

# 视黄酸对海马神经元细胞内钙离子浓度的影响

张小娟 李廷玉\* 刘友学 陈洁 瞿平 魏小平

(重庆医科大学儿童医院, 儿童营养研究中心, 重庆 400014)

**摘要** 探讨全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, atRA)对原代培养的海马神经元胞内钙离子浓度的影响,以进一步了解atRA参与学习记忆可能机制。分离新生Wistar大鼠海马,采用添加B27的无血清培养液进行海马神经元原代培养,免疫荧光鉴定培养的神经细胞;以fura-2/AM温育海马神经元,采用钙离子测定系统动态观察视黄酸对海马细胞内钙离子浓度的影响。结果显示:(1)培养的神经元纯度达90%;(2)atRA作用于海马神经元,能引起海马神经元胞内钙离子浓度的升高;(3)这种升高与atRA浓度及神经元的发育时间相关;(4)钙离子升高的具体方式是通过细胞外钙离子内流;(5)视黄酸核受体 $\alpha$ (RAR $\alpha$ )的拮抗剂Ro41-5253(Ro)对atRA升高的神经元胞内钙离子浓度有抑制作用。atRA与RAR $\alpha$ 结合,促使海马神经元胞外钙离子的内流,这可能是atRA参与学习记忆的机制之一。

**关键词** 视黄酸; 钙影像; 海马神经元; fura-2

全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, atRA)是维生素A在机体内发挥作用的活性形式之一,参与神经形成、分化及轴突的生长,atRA亦参与维持成年神经元及神经干细胞的分化状态。近年有报道维生素A参与学习记忆<sup>[1]</sup>。本课题组前期研究发现,边缘型维生素A缺乏(marginal vitamin A deficiency, MVAD)会损伤仔鼠学习记忆,影响海马脑片的长时程增强(long term potentiation, LTP)<sup>[2]</sup>,推测atRA影响了突触可塑性信号通路。而钙离子在神经元LTP形成中起着非常重要作用,目前尚没有atRA调节原代培养神经元钙离子浓度的报道。本实验通过钙离子测定仪,实时动态监测在加入atRA后,海马神经细胞钙离子浓度变化,并通过不同的处理方法,以期观察atRA对原代培养海马神经元内钙离子浓度影响及可能的机制,从而进一步了解atRA对大鼠学习记忆影响的相关机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级出生24 h内的Wistar新生乳鼠,雌雄不限,重庆医科大学儿童医院动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12培养基、胎牛血清、胰蛋白酶及B27培养基添加剂均为Gibco公司产品;atRA、多聚赖氨酸、DMSO、fura-2AM均为Sigma公司产品;兔抗大鼠神经元特异烯醇化酶

(neuron specific enolase, NSE)单克隆抗体, FITC标记抗兔IgG均为Abcom公司产品;其余的为市售的分析纯。

1.1.3 主要试剂配制 HBSS:含137.93 mmol/L NaCl, 5.33 mmol/L KCl, 4.17 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 1.26 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.493 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.407 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 0.441 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.338 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.56 mmol/L D-Glucose, 调pH值为7.2, 10磅10 min高压灭菌待用,无钙HBSS即不含钙及镁离子的HBSS。种植培养液:DMEM/F12(1:1)培养液,加入胎牛血清,使其终浓度为10%。无血清培养液:DMEM/F12(1:1)培养液,加入B27至终浓度为2%。荧光染料配制:将fura-2溶于无水DMSO配成1 mmol/L储备液,分装冻存。负载前用HBSS液稀释为3  $\mu$ mol/L。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠海马神经元培养 (1)多聚赖氨酸铺板。在超净台内,将洗净的无菌盖玻片置于6孔板或24孔板内,每孔加入1 ml多聚赖氨酸,使盖玻片充分浸透,作用过夜。吸出多余多聚赖氨酸,用D-Hank's液洗2遍,置于培养箱待用。(2)大鼠海马神经元无血清原代培养。取出生24 h内的Wistar乳鼠,75%乙醇消毒后断头取脑,钝性分离迅速取出海马组

收稿日期:2009-12-11 接受日期:2010-03-26

国家自然科学基金资助项目(No.30600495)

\*通讯作者。Tel: 023-63630913, E-mail: tyli@vip.sina.com.

