

去分化人脐带间充质干细胞通过重编程基因表达参与缺氧缺血性脑损伤大鼠神经修复

代梦洁¹, 刘佳¹, 詹学¹, 陈洁², 李廷玉², 古佳露³, 周小勤¹

(1. 重庆医科大学附属儿童医院消化科, 重庆 400014; 2. 儿童营养与健康重庆市重点实验室、
儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童发育重大疾病国家国际合作基地、
儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014; 3. 西北妇女儿童医院儿童保健科, 西安 710000)

【摘要】目的:探讨人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)、神经分化 hUC-MSCs(Dif)、神经去分化 hUC-MSCs(De-Dif)及神经再分化 hUC-MSCs(Re-Dif)4 种状态的细胞移植治疗缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)大鼠治疗效果,期望找寻治疗效率更优的种子细胞。**方法:**体外培养 hUC-MSCs,按 MNM 成神经诱导方法进行神经分化、去分化、再分化诱导,通过对 4 种状态细胞光镜下形态观察及全基因表达谱芯片分析;移植入 HIBD 神经损伤动物体内,进行功能学检测;应用基因和蛋白检测手段,对最优种子细胞进行可能机制探讨。**结果:**hUC-MSCs 在体外可成功进行神经分化、去分化、再分化诱导;全基因表达谱芯片发现,诱导过程中 hUC-MSCs、Dif、De-Dif 及 Re-Dif 4 种状态细胞基因进行重编程表达,De-Dif 与 hUC-MSCs 基因表达模式最相近;将 4 组细胞移植入 HIBD 实验大鼠体内,发现 4 种细胞均可促进 HIBD 大鼠神经功能恢复,但 De-Dif 较其他 3 组细胞发挥更大的神经修复潜能,差异具有统计学意义($P=0.000$);对 hUC-MSCs 与 De-Dif 2 组间进行 GO 生物学功能分析,发现 De-Dif 主要参与缺氧反应;De-Dif 组较 hUC-MSCs 组高表达神经标志物 MAP2、NSE、Tau、 β -tubulin III,干性基因 *C-MYC*、*NANOG* 和视黄酸核受体 *RAR β* 。**结论:**去分化过程可能通过重编程调控神经标志物基因 *MAP2*、*NSE*、*Tau*、 β -*tubulin III*,干性基因 *C-MYC*、*NANOG* 及 *RAR β* 基因表达,促进 De-Dif 参与 HIBD 神经修复。

【关键词】人脐带间充质干细胞;去分化;重编程;缺氧缺血性脑损伤;神经修复

【中图分类号】R742;R329.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-03-14

Dedifferentiated human umbilical cord mesenchymal stem cells participate in neurological restoration in rats with hypoxic-ischemic brain damage by reprogramming gene expression

Dai Mengjie¹, Liu Jia¹, Zhan Xue¹, Chen Jie², Li Tingyu², Gu Jialu³, Zhou Xiaojin¹

(1. Department of Gastroenterology, Children's Hospital of Chongqing Medical University;

2. Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Health for Children; Ministry of Education Key Laboratory of Development and Disorders; China International Science and Technology

Cooperation Base of Child development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics;

3. Department of Child Healthcare, Northwest Women and Children's Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells(hUC-MSCs), neuronal-differentiation hUC-MSCs(Dif), neuronal-dedifferentiation hUC-MSCs(De-Dif), and neuronal-redifferentiation hUC-MSCs(Re-Dif) in the treatment of rats with hypoxic-ischemic brain damage(HIBD), and to find seed cells with better therapeutic efficiency.

Methods: The hUC-MSCs were cultured *in vitro*, and neuronal differentiation, dedifferentiation, and redifferentiation were induced by the MNM neural induction method. The morphology of the cells in these four states was observed under a light microscope, and gene expression was analyzed by whole-gene expression profile microarray. The cells were transplanted into HIBD animals with nerve

injury to perform functional detection. The gene and protein detection methods were used to investigate the possible mechanism of optimal seed cells. **Results:** Neuronal differentiation, dedifferentiation, and redifferentiation of hUC-MSCs were successfully performed *in vitro*. The whole-gene expression profile microarray showed reprogramming expression of genes in hUC-

作者介绍:代梦洁, Email:1806092249@qq.com,

研究方向:干细胞、神经修复和移植治疗。

通信作者:周小勤, Email:zhouxiaojin_20@126.com。

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(编号:81601973)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190422.1516.006.html>

(2019-04-23)

MSCs, Dif, De-Dif, and Re-Dif, and De-Dif and hUC-MSCs had similar gene expression patterns. The four groups of cells were transplanted into the HIBD experimental rats, and the results showed that all four types of cells promoted neurological function recovery in HIBD rats, and De-Dif had a greater potential for nerve repair than the other three types of cells ($P=0.000$). Gene ontology analysis was performed for hUC-MSCs and De-Dif, and the results showed that De-Dif was mainly involved in hypoxia response. Compared with the hUC-MSCs group, the De-Dif group had significantly higher expression of the nerve markers microtubule associated protein 2 (MAP2), neuron-specific enolase (NSE), Tau, and β -tubulin III and the stem genes *C-MYC*, *NANOG*, and *RAR β* . **Conclusion:** Dedifferentiation may regulate the expression of the nerve markers *MAP2*, *NSE*, *Tau*, and *β -tubulin III* and the stem genes *C-MYC*, *NANOG*, and *RAR β* by reprogramming, which promotes the participation of De-Dif in HIBD nerve repair.

[Key words] human umbilical cord mesenchymal stem cell; dedifferentiation; reprogramming; hypoxic-ischemic brain damage; neurological restoration

缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 是围生期新生儿在宫内、分娩时或出生时因脑部缺氧缺血引起的神经功能障碍性疾病, 是新生儿死亡和发生癫痫的首要原因^[1]。尽管近年来对 HIBD 的认识加深, 治疗手段提高使得存活率增加^[2], 但其预后不良率达 35%~38%, 尤其注意力障碍和智力受损^[3]。因此, 促进 HIBD 神经修复, 找到临床有效的治疗方式显得尤为重要。

近年来, 研究发现人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs) 移植可促进 HIBD 模型动物神经修复, 为临床治疗 HIBD 带来曙光^[4-5]。但 hUC-MSCs 体内存活率低、定向分化率低, 神经修复效果不明显等问题日渐突出, 找寻适宜种子细胞以优化移植方案、提高治疗效率, 成为 hUC-MSCs 移植治疗领域的热点话题^[6]。

