

文章编号:1001-6880(2016)7-1139-05

十子代平方水煎液对原代骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型的影响

周雪梅¹,田春雨¹,喇孝瑾¹,陈国林²,张碧溦¹,付茜茹¹,程瑞婷¹,李继安^{1*}¹华北理工大学中医院,唐山 063000;²河北文安县医院,文安 065800

摘要:本实验观察十子代平方对原代骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型的影响,探讨其改善胰岛素抵抗的作用机制。对原代骨骼肌细胞应用 5×10^{-7} mol/L 胰岛素干预 12 h 建立胰岛素抵抗模型,应用十子代平方高、中、低浓度(400、100、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (SZDP-H、SZDP-M、SZDP-L) 对造模成功的骨骼肌细胞进行干预,同时另设正常组、模型组,吡格列酮组(40 $\mu\text{mol}/\text{L}$)作对照,药物干预 24 h 后用葡萄糖氧化酶法测定骨骼肌细胞上清液葡萄糖剩余量,采用 Western-blot 方法测定该方药物干预后骨骼肌细胞 AKT、GSK-3 β 蛋白的表达。实验结果表明十子代平方可以改善骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型的葡萄糖代谢,增加 AKT 和磷酸化位点 Ser473 蛋白表达,降低 GSK-3 β 蛋白表达,增加其磷酸化位点 Ser9 蛋白表达。十子代平方可能通过调节 AKT/GSK3 β 通路的机制改善胰岛素抵抗模型骨骼肌细胞的葡萄糖代谢。

关键词:十子代平方;骨骼肌细胞;胰岛素抵抗;AKT/GSK-3 β

中图分类号:R2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.7.026

Effect of Water Extract of Shizidaiping Prescription on Insulin Resistance of Skeletal Muscle Cells

ZHOU Xue-mei¹, TIAN Chun-yu¹, LA Xiao-jin¹, CHEN Guo-lin²,ZHANG Bi-wei¹, FU Qian-ru¹, CHENG Rui-ting¹, LI Ji-an^{1*}¹College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China;²Hebei Wen'an County Hospital, Wen'an 065800, China

Abstract: To observe the effect of Shizidaiping formula on insulin resistance skeletal muscle cells and to explore its mechanism in improving insulin resistance. Insulin resistant model was developed with 5×10^{-7} mol/L insulin intervention for 12 h. High, middle and low concentrations of Shizidaiping formula (400, 100, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (SZDP-H, SZDP-M and SZDP-L) were then applied on skeletal muscle cells. Pioglitazone (40 $\mu\text{mol}/\text{L}$) was used as positive control. The content of glucose in skeletal muscle cell supernatant was determined by glucose oxidase method and the expressions of AKT and GSK-3 β was detected with Western-blot method. The results showed that Shizidaiping formula can improve glucose metabolism, increase the content of AKT and AKT phosphorylation level, decrease the content of GSK-3 β , and increase GSK-3 β phosphorylation level. Shizidaiping formula improve glucose metabolism through increasing phosphorylation levels of AKT and GSK-3 β .

Key words: Shizidaiping formula; skeletal muscle cell; insulin resistance; AKT/GSK-3 β

十子代平方由菟丝子、女贞子、莱菔子、苏子、车前子、茺蔚子、枸杞子、决明子、栀子、五味子 10 味临床常用中药组成,前期实验研究表明该方可以有效抑制 3T3-L1 脂肪细胞增殖,改善其胰岛素抵抗^[1],但其改善胰岛素抵抗机制尚不十分明确。本实验通过体外建立骨骼肌细胞的胰岛素抵抗模型,观察其

对该模型的葡萄糖代谢的影响,旨在发现十子代平方改善胰岛素抵抗作用的相关机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

选取 3~5 d SD 新生乳鼠,饲养于华北理工大学医学实验动物中心,动物许可证号 SCXK-(军)2014-0001,购买于中国人民解放军军事医学科学院动物实验中心。

