

# 共存递质囊泡循环动力学研究细胞模型的建立

吕 军<sup>1,2</sup>, 何功浩<sup>1,3</sup>, 周 颖<sup>1</sup>, 侯 征<sup>1</sup>, 陈瑛瑛<sup>1</sup>, 薛晓燕<sup>1</sup>, 罗晓星<sup>1</sup>

(1. 第四军医大学药理学系药理学教研室, 陕西西安 710032; 2. 西安交通大学医学院  
第一附属医院药学部, 陕西西安 710061; 3. 成都军区昆明总医院药学部, 云南昆明 650032)

**摘要:**目的 直接证明 PC12 细胞能够合成和分泌组胺(histamine, HA), 为将其应用于交感神经共存递质囊泡循环动力学研究提供实验依据。方法 常规培养 PC12 细胞, 用嵌套 RT-PCR(nRT-PCR) 和 Western blot 技术检测其合成 HA 的关键酶组氨酸脱羧酶(histidine decarboxylase, HDC) 的 mRNA 和蛋白表达, 利用免疫荧光技术观测 HA、HDC 以及 HA 囊泡在细胞中的定位。结果 从基因和蛋白水平均证实了该细胞中表达 HDC, 并利用形态学方法在细胞中检测到 HA、HDC 以及 HA 囊泡的存在。结论 PC12 细胞确实含有 HA, 结合分化型 PC12 细胞与交感神经元相似的特征, 可将其作为交感神经共存递质囊泡循环动力学研究的理想细胞模型。

**关键词:** 组胺; 组氨酸脱羧酶; PC12; 囊泡; 共存递质; 嵌套 RT-PCR(nRT-PCR); 交感神经元

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1671-8259(2011)05-0557-04

## Establishment of cell model used by researching cycle kinetics of vesicles containing co-existence neurotransmitters

LÜ Jun<sup>1,2</sup>, HE Gong-hao<sup>1,3</sup>, ZHOU Ying<sup>1</sup>, HOU Zheng<sup>1</sup>,  
CHEN Ying-ying<sup>1</sup>, XU E Xiao-yan<sup>1</sup>, LU O Xiao-xing<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061; 3. Department of Pharmacy, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming 650032, China)

**ABSTRACT: Objective** To prove directly that PC12 cells can synthesize and secrete histamine (HA) and to provide experimental evidence for researching vesicle recycle kinetics of sympathetic cotransmitter. **Methods** PC12 cells were cultured in the conventional way. RT-PCR and Western blot techniques were used to detect histidine decarboxylase (HDC), the key enzyme, in HA synthesis process. Immunofluorescence technique was used to detect HA, HDC and HA vesicles in the differentiated PC12 cells. **Results** HDC expression could be detected in PC12 cells at both the mRNA and protein levels. Furthermore, immunofluorescence data showed that detectable levels of HA, HDC and HA vesicles were found in PC12 cells. **Conclusion** Since PC12 cells have HA expression and the characteristic similar to that of the sympathetic neuron, they can be used as an ideal cell model for researching vesicle recycling kinetics of sympathetic cotransmitter.

**KEY WORDS:** histamine; histidine decarboxylase; PC12; vesicle; co-existence neurotransmitter; nested reverse transcription-polymerase chain reaction (nRT-PCR); sympathetic neuron

多种神经递质在神经元内共存是神经系统的普遍现象, 神经递质释放的本质是囊泡与突触前膜融合, 进而递质释放。然而不同的共存递质释放时是否会相互影响及如何影响等机制还有待阐明, 故对于共

存递质囊泡释放调控的分子机理尚须详细研究。

1991年我们实验室首先发现了豚鼠心脏交感神经末梢突触前膜存在组胺(histamine, HA) H<sub>3</sub>受体, 并证实该受体被激动后可抑制心脏交感神经释放

收稿日期: 2011-02-22 修回日期: 2011-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30800310); 中国博士后科学基金资助项目(No. 20090451521)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30800310) and the National Science Foundation for Post-doctoral Scientists of China (No. 20090451521)

