

张茹鑫,李承罡,杜若琛,等. 人脐带间充质干细胞对自然衰老大鼠海马自噬水平的影响[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 796-804.

Zhang RX, Li CG, Du RC, et al. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on autophagy in the naturally aging rat hippocampus [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 796-804.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2020. 06. 009

人脐带间充质干细胞对自然衰老大鼠海马自噬水平的影响

张茹鑫¹, 李承罡^{2*}, 杜若琛¹, 原一桐¹, 李宵¹, 赵碧春¹, 张玉娟¹, 王春芳^{1*}

(1. 山西医科大学实验动物中心, 太原 030001; 2. 山西医科大学第二医院, 太原 030001)

【摘要】 目的 本研究探究移植人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)是否能通过调节自然衰老大鼠自噬水平来改善学习记忆及认知衰退。**方法** SD 大鼠屏障环境饲养至衰老年龄(24 月龄), 行为学挑选出认知衰退明显的老年鼠, 分为细胞移植组(H 组)和生理盐水组(C 组), 3 月龄 SD 大鼠为正常组(N 组)。H 组: 尾静脉注射 hUCMSCs 细胞混悬液 500 μ L, 剂量为每只 2×10^6 个, C 组和 N 组分别尾静脉注射无菌生理盐水。时间均为每周 1 次, 连续 4 周。通过 Morris 水迷宫, Y 迷宫及新物体识别实验观察其学习记忆能力变化; 通过 HE 染色观察大鼠海马神经元形态改变; 通过 Western Blot 检测海马 LC3II/I、Beclin1、P62 的相对表达量。**结果** (1) 行为学结果显示 H 组和 N 组学习记忆能力显著高于 C 组。(2) HE 染色中 H 组和 N 组海马 CA1 区和 DG 区神经细胞排列较规整, 细胞结构完整, 细胞核饱满, C 组 CA1 区神经元数量减少, 细胞排列疏松, 细胞核固缩, 呈退行性病变。(3) H 组和 N 组中 P62 蛋白含量显著低于 C 组, Beclin1 和 LC3 II/I 显著高于 C 组。**结论** 静脉注射人脐带间充质干细胞改善自然衰老大鼠的学习记忆及认知衰退, 可能与干预后自噬水平的恢复有关。

【关键词】 衰老; 自噬; 人脐带间充质干细胞; 认知衰退; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 06-0796-09

Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on autophagy in the naturally aging rat hippocampus

ZHANG Ruxin¹, LI Chenggang^{2*}, DU Ruochen¹, YUAN Yitong¹, LI Xiao¹, ZHAO Bichun¹,
ZHANG Yujuan¹, WANG Chunfang^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.
2. Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

Corresponding author: WANG Chunfang. E-mail: wangchunfang@sxmu.edu.cn; LI Chenggang. E-mail: lcgsydeyjkz@163.com

【基金项目】 山西省重点研发项目(201803D31068), 山西省应用基础研究项目(201801D121212, 201901D211319, 201901D111384), 山西省高等学校科技创新项目(2019L0445, 2019L0418)。

Funded by Key R&D project of Shanxi Province (201803D31068), Applied Basic Research Project of Shanxi Province (201801D121212, 201901D211319, 201901D111384), Science and Technology Innovation Project of Colleges and Universities of Shanxi Province (2019L0445, 2019L0418).

【作者简介】 张茹鑫(1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 干细胞与神经发育再生。Email: zhangruxinin@163.com

【通信作者】 王春芳(1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 干细胞与神经发育再生。Email: wangchunfang@sxmu.edu.cn;

李承罡(1971—), 男, 副主任医师, 研究方向: 脊柱脊髓损伤。Email: lcgsydeyjkz@163.com。

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To explore whether transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) can improve learning, memory and cognitive decline by regulating autophagy levels in naturally aging rats. **Methods** Sprague-Dawley rats were reared in a barrier environment to the age of 24 months. Behavioral studies select aging rats with obvious cognitive decline; the rats were divided into a cell transplantation group (group H) and a normal saline group (group C). For comparison, a normal group (group N) of 3-month-old rats was included. Rats in group H were injected with 2×10^6 hUCMSCs in a volume of 500 μ L through the tail vein. Rats in groups C and N were injected with an equal volume of sterile saline through the tail vein. Injections were performed once per week for 4 weeks. Changes in learning and memory ability were assessed using the Morris water maze, Y maze, and novel object recognition test. Changes in rat hippocampal neuron morphology were assessed using hematoxylin-eosin staining. Relative expression levels of hippocampal LC3II/I, Beclin1, and p62 were assessed using Western Blot. **Results** Behavioral analyses showed that the learning and memory abilities were significantly better in groups H and N than in group C. HE staining of nerve cells in the CA1 and DG areas of the hippocampus revealed more regular arrangements, more complete cell structure, and more intact nuclei in groups H and N. Conversely, the number of neurons in the CA1 area was reduced, cell arrangement was loose, nuclei were shrunken, and degenerative disease was present in group C. p62 protein content was significantly lower in groups H and N than in group C, while Beclin1 and LC3II/I protein levels were significantly higher in groups H and N than in group C. **Conclusions** Intravenous injection of hUCMSCs improved learning, memory, and cognitive decline in naturally aging rats, presumably by restoration of autophagy.

