

论著·实验研究

## 脐血单个核细胞移植联合高压氧治疗对 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的影响

马泽<sup>1</sup> 闫少珍<sup>1</sup> 王晓莉<sup>1</sup> 陈伟<sup>1</sup> 曹向昱<sup>2</sup> 董鹏<sup>1</sup> 赵岩松<sup>3</sup>

(潍坊医学院 1. 医学影像学系; 2. 临床医学专业 2011 级; 3. 临床学院眼科, 山东 潍坊 261053)

**[摘要]** **目的** 观察脐血单个核细胞(UCBMC)联合高压氧(HBO)治疗对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠远期行为学及组织学的影响。**方法** 7日龄 Sprague-Dawley 新生大鼠随机分为正常对照组、缺氧缺血性脑损伤(HIBD)组、UCBMC 移植组及 UCBMC 联合 HBO(UCBMC+HBO)组。采用 Rice 法制成 HIBD 模型。HBO 于造模 3 h 进行,造模后 24 h 行 UCBMC 移植。采用 Western blot 法观察联合治疗对 HIBD 大鼠脑内 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白的影响,采用 T 迷宫、放射性迷宫试验及尼氏染色法,观察联合治疗对 HIBD 大鼠远期行为学及 HIBD 大鼠脑海马 CA1 区组织学的影响。**结果** 移植后 24 h,UCBMC+HBO 组大鼠脑内 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白的表达水平均显著低于 HIBD 组与 UCBMC 组( $P<0.05$ )。HIBD 组学习记忆及运动能力均减退,海马 CA1 区锥体细胞数减少,UCBMC+HBO 组大鼠学习记忆及运动能力均较 UCBMC 组及 HIBD 组有改善,海马 CA1 区锥体细胞数显著多于 UCBMC 组及 HIBD 组( $P<0.05$ )。**结论** UCBMC 联合 HBO 治疗可减轻 HIBD 新生大鼠 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白的表达,促进脑损伤的修复并改善远期行为学。**[中国当代儿科杂志, 2015, 17(7): 736-740]**

**[关键词]** 脐血单个核细胞; 缺氧缺血性脑损伤; 高压氧; 新生大鼠

## Effects of umbilical cord mononuclear cells transplantation combined with hyperbaric oxygen therapy on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats

MA Ze, YAN Shao-Zhen, WANG Xiao-Li, CHEN Wei, CAO Xiang-Yu, DONG Peng, ZHAO Yan-Song. Department of Medical Imaging, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China (Wang X-L, Email: wxlpine@163.com)

**Abstract: Objective** To study the effects of umbilical cord mononuclear cells (UCBMC) transplantation combined with hyperbaric oxygen (HBO) therapy on the long-term behaviors and histology in neonatal rats after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly assigned to four groups: normal control (CON), HIBD, UCBMC and UCBMC+HBO. HIBD was induced according to the Rice-Vannucci method. The rats in the UCBMC+HBO group were treated with HBO 3 hours after HIBD, followed by UCBMC transplantation 24 hours after HIBD. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  protein levels were examined by Western blot analysis in the 4 groups. T-maze test and radial arm maze test were used to detect the long-term learning memory capability. Nissl staining was used to examine the histological changes of the hippocampal CA1 region. **Results** Twenty-four hours after transplantation, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  protein levels in the UCBMC+HBO group were significantly reduced compared with the HIBD ( $P<0.01$ ) and UCBMC groups ( $P<0.05$ ). The study and memory capabilities were impaired, and the number of the pyramidal cells in the hippocampal CA1 region was reduced in the HIBD group. The study and memory capabilities were greatly improved and the number of pyramidal cells increased significantly in the UCBMC+HBO group compared with the UCBMC and HIBD groups ( $P<0.05$ ). **Conclusions** UCBMC transplantation combined with HBO therapy could reduce the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  protein, improve long-term behaviors and alleviate brain damages in the hypoxic ischemic neonatal rats. **[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(7): 736-740]**

