

菟丝子提取物在 PC12 细胞株中的神经营养因子样活性

刘建辉 姜 波 包永明 安利佳*

(大连理工大学生物工程系, 大连 116024)

摘要 以常用的 PC12 细胞株为实验模型, 考察了菟丝子提取物诱导 PC12 细胞分化及对相关激酶活性的影响. 发现该提取物在诱导 PC12 细胞分化的同时, 可明显提高有丝分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 磷酸化. MAPK 激酶的特异抑制剂 PD98059, 能够有效地抑制菟丝子提取物诱导 PC12 细胞中 MAPK 的磷酸化和突起的延伸, 表明该提取物诱导 PC12 细胞分化可能与 MAPK 途径有关. 同时还发现, 该提取物能一定程度地抑制去血清引起的细胞凋亡, 表明它具有一定的神经营养因子样作用.

关键词 菟丝子提取物, 有丝分裂原激活的蛋白激酶, PD98059, PC12 细胞

学科分类号 Q26

生长因子、细胞激酶、神经递质以及激素等激活的几种信号转导途径在神经系统中具有特殊的生理意义, 至少有三个信号转导途径与有丝分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 有关, 其中一个途径是细胞被刺激后引起 MAPK 1/2 持续活化^[1]. 据报道, 维持 p42 和 p44MAPK 持续活化对诱导几种细胞的分化和增殖不仅是必需的、而且是足够的^[2].

神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 对维持交感和感觉神经系统神经元的存活和发育具有重要作用^[3,4]. NGF 通过激活酪氨酸激酶相关的受体 p140^{trk} (TrkA) 完成信号转导^[5,6], 抑制 PC12 细胞增殖、促进分化、诱导细胞长出大量突起, 已被人们作为判断细胞是否分化的标准之一^[7,8].

据记载, 菟丝子是一种上等中药, 在传统药方中主要用于壮阳、滋补肝肾^[9]. 另外, 菟丝子在抗衰老和增强记忆力等方面也有重要作用, 本文以常用的大鼠嗜铬神经瘤 PC12 细胞为模型, 探讨菟丝子提取物诱导 PC12 细胞分化及对相关激酶的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

在室温下, 用 5 L 甲醇渗漉 3 kg 菟丝子种子的干粉, 提取液经减压蒸干得棕色糖浆 217 g, 乙醚脱脂 (300 ml × 3), 剩余物 (78.9 g) 上硅胶柱, CHCl₃-MeOH-H₂O (1:1:1) 洗脱, 浓缩最下层得到 13.4 g 干粉, 用 Sephadex G50 柱层析得到浅黄色粉末状糖苷 (9.57 g), 约占总重量的 0.32%, 这一部分用来培养 PC12 细胞以考察其神

经活性.

7S NGF 购于 Sigma 公司. phospho-MAPK1/2 和 MAPK1/2 单克隆抗体购自基因公司. PD98059 (一种特异的 MAPK 激酶抑制剂) 是 Gibco 公司产品, 用二甲基亚砷溶解配成 5 mmol/L 储备液于 -70℃ 储存备用. 除非特别指明, 其他试剂都购自华美公司.

1.2 PC12 细胞培养及突起伸长分析

大鼠嗜铬神经瘤 PC12 细胞在 37℃、5% CO₂ 的孵箱中培养, 培养基是 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 补加 10% 灭活马血清和 5% 灭活胎牛血清. 为了考察 NGF、菟丝子提取物及其他物质对 PC12 细胞的影响, PC12 细胞接种到 24 孔培养板中, 细胞密度为 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$. 细胞贴壁后, 培养基换成补加 2% 灭活马血清和 1% 灭活胎牛血清的测试培养基. 在做细胞突起伸长分析时, 每个孔随机选择 3 或 4 个视野, 统计长度超过 1.5 倍细胞直径的细胞突起, 每个孔统计 100 个细胞, 每个数据点至少重复 3 次. 为了考察突起伸长与药物浓度的剂量关系以及菟丝子提取物对 NGF 诱导 PC12 细胞分化的增强作用, 在 PC12 细胞中加入 0~100 mg/L 的提取物或 (/与) 半饱和剂量的 NGF (20 μg/L) 共培养, 然后分析突起伸长情况, 并做统计分析.

