

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.18.003
文章编号: 1005-8982 (2022) 18-0013-12

中枢神经系统损伤专题·论著

全身亚低温联合人脐带血间充质干细胞移植改善新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后认知障碍和能量衰竭的机制研究*

祝巍¹, 王立君², 沈文生¹, 王思思³, 李颖⁴, 李雨静⁴, 王静竹¹,
高燕¹, 方聪¹, 赵寒阳¹, 孙秀红¹, 孙智勇¹

(1. 吉林省妇幼保健院 新生儿科, 吉林 长春 130012; 2. 吉林大学第一医院 小儿呼吸科, 吉林 长春 130061; 3. 吉林大学第一医院 转化医学院, 吉林 长春 130061; 4. 延边大学医学院 儿科系, 吉林 延吉 133002)

摘要: **目的** 探究全身亚低温联合人脐带血间充质干细胞(hCMNCs)移植改善新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后认知障碍和能量衰竭的机制。**方法** 7日龄新生SD乳鼠330只。随机分为11组, 每组30只。空白对照组(A组)、HIBD常温组(B组)、HIBD亚低温持续72 h组(C组)、HIBD亚低温24 h干细胞移植组(D组)、HIBD亚低温48 h干细胞移植组(E组)、HIBD亚低温72 h移植组(F组)、HIBD亚低温24 h后持续3 d移植干细胞(G组)、HIBD 24 h干细胞移植组(H组)、HIBD 48 h干细胞移植组(I组)、HIBD 72 h干细胞移植组(J组)、HIBD 24 h、48 h、72 h干细胞移植组(K组)。乳鼠生长的第10天、第21天和第35天对其进行称重; 通过Morris水迷宫实验检测乳鼠学习和记忆能力, 超微电镜观察分析乳鼠脑组织神经元细胞及突触超微结构的变化, 苏木精-伊红(HE)染色观察脑组织病理学变化, 酶联免疫吸附试验检测乳鼠脑组织炎症因子和干细胞分化标记蛋白含量, 免疫荧光染色检测脐带CD24和CD29阳性表达率, 荧光显微镜测量线粒体膜电位。**结果** A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K组乳鼠生长第10天、第21天和第35天体重比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点乳鼠体重有差异($F=13.285, P=0.000$), 各组乳鼠第21天与第35天体重比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); ②各组乳鼠体重有差异($F=20.097, P=0.000$), B组乳鼠体重较A组降低($P<0.05$), C~K组乳鼠体重较B组升高($P<0.05$), G、I组乳鼠体重较B、C、D、E、F、H、J、K组均升高($P<0.05$), 且G组与I组乳鼠体重比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); ③各组乳鼠体重变化趋势有差异($F=28.712, P=0.000$)。C~F组3种反射(悬崖调转反射、阴性趋地性、步态反射)时间较A组延长($P<0.05$), 但较B组缩短($P<0.05$); C组3种反射时间较A、D~J组延长($P<0.05$); G~K组3种反射时间与A组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); C~F组3种反射时间较G~K组延长($P<0.05$)。HE染色结果显示, 与A组比较, B~K组乳鼠HIBD模型复制成功后第3天, 脑间质水肿, 小血管间隙增宽, 左侧大脑出现大片坏死, 细胞溶解、破坏、消失; 皮质海马神经元排列紊乱, 核固缩、崩解, 细胞浓染, 并见小胶质细胞。第21天, B~K组与A组有差异, B~K组脑组织见不同程度的损伤, 其中B组可见大的梗塞灶及液化空洞形成。C~K组表现为部分炎症细胞; B组与C~K组比较, 脑损伤程度较大。其中G、J、K组脑损伤及炎症程度较C~F、H、I组小。B~K组逃避潜伏期较A组延长($P<0.05$), G、J、K组逃避潜伏期较B~F、H组缩短($P<0.05$)。B~K组神经元致密区长度较A组变短($P<0.05$), 厚度较A组变薄($P<0.05$), 而突触间隙宽度较A组变厚($P<0.05$)。C~K组乳鼠神经元致密区长度较B组变长($P<0.05$), 厚度较B组变厚($P<0.05$), 突触间隙宽度较B组变薄($P<0.05$)。G~J组乳鼠神经元致密区长度较D~F、K组变长($P<0.05$), 厚度较D~F、K组变厚($P<0.05$), 突触间隙宽度较D~F、K组变薄($P<0.05$)。A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K组乳鼠HIBD模型复制成功后第3天、第8天、第12天的TNF- α 、IL-6、Nestin、TUBB、MBP比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点TNF- α 、IL-6、Nestin、TUBB、MBP有差异

收稿日期: 2022-04-29

* 基金项目: 吉林省科技发展计划项目(No: 20190304110YY); 吉林省卫生与健康技术创新项目(No: 2020J125)

[通信作者] 孙智勇, E-mail: Jeromesursun@126.com; Tel: 13843123969

($F=39.451, 19.754, 36.957, 16.794$ 和 16.958 , 均 $P=0.000$); ②各组乳鼠 TNF- α 、IL-6、Nestin、TUBB、MBP 有差异($F=10.719, 10.159, 43.271, 5.947$ 和 $11.217, P=0.000, 0.000, 0.000, 0.012$ 和 0.000); B~K 组 TNF- α 、IL-6 在 HIBD 模型复制成功第 3 天、第 8 天和第 12 天较 A 组升高($P < 0.05$), C~K 组 TNF- α 、IL-6 较 B 组降低($P < 0.05$)。C~K 组 Nestin、TUBB 和 MBP 较 B 组升高($P < 0.05$)。③各组乳鼠 TNF- α 、IL-6、Nestin、TUBB、MBP 变化趋势有差异 ($F=22.678, 25.483, 6.597, 20.159$ 和 $20.154, P=0.000, 0.000, 0.003, 0.000$ 和 0.000)。A~C 组 CD24 和 CD29 阳性表达率较 E~K 组降低($P < 0.05$), G、I 组较 H、J、K 组 CD24 和 CD29 阳性表达率升高($P < 0.05$)。B~K 组线粒体膜电位较 A 组降低($P < 0.05$), C~K 组线粒体膜电位较 B 组升高($P < 0.05$), G~J 组线粒体膜电位较 C~F 组升高($P < 0.05$)。结论 亚低温联合 UCMSCs 能改善 HIBD 乳鼠认知障碍和能量衰竭, 对脑神经有保护作用。

关键词: 亚低温; 干细胞移植; 脑缺血损伤; 能量衰竭; 乳鼠

中图分类号: R512.91

文献标识码: A

Mechanism of mild whole-body hypothermia combined with human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation in ameliorating cognitive impairment and energy failure after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats*

Wei Zhu¹, Li-jun Wang², Wen-sheng Shen¹, Si-si Wang³, Ying Li⁴, Yu-jing Li⁴, Jing-zhu Wang¹,
Yan Gao¹, Cong Fang¹, Han-yang Zhao¹, Xiu-hong Sun¹, Zhi-yong Sun¹

