

HIF-1 α 和Notch1在原代培养的神经元及胶质细胞的混合体系中的相互作用

丁君¹, 郑瑾², 范威³

摘要 目的:观察在原代混合培养的神经元及胶质细胞的体系中,HIF-1 α 和Notch1基因间是否存在相互作用。**方法:**构建体外原代培养神经元及胶质细胞的混合体系,应用电穿孔转染方法分别沉默HIF-1 α 和Notch1基因。RT-PCR检测HIF-1 α 和Notch1基因转录水平,Western blot方法检测HIF-1 α 和Notch1蛋白表达水平。**结果:**沉默HIF-1 α 基因后,HIF-1 α 和Notch1基因转录及蛋白表达水平均显著下降;沉默Notch1基因后,HIF-1 α 和Notch1基因转录及蛋白表达水平均显著下降。**结论:**在原代培养的神经元及胶质细胞的混合体系中,HIF-1 α 和Notch1之间可能存在相互作用的关系。

关键词 神经元;胶质细胞;缺氧诱导因子-1;Notch1

中图分类号 R741;R741.02;R742 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20210196

本文引用格式:丁君,郑瑾,范威. HIF-1 α 和Notch1在原代培养的神经元及胶质细胞的混合体系中的相互作用[J]. 神经损伤与功能重建, 2021, 16(12): 695-697.

Interaction between HIF-1 α and Notch1 in a Mixed System of Primary Cultured Neurons and Glial Cells DING Jun¹, ZHENG Jin², FAN Wei³. 1. Department of Neurology, Wuhan First Hospital, Wuhan 430030, China; 2. Department of Neurology, Wuhan Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 3. Department of Breast Surgery, Hubei Cancer Hospital, Wuhan 430000, China

Abstract Objective: To investigate whether there is an interaction between HIF-1 α and Notch1 in co-cultured neurons and glial cells. **Methods:** Cortical neurons and glial cells were co-cultured *in vitro*. The HIF-1 α and Notch1 genes in the co-cultured cells were muted by electroporation transfection, then the transcription levels and protein expression levels of Notch1 and HIF-1 α were detected by RT-PCR and Western Blot, respectively. **Results:** After silencing either the HIF-1 α or Notch1 gene, the transcription and protein expression levels of both HIF-1 α and Notch1 were reduced. **Conclusion:** There may be an interaction between HIF-1 α and Notch1 in the neuron and glial cell co-culture system.

Key words neurons; glial cells; HIF-1 α ; Notch1

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年期最常见的痴呆类型,全球范围内累及人数已高达3000万,且随着人类寿命的延长,发病率逐渐增加^[1,2]。AD的发病机制复杂且多条途径相互作用构成网络状结构。缺氧是多种疾病发生的诱因,HIF-1 α 是细胞应对缺氧环境的重要转录因子^[3-5]。AD患者脑内HIF-1 α 的表达较对照组增高^[6,7]。Notch受体蛋白是一组跨膜蛋白受体家族,参与多种病理生理过程,Notch1主要存在于中枢神经系统^[8,9]。HIF-1 α 和Notch1两者相互作用,参与多种疾病的进程^[10]。本研究拟在体外原代培养的神经元及胶质细胞的混合培养体系中,研究Notch1和HIF-1 α 在成熟神经元及胶质细胞内的相互作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物 出生3 d内的C57BL/6J乳鼠50只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂与材料 DMEM培养基、多聚赖氨酸购于Sigma公司;Nuwacell电转液购于中盛溯源公司;羊抗小鼠HIF-1 α 抗体、兔抗小鼠Notch-1抗体(1:400),兔抗小鼠 β -actin抗体(1:800)及二抗购于Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 分组 乳鼠随机分为对照组20只,HIF-1 α 基因沉默组15只,Notch1基因沉默组15只。对照组为原代神经元及胶质混合培养细胞;HIF-1 α 基因沉默组和Notch1基因沉默组分别采用电穿孔转染法沉默原代神经元及胶质混合培养细胞的HIF-1 α 及Notch1基因。