[Keywords] aging; autophagy; human umbilical cord mesenchymal stem cells; cognitive decline; rats

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着全球人口老龄化的进程日益加快,衰老已经成为国内外神经科学与衰老生物研究的热点问题,而脑是受衰老影响最大的器官之一,脑的衰老会引起大脑内微环境的改变,主要表现为树突棘密度的降低、树突数量的减少以及突出后模致密物的变薄,这些被认为是衰老时记忆力减退、认知功能衰退的原因。研究显示,在自然衰老的机体中,ATG 蛋白或自噬诱导所需要的其他蛋白如 Sirtuin1 表达下调^[1-2]。有研究显示,通过对酿酒酵母菌中年龄老化因子的无偏筛选,发现了多个具有自噬缺陷的短寿突变体(包括 117 个短寿突变体中的 10 个 ATG 突变)^[3]。在阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)和亨廷顿病中,自噬有神经保护的作用^[1]。在正常人类衰老大脑中,自噬相关基因 5 (autophagy-related5, Atg5),自噬相关基因 7 (autophagy-related7, Atg7)和 Beclin 1 表达下调,与年龄相关的骨关节炎中 UNC-51 样激酶 1 (UNC-51-like kinase 1, ULK1)、Beclin1 和微管相关蛋白 1 轻链 3 II/I (microtubule-associated protein1 light chain 3 II/I, LC3II/I)表达也下调^[4-5]。这些发现表明,自噬的减弱可能是造成衰老表型的一种原因,因此提高自噬是抗衰老的有效手段。

人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)自发现以来,就因其具有高度的自我更新和多向分化潜能而备受关注,已经被用于多种疾病的基础研究和临床试验研

究。文献报道, hUCMSCs 通过改善突触可塑性和内源性神经发生恢复了老年小鼠海马依赖性学习记忆能力^[6]。有研究显示 hUCMSCs-exo 可以诱导自噬并且穿过血脑屏障到达灰质,减轻帕金森(Parkinson's disease, PD)大鼠模型的不对称旋转缺陷^[7]。在膀胱肿瘤中通过 AKT/mTOR 信号通路,使 Atg5、Atg7 和 Beclin1 上调并使磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (p-mTOR)下调增强膀胱肿瘤自噬性^[8]。在器官退行性病变中,移植人脐带间充质干细胞后使各脏器中自噬相关蛋白 Beclin1、LC3II/I 高表达,证明 hUCMSCs 通过调节自噬提高机体抗氧化应激的能力来延缓衰老^[9]。但 hUCMSCs 对于衰老进程中引起的脑部自噬水平紊乱是否有调节作用,以及是否可以通过移植来调控自噬的发生改善认知功能方面的报道较少。因此,本研究目的是评估静脉注射 hUCMSCs 对自然衰老引起的认知障碍的作用及调节脑部海马区自噬水平的潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

50 只 24 月龄清洁级雄性 SD 大鼠,体重约为 800 g;15 只 3 月龄清洁级雄性 SD 大鼠,体重约为 300 g。购于山西医科大学实验动物中心【SCXK(晋)2019-0005】,饲养于山西医科大学实验动物中心屏障

环境中【SYXK(晋)2019-0007】。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22~25℃。所有操作均符合实验大鼠的饲养过程和其他实验操作均符合实验动物伦理学要求(审批号:SYDL2020004)以及中华人民共和国《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂与仪器

Anti-LC3II/I Rabbit pAb (Wanleibio, WL01506), Anti-P62 Rabbit pAb (Wanleibio, WL02385), Anti-Beclin1 Rabbit pAb (Wanleibio, WL02508), Anti- β -actin Rabbit pAb (Wanleibio, WL01372), HRP Conjugated AffiniPure Goat Anti-rabbit/mouse IgG (BOSTER, BA1054), PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™, 26616), Beyo ECL Star (Beyotime, P0018AFT), HE 染色试剂盒 (Solarbio, G1120), 通用型组织固定液 (Servicebio, G1101)。

Morris 水迷宫和动物运动轨迹跟踪系统 (Noldus, 荷兰), Y 迷宫实验箱(自制), 新物体识别实验箱(自制), 细胞培养箱 (Heal Force, HF240, 中国), 石蜡切片机 (Leica RM 2245, 德国), 荧光显微镜 (OLYMPUS, 日本), 电泳仪 (Bio-Rad, 美国), 转膜仪 (Bio-Rad, 美国), 高灵敏度化学发光成像系统 (Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

经过行为学筛选出现学习认知衰退的 24 月龄大鼠 30 只,再将其随机分为:细胞移植组(H 组)(15 只),生理盐水组(C 组)(15 只)。3 月龄大鼠分为:正常年轻组(N 组)(15 只)。H 组:尾静脉注射 hUCMSCs 细胞混悬液 500 μ L,剂量为每只 2×10^6 个。C 组和 N 组分别尾静脉注射 NaCl,连续 4 次。细胞移植组所有大鼠均无脱失,注射细胞后无免疫排斥反应和急性毒性反应,注射后 1 个月时间内所有 SD 大鼠也均无其他异常现象。

