

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.08.005

缺氧预处理对神经干细胞间隙连接蛋白的表达及半通道功能的影响*

马伟康 刘庆鹏 刘 凯 张 雷 王立春 韩 竹 刘 亮 李 琛 孙崇毅[△]

(哈尔滨医科大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的:检测缺氧预处理对神经干细胞间隙连接蛋白的表达情况及半通道功能的影响,为探究缺氧预处理后神经干细胞间细胞通讯提供理论依据。**方法:**采用免疫组织化学方法检测对照组及缺氧预处理 1 小时组、缺氧预处理 4 小时组、缺氧预处理 8 小时组、缺氧预处理 12 小时组神经干细胞中 cx43、cx36、cx47 的表达情况。通过激光共聚焦激光扫描显微镜测量钙黄绿素滤过情况以评估半通道功能的变化。**结果:**与对照组($1.03 \pm 0.14\%$)比较,在 0.5% 氧气条件下暴露 8 小时($3.05 \pm 0.40\%$)和 12 小时($5.51 \pm 0.31\%$)的神经干细胞坏死率较显著升高($P < 0.05$)。与对照组相比,缺氧预处理 4、8、12 小时组神经干细胞中 cx43、cx36、cx47 的表达显著增加,且随着缺氧预处理时间的延长而显著增加($P < 0.05$)。与对照组及加入半通道阻滞剂组相比,缺氧预处理组半通道滤过功能显著增强($P < 0.05$)。**结论:**缺氧预处理可以以时间依赖性方式提高神经干细胞间隙连接蛋白的表达和半通道滤过功能。神经干细胞暴露于低氧环境而不引起坏死显著增加的最佳时间为 4 小时。

关键词:缺氧预处理;神经干细胞;间隙连接蛋白;半通道

中图分类号:R-33;R331.2;R651 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)08-1420-05

Hypoxic Preconditioning Increases the Expression of Connexins and the Hemichannel Filtration Function*

MA Wei-kang, LIU Qing-peng, LIU Kai, ZHANG Lei, WANG Li-chun, HAN Zhu, LIU Liang, LI Chen, SUN Chong-yi[△]

(The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China)

ABSTRACT Objective: Determine the expression of gap junction protein and the changes of hemichannel function after hypoxia preconditioning of neural stem cells, which provided a theoretical basis for exploring the communication between neural stem cells after hypoxia preconditioning. Create a standardized preconditioning procedure and reproducibly expose the NSCs to hypoxia. Explore the best time for neural stem cells to be exposed to hypoxia without increasing necrosis. **Methods:** The expression of cx43, cx36, and cx47 in the neural stem cells of the control group and the hypoxia- preconditioned neurons were determined by immunohistochemical method at 1 h, 4 h, 8 h, and 12 h, respectively. The calcein dye efflux experiments was observed by laser confocal laser scanning microscopy to observe changes in hemichannell function. **Results:** Compared with the control group ($1.03 \pm 0.14\%$), the necrosis rate of neural stem cells in 8 hours ($3.05 \pm 0.40\%$) and 12 hours ($5.51 \pm 0.31\%$) exposed to 0.5% oxygen was significantly higher ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of cx43, Cx36 and Cx47 in neural stem cells increased significantly after hypoxic preconditioning for 4, 8 and 12 hours ($P < 0.05$). Hypoxia pretreatment group had significantly enhanced hemichannel filtration function compared with the control group and the hemichannel blocker group. **Conclusions:** Hypoxic preconditioning can improve the expression of connexin and the half-channel filtration function of neural stem cells in a time-dependent manner. The optimal time for neural stem cells to be exposed to hypoxia without causing significant increase in necrosis is 4 hours.

