

## 异种脐血单个核细胞移植对老年小鼠的影响

李 军, 马金容, 李志国, 毕之祺, 张雪梅, 秦林才, 俞 华, 马彦竹, 姜英虹, 李 萍<sup>\*</sup>  
(昆明学院 医学院, 云南 昆明 650214)

**摘要:**随着我国逐渐步入老龄化社会,老年人整体健康质量的提高亟待解决.而探讨将长寿命物种的干细胞鞘内移植进低寿命物种,移植细胞的存活情况及其对宿主的影响具有重要意义.为此,通过大样本观察鞘内移植人脐血单个核细胞对小鼠自然衰老进程的影响,明确鞘内注射的人脐血单个核细胞可在老年小鼠脑脊液中存活一段时间,并能显著提高老年小鼠的骨密度( $P=0.000$ ),且无明显副作用,但其不能提高老年小鼠的心脏每搏量以及改善脑组织端粒长度(皆 $P>0.05$ ).

**关键词:**脐血单个核细胞;鞘内注射;衰老;异种移植

**中图分类号:**R363 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2017)06-0112-03

**DOI:**10.14091/j.cnki.kmxyxb.2017.06.025

### Study of the Effects of Cord Blood Mononuclear Cells Xenotransplantation upon Aged Mouse

LI Jun, MA Jinrong, LI Zhiguo, BI Zhiqi, ZHANG Xuemei, QIN Lincan, YU Hua, MA Yanzhu, JIANG Yinghong, LI Ping<sup>\*</sup>  
(Medical College, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

**Abstract:** With the society stepping into an aging time, improving the overall health quality of the older is a burning issue. It is significant to study the survival rate and the effect on the host by injecting the stem cells of long-lived species into the short-lived species. Therefore, the effects of intrathecal injection human cord blood mononuclear cells upon mouse natural aging process were observed. The data suggests that the intrathecally injected human cord blood mononuclear cells can survive for a period of time in mouse cerebrospinal fluid. They can significantly improve the bone density of old mouse with no obvious side effects( $P=0.000$ ). But they can't change the cardiac stroke volume and brain cell telomere length of the old mouse(all  $P>0.05$ ).

**Key words:** cord blood mononuclear cell; intrathecal injection; senility; xenotransplantation

抗衰老研究历来都是一个热门课题,但至今为止,得到学术界普遍认可的抗衰老方法只有饥饿疗法<sup>[1]</sup>.而干细胞的研究给科学界带来了日新月异的变化,为老年医学带来曙光.人类是高等动物,其寿命较长.而小鼠寿命只有2 a左右,移植的干细胞的寿命明显长于受体小鼠的细胞,将长寿动物的干细胞移植进短寿动物的体内,理论上有可能延长短寿动物的寿命.

本课题组前期创造了干细胞腹腔移植的有效移植途径<sup>[2-11]</sup>.而脐血中含有多种干细胞,包括脐血间充质干细胞、脐血造血干细胞及其前体细胞等,这

些干细胞主要富集于脐血单个核细胞中<sup>[12-16]</sup>.但众所周知,同种异体干细胞研究不可避免地会遭遇免疫排斥反应,为此,有必要探讨一种较有效的干细胞移植途径.而大脑因为存在血脑屏障,故其被誉为机体免疫豁免区.本研究拟通过鞘内注射法移植干细胞,以期使移植的细胞能存活较长时间.

本研究选用BALB/c老年小鼠为研究对象,它是国际上最为通用的近交系品种之一<sup>[17]</sup>,其使用量仅次于C57小鼠,有关SPF级BALB/C雌鼠平均寿命,多报道为561 d<sup>[18]</sup>,由于该小鼠生命周期短,因此在

收稿日期:2017-09-25

**基金项目:**昆明学院校级科研项目(XJZX1607, XJZD1608);2016年国家级大学生创新创业训练计划项目“人脐血单个核细胞抗小鼠衰老作用研究”;2017年云南省大学生创新创业训练计划项目“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”.

**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.

<sup>\*</sup> **通讯作者:**李萍(1965—),女,四川大竹人,副教授,硕士,主要从事老年医学研究, E-mail:1571877702@qq.com.

相对较短的时间内就可观察到其明显的老化,从而减低了外界的影响. 本研究通过大样本观察鞘内注射人脐血单个核细胞抗小鼠衰老作用,并观察鞘内注射法移植异种干细胞在受体内存活、分布以及作用.

1 方法与资料

1.1 资料

12 月龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购买自四川省医学科学院四川省人民医院实验动物研究所,合格证号 SCXK(川)2013-15. 动物长期饲养在成都军区昆明总医院 SPF 动物实验室. 小鼠超声心动图在暨南大学医学院生理教研室完成. DMEM/F-12 培养液购自美国 Gibco 公司. Hoechst 33258 购自美国 Invitrogen 公司.