织,轻轻剔除脑膜及血管后置于冰D-Hanks液中清洗2次。将海马剪成约1 mm<sup>3</sup>小块(以上操作在冰上进行),转入含4 ml无血清DMEM/F12培养液的离心管内,加入等体积0.25%胰蛋白酶(终浓度为0.125%)。用巴氏吸管轻轻吹打几次后置37℃,5% CO<sub>2</sub>水浴箱内消化10~15 min,每5 min振荡1次。用4 ml种植培养液终止消化,巴氏吸管反复轻轻吹打至组织块基本消失。200目不锈钢筛网过滤。离心,收集沉淀。用种植培养液制成细胞悬液,台盼蓝染色,血球计数板计数,以1×10<sup>6</sup>个/ml密度种植于放有包被过多聚赖氨酸盖玻片的培养板内,置37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养。24 h后将培养液全部换成无血清培养液,以后隔2天用无血清培养液半量换液1次,每天在倒置相差显微镜下观察细胞生长情况。

**1.2.2 免疫荧光鉴定NSE** 细胞免疫荧光染色:用冷PBS洗细胞3次,以新鲜配置的4% (质量分数)多聚甲醛室温固定细胞10 min,吸去多聚甲醛,PBS洗3次,每次10 min。用0.12% (体积分数) Triton X-100的PBS对细胞进行透化处理15 min,然后加入封闭液:含3% (质量分数) BSA的山羊血清室温封闭1 h。换为相应一抗(兔抗大鼠NSE单克隆抗体)4℃湿盒过夜,PBS清洗3次后加入FITC标记的抗兔二抗,室温避光温育1 h。然后加入DAPI,室温染细胞核5 min(避光)。PBS漂洗3次,每次5 min,最后用90%甘油封片。荧光显微镜下观察NSE表达阳性细胞,随机取5个视野,摄像后利用SPOT3.4软件计算每个视野中NSE表达阳性细胞数占该视野总细胞数的比例,即为神经元纯度。

**1.2.3 实验分组** 不同atRA浓度分组:设立4组:HBSS,0.5 μmol/L atRA,5 μmol/L atRA,10 μmol/L atRA(细胞外液为含Ca<sup>2+</sup> HBSS)。

本实验还依体外培养不同时间点分组:体外培养(days *in vitro*, DIV)4天、8天和12天,检测atRA(5 μmol/L)对海马神经细胞内钙离子浓度反应(细胞外液为含Ca<sup>2+</sup> HBSS)。

为了解atRA对海马神经元钙离子浓度的影响是通过外钙内流还是胞内储存钙的释放,实验分为4个组:细胞外液为含钙的HBSS:5 μmol/L atRA(atRA组)和不加atRA(HBSS组);细胞外液为无钙的HBSS:5 μmol/L atRA(atRA组)和不加atRA(HBSS组)。

最后,为探讨视黄酸核受体alpha(RARα)是否参与atRA升高神经元胞内钙离子浓度这一过程,本实验采用RARα选择性拮抗剂Ro41-5253(Ro),其浓

度参照文献<sup>[3]</sup>,为1 μmol/L。实验分3组:Ro组、atRA组和HBSS组。具体方法:Ro组为将Ro预处理海马神经元1 h后,再加入atRA检测钙离子浓度;而atRA组与HBSS组加入与Ro等量的HBSS 1 h后,再分别予atRA和HBSS作用。

