

牛膝多肽可能通过 ERK1/2 途径诱导 PC12 细胞向神经元分化

袁颖¹, 于舒¹, 沈卫星², 赵华龙¹, 吴泓枢¹, 顾晓松¹, 丁斐^{1*}

(¹江苏省神经再生重点实验室, ²南通大学医学院, 江苏 南通 226001)

[摘要] 目的:研究牛膝多肽(ABPP)诱导 PC12 细胞向神经元分化的作用,初步探讨 ABPP 作用于 PC12 细胞的信号转导途径。方法:以体外培养的 PC12 细胞为研究模型,观察在低血清的情况下不同浓度 ABPP(0.25、0.50、1.00 $\mu\text{g/ml}$)诱导 PC12 细胞发生的形态学改变。采用免疫荧光细胞化学法,观察神经丝蛋白(NF-H)在 ABPP 诱导分化的 PC12 细胞中的表达;采用 Western blot 法观察 ABPP(1.0 $\mu\text{g/ml}$)加药后不同时间段(0、6、12 h 和 1、2、3、7 d)和不同浓度 ABPP(0.25、0.50、1.00 $\mu\text{g/ml}$)加药 2 d 后对 PC12 细胞 ERK1/2 活性的影响,同时应用 ERK1/2 特异性拮抗剂 PD98059 与 ABPP 共培养 PC12 细胞,分析 ABPP 对 PC12 细胞的作用与 ERK1/2 通路的关系。结果:ABPP 处理 3 d 后,部分 PC12 细胞开始出现神经元样的形态。随着加药时间延长具有神经元样的细胞逐渐增多,到 7 d 时,可以见到神经生长因子(NGF)和 ABPP 处理组 PC12 细胞的突起都显著增多,能形成网络;14 d 时,这种现象愈发显著。加药后 7 d 和 14 d, ABPP 各浓度组的细胞分化率以及细胞突起长度均明显提高,且存在明显的剂量反应关系。加药第 7 天和第 14 天, ABPP 高剂量组与 NGF 组的 PC12 细胞均出现 NF-H 标记阳性的分化细胞。ABPP 对 ERK1/2 的激活作用存在明显的量效关系,以 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 作用 2 d 为最大。当用 PD98059 抑制 ERK1/2 的活化时, ABPP 对 ERK1/2 的激活作用被部分阻断。结论:ABPP 具有诱导 PC12 细胞神经元性分化的作用,此作用可能是通过 ERK1/2 信号转导途径实现的。

[关键词] 牛膝多肽;PC12 细胞;神经元性分化;ERK1/2

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)12-1652-06

doi:10.7655/NYDXBNS20131202

Neuronal differentiation of PC12 cells through ERK1/2 pathways

Yuan Ying¹, Yu Shu¹, Shen Weixing², Zhao Hualong¹, Wu hongshu¹, Gu xiaosong¹, Fei Ding^{1*}

(¹Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration, ²School of Medicine, Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the potential ability of ABPP on the neuronal differentiation of PC12 cells and to preliminarily investigate the activation of ERK1/2 cascade involved. **Methods:** By cell culture in the low-concentration of serum, the morphological changes of PC12 cells treated with ABPP at different concentration (0.25, 0.50, 1.00 $\mu\text{g/ml}$) were detected. Fluorescent immunocytochemistry was performed to examine the expression of NF-H in differentiated PC12 cells induced by 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ABPP. Western blot was performed to detect the activities of ERK1/2 in PC12 cells activated by 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ABPP for different periods (0 h, 6 h, 12 h, 1 d, 2 d, 3 d and 7 d) and by different concentrations (0.25, 0.50, 1.00 $\mu\text{g/ml}$) of ABPP for 2 days co-cultured with activated (diphosphorylated ERK1/2) antibody and mitogen activated protein kinase (MAP Kinase, MAPK, ERK-1 & ERK-2) antibody. **Results:** After 3 days treated with ABPP (0.25, 0.50, 1.00 $\mu\text{g/ml}$), PC12 cells started to present neuron morphology characteristics. As time went on, the number of the differentiated PC12 cells increased. At the 7th day the differentiated PC12 cells produced the neurite network and at the 14th day the phenomena became more obvious. It showed that ABPP promoted the differentiation of PC12 by in a dose-dependent manner. ABPP activated ERK1/2 in PC12 cells in a dose-dependent manner and a time-dependent manner, with the best concentration of 1.0 $\mu\text{g/ml}$ for 2 days. PD98059 significantly inhibited ABPP-induced phosphorylation of ERK1/2. **Conclusion:** ABPP could induce the neuronal differentiation of PC12 cells through ERK1/2 pathways.

