基础研究 文章编号：0253-3626（2011）04-0423-03

人参总皂苷对 PC12 细胞分化的影响

李晗宇[1]，王顺和[1]，郑 娟[1]，姜 蓉[2]
（1. 重庆医科大学基础医学院病理学教研室；2. 重庆医科大学干细胞与组织工程研究室，重庆 400016）

【摘 要】目的：研究人参总皂苷（Total saponin of panax ginseng，TSPG）诱导 PC12 细胞神经元性分化的作用。方法：体外培养 PC12 细胞，观察 PC12 细胞在 TSPG 的影响下细胞发生的形态学改变。诱导 48 h 透射电镜观察突触连接形成情况，72 h 利用免疫细胞化学技术，观察 TSPG 作用后 PC12 细胞向 MAP-2（Microtubule-associated protein 2）阳性细胞分化的情况。结果：TSPG 作用后的 PC12 细胞其突起长度和细胞直径较对照组明显增长和增大[长度由（13.95 ± 2.59）μm 增长至（30.33 ± 3.82）μm；直径由（8.25 ± 1.82）μm 提高到（14.33 ± 2.84）μm，$P < 0.05$]。TSPG 能促进 PC12 细胞形成突触连接。TSPG 组表达 MAP2 的阳性细胞率明显高于对照组（由 4.55%提高到 12.22%，$P < 0.05$）。结论：TSPG 具有诱导 PC12 细胞神经元性分化的作用。

【关键词】人参总皂苷；PC12 细胞；分化
【中国图书分类法分类号】R736.6 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-01

Differentiation of PC12 cells induced by total saponin of panax ginseng

LI Han-yu, et al
(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the potential ability of TSPG (Total saponin of panax ginseng) to induce the neuronal differentiation of PC12 cells. *Methods*: PC12 cells were cultured in vitro, and their morphological changes under the TSPG were observed. The synaptic linkage were observed by transmitting electronic microscope after the PC12 cells were exposed to TSPG for 48 h and the expression of MAP-2 was detected by immunocytochemistry after 72 h. *Results*: The length of neurite and max diameter of PC12 cells in TSPG group were obviously longer and bigger than those in control group ((13.95 ± 2.59) μm to (30.33 ± 3.82) μm; (8.25 ± 1.82) μm to (14.33 ± 2.84) μm, $P < 0.05$) TSPG could induce PC12 cells to form the synaptic linkage.compared with the control group, the number of MAP-2 positive cells was significantly increased in TSPG group (4.55% to 12.22%, $P < 0.05$). *Conclusion*: TSPG can induce the neuronal differentiation of PC12 cells.

【Key words】total saponin of panax ginseng; PC12 cell; differentiation

人参总皂苷（Total saponin of panax ginseng，TSPG）是人参主要的药理活性成分[1]，有着较为广泛的药理作用，如稳定神经细胞膜、保护突触结构、增加突触数目，对神经递质的影响和抑制神经毒性作用等[2]。大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 起源于神经嵴，是当前广泛用以研究神经细胞功能、分化和凋亡的一种组织细胞培养模型。它可在神经生长因子（Nerve growth factor，NGF）的诱导下，通过激活酪氨酸激酶相关的受体 TrkA 完成信号转导[3,4]，从而抑制 PC12 细胞增殖，促进其分化成神经元样细胞。本实验用 TSPG 诱导处理 PC12 细胞，观察其对 PC12 细胞分化能力的影响，以期为进一步探讨其作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 TSPG

重庆医科大学干细胞研究室王亚平教授惠赠（购自吉林宏久生物有限公司），纯度 98%。实验前用 DMEM 培养液配置成 2.5 mg/ml 浓度，正压过滤除菌，4℃备用。

1.2 主要药物与试剂

DMEM 购自GIBCO公司，胎牛血清购自杭州四季青，MAP-2（Microtubule-associated protein 2）单克隆抗体购自北京中杉生物技术有限公司，免疫组织化学试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 PC12 细胞培养