Key words: Hypoxic preconditioning; Neural stem cells; Connexins; Hemichannel

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; R651 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)08-1420-05

前言

神经干细胞移植在治疗许多不可逆性神经系统病变中拥有巨大的应用前景,移植的神经干细胞可替代受损并失去功能的神经元和胶质细胞,并建立细胞间通讯^[1]。然而,移植到宿主体内的神经干细胞普遍存活率不高,大大影响了疗效^[2]。文献报

道,神经干细胞移植的低存活率归因于细胞的失巢凋亡,潜在的免疫反应以及氧化应激造成的细胞凋亡^[3]。缺氧或者低氧环境可引起生理和病理性反应,就像一双把刃剑,一方面可以导致细胞损伤及死亡,另一方面,亚致死性缺氧可触发适应性反应称为低氧预适应或缺氧耐受性,对细胞和组织的存活至关重要。通常情况下,缺氧条件和细胞内 ROS 水平有助于维持大脑

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(H201419)

作者简介:马伟康(1991-),男,硕士研究生,主要研究方向:脊髓损伤修复,E-mail: 491938487@qq.com

[△] 通讯作者:孙崇毅(1972-),男,硕士研究生导师,教授,主要研究方向:脊髓损伤修复,E-mail: 2238893@qq.com,电话:15204600666

(收稿日期:2019-09-07 接受日期:2019-09-30)

中的神经干细胞增殖和自我更新^[4,5]。细胞间通讯的基础是细胞间连接,而细胞连接是间隙连接蛋白形成的两个半通道(连接子)构成。而单独的连接子又是六个间隙连接蛋白行成的共聚物,可以连接细胞间 2-4 nm 的间隙,允许相邻细胞细胞质间快速直接的信号交换,并提供最多 1kDa 分子交换的细胞内通道。根据连接蛋白质量命名为 cx43、cx36、cx47 等(例如连接蛋白质量为 43kDa,命名为 cx43)。研究表明缺氧组织中,间隙连接发挥了重要的神经保护作用,可能与它介导神经保护性分子通过有关^[6]。本研究通过研究缺氧预处理后神经干细胞间隙连接蛋白的表达及半通道功能的变化,旨在为缺血缺氧组织神经保护机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 神经干细胞 鼠类神经干细胞系 C17.2 购自上海雅吉生物。细胞为贴壁生长,培养箱中培养,培养环境是 37℃,5% CO₂,湿度 100%。细胞培养至密度达 80%以上时传代培养。

1.1.2 主要试剂 83%的改良杜氏伊格尔培养基、0.11 g/L 的丙酮酸盐、吡哆醇、5%的马血清、1%200 mM 的 L- 谷氨酰胺和 1%的青霉素 / 链霉素 / 夫西地酸溶液,cx43、cx36、cx47 蛋白特异性抗体(1:60),Alexa 546 二抗购自美国 Invitrogen 公司,10%胎牛血清,Hanks 平衡盐溶液,钙黄绿素 AM (Mw=995 Da),100 mM 甘珀酸(Carbenoxolone (CBX))购自美国 sigma 公司,防荧光淬灭封片剂(DAPI Vectashield)购自美国 vector 公司。

1.1.3 主要设备仪器 卡尔蔡司 LSM 510 SYSTEM 共焦激光扫描显微镜购自德国 Carl Zeiss 公司,Leica DM IRBE 激光共聚焦激光扫描显微镜购于德国 Leica Microsystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 神经干细胞的扩增与维持 小鼠神经干细胞系 C17.2 建模。这种干细胞克隆来源于 P4 小鼠小脑和逆转录病毒转染干细胞基因 myc 并可以一直保持多向分化潜能和自我更新。将干细胞培养基添加到聚-L- 赖氨酸包被的载玻片上来培养神经干细胞。干细胞培养基中含有改良杜氏伊格尔培养基、丙酮酸盐、吡哆醇、胎牛血清、马血清、L- 谷氨酰胺和青霉素 / 链霉素 / 夫西地酸。细胞培养物在 37℃ 的标准培养箱中,培养环境的空气中含有 5% 的二氧化碳。