[Key words] ABPP; PC12 cell; neuronal differentiation; ERK1/2

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(12): 1652-1657]

[基金项目] 国家自然科学基金(30970996);江苏省“六大人才高峰”项目(2010-WS-073);南通市科技计划项目(AS2011014);南通市第四期“226工程”科研项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: dingfei@ntu.edu.cn

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 (rat adrenal pheochromocytoma, PC12) 细胞是最常用的神经生物和神经化学研究的细胞模型。PC12 细胞能够合成并储存儿茶酚胺类的神经递质多巴胺和去甲肾上腺素,在神经生长因子(NGF)的诱导下,PC12 细胞停止增殖,出现突起,表现出类似原代培养的交感神经元的分化型表型,因此 PC12 细胞是研究神经细胞生物学行为的理想材料^[1-2]。

近年来的研究发现,丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)信号通路是参与细胞生长、发育、分裂以及细胞间功能同步等多种生理功能的最主要通路之一。在真核生物中已经确定的 MAPK 信号转导通路中的 ERK1/2 通路(细胞外信号调节激酶)的主要作用是在生长因子的刺激下被活化,促进细胞生长、增殖和分化。同时由于 ERK1/2 通路是各种细胞维持生理生化功能的重要胞内信号转导通路,与胞内其他很多重要的信号通路存在交互联系。

本实验室对从中药牛膝中提取的牛膝多肽(polypeptides of *Achyranthes bidentata* blume, ABPP)做了一些有益的基础研究^[3-4]。本研究观察 ABPP 对 PC12 细胞分化的影响,对其激活 ERK1/2 通路的研究能为将来进一步深入探讨 ABPP 的信号转导途径提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

PC12 细胞由美国模式菌种收集中心(ATCC)提供。牛膝多肽(ABPP,南通大学神经再生重点实验室研制^[5]),DMEM 高糖培养基(Gibco 公司,美国),马血清(Gibco 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青有限公司),胰蛋白酶、NGF (Sigma 公司,美国),PD98059 (Promega 公司,美国),L-多聚赖氨酸、Hoechst 33342、rabbit anti-NF-H polyclonal antibody (Sigma 公司,美国),FITC-anti-rabbit IgG(Santa Cruz 公司,美国)、细胞蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量试剂盒(申能博采生物科技有限公司),丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(Gibco 公司,美国),TEMED(Sigma 公司,美国),PVDF 膜(Bio-Rad 公司,美国),Monoclonal Anti-MAP Kinase, Activated (Diphosphorylated ERK1/2) antibody in mouse、anti-mitogen activated protein kinase (MAP Kinase, MAPK, ERK-1/ERK-2) (Sigma 公司,美国),IRDye 800 conjugated affinity purified goat anti-mouse IgG、IRDye 800 conjugated affinity purified donkey anti-

rabbit IgG(Odyssey 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 PC12 细胞的培养

PC12 细胞用 DMEM 高糖完全培养基(含 5%胎牛血清,10%马血清,100 U/ml 青霉素,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素)在以 L-多聚赖氨酸包被处理过的培养瓶中培养,置于 5%CO₂、饱和湿度、37℃培养箱内培养。每 2 d 换 1 次液,每 3 d 传 1 次代。

