

# 白肉灵芝水提物促进 PC-12 细胞分化作用研究

熊川<sup>1</sup>, 陈诚<sup>2</sup>, 陈祖琴<sup>1</sup>, 李强<sup>1</sup>, 林杨<sup>1</sup>, 黄文丽<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>四川省农业科学院生物技术核技术研究所, 成都 610061; <sup>2</sup>四川省农业科学院植物保护研究所, 成都 610066

**摘要:**评价白肉灵芝促进 PC-12 细胞分化效果, 并探索作用机制。采用体外培养未分化 PC-12 细胞, 观察其在白肉灵芝水提物诱导下突起生长情况, 结合免疫荧光染色计算分化率, 通过加入细胞分化作用中关键节点特异性抑制剂探索作用机制。在设定范围内, 白肉灵芝水提物处理组分化细胞明显多于对照组, 且浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时效果最佳, 分化比例  $8.73 \pm 0.91\%$ 。添加 TrkA、MEK/ERK1/2 和 PI3K/Akt 的抑制剂, 能显著降低白肉灵芝水提物处理组分化细胞数目。白肉灵芝水提物通过增强 TrkA、MEK/ERK1/2 和 PI3K/Akt 通路能有效促进 PC-12 细胞分化, 具有神经保护功能。

**关键词:**

中图分类号: Q246

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.7.025

## Potential of Neuritogenic Activity of *Ganoderma leucocontextum* on Rat Pheochromocytoma Cells

XIONG Chuan<sup>1</sup>, CHEN Cheng<sup>2</sup>, CHEN Zu-qin<sup>1</sup>, LI Qiang<sup>1</sup>, LIN Yang<sup>1</sup>, HUANG Wen-li<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology and Nuclear Technology Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610061, China; <sup>2</sup>Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of the aqueous extracts of *Ganoderma leucocontextum* on differentiation of rat pheochromocytoma (PC-12) cells. Cytotoxic effects of *G. leucocontextum* aqueous extracts towards PC12 cells were determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The potentiation of neuritogenic activity was assessed by neurite outgrowth stimulation assay and alteration of neuronal morphology was visualized by immunofluorescence staining of the neurofilament. Involvement of cellular signaling pathways, the Trk protooncogene family member, TrkA, mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK1/2) and phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) in mushrooms-stimulated neuritogenesis were examined by using specific pharmacological inhibitors. The aqueous extracts of *G. leucocontextum* caused a marked stimulation of neuritogenesis with no detectable cytotoxic effects towards PC-12 cells. The activation of TrkA, MEK/ERK1/2 and PI3K/Akt signaling pathways were necessary for the NGF and aqueous extracts to promote neuritogenesis. *G. leucocontextum* aqueous extracts may contain NGF-like bioactive compound(s) and had potential neuritogenic effects in preventing and treating neurological disorders.

**Key words:** *Ganoderma leucocontextum*; PC-12 cell; neuritogenic activity

中国灵芝资源十分丰富, 发表并定名的至少有 80 种<sup>[1-3]</sup>。灵芝在中国传统中医中广泛应用, 其药用价值多有论述<sup>[4,5]</sup>, 现代研究证明灵芝具有抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、清除自由基、对放射性损伤及化学治疗药物损伤的保护等作用<sup>[6,7]</sup>。近年来, 灵芝的神经保护作用得到研究。灵芝能够有效促进新

生神经元的分化和减少氧化压力引起的神经元毒性, 具有神经保护功能, 能够预防治疗帕金森综合征 (Parkinson's disease)、阿尔茨海默病 (Alzheimer disease) 等神经系统疾病<sup>[8,9]</sup>, 在保健品、药品研发上具有广阔的应用空间。PC-12 细胞则是目前广泛用来研究神经细胞功能、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 (NGF) 诱导下分化成神经元样细胞。NGF 通过激活酪氨酸激酶相关的受体 TrkA 完成信号转导<sup>[10]</sup>, 抑制 PC-12 细胞增殖、促进分化、诱导细胞长出大量突起, 已被作

