

Notch1蛋白调控的小胶质细胞极化对小鼠癫痫发作的保护作用

朱洋洋¹, 刘梦¹, 杨道迪¹, 胡依依², 方敬献¹

(1. 南阳市第一人民医院神经内科, 河南 南阳 473000; 2. 郑州大学医学院基础医学院病理生理学教研室, 郑州 450001)

摘要 **目的** 探讨Notch1蛋白调控的小胶质细胞极化对小鼠癫痫发作的保护作用。**方法** 采用Notch1正常表达(Notch1^{normal})和Notch1高表达(Notch1^{over})小鼠构建戊四唑(PTZ)点燃癫痫模型,以Racine等级达到IV级为标准,评价Notch1表达对癫痫发作的影响。通过免疫荧光染色检测小鼠颞叶组织中小胶质细胞活化和极化,采用酶联免疫吸附试验检测小鼠颞叶组织中炎症细胞因子水平。**结果** Notch1高表达对癫痫发作有较强的抵抗作用。与Notch1^{normal}+Sal组相比,Notch1^{normal}+PTZ组小鼠颞叶组织中Iba1、CD16和Arg1蛋白相对荧光强度明显增加($P < 0.05$),TNF- α 、IL-6、IL-10含量明显增加($P < 0.05$);与Notch1^{normal}+PTZ组相比,Notch1^{over}+PTZ组小鼠颞叶组织Iba1和CD16蛋白相对荧光强度明显降低($P < 0.05$),Arg1蛋白相对荧光强度明显增加($P < 0.05$),TNF- α 、IL-6含量明显减少($P < 0.05$),IL-10含量进一步增加($P < 0.05$)。**结论** Notch1蛋白高表达能够明显提高M2型小胶质细胞极化,抑制M1型小胶质细胞极化,增强小鼠对癫痫发作的抵抗性。

关键词 Notch1; 小胶质细胞; 极化; 炎症反应; 癫痫

中图分类号 R742.1 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2025)03-0228-05

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250318.1446.034>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.03.008

Protective effect of Notch1-regulated microglial polarization against epileptic seizure in mice

ZHU Yangyang¹, LIU Meng¹, YANG Daodi¹, HU Yiyi², FANG Jingxian¹

(1. Department of Neurology, Nanyang First People's Hospital, Nanyang 473000, China; 2. Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, School of Medicine of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract **Objective** To investigate the protective effect of Notch1-regulated microglial polarization against epileptic seizure in mice. **Methods** The pentylenetetrazole (PTZ) kindling models of epilepsy were established in mice with normal (Notch1^{normal}) and high (Notch1^{over}) expression of the Notch1 protein, with Racine grade IV set as the standard, to evaluate the effect of Notch1 expression on seizure susceptibility. Microglial activation and polarization in the temporal lobe tissues of mice were detected using immunofluorescence staining, and the levels of inflammatory cytokines in the temporal lobe tissues was detected using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** High Notch1 expression showed high resistance to seizures. Compared with the Notch1^{normal}+Sal group, the relative fluorescence intensity of Iba1, CD16, and Arg1 proteins in the temporal lobes of mice in the Notch1^{normal}+PTZ group, as well as the TNF- α , IL-6, and IL-10 levels significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the Notch1^{normal}+PTZ group, the relative fluorescence intensity of Iba1 and CD16 proteins in the temporal lobes of mice in the Notch1^{over}+PTZ group significantly decreased ($P < 0.05$), the relative fluorescence intensity of Arg1 protein significantly increased ($P < 0.05$), the TNF- α and IL-6 levels significantly decreased ($P < 0.05$), and the IL-10 level further increased ($P < 0.05$). **Conclusion** High Notch1 protein expression significantly enhanced M2-type microglial polarization, inhibited M1-type microglial polarization, and increased resistance to seizure susceptibility in mice.

