

HIF-1通路在低氧调控神经干细胞发育中的作用*

赵 名 范 明** 朱玲玲**

(军事科学院军事医学研究院军事认知与脑科学研究所, 北京 100850)

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0260

氧气对动物生命至关重要,但长期以来人们一直不清楚细胞如何适应氧气水平的变化.为表彰在“发现细胞如何感知和适应氧气供应”方面所做出的贡献,2019年诺贝尔生理学或医学奖被授予了美国科学家威廉·凯林、格雷格·塞门扎以及英国科学家彼得·拉特克利夫.低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是感知低氧的关键蛋白质,通过调控其靶基因的表达来适应不同的氧气水平.HIF-1信号通路在生物发育、代谢、贫血、损伤修复等生理和病理生理过程中具有重要生物学意义.本文就低氧对神经干细胞发育的调控进行综述,为探索低氧调控神经发育和干细胞移植用于神经系统疾病的防治提供理论依据.

1 低氧与神经干细胞发育

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)具有自我更新的特性及分化为神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞的潜能.成年哺乳动物脑内,神经干细胞主要存在于侧脑室下区(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回的颗粒下区(subgranular zone, SGZ)部位.在中枢神经系统内,神经干细胞存在于相对低氧的微环境中,氧浓度为1%~8%或更低.低浓度的氧气是成年哺乳动物大脑特定区域内存在神经发生的生理基础^[1-2].

在体内,低氧能够调节神经干细胞的命运.早在2005年,我们课题组就发现,间歇性缺氧(3 000 km, 4 h/d)促进大鼠体内神经干细胞的原位增殖,但脑室下区和齿状回部位中神经干细胞的增殖程度存在差异^[3-4].随后的研究发现间歇性低氧能够促进在体内新生神经元的存活和迁移以及树突棘的形态发生,也增加了嗅球中的神经发

生^[5-6].同时发现了间歇性低氧可以增加内源性神经祖细胞(neural progenitor cells, NPCs)的增殖,诱导成年大鼠海马齿状回产生更多的新生神经元^[7].Zhu等^[7]利用大鼠慢性应激模型发现,间歇性低氧能够促进内源性神经祖细胞的增殖,诱导成年大鼠海马中出现更多的新生神经元,从而产生抗抑郁样作用.然而,也有研究报道,严重低氧可能会影响动物的神经发生和神经元可塑性.将大鼠暴露于模拟海拔6 100 m, 3~7 d后可导致其空间记忆损害,并伴有神经元损伤增加和树突棘数目减少^[8].由此可以看出,适度的氧含量对于神经干细胞的增殖反应至关重要.

在体外培养的神经干细胞也证明适度缺氧对神经干细胞的增殖更有利.Zhao等^[9]将从大鼠胚胎(E13.5)脑中分离出来的神经干细胞暴露于不同的氧气浓度(3%~21% O₂)中3 d,结果表明,低氧,尤其是10%氧气,能够显著促进神经球形成和干细胞增殖.Zhang等^[10]利用同样的实验体系,则发现在低氧条件下,从神经干细胞分化出来的多巴胺阳性神经元的百分比明显增加,培养基中的多巴胺含量高于常氧条件.并且2.5%至5%的轻度缺氧能够促进神经干细胞向神经少突胶质祖细胞的分化^[11].将小鼠神经干细胞暴露于1%氧气条件下,尽管神经干细胞没有显示出明显的形态变化并且保留着细胞免疫化学标志.但基因芯片分析表明,细

* 国家自然科学基金重点项目(81430044)和北京市科委项目(Z161100000216134)资助.

** 通讯联系人.

朱玲玲. Tel: 010-66931315, E-mail: linglingzhuamms@126.com

范明. Tel: 010-66932333, Email: fanmingchina@126.com

收稿日期: 2019-10-30, 接受日期: 2019-11-06

胞已上调了与生存和增殖有关的多种因子,使神经干细胞朝着特定的分化潜能发育,同时保持它们未分化状态^[12].因此,氧浓度是在体内外神经干细胞增殖和分化的最关键的环境条件之一.

2 低氧对神经干细胞的调控机制

低氧能够通过多条信号通路影响神经干细胞的

发育,除HIF-1调节靶基因(如VEGF、EPO)通路外,还能在不同层面影响Notch、Wnt、Shh等干细胞信号通路.此外,随着microRNA的不断发现和功能的阐明,microRNA在低氧调控神经干细胞发育中起着重要作用.这些信号通路之间并不孤立,彼此间存在交互作用(cross-talk),协调调节下游基因的表达(图1).

