

• 基础科研论著 •

低氧预处理人牙髓干细胞调控铁死亡减轻 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤

霍启晓¹, 高淑君², 徐康¹, 房祥艳¹, 肖培伦³, 王晓莉⁴, 王凡涛²

1. 山东第二医科大学口腔医学院, 山东 潍坊 261053; 2. 山东第二医科大学附属医院口腔科;

3. 山东第二医科大学基础医学院解剖学教研室; 4. 山东第二医科大学医学影像学院

摘要: **目的** 探究低氧预处理人牙髓干细胞(H-hDPSCs)移植对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)新生大鼠脑神经元铁死亡的影响,为新生儿 HIBD 的治疗提供新思路。**方法** 选取健康 7d Sprague Dawley 大鼠 64 只,随机分为对照(Sham)组、HIBD 组、常氧培养 hDPSCs(N-hDPSCs)组和低氧预处理 hDPSCs(H-hDPSCs)组,每组 16 只。HIBD 模型采用经典 Rice-Vannucci 法建立, N-hDPSCs 或 H-hDPSCs 建模后 24h 移植至侧脑室。移植后 72h,采用苏木素伊红(HE)与尼氏染色法观察损伤侧大脑皮层组织病理学变化;ELISA 法检测血清铁和损伤侧大脑皮层组织铁含量的变化;NeuN/ACSL4、NeuN/GPX4、NeuN/SLC7A11 免疫荧光双标染色与 Western blot 检测 ACSL4、GPX4、SLC7A11 蛋白在损伤侧大脑皮层神经元的表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应法(qRT-PCR)检测大脑皮层 ACSL4、GPX4、SLC7A11 mRNA 的表达水平。**结果** HE 及尼氏染色结果显示,与 Sham 组相比,HIBD 组神经细胞排列紊乱,细胞核深染固缩,尼氏小体数量较少, N-hDPSCs 组和 H-hDPSCs 组与 HIBD 组相比损伤减轻。血清铁和大脑皮层组织铁含量 HIBD 组最高, N-hDPSCs 组次之, Sham 组最低($F=79.565, 121.065, P<0.001$)。免疫荧光染色示 Sham 组 NeuN⁺ GPX4⁺ 和 NeuN⁺ SLC7A11⁺ 细胞数最高, H-hDPSCs 组次之, HIBD 组最低($F=30.896, 75.089, P<0.001$); NeuN⁺ ACSL4⁺ 细胞数 HIBD 组最高, N-hDPSCs 组次之, Sham 组最低($F=87.724, P<0.001$)。qRT-PCR 和 Western blot 结果示, H-hDPSCs 组和 N-hDPSCs 组 GPX4, SLC7A11 的 mRNA 及蛋白表达水平显著高于 HIBD 组,且 H-hDPSCs 组显著高于 N-hDPSCs 组($F=1008.209, 41.765, 48.178, 43.303, P<0.001$); H-hDPSCs 组和 N-hDPSCs 组 ACSL4 的 mRNA 及蛋白表达水平显著低于 HIBD 组,且 H-hDPSCs 组显著低于 N-hDPSCs 组($F=234.513, 164.942, P<0.001$)。**结论** hDPSCs 移植可通过抑制大脑皮层铁死亡相关基因的表达,抑制神经元铁死亡发生,新生大鼠 HIBD 得以减轻,且 H-hDPSCs 效果优于 N-hDPSCs。

关键词: 低氧; 人牙髓干细胞; 新生大鼠; 缺氧缺血性脑损伤; 铁死亡

中图分类号: R179

文献标识码: A

文章编号: 1008-6579(2025)09-0976-06

doi: 10.11852/zgetbjzz2024-1254

Hypoxia-preconditioned human dental pulp stem cells attenuate hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats by regulating ferroptosis