1.3 检测菟丝子提取物对相关激酶的影响

采用 Sano 等^[10]介绍的方法检测 MAPK 和 phospho-MAPK 的表达, 用 10% 聚丙烯酰胺凝胶

* 通讯联系人. Tel: 0411-4706355, Fax: 0411-4706365

E-mail: liujhmail@sina.com

收稿日期: 2002-08-19, 接受日期: 2002-10-16

电泳分离细胞裂解液, 然后用 DYCP 半干式转膜仪将蛋白质条带印迹到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride membranes, PVDF) 膜上. 转膜前, 将 PVDF 膜浸在甲醇中 1 min, 然后在转膜缓冲液中浸泡 5 min; 印迹后的膜用含 5% 马血清的 TBS (20 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5, 150 mol/L NaCl) 封闭 2 h (室温), 然后用特异的 MAPK 或 phospho-MAPK 一抗 4℃ 孵育过夜. 次日, 用加 0.1% Tween 20 的 TBS 洗膜三次, 每次 5 min; 接着用辣根过氧化物酶标记的 IgG 孵育 1 h, 洗膜后用 DAB 控制显色, 对显色条带进行拍照, 并进行定量分析.

1.4 DNA 片段化分析

DNA 片段采用 Praticce 等^[11]介绍的方法, 用琼脂糖凝胶电泳进行分析. 收集细胞, 漂洗, 然后用 0.5 ml 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0, 其中包括 1 mmol/L EDTA、0.25% Nonidet P-40 和 0.1% RNase A) 在 37℃ 处理 30 min, 随后加入 10 g/L 蛋白酶 K 50 μ l, 接着孵育 30 min. 取 5 μ g DNA 在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 紫外灯下观察电泳结果并拍照.

2 结 果

2.1 菟丝子提取物对 PC12 细胞的毒性分析

收集对数生长期的 PC12 细胞, 然后以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种在 24 孔板中. 待细胞贴壁后,

Table 1 Cytotoxic effect of the extract on PC12 cells

	Treatment	Average absorbance
Extract	0 mg/L	0.678 $\pm$ 0.02
	3 mg/L	0.717 $\pm$ 0.01*
	10 mg/L	0.722 $\pm$ 0.02
	30 mg/L	0.734 $\pm$ 0.03
	50 mg/L	0.736 $\pm$ 0.04*
	100 mg/L	0.741 $\pm$ 0.02*
Control	Total cell lysate	2.740 $\pm$ 0.08
	NGF (100 μ g/L)	0.728 $\pm$ 0.02*

The cytotoxic effect of the extract was determined by measuring the LDH released from the cytosol of dead cells. PC12 cells were treated with the extract at test medium as indicated time. As control, PC12 cells were treated with NGF that was capable of differentiating PC12 cells into sympathetic neurons. Cell-free supernatant was collected and adding substrate mixture containing tetrazolium violet and sodium lactate quantitated the LDH released by dead cells. Water-soluble formazan dye was detected directly at 440 nm. Total cell lysate, indicating the maximum releasable LDH in PC12 cells, was prepared by incubating the PC12 cells with 0.3% Triton X-100 in assay medium. Experiments were performed at least three times and results indicated in the table were $\bar{x} \pm s$, $n = 6$. * $P < 0.01$. The extract alone did not give positive absorbance (data not shown).

培养基更换为测试培养基 (DMEM 补充 1% 胎牛血清和 2% 马血清). 在药物作用细胞 2~4 天后, 通过检测 PC12 细胞的代谢物乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性来考察细胞的增殖情况, 同时通过细胞毒性测试来考察该提取物对 PC12 细胞是否具有毒副作用. 实验结果证明, 在 0~100 mg/L 范围内, 该提取物对 PC12 细胞无明显细胞毒性 (表 1).