1.2.2 ABPP 诱导 PC12 细胞分化的形态学观察

取处于对数生长期的 PC12 细胞,以 1×10^4 个/ml 接种于 12 孔培养板,24 h 后改用含 1%胎牛血清和 1%马血清的低血清 DMEM 培养液培养。实验分 5 组,分别为 ABPP 低剂量组(0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ABPP 中剂量组(0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、ABPP 高剂量组(1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、阳性对照组(NGF 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、空白对照组(加入等量的低血清 DMEM 培养基)。2 d 换液 1 次且维持培养基药物浓度。实验重复 3 次。第 7 天和第 14 天分别观察细胞分化的形态学改变。光镜下,各组随机选择 15 个视野,计数突起细胞(突起长度超过胞体直径 1 倍)的百分比和细胞突起的长度。

1.2.3 ABPP 诱导 PC12 细胞神经元性分化的检测

实验分 3 组,分别为 ABPP 高剂量组(1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、阳性对照组(NGF 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和空白对照组(加入等量的低血清 DMEM 培养基)。PC12 细胞按上法培养 7 d 和 14 d 后,用 4%多聚甲醛室温下固定 30 min。用含 10%羊血清、0.3% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 液在 37℃条件下封闭 60 min。加一抗(rabbit anti-NF-H, 1:200),4℃过夜。加二抗(FITC-anti-rabbit IgG, 1:200),室温、避光放置 1 h。实验中设不加一抗的空白对照组,以 0.01 mol/L PBS 代替 anti-NF-H,其余步骤同前。Hoechst 33342(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)复染细胞核 20 min。在激光共聚焦显微镜下观察免疫荧光细胞化学检测结果。

1.2.4 ABPP 对 PC12 细胞 ERK1/2 活性的影响

1.2.4.1 不同浓度 ABPP 对 PC12 细胞 ERK1/2 活性的影响

取处于对数生长期的 PC12 细胞,消化、分组接种于 6 孔细胞培养板,每组细胞计数约为 2×10^6 个/ml。以低血清 DMEM 培养基培养 6 h 后加入 ABPP 使其终浓度分别为 0.25、0.50、1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$,于加药后 2 d 提取总蛋白,采用 BCA 法测定总蛋白浓度。15% SDS-PAGE 电泳分离后,采用半干转移至 PVDF 膜(35 mA, 90 min)。5%脱脂奶粉的 TBS/T 中,4℃包被过夜。分别采用 anti-ERK1/2(1:1 000)和

anti-p-ERK1/2(1:1 000),一抗4℃过夜。相应二抗IRDye 800 Conjugated Affinity Purified Goat Anti-Mouse IgG (1:10 000)和IRDye 800 Conjugated Affinity Purified Donkey Anti-Rabbit IgG(1:10 000),室温1.5 h。空白对照组以0.01 mol/L PBS代替anti-ERK1/2和anti-p-ERK1/2,其余步骤同上。显色后,Odyssey Infrared Imaging System(Rockland,美国)进行灰度扫描,PDQuest7.2.0软件分析结果。每次实验在相同条件下重复3次。

1.2.4.2 ABPP不同作用时间对PC12细胞ERK1/2活性的影响

取处于对数生长期的PC12细胞,消化、分组接种于6孔细胞培养板,每组细胞计数约为 2×10^6 个/ml。以低血清DMEM培养基培养6 h后加入ABPP使其终浓度为1.0 μg/ml,分别于加药后0、6、12 h和1、2、3、7 d提取总蛋白,采用BCA法测定总蛋白浓度。SDS-PAGE电泳和Western blot步骤同前。

1.2.5 PD98059对ABPP激活的ERK1/2的影响

取处于对数生长期的PC12细胞,消化、分组接种于6孔细胞培养板,每组细胞计数约为 2×10^6 个/ml。以低血清DMEM培养基培养6 h后,分别加入ABPP(1.0 μg/ml)、PD98059(10 μmol/L)、ABPP(1.0 μg/ml)+PD98059(10 μmol/L)、等量的低血清DMEM培养基作为空白对照,其中PD98059提前1 h加到培养基中。于加药后2 d提取总蛋白,采用