HUO Qixiao¹, GAO Shujun², XU Kang¹, FANG Xiangyan¹, XIAO Peilun³, WANG Xiaoli⁴, WANG Fantao²1. Shandong Second Medical University, Weifang, Shandong 261053, China; 2. Department of Stomatology, Affiliated Hospital of Shandong Second Medical University; 3. Department of Anatomy, School of Basic Medical Science Shandong Second Medical University; 4. School of Medical Imaging, Shandong Second Medical University
Corresponding author: WANG Fantao, E-mail: wang.fantao@163.com; WANG Xiaoli, E-mail: wxl@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effects of hypoxia-preconditioned human dental pulp stem cells (H-hDPSCs) transplantation on neuronal ferroptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD), in order to provide novel therapeutic insights for neonatal HIBD. **Methods** A total of 64 7-day-old Sprague Dawley rats were randomly assigned to four groups: sham-operated (Sham), HIBD, normoxic-cultured hDPSCs (N-hDPSCs), and hypoxia-preconditioned hDPSCs (H-hDPSCs), with 16 rats in each group. The HIBD model was established using the Rice-Vannucci method. N-hDPSCs or H-hDPSCs were transplanted into the lateral ventricle 24 hours post-modeling. At 72 hours post-transplantation, histopathological changes were assessed by hematoxylin-eosin (HE) and Nissl staining, serum and cortical iron levels were measured by ELISA. Expression levels of ACSL4, GPX4, and SLC7A11 mRNA in the cerebral cortex detected by real-time quantitative fluorescence polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** The results of HE and Nissl staining showed that compared with the Sham group, HIBD group showed neuronal disarray, pyknotic nuclei, and

基金项目: 国家自然科学基金(82071888); 山东省中医药科技项目(Z-2023059)**作者简介:** 霍启晓(1998—), 女, 在读硕士研究生, 主要研究方向为牙髓干细胞治疗缺氧缺血性脑病。**通信作者:** 王凡涛, E-mail: wang.fantao@163.com; 王晓莉, E-mail: wxl@163.com

reduced Nissl bodies, while both hDPSCs groups exhibited attenuated damage. Compared with the Sham group, serum iron and iron content of the cortical tissue on the injured side were as the followings in the remaining three groups: HIBD>N-hDPSCs>Sham ($F=79.565, 121.065, P<0.001$). In terms of ferroptosis markers: GPX4+/SLC7A11+ neurons were as the followings: Sham>H-hDPSCs>HIBD ($F=30.896, 75.089, P<0.001$), ACSL4+ neurons were as the followings: HIBD>N-hDPSCs>Sham ($F=87.724, P<0.001$). H-hDPSCs showed higher GPX4 or SLC7A11 and lower ACSL4 expression than N-hDPSCs at both mRNA (qRT-PCR) and protein (Western blot) levels ($P<0.001$).

Conclusions Transplantation of hDPSCs mitigates HIBD by suppressing neuronal ferroptosis, with hypoxia-preconditioned cells demonstrating superior therapeutic effects through regulation of ferroptosis-related pathways (GPX4/SLC7A11 upregulation and ACSL4 downregulation).

Keywords: hypoxia; human dental pulp stem cells; neonatal rats; hypoxic-ischemic brain damage; ferroptosis

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿神经功能障碍甚至死亡的重要原因^[1],是围生期窒息引起的缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)。HIBD引发的神经系统后遗症,如脑瘫、癫痫等,其机制有待进一步探究^[2]。铁死亡是由铁依赖性的脂质过氧化物过量蓄积所触发的一种程序性细胞死亡方式,是 HIBD 的重要机制之一^[3-5],其关键蛋白包括:酰基辅酶 a 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)^[6-9]。人牙髓干细胞(human dental pulp stem cells, hDPSCs)起源于胚胎时期神经嵴,与神经细胞同源,可分泌多种神经保护和免疫调节因子,具有更强的神经再生与修复作用^[10]。有研究发现,干细胞通过抑制铁死亡减轻脊髓损伤等多种疾病^[11-12],本课题组前期研究发现,低氧预处理 hDPSC 可减轻新生大鼠 HIBD,其机制尚待阐明^[13-14]。由此,本研究拟通过建立 HIBD 模型,探究低氧预处理 hDPSCs 移植对大脑皮层神经元铁死亡的作用,为 hDPSCs 治疗 HIE 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 SPF 级 7 日龄 Sprague Dawley 新生大鼠 64 只,山东济南朋悦实验动物繁育公司提供,许可证号:SCXK(鲁)20220006,平均体重(11.6 ± 1.8)g,雌雄不限。随机数字表法分成对照(Sham)组、HIBD 组、常氧预处理 hDPSCs(N-hDPSCs)组和低氧预处理 hDPSCs(H-hDPSCs)组,每组各 16 只。HIBD 组、N-hDPSCs 组和 H-hDPSCs 组依据经典 Rice-Vannucci 法^[15]建立新生大鼠 HIBD 模型,Sham 组仅分离右侧颈总动脉不进行缺氧缺血处理,不注射牙髓干细胞。移植后 72h,每组

行 HE、尼式和免疫荧光双标染色($n=6$),血清铁、组织铁测定($n=4$),Western blot($n=3$)和 qRT-PCR 检测($n=3$)。本研究已通过山东第二医科大学动物伦理委员会许可(编号:2023SDL292)。