**Key words:** Umbilical cord blood mononuclear cell; Hypoxic-ischemic brain damage; Hyperbaric oxygen; Neonatal rat

**[收稿日期]** 2015-02-17; **[接受日期]** 2015-06-13

**[基金项目]** 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(2013WS0295)。

**[作者简介]** 马泽,男,在读本科。

**[通信作者]** 王晓莉,女,教授。

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿科严重的疾病,威胁着新生儿的生命<sup>[1]</sup>,寻找其有效的治疗方案具有重要意义。细胞移植与高压氧(HBO)治疗是目前HIE比较有希望的两种治疗方案。近年来,脐血库的兴起为细胞治疗提供了新的来源,研究发现脐血单个核细胞(umbilical cord mononuclear cells, UCBMC)脑内移植可存活,并减轻新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)<sup>[2]</sup>,但不能完全抑制脑组织损伤。研究还发现HBO不仅可减轻HIBD<sup>[3]</sup>,且可改善损伤神经组织的微环境,抑制免疫炎症反应,促进细胞移植<sup>[4-5]</sup>,本课题组在前期工作中发现UCBMC移植可减轻新生大鼠HIBD程度,其疗效显著优于单纯介质组<sup>[6]</sup>。那么UCBMC联合HBO治疗是否可改善UCBMC移植的疗效呢?目前该方面的研究报道甚少。故本研究采用UCBMC联合HBO治疗新生大鼠HIBD,并观察其对远期行为学、组织学的影响并探讨其对炎症因子白介素1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )蛋白的影响及机制,以期HIBD的治疗选择最佳的治疗方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

健康7日龄Sprague-Dawley(SD)新生大鼠(清洁级,由山东省中医药大学提供并批准使用),雌雄不限,体重12.1~15.6 g,平均 $13.9 \pm 1.6$  g,随机分为4组:(1)正常对照组,不做任何处理;(2)缺氧缺血性脑损伤组(HIBD组);(3)UCBMC组(HIBD后24 h单纯移植UCBMC);(4)UCBMC+HBO组(HIBD后3 h,行HBO治疗,HIBD后24 h移植UCBMC);各组分别于移植后24 h、28 d处死大鼠。

### 1.2 主要试剂与设备

人全血单个核细胞分离液购自天津TBD公司;IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 抗体购自美国Santa Cruz公司;常压氧舱(武汉七〇一研究所);婴儿高压氧舱(武汉七〇一研究所);大鼠脑立体定位仪(深圳瑞奥德公司);5  $\mu$ L微量注射器(上海生物工程有限公司);正置荧光显微镜(日本OLYMPUS公司);

石蜡切片机(英国Shanton公司);电子分析天平(美国梅特勒公司);放射性迷宫(DL-REB,中国东乐公司)、T迷宫(DL-RTM,中国东乐公司)。

### 1.3 HIBD模型的制作

采用经典Rice-Vannucci方法<sup>[7]</sup>制成HIBD模型,乙醚吸入麻醉,颈部正中切口,分离左侧颈总动脉双线结扎,并在结扎中间剪断,后置于 $8.00\% \pm 0.01\%$ 低氧舱内缺氧2 h,舱内温度控制在 $36.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ ,湿度为 $70\% \pm 5\%$ 。实验结束后,将大鼠放回鼠笼,由母鼠喂养。正常对照组不做任何处理。

### 1.4 HBO治疗

HIBD后3 h内,UCBMC+HBO组大鼠行HBO治疗,每日治疗1次,连续治疗7 d,方法如下:

- (1)洗舱:纯氧洗舱15 min,流量10 L/min;
- (2)升压:纯氧升压15~20 min,流量为5~8 L/min;
- (3)稳压:2个绝对大气压稳压治疗60 min,监测氧气浓度不低于85%;
- (4)减压:匀速减压,20~30 min内减压完毕<sup>[8]</sup>。

### 1.5 UCBMC的采集、分离与移植

经足月孕妇知情并同意,采集脐血约50 mL,0.01 mol/L灭菌磷酸盐缓冲液等体积稀释,灭菌试管中先加入人单个核细胞分离液,缓慢加入稀释血(稀释血与单个核细胞分离液的体积比约为2:1),2000 r/min离心20 min,吸取中间白膜层的单个核细胞。生理盐水洗涤并制成单个核细胞悬液,置冰上备用。造模后24 h,UCBMC组与UCBMC+HBO组大鼠分别置于大鼠立体定位仪上,左侧侧脑室(AP: -0.5 mm, ML: -2 mm, DV: -2 mm)注入UCBMC悬液,每只大鼠注入 $3 \times 10^6$ 个/ $2 \mu$ L活细胞,缓慢注入,留针5 min,拔针缝合头皮,复温苏醒后回笼饲养。

