

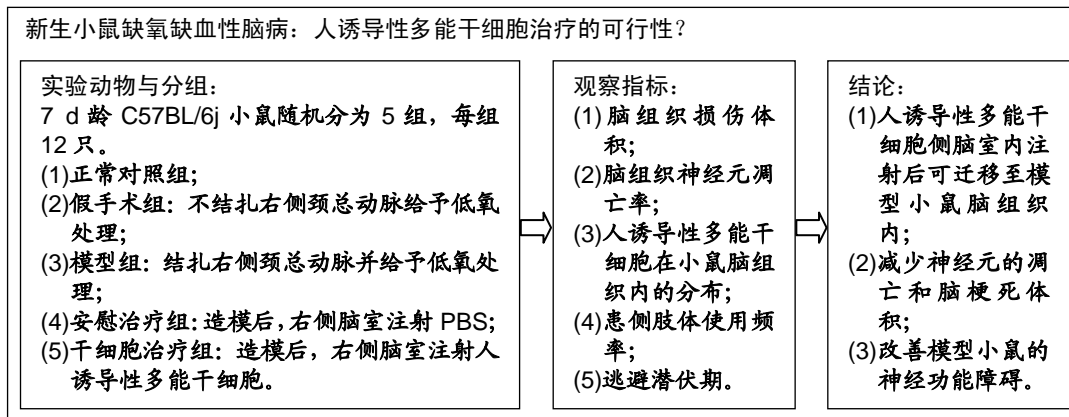
人诱导性多能干细胞移植治疗新生小鼠缺氧缺血性脑病

龚 佼, 刘 铭(西南医科大学附属医院小儿外科, 四川省泸州市 646000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1825

ORCID: 0000-0001-9948-0216(龚佼)

文章快速阅读:



龚佼, 女, 1992 年生, 四川省通江县人, 汉族, 2019 年西南医科大学毕业, 硕士, 主要从事小儿普通外科和小儿骨科方向研究。

通讯作者: 刘铭, 硕士, 西南医科大学附属医院小儿外科, 四川省泸州市 646000

文献标识码: B

稿件接受: 2019-05-13



文题释义:

诱导性多能干细胞: 是将体细胞重新编程获得的具有与胚胎干细胞类似的多能性干细胞, 既能从健康机体的体细胞中获取, 也可以从患病机体的体细胞中获取, 不仅为疾病病因、发病机制、药物筛选等方面的研究提供模型, 也为组织工程提供种子细胞。越来越多的研究证实, 诱导性多能干细胞可分化为多种有功能的细胞, 用于治疗阿尔茨海默病、心血管疾病和器官损伤等, 为组织器官损伤的再生修复带来广阔应用前景。

新生儿缺氧缺血性脑病: 是围产期新生儿因缺氧引起的脑部病变, 患儿常伴有癫痫、神经系统发育异常(学习障碍、精神发育迟滞), 严重者有脑瘫后遗症。该病的发生机制是缺血缺氧引起的胎儿脑细胞能量代谢障碍, 造成脑部损伤, 病变多发生于大脑两侧皮质和脑室周围的白质, 以脑水肿、神经元凋亡与坏死、脑组织丢失为主, 这些病理生理变化与永久性神经损伤直接相关。临床上用于此病治疗的公认方法是亚低温和辅助性药物治疗, 但均无法避免因缺血缺氧区域神经丢失引起的神经系统功能障碍, 而针对中枢神经系统损伤的有效治疗方法是促进神经细胞的再生、神经组织的修复和神经功能的恢复。干细胞移植为其带来新的治疗思路。

摘要

背景: 干细胞移植治疗新生小鼠缺氧缺血性脑病的研究主要集中在间充质干细胞和神经干细胞, 人诱导性多能干细胞脑室移植的相关研究鲜有报道。

目的: 观察人诱导性多能干细胞移植对缺氧缺血性脑病新生小鼠神经元凋亡及神经功能的影响。

方法: 将 60 只 7 d 龄 C57BL/6j 小鼠随机分为 5 组, 每组 12 只, 正常对照组不予处理, 假手术组不结扎右侧颈总动脉, 模型组结扎右侧颈总动脉并给于低氧处理, 安慰治疗组造模后向右侧脑室注射磷酸盐缓冲液, 干细胞治疗组造模后向右侧脑室内注射人诱导性多能干细胞。治疗 14 d 后, 免疫组织化学荧光染色观察人诱导性多能干细胞在脑组织中的分布, TTC 染色法检测各组脑组织损伤体积, Tunel 染色法检测各组脑组织神经元凋亡率; 治疗 28 d 后, 圆筒实验检测各组小鼠患侧肢体使用频率, 水迷宫法检测各组小鼠逃避潜伏期。