(1. Department of Neonatology, Jilin Women and Children Health Hospital, Changchun, Jilin 130012, China; 2. Department of Pediatric Respiratory Medicine, The First Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130061, China; 3. College of Translational Medicine, The First Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130061, China; 4. Department of Pediatrics, Medical College of Yanbian University, Yanji, Jilin 133002, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of mild whole-body hypothermia combined with human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation in ameliorating cognitive impairment and energy failure after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in neonatal rats. **Methods** A total of 330 7-day-old neonatal SD rats were randomly divided into 11 groups, including blank control group (A), HIBD + normal temperature group (B), HIBD + 72-hour mild hypothermia group (C), HIBD + 24-hour mild hypothermia + stem cell transplantation group (D), HIBD + 48-hour mild hypothermia + stem cell transplantation group (E), HIBD + 72-hour mild hypothermia + stem cell transplantation group (F), HIBD + 24-hour mild hypothermia + 3-day stem cell transplantation group (G), HIBD + 24-hour stem cell transplantation group (H), HIBD + 48-hour stem cell transplantation group (I), HIBD + 72-hour stem cell transplantation group (J), and HIBD + 24-hour, 48-hour, 72-hour stem cell transplantation group (K), with 30 animals in each group. The rats were weighed and compared in the 10th, 21st and 35th days of the growth. The learning and memory abilities of rats were detected by Morris water maze test. The ultrastructural changes of neurons and synapses in rat brain tissues were observed and analyzed by electron microscopy. The histopathological changes in the rat brain tissues were observed with H&E staining. Serum levels of inflammatory factors and stem cell differentiation markers were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The positive expression rates of CD24 and CD29 in the umbilical cord were detected by immunofluorescence. The mitochondrial membrane potential was detected by a fluorescence microscope. **Results** The rats in all the groups were weighed and compared on the 10th, 21st and 35th days of growth. The repeated measures ANOVA showed that the body weight of rats at different time points was different ($F = 13.285, P = 0.000$), and that the body weight of rats at 21 d and 35 d in each group was significantly different ($P < 0.05$). The body weight of rats was also different among the groups ($F = 20.097, P = 0.000$), where the body weight of rats in group B was lower than that in group A ($P < 0.05$), the body weight of rats in groups C to K was higher than that in group B ($P < 0.05$), and the body weight of rats in group G and I was higher than that in groups B to K ($P < 0.05$). There was no significant difference in body

weight of rats between group I and group G ($P > 0.05$). The change trend of body weight of rats in each group was different ($F = 28.712, P = 0.000$). The response time of cliff avoidance reaction, negative geotaxis and gait reflex in group C, D, E and F was longer than that in group A ($P < 0.05$), but was shorter than that in group B ($P < 0.05$). The response time of cliff avoidance reaction, negative geotaxis and gait reflex in group C was longer than that in group A, D, E, F, G, H, I and J ($P < 0.05$), while that was not different among group A and group G, H, I, J and K ($P < 0.05$). The response time of cliff avoidance reaction, negative geotaxis and gait reflex in group C, D, E and F was longer than that in group G, H, I, J and K ($P < 0.05$). The results of H&E staining on the 3rd day after the successful establishment of HIBD model showed interstitial cerebral edema, dilated perivascular spaces, large areas of necrosis in the left brain, cytolysis, cytoclasis, cell loss, irregular arrangement of cortical and hippocampal neurons, karyopyknosis, karyorrhexis, darkly stained cells, and the presence of microglia in rats of group B to K compared with group A. On the 21st day, the injury in group B to K was different from that in group A, and various degrees of injury was observed in groups B to K, where large infarcts and cavities due to liquefactive necrosis were observed in group B while some inflammatory cells were observed in group C to K. The degree of brain damage was greater in group B than that in group C to K, while the degrees of brain injury and inflammation in G, J and K groups were lower than those in C to F, H and I groups. The escape latency of rats in group B to K was longer than that in group A ($P < 0.05$), and the escape latency of groups G, J and K was shorter than that of groups B to F and H ($P < 0.05$). The postsynaptic density was shorter and thinner, and the synaptic cleft was wider in rats of groups B to K than those in group A ($P < 0.05$). Compared with group B, the postsynaptic density was longer and thicker, and the synaptic cleft was narrower in groups C to K ($P < 0.05$). Compared with groups D to F and K, the postsynaptic density was longer and thicker, and the synaptic cleft was narrower in groups G to J ($P < 0.05$). The levels of TNF- α , IL-6, Nestin, TUBB and MBP were compared in groups A to K on the 3rd, 8th and 12th day after modeling, and the results were analyzed by repeated measures ANOVA. The levels of TNF- α , IL-6, Nestin, TUBB and MBP were significantly different at different time points ($F = 39.451, 19.754, 36.957, 16.794$ and 16.958 , all $P = 0.000$) and among groups ($F = 10.719, 10.159, 43.271, 5.947$ and 11.217 , $P = 0.000, 0.000, 0.000, 0.012$ and 0.000). The serum levels of TNF- α and IL-6 in groups B to K were significantly higher than those in group A, while the serum levels of TNF- α and IL-6 in groups C to K were significantly lower than those in group B on the 3rd, 8th and 12th day after modeling ($P < 0.05$). Compared with group B, the serum levels of Nestin, TUBB and MBP in groups C to K were significantly higher ($P < 0.05$). The change trends of the serum levels of TNF- α , IL-6, Nestin, TUBB and MBP were also different among the groups ($F = 22.678, 25.483, 6.597, 20.159$ and 20.154 , $P = 0.000, 0.000, 0.003, 0.000$ and 0.000). The positive expression rates of CD24 and CD29 in groups A to C were lower than those in groups E to K ($P < 0.05$), and the positive expression rates of CD24 and CD29 in groups G and I were higher than those in groups H, J and K ($P < 0.05$). The mitochondrial membrane potential of groups B to K was lower than that of group A ($P < 0.05$), the mitochondrial membrane potential of groups C to K was higher than that of group B ($P < 0.05$), and the mitochondrial membrane potential of groups G to J was higher than that of groups C to F ($P < 0.05$). **Conclusions** Mild hypothermia combined with human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation can improve the cognitive impairment and energy failure of HIBD neonatal rats and exhibits a neuroprotective effect.

Keywords: mild hypothermia; stem cell transplantation; cerebral ischemia injury; energy failure; neonatal rats

新生儿大脑缺氧缺血是儿童死亡和神经功能障碍的常见原因, 导致长期延迟的认知和行为缺陷^[1-2]。使用干细胞或祖细胞来减轻脑损伤或促进再生是一种很有前途的治疗方法, 已在不同的中枢神经系统疾病和缺血性疾病中进行了尝试^[3-4]。大脑缺氧缺血导致原代细胞丧失, 神经干细胞可能产生胶质细胞和神经元谱系细胞^[5-6]。有证据表明, 细胞替代可能是提高学习和记忆能力的最重要机制之一。然而, 大脑缺氧缺血后, 移植细胞经常被微

环境诱导凋亡。治疗性亚低温通过多种机制发挥强大的神经保护作用, 如降低代谢率、减少谷氨酸释放、减少活性氧的形成、防止血脑屏障破坏, 以及调节炎症和凋亡因子的表达^[7-8]。迄今为止, 低温是最有希望的神经保护剂, 其具有多方面的神经保护作用, 包括减少梗塞, 减少细胞内钙内流, 降低细胞内酸中毒, 抑制氧自由基的形成, 预防血脑屏障破坏和抑制炎症细胞浸润。脐带血中检测到具有高增殖潜能的未成熟造血干/祖细胞、间充质干细胞

等,多种干细胞及免疫细胞可以通过多种途径治疗缺氧缺血性脑病,为组织再生建立有利的细胞微环境,促进脑损伤后恢复。因此,本研究通过复制新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)模型,探讨亚低温联合人脐带血间充质干细胞(umbilical cord blood mesenchymal stem cells, UCMSCs)移植治疗缺氧缺血性脑病的疗效及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 7日龄新生SD清洁级乳鼠330只,体重7~9 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001,实验动物使用许可证号:SYXK(吉)2019-0012。将乳鼠饲养在(24±2)℃、12 h昼/夜循环照明,相对湿度为40%~70%的环境中,随机获取水和食物。

