

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: 不同浓度低氧影响少突胶质前体细胞迁移能力
作者: 王倩, 汪兆艳, 栾佐, 袁玉华
收稿日期: 2025-09-16
网络首发日期: 2025-10-22
引用格式: 王倩, 汪兆艳, 栾佐, 袁玉华. 不同浓度低氧影响少突胶质前体细胞迁移能力[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20251022.0946.004>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

不同浓度低氧影响少突胶质前体细胞迁移能力

王倩^{1,2}, 汪兆艳², 栾佐², 袁玉华¹

(¹天津医科大学总医院检验科, 天津 300052; ²中国人民解放军总医院第六医学中心儿科, 北京 100048)

摘要 **目的** 探讨低氧对人少突胶质前体细胞(hOPCs)迁移能力的影响及其调控机制。**方法** 根据培养体系中氧浓度的差异, 设置3个实验组: 21% O₂组(常氧对照组)、5% O₂组及2% O₂组。通过Transwell迁移实验检测hOPCs在常氧(21%O₂)、5%O₂、2%O₂条件下的迁移能力; 利用RT-qPCR、转录组测序、流式细胞分析术检测缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、趋化因子受体4(CXCR4)等基因和蛋白的表达变化; 结合生物信息学分析与迁移相关的KEGG通路, 以探讨不同氧浓度对hOPCs迁移能力的影响及其可能机制。**结果** 5%O₂和2%O₂浓度的低氧处理均能促进hOPCs体外迁移, 且2%O₂浓度下的促迁移作用更为显著($P<0.001$)。低氧处理后hOPCs的HIF-1 α 和CXCR4等mRNA表达水平均显著升高($P<0.001$)。与5%O₂浓度相比, 2%O₂浓度下细胞CXCR4表达更高($P<0.0001$)。流式检测显示, 低氧处理后CXCR4表达显著增加($P<0.01$), 且随着氧浓度的降低, 其表达量进一步升高($P<0.0001$)。普通转录组测序分析表明, 低氧处理可激活PI3K-Akt信号通路与轴突引导通路。**结论** 低氧处理可增强hOPCs体外迁移能力, 且该效应与氧浓度呈负相关, 其机制可能与上调HIF-1 α 、CXCR4等基因表达, 激活迁移相关PI3K-Akt信号通路与轴突引导通路有关。

关键词 hOPCs; 低氧; 迁移; HIF- α ; CXCR4; PI3K-Akt信号通路; 轴突引导通路

中图分类号 Q2-33

文献标志码 A

Effects of hypoxia at different concentrations on the migration capacity of oligodendrocyte progenitor cells

Wang Qian^{1,2}, Wang Zhaoyan², Luan Zuo², Yuan Yuhua¹

(¹Dept of Laboratory, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin, 300052;

²Dept of Pediatrics, The sixth Medical Center of the Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing, 100048)

Abstract Objective To explore the effects of hypoxia on the migration ability of human

2025-09-16 接收

基金项目: 国家重点研发计划项目(编号: 2017YFA0104203)

作者简介: 王倩, 女, 硕士研究生;

袁玉华, 男, 教授, 主任技师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: yuanyuh840917@163.com

oligodendrocyte precursor cells (hOPCs) and its regulatory mechanisms. **Methods** Based on the variations in oxygen concentration within the culture system, three experimental groups were set up: the 21% O₂ group (normoxic control group), the 5% O₂ group, and the 2% O₂ group. The migration ability of hOPCs under normoxia (21% O₂), 5% O₂, and 2% O₂ conditions was detected through the Transwell migration assay. RT-qPCR, transcriptome sequencing, and flow cytometry were used to detect the expression changes of genes and proteins such as hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) and Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 4 (CXCR4). Bioinformatics analysis was combined to analyze the KEGG pathways related to migration, so as to explore the effects of different oxygen concentrations on the migration ability of hOPCs and their possible mechanisms. **Results** Hypoxia treatments at concentrations of 5% O₂ and 2% O₂ could both promote the *in vitro* migration of hOPCs, and the promoting effect of migration was more significant at the 2% O₂ concentration ($P<0.001$). After hypoxia treatment, the mRNA expression levels of HIF-1 α , CXCR4, etc. in hOPCs significantly increased ($P<0.001$). Compared with the 5% O₂ concentration, the expression of CXCR4 in cells was higher at the 2% O₂ concentration ($P<0.0001$). Flow cytometry analysis detection showed that the expression of CXCR4 increased significantly after hypoxia treatment ($P<0.01$), and with the decrease of oxygen concentration, its expression level further increased ($P<0.0001$). Ordinary transcriptome sequencing analysis indicated that hypoxia treatment could activate the PI3K-Akt signaling pathway and the Axon guidance pathway. **Conclusion** In conclusion, hypoxia treatment can enhance the *in vitro* migration ability of hOPCs, and this effect is negatively correlated with the oxygen concentration. Its mechanism may be related to the up-regulation of the expression of genes such as HIF-1 α and CXCR4, and the activation of the migration related signaling pathway including PI3K-Akt signaling pathway and Axon guidance pathway.