课题组前期研究发现, 运用本课题组成熟建立的 MNM 成神经诱导方法, 可以对大鼠骨髓间充质干细胞 (rat derived bone marrow mesenchymal stem cells, rBMSCs) 成功进行神经分化、去分化诱导, 一方面发现神经分化 MSCs 移植入神经损伤动物体内可以发挥神经保护作用^[7]; 另一方面发现 rBMSCs 可成功去分化为类干细胞 (De-MSCs), 将其移植入 HIBD 动物体内, 发现其具有更大的神经保护作用, 提示经去分化诱导后的细胞在治疗神经系统疾病中具有更明显优势^[8]。因此, 为寻找更优秀的种子细胞, 本研究尝试对 hUC-MSCs 进行本课题组已成熟建立的神经分化、去分化, 甚至再分化诱导, 对 hUC-MSCs、神经分化 hUC-MSCs (Dif)、神经去分化 hUC-MSCs (De-Dif) 及神经再分化 hUC-MSCs (Re-Dif) 4 种状态的 hUC-MSCs 移植治疗效果进行研究, 期望找寻治疗效率更高的种子细胞, 并探讨可能的作用机制, 为 HIBD 临床治疗带来希望。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞与实验动物 hUC-MSCs 由重庆市干细胞库提供, 并获得重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会许可 (024/2013)。本实验共用 80 只 SPF 级 SD 幼鼠, 由重庆医科大学提供, 已通过重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会许可 (012/2015)。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清 (Gibco, Australia), DMEN/F12 细胞培养基 (Gibco, USA), Tryple/EDTA (Gibco, USA), ATRA (Sigma-Aldrich, USA), BHA (Sigma-Aldrich, USA), 丙戊酸 (Sigma-Aldrich, USA), Forskolin (Sigma-Aldrich, USA), 氢化可的松 (Sigma-Aldrich, USA), HBSS 改良型 (Sigma-Aldrich, USA), 胰岛素 (MCE, China), CD34-PE (eBioscience, USA), CD29-PE (eBioscience, USA), CD45-FITC (eBioscience, USA), HLA-ABC PE (eBioscience, USA), HLA-DR FITC (eBioscience, USA), CD44-FITC, CD90-PE (BD Biosciences, USA), CD105-PE (BD Biosciences, USA), mRNA 提取试剂盒 (Bipteck, China), cDNA 逆转录试剂盒 (Takara, Japan), RT-PCR 试剂 (Takara, Japan), Trizol (Invitrogen, USA), 兔抗人 NSE 一抗 (Abcam, UK), 小鼠抗人 MAP2 一抗 (Santa Cruz, USA), 小鼠抗人 β -actin (Santa Cruz, USA), 兔抗人 C-MYC 一抗 (Abcam, UK), 兔抗人 NANOG 一抗 (Abcam, UK), 小鼠抗人 RAR β 一抗 (Abcam, UK), 山羊抗小鼠二抗 (HRP) 及山羊抗兔二抗 (HRP) (Santa Cruz, USA)。

1.2 方法

1.2.1 hUC-MSCs 培养 细胞接种于 75 cm² 一次性培养瓶中, 加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基, 摇匀, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内培养, 2~3 d 更换新鲜培养基 1 次, 待细胞长至 90% 融合时, 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 hUC-MSCs 流式细胞检测 将 hUC-MSCs 用胰酶消化制成 1×10^7 个/mL 细胞悬液, 血清封闭 30 min, PBS 洗涤 2 次, 加入 IgG1-PE、IgG1-FITC、CD29-PE、CD44-FITC、CD34-PE、CD45-FITC、CD90-PE、HLA-DR-FITC、CD105-PE、HLA-ABC-PE 抗体, 避光孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次后上机检测。

1.2.3 hUC-MSCs 神经分化、去分化、再分化诱导 根据本课题组成熟建立去分化诱导方法^[6]。给予 hUC-MSCs 1 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 预诱导 24 h, 24 h 后用 D-Hank's 清洗 2 遍, 加入 MNM 诱导液(即 100 mL DMEM/F12 培养基含 2%二甲亚砜, 200 $\mu\text{mol/L}$ BHA, 20 mmol/L 氯化钾, 1.6 mmol/L 丙戊酸, 8 $\mu\text{mol/L}$ Forskolin, 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 氢化可的松, 4 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素)进行神经分化诱导 24 h, 获得神经分化状态的细胞(用 Dif 表示), 神经分化诱导 24 h 后, 给予 D-Hank's 清洗 2 遍, 加入新鲜含 10%FBS 的 DMEM/F12 细胞培养基培养 24 h, 获得去分化状态细胞(用 De-Dif 表示), 24 h 后再次给予 MNM 诱导 24 h, 获得再分化状态的细胞(用 Re-Dif 表示)。

1.2.4 Affymetrix U133 全基因表达谱芯片检测 利用 Affymetrix U133 全基因表达谱芯片检测 4 种不同状态细胞的基因表达情况, 每组分别有 3 个不同的生物学重复, 具体编号为: hUC-MSCs 组(1E、2E、3E)、Dif 组(4E、5E、6E)、De-Dif 组(7E、8E、9E)及 Re-Dif 组(10E、11E、12E), 收集各组细胞 RNA 存放于 Trizol 中, 纯化及定量质检后, 靶基因 cRNAs 被碎片化为 35~200 bp 碱基长度, 与包含 54 675 个探针的 Human Genome U133 Plus 2.0 array 在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下进行杂交 16 h。杂交数据采用 Affymetrix[®] GeneChip[®] Command Console[®] Software 进行分析。Cluster version 2.11 Software 进行聚类分析。Affymetrix[®] NetAffx[™] Analysis Center Software 进行 GO 生物学功能分析。

1.2.5 实验动物建模及细胞移植 出生 7 d 的 SPF 级 SD 大鼠分组、编号, HIBD 造模方法及缺氧处理参考既往发表文

章^[9]。建模完成后 5 d, 将各组实验动物分组, 脑立体定位仪向下大鼠侧脑室注射移植相应细胞, 5 μL 细胞悬液含有 2×10^5 个细胞, 对照组注射等体积 PBS($n=17$), 细胞移植组分为 hUC-MSCs 组($n=13$)、Dif 组($n=15$)、De-Dif 组($n=14$)及 Re-Dif 组($n=8$), 同时设立假手术 Sham 组($n=9$)。颅内注射完成后由母鼠继续代养。

1.2.6 Morris 水迷宫行为学实验 各组实验大鼠颅内注射 1 个月后进行水迷宫测试。整个 Morris 水迷宫行为学实验共持续 6 d, 第 1 天可视平台测试, 实验大鼠随机从 4 个不同象限进入迷宫内, 记录大鼠在迷宫内游动轨迹, 时间设定为 1 min。第 2~5 天定位航行训练, 第 6 天为平台探索测试, 软件记录实验大鼠在 1 min 内穿越平台所在位置的次数。

