

# 人脐带间充质干细胞内源性SDF-1 $\alpha$ 促进HIBD大鼠 神经功能修复的实验研究

杨亭 古佳露 周小勤 谷燕 何慕兰 李廷玉 陈洁\*

(重庆医科大学附属儿童医院儿童营养研究室, 儿童营养与健康重庆市重点实验室,  
儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际合作基地, 重庆 400014)

**摘要** 该文主要研究人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)促进缺氧缺血性脑损伤(Hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)神经功能修复的作用及机制。hUC-MSCs移植后, 对大鼠进行行为学观察, 运用HE(hematoxylin-eosin)染色观察海马组织病理改变, Western blot检测hUC-MSCs与氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)神经干细胞分离共培养体系、HIBD大鼠海马组织中SDF-1 $\alpha$ 、CXCR4、PI3K/AKT表达; CCK-8测定干细胞增殖情况。结果显示, hUC-MSCs移植后: HIBD大鼠学习记忆功能和海马组织病变改善; 海马区Nestin表达和海马齿状回区再生神经干细胞数量升高; 海马组织hSDF-1 $\alpha$ 、SDF-1 $\alpha$ 、CXCR4、PI3K、AKT及p-AKT表达上调。hUC-MSCs促进OGD损伤神经干细胞增殖及hSDF-1 $\alpha$ 分泌, 上调PI3K和p-AKT表达。该文结果提示, hUC-MSCs移植上调HIBD大鼠海马组织hSDF-1 $\alpha$ 分泌, 激活PI3K/AKT通路, 诱导内源性神经干细胞再生, 改善HIBD大鼠学习记忆功能。

**关键词** 人脐带间充质干细胞; SDF-1 $\alpha$ ; 缺氧缺血性脑损伤; 神经干细胞; PI3K/AKT信号通路

## Endogenous SDF-1 from the hUC-MSCs Promotes Improvement of Nerve Function in the HIBD Rats

Yang Ting, Gu Jialu, Zhou Xiaoqin, Gu Yan, He Mulan, Li Tingyu, Chen Jie\*

(Children's Research Center, Children's Hospital of Chongqing Medical University,

Chongqing Key Laboratory of Child's Nutrition and Health, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders,  
China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing 400014, China)

**Abstract** The paper mainly studies the role and mechanism of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) in promoting neurological repair of hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). After transplantation of hUC-MSCs, HIBD rats were observed for behavior, histopathological changes of hippocampus were observed by hematoxylin-eosin staining, the supernatant in co-culture system of hUC-MSCs and oxygen glucose deprivation (OGD) neural stem cells was detected by Western blot, the expression of SDF-1 $\alpha$ , CXCR4 and PI3K/AKT in hippocampus tissue of HIBD rats were detected, and the proliferation of stem cells was measured by CCK-8. The results showed that after transplantation of hUC-MSCs, the learning and memory function and hippocampal

收稿日期: 2018-11-22 接受日期: 2018-12-18

国家自然科学基金面上(批准号: 81271385)和重庆医科大学附属儿童医院干细胞专项(批准号: SCT-201203)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13018375453, E-mail: jchen010@hospital.cqmu.edu.cn

Received: November 22, 2018 Accepted: December 18, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81271385) and Stem Cell Project of Children's Hospital of Chongqing Medical University (Grant No.SCT-201203)

\*Corresponding author. Tel: +86-13018375453, E-mail:jchen010@hospital.cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-06-13 18:04:52 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190613.1804.028.html>

pathological changes of HIBD rats were improved, the expression of Nestin in hippocampus and the number of re-generated neural stem cells in dentate gyrus of hippocampus were increased, and the expressions of hSDF-1 $\alpha$ , SDF-1 $\alpha$ , CXCR4, PI3K, AKT and p-AKT in hippocampus were up-regulated. hUC-MSCs promote the proliferation and secretion of hSDF-1 $\alpha$  in nerve stem cells injured by OGD, and up-regulate the expression of PI3K and p-AKT.

**Keywords** human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs); SDF-1 $\alpha$ ; hypoxic-ischemic brain damage (HIBD); neuron stem cells (NSCs); PI3K/AKT signaling pathway

人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)增殖能力明显强于骨髓等组织来源的干细胞,经诱导hUC-MSCs可跨胚层向神经细胞、内皮细胞等分化<sup>[1-2]</sup>,且较骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)有更强的分化潜能<sup>[3]</sup>。hUC-MSCs自身表达SOX9、Col IIA1<sup>[4]</sup>,具有神经细胞前体和前软骨细胞特性,诱导后表达更多胶原蛋白,因此hUC-MSCs在神经系统及运动系统的损伤修复方面具有其他干细胞不可比拟的优势<sup>[5]</sup>。hUC-MSCs自身可以分泌大量神经营养因子、血管生成因子等多种细胞因子,且损伤微环境可促进上述因子的分泌<sup>[6-7]</sup>,从而更好的发挥修复作用;其在缺血性脑卒中、创伤性脑损伤、阿尔茨海默病等疾病的治疗中均取得很好的效果<sup>[8-9]</sup>。

我们前期研究发现, hUC-MSCs可通过分泌IL-8, 促进新生鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)大鼠海马区血管生成, 进而促进其学习记忆功能的恢复<sup>[10]</sup>。基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1), 是趋化因子家族中重要成员之一, 除具有经典的趋化作用外, 还具有抗凋亡、促进神经血管生成等作用, 另外具有类神经递质活性。SDF-1 $\alpha$ 是其主要形式, CXCR4是最常见的SDF-1特异性受体。SDF-1 $\alpha$ 和CXCR4特异性结合后在脑损伤、脑退行性疾病神经修复过程中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。有研究指出, hUC-MSCs可通过分泌SDF-1 $\alpha$ 等因子参与血管和胶质细胞生成, 促进创伤性脑损伤动物脑功能修复<sup>[12]</sup>, 且通过PI3K/p-AKT通路促进体外培养的神前体细胞增殖<sup>[13]</sup>。本实验运用HIBD新生大鼠动物模型, 在明确hUC-MSCs移植治疗HIBD的效果基础上, 进一步探讨SDF-1 $\alpha$ 促进神经修复的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及细胞