Keywords Notch1; microglia; polarization; inflammatory reaction; epilepsy

颞叶癫痫是一种神经系统疾病,全球患病率约为1%^[1]。然而,癫痫的发作机制不明,约30%的颞叶癫痫患者存在抗癫痫药物抵抗^[2]。因此,癫痫的发作机制以及更多的治疗靶点有待进一步研究。小胶

质细胞是中枢神经系统中动态调控的免疫细胞,在癫痫治疗中受到越来越多的关注。研究^[3]显示,颞叶癫痫模型构建后3 d内,前额皮层中M1型和M2型小胶质细胞标志物表达不断增加,之后M1型和M2型小胶质细胞比例不断变化,M1型小胶质细胞逐渐增加,而M2型小胶质细胞逐渐减少。然而,M1型和M2型小胶质细胞极化相关的分子机制尚未完全阐明。

Notch1及其配体Jagged1在小胶质细胞中高度表达,与下游基因一同调控小胶质细胞激活、极化

基金项目:河南省科技发展计划(222102310145)

作者简介:朱洋洋(1990-),女,硕士研究生。

通信作者:方敬献,E-mail:nanyangshennei@163.com

收稿日期:2024-03-19

网络出版时间:2025-03-19 14:23:15

和炎症诱导^[4]。在大脑钝性挫伤模型中,Notch1蛋白表达和小胶质细胞活化程度协同升高^[5]。此外,研究^[5-6]发现,Notch1能够通过调控M1型和M2型小胶质细胞极化,减轻缺血性卒中神经功能损伤。然而,Notch1调控的小胶质细胞激活和表型极化对癫痫的影响尚不清楚。本研究通过多种癫痫点燃模型,探究Notch1蛋白高表达对戊四唑(pentylenetetrazole, PTZ)点燃癫痫发作进程的影响,为Notch1靶点药物的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

PTZ,购自美国Sigma-Aldrich公司;兔抗鼠离子钙结合适配器分子1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1)蛋白抗体、大鼠抗小鼠CD16蛋白抗体、大鼠抗小鼠精氨酸酶1(arginase-1, Arg1)蛋白抗体,购自英国abcam公司;生物胞素Alexa Fluor 488标记羊抗兔二抗和菁类荧光染料Cy3标记羊抗大鼠二抗,购自上海碧云天生物技术股份有限公司;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin, IL)-6和IL-10酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,购自美国BioLegend公司。

1.2 实验动物和分组

采用48只、雌雄各半的C57BL/6小鼠构建Notch1正常表达(Notch1^{normal})和Notch1高表达(Notch1^{over})小鼠,各24只,由百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2020-0007。小鼠饲养于SPF级实验动物房中。维持饲养环境安静,保证充足的饲料和水,控制室内温度(24 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度(40 \pm 10)%,维持12 h昼夜循环。本研究通过南阳市第一人民医院伦理委员会审核批准,审批号:[2022]伦审19号。

取24只Notch1^{normal}小鼠,分为Notch1^{normal}+生理盐水组(Notch1^{normal}+Sal组)和Notch1^{normal}+PTZ组,雌雄各半,每组12只。取24只Notch1^{over}小鼠,分为Notch1^{over}+生理盐水组(Notch1^{over}+Sal组)和Notch1^{over}+PTZ组,雌雄各半,每组12只。

Notch1^{normal}+PTZ组和Notch1^{over}+PTZ组小鼠,每日腹腔注射0.5 mL PTZ溶液(30 mg/kg),连续28 d,构建癫痫慢性点燃模型^[7]。给药后30 min内,观察小鼠癫

痫发作行为,根据Racine评分标准评估癫痫发作等级,当连续3 d达到IV级时,认为模型建立成功,记录此时时间。Notch1^{normal}+Sal组和Notch1^{over}+Sal组小鼠,每日腹腔注射0.5 mL生理盐水,连续28 d。

1.3 Racine评分^[7]标准

0级,无抽搐发作;I级,面部和嘴抽动;II级,频繁点头运动;III级,单侧前肢阵挛;IV级,双侧前肢抽搐,时常身体立起;V级,全面性强直阵挛发作,即身体背曲强直和跌倒。

1.4 免疫荧光染色检测小胶质细胞活化和极化

将小鼠处死后心脏灌注,取出完整脑组织,放入4%多聚甲醛中固定24 h。取出脑组织,梯度乙醇脱水,冷冻液包埋,切成约10 μ m厚冠状切片,表面滴加山羊血清封闭。切片清洗后,分别滴加兔抗鼠Iba1抗体稀释液和大鼠抗小鼠CD16或Arg1抗体(1 : 100)稀释液,4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育过夜。清洗切片表面,滴加二抗稀释液,室温避光孵育1 h。清洗切片表面,滴加DAPI染料孵育5 min进行细胞核染色,荧光显微镜下观察荧光发光并拍照。

