

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01096

· 论 著 ·

# 磁刺激对小鼠原代海马神经元突触素、生长相关蛋白及脑源性神经营养因子表达的影响

马 隽<sup>1,2,3△</sup>, 张展翅<sup>1,2△</sup>, 崔慧先<sup>1,2\*</sup>, 王铭维<sup>2\*</sup>, 王彦永<sup>2</sup>, 马芹颖<sup>2</sup>

1. 河北医科大学基础医学院, 石家庄 050017

2. 河北省脑老化与认知神经科学实验室, 石家庄 050017

3. 河北体育学院, 石家庄 050001

**[摘要]** **目的** 观察磁刺激对原代海马神经元形态及突触素(SYN)、生长相关蛋白 43(GAP43)、脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响, 探讨磁刺激对突触可塑性的影响及可能机制。**方法** 原代海马神经元随机分为对照组、假刺激组及40%(1 Hz, 0.76 T)、60%(1 Hz, 1.14 T)、80%(1 Hz, 1.52 T)最大磁刺激输出强度组, 各刺激组自细胞接种后第2~6天接受磁刺激, 连续5 d; 假刺激组置于相同磁场装置环境, 但不接受磁刺激。各组细胞于第7天相同时间取材。采用扫描电镜、细胞免疫荧光法、蛋白质印迹及 RT-PCR 等方法观察神经元形态变化及 SYN、GAP43 与 BDNF 蛋白、mRNA 的表达。**结果** 40%强度组神经元突起长度增长、胞间神经联系增多, SYN 免疫反应性、BDNF 免疫反应性及蛋白表达均高于对照组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), GAP43 免疫反应性及蛋白水平未见明显升高, SYN、GAP43 与 BDNF mRNA 表达量高于对照组( $P < 0.05$ ); 60%强度组突起长度与数量增加( $P < 0.01$ )、交织成密集网络, SYN、GAP43 与 BDNF 免疫反应性、蛋白及 mRNA 表达量均高于对照组( $P < 0.01$ ); 80%强度组突起数目、长度增加, 同时有细胞损伤现象, GAP43 免疫反应性、BDNF 免疫反应性及蛋白水平高于对照组( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), SYN 免疫反应性及蛋白表达与对照组相比差异无统计学意义, SYN、GAP43 及 BDNF mRNA 表达增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 磁刺激通过促进原代海马神经元 BDNF 的合成或分泌, 上调 SYN、GAP43 的表达, 影响神经元形态, 可能在调控突触可塑性、促进神经网络构建方面发挥重要作用; 不同磁刺激参数刺激效果不同。

**[关键词]** 磁刺激; 突触; 神经网络; 原代海马神经元**[中图分类号]** R 338.13**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2011)10-1096-07

## Effects of magnetic stimulation on expression of SYN, GAP43, and BDNF in primary mouse hippocampal neurons

MA Jun<sup>1,2,3△</sup>, ZHANG Zhan-chi<sup>1,2△</sup>, CUI Hui-xian<sup>1,2\*</sup>, WANG Ming-wei<sup>2\*</sup>, WANG Yan-yong<sup>2</sup>, MA Qin-ying<sup>2</sup>

1. College of Basic Medical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China

2. Brain Aging and Cognitive Neuroscience Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang 050017, Hebei, China

3. Hebei Institute of Physical Education, Shijiazhuang 050001, Hebei, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of magnetic stimulation on the expression of synaptophysin (SYN), growth associated protein43 (GAP43), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in primary mouse hippocampal neurons, so as to explore the possible mechanism of magnetic stimulation in mediating synaptic plasticity. **Methods** Primary mouse hippocampal neurons were randomly divided into control group, sham stimulation group, and magnetic stimulation groups with various output intensities: 40% (1 Hz, 0.76 T), 60% (1 Hz, 1.14 T), and 80% (1 Hz, 1.52 T). Cells were stimulated from the 2<sup>nd</sup> d to the 6<sup>th</sup> d after plantation; cells in the sham stimulation group was placed in the same environment, but did not accept magnetic stimulation, and cells were drawn at the same time on 7<sup>th</sup> d. Scanning electron microscopy, immune cell fluorescence, Western blotting analysis and RT-PCR methods were used to study the morphological changes of neurons and the expressions of SYN, GAP43, and BDNF at protein and mRNA levels. **Results** In the 40% intensity group the neurite length of neurons and neural connections between cells were both increased, and the SYN-ir, BDNF-ir COD values and protein expressions were

**[收稿日期]** 2011-07-26 **[接受日期]** 2011-09-16**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)前期研究专项(2010CB535005). Supported by Special Preliminary Project of National Key Basic Research Plan (“973” Program, 2010CB535005).**[作者简介]** 马 隽, 博士生, 讲师. E-mail: majunwaitingforyou365@yahoo.com.cn; 张展翅, 博士生, 讲师. E-mail: ZZCHI@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

\* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 0311-85917005, E-mail: cuihxf@yahoo.com.cn; Tel: 0311-86261037, E-mail: wmw@jyyy.com.cn

significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), but GAP43-ir COD value and protein level were not significantly increased; SYN, GAP43, and BDNF mRNA expressions were also markedly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). In the 60% intensity group, the length and number of neuritis (woven into dense network) were also increased significantly compared with those in the control group ( $P < 0.01$ ); COD values of immune reactivity for SYN, GAP43, and BDNF, and their expressions at protein and mRNA were all significantly higher ( $P < 0.01$ ). The neuritis in the 80% intensity group had increased length and number, but with cell damage; GAP43-ir and BDNF-ir COD values and protein levels were also significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), but SYN-ir COD value and protein expression were not significantly different from those of the control group; and SYN, GAP43, and BDNF mRNA expressions were significantly increased compared with control group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Magnetic stimulation may increase SYN, GAP43 expression by promoting BDNF synthesis and secretion, and thus plays a very important role in affecting neuronal morphology, regulation of synaptic plasticity, promoting neural network construction; magnetic stimulation at different parameters results in different stimulus results.

[Key words] magnetic stimulation; synapses; nerve net; primary hippocampal neurons

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(10): 1096-1102]

经颅磁刺激(transcranial magnetic stimulation, TMS)是通过时变磁场作用于不同脑区产生可传导性的感应电流,可以抑制或易化刺激位点及与其有突触联系的神经细胞的兴奋性,从而影响脑组织深部神经细胞功能活性的一项无创、无痛、非侵入性的脑研究手段<sup>[1]</sup>。临床上已在脑卒中、帕金森病、老年痴呆等神经系统疾病方面取得了令人满意的疗效<sup>[2]</sup>。突触素(synaptophysin, SYN)与生长相关蛋白(growth-associated protein, GAP43)是磷酸化膜蛋白,主要分布于生长、分化和再生的神经终末突触前膜上,参与神经发育与再生,反映突触结构功能变化,常被作为突触前终末特异性标志物来检测突触活力<sup>[3-5]</sup>。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)是引起突触可塑性变化的活跃分子,在海马突触可塑性方面起着重要作用<sup>[6]</sup>。

近年来关于 TMS 的研究大多集中于其对病理状态下突触重塑与再生的影响,而关于其对正常脑发育、神经网络构建等的影响研究较少。本研究以正常小鼠原代海马神经元为研究对象,通过施加不同强度低频磁刺激,观察磁场对正常生活神经元形态及 SYN、GAP43、BDNF 表达的影响并分析其作用机制,为进一步探讨磁刺激对改善认知功能、干预脑老化进程提供理论基础及前期资料,以期深入揭示磁刺激对神经可塑性的影响及可能机制。

## 1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 出生 24 h 内的新生昆明小鼠由河北省实验动物中心提供。Magstim22 磁刺激治疗仪(丹麦);兔抗 SYN 单克隆抗体、兔抗 GAP43 单克隆抗体、兔抗 BDNF 单克隆抗体、小鼠抗 MAP2

单克隆抗体(Epitomics, 美国);山羊抗兔 TRITC、山羊抗小鼠 FITC(KPL, 美国);兔抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体(Sigma, 美国);RT 反应体系试剂、PCR 反应体系试剂(Promega, 美国);DMEM 培养液、胎牛血清、Neurobasal Media、B27(Gibco, 美国)等。

1.2 原代海马神经元的培养 将新生昆明小鼠无菌条件下迅速断头取脑、游离双侧海马,置于 1 ml D-Hanks 液中,用虹膜剪将组织剪成约 1 mm<sup>3</sup>大小的组织小块,再加入 1 ml 0.25% 胰蛋白酶,37℃ 消化 15 min,将组织块和消化液一起移入离心管,加入完全培养液(DMEM+10% FBS、1% 青链霉素)2 ml 终止消化,吹打组织约 20 次,离心 5 min,弃上清,在沉淀中加入完全培养液 2 ml,吹打约 20 次,吸取细胞悬液,调整细胞密度为  $(5 \sim 10) \times 10^5$ /ml,接种于经 0.1% 多聚赖氨酸包被的培养皿中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。接种约 24 h 后,去除完全培养液,改为 Neurobasal+2% B27 无血清培养液,每 3 d 全量换液 1 次,细胞培养周期为 7 d。

1.3 神经元纯度鉴定 参照张小娟等<sup>[7]</sup>神经元纯度鉴定方法,用 4% (质量分数)多聚甲醛室温固定细胞 30 min,吸去多聚甲醛,PBS 洗 5 min  $\times$  3 次,用 0.3% Triton X-100+5% 山羊血清(体积分数)的 PBS 于室温对细胞进行透化、封闭处理 30 min,吸去 PBS,漂洗细胞 5 min  $\times$  3 次,然后加入兔抗小鼠 MAP2 单克隆抗体 4℃ 孵育过夜,PBS 清洗 5 min  $\times$  3 次后加入山羊抗兔 FITC(1:100)二抗,室温孵 1 h (避光),然后 Houchest33258 室温复染细胞核 5 min (避光),PBS 漂洗后用 70% 甘油封片,荧光显微镜下观察 MAP2 表达阳性细胞,随机取 10 个视野,摄像后利用 Image Pro-Plus 5.0 软件计算每个视野中

