doi：10.7499/j.issn.1008-8830.2504152

论著·实验研究

人脐带间充质干细胞通过激活Nrf2/Keap1/HO-1信号通路对新生大鼠脑白质损伤的保护作用

王超[1]　王梦欣[1]　朱艳萍[2]

（1.新疆医科大学儿科学院，新疆乌鲁木齐　830054；
2.新疆医科大学第一附属医院新生儿科，新疆乌鲁木齐　830054）

［摘要］**目的**　探讨人脐带间充质干细胞（human umbilical cord mesenchymal stem cell, HUC-MSC）通过核转录因子红系2相关因子2（nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2）/Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1（Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1, Keap1）/血红素加氧酶1（heme oxygenase-1, HO-1）信号通路对新生大鼠脑白质损伤（white matter injury, WMI）的保护作用。**方法**　将3日龄Sprague-Dawley大鼠通过单侧颈总动脉结扎联合低氧法构建新生大鼠WMI模型。实验分为两部分：（1）将新生大鼠随机分为假手术组、缺氧缺血（hypoxia-ischemia, HI）组、HUC-MSC组（各组n=36），于建模后7、14、21 d收集脑组织样本进行检测；（2）将新生大鼠随机分为假手术组、HI组、HUC-MSC组、HUC-MSC+ML385（Nrf2特异性抑制剂）组（各组n=12），于建模后14 d收集脑组织样本进行检测。采用苏木精-伊红染色观察脑组织病理改变，劳克坚牢蓝染色观察脑组织髓鞘化情况，免疫组织化学染色检测Nrf2、髓磷脂碱性蛋白质（myelin basic protein, MBP）及髓鞘蛋白脂质蛋白质（proteolipid protein, PLP）的定位表达，免疫荧光染色观察突触素（synaptophysin, SYP）、突触后致密区95（postsynaptic density-95, PSD-95）的定位表达，免疫印迹法检测Nrf2、Keap1、HO-1、SYP、PSD-95、MBP、PLP蛋白表达，Morris水迷宫实验评估大鼠空间认知能力改变。**结果**　建模后7、14、21 d，假手术组脑白质结构完整，细胞形态正常，神经纤维排列整齐；HI组脑白质结构破裂、细胞空泡化、神经纤维排列紊乱；HUC-MSC组脑白质病理改变较HI组减轻；与HI组相比，HUC-MSC组Nrf2阳性表达和蛋白表达、HO-1蛋白表达增加（P<0.05），Keap1蛋白表达减少（P<0.05）。与HI组相比，HUC-MSC组SYP、PSD-95平均荧光强度和蛋白表达及MBP、PLP阳性表达和蛋白表达、髓鞘平均光密度值、平台穿越次数、目标象限停留时间增加（P<0.05）；与HUC-MSC组相比，HUC-MSC+ML385组上述指标降低（P<0.05）。**结论**　HUC-MSC可能通过激活Nrf2/Keap1/HO-1信号通路促进新生大鼠WMI后少突胶质细胞的成熟和突触形成，改善其空间认知能力。

［中国当代儿科杂志，2025，27（11）：1398-1407］

［关键词］脑白质损伤；少突胶质细胞；核转录因子红系2相关因子2；人脐带间充质干细胞；新生大鼠

Human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against neonatal white matter injury by activating the Nrf2/Keap1/HO-1 signaling pathway

WANG Chao, WANG Meng-Xin, ZHU Yan-Ping. Department of Neonatology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China (Zhu Y-P, Email: 1119788145@qq.com)

Abstract: Objective　To investigate whether human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUC-MSCs) play protective effects against white matter injury (WMI) in neonatal rats via activation of the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway. **Methods**　A neonatal WMI model was established in 3-day-old Sprague-Dawley rats by unilateral common carotid artery ligation combined with hypoxia. The study comprised two parts. (1) Rats were randomized into sham, hypoxia-

［收稿日期］2025-04-24；［接受日期］2025-09-25
［基金项目］国家自然科学基金地区科学基金（82060288）。
［作者简介］王超，男，博士研究生。
［通信作者］朱艳萍，女，主任医师。Email：1119788145@qq.com。

ischemia (HI), and HUC-MSC groups (n=36 per group); brain tissues were collected at 7, 14, and 21 days after modeling. (2) Rats were randomized into sham, HI, HUC-MSC, and HUC-MSC+ML385 (Nrf2 inhibitor) groups (n=12 per group); tissues were collected 14 days after modeling. Hematoxylin-eosin staining assessed histopathology, and Luxol fast blue staining evaluated myelination. Immunohistochemistry examined the localization and expression of Nrf2, myelin basic protein (MBP), and proteolipid protein (PLP). Immunofluorescence assessed synaptophysin (SYP) and postsynaptic density-95 (PSD-95). Western blotting quantified Nrf2, Keap1, HO-1, SYP, PSD-95, MBP, and PLP. Spatial learning and memory were evaluated by the Morris water maze. **Results** At 7, 14, and 21 days after modeling, the sham group showed intact white matter, whereas the HI group exhibited white matter disruption, cellular vacuolation, and disorganized nerve fibers. These pathological changes were attenuated in the HUC-MSC group. Compared with the HI group, the HUC-MSC group showed increased Nrf2 immunopositivity and protein levels, increased HO-1 protein levels, and decreased Keap1 protein levels (P<0.05). Compared with the HI group, the HUC-MSC group had higher SYP and PSD-95 immunofluorescence intensities and protein levels, higher MBP and PLP positivity and protein levels, increased mean optical density of myelin, more platform crossings, and longer time in the target quadrant (all P<0.05). These improvements were reduced in the HUC-MSC+ML385 group compared with the HUC-MSC group (P<0.05). **Conclusions** HUC-MSCs may promote oligodendrocyte maturation and synaptogenesis after neonatal WMI by activating the Nrf2/Keap1/HO-1 pathway, thereby improving spatial cognitive function.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2025, 27(11): 1398-1407]

Key words: White matter injury; Oligodendrocyte; Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2; Human umbilical cord mesenchymal stem cell; Neonatal rat

据世界卫生组织估计，全球早产儿发生率为4%~16%[1]。尽管新生儿护理取得了进展，极早产儿仍是脑白质损伤（white matter injury, WMI）的高危人群[2]。WMI主要导致新生儿神经发育障碍，包括运动障碍、认知缺陷、行为问题以及其他神经系统后遗症[3]。WMI发病机制由炎症和缺氧缺血（hypoxia-ischemia, HI）驱动，引起氧化应激和少突胶质细胞（oligodendrocyte, OL）前体凋亡，从而导致髓鞘形成障碍[4]。目前针对WMI的治疗手段有限，亟需探索新型治疗策略。

