

研究论文

脂肪来源干细胞移植对脑缺血大鼠脑红蛋白表达的
影响及作用机制黄欢^{1,2*} 郑谋炜^{1,2} 梅爱农^{1,2}⁽¹⁾福建省立医院干部特诊一科, 福州 350001; ⁽²⁾福建医科大学省立临床医学院, 福州 350001)

摘要 该文探讨了脂肪来源干细胞(ADSC)移植对脑缺血大鼠梗死周边区皮质中脑红蛋白(Ngb)表达的影响, 以揭示ADSC促进脑梗死后神经功能恢复的相关机制。SD大鼠采用改良的Longa线栓法建立大脑中动脉闭塞(MCAO)缺血性脑梗死模型, 分为假手术组(sham)、模型组(MCAO)和移植组(ADSC)。模型建立后24 h, ADSC组大鼠通过颈动脉途径移植注射50 μ L的ADSC悬液(含细胞约 2×10^6 个), 而MCAO组大鼠则注射相同体积的生理盐水。于模型建立后第1、3、7天采用修正版神经功能缺损评分(mNSS)评估各组大鼠的神经功能。末次mNSS评估后将大鼠断头取脑, 采用透射电镜观测脑梗死周边区皮质中线粒体的损伤情况; 采用试剂盒检测该区域氧化应激和能量代谢相关指标的水平; 采用Western blot法和免疫荧光法检测该区域Ngb的表达情况。结果显示, 与MCAO组大鼠相比, ADSC移植可显著改善大鼠的mNSS评分, 减轻脑梗死周边区皮质的线粒体损伤; 显著提高该区域三磷酸腺苷(ATP)、 Na^+ - K^+ -ATP酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP酶和超氧化物歧化酶(SOD)的水平, 以及抑制丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)的水平; 并且显著增加神经元细胞胞质中Ngb蛋白的表达水平。总之, ADSC移植可以促进脑缺血大鼠神经功能的恢复, 其可能部分通过促进Ngb在梗死周边区皮质中的表达, 进而起到保护线粒体结构、改善能量代谢缺陷和减轻氧化应激反应的作用。

关键词 脑梗死; 干细胞; 脑红蛋白; 线粒体; 氧化应激; 能量代谢

The Effect and Mechanism of Adipose-Derived Stem Cells Transplantation
on Expression of Neuroglobin in Rats with Cerebral IschemiaHUANG Huan^{1,2*}, ZHENG Mouwei^{1,2}, MEI Ainong^{1,2}⁽¹⁾Department of Geriatric Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China;⁽²⁾Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

Abstract The objective of this research was to investigate the impact of ADSC (adipose-derived stem cell) transplantation on Ngb (neuroglobin) expression in the peri-infarct cortex of rats with cerebral ischemia, and to elucidate the mechanisms by which ADSC facilitate the recovery of neurological function following cerebral infarction. MCAO (middle cerebral artery occlusion) model was established in SD (Sprague-Dawley) rats using modified Longa's method, and the animals were randomly assigned to three groups: sham group, MCAO group, and ADSC

收稿日期: 2024-07-18

接受日期: 2024-09-11

福建省自然科学基金(批准号: 2020J011073)资助的课题

*通信作者。Tel: 13400550613, E-mail: leomed@fjmu.edu.cn

Received: July 18, 2024

Accepted: September 11, 2024

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2020J011073)

*Corresponding author. Tel: +86-13400550613, E-mail: leomed@fjmu.edu.cn

group. At 24 hours post-model establishment, the ADSC group received intravenous injection of 50 μ L ADSC suspension (approximately 2×10^6 cells) via the carotid artery, whereas the MCAO group was administered an equivalent volume of saline. Neurological function was assessed using mNSS (modified neurological severity scores) on the 1st, 3rd, and 7th days post-model establishment. Subsequently, the rats were euthanized, and their brains were harvested for analysis. Mitochondrial damage in the peri-infarct cortex was examined using transmission electron microscope, and levels of oxidative stress and energy metabolism indicators were measured using assay kits. The expression of Ngb was determined using Western blot and immunofluorescence techniques. The results indicated that ADSC transplantation significantly improved the mNSS scores of rats, mitigated mitochondrial damage in the peri-infarct cortex, and increased the levels of ATP (adenosine triphosphate), Na^+ - K^+ -ATPase, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase, and SOD (superoxide dismutase), while also suppressing the levels of MDA (malondialdehyde) and NO (nitric oxide). Furthermore, ADSC transplantation notably elevated the expression of Ngb protein within the cytoplasm of neuronal cells. In summary, ADSC transplantation appears to enhance neurological function in rats post-cerebral infarction, potentially through the upregulation of Ngb expression in the peri-infarct cortex, which may protect mitochondrial structure, ameliorate energy metabolism deficiencies, and diminish the oxidative stress response.