结果与结论: ①治疗 14 d 后, 人诱导性多能干细胞在小鼠患侧和对侧脑组织中均有分布; ②治疗 14 d 后, 干细胞治疗组小鼠脑损伤体积小于模型组和安慰治疗组($P < 0.01$); 干细胞治疗组小鼠脑组织内神经元凋亡率低于模型组和安慰治疗组($P < 0.01$); ③治疗 28 d 后, 干细胞治疗组小鼠缺血侧肢体的使用频率高于模型组和安慰治疗组($P < 0.01$), 干细胞治疗组小鼠逃避潜伏期短于模型组和安慰治疗组($P < 0.01$); ④结果表明, 侧脑室内注射诱导性多能干细胞可迁移至模型小鼠脑组织内, 减少神经元的丢失和脑损伤体积, 并能改善小鼠的神经功能障碍。

关键词:

人诱导性多能干细胞; 新生小鼠; 缺氧缺血性脑病; 认知功能障碍; 侧脑室; 干细胞移植; 神经元; 凋亡

中图分类号: R459.9; R394.2; R722

Human induced pluripotent stem cell transplantation for hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal mice

Gong Jiao, Liu Ming (Department of Pediatric Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan Province, China)

Gong Jiao, Master,
Department of Pediatric
Surgery, Affiliated Hospital of
Southwest Medical
University, Luzhou 646000,
Sichuan Province, China

Corresponding author:
Liu Ming, Master,
Department of Pediatric
Surgery, Affiliated Hospital of
Southwest Medical
University, Luzhou 646000,
Sichuan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Stem cell transplantation for the treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal mice mainly concerns mesenchymal stem cells and neural stem cells, but not enough emphasis has been placed on lateral ventricular human induced pluripotent stem cells transplantation.

OBJECTIVE: To observe the effects of transplantation of human induced pluripotent stem cells on neuronal apoptosis and cognitive function in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy.

METHODS: Sixty 7-day-old C57BL/6j mice were randomly divided into five groups, 12 in each group. Normal control group was not treated, sham operation group was not subjected to ligation of the right common carotid artery, and model group was subjected to ligation of the right common carotid artery and hypoxic intervention. Phosphate buffer solution was injected into the right ventricle after model establishment in placebo treatment group, and human induced pluripotent stem cells were injected into the right ventricle after model establishment in stem cell treatment group. After 14 days of treatment, immunohistochemical fluorescence staining was used to observe the distribution of human induced pluripotent stem cells in brain tissues, TTC staining was used to detect the damage area and calculate the volume of brain tissues, and TUNEL staining was used to detect the apoptotic rate of neurons in brain tissues. After 28 days of treatment, cylindrical test was used to detect the frequency of limb uses in each group, and water maze method was used to detect escape latency in mice.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) After 14 days of treatment, human induced pluripotent stem cells were evenly distributed in the affected side and contralateral brain tissues of mice. (2) After 14 days of treatment, the infarct volume of brain tissue in the stem cell treatment group was smaller than that in the model group and placebo treatment group ($P < 0.01$). (3) After 14 days of treatment, the apoptotic rate of neurons in the brain tissue in the stem cell group was lower than that of the model group and placebo treatment group ($P < 0.01$). (4) After 28 days of treatment, the frequency of ischemic limb use in the stem cell treatment group was higher than that in the model group and the placebo treatment group, and shorter escape latency was detected in the stem cell treatment group than in the model group and the placebo treatment group ($P < 0.01$). These findings indicate that the transplantation of induced pluripotent stem cells into the lateral ventricle could migrate into the mouse brain tissue, reduce the apoptosis of neurons and the volume of cerebral infarction, and improve neurological dysfunction in the model mice.

Key words: human induced pluripotent stem cells; neonatal mice; hypoxic-ischemic encephalopathy; cognitive impairment; lateral ventricle; stem cell transplantation; neurons; apoptosis

0 引言 Introduction

新生儿缺氧缺血性脑病是围产期新生儿因缺氧引起的脑部病变,患儿常伴有癫痫、神经系统发育异常(学习障碍、精神发育迟滞),严重者有脑瘫后遗症甚至死亡^[1]。新生儿缺氧缺血性脑病的主要病理生理过程是脑部血流异常引起的能量代谢异常和氧自由基损伤,导致神经元过度死亡和神经胶质细胞增生^[2]。临床上用于新生儿缺氧缺血性脑病治疗的公认方法是亚低温和辅助性药物治疗^[3]。亚低温治疗通过抑制细胞凋亡和减少自由基产生来改善患儿的预后,药物治疗通过改善脑血流和脑部能量代谢来缓解症状^[4]。但两种方法均无法治疗因缺氧缺血区域神经元丢失引起的神经系统功能障碍,而针对中枢神经系统损伤的有效治疗方法是促进神经细胞的再生、神经组织的修复和神经功能的恢复^[5]。