### 1.6 Western blot法检测IL-1 $\beta$ 与TNF- $\alpha$ 蛋白的表达

移植24 h<sup>[9]</sup>,断头取脑处死各组大鼠( $n=8$ ),每只大鼠取左脑前囟前1.0~-4.5 mm脑组织,立即放入液氮研磨,加入全细胞裂解液提取总蛋白,采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,取60  $\mu$ g蛋白,10%的聚丙烯酰胺分离胶分离,电压300 V,湿转膜1 h,50 g/L的脱脂奶粉室温封闭1~2 h,分别加入IL-1 $\beta$ (1:1000)、TNF- $\alpha$ (1:2000)、GAPDH(1:1000)一抗,4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。洗膜后,加入相

应的二抗室温孵育 2 h, 采用 ECL 化学发光试剂盒显影, 曝光, 扫描, 凝胶成像系统分析目的蛋白的光密度值, 计算其与相应 GAPDH 光密度值的比值并行统计学分析。

### 1.7 T 迷宫试验

自 22 日龄起进行 T 迷宫测试 ( $n=8$ ), 左右两臂的末端放置约 40 mg 的食物。测试分为预备和测试两个阶段。预备阶段时, 训练大鼠在 T 迷宫的一臂觅食后, 15 s 后需进入另一臂觅食, 觅食适应 2 d 后, 进入正式测试。每只动物每日测试 5 次, 每次间隔 15 min, 连续 4 d, 并记录每日测试的正确率。

### 1.8 空间学习记忆能力放射性迷宫测试

自 30 日龄起, 进行放射性迷宫测试 ( $n=8$ )。测试前禁水 48 h, 仅傍晚饮水 30 min。开始 2 d 在每个臂的孔内都放 50  $\mu$ L 水, 让动物在迷宫内自由觅水。空间测试时在 3 个相邻角度分别为 135°、90° 和 135° 的臂内加水, 每天测试 5 次, 每次间隔 1 min, 连续测试 3 d, 每次测试时, 大鼠放在迷宫中央面朝固定的第 3 臂, 3 个臂的水都被找到时实验结束, 记录找到 3 个臂的水所花的时间以及记忆错误的次数 (即进入没有水的臂的次数)<sup>[10]</sup>。

### 1.9 Nissl 染色

移植后 4 周, 各组大鼠常规灌注后取脑 ( $n=8$ ), 常规包埋并制成脑组织石蜡切片, 脱腊至水。0.1% 甲苯胺蓝 60℃ 孵育 1 min, 水洗, 70%、80% 乙醇脱水各 1 min, 95% 酒精镜下分化, 直至细胞核及其背景均为淡蓝或无色, 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。采用 Cellsens 16.0 分析软件, 计数损伤侧海马 CA1 区单位面积锥体细胞数。

### 1.10 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析, 所有计量资料用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 方差齐性资料采用单因素方差分析, 组间比较采用 SNK- $q$  检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IL-1 $\beta$ 与 TNF- $\alpha$ 蛋白的 Western blot 结果

移植后 24 h, 各组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白表达

差异均有统计学意义 ( $F$  值分别为 31.0 和 70.99, 均  $P<0.01$ )。其中 HIBD 组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白表达水平明显高于对照组, 差异有统计学意义 (均  $P<0.01$ ); UCBMC 组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白表达水平明显低于 HIBD 组 (均  $P<0.01$ ), 但仍高于对照组 (均  $P<0.01$ ); UCBMC+HBO 组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  蛋白表达水平明显低于 HIBD 组及 UCBMC 组 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), 但仍明显高于对照组 ( $P<0.05$ )。见图 1。