近年来，干细胞治疗因其在细胞增殖、分化和免疫调节等方面的优势在神经再生医学领域引起了广泛关注[5]。人脐带间充质干细胞（human umbilical cord mesenchymal stem cell, HUC-MSC）凭借强大的再生潜能、低免疫原性且无病毒感染风险，成为细胞移植的理想选择[6]。研究表明，HUC-MSC通过抗炎、抗氧化、免疫调节及促血管生成等机制，在神经系统疾病的治疗中已取得显著疗效[7]。HUC-MSC移植可促进新生大鼠WMI的髓鞘化，改善空间认知功能并减轻神经炎症[8-9]。值得注意的是，核转录因子红系2相关因子2（nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2）在调节神经炎症反应和脑保护中发挥重要作用[10]。Nrf2/HO-1通路的激活可以有效减轻氧化应激和炎症反应，从而改善脑损伤模型的神经行为学结果[11-12]，突出了调节该通路的治疗潜力。已有相关研究表明，HUC-MSC在中枢神经系统疾病如缺血性卒中[13]、阿尔茨海默病[14]、帕金森病[15]和创伤性脑损伤[16]中通过激活Nrf2/HO-1通路改善脑损伤。本课题组通过构建新生大鼠WMI模型，探讨HUC-MSC是否通过Nrf2/HO-1通路促进髓鞘化和突触形成来逆转WMI，为未来干细胞移植在神经再生医学中的临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要仪器和试剂

HUC-MSC购自武汉普诺赛有限公司（CP-CL11）。主要仪器包括低氧实验箱（上海塔望科技有限公司）、标准型脑立体定位仪（深圳市瑞沃德生命科技有限公司）。主要试剂包括兔抗突触素（synaptophysin, SYP）多克隆抗体（17785-1-AP，武汉三鹰生物技术有限公司）、兔抗突触后致密区95（postsynaptic density-95, PSD-95）多克隆抗体（20665-1-AP，武汉三鹰生物技术有限公司）、兔抗髓磷脂碱性蛋白质（myelin basic protein, MBP）单克隆抗体（ab218011, Abcam，美国）、小鼠抗髓鞘蛋白脂质蛋白质（proteolipid protein, PLP）单克隆抗体（ab9311, Abcam，美国）、兔抗Nrf2单克隆抗体（33649T, Cell signaling Technology，美国）、兔抗Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1（Kelch like ECH associated protein 1, Keap1）多克隆抗体（8047T, Cell signaling Technology，美国）、兔抗血红素加氧酶1（heme oxygenase-1, HO-1）单克隆抗体（43966T, Cell signaling Technology，美国）。

1.2 HUC-MSC培养和动物模型构建

HUC-MSC在含10%胎牛血清、1%青霉素/链霉素的α-MEM完全培养基中进行传代培养，选择使用第3代细胞进行后续移植实验。本研究经新疆医科大学第一附属医院动物实验医学伦理委员会批准（编号：IACUC-20200318-65），动物实验符合《实验动物福利伦理审查指南》要求。选用3日龄Sprague-Dawley（SD）大鼠，饲养于SPF级房间，环境条件为温度（22±2℃）、湿度（55%±5%）、照明12 h明暗交替。参照文献［17-18］采用单侧颈总动脉结扎联合缺氧法构建新生大鼠WMI动物模型：3日龄SD大鼠经异氟烷麻醉后固定，暴露颈总动脉，以外科缝线结扎上下端并剪断，缝合切口后置于母鼠身边恢复1 h。将大鼠置于恒温缺氧箱（8%氧气、92%氮气）缺氧2.5 h。假手术组仅暴露颈总动脉并缝合伤口，不进行其他处理。

1.3 实验分组及药物干预

156只3日龄SD大鼠按以下方式分组。第一部分实验分组：将HI造模后7、14、21 d的SD大鼠分别随机分为假手术组、HI组、HUC-MSC组（各组n=36）；每个时间点下，每组12只大鼠。第二部分实验分组：将HI造模后14 d的SD大鼠随机分为假手术组、HI组、HUC-MSC组、HUC-MSC+ML385组（Nrf2特异性抑制剂），每组12只大鼠。

HUC-MSC移植：根据本课题组前期研究确定HUC-MSC移植相关参数（剂量、频次和时间窗）[19-20]。无菌条件下收集第3代HUC-MSC并调整浓度至1×10^5个细胞/μL，选择HI后2 h进行干细胞移植，借助脑立体定位仪，以前囟门位置为中心点，向左移动1.5 mm、向后移动1.5 mm，缓慢进针至2.5 mm（有突破感时停止），以1 μL/min速度缓慢输入。ML385抑制剂处理：在无菌条件下配置ML385储存液（浓度5 mg/mL），再按30 mg/kg剂量计算每只大鼠所需用量；采用胰岛素注射器进行腹腔注射，注射部位为左下腹部，模型构建后每日注射1次，连续注射7 d。

1.4 样本收集

大鼠经异氟烷麻醉后固定于解剖板，暴露心脏并插入灌流针，以PBS溶液行体循环灌注。不同时间点每组6只大鼠取脑组织，经固定、脱水、透明及石蜡包埋，制成4 μm石蜡切片，行苏木精-伊红（hematoxylin-eosin, HE）染色、劳克坚牢蓝（Luxol fast blue, LFB）染色、免疫组织化学染色及免疫荧光染色；6只大鼠取脑组织侧脑室周围区域，置于-80℃冰箱冻存用于免疫印迹实验。

1.5 HE染色

组织切片经脱蜡、水化后，依次用苏木精染色30 s，伊红染色1 min。再经梯度乙醇脱水，中性树胶封片。在光学显微镜下采集图像，观察各组病理学改变。

1.6 LFB染色

组织切片脱蜡后，依次在70%、80%、90%、95%乙醇中各醇化2 min；随后浸入预热至60℃的LFB染色液，孵育4 h。孵育后依次经95%乙醇（2 min）、蒸馏水（30 s）、0.05% $LiCO_3$溶液（1 min）、75%乙醇（10 s）、蒸馏水（30 s）分化，至背景无色、髓鞘清晰；最后经脱水封片。通过光学显微镜采集图像，采用Image J软件测量平均光密度值并统计分析。