1.2 方法

将动物按完全随机法分成实验组和对照组两组,每组 50 只小鼠. 2016 年 3 月—2017 年 6 月期间于成都军区昆明总医院妇产科手术室收集剖复产男性婴儿脐血单个核细胞(剖复产之前已经证实输血前 4 项均为阴性),具体操作流程详见课题组前期工作<sup>[19]</sup>. 用 DMEM/F-12 培养液将 Hoechst 33258 标记的脐血单个核细胞稀释,每只 BALB/c 雌性老年小鼠单次鞘内注射 105 个(10  $\mu$ L 体积)脐血单个核细胞(细胞现提现用)<sup>[20]</sup>,对照组单纯鞘内注射等量 DMEM/F-12 培养液.

对移植前后小鼠的一般情况进行对比,观察它们的精神状况、体力活动度、毛发、形态以及移植物抗宿主病情况. 并观察输注后小鼠存活情况,同时检测干细胞致瘤情况.

为排除老年小鼠会发生自然死亡现象,移植 3 个月后,对比小鼠的每搏量、骨密度、细胞端粒水平. 并荧光示踪干细胞.

移植 3 个月后,首先按照课题组前期研究方法做小鼠超声心动图<sup>[4-6]</sup>. 完成之后,用 1 mL 注射器从枕骨大孔抽取脑脊液,进行涂片以检测植入的荧光细胞,详细操作流程参照李越峰等<sup>[21]</sup>的实验流程. 其次按照 TeloTAGGG Telomere Length Assay kit 试剂盒操作流程,将已昏死的小鼠应用 Southern-blot 杂交技术检测脑组织端粒长度,具体操作参照黄浩等<sup>[22]</sup>的操作流程. 最后取新鲜右侧股骨,应用骨密度仪(Hologic QDR-4500, USA)小动物软件检测整段股骨的骨密度.

1.3 统计学处理

统计分析采用 SPSS v19.0 软件,通过两独立样本

*t* 检验进行组间比较, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义.

2 结果

移植前后小鼠毛发、形态、精神状态、体力活动度等一般情况无明显变化. 人脐血单个核细胞鞘内注射小鼠 3 个月后,在绝大多数脑脊液涂片中都检测不到移植的细胞,仅仅在极少数涂片中能检测到个别存活的蓝色荧光标记的人脐血单个核细胞(详见图 1). 小鼠在移植 3 个月内都能生存良好,未观察到移植物抗宿主病,也未发现干细胞致瘤以及其他明显的副作用. 移植 3 个月后做超声心动图检测小鼠每搏量,与对照组相比  $P > 0.05$ ,表明差异无统计学意义(详见表 1). 但是移植 3 个月后骨密度发生显著性变化,实验组骨密度明显大于对照组, $P < 0.05$ (详见表 2). 实验组脑组织细胞的端粒长度与对照组相比,差异没有统计学意义( $P > 0.05$ ,详见表 3).



图1 移植3个月小鼠脑脊液涂片检测植入的细胞(400X)

表 1 移植 3 个月后各组小鼠每搏量

组别	N	每搏量/ $\mu$ L
对照组	50	52.348 0 $\pm$ 2.554 6
实验组	50	53.042 8 $\pm$ 3.792 3 <sup>*</sup>

注:1)与对照组相比,<sup>\*</sup> $P = 0.285$ ;2)每搏量表示为(均数  $\pm$  标准差).

表 2 移植 3 个月后各组小鼠骨密度

组别	N	骨密度/( $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$ )
对照组	50	76.315 2 $\pm$ 3.223 7
实验组	50	79.272 2 $\pm$ 4.660 0 <sup>*</sup>

注:1)与对照组相比,<sup>\*</sup> $P = 0.000$ ;2)骨密度表示为(均数  $\pm$  标准差).

表 3 小鼠脑组织细胞端粒长度

组别	N	脑组织端粒长度/kb
对照组	50	9.898 2 $\pm$ 0.792 4
实验组	50	10.016 4 $\pm$ 0.427 8 <sup>*</sup>

注:1)与对照组相比,<sup>\*</sup> $P = 0.356$ ;2)脑组织端粒长度表示为(均数  $\pm$  标准差).

3 讨论

本研究结果提示,鞘内注射法异种移植干细胞安全有效,无副作用出现. 人脐血单个核细胞鞘内注射

移植小鼠3个月后,移植的细胞除个别存活外基本消失殆尽.提示异种移植,植入细胞多则可以存活3个月,但不能长期存活.推究其原因,短期存活可能与血脑屏障作用有关.异种移植种间强烈的移植免疫排斥导致移植的细胞在不到3个月的时间基本消失殆尽.