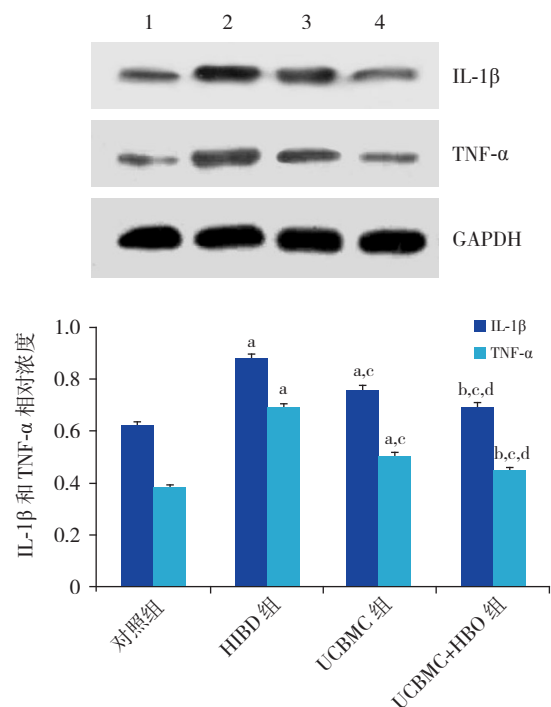


图1 UCBMC 联合 HBO 治疗对 HIBD 大鼠脑 IL-1 $\beta$  与 TNF- $\alpha$  蛋白的影响 上图为电泳条带结果: 1 为对照组, 2 为 HIBD 组, 3 为 UCBMC 组, 4 为 UCBMC+HBO 组。下图为统计结果: a 示与对照组比较,  $P<0.01$ ; b 示与对照组比较,  $P<0.05$ ; c 示与 HIBD 组比较,  $P<0.01$ ; d 示与 UCBMC 组比较,  $P<0.05$ 。

### 2.2 T 迷宫测试结果

在连续 4 d 测试中, 对照组、UCBMC 组、UCBMC+HBO 组的正确率逐渐增高, 而 HIBD 组正确率上升不明显; 测试第 4 d 时 UCBMC 组正确率较 HIBD 组明显提高 ( $P<0.01$ ), 但仍低于对照组 ( $P<0.01$ ), UCBMC+HBO 组正确率明显高于 HIBD 组及 UCBMC 组 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), 但仍低于对照组 ( $P<0.05$ )。见图 2。

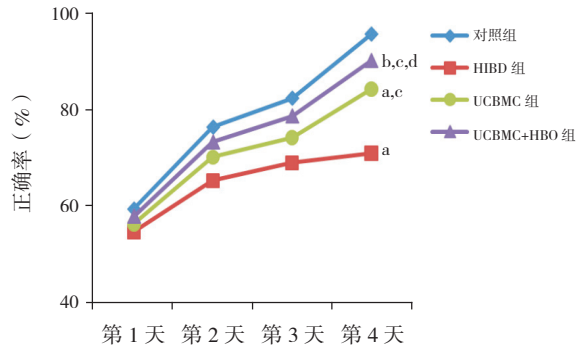


图2 各组T迷宫实验结果 a示与对照组比较,  $P<0.01$ ; b示与对照组比较,  $P<0.05$ ; c示与HIBD组比较,  $P<0.01$ ; d示与UCBMC组比较,  $P<0.05$ 。

### 2.3 放射性迷宫觅水测试结果

HIBD组大鼠觅水时间 ( $147 \pm 13$  s) 显著长于对照组 ( $102 \pm 9$  s), 而错误次数 ( $14.0 \pm 1.2$ ) 显著高于对照组 ( $9.7 \pm 1.0$ ) (均  $P<0.01$ )。UCBMC组觅水时间 ( $122 \pm 10$  s) 较HIBD组显著减少 ( $P<0.01$ ), 仍高于对照组 ( $P<0.01$ ), 其错误

次数 ( $12.0 \pm 1.2$ ) 显著高于对照组 ( $P<0.01$ ), 但仍低于HIBD组 ( $P<0.01$ )。UCBMC+HBO组觅水时间 ( $111 \pm 10$  s) 较HIBD组及UCBMC组均明显减少 (均  $P<0.01$ ), 但仍明显高于对照组 ( $P<0.05$ ); 其错误次数 ( $10.8 \pm 1.1$ ) 较HIBD组及UCBMC组均减少 (均  $P<0.01$ ), 但仍明显高于对照组 ( $P<0.05$ )。见图3。

### 2.4 海马CA1区尼氏染色结果

对照组海马CA1区锥体细胞排列整齐, 形态规则, 尼氏体呈大颗粒, 且数量较多; 而HIBD组损伤侧海马CA1区锥体细胞排列不整齐, 形态不规则, 神经元数目明显低于对照组 ( $P<0.01$ ); UCBMC组损伤侧海马CA1区锥体细胞排列较整齐, 神经元数目高于HIBD组 ( $P<0.01$ ), 但仍低于对照组 ( $P<0.01$ ); UCBMC+HBO组损伤侧海马CA1区锥体细胞胞浆中尼氏体清晰可见, 神经元数目显著多于UCBMC组 ( $P<0.05$ ) 及HIBD组 ( $P<0.01$ ), 但仍低于对照组 ( $P<0.05$ )。见图4。