SD大鼠购买于重庆医科大学实验动物中心(合

格证: SCXK(渝)2012-0001), 饲养于SPF级动物饲养房, 并通过动物伦理委员会审批。实验所用人脐带间充质干细胞来源于重庆市干细胞库, 获得医院伦理委员会许可(approval number: 024/2013), hUC-MSCs的培养及扩增均按标准流程操作, hUC-MSCs的细胞形态、表面抗原和分化潜能等均做过鉴定<sup>[14]</sup>, 符合国际细胞治疗协会推荐的标准<sup>[15]</sup>。原代大鼠神经干细胞, 取自出生1天以内新生大鼠海马组织。

### 1.2 主要试剂

干细胞完全培养基由DMEM/F12(1:1)(Gibco, USA)加10%胎牛血清配制(Gibco, USA), 再予1%的双抗青霉素(Gibco, USA)。消化液采用Triple(Gibco, USA); 细胞清洗液采用自配D-Hanks液; 细胞接种均于12孔板(Cosmo, USA)和25 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶(Corning, USA); 细胞离心采用15 mL离心管(BD, USA); 抗人CD34、CD44、CD29、CD45和CD105抗体(eBioscience, USA); 兔抗人NSE抗体(abcam, USA); 羊抗兔FITC荧光二抗(Bioss, China); 尼氏染色液(Beyotime, China); 胞核荧光染液为Hoechst 33258(Beyotime, China); 成骨诱导培养基和成脂诱导培养基和成神经诱导培养基(HyClone, USA); 秋水仙碱(Sigma, USA)。

### 1.3 HIBD动物模型建立及hUC-MSCs侧脑室移植

实验选用出生7天SPF级同窝健康SD大鼠, 采用经典Rice法建立HIBD模型。HIBD建模后5天, 将建模大鼠随机分为PBS组( $n=35$ )和hUC-MSCs移植组( $n=40$ )。麻醉建模大鼠并固定, 在脑立体定位仪指引下, 沿矢状线剪开顶部皮肤, 暴露前囟, 进针坐标为: 前囟后1.1~1.2 mm, 左侧旁开1.3 mm, 进针深度3.5~4.0 mm, 微量注射器注射hUC-MSCs细胞悬液5  $\mu$ L( $5 \times 10^5$ 细胞), 注射速度1  $\mu$ L/min, 时间5 min, 每只注射完留针2 min。PBS组给予5  $\mu$ L过滤灭菌的PBS。整个过程注意给实验大鼠保温, 待其苏醒再次清理血迹后放回母鼠笼继续喂养。细胞移植后28天进行Morris水迷宫实验和Object-in-place新事物探索实验。

## 1.4 HIBD大鼠脑组织观察及相关蛋白的表达水平检测

HIBD模型鼠干细胞移植后1天用于固定脑组织进行HE染色、脑组织冰冻切片利用Nestin和Brdu进行双标,分别观察脑组织病理改变和再生的大鼠海马DG区神经干细胞。Western blot检测海马组织中SDF-1 $\alpha$ 、CXCR4、Nestin、PI3K/AKT信号通路关键蛋白表达水平变化。

## 1.5 神经干细胞分离培养

取出生1天内SD大鼠脑组织,迅速置于装有预冷的D-Hanks液的容器中,显微镜下迅速剥离并分离海马组织。弯剪将海马组织剪碎,移液枪收集至无菌离心管中,巴氏管轻轻吹打后,依次用200目、400目金属滤网过滤细胞悬液;收集滤液于无菌离心管中,1 000 r/min $\times$ 5 min离心,弃上清;D-Hanks重悬洗2遍,再离心;稀释并计数细胞,6孔板 $1\times 10^6$ 个/孔,4~5 mL培养基/孔,全程无菌操作,冰上进行,用NSCs培养基悬浮培养。然后将培养液置于5% CO<sub>2</sub>、21% O<sub>2</sub>、37 °C孵箱培养,每2天换液。

## 1.6 NSCs氧糖剥夺损伤及分离共培养

体外运用氧糖剥夺损伤(OGD)模拟HIBD损伤,Transwell分离小室用于hUC-MSCs、hSDF-1中和抗体与OGD损伤的NSCs分离共培养。具体分为3组:组1不干预;组2收集P3 hUC-MSCs,以 $1.5\times 10^5$ 种于24孔板Transwell上室;组3收集P3 hUC-MSCs,以 $1.5\times 10^5$ 种于24孔板Transwell上室,并加入hSDF-1 Antibody(2.4  $\mu$ g/mL,3次/24 h)。在5% CO<sub>2</sub>、21% O<sub>2</sub>、37 °C培养箱分离共培养24 h。ELISA检测三组培养上清中hSDF-1 $\alpha$ 分泌情况,CCK-8试剂盒检测OGD损伤的神经干细胞增殖变化;Western blot检测PI3K/AKT信号通路关键蛋白表达水平变化。

## 1.7 统计学分析

采用GraphPad Prism 5.0软件进行统计分析,多组样本间差异采用单因素方差分析,组样本间比较采用 $t$ 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。水迷宫实验数据为多次重复检测结果。

