

缺氧诱导因子 1 α 对缺氧处理后人羊膜间充质干细胞耐受缺氧的影响



葛礼豪¹, 于德水², 苏瑞超¹, 曹阳¹

1. 锦州医科大学附属第一医院骨科 (辽宁锦州 121001)
2. 锦州医科大学 (辽宁锦州 121001)

【摘要】 目的 通过瞬时转染缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α), 观察缺氧处理后人羊膜间充质干细胞 (human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs) 存活及凋亡情况, 探讨 HIF-1 α 对 hAMSCs 耐受缺氧的影响。方法 取健康剖宫产产妇自愿捐赠的羊膜组织分离、培养 hAMSCs, 通过倒置相差显微镜形态学观察及免疫荧光法检测干细胞标志物 OCT-4、NANOG 表达, 对培养细胞进行鉴定。取第 3 代 hAMSCs 进行缺氧处理 (200 μ mol/L CoCl₂、24 h), 按以下分组瞬时转染各组质粒: A 组为 hAMSCs 空白组, B 组为 pcDNA3.1 阴性对照组, C 组为 shRNA 阴性对照组, D 组为 shRNA-HIF-1 α 干扰组, E 组为 pcDNA3.1-HIF-1 α 过表达组。缺氧处理后 12、24、48 h 采用细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit 8, CCK-8) 检测各组细胞存活率; 24 h 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率, 并采用 Western blot 检测 HIF-1 α 、VEGF、B 细胞淋巴瘤/白血病 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2-Associated X 的蛋白质 (Bax)、活化型半胱天冬酶-3 (cleaved Caspase-3, C-Caspase-3) 蛋白表达。结果 CCK-8 法检测示, 缺氧处理后各时间点与 A、C 组比较, D 组细胞存活率明显降低 ($P < 0.05$); 而与 A、B 组比较, E 组细胞存活率明显升高 ($P < 0.05$); E 组内 24 h 时细胞存活率明显高于 12、48 h 时 ($P < 0.05$)。流式细胞仪检测示, 与 A、C 比较, D 组细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$); 与 A、B 组比较, E 组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)。Western blot 检测示, 与 A、C 组比较, D 组细胞中 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2 蛋白表达明显减少, Bax、C-Caspase-3 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$); 而 E 组结果相反, 与 A、B 组比较, E 组细胞中 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2 蛋白表达明显增加, Bax、C-Caspase-3 蛋白表达明显减少。结论 HIF-1 α 基因过表达能够明显改善 hAMSCs 耐受缺氧能力, 其机制可能与上调 VEGF 和相关凋亡基因 Bcl-2 表达及下调 Bax 和 C-Caspase-3 表达作用相关。

【关键词】 缺氧诱导因子 1 α ; 人羊膜间充质干细胞; 耐受缺氧; 凋亡

Effects of hypoxia-inducible factor 1 α on hypoxic tolerance of human amniotic mesenchymal stem cells after hypoxia

GE Lihao¹, YU Deshui², SU Ruichao¹, CAO Yang¹

1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou Liaoning, 121001, P.R.China
2. Jinzhou Medical University, Jinzhou Liaoning, 121001, P.R.China

Corresponding author: YU Deshui, Email: ydsfsyy@163.com

【Abstract】 Objective Under hypoxic conditions, the survival and apoptosis of human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSCs) were observed by transient transfection of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), to investigate the effect of HIF-1 α on hypoxia tolerance of hAMSCs. **Methods** The hAMSCs were isolated and cultured from amniotic membrane tissue from voluntary donors for cesarean section. And the morphological observation by inverted phase contrast microscope and immunofluorescence detection of the expression of stem cell markers OCT-4 and NANOG were performed to identify the cultured cells. The third generation hAMSCs were treated with anoxia for 24 hours with 200 μ mol/L CoCl₂, and transient transfection of plasmids were added in groups according to the following grouping: group A was hAMSCs blank group; group B was pcDNA3.1 negative control group; group C was short hairpin RNA (shRNA) negative control group; group D was shRNA-HIF-1 α interference group; group E was pcDNA3.1-HIF-1 α over expression

DOI: 10.7507/1002-1892.201710104

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81541043); 辽宁省自然科学基金指导计划项目 (201602329)