1.2.7 Object-in-place 新事物探索实验 各组实验大鼠在颅内注射 1 个月后进行 Object-in-place 新事物探索实验。整个实验过程分为 3 d, 第 1~2 天为适应期, 每天同一时间将每只实验大鼠放入缸内 10 min, 让其适应缸内环境。第 3 天为测试期, 放置 4 个不同形状的玩具于正方形缸的 4 个角落, 将实验大鼠放入缸内进行新事物探索时间 5 min, 然后将大鼠放回饲养笼休息 5 min, 最后进入 3 min 样本测试期, 再次将实验大鼠放回缸内, 记录其对 4 个玩具的探索时间。

1.2.8 总 RNA 提取及相关基因表达的检测 按照总 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)方法提取, RNA 浓度测定仪检测 RNA 浓度后, 将 mRNA 逆转录为 cDNA, 采用 SYBR-Green Real-time PCR 试剂盒, 20 μL 反应体系, 所有检测基因以 β -actin 基因表达为内参。引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

基因名称	基因号	引物序列	产物长度 (bp)
<i>MAP2</i>	HSU01828	5'-ACCTCAACACCCACTACCC-3' 5'-CTCACTCGGCACCAAGAT-3'	156
<i>NSE</i>	NM_001975	5'-TTGGATGGGACTGAGAACA-3' 5'-GCACAGGCAGGATGAGGT-3'	154
<i>Tau</i>	XM_005257371	5'-CCCTGGCGGAGGAAATAA-3' 5'-TTGCTGAGATGCCGTGGA-3'	141
β -tubulin III	HSU47634	5'-CAGCAAGGTGCCGTGAGGA-3' 5'-GCCGTGCCCTTGTAGGGTT-3'	104
β -actin	X00351	5'-GTGAAGCTGACAGCAGTCGGTT-3' 5'-GAGAAGTGGGTGGCTTTTAGGA-3'	159
<i>C-MYC</i>	NM_002467	5'-GCTGCTTAGACGCTGGATTT-3' 5'-CACCGAGTCGTACTCGAGGT-3'	114
<i>NANOG</i>	NM_001355281	5'-GCAAGAAGTCTCCAACATCCTGA-3' 5'-CATTGCTATTCTTCGGCCAGTT-3'	116
<i>Oct4</i>	NM_002701	5'-CGTGAAGCTGGAGAAGGAGA-3' 5'-CTTGGCAAATTGCTCGACTT-3'	91
<i>SOX2</i>	NM_003106	5'-AAGAGAACACCAATCCCATCCA-3' 5'-AGTCCCCCAAAAAGAAGTCCA-3'	95
<i>RARα</i>	XM_005257552	5'-TCCGCCGCAGCATCCAGAAGAACAT-3' 5'-ACTCGGGCTTGGGCACCTCCTTCTT-3'	186
<i>RARβ</i>	NM_001290216	5'-GGAACACAGCAGAGCACAG-3' 5'-ACGAGTGCTGACTGACTGAC-3'	76
<i>RARγ</i>	XM_024449114	5'-CGCCGAAGCATCCAGAAGAAC-3' 5'-GCCATTCTGGTCACTTGTTC-3'	81

1.2.9 Western blot 检测相关蛋白的表达 加入蛋白裂解液,裂解充分后细胞刮反复刮取并收集细胞悬液,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,采用 BCA 法测定蛋白浓度,根据 SDS-PAGE 试剂盒进行蛋白上样准备,配胶及上样,SDS-PAGE 电泳、转膜,完成后进行相应蛋白免疫学检测,用 Quantity one 进行条带灰度分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 或 GraphPad Prism 统计软件分析,数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组样本采用 t 检验,2 组以上各组样本间的统计学差异采用单因素方差分析(one-way ANOVA),各组样本对同一变量进行重复测量,统计学差异采用重复测量多因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 hUC-MSCs 流式细胞鉴定

流式细胞技术检测 hUC-MSCs 细胞表面标志(图 1),结果显示细胞表面阳性表达 CD29、CD44、CD90、CD105、HLA-ABC,阴性表达免疫原性标志 HLA-DR 和造血干细胞标志 CD34、CD45。提示 hUC-MSCs 具有 hMSCs 的表面抗原。

2.2 hUC-MSCs 体外神经分化、去分化及再分化诱导

正常培养下的 hUC-MSCs、Dif、De-Dif 呈扁平梭形或细

长针尖样,漩涡状贴壁生长,细胞生长迅速,3~4 d 可长满整个培养皿(图 2)。但 Re-Dif 细胞形态发生明显变化,呈现神经元样细胞形态,胞体收缩变圆而亮,细胞有单极或多极突起,部分突起连成网状,神经诱导率可达 80%~90%(图 2)。hUC-MSCs 在体外经 MNM 神经诱导后,分化、去分化无明显形态改变(图 2),但转变为再分化状态细胞后,会出现神经元样细胞形态,提示仅一次神经分化诱导尚不足以使 hUC-MSCs 呈现神经元样细胞的形态变化。

2.3 Affymetrix U133 真核生物基因表达谱芯片检测 hUC-MSCs、Dif、De-Dif、Re-Dif 4 组细胞全基因表达模式

通过全基因表达聚类分析,hUC-MSCs 组基因表达模式与 De-Dif 组基因表达模式最接近,一致地低表达和高表达大多数基因(图 3A)。前期结果表明 Dif 组和 Re-Dif 组基因表达模式较接近,与 hUC-MSCs 及 De-Dif 组呈现几乎对立的表达模式^[5]。运用全基因散点图分析,hUC-MSCs 组与 De-Dif 组基因表达模式接近,较少差异基因出现,主要呈现黑色标记的无差异基因(图 3B);前期结果表明 hUC-MSCs 与 Dif 组和 Re-Dif 组基因表达差异较大,一方面提示 hUC-MSCs 在体外诱导后基因进行了重编程调整,表达模式发生改变,另一方面提示 De-Dif 的基因表达模式最接近 hUC-MSCs^[5]。

