

· 研究原著 ·

碱性成纤维细胞生长因子基因真核表达载体转染骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病

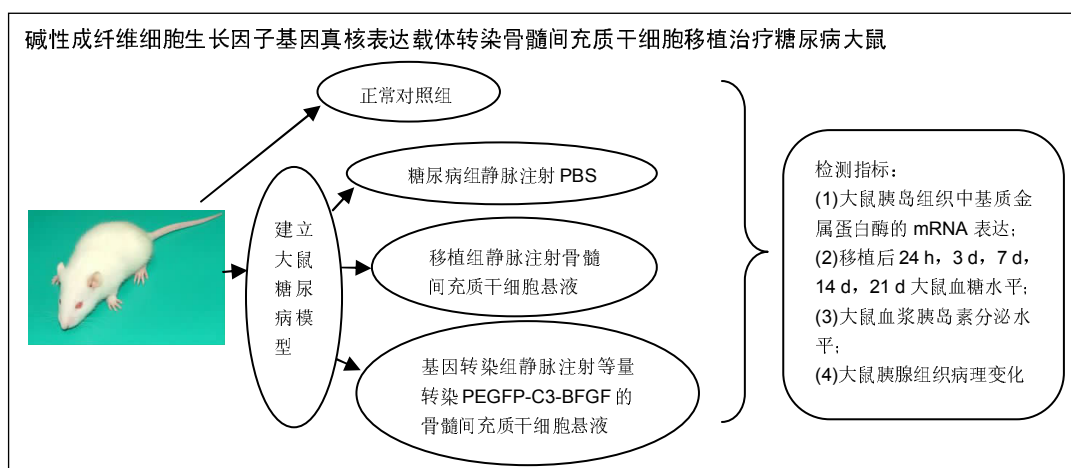
田雪品, 刘海英(承德市中心医院内分泌科, 河北省承德市 067000)

引用本文: 田雪品, 刘海英. 碱性成纤维细胞生长因子基因真核表达载体转染骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(36):5385-5391.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.36.010

ORCID: 0000-0002-5123-9594(田雪品)

文章快速阅读:



田雪品, 女, 1980 年生, 河北省承德市人, 汉族, 2015 年河北医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事内分泌研究。

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2016)36-05385-07

稿件接受: 2016-07-12

文题释义:

转染: DNA 小片段插入体细胞或细胞系的过程。若此 DNA 未与宿主细胞 DNA 整合而获表达, 称“瞬时转染(transient transfection)”；若与宿主细胞 DNA 整合并随后者的复制而复制称“稳定转染(stable transfection)”。

胰岛素抵抗: 是指各种原因使胰岛素促进葡萄糖摄取和利用的效率下降, 机体代偿性的分泌过多胰岛素产生高胰岛素血症, 以维持血糖的稳定。胰岛素抵抗易导致代谢综合征和 2 型糖尿病。20 世纪 50 年代 Yallow 等应用放射免疫分析技术测定血浆胰岛素浓度, 发现血浆胰岛素水平较低的病人胰岛素敏感性较高, 而血浆胰岛素较高的人对胰岛素不敏感, 由此提出了胰岛素抵抗的概念。

摘要

背景: 研究证实骨髓间充质干细胞可以明显提高糖尿病大鼠胰岛功能恢复及改善高血糖状态, 可能与自体胰腺干细胞分化能力增强有关。

目的: 验证碱性成纤维细胞生长因子基因真核表达载体(PEGFP-C3-BFGF)转染骨髓间充质干细胞并移植入糖尿病大鼠体内后, 对大鼠糖尿病的治疗效果。

方法: 通过重组腺病毒(Ad.aFGF)介导 PEGFP-C3-BFGF 转染入骨髓间充质干细胞, 利用荧光显微镜观察 PEGFP-C3-BFGF 的表达。将 80 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、糖尿病组、移植组及基因转染组, 每组 20 只, 采用链脲佐菌素(STZ)腹腔注射建立大鼠糖尿病模型, 模型建立后于对照组给予门静脉注射生理盐水, 糖尿病组门静脉注射 PBS 液, 移植组门静脉注射骨髓间充质干细胞悬液 1 mL, 基因转染组门静脉注射等量转染 PEGFP-C3-BFGF 的骨髓间充质干细胞悬液。利用 RT-PCR 法检测各组大鼠胰岛组织中基质金属蛋白酶的 mRNA 表达差异; 检测移植后 24 h, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d 各组大鼠血糖水平; 移植后 3 周利用 ELISA 法检测各组大鼠血浆胰岛素分泌水平; 苏木精-伊红染色观察大鼠胰腺组织病理变化。

