

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.12.005  
文章编号: 1005-8982 (2023) 12-0024-09

实验研究·论著

## 低氧预处理人牙髓干细胞移植对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑白质损伤的影响\*

武沐洋<sup>1</sup>, 王晓莉<sup>2</sup>, 高淑君<sup>1</sup>, 张浩<sup>1</sup>, 肖培伦<sup>3</sup>, 王凡涛<sup>4</sup>

(潍坊医学院 1. 口腔医学院, 2. 医学影像学院, 3. 基础医学院, 山东 潍坊 261053;  
4. 潍坊医学院附属医院 口腔科, 山东 潍坊 261053)

**摘要: 目的** 探讨低氧预处理人牙髓干细胞移植(H-hDPSCs)对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠脑白质损伤及内源性神经干细胞的影响。**方法** 将健康7 d龄Sprague-Dawley新生大鼠随机分为假手术组、HIBD组、常氧培养hDPSC移植组(N-hDPSCs组)及低氧预处理hDPSC移植组(H-hDPSCs组),每组11只。采用经典的Rice-Vannucci法复制HIBD模型。模型复制后7 d采用增殖细胞核抗原(PCNA)/巢蛋白(Nestin)免疫荧光双标法检测大鼠侧脑室室管膜下区内源性神经干细胞(NSCs)的增殖;模型复制后3周,滑竿实验、Y迷宫实验及模型复制后4周Morris水迷宫实验检测大鼠的运动及空间记忆能力;行为学实验后采用神经元特异性核蛋白(NeuN)免疫荧光法检测大鼠脑组织皮层和海马CA1区神经元的表达;采用髓鞘碱性蛋白(MBP)及神经纤维丝蛋白重链(NF200)免疫荧光双标法检测纹状体及胼胝体区髓鞘及神经纤维的表达。**结果** HIBD组模型复制后7 d的侧脑室室管膜下区增殖NSCs数较假手术组少( $P < 0.05$ ),N-hDPSCs组、H-hDPSCs组较HIBD组多,但较假手术组少( $P < 0.05$ ),N-hDPSCs组较H-hDPSCs组少( $P < 0.05$ )。N-hDPSCs组、H-hDPSCs组模型复制后3周爬杆时间较假手术组长( $P < 0.05$ ),但较HIBD组短( $P < 0.05$ ),H-hDPSCs组较N-hDPSCs组短( $P < 0.05$ )。HIBD组新异臂停留时间较假手术组短( $P < 0.05$ ),N-hDPSCs组、H-hDPSCs组较HIBD组长( $P < 0.05$ ),但较假手术组短( $P < 0.05$ ),而N-hDPSCs组较H-hDPSCs组短( $P < 0.05$ )。各组大鼠第1天、第2天、第3天、第4天逃避潜伏期比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点逃避潜伏期有差异( $F = 662.825, P = 0.000$ );②各组逃避潜伏期有差异( $F = 109.286, P = 0.000$ ),N-hDPSCs组、H-hDPSCs组大鼠较假手术组长( $P < 0.05$ ),但均较HIBD组短( $P < 0.05$ ),H-hDPSCs组较N-hDPSCs组短( $P < 0.05$ );③各组逃避潜伏期变化趋势有差异( $F = 20.543, P = 0.000$ )。N-hDPSCs组、H-hDPSCs组大鼠在第5天的空间探索实验中穿台次数较假手术组少( $P < 0.05$ ),但较HIBD组多( $P < 0.05$ ),H-hDPSCs组较N-hDPSCs组多( $P < 0.05$ )。N-hDPSCs组、H-hDPSCs组大鼠在目标象逗留时间百分比较假手术组小( $P < 0.05$ ),但较HIBD组多( $P < 0.05$ ),H-hDPSCs组较N-hDPSCs组多( $P < 0.05$ )。N-hDPSCs组、H-hDPSCs组NeuN阳性细胞数较HIBD组多( $P < 0.05$ ),但较假手术组少( $P < 0.05$ ),N-hDPSCs组较H-hDPSCs组少( $P < 0.05$ )。N-hDPSCs组、H-hDPSCs组纹状体、胼胝体区MBP、NF200蛋白平均荧光强度高于HIBD组( $P < 0.05$ ),但低于假手术组( $P < 0.05$ ),H-hDPSCs组高于N-hDPSCs组( $P < 0.05$ )。**结论** H-hDPSCs与N-hDPSCs移植可有效改善HIBD新生大鼠远期行为学,并促进HIBD新生大鼠内源性NSCs的增殖,减轻脑白质损伤进而促进HIBD神经修复,且H-hDPSCs移植的疗效优于N-hDPSCs。

**关键词:** 低氧预处理;人牙髓干细胞;缺氧缺血性脑损伤;脑白质损伤;新生大鼠

**中图分类号:** R722.19

**文献标识码:** A

## Effects of hypoxia-preconditioned human dental pulp stem cell transplantation on cerebral white matter injury in neonatal rat

收稿日期: 2022-11-12

\* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 82071888);山东省自然科学基金(No: ZR2020MH074);山东省中医药科技发展计划项目(No: 2019-0417, 2019-0421);潍坊市科技发展计划项目(No: 2020YX037)

[通信作者] 王凡涛, E-mail: wang.fantao@163.com

## models of hypoxic-ischemic brain damage\*

Wu Mu-yang<sup>1</sup>, Wang Xiao-li<sup>2</sup>, Gao Shu-jun<sup>1</sup>, Zhang Hao<sup>1</sup>, Xiao Pei-lun<sup>3</sup>, Wang Fan-tao<sup>4</sup>