通讯作者: 罗晓星, 教授, 博士生导师. E-mail: xluo3@fmmu.edu.cn

作者简介: 吕军(1977), 男(汉族), 博士后, 讲师. 研究方向: 分子药理学. E-mail: lu jun\_2002@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2011-05-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1399.R.20110509.1114.002.html>

去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)<sup>[1-2]</sup>, 随后相继被不同国家多个实验室的研究结果证实<sup>[3-6]</sup>。在此基础上, 我们又发现 HA 和 NE 在豚鼠颈上神经节(superior cervical ganglion, SCG) 共存, 在心脏交感神经末梢共释放<sup>[7-8]</sup>, 而且 HA 具有一定的突触效应功能<sup>[9]</sup>, 并首次提出 HA 可能是一种新的交感神经递质。进而通过激光共聚焦显微镜技术和免疫荧光双标技术, 我们在小鼠 SCG、狗 SCG 和腹腔神经节也发现有 HA 和 NE 共存<sup>[10]</sup>。但是还需要深入研究有关交感神经 HA 和 NE 共释放的规律以及 HA 囊泡和 NE 囊泡释放循环动力学等问题, 以阐明共存递质释放的调控机理。

前期, 我们研究主要以豚鼠 SCG 为对象, 研究 HA 和 NE 在交感神经中共存问题。但是由于豚鼠 SCG 个体差异大、取材不便、步骤繁琐、污染几率大、失败率高, 通常会影响到实验进程和结果的准确度, 故本试验试图寻找能够替代豚鼠 SCG 作为研究交感神经 HA/NE 共存相关问题的理想细胞模型。大多数体外进行的囊泡分泌研究都是通过肾上腺嗜铬细胞建立模型<sup>[11]</sup>, 大鼠嗜铬细胞瘤(PC12) 细胞便于培养<sup>[12]</sup>, 增殖和分化的背景知识也被人们熟知, 而且, PC12 细胞与嗜铬细胞相比, 有着更小的囊泡和量子的大小, 与神经元更为相似。因此, 我们选用 PC12 细胞作为研究对象。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 兔抗 HA 多克隆抗体购于美国 Sigma 公司, 兔抗  $\beta$ -actin 多克隆抗体、山羊抗组氨酸脱羧酶(histidine decarboxylase, HDC) 多克隆抗体、HRP-山羊抗兔 IgG、HRP-驴抗山羊 IgG、FITC-驴抗山羊 IgG 和 Texas Red-驴抗兔 IgG 购于美国 Santa Cruz 公司, FM1-43 购于美国 Molecular Probes 公司, ECL 发光试剂盒购于美国 Pierce 公司, Trizol 购于美国 Invitrogen 公司, 逆转录试剂盒购于美国 Fermentas 公司。

**1.2 PC12 细胞培养** PC12 细胞购于第四军医大学神经生物学系。PC12 细胞株置于含 100 mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养基中, 于 37 °C、饱和湿度、50 mL/L CO<sub>2</sub> 环境中培养。细胞 1~2 d 更换培养液 1 次, 细胞丰度达约 70%~80% 时传代, 实验均取对数生长期细胞。

**1.3 HDC 基因 mRNA 的测定** 采用 Trizol 一步法提取 PC12 细胞总 RNA, 用逆转录试剂盒进行逆转录反应, 随后行 PCR 反应。为增加检测灵敏度, 参考 TIPPENS 等<sup>[13]</sup> 的方法, 使用嵌套 RT-PCR(nested reverse transcription-polymerase chain reaction,

nRT-PCR) 法测定 HDC 基因的 mRNA。PCR 反应条件为: 94 °C 1 min, 55 °C 2 min, 72 °C 3 min, 循环 30 次。引物如下: HDC(M29591.1), 产物长度 440 bp, First step——Forward: 5'-AGAGATGGTGGATTACA-TCT-3', Reverse: 5'-TACTTGTCTTGACCCAGAA-3'; Second step——Forward: 5'-ATTGCCCTGCTGGCAGCAAG-3', Reverse: 5'-TTAAAGGTGAAAGGAGTCGGG-3'。 $\beta$ -actin(NM\_031144), 产物长度 445 bp, Forward: 5'-GAGGGAATCGTGCGTGAG-3', Reverse: 5'-CTGGAAGGTGGACAGT-GAG-3'。产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 紫外凝胶成像系统摄影。