结果与结论: ①荧光显微镜观察到 PEGFP-C3-BFGF 转染入骨髓间充质干细胞 48 h 后, 呈现出明显的特异性绿色荧光; ②移植后 2 周与对照组比较, 糖尿病组的基质金属蛋白酶 mRNA 表达明显增加($P < 0.05$), 移植组及基因转染组基质金属蛋白酶 mRNA 的表达较糖尿病组明显下降($P < 0.05$); ③移植后不同时间点各组大鼠血糖比较, 基因转染组<移植组<糖尿病组, 但基因转染组仍>对照组(均 $P < 0.05$); ④移植后不同时间点各组大鼠血浆胰岛素分泌水平比较, 基因转染组>移植组>糖尿病组, 但基因转染

Tian Xue-pin, Master,
Attending physician,
Department of
Endocrinology, Chengde
Central Hospital, Chengde
067000, Hebei Province,
China

组仍<对照组(均 $P < 0.05$); ⑤各组大鼠胰腺组织病理情况比较, 移植组优于糖尿病组, 基因转染组又优于移植组, 接近于对照组。⑥结果说明, PEGFP-C3-BFGF 转染骨髓间充质干细胞移植入糖尿病大鼠体内, 可以改善大鼠血糖水平, 促进胰岛素的分泌, 其可能是通过下调基质金属蛋白酶 mRNA 的表达从而改善大鼠糖尿病病变程度。

关键词:

干细胞; 移植; 糖尿病; PEGFP-C3-BFGF; 转染; 骨髓间充质干细胞; 大鼠; 疗效

主题词:

干细胞; 间质干细胞; 移植; 糖尿病; 成纤维细胞生长因子2; 组织工程

Effect of basic fibroblast growth factor gene transfection on bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for diabetes mellitus

Tian Xue-pin, Liu Hai-ying (Department of Endocrinology, Chengde Central Hospital, Chengde 067000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Existing studies have shown that bone marrow mesenchymal stem cells can significantly improve islet function in diabetic rats to decrease excessively high blood glucose level, which may be related to the enhancement of differentiation ability of autologous pancreatic stem cells.

OBJECTIVE: To observe the therapeutic efficacy of basic fibroblast growth factor gene eukaryotic expression vector (PEGFP-C3-BFGF) transfection of bone marrow mesenchymal stem cells in diabetic rats.

METHODS: Recombinant adenovirus (Ad.aFGF) mediated PEGFP-C3-BFGF was transfected into bone marrow mesenchymal stem cells, and PEGFP-C3-BFGF expression was observed using fluorescence microscopy. Eighty Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group, diabetes group, transplantation group, gene transfection group, with 20 rats in each group. After modeling, rats in different groups were given portal vein injection of normal saline, PBS, 1 mL of bone marrow mesenchymal stem cell suspension, and 1 mL of PEGFP-C3-BFGF-transfected bone marrow mesenchymal stem cell suspension. RT-PCR method was used to detect mRNA expression of matrix metalloproteinases in pancreatic tissue of rats in each group. Blood glucose levels of rats were detected at 24 hours, 3, 7, 14, 21 days after transplantation. ELISA method was used to detect plasma insulin levels in rats. Pathological changes of the pancreas were observed using hematoxylin-eosin staining.

RESULTS AND CONCLUSION: Under the fluorescence microscope, PEGFP-C3-BFGF transfected into cells after 48 hours showed significant specific red fluorescence. Two weeks after transplantation, matrix metalloproteinases mRNA expression was significantly increased in the diabetes group compared with the control group ($P < 0.05$), while it was decreased in the transplantation and gene transfection groups compared with the diabetes group ($P < 0.05$). After transplantation, the blood glucose levels in rats were ranked as follows: control group < gene transfection group < transplantation group < diabetes group ($P < 0.05$), and the plasma insulin levels in rats ranked as follows: control group > gene transfection group > transplantation group > diabetes group ($P < 0.05$). Pathological findings of the pancreas showed that the transplantation group was superior to the diabetes group, but inferior to the gene transfection group that was similar to the control group. All these findings indicate that PEGFP-C3-BFGF-transfected bone marrow mesenchymal stem cell transplantation can improve blood glucose levels and stimulate insulin secretion in diabetic rats, which may improve the severity of diabetes mellitus by decreasing the mRNA expression of matrix metalloproteinases.

Subject headings: Stem Cells; Mesenchymal Stem Cells; Transplantation; Diabetes Mellitus; Fibroblast Growth Factor 2; Tissue Engineering

Cite this article: Tian XP, Liu HY. Effect of basic fibroblast growth factor gene transfection on bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for diabetes mellitus. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(36):5385-5391.