通信作者: 于德水, Email: ydsfsyy@163.com

group. Cell survival rate of each group was measured by cell count kit 8 (CCK-8) at 12, 24, 48 hours after hypoxia treatment. Flow cytometry was used to detect apoptosis rate in each group at 24 hours after hypoxia treatment. The expression levels of proteins HIF-1 α , vascular endothelial growth factor (VEGF), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bax, and C-Caspase-3 were detected by Western blot at 24 hours after hypoxia treatment. **Results** CCK-8 assay showed that the survival rate of group D was significantly lower than that of groups A and C at all time points after hypoxia treatment ($P<0.05$); while the cell survival rate in group E was significantly higher than that in groups A and B ($P<0.05$); the cell survival rate at 24 hours in group E was significantly higher than that at 12 and 48 hours ($P<0.05$). The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate in group D was significantly higher than that in groups A and C ($P<0.05$), and in group E was significantly lower than that in groups A and B ($P<0.05$). Western blot showed that the expressions of HIF-1 α , VEGF, and Bcl-2 proteins in group D were significantly decreased when compared with those in groups A and C, the expressions of Bax and C-Caspase-3 proteins were significantly increased ($P<0.05$). On the contrary, the expressions of HIF-1 α , VEGF, and Bcl-2 proteins in group E were significantly higher than those in groups A and B, the expressions of Bax and C-Caspase-3 proteins were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Overexpression of HIF-1 α gene can significantly improve hAMSCs tolerance to hypoxia, the mechanism may be related to up-regulation of the expression of VEGF and related apoptotic gene Bcl-2, and down-regulation of Bax and C-Caspase-3 expression.

【Key words】 Hypoxia inducible factor 1 α ; human amniotic mesenchymal stem cells; tolerate hypoxia; apoptosis

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81541043); Natural Science Foundation Guidance Program Project of Liaoning Province (201602329)

人羊膜间充质干细胞 (human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs) 移植能促进脊髓损伤神经功能恢复, 既往研究发现其主要通过提高 VEGF 和 BDNF 表达, 促进血管和神经再生来改善脊髓损伤后神经功能的恢复^[1]。近年研究发现, 脊髓损伤动物模型体内移植 hAMSCs 后, hAMSCs 具有明显的耐受缺氧能力, 同时能显著减少脊髓组织梗死和继发性神经元的损伤^[2-3]。这为采用 hAMSCs 移植治疗脊髓损伤提供了新的理论依据。然而如何提高 hAMSCs 耐受缺氧能力, 目前少有报道。缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α) 是目前发现的唯一一个高度特异性的、在缺氧条件下能够发挥活性的核转录因子, 是专一调节氧稳态的重要介质, 同时参与调控 MSCs 增殖、凋亡和耐受缺氧等作用^[4]。研究发现, HIF-1 α 可提高 BMSCs 耐受缺氧能力^[5]。我们推测 HIF-1 α 是调节 hAMSCs 耐受缺氧能力的重要转录因子之一。本研究通过转染 HIF-1 α 基因, 观察缺氧处理后 hAMSCs 的存活与凋亡情况, 以探讨 HIF-1 α 基因对 hAMSCs 耐受缺氧的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂、仪器

羊膜组织取自锦州医科大学附属第一医院 10 位健康剖宫产产妇, 经医院伦理委员会批准使用, 产妇均知情同意。

胶原酶 IV (Sigma 公司, 美国); 兔抗人 HIF-1 α

单克隆抗体 (Abcam 公司, 英国); 兔抗人 B 细胞淋巴瘤/白血病 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2-Associated X 的蛋白质 (Bax)、活化型半胱天冬酶-3 (cleaved Caspase-3, C-Caspase-3) 多克隆抗体 (Absci 公司, 美国); 各质粒 (上海吉玛制药技术有限公司); Lipofectamine™3000 (Invitrogen 公司, 美国); 实时荧光定量 PCR 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit 8, CCK-8) 试剂盒 (Dojindo 公司, 日本); AnnexinV-PE-7AAD 试剂盒 (天津三箭生物技术股份有限公司)。CO₂ 培养箱 (Thermo Fisher 公司, 美国); CKX-31 倒置相差显微镜、IX-71 倒置荧光显微镜 (Olympus 公司, 日本); Tecan Infinite M200 多功能酶标仪 (Tecan 公司, 瑞士); 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国); 流式细胞仪 (Roche 公司, 瑞士)。

