

低氧预处理骨髓间充质干细胞移植治疗 大鼠急性脊髓损伤的实验研究

孟庆溪^{1,2}, 王伟恒¹, 孟庆美³, 孙子杰¹, 罗盛昌¹, 余将明¹, 席焱海¹, 叶晓健¹

(1 第二军医大学附属长征医院脊柱微创中心 200003 上海市; 2 济南军区总院骨科 250031 济南市;

3 泰安市中心医院儿科 271000 泰安市)

【摘要】目的:研究低氧预处理骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)移植对大鼠急性脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)治疗效果的影响并探讨其可能的机制。**方法:**转绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的 SD 大鼠 10 只, 体重 55.6 ± 4.2 (50~60)g, 通过改良全骨髓贴壁法从大鼠骨髓中分离培养大鼠 BMSCs 并进行细胞纯度和分化能力鉴定。应用 0、10、50、100、200 和 $300 \mu\text{M}$ 的二氯化钴(CoCl_2)低氧预处理 BMSCs 后, 通过 CCK-8 法检测低氧对细胞增殖的影响, 细胞血清剥夺培养 0、6、12 和 24h 后, 流式细胞法检测血清剥夺对细胞凋亡的影响, Transwell 法检测低氧对 BM-SCs 培养 6、12、24h 后细胞迁移的影响, 流式细胞法检测低氧对细胞凋亡的影响, PCR 法检测相关分子通路, 找出合适的低氧处理条件。体内实验, 使用 Allen 法垂直打击建立 SCI 模型, 实验分为 A 组(假手术组)、B 组(对照组)、C 组(BMSCs 组)和 D 组(H-BMSCs 组)($n=20$)。A 组的大鼠进行外科手术, 但不锤击脊髓, B、C 和 D 组均进行锤击脊髓行 SCI 造模和蛛网膜下腔注射生理盐水和低氧预处理前后的 BMSCs。通过术前、术后 1、3、7、10、14、21、28 天 BBB 评分研究大鼠的神经功能恢复, 术后 72h 免疫荧光染色法确定移植细胞的存活情况和小胶质细胞激活情况, 术后 72h 和 28d HE 染色评估脊髓组织病理损伤情况。**结果:**CCK-8 结果表明 CoCl_2 浓度越高对 BMSCs 增殖能力抑制越大, $100 \mu\text{M}$ CoCl_2 培养 24h 可以明显降低 BMSCs 增殖($P<0.05$), 提高 BMSCs 的凋亡($P<0.05$), 但能够显著增强预处理后 BMSCs 6 和 12h 后的细胞迁移的数量($P<0.05$), 显著降低细胞血清剥夺培养 24h 后细胞凋亡率($P<0.05$)。动物实验, 与 B 组相比, C 组的治疗可显著提高 14d、21d 和 28d 的 BBB 评分($P<0.05$)。D 组的 BBB 评分在 21d 和 28d 时明显高于 C 组($P<0.05$)。HE 染色结果显示, BMSC 移植可以显著减少脊髓损伤部位细胞死亡, 出血和炎性细胞浸润, 而与 C 组相比, D 组中的脊髓病理学损伤更轻微。细胞移植 72h 后, 在 C 组和 D 组中均可见绿色荧光细胞, 且绿色荧光的细胞数量 D 组(254.0 ± 35.5)中明显高于 C 组(143.2 ± 22.3 , $P<0.05$)。SCI 72h 后 Iba-1 免疫荧光染色显示, 与 B 组(759.0 ± 114.3)相比, BMSC(544.8 ± 37.1)和 D 组(422.4 ± 56.0)小胶质细胞数明显减少($P<0.05$), 且 D 组抑制小胶质细胞激活的能力更强($P<0.05$)。**结论:**低氧预处理 BMSCs 通过提高移植细胞的存活率, 增强抑制小胶质细胞的激活能力, 提高了 SCI 后大鼠神经功能的恢复, 机制为低氧预处理能够增强细胞的抗损伤和迁移能力, 是一种提高 BMSCs 移植治疗 SCI 疗效的有效手段。

【关键词】 脊髓损伤; 干细胞治疗; 骨髓间充质干细胞; 低氧; 凋亡; 迁移, 小胶质细胞

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.10.10

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-10-0933-11

Effects of hypoxic preconditioning of bone marrow mesenchymal stem cells on acute spinal cord injury in rats/MENG Qingxi, WANG Weiheng, MENG Qingmei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(10): 933-943

【Abstract】 Objectives: To investigate the effects of hypoxic preconditioning of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on acute spinal cord injury (SCI) in rats and related mechanisms. **Methods:** BMSCs were isolated from 10 SD rats (55.6 ± 4.2 g) and cultured by modified whole bone marrow adherence methods, and then were transfected with green fluorescent protein (GFP) gene. In vitro, the proliferation ability of BMSCs

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81472071); 2016 骨科围手术期血液管理项目(编号: 2016-N-14-06)

第一作者简介: 男(1978-), 博士研究生在读, 研究方向: 脊柱外科

电话: (021)81886807 E-mail: mengqingxi@smmu.edu.cn

通讯作者: 叶晓健 E-mail: xjyspine@smmu.edu.cn

was tested by using CCK-8 after treated by CoCl_2 in different concentrations (0, 10, 50, 100, 200 and $300\mu\text{M}$). The anti-apoptosis effect of serum deprivation after 0, 6, 12 and 24h culture migration was tested by using Transwell, and apoptosis was tested by using flow cytometry. In vivo experiment, vertical strike SCI model was used and hypoxic preconditioning BMSCs were injected subcutaneously, then the injected models were divided into sham operation group(group A), control group(group B), normal cell group(group C) and hypoxic preconditioning cell group(group D). The recovered neurological function was studied by BBB score before operation and 1, 3, 7, 10, 14, 21 and 28 days after operation. The pathological damage of spinal cord was evaluated by using HE staining 72h and 28d after SCI. Immunofluorescence staining was used to determine the transplanted cells viability and microglia activation. **Results:** In vitro experiments, the cck-8 results showed that the higher was the concentration of CoCl_2 , the greater was the effect on the proliferation capacity of BMSCs, and the 24h culture of $100\mu\text{M}$ CoCl_2 could significantly reduce the proliferation ability of BMSCs ($P<0.05$) and increase the apoptosis of BMSCs($P<0.05$). However, the number of cell migration of BMSCs at 6 and 12h after pretreatment significantly increased($P<0.05$), and the apoptosis rate after serum deprivation culture for 24h was significantly reduced($P<0.05$). In vivo experiments, compared with group B, the treatment of BMSCs could significantly improve BBB score of 14 days, 21 days and 28 days($P<0.05$). BBB score of group D was significantly higher than that of group C at 21 and 28 days($P<0.05$). HE staining results showed that BMSCs transplantation could significantly reduce cell death, bleeding and inflammatory cell infiltration at the spinal cord injury site. While compared with group C, the pathological injury of spinal cord in group D was more mild. After 72h of cell transplantation, green fluorescence cells were seen in both group C and group D, and the number of green fluorescence cells in group D(254.0 ± 35.5) was significantly higher than that in group C(143.2 ± 22.3 , $P<0.05$). At 72h after SCI, iba-1 immunofluorescence staining showed that the number of microglia cells in group C(544.8 ± 37.1) and group D(422.4 ± 56.0) decreased significantly($P<0.05$), and the ability of group D to inhibit the activation of microglia cells was higher($P<0.05$), compared with group B(759.0 ± 114.3). **Conclusions:** Hypoxic preconditioning manipulation of BMSCs is an effective way to improve the efficacy of cell transplantation in the treatment of SCI.