0 引言 Introduction

流行病学资料显示,糖尿病的发病率不断升高,已经严重威胁到人类的生命健康^[1-3]。一直以来口服药物及胰岛素被视为治疗糖尿病的主要手段^[4]。目前采用基因工程手段建立内源性胰岛素排泄得到了人们广泛的关注^[5-6],但由于排异反应和来源不足等问题,限制其广泛应用于临床。骨髓间充质干细胞是成体干细胞的一种,可向不同方向分化^[7-8],在特定环境中,能够分化为多种组织类型的非造血细胞^[9-14]。加之具有易培养、增殖快、不涉及德行和伦理学争端等优点,为糖尿病的血糖控制及延缓疾病进展提供了有效手段,在未来的医学发展中很可能成为首选手段^[15]。

碱性成纤维细胞生长因子具有极其广泛的作用和至关重要的价值,能够维持人胚胎干细胞的未分化状态;还能够调控人骨髓间充质干细胞的迁移分化从而参与血糖的调节。许多体内外实验均表明外源性植入碱性成纤维细胞生长因子能明显改善血糖状态,但是植入于体内的外源性碱性成纤维细胞生长因子易于降解,影响其疗效^[16]。随着基因工程中分子生物学技术的出现及广泛应用,可将碱性成纤维细胞生长因子基因转染至种子细胞骨髓间充质干细胞中,使其能够超表达碱性成纤维细胞生长因子蛋白以达到治疗糖尿病的目的。但碱性成纤维细胞生长因子基因转染是否影响骨髓间充质干细胞的生长特性而达到治疗糖尿病的目的?为此,文章将构建的碱性成纤维细胞生长因子真核分泌表达载体 PEGFP-C3-BFGF 转染至分离培养的骨髓间充质干细胞中,观察碱性成纤维细胞生长因子基因转染对骨髓间充质干细胞生长特性的影响,以便进一步研究碱性成纤维细胞生长因子基因转染骨髓间充质干细胞对血糖的调控能力。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年10月至2015年11月在河北省动物实验室完成。

1.3 材料

实验动物: 80只雌雄不限的SD大鼠,体质量150-200 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号: SCXK(冀)2007-0005。SD大鼠随机分为正常对照组、糖尿病组、移植组及基因转染组4组,每组各20只,单独放于4个笼子里。保持动物良好的卫生条件,允许其自由采食,并给与供水。其中:①对照组给

予门静脉注射生理盐水;②糖尿病组门静脉注射PBS;③移植组门静脉注射骨髓间充质干细胞悬液1 mL;④基因转染组门静脉注射等量转染PEGFP-C3-BFGF的骨髓间充质干细胞悬液。

实验材料及来源: EGFP-C3-bFGF由医学实验科保存;限制性内切酶EcoR I、Hind III、T₄ DNA连接酶(大连宝生物工程有限公司),TaqDNA聚合酶(BioLabs, NEWENGLAND),含有EGFP的真核表达载体(pEGFP-C3, Invitrogen, USA),质粒提纯试剂盒、DNA胶纯化试剂盒(Promega, USA),含bFGF cDNA的质粒PBR322_bFGF(军事医学科学院七所施明老师惠赠),骨髓间充质干细胞(Cell Applications公司),大肠杆菌Topi0感受态(本实验室保存),2 000 DNA Marker、1 kb DNA Marker(大连宝生物工程有限公司)。抗生素PSA(Cascade公司); LipofectamineTM2000脂质体转染试剂及Trizol(Invitrogen公司); 苏木精染液(解放军总医院第一附属医院全军创伤修复重点实验室)。

1.4 方法

1.4.1 荧光染色标记转染PEGFP-C3-BFGF的骨髓间充质干细胞 采用LipofectamineTM2000脂质体转染法进行操作。①转染前5.0-6.0 h进行新培养基的更换;②将质粒和骨髓间充质干细胞培养基均置于无菌EP管中,轻轻晃动,使其均匀;③将脂质体和培养基均置于EP管中,并进行晃动,室温温育;④将步骤②、③结束时得到的液体进行混合,并在室温下温育;⑤将上一步中得到的混合液加入到培养孔以及培养瓶中,晃动使其均匀;⑥置于37 °C、体积分数5%CO₂恒温培养箱培养6 h;⑦弃去液体,按照0.5 mL/孔的标准在24孔板中加入耐骨髓间充质干细胞培养基,按照1.5 mL/孔于6孔板中加入骨髓间充质干细胞培养基,加入3 mL骨髓间充质干细胞培养基于25 cm²培养瓶中,将其放于培养箱中待用;⑧36 h末,对各个的表达情况进行测定。25 cm²塑料培养瓶中PEGFP-C3-BFGF转染至骨髓间充质干细胞,培养36 h后,在488 nm波长处对荧光的产生情况进行测定,并选取5个随机视野,对其荧光阳性细胞数和该视野中总的细胞数进行观察,计算按上述步骤操作后的转染情况。