1.2.2 电穿孔转染法沉默HIF-1 α 及Notch1

作者单位

1. 武汉市第一医院
神经内科

武汉 430030

2. 武汉协和医院
神经内科

武汉 430022

3. 湖北省肿瘤医院
乳腺中心

武汉 430079

收稿日期

2021-07-20

通讯作者

范威

fx805@126.com

注:丁君和郑瑾为
并列第一作者

基因 取乳鼠大脑皮质组织(神经元及胶质细胞混合体系),用胰酶消化;将消化并滤过的细胞悬液中加入电转液及siRNA工作液(HIF-1 α siRNA引物为F: 5'-TCTCCAAGCCCTCCAAGTATGA-3',R: 5'-GATGCTTAGCAGTGGTCGTTTC-3'; Notch1 siRNA引物为F: 5'-GGGTGGTCAGGAAAATCATGTCA-3',R: 5'-AGTTCACAGTGGGGACCAGTATC-3'),置入电转杯中,放入电转仪的卡槽,进行电转操作。电转转染后的细胞加入已预热的无钙镁DMEM培养基中,混匀,接种于24孔板内。1h后将细胞更换为维持培养基(Neurobasal+B-27+Glutamine)。此后每2~3天半量换液1次,培养14d后进行后续研究。

1.2.3 RT-PCR检测HIF-1 α 及Notch1基因转录水平
转染培养14d后,全量吸出培养基,PBS漂洗3遍。常规Trizol法提取细胞总RNA并测定浓度。各组样品中均取20 μ L的RNA进行逆转录(引物: β -actin F: 5'-CAGCATGGAGGGGCCGACTCATC-3',R: 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3; HIF-1 α F: 5'-TTCTCAAGCCCTCCAAGTATGA-3',R: 5'-GATGCCTTAGCAGTGGTCGTTTC-3'; Notch1 F: 5'-GGG TGGTCAGGAAAATCATGTCA-3',R: 5'-AGTTCACAGTGGGGACCAGTATC-3')。

1.2.4 免疫印迹法检测HIF-1 α 及Notch1蛋白表达水平
根据细胞蛋白提取试剂盒说明书提取细胞总蛋白,转膜后孵育HIF-1 α (1:600)、Notch-1(1:400)和 β -actin(1:800)一抗,4 $^{\circ}$ C过夜;用封闭液稀释对应的HRP标记的二抗(1:5000),在室温下摇床孵育2h。ECL显色,凝胶成像系统分析。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本均数t检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 沉默HIF-1 α 基因后HIF-1 α 和Notch1基因转录及蛋白表达水平

2.1.1 沉默HIF-1 α 基因后HIF-1 α 基因转录及蛋白表达水平
与对照组相比,转染HIF-1 α 的siRNA后,原代混合培养体系神经元及胶质细胞的HIF-1 α 的基因转录水平显著下降,蛋白表达水平也明显下降(均 $P<0.05$),见图1。