目前,干细胞移植已成为神经再生医学研究的热点问题,在治疗脑缺血疾病方面取得了突破性进展^[6]。干细胞具有多向分化和自我更新能力,在所处微环境的诱导下可分化为与周围细胞结构与功能相类似的细胞,达到改善症状和功能的治疗目的^[7]。用多向分化能力的干细胞取代死亡细胞改变了神经元等细胞不可再生的现状,也为新生儿缺氧缺血性脑病的治疗带来希望。既往的研究证实,间充质干细胞在一定诱导条件下可分化成神经元和神经胶质细胞^[8]。Ma等^[9]首先将胚胎干细胞用于缺氧缺血性脑病模型小鼠的治疗,学习能力和记忆能力有明显改善。研究发现人羊水干细胞经鼻内移植可通过NF- κ B信号通路减轻缺氧缺血性脑病慢性期新生小鼠脑损伤^[10]。Park等^[11]认为脂肪间充质干细胞通过分泌髓鞘碱性蛋白保护宿主髓鞘,通过分泌血管紧张素的抗炎活性和神经营养因子的促生长作用来改善大鼠认知功能。Park等^[12]将亚低温治疗与人脐血来

源间充质干细胞移植联合应用治疗大鼠缺氧缺血性脑病,可增加星形胶质细胞的数量并改善感觉及运动功能。Zhang等^[13]将人脐带间充质干细胞移植治疗大鼠缺氧缺血性脑病,可诱导分化为神经元并抑制神经胶质细胞增生。Xie等^[14]将人脐带间充质干细胞移植治疗缺氧缺血性脑病患者可改善预后,使患者神经功能、认知能力、情绪反应和锥体外功能得到较好地恢复。肖升平等^[15]研究也发现人脐带间充质干细胞可在缺氧缺血性脑病新生鼠脑内定植。李禄全等^[16]将鼠骨髓间充质干细胞进行颅内直接移植后主要分布在患侧大脑并可分化为神经干细胞、神经元及星形胶质细胞。国内外研究主要集中在干细胞移植对神经功能的改善方面,而对于干细胞移植后能否替代凋亡细胞的研究较少。

诱导性多能干细胞增殖能力强,来源广泛,可诱导分化为多种细胞,没有移植排斥及伦理学问题,是细胞替代治疗的理想种子细胞^[17-18]。因此,该研究应用人诱导性多能干细胞移植治疗缺氧缺血性脑病模型小鼠,观察诱导性多能干细胞在脑损伤区域的分布及对神经功能恢复的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 自2017年10月至2018年10月在西南医科大学实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级雌性新生C57BL/6j小鼠60只,鼠龄7 d,体质量(10 \pm 1) g,购于北京维通利华实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2014-0001。

1.3.2 实验细胞 人诱导性多能干细胞株购于北京赛贝生物技术有限公司。

人诱导性多能干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	购买于北京赛贝生物技术有限公司, 规格: 1×10^6 , 批号: CA4025106
细胞培养基:	PSCeasy [®] 人多潜能干细胞培养基
添加材料:	PSCeasy [®] 人多潜能干细胞添加剂
培养时间:	培养 20 d
细胞传代:	每隔 5 d 传代 1 次, 传代比例 1 : 6
细胞鉴定:	经过流式细胞术、拟胚体形成实验、免疫荧光染色证实为人诱导性多能干细胞

1.3.3 实验试剂及仪器 PSCeasy[®]人多潜能干细胞培养基、EDTA人多潜能干细胞传代工作液和人多潜能干细胞消化液(北京赛贝生物技术有限公司); 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)、2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(TTC)、水合氯醛(美国Sigma公司); 兔抗鼠BrdU单克隆抗体、FITC标记的山羊抗鼠IgG(Santa Cruz公司); 一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)(碧云天生物技术公司); CO₂培养箱(Thermo公司); 光学显微镜、体视解剖显微镜和倒置相差显微镜(日本Olympus公司); 小鼠脑立体定向仪(江苏赛昂斯生物科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 将60只新生小鼠随机分为正常对照组、假手术组、模型组、安慰治疗组和干细胞治疗组, 每组12只。

1.4.2 新生小鼠缺氧缺血性脑病模型的制备^[19] 取7 d龄新生小鼠, 腹腔注射1%水合氯醛(3 mL/kg)进行麻醉, 仰卧位固定于手术台, 体积分数为75%乙醇消毒颈部皮肤, 在体视解剖显微镜下进行手术, 做颈部正中切口, 钝性分离肌肉组织, 暴露右侧颈总动脉, 双重结扎并离断, 缝合手术切口并涂抹红霉素软膏; 手术结束后将新生小鼠送回母鼠笼内, 室温恢复2 h后, 将小鼠放入低氧箱(持续通入体积分数为8%O₂+体积分数为92%N₂混合气体的密闭箱)中37 °C模拟缺氧过程, 3 h后送回母鼠笼中喂养。假手术组操作同上, 只暴露右侧颈总动脉, 不进行结扎。正常对照组不进行任何处理。

1.4.3 治疗方法 正常对照组、假手术组和模型组不进行治疗, 安慰治疗组在脑立体定向仪的辅助下向新生小鼠右侧脑室内注射2 μL PBS, 干细胞治疗组在脑立体定向仪的辅助下向新生小鼠右侧脑室内注射3 μL第3代人诱导性多能干细胞悬液(含细胞 5×10^6 个), 在注射前48 h, 用BrdU标记第3代人诱导性多能干细胞。