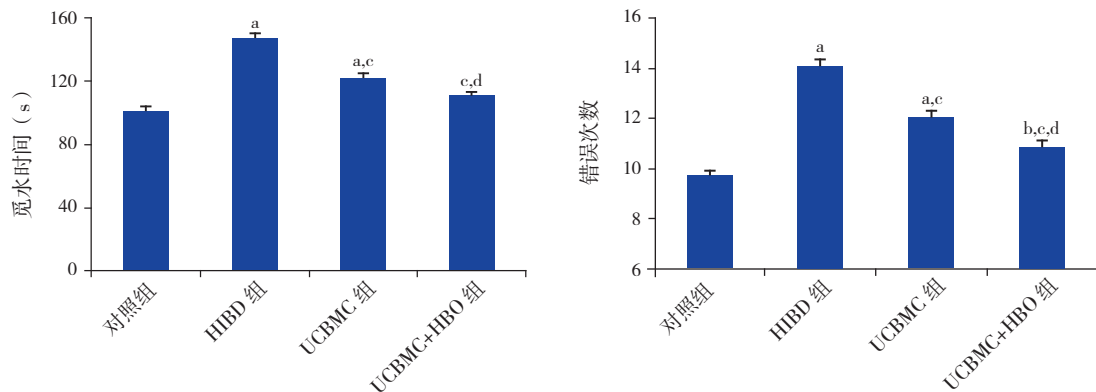


图3 各组放射性迷宫实验觅水时间 (左) 及错误次数 (右) 比较 a示与对照组比较,  $P<0.01$ ; b示与CON组比较,  $P<0.05$ ; c示与HIBD组比较,  $P<0.01$ ; d示与UCBMC组比较,  $P<0.01$ 。

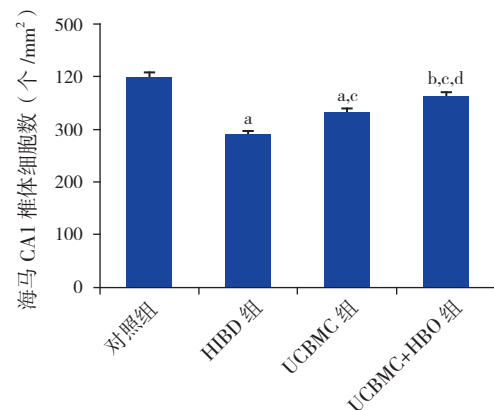
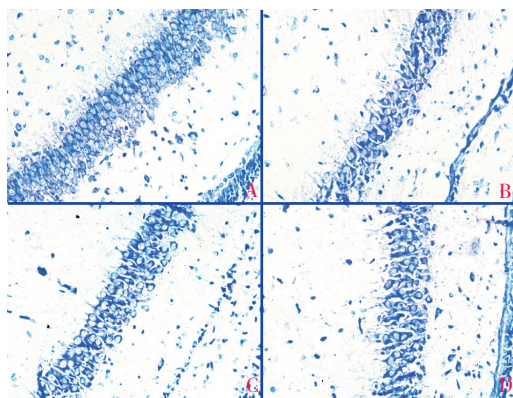


图4 各组损伤侧海马CA1区锥体细胞数比较 左图为尼氏染色图 ( $\times 400$ ): A: 对照组; B: HIBD组; C: UCBMC组; D: UCBMC+HBO组。右图为统计图: a示与对照组比较,  $P<0.01$ ; b示与对照组比较,  $P<0.05$ ; c示与HIBD组比较,  $P<0.01$ ; d示与UCBMC组比较,  $P<0.05$ 。

### 3 讨论

近年来多数研究表明新生儿缺氧缺血后急性炎症反应是导致 HIBD 的重要原因,减轻炎症反应是 HIBD 治疗的关键所在。UCBMC 含有许多未成熟的干细胞,不仅具有自我更新与向神经细胞分化的潜能,而且可以减轻炎症反应<sup>[11]</sup>。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  与新生儿缺氧缺血后炎症反应的发生密切相关,本研究发现 HIBD 新生大鼠 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白表达明显增加,这与文献报道一致<sup>[12]</sup>,而 UCBMC 移植后 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白表达降低,但仍高于对照组,提示 UCBMC 可减轻炎症反应,但不能完全抑制 HIBD 新生大鼠的炎症反应。另外本研究发现 UCBMC 可以改善 HIBD 大鼠的远期行为学及组织学损伤,但不能完全治愈 HIBD,因此,寻求一种新的治疗方案改善 UCBMC 的治疗效果是本研究的重点。