2.1.2 沉默HIF-1 α 基因后Notch1基因转录及蛋白表达水平
与对照组相比,转染HIF-1 α 的siRNA后,原代

混合培养体系神经元及胶质细胞的Notch1的基因转录水平显著下降,蛋白表达水平也明显下降(均 $P<0.05$),见图2。

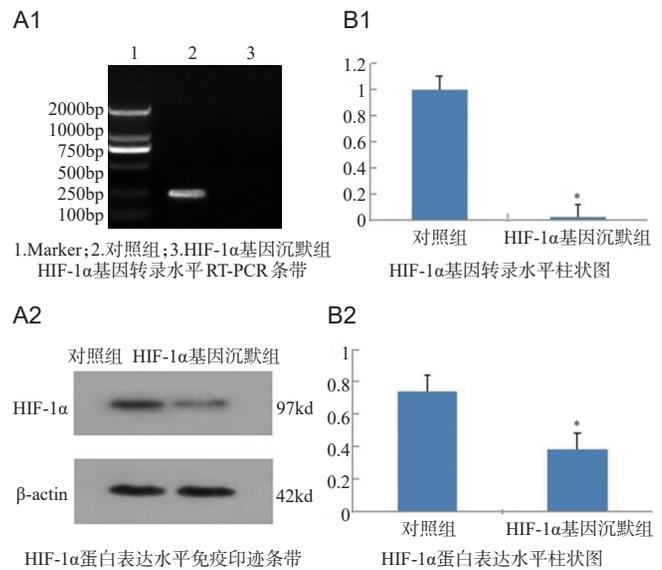


图1 沉默HIF-1 α 基因后HIF-1 α 基因转录及蛋白表达水平

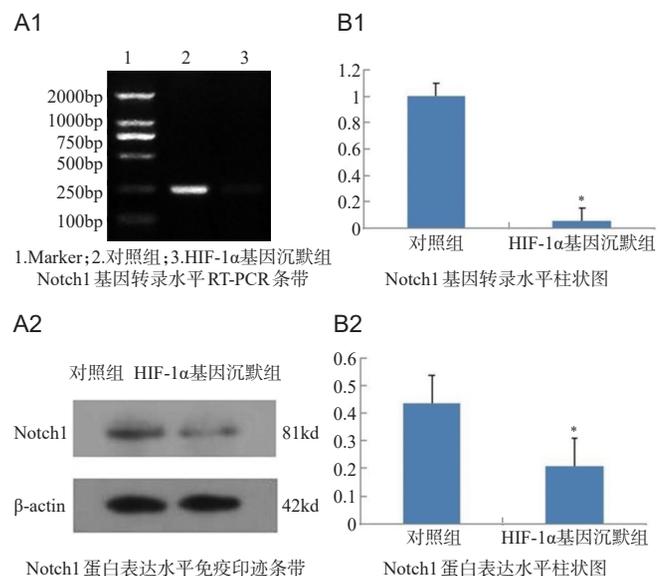


图2 沉默HIF-1 α 基因后Notch1基因转录及蛋白表达水平

2.2 沉默Notch1基因后Notch1和HIF-1 α 基因转录及蛋白表达水平

2.2.1 沉默Notch1基因后Notch1基因转录及蛋白表达水平
与对照组相比,转染Notch1的siRNA后,原代混合培养体系神经元及胶质细胞的Notch1的基因转录水平显著下降,蛋白表达水平也明显下降(均 $P<0.05$),见图3。

2.2.2 沉默Notch1基因后HIF-1 α 基因转录及蛋白表达水平
与对照组相比,转染Notch1的siRNA后,原代混合培养体系神经元及胶质细胞的HIF-1 α 的基因转录水平显著下降,蛋白表达水平也明显下降(均 $P<$

0.05), 见图4。

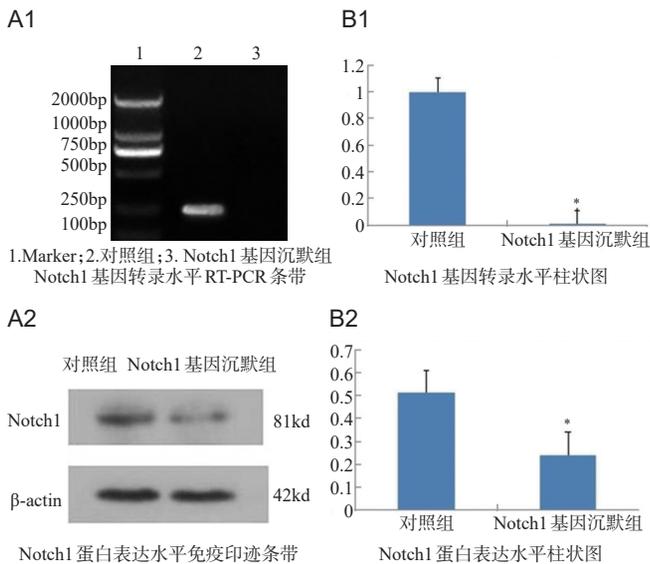


图3 沉默 Notch1 基因后 Notch1 基因转录及蛋白表达水平

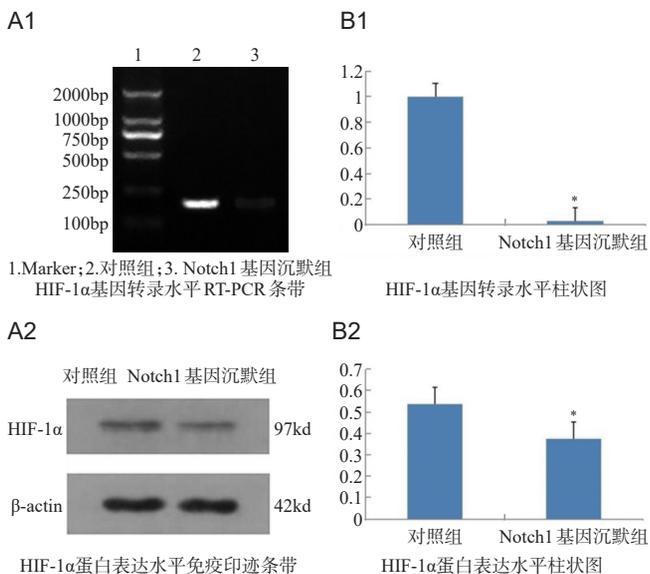


图4 沉默 Notch1 基因后 HIF-1α 基因转录及蛋白表达水平

3 讨论

AD 的发病机制学说有 Aβ 假说、Tau-蛋白假说、炎症假说及胆碱能损伤假说、钙离子通道失调假说等^[11]。其中, 缺血缺氧可能是疾病发生发展的重要因素。HIF-1α 是调控细胞对缺血缺氧环境做出反应的重要细胞因子, 可抑制缺氧诱导的神经元的凋亡^[12], 也可对抗 β 淀粉样蛋白的毒性作用^[13]。Notch1 主要分布于中枢神经系统, 在 AD 的病理状态下异常活化^[14]。AD 患者脑内 HIF-1α 表达较同年齡同性别的对照组增高^[7]。多