1.4.2 采用链脲佐菌素(STZ)腹腔注射 禁食12 h后,于大鼠尾静脉处取血测定血糖值,然后按照60 mg/kg剂量体内注射链脲佐菌素,再次于同一部位取血,检测糖尿病模型是否建造成功。若造模后空腹血糖值≥6.7 mmol/L,且具有糖尿病三多一少的症状,即为糖尿病造模成功^[17]。STZ模型创立后于对照组经静脉途径给

予0.9%NaCl, 糖尿病组经静脉途径给予等量PBS, 移植组经静脉途径给予1 mL 骨髓间充质干细胞悬液(含 1×10^7 个细胞), PEGFP-C3-BFGF组经静脉途径给予等量转染PEGFP-C3-BFGF的骨髓间充质干细胞悬液。

1.4.3 RT-PCR检测基质金属蛋白酶 mRNA表达 移植后2周, 参照Trizol中提到的实验步骤提取各组大鼠胰岛组织RNA。将RNA进行反转录, 再将得到的产物进行扩增反应, 其中cDNA合成及反应的内参照以 β -actin为准。PCR所用的引物序列: 基质金属蛋白酶上游引物为5'-CTG AAG TGT CAC AGC CTG TTT-3', 下游引物为5'-CAC ACA TGC GTG AAA CCT GTA-3'; β -actin: 上游引物为5'-TAT CGG ACG CCT GGT TAC-3', 下游引物为5'-CTC AGC CTT GAC TGT GCC-3'。PCR反应条件: 94 °C变性1 min, 55 °C退火45 s, 72 °C延伸1 min, 循环32周后72 °C延伸7 min。每一步反应均进行重复操作3次。对得到的终产物进行测定, 计算mRNA表达量。

1.4.4 检测血糖水平、比较血糖改善情况 于移植后24 h, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d对各组大鼠的空腹血糖进行监测, 并对各大鼠进行OGTT试验, 观察移植后不同时间点的反应性, 从而比较血糖的改善情况。

1.4.5 ELISA法检测大鼠血浆胰岛素分泌水平 移植治疗第3周, 用乙醚麻醉各组大鼠, 经大鼠主动脉取血, 取部分血浆按胰岛素ELISA试剂盒说明书的方法, 测定各组大鼠血浆胰岛素浓度。在试剂盒中提供的酶标板上将单抗进行包被, 再根据操作步骤加入样品及不同浓度的标准品, 加入二抗, 在酶标板上形成双抗夹心的聚合物, 加入用HRP标记的Streptavidin, 根据说明书中的操作步骤加入底物, 使液体显色, 避光静置, 再加入终止液, 观察显色加深, 用酶标仪进行空腹胰岛素水平的测量。根据公式胰岛素抵抗指数=空腹血糖 $\times$ 空腹胰岛素水平/22.5进行胰岛素抵抗指数的计算。

1.4.6 苏木精-伊红染色法观察胰腺组织病理变化 移植8周末, 将糖尿病大鼠采用颈椎脱臼处死并迅速切开皮肤、皮下, 进入腹腔, 观察胰腺的一般状况。取出各组大鼠的胰腺组织, 去掉周围的系膜及脂肪组织, 纵行切开, PBS洗净附着物, 用体积分数4%甲醛进行固定, 并行常规石蜡包埋及切片。将切片进行脱蜡至水、苏木精染色、系列盐酸乙醇脱水、自来水反蓝、伊红染色、再次进行乙醇脱水、透明及封固处理。观察胰腺组织的病理变化。

1.5 主要观察指标 观察荧光染色标记转染PEGFP-C3-BFGF的骨髓间充质干细胞; RT-PCR法检测基质金

属蛋白酶的mRNA表达; 检测血糖水平、比较血糖改善情况; ELISA法检测大鼠血浆胰岛素分泌水平; 苏木精-伊红染色法观察胰腺组织病理变化。

1.6 统计学分析 采用SPSS17.0统计软件包对统计结果进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间差异比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠80只, 分为4组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 荧光显微镜下观察骨髓间充质干细胞PEGFP-C3-BFGF的表达情况 PEGFP-C3-BFGF转染入骨髓间充质干细胞48 h后, 荧光显微镜下可看到转染了PEGFP-C3-BFGF的骨髓间充质干细胞呈现绿色荧光, 而未转染PEGFP-C3-BFGF的骨髓间充质干细胞无绿色荧光表达, 见图1。

