



## 全反式视黄酸对新生大鼠纹状体神经干细胞向神经元样细胞分化的作用

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一种能够自我增殖和具有多向分化潜能的前体细胞,其增殖、分化过程,可视为神经发育与再生的简化模型,利用其治疗中枢神经系统退行性和损伤性疾病已经日渐引起关注[1][2]。如何促进NSCs的增殖并定向诱导其分化是神经科学界研究的热点。全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, atRA)具有广泛的生物学作用,为哺乳动物大脑的正常发育和细胞的增殖分化所必需。近年研究发现,在哺乳动物的大脑生长发育过程,视黄酸信号系统在中枢神经系统的神经细胞增殖抑制和终末分化中起关键作用,因此视黄酸(RA)亦被认为是一种神经营养素[3][4]。atRA在诱导包括胚胎肿瘤细胞系、胚胎干细胞、神经干细胞的等神经分化中发挥重要作用[5][6]。作为神经系统发育的重要营养因子,atRA可以调节神经细胞上神经营养因子受体的表达,并且与NSCs的分化调控有关[7][8]。因此,本研究以分离培养的新生大鼠纹状体的NSCs为研究对象,探讨了atRA对NSCs的诱导分化作用及其机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物及材料

出生1~3 d的SD大鼠,由本校实验动物中心提供。DMEM/F12(1:1)、B27、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、TRIzol均为Gibco公司产品;新生小牛血清(FCS)购自杭州四季青;兔抗大鼠神经巢蛋白(nestin)、兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)、兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(GFAP),异硫氰酸荧光素(FITC)标记二抗均购自武汉博士德;atRA、DMSO购自Sigma公司。一步法RT-PCR试剂盒购自日本宝生物有限公司。

基础培养液:DMEM/F12(1:1混合)中内含15 mmol/L HEPES、2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2%B27以及100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素。

神经干细胞培养液:基础培养液+bFGF 20 μg/L。

神经干细胞分化诱导培养液:基础培养液+1% FCS。

atRA储备液:以DMSO为溶剂,配成浓度为 $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L atRA储备液,过滤除菌,避光, -20 °C保存。

#### 1.2 神经干细胞的分离培养及鉴定

将新生SD大鼠用75%乙醇消毒后,无菌操作条件下断颈取头,剪开颅腔,取出全脑置于4 °C D-Hanks溶液(pH7.4)中,解剖显微镜下分离纹状体,快速剥离脑膜,去净血管,移入小瓶内(瓶内预先加入冷的D-Hanks溶液),剪碎脑组织,用抛光的直头细吸管轻轻吹打,使之成为细胞悬液,用200目细胞筛(孔径76 μm)过滤,得到较为纯净的纹状体组织细胞悬液。将收集到的细胞悬液离心后,重悬于基础培养液中,用吸管再次吹打,如此反复两次,就可以获得单细胞悬液。计数并调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ /ml,接种于内含神经干细胞培养液的12孔培养板中,37 °C、5%CO<sub>2</sub>的培养条件下培养。每2~3 d半量换液,7 d传代1次。分别取原代与子代细胞做巢蛋白免疫组化染色。

#### 1.3 细胞分化实验

取生长状态良好的第3代NSCs用于本实验。将NSCs细胞克隆接种于12孔培养板，培养板中预先放置多聚赖氨酸处理过的无菌玻片。NSCs诱导前撤走生长因子bFGF，将神经干培养液换为神经干细胞分化诱导培养液。实验分为两组，atRA作用组：撤走生长因子bFGF，将神经干培养基换为神经干细胞分化诱导培养液+不同浓度atRA（分别为0.01、0.1、1.0、10.0  $\mu\text{mol/L}$ ）。对照组：神经干细胞分化诱导培养液+0.01%DMSO。各组细胞培养7 d后做免疫组织化学染色。

#### 1.4 免疫组织化学染色及神经元样细胞分化率的计算

将培养和经诱导分化处理的细胞用丙酮固定15 min后，分别加入抗巢蛋白(抗体稀释度1:200)标记未分化的细胞克隆，用抗NSE(1:200)和抗GFAP(1:400)标记分化后的神经元和神经胶质细胞，37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min，再经FITC标记的二抗(1:40)在37  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min后，在荧光显微镜下观察并拍照记录。阴性对照组为不加一抗，直接用FITC标记的二抗在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30 min。