1.2.2 缺氧预处理及实验分组 缺为了建立缺氧预处理的标准化处理流程,重复进行神经干细胞缺氧预处理,实验组的细胞培养被转移到一个定制的 3L 密封容器中,容器中含有 0.5% 的氧,5% 的二氧化碳,和 94.5% 氮气。加热到 37℃,置于恒温箱中。对照组细胞也置于恒温箱中,但位于密闭容器之外,未行缺氧预处理。根据缺氧预处理时间 1h,4h,8h,12h。将神经干细胞分为 4 个实验组。

1.2.3 免疫组织化学 应用免疫组化方法对各组神经干细胞 cx43、cx36、cx47 进行测定。用 PBS(0.1M)溶液冲洗两次,然后用 4%多聚甲醛固定 10 min。用 5%的脱脂奶粉在 0.1 M PBS 溶液中封闭 30 min。单克隆使用 cx43、cx36、cx47 蛋白特异性抗体。载玻片与原代培养抗体在潮湿的房间里过夜。通过 Alexa 546 二抗完成荧光染色并在显微镜下观察。所有抗体用 0.1 M PBS 溶液稀释。载玻片最终被安装在防荧光淬灭封片剂中。使

用共聚焦显微镜及随后的三维重建来分析各个连接蛋白的表达以及定位。采用卡尔蔡司 LSM 510 SYSTEM 共焦激光扫描显微镜扫描,并拍摄图像。单个细胞中 cx43、cx36、cx47 聚集体的数量使用基于 Otsu 阈值和 ImageJ 中的 Watershed 分离程序的自定义宏自动计数。

1.2.4 半通道功能的测定 半通道功能通过钙黄绿素滤过试验测试。为了阻断半通道开放,对照组神经干细胞在钙黄绿素染料加载后加入 100 mM 甘珀酸(CBX)至少 10 分钟后再进行钙黄绿素染料滤过试验,为 CBX 组。将经过钙黄绿素滤过试验的神经干细胞分对照组,缺氧预处理 4 h 组及 CBX 组。用 Hanks 平衡盐溶液清洗两次,然后负载可进入间隙的 150 mM 的间隙连接的渗透染料钙黄绿素,染液预先在室温下用 HBSS 溶液溶解 15 min。在该实验中,使用 488 nm 的氩离子激光束来激发钙黄绿素染料发射荧光。荧光采集装置是 Leica DM IRBE 激光共聚焦激光扫描显微镜。图像每 10s 采集一次,持续采 30 min,成像期间,神经干细胞一直保存在 37℃ 细胞培养液中。记录各组神经干细胞内钙黄绿素荧光强度变化百分比表示为 FX / F0 (FX 代表 X 分钟的荧光强度,F0 代表初始时荧光强度)。

1.3 统计学分析

数据以平均值± SEM 表示,通过方差分析和 Bonferroni 测试来确定具有相同方差的组之间的统计学差异。方差由 Brown-Forsythe 检验确定,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。数据均采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 不同时间缺氧预处理的神经干细胞坏死率比较

与对照组(坏死率 $1.03 \pm 0.14\%$)比较,在 0.5% 氧气条件下暴露 1 小时 (坏死率 $1.12 \pm 0.12\%$)、4 小时 (坏死率 $1.05 \pm 0.15\%$) 的神经干细胞坏死率差异无统计学意义(分别为 $P=0.7$ 和 0.6)。在这些组中,约 1% 的神经干细胞呈 PI 染色阳性。然而,暴露于缺氧 8 小时 ($3.05 \pm 0.40\%$) 和 12 小时 (坏死率 $5.51 \pm 0.31\%$) 的神经干细胞坏死率较对照组显著升高($P < 0.05$),见图 1。