2.2 菟丝子提取物诱导 PC12 细胞突起伸长分析

如文献 [12] 报道, 在加入 NGF 48 h 后, 细胞长出大量突起, 表现出神经元形态特征, 而且 NGF 与突起的伸长呈剂量依赖关系. 在用药物处理细胞 2 天后, 与对照组相比, 细胞增殖率大大降低, 而且在 0~50 mg/L 范围内, PC12 细胞突起的伸长与加入药物浓度呈线性关系. 在本实验中,

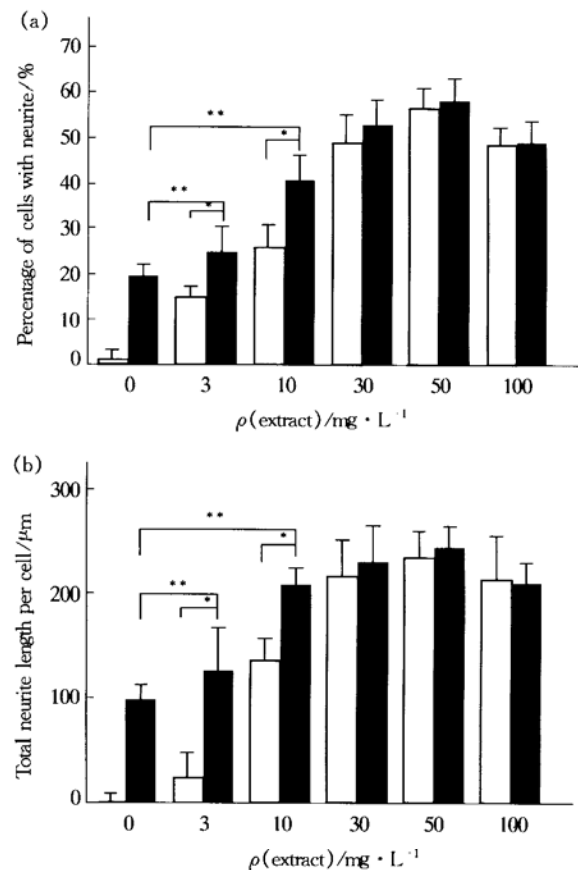


Fig. 1 Dose dependence of the extract and additive effect of NGF on PC12 neuritogenesis

PC12 cells were incubated with 20 μ g/L NGF (/ or) the extract at the indicated concentrations for 72 h. Both the percentage of neurite-bearing cells (a) and the total neurite length per cell (b) in PC12 cells give the consistent conclusion for the additive effect of *C. chinensis* extract. All data points represent ($\bar{x} \pm s$) of three separate experiments performed in triplicate. The additive effect was statistically significant (* $P < 0.01$; ** $P < 0.05$) by Student's *t* test. □: The extract alone; ■: The extract plus 20 μ g/L NGF.

NGF 诱导 PC12 细胞分化的半饱和剂量和饱和剂量分别是 20~25 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$, 这与 Lyons 等^[13]报道的结果基本一致. 实验结果如图 1 所示, 该提取物诱导 PC12 细胞分化的半饱和、饱和剂量分别为 10 和 50 mg/L .

将 20 $\mu\text{g/L}$ NGF 与各种浓度 (0~100 mg/L) 的提取物混合培养, 结果发现突起伸长的细胞比例和单个细胞突起总长度都显著增加. 这表明, 在低浓度 NGF 存在下, 该提取物对 NGF 诱导 PC12 细胞分化有明显的增强作用. 但是, 在 NGF 饱和的情况下, 此增强作用并不明显 (图 1).