2.3 RT-PCR检测基质金属蛋白酶mRNA表达 移植后2周, 对照组、糖尿病组、移植组及基因转染组中均发现有基质金属蛋白酶mRNA表达, 与对照组比较, 糖尿病组的基质金属蛋白酶mRNA表达明显增加, 移植组及基因转染组基质金属蛋白酶mRNA的表达较糖尿病组明显下降, 各组间差异有显著性意义($P < 0.05$); 见图2。

2.4 血糖观察结果 移植后不同时间点糖尿病组的血糖水平明显高于对照组, 基因转染组与移植组的血糖水平又显著低于糖尿病组, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 基因转染组的血糖水平仍高于对照组, 各组间比较差异均有显著性意义(均 $P < 0.05$), 见表1。

2.5 血浆胰岛素分泌情况比较 基因转染组的空腹胰岛素水平明显高于移植组与糖尿病组, 胰岛素抵抗指数低于移植组与糖尿病组, 组间比较差异均有显著性意义($P < 0.05$); 基因转染组的空腹胰岛素水平仍低于对照组, 胰岛素抵抗指数高于对照组; 各组空腹胰岛素水平及胰岛素抵抗指数比较差异均有显著性意义(均 $P < 0.05$); 见表2。

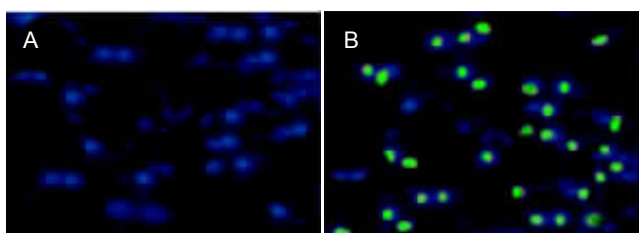
2.6 镜下观察苏木精-伊红染色后胰腺组织的病理变化 胰腺组织病理改善情况各组比较, 移植组优于糖尿病组, 基因转染组又优于移植组, 接近于对照组。对照组为正常胰腺组织, 结构清晰; 糖尿病组的胰岛结构遭到破坏, 胰岛体积变小, 数量变少, 可看到纤维增生, 以及炎性细胞的浸润; 移植组炎性细胞浸润较糖尿病组减轻; 基因转染组炎性细胞浸润明显减轻, 萎缩变小的胰岛逐渐增大, 结构恢复较为完整。见图3。

表 1 各组大鼠不同时间点的血糖水平

($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 1 Blood glucose levels of rats at different time after transplantation

组别	24 h 后	3 d 后	7 d 后	14 d 后	21 d 后
对照组	3.411 $\pm$ 0.459	3.379 $\pm$ 0.458	3.417 $\pm$ 0.457	3.388 $\pm$ 0.460	3.405 $\pm$ 0.460
糖尿病组	11.263 $\pm$ 1.833	20.99 $\pm$ 2.878	22.044 $\pm$ 3.489	22.989 $\pm$ 3.598	22.988 $\pm$ 3.682
移植组	7.654 $\pm$ 0.974	16.235 $\pm$ 2.673	17.170 $\pm$ 2.041	16.735 $\pm$ 2.256	17.969 $\pm$ 2.457
基因转染组	5.593 $\pm$ 0.626	6.028 $\pm$ 0.423	5.362 $\pm$ 0.364	5.967 $\pm$ 0.421	5.236 $\pm$ 0.364

表注: 不同时间点各组间比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。图 1 荧光显微镜下观察骨髓间充质干细胞PEGFP-C3-BFGF 的表达($\times 100$)Figure 1 PEGFP-C3-BFGF expression in bone marrow mesenchymal stem cells under fluorescence microscope ($\times 100$)

图注: 图 A 为未转染 PEGFP-C3-BFGF 的骨髓间充质干细胞仅见细胞核呈蓝色荧光, 胞浆无绿色阳性荧光信号; B 为转染了 PEGFP-C3-BFGF 的骨髓间充质干细胞呈现绿色荧光信号。

表 2 各组空腹胰岛素水平与胰岛素抵抗指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Fasting insulin levels and insulin resistance index in rats

组别	空腹胰岛素水平	胰岛素抵抗指数
对照组	32.21 $\pm$ 2.42	4.86 $\pm$ 0.11
糖尿病组	20.31 $\pm$ 1.71	20.73 $\pm$ 0.16
移植组	22.17 $\pm$ 1.64	17.69 $\pm$ 0.14
基因转染组	28.17 $\pm$ 1.89	6.25 $\pm$ 0.12