Key words hOPCs; low oxygen; migration; HIF- α ; CXCR4; PI3K-Akt signaling pathway; Axon guidance pathway

Fund program National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFA0104203)

Corresponding authors Yuan Yuhua, E-mail: yuanyuh840917@163.com

中枢神经系统中的少突胶质前体细胞（oligodendrocyte precursor cells, OPCs），会发育分化为成熟的少突胶质细胞（oligodendrocytes, OLs），从而形成髓鞘结构^[1]。大脑髓鞘受损后，

神经系统的信号传导受到影响，导致感觉、运动和认知能力的缺陷。OPCs 的特异性标志物血小板衍生生长因子 α (platelet-derived growth factor alpha, PDGF- α) 调控 OPCs 增殖、存活和迁移；标志物少突胶质细胞系转录因子 2 (oligodendrocyte lineage transcription factor 2, OLIG2) 参与 OPCs 的谱系决定和分化^[2]。OPCs 的迁移能力减弱，进入脱髓鞘病变部位的细胞不足是影响其移植后成髓鞘效果的关键因素^[3]。趋化因子受体 4[chemokine (C-X-C motif) receptor 4, CXCR4]的表达水平与 OPCs 的迁移能力正相关^[4]。提高 OPCs 的迁移能力有望成为脱髓鞘疾病治疗的关键。低氧处理可有效提升干细胞的迁移能力，显著增强神经干细胞、间充质干细胞等多种干细胞的迁移潜能^[5]。但低氧处理对人少突胶质前体细胞 (human oligodendrocyte precursor cells, hOPCs) 迁移能力的影响及其机制方面的研究鲜见报道。该文探讨了不同低氧浓度对 hOPCs 迁移能力的影响，并剖析其潜在机制，旨在为临床转化奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及耗材

DMEM/F12 培养基、肝素、B27 与 N2 细胞培养添加剂、Neurobasal™-A 培养基、GlutaMAX™-1 (美国 Gibco 公司)；人类血浆纤维连接蛋白、DAPI (美国 Sigma 公司)；血小板衍生生长因子、神经营养因子-3、白血病抑制因子 (美国 Pepro Tech Inc)；PBS (中国 Solarbio 公司)；TRIzol 试剂 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；兔抗人 PDGFR- α 、兔抗人 OLIG2、小鼠抗人 A2B5、驴抗小鼠 ALexa FLuor 488、驴抗兔 ALexa FLuor 488 (英国, Abcam 公司)；小鼠抗人 BV421-PDGFR- α (美国, BD 公司)；小鼠抗人 PE-A2B5 (德国 Miltenyi Biotec 公司)；小鼠抗人 FITC -OLIG2 (美国 Millipore 公司)；小鼠抗人 PE-CXCR4、Human TruStain FcX™ (美国 Biolegend 公司)；Transwell 小室、六孔板 (美国 Corning 公司)；RNA prep Pure Cell/Bacteria Kit、DNase (中国 Tiangen 公司)；5×Prime ScriptRT Master Mix、TB Green®Fast qPCR Mix (日本 TAKARA 公司)。

1.2 实验仪器

超净工作台 (中国亚泰克隆公司)；细胞培养箱 (日本 SANYO 公司)；三气培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；离心机 (日本 KUBOTA 公司)；流式细胞仪 (美国 BD 公司)；倒置显微镜、数字共聚焦激光扫描显微镜 (日本 Olympus 公司)；Chromo 4 Real-TimePCR 检测系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 hOPCs 诱导分化及鉴定

根据先前实验团队的诱导方案^[6]，公司从人神经干细胞 (human neural stem cells, hNSCs)

诱导为 hOPCs 进行扩增培养。将 hOPCs 连续传代至 P₂ 用于细胞鉴定实验。通过免疫荧光和流式检测鉴定 hOPCs 的两种标志物，即 PDGFR- α 和 OLIG2。低氧（5%O₂、2%O₂）预处理后，通过镜下观察细胞形态变化，流式测定 PDGFR- α 和 OLIG2 的表达变化。

1.3.2 Transwell 实验测试不同氧浓度下 hOPCs 的迁移能力

常氧条件下培养至 P₂ 的 hOPCs 消化传代时，将细胞分为 3 组：常氧组（21%O₂）、5%O₂ 组、2%O₂ 组。3 组细胞在常氧条件下培养 6 d，第 7 天，将低氧组细胞转入低氧培养箱，使细胞在低氧（5%O₂、2%O₂），5%CO₂，37℃培养条件下处理 24 h，常氧组细胞在常氧条件下继续培养。用 Accutase 酶分别消化 3 组细胞，hOPCs 培养基重悬细胞并计数，取单细胞接种到已包被人类血浆纤维连接蛋白的 Transwell 小室的上室内，2×10⁴ 个/孔。标记分组：常氧组、5%O₂ 组、2%O₂ 组，每组设 3 个复孔。Transwell 小室的上室加入细胞悬液 100 μ L，下室加入 hOPCs 培养基 500 μ L 后将小室放入 5%CO₂、37℃培养箱孵育。细胞在培养箱中迁移时间为 24 h。迁移时间终点时取出小室，吸弃上室液体，用无菌棉签擦拭内表面，尽量去除残留内表面的细胞，擦拭完毕后，用 4%多聚甲醛固定细胞 10 min，用 PBS 洗净小室甲醛残留，控干。用 DAPI 染色剂对细胞核染色 10 min，染色完成，用荧光倒置显微镜拍照记录。采用 ImageJ 软件对迁移的细胞进行定量分析。计算出迁移至小室底部的细胞数量（N₁），根据每孔初始细胞接种数（N₂），再进一步计算出细胞迁移率（V₁%）。即：细胞迁移率（V₁%）=N₁/N₂×100%。

1.3.3 流式细胞术测定不同氧浓度下 hOPCs 标志物（PDGFR- α 、OLIG2）及 CXCR4 受体的变化

将培养完毕的 3 组细胞分别消化计数，每组细胞分装至流式管中，每管细胞数量为 5×10⁵ 个，2 000 r/min 离心 5 min，充分弃上清液后混匀细胞，每管加入 5 μ L Human TruStain FcX™ Fc 受体阻断剂（货号：422302），室温孵育 10 min。设置①号管为空白对照，分别在②、③、④、⑤、⑥和⑦管中加入 5 μ L BV421 Mouse IgG2a, k Isotype Control、5 μ L BV421-PDGFR- α 、5 μ L Mouse IgG2b Kapa Light Chain Isotype Control、10 μ L FITC-OLIG2、5 μ L PE-Mouse IgG2a k Isotype Control 和 10 μ L PE-CXCR4 等流式抗体后 4℃孵育 30 min，用 Wash Bufferh 缓冲液洗涤细胞后上机检测。使用 FlowJo 软件 v10 分析数据。

