



УДК 57.053:576.535

ВЛИЯНИЕ СЕРОТОНИНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК ФЕОХРОМОЦИТОМЫ PC12

ПОСЫПАНОВА Г. А., *ГОЛУБЕВА Е. Е., **КОНДРАТЬЕВ А. Д.,
СУВОРОВ Н. Н., СЕВЕРИН Е. С.

Институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова.

*Институт прикладной молекулярной биологии МЗ СССР.

**Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва

Исследовано влияние серотонина и некоторых его агонистов на морфологическую дифференцировку и пролиферативную активность клеток феохромоцитомы PC12. Показано, что под действием серотонина происходит индукция роста нейритов и снижение включения [³H]тимидина в ДНК клеток PC12. Исследованы параметры этих процессов. Обнаружено усиление эффекта серотонина фактором роста нервов. Показано отличие друг от друга механизмов индукции дифференцировки клеток PC12 серотонином, фактором роста нервов и соединениями, повышающими внутриклеточный уровень cAMP.

Клеточная линия PC12 была получена Greene и Tischler [1] путем клонирования опухолевых клеток крысиной феохромоцитомы, являющихся продуктом неопластической трансформации хромаффинных клеток паренхимы мозгового слоя надпочечников. В ходе эмбрионального развития хромаффинные клетки ведут свое происхождение из той же группы клеток, из которой впоследствии образуются ганглии симпатического брюшного сплетения [2]. Таким образом, PC12 являются клетками нейронального происхождения. Линия клеток PC12 стала удобной моделью для изучения дифференцировки симпатических нейронов. Под действием фактора роста нервов (ФРН) эти клетки, обычно круглые или полигональные, прекращают пролиферацию и принимают характерную для симпатического нейрона форму, образуя сеть разветвленных нейритов. Этот процесс сопровождается целым рядом биохимических изменений, характерных для развивающегося симпатического нейрона, таких как индукция биосинтеза АХЭ [3], появление электровозбудимости [4] и т. д. Механизм действия ФРН в настоящее время не ясен. Удобным подходом к его изучению является поиск соединений, способных имитировать действие ФРН на клетки-мишени. Недавно было показано, что ряд онкогенов (V-src, gas) способен стимулировать ФРН-подобную дифференцировку клеток PC12 [5, 6]. Индукция роста нейритов наблюдалась в

ряде случаев при повышении внутриклеточного уровня сАМР [7, 8], причем эффект был синергичен действию ФРН.

Целью исследования явилось изучение влияния нейромедиатора серотонина на пролиферативную активность клеток РС12 и их морфологическую дифференцировку. Ранее было показано, что клетки РС12 обладают высокоаффинной системой поглощения серотонина [9], однако длительное действие серотонина на эти клетки не было исследовано. В данной работе показано, что при длительной инкубации клеток РС12 с серотином наблюдается индукция морфологической дифференцировки и снижение интенсивности клеточной пролиферации.

Материалы и методы

Клетки феохромоцитомы РС12, субклонированные по повышенной адгезии к субстрату [10], культивировали на среде RPMI 1640, содержащей 7,5% термонактивированной лошадиной сыворотки («Flow»), 7,5% эмбриональной телячьей сыворотки («Serba»), 50 мкг/мл стрептомицина и 50 Ед/мл пенициллина в пластиковых культуральных флаконах площадью 75 см² («Greiner»). Клетки инкубировали при 37° в увлажненной атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% CO₂.

Для определения индекса клеток с нейритами, клетки снимали с субстрата, тщательно ресуспендировали и высевали с низкой плотностью ($5-10 \times 10^3$ клеток на мл) в 12-луночные платы («Flow»). При необходимости, после распластывания клеток по субстрату, среду с сывороткой удаляли, клетки промывали бессывороточной средой 3 раза по 10 мин и осуществляли дальнейшую инкубацию в среде без сыворотки. К клеткам стерильно добавляли фактор, тестируемый на нейритстимулирующую активность. После окончания инкубации среду удаляли, клетки промывали два раза солевым раствором Хэнкса и фиксировали 15 мин в смеси этанол-уксусная кислота (3:1). Подсчет клеток с нейритами проводили с помощью фазово-контрастной микроскопии при увеличении $\times 160$. Число клеток с нейритами подсчитывали в 2—3 тысячах клеток с 5 препаратов и выражали в процентах. Фотографии клеток получали с помощью инвертированного микроскопа («Orion») с применением дифференциально-интерференционного контраста при увеличении $\times 160$.