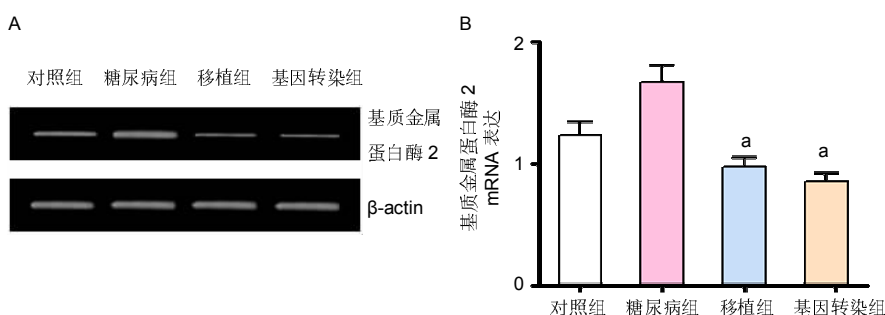
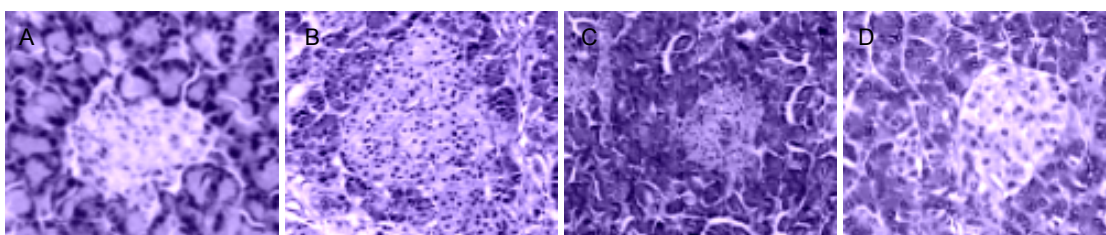
表注: 各组空腹胰岛素水平比较及胰岛素抵抗指数比较差异均有显著性意义(均 $P < 0.05$)。

图 2 RT-PCR 检测各组大鼠的基质金属蛋白酶 mRNA 表达

Figure 2 RT-PCR detection of matrix metalloproteinases mRNA expression in rats

图注: 图 A 为各组基质金属蛋白酶 mRNA 电泳表达; B 显示移植组及基因转染组基质金属蛋白酶 mRNA 的表达较糖尿病组明显下降($P < 0.05$)。

图 3 各组大鼠胰腺组织的病理变化($\times 200$)Figure 3 Pathological changes of the rat pancreas ($\times 200$)

图注: 图 A 为正常胰腺组织, 结构清晰; B 为糖尿病组胰岛结构遭到破坏; C 为移植组炎性细胞浸润较糖尿病组减轻; D 为基因转染组炎性细胞浸润明显减轻, 萎缩变小的胰岛逐渐增大, 结构恢复较为完整。

3 讨论 Discussion

近年来, 糖尿病的再生替代疗法逐渐走入人们的视线, 并引起人们的广泛关注^[18-20]。目前主要有胰腺移植、以及干细胞移植等方法来治疗糖尿病^[21-23], 其中骨髓间

充质干细胞移植成为医务工作者关注的焦点^[24-25]。骨髓间充质干细胞是一种具有广泛分化作用的细胞, 在不同的条件下能够分化为不同类型的细胞, 在给予某种特定条件后可向特定方向分化^[26-29]。研究表明, 通过外

源性基因对骨髓间充质干细胞细胞进行修饰,进而创建出一种“细胞载体”用于安全的基因治疗;而且,骨髓间充质干细胞不存在移植排斥反应及伦理学争议,从而真正实现自体移植^[30-32]。此外,已有研究证实骨髓间充质干细胞可以明显提高糖尿病大鼠胰岛功能恢复及改善高血糖状态,这可能与自体胰腺干细胞分化能力增强有关^[33-36]。迄今为止很多证据已表明,在一定的条件下,骨髓间充质干细胞能够向调节血糖的方向分化^[37]。

