

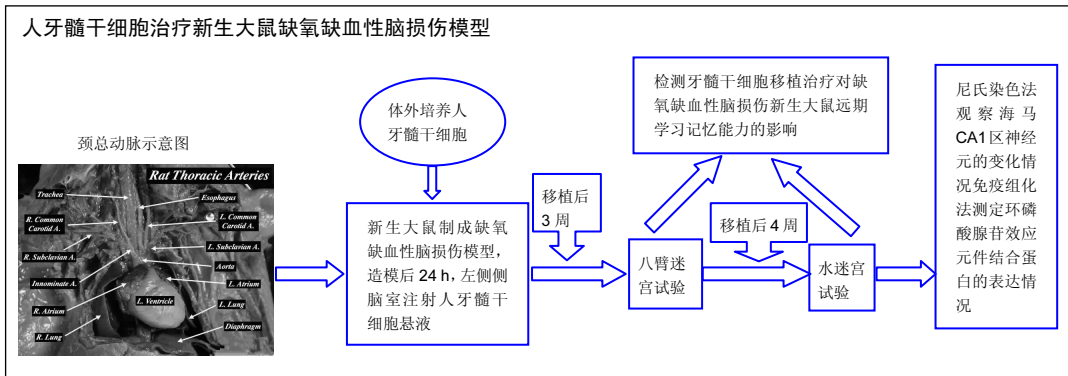
牙髓干细胞移植治疗缺氧缺血性脑损伤新生大鼠远期行为学及环磷酸腺苷反应元件结合蛋白的变化

王爱¹, 牟青杰², 王晓莉³, 闫少珍³, 曲鹏宇¹, 王海宇³, 胡温庭¹(潍坊医学院, ¹口腔医学院, ²临床医学院血液科, ³医学影像学系, 山东省潍坊市 261053)

引用本文: 王爱, 牟青杰, 王晓莉, 闫少珍, 曲鹏宇, 王海宇, 胡温庭. 牙髓干细胞移植治疗缺氧缺血性脑损伤新生大鼠远期行为学及环磷酸腺苷反应元件结合蛋白的变化[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(5):701-706.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2017.05.008 ORCID: 0000-0002-9737-9082(王爱)

文章快速阅读:



王爱, 女, 1988 年生, 山东省海阳市人, 汉族, 潍坊医学院在读硕士, 主要从事口腔颌面外科学研究。

通讯作者: 王晓莉, 博士, 教授, 潍坊医学院医学影像学系, 山东省潍坊市 261053

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2017)05-00701-06

稿件接受: 2016-12-22

文题释义:

环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB): 是调节基因转录的一种蛋白质, cAMP/PKA-CREB 信号转导通路能促进神经细胞的存活、再生、分化等, 学习记忆功能密切相关。该通路是长时程记忆形成的中心分子途径, CREB 起关键调控作用, 是影响记忆存储的关键蛋白, 与长时程增强密切相关。

人牙髓干细胞: 牙髓干细胞是存在于髓腔中的软组织, 可自我更新, 具有多向分化的潜能, 研究表明牙髓干细胞在特定条件下可以分化为神经样细胞和神经胶质细胞。人牙髓干细胞来源于外胚层, 与神经细胞具有同源性, 且取材方便, 免疫排斥小, 自体移植不存在伦理学问题等优点, 因此, 在再生医学和组织工程研究中具有广阔的研究前景。

摘要

背景: 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)是影响记忆存储的关键蛋白, 与长期记忆密切相关, 研究牙髓干细胞侧脑室移植远期行为学及 CREB 的变化机制可为缺氧缺血性脑损伤的治疗提供新思路。

目的: 观察人牙髓干细胞移植对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠远期行为学以及 CREB 表达的影响, 为缺氧缺血性脑损伤的治疗提供科学的理论依据。

方法: 36 只健康 7 d 龄 SD 大鼠随机等分为正常组、缺氧缺血性脑损伤组和牙髓干细胞组。采用经典的 Rice 法建立新生大鼠缺氧缺血性脑损伤模型, 造模后 24 h 后, 牙髓干细胞组经侧脑室注入 2 μ L 人牙髓干细胞(浓度为 $1.5 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$), 正常组和缺氧缺血性脑损伤组分别注射等量生理盐水。