[Key words] Spinal cord injury; Stemcell therapy; Bone mesenchymal stem cells; Hypoxia; Apoptosis; Migration; Microglia

[Author's address] Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China

脊髓损伤(spinalcordinjure,SCI)是一种临床常见的严重创伤,且发病率逐年增高,预后差,一直以来因其高致残率高死亡率而被视为医学界的一大难题^[1,2]。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells,BMSCs)是一种具有良好分化能力且较容易分离获取的成体干细胞,作为种子细胞在治疗颅脑损伤和SCI方面取得了较好疗效^[3,4]。但有关BMSCs移植还有许多问题亟需解决。首先细胞移植后存活率较低,且分化能力差。目前大多数动物实验表明^[5],SCI后1周内的急性期是进行干细胞移植的最佳时期。而SCI后急性期的高氧化应激、高炎症因子等特殊微环境导致移植干细胞存活率低、细胞因子分泌不足、定向分化能力差等问题,大大降低了移植细胞的治疗效果^[6]。研究表明^[7,8],经蛛网膜下腔移植是最有效的途径,蛛网膜下腔移植的细胞存活率仅3.4%~

4.1%,严重影响了干细胞移植的治疗效果。如何提高移植细胞存活率及移植效率是提高干细胞移植治疗SCI疗效的关键。研究表明^[9],低氧预处理可以有效提高细胞的抗损伤能力,是迄今为止发现的强有力的内源性保护机制。还有研究表明低氧预处理干细胞可以有效地提高心肌梗死及脑梗死动物模型中移植后的细胞存活及功能^[10,11]。目前尚未见有关低氧预处理BMSCs治疗SCI的报道,本研究旨在使用低氧预处理BMSCs经蛛网膜下腔移植治疗SCI,观察低氧预处理BMSCs治疗的效果。

1 材料和方法

1.1 动物材料

本实验使用转绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)基因的SD大鼠10只,

(50~60g)分离培养 BMSCs(BMSC-GFP)。SD 大鼠(200~220g)80 只,雌性。所有实验动物均购自上海市第二军医大学实验动物中心。动物实验前饲养于 20~22℃无特殊病原菌的动物房 1~2 周以适应环境,自由摄入食物和水。所有实验过程均经上海市第二军医大学实验动物管理伦理委员会批准进行。

1.2 BMSCs 分离培养鉴定

根据文献^[12]大鼠原代 BMSCs 提取方法,过量(10%)水合氯醛麻醉处死大鼠,于 75%酒精中浸泡消毒 5~10min。使用眼科剪将 10 只转 GFP 基因的大鼠双侧股骨及胫骨取出,浸泡于预冷的培养基(DF-12),使用 10ml 注射器冲洗骨髓腔直至股骨胫骨变白,1000r/min 离心 5min,使用含有 10%胎牛血清(Science Cell)和 1%双抗体(青霉素-链霉素,Gibco)完全培养基重悬浮,置于 T12 的培养瓶中培养。24h 后更换培养基,之后每隔 2d 更换培养基。当细胞融合率达到 70%~80%时进行细胞传代。第三代细胞通过流式细胞术(FAC500,美国贝克曼库尔特公司)鉴定细胞表面标记 CD29 (FITC)、CD90 (PE)、CD45 (APC) 和 CD31 (PE)以检测细胞纯度。纯度评估后,使用第三代(P3)的细胞以 1×10^5 /ml 密度在成骨和成脂专用培养基(Scien Cell)中进行 BMSCs 定向成骨细胞、成脂、成神经细胞分化诱导培养。培养基 3d 更换 1 次。定向诱导培养 3 周后,4%多聚甲醛固定细胞,使用油红 O(Sigma)进行成脂染色,使用西素红(Sigma)进行成骨细胞染色,使用 Nestin 抗原免疫荧光染色鉴定细胞向神经细胞分化的能力,染色完成后在光学显微镜及荧光显微镜下观察(Olympus,日本)评估细胞分化能力。

1.3 低氧预处理对 BMSCs 增殖的影响

CoCl₂ 加入完全培养基进行低氧预处理,浓度分别为:0、10、50、100、200 和 300μM。分别培养 6、12、24、48h。CCK8 法检测不同浓度的低氧环境对 BMSCs 增殖活性的影响,选择最佳的低氧预处理条件。将 P3 代 BMSCs 以 5×10^3 个/孔,100μl 完全培养基接种于 96 孔板内,不同条件及培养时间低氧预处理后,使用 CCK-8 试剂盒(碧云天)检测细胞的增殖情况。使用酶标仪(Bio Tek)在紫外线 450nm 处检测 BMSCs 在不同浓度 CoCl₂ 低氧环境下增殖情况。重复 3 次,每种浓度 3 个复孔。

1.4 低氧预处理对血清剥夺后细胞凋亡的影响

根据细胞增殖及凋亡实验结果,选取 100μM CoCl₂ 培养 24h 为低氧预处理条件。将 P3 代 BMSC 以 1×10^5 /孔的密度种于 6 孔板内在 0μM 和 100μM CoCl₂ 培养 24h 后,收集贴壁细胞使用流式细胞术检测 100μM CoCl₂ 培养 24h 对 BMSCs 凋亡率的影响。之后我们对 100μM CoCl₂ 培养 24h 后的 BSMCs 在不含血清的培养基中培养 24h,进行血清剥夺实验。收集贴壁的细胞,以流式细胞检测技术检测低氧预处理对 BMSCs 抗血清剥夺能力的影响。使用 Annexin V-PI 细胞凋亡检测试剂盒(BD,美国)检测 BMSCs 的凋亡情况。所有染色程序均遵照流动抗体说明进行,并在 1h 内完成。实验重复 3 次,每次使用 3 个复孔。

1.5 低氧预处理对 BMSCs 迁移能力的影响

应用 Transwell 培养体系(8μm,MILLIPORE)研究低氧预处理对 BMSCs 迁移能力的影响。根据增殖及凋亡实验选取 100μM CoCl₂ 低氧预处理 24h 为低氧预处理条件。低氧预处理后放入完全培养基内培养,分别于 6、12、24h 观察 BMSCs 迁移情况。取 P3 代 BMSCs,分为两组:0μM CoCl₂ 培养组和 100μM CoCl₂ 低氧培养组,培养 24h 后,调整细胞密度为 5×10^4 /孔,100μl 接种于 Transwell 上室;下室加入完全培养基 600μl,37℃培养 12h 后取出 Transwell,吸掉上下室培养液,用 0.01M PBS 洗 3 遍,4%多聚甲醛固定 30min。室温下晾干后,棉签轻轻擦去上层未迁移细胞。0.1%的结晶紫(谷歌公司,武汉)进行细胞染色 20min。使用光学显微镜进行观察,随机选择 5 个视野进行细胞计数。重复 3 次,每次 3 个复孔。

1.6 低氧预处理对 BMSCs 及相关基因的影响

将 P3 代 BMSCs 以 1×10^5 /孔的密度种于 6 孔板内在 0μM 和 100μM CoCl₂ 培养 24h 后,收集贴壁细胞,检测低氧处理对 BMSCs 迁移相关基因 HIF-1α 和 CXCR4 的 mRNA 表达的影响。将 P3 代 BMSCs 以 1×10^5 /孔的密度种于 6 孔板内。0μM 和 100μM CoCl₂ 培养 24h 后,血清剥夺培养 24h,收集贴壁细胞,检测低氧预处理对 BMSCs 凋亡相关基因 caspase-3 和 bcl-2 的 mRNA 表达的影响。收集贴壁细胞,提取总 mRNA,将 RNA 样品逆转录成 cDNA,然后特异性扩增基质特异性基因和电泳分离。以 GAPDH 为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行计算,重复三次。引物由上海生工合成(表 1)。