碱性成纤维细胞生长因子是在人体中存在的非常微量的活性物质,具有广泛分布及促进特定细胞增殖的作用^[38]。但是给予机体注射外源性碱性成纤维细胞生长因子后在体内易发生降解,影响其广泛应用。自碱性成纤维细胞生长因子的 cDNA 问世以来,其研究取得重大进展。实验发现当从外源途径给予碱性成纤维细胞生长因子时可以诱导骨髓间充质干细胞向胰岛细胞分化,参与机体糖代谢紊乱的调节,进而对糖尿病起到一定的作用。因此,作者通过构建 PEGFP-C3-BFGF,使其在大鼠胰腺细胞表达,研究其对糖尿病的作用。实验结果显示:PEGFP-C3-BFGF 转染的骨髓间充质干细胞移植后,4 组大鼠均发现有基质金属蛋白酶 mRNA 表达,且于对照组比较,糖尿病组的基质金属蛋白酶 mRNA 表达明显增加,移植组及基因转染组基质金属蛋白酶 mRNA 的表达较糖尿病组明显下降;不同时间点胰岛素分泌情况及血糖水平得到不同程度改善,进一步研究发现 PEGFP-C3-BFGF 通过诱导胰腺组织新生血管形成,引起胰岛 β 细胞的再生,从而修复 β 细胞功能,因此可推测 PEGFP-C3-BFGF 转染的骨髓间充质干细胞主要起促进作用,并且无移植后的免疫排斥反应。研究还发现移植后不同时间点,各组大鼠血糖改善情况基因转染组<移植组<糖尿病组,但基因转染组仍>对照组,提示给你提输入外源转染的骨髓间充质干细胞可以很大程度上改善糖尿病的糖代谢紊乱状态。

研究结果显示:PEGFP-C3-BFGF 转染骨髓间充质干细胞移植入糖尿病大鼠体内,可以改善大鼠血糖水平,促进胰岛素的分泌,表明其移植后不仅能在体内良好存活,而且可进一步促进 β 细胞再生,调节血糖。猜测其机制可能是通过将基质金属蛋白酶 mRNA 的表达降低从而起到改善大鼠糖尿病病变程度的作用。总之,将 PEGFP-C3-BFGF 转染骨髓间充质干细胞移植入糖尿病大鼠体内,不仅对血糖起到很好的调节作用,而且能避免易分解的的作用缺陷,必对糖尿病的防治起到

重要作用。

作者贡献: 设计、实施、评估者分别为第一、二作者。是盲法评估。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] 袁凤山,王长军,董飞,等.诱导回输胰岛素分泌细胞对大鼠糖尿病的疗效[J].中国生物工程杂志,2011,31(5):94-98.
- [2] Zhang YQ,Li JT,Wang TJ,et al.Amplitude of sensory nerve action potential in early stage diabetic peripheral neuropathy: an analysis of 500 cases.Neural Regener Res. 2014;9(14): 1389-1394.
- [3] Infante-Garcia C, Ramos-Rodriguez JJ, Monica Garcia-Alloza. Prediabetes and type 2 diabetes implication in central proliferation and neurogenesis. Neural Regen Res. 2015;10(1): 28-29.
- [4] 肖醉萱,邓德明,孙爱萍. NF- κ B、PKC 与糖尿病及胰岛素的抗炎作用[J].长江大学学报自然科学版:医学卷,2010,7(1):73-76.
- [5] 沈坤堂,秦新裕,张新,等.胰岛素基因在 β 细胞中的调节表达[J].中华医学杂志,2002,82(11):780-783.
- [6] 高峰,周汉新,李莉莎,等. PDX1 和 BTC 共表达的骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠糖尿病的实验研究[J].广东医学,2009,30(6): 866-869.
- [7] Heo JS,Choi SM,Kim HO,et al.Neural transdifferentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on hydrophobic polymer-modified surface and therapeutic effects in an animal model of ischemic stroke. Neuroscience. 2013;238(6):305-318.
- [8] Manley NC, Steinberg GK. Tracking stem cells for cellular therapy in stroke. Curr Pharm Des. 2012; 18(25):3685-3693.

