DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.005
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2173-04

论著

全反式维甲酸对 PC_{12} 细胞 AchE 和 ChAT 活性的影响

滕晓华,黄其林,张可成 (第三军医大学附属新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 观察不同浓度全反式维甲酸(RA)诱导 PC_{12} 细胞呈现拟胆碱能神经元表型,以及不同 RA 浓度对 PC_{12} 细胞增殖及细胞凋亡的影响。方法 利用 1~50 μmol/L 浓度 RA 诱导 PC_{12} 细胞,MTT 法、流式细胞仪、TUNEL 法、分光光度法和放射酶学法检测细胞生长曲线和细胞生长周期的变化、细胞凋亡情况、乙酰胆碱酯酶(AchE)和胆碱乙酰基转移酶(ChAT)活性变化。结果 ①1,5,10,20 μmol/L 浓度 RA 均明显增加 ChAT 活性,以 10 μmol/L 浓度时 ChAT 活性最高,超过该浓度后 ChAT 活性呈下降趋势。RA 对 AchE 活性无明显诱导作用。②当浓度大于 10 μmol/L 后 RA 诱导 PC_{12} 细胞凋亡的作用明显增强。③1~50 μmol/L 浓度 RA 均能抑制 PC_{12} 细胞增殖,RA 浓度越高,抑制作用越明显,呈明显的剂量依赖效应。④RA 对细胞周期的抑制作用主要表现于 G_1→S 期。结论 RA 具有诱导 PC_{12} 细胞呈现拟胆碱能神经元表型的作用,10 μmol/L 是最佳诱导浓度。

关键词:全反式维甲酸;PC_{12} 细胞;胆碱能神经元;凋亡
中图法分类号:R345.5;R730.263;R979.1 文献标识码:A

Effects of all-trans retinoic acid on the activities of AchE and ChAT in PC_{12} cells

TENG Xiao-hua, HUANG Qi-lin, ZHANG Ke-cheng (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the cholinergic neuron properties and the changes of proliferation and apoptosis of PC_{12} cell induced by different concentrations of all-trans retinoic acid (RA). Methods PC_{12} cell was induced by RA of concentrations of 1—50 μmol/L. Changes of cell growth curve and cycle, apoptosis and changes of activities of acetylcholinesterase (AchE) and choline acyltransferase (ChAT) were detected by MTT assay, flow cytometry, TUNEL method, spectrophotometry and radiochemistry assay, respectively. Results ① RA significantly enhanced the activity of ChAT with concentrations between 1 to 20 μmol/L. The activity of ChAT with concentration of 10 μmol/L was higher than those with other concentrations. ② The apoptosis of RA-induced PC_{12} cells was markedly enhanced when concentration was higher than 10 μmol/L. ③ A concentration-dependent inhibition of proliferation was demonstrated in the RA-induced PC_{12} cells. ④ PC_{12} cells proliferation was blocked in the G_1→S phase. Conclusion RA can be used to induce PC_{12} cells to show the properties of cholinergic neuron with an optimal concentration of 10 μmol/L.

Key words: all-trans retinoic acid; PC_{12} cell; cholinergic neuron; apoptosis

研究表明维甲酸及其衍生物对肿瘤细胞具有增殖抑制和诱导分化及凋亡的作用,但目前这些作用的分子机制尚不完全清楚。PC_{12} 细胞是大鼠嗜铬细胞瘤单克隆细胞株,该细胞内含有合成多种神经递质的关键酶,因而具有分化为各种神经元递质表型的潜能[1]。本研究利用全反式维甲酸(All-trans retinoic acid, RA)作为诱导分化剂,观察不同浓度 RA 诱导 PC_{12} 细胞呈现拟胆碱能神经元表型,以及不同浓度 RA 对 PC_{12} 细胞生长、增殖及细胞凋亡的影响,探讨 RA 诱导的 PC_{12} 细胞作为胆碱能神经元替代细胞的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 PC_{12} 细胞由中科院上海生物细胞研究所提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养液(美国 Gibco 公司);胎牛血