1.2 hAMSCs 分离、培养及鉴定

参照文献[6]报道的分离 hAMSCs 方法并加以改进。取羊膜组织, 剪碎为约 1 mm×1 mm 大小组织, 0.25% 胰蛋白酶消化 10 min 后, 200 目细胞筛过滤, 细胞筛中羊膜组织加入 1 mg/mL 胶原酶 IV, 37℃ 消化 1 h; 再次过滤, 滤液以离心半径 25 cm、1 500 r/min 离心 5 min, 重复 2 次, 收集细胞。加入含 10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 DMEM/F12 培养基, 37℃、5%CO₂ 孵箱培养。3 d 后换液, 之后隔天换液, 约 10 d 左右细胞密度达 80%~90% 时进行传代培养。倒置相差显微镜观察

细胞形态变化。取第 3 代 hAMSCs, 参照文献[7]方法采用免疫荧光法检测干细胞标志物 OCT-4、NANOG 的表达。

1.3 实验分组及方法

实验分为 5 组: A 组为 hAMSCs 空白组, 不进行任何处理; B 组为 pcDNA3.1 阴性对照组, 细胞转染 pcDNA3.1 过表达空载质粒; C 组为 shRNA 阴性对照组, 细胞转染 shRNA 干扰空载质粒; D 组为 shRNA-HIF-1 α 干扰组, 细胞转染 shRNA-HIF-1 α 干扰质粒; E 组为 pcDNA3.1-HIF-1 α 过表达组, 细胞转染 pcDNA3.1-HIF-1 α 过表达质粒。具体操作: 取第 3 代 hAMSCs, 经 200 μ mol/L CoCl₂、24 h 缺氧处理(根据文献[8]及预实验得出的缺氧处理理想条件), 待细胞密度达 50% 左右时, 按以上分组瞬时转染各组质粒, 将质粒和 LipofectamineTM3000 复合物轻轻吹打混匀, 均匀缓慢加入培养皿中, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 孵育 10 min, 备用【核描述是否准确?】。

1.4 观测指标

1.4.1 CCK-8 法检测细胞存活率 各组分别于缺氧处理后 12、24、48 h 每孔加入 10 μ L CCK-8 细胞计数试剂, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵育 4 h 后, 于 540 nm 波长下测定各孔吸光度(A)值, 按以下公式计算各组细胞存活率: 各组 A 值/A 组 A 值。

1.4.2 流式细胞术检测细胞凋亡率 各组分别于缺氧处理后 24 h 消化、收集 hAMSCs, 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL, 常规采用流式细胞术检测各组细胞凋亡率。

1.4.3 Western blot 检测 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2、Bax、C-caspase-3 蛋白表达 各组分别于缺氧处理 24 h 后消化、收集 hAMSCs, 冰上裂解、匀浆、离心、取上清弃沉淀、测定蛋白含量。等量蛋白(10 μ g)样本上样, SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 湿转法至聚偏氟乙烯膜上, 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h; 加入兔抗人 HIF-1 α (1 : 1 000) 抗体, 兔抗人 VEGF、Bcl-2、Bax、C-Caspase-3 抗体 (1 : 500), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗 3 次; 山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 2 h, TBST 漂洗; 化学发光试剂 ECL 发光, 显影。以内参 β -actin 为对照, Gel-Pro Analyzer 软件分析 HIF-1 α 与 β -actin 的积分吸光度 (IA) 值的比值, 表示 HIF-1 α 蛋白相对表达量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS20.0 统计软件进行分析。数据以均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *t* 检验【核!】; 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 hAMSCs 形态观察及鉴定

培养 3 d, 倒置相差显微镜可观察到少量 hAMSCs 贴壁, 呈长梭形, 其中混杂有椭圆形人羊膜上皮细胞; 7 d 后细胞开始增殖并形成细胞集落, 呈放射状或漩涡状分布; 14 d 后细胞达 80% ~ 90% 融合。传代后, 细胞增殖速度加快, 2 ~ 3 d 即可长满培养瓶底; 随着传代代数增加, 细胞形态多较均一, 并呈漩涡状或放射状排列生长。见图 1。

