

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,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 人少突胶质前体细胞;低氧;迁移;缺氧诱导因子-1 α ;趋化因子受体4;PI3K-Akt信号通路;轴突引导通路

中图分类号 Q 2-33

文献标志码 文章编号 1000-1492(2026)01-0023-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.01.005

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);PDGF、神经营养因子-3、白血病抑制因子(美国Pepro Tech Inc);PBS(北京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、6孔板(美国Corning公司);RNA prep Pure Cell/Bacteria Kit、DNase(北京Tiangen公司);5×

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

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(北京亚泰科隆公司);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],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 PEMouse 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和低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, 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℃、30 s, 95℃、5 s, 60℃、30 s,共完成40个循环。基因引物序列如下: CXCR4上游引物为5'-CTTCTTAAGTGGCATTGTGG-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^{- $\Delta\Delta$ C_T}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,1×10⁶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℃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 Bio-analyzer 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、1C),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、1E)。

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% O_2 预处理后 hOPCs 的迁移率提高至 $(29.88 \pm 1.95)\%$, 2% O_2 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

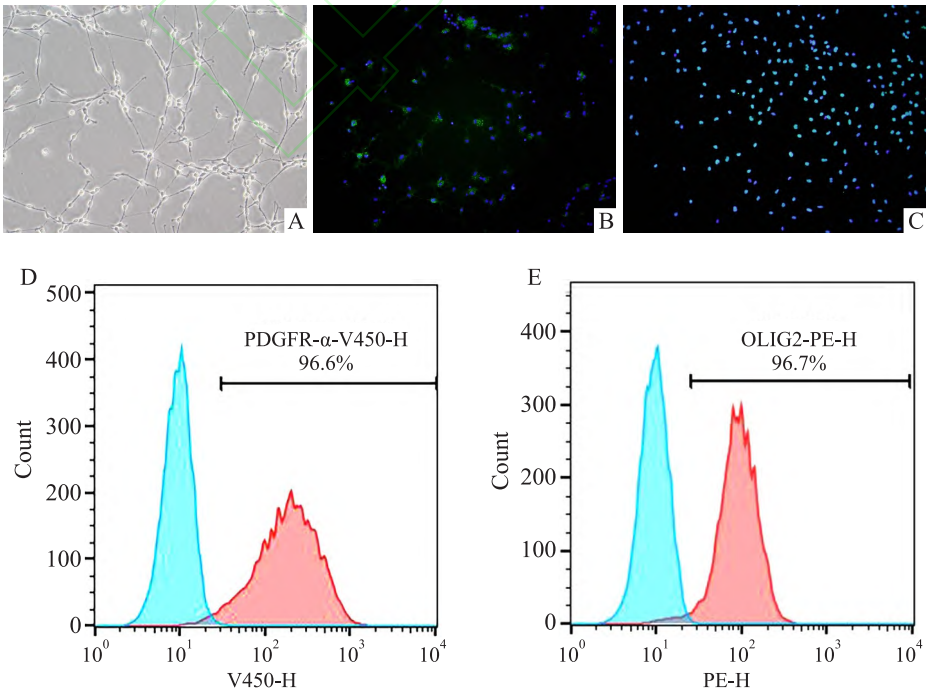


图1 hOPCs培养鉴定图 × 200

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.

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% O_2 , 2% O_2)预处理24 h后,细胞形态并未有明显变化(图3A-3C)。5% O_2 预处理后,PDGFR- α 和OLIG2的阳性率分别为95.8%和97.7%(图3D、3E)。2% O_2 预处理后,PDGFR- α 和OLIG2的阳性率分别为94.3%和95.1%(图3F、3G)。低氧与常氧比较,标志物PDGFR- α 和OLIG2的表达无显著差异。

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% O_2 和2% O_2)条件下hOPCs中CXCR4-mRNA和HIF-1 α -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(2% O_2)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% O_2 组和2% O_2 组差异无统计学意义。见图4。

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% O_2 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% O_2 处理24 h后,其表达率提升至(72.47 \pm 0.83)%,约为常氧条件下的4.9倍。与5% O_2 相比,2% O_2 更加显著提升了CXCR4表达。见图5。

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% O_2 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、