- [9] 马晓博,赵瑛.肠内肠外营养对大鼠肠道损伤后屏障功能恢复的实验研究[J].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(12):3194-3197.
- [10] Yang X, Liu YN, Han Q, et al. Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted Flk-1(+) mesenchymal stem cell in lung. *Exp Hematol*. 2007;35(9):1466-1475.
- [11] 吴春朋,张潜,方宁,等.骨髓间充质干细胞移植促进糖尿病大鼠后肢缺血血管的新生[J].中国组织工程研究,2012,16(1):76-80.
- [12] Zhang YJ, Hao HJ, Liu JJ, et al. Repair and regeneration of skin injury by transplanting microparticles mixed with Wharton, s jelly and MSCs from the human umbilical cord. *Int J Low Extrem Wounds*.2012;11(4):264-270.
- [13] 祝荫,程明,吕农华,等. NK4基因慢病毒载体的构建及其在骨髓间充质干细胞中的表达[J].生物医学工程学杂志,2011,28(5): 976-981.
- [14] Biazar E, Keshel SH. The healing effect of stem cells loaded in nanofibrous scaffolds on full thickness skin defects. *J Biomed Nanotechnol*.2013;9(9):1471-1482.
- [15] 杨亚丽,高峰,齐晖,等.骨髓间充质干细胞移植人糖尿病大鼠胰岛腺后的分化及对血糖的影响[J].基础医学与临床,2009,29(6): 584-588.
- [16] Schmidt A,Ladage D,SchinkOthe T,et al.Basic fibroblast growth factor controls migration in human mesenchymal stem cells.*Stem Cells*.2006;24: 1750-1758
- [17] 邵珠林,徐向进,陈频,等.利拉鲁肽诱导骨髓间充质干细胞定向分化及移植治疗1型糖尿病大鼠的研究[J].中华糖尿病杂志,2014, 6(3):172-177.
- [18] Biron-Shental T,Amiel A,Anchidin R,et al.Telomere length and telomerase reverse transcriptase mRNA expression in patients with hepatitis C. *Hepatogastroenterology*.2013; 60(127):1713-1716.
- [19] 杨柏梁,郭丽,任淑萍,等.骨髓间充质干细胞对糖尿病大鼠疗效观察[J].中国公共卫生,2009,25(8):973-974.
- [20] 王燕,赵霞,范斌,等.2型糖尿病血压控制与未来出现肾病终点的观察性研究[J].首都医科大学报,2012,33(4): 472-476.
- [21] 雷川云,柯亭羽,徐勉.干细胞移植治疗2型糖尿病急性心肌梗死的研究进展[J].中国医药科学,2013,3(19):36-38.
- [22] 单莎瑞,黄国志.干细胞抗衰老的理论研究与进展[J].中国组织工程研究,2013,17(23):4347-4354.
- [23] 郑培,安沂华,王晓东,等.脐带间充质干细胞移植治疗糖尿病周围神经病变的疗效观察[J].武警医学,2013,24(5): 398-401.
- [24] 陈崇岩,吴德全.干细胞分化为胰岛素分泌细胞研究进展[J].肝胆胰外科杂志,2013,25(4):347-349.
- [25] 谭笑,汪年松.干细胞治疗糖尿病肾病的研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2013,14(8):738-740.
- [26] 刘小银,莫朝晖.干细胞移植治疗糖尿病下肢血管病变的研究进展[J].医学综述,2013,19(17):3175-3179.
- [27] 谢婷,欧阳建,陈军浩,等.犬骨髓间充质干细胞体外诱导分化为胰岛样细胞的研究[J].中国糖尿病杂志,2010, 18(4): 298-302.
- [28] Pievani A, Borleri G, Pende D, et al. Dual-functional capability of CD3+CD56+CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity. *Blood*. 2011;118(12):3301-3310.
- [29] 葛亮,赵建勇,孙诚谊,等.大鼠脂肪间充质干细胞体外转染为胰岛素分泌细胞的实验研究[J].中华消化外科杂志, 2013,12(8): 592-596.
- [30] 林雨佳,高峰,吴德全,等.大鼠胰岛细胞联合移植骨髓间充质干细胞的免疫调节作用[J].中华器官移植杂志,2011, 32(3):172-176.
- [31] 李煜环,宋振顺,范子扬,等.骨髓间充质干细胞体外对1型糖尿病大鼠淋巴细胞的免疫调节作用[J].中华实验外科杂志,2011,28(2):209-211.
- [32] 朱沙俊,陆玉华,朱建伟,等.骨髓间充质干细胞自体介入移植治疗糖尿病Beagle犬[J].中华实验外科杂志,2010, 27(10):1498- 1500.
- [33] Zhao D, Wu H, Li F, et al. Electromagnetic field change the expression of osteogenesis genes in murine bone marrow mesenchymal stem cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2008;28(2):152-155.
- [34] 贾延劫,周燕,杨于嘉,等.干细胞诱导分化为胰岛的研究进展[J].中华内分泌代谢杂志,2004,20(1):87-89.
- [35] Choi KS, Shin JS, Lee JJ, et al. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun*.2005; 330(4):1299-1305.
- [36] Alexanian AR, Maiman DJ, Kurpad SN, et al. In vitro and in vivo characterization of neurally modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment. *Stem Cells Dev*. 2008;17(6):1123-1130.
- [37] 张金池,欧阳亮远,吴佳文,等.体外诱导糖尿病鼠骨髓间充质干细胞向血管内皮样细胞分化的研究[J].中华实验外科杂志,2012,29(1):55-57.
- [38] hoh N.The Fsf Families in Humans,Mice,and Zebrafish:Their Evolutional Processes and Roles in Development,Metabolism and Disease.*Biol Pharm Bull*.2007;30 (10):1819-1825.