PC12 细胞购自上海细胞生物学研究所细胞库，细胞置于 DMEM 培养液（含 10%胎牛血清，100 U/ml 青霉素，100 g/L 链霉素，200 mg/L 谷氨酰胺），5%CO_2，饱和湿度，37℃培养箱内培养，每 2 d 换 1 次液，待单层细胞生长至 80%汇合后传代培养。

1.4 TSPG 诱导 PC12 细胞的形态学观察

将 PC12 细胞按 3×10^4 个/ml 接种于 24 孔板中，实验分为对照组和 10 mg/L TSPG 处理组，每组 5 个复孔培养。光镜下各组随机选择 5 个视野，计数突起细胞（突起长度超过胞体直径的 1 倍）的百分比。利用显微镜测微尺测量 2 组分化细胞的细胞直径和突起长度。实验重复 3 次。将 TSPG 和 DMEM

作者介绍：李晗宇（1985-），女，硕士，
研究方向：干细胞和神经损伤及再生。
通信作者：王顺和，男，教授，Email：wangshunhe120@yahoo.com。

单纯培养基各自作用 48 h 后的细胞离心收集后，2.5%戊二醛 4℃固定 4 h，PBS 缓冲液漂洗，1%锇酸固定 2 h，PBS 缓冲液漂洗，梯度酒精、梯度丙酮脱水，环氧树脂包埋液浸透，包埋，36℃~60℃聚合，修块，超薄切片，醋酸双氧铀及柠檬酸铅双重电子染色后，透射电镜观察。

1.5 免疫细胞化学染色

培养至第 3 天，弃去培养液，PBS 冲洗，4%多聚甲醛固定 20 min 后，PBS 洗涤 5 min × 3 次，加入封闭用山羊血清，37℃孵育 10 min，甩去血清后加入一抗工作液（MAP-2 单克隆抗体，1:100），4℃孵育过夜，PBS 洗涤 5 min × 3 次，加生物素标记二抗工作液，37℃孵育 30 min，PBS 洗涤 5 min × 3 次，加辣根酶标记链霉卵白素工作液，37℃孵育 30 min，PBS 洗涤 5 min × 3 次。DAB 显色，苏木素核复染。封片。实验中设不加一抗的空白对照组。免疫组织化学染色结束后，计数每张切片 5 个高倍视野的阳性细胞数与细胞总数，计算阳性细胞率。

1.6 统计分析

运用 SPSS11.0 统计分析软件，细胞直径和突起长度组间均数比较采用单因素方差分析，组间细胞分化率、阳性细胞率采用 χ^2 检验进行统计学分析。

2 结　果

2.1 TSPG 对 PC12 细胞的诱导分化作用

未经处理的 PC12 细胞胞体较小，呈圆形或椭圆形，折光性强，无突起或仅有短小突起。经 TSPG 作用数 10 h，少数 PC12 细胞胞体发生变形，呈梭形、三角形或多角形。24 h 后，镜下观察见部分细胞长出了类似神经元的突起，胞体折光性较高，48 h 后，镜下折光性逐渐降低，胞体变大，不少细胞胞体呈梭形、三角形或多角形。有突起的细胞数增多且突起较前明显增长。培养至 72 h，细胞胞体更大，突起更长，胞体折光性显著降低，大部分细胞已长出长突起，突起之间相互连接交织成网（图 1，表 1）。各组随机选取 5 个视野，计数 PC12 细胞分化率，结果发现实验组的细胞分化率明显高于对照组（$P<0.05$，表 2）。电镜下，TSPG 作用后的 PC12 细胞可见细胞间有突触连接形成，而对照组却未见突触连接形成（图 2）。

2.2 TSPG 对 PC12 细胞 MAP-2 表达的影响

诱导至 72 h，进行抗 MAP-2 免疫细胞化学检测，结果显示：经 TSPG 处理后的 PC12 细胞出现 MAP-2 标记阳性的分化细胞数比对照组明显增多（表 3，图 3）。