1.1.2 动物分组及HIBD模型的复制 将7日龄新生乳鼠330只,随机分为11组,每组30只。空白对照组(A组)、HIBD常温组(B组)、HIBD亚低温持续72 h组(C组)、HIBD亚低温24 h干细胞移植组(D组)、HIBD亚低温48 h干细胞移植组(E组)、HIBD亚低温72 h移植组(F组)、HIBD亚低温24 h后持续3 d移植干细胞(G组)、HIBD 24 h干细胞移植组(H组)、HIBD 48 h干细胞移植组(I组)、HIBD 72 h干细胞移植组(J组)、HIBD 24 h、48 h、72 h干细胞移植组(K组)。复制HIBD模型^[9]:乳鼠乙醚麻醉1 min后,解剖显微镜下剪开乳鼠颈部正中皮肤,于胸锁乳突肌深部分离左侧颈总动脉,用6-0 F丝线结扎两端并剪断血管,术后恢复2 h。将乳鼠放入37℃密闭缺氧箱,持续充入8%氧气+92%氮气的混合气体,气流量0.5~1.0 L/min,缺氧2 h。A组:只分离左侧颈总动脉但不结扎,缝合皮肤后不做缺氧处理。B组乳鼠维持肛温36~37℃。C~G组在HIBD模型复制成功后立即置于自制可控温箱内,维持肛温32~33℃,亚低温治疗期间乳鼠为人工管饲配方乳喂养,亚低温治疗72 h后放回母鼠身边,由母鼠喂养。A、B、H~K组乳鼠均由母乳喂养。干细胞移植为人脐血单核细胞(human cord blood mononuclear cells, hCMNCs)乳鼠鼻腔内移植,干细

胞移植数量为:通过微量注射器鼻腔注入2 μL UCMSCs细胞悬液(1×10⁶个细胞),时间>5 min,留针5 min。第10天、第21天和第35天各组乳鼠进行称重^[10]。

1.1.3 主要试剂 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(武汉赛维尔生物有限公司),抗CD24(1:100)、抗CD29(1:100)(美国Abcam公司),4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(美国Vector Laboratories Inc公司)。

1.1.4 主要仪器 Morris水迷宫(吉林大学第一医院转化医学院),Epon(英国Agar Scientific公司),透射电子显微镜(型号:JEM-1400系列120 kV,美国JEOL公司),脱水机(型号:JJ-12J)、包埋机(型号:JB-P5)(武汉俊杰电子有限公司),病理切片机(型号:RM2016,上海徠卡仪器有限公司),偏光显微镜(型号:BX-51,日本Olympus公司),低温恒温器(型号:CM3050S-3,美国Leica Microsystems公司)。

1.2 方法

1.2.1 早期神经反射 HIBD模型复制成功后,分别观察各组乳鼠第12天的悬崖调转反射、阴性趋地性、步态反射。①悬崖调转反射:将长、宽各30 cm的木板放置在水平桌面边缘,分别将乳鼠的双侧前爪置于木板边缘,松开乳鼠后开始记录乳鼠爬动并掉转头部与木板边缘呈90°时所需时间。如果>60 s乳鼠不能完成反射,则记录实验最高值为60 s。②阴性趋地性:将长度为30 cm的木板置于桌面上,倾斜度为35°。乳鼠头朝下放置于木板上,双侧后爪置于木板中央,记录乳鼠爬动掉转身体并将头部朝上(180°)所需时间。如果>60 s乳鼠仍不能调转身体则记录实验最高值为60 s。③步态反射:将乳鼠置于直径为13 cm的白色圆纸中央,白色圆纸固定于桌面,记录乳鼠双侧前爪爬出圆纸边缘的时间。如果>60 s乳鼠前爪不能爬出圆纸边缘,则记录实验最高值为60 s。每天3种反射各进行3次,取3次的平均值,2次反射评估间隔时间>5 min,以便乳鼠得到充分休息。

1.2.2 Morris水迷宫实验 各组HIBD模型复制成功后28 d进行Morris水迷宫实验,以逃避潜伏期所需时间来评估乳鼠的学习和记忆能力。Morris水迷

宫由平台、圆形水池和记录装置组成,水池上空通过一个数字摄像机与计算机相连接。水池直径 120 cm,高 60 cm,池壁黑色,将水池分东北、东南、西南和西北 4 个象限。每天开始实验时,在水池里注水 30 cm 深,圆柱形平台由透明有机玻璃做成,置于任一象限中央,平面没于水面下 1 cm。为避免乳鼠直接看到平台,在水中加入白色悬浮聚乙烯颗粒,使水不透明,水温维持在 $(22 \pm 5)^\circ\text{C}$ 左右。水池四周用蓝色布帘包围,布帘上面挂有 4 个几何图形作为空间参照物,且位置始终保持不变,每天换水。所有乳鼠均进行隐蔽平台实验 5 d、探索实验 1 d,以评价各组乳鼠学习和记忆能力。每次实验在隔音的房间内进行,水池、光源、鼠笼等实验室各物件的位置保持不变。隐蔽平台实验测试前,让乳鼠在不含平台的水池中自由游泳 2 d,熟悉迷宫环境。实验时平台置于东北象限中央且位置固定不变。在平台对侧选取 2 个与之距离相等的点作为入水点,将乳鼠面贴壁轻轻放入水中,记录乳鼠找到平台的时间(逃避潜伏期)。如果乳鼠 90 s 内找不到平台,则潜伏期计为 90 s,每天在 2 个入水点各进行一次测试,用 2 次逃避潜伏期的平均数进行统计分析。

1.2.3 透射电镜观察乳鼠脑组织神经元细胞及突触超微结构 取 HIBD 模型复制成功后第 8 天乳鼠的脑组织,取 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 海马组织固定在 4% 多聚甲醛中,再固定于 2% 四氧化锇。用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤,在 30%、50% 和 70% 乙醇中梯度脱水,在 95% 乙醇、无水乙醇和环氧丙烷中继续脱水。将样品嵌入 Epon,将 80 nm 厚的超薄切片安装在铜网格上,透射电子显微镜下进行观察。

1.2.4 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察乳鼠脑组织病理学变化 取 HIBD 模型复制成功后第 3 天、第 21 天乳鼠的脑组织,浸入 4°C 、4% 甲醛溶液中 24 h。脑组织脱水、包埋在石蜡块中,切成 $4\ \mu\text{m}$ 厚的冠状切片。切片脱蜡、水化,行 HE 染色。采用由偏光显微镜组成的计算机辅助图像分析系统,用 200 和 400 放大倍数拍摄。

1.2.5 ELISA 检测白细胞介素 6(Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、神经上皮干细胞蛋白(Nestin)、 β -微管蛋白(β -tubulin, TUBB)、甘露糖结合蛋白(mannose-binding

protein, MBP)含量 收集各组 HIBD 模型复制成功后第 3 天、第 8 天、第 12 天乳鼠的脑组织。脑组织在 1 mL 冰冷的 PBS (pH=7.2) 中通过超声处理均质化, 4°C 、12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,采用 ELISA 试剂盒测定蛋白含量。