1.7 大鼠 SCI 模型的建立和 BMSCs 的移植

雌性 SD 大鼠, 10% 水合氯醛 30ml/kg 腹腔注射麻醉, 待大鼠全身瘫软, 固定四肢无挣扎反应后, 固定于江湾 II 型大鼠固定器, 以 T10 为中心, 切开皮肤, 咬除棘突及椎板, 充分暴露脊髓, 采用经典的 Allen 法^[13]垂直打击脊髓制造大鼠 SCI 动物模型: 采用 10g 的重锤自 50mm 高处自由落下, 撞击大鼠 T10~12 节段的脊髓, 大鼠鼠尾及双下肢出现痉挛性来回摆动的脊髓休克症状提示造模成功, 术后 3d 常规青霉素 50 万单位/只肌肉注射, 预防感染。术后 12h/次腹部按摩, 帮助排尿, 直至大鼠可自行排尿。大鼠 SCI 造模成功后 10min 即进行蛛网膜下腔细胞移植。

80 只雌性 SD 大鼠随机分为 4 组: A 组(假手术组)、B 组(对照组)、C 组(BMSC 组)和 D 组(H-BMSC 组)($n=20$)。A 组的大鼠进行外科手术, 但不进行锤击。10% 水合氯醛 30ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠, 在 L3~5 水平进行腰椎穿刺, 有脑脊液抽出代表穿刺成功, 即可进行蛛网膜下腔注射。B、C 和 D 组均进行 SCI 造模和蛛网膜下腔注射。使用 30 号针头注射含有 1×10^6 个 P3 BMSC-GFP 的 20 μ l 生理盐水, 缓慢推注 5min, 以防止细胞渗漏, 其中 B 组相同条件下蛛网膜下腔注入等量的生理盐水, C 组使用的是普通条件下培养的 P3 BMSCs, D 组使用的是 100 μ M CoCl_2 低氧预处理 24h 的 P3 BMSCs。

1.8 HE 染色评估脊髓组织病理损伤情况

建模失败 3 只, 死亡 2 只, 将建模失败和死亡的大鼠排除。BMSCs 移植 72h 后每组取材 5 只大鼠, 28d 后取材剩余大鼠。使用过量水合氯醛麻醉处死大鼠。0.01M PBS 心脏灌注 10min 后, 4% 多聚甲醛灌注大鼠 20min。打开椎板, 以损伤脊髓为

中心上下 3mm 取材脊髓组织。将取出的脊髓固定在 4% 多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA) 中 4h, 然后梯度酒精脱水, 包埋在石蜡中, 切成 5 μ m 切片, HE 染色, 并在显微镜下观察。

1.9 免疫荧光染色

大鼠 SCI 造模 72h 后, 每组取 5 只大鼠, 并对取材的受损脊髓组织进行免疫荧光染色, 检测脊髓组织中 GFP 和 iba-1 的表达。以损伤的脊髓为中心上下 3mm 取材脊髓组织。将取出的脊髓在 4% PFA 中固定 4h, 并置于组织胶(Tek O.C.T)中。使用冷冻切片机(LEICA CM 1950, 德国)以冠状位制成 10 μ m 厚的切片。将切片用 0.01M PBS 漂洗 3 次, 用 10% 驴血清封闭 30min, 使用山羊抗大鼠的 iba-1 (1:500, Abcam) 在 4 $^{\circ}$ C 温度下孵育过夜。之后与相应的兔抗山羊二抗体在室温下孵育 2h。细胞核使用 dapi 染色 (HARVEY)。移植的 BMSC-GFP 在荧光显微镜下自发显示绿色荧光。使用荧光显微镜(Olympus)进行观察, 计算阳性细胞的百分比(阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$)。在高倍视野下随机每组随机选取 10 个视野, 计算阳性细胞比例。

1.10 BBB 评分评估大鼠神经功能恢复情况

大鼠在 SCI 造模前, BMSCs 治疗后 1、3、7、10、14、21、28d 使用 BBB (Basso Beattie Bresnahan) 评分法^[14], 评估 4 组大鼠的髋关节、踝关节的运动和躯干运动情况($n=12\sim 15$)。研究低氧预处理 BMSCs 对大鼠 SCI 后神经功能恢复的影响。

1.11 统计学分析

使用 SPSS 21 软件进行数据分析, 使用 Graph pad prism 5 软件制图。实验数据使用均值加减标准差表示。使用重复测量方差分析和 Fisher LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 培养、分化及鉴定结果

光学显微镜显示 BMSCs 形态均匀, 呈纺锤形或梭形, 细胞纯度高(图 1a)。定向诱导培养 3 周后, 茜素红染色可见在细胞中观察到深褐色钙结节, 说明 BMSCs 具有成骨细胞分化能力(图 1b)。油红 O 染色显示在细胞中观察到棕色脂滴形成, 说明 BMSCs 具有成脂细胞分化能力(图 1c)。细胞核被 dapi 染成蓝色(图 1d)。Nestin 抗原免疫荧光染色在荧光显微镜下可见所有细胞均为强绿色

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	上游引物(5'-3')/下游引物(5'-3') Reverse Primers(5'-3')/Forward Primer(5'-3')
GAPDH	GCAAGTTCAACGGCACAG
	GGCCCTCCTGTTGTTATGG
HIF-1 α	CACTGCACAGGCCACATTCAT
	AAGCAGGTCATAGGCGGTTTC
CXCR4	TCCGTGGCTGACCTCCTCTT
	CAGCTTCTCGGCCTCTGGC
bcl-2	TCCTTCCAGCCTGAGAGCAACC
	CGACGCTAGCGACGAGAGAAG
Caspase-3	GCGGTATTGAGACAGACAGTGAAC
	GCGGTAGAGTAAGCATACAGGAAGT

荧光(图 1e),且部分细胞 Nestin 染色阳性呈红色(图 1f),说明 BMSCs 具有成神经细胞分化能力。说明获得的 P3 BMSCs 具有良好的三系分化能力。流式细胞检测而现实 P3 BMSCs 表明 CD29