以上除第二个分组外,其余各处理组皆为培养8天的神经元。

**1.2.4 大鼠海马神经元钙离子浓度测定** 取上述培养海马神经细胞,HBSS液冲洗3次,立刻加入3 μmol/L fura-2/AM液。放于37℃的培养箱中,负载30 min。在此过程中应蔽光。吸出工作液,用HBSS液冲洗3遍,加入HBSS平衡10 min,上机观察。使用钙离子测定仪,数据经NIS-Element AR3.0(Nikon)软件系统对图像及时间进行实时监控获得,检测6 min,以波长分别在340 nm与380 nm荧光强度的比值(R<sub>340/380</sub>)表示细胞内钙离子强度,每次实验检测至少10个细胞,加入处理前进行1 min的基线检测(基线在一个比较小的范围内波动),每个实验重复至少3次。以处理后的钙离子升高的最大值(M1)与处理前基线值变化的最大值(M0)的比值作为评价指标,以R<sub>340/380</sub> times (M1/M0)表示。

**1.2.5 统计学处理** 统计应用SPSS10.0分析软件,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,单因素多组比较采用方差分析,组间两两比较采用 $q$ 检验,实验前后对比采用配对 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著差异性。

## 2 结果

### 2.1 原代培养大鼠海马神经元形态观察

在倒置相差显微镜下观察,刚接种的神经元呈圆形、透亮、单个均匀分布。种植2 h后部分细胞已贴壁,贴壁细胞呈圆形或椭圆形,周边可见明显光晕,少数细胞伸出短小突起。24 h后细胞贴壁完全,生长旺盛,大部分细胞已伸出突起,突起也相应延长,培养2~3天后,胞体变大,细胞多呈纺锤形,可见双极或多极突起,以双极为主,突起部分出现相互连接,形成稀疏网络。培养7天后,神经元体积进一步增大,胞体丰满且光晕明显,立体感强,多呈锥体形,胞核和核仁清晰可见,突起增多伸长且分支很多,形成网络。培养9~14天,神经细胞更加成熟(图1)。

### 2.2 培养物性质及细胞纯度鉴定

体外培养7天的海马神经元,免疫荧光染色结果:荧光显微镜下FITC标记的NSE,为明亮的绿色。原代培养物中富含神经元,形态良好,核大而清晰,神

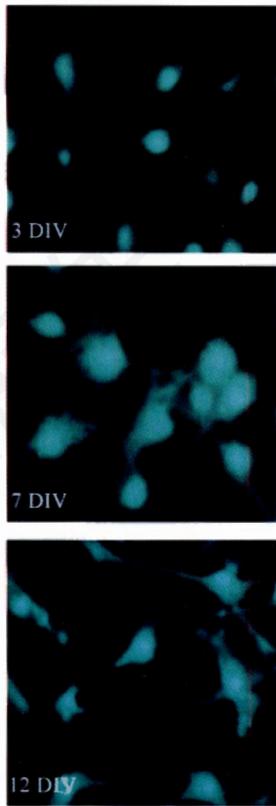


Fig.1 Neurons of 3 DIV, 7 DIV and 12 DIV dyed by fura-2 in microscope (200×)

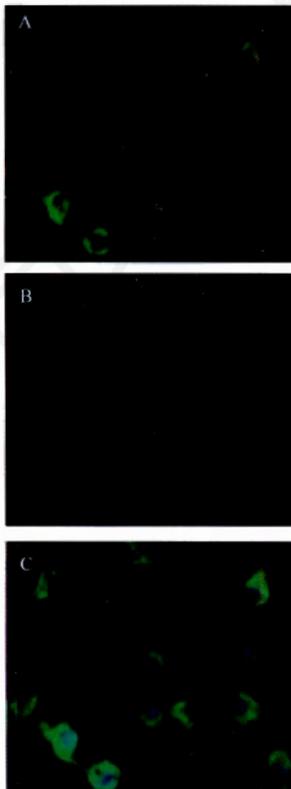


Fig.2 Neurons of NSE immunofluorescence

A: NSE immunofluorescence; B: nucleoli by DAPI labeling; C: merge (200×).