# 2 结果

## 2.1 hUC-MSCs移植促进HIBD大鼠学习记忆功能修复

Morris水迷宫检测HIBD大鼠的学习记忆功能,发现hUC-MSCs移植组及未移植组大鼠(PBS组)在第1天可视平台测试中,找到平台所用的距离和时间

均无统计学差异(图1A和图1B),表明HIBD损伤及干细胞移植没有影响大鼠的视觉及运动能力。随着训练天数的增加(第2~5天),两组大鼠找到平台所用时间均逐渐减少,但hUC-MSCs组所用时间显著短于PBS组(图1C)。第6天空间探索实验中,hUC-MSCs移植组大鼠穿过平台所在区域的次数显著多于PBS组(图1D)。另外,两组大鼠Object-in-place测试结果如图1E所示,发现hUC-MSCs移植组对新事物的探索能力明显优于PBS组。

## 2.2 海马组织HE染色

hUC-MSCs移植后的海马组织病理切片观察,可见细胞排列较紧密,细胞肿胀、核固缩、空泡情况较少;而PBS组大鼠海马组织细胞排列紊乱,结构不清、细胞肿胀、疏松,细胞核固缩呈空泡状较多(图2)。

## 2.3 hUC-MSCs移植后HIBD大鼠海马DG区的影响

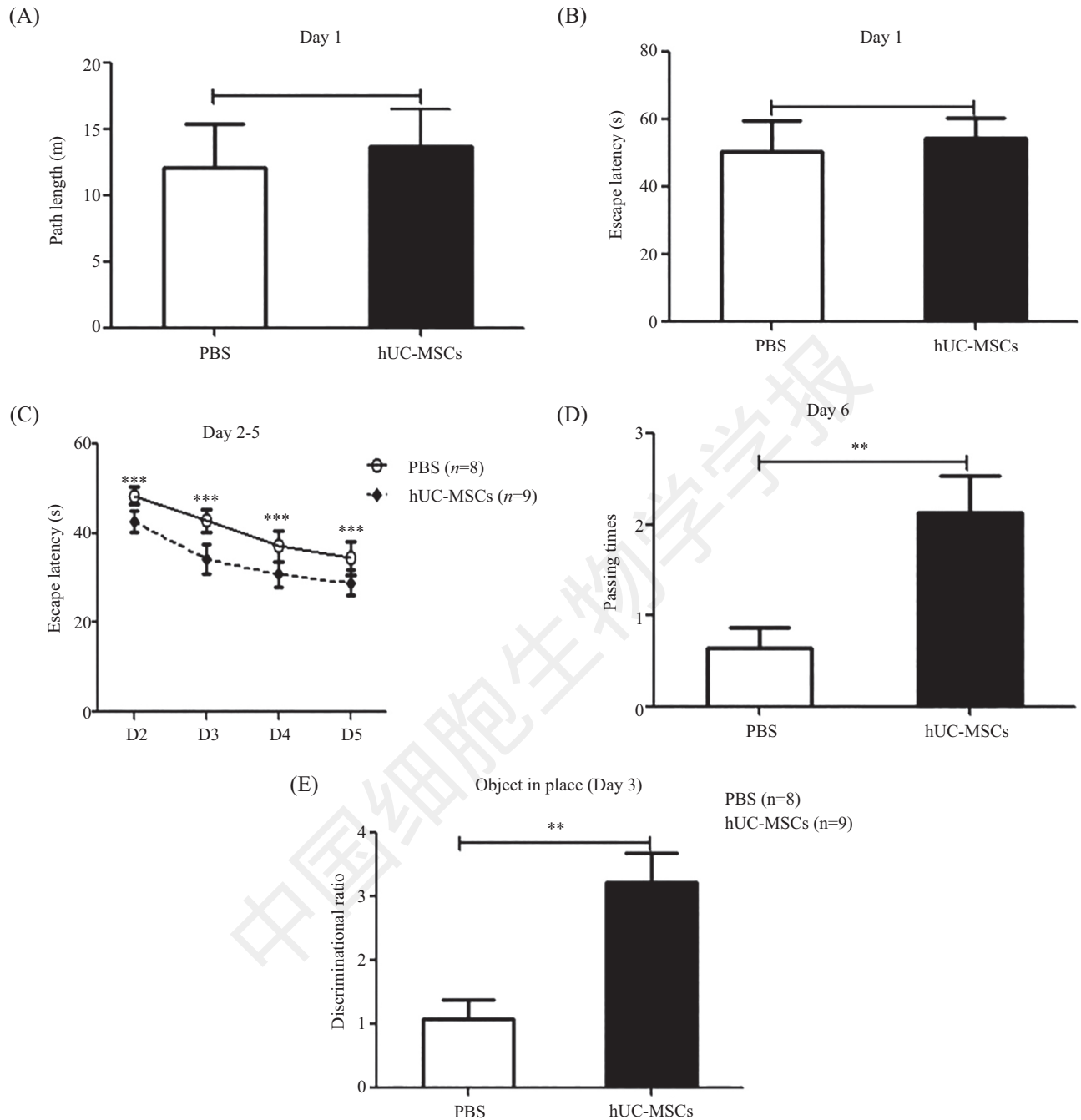
Nestin蛋白表达水平显著高于PBS组(图3A),量化分析两组间差异具有统计学意义( $P<0.000 1$ ,图3B)。Nestin和Brdu进行双标,免疫荧光观察再生的神经干细胞,发现hUC-MSCs移植组海马DG区再生神经干细胞显著多于PBS组(图3C和图3D),量化分析两组间具有统计学差异( $P=0.022 9$ ,图3E)。