BCA法测定总蛋白浓度。SDS-PAGE电泳和Western blot步骤同前。

1.3 统计学方法

应用SPSS11.5统计软件进行分析。采用One-way ANOVA统计分析软件计算,所得结果表示为均数±标准差($\bar{x} \pm s$),两两比较采用Turkey post hoc分析, $P \leq 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 ABPP诱导PC12细胞分化的形态学观察

NGF组处理6 h或ABPP各浓度组处理3 d后,部分PC12细胞开始出现神经元样的形态:细胞胞体的皱缩、平展以及可见有明显的类似于神经元突起的生长,细胞停止增殖。随着加药时间延长具有神经元样的细胞逐渐增多,到7 d时,可以见到NGF和ABPP各浓度组PC12细胞的突起都显著增多;到14 d时,NGF(图1E)和ABPP处理组(图1B~D)PC12细胞的突起都能形成网络。分别于加药后7 d和14 d,各组随机取15个视野,计数PC12细胞分化率以及细胞突起长度。结果表明,于加药后7 d和14 d ABPP各浓度组的细胞分化率以及细胞突起长度均明显高于空白对照组($P < 0.01$),且存在明显的量效关系(表1)。

2.2 ABPP诱导PC12细胞神经元性分化的检测

7 d和14 d后采用抗NF-H的抗体,通过免疫

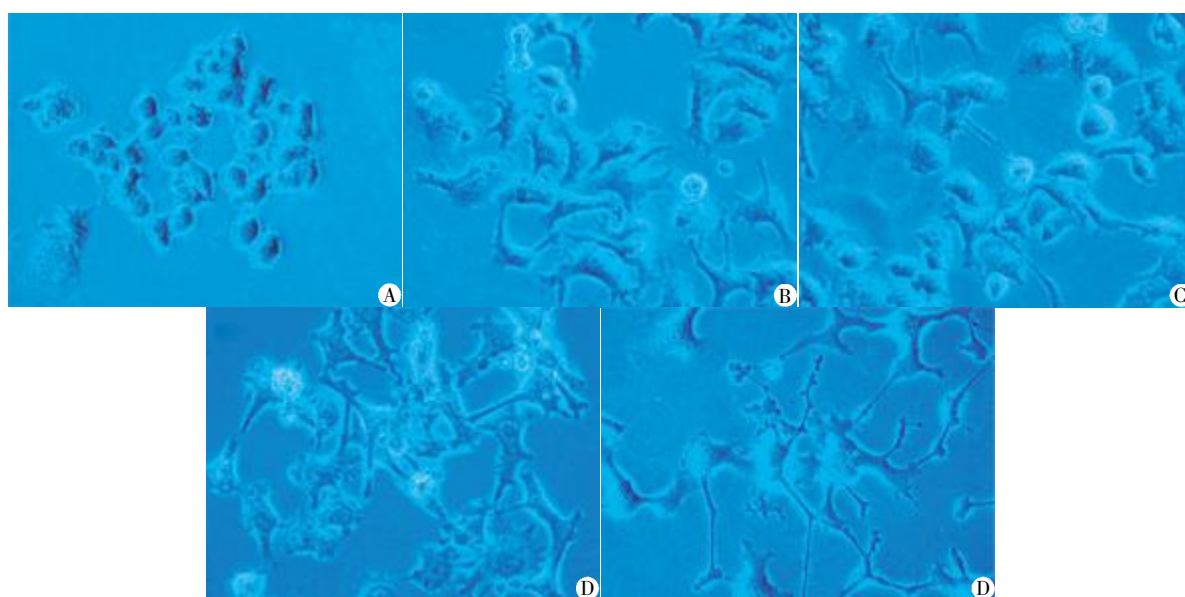


图1 ABPP诱导PC12细胞分化14 d的光镜观察结果($\times 400$)
A:培养14 d后空白对照组PC12细胞仅见极少数有突起的细胞;B、C、D:ABPP(0.25、0.50、1.00 μg/ml)组PC12细胞可见有大量的细胞有明显的突起生长,且部分突起连接成网状;E:NGF(0.05 μg/ml)组PC12细胞可见有大量的细胞有明显的突起生长,且部分突起连接成网状。