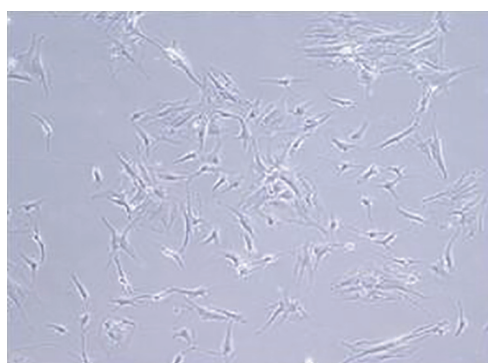


图 1 第 3 代 hAMSCs 形态观察 (倒置相差显微镜 $\times 10$)

Fig.1 Morphological observation of the third generation hAMSCs (Inverted phase contrast microscope $\times 10$)

细胞免疫荧光法检测示, 细胞核中可见 OCT-4、NANOG 表达, 提示所培养细胞为 hAMSCs。见图 2。

2.2 hAMSCs 缺氧处理后相关观测

2.2.1 CCK-8 法检测细胞存活率 缺氧处理后 12、24、48 h, 与 A、C 组比较, D 组细胞存活率明显降低, 而与 A、B 组比较, E 组细胞存活率明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。E 组组内比较, 与 12、48 h 比较, 24 h 时细胞存活率明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 12、48 h 间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

2.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 缺氧处理后 24 h, A ~ E 组细胞凋亡率分别为 $2.80\% \pm 0.28\%$ 、 $3.75\% \pm 0.35\%$ 、 $3.60\% \pm 0.26\%$ 、 $8.56\% \pm 0.94\%$ 、 $1.90\% \pm 0.14\%$ 。与 A、C 组比较, D 组细胞凋亡率显著升高, 与 A、B 组比较, E 组细胞凋亡率显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.2.3 Western blot 检测各组各蛋白表达变化 缺氧处理后 24 h, 与 A、C 组比较, D 组细胞中 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2 蛋白表达明显减少, Bax、C-Caspase-3 蛋白表达明显增加, 比较差异均有统计

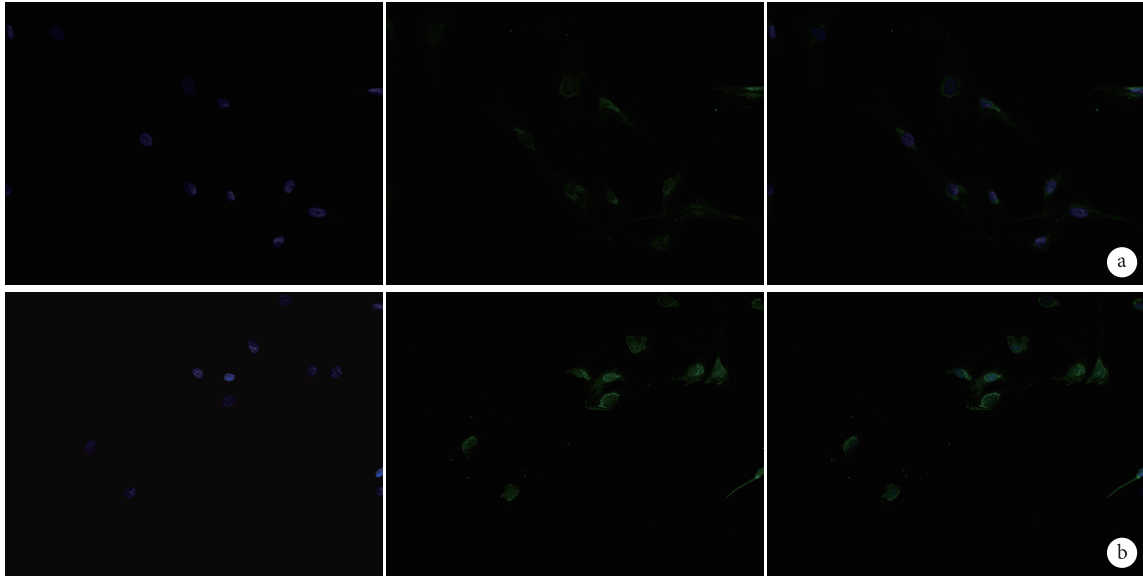


图2 免疫荧光法鉴定 OCT-4、NANOG 在 hAMSCs 中的表达 (荧光显微镜×20) 从左至右依次为 DAPI、FITC、二者重叠 a. OCT-4; b. NANOG