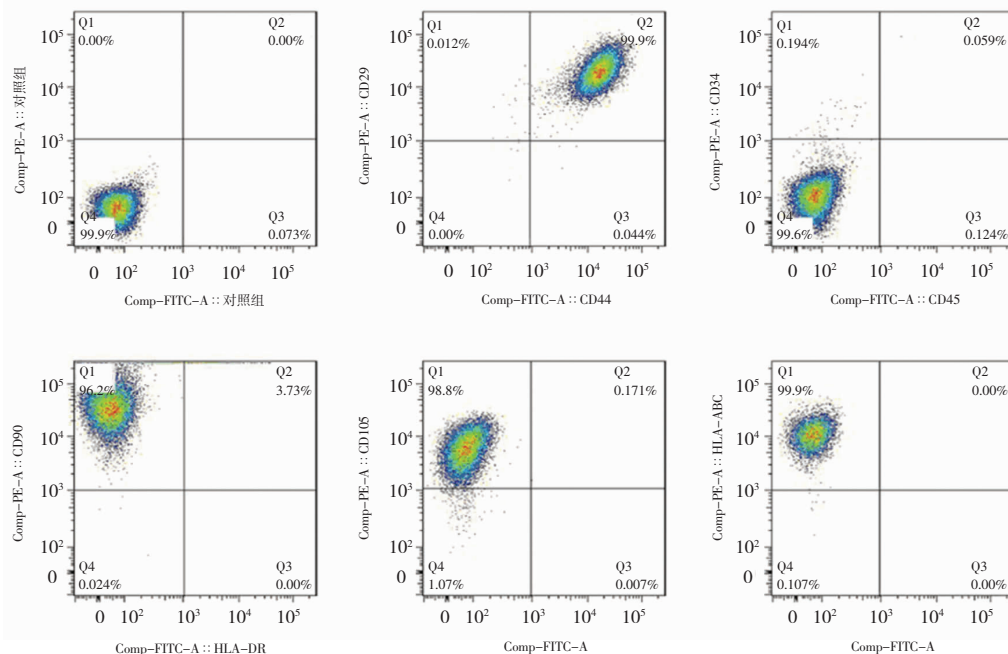


图 1 流式细胞术检测 hUC-MSCs 表面抗原

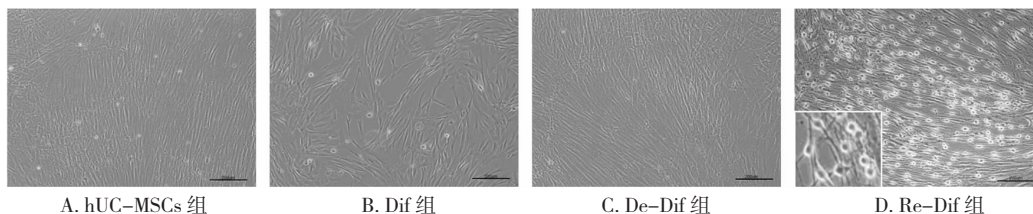


图 2 hUC-MSCs、Dif、De-Dif 及 Re-Dif 4 组细胞形态特征(100× 光镜,标尺 =200 μm)

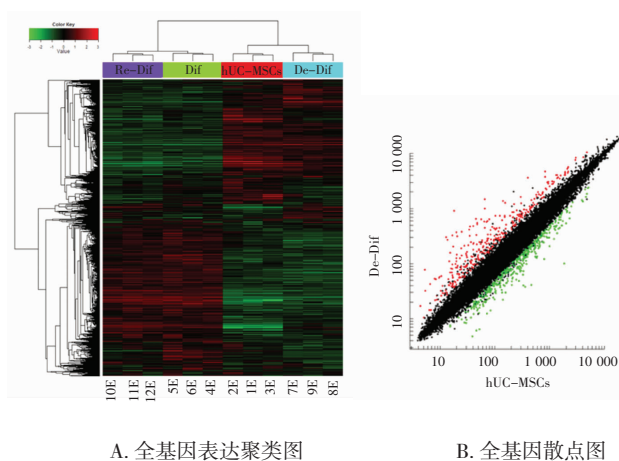


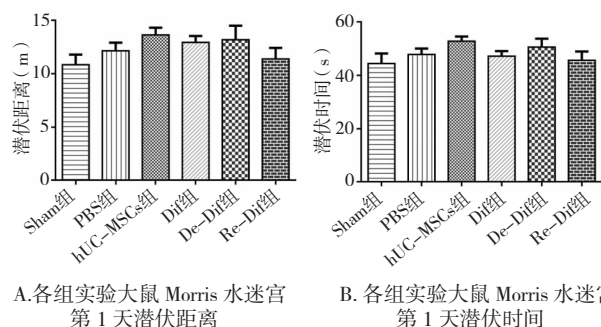
图 3 hUC-MSCs、Dif、De-Dif 及 Re-Dif 4 组细胞全基因表达模式分析

2.4 hUC-MSCs、Dif、De-Dif 及 Re-Dif 移植对 HIBD 模型大鼠学习记忆功能的影响

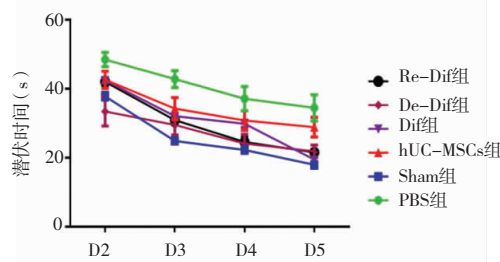
通过 Morris 水迷宫行为学实验,4 种状态 hUC-MSCs 移植对 HIBD 大鼠学习记忆功能的影响如图 4A、B 所示。第 1 天平台测试中,Sham 组($n=9$)、PBS 组($n=17$)、hUC-MSCs 组($n=16$)、Dif 组($n=12$)、De-Dif 组($n=14$)和 Re-Dif 组($n=10$)实验大鼠找到平台所用时间和距离没有统计学差异($P>0.05$),说明各组间具有可比性。第 2~5 天定位航行训练中,6 组大鼠找到平台所用时间均逐渐缩短(图 4C)。4 个细胞移植组中,De-Dif 组找到平台所用时间最短($P=0.000$,De-Dif vs. hUC-MSCs,D2-D5),而 hUC-MSCs、Dif、Re-Dif 3 组间无明显区别。第 6 天平台探索实验中,hUC-MSCs、Dif、De-Dif 及 Re-Dif 4 个细胞移植组均较 PBS 组找到平台次数多,差异具有统计学意义($P=0.000$,hUC-MSCs vs. PBS; $P=0.000$,Dif vs. PBS; $P=0.001$,Re-Dif vs. PBS; $P=0.000$,De-Dif vs. PBS),如图 4D 所示。4 个细胞移植组进行组内比较,发现 De-Dif 较 hUC-MSCs、Dif、Re-Dif 3 组找到平台次数均增多,差异具有统计学意义($P=0.002$,De-Dif vs. hUC-MSCs; $P=0.001$,De-Dif vs. Dif; $P=0.003$,De-Dif vs. Re-Dif)。上述结果表明,hUC-MSCs 以及神经分化、去分化及再分化诱导后,4 种状态的细胞都能促进 HIBD 模型大鼠的空间学习记忆能力恢复,而 De-Dif 则可发挥更明显的神经修复作用。

