

脐带间充质干细胞移植对老年痴呆小鼠 SAMP8 学习记忆的影响

周会芳¹ 张密霞² 高 丽² 庄朋伟² 徐 倩¹ 张艳军²

(1 天津中医药大学中西医结合学院, 天津, 300193; 2 天津中医药大学中药学院, 天津, 300193)

摘要 目的:探讨脐带间充质干细胞(HUMSCs)移植对老年痴呆小鼠 SAMP8 学习记忆能力的影响。方法:培养人脐带间充质干细胞,通过尾静脉以高中低 3 个剂量($2.5 \times 10^5/0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$, $5 \times 10^5/0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$, $1 \times 10^6/0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$)分别向 7 月龄 SAMP8 老年痴呆小鼠移植 HUMSCs,并设立移植生理盐水组和 R1 小鼠正常对照组。HUMSCs 移植 45 d 后, MORRIS 水迷宫和跳台实验检测其学习记忆能力。结果:与 R1 正常对照小鼠比较, SAMP8 老年痴呆小鼠生理盐水组学习记忆能力明显降低;和移植生理盐水组比较, 细胞移植低剂量组水迷宫逃避潜伏期显著缩短($P < 0.05$), 穿越平台次数显著增加($P < 0.05$);跳台潜伏期显著延长($P < 0.05$), 错误次数显著减少($P < 0.05$), 结论:低剂量的脐带间充质干细胞移植能增强老年痴呆小鼠 SAMP8 的学习记忆能力。

关键词 脐带间充质干细胞;移植;SAMP8;学习记忆

Effects of HUMSCs on Learning Ability and Memory in Mice SAMP8 with Alzheimer's Disease

Zhou Huifang¹, Zhang Mixia², Gao Li², Zhuang Pengwei², Xu Qian¹, Zhang Yanjun²

(1 School of Integrative Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2 School of Traditional Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract Objective: To explore the effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUMSCs) on the learning ability and memory of mice SAMP8 with Alzheimer's disease. **Methods:** We cultivated human umbilical cord mesenchymal stem cells, provided three doses HUMSCs ($2.5 \times 10^5/0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$, $5 \times 10^5/0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$, $1 \times 10^6/0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$) for the transplantation of seven months SAMP8 Alzheimer's mice by the tail vein, and set up the normal saline group and normal control group R1 mice for comparison. After 45 days, MORRIS water maze and jumping apparatus were used to test the ability of learning and memory of the subjects. **Results:** Compared with normal control mice R1, normal saline group of SAMP8 Alzheimer's mice performed significantly worse on the learning and memory tests. But there was significant improvement in Morris water maze test compared with the normal saline group, including shorter escape latency ($P < 0.05$) more platform crossing frequencies ($P < 0.05$), and in jumping apparatus including less jumping stand error number ($P < 0.05$) and longer step down latency ($P < 0.05$). **Conclusion:** Low dose of HUMSCs can enhance learning and memory ability of SAMP8 Alzheimer's mice.

Key Words HUMSCs; Transplantation; SAMP8; Learning and memory

中图分类号:R229;R394-3 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.09.024

老年痴呆症是发生在老年期及老年前期的一种原发性退行性脑病,它使老年人记忆、思维、分析判断能力下降,严重影响老年人生活质量。治疗老年痴呆的药物和方法越来越多,实验研究表明多种药物或者运动等方法^[1-3],都可以减缓老年痴呆症的发病进程,但效果仍不是很理想。因此,我们试图通过向老年痴呆成体移植有活力、分化能力强的细胞来阻止老年痴呆症的发病进程。

人脐带间充质干细胞(Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells, HUMSCs)是具有多能性的

一种干细胞,它具有高度自我更新和多向分化潜能的特点,越来越多的研究应用干细胞移植的方法来观察其对老年痴呆小鼠的治疗效果^[4-5],成为干细胞领域的研究热点。因此,本实验拟向老年痴呆小鼠移植脐带间充质干细胞观察能否改善其学习记忆能力,为人类老年痴呆的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SAMP8 老年痴呆小鼠,7 月龄 40 只,对照组 R1 小鼠 10 只,由天津中医药大学第一附