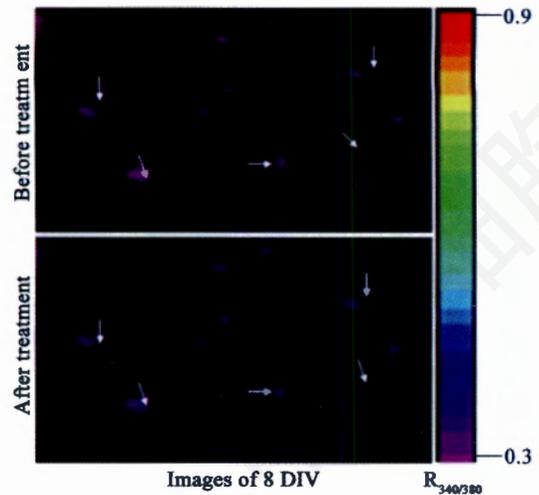


Fig.3 Intracellular changes of  $R_{340/380}$  after atRA treatment  
 $R_{340/380}$  is presented by color panel in the right. Before atRA treatment, there was more purple and less blue in neurons than that of neurons after treatment .

神经元所占比例高(图2)。培养7天的神经细胞纯度达到90%。

### 2.3 不同浓度 atRA 对海马神经细胞内钙离子浓度的影响

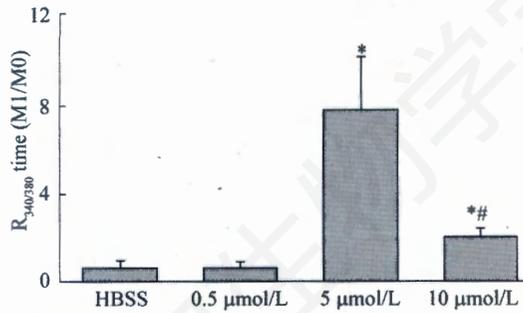
静息状态下细胞内荧光强度在较小的范围内波动, 加入处理后5 min内, 0.5  $\mu\text{mol/L}$  组 Ratio times (M1/M0)为  $0.598 \pm 0.37$ , 与 HBSS 组比较  $P > 0.05$ ; 10  $\mu\text{mol/L}$  组为  $2.02 \pm 0.36$ , 与 HBSS 组比较  $P < 0.05$ , 但升高的幅度明显低于于 5  $\mu\text{mol/L}$  ( $7.83 \pm 3.78$ )组,  $P < 0.05$  (图3, 图4)。

### 2.4 atRA 对体外培养不同时间点原代海马神经元钙离子浓度的影响

结果显示, 在体外培养的3个时间点, atRA 都能引起神经元胞内荧光强度的升高。在4天、8天及12天, Ratio times (M1/M0)分别为  $1.28 \pm 0.55$ 、 $8.78 \pm 2.93$ 、 $7.61 \pm 2.45$ , 但8天时升高的幅度最大, 与其余两组比较,  $P < 0.05$ , atRA 作用后, 体外培养12天神经元胞内钙离子浓度高于体外培养4天神经元,  $P < 0.05$ (图5)。

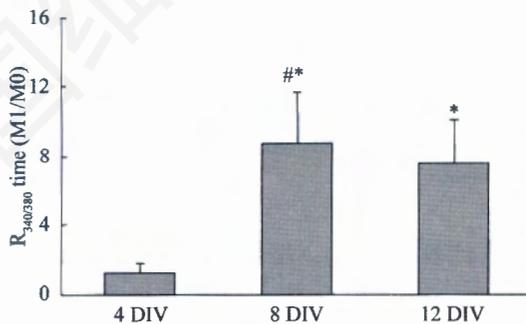
### 2.5 atRA 升高神经元钙离子浓度是通过细胞外钙离子内流实现

当细胞外液为含  $\text{Ca}^{2+}$  与无  $\text{Ca}^{2+}$  组, 用 5  $\mu\text{mol/L}$  atRA 刺激, 作用 360 s, 发现含  $\text{Ca}^{2+}$  组荧光强度明显高于无钙组。Ratio times (M1/M0)分别为:  $8.15 \pm 3.06$  和  $0.73 \pm 0.29$ ,  $P < 0.05$ , 提示 atRA 对海马神经元内钙离子浓度增加是通过细胞外钙离子内流实现(图6)。