收稿日期:2016-03-28 接受日期:2016-05-20

基金项目:河北省国际科技合作计划(13392502D)

*通讯作者 Tel:86-315-3726292;E-mail:lnyy@vip.sina.com

1.2 药物与试剂

十子代平方由菟丝子、女贞子、莱菔子、苏子、车前子、茺蔚子、枸杞子、决明子、栀子、五味子等组成,购于北京同仁堂唐山连锁药店有限公司,由田春雨副教授鉴定;盐酸吡格列酮片(北京太洋药业有限公司,批号:H20040267);DMEM 高糖培养液(Gibco 公司,批号:8115031);无酚红 DMEM 高糖培养液(Gibco 公司,批号:1042204);胎牛血清(GEMINI 公司,批号:A97D00E);青/链霉素即双抗(HyClone 公司,批号:J130054);MTT 试剂盒(碧云天生物技术研究所,产品编号:C0009);葡萄糖测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号:143331);胰岛素注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司,批号:1406219);AKT(万类生物科技,14103020);Anti-AKT1(phospho S473)(艾博抗上海贸易有限公司,批号:ab81283);GSK-3 β (万类生物科技,批号:15030920);Anti-GSK3 beta(phospho S9) antibody(艾博抗上海贸易有限公司,批号:ab131097);GAPDH(巴傲得生物科技有限公司,批号:AA56133)。

1.3 主要仪器

BS224S 精密电子天平(德国 SARTORIUS 公司);M200PRO 酶标仪(瑞士 TECAN 公司);生物安全柜(美国 Thermo Scientific 公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司)。

2 实验方法

2.1 药物提取方法

十子代平方中菟丝子、莱菔子、车前子、茺蔚子、枸杞子、决明子、女贞子、栀子、苏子、五味子按照重量比 3:3:2:2:2:2:2:2:2 的比例混合并粉碎成粗末,加 8 倍量水煎煮 8 h,静置 12 h 后 12000 rpm 离心取上清液备用。

2.2 原代细胞取材与培养^[2]

将 3~5 d SD 乳鼠放入 75% 酒精浸泡消毒,取乳鼠后肢肌肉放入培养皿,将其剪 0.1³ cm 小块,PBS 清洗 3 次,去除血液,剔除脂肪、结缔组织及骨骼,DMEM 培养液(含 10% FBS + 2% 双抗 + DMEM 培养基)清洗 3 次,用眼科弯镊将肌肉小块移入培养瓶,尽量均匀平行排开,将培养瓶翻转倒置在含 5% CO₂,37 °C 的细胞培养箱中培养。2 h 后将培养瓶正置,加入 2~3 mL 培养液,继续培养,3 d 后观察细胞,待细胞从组织爬出将培养瓶内培养液补足到 6~8 mL 继续培养,隔天换液。5 d 后观察细胞,

细胞长满后用 DMEM 清洗,2~3 次,加入 0.25% 胰酶消化液 1 mL,镜下观察细胞,待细胞收缩成圆形,加入消化终止液(含 20% FBS + DMEM)2 mL 终止消化,按照 1 瓶传 3 瓶进行传代,传代后细胞加入 CO₂ 培养箱培养,隔天换液。

2.3 原代骨骼肌细胞造模及药物干预^[3,4]

采用差速贴壁法对细胞进行纯化,将第 2 代骨骼肌细胞按照 2×10^4 接种到 96 孔板中进行培养、待细胞长至 70% 时改用诱导液(2% FBS + 1% 青/链霉素 + DMEM)诱导分化,长出肌管后将 96 孔板中的培养液倒掉,用 PBS 清洗 3 次,每孔加入(2% FBS + 1% 双抗 + 无酚红 DMEM)的无酚红诱导液 180 μ L,加入胰岛素 20 μ L,设不同胰岛素浓度(5×10^{-5} 、 5×10^{-6} 、 5×10^{-7} 、 5×10^{-8} 、 5×10^{-9} mol/L),并设正常孔(不加胰岛素),在干预 12 h 后用葡萄糖氧化酶法测定细胞上清液的葡萄糖含量,并采用 MTT 方法检测细胞活力,确定胰岛素造模浓度。骨骼肌细胞造模成功后用 PBS 清洗 3 次,加入无酚红诱导液 180 μ L,参考相关文献^[1]并经过反复摸索确定十子代平方浓度,SZDP-H,SZDP-M,SZDP-L(400、100、25 μ g/mL)对骨骼肌细胞进行干预,同时设正常组,模型组,盐酸吡格列酮组(40 μ mmol/L)^[5]干预 24 h 后测定细胞上清葡萄糖含量。