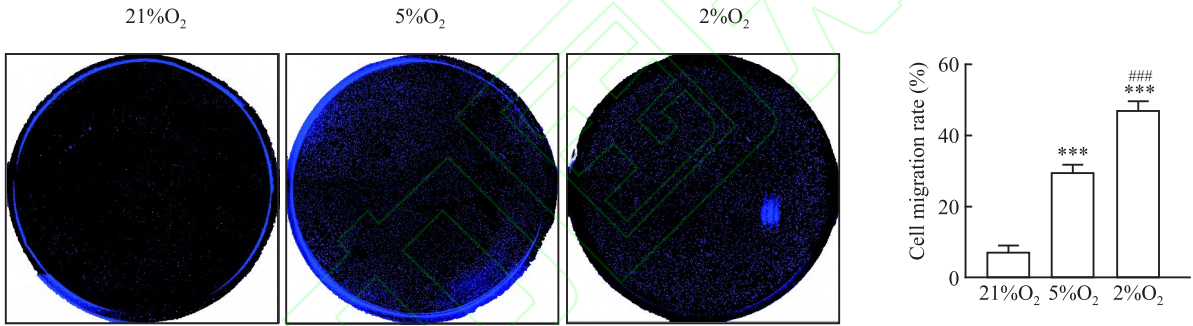


图2 Transwell实验迁移结果

Fig. 2 The results of Transwell experiment showing migration ability

*** $P<0.001$ vs 21% O_2 group; ### $P<0.001$ vs 5% O_2 group.

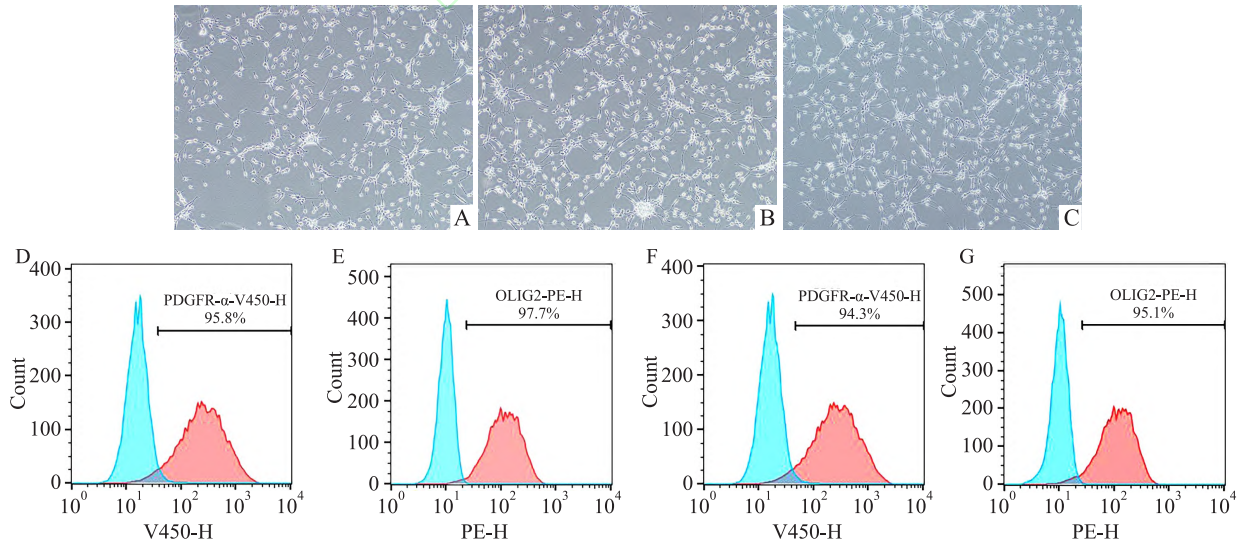


图3 常氧和低氧明场对比及低氧后流式检测 $\times 100$

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

A: Normoxigen; B: 5% O_2 ; C: 2% O_2 ; D, E: The expression of biomarkers in hOPCs pretreated with 5% O_2 hypoxic; F, G: The expression of biomarkers in hOPCs pretreated with 2% O_2 hypoxic.

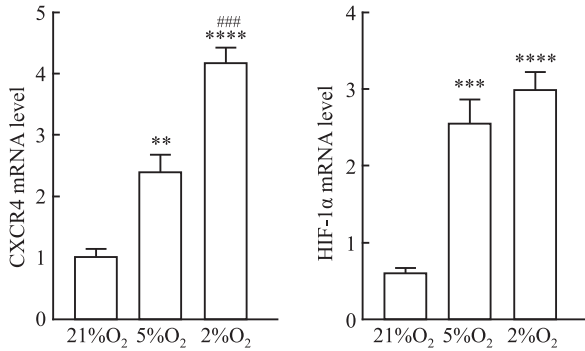


图4 不同氧浓度下 CXCR4-mRNA 及 HIF-1α-mRNA 的表达

Fig. 4 The expression of CXCR4-mRNA and HIF-1α-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.