MAP2 表达阳性细胞数占该视野总细胞数的比例,即为神经元纯度。

1.4 原代海马神经元分组及磁刺激参数设定 将原代海马神经元按接种先后顺序,用随机数字法分为对照组、假刺激组及 40%、60%、80%最大强度刺激组,每组 10 只培养皿。接种当日为第 1 天,对照组于细胞培养箱中正常孵育 7 d;各刺激组于第 2~6 天按照设定参数分别接受磁刺激,连续 5 d;假刺激组置于相同磁场装置环境,但不接受磁刺激。各组细胞于第 7 天相同时间取材。

应用磁刺激治疗仪 MS22 圆形线圈,线圈内径 10 mm,外径 60 mm,最大输出场强 1.9 T。设计刺激参数为:刺激频率 1 Hz;刺激强度 40%(0.76 T)、60%(1.14 T)、80%(1.52 T)最大输出强度;3 组/日,5 序列/组,20 次/序列,每个序列间隔 10 s,每组间隔 60 s,连续刺激 5 d,每日 14:00~15:00 实施刺激;磁头距细胞约 1.0 cm。

1.5 原代海马神经元扫描电镜标本制备 双蒸水清洗神经元 5 min×3 次,1%(体积分数)戊二醛室温固定 5 min,再用双蒸水清洗 5 min×3 次,70%、80%、90%、100%乙醇各 5 min 进行梯度脱水,再经过 70%、80%、90%、100%叔丁醇各 5 min,真空临界点干燥,镀金 15 min,日立 S3500 扫描电镜观察并拍照。

1.6 细胞免疫荧光标记 对各组细胞进行清洗、固定、透化、封闭处理(见 1.3 项下),分别加入兔抗 SYN(1:200)、兔抗 GAP43(1:200)、兔抗 BDNF(1:200)一抗 4℃孵育过夜,PBS 洗 5 min×3 次,加入山羊抗兔 TRITC(1:100)二抗室温孵育 2 h(避光),清洗、封片,即可于 400 倍倒置荧光显微镜下观察、拍照。每个视野随机选取 20 个神经元,参照文献<sup>[8-9]</sup>,应用 Photoshop7.0 软件,先用魔棒工具选定免疫阳性区及背景区,再用直方图工具测定阳性区、背景区亮度值,以二者比值代表免疫阳性产物矫正光密度(corrected optical density, COD),并求取平均值。各组实验独立重复 3 次。以 PBS 代替一抗和二抗作为阴性对照,结果显示目标区域无标记细胞。

1.7 蛋白质印迹分析 提取各组细胞蛋白,加入 RIPA+1% PMSF 裂解液,超声细胞破碎仪裂解 20 s,冰上静止 30 min,4℃离心 20 min,上清为细胞总蛋白提取液。用 BCA 法测定蛋白浓度,取各组等量蛋白提取液(50 μg/25 μl)经 10% SDS-PAGE 分

离后转膜至 PVDF 膜,5%牛奶室温封闭 2 h,兔抗 SYN(1:5 000)、兔抗 GAP43(1:5 000)、兔抗 BDNF(1:5 000)、鼠抗 β-actin(1:1 000)一抗 4℃孵育过夜,再分别用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠 IgG(均 1:1 000)二抗室温孵育 2 h,充分洗涤,ECL 法发光显色,FUJIFILM LAS-4000 凝胶成像系统采集分析,用目的蛋白条带的光密度值与内参 β-actin 条带的光密度值作为目的蛋白的相对表达量。各组实验独立重复 3 次。

1.8 RT-PCR 方法检测 SYN、GAP43、BDNF mRNA 收集原代海马神经元,TRIzol 法提取总 RNA,测定其浓度及纯度,-80℃冻存储存备用。每个样品取 2 μg RNA 反转录合成 cDNA,再各取 1 μl cDNA 进行 PCR 扩增。引物由上海生工合成,序列如下:SYN(711 bp)上游引物 5'-TTC TTC GGA ATG GAG TCA AA-3',下游引物 5'-TGC TTG TCT TCA TCC TGG TG-3';GAP43(206 bp)上游引物 5'-CGA GAA AGA TCC CAA GTC CA-3',下游引物 5'-GAA CGG AAC ATT GCA CAC AC-3';BDNF(445 bp)上游引物 5'-TCG CTT CAT CTT AGG AGT-3',下游引物 5'-TCA ACA TAA ACC ACC AAC-3';β-actin(302 bp)上游引物 5'-TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG-3',下游引物 5'-TCC TCC CTG GAG AAG AGC TA-3'。PCR 反应条件:94℃ 2 min;94℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 5 min。各 RT-PCR 产物行 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳。富康 LAS4000 凝胶成像系统采集、分析,计算目的 mRNA 与 β-actin 的比值作为 SYN、GAP43、BDNF mRNA 的相对表达量。各组实验独立重复 3 次。