Fig.2 Expression of OCT-4 and NANOG in hAMSCs by immunofluorescence assay (Fluorescence microscope×20) From left to right for DAPI, FITC, and merge a. OCT-4; b. NANOG

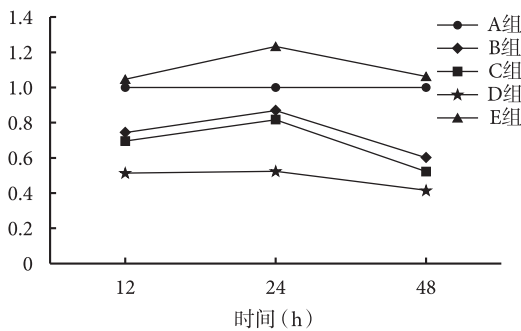


图3 CCK-8 法检测各时间点各组细胞存活率

Fig.3 The survival rate of each group at different time points detected by CCK-8 method

学意义 ($P < 0.05$) ; 而 E 组结果相反, 与 A、B 组比较, E 组细胞中 HIF-1 α 、VEGF、Bcl-2 蛋白表达明显增加, Bax、C-Caspase-3 蛋白表达明显减少, 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5、6。

3 讨论

hAMSCs 移植治疗脊髓损伤成为近年研究热点, 主要原因是 hAMSCs 属于多能干细胞, 能调节机体免疫功能、避免异体移植的免疫排斥反应^[9], 且其不具有成瘤性, 安全性好^[10]; 同时, hAMSCs 在缺氧条件下具有更强的繁殖能力, 在损伤的脊髓组织中能长期存活^[11]。而 hAMSCs 繁殖和存活能力是治疗脊髓损伤的关键因素之一。hAMSCs 繁殖和存活能力主要与 MSCs 的耐缺氧能力相关^[12]。研究

证实在缺氧条件下, MSCs 氧自由基减少, 对细胞的破坏作用降低或减弱, 同时持续 HIF-1 α 的表达并诱导相关生长因子表达, 促进缺氧区域新生血管形成, 增加细胞对缺氧的耐受能力^[13]。

HIF-1 α 是调控缺氧效应的一类极为重要的转录因子, 其分布和作用十分广泛, 可通过调控下游靶基因来增强 MSCs 对缺氧的耐受性^[14]。VEGF 是目前最强的促血管生成因子, 也是 HIF-1 α 重要的靶基因。已有研究证实 VEGF 具有抗凋亡和促进血管新生的作用^[15]。在脑缺血动物模型中发现, 缺血区 HIF-1 α 表达上调的同时 VEGF 表达亦增加, 从而促进血管生成来对抗缺血缺氧性损伤; 而通过实验干预减少 HIF-1 α 的降解, 则能诱导 VEGF 表达上调, 减少神经细胞凋亡, 促进新生血管形成, 增强细胞耐缺氧能力^[16-17]。本实验缺氧处理 hAMSCs 后, 检测各组细胞存活率时发现, A 组高于 B、C 组, 这可能与 B、C 空载组 hAMSCs 受损程度及 HIF-1 α 未明显表达有关。E 组 HIF-1 α 高表达时 hAMSCs 存活率明显升高, 而 D 组 hAMSCs 存活率明显下降, 提示 HIF-1 α 基因参与调控 hAMSCs 的存活能力。实验结果还显示, hAMSCs 存活率有时间依赖性, 在 24 h 时其存活率明显高于其他时间点, 这与 Western blot 检测 24 h 时 HIF-1 α 蛋白高表达结果一致, 提示缺氧时间长短对 hAMSCs 存活率有干预作用。Western blot 结果显示, 在 E 组中 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达水平同步增加, 而 D 组