1.4.4 TTC染色法检测脑组织损伤体积^[20] 治疗后14 d, 每组各取3只小鼠, 取出大脑组织, 在-20 °C冰箱快速冷冻20 min, 用冰冻切片机制作30 μm厚的大脑皮质冠状面切片, 每隔2 mm脑组织切取1片, 共切5张, 用2%TTC溶液将脑片在37 °C避光染色40 min。正常脑组织染成红色, 损伤区脑组织呈白色。用图像采集系统拍照, Image Pro Plus 6.0软件测量各组小鼠脑片的损伤面积。脑损伤体积=脑损伤面积×切片厚度(30 μm), 将每张切片计算所得的脑

损伤体积求和即为脑损伤体积。

1.4.5 Tunel染色法检测脑组织神经元凋亡率^[21] 治疗后14 d, 每组各取3只小鼠, 取出大脑组织, 制作8 μm厚的冰冻切片备用。每组取3张冰冻切片, 按照说明书步骤操作, 40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS洗涤3次, 每次5 min, 用含0.3% Triton X-100的PBS孵育2 min, 滴加TUNEL检测液, 37 °C避光孵育60 min, DAPI染核呈蓝色, 用抗荧光淬灭封固液封固后在荧光显微镜下观察。以出现绿色荧光为凋亡细胞, 每张切片选取5个高倍视野, 计算凋亡神经元数量/视野内所有神经元的数量×100%, 即为神经元凋亡率。

1.4.6 免疫组织化学荧光染色法观察人诱导性多能干细胞在小鼠脑组织中的分布^[22] 取上述1.4.5中制备的冰冻切片, 每组3张, 40 g/L多聚甲醛固定10 min, 2 mol/L HCl 37 °C处理30 min, 体积分数为10%山羊血清室温封闭45 min, 滴加兔抗鼠BrdU单克隆抗体(1 : 200), 4 °C过夜, 次日加FITC标记的二抗(1 : 500), 室温孵育30 min, 荧光显微镜观察, BrdU阳性细胞的胞核呈绿色。

1.4.7 圆筒实验(Cylinder Test)检测小鼠患侧肢体使用频率^[23] 治疗后28 d, 每组各取3只小鼠, 分别放入直径为6 cm、高为10 cm的圆柱形缸内, 每只小鼠的观察时间为5 min, 记录小鼠使用左前肢、右前肢和两前肢一起支撑缸壁的次数, 根据公式: 缺血侧前肢使用频率=(对侧前肢使用次数+双前肢使用次数/2)/(对侧前肢使用次数+双前肢使用次数+缺血侧前肢使用次数)×100%, 计算小鼠患侧前肢的使用频率。

1.4.8 水迷宫法观察小鼠学习与记忆能力^[24] 治疗后28 d, 每组各取3只小鼠, 分别放入水迷宫装置内, 记录小鼠找到平台的时间计为逃避潜伏期, 每日测量2次, 取平均值计入统计分析。将小鼠放入游泳池中, 小鼠通过视觉记忆找到水平面以下的平台, 找不到或找到平台时间延长则表明小鼠的记忆功能受损, 寻找平台的时间越长表示损伤程度越重。

1.5 主要观察指标 ①小鼠脑组织损伤体积; ②小鼠脑组织神经元凋亡率; ③人诱导性多能干细胞在小鼠脑组织内的分布; ④小鼠患侧肢体使用频率; ⑤小鼠的逃避潜伏期。

1.6 统计学分析 所有计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 20.0软件进行统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用S-N-K检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 参加实验的小鼠共60只, 实验过程顺利, 无死亡动物, 60只小鼠的实验数据均进入结果分析。

2.2 人诱导性多能干细胞在小鼠脑组织中的分布 绿色荧光标记的人诱导性多能干细胞散在分布于患侧大脑皮质, 颞叶皮质部位较多, 提示移植14 d时人诱导性多能干细胞仍在脑组织内存活并移行, 见图1。

2.3 各组小鼠大脑损伤体积比较 TTC染色结果显示, 假手术组小鼠大脑皮质无苍白区, 模型组、安慰治疗组和干

细胞治疗组小鼠大脑皮质内可见苍白区,见图2。治疗14 d后,干细胞治疗组小鼠脑组织损伤体积小于模型组和安慰治疗组($P < 0.01$),见表1。

表1 各组小鼠脑组织损伤体积比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	脑组织损伤体积(mm ³)
正常对照组	0.00±0.00
假手术组	0.00±0.00
模型组	21.76±3.23 ^{ab}
安慰治疗组	20.15±3.17 ^{ab}
干细胞治疗组	10.34±2.28 ^{abcd}

表注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与假手术组比较,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.01$;与安慰治疗组比较,^d $P < 0.01$ 。