和 CD90 的阳性率高于 90%,CD31 和 CD45 低于 2%,表明所获得的 P3BMSCs 的纯度较高(图 2)。

2.2 低氧预处理对 BMSCs 增殖及凋亡的影响

CCK-8 结果显示,100 μ M CoCl₂ 组中,C 组较

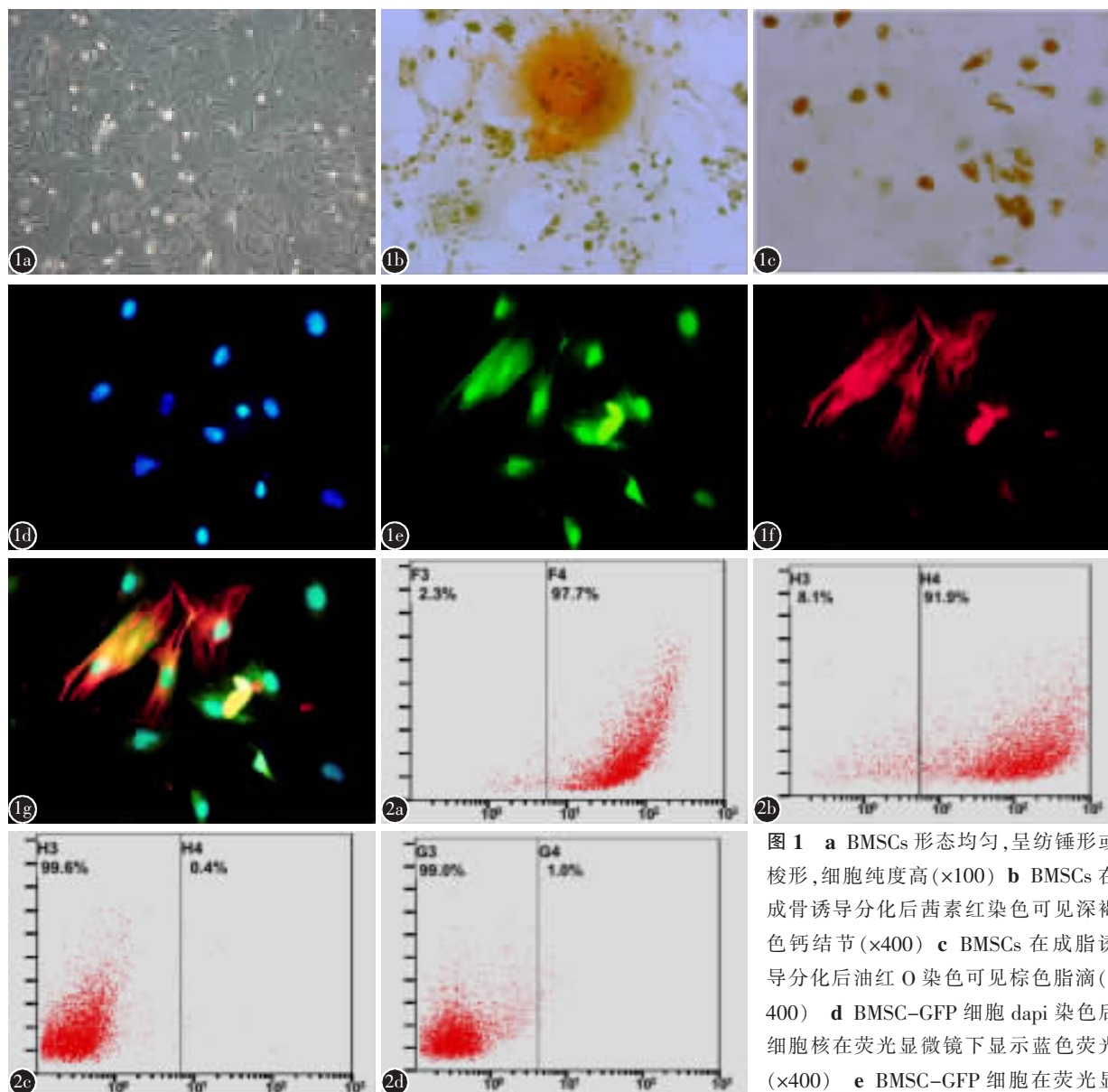


图 1 a BMSCs 形态均匀,呈纺锤形或梭形,细胞纯度高($\times 100$) b BMSCs 在成骨诱导分化后茜素红染色可见深褐色钙结节($\times 400$) c BMSCs 在成脂诱导分化后油红 O 染色可见棕色脂滴($\times 400$) d BMSC-GFP 细胞 dapi 染色后细胞核在荧光显微镜下显示蓝色荧光($\times 400$) e BMSC-GFP 细胞在荧光显微镜下显示绿色荧光($\times 400$) f BMSC-GFP 细胞在成神经诱导分化后 Nestin 染色在荧光显微镜下显示红色荧光($\times 400$) g 为 d, e, f 融合显示($\times 400$)

图 2 a 流式细胞术检测 P3 BMSCs 标记 CD29 阳性率为 97.7% b 流式细胞术检测 P3 BMSCs 标记 CD90 阳性率为 91.9% c 流式细胞术检测 P3 BMSCs 标记 CD31 阳性率为 0.4% d 流式细胞术检测 P3 BMSCs 标记 CD45 阳性率为 1.0%

Figure 1 a BMSCs are uniform in shape, spindle-shaped or fusiform, with high cell purity($\times 100$) b The result of BMSCs cultured in osteogenic medium for 3 weeks stained by alizarin red, and dark brown calcium nodules were observed ($\times 400$) c The result of BMSCs cultured in adipogenic medium 3 w stained by oil red O, and brown fat droplets were observed ($\times 400$) d-f The result of BMSC-GFP cells cultured in neural differentiation medium 3 w stained by Nestin showed blue nucleus(d), green fluorescence(e) and red fluorescence(f) under the fluorescence microscope($\times 400$), the g merge of d, e and f **Figure 2** a The positive rate of CD29 on P3 BMSCs was 97.7% b the positive rate of CD90 was 91.9% c the positive rate of CD31 was 0.4% d the positive rate of CD45 1.0%

D组细胞增殖在 6、12、24 和 48h 显著降低(表 2)。使用流式细胞法检测细胞凋亡时,检测结果可以分为早期细胞凋亡和晚期细胞凋亡,本实验中的凋亡率指的是早期凋亡和晚期凋亡之和,即总凋亡率。 CoCl_2 可以以时间依赖的方式调节 BMSCs 的凋亡率(表 2,图 1a~d)。FCM 检测结果显示,48h $100\mu\text{M}$ CoCl_2 预处理后,D 组凋亡率约为 $(27.5\pm 2.8)\%$,与 C 组相比明显升高,特别是晚期凋亡率(表 2, $P<0.05$)。24h 组 H-BMSC 凋亡率明显升高,凋亡率为 $(12.2\pm 2.7)\%$ 。根据细胞存活率和凋亡率的结果,将 $100\mu\text{M}$ CoCl_2 培养 24h 作为 BMSCs 化学缺氧预处理的实验模型。

2.3 低氧预处理对 BMSCs 迁移能力的影响

通过 Transwell 细胞迁移实验的结果显示, BMSCs 在 Transwell 系统中培养 6h, C 组中仅有少量细胞通过,而 D 组通过的细胞数量显著增多($P<0.05$,图 3,表 3)。随着 BMSCs 培养时间的延长, C 组和 D 组两组细胞数量明显增多,培养 12h 时 D 组细胞迁移数量明显高于 C 组。培养 24h 后,两组细胞数量增多,差异无统计学意义,提示 24h 大多数细胞均迁移通过 Transwell 膜。

2.5 低氧预处理 BMSCs 对 caspase-3、bcl-2、HIF-1 α 和 CXCR4 的 mRNA 表达的影响

采用 RT-PCR 方法检测 BMSCs 中 caspase-3、bcl-2、HIF-1 α 、CXCR4 的 mRNA 表达。与 C 组比较, D 组 bcl-2 mRNA 表达增加, caspase-3 明

表 2 CCK-8 法检测不同浓度的 CoCl_2 预处理不同时间对 BMSCs 增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of different concentrations CoCl_2 on the proliferation of BMSCs cultivated for different time as detected by CCK-8 assay

	0h	6h	12h	24h	48h
0 μM	1.01 $\pm$ 0.06	1.11 $\pm$ 0.09	1.41 $\pm$ 0.18 ^②	1.82 $\pm$ 0.19	2.6 $\pm$ 0.18 ^②
10 μM	1.00 $\pm$ 0.08	1.05 $\pm$ 0.09	1.30 $\pm$ 0.13 ^②	1.56 $\pm$ 0.18	2.38 $\pm$ 0.10 ^②
50 μM	1.00 $\pm$ 0.09	0.95 $\pm$ 0.12	1.14 $\pm$ 0.18	1.30 $\pm$ 0.12 ^①	1.75 $\pm$ 0.16 ^①
100 μM	1.01 $\pm$ 0.10	0.85 $\pm$ 0.14	0.98 $\pm$ 0.12 ^②	1.15 $\pm$ 0.11	1.41 $\pm$ 0.11#
200 μM	1.03 $\pm$ 0.09	0.80 $\pm$ 0.17	0.88 $\pm$ 0.15	0.95 $\pm$ 0.16 ^①	0.89 $\pm$ 0.13 ^①
300 μM	1.01 $\pm$ 0.06	0.72 $\pm$ 0.10	0.58 $\pm$ 0.13	0.44 $\pm$ 0.28	0.24 $\pm$ 0.10
凋亡率(%) Apoptotic rate	4.083 $\pm$ 0.749	8.050 $\pm$ 1.067 ^③	9.017 $\pm$ 1.433 ^③	12.183 $\pm$ 2.701 ^{③④}	27.257 $\pm$ 2.680 ^{②③④}

注:①与 100 μM 组相比 $P<0.05$;②与 24h 组相比 $P<0.05$;③与 0h 组相比 $P<0.05$;④与 6h 组相比 $P<0.05$

