

神经生长因子介导的促神经生长化合物 筛选系统的建立*

裴武红¹⁾ 舒翠玲¹⁾ 陈 兴¹⁾ 夏国伟²⁾ 李 松^{3)**} 沈倍奋¹⁾

(¹⁾北京基础医学研究所, 北京 100850, ²⁾北京放射医学研究所, 北京 100850, ³⁾北京毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 为了合理评价化合物的促神经再生活性, 用溴化四唑蓝 (MTT)、分化计数、图象处理等方法, 借助 FK506、GPI1046 阳性化合物, 建立了一个基于 PC12 细胞存活和分化的化合物筛选系统。结果表明, 无论在细胞存活实验还是在分化实验中, FK506、GPI1046 都可以明显增强神经生长因子 (NGF) 的效应, 即有促神经再生的作用。也就是说, 这一系统将有助于从组合化学方法合成的化合物文库中, 筛选出具有促神经再生活性的化合物。

关键词 化合物筛选, 神经再生, 神经生长因子, 图象分析

学科分类号 R392.11

促神经再生化合物的研制是近两年国际上研究的一大热点^[1]。这是因为, 一方面, 目前临床上尚无有效的神经损伤和神经退行性疾病的治疗药物; 另一方面, 这类化合物具有比各种神经营养因子更多的优点, 如能通过血脑屏障、易于吸收、无神经过度生长效应、稳定性好等^[2~4]。那么, 如何来评价化合物的促神经再生活性, 如何从一个大规模的组合文库中上百个化合物中, 快速而准确地筛选出其中具有促神经再生作用的少数几种来, 目前仍无很系统地报道。本文中, 我们以 PC12 为效应细胞, 以 FK506、GPI1046 为阳性化合物, 建立了一个基于 PC12 细胞存活和分化的化合物筛选系统, 对这类化合物的筛选进行了有益的尝试。

1 材料与方法

1.1 材料

PC12 细胞由本所刘少君教授提供; 2.5 S 神经生长因子 (2.5 S NGF) 由本所马子敏博士提供; FK506 购自 Sigma 公司; GPI1046 由北京毒物药物研究所肖军海博士合成; RPMI1640、胎牛血清、马血清购自 HyClone 公司; 多聚赖氨酸为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 MTT 方法: PC12 细胞用 RPMI1640 洗涤两次, 再用含 10 $\mu\text{g/L}$ NGF 的 RPMI1640 调整细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$, 种于 96 孔板, 每孔 100 μL 。再加入相应的各种化合物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱培养 48 h 后, 加入 MTT 测定细胞的存活情况。

1.2.2 乙醇诱导分化方法: 在预先用多聚赖氨酸包被的 24 孔板中, 每孔加入 100 μL 1 mol/L 乙醇, 再加入用 5% 胎牛血清、10% 马血清 RPMI1640 调整细胞浓度为 $2 \times 10^3/\text{ml}$ 的 PC12 细胞 800 μL , 及按一定比例稀释的 NGF、FK506 或 GPI1046 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱培养 72~120 h 后, 显微观察细胞的分化情况, 计数 300~400 个细胞, 计算出具有轴突的细胞的百分数 (% cells with axons), 以及轴突数量对细胞总数的百分数 (% axons / total cells)。

1.2.3 图象分析方法: 采用 Polaroid Digital Microscope Camera (10 $\times$ 20) 获取图象, 然后采用 Lei Quantimet 970 图象分析系统分割轴突, 测量轴突面积; 并进行细胞计数。以轴突面积/细胞数作为衡量分化的指标。

2 结果与讨论

2.1 可用于大规模筛选的细胞存活方法

PC12 细胞是大鼠嗜铬瘤细胞, 是一种肾上腺来源的神经元细胞系。其表面具有 NGF 高亲和力受体 TykA 和低亲和力受体 P75, P75 可以诱导 PC12 细胞在无血清培养时发生细胞凋亡^[5]。NGF 结合 P75 抑制细胞凋亡, 从而维持 PC12 细胞在无血清培养基中的存活, 这一结果可以用 MTT 方法

* 国家“973”计划资助项目 (G1998051107)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66931250, E-mail: Qn_Sli@yahoo.com

收稿日期: 2000-07-24, 接受日期: 2000-08-23

得到反映. 我们把 NGF 与 FK506 或 GPI1046 与细胞共培养时, MTT 结果表明, 在 $10 \mu\text{g/L}$ NGF 与 10 nmol/L FK506 或 GPI1046 联合诱导时, FK506、GPI1046 都能明显提高 NGF 的效应, 提高 PC12 细胞无血清培养时的存活数目 (图 1). 而单独的 FK506 或 GPI1046 却不能促进 PC12 细胞的存活.