Пролиферативную активность клеток РС12 определяли по модифицированному методу Rubin [11]. Клетки высевали в 24-луночные платы и инкубировали как описано выше. За 16 ч до окончания опыта (кроме специально оговоренных случаев) в среду вводили [³H]тимидин (20 Ки/ммоль) в конечной концентрации 1 мкКи/мл. После окончания инкубации среду удаляли, клетки промывали два раза солевым раствором Хэнкса, фиксировали 5%-ной ТХУ два раза (10 мин и 5 мин) при 4° и экстрагировали ДНК 0,6 мл 10% ТХУ в течение 2 ч при 70°. По 0,5 мл экстракта вносили во флаконы, содержащие по 5 мл диоксанового сцинтиллятора и измеряли радиоактивность на жидкостном спектрометре «Interiechnique SL-30» (Франция).

Количество живых клеток определяли с помощью гемоцитометра в присутствии трипанового синего. ФРН выделяли из семенной плазмы быка по методу Кондратьева и соавт. [12]. Концентрацию белка определяли по методу Bradford [13].

Результаты и обсуждение

Влияние серотонина на морфологию клеток РС12 определяли, культивируя их на среде, содержащей сыворотку в течение 5 суток. Было обнаружено, что серотонин способен индуцировать рост нейритов у части клеток РС12. Морфология стимулированных серотонином клеток приведена на рис. 1 в сравнении с клетками, обработанными фактором роста нервов. Зависимость величины индекса клеток с нейритами (N_i) от времени инкубации с серотонином представлена на рис. 2. Из данных, приведенных на рис. 2, следует, что уже на 1-е сутки после добавления серотонина у части клеток (N_i 10,1%) появляются нейриты. К 5-м суткам величина N_i достигает 40,5%, что близко к значению N_i для клеток, обработанных ФРН в течение того же времени (N_i 56,7%). Ранее было показано, что рост нейритов у клеток РС12, культивируемых на среде

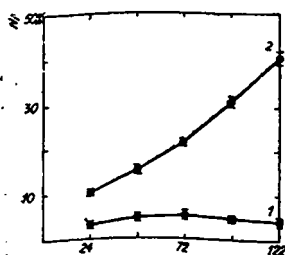


Рис. 2. Зависимость индекса клеток с нейритами (N_i , %) от времени инкубации с серотонином. 1— N_i в контрольной культуре; 2— N_i в присутствии серотонина (0,5 мМ)

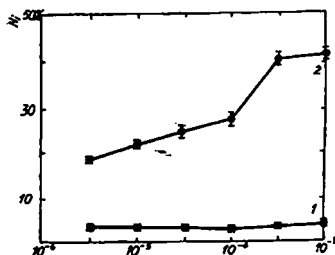


Рис. 3. Зависимость индекса клеток с нейритами (N_i , %) от концентрации серотонина на 5-е сутки инкубации. 1— N_i в контрольной культуре; 2— N_i в присутствии серотонина

без сыворотки, индуцируется уже на 1-е сутки инкубации с ФРН, достигая величины N_i около 40%. В случае серотонина, перевод клеток на бессывороточную среду не приводил к ускорению индукции роста нейритов или изменению характера временной зависимости, представленной на рис. 2. Совместное добавление серотонина (0,5 мМ) и ФРН (1,9 нМ) приводило к взаимному усилению эффекта (N_i на 5-е сутки 73,5%) (рис. 1, 2). Индукция роста нейритов начинала детектироваться при кон-