1.2.2 细胞培养

脐带组织来源于山西省儿童医院,经伦理委员会批准并经过产妇及家属知情同意。细胞培养方法参照^[10],将第 3~4 代细胞用 0.25%胰酶/EDTA 消化后,再用 0.9%的生理盐水漂洗,重悬细胞并调整密度为每毫升 4×10^6 个。

1.2.3 新物体识别

细胞注射结束 1 周后,开始新物体识别实验。实验方法参照^[11]新物体识别概率视为新物体探索次数/总探索次数 $\times 100\%$ 表示^[12],新物体辨别系数视为(新物体探索时间 - 旧物体探索时间)/(新物

体探索时间 + 旧物体探索时间)表示^[13]。数据采集处理由 ANY-Maze 软件(Stoeling, 美国)完成。

1.2.4 Y 迷宫

新物体识别实验结束 1 d 后,开始 Y 迷宫实验。自发交替行为测试:用于测试大鼠短期工作记忆能力。实验开始时,将大鼠放入 Y 迷宫任意臂末端,任其自由探究 8 min,摄像系统记录动物的活动,记录分析大鼠的进入各臂的顺序和总次数,并计算交替正确率。交替正确率=进臂正确的次数/(进臂总次数-2) $\times 100\%$ ^[14]。

新异臂探索实验:用于检测大鼠的空间探索能力,分为两部分:训练期,用挡板将新异臂隔开,将大鼠放入剩余某臂中,并使其自由活动 10 min,24 h 后进行测试部分。测试期,取出挡板,将大鼠随机放入一臂中,使其在实验箱内活动 5 min。录像并记录每只大鼠进入新异臂的次数。数据采集处理由 ANY-Maze 软件(Stoeling, 美国)完成。

1.2.5 Morris 水迷宫

Y 迷宫结束 1 d 后,开始 Morris 水迷宫实验。用来测试大鼠的长期工作记忆能力。实验方法参照^[15],数据采集处理由 Ethovision 3.0 软件(Noldus Information Technology, 荷兰)完成。

1.2.6 HE 染色

大鼠腹腔注射 1%的戊巴比妥钠(50 mg/kg),完全麻醉后暴露心脏,先用 180 mL 0.9%无菌生理盐水冲洗,然后 180 mL 4%多聚甲醛灌注。待灌注成功后,分离出大脑,置于 4%多聚甲醛内常温固定 24 h,制作石蜡切片,然后进行 HE 染色,最后中性树脂封片后镜下观察并拍片记录。通过 HE 染色观察海马内部细胞的结构变化。

1.2.7 Western Blot

将 SD 大鼠麻醉后快速断头,冰上取出大鼠新鲜海马组织,-80℃冷冻保存。取出加入组织裂解液冰上研磨、低温离心提取总蛋白。利用 BCA 法检测蛋白浓度,各样本内蛋白含量根据标准曲线计算。每组取 40 μ g 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),再将蛋白转移至 PVDF 膜上,封闭用含 5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液,室温摇床封闭 1.5 h,将封闭好的 PVDF 膜浸泡在以 TBST 稀释的 LC3II/I (1:750),P62 (1:1000),Beclin1 (1:750), β -actin (1:1000)一抗中,4℃条件下孵育过夜,洗涤后浸泡在以 TBST(1:10000)稀释的二抗中,室温摇床孵育 2 h。最后将 PVDF 膜放至凝胶成像仪上,加入 ECL 化学发光剂显色成像并保存。条带的灰度值采用 Image Lab 软件分析。

1.3 统计学分析

结果用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有数据均用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5 软件处理,多组间均数比较采用单因素方差分析或重复测量的方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 hUCMSCs 的形态观察

原代 hUCMSCs 培养 14 d 后贴壁生长,第 3 代细胞生长状态良好,呈长梭形漩涡状,典型集落生长(图 1A,1B),细胞融合至 80~90% 时用于实验。

2.2 hUCMSCs 改善衰老大鼠在新物体识别实验中的学习记忆能力

H 组大鼠和 N 组大鼠新物体识别率和分辨系数显著高于 C 组 ($P < 0.01$),H 组和 N 组间无显著差异(图 2A,2B)。

2.3 hUCMSCs 改善衰老大鼠在 Y 迷宫实验中的短期工作记忆和空间探索能力

H 组和 N 组自发交替行为显著高于 C 组 ($P < 0.05$),H 组和 N 组间无显著差异(图 3A)。H

组和 N 组进入新异臂的次数显著高于 C 组 ($P < 0.05$),H 组和 N 组间无显著差异(图 3B)。

2.4 hUCMSCs 改善衰老大鼠在经典水迷宫实验中的长期工作记忆和空间探索能力

H 组和 N 组大鼠随着训练时间延长,逃避潜伏期显著短于 C 组大鼠,在训练的第 4 天差异极显著 ($P < 0.01$);H 组和 N 组无差异(图 4A);在第 5 天的空间探索实验中,游泳轨迹可看出 H 组和 N 组呈直线式搜索,C 组呈曲线式搜索(图 4B);H 组和 N 组跨越平台次数和目的象限停留时间显著大于 C 组 ($P < 0.01$)(图 4C、4D);此外,各组大鼠的游泳速度没有统计学差异(图 4E)。