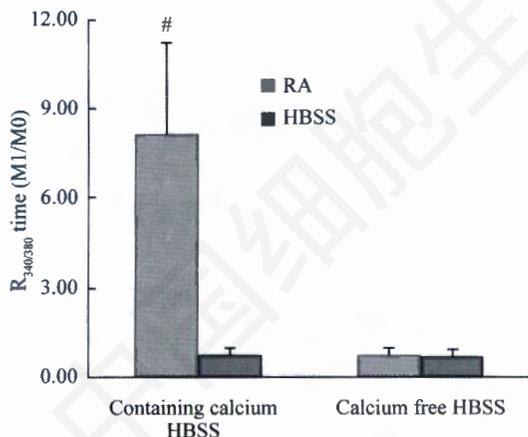
**Fig. 4** Changes of intercellular calcium concentration after atRA treatment (8 DIV)

\* $P < 0.05$ , vs HBSS; \*\* $P < 0.05$ , vs 10 μmol/L.



**Fig. 5** Effects of atRA (5 μmol/L) on intracellular calcium concentration of different DIV neurons

\* $P < 0.05$ , vs 4 DIV; \*\* $P < 0.05$ , vs 12 DIV.

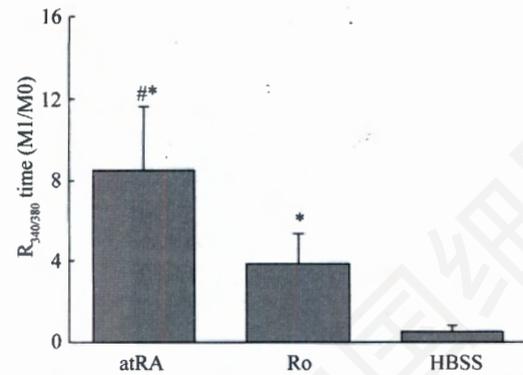


**Fig. 6** Comparison of calcium concentration between calcium-free group and containing-calcium group after treated with 5 μmol/L atRA

\* $P < 0.05$ , vs the other three groups.

### 2.6 Ro 对 atRA 升高的海马神经元钙离子浓度的影响

与 atRA 组比较, Ro 组在预先加入 RAR $\alpha$  选择性拮抗剂后, 海马神经元胞内钙离子浓度升高幅度明显降低, Ratio times (M1/M0) 为  $3.89 \pm 1.49$ , 而 atRA 组为  $8.49 \pm 3.18$ , 两组比较,  $P < 0.05$ ; 但与 HBSS 组相比, Ro 组胞内钙明显升高,  $P < 0.05$  (图 7)。



**Fig. 7** Effect of Ro on increased intracellular calcium level elicited by atRA

\*\* $P < 0.05$ , vs Ro; \* $P < 0.05$ , vs HBSS.

## 3 讨论

细胞内钙离子浓度变化被认为是 LTP 信号通路中重要的生理活动之一, LTP 依赖于突触前神经末梢兴奋性递质的释放(以谷氨酸为主), 作用于 N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDAR)<sup>[4]</sup>, 或脑源性神经营养因子(BDNF)作用于 TrkB 受体等, 使 Ca<sup>2+</sup> 内流, 激活蛋白激酶 A (PKA)、蛋白激酶 C (PKC)、促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)等 Ca<sup>2+</sup> 依赖性激酶<sup>[5-7]</sup>, 促使新的基因转录, 产生新的蛋白质, 使 LTP 进入维持阶段。其中, 经 NMDA 受体离子通道瞬间流入的 Ca<sup>2+</sup> 是 LTP 的主要初始诱导信号。