(1. School of Stomatology, 2. School of Medical Imaging, 3. School of Basic Medicine, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China; 4. Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of hypoxia-preconditioned human dental pulp stem cell (H-hDPSCs) transplantation on cerebral white matter injury and endogenous neural stem cells (NSCs) in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Healthy Sprague-Dawley rats, aged 7 days, were randomly divided into sham group, HIBD group, normoxia-cultured human dental pulp stem cell (N-hDPSCs) transplantation group and H-hDPSCs transplantation group, with 11 rats in each group. The HIBD model was established using the classical Rice-Vannucci method. The proliferation of endogenous NSCs in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricle of rats in each group was detected by immunofluorescence double-labeling of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Nestin 7 days after modeling. The motor and spatial memory abilities of rats in each group were detected by the pole test and the Y-maze test 3 weeks after modeling and the Morris water maze test 4 weeks after modeling. Following the behavioral tests, the expression of neurons in the cerebral cortex and the CA1 region of hippocampus was detected via immunofluorescence staining with neuron-specific nuclear protein (NeuN) as the marker, while the expressions of myelin and nerve fibers in the striatum and corpus callosum was detected via immunofluorescence double-labeling of the myelin basic protein (MBP) and neurofilament 200 (NF200). **Results** The number of proliferating NSCs in SVZ of the lateral ventricle in the HIBD group was lower than that in the sham group 7 days after modeling ( $P < 0.05$ ), while that in the N-hDPSCs transplantation group and that in the H-hDPSCs transplantation group were higher compared with the HIBD group but lower compared with the sham group ( $P < 0.05$ ). Besides, the number of proliferating NSCs in SVZ of the lateral ventricle in the N-hDPSCs transplantation group was lower than that in the H-hDPSCs transplantation group ( $P < 0.05$ ). The total time spent in the pole test 3 weeks after modeling in the N-hDPSCs transplantation group and the H-hDPSCs transplantation group was longer than that in the sham group ( $P < 0.05$ ) but was shorter than that in the HIBD group ( $P < 0.05$ ), while that in the H-hDPSCs transplantation group was shorter compared with the N-hDPSCs transplantation group ( $P < 0.05$ ). In the Y-maze test, the time spent in the novel arm in the HIBD group was shorter than that in the sham group ( $P < 0.05$ ), while that in the N-hDPSCs transplantation group and the H-hDPSCs transplantation group was longer compared with the HIBD group ( $P < 0.05$ ) but was shorter compared with the sham group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the time spent in the novel arm in the Y-maze test in the N-hDPSCs transplantation group was even shorter than that in the H-hDPSCs transplantation group ( $P < 0.05$ ). The escape latency in the Morris water maze test on the first day, the second day, the third day and the fourth day was compared via repeated measures ANOVA, which revealed that the escape latency was different among the time points ( $F = 662.825, P = 0.000$ ) and among the groups ( $F = 109.286, P = 0.000$ ). Specifically, the escape latency in the N-hDPSCs transplantation group and the H-hDPSCs transplantation group was longer than that in the sham group ( $P < 0.05$ ) but was shorter than that in the HIBD group ( $P < 0.05$ ), and that in the H-hDPSCs transplantation group was even shorter relative to that in the N-hDPSCs transplantation group ( $P < 0.05$ ). In addition, the change trend of the escape latency was different among the groups ( $F = 20.543, P = 0.000$ ). The number of platform crossings in the probe test on the fifth day in the N-hDPSCs transplantation group and that in the H-hDPSCs transplantation group were lower compared with the sham group ( $P < 0.05$ ) but were higher compared with the HIBD group ( $P < 0.05$ ), and that in the H-hDPSCs transplantation group was even higher than that in the N-hDPSCs transplantation group ( $P < 0.05$ ). The percentages of time spent in the target quadrant in the N-hDPSCs transplantation group and the H-hDPSCs transplantation group were lower compared with the sham group ( $P < 0.05$ ) but were higher compared with the HIBD group ( $P < 0.05$ ), and the percentage of time spent in the target quadrant in the H-hDPSCs transplantation group was even higher than that in the N-hDPSCs transplantation group ( $P < 0.05$ ). The number of NeuN-positive cells in the N-hDPSCs transplantation group and that in the H-hDPSCs transplantation group were higher than that in the HIBD group ( $P <$

0.05) but were lower than that in the sham group ( $P < 0.05$ ), and that in the N-hDPSCs transplantation group was even lower than that in the H-hDPSCs transplantation group ( $P < 0.05$ ). The mean fluorescent intensity of MBP and NF200 in the striatum and corpus callosum of rats in the N-hDPSCs transplantation group and the H-hDPSCs transplantation group was higher compared with the HIBD group ( $P < 0.05$ ) but was lower compared with the sham group ( $P < 0.05$ ), while that in the H-hDPSCs transplantation group was even higher than that in the N-hDPSCs transplantation group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Transplantation of both H-hDPSCs and N-hDPSCs could effectively improve the long-term behavioral function, enhance the proliferation of endogenous NSCs, reduce cerebral white matter injury and thus promote neural recovery in HIBD neonatal rats. Besides, the efficacy of H-hDPSCs transplantation is superior to that of N-hDPSCs transplantation.