Keywords cerebral infarction; stem cells; neuroglobin; mitochondria; oxidative stress; energy metabolism

在全球范围内,脑卒中是导致患者残疾和死亡的主要常见原因,严重威胁人类的健康,并且增加家庭和社会的负担^[1]。其中,大约80%的脑卒中病例是缺血性脑卒中,其特征是脑动脉闭塞进而导致脑组织出现缺血缺氧性损伤,涉及的病理机制较为复杂,包括氧化应激、能量代谢障碍、钙超载、炎症反应、凋亡通路的激活以及兴奋性氨基酸毒性等^[2-3]。其中,氧化应激以及能量代谢障碍是缺血性脑卒中的典型病理特征,也是阻碍神经功能恢复的主要因素^[2-3]。前期基础研究表明,脂肪来源干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC)移植有利于缺血性脑卒中后受损神经功能的恢复,其机制研究主要集中于ADSC的免疫调节作用以及各种具有脑保护作用的神经营养/生长因子的分泌^[4-5],而对于ADSC在氧化应激和能量代谢障碍方面的作用,目前研究仍较少。脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)作为一种氧结合蛋白,在大脑皮层、丘脑和小脑等高代谢的脑组织中广泛表达^[6]。研究表明,在缺血性脑卒中的急性期,脑红蛋白在损伤区的表达量增高,可以减轻氧化应激反应、改善局部脑代谢和抑制凋亡,起到内源性的神经保护作用^[6-7]。因此,本实验通过建立大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的缺血性脑梗死模型,研究ADSC移植对脑缺血大鼠神经功能、线粒体结构、能量代谢情况、氧化应激水平以及Ngb表达的影响,旨

在探索ADSC移植有利于改善脑缺血大鼠神经功能缺损的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 42只SPF级SD雄性大鼠,购于北京华阜康生物科技公司[SCXK(京)2019-0008]。其中36只体质量250~280 g的SD大鼠(8周龄)用于建立缺血脑梗死模型,按随机数字表法分为3组:Sham组、MCAO组和ADSC组,每组12只。另外6只体质量80~100 g的SD大鼠(4周龄)用于分离培养ADSC。所有大鼠在共同的生活环境中常规饲养,相关的实验操作均符合福建省立医院实验动物伦理委员会的要求,伦理批准号:IACUC-FPH-SL-20240227[0093]。

1.1.2 主要实验试剂 I型胶原酶购自美国Sigma-Aldrich公司;胰蛋白酶、DMEM培养基购自美国Gibco公司;小鼠抗CD34、CD44、CD45和Ngb抗体购自美国Santa Cruz公司;聚乙烯50导管购自美国Becton Dickinson公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、 Na^+ - K^+ -ATP酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP酶检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;RIPA裂解液、BCA试剂盒、ECL显色液购自上海碧云天

生物技术股份有限公司; PVDF膜购自美国Millipore公司; 兔抗神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Dylight 488标记的驴抗兔二抗、Cy3标记的驴抗小鼠二抗购自美国Jackson ImmunoResearch公司。

1.2 方法

1.2.1 ADSC的制备和鉴定 用异氟烷麻醉80~100 g的大鼠, 取腹股沟处的脂肪组织约0.5 g, 剪碎成乳糜状后加入0.3% I型胶原酶消化1 h; 经过100目过滤器过滤去除碎屑, 然后在室温下以1 000 r/min离心10 min, 去除上清液和漂浮的组织, 重新振荡混匀细胞沉淀物; 同法再次经过离心去除上清后, 将细胞沉淀物振荡混匀制成单细胞悬液, 接种于培养瓶移入培养箱内培养。待细胞融合达到80%~90%时, 用0.05%胰蛋白酶消化传代。取第3~4代的细胞用于移植, 移植前通过免疫荧光法鉴定ADSC: 将ADSC接种在24孔细胞培养板中, 在室温下经过多聚甲醛固定20 min、血清封闭30 min后, 滴加小鼠抗CD34、CD44和CD45抗体(1:100), 4 °C冰箱孵育1 h; 洗涤3次后, 滴加Cy3荧光素标记的二抗(1:400), 室温避光孵育45 min; 再次洗涤3次后, 于荧光显微镜下观察拍照。将预备移植的ADSC制成单细胞悬液, 在室温下以1 000 r/min离心5 min后弃上清, 用DMEM液洗涤; 经过重复3次离心、洗涤, 用生理盐水重悬细胞, 调整细胞密度为 4×10^7 个/mL。

1.2.2 建立大鼠MCAO模型 采用线栓法建立大鼠MCAO模型: 用异氟烷麻醉250~280 g的大鼠, 通过颈部中线切口暴露右颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉; 血管夹阻断颈总动脉, 离断颈外动脉, 将线栓由断口插入颈内动脉, 直到大脑中动脉的起始部, 阻断该处血流。阻断血流1.5 h后, 缓慢退出线栓, 结扎颈外动脉, 松开血管夹, 重新恢复大脑中动脉血流再灌注, 最后缝合颈部切口。Sham组大鼠除了不插入线栓阻断大脑中动脉以外, 其他的手术操作相同。

1.2.3 经颈动脉途径移植ADSC 在模型建立后24 h重新麻醉大鼠, 血管夹阻断颈总动脉, 从右侧颈外动脉残端处剪一小口, 将聚乙烯50导管沿此插入颈内动脉。对于ADSC组的大鼠, 以5 μ L/min的速度小心缓慢地注入预先准备好的50 μ L ADSC细胞悬液(约 2×10^6 个细胞); 而MCAO组的大鼠, 则以同样的速度