1.2 主要仪器与试剂 脑立体定位仪(美国 Stoelting 公司);三气培养箱(美国 Thermo 公司);正置荧光显微镜(BX-51,日本 Olympus 公司);化学发光凝胶成像仪(6100t,上海勤翔公司);荧光封片剂(含 DAPI,美国 Sigma 公司);苏木素伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒、血清铁及组织铁含量检测试剂盒(均购于北京索莱宝公司);尼氏染色试剂盒(南京凯基公司);兔抗大鼠 ACSL4、兔抗大鼠 GPX4、兔抗大鼠 SLC7A11(均购于英国 Affinity 公司);小鼠抗大鼠 NeuN(武汉三鹰公司);Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔、Alexa Fluor 594 标记的山羊抗鼠荧光二抗(均购于北京中杉金桥公司);兔抗 β -actin(武汉爱博泰克公司)。

1.3 方法

1.3.1 hDPSCs 低氧预处理、移植 与本课题组前期方法一致^[14]。

1.3.2 标本的采集与处理 移植后 72h,3%戊巴比妥钠(15mg/kg)腹腔注射麻醉,取血清及大脑皮层,-80℃冰箱保存,用于血清铁、组织铁含量,分子生物学检测;4%多聚甲醛心脏灌注,取脑,乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡包埋,冠状位切片,厚度 $4\mu\text{m}$,用于组织学染色。

1.3.3 HE 染色、尼式染色 大鼠脑组织石蜡包埋、切片。HE 染色:将切片脱蜡酒精水化后,苏木素室温染 10min,分化液 30s 后冲洗,伊红染 2min,乙醇脱水至透明,封片。尼式染色:0.1%甲苯胺蓝溶液染色 10min,去离子水冲洗,95%乙醇脱水,透明,封片。

1.3.4 血清铁及组织铁含量测定 血清铁:取血清,试剂盒说明配置标准液,酶标仪 520nm 测定吸

光度 OD 值。组织铁:称取等量大脑皮层研磨,加提取液,离心取上清,加组织铁试剂,沸水浴后加氯仿,离心取上清,酶标仪 520nm 测定吸光度 OD 值。计算公式同本课题组^[16]。

1.3.5 免疫荧光染色 切片脱蜡,抗原修复,0.3% TritonX-100 透膜,5% BSA-PBS 封闭,加一抗混合液(1:200),4℃过夜,PBS 洗涤,滴加二抗混合液(1:200),37℃避光孵育 1h,封片。正置荧光显微镜观察并拍照。

1.3.6 Western blot 将损伤侧脑组织裂解,BCA 法测定蛋白浓度,12%聚丙烯酰胺分离胶电泳、PVDF 转膜、封闭,一抗(1:1 000),4℃过夜,二抗(1:10 000),37℃孵育 2h。曝光拍照,Image J 软件分析条带灰度值。

1.3.7 实时荧光定量聚合酶链式反应法 实时荧光定量聚合酶链式反应法(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR):取大脑皮层,提取 RNA,逆转录为 cDNA,SYBR Green 荧光染料法进行相对定量。10μL 体系:cDNA 模板 1μL、无酶水 3.2μL、SYBR Premix 荧光定量反应试剂 5μL,上游、下游引物各 0.4μL,反应条件:95℃预变性 5min。PCR 反应阶段:95℃变性 10s,60℃退火 10s,72℃延伸 20s,循环 40 次,结果以 C_q 值表示,2^{-ΔΔC_q}法比较各组 mRNA 表达差异。ACSL4:上游(5'-3'): TCCAAGC-

CAGAAACTCAAGC,下游(5'-3'): GGTGTACATGACAATGGCCAT; GPX4:上游(5'-3'): AATTTCGACGCCAAGGACATC,下游(5'-3'): AGGCCAGGATTCGTAAACCA; SLC7A11:上游(5'-3'): GCTGACACTCGTGCTATT,下游(5'-3'): ATTCTGGAGGTCTTTGGT; β-actin:上游(5'-3'): TATCCTGGCCTCACTGTCCA,下游(5'-3'): AAGGGTGTAACACGCAGCTC。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 25.0 对实验数据统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性资料,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用 SNK-*q* 法检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组新生大鼠皮层神经细胞形态学变化 HE 染色结果:Sham 组大脑皮层细胞排列整齐,细胞核规整,胞浆色浅均匀;HIBD 组细胞排列紊乱,细胞核固缩且深染,部分细胞见空泡样改变;N-hDPSCs 组和 H-hDPSCs 组细胞排列较规则,损伤减轻。尼氏染色结果:Sham 组神经细胞排列整齐规律,尼氏小体明显;HIBD 组神经细胞排列紊乱,空泡形成,尼氏小体减少;N-hDPSCs 组和 H-hDPSCs 组空泡较少,结构较正常。见图 1。