2.4 原代骨骼肌细胞鉴定^[2]

待细胞长至 70% 时改用诱导液(2% FBS + 1% 双抗 + DMEM)诱导分化,诱导 5~7 d,PBS 清洗 3 次,用 2.5% 戊二醛固定 30 min,PBS 清洗 3 次,加入 1% TritonX-100 干预 10 min,蒸馏水洗 3 次,再加入 0.2% 考马斯亮兰(R-250)溶液,染色 30 min,蒸馏水漂洗 3 次,显微镜下观察。

2.5 Western-blot 方法观察十子代平方对 AKT/GSK-3 β 信号通路的影响

按照上述方法对细胞进行药物干预,干预后 PBS 清洗 2~3 次,用细胞刮轻轻刮下细胞,加入细胞裂解液(裂解液 + 1% PMSF)250 μ L,裂解 30 min,整个过程需在冰上完成,将裂解好的蛋白收集于冻存管,-20 °C 冻存待用。Western-blot 方法检测相关蛋白表达量。

2.6 统计学处理

实验数据应用 SPSS 20.0 软件及 Excel 2007 进行分析,实验结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐采用 LSD 法,不齐采用 Dunnett's T3 法, $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 原代骨骼肌细胞取材结果

原代骨骼肌细胞 3 d 后开始由组织块爬出,围绕组织块向外平行排列生长,5 d 后大量骨骼肌细胞从组织块爬出,细胞大多呈梭形,少许不规则图形。

3.2 原代骨骼肌细胞诱导结果

不经诱导骨骼肌细胞形状多为三角形、多边形等,形状不规则,排列没有规律性,经诱导后细胞开始出现肌管,肌丝结构明显,且逐渐转为梭形,开始

有规律生长。

3.3 高胰岛素诱导骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型

不同浓度胰岛素作用于骨骼肌细胞 12 h 后测定细胞上清液葡萄糖含量, 5×10^{-7} mol/L、 5×10^{-6} mol/L、 5×10^{-5} mol/L 浓度胰岛素组与正常组比较存在显著性差异($P < 0.05$),其他组与正常组比较没有差异;不同浓度胰岛素作用于骨骼肌细胞 12 h 后检测细胞活力, 5×10^{-7} mol/L 胰岛素组与正常组比较没有差异,对细胞活力没有影响, 5×10^{-6} mol/L、 5×10^{-5} mol/L 浓度胰岛素干预后骨骼肌细胞活力有所下降,最终确定骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型造模浓度为 5×10^{-7} mol/L(见表 1)。

表 1 胰岛素干预 12 h 后细胞上清葡萄糖含量及细胞活力比较($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of glucose contents in cell supernatant and cell viability after insulin intervention 12 h ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

分组 Group	细胞上清葡萄糖含量 Glucose concentration in cell supernatant (mmol/L)	MTT(OD)
正常组 Normal group	16.06 ± 0.13	0.35 ± 0.01
5×10^{-9} mol/L 胰岛素 Insulin	17.11 ± 1.06	0.36 ± 0.01
5×10^{-8} mol/L 胰岛素 Insulin	17.24 ± 0.51	0.34 ± 0.03
5×10^{-7} mol/L 胰岛素 Insulin	$18.38 \pm 0.66^*$	0.33 ± 0.02
5×10^{-6} mol/L 胰岛素 Insulin	$18.46 \pm 0.28^*$	$0.30 \pm 0.03^*$
5×10^{-5} mol/L 胰岛素 Insulin	$18.85 \pm 0.18^*$	$0.29 \pm 0.02^*$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, * $P < 0.05$.