注射相同量的生理盐水。注射完成后, 撤出导管, 重新结扎颈外动脉残端, 松开颈总动脉处的血管夹, 然后缝合切口。

1.2.4 大鼠神经功能评定 在模型建立后第1、3、7天, 分别对各组大鼠采用修正版神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS)方法^[8]进行神经功能的评定。mNSS评分系统由运动能力、感觉反应、反射行为和平衡能力四个部分组成。在这一评分系统中, 健康大鼠的得分为0分, 得分越高则反映越严重的神经功能损害, 最高分值为18分。第7天末次mNSS评分后将所有大鼠断头取脑用于后续检测分析。

1.2.5 电镜观察线粒体损伤情况 将大鼠麻醉后进行断头取脑, 从脑梗死周边区皮质中快速切下约1 mm³的脑组织块, 在4 °C下经过2.5%戊二醛固定2 h, 漂洗3次; 1%锇酸后固定2 h, 再次漂洗3次。之后, 组织块在经过酒精(50%、70%、90%)和丙酮(90%、100%)逐步梯度脱水处理后, 使用环氧树脂进行包埋。初步修整包埋块, 然后使用超薄切片机进行切片, 切片的厚度为70~90 nm。切片完成后, 进行3%醋酸铀和枸橼酸铅的双重染色处理, 最后将这些切片置于透射电镜下观察脑组织细胞线粒体的损伤情况, 并拍照。

1.2.6 试剂盒测定氧化应激和能量代谢相关指标 取大鼠脑梗死周边区皮质组织, 称重后放入玻璃匀浆器, 按重量(g):体积(mL)=1:9的比例加入0~4 °C的生理盐水, 在4 °C下将脑组织研磨成匀浆。然后, 将脑组织匀浆在4 °C下以2 500~3 000 r/min离心10 min, 收集上清液, 严格按照试剂盒的操作方法, 分别测定脑组织中氧化应激相关指标(SOD、NO、MDA)和能量代谢相关指标(ATP、Na⁺-K⁺-ATP酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP酶)的水平。

1.2.7 Western blot法检测Ng2的表达情况 取大鼠脑梗死周边区皮质组织, 经过研磨成匀浆后, 加入RIPA裂解液以提取蛋白质。依照BCA试剂盒操作方法测定蛋白质的浓度, 取30 μ g的蛋白质经过垂直电泳分离, 进一步电转移至PVDF膜上, 于100 g/L脱脂牛奶液室温下封闭2 h。PBS洗膜3次, 滴加一抗Ng2抗体(1:1 000)和GAPDH抗体(1:1 000), 4 °C冰箱孵育过夜; PBS洗膜3次, 滴加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000), 37 °C孵育1 h。再次PBS洗膜3次, 加入ECL显色液, 避光显色, 然后用X胶片进行显影。

和曝光,扫描X胶片。利用ImageJ软件测量扫描的蛋白条带灰度值,Ngb蛋白的相对表达水平=目的蛋白Ngb的灰度值/内参蛋白GAPDH的灰度值,最终结果根据sham组的值进行标准化处理。

1.2.8 免疫荧光法检测Ngb的表达 制作大鼠脑组织冠状位的冰冻切片,在室温下经过血清封闭2 h、Triton-X100破膜20 min处理后,滴加一抗Ngb抗体(1:150)和NSE抗体(1:150,标记神经元细胞),4 °C冰箱孵育过夜;切片经过3次浸洗后,滴加Cy3和Dylight488荧光素标记的二抗(1:500),37 °C避光孵育1 h;最后再加入DAPI(标记细胞核),37 °C下避光孵育10 min。切片经过3次浸洗后封片,置于荧光显微镜下观察,并拍照。

1.2.9 统计分析 在本研究中,定量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,所有数据均经过正态性检验和方差齐性检验。数据分析采用SPSS 27.0版本

的统计学软件,两组间比较用独立样本 t 检验;多组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

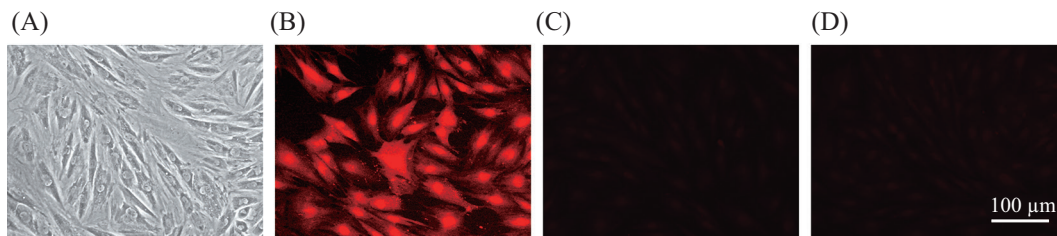
2 结果

2.1 ADSC的形态和鉴定

经过传代培养的第3~4代ADSC在光镜下呈单层、大而扁平的细胞,当细胞增殖达到融合时,表现出纺锤形的成纤维细胞形态;免疫荧光染色显示,第3~4代的ADSC表面抗原CD44呈阳性,而CD34和CD45呈阴性(图1),与既往的研究报道一致^[9]。