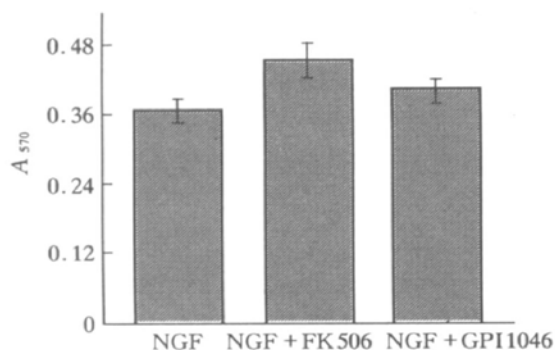


Fig. 1 Effect of NGF cooperate with FK506 or GPI1046 on the survival of PC12 cell

应用这一方法, 可以直接筛选出具有促进 NGF 效应、提高 PC12 细胞存活的活性化合物. 同时, 淘汰那些因纯度差而引起细胞毒的化合物以及不具有促神经再生活性的化合物.

2.2 评价化合物神经分化活性的乙醇分化方法

根据文献报道, 将乙醇引入神经细胞的培养体系, 可以明显提高神经细胞分化的程度^[6]. 为了验证其在利用 PC12 细胞分化筛选化合物中的可行性, 我们首先观察了不同浓度 NGF 诱导的 PC12 细胞的分化情况, 并就目前常用的两种不同的分化计数方法, 即具有轴突细胞的百分数 (% cells with axons) 以及轴突数量对细胞总数的百分数 (% axons/total cells), 对分化结果进行了定量. 结果表明: 随着 NGF 浓度的提高, PC12 细胞的分化水平也相应提高 (图 2). 另外, 我们还比较了在 $50 \mu\text{g/L}$ NGF 条件下, 乙醇分化方法与文献报道^[7,8]的低血清分化方法的分化结果. 结果表明, 乙醇分化方法测定的具有轴突细胞的百分数约为 100%, 而低血清分化方法测定的具有轴突细胞的百分数约为 80%. 说明乙醇分化方法的灵敏度要高于文献报道的低血清分化方法, 这一点与预期结果相符. 乙醇为何能提高分化水平, 原因目前还不清楚. 有人认为乙醇的存在抑制了血清中某些蛋白质因子, 也有人认为其改变了细胞膜的某些性质, 从而更利于轴突的生长.

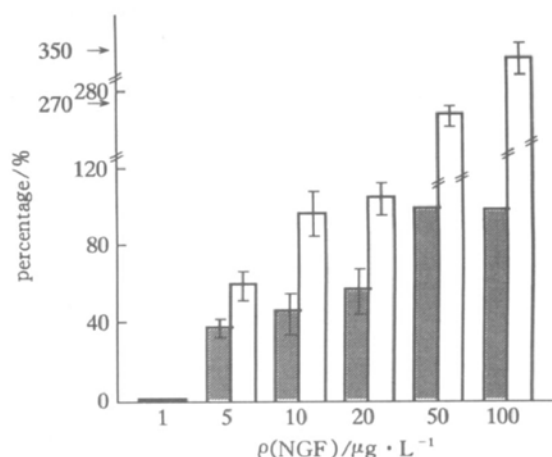


Fig. 2 Effect of NGF concentration on the differentiation of PC12 cell

■: response cell/total cells; □: axons/total cells.

我们选择 $10 \mu\text{g/L}$ NGF 与 10 nmol/L FK506 或 GPI1046 联合诱导 PC12 细胞的分化. 在分化体系中, 也加入 100 mmol/L 的乙醇, 结果表明, FK506、GPI1046 都能明显增强 NGF 所诱导的分化效应 (图 3). 而单独的 FK506 或 GPI1046 对 PC12 细胞分化则无效应.

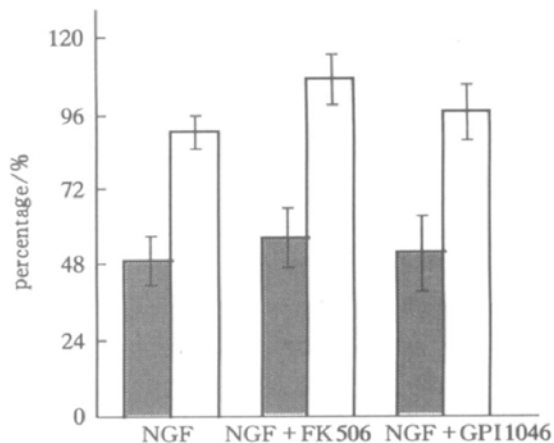


Fig. 3 Effect of NGF cooperating with FK506 or GPI1046 on the differentiation of PC12 cell

■: response cell/total cells; □: axons/total cells.