表 1　PC12 细胞培养 72 h 其突起长度和最大直径的比较（n=30，$\bar{x}\pm s$）

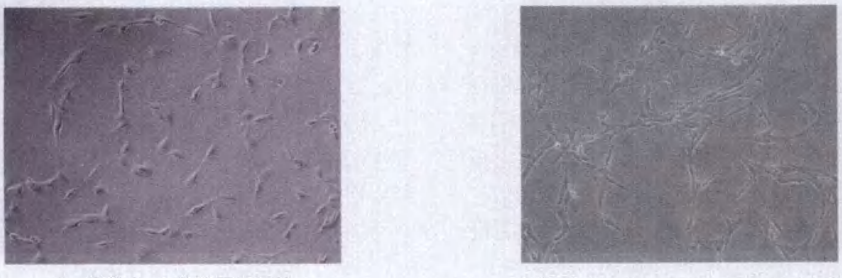
组别	浓度（mg/L）	突起长度（μm）	细胞最大直径（μm）
对照组	0	13.95 ± 2.59	8.25 ± 1.82
TSPG组	10	30.33 ± 3.82*	14.33 ± 2.84*

注：与对照组比较 *$P<0.05$

表 2　两组细胞分化率的比较

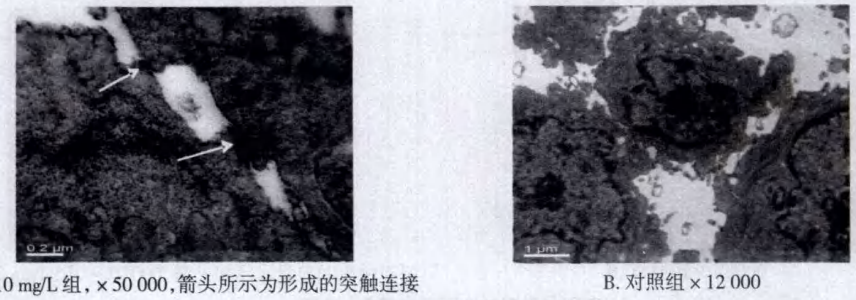
组别	浓度(mg/L)	视野数(个)	细胞总数(个)	分化细胞数(个)	分化率(%)
对照组	0	5	96	9	9.38
TSPG组	10	5	103	24	23.3*

注：与对照组比较 *$P<0.05$



A. 培养 72 h 的对照组细胞　　B. 培养 72 h 的 10 mg/L TSPG 组的细胞

图 1　TSPG 作用后细胞形态学的观察（× 100）



A. 10 mg/L 组，× 50 000，箭头所示为形成的突触连接　　B. 对照组 × 12 000

图 2　透射电镜下突触连接的观察

表 3 两组 MAP-2 阳性细胞百分率比较

组别	浓度(mg/L)	视野数(个)	细胞总数(个)	阳性细胞数(个)	阳性细胞率(%)
对照组	0	5	88	4	4.55
TSPG组	10	5	90	11	12.22*

注：与对照组比较 *$P<0.05$



A. 10 mg/L 组　　B. 对照组

图 3 免疫组织化学检测 MAP-2 表达（×400）

3 讨 论

TSPG是传统中药人参的主要药用成分。而人参作为中医传统“补气生血”的要药，在机体的药理作用十分广泛。有研究发现，TSPG 能促进脑内蛋白质合成，稳定神经细胞膜，保护突触结构，增加突触数目，抑制神经毒性及抗神经细胞凋亡等作用。因此，我们推测，TSPG 对 PC12 细胞神经元性分化可能也存在促进作用。

目前已有很多研究方法在体外培养 PC12 细胞并诱导它向神经元样细胞分化，这种分化使其在形态、生理、生化及功能方面更接近于神经元，是在分子水平上研究神经元分化的很好模型[5,6]。然而，在分离培养和诱导分化等环节中，方法不统一。体外诱导 PC12 细胞向神经元细胞分化的最终目的在于应用。有些诱导剂有一定毒性，不能用于人体内。因此寻找有效而无害的诱导剂十分必要。中药具有来源广，价廉，副作用小等优势，对 PC12 细胞长期生长分化无毒且利于分化后细胞活体移植，已越来越受到重视。据文献报道一些中药如陈香木[7]（Lignaloes）、菟丝子（Cuscuta chinensis）[8]等提取物具有与 NGF 相似的功能，对 PC12 细胞有一定的营养作用，可以诱导 PC12 细胞分化。