1.5 炎性细胞因子检测

小鼠处死后取颞叶组织匀浆,制成待测样品,采用双缩脲蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。取提前包被完成的TNF- α 、IL-6、IL-10 ELISA检测板,稀释试剂盒中标准品。将检测样品和标准品加入ELISA检测板各个样品孔中,37 $^{\circ}$ C孵育2 h。弃去板中样品,洗板后加入对应一抗稀释液,37 $^{\circ}$ C孵育1 h。弃去一抗稀释液,洗板后加入HRP标记二抗稀释液,37 $^{\circ}$ C孵育1 h。弃去二抗稀释液,洗板后加入显色液,15 min后加入终止液,450 nm处检测各个样品光密度值。通过标准曲线计算出各个样品中TNF- α 、IL-6、IL-10含量。

1.6 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在癫痫慢性点燃模型中评估Notch1蛋白高表达对小鼠癫痫发作的影响

Notch1^{normal}+PTZ组和Notch1^{over}+PTZ组连续3次到达Racine IV级症状的平均时间分别为(16.10 \pm

2.00) d和(23.15 ± 2.58) d,与Notch1^{normal}+PTZ组相比,Notch1^{over}+PTZ组小鼠连续3次到达Racine IV级症状的平均时间明显延长($P < 0.05$)。

2.2 Notch1蛋白高表达对小胶质细胞极化的影响
与Notch1^{normal}+Sal组相比,Notch1^{normal}+PTZ组小

鼠颞叶组织中Iba1、CD16和Arg1蛋白相对荧光强度均明显增加($P < 0.05$);与Notch1^{normal}+PTZ组相比,Notch1^{over}+PTZ组小鼠颞叶组织中Iba1和CD16蛋白相对荧光强度明显降低($P < 0.05$),Arg1蛋白相对荧光强度明显增加($P < 0.05$)。见图1、图2、表1。

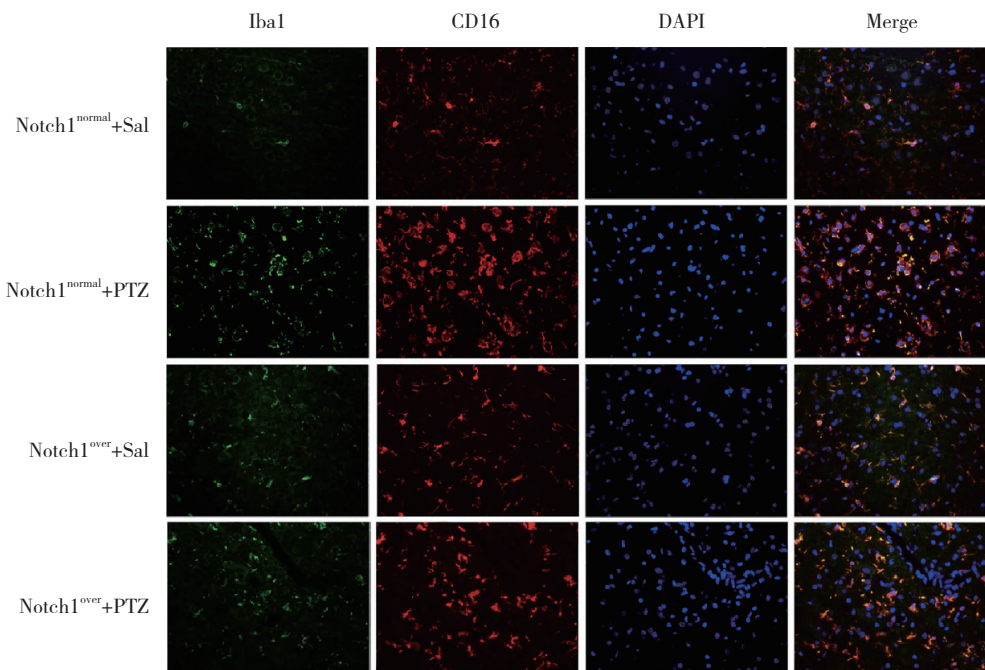


图1 小鼠颞叶组织中Iba1和CD16蛋白免疫荧光染色 ×20

Fig.1 Immunofluorescence staining of Iba1 and CD16 proteins in the temporal lobes of mice ×20