本课题组前期研究显示, 在维生素 A 缺乏的大鼠海马脑片中加入 atRA, 可以观察到海马 CA1 区降低的 LTP 恢复正常<sup>[2]</sup>。推测 atRA 可能通过某种途径引起海马神经细胞内钙离子浓度的升高, 从而影响 LTP。目前尚无研究发现 atRA 可以直接促进海马神经细胞内钙离子浓度的增加, 本实验发现不同浓度 atRA: 0.5 μmol/L、5 μmol/L 及 10 μmol/L 作用于海马神经元, 所导致的细胞内钙浓度变化不同, 说明 atRA 对海马神经元胞内钙离子浓度的影响与 atRA 的浓度相关。低浓度的 atRA 引起的钙离子浓度升高幅度明显低于较高浓度 5 μmol/L atRA 所引起的反应, 但更高浓度的 atRA (10 μmol/L) 组, 其升高的神经元胞内钙离子浓度却低于 5 μmol/L atRA 组, 而且 atRA (10 μmol/L) 作用于神经元较长时间(24 h)后, 神经元出现了凋亡或 / 和坏死的现象(尚未发表的数据), 分析为高浓度 atRA 的细胞毒作用。同时, 本实验还比较 atRA 对不同体外培养时间点海马神经元胞内钙离子浓度影响, 发现培养 4 天时, atRA 所引起的神经元钙离子浓度的变化要明显低于 8 天及 12 天的变化, 分

析为海马神经元体外培养4天时,发育尚不太成熟、突触联系相对较少、相关的受体表达较少等,提示atRA对海马神经细胞钙离子调节可能与神经元体外发育时间相关。

为了解atRA引起的神经元胞内钙增加是通过胞外钙内流还是胞内钙的释放,实验设计不同细胞负载液:含Ca<sup>2+</sup> HBSS与无Ca<sup>2+</sup> HBSS,结果发现负载液为无Ca<sup>2+</sup>时,细胞内钙离子浓度无明显变化,提示本实验观察到的atRA引起的Ca<sup>2+</sup>浓度增加是通过胞外Ca<sup>2+</sup>内流而致。最后,为进一步探讨atRA作用的机制,实验采用RAR $\alpha$ 选择性拮抗剂Ro,发现Ro能部分降低atRA所引起的细胞内钙离子浓度的升高,提示atRA可以通过RAR $\alpha$ 结合发挥其升高神经元胞内钙离子浓度的作用。

综上所述,本实验研究发现,atRA可以通过与RAR $\alpha$ 结合,促使原代培养海马神经元胞外钙离子内流,而且这种效应与atRA浓度及神经元体外培养时间相关,但atRA与RAR $\alpha$ 结合后,又通过什么途径引起细胞外钙离子内流?用atRA经典的转录功能很难解释。Poon等<sup>[8]</sup>发现树突膜相关的RAR $\alpha$ 的表达可能介导atRA调节的神经元翻译,而神经元的翻译调节对于长时程突触可塑性的表达和维持是非常重要的。另有报道RAR $\alpha$ 与许多树突RNA转运颗粒(包括富含嘌呤的元件结合蛋白Pura)中的RNA结合蛋白和翻译因子一起,海马的RAR $\alpha$ 可能参与编码GluR1和CAMKIIa的mRNA,促进其翻译<sup>[9]</sup>。Sutton等<sup>[10]</sup>认为atRA可促进GluR1受体翻译的快速增强,这可以用翻译启动效率增加和/或翻译延伸过程的抑制去除来解释,这种atRA参与翻译的快速增强似乎可以解释本实验观察到的atRA引起的细胞外钙离子的