2.4 各组小鼠脑组织神经元凋亡率比较 Tunel染色结果显示,正常对照组和假手术组小鼠脑组织内偶见散在分布的凋亡神经元,模型组和安慰治疗组小鼠脑组织内凋亡的神经元较多,见图3A-E,干细胞治疗组小鼠脑组织内神经元凋亡率低于模型组和安慰治疗组($P < 0.01$),模型组和安慰治疗组小鼠脑组织内神经元凋亡率高于正常对照组和假手术组($P < 0.01$),见图3F。

2.5 各组小鼠缺血侧肢体的使用频率比较 移植28 d后,模型组和安慰治疗组小鼠缺血侧肢体的使用频率低于正常对照组、假手术组和干细胞治疗组($P < 0.01$);干细胞治疗组小鼠缺血侧肢体的使用频率低于正常对照组和假手术组,但差异无显著性意义($P > 0.05$),见表2。

表2 各组小鼠缺血侧肢体的使用频率比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	缺血侧肢体的使用频率(%)
正常对照组	50.03±2.64
假手术组	49.52±2.12
模型组	30.34±2.87 ^{ab}
安慰治疗组	29.73±3.11 ^{ab}
干细胞治疗组	46.77±3.84 ^{abcd}

表注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与假手术组比较,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.01$;与安慰治疗组比较,^d $P < 0.01$ 。

2.6 各组小鼠逃避潜伏期比较 移植28 d后,模型组和安慰治疗组小鼠逃避潜伏期大于正常对照组、假手术组和干细胞治疗组($P < 0.01$);干细胞治疗组小鼠逃避潜伏期小于正常对照组和假手术组($P < 0.01$),见表3。

表3 各组小鼠逃避潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	逃避潜伏期(s)
正常对照组	31.27±4.34
假手术组	30.89±3.85
模型组	103.16±12.04 ^{ab}
安慰治疗组	101.73±13.51 ^{ab}
干细胞治疗组	54.39±7.46 ^{abcd}

表注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与假手术组比较,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.01$;与安慰治疗组比较,^d $P < 0.01$ 。

3 讨论 Discussion

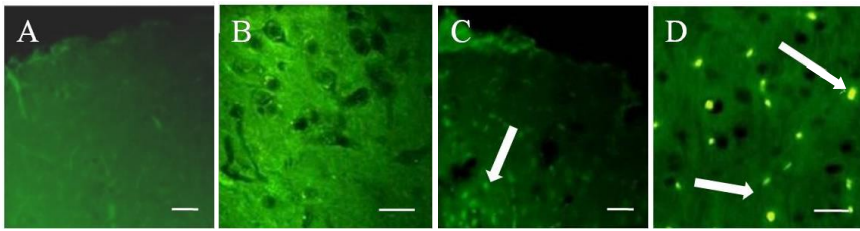
人诱导性多能干细胞是由体细胞经重编程获得的干细胞,理论上可以分化为所有种类的细胞,避免了移植排斥等问题。既往研究证实,人诱导性多能干细胞在体外培养可分化为有功能的神经元,首先诱导性多能干细胞在3D培养体系中分化为神经上皮细胞,随后神经上皮细胞分裂增殖并分化形成特异性的神经元,最后新分化产生的神经元迁移到特定部位形成大脑皮质的板层结构。

目前,临床上尚无确切有效治疗新生儿缺氧缺血性脑病的药物^[25]。随着干细胞技术的发展,干细胞移植为新生儿缺氧缺血性脑病的治疗及后遗症的防治开辟了新途径^[26]。干细胞治疗缺氧缺血性脑病的主要机制有2个方面,一是通过细胞替代介导神经功能的恢复,主要包括神经再生、神经纤维再生、血管再生和突触形成;另一方面是细胞的旁分泌效应,主要包括细胞因子的免疫调节和生长因子的促生长作用。该研究应用人诱导性多能干细胞移植治疗新生儿缺氧缺血性脑病,结果表明人诱导性多能干细胞可迁移到脑组织中,有效降低了小鼠脑损伤体积和神经元凋亡数量,还促进了小鼠神经功能的恢复。

针对缺氧缺血性脑病的研究主要依赖于缺氧缺血性脑病动物模型的制备。既往研究发现,小鼠脑部的血液供应与人类相似,且出生后7 d小鼠的大脑成熟度与足月新生儿的大脑成熟度相近。单纯缺氧或结扎一侧颈总动脉不能使脑组织发生病理改变,单纯结扎一侧颈总动脉也不会影响小鼠脑血流量,而在结扎一侧颈总动脉后进行低氧处理则可使小鼠脑部血流量降低80%^[28-29]。同时,低温能通过延迟神经元内ATP的耗竭发挥对脑组织的保护作用^[30-31]。故该研究选用出生后7 d的C57BL/6j小鼠,采用经典的造模方法在室温条件下建立新生儿小鼠缺氧缺血性脑病模型。Tunel染色结果显示,模型组小鼠脑组织神经元凋亡数量增多,高于正常对照组和假手术组。