结果与结论: 牙髓干细胞组大鼠平均觅水时间、平均逃避潜伏期及平均逃避距离亦显著短于缺氧缺血性脑损伤组($P < 0.01$), 但其平均觅水时间、逃避潜伏期及距离均长于正常组($P < 0.01$); 尼氏染色结果示人牙髓干细胞组海马 CA1 区细胞排列较规则, 细胞数量较多, 显著多于缺氧缺血性脑损伤组, 但仍少于正常组($P < 0.05$); 免疫组织化学染色结果示人牙髓干细胞组 CREB 阳性细胞数亦显著多于缺氧缺血性脑损伤组, 但仍显著少于正常组($P < 0.01$)。提示人牙髓干细胞移植可通过促进海马 CA1 区 CREB 的表达, 改善缺氧缺血性脑损伤新生大鼠远期学习记忆能力, 从而修复新生大鼠缺氧缺血性脑损伤。

关键词:

干细胞; 移植; 牙髓干细胞; 缺氧缺血性脑损伤; 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白; 八臂迷宫; Morris 水迷宫; 尼氏染色; 免疫组织化学染色; 新生大鼠; 国家自然科学基金

主题词:

牙髓; 环 AMP 反应性元件结合蛋白; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金项目(81000268); 山东省自然科学基金项目(ZR2014JL049); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2014WS0473); 山东自然科学基金项目(ZR2014HQ077)

Wang Ai, Studying for master's degree, Institute of Stomatology, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China

Corresponding author: Wang Xiao-li, M.D., Professor, Department of Medical Imaging, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China

Effects of dental pulp stem cell transplantation on the long-term behavior and cAMP response element binding protein in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage

Wang Ai¹, Mu Qing-jie², Wang Xiao-li³, Yan Shao-zhen³, Qu Peng-yu¹, Wang Hai-yu³, Hu Wen-ting¹ (¹Institute of Stomatology, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China; ²Department of Hematology, Clinical Medical School, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China; ³Department of Medical Imaging, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: cAMP response element binding protein (CREB) is a key protein of memory, which is closely related to long-term memory. It will provide a new way for the treatment of hypoxic ischemic brain damage (HIBD) to study the effects of dental pulp stem cells transplantation on the long-term behavior and CREB protein *via* the lateral ventricle in neonatal HIBD rats.

OBJECTIVE: To observe the changes in long-term behavior and CREB protein expression in neonatal HIBD rats after human dental pulp stem cell transplantation, thereby providing scientific evidence for clinical treatment of neonatal HIBD.

METHODS: Thirty-six healthy 7-day-old Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal, HIBD and cell transplantation group. The hypoxic ischemic brain damage models were established in the brain damage and cell transplantation groups. Twenty-four hours after HIBD, human dental pulp stem cells were injected into the left lateral cerebral ventricle of rats in the cell transplantation group, totally 3×10^6 living cells. Equal volume of normal saline was injected into the left lateral cerebral ventricle of rats in the normal control and HIBD groups.

RESULTS AND CONCLUSION: The average time to seek water, the average escape latency and escape distance of the human dental pulp stem cells group were significantly shorter than those of hypoxic ischemic brain injury group ($P < 0.01$), but longer than those in the normal group ($P < 0.01$). Nissl staining showed that the cells in the hippocampal CA1 region in human dental pulp stem cells group were more regular, the number of cells was significantly higher than that of hypoxic ischemic brain injury group, but still significantly less than that in the normal group ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining results showed that the number of CREB positive cells in human dental pulp stem cells group was significantly higher than those in HIBD group, but still significantly less than those in the normal group ($P < 0.01$). It is suggested that human dental pulp stem cells transplantation could promote the expression of CREB protein in the hippocampal CA1 region, to improve the long-term learning and memory ability of hypoxic ischemic neonatal rats, and thus repair HIBD.

Subject headings: Dental Pulp; Cyclic AMP Response Element-Binding Protein; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81000268; the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. ZR2014JL049, ZR2014HQ077; the Medicine and Health Science Development Plan of Shandong Province, No. 2014WS0473

Cite this article: Wang A, Mu QJ, Wang XL, Yan SZ, Qu PY, Wang HY, Hu WT. Effects of dental pulp stem cell transplantation on the long-term behavior and cAMP response element binding protein in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(5):701-706.