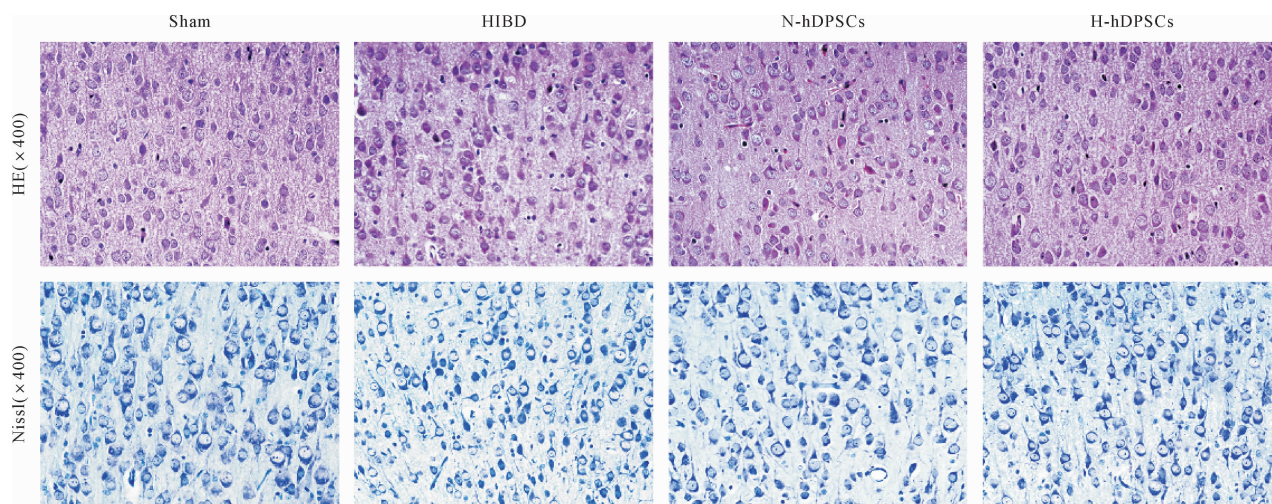


图 1 低氧预处理 hDPSCs 对大脑皮层神经细胞的影响(标尺=20μm)

Fig. 1 Effects of hypoxic preconditioning of hDPSCs on cerebral cortical neuronal cells (scale bar=20μm)

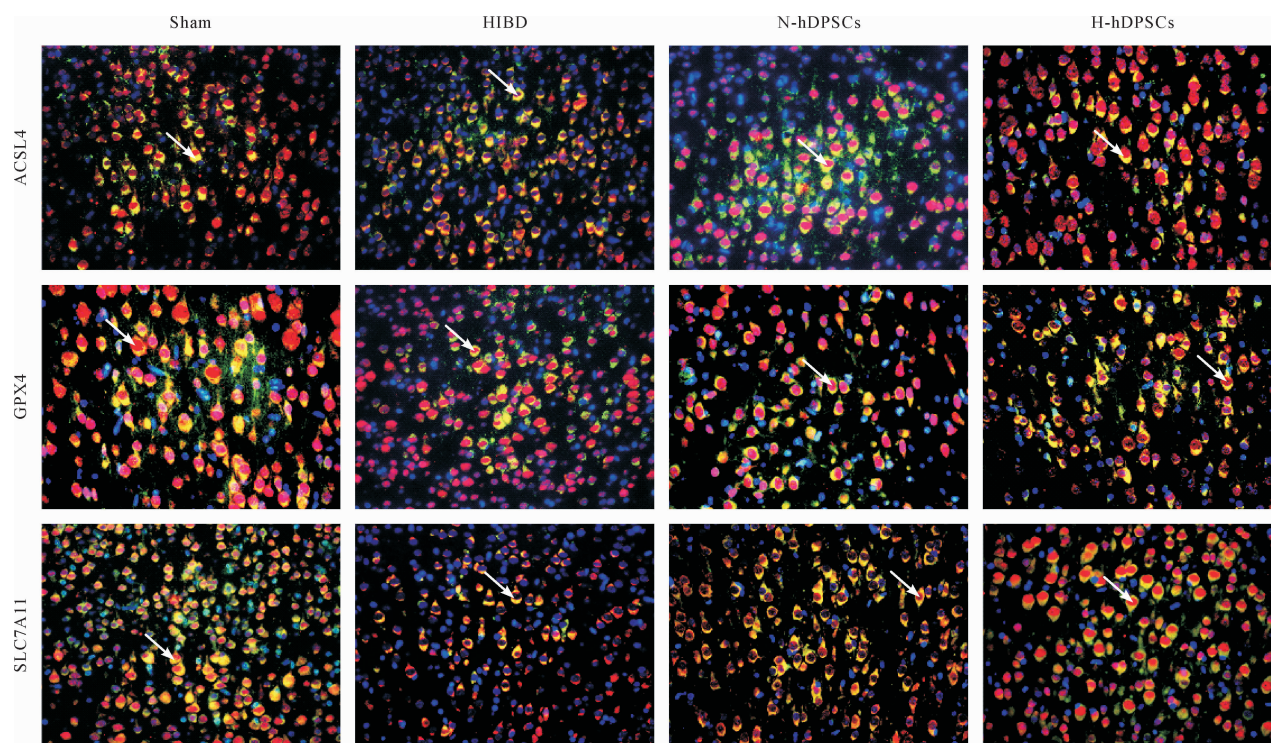
2.2 各组新生大鼠血清铁和损伤侧大脑皮层组织铁含量比较 Sham 组、HIBD 组、N-hDPSCs 组及 H-hDPSCs 4 组新生大鼠血清铁、大脑皮层铁含量依次为:HIBD 组>N-hDPSCs 组>H-hDPSCs 组>