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070274)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070274)
作者简介:滕晓华(1971—),男,福建省福州市人,硕士,主治医师,主要从事神经变性疾病的基础方面的研究,现在解放军第534医院,洛阳 471000
通信作者:黄其林,电话:(023)68774610
收稿日期:2002-01-22;修回日期:2002-04-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

清(FBS,天津血液制品研究所); RA(Sigma 公司); TUNEL 检测试剂盒(Roche 公司),MTT(Fulka 公司);乙酰胆碱酯酶测试试剂盒(南京建成生物工程研究所);[^{3}H] 乙酰辅酶 A(英国 Amersham 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PC_{12} 细胞常规培养在 50 ml 玻璃培养瓶中,置于恒温细胞培养箱(美国 Shellab 公司)中,培养基为含 5%FBS、100 U/ml 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基(pH 7.2);培养条件:37 ℃ 5% CO_2,湿度 95%,依实验分组在培养基中加入不同浓度的 RA。

1.2.2 实验分组 根据培养基中 RA 终浓度的不同分为:正常对照组(即无 RA 培养基培养的 PC_{12} 细胞);1 μmol/L RA 组;5 μmol/L RA 组;10 μmol/L RA 组;20 μmol/L RA 组;50 μmol/L RA 组。

1.2.3 细胞形态学观察 采用相差显微镜观察及免疫细胞化学方法。将细胞接种于 1.2 cm× 1.2 cm 玻片,加入含不同浓度 RA 的培养基,培养 6 d 后取出玻片,用 0.1 mol/L PBS 漂洗 1 次,4%多聚甲醛固定细胞 10 min,按本室常规方法进行免疫细胞化学染色(S-P 法)[2],一抗分别为羊抗大鼠胆碱乙酰基转移酶(Choline acetyltransferase, ChAT)(抗体稀释度 1∶500)、小鼠抗大鼠乙酰胆碱酯酶(Acetyl cholinesterase, AchE)(抗体稀释度为 1∶100),S-P 试剂盒购自中山公司,DAB 显色、封片、观察。

1.2.4 细胞生长曲线绘制 采用 MTT 法。每组细胞以(1~10)× 10^3/孔接种于 96 孔培养板中,加 200 μl 培养基,分别培养 0、2、4、6、8、10、12、14 d,每组每次分别取 4 孔进行检测;每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 20 μl,置于恒温细胞培养箱继续培养 4 h,弃培养液,加入 DMSO 150 μl,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪(波长 490 nm)检测。以天数为横轴,吸光度(A_{490})为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.2.5 细胞周期分析 细胞接种于 50 ml 细胞培养瓶中,用含不同浓度 RA 的培养基培养 6 d,常规流式细胞仪制样,FACStarplus 型流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)检测。每个样本随机测定 1× 10^4 个细胞,并计算细胞增殖指数。计算方法:增殖指数(%)=(S+G_2/M)/(G_1+S+G_2/M)×100%。

1.2.6 TUNEL 法检测细胞凋亡 接种 PC_{12} 细胞于 1.2 cm× 1.2 cm 玻片上,2 h 后更换为含不同浓度 RA 的培养液,每组分别在培养的 2、5、8 d 取 3 张玻片进行检测。按原位凋亡检测试剂盒说明操作。以无末端转移酶的标记液代替 TUNEL 复合物作阴性对照,以细胞核呈明确的棕黄色为阳性染色,每张玻片随机选择 10 个高倍视野(× 400),计算阳性细胞的百分数,即为细胞凋亡指数。