1.2.6 免疫荧光染色检测乳鼠脑组织中移植的人脐带血 CD24 和 CD29 阳性表达率 取 HIBD 模型复制成功后第 21 天乳鼠的脑组织,置于 10% 甲醛中固定过夜。脑组织在 20% 蔗糖溶液中浸泡 2 d,转移到 30% 蔗糖溶液中 2 d,最后将大脑嵌入 OCT 化合物置于 -80°C 条件下冷冻。在低温恒温器内 -20°C 条件下将冷冻脑组织切成 $10\ \mu\text{m}$ 厚的冠状切片。将切片的组织固定在载玻片上用于免疫荧光染色。PBS 清洗 3 次, 5 ~ 10 min/次, 0.3% Triton X-100 室温孵育 15 min。PBS 清洗 3 次, 5 min/次, 5% 驴血清室温封闭 1 h, 在 4°C 条件下与一抗 CD24(1:100)、CD29(1:100)孵育过夜, PBS 洗涤后, 室温下与二抗 CD24(1:200)、CD29(1:200)孵育 2 h。用 PBS 洗涤载玻片 3 次, 10 min/次。最后用 DAPI 覆盖, 采用荧光显微镜 Leica DMI8 对载玻片进行可视化, 并通过 Leica Application Suite 软件进行分析。为评估 CD24(绿色荧光)和 CD29(红色荧光)细胞的数量, 对每组脑组织 3 个不同切片中的每个视野进行计数, 以平均数表示每平方毫米的阳性细胞占比。

1.2.7 荧光显微镜测量线粒体膜电位 HIBD 模型复制成功第 21 天, 将乳鼠安乐死, 灌注冰冷的 PBS, 从脑组织中分离出线粒体。将神经元与 JC-1 染色溶液在 37°C 条件下孵育 20 min, 用 JC-1 染色缓冲液洗涤, 浸入神经元培养基中。使用荧光显微镜拍摄阳性染色细胞图像。正常线粒体产生红色荧光, 去极化或失活的线粒体产生绿色荧光。线粒体膜电位为红色与绿色荧光的比率。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组乳鼠的行为学变化

实验前各组乳鼠行为能力正常, B 组乳鼠在行

左侧颈总动脉剪断时先出现躁动、持续颤抖,继而出现精神萎靡,嗜睡少动,出箱后少数出现抽搐、全身僵直、角弓反张表现。所有 HIBD 模型乳鼠在缺氧缺血过程中相继出现烦躁不安、气促、发绀、肌肉颤动、全身抖动、站立不稳、不能翻身,行走时右后肢拖步、夹尾右旋,复氧后 1 h 表现为固定向左侧旋转运动。

2.2 各组乳鼠体重变化

A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 组乳鼠生长第 10 天、第 21 天和第 35 天体重比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点乳鼠体重有差异($F=13.285, P=0.000$),各组乳鼠第 21 天与第 35 天体重比较,差异有统计学意义($P<0.05$);②各组乳鼠体重有差异($F=20.097, P=0.000$),B 组乳鼠体重较 A 组降低($P<0.05$),C~K 组乳鼠体重较 B 组升高($P<0.05$),G、I 组乳鼠体重较 B、C、D、E、F、H、J、K 组均升高($P<0.05$),且 G 组与 I 组乳鼠体重比较,差异无统计学意义($P>0.05$);③各组乳鼠体重变化趋势有差异($F=28.712, P=0.000$)。见表 1。

表 1 各组乳鼠不同时间点体重比较 ($n=30, g, \bar{x} \pm s$)

组别	第 10 天	第 21 天	第 35 天
A 组	24.47 ± 3.28	70.53 ± 3.52	134.62 ± 6.49
B 组	22.71 ± 2.38	27.38 ± 2.39	55.29 ± 5.24
C 组	24.15 ± 3.33	31.56 ± 3.28	63.17 ± 3.61
D 组	23.09 ± 3.12	36.38 ± 2.66	69.29 ± 4.15
E 组	24.62 ± 2.12	45.25 ± 2.18	83.25 ± 3.26
F 组	24.46 ± 4.05	40.62 ± 2.44	75.24 ± 3.14
G 组	25.39 ± 3.22	64.54 ± 3.11	121.54 ± 5.33
H 组	23.17 ± 2.26	54.21 ± 3.18	96.24 ± 3.18
I 组	25.52 ± 3.13	65.51 ± 3.77	125.48 ± 3.29
J 组	22.68 ± 2.21	59.31 ± 3.50	102.47 ± 5.33
K 组	23.47 ± 3.22	48.46 ± 2.17	89.36 ± 4.22

2.3 各组乳鼠早期行为反射比较

A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 组 HIBD 模型复制成功第 12 天乳鼠的悬崖调转反射、阴性趋地性、步态反射比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较结果:C~F 组 3 种反射时间较 A 组延长($P<0.05$),但较 B 组缩短($P<0.05$);C 组 3 种反射时间较 A、D~J 组延长($P<0.05$);G~K 组

3 种反射时间与 A 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);C~F 组 3 种反射时间较 G~K 组延长($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组乳鼠早期行为反射比较 ($n=30, s, \bar{x} \pm s$)

组别	悬崖调转反射	阴性趋地性	步态反射
A 组	23.17 ± 4.48	20.52 ± 3.17	30.54 ± 3.22
B 组	52.26 ± 5.26	54.51 ± 4.39	51.38 ± 4.72
C 组	46.37 ± 4.18	48.32 ± 3.15	46.25 ± 5.38
D 组	34.26 ± 3.11	33.38 ± 4.30	37.49 ± 3.86
E 组	37.00 ± 4.05	35.14 ± 5.38	35.22 ± 3.16
F 组	39.00 ± 3.26	36.27 ± 4.12	37.37 ± 4.26
G 组	26.49 ± 3.44	22.51 ± 4.26	32.86 ± 3.25
H 组	25.24 ± 4.18	24.71 ± 3.23	34.56 ± 3.77
I 组	27.36 ± 3.11	25.67 ± 4.29	36.41 ± 4.32
J 组	24.35 ± 5.25	26.33 ± 6.20	36.51 ± 6.74
K 组	27.51 ± 3.86	28.52 ± 6.33	36.21 ± 5.44
F 值	23.044	19.586	31.321
P 值	0.001	0.001	0.001

2.4 各组乳鼠脑组织病理学变化

HE 染色结果显示,与 A 组比较,B~K 组乳鼠 HIBD 模型复制成功后第 3 天,脑间质水肿,小血管间隙增宽,左侧大脑出现大片坏死,细胞溶解、破坏、消失;皮质海马神经元排列紊乱,核固缩、崩解,细胞浓染,并见小胶质细胞。第 21 天,B~K 组与 A 组有差异,B~K 组脑组织见不同程度的损伤,其中 B 组可见大的梗塞灶及液化空洞形成,表现为组织结构模糊,炎症细胞增多,神经元坏死,神经细胞表型为空泡,细胞质淡染,细胞核固缩,染色呈蓝褐色,部分细胞发生裂解、溶解。C~K 组表现为部分炎症细胞;B 组与 C~K 组比较,脑损伤程度较大。其中 G、J、K 组脑损伤及炎症程度较 C~F、H、I 组小。见图 1。

2.5 各组乳鼠逃避潜伏期比较

A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 组乳鼠逃避潜伏期分别为(16.36 ± 4.27)s、(102.56 ± 18.44)s、(73.29 ± 8.27)s、(68.34 ± 6.59)s、(63.31 ± 5.02)s、(69.44 ± 5.68)s、(39.62 ± 5.18)s、(74.51 ± 6.37)s、(66.29 ± 5.15)s、(42.55 ± 6.43)s 和 (45.64 ± 5.18)s,经单因素方差分析,差异有统计学意义($F=10.772, P=0.003$)。进一步两两比较结果:B~K 组逃避潜伏期较 A 组延长($P<$

