



人造血干细胞人源化小鼠的疝气表型分析

施海霞, 陈 炜, 邓 巍, 梁 虹

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 研究成年雄性人源化小鼠个体出现疝气症状的原因和对人源化小鼠的影响。方法 利用显微注射法构建人造血干细胞人源化小鼠, 对疝气表型特征、小鼠行为、生理和病理变化进行了研究。结果 2月龄雄性人源化小鼠出现直接性疝气症状, 腹股沟区致密结缔组织结构减少可能是疝气形成的主要原因。疝气小鼠同时伴有耐力和运动协调性下降, 但疝气对小鼠的繁殖系统无显著影响。结论 雄性人造血干细胞人源化小鼠具有显著的疝气症状, 其发生机理有待进一步研究。

【关键词】 造血干细胞; 人源化小鼠; 疝气; Rota-rod 转轮

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)05-0056-04

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.05.012

Injection Human Hematopoietic Stem Cells into Murine Blastocysts Causes Herniation in Adult Humanized Mice

SHI Hai-xia, CHEN Wei, DENG Wei, LIANG Hong

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicines, Ministry of Health;
Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences,
Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the cause of formation of herniation found in adult male humanized mice and the effect of that herniation on humanized mice. **Methods** Construction humanized mice with the method of injection human hematopoietic stem cells into murine blastocysts. The phenotypic characteristics and pathological mechanism of herniation, the effects of herniation on behavior and physiological reaction of humanized mice were analyzed. **Results** 2 months of age or older male humanized mice developed direct inguinal hernias. The loss of dense connective tissue may be the main reason of the inguinal hernias. The motor coordination and endurance of humanized mice decreased as compared with wild-type mice, but the reproductive system of male humanized mice have no difference from the wild-type mice. **Conclusions** Adult male humanized mice suffer from inguinal hernias, the formation mechanism of which should be further researched.

【Key words】 Hematopoietic stem cells; Humanized mice; Herniation; Rota-rod

人源化动物在人类疾病与再生医学研究中具有广泛应用, 人源化小鼠的出现为在活体内进行人类生物学、生理与病理学研究提供了可能。2002年, Harder 等^[1]最早报道将人脐血造血干细胞注射

到小鼠囊胚中构建人源化小鼠, 这种免疫系统尚未成熟的小鼠早期胚胎为人脐血干细胞的存活和分化提供了适宜的异种体内微环境, 在成年小鼠造血系统中可检测到人源化细胞的嵌合。这种模型不

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务项目支持(DWS201013)。

[通讯作者] 梁虹, E-mail: liangh@cnilas.org。

仅可作为人造血干细胞体内检测的实验模型,而且可通过人造血干细胞连续多次植入、人基质细胞共植入和人特异性细胞因子动员等方法提高嵌合体中的人源细胞比例,具有巨大的潜在应用价值。

本课题组利用造血干细胞囊胚显微注射法构建了人源化小鼠造血嵌合体模型,在 2 月龄人源化小鼠中仍可检测到人源化细胞的存在^[2],但 2 月龄雄性人源化小鼠中出现显著的疝气症状。本文对疝气的病因、对动物生理、行为表型及对模型应用的潜在影响进行了研究。

1 材料和方法

1.1 人造血干祖细胞制备

正常健康新生儿脐血由北京市脐带造血干细胞库提供(孕母排除病毒性肝炎、艾滋病和梅毒感染)。脐血用肝素钠抗凝,12 h 内分选。用 Ficoll Paque PLUS 淋巴细胞分离液(密度 1.077, GE Healthcare 公司)以不连续密度梯度离心,收集界面白膜层悬浮细胞即为脐血单个核细胞(MNC),MNC 再经 EasySep 复选人造血干祖细胞(含 CD41)试剂盒(stemcell 公司)分选获得人造血干祖细胞。

1.2 干细胞囊胚显微注射

以 3~4 周龄 ICR 雌鼠作为囊胚供体鼠。采用 PMSG 和 hCG 进行超排处理,第 2.5 天取桑椹胚,KSOM 液培养过夜,次日囊胚充分扩张后进行造血干细胞的显微注射,每个囊胚内注射 15~20 枚造血干细胞,移植入假孕鼠 2.5 d 子宫中。