Note:①Compared with 100 μM group, $P<0.05$; ②Compared with 24h group, $P<0.05$; ③Compared with 0h group, $P<0.05$; ④Compared with 6h group, $P<0.05$

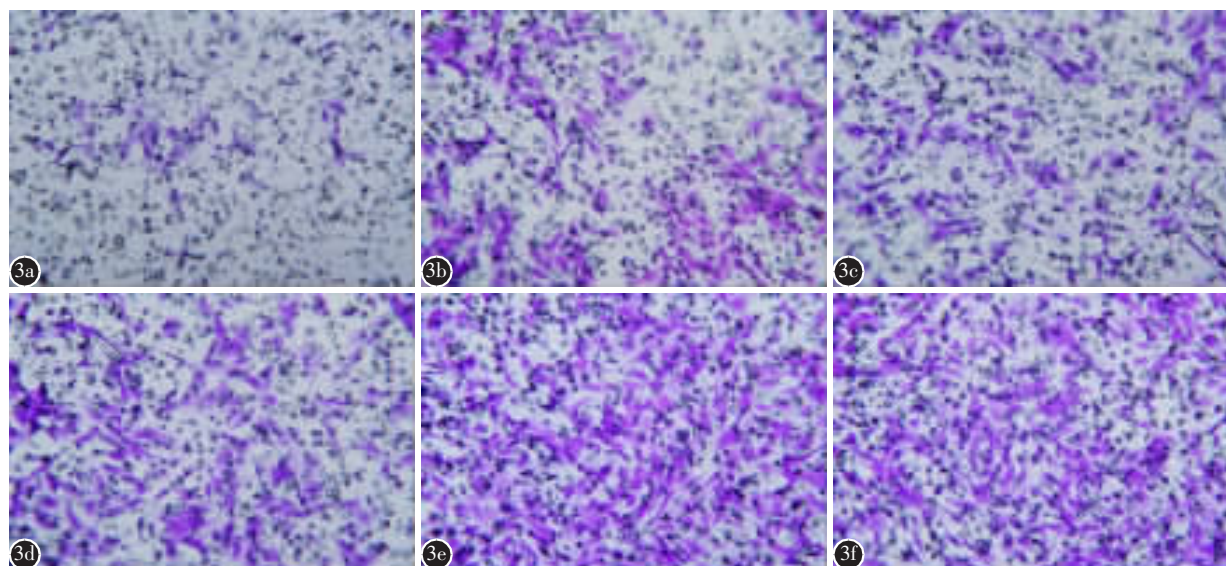


图 3 结晶紫染色 BMSC, 其中紫色的即为迁移通过 Transwell 培养体系的 BMSC 细胞 a、c、e C 组分别培养 6、12、24 h 迁移细胞的结晶紫染色结果 b、d、f 显示 D 组培养 6、12 和 24 h 的迁移细胞的结晶紫染色结果迁移($\times 400$)

Figure 3 a, c, e Represented the cells migration in group C at 6, 12 and 24 h b, d, f Showed the cells migration in group D at 6, 12 and 24h

显降低 (表 4, $P<0.05$)。低氧预处理 BMSCs 24h 后, 细胞中 HIF-1 α 和 CXCR4 的表达明显增加 (表 5, $P<0.05$)。

2.6 低氧预处理 BMSCs 对 SCI 后大鼠的神经功能的影响

BBB 评分结果 (表 5) 显示, SCI 可以明显降低手术后的 BBB 评分, 在 B 组中 BBB 评分随着时间的推移呈现出逐渐增加的趋势, SCI 2 周后改善不明显, 说明大鼠 SCI 后运动功能可自然改善, 但恢复程度有限。而 BMSCs 移植治疗可显著提高 BBB 评分 ($P<0.05$)。D 组的 BBB 评分在 21d 和 28d 时明显高于 C 组 ($P<0.05$)。BBB 评分表明, 低氧预处理可以显著提高 BMSCs 改善 SCI 大鼠运动功能恢复的能力。

2.7 组织病理学分析

HE 染色证实, 大鼠 SCI 损伤 72h 后 B 组脊髓损伤中脊髓灰质和白质之间的边界不清楚, 有出血, 液化和炎症细胞浸润, 神经纤维紊乱, 大量神经元细胞坏死, 萎缩 (图 4a)。在 C 组中, 在受伤的脊髓部位观察到局部出血和少量炎症细胞浸润

(图 4b)。在 D 组中, 神经元细胞和炎症细胞数量均少于 C 组 (图 4c)。细胞移植 28d 后, B 组可见脊髓空洞形成, 脊髓灰质和白质边界不清楚, 炎症细胞浸润 (图 4d)。在 C 组和 D 组中炎症细胞浸润较少, 组织损伤较轻, 脊髓空洞面积较小 (图 4e, f)。BMSC 移植可以显著减少脊髓损伤部位细胞死亡, 出血和炎症细胞浸润。与 C 组相比, D 组中的脊髓病理学损伤更轻微。

2.8 低氧预处理 BMSCs 对脊髓小胶质细胞的激活的影响

BMSCs 移植 72h 后的免疫荧光染色检测脊髓损伤节段小胶质细胞激活情况见图 5。B 组的 iba-1 型小胶质细胞数明显高于 A 组。而与 B 组相比, C 组和 D 组小胶质细胞数明显减少 (表 6, $P<0.05$)。

2.9 低氧预处理 BMSCs 对移植细胞存活的影响

细胞移植 72h 后脊髓免疫荧光染色观察 BMSC-GFP 在脊髓中数量 (图 6)。在 C 组和 D 组中均可见绿色荧光细胞, 且 D 组中绿色荧光的细胞数量明显高于 C 组。低氧预处理可以显著提高 BMSCs 在受损脊髓中的数量 (表 6, $P<0.05$)。

3 讨论

BMSCs 治疗 SCI 的机制主要包括: 作为种子细胞迁移到受损部位分化替代受损的细胞, 合成分泌生长因子, 比如血管内皮生长因子, 脑源性生长因子, 神经胶质源性神经生长因子、肝细胞生长因子等促进组织修复, BMSCs 还有良好的抗炎以及免疫调节等功能并能够抑制小胶质细胞过度

表 3 C 组和 D 组培养培养不同时间后细胞迁移数量 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 The number of the migrated cells in group C and group D after cultivation for different time

	C组 Group C	D组 Group D
6h	18.8 $\pm$ 3.962	61.2 $\pm$ 10.849 ^①
12h	79.2 $\pm$ 20.753	222.6 $\pm$ 24.419 ^①
24h	309.2 $\pm$ 9.680	303.8 $\pm$ 11.432
凋亡率 (%) Apoptotic rate	26.560 $\pm$ 3.114	15.120 $\pm$ 2.164 ^①

注: ①与 C 组相比 $P<0.05$

Note: ①Compared with group C, $P<0.05$

表 4 低氧预处理对 bcl-2, HIF-1 α , CXCR4 和 caspase-3 的 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 HP up-regulated mRNA expression of bcl-2, HIF-1 α and CXCR4 and suppresses expression of caspase-3 in BMSC

	C组 Group C	D组 Group D
Caspase-3	1.016 $\pm$ 0.068	0.744 $\pm$ 0.079 ^①
Bcl-2	0.990 $\pm$ 0.115	1.790 $\pm$ 0.194 ^①
HIF-1 α	0.988 $\pm$ 0.094	8.310 $\pm$ 1.384 ^①
CXCR4	0.978 $\pm$ 0.146	4.048 $\pm$ 0.950 ^①

注: ①与 C 组相比 $P<0.05$

Note: ①Compared with group C, $P<0.05$

表 5 BBB 评分评估大鼠 SCI 术前 1d 及术后 1、3、7、14、21 和 28d 神经功能的恢复

Table 5 BBB score was performed 1d before surgery, 1, 3, 7, 14, 21 and 28d after SCI