1.3.4 RT-qPCR 检测不同氧浓度下 CXCR4 和 HIF-1 α 基因变化

将常氧和低氧（5%O₂、2%O₂）的细胞消化处理后，用 RNA prep Pure Cell/Bacteria Kit 提取 RNA，通过 Nanoophotometer®超微分光光度计测量 RNA 浓度与纯度。利用 5×Prime Script RTMaster Mix 试剂盒完成逆转录反应（85℃、5 s，4℃、3~5 min）获得 cDNA，再以 cDNA 为模版根据 TB Green®Fast qPCR Mix 试剂盒进行 RT-qPCR 实验，检测 CXCR4-mRNA 表达水

平, 以 GAPDH 为内参基因。实验条件设置为: 95 °C、30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 共完成 40 个循环。基因引物序列如下: CXCR4 上游引物为 5' -CTTCTTAACTGGCATTGTGG-3', 下游引物为 5' -GTGATGACAAAGAGGAGGTC-3'; HIF-1 α 上游引物为 5' -CACCACAGGACAGTACAGGAT-3', 下游引物为 5' -CGTGCTGAATAATACCACTCACA-3'; GAPDH 上游引物为 5' -TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT-3', 下游引物为 5' -ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTT-3'。目的基因表达量定量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

1.3.5 常氧和低氧 (2% O₂) 组普通转录组测序

分别取消化和计数完毕的 3 组 hOPCs, 加入 2 支 15 mL 离心管中, 做好标记, 1×10^6 个/管, PBS 离心洗涤 1 次, 弃上清液, 每管加入 1 mL TRIzol 试剂, 反复混匀至细胞团消失且溶液清亮不粘稠。将 hOPCs 的 RNA 样本置于 -80 °C 冰箱冻存, 最终样本送上海欧易生物医学科技有限公司完成 mRNA 检测。提取总 RNA 并使用 DNase 消化 DNA 后, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA; 加入打断试剂将 mRNA 打断成短片段, 以打断后的 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物合成一链 cDNA, 然后配制二链合成反应体系合成二链 cDNA, 并使用试剂盒纯化双链 cDNA; 纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 然后进行片段大小选择, 最后进行 PCR 扩增; 构建好的文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 质检合格后, 使用 Illumina HiSeqTM2500 或 Illumina HiSeq X Ten 其他测序仪进行测序, 产生 125 bp 或 150 bp 的双端数据。

1.3.6 转录组测序数据的预处理及质量控制

建库测序及数据分析部分由上海欧易生物医学科技有限公司完成。高通量测序中产生的原始数据 (raw reads) 为 fastq 格式序列。为了得到可用于后续分析的高质量 reads, 需要对 raw reads 进行进一步的质量过滤。首先使用 Trimmomatic 软件进行质控并去除接头, 在此基础上过滤掉低质量碱基以及 N 碱基, 最终得到高质量的 clean reads。采用 hisat2 工具, 将过滤得到的 clean reads 比对至该物种的参考基因组, 软件参数为默认参数, 通过基因组比对率来评估样本的情况。

1.3.7 差异基因筛选及富集的 GO 和 KEGG 分析

通过 eXpress 软件获取落到各个样本中转录本 (protein-coding) 的 reads 数目, 使用 DESeq(2012) R package 的 estimateSizeFactors 函数对数据进行标准化, 并使用 nbinomTest 函数计算差异比较的 pvalue 和 foldchange 值。挑选出 $P < 0.05$, 差异倍数大于 2 的差异转录本, 并进行差异转录本的 GO 和 KEGG 富集分析, 以判定差异转录本主要影响的生物学功能或者通路。

1.4 统计学处理

使用 GraphPad Prism8 版软件和 SPSS26.0 版对本研究中的实验数据进行分析。所有实验数据均表示为 $\bar{x} \pm s$ 。多组间均数的比较采用单因素方差分析，两组间均数的比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hOPCs 的形态及特性鉴定

hOPCs 的胞体呈圆形或椭圆形，其突触呈双极状，偶见三级或多级状，细胞之间呈串珠状排列（图 1A）。免疫荧光染色结果显示 hOPCs 标志物 PDGFR- α 及 OLIG2 表达阳性（图 1B、C），流式细胞术结果显示 PDGFR- α 和 OLIG2 的阳性率分别为 96.6%和 96.7%（图 1D、E）。