**1.4 Western blot 测定 HDC 基因的蛋白表达** 提取 PC12 细胞总蛋白后, 50  $\mu$ g 蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转移至醋酸纤维膜, 50 g/L 脱脂奶室温封闭 1 h 后 1: 1000—抗 4 °C 孵育过夜, 然后 1: 500 二抗室温孵育 4 h, ECL 显影, 凝胶成像分析系统摄影。

**1.5 免疫荧光技术检测 PC12 细胞内 HDC 和 HA 的定位与表达** 40 g/L 多聚甲醛室温固定培养的 PC12 细胞 10 min, 20 g/L BSA 室温封闭 30 min, 1: 1000 兔抗 HA 抗体, 1: 1000 山羊抗 HDC 抗体, 4 °C 孵育 24 h; 1: 100 FITC 驴抗山羊 IgG, 1: 100 Texas Red 驴抗兔 IgG, 室温孵育 3 h; 500 mL/L 缓冲甘油封片, 荧光显微镜观察并摄片。各步骤间(除封闭后) 均用 0.01 mol/L PBS 洗 5 min  $\times$  5 次。阴性对照用 0.01 mol/L PBS 分别取代一抗进行孵育, 其余步骤、条件均相同。

**1.6 PC12 细胞内 HA 和 FM1-43 荧光测定** 培养的 PC12 细胞在高 K<sup>+</sup> (50 mmol/L) + FM1-43 (10  $\mu$ mol/L) 室温 90 s, 不含 FM1-43 的 HEPES 液洗 5 min  $\times$  3 次, 40 g/L 多聚甲醛室温固定 10 min, 20 g/L BSA 室温封闭 30 min; 兔抗 HA 抗体(1: 1000), 4 °C 孵育 24 h; Texas Red 驴抗兔 IgG (1: 100), 室温孵育 4 h, 500 mL/L 缓冲甘油封片, 激光共聚焦显微镜观察并摄片。各步骤间(除封闭后) 均用 0.01 mol/L PBS 洗 5 min  $\times$  5 次。

## 2 结果

**2.1 PC12 细胞内 HDC 基因 mRNA 的测定结果** nRT-PCR 检测发现 PC12 细胞中有 HDC mRNA 表达, 440 bp 处有条带产生(图 1)。

**2.2 HDC 基因蛋白产物的测定结果** Western blot 检测发现 PC12 细胞中有 HDC 蛋白表达, 55 ku 处有条带产生(图 2)。

**2.3 PC12 细胞中 HA 和 HDC 的分布情况** PC12 细胞, 突起已形成, 细胞内有 HA(红)和 HDC(绿)阳

性信号, MERGE 图像显示 PC12 细胞中 HA 和 HDC 分布一致(图 3)。

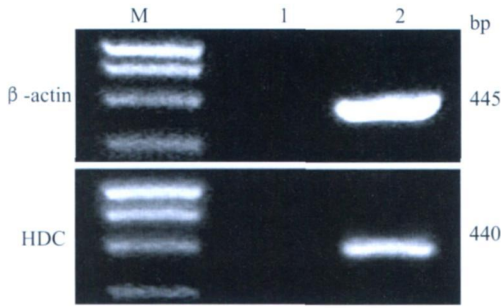


图 1 PC12 细胞 HDC nRT-PCR 分析结果  
Fig.1 nRT-PCR analysis of HDC in PC12 cells  
M: Marker; 1:对照; 2:PC12 细胞。