研究证实,神经元的凋亡是脑缺血后神经元迟发性死亡的关键触发因素,缺氧缺血性脑病永久性脑损伤的主要原因是位于侧脑室的神经干细胞或神经前体细胞对缺氧缺血敏感,在缺氧缺血发生的数小时内即可发生坏死和凋亡,仅剩余近1/4的神经干细胞,无法满足自身修复的需要^[32-33]。由于体外培养的神经干细胞来源和免疫排斥等问题限制了其在体内的应用。诱导性多能干细胞来源于自体细胞,经基因编辑后比其他成体干细胞的增殖分化潜能更大,更接近胚胎干细胞的特性,分化能力优于神经干细胞,而且可以取自皮肤等体细胞,获取较为容易,也避免了胚胎干细胞的伦理学问题。该研究将人诱导性多能干细胞注射到小鼠侧脑室内,在移植14 d后脑组织中可见BrdU标记的人诱导性多能干细胞,提示人诱导性多能干细胞经侧脑室注射后可迁移至脑组织内。Tunel染色结果也显示,人诱导性多能干细胞移植治疗组小鼠脑组织内神经元凋亡率低于模型组和安慰治疗组,提示侧脑室注射人诱导性多能干细胞能有效抑制神经元凋亡的发生,从而发挥神经保护作用。

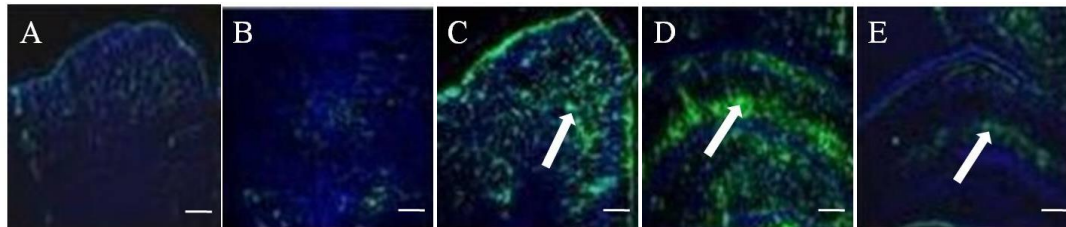
脑损伤体积及神经功能损伤的行为学评价是判断脑缺氧缺血损伤严重程度的重要指标^[34-36]。该研究结果显示,



图注: 图中 A, B 为安慰治疗组小鼠大脑皮质免疫荧光染色结果, 大脑皮质内未见绿色荧光出现 (A: 标尺 100 μm ; B: 标尺 30 μm); C, D 为干细胞治疗组小鼠大脑皮质免疫荧光染色结果, 箭头所示大脑皮质内可见发出绿色荧光的阳性细胞聚集 (C: 标尺 100 μm ; D: 标尺 30 μm)。

图 1 人诱导性多能干细胞在小鼠脑组织中的分布

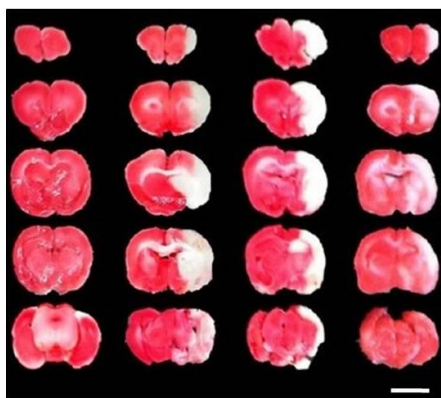
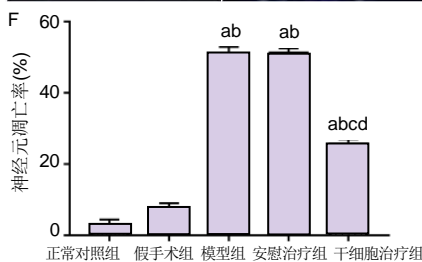
Figure 1 Distribution of human induced pluripotent stem cells in the mouse brain



图注: 图中 A-E 分别为正常对照组、假手术组、模型组、安慰治疗组和干细胞治疗组小鼠大脑皮质 TUNEL 染色结果 (标尺: 200 μm), 箭头所示为凋亡细胞呈绿色荧光; F 为各组小鼠大脑皮质神经元凋亡率比较。与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与假手术组比较, ^b $P < 0.01$; 与模型组比较, ^c $P < 0.01$; 与安慰治疗组比较, ^d $P < 0.01$ 。

图 3 各组小鼠脑组织神经元凋亡率比较

Figure 3 Comparison of apoptotic rate of neurons in the mouse brain tissue



假手术组 模型组 安慰治疗组 干细胞治疗组

图 2 各组小鼠大脑皮质 TTC 染色结果 (标尺: 1 cm)

Figure 2 TTC staining results of the mouse cerebral cortex (scale bar=1 cm)

干细胞治疗组小鼠脑损伤体积小于模型组及安慰治疗组, 提示人诱导性多能干细胞移植可缩小缺氧缺血性脑病模型小鼠脑损伤体积, 阻止脑组织的丢失。对于发生缺氧缺血性脑病的新生儿而言, 脑组织丢失将引起持续时间较长甚至永久的神经功能障碍^[37]。该研究选择圆筒实验和水迷宫实验分别从感觉与运动功能及学习与记忆能力两方面评价人诱导性多能干细胞移植对小鼠神经功能损伤的改善作用。