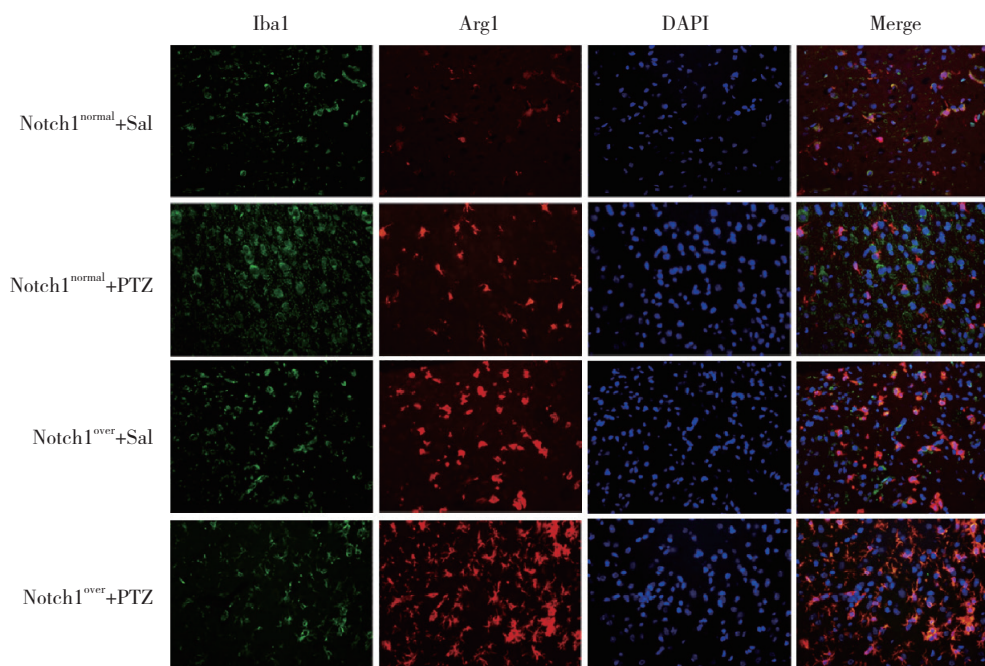


图2 小鼠颞叶组织中Iba1和Arg1蛋白免疫荧光染色 ×20

Fig.2 Immunofluorescence staining of Iba1 and Arg1 proteins in the temporal lobes of mice ×20

表1 小鼠颞叶组织中Iba1、CD16和Arg1蛋白相对荧光强度的比较

Tab.1 Comparison of relative fluorescence intensities of Iba1, CD16, and Arg1 proteins in the temporal lobes of mice

Group	Iba1	CD16	Arg1
Notch1 ^{normal} +Sal	1.00 ± 0.26	1.00 ± 0.24	1.00 ± 0.26
Notch1 ^{normal} +PTZ	4.33 ± 1.04 ¹⁾	4.55 ± 0.80 ¹⁾	1.37 ± 0.29 ¹⁾
Notch1 ^{over} +Sal	1.23 ± 0.18	1.17 ± 0.22	1.98 ± 0.37 ¹⁾
Notch1 ^{over} +PTZ	1.20 ± 0.24 ²⁾	1.33 ± 0.18 ²⁾	2.48 ± 0.37 ²⁾
<i>F</i>	49.09	44.21	12.23
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

1) $P < 0.05$ vs. Notch1^{normal}+Sal group; 2) $P < 0.05$ vs. Notch1^{normal}+PTZ group.

2.3 Notch1蛋白高表达对炎症反应的影响

与Notch1^{normal}+Sal组相比, Notch1^{normal}+PTZ组小鼠颞叶组织中TNF- α 、IL-6、IL-10含量明显增加($P < 0.05$);

与Notch1^{normal}+PTZ组相比, Notch1^{over}+PTZ组小鼠颞叶组织中TNF- α 、IL-6含量明显减少($P < 0.05$), IL-10含量进一步增加($P < 0.05$)。见表2。

表2 小鼠颞叶组织中TNF- α 、IL-6和IL-10含量的比较Tab.2 Comparison of the TNF- α , IL-6, and IL-10 levels in the temporal lobes of mice

Group	TNF- α	IL-6	IL-10
Notch1 ^{normal} +Sal	83.71 ± 14.08	136.53 ± 30.51	129.72 ± 17.12
Notch1 ^{normal} +PTZ	293.58 ± 60.92 ¹⁾	770.25 ± 99.38 ¹⁾	203.91 ± 32.20 ¹⁾
Notch1 ^{over} +Sal	76.10 ± 12.66	117.77 ± 31.57	337.68 ± 39.56 ¹⁾
Notch1 ^{over} +PTZ	126.44 ± 34.06 ²⁾	163.14 ± 32.85 ²⁾	467.99 ± 54.31 ²⁾
<i>F</i>	47.31	186.12	106.80
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

1) $P < 0.05$ vs. Notch1^{normal}+Sal group; 2) $P < 0.05$ vs. Notch1^{normal}+PTZ group.