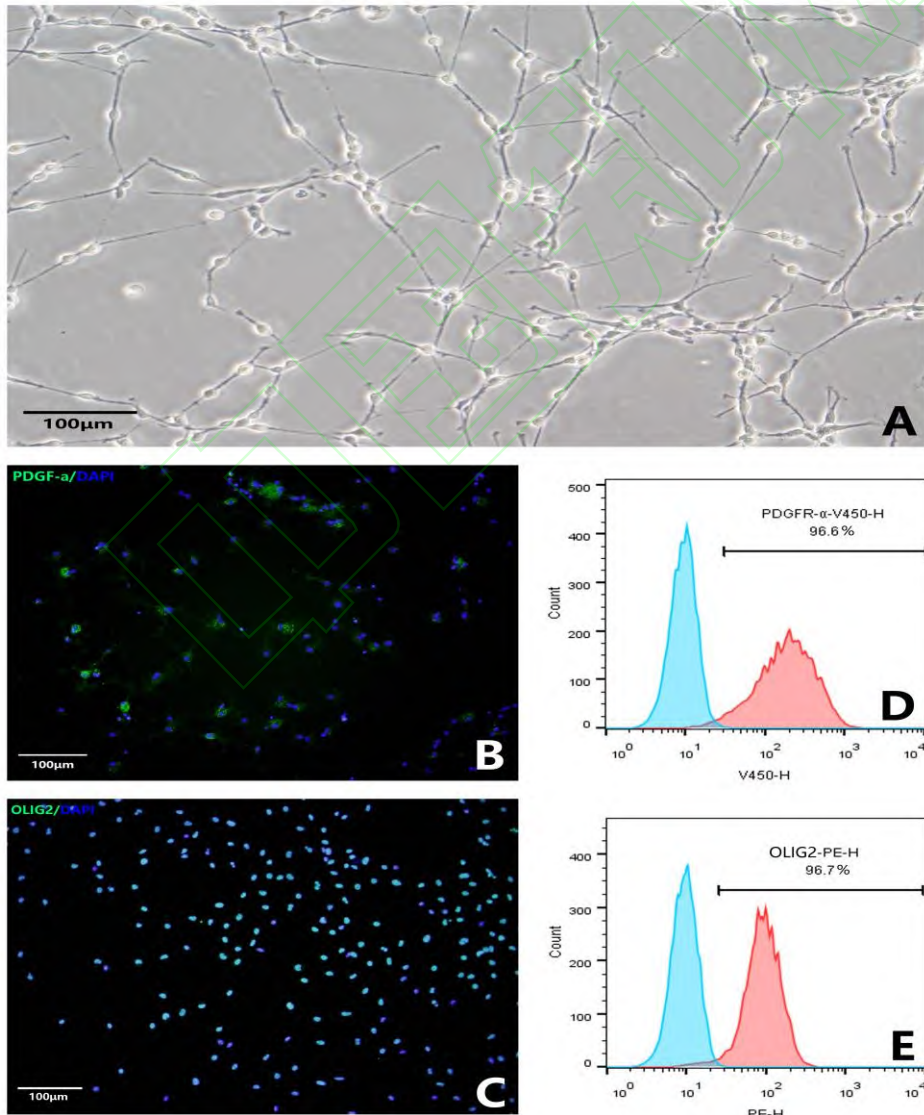


图 1 hOPCs 培养鉴定图 ×200

Fig.1 Identification of hOPCs culture ×200

A: Contrast microscopy was used to observe hOPCs morphology under brightfield; B, C: Immunofluorescence staining was used to identify the expression of PDGFR- α and OLIG2 in hOPCs; D, E: Flow cytometry was used to detect the expression of PDGFR- α and OLIG2 in hOPCs.

2.2 氧浓度对 hOPCs 迁移能力的影响

常氧条件下培养的 hOPCs 的迁移率为 $(7.30 \pm 1.86)\%$ ，5%O₂ 预处理后 hOPCs 的迁移率提高至 $(29.88 \pm 1.95)\%$ ，2%O₂ 预处理后其迁移率进一步提高至 $(42.26 \pm 6.91)\%$ ，表明低氧预处理能够显著提升 hOPCs 的迁移能力，且随着氧浓度减低细胞的迁移率明显提升（图 2）。镜下观察细胞形态，显示低氧（5%O₂，2%O₂）预处理 24 h 后，细胞形态并未有明显变化（图 3A-C）。5%O₂ 预处理后，PDGFR- α 和 OLIG2 的阳性率分别为 95.8%和 97.7%（图 3D、E）。2%O₂ 预处理后，PDGFR- α 和 OLIG2 的阳性率分别为 94.3%和 95.1%（图 3F、G）。低氧与常氧比较，标志物 PDGFR- α 和 OLIG2 的表达无显著差异。