圆筒实验是最先应用于帕金森模型大鼠肢体不对称使用的行为学评价, 由于操作简便、检测结果稳定而逐渐被用于检测脑缺血和出血等脑损伤动物模型的行为学改变, 缺血侧肢体的使用频率越低表示缺血缺氧损伤引起的行为学改变的程度越重。该研究的圆筒实验结果显示, 模型组小鼠缺血侧肢体的使用频率低于假手术组, 干细胞治疗组

小鼠缺血侧肢体的使用频率有所增加, 高于模型组和安慰治疗组, 提示人诱导性多能干细胞移植可改善神经功能。由于圆筒实验的早期分辨率较低, 该研究在移植后 28 d 进行检测, 以提高评价结果的可靠性。

水迷宫是常用于评估认知与记忆功能的方法, 操作简单且可信度高, 最先应用于大鼠, 后被证实同样适用于人类和小鼠。该研究将接受测试的小鼠放入游泳池中, 小鼠通过视觉记忆找到水平面以下的平台, 找不到或找到平台时间延长则表明小鼠的记忆功能受损, 寻找平台的时间越长表示损伤程度越重, 其中模型组小鼠逃避潜伏期长于假手术组, 干细胞治疗组小鼠逃避潜伏期短于模型组和安慰治疗组, 提示人诱导性多能干细胞移植能促进小鼠学习与记忆能力的改善。

综上所述, 该研究将人诱导性多能干细胞注射到缺氧缺血性脑病模型小鼠侧脑室内, 初步观察人诱导性多能干细胞对脑损伤区域内神经组织和神经功能的影响, 尚未探讨人诱导性多能干细胞移植的机制, 选取的时间点较少, 有一定局限性。今后将选取更多的时间点, 观察人诱导性多能干细胞迁移的路径, 探讨迁移细胞分化的机制。

作者贡献: 实验设计、实施、评估为龚俊、刘铭, 资料收集为龚俊。

经费支持: 该文章没有接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经西南医科大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 2017110036。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过西南医科大学附属医院生物统计学专家审核。

