

## ·基础研究·

# 高压氧对缺氧/复氧模型下大鼠骨髓间充质干细胞的影响及其相关机制\*

张慧<sup>1</sup> 陈银海<sup>2,3</sup> 李萌<sup>2</sup> 黄玉琴<sup>1</sup>

## 摘要

**目的:**探讨高压氧对缺氧/复氧模型下大鼠骨髓间充质干细胞的影响及其相关机制。

**方法:**选取3—4周龄SD雄性大鼠,采用全骨髓贴壁法培养至P<sub>3</sub>代,随机分为正常组A(细胞置于常规培养箱内培养)、缺氧/复氧组B(置于95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>密闭培养箱中培养9h,复氧6h)、缺氧/复氧+高压氧组C(90%O<sub>2</sub>,2.5ATA、90min)、缺氧/复氧+高压氧+YC-1组D,实验组其余时间处理和正常组相同。A、B、C、D组均于处理结束12h后行CCK-8比色法、流式细胞仪检测细胞存活率及凋亡率。Western blot检测HIF-1α、β-catenin、LEF-1蛋白表达水平。

**结果:**①与A组相比,缺氧/复氧后B、C、D组细胞存活率明显降低,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ ),给予高压氧后C组存活率比B组升高,D组存活率较C组降低( $P < 0.05$ )。②实验组B、C相比,C组中HIF-1α、β-catenin、LEF-1蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ )。③实验组C、D组相比,给予YC-1阻断剂后HIF-1α、β-catenin、LEF-1蛋白表达减少( $P < 0.05$ )。

**结论:**高压氧能够提高缺氧环境下骨髓间充质干细胞存活率,其机制可能与调控HIF-1α介导的Wnt通路有关。

**关键词** 高压氧;缺氧/复氧;骨髓间充质干细胞

**中图分类号:**R459.6, R744   **文献标识码:**A   **文章编号:**1001-1242(2017)-02-0167-07

**Effect of hyperbaric oxygen on the bone marrow mesenchymal stem cells against hypoxia/reoxygenation induced injury/ZHANG Hui, CHEN Yinhai, LI Meng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(2): 167—173**

## Abstract

**Objective:** To investigate whether hyperbaric oxygen could protect the bone marrow mesenchymal stem cells against apoptosis after hypoxia/reoxygenation induced injury.

**Method:** MSCs were generated from the bone marrow of adult male SD rats aged 3—4 weeks, they were randomly divided into control group A (cells were cultured in a normoxia), hypoxia/reoxygenation group B (cells were treated with 95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> for 9h, followed by 12h of reoxygenation), hypoxia/reoxygenation + hyperbaric oxygen group C (90% O<sub>2</sub>, 2.5ATA, 90min), hypoxia/reoxygenation + hyperbaric oxygen + YC-1 group D. Besides, the experimental group were treated the same as the normal group. 12 hours after treatment, the rate of cell survival and apoptosis in different groups was estimated by CCK-8 and flow cytometry analysis. HIF-1α, β-catenin, LEF-1 were detected by Western blotting.

**Result:** ① Compared with group A, the rate of cell survival in group B, C, D were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while administration of hyperbaric oxygen, the survival in group C was higher than group B and this could be reversed by YC-1 in group D ( $P < 0.05$ ). ② As compared to group B, the expression of HIF-1α, β-catenin, LEF-1 were increased in group C ( $P < 0.05$ ). ③ Compared to group C, YC-1 in group D could re-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.02.008

\*基金项目:广东省科技计划项目(2010B080701020)

1 南方医科大学第二临床医学院,广州,510515;2 南方医科大学珠江医院高压氧科;3 通讯作者

作者简介:张慧,女,硕士研究生,住院医师;收稿日期:2015-11-14

duce HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin, LEF-1 ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Hyperbaric oxygen produces protective effects on survival of BMSCs against hypoxia/reoxygenation injury and possibly mediated by HIF-1 $\alpha$  in Wnt pathway.