2.5 hUCMSCs 改善衰老大鼠海马 CA1 区和 DG 区神经元数量及形态

H 组和 N 组海马 CA1 区细胞排列较规整,结构完好,细胞核饱满,C 组 CA1 区神经元数量减少,排列疏松,细胞核有固缩、碎裂现象(图 5A、5B、5C)。H 组和 N 组海马 DG 区形态规整,神经细胞排列紧密,细胞结构完整,细胞核饱满。C 组大鼠海马 DG 区形态不规整,细胞数量减少,细胞核固缩,碎裂严重(图 5D、5E、5F、5G、5H、5I)。

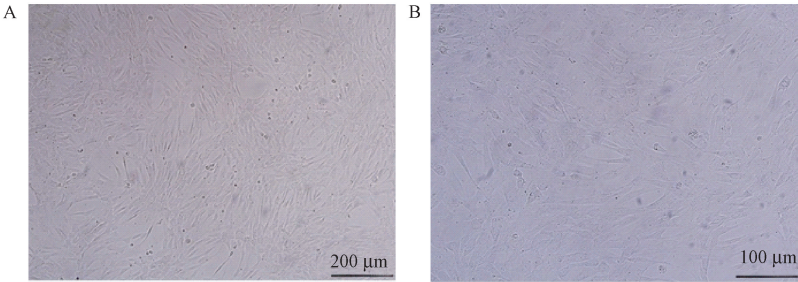
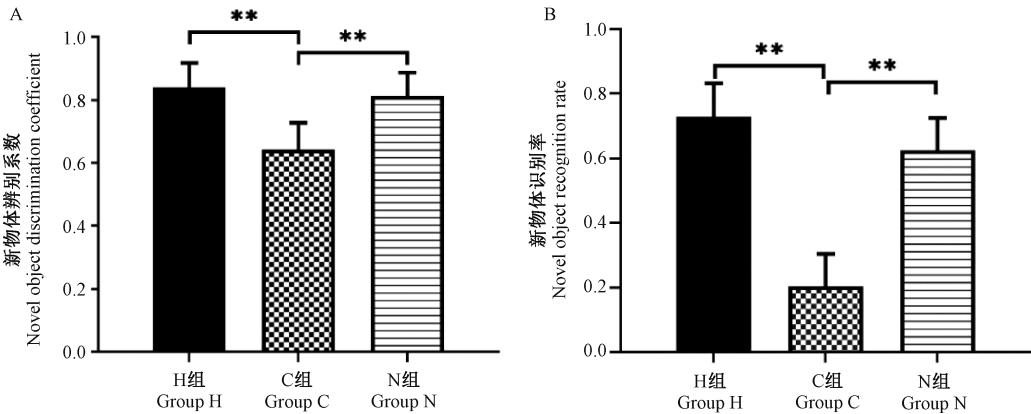


图 1 光学显微镜下处于对数期生长的第 3 代 hUCMSCs 细胞形态

Figure 1 Morphology of the third generation hUCMSCs growing in log phase under light microscope



注:与 C 组相比, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 2 新物体识别实验 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Note. Compared with group C, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Novel object recognition test ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

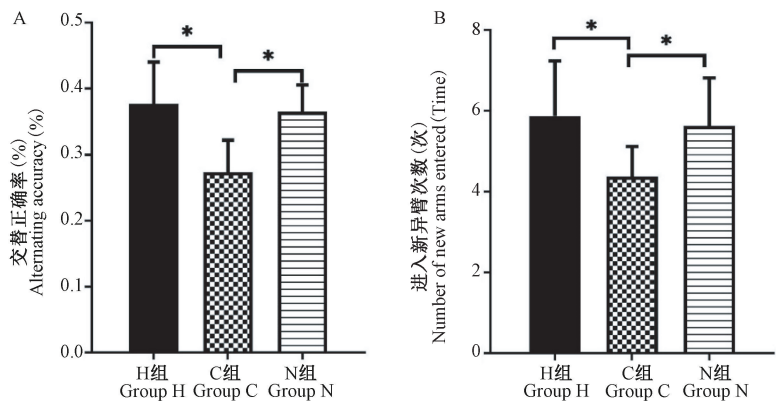


图 3 Y 迷宫实验($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Figure 3 Y Maze($\bar{x} \pm s, n = 10$)