1.7 免疫组织化学染色检测Nrf2、MBP、PLP蛋白的定位表达

组织切片脱蜡后，置于柠檬酸钠抗原修复液中热修复；修复后依次与内源性过氧化物酶（30 min）、非特异性阻断剂（30 min）孵育；随后滴加一抗［Nrf2（1∶200）、MBP（1∶5 000）、PLP（1∶1 000）］，4℃孵育12 h；再与二抗孵育30 min，洗涤后滴加DAB显色液。光学显微镜下观察至出现明显棕黄色表达时终止显色。后续经染核、脱水、封片，光学显微镜下采集图像，采用Image J软件测量平均光密度值并统计分析。

1.8 免疫荧光染色检测SYP、PSD-95蛋白的定位表达

组织切片脱蜡后热修复，依次与0.3% Triton（10 min）、10%山羊血清（30 min）孵育；滴加一抗［SYP（1∶200）、PSD-95（1∶400）］，4℃孵育12 h；随后分别与荧光二抗（2 h）、含抗荧光淬灭剂的DAPI（10 min）孵育后封片。在激光共聚焦显微镜下采集图像，采用Image J软件测量平均荧光强度。

1.9 免疫印迹法检测Nrf2、Keap1、HO-1、SYP、PSD-95蛋白表达

样本经含PMSF的RIPA裂解缓冲液裂解后，测定蛋白浓度并进行蛋白变性，均一化上样。经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳（150 V，60 min）分离，将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜（100 V，60 min）；用快速封闭液封闭15 min，分别加入一抗［Nrf2（1∶1 000）、Keap1（1∶500）、HO-1（1∶1 000）、

MBP（1∶1 000）、PLP（1∶1 000）、SYP（1∶2 000）、PSD-95（1∶1 000）］，37℃孵育 12 h；再与二抗（1∶5 000）孵育 2 h 后显影，采用 Image J 软件测定目的蛋白条带灰度值，以 β-actin 校准分析。

1.10 Morris 水迷宫检测

建模后 28 d 进行实验，第一阶段为定向航行实验：从水箱中四个象限依次放入大鼠，记录 1 min 内大鼠从水箱中游行并找到平台的时间；若未能找到平台，将大鼠置于平台停留 10 s 以强化记忆。每日训练 4 次，持续 5 d。第二阶段为空间探索实验：移除平台后，记录 2 min 内大鼠穿越原平台位置的次数及在目标象限的停留时间。通过行为学系统捕获并记录上述参数，评估各组大鼠空间认知能力的改变。

1.11 统计学分析

使用 SPSS 22.0、GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析。符合正态分布的数据以均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUC-MSC 对新生大鼠 WMI 病理改变的影响

HE 染色结果显示，建模后 7、14、21 d，假手术组脑白质结构完整，细胞形态正常，神经纤维排列有序；HI 组脑白质结构破裂，细胞空泡化，神经纤维排列紊乱；HUC-MSC 组脑白质病理改变较 HI 组明显减轻，且建模后 14 d、21 d 时上述改善效果更明显。见图 1。

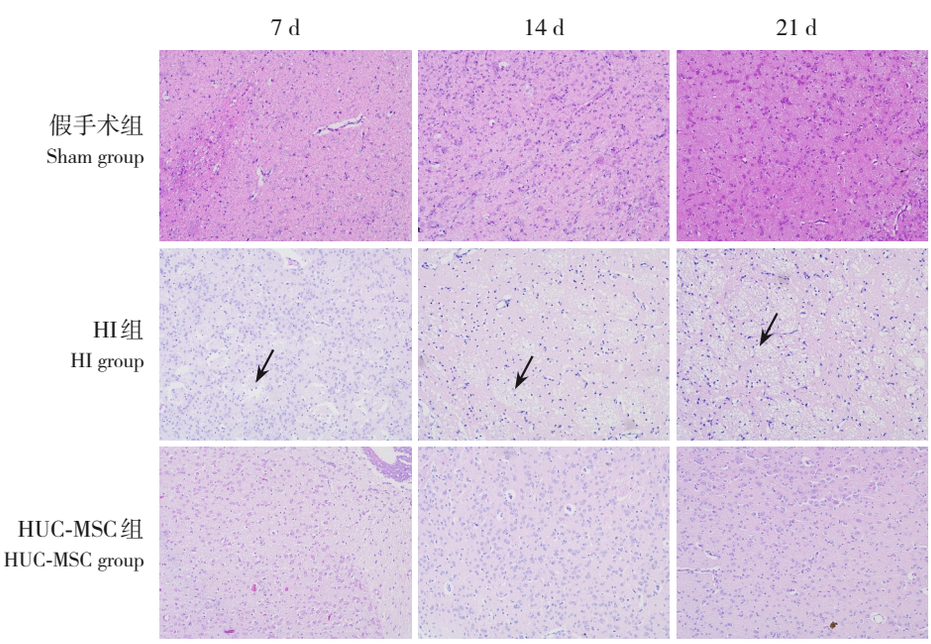


图 1 HUC-MSC 对新生大鼠 WMI 病理学改变的影响（光学显微镜，×200） 假手术组脑白质结构完整，细胞形态正常，神经纤维排列有序；HI 组脑白质结构破坏，细胞周围空泡化，神经纤维排列紊乱；HUC-MSC 组脑白质病理改变较 HI 组减轻。红色为细胞质，蓝色为细胞核；箭头所指为细胞空泡化现象。

2.2 HUC-MSC 对新生大鼠 WMI 后 Nrf2 表达的影响

免疫组织化学染色显示，Nrf2 主要表达于胼胝体（corpus callosum, CC）区和脑室下区（subventricular zone, SVZ），与 OL 髓鞘形成部位重叠。建模后 7、14、21 d，与假手术组相比，HI 组 Nrf2 阳性表达升高（P<0.05）；与 HI 组相比，HUC-MSC 组 Nrf2 阳性表达升高（P<0.05）。见图 2、表 1。