0 引言 Introduction

新生儿缺氧缺血性脑损伤可导致脑瘫、癫痫、智力低下等严重后遗症, 严重威胁着新生儿的生命^[1], 但目前尚无行之有效治疗方案, 因此, 寻找其新的治疗方案具有重要意义。近年来干细胞工程的兴起, 为缺氧缺血性脑损伤治疗提供了新方案^[2-3]。人牙髓干细胞来源于外胚层, 与神经细胞具有同源性, 且取材方便, 免疫排斥小, 自体移植不存在伦理学问题等优点, 因此, 在神经系统疾病的治疗方面具有很广阔的应用前景。研究发现人牙髓干细胞脑内移植后可以存活, 并分化为神经细胞, 从而减轻新生大鼠缺氧缺血性脑损伤^[4-9], 但其机制尚不清楚, 弄清其机制具有重要意义。环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)是一种调节基因转录的蛋白质, 在大脑神经细胞中活动时, 能够帮助激活一些基因, 这些基因与长期记忆的形成有关^[10-12], 实验拟探讨人牙髓干细胞移植对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的影响及其相关机制, 以期为人牙髓干细胞临床上治疗缺氧缺血性脑损伤提供科学的理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体内观察。

1.2 时间及地点 实验于2014年9月至2015年10月在潍坊医学院分子影像学研究中心完成。

1.3 材料

动物: 清洁级SD新生大鼠36只, 鼠龄7 d, 由青岛市实验动物和动物实验中心提供并授权使用, 动物许可证号: SCXK(鲁)20140001。

组织: 来源于10名18-25岁健康志愿者, 取正畸矫正拔出的第三磨牙, 实验方案经潍坊医学院医学伦理委员会批准, 志愿者已知情并同意。

主要试剂和仪器: 兔抗CREB购自CST公司; 二抗试剂盒(PV-9001)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 正置、倒置光学显微镜均购自日本OLYMPUS公司; 常压氧仓购自武汉七〇一研究所; 大鼠立体定位仪购自深圳瑞奥德公司; 八臂迷宫、水迷宫购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 动物分组 采用完全随机法将新生大鼠分为正常组、缺氧缺血性脑损伤组和人牙髓干细胞组, 各12只。

1.4.2 缺氧缺血性脑损伤模型的制作 采用 Rice-Vannucci方法^[13]复制缺氧缺血性脑损伤模型。大鼠经乙醚吸入麻醉, 颈部正中切开, 分离并双线结扎左侧颈总动脉, 并在结扎中间剪断, 缝合皮肤。然后, 放入含有(8.0±0.01)%低氧仓内缺氧2 h, 舱内温度控制在(36.0±1.0) °C, 相对湿度(70.0±5.0)%。实验结束后, 将大鼠放回母鼠身边喂养。正常组不做任何处理。

1.4.3 人牙髓干细胞的采集、培养、制成细胞悬液 按 Fang等^[6, 14-15]的方法, 取健康青年第三磨牙, 牙髓组织中加入10倍量的组织消化液(I型胶原酶和DisPase II), 37 °C孵育箱消化40 min后, 5 000 r/min离心3 min, 弃上清, 添加培养液(体积分数20%胎牛血清, 体积分数80%α-MEM), 吸入50 mL培养瓶中, 置于CO₂培养箱中培养。当细胞生长至80%融合时, 用0.25%胰酶消化40 min, 5 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入无菌的生理盐水制成细胞悬液, 4%锥虫蓝染色计数, 活细胞数>95%, 调整活细胞为1.5×10⁶ μL⁻¹, 置冰上备用。

1.4.4 人牙髓干细胞侧脑室移植 造模后24 h, 人牙髓干细胞组新生大鼠固定于立体定位仪上, 在左侧侧脑室(坐标AP: -0.5 mm, ML: -2 mm, DV: -2 mm)缓慢注入2 μL人牙髓干细胞悬液, 每只大鼠共注入3×10⁶个活细胞, 缓慢注入, 留针5 min, 拔针缝合头皮, 复温苏醒后回母鼠身边饲养^[16-17]。正常组与缺氧缺血性脑损伤组相同部位注射2 μL生理盐水。

1.4.5 空间学习记忆能力检测

八臂迷宫试验: 移植后3周, 将SD大鼠放入放射性八臂迷宫(铁制, 中央为一直径40 cm的圆, 共有8个呈放射性对称分布的臂, 每条臂长50 cm, 宽10 cm, 高20 cm)中^[18], 动物在测试前禁水48 h, 仅在每日傍晚饮水30 min。测试分为预备和测试两个阶段, 预备阶段在每个臂末端的容器内都放50 μL水, 让大鼠在迷宫中自由觅水2 d。测试阶段在3个臂内加水, 其相邻角度分别为135°、90°和135°, 每天测试5次, 每次间隔1 min, 连续测试3 d, 每次测试开始时将大鼠放在迷宫中央面朝固定的第3臂, 检测时间为10 min, 10 min内3个臂内的水未被全找到则时间记为10 min, 3个臂内的水都被找到或超过10 min则实验终止。记录大鼠找到3个有水臂所花的时间。