研究结果提示,单次人脐血单个核细胞鞘内注射移植小鼠,在移植3个月内,未发生明显的副作用,这可能与移植的细胞局限在脑脊髓腔内,由于血脑屏障的存在,脐血单个核细胞难以进入全身血液循环以及宿主免疫细胞也难以进入脑脊髓腔内有关.

另外,本研究结果表明,单次人脐血单个核细胞鞘内注射移植小鼠,在移植3个月后,未能明显改善老年小鼠反映心功能的指标每搏量.推究其原因,这可能与心肌在正常情况下,是不可再生的细胞,故移植的长寿命异种干细胞难以发挥决定性作用.同理,脑细胞也是不可再生的细胞,这可能导致移植后宿主脑细胞端粒长度未发生改变.提示干细胞虽然有明确的抗炎作用,但缺乏明显的抗氧化作用,因为即使是脑细胞,其端粒长度不仅与细胞分裂次数有关,也与细胞的氧化损伤积累有关,这一点,在老龄动物表现地尤为突出.

最后,单次鞘内移植人脐血单个核细胞3个月后,宿主的骨密度发生了明显的改善,此研究结果与我们之前的研究<sup>[19]</sup>报道,即脐血单个核细胞移植可提高特发性骨质疏松症的骨密度相互印证.发生的机制可能与老年小鼠普遍骨密度较低,而人的骨密度是其10倍左右,故而高骨密度物种细胞移植可能导致了低骨密度物种老年小鼠的骨密度发生明显改善,当然,具体的作用机制还缺乏,尚需进一步研究.

### [参考文献]

- [1] 络文. 科学家认为:轻微饥饿有助于健康长寿[J]. 农村成人教育,2000(10):47.
- [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, 崔正江, 吴天喜, 等. 胎盘源细胞治疗急性辐射骨髓衰竭研究[J]. 昆明学院学报, 2015, 37(3):94-96.
- [4] 李军, 张涇, 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.
- [5] 李军, 张涇, 刘革修. 移植胎盘间充质干细胞的抗衰老作用[J]. 生理学报, 2010(1):79-85.
- [6] 李军, 张涇, 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.
- [7] 朱锦灿, 陈小宇, 祝爱珍, 等. 胎鼠间充质干细胞对老年小鼠肺功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014(13):3678-3680.
- [8] 祝爱珍, 刘成成, 陈小宇, 等. 胎鼠间充质干细胞对老年小鼠心血管系统衰老的影响[J]. 中国老年学杂志, 2012(23):5193-5195.
- [9] 周艳华, 许婷婷, 李军, 等. 人脐带间充质干细胞低氧条件培养液对小鼠造血系统自然衰老的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011(3):469-474.
- [10] 许婷婷, 周艳华, 李军, 等. 人脐带间充质干细胞对小鼠自然衰老过程中骨髓脂肪化的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010(4):816-818.
- [11] 许婷婷, 李军, 周艳华, 等. 人脐带间充质干细胞对小鼠衰老进程中骨髓细胞集落生成的影响[J]. 暨南大学学报(医学版), 2009(6):614-618.
- [12] SAMOKHVALOV I M. Deconvoluting the ontogeny of hematopoietic stem cells[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014, 71(6):957-978.
- [13] WOLBANK S, GRIENSVEN M V, GRILLARIVOGLAUER R, et al. Alternative sources of adult stem cells: human amniotic membrane[J]. Bioreactor Systems for Tissue Engineering II, 2010, 123:1-27.
- [14] 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.
- [15] MAHMOOD R, CHOUDHURY M S, MEHMOOD A, et al. In vitro differentiation potential of human placenta derived cells into skin cells[J]. Stem Cells International, 2015(10):1-11.
- [16] LENSCH M W, DAHERON L, SCHLAGER T M. Pluripotent stem cells and their niches[J]. Stem Cell Reviews and Reports, 2006, 2(3):185-201.
- [17] 刘双环, 马丽颖, 王秀清, 等. BALB/C小鼠遗传污染对单克隆抗体制备的影响[J]. 实验动物科学与管理, 2006, 23(3):9-11.
- [18] 蒋腊梅, 伍伟景. 年龄相关听力损失 BALB/C小鼠耳蜗形态学观察[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2008, 14(4):263-267.
- [19] 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.
- [20] 蒋铭, 沈圆圆. 鞘内注射异氟烷对小鼠镇痛作用的影响[J]. 中国医学创新, 2010, 7(36):173-174.
- [21] 李越峰, 张泽国, 徐福菊, 等. 白芍改善睡眠作用的药效物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15):127-130.
- [22] 黄浩, 余南才, 刘倩, 等. 马齿苋水提液保护衰老小鼠DNA端粒长度缩短的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(7):804-807.