1.2.7 ChAT 活性的测定 细胞培养 8 d,超声破膜制备细胞匀浆,考马斯亮蓝法行匀浆蛋白定量(以 1~100 μg 牛血清白蛋白为标准品绘制标准曲线)。分别取 200 μl 细胞匀浆,加入 200 μl 磷酸盐缓冲液(含 150 mmol/L NaCl、5 mmol/L EDTA、3 mmol/L 胆碱、0.1 mmol/L 毒扁豆碱、0.2 mmol/L 乙酰辅酶 A、1.85× 10^4 Bq[^{3}H] 乙酰辅酶 A),37 ℃,孵育 30 min;加 200 μl 含 0.15%四苯硼的 3-庚酮中止反应,旋转混合物,从上相中提取 75 μl 进行检测。按公司提供的公式计算 ChAT 活性[3]。

1.2.8 AchE 活性的测定 细胞培养 8 d,制成细胞匀浆,测定 AchE 活性,操作方法和步骤按厂家提供的说明书进行。主要步骤如下:取 50 μl 细胞匀浆,加底物缓冲液和显色应用液各 0.5 ml,混匀,37 ℃准确反应 6 min;加抑制剂 0.03 ml、透明剂 0.1 ml、稳定剂 0.05 ml;混匀,放置 15 min,用 722 分光光度计检测(波长 412 nm,光径 0.5 cm,水调零)。采用试剂盒提供的公式计算 AchE 活性。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用本校数理统计学教研室提供的统计程序包 SPMR,进行两样本均数间 t 检验,多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 不同浓度 RA 对 PC_{12} 细胞形态的影响

与正常对照组细胞相比,添加不同浓度 RA 48 h 后,细胞数目呈下降趋势,培养基中漂浮的细胞增多,呈明显剂量依赖性。以 50 μmol/L RA 组细胞最明显,其细胞数约为对照组的 1/100。培养 6 d,各组细胞数目均有增加,但 RA 浓度越高,细胞数增加越不显著,50 μmol/L RA 组细胞几乎无明显变化。培养 2 周,1~20 μmol/L RA 组细胞数与对照组无明显差别。细胞形态以及突起长度各组间均未见明显差别。

2.2 不同浓度 RA 对 PC_{12} 细胞 ChAT 和 AchE 的影响

免疫细胞化学染色见 ChAT 主要分布于核周,正常对照组呈阳性染色,RA 诱导后呈现强阳性染色;AchE 分布在整个胞浆及细胞突起,各组间染色无明显差异。酶活性测定结果显示,见表 1。不同浓度 RA 对 PC_{12} 细胞的 ChAT 均有诱导作用,10 μmol/L 浓度时 ChAT 活性最高,与对照组相比,ChAT 活性增加约 2 倍($P<0.01$)。但各组间无统计学上的差别。RA 对 PC_{12} 细胞的 AchE 活性无明显影响。

表 1 不同浓度 RA 对 PC_{12} 细胞 ChAT 和 AchE 活性的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of RA at the concentrations of 1—20 μmol/L on the activities of ChAT and AchE in PC_{12} cells($\bar{x}\pm s$)

	PC_{12}	RA concentration(μmol/L)			
		1	5	10	20
ChAT (pmol·mg^{-1}·min^{-1})	58.7±9.76	103.6±12.3**	108.3±14.6**	120.7±15.6**	111.4±18.1**
AchE (pmol·mg^{-1}·min^{-1})	46.3±5.21	46.7±6.01	45.2±5.64	47.2±5.39	46.0±6.12

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* PC_{12}

2.3 不同浓度 RA 对 PC_{12} 细胞生长的影响

2.3.1 不同浓度 RA 对 PC_{12} 细胞生长曲线的影响 从图 1 可以看出,不同浓度 RA 对 PC_{12} 细胞增殖均有影响。随着 RA 浓度的增加,抑制作用越明显,呈剂量依赖趋势。这种抑制增殖作用主要表现为细胞增殖潜伏期延长,对数生长期内细胞倍增时间延长,1、5、10、20、50 μmol/L 不同浓度 RA 处理细胞后,倍增时间:对照组的 1.5 d,其它各组依次延长到 2.0、2.6、2.7、3.0、2.8 d。不同浓度 RA 处理 8 d 后,细胞生长抑制率分别为 7.8%、17.1%、38.0%、50.7%和 97.1%。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