2.2 不同时间缺氧预处理的神经干细胞间隙连接蛋白表达的比较

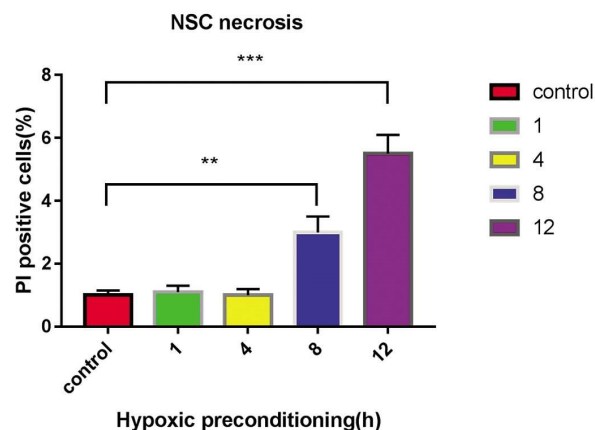


图 1 不同时间缺氧预处理的神经干细胞坏死率比较

Fig.1 Comparison of the PI positive cells of NSCs among different groups treated by hypoxia pretreatment for different time

免疫组化结果显示缺氧预处理后 cx43、cx36、cx47 表达均随着时间的增加而增加。在 cx43 表达中,对照组、1h 组、4h 组、8h 组及 12h 组的 cx43 聚集体数量分别为 (60.35 ± 5.15) 个, (55.22 ± 7.34) 个, (90.32 ± 8.13) 个, (124.85 ± 7.38) 个, (135.36 ± 10.08) 个。在 cx36 表达中,对照组、1h 组、4h 组、8h 组及 12h 组的 cx36 聚集体数量分别为 (30.10 ± 5.03) 个, (31.22 ± 5.34) 个, (46.32 ± 7.23) 个, (54.25 ± 6.18) 个, (60.85 ± 3.48) 个。在 cx47 表达中,对照组、1h 组、4h 组、8h 组及 12h 组的 cx47 聚集体数量分别为 (90.10 ± 5.53) 个, (92.22 ± 8.36) 个, (108.32 ± 6.43) 个, (115.25 ± 8.20) 个, (127.85 ± 9.08) 个。在暴露于缺氧 4 小时后,与对照组相比,NSCs 中 cx43、cx36、cx47 聚集体的数量增加 50%、53%、20%。在缺氧预处理 1 小时后,与对照相比,cx43、cx36、cx47 的表达均没有统计学差异,见图 2、3、4。

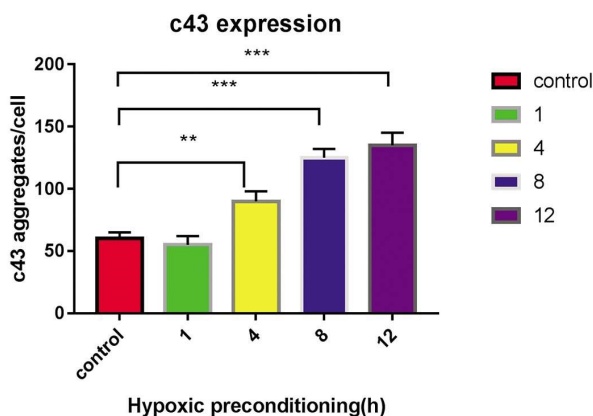


图 2 每组神经干细胞 cx43 表达的的比较

Fig.2 Comparison of the cx43 expression of NSCs among different groups

2.3 对照组、缺氧预处理 4h 组及 CBX 组半通道功能的比较

通过钙黄绿素滤过实验可以评估 NSC 半通道功能。在缺氧预处理 4 小时的 NSCs 中,染料外流的速度比对照组的 NSCs 更高,添加半通道阻断剂 CBX 可以阻断钙黄绿素流出,见图 5。