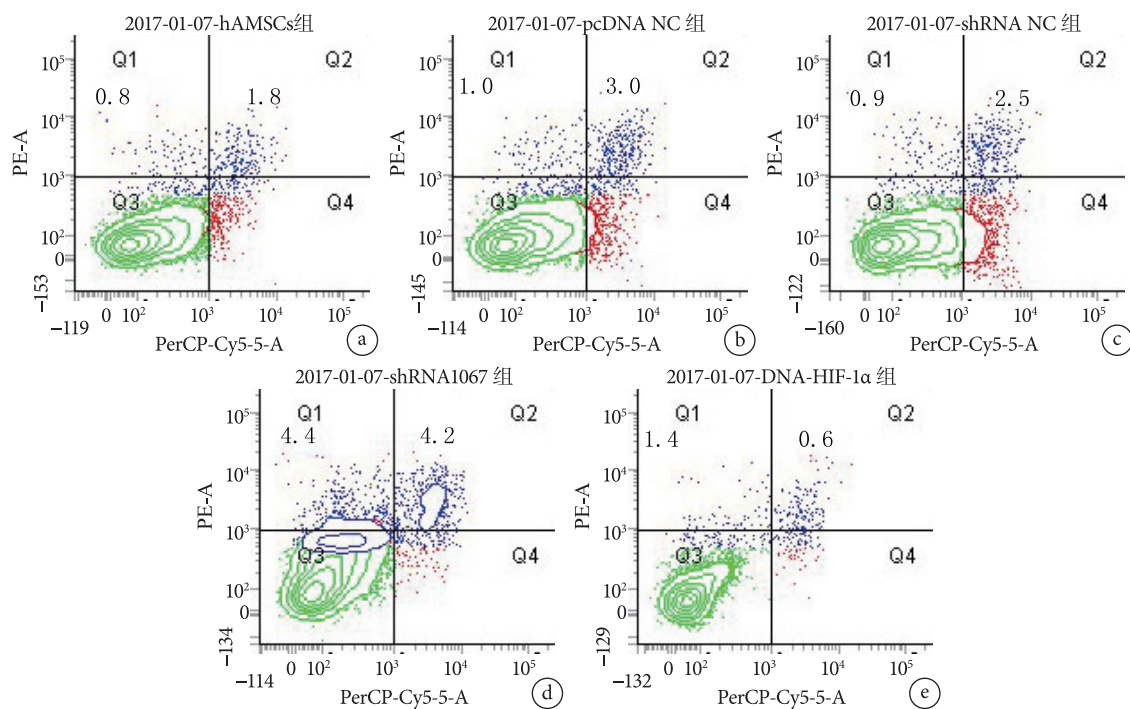


图 4 流式细胞仪检测各组缺氧处理后 24 h 细胞凋亡率 a. A 组; b. B 组; c. C 组; d. D 组; e. E 组

Fig.4 The apoptosis rate of cells at 24 hours after anoxic treatment by flow cytometry a. Group A; b. Group B; c. Group C; d. Group D; e. Group E

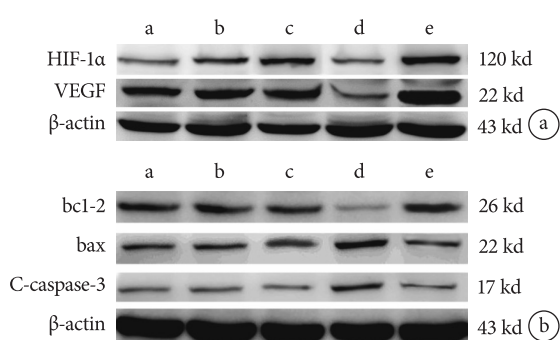


图 5 Western blot 检测各组缺氧处理后 24 h 各蛋白表达 a. HIF-1 α 、VEGF; b. Bcl-2、Bax 和 C-Caspase-3

Fig.5 Protein expressionS in each group at 24 hours after anoxic treatment by Western blot a. HIF-1 α and VEGF; b. Bcl-2, Bax, and C-Caspase-3

同步减少。表明 HIF-1 α 表达上调的同时 VEGF 表达增多, 促进新生血管生成, 参与了 hAMSCs 存活能力的调节作用。

HIF-1 α 还参与了细胞凋亡的调控, 其机制主要是缺氧条件下促进 HIF-1 α 表达, 从而使 VEGF 上调, 激活 PI3K-Akt 通路, 增加细胞活性及血管通透性, 降低细胞凋亡^[18]。其中 PI3K-Akt-HIF 通路的激活促进抗凋亡因子(如 Bcl-2)表达, 同时抑制促凋亡因子(如 Bax)的表达^[19]。Bcl-2 和 Bax 是调节细胞凋亡的两个重要相关基因, 它们通过激活一系列