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)。

3 讨论

hOPCs 可以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。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

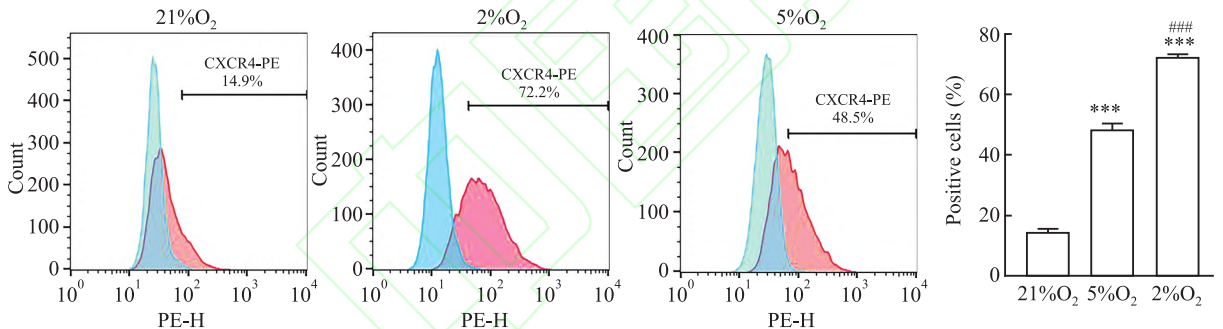


图5 低氧处理对 hOPCs 表面 CXCR4 表达的影响

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

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

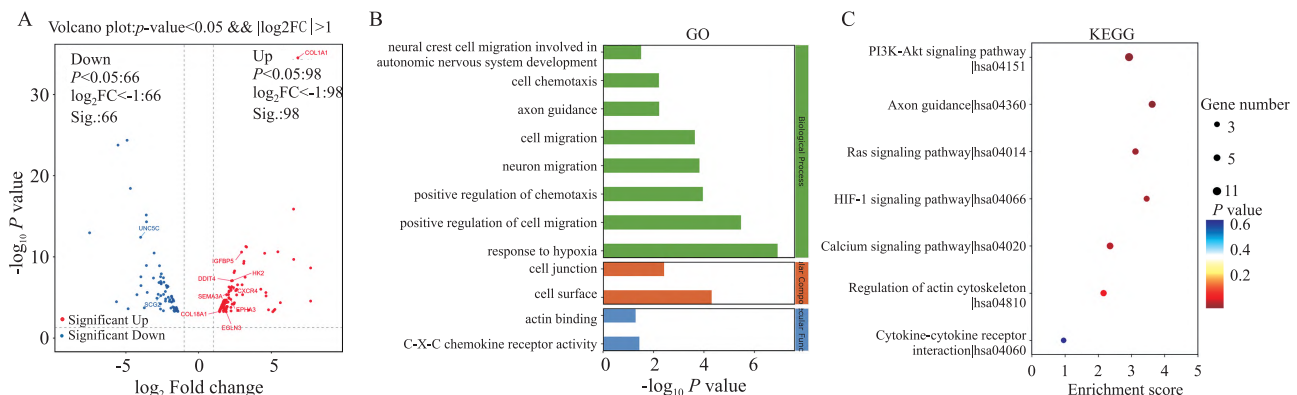


图6 差异基因表达分析

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.

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。

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(7.30 \pm 1.86)%显著提升至(42.26 \pm 6.91)%。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、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,是神经元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轴突引导通路以提高hOPCs的迁移能力。在后续工作中,课题组将进一步分析低氧处理后hOPCs的体内外髓鞘能力,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] Bidkhor 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] Dzhaliyova 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]. *Neurol 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.

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

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

(¹ Department of Laboratory, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052; ² Department 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 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** 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 human oligodendrocyte precursor cells; low oxygen; migration; hypoxia-inducible factor 1 alpha; chemokine (C-X-C motif) receptor 4; PI3K-Akt signaling pathway; axon guidance pathway

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

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