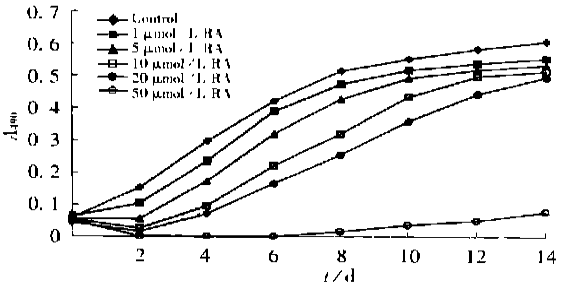


图 1　不同浓度 RA 对 PC_{12} 细胞生长曲线的影响

Fig 1　Cell growth curve of 1—50 μmol/L RA induced PC_{12} cells

2.3.2　不同浓度 RA 对 PC_{12} 细胞生长周期的影响　　与正常对照组相比, 1～50 μmol/L 不同浓度的 RA 对 PC_{12} 细胞生长周期均有作用, 表现为 G_1 期细胞增多, S 期和 G_2/M 期细胞减少, 细胞增殖指数降低, 且 RA 浓度越高, 这种作用越明显, 呈明显的剂量依赖性, 见表 2。

2.4　不同浓度 RA 对 PC_{12} 细胞凋亡的影响

TUNEL 法检测结果显示, RA 诱导 PC_{12} 细胞凋亡的作用与 RA 剂量及作用时间有关。在 1 μmol/L 浓度下细胞凋亡指数为 0.74%, 与 PC_{12} 细胞无明显差别; 但 5、10 μmol/L 时细胞凋亡指数分别为 1.64% 和 3.58%, 与对照组相比($P<0.05$); 但 20、50 μmol/L 两组的细胞凋亡指数分别为 9.34% 和 16.61%, 与对照组相比($P<0.01$), 从作用时间来看, 随着时间的延长, 细胞凋亡比例增加, 表 3 可以看出, 当 RA 浓度高于 10 μmol/L 后, RA 诱导 PC_{12} 细胞凋亡的作用明显增强, 在低浓度时则表现为对细胞生长的抑制作用和诱导分化的作用为主。

表 2　1～50 μmol/L RA 对 PC_{12} 细胞生长周期和增殖指数(PI)的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of RA at the concentrations of 1—50 μmol/L on cell growth cycle and proliferative index of PC_{12} cells(%, $\bar{x}\pm s$)

Item	PC_{12}	RA concentration(μmol/L)				
		1	5	10	20	50
Cell growth cycle						
G_1	58.41±1.64	66.32±1.76	72.94±1.85 *	76.26±2.12 *	76.56±2.75 *	83.12±2.84 **
S	31.79±1.24	26.10±1.04	21.76±0.89 *	19.56±1.06 *	17.45±1.21 **	10.58±1.02 **
G_2/M	9.80±0.11	7.57±0.26	5.30±0.13 *	4.18±0.11 *	5.99±0.14 *	6.29±0.15
PI	41.59±1.48	33.67±1.28	27.06±1.27 *	23.74±2.01 *	23.44±1.66 *	16.87±1.47 **

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* PC_{12}

表 3　1～50 μmol/L RA 对 PC_{12} 细胞凋亡指数的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effects of RA at the concentrations of 1—50 μmol/L on the apoptosis index of PC_{12} cells(%, $\bar{x}\pm s$)

Culture time(d)	PC_{12}	RA concentration(μmol/L)				
		1	5	10	20	50
2	0.45±0.11	0.64±0.10	1.32±0.58 *	2.58±0.74 *	9.34±2.01 **	16.61±3.28 **
5	0.55±0.10	0.77±0.14	1.45±0.41 *	2.72±0.68 *	10.83±2.91 **	20.11±4.01 **
8	0.74±0.16	0.65±0.08	1.87±0.56 *	3.16±0.82 *	14.38±2.67 **	25.31±4.25 **