细胞免疫荧光染色结束后，用荧光燃料DAPI复染细胞核。由于DAPI只对细胞核进行染色，故在10 $\times$ 20免疫荧光显微镜下随机在每一张玻片内取6个非重复视野，计数每一个视野的NSE阳性细胞数目及DAPI阳性细胞核数目，神经元样细胞分化率(%)=NSE+/DAPI+，重复3次(占玻片总面积的3%)。

#### 1.5 RT-PCR半定量分析RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ mRNA表达

1.5.1 引物设计 参考国外文献并采用计算机辅助设计，引物由北京奥科生物技术公司合成。RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 以及内参 $\beta$ -actin的引物序列分别为：RAR $\alpha$ ：5' TTCCGACGCAGTATCCAA 3' 和 5' CCGGTGTCA GCGTGTAG 3'，产物长度为214 bp；RAR $\beta$ ：5'-GCT-GCTGTGCGCTATGAC-3' 和5'-CATGGTGCTTC-CGGTAAT-3'，产物长度为292 bp；内参 $\beta$ -actin：5'-GAG GGAAATCGTGCGTGAC-3' 和5'-CTG-GAAGGTGGA CAGTGAG-3'，产物长度为445 bp。

1.5.2 总RNA的提取及RT-PCR 利用Trizol提取各组培养细胞的总RNA。紫外分光光度计测定D<sub>260</sub>和D<sub>280</sub>，计算RNA浓度和D<sub>260</sub>/D<sub>280</sub>值，判定RNA纯度。1.2%琼脂糖甲醛变性凝胶电泳鉴定总RNA是否降解。RT-PCR反应条件为：逆转录反应50  $^{\circ}\text{C}$  30 min；85  $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min，50  $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min，72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min，30个循环；然后72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5.3 扩增产物的半定量分析 准确吸取10  $\mu\text{l}$ 扩增产物在2%琼脂糖凝胶(含终浓度0.5  $\mu\text{g/ml}$ 溴乙锭)中进行电泳分离，凝胶图像分析系统下观察并照相，Gel-Pro system3.1分析电泳图像，测出各扩增带的积分吸光度值。以目的基因扩增量/内对照基因扩增量比值，表示所要检测基因的表达量，计算出各个样品的RAR $\alpha$ 、 $\beta$ / $\beta$ -actin比值，分析RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$  mRNA表达。

#### 1.6 统计学分析

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，利用SPSS10.0对数据进行单因素及多因素的方差分析(ANOVA)，两两比较采用LSD方法。

## 2 结果

### 2.1 NSCs体外生长

从新生大鼠纹状体组织分离培养的细胞，在原代培养的初期，可见到不少组织细胞碎片和灰暗的死细胞，而活细胞则透亮、胞体完整，并分散沉于培养板底，在条件培养基中培养2~3 d以后，存活的单个细胞因细胞分裂能各自形成2-4个细胞细胞小球(细胞簇)。随着培养时间的延长，细胞簇渐渐增多并形成漂浮的神经细胞球。这些细胞球球体透亮，边缘整齐，细胞排列紧密，继续培养，神经细胞球逐渐变大，NSCs得以大量扩增。

### 2.2 NSCs的巢蛋白抗原表达及分化

来源于新生大鼠纹状体组织的原代克隆和传代克隆，在贴壁2 h后进行巢蛋白免疫荧光细胞化学染色，克隆细胞呈巢蛋白抗原阳性，表明本实验方法分离培养的克隆细胞表达神经干细胞的特异性抗原-巢蛋白(图1a)。

取第3代细胞接种于内置多聚赖氨酸包被玻片的培养皿，在所用的神经干细胞培养液中，撤走生长因子，

加入含不同浓度atRA的神经干细胞分化诱导培养液，2~4 h后克隆贴壁并开始松散，随后发现有突起从团块边缘长出(图1b)，7 d后出现大量不同形态的分化神经细胞，分别进行免疫荧光化学染色，分化的细胞呈NSE、GFAP抗原阳性(图1c、d)。