Sham 组($P < 0.001$)。见表 1。

2.3 神经元铁死亡相关蛋白变化 与 Sham 组相比,HIBD 组、N-hDPSCs 组及 H-hDPSCs 组 NeuN⁺ GPX4⁺ 细胞、NeuN⁺ SLC7A11⁺ 细胞数降低($P <$

0.001), NeuN⁺ ACSL4⁺ 细胞数升高 ($P < 0.001$); 与 HIBD 组比较, N-hDPSCs 组与 H-hDPSCs 组 NeuN⁺ GPX4⁺ 和 NeuN⁺ SLC7A11⁺ 细胞数升高 ($P < 0.001$), NeuN⁺ ACSL4⁺ 细胞数降低 ($P <$

0.001)。H-hDPSCs 组 NeuN⁺ GPX4⁺ 细胞、NeuN⁺ SLC7A11⁺ 细胞数高于 N-hDPSCs 组, H-hDPSCs 组 NeuN⁺ ACSL4⁺ 细胞数低于 N-hDPSCs 组 ($P < 0.001$)。见图 2、表 1。



注:白色箭头所指为 NeuN 分别与 ACSL4、GPX4、SLC7A11 双标的阳性细胞。NeuN 标记神经元,染为红色;DAPI 标记细胞核,染为蓝色;ACSL4、GPX4、SLC7A11 胞质表达染为绿色。

图 2 新生大鼠大脑皮层神经元 ACSL4、GPX4 及 SLC7A11 蛋白变化($\times 400$) (标尺=20 μ m)

Fig. 2 Changes in ACSL4, GPX4 and SLC7A11 proteins in neurons of neonatal rat cerebral cortex ($\times 400$) (scale bar=20 μ m)

2.4 Western blot 检测各组新生大鼠损伤侧铁死亡相关蛋白的变化 与 Sham 组相比, HIBD 组、N-hDPSCs 组及 H-hDPSCs 组 SLC7A11 及 GPX4 蛋白表达降低 ($P < 0.001$), ACSL4 蛋白表达升高 ($P < 0.001$); 与 HIBD 组比较, N-hDPSCs 组与 H-hDPSCs 组 GPX4、SLC7A11 蛋白表达升高 ($P < 0.001$), ACSL4 降低 ($P < 0.001$), 其中, H-hDPSCs 组 GPX4、SLC7A11 蛋白表达高于 N-hDPSCs 组, ACSL4 蛋白表达低于 N-hDPSCs 组 ($P < 0.001$)。见图 3、表 1。

