

阴囊内移植脐血单个核细胞对老年小鼠机能的影响

李 军, 马彦竹, 毕之祺, 李志国, 张雪梅, 李 萍, 姜英虹, 芮丹云, 李江丽, 俞 华^{*}
(昆明学院 医学院, 云南 昆明 650214)

摘要: 为明确阴囊内异种移植脐血单个核细胞对老年小鼠机能的影响, 通过观察移植细胞的存活、作用, 明确阴囊内移植的脐血单个核细胞不仅可以在小鼠体内存活, 且无明显的副作用, 还可以显著提高雄性老年小鼠的 30 min 内交配次数 ($P=0.018$), 但其不能提高老年小鼠的存活时间以及心脏每搏量 (皆 $P>0.05$)。

关键词: 脐血单个核细胞; 老年小鼠; 阴囊; 衰老

中图分类号: R363 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2018) 03 - 0103 - 02

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2018.03.021

The Effects of Cord Blood Mononuclear Cells Xenotransplantation in Scrotum on Old Mouse Body Functions

LI Jun, MA Yanzhu, BI Zhiqi, LI Zhiguo, ZHANG Xuemei, LI Ping, JIANG Yinghong, RUI Danyun, LI Jiangli, YU Hua^{*}
(Medical College, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

Abstract: In order to identify the effects of cord blood mononuclear cells xenotransplantation in scrotum upon old mouse body functions, the transplanted cells' survival and role were observed. The data suggests that the cord blood mononuclear cells transplanted in scrotum can survive with no obvious side effects. They can significantly improve the mating times in 30 minutes of old male mouse ($P=0.018$), but fail to change the survival time and cardiac stroke volume of old mouse (all $P>0.05$).

Key words: cord blood mononuclear cell; old mouse; scrotum; senility

目前, 我国已经进入老龄化社会^[1], 也是世界上老年人口最多的国家。而我国为老年人提供的医疗保健服务与发达国家相比, 还存在明显差距。为此, 有必要立项研究延缓衰老的方法, 并将亚健康防患于未然, 从而不断改善和提高我国人民体质及健康水平。换言之, 不仅要提高人均寿命, 而且还要提升生活质量。

干细胞的研究给科学界带来了日新月异的变化, 同时也为老年医学带来曙光。多年来, 本课题组一直从事干细胞研究, 先后开展了一系列抗衰老研究, 创造了干细胞腹腔移植的有效移植途径^[2-4], 但通过临床观察, 其作用在移植后很快就消失殆尽。由于脐血中含有多种干细胞, 这些干细

胞富集于脐血单个核细胞中^[5], 因此同种异体干细胞研究不可避免地会遭到免疫排斥反应。为此, 有必要探讨一种较为有效的干细胞移植途径。睾丸组织为机体免疫豁免区, 而睾丸位于阴囊内, 并与阴囊相毗邻, 阴囊又有丰富的血流。因此, 本课题组拟通过将脐血单个核细胞移植入雄性老年小鼠的阴囊内, 以期能有避开移植免疫排斥之作用^[6]。

1 实验方法

从四川省医学科学院四川省人民医院实验动物研究所购买 12 月龄 (相当于 50 多岁的人) SPF 级雄性 BALB/c 小鼠, 将 80 只小鼠随机分配到 4 组, 分别作为对照检测组、对照寿命组、移植检测组、

收稿日期: 2018 - 04 - 10

基金项目: 2017 年云南省大学生创新创业训练计划资助项目“阴囊内移植小鼠脐血单个核细胞抗衰老作用及其机制研究”; 云南省地方本科高校基础研究联合专项资助项目 (2017FH001-086); 昆明学院校级科研资助项目 (XJZX1607, XJZD1608, XJZX1701)。

作者简介: 李军 (1973—), 男, 陕西渭南人, 副教授, 博士, 主要从事干细胞与抗衰老研究。

^{*} 通讯作者: 俞华 (1963—), 女, 云南昆明人, 副教授, 硕士, 主要从事微生物学研究, E-mail: yuhua925@126.com

移植寿命组, 每组 20 只小鼠, 其中寿命组只观察存活时间, 不做任何检测, 以防止出现干扰。

收集绿色荧光小鼠 C57BL/6 (H-2^b) 新生小鼠 (昆明医科大学神经科学研究所提供) 脐血。新生小鼠断头后, 立即用事先吸有对半体积蒸馏水稀释过的低渗 DM-F12 培养液的注射器吸取脐血, 每只小鼠取 40 ~ 60 μ L 脐血 (其中约含 $2 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$ 个脐血单个核细胞), 将所有脐血混合 (3 份以上)。低渗 DM-F12 培养液破坏红细胞半小时后, 再通过离心法获取脐血单个核细胞。最后, 实验组每只老年 BALB/c 小鼠单次阴囊注射 0.5 mL 的用生理盐水稀释过的 1×10^4 个混合脐血单个核细胞 (来自 3 只以上新生小鼠的脐血), 对照组仅注射 0.5 mL 生理盐水。