HBO 用于治疗新生儿 HIBD 已有多年的历史,研究发现 HBO 治疗可减轻损伤脑组织的免疫炎症反应<sup>[13-14]</sup>,改善脑内微环境促进细胞移植,本研究采用 UCBMC 联合 HBO 治疗 HIBD,发现 UCBMC+HBO 组大鼠脑内 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白的表达明显低于 HIBD 组与 UCBMC 组,说明 UCBMC 联合 HBO 治疗显著优于单纯 UCBMC 治疗。同时本研究还发现 UCBMC 与 UCBMC 联合 HBO 组均可显著改善 HIBD 大鼠的远期行为学,且 HBO 联合 UCBMC 治疗的疗效显著高于单纯 UCBMC 组;尼氏染色结果也提示 UCBMC 联合 HBO 治疗可减轻海马 CA1 区锥体细胞损伤,促进组织修复,其疗效优于单纯 UCBMC 治疗。

综上,UCBMC 联合 HBO 治疗可抑制 HIBD 新生大鼠 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白的表达,促进 HIBD 大鼠损伤侧海马锥体细胞的修复并改善其远期行为学,优于单纯 UCBMC 移植,有望成为 HIBD 治疗的新方案。但是由于经费所限,本研究未设计单纯 HBO 治疗组,亦未进行单纯 HBO 治疗组与 UCBMC+HBO 组的比较,因此,关于是否 UCBMC 联合 HBO 治疗优于单纯 HBO 治疗有待于进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Gill MB, Bockhorst K, Narayana P, et al. Bax shuttling after neonatal hypoxia-ischemia: hyperoxia effects[J]. J Neurosci Res, 2008, 86(16): 3584-3604.
- [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[J]. Brain Res, 2013, 1518: 26-35.
- [3] Yang YJ, Wang XL, Yu XH, et al. Hyperbaric oxygen induces endogenous neural stem cells to proliferate and differentiate in hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J]. Undersea Hyperb Med, 2008, 35(2): 113-129.
- [4] Wang Y, Zhang S, Luo M, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves local microenvironment after spinal cord injury[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(24): 2182-2188.
- [5] Qian L, Shen J, Zhao D, et al. Successful treatment of hemorrhagic cystitis after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation by hyperbaric oxygen[J]. Transplantation, 2014, 97(7): e41-e42.
- [6] 王晓莉,赵岩松,徐敏,等.脐血单个核细胞移植对 HIBD 新生大鼠内源性神经干细胞的影响[J].中华小儿外科杂志, 2010, 31(1): 63-65.
- [7] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131-141.
- [8] 王晓莉,杨于嘉,谢岷,等.高压氧治疗促进 HIBD 新生大鼠内源性神经干细胞的迁移与分化[J].中国当代儿科杂志, 2009, 11(9): 749-752.
- [9] Wang X, Zhang J, Si D, et al. Progesterone inhibits the expression of cyclooxygenase-2 and interleukin-1 $\beta$  in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage[J]. Int J Neurosci, 2014, 124(1): 42-48.
- [10] Wang XL, Zhao YS, Yang YJ, et al. Therapeutic window of hyperbaric oxygen therapy for hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats[J]. Brain Res, 2008, 1222: 87-94.
- [11] Zhu Y, Guan YM, Huang HL, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation suppresses inflammatory responses and neuronal apoptosis during early stage of focal cerebral ischemia in rabbits[J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(5): 585-591.
- [12] Stigger F, Lovatel G, Marques M, et al. Inflammatory response and oxidative stress in developing rat brain and its consequences on motor behavior following maternal administration of LPS and perinatal anoxia[J]. Int J Dev Neurosci, 2013, 31(8): 820-827.
- [13] Chen LF, Tian YF, Lin CH, et al. Repetitive hyperbaric oxygen therapy provides better effects on brain inflammation and oxidative damage in rats with focal cerebral ischemia[J]. J Formos Med Assoc, 2014, 113(9): 620-628.
- [14] Lee YS, Chio CC, Chang CP, et al. Long course hyperbaric oxygen stimulates neurogenesis and attenuates inflammation after ischemic stroke[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 512978.

(本文编辑:王庆红)