3.4 十子代平方对骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型葡萄糖代谢的影响

细胞上清葡萄糖含量测定结果(见表 2),与正常组比较,模型组、SZDP-L 组明显偏高($P < 0.05$),

表 2 十子代平方对胰岛素抵抗模型细胞培养上清液中葡萄糖含量的影响($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 The effect of Shizidaiping prescription on glucose concentration in cell supernatant of insulin resistance skeletal muscle ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

分组 Group	细胞上清葡萄糖含量 Glucose concentration in cell supernatant (mmol/L)
正常 Normal	21.53 ± 1.24
模型 Model	$24.69 \pm 0.97^*$
吡格列酮 Pioglitazone	$22.66 \pm 1.56^\Delta$
十子代平方高剂量 SZDP-H	$21.84 \pm 1.24^\Delta$
十子代平方中剂量 SZDP-M	$22.50 \pm 1.46^\Delta$
十子代平方低剂量 SZDP-L	$24.00 \pm 0.81^*$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^ $P < 0.05$ 。

Note: compared with normal group, * $P < 0.05$; compared with model group, ^ $P < 0.05$.

3.5 十子代平方对骨骼肌细胞胰岛素转导信号 AKT/GSK-3β 表达的影响

SZDP-H、SZDP-M 组没有显著性差异($P > 0.05$),与模型组比较,各治疗组均存在显著差异($P < 0.05$);与正常组比较,其磷酸化位点 Ser473 蛋白表达量与

如图 1、表 3,AKT 蛋白表达量与正常组比较,

SZDP-H、SZDP-M、SZDP-L 组无显著性差异 ($P > 0.05$) , 与模型组比较, SZDP-H、SZDP-M、SZDP-L 组均存在显著性差异 ($P < 0.05$) ; 模型组及 SZDP-M 组较正常组 GSK-3 β 表达量偏高 ($P < 0.05$) , SZDP-L 组、SZDP-H 组、盐酸吡格列酮组 GSK-3 β 表达量较

模型组偏低, 存在显著差异 ($P < 0.05$) 。其磷酸化位点 Ser9 蛋白量表达, 与正常组比较, 模型组显著降低 ($P < 0.05$) , 与模型组比较, 各治疗组显著升高。

表 3 十子代平方对胰岛素抵抗模型细胞 AKT/GSKS-3 β 蛋白表达及其磷酸化的影响 ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 The effect of Shizidaiping prescription on AKT /GSK-3 β protein expression and phosphorylation in cells of insulin resistance skeletal muscle ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

分组 Group	AKT/GAPDH	p-AKT/AKT	GSK-3 β /GAPDH	P-GSK-3 β /GSK-3 β
正常 Normal	1.73 ± 0.15	0.42 ± 0.04	0.79 ± 0.05	0.77 ± 0.01
模型 Model	$0.88 \pm 0.09^*$	$0.24 \pm 0.06^*$	1.06 ± 0.10	$0.28 \pm 0.02^*$
吡格列酮 Pioglitazone	$1.29 \pm 0.05^{*\Delta}$	$0.29 \pm 0.01^*$	$0.81 \pm 0.06^{\Delta}$	$0.64 \pm 0.05^{*\Delta}$
十子代平方高剂量 SZDP-H	$1.43 \pm 0.14^{\Delta}$	$0.36 \pm 0.02^{\Delta}$	$0.87 \pm 0.08^{\Delta}$	$0.75 \pm 0.02^{\Delta}$
十子代平方中剂量 SZDP-M	$1.53 \pm 0.19^{\Delta}$	$0.44 \pm 0.06^{\Delta}$	$0.95 \pm 0.06^*$	$0.65 \pm 0.02^{*\Delta}$
十子代平方低剂量 SZDP-L	$1.22 \pm 0.33^{*\Delta}$	$0.42 \pm 0.07^{\Delta}$	$0.81 \pm 0.01^{\Delta}$	$0.69 \pm 0.01^{*\Delta}$

注:与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

Note: compared with normal group, * $P < 0.05$; compared with model group, $^{\Delta}P < 0.05$.