收稿日期: 2016-01-26 接受日期: 2016-05-05

基金项目: 四川省青年基金 (2014JQ0054)

\* 通讯作者 Tel: 86-28-84592187; E-mail: wenli11@126.com

为判断细胞是否分化的指标之一<sup>[11]</sup>。白肉灵芝 (*Ganoderma leucocontextum*) 为李泰辉等<sup>[12]</sup>于 2015 年定名并发表,其功效尚未报道,因此本文以大鼠嗜铬神经瘤 PC-12 细胞为模型,评价白肉灵芝水提物对 PC-12 细胞分化的促进作用并探索其作用机制,为白肉灵芝的功效研发提供数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大鼠嗜铬瘤细胞株(PC-12)株由四川省中医药科学院余梦瑶老师惠赠。马血清、胎牛血清购自 Gibco 公司;NGF-7S,一抗 NF-200 购于 Sigma 公司;二抗 Anti-Rabbit IgG Fluorescein isothiocyanate (FITC) 购于 Santa Cruz 公司;TrkA 特异抑制剂 GNF5837, MEK/ERK1/2 特异抑制剂 PD98059, PI3K/Akt 特异抑制剂 LY294002, 购自 Selleck 公司。其余试剂均为分析纯。

样品于 2015 年 6 月采自四川省凉山州会东县淌塘镇(N 26°24'38", E 102°46'46"), 子实体 35 °C 烘干。提取 DNA, 选用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 对子实体 DNA 进行扩增, 电泳检测后, 目的条带进行切胶纯化, 纯化样品送至上海生物工程有限公司进行测序。鉴定结果表明, 该样本为白肉灵芝 *Ganoderma leucocontextum*。

称取白肉灵芝子实体干品 100 g, 粉碎机粉碎, 60 目过筛, 96 °C 水浴提取 6 h, 离心, 收集上清, 过滤, 滤液冻干, 得到白肉灵芝水提物, 命名为 GLH。

### 1.2 PC-12 细胞培养

PC-12 细胞用含体积分数为 2.5% 胎牛血清、15% 马血清、1% 双抗的 F-12K 培养基, 置于含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 隔 2 d 传 1 代, 取对数生长期细胞进行实验。

### 1.3 灵芝水提物对 PC-12 细胞活性影响

取对数生长期 PC-12 细胞以密度  $1 \times 10^5$  个/mL ( $10^4$  个/每孔), 每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔板, 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 培养。待细胞贴壁后, 将细胞分为 6 组, 每组 8 个复孔, 分别为对照组 (100  $\mu$ L F-12K 培养基)、5 个药物处理组 (100  $\mu$ L 终浓度分别为 800、400、200、100 和 50  $\mu$ g/mL 灵芝水提物 F-12K 培养基), CO<sub>2</sub> 培养箱培养 20 h。每孔避光加入 20  $\mu$ L 5 mg/mL 的 MTT, CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 培养 4 h 后, 吸去上清, 每孔加入 150  $\mu$ L DMSO, 振荡 10 min 后, 于 490 nm 波长下测定各孔吸光值(OD)。计算各组

细胞存活率。细胞存活率计算方法为: 细胞存活率 (%) = (实验组 OD 平均值 - 空白组 OD 平均值) / (对照组 OD 平均值 - 空白组 OD 平均值)  $\times$  100%。

### 1.4 灵芝水提物对 PC-12 细胞分化的影响

参考 Syntyche LSS 等<sup>[13]</sup>的方法完成。取对数生长期的 PC-12 细胞以  $2 \times 10^4$  个/孔密度接种于 24 孔板, 接种前 24 孔板用 0.01% 多聚赖氨酸铺板。实验分 6 组, 分别为对照组 (100  $\mu$ L F-12K 培养基), 5 个药物处理组 (1 mL 终浓度分别为 800、400、200、100 和 50  $\mu$ g/mL 灵芝水提物 F-12K 培养基), 1 个阳性对照组 (含 80 ng/mL NGF 的 F-12K 培养基), 以上实验组分别 3 天换液 1 次, 维持培养液药物浓度, 光镜下, 观察长度超过胞体直径 1 倍的细胞突起, 连续观察 7 d, 于第 7 d 每个组任取 3 个视野, 每孔统计 100 个细胞, 计算分化率。分化率 = (长度超过胞体直径 1 倍的细胞数 / 视野中总细胞数)  $\times$  100%。