2.2 ADSC移植促进脑缺血大鼠神经功能恢复

在模型建立后第1、3、7天,sham组大鼠mNSS评分均为正常0分,MCAO组和ADSC组大鼠神经功能评分均显著高于sham组,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示造模成功。其中,在模型建立后第1天,

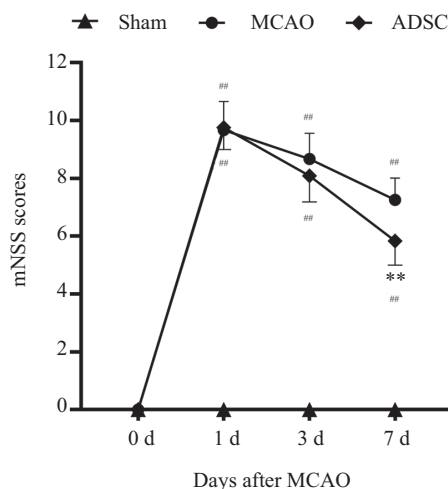


A: 光镜下观察ADSC形态; B~D: 免疫荧光法鉴定ADSC表面抗原CD44(B)、CD34(C)和CD45(D)表达情况。

A: observation of ADSC morphology under light microscope; B-D: identification of ADSC surface antigens CD44 (B), CD34 (C), and CD45 (D) by immunofluorescence analysis.

图1 ADSC的形态和鉴定

Fig.1 Morphology and identification of ADSC



mNSS评分结果。 ** $P < 0.01$, 与MCAO组比较; $^{###}P < 0.01$, 与Sham组比较。 $n = 12$ 。

The results of mNSS scores. ** $P < 0.01$ compared with MCAO group; $^{###}P < 0.01$ compared with Sham group. $n = 12$.

图2 ADSC移植促进脑缺血大鼠神经功能的恢复

Fig.2 ADSC transplantation promoted the neurological functional recovery of rats with cerebral ischemia

ADSC组大鼠的mNSS评分与MCAO组大鼠相近,表明ADSC组和MCAO组大鼠神经功能的基线水平没有显著差异($P>0.05$);模型建立后第3天,与MCAO组相比,ADSC组大鼠的mNSS评分虽然有所下降,但差异仍然不显著($P>0.05$);模型建立后第7天,与MCAO组相比,ADSC组大鼠的mNSS评分显著降低($P<0.01$)(图2),表明ADSC移植可以改善脑缺血大鼠的神经功能缺损,促进其神经功能恢复。

2.3 ADSC移植减轻脑梗死周边区皮质中线粒体损伤

透射电镜观察结果显示,Sham组大鼠脑组织的线粒体结构和形态正常,线粒体膜完整,线粒体嵴致密,基质染色均匀。而MCAO组大鼠脑组织的线粒

体结构和形态明显受损,表现为线粒体肿胀,线粒体膜破损,线粒体嵴稀疏、肿胀、断裂甚至消失;与MCAO组大鼠相比,ADSC组大鼠脑组织的线粒体损伤明显减轻(图3)。

2.4 ADSC移植改善脑梗死周边区皮质中能量代谢

MCAO组大鼠脑组织中ATP、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 含量均明显低于Sham组大鼠($P<0.01$),而ADSC组大鼠脑组织中ATP、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 含量略低于Sham组大鼠($P<0.05$ 或 0.01),较MCAO组大鼠有明显升高($P<0.01$)(图4A、图4B和图4C)。结果提示ADSC移植有助于改善大鼠脑梗死周边区皮质中脑组织的能量代谢。

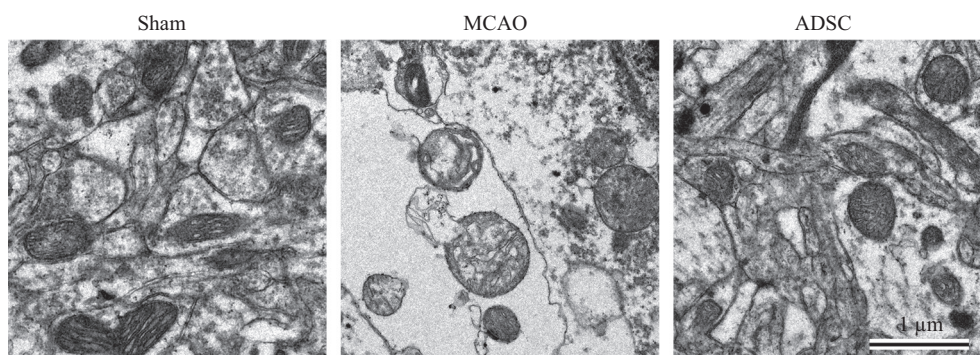
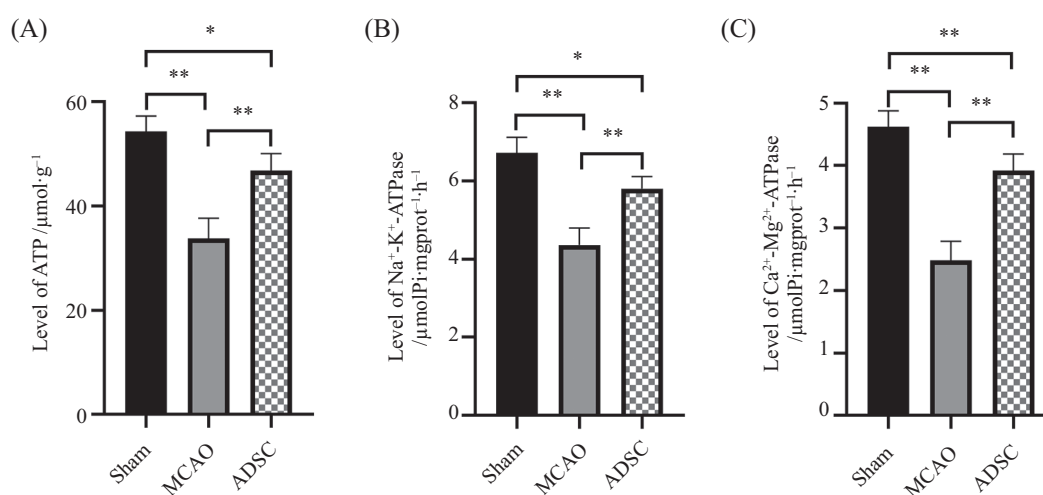