**Author's address** Zhujiang Hospital of Southern Medical University, 510282

**Key word** hyperbaric oxygen; hypoxia/reoxygenation; bone marrow mesenchymal stem cells

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是中枢神经系统严重创伤性疾病,其致残率及病死率均较高<sup>[1]</sup>。导致部分或完全运动神经、感觉神经缺失,给患者的生活造成巨大的影响<sup>[2]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)具有高度的自我复制能力和多向分化潜能,在一定的诱导条件下可跨胚层分化为神经细胞<sup>[3]</sup>,从而替代受损的神经功能,能促进髓鞘再生、分泌神经营养因子,调控炎症反应,减轻继发性损伤对原位神经元的毒害性<sup>[4]</sup>。然而,大量研究表明,骨髓间充质干细胞移植到缺血灶后,存活率仅有2%<sup>[5]</sup>,这不仅仅与干细胞移植方式相关<sup>[6]</sup>,还与脊髓损伤后微环境的改变有关,包括炎症反应,谷氨酸盐毒性作用、钙超载、氧自由基等<sup>[7-8]</sup>,阻碍了干细胞在脊髓损伤中的神经修复能力。研究发现,高压氧能够改善脊髓损伤患者的预后<sup>[9]</sup>,联合高压氧治疗的干细胞移植可改善神经缺损症状<sup>[10]</sup>,本实验通过模拟体内缺血再灌注损伤环境,探讨高压氧对骨髓间充质干细胞的保护机制,为细胞治疗学的发展提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验在南方医科大学珠江医院检验科实验中心完成。选取3—4周龄SD雄性大鼠5只,由广东省动物中心提供,所有动物处理均符合实验动物伦理学。

实验试剂:PBS(Hyclone)、DMEM低糖培养基(Gibco)、胎牛血清(Hyclone)、胰酶(Gibco)、青链霉素(Gibco)、CCK-8(日本同仁)、蛋白提取试剂盒(凯基)、核蛋白提取试剂盒(康为)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(凯基)、兔抗HIF-1 $\alpha$ 抗体(Millipore)、小鼠抗 $\beta$ -catenin抗体(Thermo fisher)、兔抗LEF-1抗体(Thermo fisher)、ECL显影试剂盒(Millipore)、YC-1(Sigma)、Annexin-V-FITC/PIz凋亡检测试剂盒(Bender Medsystems公司)。

实验仪器:生物安全柜(Thermo)、流式细胞仪(HV-85)、酶标仪(ELX808)、化学发光仪(BIORAD)、细胞培养箱(Thermo)、成人高压氧舱(宁波高压氧舱总厂)、自制密闭缺氧盒。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 大鼠骨髓间充质干细胞培养及鉴定:**参考相关文献<sup>[11]</sup>,选取3—4周龄SD雄性大鼠,腹腔注射含10%水合氯醛麻醉后,置于75%乙醇中浸泡10min,无菌条件下取双侧股骨、胫骨,仔细剔除肌肉组织,放置在含10%完全培养基(含10%胎牛血清、1%青链霉素)的离心管中,转移至超净台。PBS反复冲洗3遍后,剪去干骺端,用7号针头注射器吸取完全培养基从一侧干骺端冲洗骨髓至15ml离心管中,直至骨髓腔发白。1000rpm,5min离心,弃上清,完全培养基重悬细胞。种瓶,置于37℃、含5%CO<sub>2</sub>绝对湿度培养箱中培养,48h后换液清除未贴壁细胞,以后3天换液。待贴壁细胞密度达到80%融合度时,用含EDTA的0.25%胰酶消化,以1:2传代培养。选取P<sub>3</sub>—P<sub>5</sub>代BMSCs,加入抗大鼠CD29、CD90、CD45抗体,使用FASCCulibur流式细胞仪鉴定细胞表型<sup>[12]</sup>。

**1.2.2 分组:**将P<sub>3</sub>—P<sub>5</sub>细胞随机分成四组:正常对照组、缺氧/复氧组、缺氧/复氧+高压氧组、缺氧/复氧+高压氧+YC-1组。高压氧处理同时将非高压氧组置于同温度、湿度的高压氧舱中保持组间平衡。缺氧/复氧+高压氧+YC-1组的YC-1调整浓度至100μM并于高压氧处理前1h给予。

**1.2.3 缺氧/复氧模型的制备:**综合相关文献<sup>[13-14]</sup>,拟定以下造模方案:收集细胞,制成5×10<sup>4</sup>/ml细胞悬液,种植在96孔板中,设置4个复孔,每孔100μl培养基,随机分成以上4组。正常培养24h后缺氧/复氧组、缺氧/复氧+高压氧组、缺氧/复氧+高压氧+YC-1组倒去完全培养基,无菌PBS冲洗1遍,更换为不含血清的L-DMEM培养,置于95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中,培养9h后取出细胞,更换为完全培养基,复氧6h。正常对照组同时更换为完全培养基并置