Figure 1 Morphological observation of PC12 cells induced by ABPP after 14 days($\times 400$)

表 1 ABPP 对 PC12 细胞分化的影响

Table 1 Effects on differentiation of PC12 cells by ABPP

组别	浓度($\mu\text{g/ml}$)	视野数	7 d 细胞分化率(%)	14 d 细胞分化率(%)
Control	0	15	0	0
NGF	0.05	15	$66.05 \pm 8.40^*$	$79.05 \pm 7.79^*$
ABPP	0.25	15	$22.94 \pm 5.55^*$	$37.20 \pm 8.06^*$
	0.50	15	$33.93 \pm 8.59^*$	$46.18 \pm 7.50^*$
	1.00	15	$48.25 \pm 6.95^*$	$59.20 \pm 7.02^*$

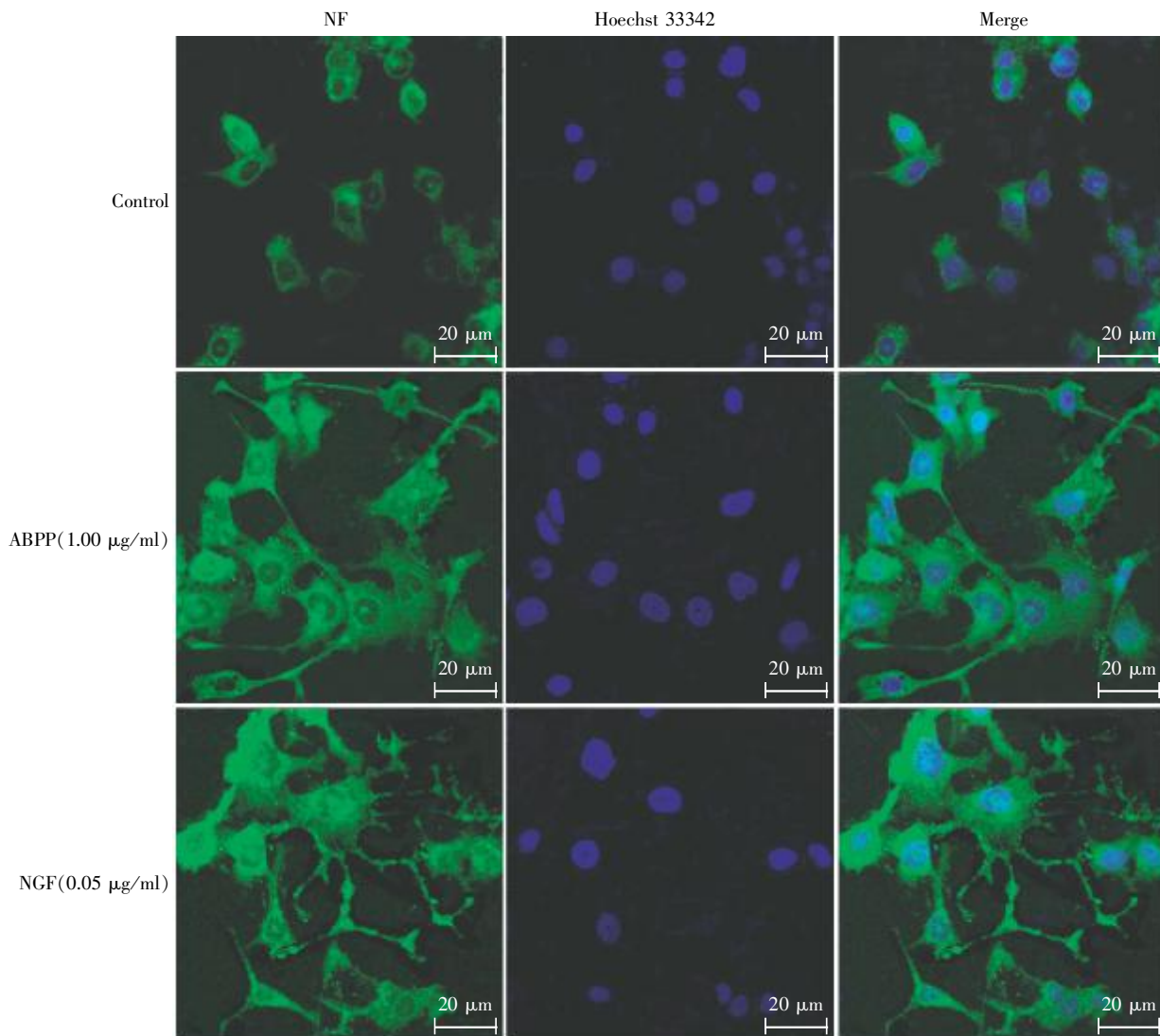
与空白对照组相比, * $P < 0.01$ 。

荧光细胞化学法检测 ABPP 诱导分化的 PC12 细胞。结果表明 ABPP 高剂量组与 NGF 组的 PC12 细胞均出现 NF-H 标记阳性的分化细胞, 可见有明显的类似于神经元突起的生长(图 2)。