Morris水迷宫试验: 移植后4周行Morris水迷宫测试^[19]。实验房间安静, 采用直径150 cm的圆形水桶, 水深22 cm左右, 在水平线以下2 cm处放置一个直径为8 cm的圆台, 水温保持在23 °C左右, 平台、水池壁均染黑以隐蔽平台。水池周围贴有固定的参照线索供大鼠定位平台。数据收集软件将水池分为4个象限, 平台位于一个固定象限的中心, 直径8 cm。历时6 d, 实验前1 d不放置平台, 让大鼠自由

游泳1 min。正式实验时将平台固定在一个象限, 位于水面下1 cm。每天每只大鼠测试4次, 每次间隔1 min, 连续测试5 d, 每次测试开始时让大鼠在平台对面的象限入水, 检测时间为60 s, 若大鼠60 s内未找到平台则潜伏期记为60 s, 大鼠爬上平台或实验时间超过60 s则实验终止。记录大鼠的逃避潜伏期及逃避距离。

1.4.6 标本的收集、石蜡包埋及切片制作 行为学测试结束后, 处死各组大鼠, 40 g/L多聚甲醛心脏灌注后断头取脑, 后固定24 h, 常规石蜡包埋, 于前凶后-3.5至-4.0 mm处行冠状位非连续切片(海马平面, 每隔5片取1片), 制成4 μm厚的石蜡切片, 分别行尼氏染色和免疫组化染色。

1.4.7 尼氏染色 取石蜡切片, 烤片2 h, 依次过二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水, 将切片放入0.1%甲苯胺蓝内, 60 °C温染1 min, 快速蒸馏水冲洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。正置相差显微镜以及照相系统下观察, 每张切片取四五个视野, 采用计算机图像分析系统软件(Cellsens Dimension 1.16)(日本Olympus公司)计数损伤侧海马区神经元数量。

1.4.8 免疫组织化学染色 取石蜡切片, 脱蜡至水, 水浴热修复抗原, 0.01 mol/L PBS洗涤后, 体积分数3%过氧化氢37 °C温箱孵育1 h, 充分冲洗后山羊血清封闭1 h, 弃掉封闭液, 加入兔抗CREB(1:400), 4 °C冰箱过夜, 37 °C温箱孵育30 min, 充分冲洗, 依次加入二抗试剂盒中试剂, 37 °C温箱孵育各30 min, 充分冲洗后DAB显色, 盐酸乙醇分化, 中性树胶封固。正置相差显微镜以及照相系统下观察, 每张切片取4-5个视野, 采用计算机图像分析系统软件(Cellsens Dimension 1.16)(日本Olympus公司)计数损伤侧海马区阳性神经元数量。

1.5 主要观察指标 八臂迷宫和水迷宫行为学试验测定牙髓干细胞移植治疗对大鼠远期学习记忆能力、海马CA1区神经元及CREB表达水平的影响。

1.6 统计学分析 采用SPSS 17.0软件对数据进行统计学分析, 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用SNK-q检验。P < 0.05为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人牙髓干细胞的形态 培养的人牙髓干细胞细胞呈梭形, 排列整齐(图1)。

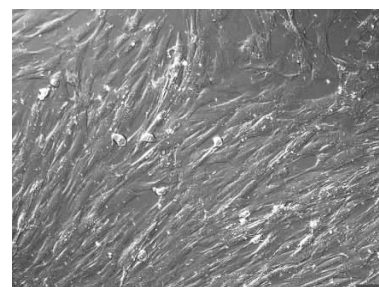


图1 人牙髓干细胞的形态(×200)

Figure 1 Morphology of human dental pulp stem cells (×200)