1.3 人源化小鼠的鉴定

小鼠出生后 9~14 d 剪尾,碱裂解法提取基因组 DNA,用人线粒体 DNA 特异性引物进行 PCR 检测:hmtDNA-FP:5' CAC CCT ATT AAC CAC TCA CG 3'; hmtDNA-RP: 5' ATG TCT GTG TGG AAA GCG 3',扩增产物大小为 264 bp。反应条件:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环,72 °C 延伸 10 min。

1.4 病理学观察

小鼠断颈处死,取 5 只疝气症状的人源化阳性小鼠和 5 只野生型小鼠的腹股沟区和阴囊组织,10% 中性福尔马林(neutral buffered formalin, NBF)固定,脱水,石蜡包埋,切片厚度 10 μm,Masson 染色观察胶原纤维含量。采用特异性人 CD45 抗体(abcom ab8216)进行免疫组织化学染色,检测相应

组织中的人源化细胞的表达。

1.5 行为学检测

选用 2 月龄的人源化阳性和阴性雄性小鼠各 9 只,野生型小鼠 10 只,采用 modified SHIRP 进行行为学初筛^[3]。随后采用 Rota-rod 转轮测试仪(UGO 公司,意大利)进行小鼠运动与耐力测定,参数设置:最小速度为 5 rpm,最大速度为 20 rpm,加速度时间为 5 min,将实验小鼠分别放到相应的跑道上,开启仪器,记录动物的爬行持续时间。最后,采用 Morris 水迷宫进行运动型和游泳耐力测定,水温 25 °C,记录动物在 1 min 内的游泳距离、速度和活跃期时间。

1.6 数据统计

实验结果采用平均值 ± SE 表示,并用 SPSS 软件对数据进行统计,数据经正态分布和方差齐性检验后,采用独立样本 *t* 检验对人源化阳性组合野生型对照组数据进行统计,采用 one-way ANOVA 分析对阳性组、阴性组和野生对照组数据进行统计分析。当 $P < 0.05$ 时为差异显著。

2 结果

本研究通过干细胞显微注射法将人脐血干祖细胞注射到小鼠囊胚中,成功获得了人源细胞嵌合体小鼠,嵌合体阳性率为 23%^[2]。在 20 只人源化雄性小鼠中,有 90% 的个体出现程度不一的疝气症状,本研究对这些疝气症状小鼠进行了病理学、生理学和行为学表型分析:

1. 病理观察

我们解剖了 5 只 2 月龄以上的雄性小鼠,小鼠的体表外观上可见程度不等的阴囊肿胀,剪开疝囊,内容物包括小肠、大肠、膀胱等腹部脏器(彩插 8 图 1),这些内容物不可回缩至腹腔。

镜下 Masson 染色显示,与野生型小鼠相比,人源化嵌合体小鼠腹膜腹股沟区致密结缔组织减少(彩插 8 图 2)。但免疫组化研究结果表明,这些病变组织中不存在人源化细胞。

2. 睾丸系数与血液激素含量

人源化嵌合体阳性和阴性及野生型雄性小鼠的睾丸系数($F_{2,10} = 2.982, P = 0.108$)、血液睾酮($F_{2,10} = 0.009, P = 0.991$)和皮质酮($F_{2,10} = 0.008, P = 0.992$)浓度之间均无显著差异。

表 1 人源化小鼠繁殖系统功能
Tab.1 Mean values of reproductive system function

参数 Parameters	人源化小鼠 Humanized mice	人源化阴性小鼠 Humanized negative mice	野生型小鼠 Wide type mice
睾丸系数 Testicular coefficient	0.639 ± 0.258	0.6893 ± 0.035	1.257 ± 0.253
睾酮 (ng/mL) Testosterone	80.365 ± 55.649	82.128 ± 16.256	87.510 ± 18.562
皮质酮 (nmol/mL) Corticosterone	0.642 ± 0.524	0.628 ± 0.162	0.693 ± 0.314