**Keywords:** hypoxic preconditioning; human dental pulp stem cells; hypoxic-ischemic brain damage; cerebral white matter injury; neonatal rats

新生儿缺氧缺血性脑病 (hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE) 是由围生期窒息引起的新生儿脑组织损伤性疾病 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD), 不仅导致大脑皮层神经元损伤, 而且可引起脑白质损伤 (white matter damage, WMD), 导致脑白质脱髓鞘改变及认知和行为障碍等学异常, 因而, 临床上亟待寻找新的有效治疗方案<sup>[1-2]</sup>。目前间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 移植作为神经修复的治疗干预措施备受关注<sup>[3-4]</sup>。研究发现, MSCs 移植可促进内源性神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 的增殖和分化, 减轻 WMD<sup>[5]</sup>。研究表明人牙髓间充质干细胞 (human dental pulp stem cells, hDPSCs) 不仅具备干细胞的特性, 而且由于其起源于胚胎时期的神经嵴结构, 更易向神经细胞分化<sup>[6-7]</sup>。CHIU 等<sup>[8]</sup>发现 hDPSCs 移植可改善新生大鼠 HIBD。研究还发现, 低氧预处理可在维持 MSCs 特性的基础上, 有效提升其增殖、分化和免疫调节性能, 促进神经功能修复<sup>[9-10]</sup>。研究表明低氧预处理后的 hDPSCs 血管生成细胞因子、生长因子增加<sup>[11]</sup>。

本课题组前期研究发现氧浓度在 5% 时更易于维持 hDPSCs 的生物学特性及神经分化<sup>[12]</sup>。但 5% 低氧预处理的 hDPSCs 移植能否减轻新生大鼠 HIBD, 目前尚不清楚。因此, 本研究采用免疫荧光法观察低氧预处理的 hDPSCs 对内源性 NSCs 增殖、神经元损伤及髓鞘修复的影响, 同时利用行为学观察 HIBD 新生大鼠的运动及空间记忆能力差异, 探讨 H-hDPSCs 移植对 HIBD 新生大鼠 WMD 的影响, 为 H-hDPSCs 治疗 HIBD 的临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

44 只 SPF 级健康 7 d 龄 Sprague-Dawley 大鼠 [实验动物生产许可证号: SCXK(鲁)20190003, 实验动物使用许可证号: SYXK(鲁)20190016], 由山东省济南朋悦实验动物繁育有限公司提供。大鼠雌雄不限, 平均体重 ( $12.0 \pm 1.5$ ) g, 按照随机数字表法分为假手术组、HIBD 组、常氧培养 hDPSC 移植组 (N-hDPSCs 组)、低氧预处理 hDPSC 移植组 (H-hDPSCs 组), 每组 11 只。

### 1.2 主要仪器与试剂

冰冻切片仪、水迷宫装置 (深圳瑞沃德公司), 正置荧光显微镜 (日本 Olympus 株式会社), 脑立体定位仪 (美国 Stoelting 公司), 电凝笔 (美国 Roboz 公司), 低氧舱 (武汉七〇一研究所公司), 抗人核抗原 (anti-human nuclei antigen, HuNu) (美国 Abcam 公司), 抗增殖型细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、巢蛋白 (neuronal stem cell protein, Nestin)、髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP)、神经纤维丝蛋白 (neurofilament200, NF200)、神经元特异核蛋白 (neuronal nuclei, NeuN) (武汉三鹰生物技术公司), Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G、Alexa Fluor 594 标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G (北京中杉金桥公司), 含 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 的荧光封片剂 (美国 Sigma 公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 新生大鼠 HIBD 模型复制** 依据经典 Rice-Vannucci 法<sup>[13]</sup>复制新生大鼠 HIBD 模型。新生大鼠乙醚吸入麻醉后以仰卧位固定于手术台, 消毒后行

颈部正中切口,分离右侧颈总动脉并电凝,术后大鼠置于低氧舱内连续缺氧[37℃、氧舱浓度(8.00±0.01)%]2h,放回原笼饲养。假手术组仅暴露右侧颈总动脉,不做电凝处理。

**1.3.2 hDPSCs 低氧预处理** 取对数生长期的 hDPSCs 细胞,调整三气培养箱氧气浓度为 5%,二氧化碳浓度为 5%,37℃ 环境下进行 hDPSCs 低氧预处理,培养 24 h 后取出。0.25% 胰蛋白酶消化,调整 H-hDPSCs 浓度为  $1.5 \times 10^6/\mu\text{L}$ ,置于冰上备用。

**1.3.3 侧脑室移植 hDPSCs** 新生大鼠 HIBD 模型复制 24 h 后吸入乙醚麻醉,沿颅骨矢状线剪开皮肤。在脑立体定位仪上,以前囟作为原点,将微量注射针调整至右侧侧脑室(坐标 AP: -0.5 mm, ML: -2 mm, DV: -2 mm),N-hDPSCs 组与 H-hDPSCs 组注入  $2 \mu\text{L}$  hDPSCs 悬液,速度为  $1 \mu\text{L}/\text{min}$ ,注射完成后留针 5 min。假手术组和 HIBD 组注射等量生理盐水。注射结束后缝合伤口,将苏醒的新生大鼠放回母鼠处。

**1.3.4 行为学实验** ①滑竿实验:模型复制后 3 周,取直径约 1 cm、长 50 cm 的木棍,竖直放置,表面缠绕纱布以增加摩擦阻力。将各组大鼠分别置于爬杆顶端,以大鼠向下运动为计时起点,至四肢全部落地计时结束,记录该时长为爬杆时间。每只大鼠连续测 3 次,每次间隔 2 min,取平均值。②Y 迷宫实验:滑竿实验之后,将大鼠放入由三臂(新异臂、起始臂及其他臂)构成的装置,每臂彼此间夹角均为 120° 的 Y 迷宫中。训练期:关闭新异臂,开放其他臂两臂,大鼠由起始臂放入,使其在两开放臂内自由探索 5 min,结束后放回原饲养笼,1 h 后进入测试期。测试期:同时开放三臂,大鼠由起始臂放入,使其在三臂内自由探索 5 min。摄像机置于 Y 迷宫装置正上方全程跟踪记录。实验结束后,记录测试期内大鼠在新异臂中停留时间。③Morris 水迷宫实验:模型复制后 4 周将大鼠放入水迷宫中进行实验。行可视化训练(1 d):将目标平台放在第 1 象限,置于水上,使大鼠入水适应环境;逃避潜伏期(4 d):使大鼠从不同方位入水,训练频次 4 次/d,记录 90 s 内大鼠从入水到找到平台所用时间,训练间隔 15~20 min;平台探索测试期(1 d):撤除水下平台,从目标象限对侧相同入水点将大鼠放入水中,记录大鼠 90 s 内目标象限逗留时间百分比、