图注: 人牙髓干细胞细胞呈梭形, 排列整齐。

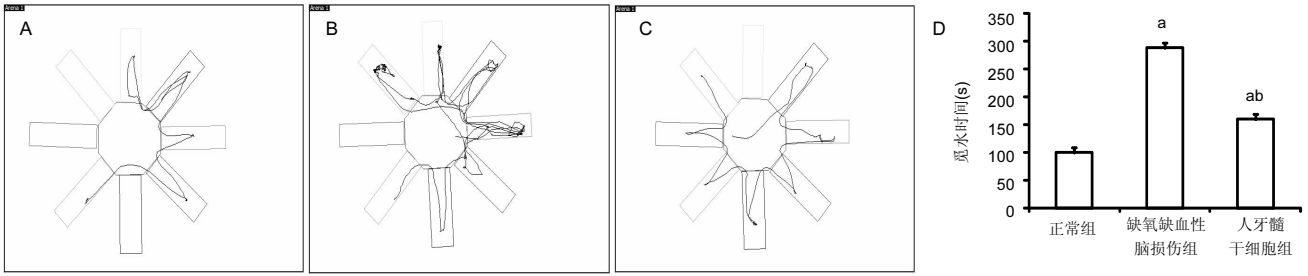


图2 牙髓干细胞移植对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠八臂迷宫实验结果的影响

Figure 2 Eight-arm maze test results in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage undergoing dental pulp stem cell transplantation
 图注: 图中 A-C 为经过训练后大鼠找到 3 个有水臂的线路图, 其中 A 为正常组, B 为缺氧缺血性脑损伤组, C 为人牙髓干细胞组; D 为各组大鼠平均觅水时间的比较的柱状图。与正常组相比, ^a $P < 0.01$; 与缺氧缺血性脑损伤组相比, ^b $P < 0.01$ 。

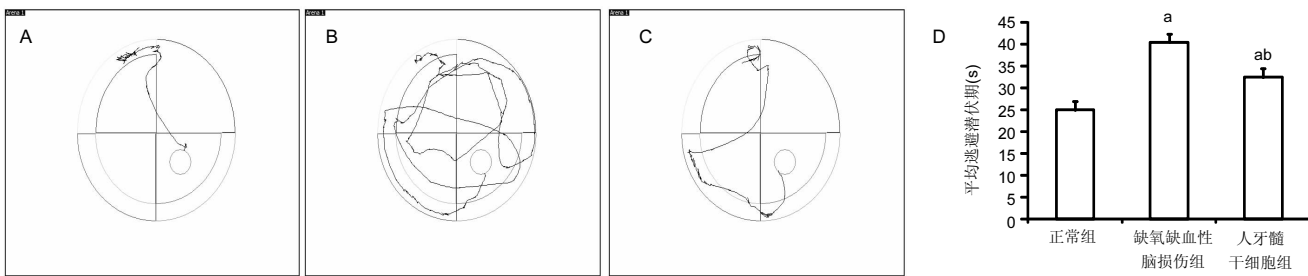


图3 牙髓干细胞移植对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠 Morris 水迷宫实验结果的影响

Figure 3 Morris water maze test results in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage undergoing dental pulp stem cell transplantation

图注: 图中 A-C 为经过训练后大鼠找到平台的线路图, 其中 A 为正常组, B 为缺氧缺血性脑损伤组, C 为人牙髓干细胞组; D 为各组大鼠平均逃避潜伏期的比较的柱状图。与正常组相比, ^a $P < 0.01$; 与缺氧缺血性脑损伤组相比, ^b $P < 0.01$ 。

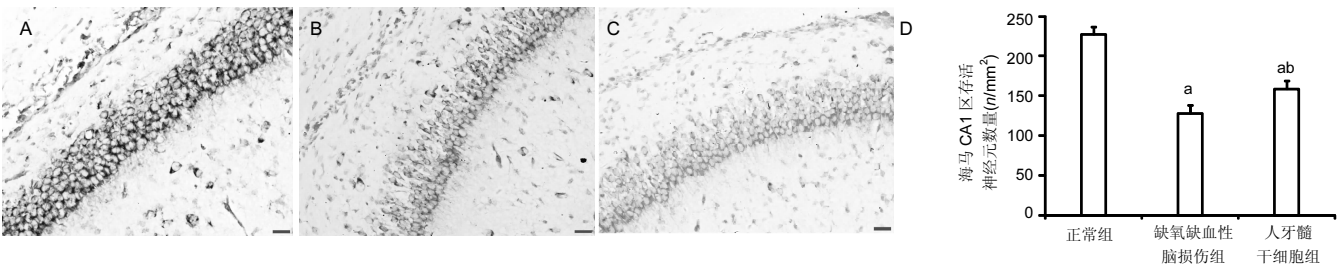


图4 人牙髓干细胞对缺氧缺血性脑损伤模型大鼠海马 CA1 区细胞凋亡的影响

Figure 4 Effects of human dental pulp stem cells on cell apoptosis in the hippocampal CA1 area in rats with hypoxic-ischemic brain damage
 图注: 图中 A-C 为海马 CA1 区的细胞 (尼氏染色, $\times 400$), 其中 A 为正常组, 可见大量神经元细胞, 细胞排列整齐, 形态规则; B 为缺氧缺血性脑损伤组, 可见极少量神经元细胞, 细胞排列不整齐, 形态不规则; C 为人牙髓干细胞组, 可见少量神经元细胞, 细胞排列较整齐, 形态较规则; D 为各组海马 CA1 区存活细胞数量的比较的柱状图。与正常组相比, ^a $P < 0.05$; 与缺氧缺血性脑损伤组相比, ^b $P < 0.05$ 。