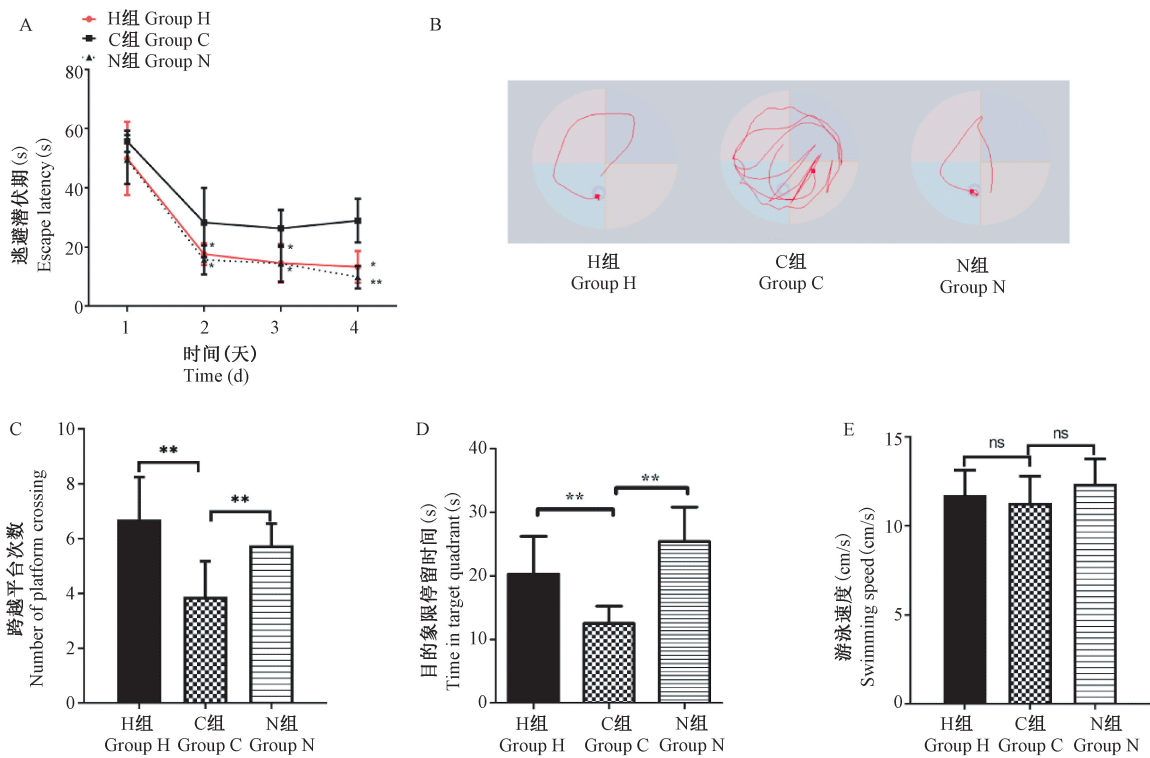


图 4 Morris 水迷宫实验($\bar{x} \pm s, n = 10$)

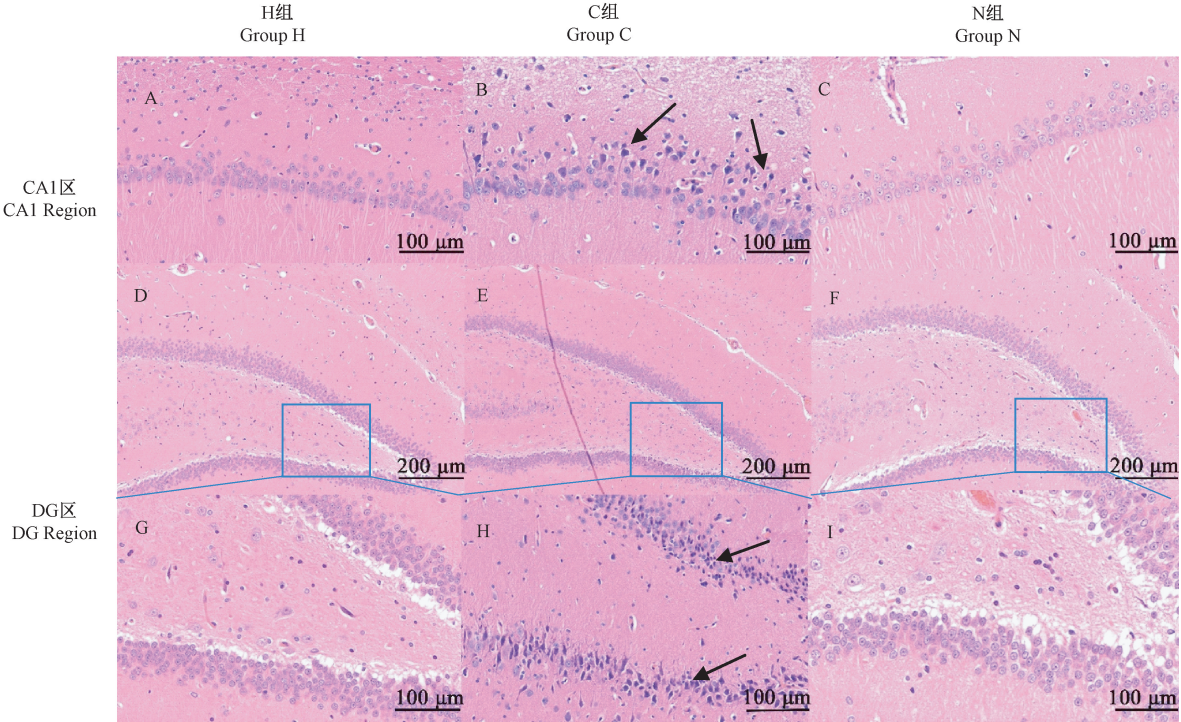
Note. A, B. The time and track of the rats to find the platform in the positioning cruise experiment. C, D. The number of times the rats crossed the platform in the space exploration experiment and the time they stayed in the target quadrant. E. Swimming speed of rats in water maze experiment.

