

• 论著 •

神经母细胞瘤细胞急性缺氧后不协调类 33 磷蛋白 1 和缺氧诱导因子-1α 蛋白的表达变化

谭斐 刘静 赵琛 景良 郭阳

【摘要】 目的 探讨具有神经元特性的神经母细胞瘤细胞在急性缺氧后不协调类 33 磷蛋白 1(Ulip1)与缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)表达水平的变化。方法 选择具有神经元特性的神经母细胞瘤细胞株 KCNR 和 BE2,将细胞分别置于正常氧浓度(体积分数为 20% O₂)和缺氧条件下(1% O₂)处理 4 h,提取蛋白。采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)定量测定 Ulip1 和 HIF-1α 表达。结果 在 KCNR 和 BE2 细胞急性缺氧 4 h 后,HIF-1α 表达水平均显著升高,Ulip1 的两个异构体 Ulip1a 和 Ulip1b 表达水平均降低;其中 HIF-1α 表达水平在 KCNR 细胞内升高了 1.6 倍,在 BE2 细胞内升高了 2.9 倍;Ulip1a 在 KCNR 细胞内降低了 55%,在 BE2 细胞内降低了 20%;Ulip1b 在 KCNR 细胞内降低了 44%,在 BE2 细胞内降低了 13%。结论 Ulip1 可能通过影响 HIF-1α 参与了缺氧诱导的神经细胞损伤及之后的修复过程。

【关键词】 缺氧诱导因子-1α; 不协调类 33 磷蛋白 1; 神经母细胞瘤细胞

The changes in expression of uncoordinated 33-like phosphoprotein 1 and hypoxia-inducible factor-1α in neuroblastoma cells under hypoxic condition TAN Fei, LIU Jing, ZHAO Chen, JING Liang, GUO Yang. Department of Neurology, the Affiliated Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China

【Abstract】 Objective To study the differences in expression of uncoordinated 33-like phosphoprotein 1 (Ulip1) and hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) in neuroblastoma cell lines that have neuronal characteristics under normoxia and hypoxia conditions. **Methods** Two neuroblastoma cell lines (KCNR and BE2) which had neuronal characteristics were used in this study. The neuroblastoma cells were cultured under normoxic (20% of oxygen) or hypoxic (1% of oxygen) conditions for 4 hours, then cells were harvested and proteins were extracted. Western blotting was used to detect the levels of Ulip1 and HIF-1α. **Results** After 4-hour hypoxia treatment, the expression of HIF-1α increased significantly in both cell lines, while the expression of Ulip1a and Ulip1b, which were two isoforms of Ulip1, decreased. There was an 1.6-fold increase of HIF-1α expression in KCNR cells and 2.9-fold increase in BE2 cells; for Ulip1a expression, there was a 55% decrease in KCNR cells and a 20% decrease in BE2 cells; for Ulip1b expression, there was a 44% decrease in KCNR cells and a 13% decrease in BE2 cells. **Conclusion** Ulip1 maybe involved in the hypoxia-induced damage or repair processes in neuronal cells through HIF-1α.

【Key words】 Hypoxia-inducible factor-1α; Uncoordinated 33-like phosphoprotein 1; Neuroblastoma cell

不协调类 33 磷蛋白(Ulips)是一组胞质磷酸化蛋白,目前在脊椎动物中至少有 5 个成员(Ulip1~Ulip5)。根据不同的研究领域及基因功能,Ulip 又被命名为塌陷反应介导蛋白(CRMP)、分裂后启动蛋白(TOAD)、二氢嘧啶酶相关蛋白(DPR)等。作为神经生长发育调节基因,Ulips 在胎儿大脑组织和发育中的神经元内具有较高的表达水平。1995 年,第一个 Ulip 成员作为 Sema3A 信号通路中的一个细胞内组成成分被确定,随后 4 个新成员陆续被发现^[1]。大量研究表明,Ulips 的功能并不限于神经系