3. 运动行为学

对人源化小鼠行为学初筛表明,在尾巴姿势和反抗行为这两个指标上,人源化小鼠、人源化阴性小鼠和野生型小鼠之间具有显著差异(尾巴姿势: $F = 3.571, P = 0.043$; 反抗行为: $F = 3.551, P = 0.044$),其中,人源化小鼠的尾巴姿势得分显著高于野生型小鼠($P = 0.014$),人源化小鼠尾巴上翘的比例高于野生型小鼠,这可能是因为阴囊肿大引起的尾巴姿势变化,而不代表动物的应激性升高。人源化小鼠的逃逸行为($P = 0.03$)和反抗行为($P = 0.015$)显著低于阴性嵌合小鼠。人源化小鼠的正位反射($P = 0.034$)高于野生型小鼠。人源化小

鼠的抓力($P = 0.027$)显著低于野生型小鼠,表明小鼠的后肢运行协调性下降(表 2)。

在 Rota-rod 转轮实验中,各组之间具有显著差异($F_{2,25} = 4.330, P = 0.024$)。其中,阳性和人源化阴性小鼠在转棒上的运动持续时间均显著低于野生型小鼠($P = 0.03; P = 0.012$)。

各组小鼠在游泳距离($F_{2,26} = 3.572, P = 0.043$)、速度($F_{2,26} = 3.546, P = 0.043$)上具有显著差异,人源化小鼠的游泳距离和速度显著低于野生型小鼠($P = 0.014$)而各组小鼠的活跃期时间($F_{2,26} = 1.373, P = 0.271$)无显著差异。

表 2 Modified SHIRPA 行为学实验结果
Tab.2 Behavior analysis in modified SHIRPA

行为参数 Behavioral parameters	人源化小鼠 Humanized mice	人源化阴性小鼠 Humanized negative mice	野生型小鼠 Wide type mice
活跃性	1.667 ± 0.167	1.556 ± 0.242	1.400 ± 0.221
排便	0.333 ± 0.167	0.556 ± 0.176	0.600 ± 0.163
震惊反射	1.889 ± 0.111	1.778 ± 0.147	1.700 ± 0.153
穿格数	15.556 ± 1.591	14.556 ± 2.199	18.100 ± 2.084
尾巴姿势	1.667 ± 0.167 *	1.222 ± 0.278	1.000 ± 0.000 *
逃逸行为	0.400 ± 0.163 *	1.000 ± 0.236	1.111 ± 0.261 *
反抗行为	2.111 ± 0.351 *	3.000 ± 0.000 *	2.700 ± 0.213
正位反射	0.667 ± 0.167 *	0.222 ± 0.147 *	0.200 ± 0.133 *
抓力	0.556 ± 0.176 *	0.667 ± 0.167	0.750 ± 0.083 *

表 3 Rota-rod 转轮实验
Tab.3 The Rota-rod Test

行为参数 Behavioral parameters	人源化小鼠 Humanized mice	人源化阴性小鼠 Humanized negative mice	野生型小鼠 Wide type mice
运动时间(s) Movement times	99.889 ± 16.451	89.111 ± 17.647	159.600 ± 20.616

表 4 人源化小鼠的游泳实验
Tab.4 Mean values of swim test

行为参数 Behavioral parameters	人源化小鼠 Humanized mice	人源化阴性小鼠 Humanized negative mice	野生型小鼠 Wide type mice
运动距离 (cm)	1322.830 ± 55.598 *	1432.222 ± 59.008	1595.109 ± 90.404 *
活跃期时间 (s)	51.076 ± 1.925	55.031 ± 1.368	54.284 ± 1.816
速度 (cm/s)	22.077 ± 0.928 *	24.003 ± 0.984	26.621 ± 1.509 *

3 讨论

耻骨肌孔 (myopectineal orifice) 是一个位于腹股沟区的卵圆形裂孔, 仅以一层腹横筋膜结缔组织抵抗腹腔内压力, 这部位区域的薄弱会引起疝气形成^[4]。本研究表明人源化小鼠腹股沟区致密结缔组织减少, 致密结缔组织是筋膜鞘的主要组分, 因此致密结缔组织的减少可能是疝气形成的直接原因。并且, 疝气仅在 2 月龄以上成年雄性个体中发生。因此, 人源化小鼠疝气表型属于直接性腹股沟疝。