穿越平台次数。

**1.3.5 标本制备** 各组大鼠在 hDPSCs 移植后 24 h、模型复制后 7 d、行为学实验后分别注射 10 g/L 戊巴比妥钠(50 mg/kg),腹腔麻醉,常规心脏灌注后取脑组织,4% 多聚甲醛固定 24 h,更换蔗糖溶液梯度脱水至脑组织沉底。用冷冻切片机对脱水脑组织行冠状切片,厚度 20  $\mu\text{m}$ 。

**1.3.6 免疫荧光染色** 采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)漂洗切片 5 min;5% 山羊血清封闭液(bovine serum albumin, BSA)+0.3% Triton X-100 破膜;BSA 封闭后弃掉,于 hDPSCs 移植后 24 h 的切片中孵育抗人核抗原 HuNu(1:100)。次日,充分洗涤后加入山羊抗兔荧光二抗(1:300)和山羊抗小鼠荧光二抗(1:300),37℃ 避光孵育 1 h,用 0.01 mol/L PBS 冲洗,用含 DAPI 的荧光封片剂封片。正置荧光显微镜下观察侧脑室内移植的 hDPSCs。

于模型复制后 7 d 的切片中分别加入含 PCNA(1:200)与 Nestin(1:200)的一抗混合液,次日,充分洗涤后加入山羊抗兔荧光二抗(1:300)和山羊抗小鼠荧光二抗(1:300),37℃ 环境避光孵育 1 h,用 0.01 mol/L PBS 冲洗,用含 DAPI 的荧光封片剂封片。正置荧光显微镜下观察侧脑室室管膜下区增殖的 NSCs,每张切片随机取 5 个视野,计算单位面积下阳性细胞数。

于行为学实验之后的切片中分别加入含 NeuN(1:400)、MBP(1:400)与 NF200(1:400)一抗混合液,4℃ 孵育过夜。次日,充分洗涤后加入山羊抗兔荧光二抗(1:300)和山羊抗小鼠荧光二抗(1:300),37℃ 避光孵育 1 h,0.01 mol/L PBS 冲洗,用含 DAPI 的荧光封片剂封片。正置荧光显微镜下观察新生大鼠脑组织皮层及海马 CA1 区 NeuN<sup>+</sup> 细胞数和胼胝体、纹状体区 MBP、NF200 蛋白的表达,每张切片随机取 5 个视野,计算单位面积下阳性细胞数或者平均荧光强度。

## 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 27.0 统计软件。计量资料以均数±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 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

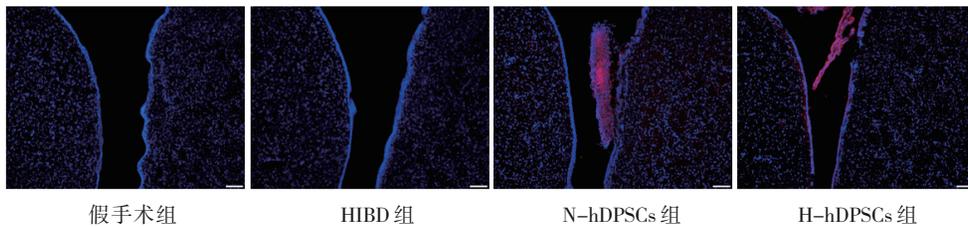
### 2.1 HuNu 免疫荧光染色结果

hDPSCs 移植 24 h 后,可在侧脑室内观察到移植的 hDPSCs。见图 1。

### 2.2 各组 H-hDPSC 移植后脑组织侧脑室室管膜下区 NSCs 增殖数比较

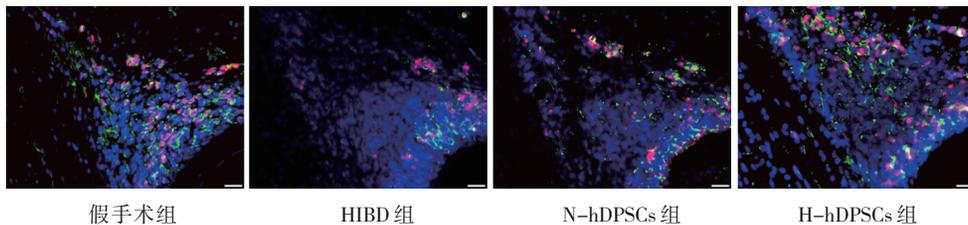
假手术组、HIBD 组、N-hDPSCs 组、H-hDPSCs 组

模型复制后 7 d 的侧脑室室管膜下区增殖 NSCs 数分别为  $(672.6 \pm 23.0)$ 、 $(255.3 \pm 23.5)$ 、 $(386.2 \pm 14.5)$ 、 $(479.5 \pm 26.5)$  个/ $\text{mm}^2$ ,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ( $F=308.642, P=0.000$ );进一步两两比较显示,HIBD 组较假手术组少 ( $P<0.05$ ),N-hDPSCs 组、H-hDPSCs 组较 HIBD 组多,但较假手术组少 ( $P<0.05$ ),N-hDPSCs 组较 H-hDPSCs 组少 ( $P<0.05$ )。见图 2。