## 2.4 hUC-MSCs移植对HIBD大鼠海马SDF-1 $\alpha$ /CXCR4、PI3K/AKT的影响

SDF-1 $\alpha$ 可与其受体CXCR4特异性结合,促进神经再生。因此,我们首先检测两组大鼠海马组织中hSDF-1 $\alpha$ 分泌水平,发现hUC-MSCs移植组hSDF-1 $\alpha$ 分泌水平明显高于PBS组(图4A),进一步检测hUC-MSCs组的海马组织中SDF-1 $\alpha$ 及CXCR4蛋白表达水平均较PBS组显著升高(图4B和图4D)。为了明确hUC-MSCs移植促进神经再生的可能作用机制,我们同时对PI3K/AKT相关信号通路进行了检测。发现hUC-MSCs组海马组织中PI3K、AKT及P-AKT蛋白表达水平均较PBS组显著升高(图4E~图4H)。

## 2.5 hUC-MSCs与OGD损伤神经干细胞分离共培养

在hUC-MSCs与OGD损伤神经干细胞(NSCs)分离共培养模型中发现与hUC-MSCs分离共培养后,培养上清中hSDF-1 $\alpha$ 浓度显著高于OGD组(图5A),NSCs增殖能力亦较OGD组显著增强(图5B),PI3K、p-AKT蛋白表达水平也随之上调(图5D和图5E)。当加入hSDF-1 $\alpha$ 抗体不仅可明显下调共培养体系中hUC-MSCs来源的hSDF-1 $\alpha$ 分泌水平(图5A),



A: 第1日寻找可视化平台的路径长度, PBS组( $n=15$ ), hUC-MSCs组( $n=19$ ); B: 第1日寻找可视化平台的时间, PBS组( $n=15$ ), hUC-MSCs组( $n=19$ ); C: 第2~5日寻找非可视化平台的时间, PBS组( $n=15$ ), hUC-MSCs组( $n=19$ ); D: 第6日穿越平台的次数, PBS组( $n=15$ ), hUC-MSCs组( $n=19$ ); E: 第3日穿越不同新事物位置比率, PBS组( $n=8$ ), hUC-MSCs组( $n=9$ )。  $**P<0.01$ 。

A: the path length of the first day to find the visualization platform, PBS group ( $n=15$ ), hUC-MSCs group ( $n=19$ ); B: the time to find the visualization platform on the first day, PBS group ( $n=15$ ), hUC-MSCs group ( $n=19$ ); C: the time to find the non-visualization platform on the 2nd to 5th day, PBS group ( $n=15$ ), hUC-MSCs group ( $n=19$ ); D: the number of times to cross the platform on the 6th day, PBS group ( $n=15$ ), hUC-MSCs group ( $n=19$ ); E: the ratio of new things to cross the 3rd day. PBS group ( $n=8$ ) and hUC-MSCs group ( $n=9$ ).  $**P<0.01$ .

图1 hUC-MSCs移植后HIBD大鼠神经行为学评价

Fig.1 Neurobehavioral evaluation of HIBD rats after hUC-MSCs transplantation



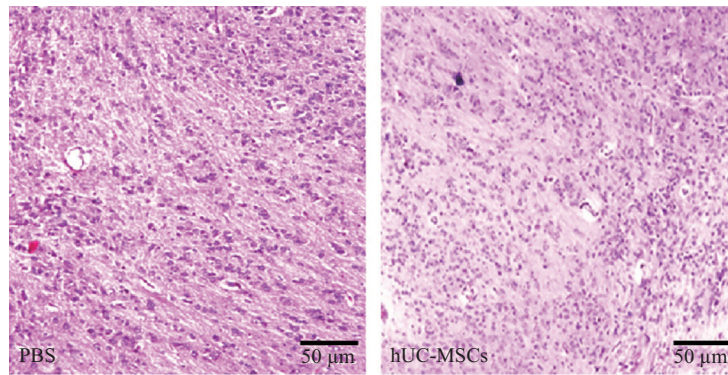
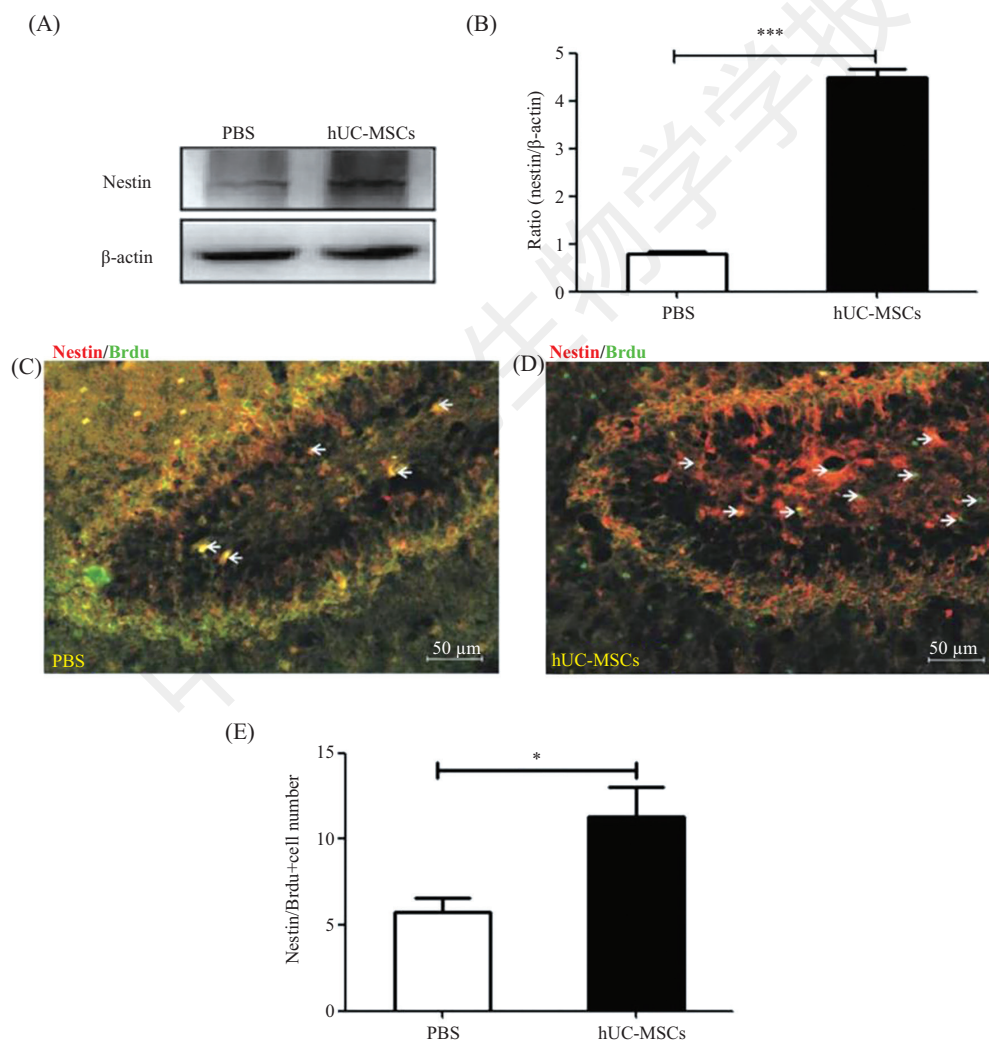