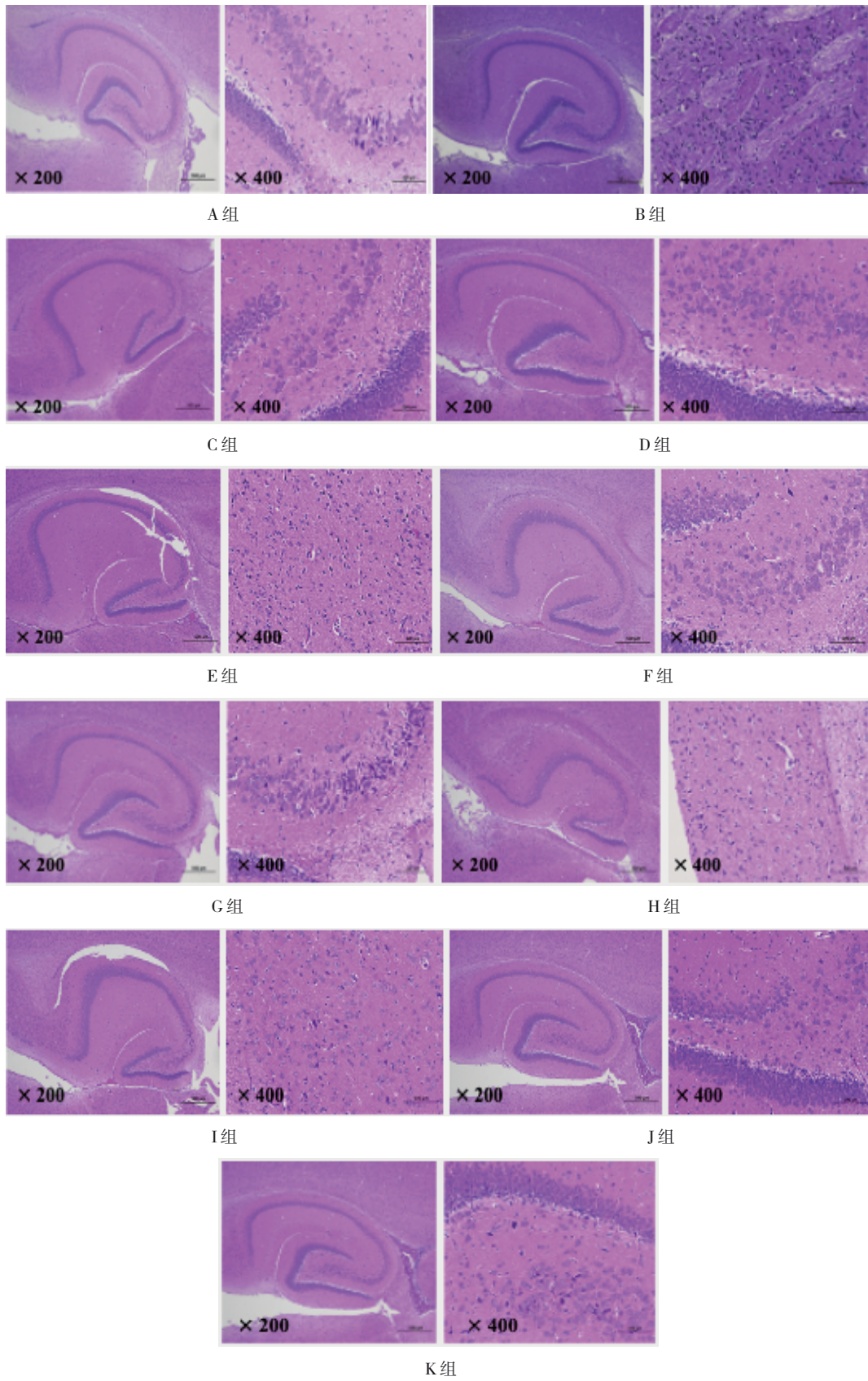


图1 各组乳鼠脑组织病理切片检查 (HE染色)

0.05), G、J、K 组逃避潜伏期较 B~F、H 组缩短 ($P < 0.05$)。

2.6 各组乳鼠脑组织神经元细胞及突触超微结构变化

超微电镜观察结果显示, A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 组 HIBD 模型复制成功第 8 天乳鼠神经元致密区长度、致密区厚度、突触间隙宽度比较, 经单因素方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: B~K 组神经元致密区长度较 A 组变短 ($P < 0.05$), 厚度较 A 组变薄 ($P < 0.05$), 而突触间隙宽度较 A 组变厚 ($P < 0.05$)。C~K 组乳鼠神经元致密区长度较 B 组变长 ($P < 0.05$), 厚度较 B 组变厚 ($P < 0.05$), 突触间隙宽度较 B 组变薄 ($P < 0.05$)。G~J 组乳鼠神经元致密区长度较 D~F、K 组变长 ($P < 0.05$), 厚度较 D~F、K 组变厚 ($P < 0.05$), 突触间隙宽度较 D~F、K 组变薄 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 2。

2.7 各组乳鼠脑组织炎症因子和干细胞分化标记蛋白比较

A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 组 HIBD 模型复制成功后第 3 天、第 8 天、第 12 天乳鼠脑组织 TNF- α 、IL-6、Nestin、TUBB、MBP 比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点 TNF- α 、IL-6、Nestin、TUBB、MBP 有差异 ($F = 39.451$ 、 19.754 、 36.957 、 16.794

表 3 各组乳鼠神经元细胞及突触超微结构比较

($n = 30$, nm, $\bar{x} \pm s$)

组别	致密区长度	致密区厚度	突触间隙宽度
A 组	532.47 \pm 43.26	39.35 \pm 5.39	18.31 \pm 3.72
B 组	288.10 \pm 14.95	22.69 \pm 4.30	25.20 \pm 2.14
C 组	301.34 \pm 18.43	29.63 \pm 5.78	23.29 \pm 2.88
D 组	336.30 \pm 22.42	31.40 \pm 5.81	22.62 \pm 3.96
E 组	353.62 \pm 21.53	33.20 \pm 4.64	21.95 \pm 2.22
F 组	347.45 \pm 23.74	32.73 \pm 4.25	22.20 \pm 2.56
G 组	420.20 \pm 26.76	37.69 \pm 6.35	20.97 \pm 2.28
H 组	398.35 \pm 29.54	34.11 \pm 6.33	21.04 \pm 1.25
I 组	449.32 \pm 29.44	38.20 \pm 5.77	20.04 \pm 2.30
J 组	407.54 \pm 28.55	36.35 \pm 5.41	20.62 \pm 1.93
K 组	387.30 \pm 25.44	33.63 \pm 4.54	22.43 \pm 1.98
F 值	11.645	9.006	13.732
P 值	0.013	0.021	0.009

和 16.958, 均 $P = 0.000$); ②各组乳鼠 TNF- α 、IL-6、Nestin、TUBB、MBP 有差异 ($F = 10.719$ 、 10.159 、 43.271 、 5.947 和 11.217 , $P = 0.000$ 、 0.000 、 0.000 、 0.012 和 0.000); B~K 组 TNF- α 、IL-6 在 HIBD 模型复制成功第 3 天、第 8 天和第 12 天较 A 组升高 ($P < 0.05$), C~K 组 TNF- α 、IL-6 较 B 组降低 ($P < 0.05$)。C~K 组 Nestin、TUBB 和 MBP 较 B 组升高 ($P < 0.05$)。③各