3 讨论

慢性点燃模型能够较好地模拟癫痫的进展和长期反复性发作,已用于多种癫痫的病理、生理研究以及抗癫痫药物筛选^[7-8]。本研究首先比较了Notch1^{over}和Notch1^{normal}小鼠在癫痫点燃中的差异,结果显示,Notch1^{normal}小鼠在癫痫慢性点燃模型中连续3次到达Racine IV级症状的时间增加。提示Notch1高表达能够明显减轻小鼠癫痫症状,延缓癫痫的发生时间,降低癫痫易感性。

中枢神经系统中,PTZ侵入会诱导小胶质细胞活化和极化,诱发炎症反应,促进癫痫病理进展。然而,不同点燃模型、发作时间和检测时间点间,小胶质细胞极化存在差异^[9]。急性癫痫模型中,小胶质细胞首先会出现不同程度的活化,M1型(CD16/CD86)和M2型(CD206/Arg1)小胶质细胞极化标志

物的mRNA表达明显增加^[9]。然而,在慢性点燃模型中,在前期M1型和M2型小胶质细胞极化标志物表达水平均明显升高,随着癫痫的发展,M2型小胶质细胞极化标志物表达水平在癫痫不断发作中逐渐降低^[10]。本研究结果显示,与Notch1^{normal}+Sal组相比,Notch1^{normal}+PTZ组小鼠脑组织中炎性细胞因子TNF- α 和IL-6含量、小胶质细胞活化标志物Iba1和M1型极化标志物CD16表达增加,提示慢性点燃模型会诱发小胶质细胞向促炎性表型极化。与此同时,IL-10含量和M2型极化标志物Arg1表达增加,提示M2型小胶质细胞极化增加,但其趋势远不及M1型小胶质细胞极化。

Notch1蛋白早期被发现具有调控神经干细胞再生功能,激活或抑制Notch1蛋白将不同程度影响神经干细胞命运^[11]。随着研究的进展,Notch1蛋白被发现与炎症反应相关,但关于其机制的研究结果仍存在一些矛盾。有研究^[12]认为,Notch1蛋白促进热

休克因子激活,进而抑制NLRP3功能和肝细胞凋亡,从而缓解缺血再灌注诱导的肝损伤。但有研究^[13]认为,Notch1会介导炎症,加速内皮细胞衰老,最终导致内皮细胞功能障碍。此外,脂多糖激活的小胶质细胞通过提高Notch1蛋白表达水平,调控促炎性细胞因子的释放^[14]。以上研究结果提示,Notch1蛋白对炎症反应的调控作用机制仍有待进一步研究,且Notch1蛋白表达在炎症反应的不同时期可能存在差异。本研究结果显示,Notch1蛋白表达能够明显调控小胶质细胞极化。小胶质细胞极化调节是一类新的神经保护途径。研究^[15]发现,腹腔注射IL-4/ γ 干扰素可调节小胶质细胞表型的比例,抑制极化的M1型小胶质细胞中IL-1 β 的合成,明显改善小鼠慢性癫痫活动。本研究结果显示,Notch1蛋白高表达与M1型小胶质细胞极化减少、M2型小胶质细胞极化增加相关。与Notch1^{normal}+Sal组比较,Notch1^{over}+Sal组小鼠CD16蛋白表达虽然未见明显变化,但Arg1蛋白表达明显增加,且抗炎细胞因子IL-10含量增加,提示Notch1^{over}小鼠对中枢炎症反应具有一定的抵抗性。此外,与Notch1^{normal}+PTZ组相比,Notch1^{over}+PTZ组小鼠颞叶组织中炎性细胞因子TNF- α 、IL-6含量明显减少,小胶质细胞活化和M1型极化标志物Iba1、CD16蛋白表达明显降低,但M2型极化标志物Arg1蛋白表达明显增加。这在一定程度上解释了Notch1蛋白表达调控小胶质细胞表型转化的机制。

本研究存在一定的局限性。首先,本研究仅对Notch1蛋白高表达小鼠进行了研究,而未探讨Notch1蛋白敲低或抑制小鼠对癫痫的易感性,未能全面说明Notch1蛋白对炎症反应和小胶质细胞活化的影响。其次,本研究未对Notch1蛋白下游信号通路的变化进行进一步研究,其对小胶质细胞调控的影响有待进一步探索。

综上所述,本研究结果提示,小鼠脑组织中Notch1蛋白高表达能够明显提高M2型小胶质细胞极化,增加小鼠对癫痫发作的抵抗性。

参考文献:

[1] DING D, ZHOU D, SANDER JW, et al. Epilepsy in China: major progress in the past two decades [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20 (4) : 316-326. DOI: 10.1016/S1474-4422 (21) 00023-5.