图3 ADSC移植减轻脑梗死周边区皮质中线粒体损伤

Fig.3 ADSC transplantation reduced mitochondrial damage in the peri-infarct cortex

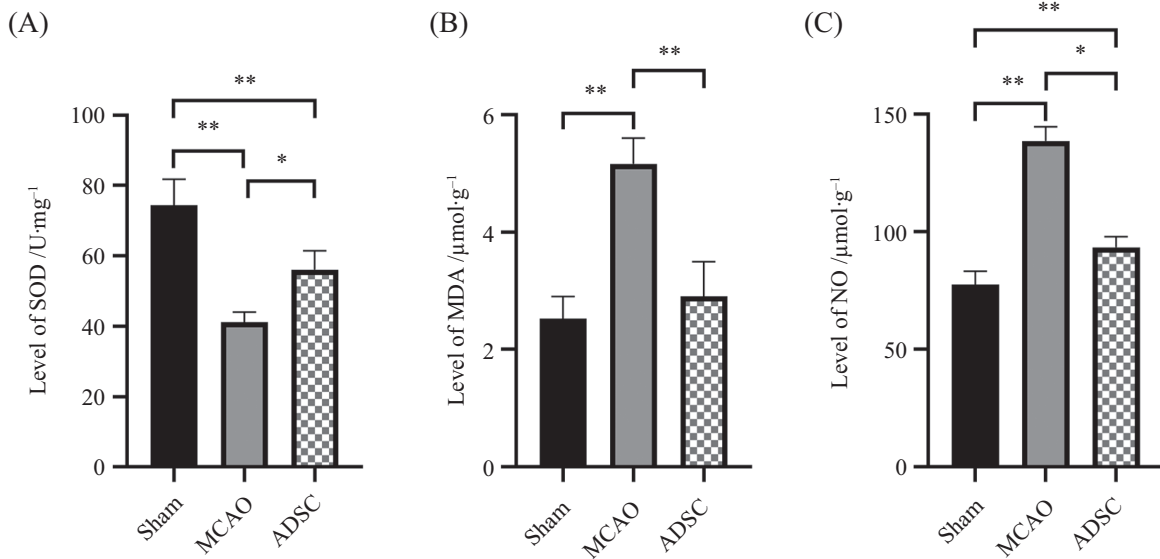


A: 各组大鼠脑梗死周边区皮质中ATP的水平; B: 各组大鼠脑梗死周边区皮质中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 的水平; C: 各组大鼠脑梗死周边区皮质中 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 的水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。n=6。

A: the level of ATP in the peri-infarct cortex in each group; B: the level of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in the peri-infarct cortex in each group; C: the level of $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ in the peri-infarct cortex in each group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. n=6.

图4 ADSC移植改善脑梗死周边区皮质中能量代谢

Fig.4 ADSC transplantation improved energy metabolism in the peri-infarct cortex



A: 各组大鼠脑梗死周边区皮质中SOD的水平; B: 各组大鼠脑梗死周边区皮质中MDA的水平; C: 各组大鼠脑梗死周边区皮质中NO的水平。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。 $n=6$ 。

A: the level of SOD in the peri-infarct cortex in each group; B: the level of MDA in the peri-infarct cortex in each group; C: the level of NO in the peri-infarct cortex in each group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。 $n=6$ 。

图5 ADSC移植减轻脑梗死周边区皮质中氧化应激反应

Fig.5 ADSC transplantation alleviated oxidative stress response in the peri-infarct cortex