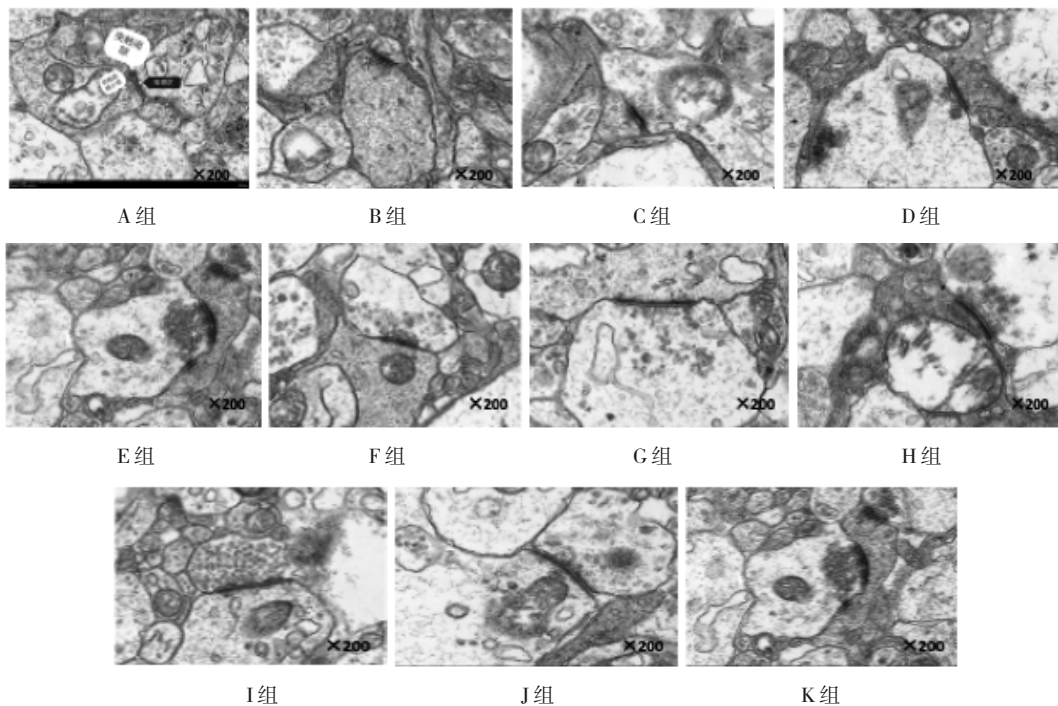


图 2 各组乳鼠神经元细胞 (透射电子显微镜)

组乳鼠 TNF- α 、IL-6、Nestin、TUBB、MBP 变化趋势有 0.000、0.000、0.003、0.000 和 0.000)。见表 4。
 差异 ($F=22.678$ 、 25.483 、 6.597 、 20.159 和 20.154 , $P =$

表 4 各组乳鼠不同时间点 TNF- α 、IL-6、Nestin、TUBB、MBP 比较 ($n=30$, pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α			IL-6			Nestin		
	第3天	第8天	第12天	第3天	第8天	第12天	第3天	第8天	第12天
A组	3.15 ± 0.26	3.39 ± 0.29	3.98 ± 0.51	3.56 ± 0.44	3.72 ± 0.52	3.92 ± 0.55	0.35 ± 0.06	0.39 ± 0.08	0.40 ± 0.08
B组	12.79 ± 2.36	13.52 ± 2.41	13.62 ± 3.01	21.84 ± 3.53	23.01 ± 3.82	23.65 ± 4.26	0.24 ± 0.03	0.27 ± 0.05	0.29 ± 0.06
C组	8.48 ± 0.77	8.55 ± 0.98	9.12 ± 1.02	13.86 ± 1.32	14.15 ± 1.63	15.62 ± 2.31	0.41 ± 0.10	0.50 ± 0.16	0.59 ± 0.15
D组	6.64 ± 0.47	6.88 ± 0.63	7.32 ± 0.69	13.76 ± 1.24	14.52 ± 1.71	16.01 ± 2.37	0.42 ± 0.09	0.49 ± 0.11	0.63 ± 0.12
E组	5.40 ± 1.02	5.96 ± 1.13	5.99 ± 1.35	1031 ± 1.06	11.12 ± 1.06	12.98 ± 1.57	0.44 ± 0.10	0.52 ± 0.13	0.64 ± 0.16
F组	7.43 ± 1.16	7.59 ± 1.25	8.68 ± 1.25	11.78 ± 1.24	12.55 ± 1.63	13.15 ± 2.20	0.37 ± 0.07	0.41 ± 0.10	0.45 ± 0.09
G组	11.51 ± 1.94	11.81 ± 2.03	12.55 ± 2.20	9.54 ± 1.00	9.87 ± 1.21	10.89 ± 1.52	0.45 ± 0.10	0.49 ± 0.11	0.51 ± 0.11
H组	9.48 ± 1.22	9.62 ± 1.35	10.12 ± 1.59	10.70 ± 1.15	11.32 ± 1.31	11.66 ± 1.71	0.44 ± 0.09	0.53 ± 0.12	0.54 ± 0.12
I组	6.63 ± 0.58	6.71 ± 0.75	7.71 ± 0.87	7.05 ± 0.95	7.95 ± 1.02	8.68 ± 1.16	0.37 ± 0.08	0.39 ± 0.09	0.42 ± 0.09
J组	9.99 ± 1.25	10.21 ± 1.39	10.36 ± 1.58	9.38 ± 1.01	9.95 ± 1.19	9.96 ± 1.27	0.35 ± 0.08	0.38 ± 0.07	0.46 ± 0.09
K组	14.03 ± 2.51	15.10 ± 2.98	15.51 ± 2.87	12.71 ± 1.47	13.32 ± 1.78	14.05 ± 2.26	0.41 ± 0.12	0.46 ± 0.15	0.49 ± 0.17

组别	TUBB			MBP		
	第3天	第8天	第12天	第3天	第8天	第12天
A组	0.32 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.36 ± 0.05	0.57 ± 0.13	0.60 ± 0.21	0.63 ± 0.14
B组	0.23 ± 0.02	0.27 ± 0.05	0.29 ± 0.03	0.38 ± 0.08	0.40 ± 0.09	0.428 ± 0.10
C组	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.04	0.36 ± 0.06	0.46 ± 0.08	0.51 ± 0.10	0.49 ± 0.10
D组	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.38 ± 0.05	0.47 ± 0.08	0.49 ± 0.09	0.52 ± 0.11
E组	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.48 ± 0.08	0.53 ± 0.11	0.53 ± 0.15
F组	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.44 ± 0.05	0.47 ± 0.06	0.54 ± 0.09
G组	0.39 ± 0.05	0.42 ± 0.06	0.42 ± 0.06	0.54 ± 0.09	0.57 ± 0.12	0.57 ± 0.11
H组	0.31 ± 0.07	0.35 ± 0.08	0.36 ± 0.09	0.51 ± 0.10	0.53 ± 0.11	0.58 ± 0.16
I组	0.47 ± 0.09	0.48 ± 0.10	0.49 ± 0.12	0.65 ± 0.10	0.66 ± 0.12	0.76 ± 0.19
J组	0.36 ± 0.06	0.38 ± 0.07	0.39 ± 0.07	0.55 ± 0.09	0.59 ± 0.10	0.63 ± 0.11
K组	0.36 ± 0.05	0.42 ± 0.04	0.38 ± 0.06	0.43 ± 0.04	0.45 ± 0.06	0.51 ± 0.09

2.8 各组乳鼠脑组织 CD24 和 CD29 阳性表达率比较

A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 组乳鼠脑组织 CD24 和 CD29 阳性表达率比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: A ~ C 组 CD24 和 CD29 阳性表达率较 E ~ K 组降低 ($P < 0.05$), G、I 组较 H、J、K 组 CD24 和 CD29 阳性表达率升高 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 3。

2.9 各组乳鼠脑组织线粒体膜电位比较

A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 组乳鼠脑组织线

粒体膜电位分别为 (1.96 ± 0.28)AU、(0.75 ± 0.04)AU、(0.85 ± 0.03)AU、(1.10 ± 0.11)AU、(1.27 ± 0.13)AU、(1.31 ± 0.15)AU、(1.64 ± 0.23)AU、(1.52 ± 0.18)AU、(1.71 ± 0.20)AU、(1.43 ± 0.16)AU 和 (1.48 ± 0.18)AU,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F=13.527$, $P=0.0014$)。进一步两两比较结果: B ~ K 组线粒体膜电位较 A 组降低 ($P < 0.05$), C ~ K 组线粒体膜电位较 B 组升高 ($P < 0.05$), G ~ J 组线粒体膜电位较 C ~ F 组升高 ($P < 0.05$)。