统发育过程中神经元内信号的转导,它们参与神经元的分化、生长锥的发育和轴突的定向生长、核酸代谢以及癌症细胞的侵袭和转移等^[2-4]。最新研究发现,脑损伤后 Ulip1 通过与 RhoA 相互作用调节神经元突起外生抑制^[5]。缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)是一种随着细胞内氧浓度变化而调节基因表达的转录激活因子。牛铁生等^[6]研究表明,HIF-1α 的表达是依赖蛋白激酶 C 激活的,蛋白激酶 C 是 HIF-1α 表达的重要信号转导道路。脑中风后脑缺血、缺氧造成神经系统损伤,HIF-1α 表达上调,HIF-1α 激活后通过促进新生血管的形成来保护心、脑、肾等组织免受缺血损害^[7-9]。但 Ulip1 在此病理过程中的变化和作用尚不清楚。本研究中利用 HIF-1α 作为缺氧模型的参照,初步探讨细胞缺氧后 Ulip1 的变化。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.10.014

基金项目:辽宁省科研计划项目(2009225010-12)

作者单位:110004 辽宁沈阳,中国医科大学附属盛京医院神经内科

Email:tanf@sj-hospital.org

1 材料和方法

1.1 实验试剂:抗 HIF-1α 抗体和抗 HIF-1β 抗体均购自美国 Novus 生物公司。抗 Ulip1 抗体由美国 ZYMED 公司制备,利用 Ulip1 多肽免疫家兔产生特异性抗体。抗 Tubulin 抗体、羊抗兔抗体及羊抗鼠抗体购自美国细胞信号技术公司。

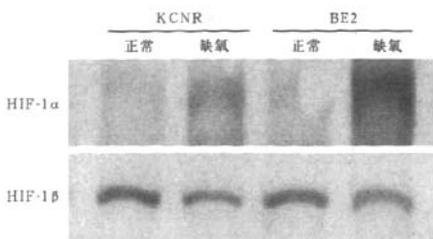
1.2 细胞株:选择两个具有神经元生长特点的神经母细胞瘤细胞株 KCNR、BE2,将细胞置于含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养基中,于 37 °C 含体积分数为 5%CO₂ 的孵育箱中培养。

1.3 细胞缺氧处理:KCNR 和 BE2 细胞首先在含有体积分数为 20% O₂ 的 37 °C 孵育箱中培养 24 h,然后置于含 1% O₂ 的 37 °C 孵育箱中再处理 4 h,最后用冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 遍,快速收取细胞。

1.4 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)测定 HIF-1α 表达:正常氧状态或缺氧处理的细胞在蛋白提取液中于 4 °C 裂解 20 min,离心后提取上清液,测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白,在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中分离蛋白、转膜、封闭、滴加一抗孵育 16 h、洗膜、加二抗孵育 1 h,最后用化学发光法检测。利用 NIH Image 1.63 软件定量测定 Western blotting 的结果。HIF-1α 以 HIF-1β 为内标、Ulip1 以 Tubulin 为内标进行标准化,结果以相对密度单位(RDU)表示,以其在正常氧状态下设定的表达水平为 1,比较缺氧后表达水平的变化。

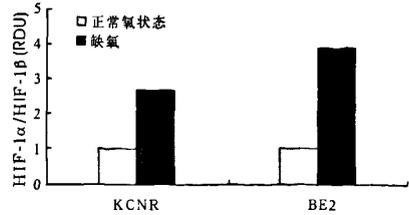
2 结果

2.1 缺氧后 HIF-1α 的表达:Western blotting 结果显示,KCNR 和 BE2 细胞缺氧 4 h 后 HIF-1α 表达水平均显著升高,而 HIF-1β 变化不大(图 1)。密度定量分析显示,缺氧 4 h 后 HIF-1α 水平在 KCNR 细胞内升高了 1.6 倍,在 BE2 细胞内升高了 2.9 倍(图 2)。



HIF-1:低氧诱导因子-1

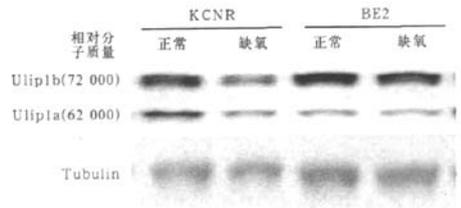
图 1 蛋白质免疫印迹法测定神经母细胞瘤细胞株 KCNR 和 BE2 在正常氧状态和缺氧 4 h 时 HIF-1α 的表达