2.5 ADSC移植减轻脑梗死周边区皮质中氧化应激反应

MCAO组和ADSC组大鼠脑组织中抗氧化酶SOD含量均低于Sham组($P<0.01$), 但ADSC组大鼠高于MCAO组大鼠($P<0.05$)(图5A); MCAO组大鼠脑组织中MDA和NO含量均高于Sham组大鼠($P<0.01$), ADSC组大鼠MDA的含量低于MCAO组大鼠($P<0.01$), 略高于Sham组大鼠, 但无统计学差异($P>0.05$), 另外ADSC组大鼠NO的含量虽高于sham组大鼠($P<0.01$), 但同样低于MCAO组大鼠($P<0.01$)(图5B和图5C)。这些结果表明, ADSC移植有助于减轻脑梗死周边区皮质中脑组织的氧化应激反应。

2.6 ADSC移植促进脑梗死周边区皮质中Ngb的表达

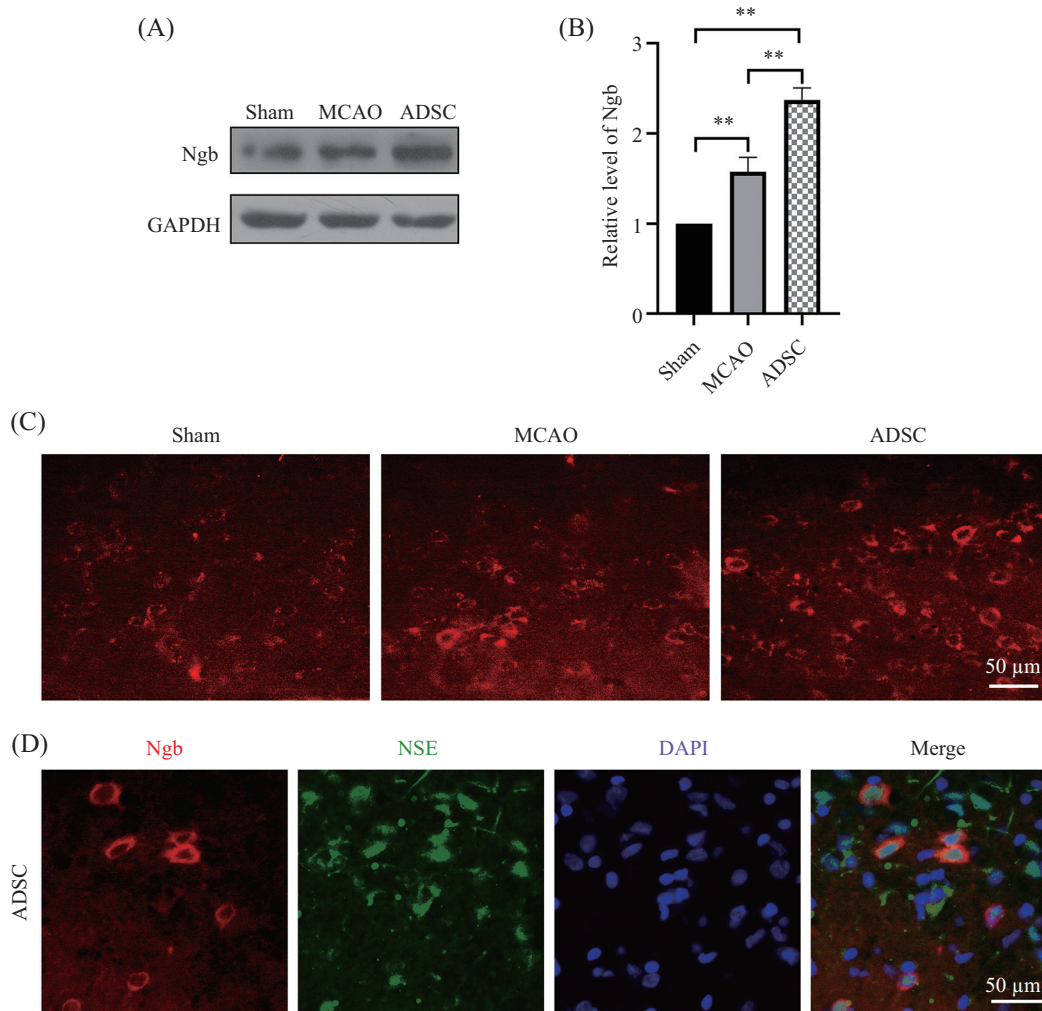
Western blot的结果显示, 模型建立后第7天, Sham组大鼠脑组织中Ngb有一定量表达, 与之相比, MCAO组和ADSC组大鼠Ngb的表达水平均有所升高(均为 $P<0.01$); 且与MCAO组大鼠相比, ADSC组大鼠升高水平更加显著, 差异具有统计学意义($P<0.01$)(图6A和图6B)。免疫荧光法的结果与Western blot法的结果基本相符, 在脑梗死周边的皮质区域, MCAO组和ADSC组大鼠中Ngb阳性细胞数较

Sham组增多, 尤其是ADSC组大鼠(图6C)。多重免疫荧光法进一步显示, 该区域的Ngb蛋白大部分在NSE标记的神经元细胞质中表达(图6D)。

3 讨论

近十几年来, 随着干细胞研究的不断发展, 干细胞移植治疗缺血性脑卒中成为研究的热点之一^[10]。在诸多种类的干细胞中, ADSC由于来源丰富、抽取方便, 易于分离及体外培养、增殖、诱导分化, 同时可以避免免疫排斥及伦理学争议, 具有极大的优势和广阔的应用前景^[11]。动物研究表明, ADSC移植可以抑制神经细胞凋亡, 减轻炎症反应, 促进神经和血管再生, 缩小脑梗死体积, 从而改善缺血性脑卒中导致的神经功能缺损^[12-13]。本研究的结果也表明, ADSC移植可以促进脑缺血大鼠神经功能的恢复, 与前期的研究相符。