3 讨论

中枢神经系统损伤可以导致损伤平面以下永久性不可逆

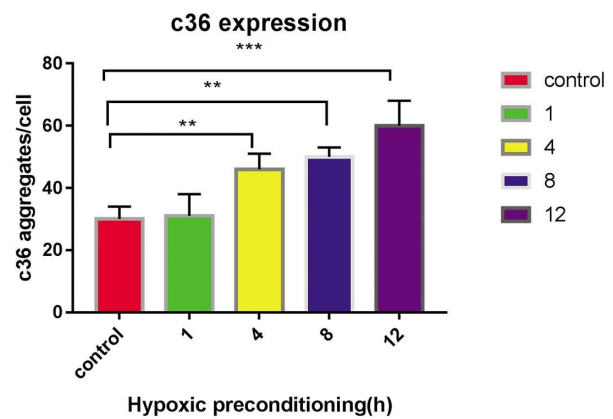


图 3 每组神经干细胞 cx36 表达的的比较

Fig.3 Comparison of the cx36 expression of NSCs among different groups

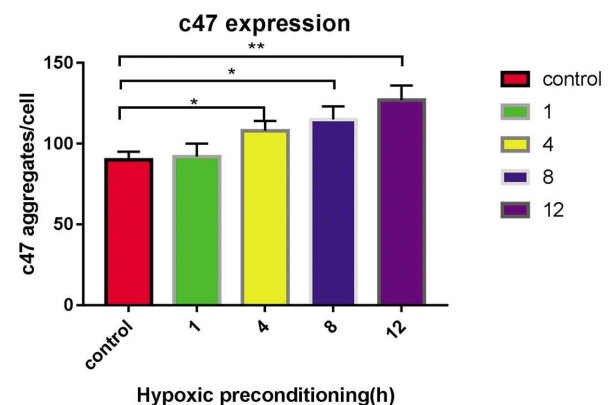


图 4 每组神经干细胞 cx47 表达的的比较

Fig.4 Comparison of the cx47 expression of NSCs among different groups

的运动和感觉功能的丧失^[7],这是一个长期困扰临床医师的难题^[8]。局部瘢痕和局部炎性反应妨碍轴突的生长,并阻碍了神经组织的修复^[9,10]。目前,神经干细胞移植被认为是治疗中枢神经系统损伤的具有极大前景的治疗方法,为神经系统疾病患者带来希望^[11-13]。然而,神经干细胞移植的低生存率的问题一直未能解决,严重影响了神经干细胞移植的预期效果^[14,15]。

缺氧预处理作为一种可以增强中风和其他中枢神经系统疾病内源性神经保护的方法已被广泛研究^[16,17]。预处理的基本概念是“任何能够对组织或器官造成损伤的刺激物在接近(但