图2 PBS组和hUC-MSCs组大鼠海马组织HE染色病理切片

Fig.2 Histopathological changes of hippocampus in experimental rats in PBS group and hUC-MSCs group by HE staining

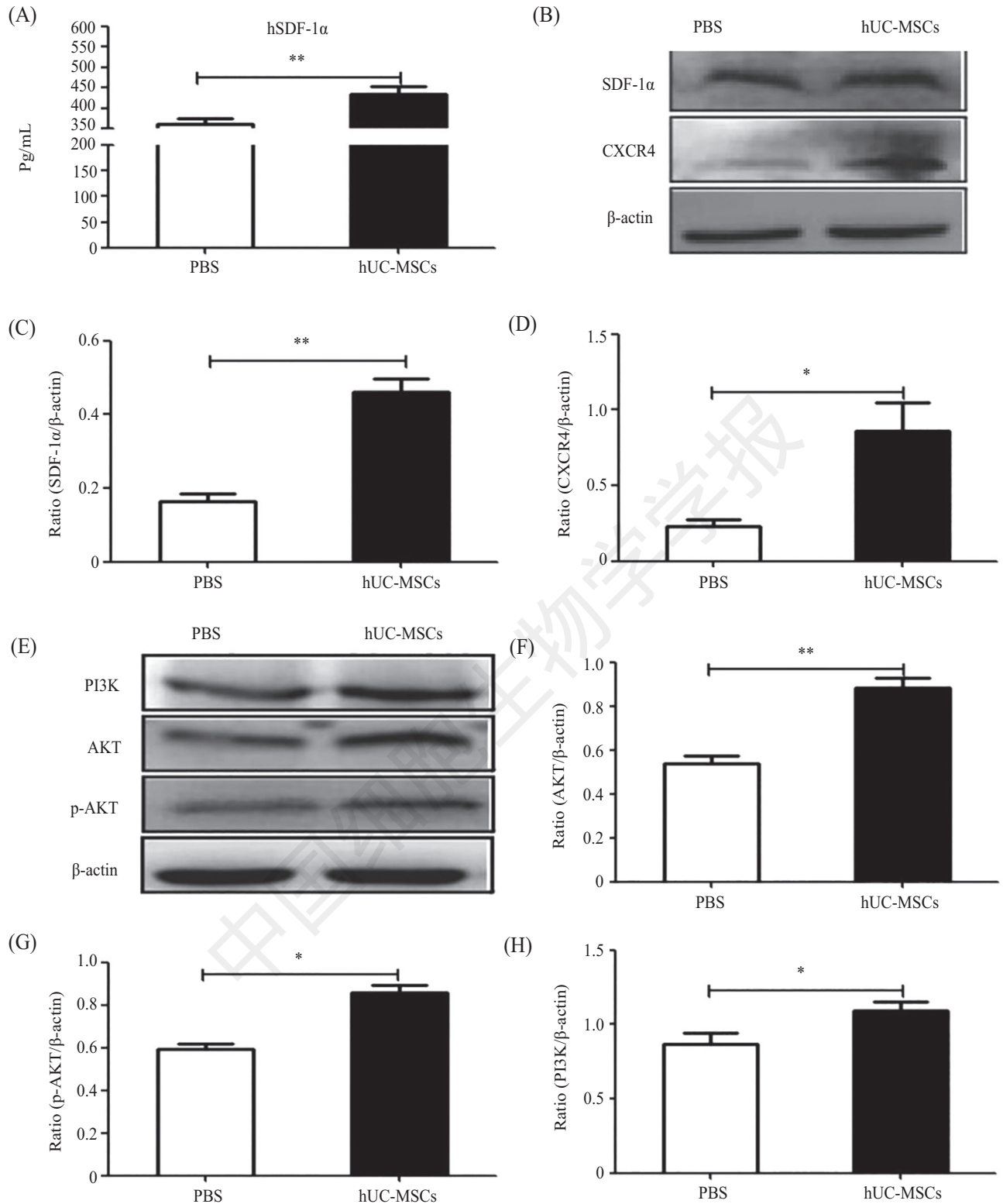


A、B: Nestin蛋白表达水平变化( $n=6$ ); C~E: DG区再生神经干细胞数量变化( $n=6$ )。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A,B: changes of Nestin protein expression level ( $n=6$ ); C-E: changes in the number of regenerated neural stem cells in DG region ( $n=6$ ). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