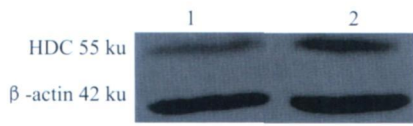


图 2 Western blot 检测 PC12 细胞 HDC 和  $\beta$ -actin 蛋白的表达结果  
Fig.2 Western blot analysis of the protein expressions of HDC and  $\beta$ -actin in PC12 cells  
1:50  $\mu$ g; 2:100  $\mu$ g。

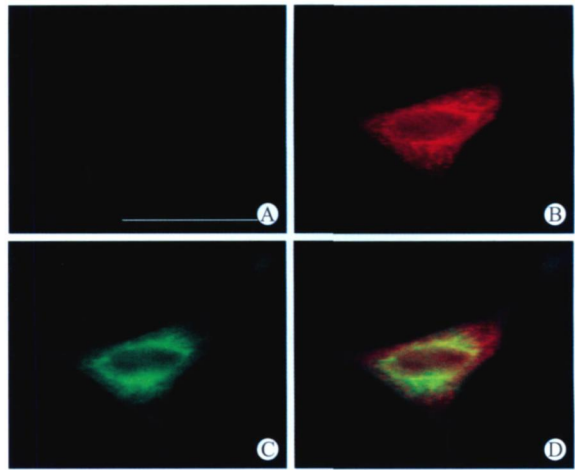


图 4 PC12 细胞 HA 和囊泡荧光染色图像  
Fig.4 Images of fluorescent microscopy showing double stainings for histamine and synaptic vesicle in PC12 cell  
A: 阴性对照; B: HA; C: FM1-43; D: MERGE; Bar= 20 $\mu$ m。

于实验动物,主要是大鼠和小鼠,或者是从屠宰场所获取的牛的嗜铬细胞<sup>[11]</sup>。大鼠 PC12 细胞就是其中之一,其普及主要是因为它对各种药理学的操作处理极具通用性,而且非常容易进行细胞培养,其增殖和分化的背景知识也被人们熟知。而且,PC12 细胞与嗜铬细胞相比,有着更小的囊泡和量子的大小,这一点上与神经元更为相似,因此比较适合作为研究对象。

PC12 细胞系最初于 1976 从大鼠的肾上腺髓质肿瘤中分离获得<sup>[12]</sup>。与肾上腺嗜铬细胞类似,PC12 细胞能够合成并储存多巴胺和 NE,这两种递质都可在以钙离子依赖性的去极化时进行释放<sup>[14]</sup>。PC12 细胞的表型与交感神经节的神经元类似,其内的酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)的活性可通过神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、胰岛素、糖皮质激素、霍乱菌毒素和高平板接种密度的刺激而增强<sup>[15-16]</sup>。作为一个常用的研究神经细胞发育和功能的模型,该细胞株克隆已经使用了 30 多年。当培养基中有动物血清存在时,PC12 细胞呈圆形、胞体明亮,迅速增殖。在此条件下,PC12 细胞表现出许多不成熟神经细胞特性,可以转变成肾上腺嗜铬细胞,也可以变成交感样神经细胞,称为未分化型 PC12 细胞;在 NGF 诱导下,PC12 细胞能分化成交感神经样细胞,具有交感神经元的形态、生化和生理特征,称为分化型 PC12 细胞。后者多作为神经细胞发育和功能的研究模型。本实验就是使用分化型 PC12 细胞,培养后可形成分化成交感神经样细胞,并形成突起。

PC12 细胞能够合成并储存多巴胺和 NE,且其多种生物性状与交感神经元类似,故已广泛应用于神经生物学方面的研究,包括神经分泌研究<sup>[11]</sup>。为了能将