1.9 统计学处理 倒置荧光显微镜 200 倍镜下以“之”字形由上而下随机选择 20 个不同的视野拍照,每个视野以中心向外圆形辐射区域内随机统计 20 个神经元,使每次实验最终计得到的细胞总数不少于 400 个,各组独立重复 3 次。应用 Image Pro-Plus 5.0 软件计数 MAP-2 阳性细胞的突起个数及测量突起长度,为保证采集图像的质量,每次实验均根据阴性对照结果调节曝光时间。原代海马神经元突起个数、长度,SYN、GAP43、BDNF 免疫阳性产物、蛋白与 mRNA 的表达应用 Statistical Analysis System V8 软件进行相关数据分析,统计结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,多样本均数的比较采用单因素方差分析,组间两两比较应用 SNK 法完成。

## 2 结 果

2.1 原代海马神经元纯度鉴定及形态观察 在倒置相差显微镜下,刚接种的海马神经细胞呈圆形、透亮、分布均匀;4~6 h 后部分细胞贴壁;10~12 h 后细胞贴壁完全,胞体发亮,呈圆形或椭圆形,伸出短小突起,形似蜘蛛;培养 2~3 d 后,胞体变大,突起增粗伸长,部分相互连接形成稀疏网络;培养 5~7 d 后,神经元胞体丰润且具特异光晕,突起进一步增多伸长且分支增多,构建明显网络。在扫描电镜下观察可见,成熟的海马神经元形态多样,立体感强,呈现锥体形、三角形、梭形、多边形等。体外培养 7 d 的海马神经元,免疫荧光染色结果显示 MAP2 阳性细胞纯度大于 90%。

2.2 磁刺激对原代海马神经元形态的影响 结合扫描电镜结果和 MAP2 免疫荧光标记进行测量计数,将各组神经元按照突起个数( $n$ )为标准分类: $n \leq$

2 个、 $2 < n < 5$  个、 $n \geq 5$  个,并测量每个神经元各突起长度,分别进行比较。表 1 结果表明,对照组与假刺激组神经元突起长度和数量差异无统计学意义;40%强度组突起长度大于对照组( $P < 0.05$ ),但突起数目与对照组差异无统计学意义;60%强度组突起长度与多于 2 个突起的神经元数量均高于对照组( $P < 0.05$ );80%强度组突起长度大于对照组( $P < 0.05$ ),有 3~4 个突起的神经元数量也多于对照组( $P < 0.05$ )。

由扫描电镜图 1(S1~S5)观察可见,对照组、假刺激组神经元形态相似,胞体丰满,发出清晰的轴突和树突,突起个数和长度适中,神经元间已建立纤维联系;40%强度组胞间神经联系增多、突起长度增加;60%强度组神经元伸出多个突起、纤维细长,细密交织成网络;80%强度组突起数目多、突起长度长,但有的突起可见胞膜破损、胞质外流的现象。

表 1 原代海马神经元突起数目及长度比较  
Tab 1 Length and number of neurites between cells

( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

Group	Neurons with different number of neurites			Length of neurites $l/\mu\text{m}$
	$n \leq 2$	$2 < n < 5$	$n \geq 5$	
Control	8.7±1.7	8.3±1.8	2.1±0.8	12.95±3.63
Sham stimulation	8.4±1.9	8.2±1.7	2.0±0.8	12.62±4.26
40% maximum output intensity	8.6±1.3	8.7±1.3	2.2±0.7	14.07±3.65*
60% maximum output intensity	8.6±1.8	9.9±1.3**	2.6±0.9*	15.35±6.45**
80% maximum output intensity	8.5±1.5	9.2±1.8*	2.2±0.8	14.22±5.03*

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

2.3 磁刺激对原代海马神经元 SYN、GAP43、BDNF 表达的影响

2.3.1 细胞免疫荧光染色结果 SYN 免疫荧光阳性标记为海马神经元胞膜上呈不连续断点状分布及在树突两侧表达;GAP43 蛋白阳性产物主要在神经元胞膜上呈片层分布,突起表达较少;BDNF 免疫阳性标记主要在神经元胞质及突起上。由图 1 可见,对照组与假刺激组神经元各阳性蛋白表达差异无统计学意义;40%磁刺激强度组 SYN 免疫反应性(SYN-ir)、BDNF-ir COD 值均高于对照组( $P < 0.05$ );GAP43-ir COD 值有增加的趋势,但差异不明显;60%强度组 SYN 标记产物分布密集、面积显著增加,SYN-ir、GAP43-ir 与 BDNF-ir COD 值均高于对照组( $P < 0.01$ );80%强度组 SYN-ir COD 值低于 60%强度组( $P < 0.05$ ),且与其他各组差异无统

计学意义,GAP43-ir COD 值高于对照组( $P < 0.05$ ),且与 60%强度组差异无统计学意义,BDNF-ir COD 值高于对照组( $P < 0.05$ ),且与 40%强度组差异无统计学意义。