属医院提供,标准鼠饲料常规饲养。

1.1.2 细胞与试剂 人脐带间充质干细胞:协和干细胞基因工程有限公司提供。DMEM/F12、EGF、bFGF、谷氨酰胺、EDTA (Sigma 公司);特优级胎牛血清 (Bioind 公司);青、链霉素 (invitrogen 公司);CO₂ 恒温培养箱 (Forma 3110, Thermo);倒置相差显微镜 (DC300F, Leica), MORRIS 水迷宫 (DMS-2 型, 中国医学科学院药物研究所);YLS-3TB 跳台记录仪 (济南益延科技发展有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 脐带间充质干细胞培养 购买脐带间充质干细胞,以完全培养基培养进行培养(完全培养基为:DMEM/F12, 含 10% FBS、1% PS、1% LG、0.5% EGF、0.5% bFGF),每 2~3 d 换液,细胞长至 80% 融合后传代,培养至稳定生长的第 3 代。

1.2.2 实验分组和细胞移植 实验共分为 5 组,将 40 只 SAMP8 老年痴呆小鼠分为 4 组,每组 10 只,细胞移植高中低 3 个剂量组和移植生理盐水组,正常对照组(R1 小鼠 10 只)。将第 3 代 HUMSCs 接种于 75 cm² 培养瓶,待细胞长至 70% 融合,胰蛋白酶-EDTA 消化,调整细胞至所需浓度,通过尾静脉移植以 2.5 × 10⁵/0.2 mL/20 g、5 × 10⁵/0.2 mL/20 g、1 × 10⁶/0.2 mL/20 g 3 个剂量分别对 SAMP8 进行移植,生理盐水组和正常对照组都尾静脉注射生理盐水。

1.2.3 MORRIS 水迷宫检测 细胞移植后 45 d, MORRIS 水迷宫检测小鼠学习记忆能力^[6],包括小鼠在水中的逃避潜伏期、平均游泳速度、第四象限路程、首次穿越时间和穿越次数,所有实验小鼠均提前熟悉环境 1 d、隐蔽平台试验连续进行 5 d、空间探索试验 1 d,观察小鼠的学习记忆能力。隐蔽平台实验:实验开始前 1 d 让小鼠在不含平台的水池中自由游泳 90 s,训练的时候将动物面朝池壁轻轻放入水中,记录小鼠从入水至爬上平台的时间(即逃避潜伏期),如果 90 s 内小鼠爬上平台,让小鼠在平台上停留 15 s,如果 90 s 内找不到平台,将其潜伏期记为

90 s,并抓起小鼠放在平台上休息 15 s。正式的隐蔽平台实验连续进行 5 d,每天上午下午各测试 1 次,记录每只小鼠的逃避潜伏期。空间探索试验:在 5 d 的隐蔽平台实验结 24 h 后,移走平台,然后将小鼠从相同的象限轻轻放入水中,记录小鼠在 90 s 内的平均游泳速度、在第四象限停留的时间和路程、第 1 次穿越平台位置时间以及穿越平台位置次数。

1.2.4 跳台实验 MORRIS 水迷宫检测结束后 2 d,开始小鼠跳台实验。正式实验前将小鼠放入跳台仪实验平台内,适应环境 5 min,然后将实验小鼠轻放于跳台上,并接通铜栅通电(50 V),从跳台上跳下的小鼠四肢在接触铜栅的时候会受到电击,小鼠为了逃避电击,会跳下跳台返回安全区(若 30 s 内小鼠不跳下跳台,则将其放下跳台),反复学习 5 min,并记录此训练的 5 min 内的触电次数(错误次数)。24 h 后进行重复实验,测试小鼠的记忆能力,将实验小鼠轻放在跳台上,记录小鼠从放在跳台上至第 1 次跳下跳台的时间即潜伏期和 5 min 内的错误次数,作为记忆保持的评价指标。

1.3 统计学方法 各组数据用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 统计软件分析,以方差分析进行显著性检验, $P < 0.05$ 作为统计学差异判定标准。

2 结果

2.1 HUMSCs 的形态 体外培养的 HUMSCs 呈长梭形贴壁生长,胞核清晰位于细胞中央,细胞呈漩涡状迅速生长。

2.2 脐带间充质干细胞移植对 SAMP8 小鼠学习记忆能力的影响

2.2.1 水迷宫实验结果 从逃避潜伏期来看,空白对照组明显优于移植生理盐水组,均有统计学意义($P < 0.05$)。细胞移植各组数值分别处于生理盐水组 and 对照组之间,从第 3 天开始,移植低剂量组明显优于其他浓度的细胞移植组,与移植生理盐水组有统计学意义($P < 0.05$)且优于移植生理盐水组,结果见表 1。