于37℃、含5%CO<sub>2</sub>绝对湿度培养箱中培养。

**1.2.4 高压氧参数设置:**缺氧/复氧+高压氧组、缺氧/复氧+高压氧+YC-1组均于复氧6h结束后给予高压氧处理,具体方案如下:将96孔板置于氧气加压舱中,以纯氧洗舱10min,关闭舱门,然后在25min内升压至0.25MPa,维持50min。稳压期间舱内平均氧浓度不得低于90%。随之在25min之内将舱内压力恢复至正常气压,总共100min。1次/12h,连续治疗2天。高压氧处理同时将非高压氧处理的实验组置于相同氧舱中100min,以保持组间平衡。

**1.2.5 CCK-8比色法检测细胞存活率:**给予高压氧或非高压氧处理后12h,向复孔中加入10μl CCK-8溶液,充分混匀后放入37℃培养箱中孵育1h,用酶标仪450nm波长测定各组吸光度,同时设置空白对照组,按公式计算各组存活率,实验重复3次。

**1.2.6 流式细胞仪检测凋亡:**以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 将细胞种植于60mm培养皿中,给予不同处理后吸取上清液至离心管,贴壁细胞用PBS洗涤,胰酶消化后将细胞转入相应离心管,1000rpm/min离心5min,收集细胞。PBS洗涤2次后加入400μl Annexin V结合液悬浮细胞,再加入5μl Annexin V-FITC染色液,4℃避光孵育15min,再加入10μl PI染色液4℃孵育5min,上流式细胞仪检测,采用Cell Quest软件进行结果分析。

**1.2.7 Western blot:**参考说明书,各组给予不同处理结束后12h,向60mm培养皿中加入预冷裂解缓冲液200μl,冰上摇床30min。收集细胞,离心(4℃,12000rpm,10min)后取上清,BCA试剂盒测量总蛋白浓度并调整至同一水平。行聚丙烯酰胺凝胶电泳(每孔加样20μl)、转膜、5%脱脂奶粉封闭2h,分别加入兔抗HIF-1α抗体(1:2000)、小鼠抗β-catenin抗体(1:1000)、兔抗LEF-1抗体(1:1000),4℃孵育过夜。TBST脱色摇床上清洗3遍,分别加入相应标记辣根过氧化物酶二抗孵育1h,TBST清洗2遍,加入ECL显影液,上机检测。扫描图像后用Quantity One软件分析各条带灰度值。以β-actin作为内参,以Histone H3作为核蛋白内参进行标准对照。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行统计学处理,所有数据均以均数±标准差表示,多组均数的比较采用单

因素方差分析,进一步两两比较采用LSD检验。

## 2 结果

### 2.1 大鼠骨髓间充质干细胞培养及鉴定

**2.1.1 培养:**骨髓间充质细胞种植在25cm<sup>2</sup>培养瓶48h后,弃上清,去除混杂及未贴壁细胞后,加入等量培养液,倒置显微镜下观察细胞形态,可见呈圆形的折光性强的胞体,伸出2—3个不等的突起,部分形成细胞集落,待7天贴壁细胞克隆增殖后,镜下可见细胞多趋向于成纤维样细胞形态,胞质丰富,细胞呈平行排列生长或旋涡状生长,约7—10d可达到80%融合度,此时以1:2消化传代。

**2.1.2 鉴定:**流式细胞仪检测结果显示P3骨髓间充质干细胞CD29、CD90阳性率分别为(99.37±0.67)%和(99.61±1.21)%,不表达造血干细胞特异性标记CD45,其阳性率为(0.93±1.08)%。

### 2.2 各组吸光值的比较

**2.2.1 不同缺氧/复氧时间后骨髓间充质干细胞存活率比较:**与正常组相比,缺氧/复氧3h后骨髓间充质干细胞存活率89.33%±1.97%下降,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ );6h细胞存活率85.20%±1.80%较3h时下降,但无显著性差异( $P > 0.05$ );随着缺氧时间的延长,细胞发生凋亡明显,存活率逐渐下降,至缺氧9h时,细胞存活率为65.13%±2.74%,所有缺氧组与正常组相比,差异均具有显著性意义( $P < 0.05$ ) (图1A)。选取缺氧9h,复氧6h作为后续实验的缺氧/复氧条件。