### 1.5 分化 PC-12 细胞形态观察

参照 Schimmelpfeng J 等<sup>[14]</sup>方法完成免疫荧光反应。按照密度  $5 \times 10^3$  个/孔接种 12 孔板, 细胞贴壁后分别加入 NGF, 200  $\mu$ g/mL 白肉灵芝水提物 (后经验证为最适浓度), 阴性对照为等量 F-12K 培养基, 培养 48 h。取出细胞培养板, 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 清洗后, 加入一抗 NF-200, 4 °C 冰箱过夜, 之后加入二抗 anti-Rabbit IgG-FITC, 避光 37 °C 孵育 1 h, 最后 DAPI 完成细胞核染色, 荧光显微镜观察。

### 1.6 灵芝水提物对 PC-12 细胞分化作用通路探索

按照 1.4 中方法完成铺板, 实验分 5 组, 分别为对照组 (100  $\mu$ L F-12K 培养基), 1 个阳性对照组 (含 80 ng/mL NGF 的 F-12K 培养基) 和抑制剂处理 3 组, 抑制剂处理组预先添加 200  $\mu$ g/mL 白肉灵芝水提物处理 48 h, 之后分别添加 10  $\mu$ M GNF5837, 40  $\mu$ M PD98059 和 30  $\mu$ M LY294002 特异性抑制剂, 抑制剂处理 1 h, 后续试验及统计同 1.4。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度白肉灵芝水提物对 PC-12 细胞活性影响

MTT 法检测各浓度白肉灵芝水提物对 PC-12 细胞作用 24 h 后细胞生长抑制情况。结果显示: 预设的白肉灵芝水提物 5 个浓度对 PC-12 细胞均没有显著性抑制作用 (结果见图 1), 可见, 在实验浓度范

围内,白肉灵芝水提取物对 PC-12 细胞没有毒性,能够开展后续促分化实验。

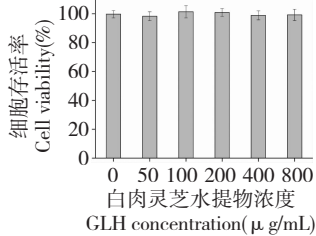


图1 不同浓度白肉灵芝水提取物对 PC-12 细胞活性影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of GLH on viability of PC-12 cells

## 2.2 白肉灵芝水提取物对 PC-12 细胞分化的影响

采用含 80 ng/mL NGF 的 F-12K 培养基处理 PC-12 细胞作为阳性对照,结果显示:阳性对照 NGF 对 PC 细胞分化促进作用最为显著,分化细胞比例达  $12.02 \pm 1.01\%$ ,白肉灵芝水提取物浓度为 100、200、400 和 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,对于 PC-12 细胞分化有明显的促进作用,且 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度促进作用最佳,分化细胞比例为  $8.73 \pm 0.91\%$  (结果见图 2)。

采用 NF-200 抗体处理后,荧光染色观察,细胞核显示蓝色,神经丝蛋白(NF-200)显示绿色。结果表明:添加 NGF 和白肉灵芝水提取物后,PC-12 细胞 NF-200 蛋白表达量明显增加(图 3B、C),图中绿色荧光(箭头标注处)数目明显多于对照组,且 NF-200 蛋白多在已分化出的触手的尖端表达,证明 NF-200 蛋白的表达确实可以作为判定 PC-12 细胞是否分化的标志之一。