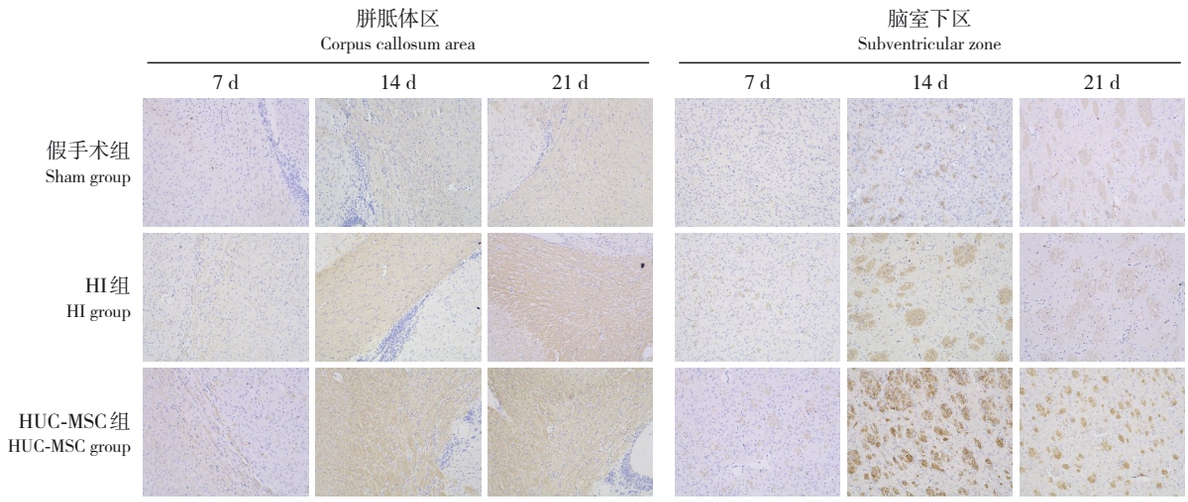


图2　免疫组织化学染色检测不同时间点各组CC及SVZ区域的Nrf2表达情况（光学显微镜，×200）　棕黄色为Nrf2阳性表达，蓝色为细胞核。Nrf2主要定位表达于CC区和SVZ，HUC-MSC组Nrf2阳性表达较HI组升高。

表1　不同时间点各组CC及SVZ区域Nrf2表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$，n=6）

组别	CC区			SVZ		
	建模后7 d	建模后14 d	建模后21 d	建模后7 d	建模后14 d	建模后21 d
假手术组	0.127 ± 0.004	0.101 ± 0.004	0.118 ± 0.005	0.108 ± 0.005	0.114 ± 0.005	0.121 ± 0.006
HI组	0.172 ± 0.007[a]	0.158 ± 0.019[a]	0.191 ± 0.006[a]	0.176 ± 0.007[a]	0.195 ± 0.005[a]	0.180 ± 0.007[a]
HUC-MSC组	0.221 ± 0.006[a,b]	0.259 ± 0.026[b]	0.295 ± 0.020[b]	0.233 ± 0.007[a,b]	0.273 ± 0.007[a,b]	0.235 ± 0.007[a,b]
F值	59.813	13.661	49.714	103.061	176.320	73.446
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a示与假手术组相比，P<0.05；b示与HI组相比，P<0.05。［HI］缺氧缺血；［HUC-MSC］人脐带间充质干细胞；［CC］胼胝体；［SVZ］脑室下区。

2.3　HUC-MSC对新生大鼠WMI后Nrf2、Keap1及HO-1蛋白表达水平的影响

免疫印迹结果显示，建模后7、14、21 d，与假手术组相比，HI组Nrf2、HO-1蛋白表达水平增加，Keap1蛋白表达水平减少（P<0.05）；与HI组相比，HUC-MSC组Nrf2、HO-1蛋白表达水平增加，Keap1蛋白表达水平减少（P<0.05）。见图3、表2。

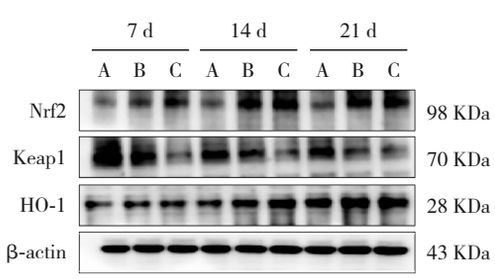


图3　免疫印迹法检测Nrf2、Keap1和HO-1蛋白表达条带图　A：假手术组；B：HI组；C：HUC-MSC组。

表2　不同时间点各组新生大鼠脑组织Nrf2、Keap1和HO-1蛋白表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$，n=6）

组别	Nrf2			Keap1			HO-1		
	建模后7 d	建模后14 d	建模后21 d	建模后7 d	建模后14 d	建模后21 d	建模后7 d	建模后14 d	建模后21 d
假手术组	0.31 ± 0.03	0.68 ± 0.05	0.59 ± 0.10	1.03 ± 0.07	1.00 ± 0.05	1.07 ± 0.05	0.45 ± 0.05	0.69 ± 0.03	0.88 ± 0.04
HI组	0.68 ± 0.05[a]	0.92 ± 0.04[a]	0.87 ± 0.09[a]	0.74 ± 0.04[a]	0.79 ± 0.05[a]	0.87 ± 0.06[a]	0.70 ± 0.04[a]	0.92 ± 0.03[a]	1.19 ± 0.06[a]
HUC-MSC组	0.86 ± 0.06[a,b]	1.12 ± 0.05[a,b]	1.16 ± 0.09[a,b]	0.43 ± 0.06[a,b]	0.55 ± 0.03[a,b]	0.65 ± 0.04[a,b]	0.90 ± 0.04[a,b]	1.15 ± 0.05[a,b]	1.44 ± 0.10[a,b]
F值	37.621	19.375	10.482	28.152	25.113	16.527	24.648	42.271	16.359
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a示与假手术组相比，P<0.05；b示与HI组相比，P<0.05。［HI］缺氧缺血；［HUC-MSC］人脐带间充质干细胞；［Nrf2］核转录因子红系2相关因子2；［Keap1］Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1；［HO-1］血红素加氧酶1。

2.4 HUC-MSC 对新生大鼠 WMI 后突触相关蛋白表达的影响

免疫荧光染色结果显示，突触前蛋白 SYP 和突触后蛋白 PSD-95 主要表达于 SVZ（图 4）。免疫荧光染色和免疫印迹结果显示，建模后 14 d，与假手术组相比，HI 组 SYP、PSD-95 荧光强度和蛋白表达水平减少（P<0.05）；与 HI 组相比，HUC-MSC 组 SYP、PSD-95 荧光强度和蛋白表达水平增加（P<0.05）；与 HUC-MSC 组相比，HUC-MSC+ML385 组 SYP、PSD-95 荧光强度和蛋白表达水平减少（P<0.05）。见表 3、图 4~5。