下游基因在细胞凋亡中发挥作用。研究表明^[20]在脑缺血再灌注损伤中, Bcl-2 过表达能抑制细胞凋亡, Bax 过表达可通过抑制 Bcl-2 的作用而促使细胞凋亡。Bcl-2/Bax 蛋白表达比例也是决定细胞凋亡的关键, 当比例增大时细胞凋亡受抑制, 反之则促进凋亡^[21]。本实验 Western blot 结果显示, E 组 HIF-1 α 蛋白表达增加的同时 Bcl-2 蛋白表达增加, Bax 蛋白表达降低, Bcl-2/Bax 比例变大, 提示 HIF-1 α 过表达对 hAMSCs 的 Bcl-2 和 Bax 表达水平具有明显调节作用。干预 C-Caspase-3 的激活, 可有效抑制细胞凋亡的发生^[22]。E 组 HIF-1 α 蛋白表达增加而 C-Caspase-3 蛋白表达降低, 活性减弱, 提示 HIF-1 α 过表达对 C-Caspase-3 蛋白的表达水平具有调节作用。流式细胞仪检测结果显示, E 组 hAMSCs 凋亡率明显降低, 提示 HIF-1 α 基因高表达可降低 hAMSCs 凋亡率。上述结果表明, HIF-1 α 表达上调同时 VEGF 表达也增多, 可促进 Bcl-2 表达并抑制 Bax 表达, 降低 C-Caspase-3 活性, 从而增强 hAMSCs 抗凋亡能力。

综上所述, hAMSCs 缺氧处理后 HIF-1 α 基因过表达可提高其细胞存活及抗凋亡能力, 改善 hAMSCs 的耐受缺氧能力, 其可能机制与上调 VEGF 和相关凋亡基因 Bcl-2 表达及下调 Bax 和 C-Caspase-3 表达作用相关。

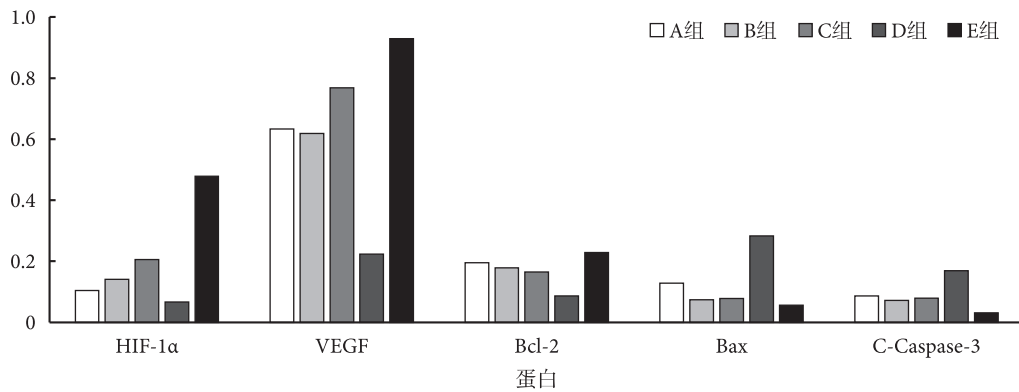


图6 Western blot 检测各组缺氧处理后 24 h 各蛋白相对表达量

Fig.6 The relative expression of protein in each group at 24 hours after anoxic treatment by Western blot