**2.2.2 CCK-8检测各组存活率比较:**与正常组相比,缺氧/复氧处理后骨髓间充质干细胞存活率明显下降( $P < 0.05$ )。高压氧处理组细胞存活率80.13%±0.99%较缺氧/复氧组68.61%±1.10%增高( $P < 0.05$ );为进一步探讨高压氧对缺氧/复氧环境下骨髓间充质干细胞的保护机制,高压氧处理前1h给予YC-1(100μM),可见细胞存活率70.04%±1.88%较高压氧组下降( $P < 0.05$ ) (图1B)。

**2.2.3 流式细胞仪检测各组凋亡率比较:**与正常组相比,缺氧/复氧处理后各组骨髓间充质干细胞凋亡率明显增加10.04%±1.35% Vs 24.55%±2.10%,差异具有显著性意义(见图2);给予高压氧处理后,凋亡率较缺氧/复氧组有所下降14.33%±0.74%,( $P <$

0.05);给予阻断剂组凋亡率再次升高 $21.72\% \pm 1.78\%$ ,差异具有显著性意义,这说明高压氧能够对缺氧/复氧模型中大鼠骨髓间充质干细胞发挥抗凋亡作用,该作用可能与HIF-1 $\alpha$ 有关。

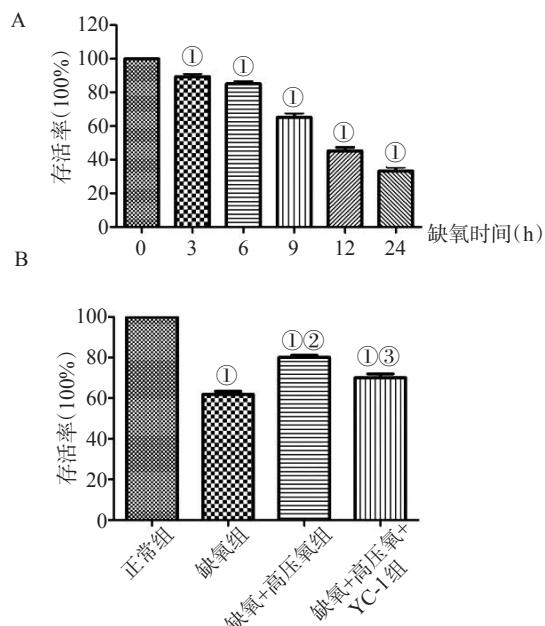
### 2.3 Western blot结果

为进一步证明HIF-1 $\alpha$ 是否参与高压氧抗凋亡作用中的机制,采用蛋白免疫印迹方法发现,与正常组相比,缺氧/复氧后HIF-1 $\alpha$ 升高,但差异无显著性意义( $P > 0.05$ )(图3);与缺氧/复氧组相比,高压氧处理后HIF-1 $\alpha$ 增加( $P < 0.05$ ),给予HIF-1 $\alpha$ 阻断剂YC-1,HIF-1 $\alpha$ 表达量较高压氧组有所下降;缺氧/复氧后给予高压氧处理可增加 $\beta$ -catenin、LEF-1蛋白表达( $P < 0.05$ ),给予阻断剂YC-1后上述蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ )(图4),这说明高压氧可通过诱导HIF-1 $\alpha$ 增加 $\beta$ -catenin、LEF-1蛋白表达,且能够促进 $\beta$ -catenin进入胞核中,从而诱导靶基因的表达。