表 3　各组新生大鼠脑组织 SYP、PSD95、MBP、PLP 表达水平及髓鞘染色结果的比较　（$\bar{x} \pm s$，n=6）

组别	平均荧光强度		蛋白相对表达量				平均光密度值	
	SYP	PSD95	SYP	PSD95	MBP	PLP	MBP	PLP
假手术组	94.2 ± 2.7	132.8 ± 3.3	2.19 ± 0.18	1.580 ± 0.183	0.98 ± 0.05	1.03 ± 0.10	0.282 ± 0.022	0.489 ± 0.023
HI 组	57.7 ± 1.5^{a}	40.7 ± 2.7^{a}	1.28 ± 0.04^{a}	0.083 ± 0.011^{a}	0.25 ± 0.05^{a}	0.53 ± 0.03^{a}	0.113 ± 0.011^{a}	0.131 ± 0.011^{a}
HUC-MSC 组	85.3 ± 3.5^{a,b}	93.8 ± 2.9^{a,b}	1.91 ± 0.13^{b}	1.059 ± 0.113^{b}	0.75 ± 0.07^{a,b}	0.90 ± 0.06^{b}	0.261 ± 0.012^{b}	0.359 ± 0.022^{a,b}
HUC-MSC+ML385 组	66.9 ± 2.3^{a,b,c}	61.5 ± 2.7^{a,b,c}	1.19 ± 0.11^{a,c}	0.498 ± 0.087^{a,b,c}	0.28 ± 0.04^{a,c}	0.50 ± 0.05^{a,c}	0.132 ± 0.011^{a,c}	0.163 ± 0.013^{a,c}
F值	41.759	194.840	14.838	31.671	43.615	17.390	46.159	145.148
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a示与假手术组相比，P<0.05；b示与 HI 组相比，P<0.05；c示与 HUC-MSC 组相比，P<0.05。［HI］缺氧缺血；［HUC-MSC］人脐带间充质干细胞；［SYP］突触素；［PSD-95］突触后致密区 95；［MBP］髓磷脂碱性蛋白质；［PLP］蛋白脂质蛋白质；［LFB］劳克坚牢蓝染色。

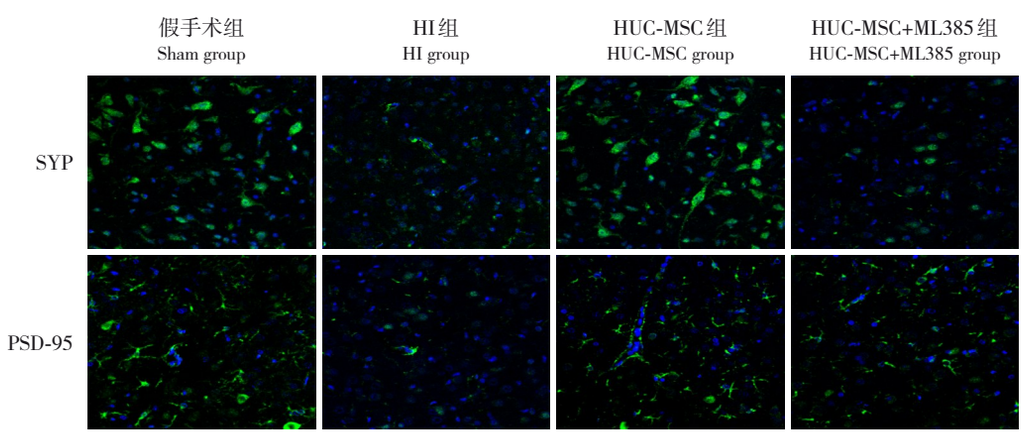


图 4　免疫荧光染色检测 SYP、PSD-95 蛋白定位表达（激光共聚焦显微镜，×400）　绿色荧光为 SYP 和 PSD-95 阳性表达，蓝色荧光为细胞核。SYP 和 PSD-95 主要表达于 SVZ，HUC-MSC 组 SYP、PSD-95 荧光强度较 HI 组增加；HUC-MSC+ML385 组 SYP、PSD-95 荧光强度较 HUC-MSC 组减少。

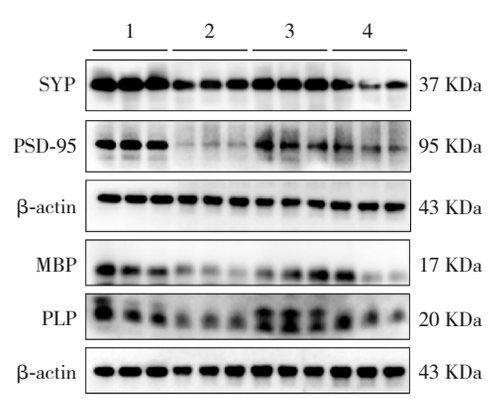


图 5　免疫印迹法检测 SYP、PSD-95、MBP 及 PLP 蛋白表达条带图　1：假手术组；2：HI 组；3：HUC-MSC 组；4：HUC-MSC+ML385 组。

2.5 HUC-MSC 对新生大鼠 WMI 后 OL 成熟及髓鞘化的影响

免疫组织化学染色及 LFB 染色结果显示，成熟 OL 标志物 MBP、PLP 及髓鞘主要表达于 CC 区（图 6）。免疫组织化学染色、免疫印迹结果显示，与假手术组相比，HI 组 MBP、PLP 阳性表达和蛋白表达水平减少（P<0.05）；与 HI 组相比，HUC-MSC 组 MBP、PLP 阳性表达和蛋白表达水平增加（P<0.05）；与 HUC-MSC 组相比，HUC-MSC+ML385 组 MBP、PLP 阳性表达和蛋白表达水平减少（P<0.05）。LFB 染色结果显示，HI 组（0.062 ± 0.005）髓鞘平均光密度值较假手术组（0.238 ±

0.011）减少（$P<0.05$），HUC-MSC 组（0.177 ± 0.016）髓鞘平均光密度值较 HI 组增加（$P<0.05$），HUC-MSC+ML385（0.082 ± 0.010）髓鞘平均光密度值较 HUC-MSC 组减少（$P<0.05$）。见图 5~6、表 3。

2.6 HUC-MSC 通过 Nrf2/Keap1/HO-1 通路促进新生大鼠 WMI 后空间认知能力改变

Morris 水迷宫结果显示，与假手术组相比，HI 组平台穿越次数、目标象限停留时间减少（$P<0.05$）；与 HI 组相比，HUC-MSC 组平台穿越次数、目标象限停留时间增加（$P<0.05$）；与 HUC-MSC 组相比，HUC-MSC+ML385 组平台穿越次数、目标象限停留时间减少（$P<0.05$）。见图 7、表 4。