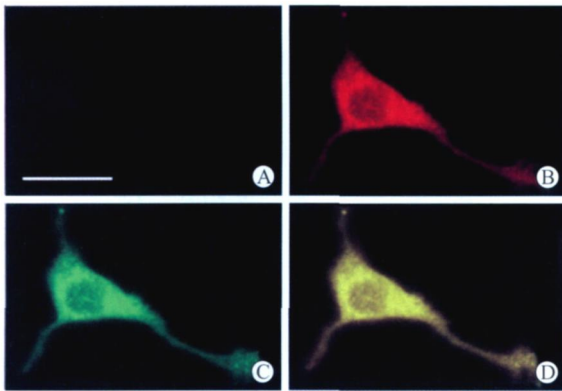


图 3 PC12 细胞 HA 和 HDC 荧光染色图像  
Fig.3 Images of fluorescent microscopy showing double immunostainings for HDC and histamine in PC12 cell  
A: 阴性对照; B: HA; C: HDC; D: MERGE; Bar= 20  $\mu$ m。

2.4 PC12 细胞中 HA 和囊泡的分布情况 PC12 细胞突起已形成,细胞内有 HA(红)和囊泡(绿)阳性信号, MERGE 图像显示黄色为 PC12 细胞中的 HA 囊泡(图 4)。

### 3 讨 论

大多数体外进行的囊泡分泌研究都是通过肾上腺嗜铬细胞建立模型的。利用肾上腺嗜铬细胞进行的神经生物学方面的研究,包括神经分泌研究,涉及范围非常广泛。嗜铬细胞的一项重要特点就是来源

其用于 HA 和 NE 共释放规律的研究,就需要直接证明 PC12 细胞能够合成和分泌 HA。PC12 细胞是否能够合成和分泌 HA 还未见报道。有些文献提示该细胞上含有 HA 受体:氧糖缺乏会伤害 PC12 细胞,肥大细胞缺血培养上清液可以对抗这种伤害并保护细胞, H<sub>1</sub> 受体阻滞剂或抗组胺血清能逆转这种作用<sup>[17]</sup>,提示这种保护作用是组胺依赖性的并通过 H<sub>1</sub> 受体实现;肌肽可以对抗 NMDA 对 PC12 细胞的伤害作用,该作用也可被 H<sub>1</sub> 或 H<sub>3</sub> 受体阻滞剂逆转<sup>[18]</sup>,其保护机制可能是肌肽直接激动 H 受体或代谢成组胺激动 H 受体来实现<sup>[19]</sup>;肌肽还可以对抗  $\beta$ 淀粉样多肽 1-42 (Amyloid $\beta$ 1-42, A $\beta$ 42)对 PC12 细胞伤害作用,该作用可被 H<sub>3</sub> 受体阻滞剂逆转<sup>[20]</sup>;组胺也可以对抗 A $\beta$ 42 对 PC12 细胞的伤害作用,该作用可被 H<sub>2</sub> 或 H<sub>3</sub> 受体阻滞剂逆转<sup>[21]</sup>。以上说明组胺受体可以介导对 PC12 细胞的保护作用,即该细胞上含有 HA 受体。但 PC12 细胞是否含有 HA 呢?目前只有间接报道<sup>[18-19]</sup>,还没有直接证据。本实验从基因(RT-PCR)和蛋白(Western blot)水平证实了该细胞中含有合成 HA 的关键酶 HDC,并利用形态学方法在细胞中观测到 HA 和 HDC 以及 HA 囊泡,结果证明 PC12 细胞确实含有 HA。结合分化型 PC12 细胞的形态、生化和生理特征,即可将其作为 HA 和 NE 共释放规律研究的细胞模型,也就可以替代豚鼠 SCG 作为研究交感神经 HA/NE 共存相关问题的理想细胞模型。