HuNu 标记的 hDPSCs 细胞核染色为红色; DAPI 标记的所有细胞核染色为蓝色。

图 1 各组对侧脑室移植 hDPSCs 的荧光染色 ( $\times 100$ )



PCNA 标记的增殖细胞核染色为红色; Nestin 标记的神经丝蛋白细胞质染色为绿色; DAPI 标记的所有细胞核染色为蓝色。

图 2 各组脑组织侧脑室室管膜下区 NSCs 增殖染色结果 ( $\times 400$ )

### 2.3 各组滑竿实验结果

假手术组、HIBD 组、N-hDPSCs 组、H-hDPSCs 组模型复制后 3 周爬杆时间分别为  $(9.6 \pm 2.7)$ 、 $(25.0 \pm 4.6)$ 、 $(17.80 \pm 2.2)$ 、 $(13.60 \pm 1.1)$  s,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ( $F=25.259, P=0.000$ ),N-hDPSCs 组、H-hDPSCs 组较假手术组长 ( $P<0.05$ ),但较 HIBD 组短 ( $P<0.05$ ),H-hDPSCs 组较 N-hDPSCs 组短 ( $P<0.05$ )。

### 2.4 各组 Y 迷宫实验结果

假手术组、HIBD 组、N-hDPSCs 组、H-hDPSCs 组新异臂停留时间分别为  $(194.3 \pm 9.4)$ 、 $(47.8 \pm 10.6)$ 、 $(124.6 \pm 10.0)$ 、 $(155.8 \pm 7.9)$  s,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ( $F=213.536, P=0.000$ );HIBD 组较假手术组短 ( $P<0.05$ ),N-hDPSCs 组、H-hDPSCs 组较 HIBD 组长 ( $P<0.05$ ),但较假手术组短 ( $P<0.05$ ),而 N-hDPSCs 组较 H-hDPSCs 组短 ( $P<0.05$ )。

### 2.5 各组 Morris 水迷宫实验结果

各组大鼠第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 4 天逃避潜伏期比较,经重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点逃避潜伏期有差异 ( $F=662.825, P=0.000$ );②各组逃避潜伏期有差异 ( $F=109.286, P=0.000$ ),N-hDPSCs 组、H-hDPSCs 组大鼠较假手术组长 ( $P<0.05$ ),但均较 HIBD 组短 ( $P<0.05$ ),H-hDPSCs 组较 N-hDPSCs 组短 ( $P<0.05$ );③各组逃避潜伏期变化趋势有差异 ( $F=20.543, P=0.000$ )。见表 1。

各组在第 5 天的空间探索实验中目标象逗留时间百分比、穿越平台次数比较,经方差分析,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ),N-hDPSCs 组、H-hDPSCs 组大鼠穿台次数较假手术组少 ( $P<0.05$ ),但较 HIBD 组多 ( $P<0.05$ ),H-hDPSCs 组较 N-hDPSCs 组多 ( $P<0.05$ );N-hDPSCs 组、H-hDPSCs 组大鼠在目标象逗留时间百分比较假手术组小 ( $P<0.05$ ),但较 HIBD

表 1 各组不同时间点的逃避潜伏期比较  
( $n=5, s, \bar{x} \pm s$ )

组别	第1天	第2天	第3天	第4天
假手术组	61.7 ± 6.4	20.0 ± 2.7	11.3 ± 3.5	6.3 ± 1.2
HIBD组	69.0 ± 7.0	60.1 ± 1.3	47.4 ± 1.3	34.1 ± 3.1
N-hDPSCs组	62.2 ± 8.1	42.1 ± 3.3	34.6 ± 1.9	23.8 ± 3.4
H-hDPSCs组	68.3 ± 3.7	31.1 ± 3.0	24.1 ± 1.4	13.0 ± 1.3
F值	1.798	199.718	241.952	126.280
P值	0.188	0.000	0.000	0.000

组多 ( $P < 0.05$ ), H-hDPSCs 组较 N-hDPSCs 组多 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

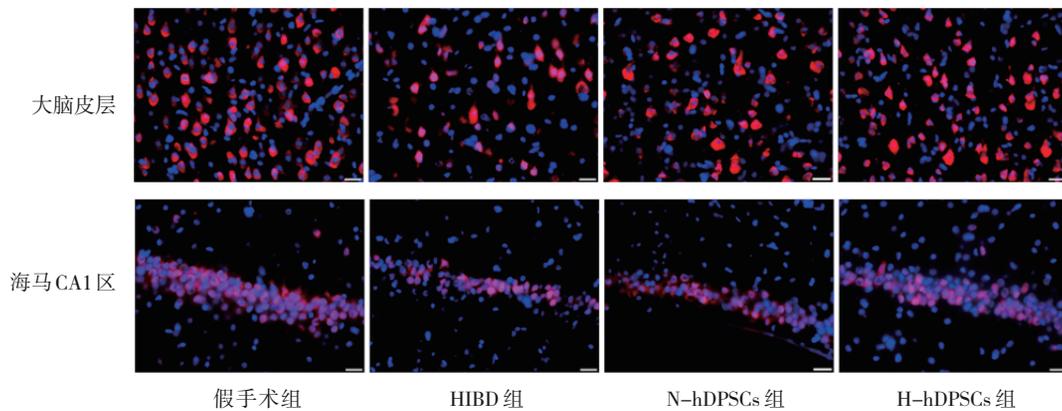
### 2.6 各组大脑皮层及海马 CA1 区 NeuN 阳性细胞数比较

各组大脑皮层及海马 CA1 区 NeuN 阳性细胞数

表 2 各组平台探索期穿越平台次数、目标象限逗留时间百分比比较 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	穿越平台次数	目标象限逗留时间百分比
假手术组	6.6 ± 1.5	41.4 ± 1.5
HIBD组	0.8 ± 0.8	22.2 ± 1.3
N-hDPSCs组	2.8 ± 0.8	28.0 ± 1.5
H-hDPSCs组	4.4 ± 1.1	32.5 ± 1.7
F值	24.147	145.233
P值	0.000	0.000