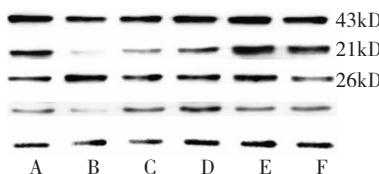


图 1 正常组(A)、模型组(B)、吡格列酮组(C)及十子代平方高(D)、中(E)、低(F)剂量组对胰岛素抵抗模型细胞 AKT/GSKS-3 β 蛋白表达及其磷酸化的影响

Fig. 1 The expression and phosphorylation of AKT/GSK-3 β protein in cells of insulin resistance skeletal muscle from normal group (A), model group (B), pioglitazone group (C), SZDP-H group (D), SZDP-M group (E) and SZDP-L group (F)

4 讨论

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病的病理基础, 它是指骨骼肌、肝脏以及脂肪等胰岛素靶组织对胰岛素敏感性降低, 其生物效应低于正常水平的一种病理生理状态。其中骨骼肌是机体消耗葡萄糖的主要器官, 胰岛素刺激所致的葡萄糖摄取与消耗约 80% 是由骨骼肌完成的, 骨骼肌组织在胰岛素抵抗中占有重要地位, 因此, 本研究以骨骼肌细胞为研究对象, 探讨十子代平方改善胰岛素抵抗的作用机制。

磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 通路为胰岛素主要信号传导通路, 其中 Akt 作为 PI3K 信号通路的主要下游分子, 是一种丝氨酸-苏

氨酸蛋白激酶, 其受到包括胰岛素在内的多种激素及生长因子的调节, PI3Ks 的调节亚基在细胞膜上与相应的受体或受体结合蛋白结合后, 其催化亚基被激活并催化生成 PIP3, PIP3 在细胞膜上募集含有 PH 结构域的 PDK1 及 Akt, PDK1 首先磷酸化位于 Akt 激酶催化区的 Thr308 位点, 之后 PDK2 磷酸化位于调节域的 Ser473 位点, 该位点的磷酸化激活 Akt, 进而刺激 GSK-3 β 磷酸化, 调节葡萄糖摄取、糖原合成、糖酵解等胰岛素代谢反应。糖原合成酶激酶-3 (GSK-3) 是糖原合成途径中的一种关键酶, 主要通过磷酸化糖原合成酶使其失活, 从而阻止糖原合成, 导致血糖升高。GSK-3 分为 GSK-3 α 和 GSK-3 β 两种亚型, 在骨骼肌中主要通过 GSK-3 β 发挥作用。发生胰岛素抵抗时, AKT、GSK-3 β 等调节因子表达异常。AKT 是维持血糖代谢平衡的必要基因, 敲除 AKT 基因后, 骨骼肌对血糖摄取减少^[6]。胰岛素刺激时, Akt 的磷酸化进一步使 CSK-3 β 在其 Ser9 磷酸化, 导致 GSK-3 β 的活性降低, 导致糖原合酶降低磷酸化, 激活的糖原合酶导致糖原合成增加进而降低血糖^[7]。

本研究以 SD 新生乳鼠原代骨骼肌细胞为研究对象, 高胰岛素干预建立胰岛素抵抗细胞模型, 观察十子代平方对该模型细胞葡萄糖代谢的影响, 探讨其作用机制, 实验结果显示 5×10^{-7} mol/L 胰岛素干预 12 h 时骨骼肌细胞上清葡萄糖含量较正常组高,