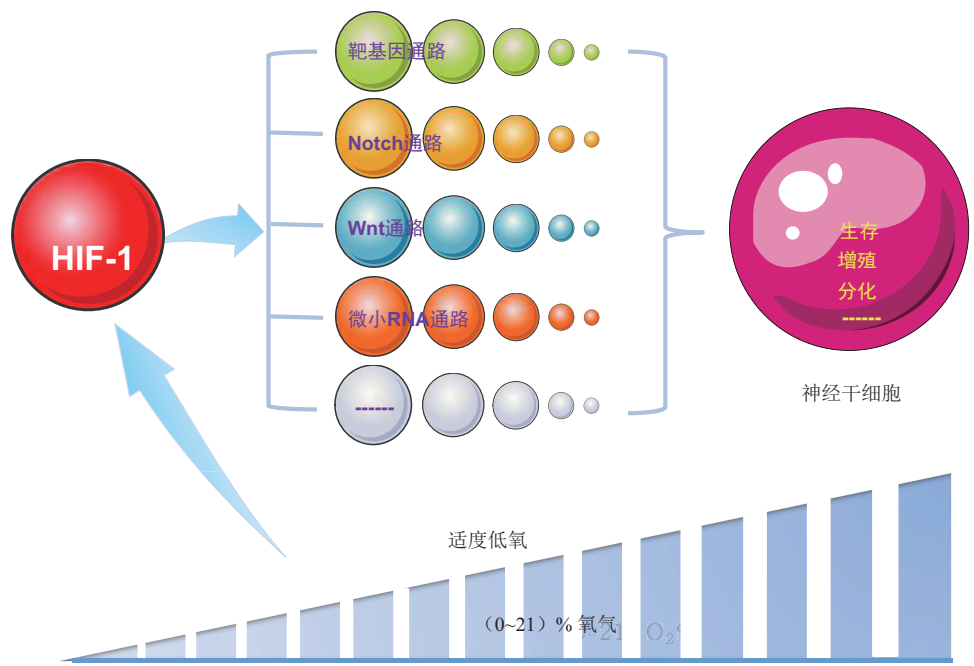


Fig. 1 HIF-1 pathway regulates neural stem cell development under hypoxia conditions
图1 HIF-1通路调控低氧条件下神经干细胞发育示意图

2.1 HIF-1/靶基因通路

低氧诱导因子(hypoxia-inducible factors, HIFs)是细胞感知和适应低氧的主要转录调节因子,该家族包含HIF-1、HIF-2、HIF-3三个成员,均是由调节亚基HIF- α 和组成性亚基HIF- β (又称为ARNT,芳香烃受体核转位因子)组成的异二聚体结构.目前,关于HIF-1 α 调控及其功能的研究最为详细,HIF-2 α 因不同的表达方式而发挥不同的生理作用,HIF-3 α 的研究较少,被认为在低氧基因的诱导中起着负调控作用^[13].

大量研究证实HIF-1信号通路在低氧驱动的神经干细胞增殖中起至关重要的作用.我们在体外培养的神经干细胞中检测了分化过程中HIF-1 α 的表达.与常氧条件相比,尽管HIF-1 α 的mRNA水平没有变化,但在低氧(3% O₂)条件下,HIF-1 α 蛋白的表达明显升高.HIF-1 α 的过表达可增加TH阳性

细胞(多巴胺能神经元)的数量和培养基中多巴胺的含量.这些结果显示,HIF-1 α 参与了低氧诱导神经干细胞,向多巴胺能分化的调节^[10].HIF-1 α 的过表达显著增加了常氧下NPC的增殖,部分模拟了低氧对体外神经干细胞增殖的影响.相反,敲低HIF-1 α 的表达,可降低缺氧诱导的神经干细胞的增殖.这些结果表明,HIF-1在低氧诱导的神经干细胞增殖中起重要作用^[9].在常氧条件下抑制脯氨酸羟化酶的活性能够模拟低氧的作用,可以促进神经干细胞自我更新的干性维持^[14].由于HIF-1 α 蛋白稳定性依赖分子伴侣热休克蛋白90(Hsp90),Hsp90蛋白小分子抑制剂GA或Radicicol可以通过下调HIF-1 α 蛋白水平来影响神经干细胞的增殖^[15].