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, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”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] Lemyre B, Chau V. Hypothermia for newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Paediatr Child Health*. 2018;23(4):285-291.
- [2] Mendler MR, Mendler I, Hassan MA, et al. Predictive Value of Thompson-Score for Long-Term Neurological and Cognitive Outcome in Term Newborns with Perinatal Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Undergoing Controlled Hypothermia Treatment. *Neonatology*. 2018;114(4):341-347.
- [3] Chevin M, Guiraut C, Sèbire G. Effect of hypothermia on interleukin-1 receptor antagonist pharmacodynamics in inflammatory-sensitized hypoxic-ischemic encephalopathy of term newborns. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):214.
- [4] Kushwah S, Kumar A, Verma A, et al. Comparison of fractional anisotropy and apparent diffusion coefficient among hypoxic ischemic encephalopathy stages 1, 2, and 3 and with nonasphyxiated newborns in 18 areas of brain. *Indian J Radiol Imaging*. 2017;27(4):447-456.
- [5] Sánchez-Illana Á, Núñez-Ramiro A, Cernada M, et al. Evolution of Energy Related Metabolites in Plasma from Newborns with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy during Hypothermia Treatment. *Sci Rep*. 2017;7(1):17039.
- [6] Xie B, Gu P, Wang W, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation on hypoxic ischemic encephalopathy. *Am J Transl Res*. 2016;8(7):3241-3250.
- [7] Ji G, Liu M, Zhao XF, et al. NF- κ B Signaling is Involved in the Effects of Intranasally Engrafted Human Neural Stem Cells on Neurofunctional Improvements in Neonatal Rat Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *CNS Neurosci Ther*. 2015;21(12):926-935.
- [8] Simiyu IN, Mchale DN, Katsonger K, et al. Prevalence, severity and early outcomes of hypoxic ischemic encephalopathy among newborns at a tertiary hospital, in northern Tanzania. *BMC Pediatr*. 2017;17(1):131.
- [9] Ma J, Wang Y, Yang J, et al. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in mouse by transplantation of embryonic stem cell-derived cells. *Neurochem Int*. 2007;51(1):57-65.
- [10] Ji G, Liu M, Zhao XF, et al. NF- κ B Signaling is Involved in the Effects of Intranasally Engrafted Human Neural Stem Cells on Neurofunctional Improvements in Neonatal Rat Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *CNS Neurosci Ther*. 2015;21(12):926-935.
- [11] Park D, Lee SH, Bae DK, et al. Transplantation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Restores the Neurobehavioral Disorders of Rats With Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Cell Med*. 2013;5(1):17-28.
- [12] Park WS, Sung SI, Ahn SY, et al. Hypothermia augments neuroprotective activity of mesenchymal stem cells for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120893.
- [13] Zhang X, Zhang Q, Li W, et al. Therapeutic effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells on neonatal rat hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neurosci Res*. 2014;92(1):35-45.
- [14] Xie B, Gu P, Wang W, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation on hypoxic ischemic encephalopathy. *Am J Transl Res*. 2016;8(7):3241-3250.
- [15] 肖升平, 马廉, 罗敏洁, 等. 人脐带血间充质干细胞在缺氧缺血性脑病新生鼠脑内的定植[J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 15(21):1655-1657.
- [16] 李禄全, 余加林, 官晓清, 等. 鼠骨髓间充质干细胞在缺氧缺血性脑病新生鼠脑内的分布及分化[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 36(4): 327-330.
- [17] 彭雅南, 赵振强. 人诱导性多能干细胞源神经元移植治疗帕金森病的现状与未来[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(36): 5458-5465.
- [18] 陈旭东, 范文娟, 袁科理, 等. 不同培养条件对小鼠诱导性多能干细胞分化为神经元样细胞的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(9):1216-1219, 1223.
- [19] 林良烽. 虾青素对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠模型的神经保护作用[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(40):6480-6484.
- [20] 罗梦娇, 王贝, 郭瑞, 等. Olig2对胚胎干细胞向神经前体细胞分化过程中 Nestin蛋白表达的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2015, 31(1):91-94.
- [21] 周永新, 刘俊, 李海英, 等. 缺氧缺血性脑病新生大鼠海马EphA5受体mRNA表达与神经元凋亡的关系[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2013, 33(11):1521-1523, 1528.
- [22] 朱江. 头部亚低温联合鼠神经生长因子治疗新生儿缺氧缺血性脑病的疗效观察[J]. *现代诊断与治疗*, 2017, 25(12):9-10.
- [23] 袁金晶, 李冰, 吴德, 等. 低氧诱导因子-1 α 基因C1772T/G1790A多态性与HIE及HIE致脑性瘫痪的关系[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2010, 25(19): 1500-1502.
- [24] 王爱, 牟青杰, 王晓莉, 等. 骨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.
- [25] Kidani Y, Miki Y, Nomimura N, et al. The therapeutic effect of CD133(+) cells derived from human umbilical cord blood on neonatal mouse hypoxic-ischemic encephalopathy model. *Life Sci*. 2016;157:108-115.
- [26] 楚冬梅, 高心静, 温丙友, 等. 干细胞治疗新生儿缺氧缺血性脑病的研究进展[J]. *医学综述*, 2018, 24(18):3649-3657.
- [27] Chaparro-Huerta V, Flores-Soto ME, Merin Sigala ME, et al. Proinflammatory Cytokines, Enolase and S-100 as Early Biochemical Indicators of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Following Perinatal Asphyxia in Newborns. *Pediatr Neonatol*. 2017;58(1):70-76..
- [28] Ohshima M, Taguchi A, Sato Y, et al. Evaluations of Intravenous Administration of CD34+ Human Umbilical Cord Blood Cells in a Mouse Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Dev Neurosci*. 2016;38(5):331-341.
- [29] Fang C, Xie L, Liu C, et al. Tanshinone IIA improves hypoxic ischemic encephalopathy through TLR-4-mediated NF- κ B signal pathway. *Mol Med Rep*. 2018;18(2):1899-1908.
- [30] Ten VS, Bradley-Moore M, Gingrich JA, et al. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Behav Brain Res*. 2003;145(1-2):209-219.
- [31] Lv HY, Wu SJ, Wang QL, et al. Effect of erythropoietin combined with hypothermia on serum tau protein levels and neurodevelopmental outcome in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neural Regen Res*. 2017;12(10):1655-1663.
- [32] Reinboth BS, Köster C, Abberger H, et al. Endogenous hypothermic response to hypoxia reduces brain injury: Implications for modeling hypoxic-ischemic encephalopathy and therapeutic hypothermia in neonatal mice. *Exp Neurol*. 2016;283(Pt A):264-275.
- [33] Zaitoun IS, Cikla U, Zafer D, et al. Attenuation of Retinal Vascular Development in Neonatal Mice Subjected to Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Sci Rep*. 2018;8(1):9166.
- [34] Moon CJ, Youn YA, Yum SK, et al. Cytokine changes in newborns with therapeutic hypothermia after hypoxic ischemic encephalopathy. *J Perinatol*. 2016;36(12):1092-1096.
- [35] Elshorbagy HH, Azab AA, Kamal NM, et al. Value of electroencephalographic monitoring in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy treated with hypothermia. *J Pediatr Neurosci*. 2016;11(4):309-315.
- [36] Chalak LF, Zhang R. New Wavelet Neurovascular Bundle for Bedside Evaluation of Cerebral Autoregulation and Neurovascular Coupling in Newborns with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Dev Neurosci*. 2017;39(1-4):89-96.
- [37] Metzler M, Govindan R, Al-Shargabi T, et al. Pattern of brain injury and depressed heart rate variability in newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatr Res*. 2017;82(3):438-443.