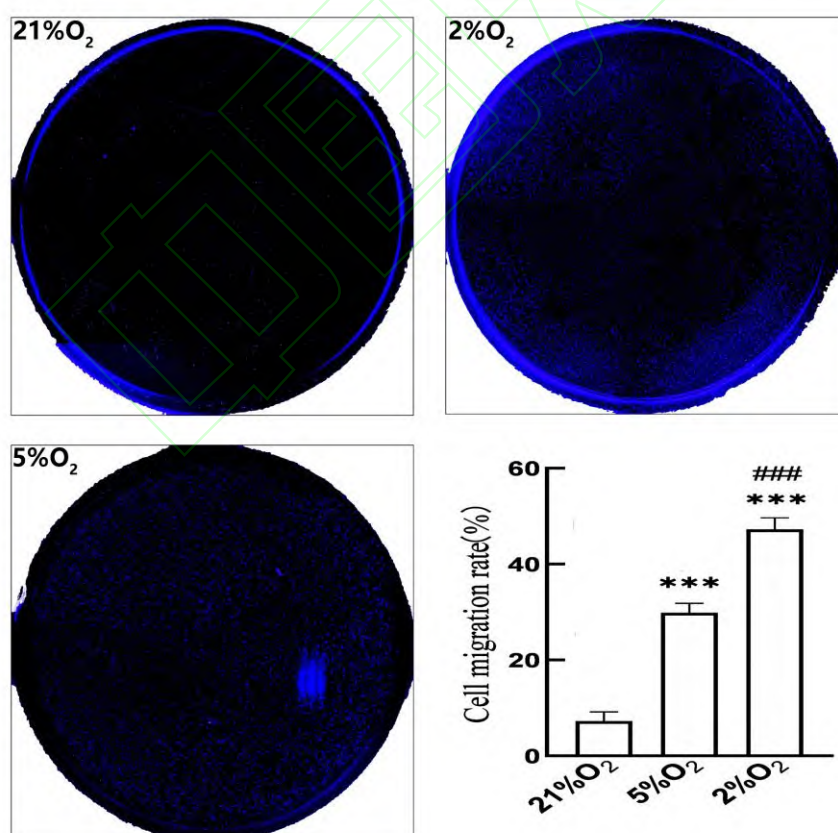


图 2 Transwell 实验迁移结果

Fig.2 The results of Transwell experiment showing migration ability

*** $P < 0.001$ vs 21%O₂ group; ### $P < 0.001$ vs 5%O₂ group.

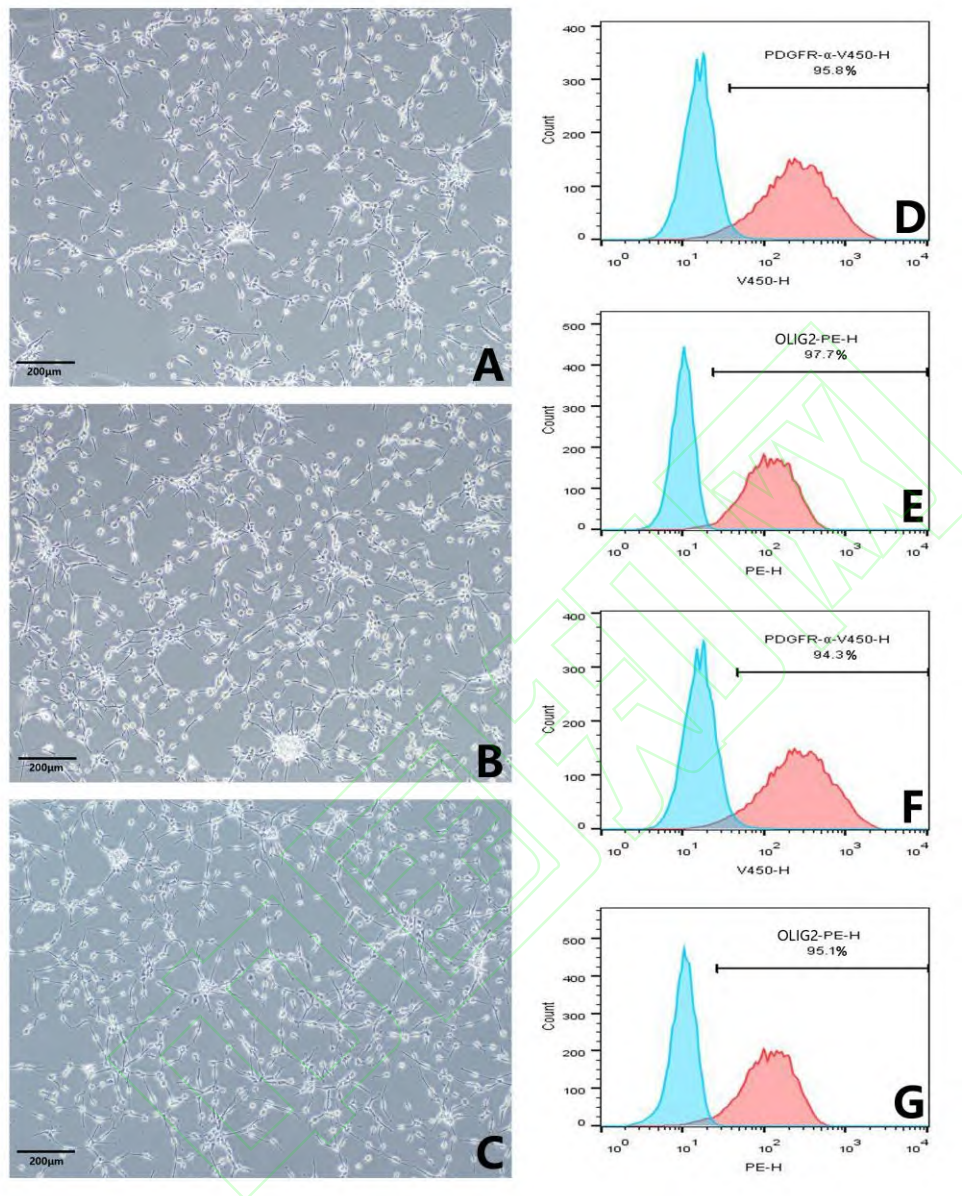


图 3 常氧和低氧明场对比及低氧后流式检测 × 100

Fig.3 Comparison of normoxia and hypoxia under brightfield and flow cytometry detection
post-hypoxic × 100

A: Normoxxygen; B: 5%O₂; C: 2%O₂; D, E: The expression of biomarkers in hOPCs pretreated with 5% O₂ hypoxic; F, G: The expression of biomarkers in hOPCs pretreated with 2% O₂ hypoxic.

2.3 氧浓度对 HIF-1 及 CXCR4-mRNA 表达的影响

通过 RT-qPCR 检测常氧和低氧（5%O₂ 和 2%O₂）条件下 hOPCs 中 CXCR4-mRNA 和 HIF-1α-mRNA 表达变化。RT-qPCR 结果显示，低氧组较常氧组 CXCR4 基因表达提高($P < 0.01$),

随着氧浓度的减低，CXCR4 基因的表达量明显增高($P<0.0001$)。同时低氧组较常氧组 HIF-1 α 基因表达显著提高($P<0.0001$)，尽管随着氧浓度降低 HIF-1 α 基因有提升的趋势，但是 5%O₂ 组和 2%O₂ 组差异无统计学意义。见图 4。