2.3 菟丝子提取物诱导 PC12 细胞分化的相关激酶

实验证实, 加入 NGF 和菟丝子提取物 20 min 时, MAPK 活性达到最大. 因此, 收集药物作用达 20 min 时的细胞, 用蛋白质印迹 (Western blots) 分析 NGF 和提取物对 MAPK 表达及磷酸化的影响, 结果如图 2 所示. 同时, 我们用 MAPK 激酶特异抑制剂 PD98059 预处理 PC12 细胞, 然后用 NGF 作用 PC12 细胞. 实验发现, 当用 PD98059 预处理细胞后, NGF 诱导的 p44 和 p42MAPK 磷酸化分别下降了 52.6% 和 20%, 这与文献报道基本一致^[15]; 同时, 延伸突起的细胞比例以及每个细胞突起的总长度都显著下降 (图 3d). 当用菟丝

子提取物处理 PC12 细胞时, MAPK1/2 都被活化, 并能维持约 1 h, p44 和 p42MAPK 的磷酸化水平分别增加 1290% 和 310%. 但用 PD98059 预处理后, MAPK 的磷酸化明显被抑制 (图 2b), 分别下降了 46.5% 和 29.0%, 而且细胞突起的延伸长度明显缩短. 上述实验结论说明, 在诱导 PC12 细胞分化和 MAPK 磷酸化方面, 该提取物与 NGF 有相似的作用.

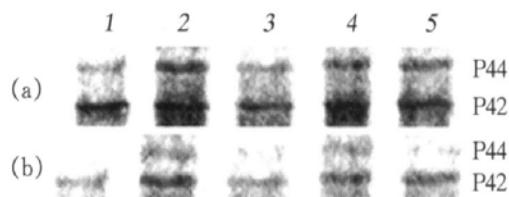


Fig. 2 Biphosphorylation of MAPK in response to the extract or NGF

MAPK were detected by Western blot analysis with anti-MAPK (a) or anti-phosphorylated MAPK antibody (b). Total cell lysate samples were subjected directly to 10% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred to PVDF membranes and immunostained with antibodies against MAPK (a) and with antibodies against phospho-MAPK (b). 1: 0 mg/L extract, 0 $\mu\text{mol/L}$ PD98059, 0 $\mu\text{g/L}$ NGF; 2: 0 mg/L extract, 0 $\mu\text{mol/L}$ PD98059, 100 $\mu\text{g/L}$ NGF; 3: 0 mg/L extract, 20 $\mu\text{mol/L}$ PD98059, 100 $\mu\text{g/L}$ NGF; 4: 50 mg/L extract, 0 $\mu\text{mol/L}$ PD98059, 0 $\mu\text{g/L}$ NGF; 5: 50 mg/L extract, 20 $\mu\text{mol/L}$ PD98059, 0 $\mu\text{g/L}$ NGF.