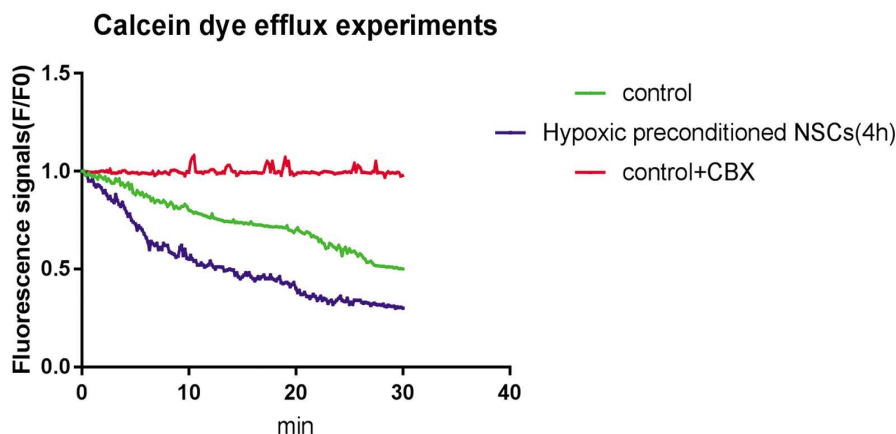


图 5 每组神经干细胞 PI 染色阳性率的比较

Fig.5 Comparison of the cx43 expression of NSCs among different groups

低于损伤阈值时都能激活内源性的保护机制",从而潜在的减轻后续更严重的刺激的影响。预处理还与交叉耐受效应相关,其中一种损伤诱导对另一种损伤的耐受,可能使缺氧预处理的神经干细胞拥有更强的"生命力"^[18,19]。缺氧预处理是细胞自我的保护机制,可以增强神经干细胞在缺氧及其他致死性环境的"生存能力"^[20,21]。还有研究表明缺氧预处理通过增加缺血诱导因子1^[22]、促红细胞生成素、血管内皮生长因子、活性氧及其他保护性蛋白的产生,使细胞在缺氧环境中形成耐受,提高细胞的生存能力和生存率^[23,24]。在脑梗死模型中,缺氧预处理被证实可以增加神经干细胞对损伤的抵抗力^[25],促进迁移和分化,促进生长因子的分泌^[26]。然而,目前缺氧预处理对神经干细胞连接影响的研究比较少。本研究从缺氧预处理后神经干细胞连接蛋白及半通道功能的角度,进一步探讨了缺氧预处理对神经干细胞自我保护的作用研究。

有研究表明缺氧预处理后间隙连接蛋白水平升高可能是由于蛋白质降解速度减慢所致,本研究结果显示缺氧预处理后cx43、cx36、cx47的表达显著增加。星形胶质细胞中Cx43水平的增加,允许ATP流出,而ATP代谢为腺苷,这被认为是缺氧预处理后内源性神经保护作用的关键机制^[27]。而间隙连接蛋白又是构成半通道及细胞间通讯的物质基础^[28,29]进一步解释了缺氧预处理后神经干细胞半通道滤过能力的增强。半通道允许细胞间小分子及离子的通过,促进了细胞之间信息及物质的交换^[30],为缺氧预处理后神经干细胞自我保护效应提供了理论依据。本研究评估了NSCs可以暴露于低氧环境而不引起坏死增加的最佳缺氧预处理的时间为4h,此条件下既能增加神经干细胞间隙连接蛋白的表达及增加半通道滤过功能,又不会导致大量神经干细胞坏死。Fan WL的研究表明在脊髓损伤后,向宿主移植缺氧预处理神经干细胞能加速其宿主神经功能的恢复^[31]。Takuma等人的研究表明缺氧预处理可以提高脑缺血缺氧小鼠模型中神经干细胞的治疗效果,通过抵抗细胞毒性因子及上调血管内皮生长因子的表达,促进了神经自我保护功能及神经功能修复^[32]。Wei-li Fan等将缺氧预处理的神经干细胞移植到脊髓损伤小鼠模型中,证实了缺氧预处理神经干细胞移植在治疗的大鼠脊髓损伤中是一种实用的、有效的治疗策略^[33]。

缺氧预处理神经干细胞移植的机制是多方面的,其中已经证实涉及了神经营养因子和生长因子的表达和分泌^[34],这些因子提高了自分泌和旁分泌活性,以保护病变区域免受进一步的损伤并刺激其后的再生^[35]。目前,关于缺氧预处理神经干细胞移植细胞间通讯的研究很少,本实验的局限性在于未行缺氧预处理神经干细胞移植,在以后的实验中,我们将探究缺氧预处理能否提高移植神经干细胞与宿主细胞之间的细胞连接与细胞通讯的相关问题。

参考文献(References)