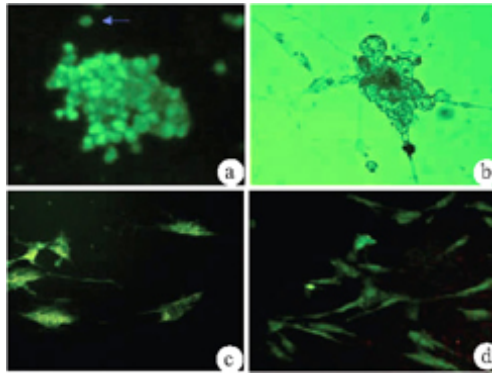


图1 神经干细胞及其分化形成的免疫荧光细胞化学染色阳性细胞

Fig.1 Differentiation of neural stem cells positive for immunofluorescent cytochemical staining (Original magnification:  $\times 200$ )

a: Nestin-positive neurosphere and cells (arrow); b: Differentiation of neural stem cells after atRA treatment; c: NSE-positive cells; d: GFAP-positive cells

### 2.3 全反式视黄酸对NSCs分化的影响

利用免疫荧光化学染色法，检测不同浓度atRA诱导NSCs分化为NSE染色阳性神经元样细胞百分率。结果显示，随着atRA浓度增高，NSCs诱导分化为NSE染色阳性神经元样细胞百分率增加( $F=358.59$ ,  $P=0.000$ )。atRA浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 时，可显著提高NSCs分化为NSE染色阳性神经元样细胞的百分率，再增高atRA的作用浓度( $10.0 \mu\text{mol/L}$ )，NSCs分化为NSE染色阳性神经元样细胞百分率与 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的atRA作用浓度组相比，则差异无统计意义( $P=0.163$ ，图2)。

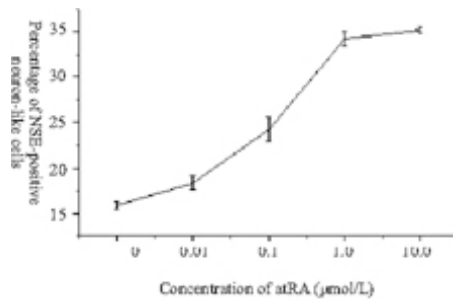


图2 不同浓度atRA对NSCs诱导分化为NSE染色阳性神经元样细胞百分率的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of atRA on the percentage of NSE-positive neuron-like cells differentiated from newborn rat striatum-derived neural stem cells in vitro

### 2.4 atRA干预后RARs mRNA表达的变化

利用RT-PCR技术，本实验证实bFGF反应性NSCs有低水平的RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 基因的表达，经atRA诱导后，RAR $\alpha$  mRNA表达变化不大，而RAR $\beta$  mRNA的表达对atRA存在剂量依赖性和时间依赖性。

结果显示，随着atRA浓度的递增，RAR $\beta$ 表达mRNA依次上升( $F=67.930$ ,  $P=0.000$ )； $1.0 \mu\text{mol/L}$  a-tRA可显著提高RAR $\beta$ 的mRNA表达水平；当再提高atRA浓度( $10 \mu\text{mol/L}$ )，则RAR $\beta$ 的mRNA表达较 $1.0 \mu\text{mol/L}$  atRA组无显著升高( $P=0.665$ ，图3)。

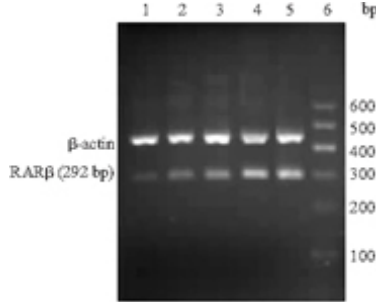


图3 atRA作用浓度对NSCs上的RAR $\beta$ 受体mRNA表达的影响

Fig.3 Effect of atRA concentration on the expression of RAR $\beta$  mRNA in NSCs analysed by RT-PCR

Lanel: Control; Lane 2-5: Cells treated with 0.01, 0.1, 1, and 10  $\mu$ mol/L atRA; Lane 6: Marker

结果显示，在0~7 d内，随着atRA作用时间的增加，RAR $\beta$  mRNA表达量逐渐上升(F=175.984, P=0.000, 图4)。

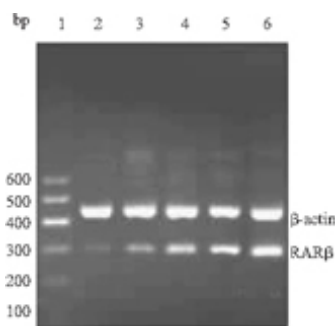


图4 atRA作用时间对NSCs上的RAR $\beta$ 受体mRNA表达的影响

Fig.4 Expression of RAR $\beta$  mRNA in NSCs with 1.0  $\mu$ mol/L atRA treatment for different time lengths