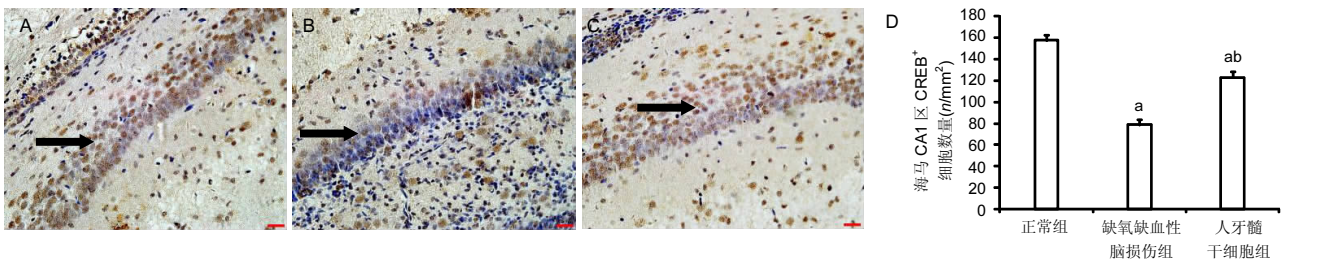


图5 人牙髓干细胞对缺氧缺血性脑损伤模型大鼠海马 CA1 区 CREB 表达的影响

Figure 5 Effects of human dental pulp stem cells on the expression of CREB in the hippocampal CA1 area of rats with hypoxic-ischemic brain damage

图注: 图中 A-C 为海马 CA1 区 CREB 表达 (免疫组织化学染色, $\times 400$), 其中 A 为正常组, 可见大量的 CREB⁺ 细胞表达; B 为缺氧缺血性脑损伤组, 可见极少量的 CREB⁺ 细胞表达; C 为人牙髓干细胞组, 可见少量 CREB⁺ 细胞表达, 黑色箭头表示 CREB⁺ 细胞表达; D 图为各组海马 CA1 区 CREB⁺ 细胞数量的比较的柱状图。与正常组相比, ^a $P < 0.01$; 与缺氧缺血性脑损伤组相比, ^b $P < 0.01$ 。

2.2 实验动物数量分析 36只新生大鼠均进入结果分析,中途无脱落。

2.3 空间学习记忆能力

2.3.1 八臂迷宫觅水检测结果 缺氧缺血性脑损伤组大鼠平均觅水时间显著长于正常组($Q=189.21, P < 0.01$)。人牙髓干细胞组平均觅水时间较缺氧缺血性脑损伤组显著减($Q=129.17, P < 0.01$),仍高于正常组($Q=60.04, P < 0.01$)。经过一段时间训练后,缺氧缺血性脑损伤组大鼠找到3个有水臂的路线要比正常组的路线要复杂,而人牙髓干细胞组大鼠的线路图较缺氧缺血性脑损伤组大鼠简化,但仍较正常组大鼠复杂(图2)。

2.3.2 Morris水迷宫检测结果 缺氧缺血性脑损伤组大鼠平均逃避潜伏期显著长于正常组($Q=15.51, P < 0.01$)。人牙髓干细胞组大鼠平均逃避潜伏期较缺氧缺血性脑损伤组显著缩短($Q=8.04, P < 0.01$),仍高于正常组($Q=7.48, P < 0.01$)。经过一段时间训练后,缺氧缺血性脑损伤组大鼠找到平台的路线要比正常组的复杂,而人牙髓干细胞组大鼠的线路图较缺氧缺血性脑损伤组大鼠简化,但仍较正常组大鼠复杂(图3)。

2.4 海马CA1区的细胞凋亡 正常组大鼠脑组织海马区神经元细胞排列整齐,形态规则,尼氏体呈大颗粒,且数量较多;缺氧缺血性脑损伤组大鼠脑组织损伤侧海马区神经元细胞排列不整齐,形态不规则,神经元数量显著少于正常组($Q=99, P < 0.05$);人牙髓干细胞组大鼠脑组织损伤侧海马区神经元细胞排列较整齐,神经元数量显著多于缺氧缺血性脑损伤组($Q=30.5, P < 0.05$),但仍显著少于正常组($Q=68.5, P < 0.05$;图4)。