- [1] Jäderstad J, Brismar H, Herlenius E, et al. Hypoxic preconditioning increases gap-junctional graft and host communication [J]. *Neuroreport*, 2010, 21(17): 1126-32
- [2] 孙崇毅,姚猛,陈立民,等.大鼠神经干细胞缺氧后的内源性促红细胞生成素表达规律[J].*中国矫形外科杂志*, 2006, 14(8): 597-599
- [3] S Sart, T Ma, Y Li. Preconditioning Stem Cells for In Vivo Delivery [J].*Bioresearch Open Access*, 2014, 3(4): 137
- [4] Jahan A, Sybille DM. Hypoxic-preconditioning enhances the regenerative capacity of neural stem/progenitors in subventricular zone of newborn piglet brain [J]. *Stem Cell Research*, 2013, 11 (2): 669-686
- [5] Wei ZZ, Zhu Y, Zhang JY, et al. Priming of the Cells: Hypoxic Preconditioning for Stem Cell Therapy [J]. *Chinese Medical Journal*, 2017, 130 (19): 2361-2374
- [6] 辛莉,郭国庆,沈伟哉,等.间隙连接蛋白家族的研究进展[J].*中国病理生理杂志*, 2007, 23(6): 1240-1243
- [7] Doulames VM, Plant GW. Induced Pluripotent Stem Cell Therapies for Cervical Spinal Cord Injury[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(4): 530
- [8] Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms[J]. *Frontiers in Neurology*, 2019, 10: 282
- [9] 马伟康,陶树清.水凝胶在脊髓损伤修复中的应用[J].*东南大学学报(医学版)*, 2016, 35(3): 460-463
- [10] Orr MB, Gensel JC. Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses [J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(3): 541-553
- [11] Katoh H, Yokota K, Fehlings MG. Regeneration of Spinal Cord Connectivity Through Stem Cell Transplantation and Biomaterial Scaffolds[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 248
- [12] Cofano F, Boido M, Monticelli M, et al. Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (11): 2698
- [13] Pereira, Inês M, Marote A, et al. Filling the Gap: Neural Stem Cells as A Promising Therapy for Spinal Cord Injury [J]. *Pharmaceuticals*, 2019, 12(2): 65
- [14] Feng X, Zhang G, Feng D, et al Spinal cord extracts from injured spinal cord impede differentiation of rat embryonic neural stem cells into neurons through regulating Notch signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(10): 3855-3861
- [15] Gazdic M, Volarevic V, Harrell CR, et al. Stem Cells Therapy for Spinal Cord Injury [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(4): 1039
- [16] Kim YH, Lee KS, Kim YS, et al. Effects of hypoxic preconditioning on memory evaluated using the T-maze behavior test[J]. *Animal Cells and Systems*, 2019,23(1): 10-17
- [17] Xu MY, Wang YF, Wei PJ, et al. Hypoxic preconditioning improves long-term functional outcomes after neonatal hypoxia-ischemic injury by restoring white matter integrity and brain development [J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2019, 25(6): 734-747
- [18] Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection [J]. *Trends in Neurosciences*, 2003, 26: 248-254
- [19] Wang JW, Qiu YR, Fu Y, et al. Transplantation with hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells suppresses brain injury caused by cardiac arrest-induced global cerebral ischemia in rats[J]. *Journal of neuroscience research*, 2017, 95(10): 2059-2070
- [20] 孙胜,高钰琪,高文详,等.缺氧预处理保护机制的研究进展[J].*临床与病理杂志*, 2005, 25 (4): 304-306