2.3.2 蛋白质印迹结果 由图 2 可见,对照组与假刺激组各蛋白表达情况无统计学差异;40%强度组 SYN、BDNF 的表达量高于对照组( $P < 0.05$ ),而 GAP43 蛋白水平未呈现明显升高;60%强度组 SYN、GAP43、BDNF 蛋白表达量均明显增加,高于对照组( $P < 0.01$ );80%强度组 SYN、GAP43、BDNF 蛋白均有多于对照组的趋势,但仅 GAP43、BDNF 的表达量升高具统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.3.3 RT-PCR 检测结果 由图 3 可见,对照组与假刺激组 SYN、GAP43、BDNF mRNA 表达无统计学差异;40%强度组 SYN、GAP43 mRNA 表达量高

于对照组( $P < 0.05$ ),BDNF mRNA 与对照组相比也明显增加( $P < 0.01$ );60%强度组 SYN、GAP43、BDNF mRNA 表达量均高于对照组( $P < 0.01$ );80%强度组 SYN mRNA 表达量高于对照组( $P < 0.05$ ),GAP43、BDNF mRNA 表达增加,与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ).

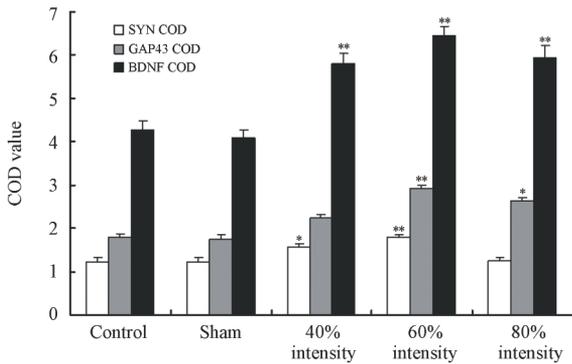
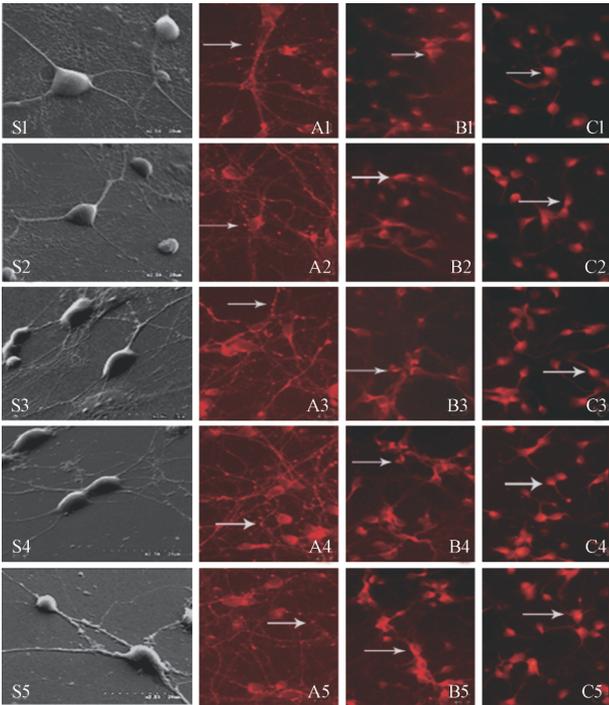


图 1 原代海马神经元形态变化及 SYN、GAP43、BDNF 免疫反应阳性细胞的表达  
Fig 1 Morphological changes of primary hippocampal neurons and SYN, GAP43, and BDNF immunoreactive cells

S1-S5: Scanning electron microscopy results of primary hippocampal neurons in control, sham, 40% intensity, 60% intensity, and 80% intensity groups, respectively; A1-A5: SYN-ir cells in control, sham, 40% intensity, 60% intensity, and 80% intensity groups, respectively (arrow); B1-B5: GAP43-ir cells in control, sham, 40% intensity, 60% intensity, and 80% intensity group, respectively (arrow); C1-C5: BDNF-ir cells in control, sham, 40% intensity, 60% intensity, and 80% intensity groups, respectively (arrow). Original magnification:  $\times 400$  (A1-C5);  $\times 2\ 500$  (S1-S5). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$

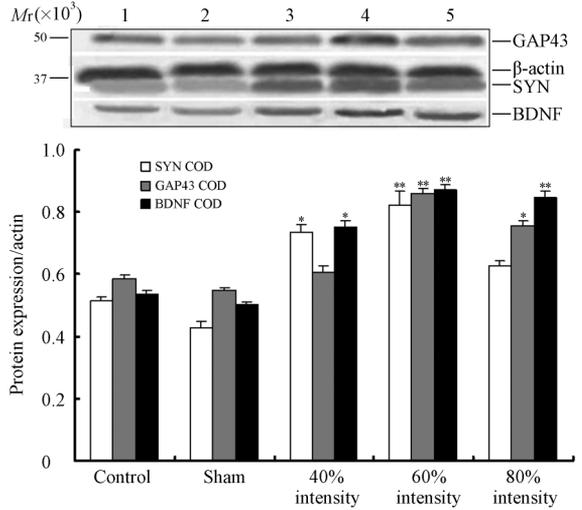


图 2 原代海马神经元 SYN、GAP43、BDNF 蛋白的表达  
Fig 2 Analysis of SYN, GAP43, BDNF protein expression in primary hippocampal neurons