## 3 讨论

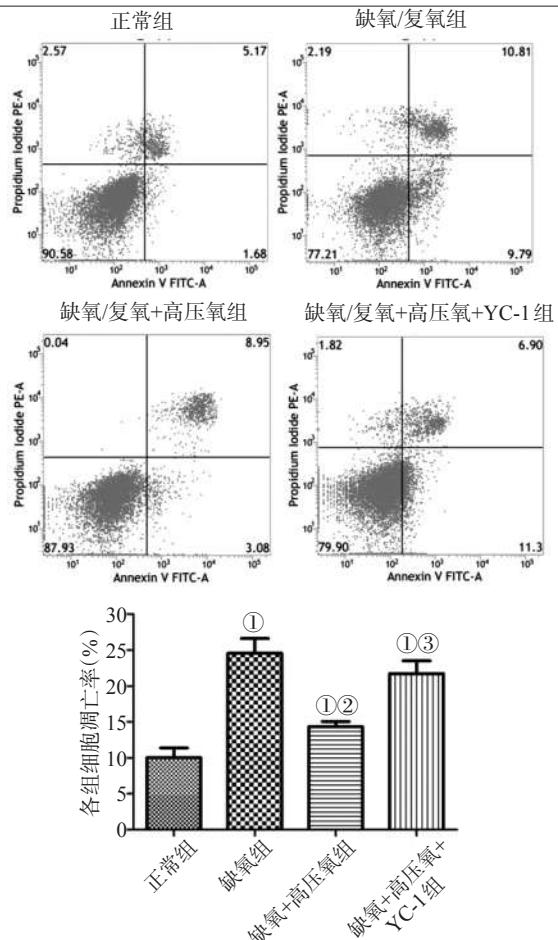
骨髓间充质干细胞移植能够明显改善脊髓损伤患者的预后<sup>[10]</sup>。它通过识别炎症区域的趋化因子到达损伤部位,调控炎症反应、分泌营养因子、修复濒

图1 CCK-8检测各组骨髓间充质干细胞存活率比较



①与正常组相比( $0\text{h}$ ) $P < 0.05$ ;②与缺氧组相比( $P < 0.05$ );③与缺氧+高压氧组相比( $P < 0.05$ )

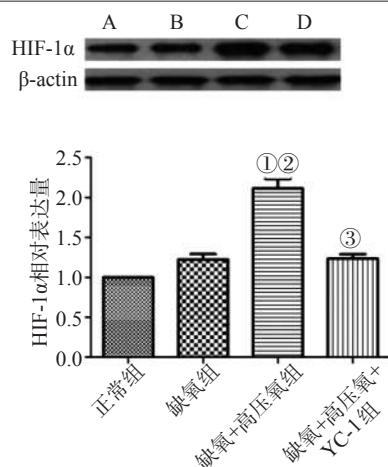
图2 流式细胞仪检测各组骨髓间充质干细胞凋亡率比较



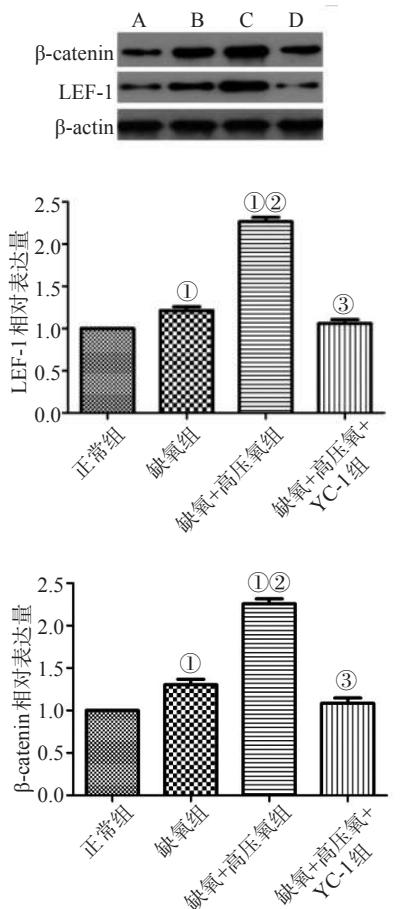
①与正常组相比( $P < 0.05$ );②与缺氧组相比( $P < 0.05$ );③与缺氧+高压氧组相比( $P < 0.05$ )

死细胞等,具有强大的修复作用。然而,由于炎症区域的缺血缺氧环境,使得骨髓间充质干细胞的存活率明显减少,大量学者针对提高骨髓间充质干细胞存活率做了一系列的研究报道,其中包括缺氧预适应<sup>[15]</sup>、七氟烷预处理<sup>[16]</sup>、高压氧预处理等<sup>[17]</sup>。高压氧治疗是国内外较为推崇的一种方法,对脊髓损伤的神经功能恢复有明显的促进作用<sup>[18-21]</sup>。本课题通过模拟脊髓内缺血再灌注损伤微环境,制备缺氧/复氧模型诱导骨髓间充质干细胞凋亡,追溯凋亡发生后高压氧对骨髓间充质干细胞的保护机制,更具有长远的临床意义。