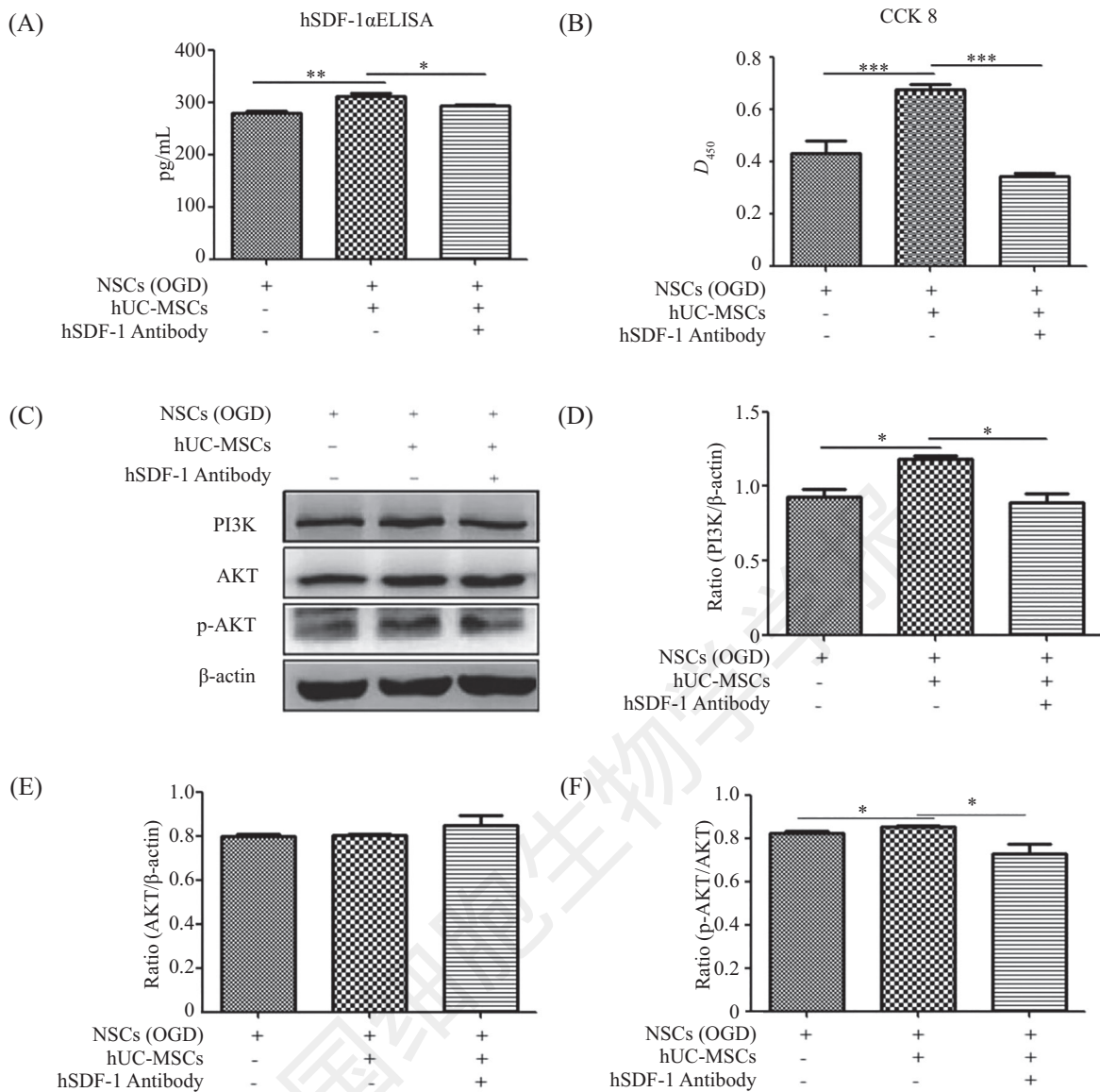
图3 hUC-MSCs移植后HBD大鼠海马DG区Nestin蛋白的表达水平变化、神经干细胞再生情况

Fig.3 Changes of nestin expression and regeneration of neural stem cells in DG region of hippocampus of HBD rats after hUC-MSCs transplantation



A: hSDF-1 $\alpha$ 分泌水平变化( $n=6$ ); B-D: SDF-1 $\alpha$ 及CXCR4蛋白表达水平变化( $n=6$ ); E-H: PI3K、AKT及p-AKT蛋白表达水平变化( $n=6$ )。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。  
A: changes of secretion level of hSDF-1 $\alpha$  ( $n=6$ ); B-D: expression level of SDF-1 $\alpha$  and CXCR4 ( $n=6$ ); E-H: expression level of PI3K, AKT and p-AKT ( $n=6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

图4 hUC-MSCs移植后HIBD大鼠海马SDF-1 $\alpha$ 、CXCR4、PI3K、AKT、p-AKT表达水平变化  
Fig.4 Levels of SDF-1 $\alpha$ , CXCR4, PI3K, AKT, p-AKT protein expressions in the rates hippocampus injured by HIBD after hUC-MSCs transplantation



A: 培养上清中hSDF-1 $\alpha$ 水平变化; B: NSCs增殖能力变化; C-F: PI3K、AKT及P-AKT蛋白表达水平变化。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001。

A: changes of hSDF-1 $\alpha$  level; B: changes of proliferation ability of NSCs; C-F: PI3K, AKT and P-AKT protein expression in culture supernatant. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001.