2.5 hUC-MSCs、Dif、De-Dif 及 Re-Dif 移植对 HIBD 模型大鼠新事物探索能力的影响

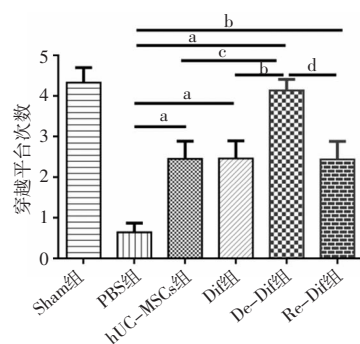
通过 Object-in-place 行为学实验(图 4E),PBS 组($n=8$)大鼠对新事物的探索能力明显低于 Sham 组($n=8$),差异具有统计学意义($P=0.000$,PBS vs. Sham),提示模型建立成功。hUC-MSCs($n=8$)、Dif($n=8$)、De-Dif($n=9$)及 Re-Dif($n=8$)4 个移植组较 PBS 组大鼠对新事物的探索能力明显提高,差异具有统计学意义($P=0.002$,PBS vs. hUC-MSCs; $P=0.002$,PBS vs. Dif; $P=0.000$,PBS vs. De-Dif; $P=0.002$,PBS vs. Re-Dif),但 De-Dif 组具有更明显的探索能力($P=0.017$,De-Dif vs. hUC-MSCs; $P=0.005$,De-Dif vs. Dif; $P=0.025$,De-Dif vs. Re-Dif),提示 De-Dif 移植对 HIBD 模型大鼠促神经修复能力更强。



A. 各组实验大鼠 Morris 水迷宫第 1 天潜伏距离 B. 各组实验大鼠 Morris 水迷宫第 1 天潜伏时间

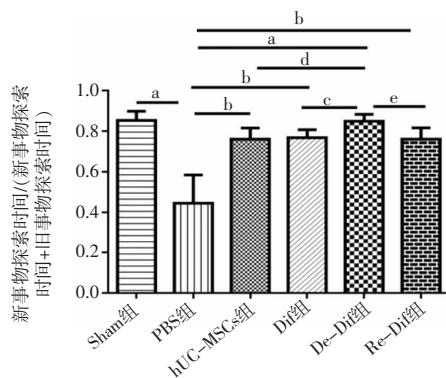


C. 各组实验大鼠 Morris 水迷宫第 2~5 天潜伏时间



注:a,PBS 组与 hUC-MSCs、Dif、De-Dif 组比较, $P=0.000$;b:PBS 组与 Re-Dif 组比较,Dif 组与 De-Dif 组比较, $P=0.001$;c:De-Dif 组与 hUC-MSCs 组比较, $P=0.002$;d:De-Dif 组与 Re-Dif 组比较, $P=0.003$

D. 各组实验大鼠 Morris 水迷宫第 6 天穿越平台次数



注:a,PBS 组与 Sham 组、De-Dif 组比较, $P=0.000$;b:PBS 组与 hUC-MSCs 组、Dif 组、Re-Dif 组比较, $P=0.002$;c:De-Dif 组与 Dif 组比较, $P=0.005$;d:hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.017$;e:De-Dif 组与 Re-Dif 组比较, $P=0.025$

E. 各组实验大鼠 Object-in-place 行为学实验

图 4 行为学实验检测各组实验大鼠空间学习记忆能力及新事物探索能力

2.6 hUC-MSCs、De-Dif 2 组细胞差异基因 GO 生物学功能分析

基因芯片发现 hUC-MSCs、De-Dif 基因表达模式相似,功能学实验发现 De-Dif 具有最大的神经修复作用,为进一步探索 De-Dif 的分子生物学特性及基因功能,通过对 hUC-MSCs、De-Dif 细胞差异基因进行分析,发现一共有 748 个差异基因,对差异基因进行 GO 生物学功能分析(图 5),发现主要参与的生物学功能包括缺氧反应、发育、信号转导、分子功能调节等,而最主要的是对低氧的反应,提示 hUC-MSCs 进行去分化诱导,有众多生物学过程参与,其中最主要的生物学功能是参与缺氧反应,可能与 De-Dif 移植治疗 HIBD 发挥神经修复作用有关。

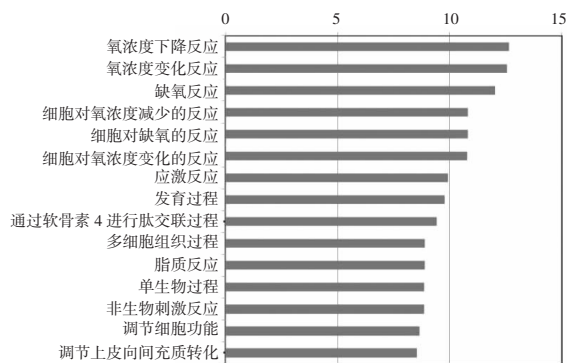


图 5 hUC-MSCs、De-Dif 2 组差异基因 GO 生物学功能分析

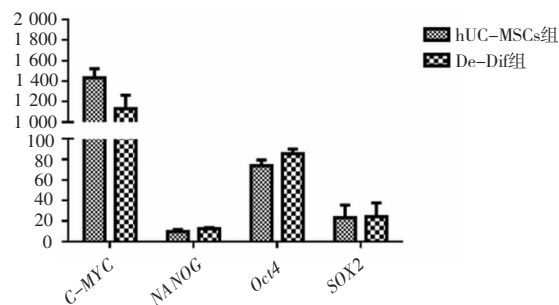
2.7 hUC-MSCs、De-Dif 2 组细胞干性基因表达情况

通过基因芯片对 hUC-MSCs、De-Dif 2 组细胞干性基因表达情况进行分析,发现 hUC-MSCs 与 De-Dif 差异表达干性基因(图 6A)。通过 Real-time PCR 对 hUC-MSCs、De-Dif 2 组细胞干性基因 *C-MYC*、*NANOG*、*Oct4*、*SOX2* 表达情况进行检测(图 6B),发现 De-Dif 组 *C-MYC* 及 *NANOG* 基因表达量高于 hUC-MSCs 组,差异具有统计学意义($P=0.002$, $P=0.021$),但 2 组表达 *Oct4* 和 *SOX2* 基因无统计学差异。通过 Western blot 对 C-MYC 及 NANOG 蛋白表达水平进行验证(图 6C、D),发现 De-Dif 组较 hUC-MSCs 组表达增高($P=0.042$, $P=0.021$),与基因检测结果一致。说明 De-Dif 干性基因 *C-MYC*、*NANOG* 表达升高,提示去分化过程可能促进干性基因重编程高表达,参与其生理功能发挥。