2.3 用于化合物活性定量的图象分析方法

将不同诱导条件下的分化细胞, 用 Polaroid Digital Microscope Camera 获取显微图象, 并用 Lei Quantimet 970 图象分析系统标记轴突和细胞计数后, 计算出轴突面积/细胞数值. 这一数值越高, 表明细胞分化程度越高. 在我们的实验结果中, 不加 NGF 组无任何分化的轴突, 轴突面积/细胞数的比值为 $0 \mu\text{m}^2/\text{个}$; 单独 NGF 对照组轴突面积/细

胞数的比值为 $39.4 \mu\text{m}^2/\text{个}$; NGF+ FK506 组的轴突面积/细胞数的比值为 $106.7 \mu\text{m}^2/\text{个}$; NGF+ GPII046 组轴突面积/细胞数的比值为 $98.6 \mu\text{m}^2/\text{个}$ (图 4). 从这一数据可以明显看出, FK506、GPII046 都具有明显的促神经再生效应, 而且,

FK506 的促神经再生活性高于 GPII046, 这一点与文献报道一致, 证明我们这一方法对评价组合文库中所合成的大量化合物的促神经再生活性是可行的.

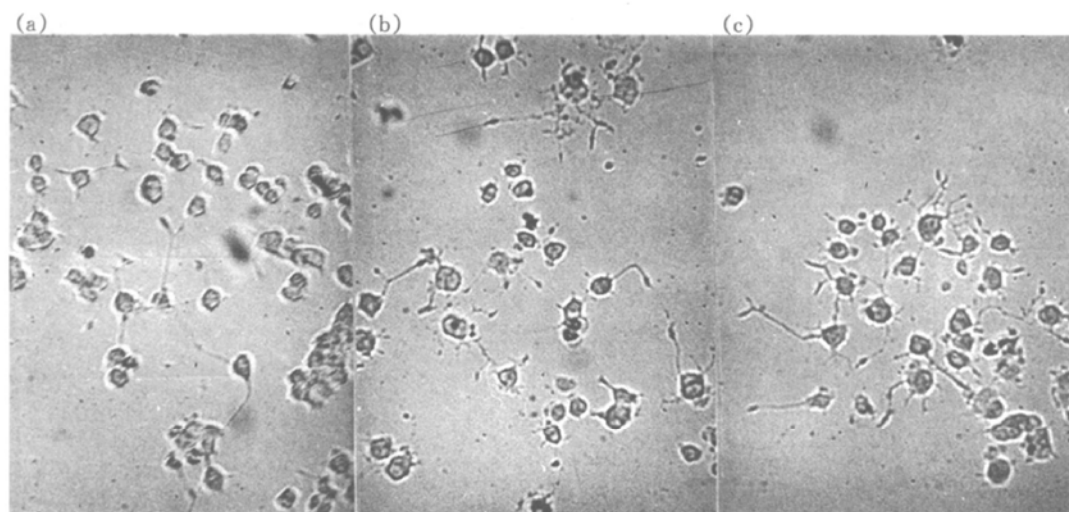


Fig. 4 Image analysis of NGF cooperating with FK506 or GPII046 on the differentiation of PC12 cell

(a) Induced by NGF alone; (b) Induced by NGF plus FK506; (c) Induced by NGF plus GPII046.

在促神经再生化合物的筛选中, 我们首先考虑到, 待筛选化合物的母体为 FK506, 其神经效应是通过 NGF 来介导的; PC12 是 NGF 的效应靶细胞, 它对 NGF 的刺激很敏感, 将 PC12 细胞作为筛选系统的靶细胞可以提高筛选的灵敏度及阳性化合物的检出效率. 我们的待筛选化合物是由组合化学法合成的化合物文库, 其数量多, 成分复杂, 纯度较差, 引入 PC12 细胞存活为基础的 MTT 方法, 用 96 孔板对化合物进行初筛, 有的放矢地解决了组合文库来源化合物存在的这些问题. 促神经再生化合物最根本的性质是其神经生物学效应. 如何反映这一活性, 是化合物活性评估的关键. 我们在分化体系中引入乙醇, 提高了分化水平, 比文献报道化合物筛选所采用的低血清分化法具有更高的灵敏度, 更有利于化合物活性的评价. 另外, 将图象分析与化合物筛选相结合, 是这一筛选系统的又一特点, 它适用于较大数量化合物样品的快速分析, 操作简单, 而且数据可靠.