1: Control group; 2: Sham group; 3: 40% intensity group; 4: 60% intensity group; 5: 80% intensity group. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$

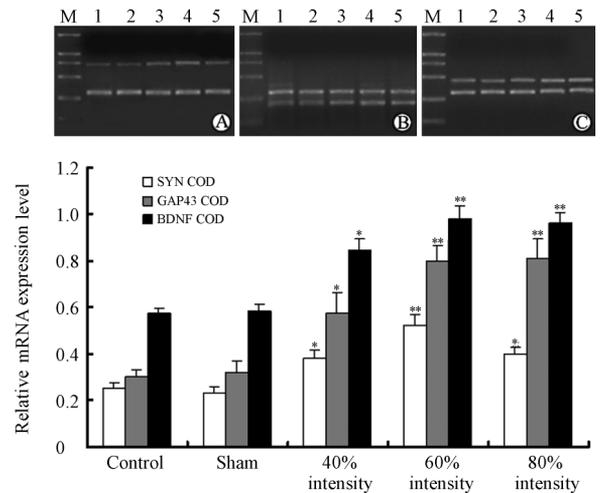


图 3 原代海马神经元 SYN、GAP43、BDNF mRNA 的表达

Fig 3 Analysis in SYN, GAP43, BDNF mRNA expression in primary hippocampal neurons

M: Marker; 1: Control group; 2: Sham group; 3: 40% intensity group; 4: 60% intensity group; 5: 80% intensity group. A: SYN; B: GAP43; C: BDNF. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

突触可塑性指突触连接在结构和功能上的修饰,是神经系统生长发育、损伤修复及学习记忆等活动的神经生物学基础<sup>[10]</sup>,长时程突触后电位增强(LTP)/抑制(LTD)常作为从突触传递能效可塑性角度研究学习记忆的指标。目前已基本明确,海马

与认知功能密切相关,因此海马神经元突触可塑性  
与学习记忆之间的关系,已成为目前研究的热点。

经颅磁刺激(TMS)近年来发展成为神经科学  
基础研究和临床治疗的有效手段,主要应用于卒中、  
抑郁症、癫痫、阿尔茨海默病、帕金森病等疾病的恢  
复治疗<sup>[1]</sup>。磁刺激的基本原理是磁场作用于神经元  
诱发大量神经终末产生电位变化,触发动作电位并  
释放神经递质进入神经元突触后膜,引起皮质突触  
LTP改变及影响LTP、LTD的突触传递作用,通过  
对突触结构功能的影响,TMS可能引起一系列其他  
神经生理进程,如参与基因和蛋白表达的调控;激发  
神经环路产生神经网络震荡等<sup>[11]</sup>。Müller等<sup>[12]</sup>  
观察到TMS引起大鼠海马CA3等脑区BDNF mRNA  
与蛋白显著增加;Wang等<sup>[13]</sup>给予血管性痴呆  
大鼠TMS(0.5 Hz、5 Hz)6周后,海马CA1区BD-  
NF、NMDAR1、SYN的mRNA与蛋白表达显著增  
加;梅元武等<sup>[14]</sup>发现TMS可促进脑卒中后梗死周  
边区GAP-43和SYN的表达上调;Osera等<sup>[15]</sup>报道  
75 Hz、2 mT磁刺激对SH-SY5Y细胞具有神经保  
护作用;Ding等<sup>[16]</sup>发现60 Hz、5 mT磁刺激作用  
10~12 h后先后可诱导人MO54细胞GAP43 mRNA  
及蛋白表达增加。上述结果提示磁刺激不仅影响  
在体动物的神经可塑性,而且对体外培养的细胞  
同样具有干预作用;磁刺激参数存在个体差异,而且  
刺激频率等参数之间存在相互作用,均会影响神经  
兴奋性和刺激效果。同时,近年来相关研究多集中  
于对病理状态的治疗,而对改善正常脑老化出现的  
学习认知障碍等症状、探究磁刺激对正常脑及神经  
系统生长发育的作用与机制的报道相对较少。因此,  
本实验着重探讨不同强度磁刺激对正常小鼠原代  
海马神经元突触可塑性的影响并分析其机制,为  
深入研究TMS与改善正常脑学习记忆能力的相关  
性提供实验数据。

本研究表明,各强度磁刺激均显著升高  
BDNF蛋白与mRNA表达,其作用机制可能为磁刺  
激触发的电兴奋传递到海马神经元后,电活动可能  
直接引起海马神经元胞体BDNF合成、释放,然后  
顺行运送至神经末梢;也可能电兴奋作用于神经末  
梢,使突触前膜发生去极化,引起神经性电活动及突  
触活动,诱导树突部位BDNF转录表达,并以逆转  
运的方式作用于突触前神经元,最终诱导BDNF在  
神经终末聚集。本实验结果显示,40%刺激强度组  
BDNF蛋白表达低于其他刺激组,可能与低强度磁  
场诱发较弱电兴奋,神经递质释放相应较少有关。  
BDNF作为神经营养因子家族的重要成员,能够促  
进神经元的存活、分化、树突和轴突的生长,尤其在