图5 hUC-MSCs分离共培养SDF-1 $\alpha$ 、CXCR4、PI3K、AKT、p-AKT表达水平变化

Fig.5 Levels of SDF-1 $\alpha$ , CXCR4, PI3K, AKT, p-AKT protein expressions in the hippocampus neurons injured by OGD following separated coculture with MSCs

而且可减弱OGD损伤NSCs的增殖能力, 同时还可抑制NSCs中的PI3K、p-AKT蛋白表达水平(图5C和图5F)。

### 3 讨论

HIBD可以导致脑瘫、癫痫、智力低下等严重后遗症, 是新生儿死亡及儿童致残的重要原因之一, 目前仍无有效的根治性治疗措施。有10%~60% HIBD患儿在新生儿期死亡, 约有25%存活下来的

HIBD患儿有许多神经系统后遗症, 严重影响生活质量, 给家庭和社会带来了沉重的负担。近年来, 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植治疗新生大鼠HIBD成为研究热点之一。越来越多的动物实验表明, 通过注射MSCs可以提高HIBD模型动物的学习和记忆能力。介于hUC-MSCs较BMSCs的众多优势, hUC-MSCs无疑成为细胞治疗中理想的种子细胞。

为进一步探讨hUC-MSCs移植对HIBD的治疗情



况, 本研究首先采用Morris水迷宫和Object-in-place测试监测模型鼠行为能力的改善情况。在Morris水迷宫测试中发现hUC-MSCs移植组寻找平台所用时间明显短于PBS组, 空间探索期找到平台次数显著多于PBS组, 提示hUC-MSCs移植可以促进HIBD大鼠空间学习记忆能力的改善。在Object-in-place测试中, hUC-MSCs移植组用来探索新事物的时间较PBS组增加, 提示hUC-MSCs移植可促进HIBD大鼠对新事物的空间认知、识别能力。同时, 本研究中的HE染色结果显示hUC-MSCs移植后海马组织细胞肿胀、核固缩及空泡情况较PBS组明显改善, 与Chen等<sup>[11]</sup>的研究结果一致, 提示hUC-MSCs移植可减轻HIBD大鼠海马组织炎症、凋亡、坏死情况。功能行为学检测及病理切片结果均表明hUC-MSCs移植对HIBD大鼠的神经损伤同样具有修复作用。

大脑受到某些刺激(如外伤、毒素、缺氧等), 静息态的神经干细胞被某些因子(如细胞因子)激活, 在损伤区增殖分化或异位增殖后, 在趋化因子的作用下迁移至损伤部位来促进神经修复。SDF-1 $\alpha$ 被认为是最重要的趋化因子之一, 研究多认为它是趋化干细胞归巢的关键因子, 能趋化内源性干细胞<sup>[15]</sup>及外源性移植细胞<sup>[16]</sup>归巢至损伤区发挥修复作用。SDF-1 $\alpha$ 与其受体CXCR4特异性结合后, 可促进神经再生从而发挥神经修复作用<sup>[17]</sup>。CXCR4<sup>+</sup>神经干细胞干性的维持依赖于神经修复区的SDF-1水平, 且SDF-1/CXCR4轴可促进内源性干细胞的正确迁移<sup>[18]</sup>, 这些结果都提示, SDF-1/CXCR4轴在调节神经前体细胞功能及神经再生过程中发挥重要作用。

我们的研究发现, hUC-MSCs移植能促进HIBD大鼠海马组织神经干细胞标志巢蛋白(Nestin)表达, 且Nestin/Brdu免疫荧光双标显示海马DG区(即神经再生的主要区域之一)再生的神经干细胞数量增加。同时海马组织微环境中的SDF-1 $\alpha$ /CXCR4轴被激活, SDF-1 $\alpha$ 及其受体CXCR4表达水平上调, 提示SDF-1 $\alpha$ /CXCR4轴在神经干细胞增殖中可能具有重要作用。这与Yu等<sup>[19]</sup>的研究结果一致。通过对可能机制的检测, 发现海马组织中PI3K/AKT通路被激活, 提示PI3K/AKT通路可能参与hUC-MSCs发挥神经修复作用。Zhang等<sup>[10]</sup>、Jin等<sup>[19]</sup>研究者亦发现, hUC-MSCs植入HIBD动物体内, PI3K/p-AKT通路被激活, 提示该通路可能在hUC-MSCs发挥HIBD移植保护作用中具有重要作用。hUC-MSCs是一种具有自我

增殖和多向分化潜能的干细胞, 植入体内后对损伤组织具有一定的修复作用, 研究发现, MSCs在体内的分化效率极低, 故仅用其分化能力不能解释它所具有的良好修复效能。新近研究表明, MSCs可通过旁分泌途径调节损伤局部的微环境, 从而促进受损组织的修复, 提示这种微环境的调节较其自身分化更具有生物学意义。故本文中检测到海马区神经干细胞的增多以及SDF-1 $\alpha$ /CXCR4、PI3K/AKT通路的激活, 推测hUC-MSCs移植可调节损伤微环境, 并进一步激活内源性细胞发挥修复作用。

为了进一步明确hUC-MSCs分泌hSDF-1 $\alpha$ 在HIBD神经损伤中的作用及机制, 我们对体外原代培养的新生大鼠海马组织神经干细胞进行氧糖剥夺损伤((oxygen glucose deprivation, OGD), 模拟在体缺氧缺血环境, 并与hUC-MSCs及加了SDF-1抗体的hUC-MSCs分别进行分离共培养, ELISA及CCK-8的检测结果显示hUC-MSCs主要通过分泌hSDF-1 $\alpha$ 促进OGD损伤的NSCs增殖而发挥保护作用。Bakondi等<sup>[20]</sup>研究发现, CD133骨髓祖细胞来源的SDF-1 $\alpha$ 促进低氧环境下神经前体细胞存活及增殖。我们发现, hUC-MSCs可通过分泌hSDF-1 $\alpha$ 激活OGD损伤NSCs中PI3K/p-AKT信号通路。有研究表明, PI3K/AKT通路被激活后可促进NSCs等细胞增殖<sup>[21]</sup>。因此, 提示hUC-MSCs内源性hSDF-1 $\alpha$ 可能是通过激活PI3K/p-AKT信号通路调控OGD损伤的NSCs增殖。