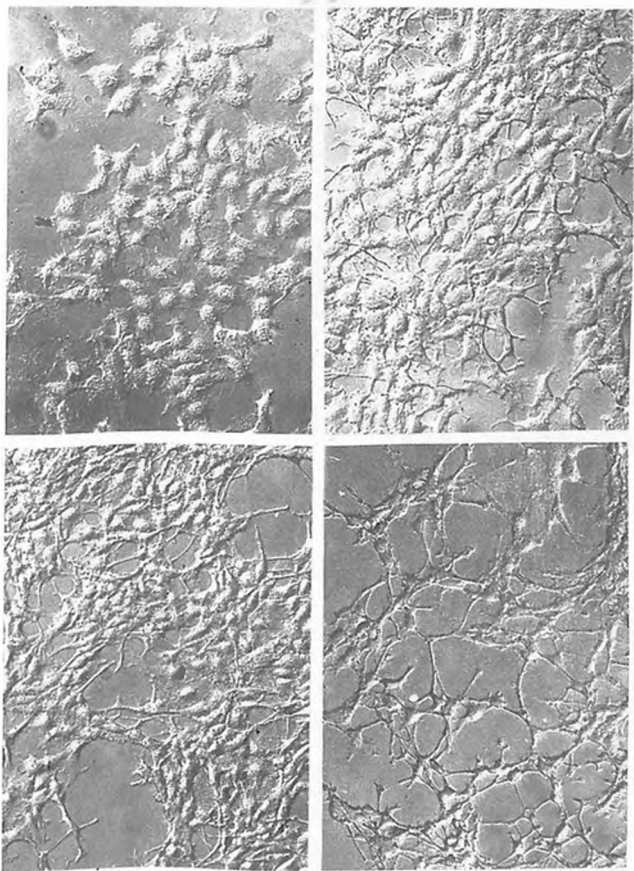


Рис. 1. Влияние серотонина и ФРН на морфологическую дифференцировку клеток РС 12 на 5-е сутки инкубации на среде с сывороткой. а—контрольная культура; б—в присутствии ФРН (1,9 мМ); в—в присутствии серотонина (0,5 мМ); г—в присутствии ФРН (1,9 мМ) и серотонина (0,5 мМ). Дифференциально-интерференционный контраст. Увеличение $\times 160$

центрации серотонина в культуральной среде, равной 5 мкМ (рис. 3) и достигала насыщения при концентрации 0,5 мМ.

Наряду с индукцией роста нейритов критерием степени дифференцировки клеток РС12 является снижение интенсивности их пролиферации. При добавлении серотонина к клеткам РС12 было обнаружено уменьшение включения $[^3\text{H}]$ тимидина в ДНК. Зависимость этого процесса от времени культивирования в присутствии серотонина (0,5 мМ) представлена на рис. 4. Из данных, приведенных на рис. 4, видно, что эффект серотонина заметен уже в течение 1-х суток, что совпадает по времени с индукцией роста нейритов. Отмеченной ранее стимуляции пролиферации фактором роста нервов в течение первых суток инкубации [14] в случае серотонина не наблюдалось. Заметное снижение включения $[^3\text{H}]$ тимидина в ДНК на 5-е сутки происходило при концентрации серотонина 50 мкМ (рис. 5), в то время как рост нейритов индуцировался при концентрации 5 мкМ (рис. 3).

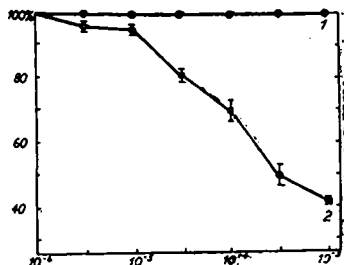
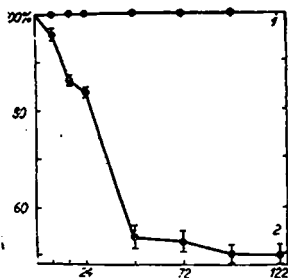


Рис. 4. Зависимость величины включения $[^3\text{H}]$ тимидина (в %) клетками РС12 от времени инкубации с серотонином. 1—уровень в контрольной культуре; 2—уровень в присутствии серотонина (0,5 мМ)

Рис. 5. Зависимость величины включения $[^3\text{H}]$ тимидина (в %) клетками РС12 от концентрации серотонина на 5-е сутки инкубации. 1—уровень в контрольной культуре (100%); 2—уровень в присутствии серотонина

Для определения специфичности влияния серотонина на индукцию дифференцировки клеток РС12 был исследован эффект ряда агонистов серотонина, а также других индолсодержащих соединений (таблица). Из данных, представленных в таблице, следует, что все указанные соединения обладают способностью снижать включение $[^3\text{H}]$ тимидина в ДНК клеток РС12. Определенный по окрашиванию клеток трипановым синим значительный цитотоксический эффект агонистов серотонина (триптамина, 5-метокситриптамина и хипазина) в концентрациях 1 мМ, не был характерен для серотонина. Ни одно из приведенных в табл. 1 соединений не индуцировало, подобно серотонину, рост нейритов у клеток РС12.

Незначительный (не более 20% величины N_1 , индуцированной серотонином) рост нейритов наблюдался при инкубации клеток с триптамином и 5-метокситриптамином. Применение серотонина в креатининовой и адипатной формах не влияло на характер индукции роста нейритов и снижения пролиферативной активности. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что нейритстимулирующий эффект специфичен для серотонина.