- [21] Zhang W, Chen M, Li H, et al. Hypoxia preconditioning attenuates lung injury after thoracoscopic lobectomy in patients with lung cancer: a prospective randomized controlled trial [J]. BMC Anesthesiology, 2019, 19(1): 209
- [22] Hao D, He C, Ma B, et al. Hypoxic Preconditioning Enhances Survival and Proangiogenic Capacity of Human First Trimester Chorionic Villus-Derived Mesenchymal Stem Cells for Fetal Tissue Engineering[J]. Stem Cells International, 2019, 2019: 9695239
- [23] 孙崇毅,姚猛,刘庆鹏,等.神经干细胞缺氧预处理后的内源性保护作用 and 促红细胞生成素的表达 [J]. 中华创伤杂志, 2006, 22 (9): 707-709
- [24] Guan R, Lv J, Xiao F, et al. Potential role of the cAMP/PKA/CREB signalling pathway in hypoxic preconditioning and effect on propofol induced neurotoxicity in the hippocampus of neonatal rats [J]. Molecular Medicine Reports, 2019, 20(2): 1837-1845
- [25] Luo Z, Wu F, Xue E, et al. Hypoxia preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells survival by inducing HIF-1 α in injured neuronal cells derived exosomes culture system[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(2): 134
- [26] Wei Z Z, Zhu Y, Zhang J Y, et al. Priming of the Cells: Hypoxic Preconditioning for Stem Cell Therapy [J]. Chinese Medical Journal, 2017, 130(19): 2361-2374
- [27] 徐娅蓓,陈国强.间隙连接蛋白 43 的表达调控及其功能[J].临床与病理杂志, 2005, 25(6): 477-480
- [28] Jiang J X, Gu S. Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins[J]. FEBS Letters, 2016, 588(8): 1186-1192
- [29] Wu JI, Wang LH. Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application [J]. Journal of biomedical science, 2019, 26(1): 8
- [30] Kim EM, Bae YM, Choi MH, et al. Connexin 43 plays an important role in the transformation of cholangiocytes with *Clonochis sinensis* excretory-secretory protein and N-nitrosodimethylamine [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2019, 13(4): e0006843
- [31] Fan WL, Liu P, Wang G, et al. Transplantation of hypoxic preconditioned neural stem cells benefits functional recovery via enhancing neurotrophic secretion after spinal cord injury in rats[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2017, 119(6): 4339-4351
- [32] Wakai T, Narasimhan P, Sakata H, et al. Hypoxic preconditioning enhances neural stem cell transplantation therapy after intracerebral hemorrhage in mice [J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2015, 36(12): 2134-2145
- [33] Fan W L, Liu P, Wang G, et al. Transplantation of hypoxic preconditioned neural stem cells benefits functional recovery via enhancing neurotrophic secretion after spinal cord injury in rats[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2017, 119(6): 4339-4351
- [34] Wang J W, Qiu Y R, Fu Y, et al. Transplantation with hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells suppresses brain injury caused by cardiac arrest-induced global cerebral ischemia in rats[J]. Journal of Neuroscience Research, 2017, 95(10): 2059-2070
- [35] Jiang RH, Wu CJ, Xu XQ, et al. Hypoxic conditioned medium derived from bone marrow mesenchymal stromal cells protects against ischemic stroke in rats [J]. Journal of cellular physiology, 2019, 234(2): 1354-1368

(上接第 1415 页)

- [24] Webb G J, Siminovitch K A, Hirschfield G M. The immunogenetics of primary biliary cirrhosis: A comprehensive review[J]. J Autoimmun, 2015, 64: 42-52
- [25] Yang C Y, Ma X, Tsuneyama K, et al. IL-12/Th1 and IL-23/Th17 biliary microenvironment in primary biliary cirrhosis: implications for therapy[J]. Hepatology, 2014, 59(5): 1944-1953
- [26] Zhang W, Sharma R, Ju S T, et al. Deficiency in regulatory T cells results in development of antimitochondrial antibodies and autoimmune cholangitis[J]. Hepatology, 2009, 49(2): 545-552
- [27] Kita H, Naidenko O V, Kronenberg M, et al. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer[J]. Gastroenterology, 2002, 123(4): 1031-1043
- [28] Zhao J, Zhao S, Zhou G, et al. Altered biliary epithelial cell and monocyte responses to lipopolysaccharide as a TLR ligand in patients with primary biliary cirrhosis[J]. Scand J Gastroenterol, 2011, 46(4): 485-494
- [29] Yang Z, Klionsky D J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 124-131
- [30] Liu W J, Shen T T, Chen R H, et al. Autophagy-Lysosome Pathway in Renal Tubular Epithelial Cells Is Disrupted by Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy[J]. J Biol Chem, 2015, 290 (33): 20499-20510
- [31] Liu W J, Xu B H, Ye L, et al. Urinary proteins induce lysosomal membrane permeabilization and lysosomal dysfunction in renal tubular epithelial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 308(6): F639-F649
- [32] Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins[J]. Autophagy, 2011, 7(3): 279-296
- [33] Du T, Nagai Y, Xiao Y, et al. Lysosome-dependent p300/FOXp3 degradation and limits Treg cell functions and enhances targeted therapy against cancers[J]. Exp Mol Pathol, 2013, 95(1): 38-45
- [34] Thome R, Moraes A S, Bombeiro A L, et al. Chloroquine treatment enhances regulatory T cells and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65913