综上所述, hUC-MSCs移植可上调HIBD大鼠海马组织hSDF-1 $\alpha$ 分泌水平, 诱导内源性神经干细胞再生, 改善HIBD大鼠学习记忆功能, 其机制可能是通过SDF-1 $\alpha$ /CXCR4信号途径, 激活PI3K/AKT通路但具体的信号调控机制, 还有待于我们今后进一步的研究。

## 参考文献 (References)

- 1 Vasiljević B, Maglajčićjukić S, Gojnić M. The prognostic value of amplitude-integrated electroencephalography in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Vojnosanit Pregl* 2012; 69(6): 492-9.
- 2 Verklan MT. The chilling details: hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Perinat Neonatal Nurs* 2009; 23(1): 59-68.
- 3 禹亚彬, 顾殿华. 人脐带间充质干细胞与骨髓间充质干细胞向肝细胞分化的比较. *中华肝胆外科杂志*(Yu yabin, Gu Dianhua. Comparison of the hepatic differentiation potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells with bone marrow mesenchymal stem cells. *Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery*) 2016; 22(1): 13-6.
- 4 Huang C, Zhao L, Gu J, Nie D, Chen Y, Zuo H, *et al.* The migra-



- tion and differentiation of hUC-MSCs(CXCR4/GFP) encapsulated in BDNF/chitosan scaffolds for brain tissue engineering. *Biomed Mater* 2016; 11(3): 035004.
- 5 Han KH, Kim AK, Kim MH, Kim DH, Go HN, Kim DI. Enhancement of angiogenic effects by hypoxia-preconditioned human umbilical cord - derived mesenchymal stem cells in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Biol Int* 2016; 40(1): 27-35.
- 6 Guo ZY, Sun X, Xu XL, Zhao Q, Peng J, Wang Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote peripheral nerve repair via paracrine mechanisms. *Neural Regen Res* 2015; 10(4): 651-8.
- 7 Zhu J, Liu Q, Jiang Y, Wu L, Xu G, Liu X. Enhanced angiogenesis promoted by human umbilical mesenchymal stem cell transplantation in stroke model is notch1 signaling associated. *Neuroscience* 2015; 290: 288-99.
- 8 Kang JM, Yeon BK, Cho SJ, Suh YH. Stem cell therapy for Alzheimer's disease: a review of recent clinical trials. *J Alzheimers Dis* 2016; 54(3): 879-89.
- 9 Galieva LR, Mukhamedshina YO, Arkhipova SS, Rizvanov AA. Human umbilical cord blood cell transplantation in neuroregenerative strategies. *Front Pharmacol* 2017; 8: 628.
- 10 Zhang DS, Bai XH, Yao YJ, Mu DZ, Chen J. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells grafts for neonatal rats model of HIBD: the mechanism of PI3K/Akt signaling pathway. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2015; 46(6): 832-6.
- 11 Cui L, Qu H, Xiao T, Zhao M, Jolkkonen J, Zhao C. Stromal cell-derived factor-1 and its receptor CXCR4 in adult neurogenesis after cerebral ischemia. *Restor Neurol Neurosci* 2013; 31(3): 239-51.
- 12 Yan HW, Yao CL, Shu JH, Zheng QY. Alpha-crystallin promotes rat olfactory ensheathing cells survival and proliferation through regulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathways. *Neurosci Lett* 2012; 531(2): 170-5.
- 13 Zhou X, Gu J, Gu Y, He M, Bi Y, Chen J, *et al.* Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improve learning and memory function in hypoxic-ischemic brain-damaged rats via an IL-8-mediated secretion mechanism rather than differentiation pattern induction. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35(6):2383-401.
- 14 Dominici M, Blanc KL, Mueller I, Slaperctortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- 15 Schuh A, Korschalla S, Kroh A, Schober A, Marx N, Sonmez TT, *et al.* Effect of SDF-1  $\alpha$  on endogenous mobilized and transplanted stem cells in regeneration after myocardial infarction. *Curr Pharm Des* 2013; 20(12): 1964-70.
- 16 Perdoni C, Mcgrath JA, Tolar J. Preconditioning of mesenchymal stem cells for improved transplantation efficacy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(6): 1-12.
- 17 Heskamp A, Leibinger M, Andreadaki A, Gobrecht P, Diekmann H, Fischer D. CXCL12/SDF-1 facilitates optic nerve regeneration. *Neurobiol Dis* 2013; 55(7):76-86.
- 18 Yu Q, Zhou L, Liu L, Cong L, Wang Y, Ge T, *et al.* Stromal cell-derived factor-1  $\alpha$  alleviates hypoxic-ischemic brain damage in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 464(2): 447-52.
- 19 Jin RL, Li WB, Li QJ, Zhang M, Xian XH, Sun XC, *et al.* The role of extracellular signal-regulated kinases in the neuroprotection of limb ischemic preconditioning. *Neurosci Res* 2006; 55(1): 65-73.
- 20 Bakondi B, Shimada IS, Peterson BM, Spees JL. SDF-1 $\alpha$  secreted by human CD133-derived multipotent stromal cells promotes neural progenitor cell survival through CXCR7. *Stem Cells Dev* 2011; 20(6): 1021-9.
- 21 Gong X, He X, Qi L, Zuo H, Xie Z. Stromal cell derived factor-1 acutely promotes neural progenitor cell proliferation in vitro by a mechanism involving the ERK1/2 and PI-3K signal pathways. *Cell Biol Int* 2015; 30(5): 466-71.