本研究采用体外细胞培养法，观察 TSPG 诱导 PC12 细胞神经元性分化的作用。MAP-2 是特异性分布于神经元胞浆和突起中的细胞骨架蛋白，且在树突中的含量多过胞体，可作为神经元的标志性蛋白，在神经元的发育、分化、塑型方面以及神经元极性获得上发挥着重要的作用[9]。故实验应用抗 MAP-2 单克隆抗体，通过免疫细胞化学法检测分化的 PC12 细胞中 MAP-2 的表达，找到 TSPG 诱导 PC12 细胞神经元性分化的证据。实验用 10 mg/L 的 TSPG 处理 PC12 细胞，在加入 TSPG 24 h 后，PC12 细胞就长出类似神经元的突起，48 h 后电镜发现细胞间有突触连接形成，72 h 后细胞体积和突起长度都比对照组增大和增长。72 h 时对分化的细胞行抗 MAP-2 免疫细胞化学染色，发现 MAP-2 表达阳性的分化细胞数明显多于对照组（$P<0.05$）。这一结果说明 TSPG 表现出了类似 NGF 样作用，促进 PC12 细胞分化，分化后的细胞表达神经元特异性标志物 MAP-2。

以往的研究提示 NGF 诱导 PC12 细胞分化是一个复杂的信号转导过程，其中有诸多因子和信号转导途径的参与[10]。那么 TSPG 促使 PC12 细胞神经元性分化的胞内信号转导途径是怎样的呢？我们将在后续实验中进一步研究。

参 考 文 献

[1] 李泰平.人参皂苷药理活性的研究进展[J].生物学教学，2003，28（4）：1-3.

[2] 沈思钰，于振华，傅晓东，等.人参皂苷对神经系统作用的研究现状及分析[J].安徽中医学院学报，2004，23（1）：62-64.

[3] Ziegler C G，Sicard F，Lattke P，et al.Dehydroepiandrosterone induces a neuroendocrine phenotype in nerve growth factor-stimulated chromaffin pheochromocytoma PC12 cells[J].Endocrinology，2008，149（1）：320-328.

[4] Mario R，Emanuela B，Jim C，et al.Nerve growth factor（NGF）influences differentiation and proliferation of myogenic cells in vitro via TrkA [J].J Devel Neurosci，2000，18（8）：869-885.

[5] Jeon C Y，Jin J K，Koh Y H，et al.Neurites from PC12 cells are connected to each other by synapse-like structures[J].Synapse，2010，64（10）：765-772.

[6] Li D H，Xu H X，Song P，et al.Effect of neuronal differentiation induced by nerve growth factor on the tolerance-dosage of ultraviolet radiation of PC12 cells[J].Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao，2009，31（1）：24-26.

[7] Mohri T，Chiba K，Yamazaki M.Activation of PC12 cells by lipophilic components of Panax ginseng[J].Planta Med，1992，58（2）：321-327.

[8] Liu J H，Jiang B，Bao Y M，et al.Effect of Cuscuts chinensis glycoside on the neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells[J].Int J Devl Neuroscience，2003，21（5）：277-281.

[9] Moon E，Her Y，Lee J B，et al.The multi-herbal medicine Gongjin-dan enhances memory and learning tasks via NGF regulation[J].Neurosci Lett，2009，466（3）：114-119.

[10] Oda M，Inoue M，Hino K，et al.Enhancement effect of polyoxometalates on NGF-induced neurite-outgrowth of PC12 cells[J].Biol Pharm Bull，2007，30（14）：787-790.

（责任编辑：冉明会）