Figure 4 Morris water maze($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.6 hUCMSCs 干预后增强了衰老大鼠海马中自噬相关蛋白的表达

H 组和 N 组大鼠海马中 LC3 II 蛋白含量较 C 组显著升高($P < 0.01$), LC3 I 蛋白含量较 C 组显著降低

($P < 0.05, P < 0.01$), LC3II 与 LC3I 的比值较 C 组显著升高($P < 0.05, P < 0.01$)(图 6A、6C), H 组和 N 组大鼠海马中 P62 蛋白含量较 C 组显著降低, Beclin1 蛋白含量较 C 组显著升高($P < 0.01$)(图 6A、6B)。

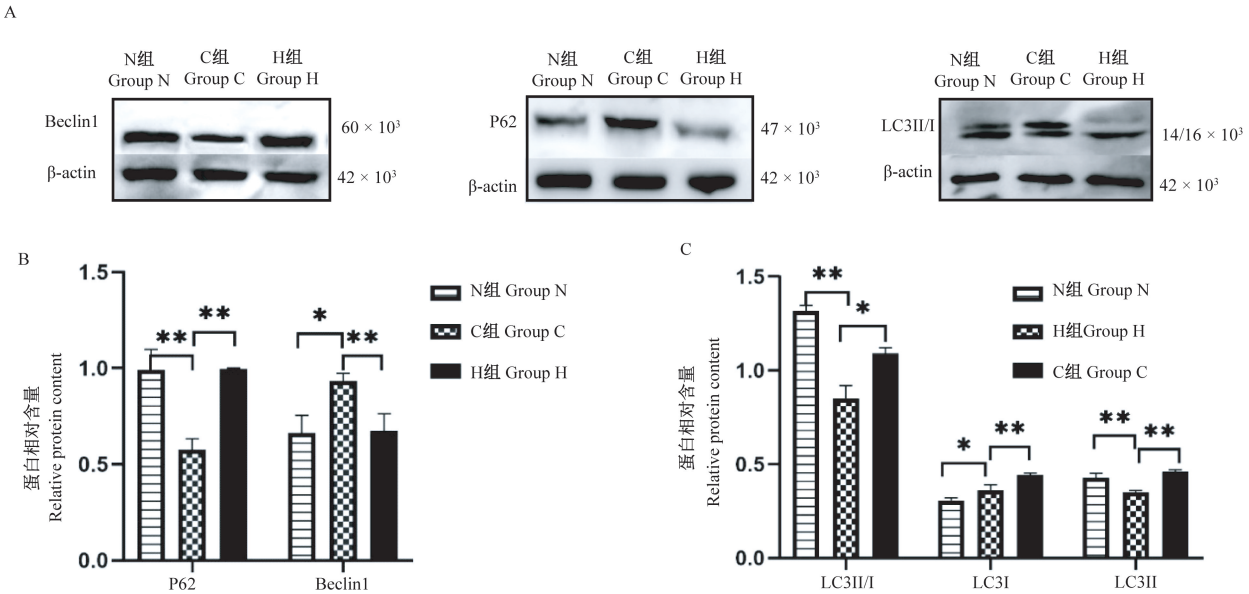


注:黑色箭头为核固缩, 碎裂。

图 5 各组海马组织 HE 染色($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note. Black arrow for nuclear shrinkage, fragmentation.

Figure 5 HE staining of hippocampal tissues of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)



注:A;Beclin1,P62 和 LC3II/I Western Blot 结果;B、C;与 C 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 6 蛋白条带和相对含量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note. A. Western Blot protein bands of Beclin1, P62and LC3II/I. B, C. Compared with group C, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Protein bands and relative protein content($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

衰老是随着年龄的增长,机体逐渐出现生物学

损伤的过程,有研究表明,中枢神经系统最易受到衰老影响,常常伴随导致认知功能下降甚至神经退行性疾病的发生,对老年人的生活造成了巨大的影

响,随着全球老龄化人口日渐增多,这一问题变得更加严峻。hUCMSCs 作为一种易获取、无伦理争议和免疫排斥反应,且具有高度自我分化及更新能力的干细胞,已经应用于很多中枢神经系统疾病的研究,能够修复神经系统的损伤和衰老过程中的导致的脑部微环境的改变^[6-7,16],大多是从 DNA 损伤和氧化应激等机制入手^[17],hUCMSCs 对脑衰老与自噬之间的关系研究较少。因此,本文选取出现认知和学习记忆能力衰退的自然衰老大鼠为研究对象,通过移植 hUCMSCs 探讨其与衰老所致的认知衰退与自噬之间的关系。

考虑到实验中水迷宫雌雄鼠的体力和游泳速度的差异,造成实验结果出现明显的两极分化^[18]且加入性别差异后不符合实验设计单一变量的原则,除此以外类似研究多数也用单一雄性大鼠作为实验对象^[19-20],因此在本实验中优先选择了单一性别雄鼠作为研究对象。

据我们所知,在临床上,脑室注射经常面临着颅内感染甚至更严重的脑损伤,其移植的必要性和转分化的频率仍有争议。相比之下,静脉移植 MSCs 较为安全,这一点是普遍比较认可的。最近一项研究也证明了这种方式的安全性^[21],与在中枢神经系统直接给药有明显的临床优势并且更容易接受^[22]。因此我们在本实验中采取了静脉注射这种侵入性较小的方式,对自然衰老出现认知障碍的动物模型进行慢性治疗,移植的剂量与时间是通过预实验来确定的。