本研究发现,缺氧/复氧环境中骨髓间充质干细胞发生明显凋亡,且随着缺氧时间的延长而加重;给

图3 各组HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达量的比较

①与正常组相比( $P < 0.05$ );②与缺氧组相比( $P < 0.05$ );③与缺氧+高压氧组相比( $P < 0.05$ )

图4 各组 $\beta$ -catenin、LEF-1蛋白表达量

①与正常组相比( $P < 0.05$ );②与缺氧组相比( $P < 0.05$ );③与缺氧+高压氧组相比( $P < 0.05$ )

予高压氧处理后存活率明显升高,这说明高压氧能够对缺氧/复氧环境中骨髓间充质干细胞发挥抗凋亡能力。为进一步研究其机制,我们给予阻断剂YC-1(3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole)后发现细胞凋亡率增加,表明高压氧可能通过缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 $\alpha$ 发挥其保护作用。HIF-1 $\alpha$ 普遍存在于人和哺乳动物细胞内,常氧下(21%O<sub>2</sub>)也有表达,但合成的HIF-1 $\alpha$ 蛋白半衰期不到5min,很快被细胞内氧依赖性泛素蛋白酶降解途径所降解,只有在低氧情况下才能稳定存在。在该研究中,我们发现缺氧/复氧组HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平和正常对照组并无显著性差异,这可能是复氧后HIF-1 $\alpha$ 的不稳定性造成的。而给予高压氧处理后,HIF-1 $\alpha$ 表达明显增高,推测与高压氧能够激活活性氧(reactive oxygen species, ROS)<sup>[22]</sup>,诱导HIF-1 $\alpha$ 的表达。高压氧调控HIF-1 $\alpha$ 表达已有文献报道<sup>[23]</sup>。高压氧预处理后HIF-1 $\alpha$ 表达增高,神经元对缺氧环境的耐受力明显增强<sup>[24]</sup>。吴婉芳等<sup>[25]</sup>也发现,高表达HIF-1 $\alpha$ 的神经干细胞在缺血灶中的存活数明显比对照组高。HIF-1 $\alpha$ 可启动下游靶基因促红细胞生成素(erythropoietin)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor)的表达<sup>[26]</sup>,增加局部红细胞携氧量,促进毛细血管再生,从而发挥其保护作用。

曾有文献指出短暂缺氧后的HIF-1 $\alpha$  mRNA比正常组明显升高,可引起 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)向细胞核转录活性的升高,调控干细胞的增殖与分化<sup>[27]</sup>。当HIF-1 $\alpha$ 表达无明显差异时Wnt通路成员蛋白表达量无显著性差异<sup>[27]</sup>,这进一步说明HIF-1 $\alpha$ 的稳定表达能够激活Wnt通路开放。 $\beta$ -catenin作为Wnt通路中的核心成员,其主要存在于细胞膜中。当信号通路被激活时,它可在胞质中稳定存在并进入细胞核内,诱导与淋巴增强因子-1(lymphoid enhancer factor-1)之间相互作用,启动特定基因,如细胞周期蛋白D1(cyclin D1)等下游靶基因转录和翻译,参与细胞的增殖、分化、凋亡等方面的调控<sup>[28]</sup>。在该实验中我们发现,虽然HIF-1 $\alpha$ 在正常对照组、缺氧/复氧组中无显著性差异,但与正常组相比,缺氧/复氧后 $\beta$ -catenin有所增加,这可能与PI3K/Akt通路影响GSK-3 $\beta$ 活性有关<sup>[29]</sup>。高压氧处理组 $\beta$ -catenin明显