缺血性脑卒中早期治疗的主要目标在于恢复缺血区脑组织的血流再灌注, 目前最有效的治疗措施是静脉溶栓和血管内机械取栓治疗^[14-15]。然而, 即使恢复血流再灌注, 相应脑组织出现不同程度的再灌注损伤也难以避免^[2]。目前, 普遍认为氧化应激损伤、能量代谢障碍、离子稳态失衡、炎症反应



A: Western blot法检测脑梗死周边区皮质Ngf蛋白表达情况; B: Ngf蛋白的半定量分析。 ** $P < 0.01$ 。 $n = 6$; C: 免疫荧光法检测脑梗死周边区皮质Ngf蛋白表达情况; D: 多重免疫荧光法检测脑梗死周边区皮质中Ngf、NSE、DAPI表达的代表性图片(ADSC组)。

A: Western blot analysis was used to detect the expression of Ngf protein in the peri-infarct cortex; B: semi-quantitative analysis of Ngf protein. ** $P < 0.01$. $n = 6$; C: immunofluorescence analysis of Ngf in the peri-infarct cortex; D: representative images of Ngf, NSE, and DAPI expression in the peri-infarct cortex of ADSC group detected by multiple immunofluorescence assay.

图6 ADSC移植促进脑梗死周边区皮质中Ngf的表达

Fig.6 ADSC transplantation promoted the expression of Ngf in the peri-infarct cortex

等在缺血/再灌注损伤中扮演着重要角色^[16]。因此,减轻氧化应激损伤和改善能量代谢是重要的潜在治疗靶点。线粒体不仅是细胞产生ATP的场所,同时也是活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生的主要场所,因此在能量代谢和氧化应激中起到关键作用^[17]。此外,线粒体还参与了钙平衡调节、细胞增殖和代谢以及程序性死亡调控等生理病理过程^[18]。研究表明,减轻脑卒中后线粒体损伤可以抑制神经细胞死亡、促进神经再生,有利于神经功能恢复^[19]。因此,线粒体结构和功能的完整性对于脑卒中后神经细胞的存活以及神经功能的修复具有重要意义。在本实验中,我们探索了ADSC移植对脑梗死周边

区皮质中脑细胞线粒体损伤和能量代谢的影响,结果表明ADSC移植可以减轻脑细胞线粒体损伤,提高 Na^+/K^+ -ATP酶、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP酶的水平,使ATP的产生增多。与此同时,我们进一步对各组大鼠脑梗死周边区皮质中的氧化应激相关指标,包括SOD、MDA、NO的水平进行了检测,结果表明ADSC移植可以提高脑梗死后大鼠抗氧化酶SOD的水平,并抑制MDA和NO的形成,提示ADSC移植可以减轻脑梗死周边区的氧化应激反应。

Ngf在中枢神经系统中广泛表达,是一种高度保守的蛋白质,对氧气具有高亲和力,可以充当缺氧传感器并启动涉及氧化和缺氧途径、细胞存活/调

亡途径以及ATP产生途径的相关信号转导^[20]。自Ngb被发现以来,许多研究已经探索了它的神经保护作用,特别是在缺氧、缺血的条件下。在过表达Ngb的转基因小鼠模型中,局灶性脑缺血导致的梗死体积明显缩小,而体内及体外研究均表明,敲低Ngb表达可加重神经元的缺血/缺氧性损伤^[16]。WEN等^[20]的研究表明,Ngb能有效清除脑缺血后过量产生的ROS,从而抑制氧化应激反应介导的ATP酶 β 1亚基谷胱甘肽化,有助于维持和保存 Na^+/K^+ -ATP酶的活性。这些及其他许多研究表明,Ngb的保护作用主要包括以下几点^[16,21-22]:(1)促进抗氧化酶的活化和氧自由基的清除,减轻氧化应激反应;(2)维持线粒体正常的结构和功能,改善细胞能量代谢;(3)抑制促炎因子的产生和促凋亡因子的活化,提高神经细胞的存活率。在本实验中,我们检测到大鼠脑梗死周边区皮质中的Ngb主要表达于神经元细胞中,在MCAO后表达水平升高,与既往的研究结果相符^[6,23],而ADSC移植可以进一步上调该区域中Ngb的表达。基于上述Ngb的神经保护作用,我们推测ADSC移植减轻脑梗死周边区皮质中脑组织的线粒体损伤和氧化应激反应,以及改善能量代谢缺陷,这可能与促进该区域的神经元细胞表达Ngb有关。