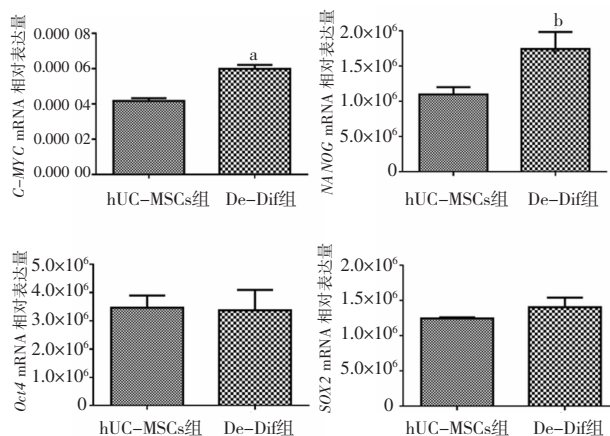
2.8 hUC-MSCs、De-Dif 2 组细胞神经标志物表达情况

通过基因芯片对 hUC-MSCs、De-Dif 2 组细胞神经标志物表达情况进行分析,De-Dif 与 hUC-MSCs 神经标志物差异表达(图 7A)。通过 Real-time PCR 检测(图 7B),De-Dif 组神经标志物 MAP2、NSE、Tau、 β -tubulin III 表达明显高于 hUC-MSCs 组,差异具有统计学意义($P=0.000$, $P=0.017$, $P=0.015$, $P=0.012$)。Western blot 检测结果对 MAP2、NSE 蛋白表达情况进行验证,得到一致的检测结果($P=0.000$, $P=0.033$;图 7C、D),Tau、 β -tubulin III 蛋白表达差异不明显($P>0.05$;图 7C、D)。上述实验结果说明,hUC-MSCs 经去分化诱导后,

神经标志物表达均较未分化 hUC-MSCs 增高,提示 De-Dif 较 hUC-MSCs 具有更大的神经潜能。

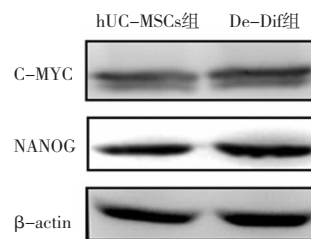


A. 芯片分析 hUC-MSCs、De-Dif 2 组细胞干性基因表达

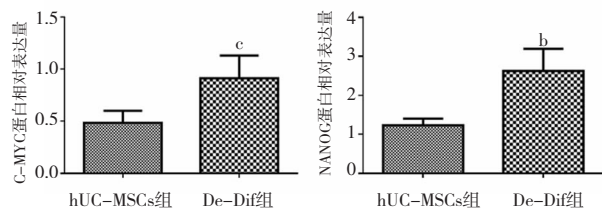


a:hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.002$;b:hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.021$

B. RT-PCR 检测 *C-MYC*、*NANOG*、*Oct4*、*SOX2* 基因表达情况



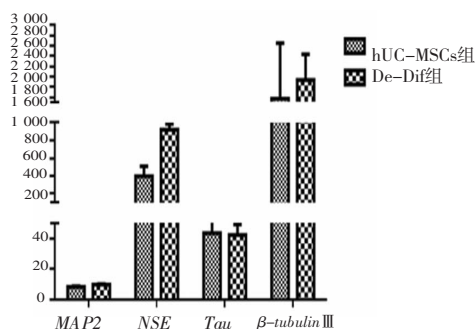
C. Western blot 检测 C-MYC、NANOG 蛋白表达



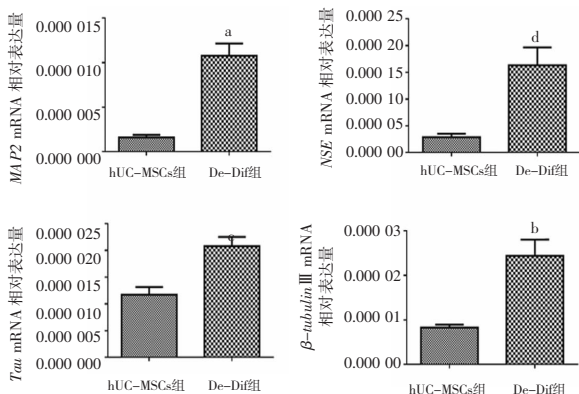
b:hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.021$;c:hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.042$

D. C-MYC、NANOG 蛋白半定量分析

图 6 hUC-MSCs、De-Dif 2 组干性基因表达情况

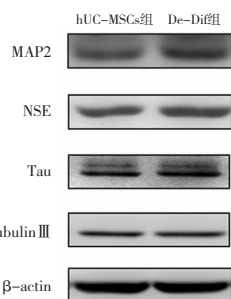


A. 芯片分析 hUC-MSCs、De-Dif 2 组细胞神经标志物表达

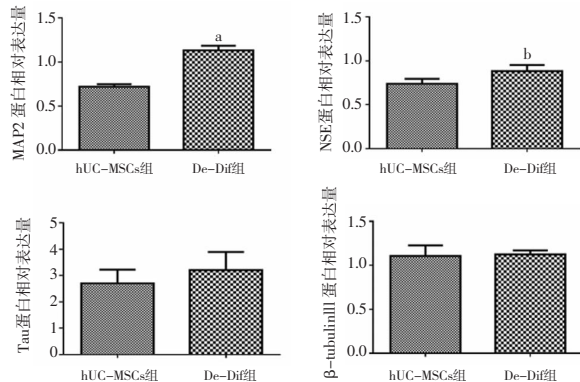


注:a,hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.000$;b:hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.012$;c:hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.015$; d:hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.017$

B. RT-PCR 检测 MAP2、NSE、Tau 和 β-tubulin III 基因表达情况



C. Western blot 检测 MAP2、NSE、Tau 和 β-tubulin III 蛋白表达情况



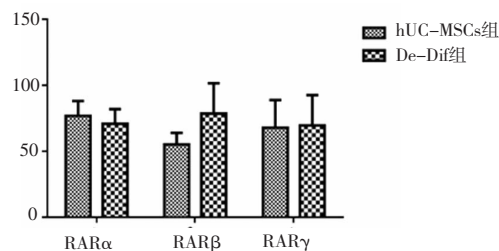
注:a,hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.000$;b:hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.033$

D. MAP2、NSE、Tau 和 β-tubulin III 蛋白半定量分析

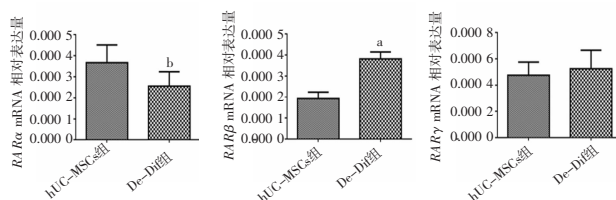
图 7 hUC-MSCs、De-Dif 2 组神经标志物表达情况

2.9 hUC-MSCs、De-Dif 2 组细胞 RARs 表达情况

通过基因芯片对 hUC-MSCs、De-Dif 2 组细胞神经标志物表达情况进行分析,发现 De-Dif 与 hUC-MSCs 差异表达 RARs(图 8A),由此通过 Real-time PCR 验证 RARα、RARβ、RARγ 表达(图 8B),发现 De-Dif 较 hUC-MSCs 差异表达 RARs,RARα 基因在 De-Dif 组表达量低于 hUC-MSCs,差异具有统计学意义($P=0.030$)。RARγ 基因表达在 2 组中无统计学差异。De-Dif 组中 RARβ 表达量明显高于 hUC-MSCs,差异具有统计学意义($P=0.000$)。通过 Western blot 对 RARβ 蛋白水平验证(8C、D),De-Dif 组 RARβ 蛋白高于 De-Dif 组,差异具有统计学意义($P=0.000$),提示 RARβ 可能参与 De-Dif 的生理作用。