基因表达谱分析显示,在低氧处理干细胞2 h后约有1.24%的基因表达发生了变化,在142个差

异表达基因中多是糖酵解和代谢相关基因^[16]. 在HIF-1的众多靶基因中, 促红细胞生成素(EPO)和血管内皮生长因子(VEGF)被认为是低氧反应的主要介导者, 参与了机体固有的低氧反应. EPO可以模仿适度低氧诱导的神经发生增强, 并被EPO中和抗体所阻断. EPO注入成人侧脑室导致室下区神经干细胞数量减少, 迁移到嗅球的新生成神经元增加. EPO可作为一种自分泌/旁分泌因子调节神经干细胞向神经元的分化潜能^[17]. 基因表达谱分析显示, VEGF可能是低氧维持神经干细胞行为的关键基因^[18]. 低氧暴露可导致体内的HIF-1 α 和VEGF表达上调并增加齿状回和脑室下区域的神经发生. 当体内的HIF-1 α 被诱导失活后, VEGF介导的血管发生消退, 可进一步导致成年SVZ区大量神经干细胞丢失. 该研究证实了SVZ区内HIF-1 α /VEGF组成性表达, 有利于维持血管壁的完整性和正常的神经发生^[19].

2.2 HIF/Notch通路

Notch1信号通路已被证实在神经发育的多个过程中起重要作用, 包括神经干细胞的增殖、分化以及新生神经元的存活^[20]. 低氧可以激活Notch1信号通路并诱导其下游基因的表达^[21]. 在研究间歇性低氧促进神经发生的体内研究中, 我们发现当Notch1缺失后, 间歇性低氧对Notch/Hes-1信号通路的激活, 以及促进成年动物体内神经发生的作用均受到抑制. 以上结果提示, Notch1通路介导了在低氧条件下, 体内促神经发生的过程^[5]. 低氧能够以Notch依赖性方式阻断神经元分化. Notch细胞内结构域(NICD)与氧稳态的关键调控因子之间HIF-1 α 存在相互作用, 并且在低氧条件下, Notch激活后, HIF-1 α 被募集到Notch反应性启动子, 从而促进其靶基因的表达^[22]. Yasui等^[23]发现低氧通过表观遗传调控赋予了人神经前体细胞向星形胶质细胞分化的潜能, 该作用是通过HIF-1 α 和Notch信号传导的协同作用来实现的. 因此, Notch在低氧维持干细胞的干性和分化潜能方面发挥重要作用.

2.3 HIF/Wnt通路

Wnt/ β -catenin通路是生物进化中极为保守的一条信号通路, 在维持干性中起着重要作用. 经典Wnt/ β -catenin通路活化的特征是Wnt蛋白与细胞表面Frizzled受体家族结合, 导致 β -catenin降解复合体被抑制, 胞浆内的 β -catenin得以稳定并转移入核; β -catenin与LEF/TCF转录因子家族相互作用诱导靶基因的表达. Mazumdar等^[24]观察到HIF-1 α 通

过增强 β -catenin激活和下游效应子LEF的表达, 调节低氧条件下胚胎干细胞中的Wnt/ β -catenin信号传导, 该调节作用延伸至原代细胞, 包括分离的神经干细胞. 在体内, Wnt/ β -catenin活性与海马的亚颗粒区中的低氧区域密切相关. HIF-1 α 缺失会损害海马Wnt通路的效应, 包括神经干细胞增殖、分化和神经元成熟. 这种损害与SGZ中减少的Wnt/ β -catenin信号传导有关. 因此, 低氧通过HIF-1 α 调控的Wnt/ β -catenin信号活性来直接调节干细胞发育. 但是也有报道认为, Wnt/ β -catenin作用于神经干细胞不依赖于HIF-1的活性. 例如, 低氧能够稳定活性的 β -catenin蛋白并增强Wnt靶基因的转录表达, 敲除HIF-1 α 对Wnt的活化没有影响, 通过对细胞周期动力学、细胞活力和干细胞维持率等检测, 发现Wnt/ β -catenin通路能够通过影响细胞周期介导低氧对神经干细胞的增殖诱导作用^[25].

2.4 HIF/微小RNA通路

自2007年以来, 越来越多的研究证实, 特定的微小RNA(microRNAs)参与了低氧反应, 并通过抑制某些基因的表达来介导低氧的生物学效应. 为研究microRNAs在低氧促进神经干细胞增殖中的作用, 微阵列分析显示神经祖细胞经低氧处理后有27个microRNAs水平发生了3倍的上调或下调, 进一步的实验证实HIF-1能够与miR-210转录起始位点上游40 bp处的低氧反应元件结合, 进而调控miR-210的表达^[26]. miR-210通过其靶基因参与对细胞存活、凋亡、线粒体代谢、DNA损伤修复和血管生成等生物学过程的调控^[27]. 低氧以时间依赖性方式增加了神经干细胞中miR-210的表达. 诱导表达的miR-210具有促进神经干细胞存活、抑制细胞凋亡的作用. miR-210通过抑制其靶基因BNIP3的表达, 进而抑制AIF入核, 最终抑制了严重低氧导致的神经干细胞凋亡^[28]. 同时还观察到DNA去甲基化在常氧和低氧下均调节神经干细胞中的miR-210表达^[29]. Voloboueva等^[30]发现, 抑制miR-210表达后可导致神经干细胞分化增强、增殖减弱, 这与线粒体内细胞色素C氧化酶和乌头酸酶的活性升高有关.