增加,而给予阻断剂干扰HIF-1 $\alpha$ 生成后, $\beta$ -catenin明显降低,且细胞核中表达量也降低,淋巴增强结合因子(lymphoid enhancer-binding factor-1, LEF-1)表达下降,细胞凋亡率增高,这说明HIF-1 $\alpha$ 可能介导Wnt通路成员的表达。但HIF-1 $\alpha$ 究竟如何调控 $\beta$ -catenin,不同的研究给出不同的结论,有研究认为HIF-1 $\alpha$ 增强 $\beta$ -catenin、LEF-1和T细胞因子-1(T cell factor-1, TCF-1)的表达,促进 $\beta$ -catenin-LEF/TCF相互结合作用<sup>[30]</sup>。然而,也有研究认为HIF-1 $\alpha$ 通过与TCF-4竞争性结合 $\beta$ -catenin,可促进 $\beta$ -catenin在细胞核的转录活动<sup>[31-32]</sup>。高压氧诱导HIF-1 $\alpha$ 高表达是如何影响 $\beta$ -catenin转录活动仍需要进一步的研究。

高压氧作为临幊上一种非侵入式物理治疗手段,在神经系统中的应用已得到广泛认可。大量文献表明高压氧能够减轻炎症反应,抑制凋亡家族中Cas-pase-3,减轻组织水肿,增加局部氧浓度,促进神经组织及血管再生,从而改善脊髓损伤患者预后<sup>[9,18,33-34]</sup>。但由于疾病的复杂性及治疗方案的多样性,高压氧在临幊上的应用矛盾未得到解决<sup>[35]</sup>。有文献报道早期高压氧介入后神经缺损症状的改善伴随着HIF-1 $\alpha$ 表达降低,从而阻断HIF-1 $\alpha$ 对组织的损伤<sup>[36-37]</sup>;而晚期高压氧介入通过增加HIF-1 $\alpha$ 发挥神经修复作用<sup>[38]</sup>,这可能与HIF-1 $\alpha$ 激活不同的通路有关<sup>[39]</sup>;除此之外,不同压力治疗方案对疾病的预后也不相同<sup>[40]</sup>,这说明高压氧的介入时间、介入次数、治疗时程等都会影响其作用。综合上述治疗方案,考虑缺氧/复氧对骨髓间充质干细胞造成的损伤,且细胞失去体内环境中其他因素的支持,我们拟定在复氧6h后给予高压氧介入,且每12h给予1次共2天高压氧处理,结果发现相比无高压氧介入组,骨髓间充质干细胞的存活率增高,但该实验仅仅建立在体外模型中,仍需进一步的体内实验研究以验证。

综上所述,高压氧治疗对缺氧/复氧模型中的骨髓间充质干细胞有保护作用,其机制可能与调控HIF-1 $\alpha$ 介导的Wnt通路有关。

## 参考文献

- [1] Ku JH. The management of neurogenic bladder and quality of life in spinal cord injury[J]. BJU Int, 2006, 98(4):739—745.
- [2] Beck KD, Nguyen HX, Galvan MD, et al. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment[J]. Brain, 2010, 133(Pt 2): 433—447.
- [3] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4):364—370.
- [4] Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23 (7):862—871.
- [5] Müller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, et al. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 41(5): 876—884.
- [6] Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(1):54—63.
- [7] Okada S, Ishii K, Yamane J, et al. In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury[J]. FASEB J, 2005, 19(13):1839—1841.
- [8] Emgård M, Hallin U, Karlsson J, et al. Both apoptosis and necrosis occur early after intracerebral grafting of ventral mesencephalic tissue: a role for protease activation[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62(5):1223—1232.
- [9] Huang H, Xue L, Zhang X, et al. Hyperbaric oxygen therapy provides neuroprotection following spinal cord injury in a rat model[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(7):1337—1342.
- [10] Geng CK, Cao HH, Ying X, et al. Effect of mesenchymal stem cells transplantation combining with hyperbaric oxygen therapy on rehabilitation of rat spinal cord injury[J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(6):468—473.
- [11] Liu J, Hao H, Xia L, et al. Hypoxia pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cells facilitates angiogenesis by improving the function of endothelial cells in diabetic rats with lower ischemia[J]. PLoS One, 2015, 10(5):e126715.
- [12] Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells[J]. Stem Cells Int, 2012, (2012):1—12.
- [13] Zhu W, Chen J, Cong X, et al. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2006, 24(2):416—425.
- [14] Chen TL, Zhu GL, Wang JA, et al. Apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells caused by hypoxia/reoxygenation