调节突触的可塑性中起关键作用<sup>[17]</sup>,尤其对于大  
脑皮质和海马神经元的发育与突触形成具有重要  
作用,抑制小鼠BDNF或TrkB基因表达导致其大  
脑皮质和海马神经元树突的发育与功能性突触的产  
生明显障碍<sup>[18-19]</sup>。

本研究结果提示,40%强度GAP43基因转录水  
平升高却未见蛋白增加。BDNF作用于高亲和性受  
体TrkB,可明显促进海马神经元内SYN磷酸  
化<sup>[20]</sup>、SYN表达上调<sup>[21]</sup>。因此,40%强度刺激通  
过上调BDNF水平,促进SYN的合成与释放,增加  
突触小泡、突触囊泡的数量,刺激突触发育,提示  
SYN可能是调节突触可塑性的先决条件,BDNF对  
原代海马神经元内SYN表达上调的促进作用可能  
有助于这些神经元突触的形成与成熟。本研究施  
加60%强度大幅提高SYN、GAP43 mRNA及蛋白  
表达。Ferreira等<sup>[22]</sup>与Chin等<sup>[23]</sup>早已证实突触  
素在促进突触形成中的关键作用;Mason等<sup>[24]</sup>  
发现GAP43在神经元生长锥形成过程中高表达,  
对轴突生长、调控形成新的突触连接有积极作用。  
60%强度诱发神经元产生电兴奋,刺激突触递质  
传递及前膜突触小泡的释放,从而加强突触活动,  
使之处于代谢旺盛、生长活跃状态,此强度可能  
是促进原代海马神经元构建神经网络的最适刺激  
条件,能有效调控突触可塑性机制。80%强度刺  
激则可能相对强度高,甚至对神经元造成损伤,  
SYN出现高转录而低蛋白的现象。研究证实,  
BDNF-TrkB结合能产生神经保护效应,刺激轴突  
芽生和新突触形成<sup>[25-26]</sup>;GAP43伴随着突触  
连接重建出现,只要有突触连接重建进行,GAP43  
蛋白表达便会增加<sup>[4]</sup>,本研究即呈现GAP43、  
BDNF mRNA与蛋白合成显著增强。分析其机制  
可能是受损神经元上调BDNF表达来刺激GAP43  
合成,聚集于轴突前终末,与膜骨架蛋白结合,  
影响轴突终末的生长状态,使生长锥更具活力,  
并抵御其回缩;也可能诱导了未受伤神经元轴突  
中的GAP43水平急剧升高,通过G蛋白、Ca<sup>2+</sup>、  
CaM等信息分子的相互作用,促进轴突侧支出芽  
并与靶区神经元重建轴突联系,体现了神经系统  
重塑代偿机制的作用。目前已经基本证实,BDNF  
与受体TrkB特异性结合,信号级联活化磷脂酶  
C(PLC-γ),衔接Shc、rAPS、SH2-B、磷脂酰肌  
醇-3激酶(PI3K)等蛋白,进而激活Ras/促分裂  
原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导途径和胞外  
信号调节激酶(ERK)的磷酸化<sup>[27-28]</sup>,触发基  
因转录,启动突触相关蛋白合成,从而实现修饰  
突触传递效能的重要作用。因此,本研究中磁刺  
激引起BDNF表达增加后,由于不同刺激强度对  
BDNF-TrkB信号转导通路及相

关通路蛋白的影响不同,导致 SYN、GAP43 等下游效应分子表达及神经元形态等作用效果的差异,与病理状态的研究结果<sup>[12-16]</sup>类似,证实磁刺激对神经生长发育与损伤修复的积极意义。