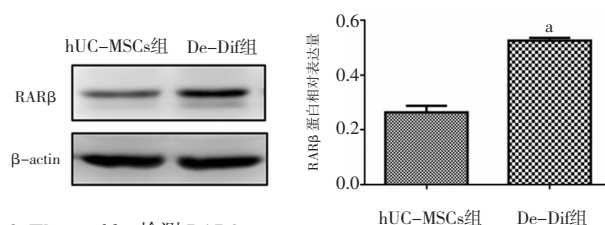


A. 芯片分析 hUC-MSCs、De-Dif 2 组细胞 RARs 表达



注:a,hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.000$;b:hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.030$

B. RT-PCR 检测 RARα、RARβ、RARγ 基因表达情况



C. Western blot 检测 RARβ

蛋白表达情况

注:a,hUC-MSCs 组与 De-Dif 组比较, $P=0.000$

D. RARβ 蛋白半定量分析

图 8 hUC-MSCs、De-Dif 2 组 RARs 表达情况

3 讨论

HIBD 常常是由围产期窒息引起的,可导致胎儿和新生儿智力低下、学习障碍等不可逆的神经损伤^[9],而且已被证明是导致脑瘫儿童发育障碍的主要因素^[10]。HIBD 发病机制是由脑细胞缺氧和缺血引

起的神经元凋亡、免疫、炎症活化等多阶段病理过程^[1],由此产生大脑不可逆的损伤。因此,寻找对神经细胞有效的治疗干预措施,对 HIBD 临床治疗及预后恢复具有重大意义。

hUC-MSCs 是人脐带间充质来源的干细胞,流式细胞鉴定结果表明 hUC-MSCs 具有 hMSCs 细胞表面免疫标志物,并且还具有如下优点:组织来源丰富,容易获取;细胞增殖和分化能力较强;免疫原性低;无伦理学争议。这些优点使 hUC-MSCs 可成为干细胞移植治疗领域的优选种子细胞^[4,12-13]。

本研究运用课题组已成熟建立的 MNM 成神经诱导方法,对 hUC-MSCs 进行神经分化、去分化及再分化诱导,获得 4 种不同状态的 hUC-MSCs,通过表达谱芯片对 4 组细胞全基因表达进行检测,发现 hUC-MSCs 组与 De-Dif 组基因表达模式最接近,而 Dif 组及 Re-Dif 组与 hUC-MSCs 组呈现几乎对立基因表达,提示 hUC-MSCs 在体外诱导后基因进行了重编程调整,表达模式发生了改变,而 De-Dif 的基因表达模式与 hUC-MSCs 最接近。Baer 等^[14]研究团队将人脂肪来源的干细胞进行成上皮细胞分化,通过 Affymetrix U133 plus 2.0 表达谱芯片对其表达水平进行检测,发现诱导分化后细胞基因表达模式会发生很大改变,且有多种表皮相关基因参与,为进一步的机制研究奠定了基础。Alaminos 等^[15]对 hUC-MSCs 进行内皮细胞分化,通过基因芯片分析发现成内皮分化的细胞基因表达模式与 hUC-MSCs 表达不同,在内皮分化过程中与内皮表型和结构相关的基因表达上调,说明 hUC-MSCs 内皮分化是向更成熟细胞发展的过程。

较多研究发现 hUC-MSCs 移植可促进 HIBD 神经修复,其作用机制可能与 hUC-MSCs 神经分化潜能有关,但其体内存活率低、作用时间短暂等缺点迫切需求寻找新的种子细胞。本研究将 4 种状态的细胞移植入 HIBD 大鼠体内,通过 2 项行为学实验,发现 4 种状态的 hUC-MSCs 均具有神经保护作用,但 hUC-MSCs 组、Dif 组和 Re-Dif 组 3 组实验大鼠在空间学习记忆能力和新事物探索能力上十分相似,无统计学差异,而 De-Dif 发挥出明显的神经修复潜能。去分化是指分化成熟的细胞从相对高分化的状态回复到低分化的状态,是组织再生修复的理想途径^[16-17]。Zhang 等^[18]研究发现去分化心肌细胞可以显著增加模型小鼠的左心功能。Liu 等^[8]研究发现成神经分化的 MSCs 可成功去分化为类干细胞(De-MSCs),发现 De-MSCs 移植较 MSCs 移植具有更大的神经保护作用,提示经去分化诱导后的细胞在治

疗神经系统疾病中具有更明显优势。这不禁让课题组思考 De-Dif 发挥更大神经修复潜能的原因。

前面的研究发现 De-Dif 具有与 hUC-MSCs 最相似的基因表达模式,功能学实验发现 De-Dif 具有最大的神经修复作用,为进一步探讨其生物学功能及作用机制,本研究进行了 GO 功能分析,发现 De-Dif 最主要的生物功能是参与低氧反应,这就可能与 De-Dif 移植提高 HIBD 大鼠空间学习记忆功能和新事物探索功能、增强神经修复能力有关。有研究认为低氧可以导致干细胞甚至正常细胞逆分化^[19-20],提示逆分化过程可能本身就涉及低氧信号通路。因此,De-Dif 移植较 hUC-MSCs 移植发挥更大促 HIBD 学习记忆功能恢复作用,是否通过 De-Dif 参与缺氧反应来发挥作用需要后续研究进一步证实。

进一步对 2 组细胞干性基因进行检测,发现 De-Dif 干性基因 *C-MYC*、*NANOG* 表达升高。研究发现,*C-MYC*、*Oct4*、*SOX2* 等干性基因与细胞去分化、重编程有关^[21]。Li 等^[22]将造血细胞去分化诱导后,发现其可表达 *Oct4*、*NANOG*、*SOX2* 等干性标志物。对 hUC-MSCs 及 De-Dif 2 组细胞神经分化潜能进行检测,通过基因及蛋白水平检测神经标志物 *MAP2*、*NSE*、*Tau* 及 β -*tubulin III* 表达情况,发现 De-Dif 较 hUC-MSCs 高表达 *MAP2*、*NSE*、*Tau* 及 β -*tubulin III*,提示 De-Dif 具有更大的神经潜能。Zhang 等^[23]报道,将人牙龈来源的 MSCs(GMSCs)去分化为多能干细胞 iNPCs 后,去分化的 iNPCs 可以成神经分化为神经元样细胞,通过促进损伤部位神经再生,较 GMSCs 发挥更大促损伤愈合能力。这些实验结果提示重编程调控 De-Dif 高表达干性基因及神经标志物。