表 4　各组大鼠平台穿越次数和目标象限停留时间比较

（$\bar{x} \pm s$，n=6）

组别	平台穿越次数	目标象限停留时间 (s)
假手术组	12.3 ± 1.1	46.0 ± 0.8
HI 组	1.3 ± 0.5[a]	11.5 ± 0.9[a]
HUC-MSC 组	9.8 ± 0.6[b]	37.0 ± 1.6[b]
HUC-MSC+ML385 组	5.5 ± 0.4[a,b,c]	25.3 ± 0.6[a,b,c]
F 值	49.532	201.619
P 值	<0.001	<0.001

注：a 示与假手术组相比，$P<0.05$；b 示与 HI 组相比，$P<0.05$；c 示与 HUC-MSC 组相比，$P<0.05$。［HI］缺氧缺血；［HUC-MSC］人脐带间充质干细胞。

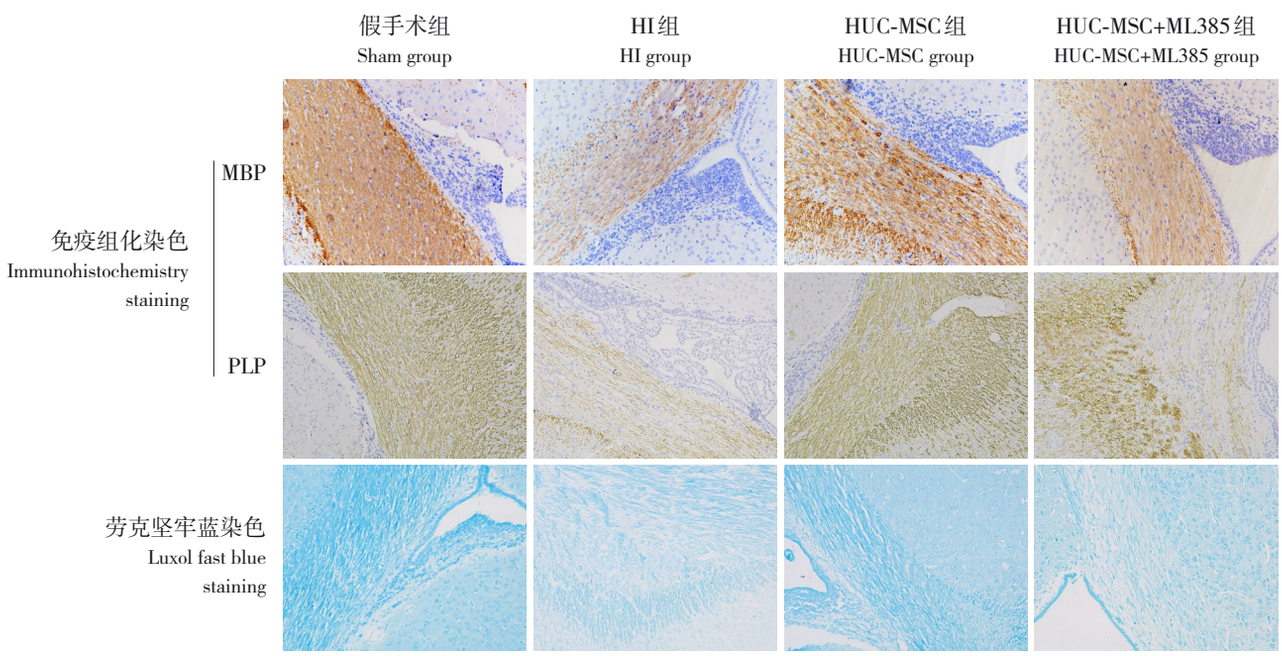


图 6　HUC-MSC 对新生大鼠 WMI 后 OL 成熟及髓鞘化的影响（光学显微镜，×200）　成熟 OL 标志物 MBP、PLP 及髓鞘主要表达于 CC 区。与 HI 组相比，HUC-MSC 组 MBP、PLP 阳性表达增加，髓鞘染色变深；与 HUC-MSC 组相比，HUC-MSC+ML385 组 MBP、PLP 阳性表达减少，髓鞘染色变浅。棕黄色为 MBP、PLP 蛋白阳性表达，蓝色为细胞核；浅蓝色为髓鞘染色。

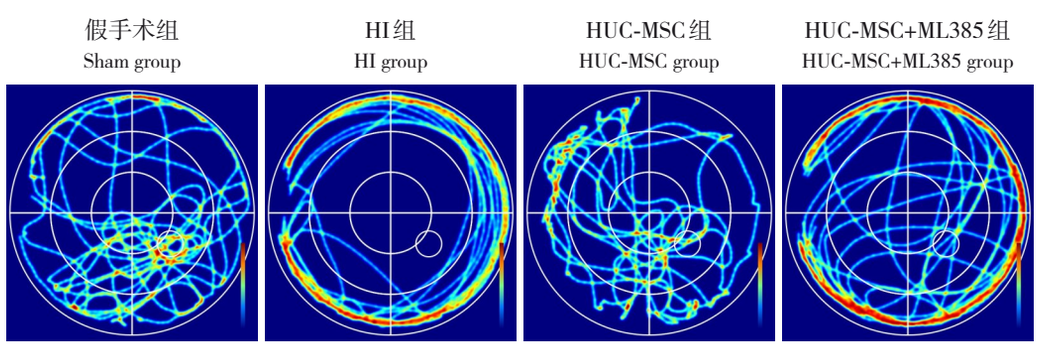


图 7　HUC-MSC 对新生大鼠 WMI 后空间认知能力的影响　图中线条代表大鼠游行轨迹，第 4 象限的小圆圈为平台位置。颜色深浅代表大鼠穿越该区域的次数：颜色越红，表明穿越次数越多；颜色越蓝，表明穿越次数越少。