- genation via multiple pathways[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(12):4686—4697.
- [15] 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.
- [16] Sun X, Fang B, Zhao X, et al. Preconditioning of mesenchymal stem cells by sevoflurane to improve their therapeutic potential[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3):e90667.
- [17] 曾毅,白晓光,董海龙,等.重复高压氧预处理对氧糖剥夺神经元保护作用的研究[J].中华神经外科疾病研究杂志,2011,10(6):508—511.
- [18] Yaman O, Yaman B, Aydin F, et al. Hyperbaric oxygen treatment in the experimental spinal cord injury model[J]. *Spine J*, 2014, 14(9):2184—2194.
- [19] Long Y, Liang F, Gao C, et al. Hyperbaric oxygen therapy reduces apoptosis after spinal cord injury in rats[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(11):4073—4081.
- [20] Nie H, Xiong L, Lao N, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(5):666—674.
- [21] Lu PG, Hu SL, Hu R, et al. Functional recovery in rat spinal cord injury induced by hyperbaric oxygen preconditioning[J]. *Neurol Res*, 2012, 34(10):944—951.
- [22] Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2009, 106(3):988—995.
- [23] Salhanick SD, Belikoff B, Orlow D, et al. Hyperbaric oxygen reduces acetaminophen toxicity and increases HIF-1alpha expression[J]. *Acad Emerg Med*, 2006, 13(7):707—714.
- [24] Peng Z, Ren P, Kang Z, et al. Up-regulated HIF-1alpha is involved in the hypoxic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning[J]. *Brain Research*, 2008, (1212):71—78.
- [25] Wu W, Chen X, Hu C, et al. Transplantation of neural stem cells expressing hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) improves behavioral recovery in a rat stroke model [J]. *J Clin Neurosci*, 2010, 17(1):92—95.
- [26] Acker T, Acker H. Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications[J]. *J Exp Biol*, 2004, 207(Pt 18):3171—3188.
- [27] Medley TL, Furtado M, Lam NT, et al. Effect of oxygen on cardiac differentiation in mouse iPS cells: role of hypoxia inducible factor- 1 and Wnt/beta- catenin signaling[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e80280.
- [28] Clevers H, Nusse R. Wnt/beta- catenin signaling and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(6):1192—1205.
- [29] Tiwari SK, Seth B, Agarwal S, et al. Ethosuximide Induces Hippocampal Neurogenesis and Reverses Cognitive Deficits in an Amyloid- $\beta$  Toxin-induced Alzheimer Rat Model via the Phosphatidylinositol 3- Kinase (PI3K)/Akt/Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(47):28540—28558.
- [30] Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, et al. O<sub>2</sub> regulates stem cells through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(10):1007—1013.
- [31] Kaidi A, Williams AC, Paraskeva C. Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(2):210—217.
- [32] Lehwald N, Tao GZ, Jang KY, et al. Wnt- $\beta$ -catenin signaling protects against hepatic ischemia and reperfusion injury in mice[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(2):707—718.
- [33] Wang L, Li W, Kang Z, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after spinal cord ischemia in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(1):55—66.
- [34] 陈晓明,张志强.高压氧治疗缺血性脑血管病机制的研究进展 [J].中国康复医学杂志,2008,(08):766—768.
- [35] Cristante AF, Damasceno ML, Barros Filho TE, et al. Evaluation of the effects of hyperbaric oxygen therapy for spinal cord lesion in correlation with the moment of intervention[J]. *Spinal Cord*, 2012, 50(7):502—506.
- [36] Huang ZX, Kang ZM, Gu GJ, et al. Therapeutic effects of hyperbaric oxygen in a rat model of endothelin-1-induced focal cerebral ischemia[J]. *Brain Research*, 2007, (1153):204—213.
- [37] Zhou Y, Liu XH, Qu SD, et al. Hyperbaric oxygen intervention on expression of hypoxia-inducible factor- 1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor in spinal cord injury models in rats[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(20):3897—3903.
- [38] Hu Q, Liang X, Chen D, et al. Delayed hyperbaric oxygen therapy promotes neurogenesis through reactive oxygen species/hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ / $\beta$ -catenin pathway in middle cerebral artery occlusion rats[J]. *Stroke*, 2014, 45(6):1807—1814.
- [39] Li Y, Zhou C, Calvert JW, et al. Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model[J]. *Exp Neurol*, 2005, 191(1):198—210.
- [40] 曾晓鹏,牟君,曾令琼.不同压力高压氧促进大脑中动脉闭塞大鼠梗死周边区细胞增殖的研究[J].重庆医学,2014,(28):3697—3699.