综上所述,磁刺激通过促进正常小鼠原代海马神经元内源性 BDNF 局部蛋白的合成或分泌,上调 SYN、GAP43 的表达,影响神经元突起数目、长度等形态变化,可能在调控突触可塑性、促进神经网络构建和突触损伤修复等方面发挥重要作用;不同磁刺激参数刺激效果不同。关于磁刺激对 BDNF-TrkB 信号转导通路的干预、调节作用及机制有待进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Miniussi C, Rossini P M. Transcranial magnetic stimulation in cognitive rehabilitation[J]. *Neuropsychol Rehabil*, 2011, 30: 1-23.
- [2] Hamilton R H, Chrysikou E G, Coslett B. Mechanisms of aphasia recovery after stroke and the role of noninvasive brain stimulation[J]. *Brain Lang*, 2011, 118(1-2): 40-50.
- [3] Bartolome M V, Zuluaga P, Carricondo F, Gil-Loyzaga P. Immunocytochemical detection of synaptophysin in C57BL/6 mice cochlea during aging process[J]. *Brain Res Rev*, 2009, 60: 341-348.
- [4] Donovan S L, Mamounas L A, Andrews A M, Blue M E, McCasland J S. GAP-43 is critical for normal development of the serotonergic innervation in forebrain[J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 3543-3452.
- [5] Casoli T, Stefano G D, Fattoretti P, Solazzi M, Delfino A, Biagini G, et al. GAP-43 mRNA detection by *in situ* hybridization, direct and indirect *in situ* RT-PCR in hippocampal and cerebellar tissue sections of adult rat brain[J]. *Micron*, 2003, 34: 415-422.
- [6] 王知非, 廖达光, 李昌琪. 大鼠坐骨神经损伤后脑源性神经营养因子对脊髓前角内生长相关蛋白 GAP-43 表达的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30: 569-571.
- [7] 张小娟, 李廷玉, 刘友学, 陈洁, 瞿平, 魏小平, 等. 简易大鼠海马神经元原代培养方法及神经元兴奋性检测[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30: 2080-2083.
- [8] Hussar P, Tokin I, Hussar U, Filimonova G, Suuroja T. Application of Photoshop-based image analysis and TUNEL for the distribution and quantification of dexamethasone-induced apoptotic cells in rat thymus[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2006, 42: 504-512.
- [9] Lehr H A, Mankoff D A, Corwin D, Santeusano G, Gown A M. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer[J]. *J Histochem Cytochem*, 1997, 45: 1559-1565.
- [10] Hasan A, Nitsche M A, Rein B, Schneider-Axmann T, Guse B, Gruber O, et al. Dysfunctional long-term potentiation-like plasticity in schizophrenia revealed by transcranial direct current stimulation[J]. *Behav Brain Res*, 2011, 224: 15-22.
- [11] Bashir S, Mizrahi I, Weaver K, Fregni F, Pascual-Leone A. Assessment and modulation of neural plasticity in rehabilitation with transcranial magnetic stimulation[J]. *PMR*, 2010, 2(12 Suppl 2): S253-S268.
- [12] Müller M B, Toschi N, Kresse A E, Post A, Keck M E. Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2000, 23: 205-215.
- [13] Wang F, Geng X, Tao H Y, Cheng Y. The restoration after repetitive transcranial magnetic stimulation treatment on cognitive ability of vascular dementia rats and its impacts on synaptic plasticity in hippocampal CA1 area[J]. *J Mol Neurosci*, 2010, 41: 145-155.
- [14] 梅元武, 刘传玉, 张小乔. 经颅磁刺激治疗对脑梗死大鼠健侧感觉运动皮质锥体细胞树突和突触结构的影响[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86: 2639-2642.
- [15] Osera C, Fassina L, Amadio M, Venturini L, Buoso E, Magenes G, et al. Cytoprotective response induced by electromagnetic stimulation on SH-SY5Y human neuroblastoma cell line[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(19-20): 2573-2582.
- [16] Ding G R, Nakahara T, Miyakoshi J. Exposure to power frequency magnetic fields and X-rays induces GAP-43 gene expression in human glioma MO54 cells[J]. *Bioelectromagnetics*, 2002, 23: 586-591.
- [17] Willson M L, McElnea C, Mariani J, Lohof A M, Sherrard R M. BDNF increases homotypic olivocerebellar reinnervation and associated fine motor and cognitive skill[J]. *Brain*, 2008, 131(Pt 4): 1099-1112.
- [18] Kohara K, Kitamura A, Adachi N, Nishida M, Itami C, Nakamura S, et al. Inhibitory but not excitatory cortical neurons require presynaptic brain-derived neurotrophic factor for dendritic development, as revealed by chimera cell culture[J]. *J Neurosci*, 2003, 23: 6123-6131.
- [19] Gorsiki J A, Zeiler S R, Tamowski S, Jones K R. Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites[J]. *J Neurosci*, 2003, 23: 6856-6865.
- [20] Jovanovic J N, Czernik A J, Fienberg A A, Greengard P, Sihra T S. Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release[J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3: 323-329.
- [21] Tartaglia N, Du J, Tyler W J, Neale E, Pozzo-Miller L, et al. Protein synthesis-dependent and independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 37585-37593.
- [22] Ferreira A, Han H Q, Greengard P, Kosik K S. Suppression of synapsin II inhibits the formation and maintenance of synapses in hippocampal culture[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 9225-9229.
- [23] Chin L S, Li L, Ferreira A, Kosik K S, Greengard P. Impairment of axon development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 9230-9234.
- [24] Mason M R, Lieberman A R, Anderson P N. Corticospinal neurons up-regulate a range of growth-associated genes following intracortical, but not spinal, axotomy[J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 18: 789-802.
- [25] Hartmann G, Tschöp M, Fischer R, Bidlingmaier C, Riepl R, Tschöp K, et al. High altitude increases circulating interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and reactive protein[J]. *Cytokine*, 2000, 12: 246-252.
- [26] Schulz R, Seeger W, Fegbeutel C, Hüsken H, Bödeker R H, Tillmanns H, et al. Changes in extracranial arteries in obstructive sleep apnoea[J]. *Eur Respir J*, 2005, 25: 69-74.
- [27] Obermeier A, Bradshaw R A, Seedorf K, Choidas A, Schlessinger J, Ullrich A. Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC- $\gamma$ [J]. *EMBO J*, 1994, 13: 1585-1590.
- [28] Sweatt J D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory[J]. *J Neurochem*, 2001, 76: 1-10.