参考文献

- Zhou HL, Zhang XJ, Zhang MY, *et al.* Transplantation of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Promotes Functional Recovery in a Rat Model of Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurochem Res*, 2016, 41(10): 2708-2718.
- Tajiri N, Acosta S, Portillo-Gonzales GS, *et al.* Therapeutic outcomes of transplantation of amniotic fluid-derived stem cells in experimental ischemic stroke. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 227.
- Roh DH, Seo MS, Choi HS, *et al.* Transplantation of human umbilical cord blood or amniotic epithelial stem cells alleviates mechanical allodynia after spinal cord injury in rats. *Cell Transplant*, 2013, 22(9): 1577-1590.
- Lee HJ, Ryu JM, Jung YH, *et al.* Novel Pathway for Hypoxia-Induced Proliferation and Migration in Human Mesenchymal Stem Cells: Involvement of HIF-1 α , FASN, and mTORC1. *Stem Cells*, 2015, 33(7): 2182-2195.
- 孔宏亮, 孙红波, 宋丽杰, 等. 缺氧诱导因子-1 α 过表达对骨髓间充质干细胞缺氧时生存能力的影响. *中国普外基础与临床杂志*, 2011, 18(3): 261-266.
- Barbati A, Grazia Mamelì M, Sidono A, *et al.* Amniotic membrane: separation of amniotic mesoderm from amniotic epithelium and isolation of their respective mesenchymal stromal and epithelial cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2012, Chapter 1: Unit 1E.8, doi: [10.1002/9780470151808.sc01e08s20](https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc01e08s20).
- Choi SA, Choi HS, Kim KJ, *et al.* Isolation of canine mesenchymal stem cells from amniotic fluid and differentiation into hepatocyte-like cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2013, 49(1): 42-51.
- Bartoszewska S, Kochan K, Piotrowski A, *et al.* The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1 α expression in human endothelial cells through a negative feedback loop. *FASEB J*, 2015, 29(4): 1467-1479.
- Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, *et al.* Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry A*, 2014, 85(1): 43-77.
- Song M, Jue SS, Cho YA, *et al.* Comparison of the effects of human dental pulp stem cells and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on ischemic human astrocytes in vitro. *J Neurosci Res*, 2015, 93(6): 973-983.
- Sharma HS. Early microvascular reactions and blood-spinal cord barrier disruption are instrumental in pathophysiology of spinal cord injury and repair: novel therapeutic strategies including nanowired drug delivery to enhance neuroprotection. *J Neural Transm (Vienna)*, 2011, 118(1): 155-176.
- Li Q, Wijesekera O, Salas SJ, *et al.* Mesenchymal stem cells from human fat engineered to secrete BMP4 are nononcogenic, suppress brain cancer, and prolong survival. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(9): 2375-2387.
- 王立维, 黄文, 赵渝. 低氧培养对间充质干细胞生物学的影响. *中国组织工程研究*, 2012, 16(23): 4329-4334.
- 祁琳, 张晓雷, 毛立群, 等. HIF-1 与低氧性疾病关系的研究进展. *武警后勤学院学报 (医学版)*, 2013, 22(4): 330-333.
- Frost P, Berlinger E, Mysore V, *et al.* Mammalian target of rapamycin inhibitors induce tumor cell apoptosis in vivo primarily by inhibiting VEGF expression and angiogenesis. *J Oncol*, 2013, 2013: 897025.
- Shen F, Fan Y, Su H, *et al.* Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia-regulated VEGF gene transfer promotes angiogenesis following focal cerebral ischemia in mice. *Gene Ther*, 2008, 15(1): 30-39.
- Reischl S, Li L, Walkinshaw G, *et al.* Inhibition of HIF prolyl-4-hydroxylases by FG-4497 reduces brain tissue injury and edema formation during ischemic stroke. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84767.
- Wang JA, Chen TL, Jiang J, *et al.* Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(1): 74-82.
- 梁俊清, 徐海波, 陈小娟, 等. 通心络通过 PI-3K/Akt/HIF 信号通路改善血管内皮细胞缺氧损伤. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(5): 846-851.
- 陈萌, 田焕娜, 吴晓光, 等. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 对脑缺血再灌注大鼠 Bcl-2、Bax 和 Beclin-1 的表达及细胞凋亡的影响. *解剖学杂志*, 2017, 40(4): 417-420.
- Li Z, Pang L, Fang F, *et al.* Resveratrol attenuates brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia via up-regulation of hippocampal Bcl-2. *Brain Res*, 2012, 1450: 116-124.
- Li Q, Li Z, Xu XY, *et al.* Neuroprotective properties of picoside II in a rat model of focal cerebral ischemia. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(11): 4580-4590.

收稿日期: 2017-10-26 修回日期: 2018-02-05

本文编辑: 王雁