3 讨论

近年来，已有研究报道HUC-MSC对神经系统疾病（尤其脑损伤）具有保护作用[21]，但其确切神经保护机制尚未明确。Zhu等[22]的研究发现，HUC-MSC可通过调节胶质细胞功能、改善远期行为结局促进脑恢复。此外，另有研究证实其可促进OL成熟和髓鞘形成[23]，凸显OL前体成熟和髓鞘形成在脑损伤治疗中的重要性。本研究采用3日龄SD大鼠构建WMI模型，HI处理后脑组织出现典型病理改变，表现为脑白质结构破坏、细胞空泡化、神经纤维排列紊乱，提示模型构建成功。HUC-MSC移植后，新生大鼠WMI脑组织病理改变减少，表明白质结构得到修复。进一步研究显示，与假手术组相比，HI组SYP、PSD-95、MBP、PLP蛋白表达水平及平台穿越次数、目标象限停留时间降低；与HI组相比，HUC-MSC组上述蛋白表达及行为学指标升高，提示HUC-MSC可促进OL成熟、髓鞘形成及突触发生，从而改善神经功能恢复。但HUC-MSC确切的神经保护机制尚未明确。Chen等[24]的研究发现，HUC-MSC通过调节脑损伤后Treg/Th17平衡促进神经功能修复。另有研究表明，HUC-MSC通过调控mir-320/klf5轴促进损伤后血管生成发挥神经保护作用[25]。此外，据报道，HUC-MSC来源的外泌体可抑制小胶质细胞死亡、减少神经元损伤[26]。目前关注HUC-MSC在HI后脑内抗氧化作用的研究较少，本研究进一步探讨其是否通过Nrf2/Keap1/HO-1通路，在WMI中发挥抗氧化应激及神经修复作用。

氧化应激是导致WMI和神经系统损害的主要病理过程，在早产儿中尤为显著[27]。Nrf2在调节氧化应激和提供神经保护方面具有重要作用[28]。正常生理状态下，Nrf2与细胞质中的Keap1结合，通过泛素化和降解维持低水平Nrf2[29]；当机体发生氧化损伤时，Keap1发生构象变化并释放Nrf2，Nrf2转移至细胞核，与抗氧化反应元件结合，促进抗氧化基因（如*HO-1*）的表达[30]。既往研究发现，Nrf2可通过上调HO-1表达拮抗氧化损伤，在缺血性卒中发病机制中发挥重要作用[31]。Zhang等[32]的研究发现，*Nrf2*基因敲除小鼠在短暂性大脑中动脉栓塞后，抗氧化酶和解毒酶的基础及诱导活性受抑制，导致脑梗死面积增大。另有研究发现，*Nrf2*基因敲除可抑制OL前体向成熟OL的分化，表明Nrf2信号通路与OL前体分化过程密切相关[33]。本研究发现，新生大鼠WMI后，脑组织Nrf2、HO-1表达升高，Keap1表达降低，大鼠平台穿越次数和目标象限停留时间减少；HUC-MSC移植可进一步上调Nrf2、HO-1蛋白表达水平，降低Keap1蛋白表达水平，并增加大鼠平台穿越次数和目标象限停留时间；而Nrf2特异性抑制剂ML385处理可导致OL成熟受阻、突触形成减少及空间认知功能下降，进一步证实了Nrf2的神经保护作用。以上结果提示，HUC-MSC可能通过激活Nrf2/Keap1/HO-1信号通路减轻氧化应激损伤，从而对WMI发挥保护作用。

本研究也存在一些局限性。首先，本研究缺乏HUC-MSC移植后的长期安全性评估，如致瘤性、免疫排斥或炎症反应等风险检测，未来需延长观察周期，开展安全性检测（如血清因子检测及肿瘤标志物筛查）。其次，本研究仅通过Nrf2特异性抑制剂ML385反向验证，无法完全排除其他通路交叉影响，后续可通过基因编辑（如过表达*Nrf2*）或*Nrf2*条件性敲除大鼠模型，验证该通路的关键作用。最后，本研究采用3日龄大鼠时未区分性别，亦未评估母体或内源性性激素（如雌激素）对神经保护的干扰，后续需纳入性别分组、激素检测及去势模型，探讨性别依赖性差异。

综上所述，本研究结果表明，HUC-MSC可能通过激活Nrf2/Keap1/HO-1通路减轻新生大鼠WMI的氧化应激，促进OL成熟、髓鞘形成和突触发育，从而改善神经功能结局。这些发现为HUC-MSC在脑损伤修复中的临床应用提供了实验基础。

作者贡献声明：王超负责实验设计、部分实验操作（免疫荧光染色、LFB染色、HE染色）、文章撰写、数据整理、数据统计；王梦欣负责免疫组织化学染色、免疫印迹实验、Morris水迷宫实验；朱艳萍负责论文审阅、论文指导、经费支持。

利益冲突声明：所有作者声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] World Health Organization. Preterm birth[EB/OL]. (2023-05-10)[2024-03-31]. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth.

[2] Travers CP, Carlo WA, Ambalavanan N. The future of outcome prediction for preterm infants in the neonatal ICU[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2022, 205(1): 6-8. PMID: 34710338.

PMCID: PMC8865594. DOI: 10.1164/rccm.202109-2188ED.

[3] Lear BA, Lear CA, Dhillon SK, et al. Is late prevention of cerebral palsy in extremely preterm infants plausible? [J]. Dev Neurosci, 2022, 44(4-5): 177-185. PMID: 34937030. DOI: 10.1159/000521618.

[4] Motavaf M, Piao X. Oligodendrocyte development and implication in perinatal white matter injury[J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15: 764486. PMID: 34803612. PMCID: PMC8599582. DOI: 10.3389/fncel.2021.764486.

[5] Tang H, Jiang Y, Zhang JH. Stem cell therapy for brain injury[J]. Stem Cells Dev, 2020, 29(4): 177. PMID: 32013774. DOI: 10.1089/scd.2020.29005.tan.

[6] Ding DC, Chang YH, Shyu WC, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy[J]. Cell Transplant, 2015, 24(3): 339-347. PMID: 25622293. DOI: 10.3727/096368915X686841.

[7] Jia Y, Cao N, Zhai J, et al. HGF mediates clinical-grade human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells improved functional recovery in a senescence-accelerated mouse model of Alzheimer's disease[J]. Adv Sci (Weinh), 2020, 7(17): 1903809. PMID: 32995116. PMCID: PMC7507104. DOI: 10.1002/advs.201903809.

[8] Liu G, Wang D, Jia J, et al. Neuroprotection of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) in alleviating ischemic stroke-induced brain injury by regulating inflammation and oxidative stress[J]. Neurochem Res, 2024, 49 (10): 2871-2887. PMID: 39026086. DOI: 10.1007/s11064-024-04212-x.

[9] Robertson NJ, Meehan C, Martinello KA, et al. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells as an adjunct therapy with therapeutic hypothermia in a piglet model of perinatal asphyxia[J]. Cytotherapy, 2021, 23(6): 521-535. PMID: 33262073. PMCID: PMC8139415. DOI: 10.1016/j.jcyt.2020.10.005.