目前, 我们已应用这一系统开展了组合文库来源的化合物筛选工作, 也取得了一些进展, 实践证明这一系统的可行性. 在今后的工作中, 我们也尝试着在筛选系统中用质谱方法来分析化合物与受

体蛋白的结合情况, 以便更全面、更精确地筛选出具有促神经再生活性的化合物.

参 考 文 献

- 1 Hamilton G S, Steiner. Immunophilins: beyond immunosuppression. *J Med Chem*, 1998, **41** (26): 5119~ 5143
- 2 Gold B G. FK506 and the role of the immunophilin FKBP-52 in nerve regeneration. *Drug Metabol Rev*, 1999, **31** (3): 649~ 663
- 3 Wang M S, Gold B G. FK506 increases the regeneration of spinal cord axons in a predegenerated peripheral nerve autograft. *J Spinal Cord Med*, 1999, **22** (4): 287~ 296
- 4 Lee M, Doolabh V B, Mackinnon S E, *et al.* FK506 promotes functional recovery in crushed rat sciatic nerve. *Muscle Nerve*, 2000, **23** (4): 633~ 640
- 5 Robinson C J, Stammers R. An *in vitro* bioassay for NGF based on 24-hours survival of PC12 cells. *Growth Factors*, 1994, **10** (2): 192~ 196
- 6 Messing R O, Hentleff M, Park J J. Ethanol enhances growth factor-induced neurite formation in PC12 cells. *Cancer Res*, 1991, **565** (2): 301~ 311
- 7 Lyons W E, George E B, Sawzin T M, *et al.* Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (11): 3191~ 3195
- 8 Gold B G, Densmore V, Shou W, *et al.* Immunophilin FK506-binding protein 52 (not FK506-binding protein 12) mediates the neurotrophic action of FK506. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, **289** (3): 1202~ 1210

Screening System for Nerve Growth Factor (NGF) -mediated Neurotrophic Compounds*

PEI Wu-Hong¹⁾, SHU Cu-Ling¹⁾, CHEN Xing¹⁾, XIA Guo-Wei²⁾, LI Song³⁾**, SHEN Bei-Fen¹⁾

(¹⁾ Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China; (²⁾ Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China; (³⁾ Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract To evaluate reasonably the neurotrophic action of small molecule. MTT, differentiation quantity and image analysis methods were used, with the FK506 and GPI1046 as positive control chemicals. A PC12 cell survival and differentiation based screening system were established, in which FK506 and GPI1046 sharply enhanced the neurotrophic action of NGF both in survival and differentiation model just as expected. The system will be helpful in screening neurotrophic novel compounds from chemical library produced by combinatorial chemistry.

Key words chemical screening, nerve regeneration, nerve growth factor, image analysis

* This work was supported by the "973" program of China (G1998051107).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931250, E-mail: Qn_Sli@yahoo.com

Received: July 24, 2000 Accepted: August 23, 2000

欢迎订阅 2002 年《动物学杂志》

《动物学杂志》是由中国科学院动物研究所、中国动物学会主办的科技期刊，亦是中國自然科学核心期刊，是以普及与提高相结合、基础性和应用性并重为宗旨的综合性学术刊物。力求及时报道动物科学领域具有创造性和重要意义的最新研究成果，介绍有创见的新思想、新学说、新技术、新方法，开展学术交流与争鸣。主要栏目有：研究报告、动物资源与管理、珍稀濒危动物、动物养殖、有害动物防治、研究生论文园地、技术与方法、研究简报和快讯、基础资料、自然保护区、综述与进展、学术论坛、专题知识讲座、科技动态、新书评介等。读者对象为：动物科学领域的研究、教学、技术、管理人员及广大业余爱好者。

《动物学杂志》为 16 开，双月刊，2002 年增加到 80 页，每册定价 12 元，全年 72 元。国内外公开发行，国内邮发代号：2-422；国外发行代号 (Code No.)：BM58，全国各地邮局均可订阅。如未能在当地邮局订到，亦可与编辑部直接联系订阅。

联系地址：北京中关村路 19 号 100080，《动物学杂志》编辑部

电话：010-62581475；传真：010-62569682；E-mail: journal@panda.ioz.ac.cn

欢迎订阅《动物学杂志》；欢迎您上《动物学杂志》上刊登广告。