Таблица

Влияние агонистов серотонина и индолсодержащих соединений на включение [3H]тимидина клетками PC12

Вещество	Концентрация, мМ	Включение [3H] тимидина по отношению к контрольной культуре (100%), в %
Триптамин	1	цитотоксичен
	0,1	44,2 $\pm$ 2,4
	0,01	89,7 $\pm$ 2,9
5- метокситриптамиин	1	цитотоксичен
	0,1	21,2 $\pm$ 0,8
	0,01	78,3 $\pm$ 0,6
Хипазин	1	цитотоксичен
	0,1	77,1 $\pm$ 2,1
	0,01	76,9 $\pm$ 1,6
Триптофан	1	55,0 $\pm$ 3,5
	0,1	92,9 $\pm$ 1,4
	0,01	49,7 $\pm$ 1,9
5-окситриптофан	1	93,2 $\pm$ 0,9
	0,1	51,2 $\pm$ 0,4
	0,01	90,7 $\pm$ 1,3

Механизм индукции дифференцировки клеток PC12 серотонином, вероятно, отличен от механизма действия ФРН, что следует из различных временных характеристик индукции роста нейритов и влияния на пролиферативную активность, а также из синергизма (или аддитивности) их действия. Ранее было показано, что аналогичные эффекты могут быть вызваны повышенным внутриклеточного уровня cAMP [7, 8]. Нам, однако, не удалось обнаружить увеличения содержания cAMP в клетках PC12, обработанных серотонином. Кроме того, индукция роста нейритов по cAMP-зависимому механизму кратковременна и к 5-м суткам число клеток с нейритами приближается к величине в контрольных культурах, что вызвано компенсирующим действием ФДЭ cAMP [7]. В случае серотонина величина N_1 с первых по пятые сутки растет. Это указывает на способность серотонина стимулировать дифференцировку клеток PC12 по пути, не связанному с повышением внутриклеточного уровня cAMP. Полученные данные подтверждают существование нескольких различных биохимических путей, по которым может проходить дифференцировка клеток нейронального происхождения.

EFFECT OF SEROTONIN ON DIFFERENTIATION OF PHEOCHROMOCYTOMA PC 12 CELL LINE

POSYPANOVA G. A., *GOLUBEVA E. E., **KONDRATYEV A. D.,
SUVOROV N. N., *SEVERIN E. S.

Moscow Institute of Fine Chemical Technology.

*Institute of Applied Molecular Biology, USSR Ministry of Health, Moscow

**Institute of Molecular Biology, the USSR Acad. Sci, Moscow

The effect of serotonin and its agonists on morphological differentiation and proliferative activity of pheochromocytoma PC12 cells was studied. It was shown that serotonin was able to induce neurite outgrowth and decrease in [3 N]-thymidine incorporation into DNA of PC12 cells. Time and concentration dependences of these processes were studied. Nerve growth factor was able to amplify the effect of serotonin. There were shown different mechanisms of PC12 differentiation induction by serotonin, nerve growth factor and compounds that elevated cAMP level.

ЛИТЕРАТУРА

1. Greene L., Tischler A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 73, p. 2424—2428, 1976.
2. Хэм А., Кормак Д.—В кн.: Гистология, т. 5, с. 106—108, М., Мир, 1983.
3. Rieger F., Shelanski M., Greene L. Develop. Biol., v. 76, p. 238—243, 1980.
4. Dichter M., Tischler A., Greene L. Nature, v. 268, p. 501—504, 1977.
5. Alema S., Casalbore P., Agostini E., Tato F. Nature, v. 316, p. 557—559, 1985.
6. Hagag N., Halegoua S., Vtola M. Nature, v. 319, p. 680—682, 1986.
7. Kondratyev A., Movsesyan V., Severin E. J. Neurochem., v. 44, suppl., S139C, 1985.
8. Guroff G., Dickens G., End D., Londos C. J. Neurochem., v. 37, p. 1431—1439, 1981.
9. Yoffe J., Borchardt R. Mol. Pharmacol., v. 21, p. 368—373, 1982.
10. Кондратьев А. Д., Мовсисян В. А., Северин Е. С., Мазакян Ю. А., Дуакин С. М.—В сб.: Материалы девятой всесоюзной конференции по биохимии нервной системы, с. 201—202, Ереван, 1983.
11. Rubin H. Science, v. 167, p. 1271—1272, 1970.
12. Кондратьев А. Д., Алахов В. Ю., Мовсисян В. А., Черный А. А., Кахкир Л. Б., Северин Е. С. Биоорг. химия, т. 12, с. 736—740, 1986.
13. Bradford M. Anal. Biochem., v. 72, p. 248—254, 1976.
14. Мовсисян В. А., Кондратьев А. Д., Дуакин С. М.—В сб.: Проблемы современной биохимии и биотехнологии. Тезисы докладов 8-го объединенного симпозиума биохимических обществ СССР—ГДР, Рига, с. 114—115, 1985.

Поступила 23. V 1988.