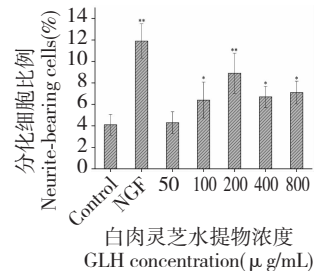


图2 不同浓度白肉灵芝水提取物对 PC-12 细胞分化影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of GLH on the neurotogenic activity of PC-12 cells

注:数值为 3 个重复的平均值  $\pm$  标准误,\* 表示 5% 差异显著性水平,\*\* 表示 1% 差异显著性水平

Note: Values were the means  $\pm$  SE of three replicates. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared to respective controls

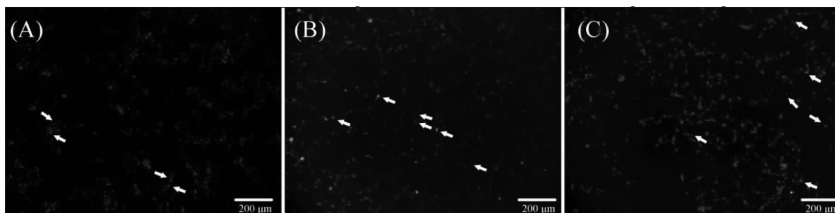


图3 PC-12 细胞免疫荧光染色观察

Fig. 3 Immunofluorescence staining of the neurofilament

注:箭头所示为 NF-200 蛋白,以指示分化细胞

Note: Arrows indicated neurite-bearing cells

## 2.3 白肉灵芝水提取物对 PC-12 细胞分化作用通路探索

采用 10  $\mu\text{M}$  GNF5837、40  $\mu\text{M}$  PD98059 和 30  $\mu\text{M}$  LY294002 特异性抑制剂分别处理细胞后,分别添加 NGF 及白肉灵芝提取物,统计 PC-12 细胞分化情况。结果显示:对照组中,PC-12 细胞自然分化率为  $5.04 \pm 0.96\%$ ,添加抑制剂 GNF5837、PD98059 和 LY294002 后,比例依次降至  $1.98 \pm 0.22\%$ 、 $3.32 \pm 0.28\%$  和  $2.96 \pm 0.24\%$ 。阳性对照组中,添加 NGF 后,PC-12 细胞分化比例为  $13.31 \pm 1.12\%$ ,添

加抑制剂后,依次降至  $4.01 \pm 0.17\%$ 、 $4.98 \pm 0.30\%$  和  $3.21 \pm 0.16\%$ 。实验组选定 GLH 浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (最佳促进分化浓度),分化比例  $9.02 \pm 0.81\%$ ,添加抑制剂后,依次降至  $2.43 \pm 0.16\%$ 、 $3.34 \pm 0.22\%$ 、 $3.01 \pm 0.32\%$  (结果见图 4)。

## 3 讨论与结论

添加 TrkA 特异抑制剂,MEK/ERK1/2 特异抑制剂和 PI3K/Akt 特异抑制剂后,PC-12 细胞分化比例显著降低,说明白肉灵芝水提取物通过这 3 条通路

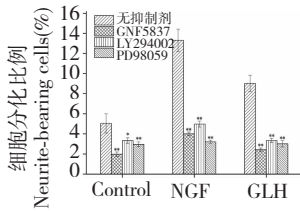


图4 不同抑制剂对 PC-12 细胞分化影响

Fig. 4 Effects of the specific inhibitors of TrkA, MEK/ERK1/2 and PI3K on GLH-stimulated neurite-bearing cells

注: 数值为 3 个重复的平均值  $\pm$  标准误, \* 表示 5% 差异显著性水平, \*\* 表示 1% 差异显著性水平

Note: Values were the means  $\pm$  SE of three replicates. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared to respective controls