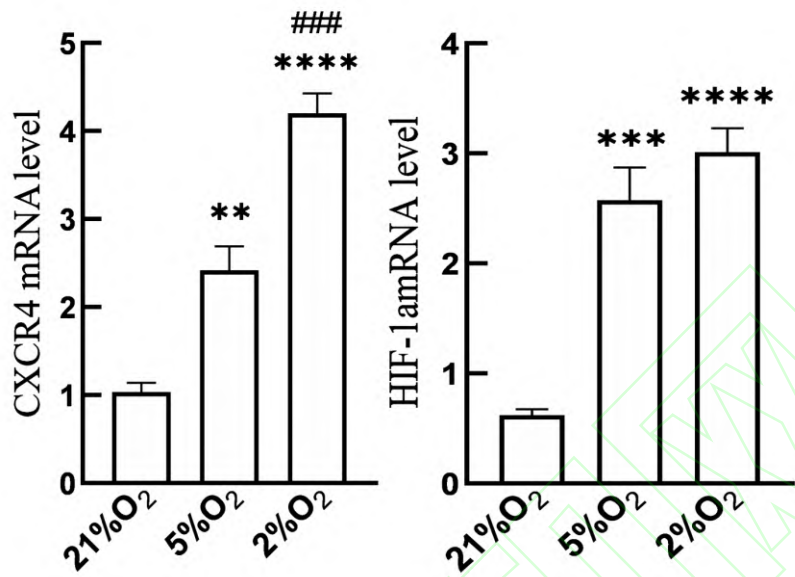


图 4 不同氧浓度下 CXCR4-mRNA 及 HIF-1 α -mRNA 的表达

Fig. 4 The expression of CXCR4-mRNA and HIF-1 α -mRNA at different oxygen concentrations

** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs 21%O₂ group; ### $P<0.001$ vs 5%O₂ group.

2.4 低氧导致 hOPCs 的 CXCR4 蛋白的表达增高

通过流式细胞术检测不同氧浓度下 hOPCs 表面 CXCR4 的表达变化。常氧条件下 CXCR4 受体阳性率为(14.57 $\pm$ 0.94)%，5%O₂ 处理 24h 后，其表达率提升至(48.57 $\pm$ 1.8)%，约为常氧条件下的 3.3 倍，2%O₂ 处理 24h 后，其表达率提升至(72.47 $\pm$ 0.83)%，约为常氧条件下的 4.9 倍（图 5）。与 5%O₂ 相比，2%O₂ 更加显著提升了 CXCR4 表达量。

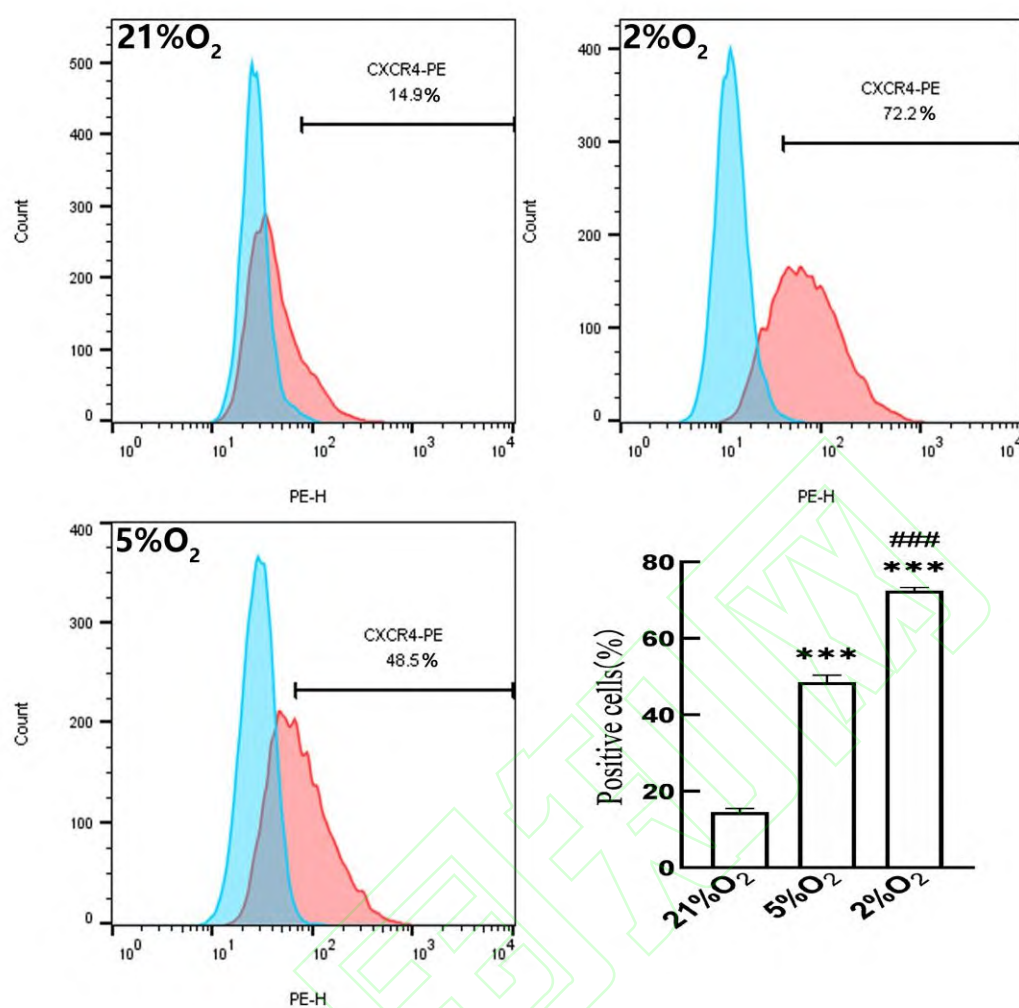


图 5 低氧处理对 hOPCs 表面 CXCR4 表达的影响

Fig.5 The effects of hypoxic treatment on CXCR4 expression on the surface of hOPCs