2.5 qRT-PCR 检测各组新生大鼠铁死亡相关蛋白的 mRNA 表达水平 HIBD 组、N-hDPSCs 组及 H-hDPSCs 组大脑皮层 ACSL4 mRNA 表达高于 Sham 组, SLC7A11 及 GPX4 mRNA 表达低于 Sham 组 ($P < 0.001$); N-hDPSCs 组及 H-hDPSCs 组 ACSL4 mRNA 表达低于 HIBD 组, SLC7A11 及 GPX4 mRNA 表达高于 HIBD 组 ($P < 0.001$)。H-

hDPSCs 组 ACSL4 mRNA 表达低于 N-hDPSCs 组, GPX4、SLC7A11 mRNA 表达高于 N-hDPSCs 组 ($P < 0.001$)。见表 1。

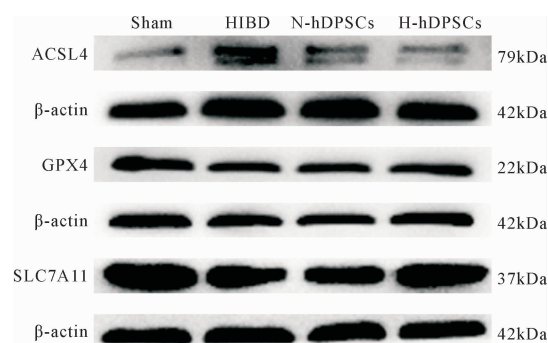


图 3 各组大鼠大脑皮层组织 ACSL4、GPX4 及 SLC7A11 蛋白表达条带图

Fig. 3 Protein expression bands of ACSL4, GPX4 and SLC7A11 in the cerebral cortex tissues of rats in various groups

表 1 hDPSCs 移植抑制大脑皮层铁死亡相关基因表达($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Transplantation of hDPSCs inhibits the expression of iron death-related genes in the cerebral cortex($\bar{x} \pm s$)

项目	指标	Sham 组	HIBD 组	N-hDPSCs 组	H-hDPSCs 组	F 值	P 值
铁含量测定	血清铁($\mu\text{mol/L}$)	2.23 $\pm$ 0.22	6.69 $\pm$ 0.49 ^a	5.19 $\pm$ 0.62 ^{ab}	3.35 $\pm$ 0.33 ^{abc}	79.565	<0.001
	组织铁($\mu\text{g/g}$)	1.84 $\pm$ 0.17	4.57 $\pm$ 0.13 ^a	3.38 $\pm$ 0.28 ^{ab}	2.76 $\pm$ 0.21 ^{abc}	121.065	<0.001
阳性细胞数	ACSL4(个/ mm^2)	142.81 $\pm$ 58.37	580.26 $\pm$ 44.85 ^a	368.76 $\pm$ 38.80 ^{ab}	262.11 $\pm$ 50.14 ^{abc}	87.724	<0.001
	GPX4(个/ mm^2)	504.34 $\pm$ 68.85	216.92 $\pm$ 61.35 ^a	323.57 $\pm$ 46.23 ^{ab}	412.15 $\pm$ 32.90 ^{abc}	30.896	<0.001
	SLC7A11(个/ mm^2)	820.68 $\pm$ 81.65	191.61 $\pm$ 45.33 ^a	401.30 $\pm$ 87.31 ^{ab}	540.49 $\pm$ 76.82 ^{abc}	75.089	<0.001
蛋白表达水平	ACSL4	0.58 $\pm$ 0.01	1.22 $\pm$ 0.06 ^a	0.98 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.78 $\pm$ 0.04 ^{abc}	164.942	<0.001
	GPX4	1.27 $\pm$ 0.07	0.67 $\pm$ 0.07 ^a	0.86 $\pm$ 0.08 ^{ab}	1.06 $\pm$ 0.05 ^{abc}	41.765	<0.001
	SLC7A11	1.27 $\pm$ 0.09	0.63 $\pm$ 0.09 ^a	0.82 $\pm$ 0.06 ^{ab}	1.05 $\pm$ 0.04 ^{abc}	43.303	<0.001
mRNA	ACSL4 mRNA	1.00 $\pm$ 0.05	1.70 $\pm$ 0.05 ^a	1.53 $\pm$ 0.03 ^{ab}	1.16 $\pm$ 0.01 ^{abc}	234.513	<0.001
表达水平	GPX4 mRNA	1.00 $\pm$ 0.01	0.50 $\pm$ 0.01 ^a	0.56 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.84 $\pm$ 0.02 ^{abc}	1 008.209	<0.001
	SLC7A11 mRNA	1.00 $\pm$ 0.08	0.52 $\pm$ 0.06 ^a	0.66 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.86 $\pm$ 0.02 ^{abc}	48.178	<0.001