3 生物学意义

神经干细胞通过产生不同类型的神经细胞保证神经连接和脑功能的完整性和精确性, 同时也为缺血性脑损伤和神经退行性疾病带来了希望. 精确的氧气浓度控制不仅为神经发育研究提供了切入点和

调控点,也为干细胞移植用于神经系统疾病的防治提供了新的策略.例如,Wakai等^[31]发现低氧预处理能够增强神经干细胞的活力并增加其植入脑出血中的存活率,具有改善干细胞治疗脑出血的功效.由于脯氨酸羟化酶(PHD)控制着HIF-1蛋白的HIF-1 α 降解关键点,因此PHD抑制剂的研发为多种疾病的防治带来了希望.目前,PHD抑制剂罗沙司他(Roxadustat)已在国内获得批准应用于慢性肾脏病透析患者的贫血治疗.PHD抑制剂在治疗慢性应激导致小鼠抑郁模型中也显示出良好的治疗效果^[32].结合其他研究小组在间歇性低氧用于治疗脑缺血、阿尔茨海默病、抑郁症、认知障碍等模型的报道^[33-35],适度低氧在神经系统疾病的防治中具有广阔的应用前景.

参 考 文 献

- [1] Panchision D M. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 2009, **220**(3): 562-568
- [2] Zhang K, Zhu L, Fan M. Oxygen, a key factor regulating cell behavior during neurogenesis and cerebral diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2011, **4**: 5
- [3] Zhu L L, Zhao T, Li H S, *et al.* Neurogenesis in the adult rat brain after intermittent hypoxia. *Brain Research*, 2005, **1055**(1-2): 1-6
- [4] Zhu L L, Wu L Y, Yew D T, *et al.* Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs. *Molecular Neurobiology*, 2005, **31**(1-3): 231-242
- [5] Zhang K, Zhao T, Huang X, *et al.* Notch1 mediates postnatal neurogenesis in hippocampus enhanced by intermittent hypoxia. *Neurobiology of Disease*, 2014, **64**: 66-78
- [6] Zhang K, Zhou Y, Zhao T, *et al.* Reduced cerebral oxygen content in the DG and SVZ *in situ* promotes neurogenesis in the adult rat brain *in vivo*. *Plos One*, 2015, **10**(10): e0140035
- [7] Zhu X H, Yan H C, Zhang J, *et al.* Intermittent hypoxia promotes hippocampal neurogenesis and produces antidepressant-like effects in adult rats. *The Journal of Neuroscience*, 2010, **30**(38): 12653-12663
- [8] Maiti P, Muthuraju S, Ilavazhagan G, *et al.* Hypobaric hypoxia induces dendritic plasticity in cortical and hippocampal pyramidal neurons in rat brain. *Behavioural Brain Research*, 2008, **189**(2): 233-243
- [9] Zhao T, Zhang C P, Liu Z H, *et al.* Hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells--role of hypoxia-inducible transcription factor-1 α . *The FEBS Journal*, 2008, **275**(8): 1824-1834
- [10] Zhang C P, Zhu L L, Zhao T, *et al.* Characteristics of neural stem cells expanded in lowered oxygen and the potential role of hypoxia-inducible factor-1 α . *Neuro-Signals*, 2006, **15**(5): 259-265
- [11] Rodrigues C A, Diogo M M, Da Silva C L, *et al.* Hypoxia enhances proliferation of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, **106**(2): 260-270
- [12] Felfly H, Zambon A C, Xue J, *et al.* Severe hypoxia: consequences to neural stem cells and neurons. *Journal of Neurology Research*, 2011, **1**(5): 10.4021/jnr70w
- [13] Tanaka T, Wiesener M, Bernhardt W, *et al.* The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3 α gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *The Biochemical Journal*, 2009, **424**(1): 143-151
- [14] Wu L Y, He Y L, Zhu L L. Possible role of PHD inhibitors as hypoxia-mimicking agents in the maintenance of neural stem cells' self-renewal properties. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2018, **6**: 169
- [15] Xiong L, Zhao T, Huang X, *et al.* Heat shock protein 90 is involved in regulation of hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells. *Cell Stress & Chaperones*, 2009, **14**(2): 183-192
- [16] Zhu L L, Zhao T, Huang X, *et al.* Gene expression profiles and metabolic changes in embryonic neural progenitor cells under low oxygen. *Cellular Reprogramming*, 2011, **13**(2): 113-120
- [17] Shingo T, Sorokan S T, Shimazaki T, *et al.* Erythropoietin regulates the *in vitro* and *in vivo* production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *The Journal of Neuroscience*, 2001, **21**(24): 9733-9743
- [18] Shi Z, Wei Z, Li J, *et al.* Identification and verification of candidate genes regulating neural stem cells behavior under hypoxia. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, **47**(1): 212-222
- [19] Li L, Candelario K M, Thomas K, *et al.* Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) is required for neural stem cell maintenance and vascular stability in the adult mouse SVZ. *The Journal of Neuroscience*, 2014, **34**(50): 16713-16719
- [20] Koch U, Lehal R, Radtke F. Stem cells living with a Notch. *Development*, 2013, **140**(4): 689-704
- [21] Mutoh T, Sanosaka T, Ito K, *et al.* Oxygen levels epigenetically regulate fate switching of neural precursor cells *via* hypoxia-inducible factor 1 α -notch signal interaction in the developing brain. *Stem Cells*, 2012, **30**(3): 561-569
- [22] Gustafsson M V, Zheng X, Pereira T, *et al.* Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Developmental Cell*, 2005, **9**(5): 617-628
- [23] Yasui T, Uezono N, Nakashima H, *et al.* Hypoxia epigenetically confers astrocytic differentiation potential on human pluripotent cell-derived neural precursor cells. *Stem Cell Reports*, 2017, **8**(6): 1743-1756
- [24] Mazumdar J, O'brien W T, Johnson R S, *et al.* O₂ regulates stem cells through Wnt/beta-catenin signalling. *Nature Cell Biology*, 2010, **12**(10): 1007-1013
- [25] Braunschweig L, Meyer A K, Wagenfuhr L, *et al.* Oxygen regulates proliferation of neural stem cells through Wnt/beta-catenin signalling. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 2015, **67**: 84-92