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D
-1d	20.8 $\pm$ 0.4	20.8 $\pm$ 0.4	20.8 $\pm$ 0.4	20.7 $\pm$ 0.5
1d	20.9 $\pm$ 0.4	1.60 $\pm$ 1.1	2.4 $\pm$ 1.3	1.7 $\pm$ 1.2
3d	21.0 $\pm$ 0.0	2.6 $\pm$ 1.4	3.8 $\pm$ 1.9	2.9 $\pm$ 1.7
7d	20.8 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 2.0	5.3 $\pm$ 2.5	5.8 $\pm$ 2.2
14d	20.9 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 2.2	6.6 $\pm$ 2.5	8.0 $\pm$ 2.9 ^②
21d	20.8 $\pm$ 0.4	6.4 $\pm$ 2.6	7.9 $\pm$ 3.0 ^①	9.7 $\pm$ 2.6 ^②
28d	20.8 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 2.5	8.1 $\pm$ 2.6 ^①	10.3 $\pm$ 2.6 ^②

注: ①与 B 组相比 $P<0.05$; ②与 C 组相比 $P<0.05$

Note: ①Compared with group B, $P<0.05$; ②Compared with group C, $P<0.05$

活化的能力^[3,15-18]。针对干细胞移植治疗 SCI 中移植细胞存活率低,细胞活性差等局限性,我们提出体外低氧预处理 BMSCs 以提高其治疗 SCI 时的存活率及治疗效果的假设。

CoCl₂ 是经典的化学低氧模拟剂,其模拟低氧的主要机制为:Co²⁺是铁螯合酶的底物,可替代氧感受器血红素中的 Fe²⁺,从而使血红蛋白锁定在脱氧合状态,使得细胞在常氧环境下也“感觉”低氧^[19]。由于 CoCl₂ 使用简便,条件易控制,因此本研究选用 CoCl₂ 培养作为体外低氧预处理方式,使用 CoCl₂ 模拟低氧环境存在一定的局限性。没有直接证据表明 CoCl₂ 在细胞内有蓄积作用,在选取 CoCl₂ 作为 BMSC 低氧预处理的体内体外实验时,BMSC 可能受到残余 CoCl₂ 的影响,因此在 BMSC 低氧预处理完毕后应使用正常培养基反复冲洗,尽量减少培养基内的残余 CoCl₂ 对实验的影响。CoCl₂ 模拟细胞低氧环境的作用机制是 Co²⁺ 诱导细胞中 HIF 及其调控基因表达,模拟常规氧

气状态下的细胞缺氧状态,这与 SCI 后组织低氧的状态有所不同^[20],但 CoCl₂ 作为 HIF 通路的稳定激活剂,可激活 HIF 及下游产物的 CXCR4 等表达^[21]。CXCR4 以及它的配体基质细胞源性因子 1(SDF-1/CXCL12)被认为是 BMSC 迁移归巢的关键因子^[22]。BMSC 在低氧预处理后可能通过 HIF-1 的介导促进 CXCR4 在细胞表面的表达,从而促进 BMSC 向损伤区域迁移、归巢和定植,这在我们的细胞试验中得到了初步证实。

在最佳的低氧预先处理条件的选择上,应遵循对细胞增殖活性影响较小,处理后可显著提高细胞对损伤耐受性为原则。因此在梯度实验结果的基础上,本实验选择了对细胞活性存在影响,但程度较轻微的 100μM CoCl₂ 的培养 24h 作为低氧预处理条件。这样一方面通过控制低氧预处理时间,防止因长期预处理和培养而产生的细胞分化及衰老等问题^[23,24],另一方面,因为使用 CoCl₂ 低氧预处理 BMSC 存在 CoCl₂ 浓度依赖性^[25],故可

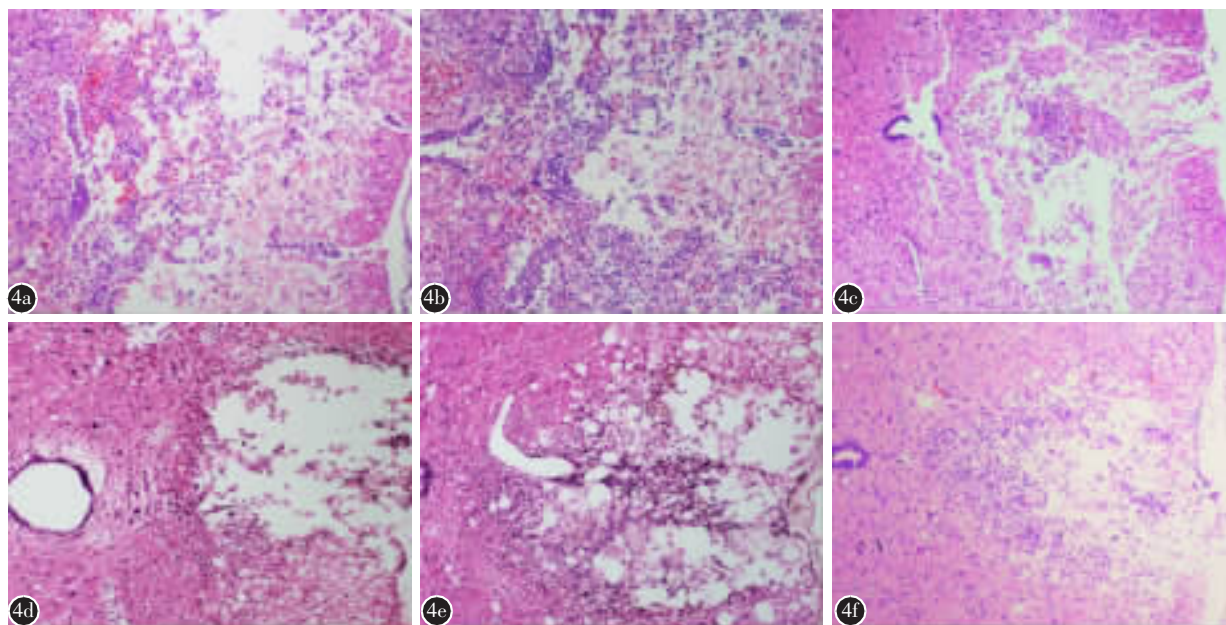


图 4 脊髓 HE 染色组织形态变化($\times 100$) **a** 细胞移植 72h 后 B 组脊髓组织结构紊乱,大量出血和炎症细胞浸润 **b** 细胞移植 72h 后 C 组脊髓局部出血和炎症细胞浸润 **c** 细胞移植 72h 后 D 组脊髓结构较完整,少量出血和炎症细胞浸润 **d** 细胞移植 28d 后 B 组脊髓空洞形成 **e** 细胞移植 28d 后 C 组脊髓空洞面积较小 **f** 细胞移植 28d 后 D 组脊髓空洞面积最小,结构较完整

Figure 4 HE staining of the spinal cord histomorphological changes **a** 72h after cell transplantation, the spinal cord tissue structure was disordered, and a large amount of hemorrhage and inflammatory cells infiltrated in group B **b** 72h after cell transplantation, there were localized hemorrhage and inflammatory cell infiltration in group C **c** 72h after cell transplantation, the spinal cord structure was intact, and a small amount of hemorrhage and inflammatory cells infiltrated in group D **d** 28d after cell transplantation, spinal cord stenosis was formed in group B **e** 28d after cell transplantation, group C had a small stenotic cavity area **f** 28d after cell transplantation, group D had the smallest stenotic cavity and the structure was intact

通过增加干预浓度提高预处理效率。为短期高效的达到预处理效果,在不显著降低细胞活性或增加细胞凋亡的情况下,选择较高浓度 CoCl_2 进行较短时间的干预可能更为合适。故本次实验中采用 $100\mu\text{M}$ CoCl_2 的培养 24h 作为低氧预处理的条件。低氧环境可影响干细胞的分化^[26],并可调节 HIF 等信号通路^[27],影响低氧相关 RNA 表达^[28]等途径影响细胞的活性和功能。在经低氧预处理时,