表 1 HUMSCS 移植对小鼠逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常对照组	10	54.88 ± 26.06	42.96 ± 19.88	35.29 ± 19.67 [△]	34.85 ± 23.20 [△]	33.06 ± 18.55 [△]
移植生理盐水组	7	84.61 ± 9.09	61.13 ± 28.85	68.66 ± 27.80 [*]	71.32 ± 21.31 [*]	64.32 ± 19.51 [*]
移植低剂量组	9	77.48 ± 20.50	71.73 ± 19.97 [*]	42.07 ± 24.64 [△]	39.72 ± 18.46 [△]	41.17 ± 28.42 [△]
移植中剂量组	6	74.70 ± 16.41	65.37 ± 19.38	63.53 ± 23.53 [*]	56.23 ± 27.01	75.59 ± 13.82 [*]
移植高剂量组	9	70.18 ± 19.34	68.08 ± 20.75 [*]	62.91 ± 23.99 [*]	71.06 ± 20.77 [*]	58.88 ± 26.84 [*]

注: * 与正常对照组比较, $P < 0.05$, [△] 与移植生理盐水组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 HUMSCS 移植对小鼠空间探索实验的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	平均速度	第四象限时间	第四象限路程	首次穿越时间	穿越次数
正常对照组	10	9.62 ± 0.94	20.04 ± 14.85	200.33 ± 136.21	27.67 ± 19.83	5.20 ± 2.70 [△]
移植生理盐水组	7	8.34 ± 1.69	22.67 ± 6.77	189.49 ± 75.7	22.51 ± 15.46	3.00 ± 2.65 [*]
移植低剂量组	9	7.65 ± 1.9	13.83 ± 6.68	115.39 ± 55.6	36.03 ± 15.34	4.11 ± 2.80 [△]
移植中剂量组	6	8.13 ± 1.09	23.13 ± 16.31	198.7 ± 56.75	46.11 ± 34.10	1.50 ± 1.38
移植高剂量组	9	7.85 ± 1.75	22.37 ± 10.37	174.13 ± 74.5	36.50 ± 26.70	3.33 ± 2.83

注：^{*}与正常对照组比较， $P < 0.05$ ，[△]与移植生理盐水组比较， $P < 0.05$ 。

空间探索测试结果显示了小鼠对隐蔽平台的记忆水平，对照组和尾静脉生理盐水组在穿越次数有统计学意义；和生理盐水组比较，移植低剂量组组穿越原平台位置次数增加，并有统计学意义；各组平均游泳速度、第四象限路程、首次穿越时间差异无统计学意义，总体结果差异不大，结果见表 2。

2.2.2 跳台实验结果 跳台实验中，各组小鼠一次性回避反应功能学习过程中错误次数没有差异，结果见表 3。从潜伏期和错误次数来看，正常对照组明显优于移植生理盐水组，且都具有统计学意义；和移植生理盐水组比较，移植低剂量和高剂量组的潜伏期增加，移植低剂量组的错误次数减少，且有统计学意义，其余各组结果差异无统计学意义，具体结果见表 4。

表 3 HUMSCs 移植对小鼠一次性回避反应功能(学习)的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	错误次数
正常对照组	10	0.90 ± 0.74
移植生理盐水组	7	1.60 ± 1.14
移植低剂量组	9	1.11 ± 1.27
移植中剂量组	6	1.83 ± 0.75
移植高剂量组	9	1.33 ± 1.22

注：各组间比较差异无统计学意义。

表 4 HUMSCs 移植对小鼠一次性回避反应记忆功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	潜伏期	错误次数
正常对照组	10	204.80 ± 124.21	0.40 ± 0.52 [△]
移植生理盐水组	7	88.27 ± 106.69 [*]	1.43 ± 0.98 [*]
移植低剂量组	9	246.84 ± 100.37 [△]	0.33 ± 0.50 [△]
移植中剂量组	6	156.4 ± 157.44	0.50 ± 0.55
移植高剂量组	9	271.70 ± 84.90 [△]	0.67 ± 1.41

注：^{*}与正常对照组比较， $P < 0.05$ ，[△]与移植生理盐水组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

具有多向分化潜能的脐带间充质干细胞被移植到小鼠体内可能分化成为神经干细胞，通过神经修复、重建，发挥延缓老年痴呆的作用。基底前脑是老年痴呆脑皮质下神经元丢失最严重的区域^[7]，该区域含有不同神经元，包括胆碱能神经元和 GABA 能

神经元，这个区域的神经元通过隔-海马通路(主要以乙酰胆碱和 GABA 为递质)与海马相联系^[8]，神经元的缺失造成了老年痴呆小鼠学习记忆障碍^[9]。脐带间充质干细胞移植分化成神经干细胞，继续分化成为神经元，补充了老年痴呆小鼠基底前脑中神经元的损失，阻碍了老年痴呆症的病程发展。