除此之外,有研究表明静脉移植 MSCs 在缺血性脑卒中、亨廷顿病^[23]和 AD^[24-25]等模型中均可迁移并定位到大脑区域^[26-27],但只有一小部分细胞会到达炎症组织,这表明它们的治疗作用可能是由于其分泌的具有免疫调节和营养活性的生物活性分子起作用^[28-29],有鉴于此,先前的研究表明,在外伤性脑损伤中,MSCs 通过与非神经系统器官(如脾)相互作用而起到神经保护作用^[30]。考虑到这些因素,我们认为间充质干细胞的治疗效果可能是由分泌的生物活性分子或其他免疫细胞介导的。

Beclin1、LC3 和 P62 参与了自噬发生的起始、延长、成熟和降解的整个过程,是判断自噬过程的关键指标。Beclin1 是自噬起始的重要组成部分,其与 PI3K 结合形成复合物,招募胞浆中的自噬相关的蛋白,形成完整自噬体^[31]。LC3 是哺乳动物细胞中酵母 Atg8 基因的同源物,一般以 LC3I 和 LC3II 两种

形式出现^[32],在 Atg4 的作用下,LC3I 经过剪切和泛素化加工修饰,与自噬体膜表面的磷脂酰乙醇胺相结合,形成 LC3II。一般以 LC3II 与 LC3I 的比值来评估自噬水平,作为反映自噬活性高低的一个有效指标^[33-34]。p62 蛋白作为细胞自噬调控过程中的一种可选择底物,其累积提示自噬能力衰退,而当 P62 被降解时表示自噬被激活,因此 P62 与自噬水平负相关^[35],本研究发现与对照组相比移植 hUCMSCs 的自然衰老大鼠的海马组织中 Beclin1 和 LC3II/I 的比值表达量显著增加,P62 蛋白表达显著下降,表示 hUCMSCs 干预诱导 Beclin1 合成增加,激活自噬的起始阶段。LC3II 合成增加,参与自噬溶酶体膜的延伸,直到自噬溶酶体形成,并在后期与 P62 相互作用后使 P62 在溶酶体降解,形成完整的自噬流。证明 hUCMSCs 干预后增强了衰老大鼠海马自噬水平,改善了随着年龄增加导致的自噬缺陷。

本课题还发现在 Morris 水迷宫实验中,移植 hUCMSCs 后的大鼠在定位航巡实验中第 2、3、4 天的逃避潜伏期明显低于对照生理盐水组,并且与 3 月龄大鼠无差异(未给数据);在撤掉水下隐藏平台后,细胞移植组经过原平台位置的次数以及在目的象限停留的时间明显高于对照生理盐水组,说明移植 hUCMSCs 后,自然衰老大鼠的长期工作记忆和空间探索能力的水平有所提高。Y 迷宫实验用来检测大鼠的空间工作记忆及片段式学习记忆,实验发现移植 hUCMSCs 组大鼠与生理盐水组相比自发交替行为正确率和进入新异臂的次数显著增加。新物体识别实验中,细胞移植组大鼠探索新物体的次数显著高于生理盐水组大鼠,以上行为学实验表明,hUCMSCs 对自然衰老大鼠的片段式记忆,长期工作记忆和空间探索能力均有所提高。在本实验中发现干细胞移植可改善自然衰老大鼠短期内的认知衰退,长期的效果还有待探索。

综上所述,静脉注射间充质干细胞是一种很有前途的治疗方法,其对改善脑衰老引起的脑部神经元丢失,自噬减弱以及对工作记忆和对物体及方位的学习记忆衰退起着重要的作用。MSCs 治疗神经退行性病变仍处于早期研究阶段,在今后的课题研究中,应致力于解开这种治疗的具体机制,将从 hUCMSCs 如何具体影响衰老大鼠海马的自噬水平以及能否长期改善脑衰老引起的认知方面的衰退进行更加深入的研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Menzies FM, Moreau K, Rubinsztein DC. Protein misfolding