对比观察移植前后小鼠一般情况, 观察小鼠的状况和移植物抗宿主病情况, 以及移植后小鼠存活时间 (从移植后开始计数)。对移植组死亡小鼠做解剖学检查, 检查干细胞致瘤情况。

移植 1 个月后检测雄性 BALB/c 小鼠 30 min 内交配次数。4 月龄 BALB/c 青年雌性小鼠购自昆明医科大学, 每天 1 mg/kg 皮下注射己烯雌酚连续 3 d, 促使雌性鼠进入发情期。晚上 20:00 ~ 23:00 期间进行交配实验, 将单只雄性老年小鼠放入 30 cm \times 20 cm \times 20 cm 饲养盒中适应 10 min 后, 放入 2 只发情期雌性小鼠。记录 30 min 内交配次数, 交配在安静、弱光条件下进行^[7]。并记录交配次数, 即雄鼠舔阴茎的次数。

移植 3 个月后组间比较 BALB/c 老年小鼠每搏量 (超声心动图) 之后, 再处死检测组小鼠, 通过荧光示踪法检测干细胞植入情况。

统计学处理。计量资料表示为: (均数 \pm 标准差); 使用 SPSS19.0 软件进行统计分析; 组间比较采用独立样本 *t* 检验; $P < 0.05$ 时, 表示差异有统计学意义。

2 结果

移植后, 小鼠生存良好, 未观察到移植物抗宿主病发生, 尸检未发现干细胞致瘤性。移植 3 个月在移植检测组极个别 BALB/c 老年小鼠阴囊仍能观察到绿色荧光标记的脐血单个核细胞, 但在血涂片中均未能检测到移植的细胞。

移植后移植寿命组小鼠存活天数与对照组寿命相比, $P > 0.05$, 表明差异无统计学意义 (见表

1)。但是, 移植 1 个月后移植检测组小鼠 30 min 内交配次数发生显著性变化, 明显多于对照检测组, $P < 0.05$ (见表 2)。移植 3 个月后, 移植检测组小鼠每搏量与对照检测组相比, $P > 0.05$, 表明差异无统计学意义 (见表 3)。

表 1 移植后小鼠存活时间

组别	N	存活时间/d
对照寿命组	20	134.800 \pm 8.030
实验寿命组	20	135.500 \pm 9.785 [*]

注: 1) 存活时间表示为 (均数 \pm 标准差); 2) 与对照寿命组相比较, ^{*} $P = 0.806$ 。

表 2 移植 1 个月后小鼠 30 min 内交配次数

组别	N	交配次数
对照检测组	20	1.300 \pm 1.031
实验检测组	20	2.100 \pm 1.021 [*]

注: 1) 交配次数表示为 (均数 \pm 标准差); 2) 与对照检测组相比较, ^{*} $P = 0.018$ 。

表 3 移植 3 个月后小鼠每搏量

组别	N	每搏量/ μ L
对照检测组	20	53.564 5 \pm 2.520 2
实验检测组	20	55.258 0 \pm 2.816 1 ^{Δ}

注: 1) 每搏量表示为 (均数 \pm 标准差); 2) 与对照检测组相比较, ^{Δ} $P = 0.052$ 。

3 讨论

研究结果表明, 阴囊内移植的脐血单个核细胞可以在宿主原位存活达 3 个月之久而未发生明显的移植物抗宿主病以及致瘤性等不良反应。推究其原因, 小鼠种间移植类似于人类同胞兄妹之间的移植, 故未发生强烈的移植免疫排斥作用。

此外, 研究结果显示, 阴囊内移植脐血单个核细胞, 在移植 1 个月后, 能显著调高雄性老年小鼠的性功能。究其原因, 可能因为阴囊移植类似于腹腔移植, 移植的细胞可以附着在附睾等组织上, 宿主不易将移植细胞清除干净, 而移植的细胞由于与宿主组织相容性较好, 移植的干细胞有可能通过旁分泌等途径改善宿主性功能。当然, 具体的作用机制目前还缺乏。

本实验通过长期观察, 未发现阴囊内异体移植脐血单个核细胞可以延长受体小鼠的寿命, 有可能与本研究采用的是 12 月龄的老年小鼠, 小鼠各方面机能都已经退化有关, 因此想整体提高机能恐非易事。

(下转第 108 页)