在研究工作进行中，对老年痴呆症的动物模型的选择也有很多。研究表明^[10]，使用乙酰胆碱 M 受体阻断剂也可以制造出老年痴呆动物模型，该模型可造成认知障碍，但缺陷在于缺乏老年痴呆的特殊病理特征，且阻断是可逆的。APP 转基因小鼠模型是国际承认的主要 AD 动物模型之一^[11]，它的原理是将 APP 基因或基因片段整合插入小鼠的基因组中，通过 APP 蛋白在小鼠大脑中积累从而产生老年斑，造成小鼠老年性痴呆，但由于整合的基因突变位点及启动子的不同，所以鼠系背景复杂，导致标准不尽相同，重复性低，最主要的还是该模型动物价格比较昂贵。有些实验使用电损毁模型或外科损毁模型，电损伤 Meynert 基底核，致使动物的大脑皮层乙酰胆碱的含量大大减少，从而造成动物学习记忆障碍^[12]，但是由于这种手术损伤较大，目前已经很少使用。以上这些方法都有其自身的缺陷，或模型不稳定、或不能完全模拟老年痴呆症的发病过程、或价格昂贵成功率不高，在实际操作中，都不易达到本实验的要求。

快速老化小鼠(SAM)是日本京都大学 Takeda 等人通过对 AKR/J 系小鼠进行筛选得到的品系，可分为 2 个亚系，即 P 系和 R 系。P 系称为快速老化小鼠(SAMP)，小鼠慢慢出现脱毛、皮肤粗糙、行为障碍及生存期短等衰老现象，并有明显遗传倾向；R 系称为抗快速老化小鼠(SAMR)，有类似正常老鼠的衰老过程^[13]。目前有 12 个亚系的 SAM 用于研究，其中 SAMP8 小鼠的衰老现象主要以学习记忆功能呈增龄性衰退，中枢神经系统如皮层、海马等部位发生病理学改变为主^[14-15]。研究表明，SAMP8 小鼠在饲养过程中脑内 β 淀粉样肽(A β)慢慢的出现沉

积^[16],而且学习记忆功能相关的脑内神经递质也逐渐发生改变,如大脑皮层和海马的乙酰胆碱、去甲肾上腺素的含量降低,阿片肽、 γ -氨基丁酸的含量升高,5-羟色胺的含量先升高后降低等^[17-18]。SAMP8 小鼠脑内脂质过氧化物的水平比同龄 SAMR1 小鼠更高,同时伴有氧化-抗氧化系统紊乱,从而出现氧化应激损伤^[16,19],更有明显的线粒体功能紊乱现象^[20]。所以我们选择 SAMP8 小鼠。

本实验所选择的 SAMP8 小鼠在 4 月龄即出现明显的老化征象^[21],而且在其成熟期(4~6 个月)过后发生快速老化,学习记忆能力也表现出增龄性减退,随着衰老的发生,SAMP8 模型小鼠表现出严重的学习记忆功能障碍。实验中通过尾静脉向 7 月龄 SAMP8 老年痴呆小鼠移植高中低 3 个剂量的 HUMSCS,45 d 利用 MORRIS 水迷宫和跳台实验检测其学习记忆能力,并设立生理盐水组和 R1 小鼠正常对照组,结果发现与 R1 正常对照小鼠比较,SAMP8 老年痴呆小鼠生理盐水组学习记忆能力明显降低,细胞移植各组小鼠学习记忆能力介于生理盐水组和正常对照组之间,其中尾静脉细胞移植低剂量组与尾静脉生理盐水组比较,差异具有统计学意义,所以认为低剂量的 HUMSCS 移植对老年痴呆小鼠的学习记忆能力有改善作用。

以高中低 3 个剂量($2.5 \times 10^5/0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$ 、 $5 \times 10^5/0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$ 、 $1 \times 10^6/0.2 \text{ mL}/20 \text{ g}$)的 HUMSCS 分别向 SAMP8 老年痴呆小鼠移植后,细胞移植高剂量组的 SAMP8 小鼠的逃避潜伏期、不同象限的停留时间、跳台实验中的错误次数及最后小鼠体重等指标都不如移植低剂量的效果好,推测可能是由于细胞浓度过高,且直接移植到动脉造成动脉栓塞,导致 SAMP8 小鼠状态不佳,其具体原因仍需要实验作为依据,后续实验会继续探究其原因。