2.3 不同浓度 ABPP 对 PC12 细胞 ERK1/2 活性的影响

影响

分别以 0.25、0.50、1.00 $\mu\text{g/ml}$ ABPP 作用于低血清培养的 PC12 细胞 2 d, 观察 ERK1/2 活性的变化。结果表明, 在所观察的剂量范围内, ABPP 对 ERK1/2 的激活作用存在明显的量效关系, 与正常



培养 14 d 后空白对照组 PC12 细胞几乎见不到有突起的细胞和 NF-H 阳性细胞。1.00 $\mu\text{g/ml}$ ABPP 组可见有大量分化的 PC12 细胞有明显的突起生长, 且部分突起连接成网状, 同时突起细胞基本都为 NF-H 标记的阳性细胞。0.05 $\mu\text{g/ml}$ NGF 组可见有大量分化 PC12 细胞有明显的突起生长, 且部分突起连接成网状, 同时突起细胞基本都为 NF-H 标记的阳性细胞。

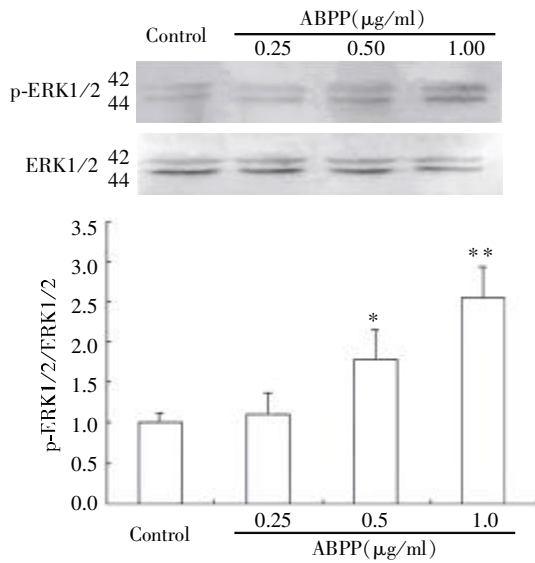
图 2 ABPP 诱导 PC12 细胞分化 14 d 的 NF-H 荧光染色结果

Figure 2 Differentiation results of control PC12 cells after 14 days detected by IF