注:HIF-1:低氧诱导因子-1

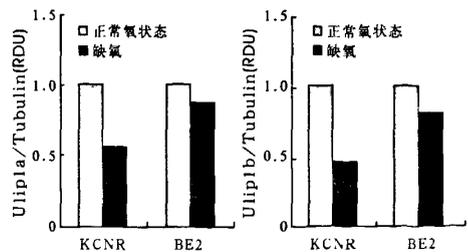
图 2 定量分析神经母细胞瘤细胞株 KCNR 和 BE2 在正常氧状态和缺氧 4 h 时 HIF-1α 的表达

2.2 缺氧后 Ulip1 的表达:Ulip1 抗体检测到蛋白质的两个异构体,一个相对分子质量为 62 000(称作 Ulip1a),另一个为 72 000(称作 Ulip1b)。在 KCNR 细胞中,缺氧 4 h 后 Ulip1 的两个异构体表达水平均明显降低;而在 BE2 细胞中,Ulip1 的两个异构体的表达水平轻度降低(图 3)。密度定量分析显示,缺氧后 Ulip1a 在 KCNR 和 BE2 细胞中分别降低 55%和 20%;Ulip1b 在 KCNR 和 BE2 细胞中分别降低了 44%和 13%(图 4)。



Ulip1:不协调类 33 磷蛋白 1

图 3 蛋白质免疫印迹法测定神经母细胞瘤细胞株 KCNR 和 BE2 在正常氧状态和缺氧 4 h 时 Ulip1 的表达



注:Ulip1:不协调类 33 磷蛋白 1

图 4 定量分析神经母细胞瘤细胞株 KCNR 和 BE2 在正常氧状态和缺氧 4 h 时 Ulip1a、Ulip1b 的表达

3 讨论

HIF-1 是细胞缺氧病理生理过程中起作用的重要转录调控因子,主要由 HIF-1α 和 HIF-1β 两个亚单位组成。HIF-1α 和 HIF-1β 表达广泛,在大多数人和啮齿类动物组织中可检测到。通常情况下 HIF-1β

蛋白持续稳定表达,而 HIF-1 α 蛋白的表达受一种氧敏感性蛋白水解机制的调节。在正常氧压力下 HIF-1 α 被迅速降解,但当氧浓度降至 5% 以下时,其表达稳定,活性进行性升高^[10]。本研究中,神经母细胞瘤细胞在缺氧 4 h 后 HIF-1 α 水平明显升高,而 HIF-1 β 维持相对稳定水平,这与文献报道相一致,并间接证明本研究中建立的缺氧模型是成功的。在此基础上我们发现,在细胞急性缺氧后 4 h Ulip1 蛋白表达水平降低。通常 Ulip1 基因编码两个异构体,即 Ulip1a 和 Ulip1b^[11]。最近研究发现,鼠背根神经节细胞在包被髓磷脂的底物上生长受抑制,利用小干扰 RNA (siRNA) 敲除鼠背根神经节细胞中的 Ulip1b 能促进这些细胞神经突的生长,表明 Ulip1b 在髓磷脂依赖性神经突外生抑制中是必需的^[5]。本研究中检测到,在相对分子质量 62 000(Ulip1a)和 72 000(Ulip1b)有两个蛋白质异构体,且在缺氧后表达水平均降低,只是在不同细胞株中降低的程度不同。Zhang 等^[12]研究发现,体外经神经毒素处理的原代皮质神经元或体内急性创伤性脑损伤后的脑皮质和海马区的 Ulip1 表达水平亦减低,这与本研究结果相似。如果 Ulip1 表达水平的降低可以促进神经元外伸生长,那么急性缺氧后 Ulip1 水平的降低可能是细胞一种自我保护作用的体现。还有研究证实,在全身缺氧的成年大鼠脑组织中 HIF-1 α 表达升高,而 HIF-1 α 的活化可以促进缺氧脑组织中细胞的生长^[13]。Ulip1 降低的这种保护作用可能通过影响 HIF-1 α 升高的表达而实现。不过要明确 Ulip1 在神经细胞缺氧后细胞损伤或细胞修复中的作用,尚需进一步观察在缺氧后不同时间 Ulip1 和 HIF-1 α 的动态变化。

参考文献

[1] Charrier E, Reibel S, Rogemond V, et al. Collapsin response

mediator proteins (CRMPs), involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. Mol Neurobiol, 2003, 28: 51-64.