参考文献

- [1] 许冠恩. 运动对老年痴呆症的影响[J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(1): 91.
- [2] 王芳媛. 体育运动对老年痴呆症的预防及运动处方的制定[J]. 辽宁体育科技, 2005, 27(2): 42-43.
- [3] 韩璇, 王永丽, 问慧娟, 等. 灯盏花抗老年痴呆作用的研究进展[J]. 医学研究与教育, 2011, 28(1): 76-78.
- [4] 崔渊博, 马珊珊, 姚宁, 等. 人脐带间充质干细胞移植对老年痴呆小鼠脑、肝组织中衰老相关基因表达的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2015, 50(1): 25-29.
- [5] 王毅鹏, 金醒昉. 人脐带间充质干细胞移植治疗血管性痴呆的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(3): 827-829.
- [6] 褚芹, 于建春, 潘建明, 等. 快速老化模型小鼠 SAMP8 行为学的增龄性变化[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(10): 1801-1804.
- [7] Gritti I, Henny P, Galloni F, et al. Stereological estimates of the basal

- forebrain cell population in the rat, including neurons containing choline acetyltransferase, glutamic acid decarboxylase or phosphate-activated glutaminase and colocalizing vesicular glutamate transporters [J]. Neuroscience, 2006, 143(4): 1051-1064.
- [8] Winters BD, Dunnett SB. Selective lesioning of the cholinergic septo-hippocampal pathway does not disrupt spatial short-term memory: a comparison with the effects of fimbria-fornix lesions [J]. Behav Neurosci, 2004, 118(3): 546-562.
- [9] Gluck MA, Myers C, Meeter M. Cortico-hippocampal interaction and adaptive stimulus representation: a neurocomputational theory of associative learning and memory [J]. Neural Netw, 2005, 18(9): 1265-1279.
- [10] 田金洲, 时晶, 苗迎春, 等. 阿尔茨海默病的流行病学特点及其对公共卫生观念的影响[J]. 湖北中医学院学报, 2009, 11(1): 3-7.
- [11] 赖永长, 侯军代, 张晓裕, 等. 去痫灵对阿尔茨海默病模型动物的预防性作用[J]. 中成药, 2011, 33(5): 757-761.
- [12] 赵淑梅, 左凤英. 呆聪液对老龄大鼠痴呆模型免疫功能的影响[J]. 潍坊医学院学报, 2000, 22(1): 11-12.
- [13] Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM): with special reference to age associated pathologies and their modulation [J]. Nipp on Eiseigaku Zasshi, 1996, 51(2): 569-578.
- [14] Chan YC, Hosoda K, Tsai CJ, et al. Favorable effects of tea on reducing the cognitive deficits and brain morphological changes in senescence-accelerated mice [J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2006, 52(4): 266-273.
- [15] Liao JW, Hsu CK, Wang MF, et al. Beneficial effect of Toona sinensis Roemer on improving cognitive performance and brain degeneration in senescence-accelerated mice [J]. Br J Nutr, 2006, 96(2): 400-407.
- [13] Petursdottir AL, Farr SA, Morley JE, et al. Lipid peroxidation in brain during aging in the senescence-accelerated mouse (SAM) [J]. Neurobiol Aging, 2007, 28(8): 1170-1178.
- [16] Zhao XH, Nomura Y. Age-related changes in uptake and release on L2[3H] noradrenaline in brain slices of senescence-accelerated mouse [J]. Int J Dev Neurosci, 1990, 8(3): 267-272.
- [17] Flood JF, Farr SA, Uezu K, et al. Age-related changes in septal serotonergic, GABAergic and glutamatergic facilitation of retention in SAMP8 mice [J]. Mech Ageing Dev, 1998, 105(122): 173-188.
- [18] 刘一凡, 石学敏, 韩景献, 等. 针刺对快速老化脑萎缩模型小鼠脑抗氧化酶活性的影响[J]. 中国针灸, 2002, 22(5): 327-330.
- [19] Xu J, Shi C, Li Q, et al. Mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of senescence-accelerated mice [J]. J Bioenerg Biomembr, 2007, 39(2): 195-202.
- [20] Pouzet B, Zhang WN, Feldon J, et al. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies [J]. Behav Brain Res, 2002, 133(2): 279-291.
- [21] 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, 3(6): 614-618.
- [22] 谷海刚, 龙大宏, 李晓滨, 等. 神经干细胞移植对老年痴呆模型鼠基底前脑小白蛋白阳性神经元和学习记忆能力的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(12): 2235-2239.