*** $P < 0.001$ vs 21%O₂ group; ### $P < 0.001$ vs 5%O₂ group.

2.5 不同氧浓度处理 hOPCs 差异基因富集 GO 功能和 KEGG 通路分析

对常氧和 2%O₂ 浓度处理的 hOPCs 进行转录组测序分析并进行比较，绘制差异基因表达火山图（图 6A）。结果显示低氧组有 98 个差异基因上调，66 个差异基因下调。在上调的基因中包括众多与细胞迁移有关的基因，例如 CXCR4、SEMA3A、COL18A1、IGFBP5、EPHA3、COL1A1、DDIT4、EGLN3 和 HK2，而在下调的基因中也有细胞迁移有关的 UNC5C 和 SCG2，说明低氧处理引起了迁移相关基因群体的改变。对差异基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析显示，在低氧和常氧 hOPCs 的比较中，差异基因富集的 GO 功能与细胞迁移有关（图 6B），验证了低氧能够提升与 hOPCs 的迁移力相关的基因表达。常氧和 2%O₂ 浓度处理的 hOPCs 比较的差异基因富集的 KEGG 通路包括轴突引导、PI3K-Akt 信号通路、钙信号通路、HIF-1 信号通路、细胞因子-细胞因子受体相互作用、肌动蛋白细胞骨架的调节和 Ras 信

号通路（图 6C）。

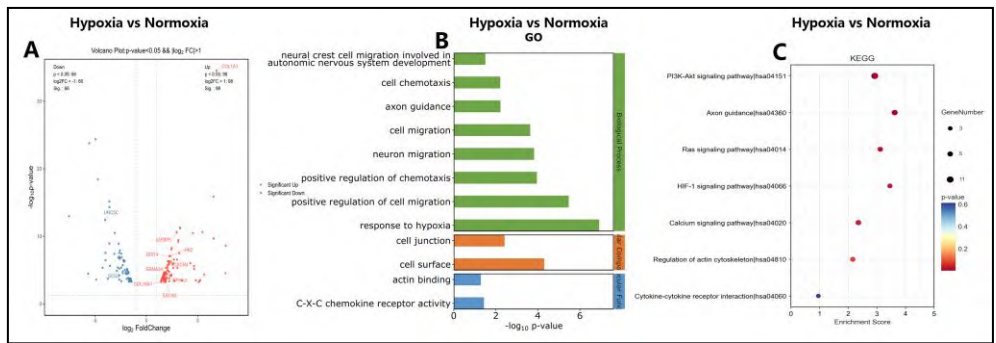


图 6 差异基因表达分析

Fig.6 Differential gene expression analysis

A: Volcano plot showing the expression of differential genes between cells in the hypoxic (2% O₂) and normoxia groups; red: upregulated genes; blue: downregulated genes; labeled genes are associated with cell migration; The y-axis is -log₁₀ (the corrected value of p value), and the abscissa is log₂ fold change; B: Differential gene enrichment and migration-related GO functional items compared between hypoxia (2% O₂) and normoxia; C: KEGG pathway diagram of differential gene enrichment and migration associated with hypoxia (2% O₂) and normoxia groups.

3 讨论

hOPCs 可以分化为少突胶质细胞并包绕轴突形成髓鞘结构，对损伤的脑白质进行实质上的补充，实现真正意义上的替代修复。然而 OPCs 的迁移能力减弱，进入脱髓鞘病变部位的细胞不足也会影响髓鞘修复效果^[3]。增强 hOPCs 的迁移能力，或可提升移植疗效。添加雷帕霉素、低氧处理^[7]、转基因^[8]等均可影响细胞的迁移能力。其中，低氧处理因无其他试剂添加，且能在增殖、迁移、分泌等多方面增强细胞功能而备受青睐^[9]。脑内氧浓度约为 1%~8%^[10]，低于体外细胞培养的常规浓度。故采用该范围内的氧浓度进行培养更符合生理状态，且低氧环境可使细胞具备更高的体内活性。本研究分析了低氧浓度（2%/5%）对 hOPCs 迁移能力的影响，结果显示低氧处理未改变细胞形态及 OPCs 特征性分子的高表达，说明增强 hOPCs 迁移能力的同时，低氧并不改变细胞本身属性。此外，2%O₂ 较 5%O₂ 具备更强的促进 hOPCs 迁移的能力。低氧处理也可诱导细胞凋亡、焦亡等，本项目组的其他研究结果显示低氧并未引发 hOPCs 凋亡增加，可能与处理时间相对较短（24 H）有关。Antebi et al^[11]认为短时间低氧处理可增加细胞适应性，而长时间处理则会引起细胞损伤。本研究的不足之处在于尚未探究不同氧浓度引发 hOPCs 凋亡的临界时间点。

低氧诱导因子（hypoxia inducible factor, HIF）家族是低氧环境下参与细胞适应的响应分

子，能促进应对基因的表达，成员包括 HIF-1、HIF-2、HIF-3 等^[12]。本研究中仅 HIF1- α 的表达量增加，HIF1- α 可能是 2%O₂、5%O₂ 低氧处理增加 OPC 迁移能力的效应分子。通过转录组测序和 qPCR 分析，显示 HIF1- α 激活后，其关联的 HK2、EGLN3、CXCR4 也被顺序激活。CXCR4 是控制细胞迁移关键信号轴 SDF-1/CXCR4 的核心分子，与细胞迁移能力密切相关^[13]。在神经系统中，CXCR4 参与了神经元发育历程、迁移行为以及突触结构的形成^[14]。本研究通过 CXCR4 的表达变化判定低氧对 hOPCs 迁移能力的改变情况，发现低氧较正常氧浓度下，CXCR4 蛋白表达阳性的 hOPCs 比例自 14.9% 上升至 72.2%，表明其迁移能力显著增强。Transwell 迁移实验再次证实了低氧可促进 hOPCs 的迁移能力，24 h 的迁移率自 (7.3 $\pm$ 1.9) % 显著提升至 (42.3 $\pm$ 6.9) %。其作用机制可能与升高 HIF1- α 表达，促进其与 CXCR4 基因启动子上的缺氧反应元件结合，提升 CXCR4 的表达相关^[15]。CXCR4 在 hOPCs 迁移、成髓鞘过程中的直接功用罕见报道，鉴于 CXCR4 在神经系统发育与疾病进展中不可或缺，且是趋化因子受体家族中的核心成员，CXCR4 极有可能在 OPCs 的迁移以及髓鞘修复中扮演关键角色。