BMSCs 的代谢发生适应性的改变,对随后而来的强烈有害性刺激产生较强的适应抵抗能力。低氧预处理 BMSCs 通过负反馈调节细胞内的迁移 (HIF-1 α 和 CXCR4) 及凋亡 (caspase-3 和 bcl-2) 等相关信号通路有关提高 BMSCs 的迁移及抗损伤能力在本研究中得到初步证实,但具体的机制仍有待进一步研究证实。

本研究通过体内体外实验证实, BMSCs 具有

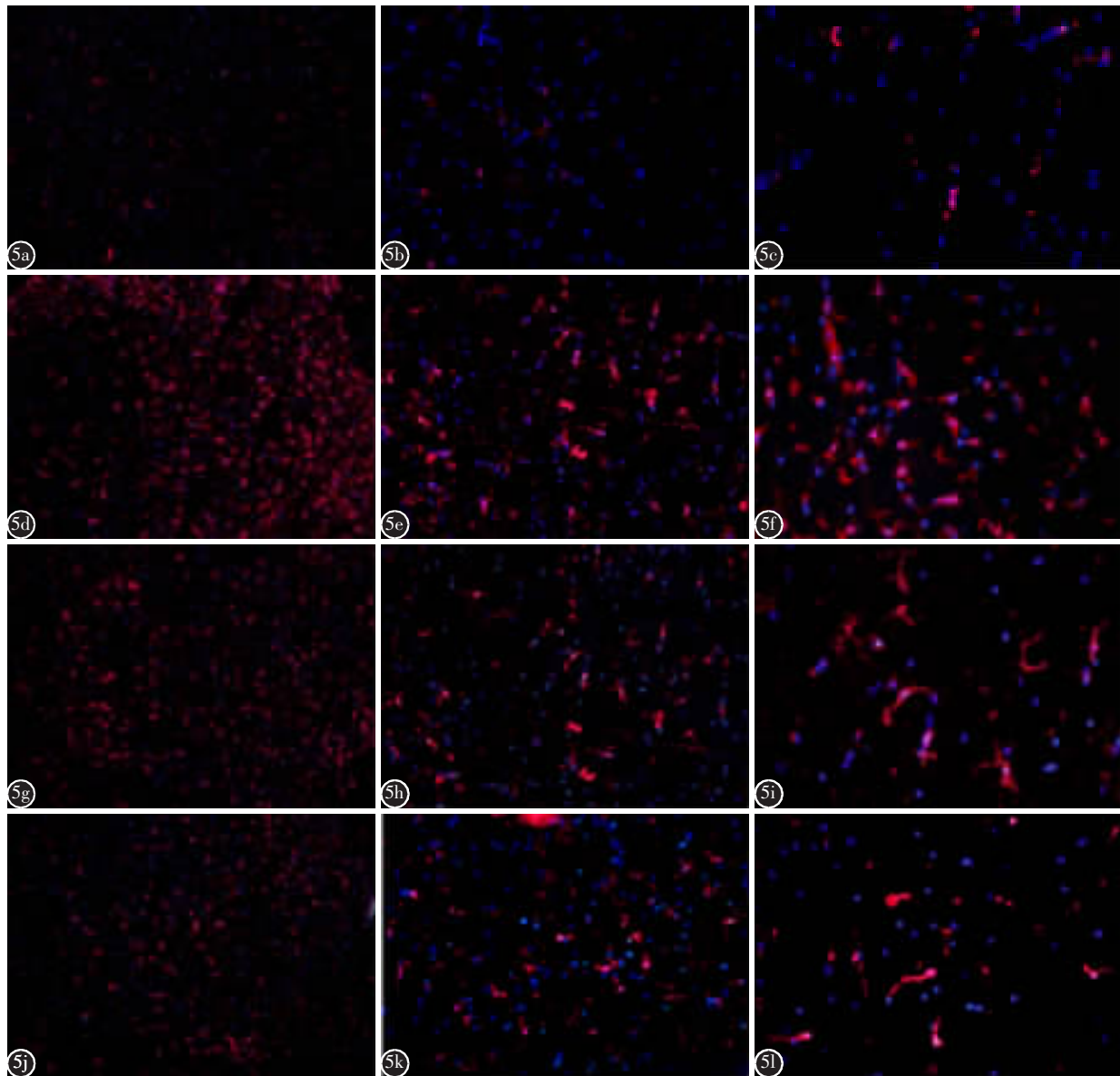


图 5 细胞移植 72h 后脊髓 iba-1 免疫荧光染色情况,其中红色为被 iba-1 染成红色的阳性细胞,蓝色为被 dapi 染成蓝色的细胞核 a~c A 组中表达微弱 d~f B 组表达强烈 g~i C 组表达较 B 组中度表达 j~l D 组表达较 C 组明显减弱,但较 A 组强

Figure 5 iba-1 immunofluorescence staining for iba-1 positive cells 72h after cells transplantation. Among them, red is a positive cell stained red by iba-1, and blue is a nuclei stained blue by dapi a~c The expression in the group A was weak d~f The expression in the group B was strong g~i The expression in the group C was moderately compared with SCI group j~l The expression in group D was significantly weaker than C, but stronger than group A

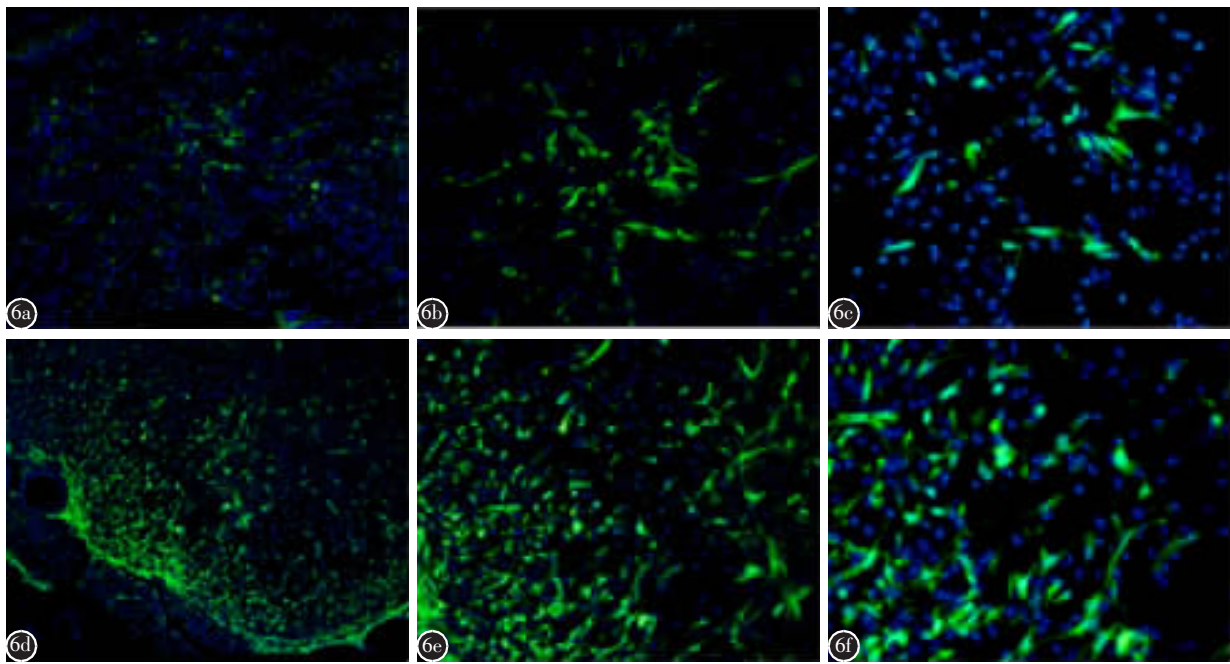


图 6 GFP 免疫荧光 a~c C 组免疫荧光染色显示阳性细胞数量较少 d~f D 组免疫荧光染色显示阳性细胞数量较多 a 和 d 为×100 b 和 e 为×200 c 和 f 为×400