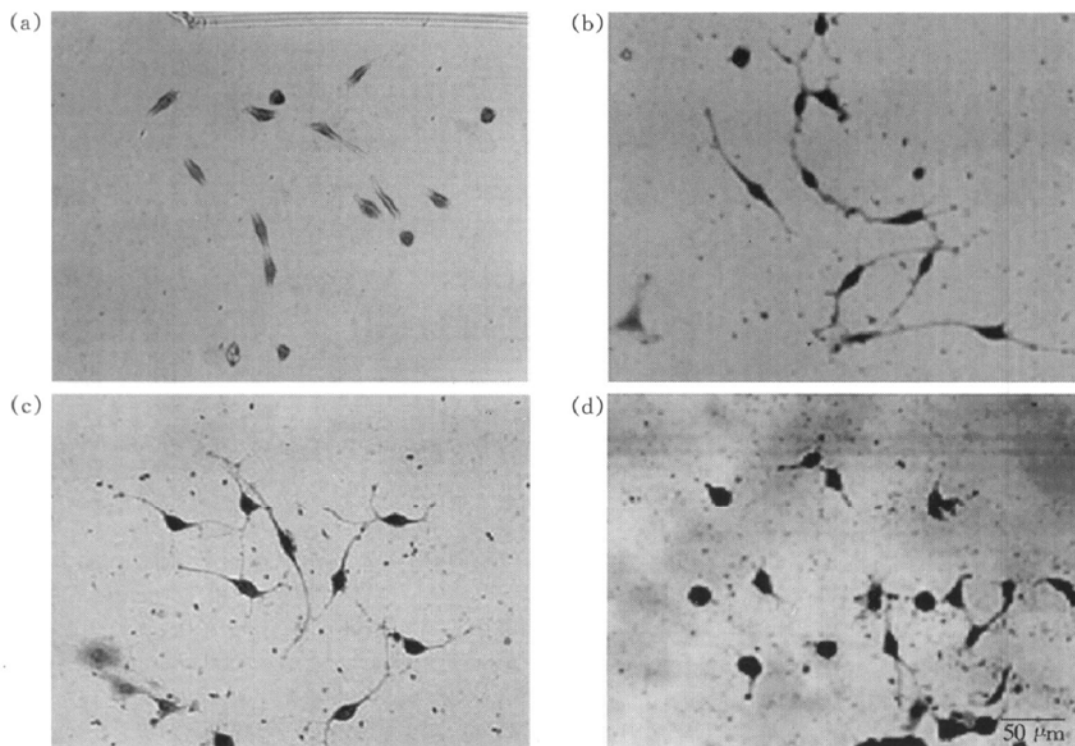


Fig. 3 Effect of the extract and/or NGF on the morphology of PC12 cells

The cells were treated for 48 h. (a) control (distilled water); (b) 100 $\mu\text{g/L}$ NGF; (c) 50 mg/L extract; (d) 50 mg/L extract + 20 $\mu\text{mol/L}$ PD98059.

2.4 菟丝子提取物对去血清培养 PC12 细胞存活的影响

实验发现, 在去血清培养后的第 7 天, 几乎所有的 PC12 细胞都会凋亡. 但培养体系中加入适当浓度的菟丝子提取物后, 在去血清后的 7 天内, 仍有 65%~80% 的细胞存活 (图 4a). 琼脂糖凝胶电

泳表明, 在去血清后 72 h, 核内的 DNA 大量片段化; 然而, 加入提取物或 NGF 都能明显地降低因去血清引起的 DNA 片段化 (图 4b), 这些结果说明, 菟丝子提取物对 PC12 细胞具有一定的神经营养作用.

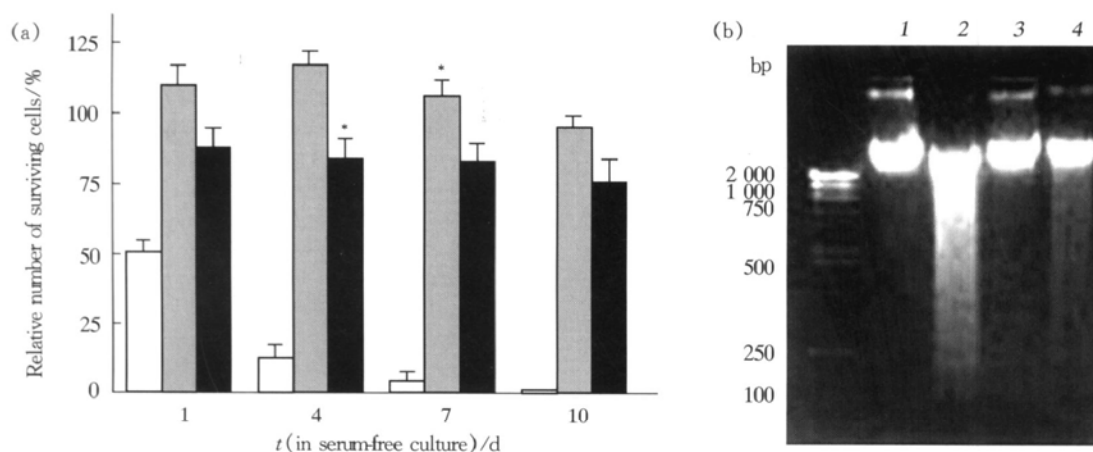


Fig. 4 Effect of the extract on long-term survival of PC12 cells in serum-free medium