综上所述,ADSC移植可以促进脑缺血大鼠的神经功能恢复,其可能部分通过促进Ngb在梗死周边区皮质中的表达,进而起到保护线粒体结构、改善能量代谢缺陷和减轻氧化应激反应的作用。ADSC移植的治疗作用在基础实验方面得到大量的证明,研究者们已经开始转向ADSC的临床研究^[24],本研究为ADSC移植疗法进一步充实了理论基础,希望该疗法可以尽早应用于临床使脑卒中患者获益。

参考文献 (References)

- [1] ZHU G G, WANG X Y, CHEN L X, et al. Crosstalk between the oxidative stress and glia cells after stroke: from mechanism to therapies [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 852416.
- [2] HE Q Y, WANG Y Q, FANG C, et al. Advancing stroke therapy: a deep dive into early phase of ischemic stroke and recanalization [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(2): e14634.
- [3] ZHANG Y, ZHANG H Y, ZHAO F Q, et al. Mitochondrial-targeted and ROS-responsive nanocarrier via nose-to-brain pathway for ischemic stroke treatment [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(12): 5107-20.
- [4] CHEN N, WANG Y L, SUN H F, et al. Potential regulatory effects of stem cell exosomes on inflammatory response in ischemic stroke treatment [J]. *World J Stem Cells*, 2023, 15(6): 561-75.
- [5] ZHANG Y C, DONG N J, HONG H L, et al. Mesenchymal stem cells: therapeutic mechanisms for stroke [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2550.
- [6] SHANG L, MAO D, LI Z, et al. Neuroglobin is involved in the hypoxic stress response in the brain [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 8263373.
- [7] BLANCO S, PERALTA S, MORALES M E, et al. Hyaluronate nanoparticles as a delivery system to carry neuroglobin to the brain after stroke [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(1): 40.
- [8] CHEN J L, LI Y, WANG L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005-11.
- [9] WANG Y, NIU H, LI L, et al. Anti-CHAC1 exosomes for nose-to-brain delivery of miR-760-3p in cerebral ischemia/reperfusion injury mice inhibiting neuron ferroptosis [J]. *J Nanobiotechnol*, 2023, 21(1): 109.
- [10] LIU X, JIA X F. Neuroprotection of stem cells against ischemic brain injury: from bench to clinic [J]. *Transl Stroke Res*, 2023, 7: 10.
- [11] GUTIERREZ F M, OTERO O L, RAMOS C J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a strategy to improve recovery after stroke [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(6): 873-81.
- [12] PHELPS J, HART D A, MITHA A P, et al. Physiological oxygen conditions enhance the angiogenic properties of extracellular vesicles from human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 218.
- [13] CHEN K H, CHEN C H, CHRISTOPHER G W, et al. Intravenous administration of xenogenic adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes markedly reduced brain infarct volume and preserved neurological function in rat after acute ischemic stroke [J]. *Oncotarget*, 2023, 7(46): 74537-56.
- [14] MAJOIE C B, CAVALCANTE F, GRALLA J, et al. Value of intravenous thrombolysis in endovascular treatment for large-vessel anterior circulation stroke: individual participant data meta-analysis of six randomised trials [J]. *Lancet*, 2023, 402(10406): 965-74.
- [15] WIDIMSKY P, SNYDER K, SULZENKO J, et al. Acute ischaemic stroke: recent advances in reperfusion treatment [J]. *Eur Heart J*, 2023, 44(14): 1205-15.
- [16] PEINADO M A, OVELLEIRO D, DEL MORAL M L, et al. Biological implications of a stroke therapy based in neuroglobin hyaluronate nanoparticles. Neuroprotective role and molecular bases [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 247.
- [17] CHEN L, CHEN S, YANG X F, et al. Antioxidants attenuate mitochondrial oxidative damage through the Nrf2 pathway: a promising therapeutic strategy for stroke [J]. *J Neurosci Res*, 2023, 101(8): 1275-88.
- [18] MARCHI S, GUILBAUD E, TAIT S W G, et al. Mitochondrial control of inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(3): 159-73.
- [19] HUANG J, CHEN L, YAO Z M, et al. The role of mitochondrial dynamics in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Biomed*

- Pharmacother, 2023, 162: 114671.
- [20] WEN H X, LIU L, ZHAN L X, et al. Neuroglobin mediates neuroprotection of hypoxic postconditioning against transient global cerebral ischemia in rats through preserving the activity of Na⁺/K⁺ ATPases [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 635.
- [21] ZHANG H H, LI Y D, XUN Y, et al. Polydatin protects neuronal cells from hydrogen peroxide damage by activating CREB/Ngb signaling [J]. Mol Med Rep, 2021, 25(1): 9.
- [22] CAI S C, LI X P, LI X, et al. Oleanolic acid inhibits neuronal pyroptosis in ischaemic stroke by inhibiting miR-186-5p expression [J]. Exp Neurobiol, 2021, 30(6): 401-14.
- [23] BLANCO S, MARTÍNEZ-LARA E, SILES E, et al. New strategies for stroke therapy: nanoencapsulated neuroglobin [J]. Pharmaceutics, 2022, 14(8): 1737.
- [24] COMBES L, SAWKULYCZ X, FANG W H, et al. Potential of adipose derived stem cell preparations in neurological repair and regeneration [J]. Biophys Rep, 2021, 7(2): 81-90.