[2] LIU TT, FENG L, LIU HF, et al. Altered axon initial segment in hippocampal newborn neurons, associated with recurrence of temporal lobe epilepsy in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16 (3) : 3169-3178. DOI: 10.3892/mmr.2017.7017.

[3] BENSON MJ, MANZANERO S, BORGES K. Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models [J]. *Epilepsia*, 2015, 56 (6) : 895-905. DOI: 10.1111/epi.12960.

[4] 连小月, 张志诚, 李晨嫣. Notch信号通路调控巨噬细胞极化加重自身免疫性甲状腺炎 [J]. *中国医科大学学报*, 2021, 50 (10) : 899-903. DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2021.10.007.

[5] CHEN R, ZHU H, WANG Z, et al. Targeting microglia/macrophages Notch1 protects neurons from pyroptosis in ischemic stroke [J]. *Brain Sci*, 2023, 13 (12) : 1657. DOI: 10.3390/brainsci13121657.

[6] LI QQ, DING DH, WANG XY, et al. Lipoxin A4 regulates microglial M1/M2 polarization after cerebral ischemia-reperfusion injury via the Notch signaling pathway [J]. *Exp Neurol*, 2021, 339 : 113645. DOI: 10.1016/j.expneurol.2021.113645.

[7] VAN ERUM J, VAN DAM D, DE DEYN PP. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale [J]. *Epilepsy Behav*, 2019, 95 : 51-55. DOI: 10.1016/j.yebeh.2019.02.029.

[8] LU Y, LIN M, OU S, et al. Astragalus polysaccharides ameliorate epileptogenesis, cognitive impairment, and neuroinflammation in a pentylenetetrazole-induced kindling mouse model [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15 : 1336122. DOI: 10.3389/fphar.2024.1336122.

[9] ZHENG Q, ZHU T, HU H, et al. TRPM2 ion channel is involved in the aggravation of cognitive impairment and down regulation of epilepsy threshold in pentylenetetrazole-induced kindling mice [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 155 : 48-60. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.11.018.

[10] XIE L, LI T, SONG X, et al. Dynamic alteration of dendrites and dendritic spines in the hippocampus and microglia in mouse brain tissues after kainate-induced status epilepticus [J]. *Int J Neurosci*, 2021, 131 (11) : 1045-1057. DOI: 10.1080/00207454.2020.1770246.

[11] YI L, ZHOU X, LI T, et al. Notch1 signaling pathway promotes invasion, self-renewal and growth of glioma initiating cells via modulating chemokine system CXCL12/CXCR4 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38 (1) : 339. DOI: 10.1186/s13046-019-1319-4.

[12] JIN Y, LI C, XU D, et al. Jagged1-mediated myeloid Notch1 signaling activates HSF1/Snail and controls NLRP3 inflammasome activation in liver inflammatory injury [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17 (12) : 1245-1256. DOI: 10.1038/s41423-019-0318-x.

[13] PARK JH, CHOI JY, LEE HK, et al. Notch1-mediated inflammation is associated with endothelial dysfunction in human brain microvascular endothelial cells upon particulate matter exposure [J]. *Arch Toxicol*, 2021, 95 (2) : 529-540. DOI: 10.1007/s00204-020-02942-9.

[14] GE Y, HUANG M, MA YF. The effects of microRNA-34a regulating Notch-1/NF- κ B signaling pathway on lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cells [J]. *World J Emerg Med*, 2017, 8 (4) : 292-296. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2017.04.008.

[15] LI T, ZHAI X, JIANG J, et al. Intraperitoneal injection of IL-4/IFN- γ modulates the proportions of microglial phenotypes and improves epilepsy outcomes in a pilocarpine model of acquired epilepsy [J]. *Brain Res*, 2017, 1657 : 120-129. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.12.006.