注:^a与 Sham 组比较, $P<0.001$;^b与 HIBD 组比较, $P<0.001$;^c与 N-hDPSCs 组比较, $P<0.001$ 。

3 讨 论

HIE 是新生儿重症监护病房入院的主要原因。尽管低温治疗在改善 HIE 患儿生存率和生活质量方面已取得显著进展,但幸存者中仍有相当一部分面临神经发育障碍的风险,而 HIBD 正是导致此类神经系统损伤的常见原因之一^[17]。铁死亡作为一种非凋亡性细胞死亡机制,被认为在 HIBD 中发挥着重要作用^[3]。研究表明,铁死亡与多种神经系统疾病密切相关,包括缺血性脑卒中、阿尔茨海默病和帕金森病等,其机制涉及铁过载、抗氧化系统失衡以及脂质过氧化物的积累。本研究旨在探讨 hDPSCs 通过调控铁死亡途径对 HIBD 的治疗作用。

3.1 成功建立新生大鼠 HIBD 模型及铁死亡鉴定

本研究用 Rice-Vannucci 法建立新生大鼠 HIBD 模型。HE 和尼式染色见,与 Sham 组比较,HIBD 组损伤侧大脑皮层细胞空泡、坏死、核固缩,神经细胞排列紊乱,与文献报道一致^[4],提示 HIBD 建模成功。铁过载是铁死亡的主要机制之一,HIBD 组血清铁和大脑皮层铁含量高于 Sham 组,可知 HIBD 后的新生大鼠血液和脑组织中铁过载,推测新生大鼠 HIBD 有铁死亡参与。

3.2 hDPSCs 移植减轻新生大鼠 HIBD,低氧预处理效果更好

hDPSCs 具有高度增殖、多系分化和神经血管特性,可从成年人智齿中获得,伦理争议小、免疫原性低,在体内外均可分化为成熟的神经细胞^[2,4-5],体外研究发现 5% 低氧条件下可促进其增殖和迁移^[13]。本课题组在 HIBD 模型建立 24h 侧脑室移植 hDPSCs,免疫荧光染色鉴定移植成功^[14]。hDPSCs 治疗 72h 后,HE 和尼式染色见,较 HIBD 组,移植后损伤减轻,H-hDPSCs 组进一步减轻,与

文献报道一致^[14]。这可能因为 hDPSCs 在低氧条件下增殖更快,细胞活性和迁移速率也更高,使其移植后更好存活,可以在 HIBD 治疗中发挥作用。

3.3 低氧预处理 hDPSCs 通过抑制铁死亡减轻新生大鼠 HIBD

细胞内清除脂质过氧化物主要依靠 GPX4,它以谷胱甘肽为底物将其转化为无害的脂质醇^[3,18]。半胱氨酸/谷氨酸逆向转运体(cystine/glutamate antiporter system,system x_c^-)可从胞外摄取胱氨酸产生细胞内的半胱氨酸,半胱氨酸合成谷胱甘肽,故 system x_c^- 在铁死亡中起到中枢调节作用,而 system x_c^- 中 SLC7A11 起到关键调控作用^[19]。细胞膜的脂质过氧化是铁死亡的直接诱因,ACSL4 能够将花生四烯酸和肾上腺素酸等不饱和脂肪酸酰化后插入膜磷脂中,加速形成有害的脂质过氧化物,直接诱导铁死亡,决定铁死亡的敏感性^[20]。本研究检测以上铁死亡关键蛋白,HIBD 组神经元 ACSL4 蛋白表达增加,GPX4 及 SLC7A11 蛋白表达减少,hDPSCs 移植后改善,提示 hDPSCs 可降低神经元铁死亡水平;其中,H-hDPSCs 组 ACSL4 表达低于 N-hDPSCs 组,GPX4 及 SLC7A11 表达高于 N-hDPSCs 组,且血清和大脑皮层铁含量较 N-hDPSCs 组低,提示低氧预处理 hDPSCs 对铁死亡治疗优于常氧 hDPSCs。

综上所述,低氧预处理 hDPSCs 移植可下调 HIBD 新生大鼠铁死亡相关蛋白 ACSL4 的表达,上调 GPX4 及 SLC7A11 蛋白表达,抑制新生大鼠皮层神经元铁死亡,促进 HIBD 大鼠大脑皮层神经细胞修复,治疗效果较常氧培养更佳,有望为干细胞在 HIBD 治疗方向提供理论依据。基于课题组前期研究,选择 hDPSCs 移植 72h 大量增殖后进行观察^[13],存在一定的局限性,后续实验可加入动态时