对照组相比,1.0 μg/ml ABPP的作用最明显(图3)。

2.4 ABPP不同作用时间对PC12细胞ERK1/2活性的影响

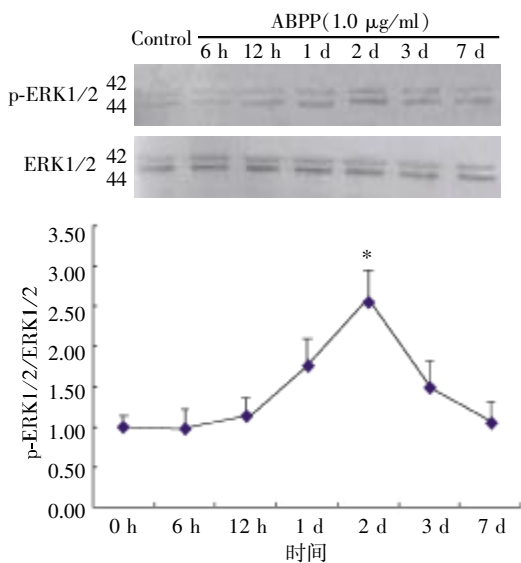
1.0 μg/ml ABPP作用于低血清培养的PC12细胞,细胞内ERK1/2的活性随着ABPP作用时间的不同而变化,作用2 d时,ERK1/2的活性被最大激活,之后又逐渐下降(图4)。



与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 不同浓度ABPP对PC12细胞ERK1/2活性的影响

Figure 3 The activities of ERK1/2 in PC12 cells activated by ABPP of different concentrations



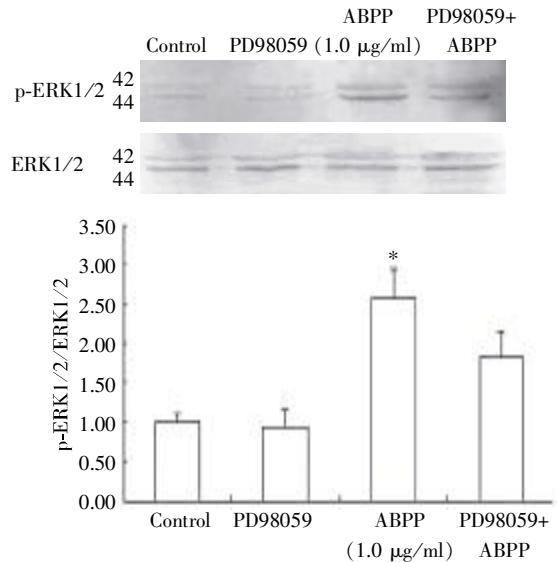
与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图4 ABPP (1.0 μg/ml)不同作用时间对PC12细胞ERK1/2活性的影响

Figure 4 The activities of ERK1/2 in PC12 cells activated by ABPP (1.0 μg/ml) at different periods

2.5 PD98059对ABPP作用于PC12细胞ERK1/2活性的影响

当用PD98059抑制MEK1/2的活化时,ABPP对ERK1/2的激活作用部分被阻断(图5)。



与阴性对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图5 PD98059对ABPP (1.0 μg/ml)诱导的PC12细胞ERK1/2活性的影响

Figure 5 PD98059 resistance on ERK1/2 phosphorylation in PC12 cells activated by ABPP (1.0 μg/ml)

3 讨论

本研究观察ABPP诱导PC12细胞神经性分化的作用。由于神经丝蛋白是神经元细胞骨架的主要成分,对维持神经元独特的形态特征以及维持神经系统正常活动必需的轴浆运输有着至关重要的作用^[6-7],是神经元所特有的标志,故本研究采用荧光免疫细胞化学法,检测分化的PC12细胞中NF-H的表达,作为ABPP诱导PC12细胞神经性分化的依据。结果表明,ABPP可表现出类似NGF样作用,促进PC12细胞的分化,且分化细胞能表达神经元特异性标志神经丝蛋白NF-H,虽然ABPP诱导PC12细胞发生分化的时间比NGF迟(3 d vs 6 h),但是通过对ABPP诱导分化的PC12细胞占培养总细胞的百分比和细胞突起长度的比较分析,表明ABPP和NGF同样具有较强的诱导PC12细胞分化的能力。

利用PC12细胞观察ABPP介导的胞内信号转导途径,侧重研究了MAPK/ERK级联途径,以初步探讨ABPP促神经生长、维持神经元存活的可能作用机制。MAPK信号通路是参与细胞生长、发育、分裂以及细胞间功能同步等多种生理功能的最主要的