[10] Dinkova-Kostova AT, Kostov RV, Kazantsev AG. The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases[J]. FEBS J, 2018, 285(19): 3576-3590. PMID: 29323772. PMCID: PMC6221096. DOI: 10.1111/febs.14379.

[11] Sun YY, Zhu HJ, Zhao RY, et al. Remote ischemic conditioning attenuates oxidative stress and inflammation via the Nrf2/HO-1 pathway in MCAO mice[J]. Redox Biol, 2023, 66: 102852. PMID: 37598463. PMCID: PMC10462885. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102852.

[12] Zhang Q, Luo C, Li Z, et al. Astaxanthin activates the Nrf2/Keap1/HO-1 pathway to inhibit oxidative stress and ferroptosis, reducing triphenyl phosphate (TPhP) -induced neurodevelopmental toxicity[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 271: 115960. PMID: 38219622. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.115960.

[13] Li Y, Huang J, Wang J, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation supplemented with curcumin improves the outcomes of ischemic stroke via AKT/GSK-3β/β -TrCP/Nrf2 axis[J]. J Neuroinflammation, 2023, 20 (1): 49. PMID: 36829224. PMCID: PMC9951499. DOI: 10.1186/s12974-023-02738-5.

[14] Ma S, Zhou X, Wang Y, et al. MG53 protein rejuvenates hUC-MSCs and facilitates their therapeutic effects in AD mice by activating Nrf2 signaling pathway[J]. Redox Biol, 2022, 53: 102325. PMID: 35525026. PMCID: PMC9079718. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102325.

[15] Wang CC, Hu XM, Long YF, et al. Treatment of Parkinson's disease model with human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes loaded with BDNF[J]. Life Sci, 2024, 356: 123014. PMID: 39182566. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.123014.

[16] Zhang L, Bai W, Peng Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes provide neuroprotection in traumatic brain injury through the lncRNA TUBB6/Nrf2 pathway[J]. Brain Res, 2024, 1824: 148689. PMID: 38030103. DOI: 10.1016/j.brainres.2023.148689.

[17] Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. J Neurosci Res, 1999, 55(2): 158-163. PMID: 9972818. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19990115)55:2<158::AID-JNR3>3.0.CO;2-1.

[18] Cheng T, Xue X, Fu J. Effect of OLIG1 on the development of oligodendrocytes and myelination in a neonatal rat PVL model induced by hypoxia-ischemia[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(4): 2379-2386. PMID: 25435330. PMCID: PMC4337744. DOI: 10.3892/mmr.2014.3028.

[19] 张军, 李明霞, 王超, 等. 不同剂量人脐带间充质干细胞移植对新生大鼠脑白质损伤的修复作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2024, 26(4): 394-402. PMID: 38660904. PMCID: PMC11057307. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2310081.

[20] 徐倩倩, 张书绢, 王超, 等. 人脐带间充质干细胞对新生大鼠脑白质损伤的修复作用[J]. 中华新生儿科杂志（中英文）, 2025, 40(5): 297-305. DOI: 10.3760/cma.j.cn101451-20241006-00348.

[21] Hoang DM, Pham PT, Bach TQ, et al. Stem cell-based therapy for human diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 272. PMID: 35933430. PMCID: PMC9357075. DOI: 10.1038/s41392-022-01134-4.

[22] Zhu LH, Bai X, Zhang N, et al. Improvement of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on glial cell and behavioral function in a neonatal model of periventricular white matter damage[J]. Brain Res, 2014, 1563: 13-21. PMID: 24680746. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.03.030.

[23] Liao Z, Yang X, Wang W, et al. hucMSCs transplantation promotes locomotor function recovery, reduces apoptosis and inhibits demyelination after SCI in rats[J]. Neuropeptides, 2021, 86: 102125. PMID: 33486279. DOI: 10.1016/j.npep.2021.102125.

[24] Chen C, Hu N, Wang J, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells promote neurological repair after traumatic brain injury through regulating Treg/Th17 balance[J]. Brain Res, 2022, 1775: 147711. PMID: 34793756. DOI: 10.1016/j.brainres.2021.147711.

[25] Feng J, He W, Xia J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomal circDLGAP4 promotes

angiogenesis after cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating miR-320/KLF5 axis[J]. FASEB J, 2023, 37(3): e22733. PMID: 36723877. DOI: 10.1096/fj.202201488R.

[26] Hu Z, Yuan Y, Zhang X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced microglial pyroptosis by promoting FOXO3a-dependent mitophagy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6219715. PMID: 34765084. PMCID: PMC8577931. DOI: 10.1155/2021/6219715.

[27] Jie Z, Huan Y, Mengyun W, et al. Nrf2 modulates immunosuppressive ability and cellular senescence of human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526(4): 1021-1027. PMID: 32317184. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.03.175.

[28] Nishikawa S, Inoue Y, Hori Y, et al. Anti-inflammatory activity of kurarinone involves induction of HO-1 via the KEAP1/Nrf2 pathway[J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(9): 842. PMID: 32916869. PMCID: PMC7554885. DOI: 10.3390/antiox9090842.

[29] Xian P, Hei Y, Wang R, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a nanotherapeutic agent for amelioration of inflammation-induced astrocyte alterations in mice[J]. Theranostics, 2019, 9(20): 5956-5975. PMID: 31534531. PMCID: PMC6735367. DOI: 10.7150/thno.33872.

[30] Kopacz A, Klóska D, Proniewski B, et al. Keap1 controls protein S-nitrosation and apoptosis-senescence switch in endothelial cells[J]. Redox Biol, 2020, 28: 101304. PMID: 31491600. PMCID: PMC6731384. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101304.

[31] Wang L, Zhang X, Xiong X, et al. Nrf2 regulates oxidative stress and its role in cerebral ischemic stroke[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(12): 2377. PMID: 36552584. PMCID: PMC9774301. DOI: 10.3390/antiox11122377.

[32] Zhang W, Wei R, Zhang L, et al. Sirtuin 6 protects the brain from cerebral ischemia/reperfusion injury through NRF2 activation[J]. Neuroscience, 2017, 366: 95-104. PMID: 28951325. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.09.035.

[33] Li Q, Lou J, Yang T, et al. Ischemic preconditioning induces oligodendrogenesis in mouse brain: effects of Nrf2 deficiency[J]. Cell Mol Neurobiol, 2022, 42(6): 1859-1873. PMID: 33666795. PMCID: PMC11421701. DOI: 10.1007/s10571-021-01068-5.

（本文编辑：杨丹）

（版权所有©2025 中国当代儿科杂志）