表 5 各组乳鼠脑组织 CD24 和 CD29 阳性表达率比较
($n=30$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	CD24 阳性表达率	CD29 阳性表达率
A 组	1.03 ± 0.36	0.71 ± 0.18
B 组	1.77 ± 0.41	0.58 ± 0.17
C 组	1.53 ± 0.24	0.36 ± 0.21
D 组	5.26 ± 1.33	1.21 ± 0.55
E 组	19.35 ± 3.55	3.41 ± 1.26
F 组	8.61 ± 1.47	2.15 ± 0.44
G 组	40.27 ± 5.33	5.73 ± 2.44
H 组	30.57 ± 3.26	4.51 ± 2.49
I 组	44.25 ± 6.33	5.89 ± 1.77
J 组	35.47 ± 4.22	4.97 ± 1.05
K 组	23.51 ± 3.56	4.41 ± 1.36
F 值	13.775	11.203
P 值	0.003	0.026

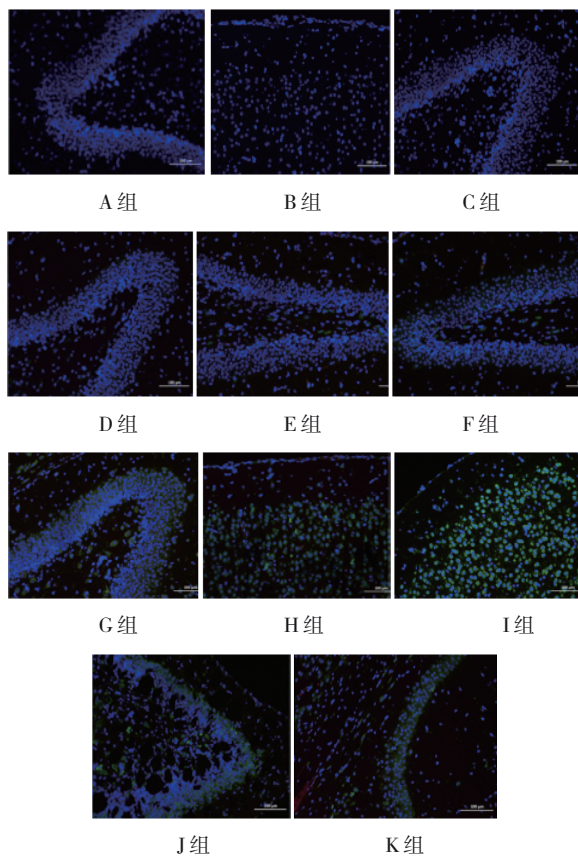


图 3 各组乳鼠脑组织 CD24 和 CD29 的阳性表达
(免疫荧光染色 × 100)

3 讨论

新生儿脑缺氧缺血可在 12 ~ 24 h 内导致死亡

或神经功能缺损(包括癫痫发作、反射改变、意识水平扭曲、发育迟缓、癫痫、智力低下和脑瘫)^[11-12]。目前,人们越来越关注将干细胞移植作为以神经细胞死亡为特征的神经退行性疾病的恢复性方法。干细胞具有分裂和分化为成熟神经元和神经胶质细胞的能力,但在发育和成熟的中枢神经系统中不存在^[13-14]。干细胞优先迁移到损伤区域,并在移植到缺氧缺血性脑后第 14 ~ 21 天表达神经元标志物,证明大脑影响这些细胞以诱导神经元分化。UCMSCs 是一种源于新生儿脐带组织中的多功能的成体干细胞(已经分化组织中的未分化细胞),具有干细胞特有的多向分化潜能。有研究证实,UCMSCs 在特定条件下可分化为脂肪、骨、软骨、神经、心肌、内皮等多种组织细胞,并且具有免疫调节特性,可用于多种病变引起的组织器官损伤修复和再生^[15-16]。然而,在后期形成的神经元数量较少,可能只有 5% 移植细胞分化成神经元。此外,移植后细胞能力差是临床应用的严重问题。尽管 >90% 细胞在移植时是存活的,但只有 5% ~ 10% 细胞在移植后存活。另一项研究发现,移植后 2 周内, <50% 移植神经干细胞继续在小鼠脑组织中存活。提高移植细胞存活率是提高细胞疗法临床价值的基本策略。在植入过程中,细胞受到缺氧缺血性损伤。调整缺氧缺血性大脑的微环境可以促进移植干细胞的分化和提高存活率,从而改善缺氧缺血性损伤小鼠的神经功能。亚低温可以减少缺氧缺血后损伤和缩小短暂局灶性缺血中的梗塞体积。低温为有意控制地将正常体温降至 30 ~ 35℃(轻度)、28 ~ 32℃(中度)和 20 ~ 28℃(深度)范围内的温度。轻度低温又称亚低温,是最有前途的神经保护剂,具有多方面的神经保护作用,并且中至深度低温同样具有保护作用。已知亚低温通过多种机制发挥强大的神经保护作用,包括降低代谢率、减少谷氨酸释放、减少活性氧的形成、防止血脑屏障破坏,以及调节炎症和凋亡因子的表达^[17-20]。迄今为止,有多种冷却方法,包括冷却毯和侵入性血管内冷却装置,在临床上广泛应用。实验中,通常在动物周围放置冰袋、冰毯或施用药物来诱导亚低温。亚低温可显著降低重度颅脑创伤后患者的病死率并改善预后。有研究表明,亚低温可减少内在和外在此的凋亡途径,并防止脑组织在缺血缺氧后发生继发性损伤^[21-23]。本研究结果表

明, 亚低温联合 UCMSCs 移植治疗比单一治疗更有效。HIBD 模型乳鼠表现为行为迟钝、少动, 体重增长缓慢。经过低温、干细胞移植后, HIBD 模型乳鼠的神经反射行为得到明显改善, 体重增加。HIBD 模型乳鼠脑组织均见不同程度的损伤, 经过单一低温或干细胞移植治疗后海马神经元损伤降低, 并改善神经元细胞及突触超微结构。神经炎症反应是未成熟大脑发育的关键病理生理因素。缺氧缺血性损伤的初始炎症反应导致继发性神经元损伤。缺氧缺血会激活小胶质细胞, 即大脑中的常驻免疫细胞, 破坏血脑屏障, 导致外周白细胞浸润, 从而进一步加剧炎症和脑损伤^[24-26]。本研究中, 亚低温、干细胞移植或联合治疗都显著降低了 HIBD 模型乳鼠脑组织炎症因子 TNF- α 和 IL-6 水平, 并发现低温下更能促进干细胞分化。HIBD 后大量活性氧的产生会导致氧化应激, 线粒体是主要靶点之一^[27-28]。线粒体损伤最初的特征是膜电位降低。将 JC-1 荧光探针用于指示膜电位的变化, 当线粒体膜电位正常时, JC-1 会在线粒体基质中积累并发出红色荧光, 而当线粒体膜电位降低或塌陷时, JC-1 不能积累并发出绿色荧光。本研究中, A 组乳鼠神经元发出红色荧光, 很少观察到绿色荧光; 然而 HIBD 乳鼠脑神经元红色荧光强度大大降低, 绿色荧光明显增强。HIBD 乳鼠在经过亚低温或者干细胞治疗后线粒体膜电位损失恢复, 这说明亚低温和干细胞治疗逆转了 HIBD 乳鼠的能量衰竭。尽管亚低温联合干细胞移植对 HIBD 发挥了保护作用, 但亚低温 24 h 后持续 3 d 干细胞移植效果最好, 因为研究中发现亚低温降低炎症反应, 同时降低干细胞活性, 但因持续补充干细胞, 数量增多, 故效果显著。本研究中, 亚低温 48 h 移植干细胞效果和单纯 48 h 移植干细胞效果次之。其原因是 24 h 炎症爆发期, 炎症消耗干细胞; 48 h 炎症稳定期, 刺激干细胞分泌抗炎外泌体, 定向分化; 72 h 脑损伤期, 脑神经元损伤重, 干细胞大量消耗^[29]。无论亚低温加干细胞移植还是单纯干细胞移植效果均优于单纯亚低温治疗。