- [26] Liu Z H, Yang G, Zhao T, *et al.* Small ncRNA expression and regulation under hypoxia in neural progenitor cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2011, **31**(1): 1-5
- [27] Devlin C, Greco S, Martelli F, *et al.* miR-210: more than a silent player in hypoxia. *IUBMB Life*, 2011, **63**(2): 94-100
- [28] Wang F, Xiong L, Huang X, *et al.* miR-210 suppresses BNIP3 to protect against the apoptosis of neural progenitor cells. *Stem Cell Research*, 2013, **11**(1): 657-667
- [29] Xiong L, Wang F, Huang X, *et al.* DNA demethylation regulates the expression of miR-210 in neural progenitor cells subjected to hypoxia. *The FEBS Journal*, 2012, **279**(23): 4318-4326
- [30] Voloboueva L A, Sun X, Xu L, *et al.* Distinct effects of miR-210 reduction on neurogenesis: increased neuronal survival of inflammation but reduced proliferation associated with mitochondrial enhancement. *The Journal of Neuroscience*, 2017, **37**(11): 3072-3084
- [31] Wakai T, Narasimhan P, Sakata H, *et al.* Hypoxic preconditioning enhances neural stem cell transplantation therapy after intracerebral hemorrhage in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2016, **36**(12): 2134-2145
- [32] Li J, Zhang S X, Wang W, *et al.* Potential antidepressant and resilience mechanism revealed by metabolomic study on peripheral blood mononuclear cells of stress resilient rats. *Behavioural Brain Research*, 2017, **320**: 12-20
- [33] Kushwah N, Jain V, Deep S, *et al.* Neuroprotective role of intermittent hypobaric hypoxia in unpredictable chronic mild stress induced depression in rats. *Plos One*, 2016, **11**(2): e0149309
- [34] Manukhina E B, Downey H F, Shi X, *et al.* Intermittent hypoxia training protects cerebrovascular function in Alzheimer's disease. *Experimental Biology and Medicine*, 2016, **241**(12): 1351-1363
- [35] Mateika J H, El-Chami M, Shaheen D, *et al.* Intermittent hypoxia: a low-risk research tool with therapeutic value in humans. *Journal of Applied Physiology*, 2015, **118**(5): 520-532