(a) cells were washed and plated in 1.0 ml of DMEM medium containing either no additive or the indicated agents. Viable cells were counted on the condition of type blue stained. The number of surviving cells is expressed as a percentage relative to the number initially plated (about 2.0×10^4 cells/cm², defined as 100%). □: none; ■: NGF; ■: extract. (b) agarose gel electrophoresis of DNA from cells treated with the extract or NGF in serum-free medium for three days. 5 μg of DNA was analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. The marker is DL2000 (Takara, Japan). 1: control; 2: 50 mg/L the extract in serum-free medium; 3: 100 μg/L NGF in serum-free medium; 4: 72 h serum-free culture.

3 讨 论

能够延伸突起的许多神经细胞株, 如神经瘤细胞、胶质细胞、大鼠嗜铬神经瘤 PC12 细胞, 都被广泛用做研究神经细胞分化及相关机理的模型. 其中, 大鼠嗜铬神经瘤 PC12 细胞由 NGF 诱导分化的研究尤甚. 研究发现, NGF 可通过与细胞表面的受体结合、活化相关激酶, 使 PC12 细胞延伸出大量突起. 在 NGF 存在下, PC12 细胞停止分裂、长出大量突起, 同时表现出部分交感神经元的生化特性^[14, 15]. 在本文中, 我们发现菟丝子提取物不仅能诱导 PC12 细胞分化、延伸突起, 而且能延长 PC12 细胞去血清培养的存活时间.

共培养半饱和剂量的 NGF 和菟丝子提取物的研究发现, 该提取物能明显地增加 NGF 诱导的 PC12 细胞分化. 但是, 在饱和剂量下, 这种增强作用并不明显. 这说明菟丝子提取物可能通过一种不同于 NGF 的方式与 PC12 细胞作用, 间接地活化了 NGF 受体, 随后, 该提取物通过与 NGF 相同

的方式激活诱导细胞分化的相关基因, 从而实现诱导 PC12 细胞分化的目的.

NGF 诱导 PC12 细胞分化主要是通过活化 NGF 受体激酶 (p140^{trk}, trk)^[15, 6], 延长 MAPK 激酶的活化时间^[2]. 在我们研究 NGF 和菟丝子提取物诱导 PC12 细胞分化的过程中发现, NGF 和菟丝子提取物都能明显地提高 MAPK 磷酸化; 当用 MAPK 激酶特异抑制剂 PD98059 预处理 PC12 细胞后, MAPK 磷酸化程度都明显降低. 但是, 添加 PD98059 并不抑制细胞长出突起, 只是抑制 MAPK 的活化, 对已活化的 MAPK 无任何影响, 这一结论也与 Sano 等^[16]的报道基本一致.

PC12 细胞去血清培养数小时后便会出现凋亡现象, 这种凋亡可以通过添加 NGF 来有效抑制^[17]. 本文研究发现, 菟丝子提取物具有与 NGF 相似的功能, 不仅能诱导 PC12 细胞分化, 而且还能够抑制 PC12 细胞因去血清而引起的凋亡, 说明菟丝子提取物对 PC12 细胞具有一定的营养作用. 从研究结果可以看出, 菟丝子提取物诱导 PC12 细