转录组测序分析提示低氧后 hOPCs 中与细胞迁移、轴突引导相关的功能基因 CXCR4、SEMA3A 等高表达。上调 PI3K-Akt 信号通路可促进 hOPCs 迁移和髓鞘形成^[16]，本研究中低氧组 PI3K-Akt 信号通路较常氧组上调，推测低氧处理促进 hOPCs 迁移及髓鞘形成与该通路相关。此外，轴突引导信号通路受多种引导因子调控，引发细胞骨架组织变化，决定生长锥转向方向，是神经网络形成的关键阶段^[17]。OPCs 迁移由肌动蛋白细胞骨架动力学驱动，在结构和功能上与神经元生长锥相似^[3]。对常氧组和低氧组 hOPCs 进行差异基因的 KEGG 通路分析，推测低氧组通过上调 Axon guidance 通路以提高 hOPCs 的迁移能力。在后续工作中，本团队将进一步分析低氧处理后 hOPCs 的体内外成髓鞘能力，从而对脱髓鞘相关疾病发挥更强的细胞替代补充作用。

参考文献

- [1] Medina R, Derias A M, Lakdawala M, et al. Overview of emerging therapies for demyelinating diseases[J]. World J Clin Cases, 2024, 12(30): 6361-73. doi:10.12998/wjcc.v12.i30.6361.
- [2] Cardona H J, Somasundaram A, Crabtree D M, et al. Prenatal overexpression of platelet-derived growth factor receptor A results in central nervous system hypomyelination[J]. Brain Behav, 2021, 11(10): e2332. doi:10.1002/brb3.2332.
- [3] Thomason E J, Escalante M, Osterhout D J, et al. The oligodendrocyte growth cone and its actin cytoskeleton: a fundamental element for progenitor cell migration and CNS myelination[J]. Glia, 2020, 68(7): 1329-46. doi:10.1002/glia.23735.

- [4] Asbelaoui N, Abi-Ghanem C, Schlecht-Louf G, et al. Interplay between androgen and CXCR4 chemokine signaling in myelin repair[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2024, 12(1): 18. doi:10.1186/s40478-024-01730-1.
- [5] Wang Q, Li Y, Yuan H, et al. Hypoxia preconditioning of human amniotic mesenchymal stem cells enhances proliferation and migration and promotes their homing *via* the HGF/C-MET signaling axis to augment the repair of acute liver failure[J]. *Tissue Cell*, 2024, 87: 102326. doi:10.1016/j.tice.2024.102326.
- [6] Zhou H, He Y, Wang Z, et al. Identifying the functions of two biomarkers in human oligodendrocyte progenitor cell development[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1):188. doi:10.1186/s12967-021-02857-8.
- [7] Wu J, Yu L, Liu Y, et al. Hypoxia regulates adipose mesenchymal stem cells proliferation, migration, and nucleus pulposus-like differentiation by regulating endoplasmic reticulum stress *via* the HIF-1 α pathway[J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1):339. doi:10.1186/s13018-023-03818-1.
- [8] Bidkhori H R, Bahrami A R, Farshchian M, et al. Mesenchymal stem/stromal cells overexpressing CXCR4(R334X) revealed enhanced migration: a lesson learned from the pathogenesis of WHIM syndrome[J]. *Cell Transplant*, 2021, 30: 09636897211054498. doi:10.1177/09636897211054498.
- [9] Garcia J P, Avila F R, Torres R A, et al. Hypoxia-preconditioning of human adipose-derived stem cells enhances cellular proliferation and angiogenesis: a systematic review[J]. *J Clin Transl Res*, 2022, 8(1): 61-70.
- [10] Fan X, Wei H, Du J, et al. Hypoxic preconditioning neural stem cell transplantation promotes spinal cord injury in rats by affecting transmembrane immunoglobulin domain-containing[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2022, 41: 9603271211066587. doi:10.1177/09603271211066587.
- [11] Antebi B, Rodriguez L A 2nd, Walker K P 3rd, et al. Short-term physiological hypoxia potentiates the therapeutic function of mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 265. doi:10.1186/s13287-018-1007-x.
- [12] Dzhalilova D S, Makarova O V. The role of hypoxia-inducible factor in the mechanisms of aging[J]. *Biochemistry*, 2022, 87(9): 995-1014. doi:10.1134/S0006297922090115.
- [13] Li J, Deng T, Zhu S, et al. The SDF-1/CXCR4 axis is involved in adipose-derived stem cell migration[J]. *Neurourol Urodyn*, 2024, 43(8): 2279-89. doi:10.1002/nau.25571.
- [14] Zhang Y, Jin Y, Li J, et al. CXCL14 as a key regulator of neuronal development: insights from its receptor and multi-omics analysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(3): 1651. doi:10.3390/ijms25031651.

- [15] Wu X, Zhang H, Sui Z, et al. CXCR4 promotes the growth and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma as a critical downstream mediator of HIF-1 α [J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(3): 926-39. doi:10.1111/cas.15265.
- [16] Yin X, Xia K, Peng S, et al. ABCF1/CXCL12/CXCR4 enhances glioblastoma cell proliferation, migration, and invasion by activating the PI3K/AKT signal pathway[J]. *Dev Neurosci*, 2024, 46(3): 210-20. doi:10.1159/000533130.
- [17] Zang Y, Chaudhari K, Bashaw G J. New insights into the molecular mechanisms of axon guidance receptor regulation and signaling[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2021, 142: 147-96. doi:10.1016/bs.ctdb.2020.11.008.