通路之一。ERK1/2 通路的主要作用是在生长因子的刺激下被活化,促进细胞生长、增殖和分化^[8]。各类生长因子可以与酪氨酸蛋白激酶受体结合,通过激活 Ras/Raf/MEK 途径使 ERK1/2 活化;而一些蛋白激酶 C 的同功酶则可以直接激活 Raf/MEK 而使 ERK1/2 活化。活化的 ERK1/2 又可以磷酸化一系列胞浆蛋白如 S6 激酶 p90rsk、细胞磷脂酶等。从而发挥一系列的生理、生化效应。

本研究结果表明,随着作用时间的延长,ABPP 激活了 ERK1/2,在作用 2 d 时 p-ERK 表达水平达到高峰,随后又逐渐下降;并且这种激活作用存在明显的剂量效应关系。结果还提示,ERK1/2 上游激活物 MEK1/2 的特异性抑制剂 PD98059 可以部分阻断 ABPP 对 ERK1/2 的激活作用。可见,ABPP 促 PC12 分化的作用很有可能是部分通过激活 ERK1/2 通路而实现的。众所周知,ERK1/2 通路中含有对调节 PC12 细胞生长、存活和分化非常重要的许多蛋白激酶^[9-10]。以往的研究提示 NGF 诱导 PC12 细胞分化是一个复杂的信号调节过程,其中有诸多因子和信号转导途径的参与^[11-12]。而 ABPP 对胞内信号转导途径的作用如何,有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal cell line of rat adrenal pheochromocytoma cells that respond to nerve growth factor [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 1976, 73(7):2424-2428
- [2] Yang Y, Xu K, Koike T, et al. Transport of autophagosomes in neurites of PC12 cells during serum deprivation [J]. *Autophagy*, 2008, 4(2):243-245
- [3] Yuan Y, Shen H, Yao J, et al. The protective effects of *Achyranthes bidentata* polypeptides in an experimental model of mouse sciatic nerve crush injury [J]. *Brain Res Bull*, 2010, 81(1):25-32
- [4] 袁 颖,周松林,顾晓松,等.牛膝多肽促大鼠海马神经元突起的生长[J]. *解剖学报*, 2009, 40(5):696-701
- [5] Shen H, Yuan Y, Ding F, et al. The protective effects of *Achyranthes bidentata* polypeptides against NMDA-induced cell apoptosis in cultured hippocampal neurons through differential modulation of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors [J]. *Brain Res Bull*, 2008, 77(5):274-281
- [6] Barry DM, Stevenson W, Bober BG, et al. Expansion of neurofilament medium C terminus increases axonal diameter independent of increases in conduction velocity or myelin thickness [J]. *J Neurosci*, 2012, 32 (18):6209-6219
- [7] Yuan A, Sasaki T, Kumar A, et al. Peripherin is a subunit of peripheral nerve neurofilaments: implications for differential vulnerability of CNS and peripheral nervous system axons [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(25):8501-8508
- [8] Mullenbrock S, Shah J, Cooper GM. Global expression analysis identified a preferentially nerve growth factor-induced transcriptional program regulated by sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and AP-1 protein activation during PC12 cell differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(52):45131-45145
- [9] Newbern JM, Li X, Shoemaker SE, et al. Specific functions for ERK/MAPK signaling during PNS development [J]. *Neuron*, 2011, 69(1):91-105
- [10] Giachello CN, Fiumara F, Giacomini C, et al. MAPK/Erk-dependent phosphorylation of synapsin mediates formation of functional synapses and short-term homosynaptic plasticity [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 6):881-893
- [11] Lin S, Liu M, Mozgova OI, et al. Mitotic motors coregulate microtubule patterns in axons and dendrites [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(40):14033-14049
- [12] JDraghetti C, Salvat C, Zanoquera F, et al. Functional whole-genome analysis identifies Polo-like kinase 2 and poliovirus receptor as essential for neuronal differentiation upstream of the negative regulator alphaB-crystallin [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(46):32053-32065

[收稿日期] 2013-05-23