内流。至于atRA/RAR $\alpha$ 是通过NMDA和/或TrkB受体而影响钙离子浓度,还是通过影响BDNF的分泌而间接调节钙离子浓度,以及是否存在atRA导致海马神经细胞钙离子浓度升高的其他机制,目前尚在进一步研究中。

### 参考文献(References)

- 1 Bonnet E, Touyarot K, Alfos S, Pallet V, Higuieret P, Arous DN. Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS One* 2008; 3(10): e3487.
- 2 Mao CT, Li TY, Liu YX, Qu P. Effects of marginal vitamin A deficiency and intervention on learning and memory in young rats. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2005; 43(7): 526-30.
- 3 Shibakura M, Koyama T, Saito T, Shudo K, Miyasaka N, Kamiyama R, *et al.* Anticoagulant effects of synthetic retinoids mediated via different receptors on human leukemia and umbilical vein endothelial cells. *Blood* 1997; 90(4): 1545-51.
- 4 Collingridge GL, Bliss TV. Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* 1995; 18(2): 54-6.
- 5 Micheau J, Riedel G. Protein kinases: which is the memory molecule? *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(4): 534-48.
- 6 Dash PK, Hochner B, Kandel ER. Injection of the cAMP-response element into the nucleus of Aplysia sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 1990; 345(6277): 718-21.
- 7 Kapur A, Yeckel MF, Gray T, Johnston D. L-type calcium channels are required for one form of hippocampal mossy fiber LTP. *J Neurophysiol* 1998; 79(4): 2181-90.
- 8 Poon MM, Chen L. Retinoic acid-gated sequence-specific translational control by RARalpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(51): 20303-8.
- 9 Chen N, Onisko B, Napoli JL. The nuclear transcription factor RAR alpha associates with neuronal RNA granules and suppresses translation. *J Biol Chem* 2008; 283(30): 20841-7.
- 10 Sutton MA, Taylor AM, Ito HT, Pham A, Schuman EM. Postsynaptic decoding of neural activity: eEF2 as a biochemical sensor coupling miniature synaptic transmission to local protein synthesis. *Neuron* 2007; 55(4): 648-61.

## Effects of All-trans Retinoic Acid on Intracellular Calcium Concentration of Hippocampal Neurons

Xiao-Juan Zhang, Ting-Yu Li\*, You-Xue Liu, Jie Chen, Ping Qu, Xiao-Ping Wei

(Nutrition Research Center, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

**Abstract** To investigate the effects and possible mechanisms of all-trans retinoic acid (atRA) on the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level of primary cultured hippocampal neurons. Hippocampal cells were isolated from newborn rats within 24 hours and cultured for 1–12 days prior to experiments. Immunofluorescence was performed to evaluate the purity of cultured cells. The cultured primary hippocampal neurons were labeled with fura-2/AM, and fluorescence images were monitored using a CCD camera, and subsequently analyzed using imaging analyzing software.  $\text{Ca}^{2+}$  activities were presented as Ratio 340/380, the ratio of fluorescence intensities excited by alternating illumination of 340 nm and 380 nm beams. We showed that atRA caused an increase in the intracellular calcium concentration in primary hippocampal neurons, which was related with concentrations of atRA and days of neurons *in vitro* (DIV). Furthermore, the increase in calcium level caused by atRA was through influx of extracellular calcium. Finally, we found that Ro41-5253 (Ro) reduced the increased Ratio 340/380 of hippocampal neurons caused by atRA. This study suggests that atRA can modulate calcium influx in hippocampal neurons, which was related with concentrations of atRA and days of neurons *in vitro*. AtRA plays a role in modulating calcium levels in hippocampal neurons possibly by binding to  $\text{RAR}\alpha$ . Finally, the role of atRA in regulating calcium concentration might be related to its effect on long-term potentiation (LTP), learning, and memory.

**Key words** retinoic acid; calcium imaging; hippocampal neurons; fura-2

Received: December 11, 2009 Accepted: March 26, 2010

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (No.30600495)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-63630913, E-mail: tyli@vip.sina.com