Figure 6 GFP immunofluorescence a~c The number of GFP positive cells inBMSC group was small d~f The number of GFP positive cellsin H-BMSC group waslarge a and d were ×100, b and e were ×200, c and f were ×400

表 6 GFP 和 iba-1 阳性小胶质细胞在各组计数

	positive microglia(200×) in 4 groups			
	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D
iba-1	175.2±33.9	759.0±114.3 ^①	544.8±37.1 ^{①②}	422.4±56.0 ^{①②③}
GFP	0	0	143.2±22.3 ^①	254.0±35.5 ^{①③}

注:①与 A 组相比 $P<0.05$;②与 B 组相比 $P<0.05$;③与 C 组相比 $P<0.05$

Note: ①Compared with group A, $P<0.05$; ②Compared with group B, $P<0.05$; ③Compared with group C, $P<0.05$

较强的适应能力,在经低氧预处理时,BMSCs 的代谢发生适应性的改变,迁移及抗损伤能力显著增强,经更强刺激后细胞存活更高,活性更好,移植到受损的脊髓中治疗效果更佳。低氧预处理 BMSCs 移植治疗急性 SCI 中具有明确优势,这为临床上进行干细胞移植治疗 SCI 时如何提高移植细胞的存活和效果提供一个有效方法。

4 参考文献

1. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury[J]. Spine J, 2004, 4(4): 451-464.
2. Selvarajah S, Hammond ER, Schneider EB. Trends in traumatic spinal cord injury-reply [J]. JAMA, 2015, 314 (15):

1643-1644.
3. Vaquero J, Zurita M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: a challenge for contemporary neurobiology [J]. Histol Histopathol, 2009, 24(1): 107-116.
4. Chiba Y, Kuroda S, Osanai T, et al. Impact of ageing on biological features of bone marrow stromal cells (BMSC) in cell transplantation therapy for CNS disorders: functional enhancement by granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)[J]. Neuropathology, 2012, 32(2): 139-148.
5. Buchmaier BS, Bibi A, Muller GA, et al. Renal cells express different forms of vimentin: the independent expression alteration of these forms is important in cell resistance to osmotic stress and apoptosis[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68301.
6. Yang X, Hao D, Zhang H, et al. Treatment with hydrogen sulfide attenuates sublesional skeletal deterioration following motor complete spinal cord injury in rats [J]. Osteoporos Int, 2017, 28(2): 687-695.
7. Chen O, Ye Z, Cao Z, et al. Methane attenuates myocardial ischemia injury in rats through anti-oxidative, anti-apoptotic and anti-inflammatory actions[J]. Free Radic Biol Med, 2016, 90: 1-11.
8. Su M, Guan H, Zhang F, et al. HDAC6 regulates the chaperone-mediated autophagy to prevent oxidative damage in injured neurons after experimental spinal cord injury [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 7263736. doi: 10.1155/2016/7263736. Epub 2015 Nov 15.
9. Zhao Z, Zhang Y, Wang L, et al. Potential for direct inter

- species electron transfer in an electric-anaerobic system to increase methane production from sludge digestion[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11094. doi: 10.1038/srep11094.
10. Zhang Y, Liu Y, Zhang J. Saturated hydrogen saline attenuates endotoxin-induced lung dysfunction [J]. *J Surg Res*, 2015, 198(1): 41-49.
 11. Ye Z, Chen O, Zhang R, et al. Methane attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats through antiapoptotic, anti-inflammatory, and antioxidative actions[J]. *Shock*, 2015, 44(2): 181-187.
 12. Wu J, Wang R, Ye Z, et al. Protective effects of methane-rich saline on diabetic retinopathy via anti-inflammation in a streptozotocin-induced diabetic rat model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466(2): 155-161.
 13. Torras J, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, et al. Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation[J]. *Kidney Int*, 2002, 61(6): 2218-2227.
 14. Hu X, Yu SP, Fraser JL, et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 135(4): 799-808.
 15. Theus MH, Wei L, Cui L, et al. In vitro hypoxic preconditioning of embryonic stem cells as a strategy of promoting cell survival and functional benefits after transplantation into the ischemic rat brain[J]. *Exp Neurol*, 2008, 210(2): 656-670.
 16. Danet GH, Pan Y, Luongo JL, et al. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(1): 126-135.
 17. Wei L, Fraser JL, Lu ZY, et al. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(3): 635-645.
 18. Lotfinia M, Lak S, Mohammadi Ghahhari N, et al. Hypoxia pre-conditioned embryonic mesenchymal stem cell secretome reduces IL-10 production by peripheral blood mononuclear cells[J]. *Iran Biomed J*, 2016, 21(1): 24-31.
 19. Yuan LL, Guan YJ. Optimal concentration and time window for proliferation and differentiation of neural stem cells from embryonic cerebral cortex: 5% oxygen preconditioning for 72 hours[J]. 2015, 10(9): 1516-1522.
 20. Ma DD, Du HM, Fynes K, et al. The differential effects of 2% oxygen preconditioning on the subsequent differentiation of mouse and human pluripotent stem cells[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 23(16): 1910-1922.
 21. Deng G, Wang W, Yang C, et al. Shaking improves the whole bone marrow adherent method of purification [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3133-3138.
 22. Khan T, Havey RM, Sayers ST, et al. Animal models of spinal cord contusion injuries[J]. *Lab Anim Sci*, 1999, 49(2): 161-172.
 23. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection [J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(2): 244-256.
 24. Ide C, Nakano N, Kanekiyo K. Cell transplantation for the treatment of spinal cord injury - bone marrow stromal cells and choroid plexus epithelial cells [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(9): 1385-1388.
 25. Forostyak S, Jendelova P, Sykova E. The role of mesenchymal stromal cells in spinal cord injury, regenerative medicine and possible clinical applications [J]. *Biochimie*, 2013, 95(12): 2257-2270.
 26. Vaquero J, Zurita M. Functional recovery after severe CNS trauma: current perspectives for cell therapy with bone marrow stromal cells[J]. *Prog Neurobiol*, 2011, 93(3): 341-349.
 27. Zhu H, Bunn HF. Oxygen sensing and signaling: impact on the regulation of physiologically important genes [J]. *Respir Physiol*, 1999, 115(2): 239-247.
 28. Rani A, Prasad S. CoCl₂-induced biochemical hypoxia down regulates activities and expression of super oxide dismutase and catalase in cerebral cortex of mice [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(9): 1787-1796.
 29. Schumacker PT. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)[J]. *Crit Care Med*, 2005, 33(12 Suppl): S423-425.
 30. Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, et al. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines[J]. *J Exp Med*, 2002, 195(9): 1145-1154.
 31. Derubeis AR, Cancedda R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances[J]. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32(1): 160-165.
 32. Saeed H, Iqtedar M. Bone Marrow Stromal Cell (BMSC) and skeletal aging: role of telomerase enzyme [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27(2): 321-333.
 33. Bernhardt WM, Campean V, Kany S, et al. Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(7): 1970-1978.
 34. Madonna R, Gorbe A, Ferdinandy P, et al. Glucose metabolism, hyperosmotic stress, and reprogramming of somatic cells[J]. *Mol Biotechnol*, 2013, 55(2): 169-178.
 35. Brune B, Zhou J. The role of nitric oxide (NO) in stability regulation of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha)[J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(10): 845-855.
 36. Nallamshetty S, Chan SY, Loscalzo J. Hypoxia: a master regulator of microRNA biogenesis and activity[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 64: 20-30.

(收稿日期:2017-09-23 修回日期:2018-07-26)

(英文编审 庄乾宇/贾丹彤)

(本文编辑 姜雅浩)