综上所述, 脐带血干细胞具有来源丰富, 采集方便, 对供者无伤害, 干细胞增殖分化能力更强, 免疫原性更低等诸多优点。亚低温联合 UCMSCs 能改善 HIBD 乳鼠认知障碍和能量衰竭, 对脑神经有保护作用。此外, 接受持续亚低温干细胞移植治疗的

乳鼠在长期行为测试和组织病理变化中表现更好。

参 考 文 献 :

- [1] BERTAGNONI G, LUPI A, FEDELI M, et al. 18F-fluorodeoxyglucose positron-emitted tomography for predicting neurological outcome in hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Brain Inj*, 2021, 35(10): 1292-1300.
- [2] DAI C F, WU B, CHEN Y X, et al. Aagab acts as a novel regulator of NEDD4-1-mediated Pten nuclear translocation to promote neurological recovery following hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(8): 2367-2384.
- [3] SUPPIEJ A, VEDOVELLI L, BOSCHIERO D, et al. Abnormal heart rate variability at school age in survivors of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy managed with therapeutic hypothermia[J]. *Eur J Paediatr Neurol*, 2020, 29: 66-70.
- [4] de ALMEIDA W, CONFORTIM H D, DENIZ B F, et al. Acrobatic exercise recovers object recognition memory impairment in hypoxic-ischemic rats[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2021, 81(1): 60-70.
- [5] JIA L J, WANG J W, CAO H M, et al. Activation of PGC-1 α and mitochondrial biogenesis protects against prenatal hypoxic - ischemic brain injury[J]. *Neuroscience*, 2020, 432: 63-72.
- [6] LE K, WU S S, CHIBAATAR E, et al. Alarmin HMGB1 plays a detrimental role in hippocampal dysfunction caused by hypoxia-ischemia insult in neonatal mice: evidence from the application of the HMGB1 inhibitor glycyrrhizin[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 11(6): 979-993.
- [7] NOORANI S, ROY B, SAHIB A K, et al. Caudate nuclei volume alterations and cognition and mood dysfunctions in adolescents with single ventricle heart disease[J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(10): 1877-1888.
- [8] TRILLO-CONTRERAS J L, RAMÍREZ-LORCA R, HIRALDO-GONZÁLEZ L, et al. Combined effects of aquaporin-4 and hypoxia produce age-related hydrocephalus[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(10): 3515-3526.
- [9] 焦梦蝶, 张天蕾, 王宏增, 等. 新生儿缺氧缺血性脑病动物模型的构建与评价方法[J]. *中华新生儿科杂志*, 2022, 37(3): 281-285.
- [10] 杨自金, 郭佳丽, 卢思广, 等. 人脐带间充质干细胞移植联合神经节苷脂注射治疗脑性瘫痪[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(19): 2803-2809.
- [11] LI C Y, MO Z H, LEI J J, et al. Edaravone attenuates neuronal apoptosis in hypoxic-ischemic brain damage rat model via suppression of TRAIL signaling pathway[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 99: 169-177.
- [12] LIU T S, YIN Z H, YANG Z H, et al. The effects of monotherapy with erythropoietin in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy on neurobehavioral development: a systematic review and meta-analysis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(5): 2318-2326.

- [13] SCHOBER M E, REQUENA D F, RODESCH C K. EPO improved neurologic outcome in rat pups late after traumatic brain injury[J]. *Brain Dev*, 2018, 40(5): 367-375.
- [14] RAZAK A, HUSSAIN A. Erythropoietin in perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Perinat Med*, 2019, 47(4): 478-489.
- [15] XIONG T, YANG X Y, QU Y, et al. Erythropoietin induces synaptogenesis and neurite repair after hypoxia ischemia-mediated brain injury in neonatal rats[J]. *Neuroreport*, 2019, 30(11): 783-789.
- [16] CAINELLI E, TREVISANUTO D, CAVALLIN F, et al. Evoked potentials predict psychomotor development in neonates with normal MRI after hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Clin Neurophysiol*, 2018, 129(6): 1300-1306.
- [17] CUI G H, WU J, MOU F F, et al. Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice[J]. *FASEB J*, 2018, 32(2): 654-668.
- [18] THEI L, ROCHA-FERREIRA E, PEEBLES D, et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 has duality in function between neuronal and astrocyte expression following neonatal hypoxic - ischaemic cerebral injury[J]. *J Physiol*, 2018, 596(23): 6043-6062.
- [19] KABATAS S, CIVELEK E, SAVRUNLU E C, et al. Feasibility of allogeneic mesenchymal stem cells in pediatric hypoxic-ischemic encephalopathy: phase I study[J]. *World J Stem Cells*, 2021, 13(5): 470-484.
- [20] DENIZ B F, CONFORTIM H D, DECKMANN I, et al. Folic acid supplementation during pregnancy prevents cognitive impairments and BDNF imbalance in the hippocampus of the offspring after neonatal hypoxia-ischemia[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 60: 35-46.
- [21] 李鸿炜, 张玮豪. 长时程亚低温疗法对重型颅脑损伤术后部分凝血功能指标、氧化应激指标和炎性因子水平的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2018, 43(2): 200-205.
- [22] 陆皓, 万意. 亚低温对重型颅脑外伤后降钙素原和白细胞介素-6 水平的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2016, 41(10): 1220-1223.
- [23] 肖婉翡, 肖农, 黄琴蓉, 等. 近红外脑功能成像技术在新生儿缺氧缺血性脑病亚低温治疗中的应用前景[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2022, 44(1): 92-94.
- [24] 金学廷, 邱正红, 刘向国. 胶质细胞源性神经营养因子在大鼠神经病理性疼痛模型中的作用及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(11): 37-42.
- [25] 王斓, 陈浙丽, 徐亮, 等. 抗精神病药喹硫平对少突胶质细胞周期的影响及其作用机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(14): 40-46.
- [26] 蒋鹏飞, 董子奕, 彭俊, 等. 蛭螭提取物对视网膜中央静脉阻塞模型兔小胶质细胞 CD68 表达的影响及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(12): 7-11.
- [27] 刘国锋, 毛琦, 李帅, 等. 星状神经节阻滞对体外循环大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(1): 114-119.
- [28] 龚健, 古正涛, 李莉, 等. 褪黑素对热打击后人脐静脉内皮细胞凋亡的保护作用[J]. *广西医科大学学报*, 2021, 38(7): 1344-1349.
- [29] 唐华兵. 人脐血单核细胞不同移植时间对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的神经保护作用研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 祝巍, 王立君, 沈文生, 等. 全身亚低温联合人脐带血间充质干细胞移植改善新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后认知障碍和能量衰竭的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(18): 13-24.

Cite this article as: ZHU W, WANG L J, SHEN W S, et al. Mechanism of mild whole-body hypothermia combined with human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell transplantation in ameliorating cognitive impairment and energy failure after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(18): 13-24.