促进 PC-12 细胞分化(图 5)。TrkA 是细胞表面的横向跨膜受体,一旦其完成磷酸化,便转化成卡钳结构,募集更多的 NGF 等功能蛋白,介导激活 MEK/ERK1/2 和 PI3K/Akt 通路<sup>[15,16]</sup>。研究证实,许多蘑菇的提取物都可以通过激活 MEK/ERK1/2 通路来促进神经丝蛋白表达。此外,ERK 通路会介导 PC12 细胞的凋亡与分化<sup>[17]</sup>,因此,蘑菇的提取物很有可能具有抑制 PC12 细胞凋亡的作用。结合其促分化效果,一起发挥神经保护功能。

同时,上述抑制剂也能显著抑制 NGF(神经生长因子)对 PC-12 细胞的分化促进作用,说明白肉灵芝水提取物中很可能含有某些拟 NGF 物质,该物质能够促进 PC12 细胞分枝,细胞间分枝相互连接,形成神经突触,进而形成神经网络结构。

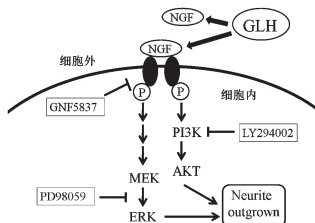


图5 白肉灵芝水提取物促进 PC-12 细胞分化作用机制

Fig. 5 Hypothetic mechanisms of GLH in promoting neurite-bearing cells in PC-12 cells

白肉灵芝有一定促进新生神经元发生的作用,在 NGF 替代物质开发上具有一定的应用前景。已有研究表明,NGF 既能有效促进神经细胞分化,同时又能保护神经细胞免受 6-羟多巴胺、 $\beta$  淀粉样肽等物质损伤,在神经系统中具有重要作用<sup>[18]</sup>。但是,从神经退行性疾病的治疗方案看,NGF 存在天

然缺陷,作为一种大分子物质,NGF 稳定性不高且无法穿过血脑屏障而发挥作用<sup>[19]</sup>。因此,具有神经活性的天然小分子化合物值得深入研究,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,所以,寻找天然的保护和促进神经生长的物质乃是神经科学、药学中的一个热点。综上所述,白肉灵芝中小分子化合物具有广阔的应用前景。

#### 参考文献

- 1 Wang DM, Wu SH, Li TH. Two records of *Ganoderma* new to mainland China. *Mycotaxon*, 2009, 108: 35-40.
- 2 Cao Y, Wu SH, Dai YC. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom "Lingzhi". *Fungal Divers*, 2012, 56: 49-62.
- 3 Cao Y, Yuan HS. *Ganoderma mutabile* sp. nov. from southwestern China based on morphological and molecular data. *Mycol Prog*, 2013, 12: 121-126.
- 4 Meng LZ, Xie J, Lv GP, et al. A comparative study on immunomodulatory activity of polysaccharides from two official species of *Ganoderma* (Lingzhi). *Nutr Cancer*, 2014, 66: 1124-1131.
- 5 Gowrie SU, Chathurdevi G, Rani K. Evaluation of bioactive potential of basidiocarp extracts of *Ganoderma lucidum*. *Int J Pharm Res All Sci*, 2014, 3: 36-46.
- 6 Li NS, Yan CY, Hua DH, et al. Isolation, purification, and structural characterization of a novel polysaccharide from *Ganoderma capense*. *Int J Biol Macromol*, 2013, 57: 285-290.
- 7 Ngai PHK, Ng TB. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. *Biochem Bioph Res Co*, 2004, 314: 988-993.
- 8 Ma CW, Feng MY, Zhai XF, et al. Optimization for the extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their antioxidant and antiproliferative activities. *J Taiwan Inst Chem E*, 2013, 44: 886-894.
- 9 Cheung WM, Hui WS, Chu PW, et al. *Ganoderma* extract activates MAP kinases and induces the neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells. *FEBS Lett*, 2000, 486: 291-296.
- 10 Rende M, Brizi E, Conner J, et al. Nerve growth factor (NGF) influences differentiation and proliferation of myogenic cells *in vitro* via TrkA. *Int J Dev Neurosci*, 2000, 18: 869-885.