2.5 海马CA1区CREB表达 免疫组织化学染色结果显示,正常组见大量CREB⁺细胞表达,与正常组相比,缺氧缺血性脑损伤组与人牙髓干细胞组CREB⁺细胞数量减少($Q=79.17, P < 0.01$; $Q=34.75, P < 0.01$),人牙髓干细胞组CREB⁺细胞数显著多于缺氧缺血性脑损伤组($Q=44.42, P < 0.01$;图5)。

3 讨论 Discussion

人牙髓干细胞是来源于神经嵴的细胞,具有更好的神经特性,更容易向神经方向分化^[20-21],具有来源丰富、无伦理争议学等优点,且具有更高的克隆形成能力^[22-23]。Woods等^[24]研究发现人牙髓干细胞可以分化成神经元和神经胶质细胞,对于治疗人脑损伤方面有特殊疗效。研究表明人牙髓干细胞可以分化为神经元样细胞和神经胶质细胞,并表达巢蛋白,胶质纤维酸性蛋白等神经细胞特异性标志^[5]。作者在此基础上进行深入探讨人牙髓干细胞移植对缺氧缺血性脑损伤大鼠远期行为学及组织学的影响及其相关机制。

实验通过八臂迷宫和Morris水迷宫来检测大鼠的空间学习记忆能力,发现人牙髓干细胞组与缺氧缺血性脑损伤组相比,新生大鼠觅水时间及逃避潜伏期显著缩短,且觅水及逃

避线路图有所简化,说明人牙髓干细胞移植可以提高缺氧缺血性脑损伤新生大鼠的学习记忆能力,这与既往研究结果一致^[6];但人牙髓干细胞组大鼠觅水时间及逃避潜伏期仍显著长于正常组,觅水及逃避线路图仍不如正常组简化,这表明人牙髓干细胞移植到侧脑室后,人牙髓干细胞组学习记忆能力较缺氧缺血性脑损伤组显著改善,但仍较正常组大鼠复杂,证明人牙髓干细胞移植虽然可以改善缺氧缺血性脑损伤新生大鼠的远期记忆,其疗效有待于进一步加强。尼氏染色结果发现人牙髓干细胞侧脑室移植后,海马CA1区尼氏小体细胞数明显增加,提示人牙髓干细胞可以分化为神经元,进而修复损伤的脑组织,这与Woods等^[24]研究结果一致。作者发现,人牙髓干细胞组神经元数量多于缺氧缺血性脑损伤组,但仍少于正常组,提示人牙髓干细胞侧脑室移植可以修复损伤的脑组织,但其疗效有待进一步提高。

CREB是作为记忆功能蛋白在1986年被Montminy等发现并命名的,能够调节多种基因的转录,研究表明CREB对长期记忆的形成有一定的影响^[10-12]。实验结果发现人牙髓干细胞移植后,CREB阳性细胞数显著多于缺氧缺血性脑损伤组,但仍显著少于正常组,说明人牙髓干细胞移植可以改善远期学习能力,但仍不能完全恢复正常状态,这与行为学结果一致,提示人牙髓干细胞可改善缺氧缺血性脑损伤大鼠的学习记忆能力,其机制可能与提高缺氧缺血性脑损伤大鼠脑组织CREB蛋白的表达有关。由于cAMP/PKA-CREB信号转导通路能促进神经细胞的存活、再生、分化等,与学习记忆功能密切相关^[25-27],CREB为影响记忆存储的关键蛋白,与长时程增强密切相关^[28]。研究表明海马区长时程记忆增强与CREB作用密切相关,其引发的基因表达,可增强海马区长时程记忆形成。CREB活性降低可抑制长期记忆的形成,其数量的增加或活性的增强可促进长期记忆的形成^[29-30]。作者发现人牙髓干细胞组新生大鼠觅水及逃亡时间均较缺氧缺血性脑损伤组显著缩短,且觅水及逃亡路线均明显简化,但仍较正常组复杂,而人牙髓干细胞组CREB蛋白表达显著高于缺氧缺血性脑损伤组,但仍低于正常组,提示人牙髓干细胞移植可通过促进CREB蛋白的表达,增强新生大鼠远期学习记忆能力,但仍有待于进一步加强。然而,人牙髓干细胞在培养及临床应用还存在许多有待解决的问题,首先,人牙髓干细胞扩增难度大、周期长,在分化的哪一阶段最适合移植的问题;其次,移植到神经组织内的人牙髓干细胞是否能真正转化为神经干细胞以及能和宿主神经元形成功能性突触连接,还有待进一步研究。