比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); HIBD 组较假手术组少 ( $P < 0.05$ ), N-hDPSCs 组、H-hDPSCs 组较 HIBD 组多 ( $P < 0.05$ ), 但较假手术组少 ( $P < 0.05$ ), N-hDPSCs 组较 H-hDPSCs 组少 ( $P < 0.05$ )。见图 3 和表 3。



NeuN 标记的神经元细胞核染色为红色; DAPI 标记的细胞核染色为蓝色。

图 3 各组大脑皮层和海马 CA1 区 NeuN 染色结果 ( $\times 400$ )

表 3 各组大脑皮层及海马 CA1 区 NeuN 阳性细胞数比较 ( $n=5, \text{个}/\text{mm}^2, \bar{x} \pm s$ )

组别	大脑皮层	海马 CA1 区
假手术组	1 094.3 ± 53.0	1 014.4 ± 33.9
HIBD组	399.6 ± 32.4	483.9 ± 30.0
N-hDPSCs组	639.3 ± 16.8	637.1 ± 27.9
H-hDPSCs组	903.4 ± 42.7	799.1 ± 32.4
F值	309.565	266.845
P值	0.000	0.000

### 2.7 各组纹状体、胼胝体 MBP、NF200 蛋白平均荧光强度比较

各组纹状体、胼胝体 MBP、NF200 蛋白平均荧光强度比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); HIBD 组

MBP、NF200 蛋白表达较假手术组稀疏, 颜色淡染, 结构紊乱, N-hDPSCs 组、H-hDPSCs 组高于 HIBD 组 ( $P < 0.05$ ), 但低于假手术组 ( $P < 0.05$ ), H-hDPSCs 组高于 N-hDPSCs 组 ( $P < 0.05$ )。见表 4 和图 4、5。

表 4 各组大鼠纹状体 MBP、NF200 蛋白平均荧光强度比较 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

组别	纹状体		胼胝体	
	MBP	NF200	MBP	NF200
假手术组	56.6 ± 2.2	59.8 ± 3.5	57.9 ± 5.1	61.9 ± 2.5
HIBD组	32.7 ± 3.9	34.0 ± 1.5	25.0 ± 1.9	29.7 ± 2.6
N-hDPSCs组	41.4 ± 1.4	40.3 ± 1.0	32.1 ± 2.2	36.6 ± 2.2
H-hDPSCs组	49.0 ± 2.0	47.8 ± 1.4	42.9 ± 3.1	45.7 ± 3.6
F值	81.292	143.775	93.037	123.771
P值	0.000	0.000	0.000	0.000

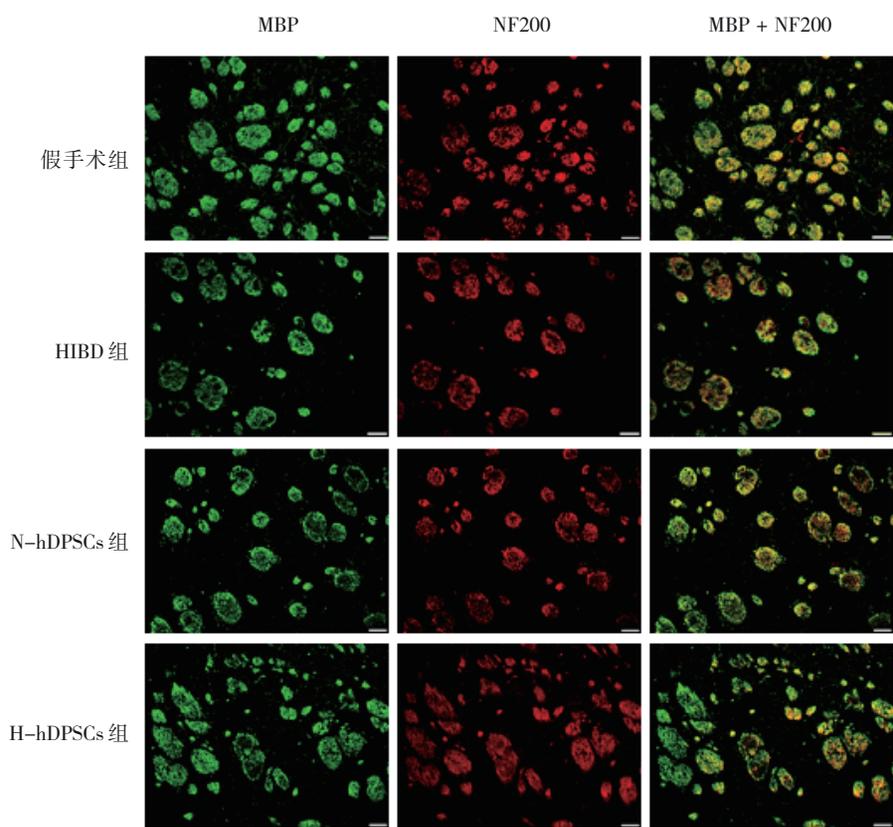


图 4 各组大鼠纹状体 MBP、NF200 免疫荧光染色结果 (× 200)