#### 参考文献:

- [1] LUO XX, TAN YH, SHENG BH. Histamine H<sub>3</sub> receptors inhibit sympathetic neurotransmission in guinea pig myocardium [J]. *Eur J Pharmacol*, 1991, 204(3): 311-314.
- [2] LUO XX, SONG L, JIANG YP, et al. Inhibition of sympathetic neurotransmission via NEM-sensitive H<sub>3</sub> receptors in the guinea pig vas deferens [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 1994, 16(3): 185-189.
- [3] ENDOU M, POLI E, LEVI R. Histamine H<sub>3</sub>-receptor signaling in the heart: possible involvement of Gi/Go proteins and N-type Ca<sup>2+</sup> channels [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 269(1): 221-229.
- [4] CHENG ZQ, BOSE D, JACOBS H, et al. Sepsis causes presynaptic histamine H<sub>3</sub> and alpha<sub>2</sub>-adrenergic dysfunction in canine myocardium [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 56(2): 225-234.
- [5] KOYAMA M, HEERDT PM, LEVI R. Increased severity of reperfusion arrhythmias in mouse hearts lacking histamine H<sub>3</sub>-receptors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(3): 792-796.
- [6] YAMAMOTO S, TAMAI I, TAKAOKA M, et al. Role of histamine H<sub>3</sub> receptors during ischemia/reperfusion in isolated rat

- hearts [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, 43(3): 353-357.
- [7] LI M, LUO X, CHEN L, et al. C $\alpha$ -localization of histamine and dopamine-beta-hydroxylase in sympathetic ganglion and release of histamine from cardiac sympathetic terminals of guinea pig [J]. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2003, 23(5-6): 327-333.
- [8] LI M, HU J, CHEN Z, et al. Evidence for histamine as a neurotransmitter in the cardiac sympathetic nervous system [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(1): H45-51.
- [9] HE G, HU J, MA X, et al. Sympathetic histamine exerts different pre- and post-synaptic functions according to the frequencies of nerve stimulation in guinea pig vas deferens [J]. *J Neurochem*, 2008, 106(4): 1710-1719.
- [10] HU J, CHEN T, LI M, et al. Wide distribution and subcellular localization of histamine in sympathetic nervous systems of different species [J]. *Neurosci Res*, 2007, 59(2): 231-236.
- [11] WESTERINK RH, EWING AG. The PC12 cell as model for neurosecretion [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2008, 192(2): 273-285.
- [12] GREENE LA, TISCHLER AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73(7): 2424-2428.
- [13] TIPPEAS AS, DAVIS SV, HAYES JR, et al. Detection of histidine decarboxylase in rat aorta and cultured rat aortic smooth muscle cells [J]. *Inflamm Res*, 2004, 53(8): 390-395.
- [14] GREENE LA, REIN G. Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells [J]. *Brain Res*, 1977, 129(2): 247-263.
- [15] SCHUBERT D, LACORBIERE M, KLIER FG, et al. The modulation of neurotransmitter synthesis by steroid hormones and insulin [J]. *Brain Res*, 1980, 190(1): 67-79.
- [16] TISCHLER AS, PERLMAN RL, MORSE GM, et al. Glucocorticoids increase catecholamine synthesis and storage in PC12 pheochromocytoma cell cultures [J]. *J Neurochem*, 1983, 40(2): 364-370.
- [17] HU W, FAN Y, SHEN Y, et al. Mast cell-derived mediators protect against oxygen-glucose deprivation-induced injury in PC12 cells and neurons [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 423(1): 35-40.
- [18] SHEN Y, HU WW, FAN YY, et al. Carnosine protects against NMDA-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells through carnosine-histidine-histamine pathway and H(1)/H(3) receptors [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 73(5): 709-717.
- [19] SHEN Y, FAN Y, DAI H, et al. Neuroprotective effect of carnosine on necrotic cell death in PC12 cells [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 414(2): 145-149.
- [20] FU Q, DAI H, HU W, et al. Carnosine protects against A $\beta$ 42-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28(2): 307-316.
- [21] 傅秋黎,戴海斌,沈耀,等.组胺对 B 淀粉样蛋白诱导 PC12 细胞阿尔茨海默病体外模型的保护作用 [J]. *浙江大学学报:医学版*, 2007, 36(2): 146-149.

(编辑 国荣)