但 MTT 测定细胞活性与正常组无差异,确定 5×10^{-7} mol/L 胰岛素干预 12 h 为骨骼肌细胞的胰岛素抵抗造模的最佳浓度与时间。十子代平方可以增加胰岛素抵抗的骨骼肌细胞的葡萄糖消耗量,表明其具有改善胰岛素抵抗的作用,十子代平方可以增加 AKT 及其磷酸化位点 Ser473 的蛋白表达,降低 GSK-3 β 蛋白表达,增加其磷酸化位点 Ser9 蛋白表达,推测该方可能是通过调节 AKT/GSK-3 β 蛋白表达改善骨骼肌胰岛素抵抗。

参考文献

- 1 Fu QR(付茜茹), Li JA(李继安), Qiu CL(邱昌龙), et al. The effect of Shizidaiping formula aqueous extract on cells proliferation and insulin resistance. *World Latest Med Inf*(世界最新医学信息文摘), 2016, 16: 134-135.
- 2 Yang L(杨亮), Chi G(迟戈), Zhang J(张俊), et al. Skeletal muscle models of insulin resistance induced by L6 cell line. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res* (中国组织工程研究与临床康复), 2009, 2: 248-251.

(上接第 1138 页)

- 11 Obermeier A, Bradshaw RA, Seedorf K, et al. Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *EMBO J*. 1994, 13: 1585-1590.
- 12 Li TH, Hua HP, Deng WQ, et al. Ganoderma leucoconatum, a new member of the *G. lucidum* complex from southwestern China. *Mycoscience*, 2015, 56: 81-85.
- 13 Ling SS, Murali ND, Pamela D, et al. Potentiation of neuritogenic activity of medicinal mushrooms in rat pheochromocytoma cells. *BMC Complement Altern M*, 2013, 13: 157-167.
- 14 Schimmelpfeng J, Weibezaahn KF, Dertinger H. Quantification of NGF dependent neuronal differentiation of PC-12 cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth. *J Neurosci Methods*, 2004, 139: 299-306.
- 15 Phan CW, David P, Naidu M, et al. Neurite outgrowth stimulatory effects of culinary-medicinal mushrooms and their tox-

- 3 Ma JT(马洁桃), Zhang L(张岭), Lai WQ(来伟旗), et al. The effect of mangiferin on glucose consumption of L6 cell and the study of its molecular mechanism. *Chin Prev Med*(中国预防医学杂志), 2013, 13: 662-666.
- 4 Ding J(丁娇), Wang DF(王涤非), Yang HJ(杨慧晶), et al. Influence of pioglitazone to insulin resistance skeletal muscle cells on PTEN proteins expression and cell apoptosis. *China J Mod Med*(中国现代医学杂志), 2013, 23: 24-28.
- 5 Hou SF(侯士方), Meng X(孟馨), Xiang HB(相泓冰), et al. Primary culture and identification of rat skeletal muscle cells. *Res Explor Labor* (实验室研究与探索), 2011, 30: 26-28.
- 6 He JH(何金花). The expressions of PI3K, AKT-1, AKT-2 and NF κ B in the skeletal muscle of type 2 diabetic osteoporosis rats. Shijiazhuang: Hebei Medical University(河北医科大学), MSc. 2012.
- 7 Chi SQ(迟毓婧), Li J(李晶), Guan YF(管又飞), et al. PI3K / Akt signaling Axis in regulation of glucose homeostasis. *Chin J Biochem Molecul Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 2010, 26: 879-885.

- icity assessment using differentiating Neuro-2a and embryonic fibroblast BALB/3T3. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13, 261-271.
- 16 Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Sci*, 1995, 270: 1326-1331.
- 17 Williams B, Dwyer DS. Structure-based discovery of low molecular weight compounds that stimulate neurite outgrowth and substitute for nerve growth factor. *J Neurochem*, 2009, 110: 1876-1884.
- 18 Li DM(李冬梅), Sun HP(孙慧萍), Yan FQ(阎赋琴). Pharmacodynamic study on the therapeutic effect of nerve growth factor on optic nerve injury in rats. *Acta Labora Anim Sci Sin*(中国实验动物学报), 2008, 2: 150-152.
- 19 Vaudry D, Stork PJ, Lazarovici P, et al. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Sci*, 2002, 296, 1648-1649.