*: $P<0.05$,　**: $P<0.01$ *vs* PC_{12}

3　讨论

体外分离培养神经元已经成为研究神经细胞形态、功能以及各种病理生理条件对神经元影响的常用方法和手段。然而, 由于神经元的特性及其十分有限的分裂、增殖能力, 迄今为止, 体外分离培养神经元依然面临着许多困难, 尚无法做到神经元的纯化培养, 在一些细胞量需要大、观察时间长的实验研究中, 体外原代培养的神经元很难满足实验的要求。因此, 寻找一种能够反映神经元特性, 具有神经元表型特征的体外替代细胞便成为许多神经科学工作者努力解决的问题之一。

PC_{12} 细胞是一种来源于肾上腺髓质的嗜铬细胞瘤细胞。从发育学的角度来看, 其发生与神经元细胞同源。该细胞含有合成多种神经递质的关键酶, 如 ChAT、酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)等, 但从其递质的特性来说, 有人将其归类为肾上腺素能神经细胞样细胞[4]。研究表明不同物质诱导 PC_{12} 细胞可以使其向不同的神经元表型分化。有资料证实 NGF、GCM 可以诱导 PC_{12} 细胞表达 TH 和 ChAT, 而具有多巴胺能或胆碱能神经元表型特征[5], RA 也有类似的作用。Ichiro 等[1]认为 RA 诱导 PC_{12} 细胞的胆碱能神经元表型作用大于 NGF、GCM 等诱导因子的诱导作用, 而且 RA 在增加 ChAT 表达的同时还抑制了 TH 基因的表达, 从而使 PC_{12} 细胞呈现拟胆碱能神经元特性。这一研究结果提示, 利用 RA 作为诱导物, 使 PC_{12} 细胞呈现胆碱能神经元表型和部分生理特性可能是解决目前神经元体外分离培养困难的一条可行途径。然而, 目前对 RA 诱导 PC_{12} 细胞的胆碱能特性的规律及机制尚不

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

完全清楚，采用多大的 RA 剂量可以获得最大的诱导效果，同时不引起细胞的凋亡，迄今尚无统一的认识[1,6]。众所周知，RA 对肿瘤细胞具有增殖抑制和诱导分化及凋亡的作用。RA 作用的强弱与其剂量的大小有一定关系。RA 量大，被诱导细胞多呈增殖抑制或凋亡状态，而在一定条件下则呈增殖、分化状态。从本实验结果来看，当 RA 的浓度为 10 μmol/L 时，ChAT 的活性最大。此后，随着 RA 浓度的增加，不仅 ChAT 的活性有所下降，而且细胞凋亡的数量明显增加。从细胞生长曲线和增殖周期来看，细胞呈明显的增殖抑制状态，这种抑制增殖的作用呈剂量依赖性。RA 对 AchE 的作用不明显。究其原因，推测可能与 RA 核内的受体有关。业已证实，RA 是通过其细胞核内受体介导而发挥作用的。由于 RA 核内受体数量是一定的。当受体结合 RA 达到饱和时，增加 RA 的量并不能增加其诱导分化作用，相反，其抑制增殖、诱导凋亡的作用却明显增强。结合本实验结果，作者认为 10 μmol/L 的 RA 浓度是诱导 PC_{12} 细胞呈现胆碱能细胞表型变化的最适剂量。

总之，RA 能诱导 PC_{12} 细胞呈现拟胆碱能神经元表型，其作用在一定范围内呈剂量依赖关系，RA 的诱导剂量以 10 μmol/L 为佳。利用 RA 诱导 PC_{12} 细胞呈现拟胆碱能神经元表型，可以作为胆碱能神经元的替代细胞用于某些实验研究。

参考文献：

[1] Ichiro M, Norikazu M, Kenzo K. Cholinergic differentiation of clonal rat pheochromocytoma cells induced by retinoic acid: increase of choline acetyltransferase activity and decrease of tyrosine hydroxylase activity[J]. Brain Res, 1989, 502(10): 53－60.