胞分化与 NGF 并不存在竞争, 因此该提取物诱导 PC12 细胞分化可能是结合到与 NGF 不同的作用位点。目前, 具有神经活性的天然小分子化合物的研究非常广泛, 因为它们有可能穿过血脑屏障, 在治疗神经退行性疾病中具有更为广阔的前景, 因此进一步深入研究菟丝子提取物的活性成分以及作用机理具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Seger R, Krebs E. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 1995, **9** (9): 726~ 735
- 2 Marshall C J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 1995, **80** (2): 179~ 185
- 3 Baker P A, Shooter E M. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p^{75LNT} reduces NGF binding to trkA on PC12 cells. *Neuron*, 1994, **13** (1): 203~ 215
- 4 Anderson D J, Axel R. A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell*, 1986, **47** (6): 1079~ 1090
- 5 Connolly J L, Greene L A, Viscarello R R, *et al.* Rapid sequential changes in surface morphology of PC12 pheochromocytoma cells in response to nerve growth factor. *J Cell Biol*, 1979, **82** (3): 820 ~ 827
- 6 Mario R, Emanuela B, Jim C, *et al.* Nerve growth factor (NGF) influences differentiation and proliferation of myogenic cells *in vitro* via TrkA. *J Devel Neurosci*, 2000, **18** (8): 869~ 885
- 7 Huff K, Guroff G. Nerve growth factor-induced alteration in the response of PC12 pheochromocytoma cells to epidermal growth factor. *J Cell Biol*, 1981, **88** (1): 189~ 198
- 8 Obermeier A, Bradshaw R A, Seedork K, *et al.* Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/trk binding sites for SHC and PLC γ . *EMBO J*, 1994, **13** (7): 1585~ 1590
- 9 江苏新医学院. 中药大辞典. 上海: 科技出版社, 1977. 2006 Jiangsu New Medicinal College. Dictionary of Chinese Crude Drugs. Shanghai: Scientific Technologic Publisher, 1977. 2006
- 10 Sano M, Kohno M, Iwanaga M. The activation and translation of extracellular signal-regulated kinases (ERK-1 and ERK-2) appear not to be required for elongation of neurites in PC12D cells. *Brain Research*, 1995, **688** (1~ 2): 213~ 218
- 11 Praticke H M, Morre S E, Dickson J G, *et al.* Nerve growth factor induced changes in neuronal cell adhesion molecule (N-CAM) in PC12 cells. *EMBO J*, 1987, **6** (7): 1859~ 1863
- 12 Tischler A S, Riseberg J C, Hardenbrook M A, *et al.* Nerve growth factor is a potent inducer of proliferation and neuronal differentiation for adult rat chromaffin cells *in vitro*. *J Neurosci*, 1993, **13** (4): 1533~ 1542
- 13 Lyons W E, George E B, Dawson T M, *et al.* Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (8): 3191~ 3195
- 14 Greene L A, Aletta J M, Rukenstein A, *et al.* PC12 pheochromocytoma cells, culture, nerve growth factor treatment, and experimental exploitation. *Methods Enzymology*, 1986, **147** (2): 207~ 216
- 15 Greene L A, Tischler A S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, **73** (7): 2424~ 2428
- 16 Sano M, Kitajima S. Activation of mitogen-activated protein kinases is not required for the extension of neurites from PC12D cells triggered by nerve growth factor. *Brain Research*, 1998, **785** (2): 299~ 308
- 17 Burstein D E, Greene L A. Nerve growth factor has both mitogenic and antimutagenic activity. *Dev Biol*, 1982, **94** (2): 477~ 482

Neurotrophic Factor-like Activity of *Cuscuta chinensis* Lam. Extract in PC12 Cell Line

LIU Jian-Hui, JIANG Bo, BAO Yong-Ming, AN Li-Jia**

(Department of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract *Cuscuta chinensis* Lam., one of the most important traditional Chinese medicines for tonifying liver and kidney, enhances mitogen-activated protein kinases (MAPKs) activity and as a consequence induces neurite outgrowth in PC12 cells. The effect of *Cuscuta chinensis* Lam. extract on neurite outgrowth and its potentiated activation of MAPK were similar to that of nerve growth factor. PD98059, a specific inhibitor of MAPK, inhibited the effect of the extract on the phosphorylation of MAPK, suggesting the extract induce the PC12 cells differentiation linked to the MAPK cascade. Furthermore, the extract prevents apoptosis of PC12 cells caused by serum deprivation, indicating that it has neurotrophic factor-like activity.

Key words *Cuscuta chinensis* Lam. extract, mitogen-activated protein kinase (MAPK), PD98059, PC12 cells

* Corresponding author. Tel: 86-411-4706355, Fax: 86-411-4706365, E-mail: liujhmail@sina.com

Received: August 19, 2002 Accepted: October 16, 2002