- [J]. 中医杂志, 2016, 57 (6): 512-515.
- [6] 韩文文, 张玉莲, 张琳琳, 等. 益肾化浊方条件培养基对神经干细胞增殖分化影响的研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26 (10): 2339-2342.
- [7] 王凯, 张琳琳, 宋宛珊, 等. 从 JAK2/STAT3 信号转导通路探讨益肾化浊方含药脑脊液对神经干细胞增殖与分化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31 (5): 1879-1882.
- [8] 郑利强, 江琼, 伍亚民, 等. APS 通过 PI3K/AKT 信号通路促进神经干细胞增殖 [J]. 基础医学与临床, 2016, 36 (10): 1359-1363.
- [9] 查倩, 江琼, 伍亚民, 等. 黄芪多糖含药血清对神经干细胞增殖和分化的影响 [J]. 中药材, 2015, 38 (8): 1721-1723.
- [10] 邵雷, 王键, 程发峰, 等. 益气活血化痰中药复方对大鼠胚胎神经干细胞生长分化增殖的影响机制研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39 (2): 113-118.
- [11] 姚璎珈, 孔亮, 教亚男, 等. 蛇床子素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进转染 APP 基因的神经干细胞分化为更多神经元且减少神经元凋亡 [J]. 中国药理学, 2015, 31 (11): 1516-1523.
- [12] 黄昕, 周胜强, 刘胜贤, 等. 补阳还五汤对去势脑缺血雌性大鼠海马神经干细胞增殖及 ERK/CREB 信号通路的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36 (12): 1-6.
- [13] 任德启, 关东升, 郭健. 益肾活血法对 EAE 大鼠模型的影响及对神经干细胞增殖分化的机制研究 [J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31 (12): 1382-1384.
- [14] 谭雪锋, 孙冰晶, 朱倩, 等. 银杏内酯 B 体外诱导神经干细胞向多巴胺能神经元分化 [J]. 解剖学杂志, 2016, 39 (1): 10-13.
- [15] 祁文, 熊鹰, 韩杰, 等. 川穹嗪对大鼠脊髓损伤后内源性神经干细胞增殖分化过程中 GFAP 表达的影响 [J]. 大众科技, 2017, 19 (1): 53-55.
- [16] 李社芳, 苗灵娟, 李宁, 等. 丹酚酸 B 对糖氧剥夺损伤大鼠海马神经干细胞增殖、凋亡和分化的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21 (17): 2735-2740.
- [17] 董宁, 赵瑞珍, 徐硕, 等. 丹梔逍遥散对广泛性焦虑大鼠海马齿状回神经干细胞增殖与分化能力的干预作用 [J]. 北京中医药, 2015, 34 (1): 63-66.
- [18] 张薇, 王大明, 谭渊, 等. 人参皂苷 Rb1、Rg1 对胎鼠体外神经干细胞促增殖分化作用的研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31 (11): 1200-1207.
- [19] 田沫, 万凤, 高健, 等. 人参皂苷 Rg1 对体外胚鼠皮层神经干细胞的增殖和神经胶质定向分化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31 (11): 4527-4530.
- [20] 万凤, 司银楚, 牛欣. 人参皂苷作用于星形胶质细胞对中风后神经干细胞增殖和分化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31 (5): 1617-1624.
- [21] 张丽, 赵丽红, 张兰, 等. 山茱萸环烯醚萜苷促进大鼠海马神经干细胞增殖和分化的影响 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24 (5): 550-553.
- [22] 陈晓锋, 王婧婧, 陆惠, 等. 壮通饮对体外培养新生大鼠海马神经干细胞增殖分化的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26 (7): 1099-1102.

(上接第 104 页)

移植 3 个月后, 宿主的每搏量并没有改善, 可能与心肌通常被认作是不可再生组织有关, 相比于处于不断更新的可再生组织, 种间移植的干细胞较难发挥组织重塑作用。

[参考文献]

- [1] 易再超, 方云龙, 尹亚楠. 浅析有氧运动对老年人抗衰老作用的研究 [J]. 文体用品与科技, 2014 (22): 177-179.
- [2] LI J, CHEN H, LV Y B, et al. Intraperitoneal injection of multipotent pooled cells treatment on a mouse model with aplastic anemia [J]. Stem Cells International, 2016 (3): 1-6.
- [3] 李军, 张涓, 刘革修. 小鼠胎盘组织细胞移植的抗衰老作用研究 [J]. 生物医学工程学杂志, 2010 (6): 1312-1316.
- [4] 李军, 张涓, 王彦平, 等. 小鼠胎盘源干细胞移植对臭氧致衰老模型的影响 [J]. 广东医学, 2010 (4): 404-406.
- [5] 李军, 刘革修. 再生障碍性贫血治疗中有待解决的主要问题 [J]. 广东医学, 2009, 30 (3): 476-478.
- [6] LI J, ZHANG L, ZHOU L, et al. Beneficial effects of non-matched allogeneic cord blood mononuclear cells upon patients with idiopathic osteoporosis [J]. Journal of Translational Medicine, 2012, 10 (1): 1-6.
- [7] 鲍雷, 王军波, 张远, 等. 吉林人参低聚肽对雄性小鼠性功能影响的实验研究 [J]. 中国预防医学杂志, 2015, 16 (10): 757-760.