[2] 黄其林，蔡文琴，张可成. 星形胶质细胞对损伤反应的体外实验研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(3)：315－317.

[3] Ward P, Qing G, Boyd K H, *et al*. Nerve growth factor-independent reduction in choline acetyltransferase activity in PC12 cells expressing mutant presenilin-1[J]. J Biol Chem, 1997, 272(36): 22 397－22 400.

[4] Matsuoka I, Kumagai M, Kurihara K. Differential and coordinated regulation of expression of norepinephrine transporter in catecholaminergic cells in culture[J]. Brain Res, 1997, 776(1-2): 181－188.

[5] Song X, Violin J D, Seidler F J, *et al*. Modeling the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos *in vitro*: macromolecule synthesis in PC_{12} cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1998, 151(1): 182－191.

[6] Okuse K, Mizuno N, Matsuoka I, *et al*. Induction of cholinergic and adrenergic differentiation in N-18 cells by differentiation agents and DNA demethylating agents[J]. Brain Res, 1993, 626(1-2): 225－233.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)24-2176-01

淋巴细胞性垂体炎 1 例

A case report of lymphocytic hypophysitis

何传秀 （重庆合川市人民医院内分泌科，重庆 401520）

患者，女，25 岁。因间断性头痛 2 年，闭经 2 个月伴复视 1 个月入院。13 岁初潮，末次月经：2003 年 1 月，21 岁结婚，育有一女。查体：身高 155 cm，体质量 61 kg。精神萎靡、表情呆板，无皮肤菲薄、紫纹、淤斑，无阴、腋毛脱落。无突眼，左眼活动受限伴复视，视野粗测无缺损。甲状腺不大，手足无增粗、肥厚，双下肢无水肿。辅助检查：血常规、电解质、肝功、血脂及 OGTT 均正常。血沉：55 mm/h，T_3、T_4、FT_3 正常，FT_4、TSH 低，LH、FSH、E_2、T 低，PRL 正常，皮质醇节律：0：00 16.0 nmol/L(0～155.0)，8：00 29.5 nmol/L(198.7～797.5)，16：00 20.2 mmol/L(85.3～451.5)。尿渗透压低，血浆渗透压正常。颅脑 MRI 平扫及增强扫描：①鞍区、右侧海绵窦及斜坡广泛异常信号，考虑肿瘤性病变(如垂体瘤)可能性大；②鼻咽顶壁广泛异常信号，结合鞍区、斜坡病变，非肿瘤性病变不除外。治疗经过：入院后给予强的松 10 mg/d，食欲及一般情况明显改善，并逐渐出现烦渴、多饮、多尿，24 h 尿量达 6 000 ml。遂转神经外科手术治疗，术中发现蝶窦内组织质地坚硬，均为骨性组织，在其中散在分布一些岛状、质地较韧的组织，将岛状组织送冰冻切片检查，初步考虑为“垂体瘤”。术中还将斜坡上端的病变组织切除，病变为有韧性的软组织，冰冻切片病理检查亦初步考虑为“垂体瘤”，与蝶窦内岛状组织一样，至此诊断为垂体瘤。遂按垂体瘤进行手术，切开鞍底硬膜后发现鞍底确实是完整的。切除鞍内肿瘤组织，最后送病理检查的标本有 4 块：蝶窦内的岛状组织、斜坡上端组织、鞍内组织和鞍底硬膜。病理检查显示在垂体细胞间存在大量核深染、胞浆少、呈簇状分布、类似小“煤球”样的细胞。在垂体细胞间存在大量分布不均匀、极少胞浆的细胞，用免疫组织化学染色的方法来明确异常细胞的来源为 B 淋巴细胞，T 淋巴细胞也呈散在分布其中。因此蝶窦内的病变确诊为淋巴细胞性垂体炎。

（下转 2180 页）

作者简介：何传秀(1952－)，女，重庆合川市人，主治医师。电话：(023) 42913981

收稿日期：2003-09-20；修回日期：2003-11-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net