间点,进一步探索低氧预处理 hDPSCs 的最佳治疗时间。

参考文献

- [1] Li C, Wu Z, Xue H, et al. Ferroptosis contributes to hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: Role of the SIRT1/Nrf2/GPx4 signaling pathway[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(12):2268-2280.
- [2] Reichert CO, de Freitas FA, Sampaio-Silva J, et al. Ferroptosis mechanisms involved in neurodegenerative diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22):8765.
- [3] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5):1060-1072.
- [4] Zhu K, Zhu X, Liu S, et al. Glycyrrhizin attenuates hypoxic-ischemic brain damage by inhibiting ferroptosis and neuroinflammation in neonatal rats via the HMGB1/GPx4 pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1-18.
- [5] Luo L, Deng L, Chen Y, et al. Identification of lipocalin 2 as a ferroptosis-related key gene associated with hypoxic-ischemic brain damage via STAT3/NF- κ B signaling pathway[J]. *Antioxidants(Basel)*, 2023, 12(1):186.
- [6] Dai Y, Chen Y, Mo D, et al. Inhibition of ACSL4 ameliorates tubular ferroptotic cell death and protects against fibrotic kidney disease[J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1):907.
- [7] Miao Y, Chen Y, Xue F, et al. Contribution of ferroptosis and GPX4's dual functions to osteoarthritis progression[J]. *EBioMedicine*, 2022, 76:103847.
- [8] He F, Zhang P, Liu J, et al. ATF4 suppresses hepatocarcinogenesis by inducing SLC7A11(xCT) to block stress-related ferroptosis[J]. *J Hepatol*, 2023, 79(2):362-377.
- [9] Berndt C, Alborzinia H, Amen VS, et al. Ferroptosis in health and disease[J]. *Redox Biol*, 2024, 75:103211.
- [10] Luzuriaga J, Polo Y, Pastor-Alonso O, et al. Advances and perspectives in dental pulp stem cell based neuroregeneration therapies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7):3546.
- [11] Wei Z, Hang S, Wiredu Ocansey DK, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived exosome shuttling mir-129-5p attenuates inflammatory bowel disease by inhibiting ferroptosis[J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 188.
- [12] Yao S, Pang M, Wang Y, et al. Mesenchymal stem cell attenuates spinal cord injury by inhibiting mitochondrial quality control-associated neuronal ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2023, 67:102871.
- [13] 张浩,高淑君,武沐洋,等.低氧浓度促进人牙髓干细胞增殖及神经分化[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2022, 31(2): 133-138.
- Zhang H, Gao SJ, Wu MY, et al. Hypoxia promotes the proliferation and neural differentiation of human dental pulp stem cells[J]. *Chin J Histochem Cytochem*, 2022, 31(2): 133-138. (in Chinese)
- [14] 高淑君,张浩,武沐洋,等.低氧预处理人牙髓干细胞对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑神经元自噬及 ATG7 的影响[J]. *中国儿童保健杂志*, 2023, 31(8): 851-857.
- Gao SJ, Zhang H, Wu MY, et al. Effects of hypoxic preconditioning of hDPSCs on autophagy and ATG7 in brain neurons of neonatal HIBD rats[J]. *Chin J Child Health Care*, 2023, 31(8):851-857. (in Chinese)
- [15] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Breierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2):131-141.
- [16] 张新月,刘晨萌,马瑜徽,等. TXNIP/Trx-1/GPX4 通路促进新生大鼠缺氧缺血后海马神经元铁死亡的作用机制[J]. *中国当代儿科杂志*, 2022, 24(9): 1053-1060.
- Zhang XY, Liu CM, Ma YH, et al. The mechanism of TXNIP/Trx-1/GPX4 pathway promoting iron death of hippocampal neurons in neonatal rats after hypoxic ischemia[J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2022, 24(9): 1053-1060. (in Chinese)
- [17] Sutio J, Vyas R, Feldman HA, et al. Association of cerebral metabolic rate following therapeutic hypothermia with 18-month neurodevelopmental outcomes after neonatal hypoxic ischemic encephalopathy[J]. *EBioMedicine*, 2023, 94:104673.
- [18] Liu Y, Wan Y, Jiang Y, et al. GPX4: The hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(3):188890.
- [19] Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: Ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. *Protein Cell*, 2021, 12(8):599-620.
- [20] Stockwell BR. Ferroptosis turns 10: Emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications[J]. *Cell*, 2022, 185(14):2401-2421.

收稿日期:2024-10-20 修回日期:2025-03-21 本文编辑:李少闻