- disorders and macroautophagy[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2): 190–197.
- [2] Lipinski MM, Zheng B, Lu T, et al. Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(32): 14164–14169.
 - [3] Matecic M, Smith DL, Pan X, et al. A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors[J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(4): e1000921.
 - [4] Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, et al. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*[J]. *Science*, 2003, 301(5638): 1387–1391.
 - [5] de Kreutzenberg SV, Ceolotto G, Papparella I, et al. Downregulation of the longevity-associated protein sirtuin 1 in insulin resistance and metabolic syndrome: potential biochemical mechanisms[J]. *Diabetes*, 2010, 59(4): 1006–1015.
 - [6] Cao N, Liao T, Liu J, et al. Clinical-grade human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells reverse cognitive aging via improving synaptic plasticity and endogenous neurogenesis[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e2996.
 - [7] Chen HX, Liang FC, Gu P, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(4): 288.
 - [8] Xie J, Liu B, Chen J, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells alleviated inflammation and inhibited apoptosis in interstitial cystitis via AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 546–552.
 - [9] 和法莲. 人脐带间充质干细胞对小鼠老年性器官功能退变的治疗作用及其机制研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2017.
He FL. The therapeutic effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells on senile sexual organ degeneration in mice and its mechanism [D]. Kunming: Kunming Medical University, 2017.
 - [10] 刘莎, 吴明, 施兵奇, 等. 脐带间充质干细胞通过上调神经营养因子表达改善 A β 损伤大鼠的学习记忆能力[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(7): 980–985.
Liu S, Wu M, Shi BQ, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells improve learning and memory by upregulation of neurotrophic factor expression in rats[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2016, 32(7): 980–985.
 - [11] 田野, 栗鑒, 原一桐, 等. 长时程抑郁小鼠模型建立及行为与神经病理特征观察[J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(3): 358–363.
Tian Y, Li Y, Yuan YT, et al. Establishment of long-term depression mouse model and observation of behavioral and neuropathological characteristics[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(3): 358–363.
 - [12] Ennaceur A, Meliani K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory[J]. *Behav Brain Res*, 1992, 51(1): 83–92.
 - [13] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications[J]. *Cogn Process*, 2012, 13(2): 93–110.
 - [14] Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-Maze for assessment of spatial working and reference memory in mice[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 105–111.
 - [15] 王凯, 李强, 孙伟明, 等. 不同浓度 A β_{25-35} 蛋白模拟阿尔茨海默病模型学习记忆的差异[J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(3): 14–19.
Wang K, Li Q, Sun WM, et al. Learning and memory differences in models of Alzheimer's disease simulated by A β_{25-35} protein at different concentrations[J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(3): 14–19.
 - [16] Yang Y, Cao TT, Tian ZM, et al. Subarachnoid transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cell in rodent model with subacute incomplete spinal cord injury: Preclinical safety and efficacy study[J]. *Exp Cell Res*, 2020, 395(2): 112184.
 - [17] Cui Y, Ma S, Zhang C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis[J]. *Behav Brain Res*, 2017, 320: 291–301.
 - [18] Kay H, Birren J. Swimming speed of the albino rat. II. Fatigue, practice, and drug effects on age and sex differences [J]. *J Gerontol*, 1958, 13(4): 378–385.
 - [19] 阮波, 王瑞, 杨远坚, 等. 从 NLRP3 炎症小体途径探讨竹节参总皂苷改善自然衰老大鼠认知功能衰退的作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(2): 344–349.
Ruan B, Wang R, Yang YJ, et al. Improved effects of saponins from *panax japonicus* on decline of cognitive function in natural aging rats via NLRPS inflammasome pathway[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2019, 44(2): 344–349.
 - [20] Wei BB, Liu MY, Zhong X, et al. Increased BBB permeability contributes to EGCG-caused cognitive function improvement in natural aging rats: pharmacokinetic and distribution analyses[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(11): 1490–1500.
 - [21] Ra JC, Shin IS, Kim SH, et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(8): 1297–1308.
 - [22] Jackson JS, Golding JP, Chapon C, et al. Homing of stem cells to sites of inflammatory brain injury after intracerebral and intravenous administration: a longitudinal imaging study [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2010, 2(1): 17.
 - [23] Edalatmanesh MA, Matin MM, Neshati Z, et al. Systemic transplantation of mesenchymal stem cells can reduce cognitive and motor deficits in rats with unilateral lesions of the neostriatum [J]. *Neurol Res*, 2010, 32(2): 166–172.
 - [24] 王欣欣, 马珊珊, 孟楠, 等. hUC-MSCs 和白藜芦醇对 AD 小鼠学习记忆能力及脑内 SIRT1 信号通路的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2016, 51(5): 576–579.
Wang XX, Ma SS, Meng N, et al. Effect of huc-Mscs and resveratrol on learning and memory ability and brain SIRT1 signaling pathway in AD mice [J]. *J Zhengzhou Univ (Med Edit)*, 2016, 51(5): 576–579.

- [25] Panchenko MM, Poltavtseva RA, Bobkova NV, et al. Localization and differentiation pattern of transplanted human multipotent mesenchymal stromal cells in the brain of bulbectomized mice[J]. Bull Exp Biol Med, 2014, 158(1): 118–122.
- [26] 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.
- [27] Shonesy BC, Thiruchelvam K, Parameshwaran K, et al. Central insulin resistance and synaptic dysfunction in intracerebroventricular-streptozotocin injected rodents [J]. Neurobiol Aging, 2012, 33(2): 430.e5–e18.
- [28] 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.
- [29] Ding M, Shen Y, Wang P, et al. Exosomes isolated from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate neuroinflammation and reduce amyloid-beta deposition by modulating microglial activation in Alzheimer's disease [J]. Neurochem Res, 2018, 43(11): 2165–2177.
- [30] Walker P, Shah S, Jimenez F, et al. Intravenous multipotent adult progenitor cell therapy for traumatic brain injury: preserving the blood brain barrier via an interaction with splenocytes[J]. Exp Neurol, 2010, 225(2): 341–352.
- [31] Hariharan N, Zhai P, Sadoshima J. Oxidative stress stimulates autophagic flux during ischemia/reperfusion[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(11): 2179–2190.
- [32] Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, et al. LC3 and GATE - 16/ GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis[J]. EMBO J, 2010, 29(11): 1792–1802.
- [33] Fujita N, Itoh T, Omori H, et al. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy [J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(5): 2092–2100.
- [34] Slobodkin MR, Elazar Z. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy[J]. Essays Biochem, 2013, 55(1): 51–64.
- [35] Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor[J]. FEBS J, 2016, 282(24): 4672–4678.

[收稿日期] 2020-08-28