研究发现睾丸和精索由腹股沟管下降到阴囊的过程受雄激素的调节, 儿童可因疝气的挤压而影响睾丸的正常发育^[5,6]。本研究结果表明人源化小鼠的疝气症状不影响睾丸的大小和功能, 疝气发生与睾酮变化无显著相关性, 这与人类男性腹股沟疝的发生与雄激素变化无关的结果相一致^[7,8]。而在形成间接腹股沟疝的 *Insl3* 转基因小鼠中, 鞘状突的形成与雄激素介导的睾丸引带外突也无相关性。

人类疝气患者具有易疲劳和体质下降等症状。本研究也发现, 造血干细胞人源化小鼠的运动机能和耐力均显著下降, 但与运动兴奋性相关的皮质酮激素含量却无显著变化。以往对人源化小鼠的相关研究发现, 恒河猴骨髓间充质干细胞嵌合体小鼠在悬尾实验时具有四肢抱拢的反常现象^[9]。而在本研究中, modified SHIRPA 行为观察发现, 人源化小鼠的正位反射高于野生型小鼠, 即悬尾状态下动物头部抬起概率增加。这与上述现象不同, 但均说明嵌合体小鼠的神经系统或运动系统中存在某种异常反射。提示在神经系统或运动系统中有异源动物细胞嵌合, 灵长类与小鼠神经细胞及神经系统反射机制的巨大差别可能是前述现象发生的原因。

异种动物造血嵌合体模型在人造血干细胞体内生物学特性、人类免疫相关疾病及其它应用研究方面具有巨大的应用潜力。目前常见的重症联合

免疫缺陷小鼠干细胞移植系统在人类免疫系统功能塑造方面存在一定局限。在免疫系统尚未成熟的胚胎发育早期进行的人源干细胞显微注射嵌合体小鼠是方法学上的一种新突破, 对这种人源化小鼠的表型分析是该模型进一步应用的基础, 本研究表明人源化小鼠的疝气表型对于小鼠运动性和耐力具有显著抑制, 但不影响小鼠的繁殖系统功能。

参考文献:

- [1] Harder F, Kirchof Petrovic S, et al. Developmental potentials of hematopoietic and neural stem cells following injection into pre-implantation blastocysts [J]. *Ann Hematol*. 2002, 81 (Suppl2): S20 - S21.
- [2] 陈炜, 冯娟, 施海霞, 梁虹, 张连峰. 人源化小鼠人源细胞检测方法 [J]. *中国比较医学杂志*. 2010, 7: 63 - 66.
- [3] 梁虹, 宋铭晶, 施海霞, 潘思丹, 张连峰. *DHCR24* 转基因小鼠的性别特异性自主活动和应激反应 [J]. *中国现代医药杂志*, 2009, 11(1): 1 - 5.
- [4] McLaughlin PJ, Bakall B, Choi J, Liu Z, Sasaki T, Davis EC, Marmorstein AD, Marmorstein LY. Lack of fibulin - 3 causes early aging and herniation but not macular degeneration in mice [J]. *Human Molecular Genetics*, 2007, 16(24): 3059 - 3070.
- [5] Baumans V, Dijkstra G, Wensing CJG 1983 The role of a non-androgenic testicular factor in the process of testicular descent in the dog [J]. *Int J Androl* 6: 541 - 552.
- [6] McMahon DR, Kramer SA, Husmann DA 1995 Antian drogen-induced cryptorchidism in the pig is associated with failed gubernacular regression and epididymal malformations [J]. *Urol* 154: 553 - 557.
- [7] Hutson JM, Breasley SW 1988 Embryological controversies in testicular descent. *Semin Urol* 6: 68 - 73.
- [8] Heyns CF, Hutson JM 1995 Historical review of theories on testicular descent. *J Urol* 153: 754 - 767.
- [9] 迟晓春, 陈曦, 杨京京, 等. 显微注射技术的改进和用灵长类间充质干细胞制备嵌合体小鼠 [J]. *解剖学杂志*, 2004, 27(2): 207 - 209.

[修回日期] 2012-0-0