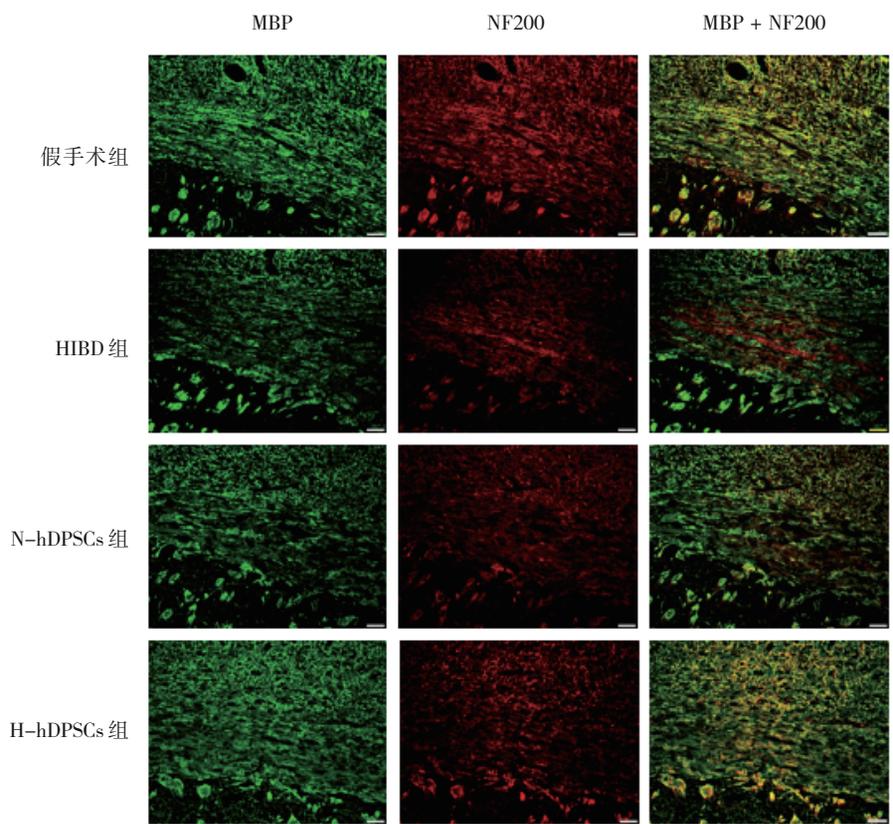


图 5 各组大鼠胼胝体 MBP、NF200 免疫荧光染色结果 (× 200)

### 3 讨论

HIE 是新生儿科的常见疾病,常伴有 WMD 并出现髓鞘损害和轴突病变等病理学改变<sup>[4]</sup>,导致发育障碍、认知及行为异常等神经系统后遗症。而新生儿处于发育期,具备较强的神经再生和修复潜能,给予干细胞移植治疗可以减轻 WMD<sup>[5]</sup>。

本研究采用脑立体定位仪进行新生大鼠侧脑室移植 hDPSCs,移植后 24 h,采用抗人核抗原 HuNu 免疫荧光染色检测侧脑室内移植的 hDPSCs,结果提示 hDPSCs 体内移植成功。hDPSCs 是来源于外胚层的 MSCs,与神经细胞同源,有较强的自我更新能力,且神经分化潜能更好。本研究采用 NeuN 免疫荧光染色观察各组大鼠脑组织皮层及海马 CA1 区神经元损伤修复情况,结果显示 HIBD 组中神经元数目减少,证明模型复制成功。而 hDPSCs 移植后神经元数目均较 HIBD 组改善,可见 hDPSCs 脑内移植后可以减轻 HIBD,与文献报道一致<sup>[8]</sup>。且 H-hDPSCs 组优于 N-hDPSCs 组,这可能是由于低氧条件更能促进 hDPSCs 增殖,提高细胞活性及迁移速率<sup>[11]</sup>,促进了 hDPSCs 体内移植后的存活及后续减轻新生大鼠 HIBD。

本研究通过滑竿实验、Y 迷宫、Morris 水迷宫实验评价各组大鼠 HIBD 后运动及空间记忆能力差别。发现与假手术组相比,HIBD 组大鼠出现严重的神经行为障碍,表现为爬杆时间延长,在 Y 迷宫新异臂的停留时间缩短,在水迷宫的逃避潜伏期增加,平台探索期穿台次数以及目标象限停留时间百分比减少,证明模型复制成功;而经 hDPSCs 干预后,N-hDPSCs 组及 H-hDPSCs 组爬杆时间较 HIBD 组缩短,逃避潜伏期缩短,穿台次数及目标象限停留时间百分比的增多,以及在 Y 迷宫中新异臂停留时间延长,说明 hDPSCs 移植可增强大鼠学习和记忆能力;且 H-hDPSCs 组在以上 3 种行为学实验中效果均优于 N-hDPSCs 组。HIBD 会导致脑白质发生脱髓鞘改变,破坏神经纤维的完整性,影响神经信号传导,导致机体产生行为认知障碍<sup>[2]</sup>,因此,推测 H-hDPSCs 更易促进 HIBD 新生大鼠行为学恢复的机制可能与 H-hDPSCs 更易减轻 HIBD 后脑白质区髓鞘和神经纤维束损伤有关<sup>[15]</sup>。

MBP 是髓鞘中的主要蛋白,NF200 通常用于标记神经元轴突,髓鞘蛋白包绕在 NF200 标记的神经元轴突周围,构成有髓神经纤维。为此,本研究采用

MBP/NF200 免疫荧光染色法观察 H-hDPSCs 移植对 HIBD 新生大鼠胼胝体区及纹状体区髓鞘及轴突损伤的影响,发现 N-hDPSCs 组及 H-hDPSCs 组在纹状体和胼胝体区的平均荧光强度表达虽低于假手术组,但高于 HIBD 组,且 H-hDPSCs 组表达量高于 N-hDPSCs 组,说明侧脑室内移植 hDPSCs 对 HIBD 所致新生大鼠脱髓鞘损伤具有改善作用,且 H-hDPSCs 组进一步证明低氧预处理后的 hDPSCs 移植能够减轻神经纤维束的损伤,有利于 HIBD 新生大鼠 WMD 的改善。