Lane 1: Marker; Lane 2: Control; Lanes 3-6: Cells 1, 3, 5, and 7 days after atRA treatment, respectively

### 3 讨论

定向分化调控是NSCs研究的核心问题。RA是微量营养素维生素A在体内的主要活性代谢产物，有研究指出，RA能促进NSCs分化为神经元[7]，但RA诱导NSCs分化的规律及机制尚不清楚。RA作用的强弱与其剂量的大小有一定的关系，采用多大的RA剂量可以获得最大的诱导效果，同时不引起细胞的凋亡，迄今尚无统一的认识。本实验利用atRA对体外培养的bFGF反应性NSCs进行分化诱导，结果发现，在一定浓度范围内atRA促进NSCs分化为神经元样细胞。当atRA的浓度为1.0  $\mu$ mol/L，与对照组相比，NSCs分化为神经元的百分率最高，当再增高atRA的作用浓度(10.0  $\mu$ mol/L)，则NSCs分化为神经元的百分率差异无统计意义，而细胞凋亡显著增加。已知RA是通过其细胞核内受体介导而发挥作用的，由于RA核内受体数量是一定的，当受体结合RA达到饱和时，增加RA的量并不能增加其诱导分化作用。结合本实验结果，笔者认为1.0  $\mu$ mol/L的atRA浓度是诱导NSCs向神经元方向分化的适宜剂量。

RA所发挥的各种各样的复杂的生物学效应，主要是通过RARs的顺式作用和反式作用完成的。研究发现，发育中的大脑皮质、海马以及纹状体中有高水平的视黄酸受体(RARs)，其中，RAR $\beta$ 是哺乳动物大脑中主要表



达的RARs[9]。实验发现,神经退行性病变如阿尔茨海默症等与VitA类物质缺乏或不正常代谢有关,RARs表达水平在老年大脑或阿尔茨海默症患者大脑中下调,而通过补充VitA类物质,RARs表达水平可恢复[10][11]。RARs作为核内受体具有与染色体DNA结合和调控基因表达的功能,当RARs结合了RA而被活化后可对一系列受其调控的靶基因产生“扳机”效应[12]。对RARs的功能分析需要对其进行靶基因的鉴定,大量的靶基因已被确定,其中某些靶基因就是RARs本身[13]。研究发现,在RAR $\beta$ 基因中存在功能性RARE介导atRA的转录激活作用,从而上调RAR $\beta$ 基因的转录。例如,在小鼠RAR $\beta$ 基因启动子内存在RARE序列,该序列含有GTTCAC重复顺序,被5个核苷酸分开,三种RAR亚型均可结合于该序列发生转录活动。因此,RA转录活动的靶基因也包括RAR $\beta$ 基因本身,这种自调节可能是通过提高受体水平来扩大RA在效应细胞中的作用[14]。利用RT-PCR技术,本实验证实bFGF反应性NSCs有低水平的RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$  mRNA的表达,经atRA诱导后,RAR $\alpha$ 表达变化不大。而NSCs内RAR $\beta$ 基因的表达对atRA存在剂量依赖性,随着atRA浓度的递增RAR $\beta$  mRNA表达量依次上升;1.0  $\mu$ mol/L atRA可显著提高RAR $\beta$  mRNA表达水平,再提高atRA浓度(10  $\mu$ mol/L),RAR $\beta$  mRNA表达无明显升高,提示1.0  $\mu$ mol/L浓度的atRA即能有效诱导NSCs上RAR $\beta$  mRNA的表达。此外,RAR $\beta$ 基因的表达对a-tRA存在时间依赖性,在0~7 d内,随着atRA作用时间的增加,RAR $\beta$ 表达量逐渐上升,提示RAR $\beta$ 在RA对NSCs诱导分化中发挥重要作用。