视黄酸核受体(retinoic acid receptor,RARs)包括 α 、 β 及 γ 3 个亚类,它们在胚胎发育、神经再生及神经系统功能维持中具有重要作用。研究指出,RARs 在干细胞重编程中具有重要作用。Wang 等^[24]研究发现,体细胞去分化为多能干细胞的过程中,促进 RARs 表达会显著促进重编程,而抑制 RARs 表达则会完全阻断重编程作用。Hou 等^[25]研究发现,RAR α 可介导去分化重编程多能干细胞发挥生理功能。而 Yang 等^[26]报道,在诱导胚胎成纤维细胞向胚胎干样细胞去分化过程中,RAR γ 通过重编程机制促进 *Oct4*、*Myc*、*klf4*、*SOX2* 等干性基因表达。因此,本研究对 hUC-MSCs 及 De-Dif 2 组细胞 RARs 表达进行检测及分析,发现差异表达 RARs 基因,而 RAR β 是表达差异最大的 RARs,结合文献报道,提示 RAR β 可能参与 De-Dif 基因重编程调控,促

进 De-Dif 干性基因 *C-MYC*、*NANOG* 及神经标志物 NSE、MAP2、Tau、 β -tubulin III 表达。因此,下一步实验拟对 RAR β 进行研究,验证 RAR β 重编程调控干性基因及神经标志物表达这一实验推测,并对其促进 HIBD 神经修复机制进行正反向研究,深入分子机制明确作用机制,为 De-Dif 作为移植种子细胞奠定基础。

综上所述,本研究通过体外培养及诱导获得 hUC-MSCs、神经分化 hUC-MSCs、神经去分化 hUC-MSCs 及神经再分化 hUC-MSCs 4 种状态的 hUC-MSCs,移植治疗 HIBD 模型大鼠后,发现去分化 hUC-MSCs 具有最大的神经保护作用,进一步探讨发现去分化过程可能通过重编程调控神经标志物基因 *MAP2*、*NSE*、*Tau*、 β -tubulin III,以及干性基因 *C-MYC*、*NANOG*、*RAR β* 表达,促进 De-Dif 参与 HIBD 神经修复。

参 考 文 献

- [1] Nair J, Kumar V. Current and emerging therapies in the management of hypoxic ischemic encephalopathy in neonates[J]. *Children*, 2018, 5(7):E99.
- [2] Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, et al. Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data[J]. *BMJ*, 2010, 340: c363.
- [3] Shankaran S, Pappas A, McDonald SA, et al. Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(22):2085–2092.
- [4] Zhang X, Zhang Q, Li W, et al. Therapeutic effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells on neonatal rat hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *J Neurosci Res*, 2014, 92(1):35–45.
- [5] Zhou X, Gu J, Gu Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improve learning and memory function in hypoxic-ischemic brain-damaged rats via an IL-8-mediated secretion mechanism rather than differentiation pattern induction[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(6):2383–2401.
- [6] Liu X, Ye R, Yan T, et al. Cell based therapies for ischemic stroke: from basic science to bedside[J]. *Progr Neurobiol*, 2014, 115:92–115.
- [7] Bi Y, Gong M, He Y, et al. AP2 α transcriptional activity is essential for retinoid-induced neuronal differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 46:148–160.
- [8] Liu Y, Jiang X, Zhang X, et al. Dedifferentiation-reprogrammed mesenchymal stem cells with improved therapeutic potential[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(12):2077–2089.
- [9] Brekke EM, Morken TS, Widerøe M, et al. The pentose phosphate pathway and pyruvate carboxylation after neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34(4):724–734.
- [10] Bonifacio SL, Glass HC, Peloquin S, et al. A new neurological focus in neonatal intensive care[J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(9):485–494.
- [11] Liu XM, Feng Y, Li AM. Nerve protective effect of Baicalin on newborn HIBD rats[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(10):806–810.
- [12] Li M, Zhang SZ, Guo YW, et al. Human umbilical vein-derived dopaminergic-like cell transplantation with nerve growth factor ameliorates motor dysfunction in a rat model of parkinson's disease[J]. *Neurochem Res*, 2010, 35(10):1522–1529.
- [13] Nagamurainoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: their advantages and potential clinical utility[J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(2):195–202.
- [14] Baer PC, Döring C, Hansmann ML, et al. New insights into epithelial differentiation of human adipose-derived stem cells[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(4):271–278.
- [15] Alaminos M, Pérez-Köhler B, Garzón I, et al. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(3):640–647.
- [16] Pesaresi M, Sebastian-Perez R, Cosma MP. Dedifferentiation, transdifferentiation and cell fusion: in vivo reprogramming strategies for regenerative medicine[J]. *FEBS J*, 2019, 286(6):1074–1093.
- [17] Eguizabal C, Montserrat N, Veiga A, et al. Dedifferentiation, transdifferentiation, and reprogramming: future directions in regenerative medicine[J]. *Semin Reprod Med*, 2013, 31(1):82–94.
- [18] Zhang Y, Zhong JF, Qiu H, et al. Epigenomic reprogramming of adult cardiomyocyte-derived cardiac progenitor cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:17686.
- [19] Wiafe B, Adesida A, Churchill T, et al. Hypoxia-increased expression of genes involved in inflammation, dedifferentiation, pro-fibrosis, and extracellular matrix remodeling of human bladder smooth muscle cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2017, 53(1):58–66.
- [20] Wang P, Wan WW, Xiong SL, et al. Cancer stem-like cells can be induced through dedifferentiation under hypoxic conditions in glioma, hepatoma and lung cancer[J]. *Cell Death Discov*, 2017, 3:16105.
- [21] Wang X, Yang Y, Huycke M. Commensal-infected macrophages induce dedifferentiation and reprogramming of epithelial cells during colorectal carcinogenesis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60):102176–102190.
- [22] Li Y, Adomat H, Guns ET, et al. Identification of a hematopoietic cell dedifferentiation-inducing factor[J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(6):1350–1363.
- [23] Zhang Q, Nguyen P, Xu Q, et al. Neural progenitor-like cells induced from human gingiva-derived mesenchymal stem cells regulate myelination of schwann cells in rat sciatic nerve regeneration[J]. *Stem Cells Trans Med*, 2016, 6(2):458–470.
- [24] Wang W, Yang J, Liu H, et al. Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1[J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2011, 108(45):18283–18288.
- [25] Hou PS, Huang WC, Chiang W, et al. Impaired neural differentiation potency by retinoic acid receptor- α pathway defect in induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Reprogram*, 2014, 16(6):467–476.
- [26] Yang J, Wang W, Ooi J, et al. Signalling through retinoic acid receptors is required for reprogramming of both mouse embryonic fibroblast cells and epiblast stem cells to induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(5):1390–1404.

(责任编辑:张辉洁)