研究发现新生大鼠脑组织存在大量的内源性 NSCs,在外界刺激下可激活,作为成熟神经元及少突胶质细胞的来源,减轻脑损伤;然而,缺氧、缺血虽可刺激内源性 NSCs,但 HIBD 脑内的缺氧微环境不易促进新生 NSCs 的存活,如能促进内源性 NSCs 的增殖,将为 HIBD 的治疗带来新思路。研究证明 MSCs 可以通过神经保护、免疫调节和促血管生成活性来支持 NSCs 的分化和增殖<sup>[16]</sup>,推测低氧预处理 hDPSCs 移植有望促进 HIBD 新生大鼠内源性 NSCs 增殖,减轻 WMD。PCNA 是增殖细胞的标志物,Nestin 是神经丝蛋白的标志物,本研究利用 PCNA/Nestin 免疫荧光双重标记侧脑室室管膜下区内增殖的内源性 NSCs,发现模型复制后 7 d,HIBD 组内侧脑室室管膜下区仅可见少量内源性 NSCs 增殖,提示 HIBD 不利于新生大鼠内源性 NSCs 的增殖与存活。N-hDPSCs 组及 H-hDPSCs 组大鼠侧脑室室管膜下区增殖的内源性 NSCs 多于 HIBD 组,且 H-hDPSCs 组多于 N-hDPSCs 组,提示 hDPSCs 可促进 HIBD 大鼠内源性 NSCs 的增殖,而在低氧预处理条件下会更有利于 NSCs 的增殖并发挥神经修复作用,成为脑白质损伤修复的重要来源,但增殖的内源性 NSCs 是否分化为少突胶质细胞及相关机制尚有待进一步研究。

综上所述,5% 低氧预处理 hDPSCs 移植疗法可有效改善新生大鼠 HIBD 后运动及空间记忆能力,促进内源性 NSCs 的增殖,重构损伤区神经元,同时能够维持神经纤维的完整性,从而减轻 WMD。本实验为低氧预处理 hDPSCs 治疗 HIBD 新生大鼠 WMD 的临床应用提供了一定的理论依据及实验支撑。

#### 参 考 文 献 :

- [1] BERTAGNONI G, LUPI A, FEDELI M, et al. <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron-emitted tomography for predicting

- neurological outcome in hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Brain Inj*, 2021, 35(10): 1292-1300.
- [2] JANOWSKA J, SYPECKA J. Therapeutic strategies for leukodystrophic disorders resulting from perinatal asphyxia: focus on myelinating oligodendrocytes[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(5): 4388-4402.
- [3] BEERAKA N M, VIKRAM P R H, GREESHMA M V, et al. Recent investigations on neurotransmitters' role in acute white matter injury of perinatal glia and pharmacotherapies-glia dynamics in stem cell therapy[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(4): 2009-2026.
- [4] 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.
- [5] VAES J E G, VINK M A, de THEIJE C G M, et al. The potential of stem cell therapy to repair white matter injury in preterm infants: lessons learned from experimental models[J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 540. [6] LUZURIAGA J, POLO Y, PASTOR-ALONSO O, et al. Advances and perspectives in dental pulp stem cell based neuroregeneration therapies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3546.
- [7] 程晨, 彭杉, 杨桐, 等. 基于牙髓干细胞的神经系统疾病治疗新进展[J]. *实用口腔医学杂志*, 2021, 37(6): 853-858.
- [8] CHIU H Y, LIN C H, HSU C Y, et al. IGF1R+ dental pulp stem cells enhanced neuroplasticity in Hypoxia-Ischemia model[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(10): 8225-8241.
- [9] ZENG J K, CHEN M, YANG Y Q, et al. A novel hypoxic lncRNA, HRL-SC, promotes the proliferation and migration of human dental pulp stem cells through the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 286.
- [10] ANTEBI B, RODRIGUEZ L A 2nd, WALKER K P 3, et al. Short-term physiological hypoxia potentiates the therapeutic function of mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 265.
- [11] BHANDI S, AL KAHTANI A, MASHYAKHY M, et al. Modulation of the dental pulp stem cell secretory profile by hypoxia induction using cobalt chloride[J]. *J Pers Med*, 2021, 11(4): 247.
- [12] 张浩, 高淑君, 武沐洋, 等. 低氧浓度促进人牙髓干细胞增殖及神经分化[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2022, 31(2): 133-138.
- [13] RICE J E 3rd, VANNUCCI R C, BRIERLEY J B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131-141.
- [14] 马瑞, 马瑜徽, 张新月, 等. 不同褪黑素治疗方案对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑白质损伤的影响[J]. *中国当代儿科杂志*, 2021, 23(3): 300-305.
- [15] LI J G, YAWNO T, SUTHERLAND A E, et al. Preterm umbilical cord blood derived mesenchymal stem/stromal cells protect preterm white matter brain development against hypoxia-ischemia[J]. *Exp Neurol*, 2018, 308: 120-131.
- [16] KAMINSKA A, RADOSZKIEWICZ K, RYBKOWSKA P, et al. Interaction of neural stem cells (NSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) as a promising approach in brain study and nerve regeneration[J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1464.

(李科 编辑)

本文引用格式: 武沐洋, 王晓莉, 高淑君, 等. 低氧预处理人牙髓干细胞移植对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑白质损伤的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(12): 24-32.

Cite this article as: WU M Y, WANG X L, GAO S J, et al. Effects of hypoxia-preconditioned human dental pulp stem cell transplantation on cerebral white matter injury in neonatal rat models of hypoxic-ischemic brain damage[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(12): 24-32.