神经元的分化受许多细胞外信号分子的影响,这些分子通过细胞膜受体介导级联反应或核受体介导作用影响早期中枢神经系统的发育[8][15]。目前研究认为,RA促进NSCs向神经元方向的分化,其中一个可能的分子途径是RA增强了NSCs对神经营养因子的反应性。研究发现,RARs的激活可以有效诱导神经营养因子受体TrkA、TrkB等的表达。神经营养因子是NSCs发育和生存所必需的蛋白质,神经营养因子及其受体是NSCs分化的主要调控因子[16]。Ito等[2]认为,神经营养因子可通过调控NSCs上各种bHLH转录因子的表达,影响NSCs的分化。RA与神经营养因子在成年个体神经发生过程中存在前后顺序及相互作用性,RA促进早期神经细胞的分化,而神经营养因子随后通过RA依赖性表达的Trk受体,促进神经细胞的成熟[8]。由此推测,神经营养因子受体基因可能是活化的RARs的靶基因,RA通过激活RARs,调节NSCs上神经营养因子受体的表达,并通过与神经营养因子联合作用对NSCs分化产生影响,有关具体路径和作用方式尚需深入研究。

我们的实验研究证实,NSCs上存在RAR $\alpha$ 、RAR $\beta$ 基因的表达,且RAR $\beta$ 基因转录水平受atRA诱导。RA作为微量营养素维生素A在体内的主要活性代谢产物,参与促进NSCs向神经元方向分化成熟,可能涉及细胞内复杂的信号系统调控机制,需要进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1]Gage FH. Mammalian neural stem cells[J]. Science, 2000, 287(5457): 1433-45.
- [2]Ito H, Nakajima A, Nomoto H, et al. Neurotrophins facilitate neuronal differentiation of cultured neural stem cells via induction of mRNA expression of basic helix-loop-helix transcription factors Mash1 and Math1[J]. J Neurosci Res, 2003, 71(5): 648-58.
- [3]Malik MA, Blusztajn JK, Greenwood CE. Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: Role of retinoic acid[J]. J Nutr Biochem, 2000, 11(1): 2-13.
- [4]Mey J, McCaffery P. Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates[J]. Neuroscientist, 2004, 10(5): 409-21
- [5]Kato M. Regulation of WNT signaling molecules by retinoic acid during neuronal differentiation in NT2 cells: threshold model of WNT action[J]. Int J Mol Med, 2002, 10(6): 683-7.
- [6]Chu PW, Cheung WM, Kwong YL. Differential effects of 9-cis, 13-cis and all-trans retinoic acids on the neuronal differentiation of human neuroblastoma cells[J]. Neuroreport, 2003, 14(15): 1935-9.
- [7]Wohl CA, Weiss S. Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial

differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors[J]. J Neurobiol, 1998, 37 (2): 281-90.

[8]Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures[J]. J Neurobiol, 1999, 38 (1): 65-81.

[9]Maden M. Role and distribution of retinoic acid during CNS development[J]. Int Rev Cytol, 2001, 209: 1-77.

[10]Verma AK, Shoemaker A, Simsiman R, et al. Expression of retinoic acid nuclear receptors and tissue transglutaminase is altered in various tissues of rats fed a vitamin A-deficient diet[J]. J Nutr, 1992, 122(11): 2144-52.

[11]Zhao X, Patton JR, Davis SL, et al. Regulation of nuclear receptor activity by a pseudouridine synthase through posttranscriptional modification of steroid receptor RNA activator[J]. Mol Cell, 2004, 15(4): 549-58.

[12]Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid [J]. J Lipid Res, 2002, 43(11): 1773-808.

[13]Yen A, Fenning R, Chandraratna R, Walker P, et al. A retinoic acid receptor beta/gamma-selective prodrug (tazarotene) plus a retinoid X receptor ligand induces extracellular signal-regulated kinase activation, retinoblastoma hypophosphorylation, G0 arrest, and cell differentiation[J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(6): 1727-37.

[14]Vivanco-Ruiz MM, de The H, Tiollais P, et al. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene[J]. Nature, 1990, 343(6254): 177-80.

[15]Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, et al. Peripheral infusion of IGF- I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus[J]. J Neurosci, 2000, 20(8): 2896-903.

[16]Cheung WM, Ip NY. Interaction of neurotrophins and retinoic acid in neuronal differentiation[J]. Mol Cells, 1998, 8(4): 496-502.