[2] Gaetano C, Matsuo T, Thiele CJ. Identification and characterization of a retinoic acid-regulated human homologue of the unc-33-like phosphoprotein gene (hUlip) from neuroblastoma cells. J Biol Chem, 1997, 272: 12195-12201.

[3] Schmidt EF, Strittmatter SM. The CRMP family of proteins and their role in Sema3A signaling. Adv Exp Med Biol, 2007, 600: 1-11.

[4] Shih JY, Lee YC, Yang SC, et al. Collapsin response mediator protein-1; a novel invasion-suppressor gene. Clin Exp Metastasis, 2003, 20: 69-76.

[5] Alabed YZ, Pool M, Ong Tone S, et al. Identification of CRMP4 as a convergent regulator of axon outgrowth inhibition. J Neurosci, 2007, 27: 1702-1711.

[6] 牛铁生, 齐国先, 付鹏, 等. 缺氧诱导因子-1 α 对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及其信号转导. 中国危重病急救医学, 2010, 22: 101-104.

[7] 黄越芳, 庄思齐, 陈东平, 等. 新生大鼠缺氧缺血性脑病模型脑组织新生血管形成及调控因素. 中华儿科杂志, 2004, 42: 210-214.

[8] 陈伟, 陈家佩, 葛世丽, 等. 低氧对大鼠肝胃组织内红细胞生成素和低氧诱导因子-1 α 基因表达的影响. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 9-12.

[9] 杜林林, 王朝晖. 低氧诱导因子-1 α 在大鼠心肌梗死中的表达及其意义. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13: 367-369.

[10] Riddle RC, Khatri R, Schipani E, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in angiogenic-osteogenic coupling. J Mol Med, 2009, 87: 583-590.

[11] Yuasa-Kawada J, Suzuki R, Kano F, et al. Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. Eur J Neurosci, 2003, 17: 2329-2343.

[12] Zhang Z, Ortens AK, Sadasivan S, et al. Calpain-mediated collapsin response mediator protein-1, -2, and -4 proteolysis after neurotoxic and traumatic brain injury. J Neurotrauma, 2007, 24: 460-472.

[13] Sharp FR, Bergeron M, Bernaudin M. Hypoxia-inducible factor in brain. Adv Exp Med Biol, 2001, 502: 273-291.

(收稿日期: 2010-09-19) (本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

预充氧呼吸可使失血性休克猪缺氧状态的出现时间延长

失血性休克患者会迅速发生机体缺氧,近日澳大利亚学者对预充氧呼吸对失血性休克猪缺氧状态出现时间的影响进行了研究。研究人员在严重缺氧状态出现前不断增加失血性休克的等级,并用预充氧呼吸法不断改变吸入氧浓度(FiO₂),期间给予持续补液。选取 15 只失血性休克猪,失血量分别控制在 15、30、45 ml/kg,并随机分为标准补液组和不补液组。在每个休克等级,随机选取 3 只出现呼吸暂停的猪进行 5 min 预充氧呼吸,FiO₂ 分别设定为 0.21、0.50、1.00,结束预充氧呼吸后,继续给予机械通气,并记录动脉血氧饱和度(SaO₂)低至 0.70 或更少时所需的时间。接近正常血容量组, SaO₂ < 0.70 时所需的时间分别为 (33 \pm 7) s (FiO₂ 0.21)、(89 \pm 12) s (FiO₂ 0.50)、(165 \pm 22) s (FiO₂ 1.00), P < 0.001。在不断增加失血量时, SaO₂ < 0.70 的发生速度明显比接近正常血容量组快 (P < 0.001),但是补液对其影响并未观察到。在失血量为 45 ml/kg 组, SaO₂ < 0.70 时所需时间分别为 15 s (FiO₂ 0.21)、65 s (FiO₂ 0.50)、140 s (FiO₂ 1.00)。由此研究者得出结论, FiO₂ 以及休克等级影响了缺氧所致呼吸暂停的比例,而非补液因素;与吸入室内空气相比,给予 100% 的氧气预吸入,可以使严重缺氧状态发生的时间延长 5 倍。研究者认为,失血性休克患者在建立紧急通气气道前给予预充氧呼吸可使其缺氧状态的出现时间推迟。

方涛, 编译自《Anesthesiology》, 2010, 113: 593-599; 胡森, 审校