项研究发现 HIF-1α 与 Notch1 在多种病理生理过程中共同发挥作用, 且在 AD 的病理状态下, HIF-1α 和 Notch1 信号通路均出现异常表达。

既往关于 HIF-1α 和 Notch1 在中枢神经系统中的研究多在单一神经细胞中进行^[15]。为更加接近真实的神经系统的情况, 本研究选择神经元及胶质细胞的混合培养体系进行试验。结果显示, 沉默 HIF-1α 基因会降低 Notch1 的基因转录和蛋白质表达; 沉默 Notch1 基因, 也会降低 HIF-1α 的基因转录和蛋白质表达。推断在原代混合培养的神经元及胶质细胞体系中, HIF-1α 和 Notch1 之间可能存在相互作用。这可能是 AD 的病理生理机制探讨的新的研究靶点。

参考文献

[1] Reitz C, Brayne C, Mayeux R, et al. Epidemiology of Alzheimer disease[J]. Nat Rev Neurol, 2011, 7: 137-152.

[2] Hampel H, Prvulovic D, Teipel S, et al. The future of Alzheimer's disease: the next 10 years[J]. Prog Neurobiol, 2011, 95: 718-728.

[3] Jeong J, Moon M. Induced hypoxia inducible factor 1 Alpha inhibits human prion peptide mediated neurotoxicity[J]. Phytother Res, 2013, 27: 1185-1192.

[4] Wang C, Wang Z. Protection by silibinin against experimental ischemic stroke: Up-regulated pAkt, pmTOR, HIF-1 α and Bcl-2, down-regulated Bax, NF-κ B expression[J]. Neurosci Lett, 2012, 529: 45-50.

[5] Lang X, Wang X. Mechanisms of cardioprotection by isoflurane against I/R injury[J]. Front Biosci, 2013, 18: 387-393.

[6] Grammas P, Samany PG. Thrombin and inflammatory proteins are elevated in Alzheimer's disease microvessels: implications for disease pathogenesis[J]. J Alzheimers Dis, 2006, 9: 51-58.

[7] Grammas P, D Tripathy. Brain microvasculature and hypoxia-related proteins in Alzheimer's disease[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2011, 4: 616-625.

[8] Itmayoshi I, Kageyama R. The role of Notch signaling in adult neurogenesis[J]. Mol Neurobiol, 2011, 44: 7-11.

[9] Franberg J, Karlstrom H, Frykman S. γ-secretase dependent production of intracellular domains is reduced in adult compared to embryonic rat brain membranes[J]. PLoS ONE, 2010, 5: 9772-9776.

[10] Bedogni B, Warneke JA, Nickoloff BJ, et al. Notch1 is an effector of Akt and hypoxia in melanoma development[J]. J Clin Invest, 2008, 118: 3660-3670.

[11] 夏兆云, 赵虹, 潘露茜, 等. Tau 蛋白在阿尔茨海默病中的作用研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(9): 450-453.

[12] Xiqing C, Weina K, Lingyun L, et al. A viral vector expressing hypoxia-inducible factor 1 alpha inhibits hippocampal neuronal apoptosis [J]. Neural Regen Res, 2014, 11: 1145-1153.

[13] Avramovich-Tirosh Y, Bar-Am O, Amit T, et al. Up-regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and HIF-target genes in cortical neurons by the novel multifunctional iron chelator anti-Alzheimer drug[J]. Curr Alzheimer Res, 2010, 7: 300-306.

[14] Ables L, Breunig J. Not (ch) just development: Notch signalling in the adult brain[J]. Nat Rev Neurosci, 2011, 12: 269-283.

[15] Linne L, Jalonen T. Astrocyte-neuron interactions: from experimental research-based models to translational medicine[J]. Prog Mol Biol Transl, 2013, 123: 191-217.

(本文编辑:唐颖馨)