总之,人牙髓干细胞移植可促进CREB蛋白的表达,改善缺氧缺血性脑损伤新生大鼠远期学习记忆能力,从而修复新生大鼠缺氧缺血性脑损伤。

作者贡献: 实验设计为王晓莉、王爱,实验实施为王爱、牟青杰、王晓莉,实验评估为闫少珍、曲鹏宇,资料收集为王海宇、胡温庭。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经潍坊医学院医学伦理委员会批准, 批准号为2014206, 实验方案志愿者已知情并同意。实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Li Y, Gonzalez P, Zhang L. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: mechanisms and possible interventions. *Prog Neurobiol.* 2012;98(2):145-165.
- [2] Wang XL, Zhao YS, Hu MY, et al. Umbilical cord blood cells regulate endogenous neural stem cell proliferation via hedgehog signaling in hypoxic ischemic neonatal rats. *Brain Res.* 2013;1518:26-35.
- [3] 马子洋, 郭晓霞. 骨髓干细胞在再生医学中的应用研究与进展[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(19):2872-2878.
- [4] Matsubara K, Matsushita Y, Sakai K, et al. Secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 promote recovery after rat spinal cord injury by altering macrophage polarity. *J Neurosci.* 2015;35(6):2452-2464.
- [5] 贺慧霞, 金岩, 史俊南, 等. 骨髓干细胞向神经细胞方向的诱导分化实验[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(4):331-334.
- [6] Fang CZ, Yang YJ, Wang QH, et al. Intraventricular injection of human dental pulp stem cells improves hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *PLoS One.* 2013;8(6):e66748.
- [7] Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest.* 2012;122(1): 80-90.
- [8] Apel C, Forlenza OV, de Paula VJ, et al. The neuroprotective effect of dental pulp cells in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna).* 2009;116(1): 71-78.
- [9] Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):435-440.
- [10] Schmid RS, Graff RD, Schaller MD, et al. NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J Neurobiol.* 1999;38(4):542-558.
- [11] White DM, Walker S, Brennehan DE, et al. CREB contributes to the increased neurite outgrowth of sensory neurons induced by vasoactive intestinal polypeptide and activity-dependent neurotrophic factor. *Brain Res.* 2000; 868(1):31-38.
- [12] Tomás Pereira I, Coletta CE, Perez EV, et al. CREB-binding protein levels in the rat hippocampus fail to predict chronological or cognitive aging. *Neurobiol Aging.* 2013;34(3):832-844.
- [13] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 1981;9(2):131-141.
- [14] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13625-13630.
- [15] Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res.* 2013;353(1):65-78.
- [16] 谢岷, 杨于嘉, 王晓莉, 等. 骨髓基质细胞移植治疗新生大鼠缺血缺氧性脑损伤时间窗探讨[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(5):396-397.
- [17] 王霞, 杨于嘉, 贾延劫, 等. 新生大鼠缺血缺氧性脑损伤神经干细胞移植部位的探讨[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(12):847-850.
- [18] Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, et al. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res.* 2000;859(2):318-325.
- [19] Morris RG. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv.* 1981;12(2):239-260.
- [20] Yalvac ME, Rizvanov AA, Kilic E, et al. Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. *Curr Pharm Des.* 2009;15(33):3908-3916.
- [21] Karaöz E, Demircan PC, Sağlam O, et al. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol.* 2011;136(4):455-473.
- [22] Ringe J, Kaps C, Schmitt B, et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res.* 2002;307(3):321-327.
- [23] Mauney JR, Kirker-Head C, Abrahamson L, et al. Matrix-mediated retention of in vitro osteogenic differentiation potential and in vivo bone-forming capacity by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79(3):464-475.
- [24] Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, et al. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology.* 2009;59(2):150-157.
- [25] Hayward P. Presenilin dysfunction leads to memory and plasticity defects. *Lancet Neurol.* 2004;3(6):327.
- [26] van den Berg M, Verbaarschot P, Hontelez S, et al. CREB expression in the brains of two closely related parasitic wasp species that differ in long-term memory formation. *Insect Mol Biol.* 2010;19(3):367-379.
- [27] Hawk JD, Abel T. The role of NR4A transcription factors in memory formation. *Brain Res Bull.* 2011;85(1-2):21-29.
- [28] Han JH, Kushner SA, Yiu AP, et al. Neuronal competition and selection during memory formation. *Science.* 2007;316(5823): 457-460.
- [29] Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, et al. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron.* 2002;34(3):447-462.
- [30] Hinoi E, Balcar VJ, Kuramoto N, et al. Nuclear transcription factors in the hippocampus. *Prog Neurobiol.* 2002;68(2): 145-165.