

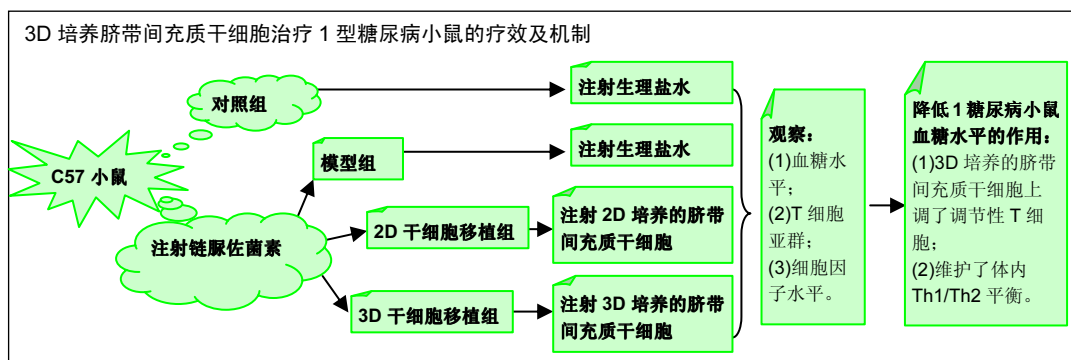
3D培养脐带间充质干细胞治疗1型糖尿病及其免疫调控机制

刘可娜¹, 李 栋², 杨光升¹(¹滨州市中医医院检验科, 山东省滨州市 256613; ²山东大学齐鲁医院低温医学研究室, 山东省济南市 250012)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0437

ORCID: 0000-0002-9924-7104(刘可娜)

文章快速阅读:



刘可娜, 女, 1978 年生, 山东省滨州市人, 汉族, 2006 年北京中医药大学毕业, 主管检验师, 主要从事医学检验和干细胞基础研究。

通讯作者: 杨光升, 副主任检验技师, 滨州市中医医院检验科, 山东省滨州市 256613

中图分类号:R318

文献标识码:B

稿件接受: 2017-09-13



文题释义:

3D 培养: 又称为三维培养, 指利用球形或巢状载体, 结合传统的二维细胞培养基, 建立起来的一种新型的细胞培养体系, 细胞在空间以三维密集方式生长, 其受力结构、细胞骨架排列和主要基因表达与体内真实环境类似, 能够更好地发挥细胞功能。目前三维培养细胞已经成为药厂药筛、生理实验的主要模式, 有效避免了二维培养细胞处于非正常生理生长状态下无法模拟体内细胞的弊端。

调节性 T 细胞: 简称 Treg, 是一类具有免疫抑制性的 T 细胞亚群, 通过分泌白细胞介素 4、白细胞介素 10 和转化生长因子 β 对效应 T 淋巴细胞起抑制作用。1995 年首次发现清除天然 CD4⁺CD25⁺Treg 细胞可导致自身免疫疾病, 而补充这种细胞又可以防止自身免疫疾病的发生。目前发现调节性 T 细胞与类风湿性关节炎、1 型糖尿病、系统性红斑狼疮等很多自身免疫性疾病的发病有重要的联系。

摘要

背景: 脐带间充质干细胞可分化成胰岛 β 细胞用于移植治疗 1 型糖尿病, 但需要进一步提高疗效, 并研究其免疫调节机制。

目的: 观察 3D 培养的脐带间充质干细胞移植对 1 型糖尿病小鼠的疗效及免疫调节机制。

方法: 组织贴壁法分离脐带间充质干细胞并进行 3D 培养, 扫描电镜观察细胞形态, 流式细胞术检测细胞表面标志物; 采用链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病小鼠模型, 2D 干细胞移植组和 3D 干细胞移植组于造模 7 d 后尾静脉注射脐带间充质干细胞(5×10^6 /只), 对照组和模型组小鼠注射等体积生理盐水。移植后每周检测各组小鼠空腹血糖, 连续 4 周; 移植后 30 d, 制备小鼠单个脾细胞悬液, 流式细胞术检测 T 细胞亚群变化; 移植后 30 d, ELISA 试剂盒检测各组小鼠血清中细胞因子白细胞介素 4, 白细胞介素 10, 白细胞介素 2, γ -干扰素水平。

结果与结论: ①3D 培养体系下脐带间充质干细胞生长良好, 高表达细胞表面标志物 CD44, CD73、CD90 和 CD105; ②细胞移植 2-4 周后, 小鼠血糖水平显著下降, 与模型组相比差异有显著性意义($P < 0.05$); 3D 干细胞移植组血糖水平低于 2D 干细胞移植组, 第 4 周差异有显著性意义($P < 0.05$); ③与模型组相比, 干细胞移植组 Th1 细胞百分比下降, Th2 细胞与 Treg 细胞百分比显著升高($P < 0.01$); 与 2D 干细胞移植组相比, 3D 干细胞移植组 Th1 细胞亚群百分比降低, Th2 细胞亚群和 Treg 细胞百分比升高($P < 0.05$); ④与模型组相比, 干细胞移植组白细胞介素 2 和 γ -干扰素水平降低, 而白细胞介素 4 和白细胞介素 10 水平明显升高; 与 2D 干细胞移植组相比, 3D 干细胞移植组白细胞介素 2 水平降低, 白细胞介素 4 和白细胞介素 10 水平升高($P < 0.05$); ⑤结果表明, 3D 培养的脐带间充质干细胞移植治疗 1 型糖尿病小鼠效果优于 2D 培养的脐带间充质干细胞, 其机制可能与上调调节性 T 细胞, 维护体内 Th1/Th2 平衡相关。

关键词:

干细胞; 3D 培养; 脐带间充质干细胞; 表面标志物; 1 型糖尿病; 血糖; 免疫调节; T 细胞亚群; 调节性 T 细胞; 细胞因子

主题词:

脐带; 间充质干细胞移植; 糖尿病, 1 型; 血糖; 免疫调节; 组织工程

3D-cultured umbilical cord mesenchymal stem cells for treatment of type 1 diabetes: therapeutic effects and immunomodulatory mechanism

Liu Ke-na¹, Li Dong², Yang Guang-sheng¹ (¹Clinical Laboratory, Binzhou City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Binzhou 256613, Shandong Province, China; ²Cryomedicine Laboratory, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China)

Liu Ke-na, Laboratorian in charge, Clinical Laboratory, Binzhou City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Binzhou 256613, Shandong Province, China

Corresponding author:
Yang Guang-sheng,
Associate chief laboratorian,
Clinical Laboratory, Binzhou City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Binzhou 256613, Shandong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) can differentiate into islet beta cells for type 1 diabetes mellitus therapy; however, it is necessary to further improve the therapeutic effect and study its immunomodulatory mechanism.

OBJECTIVE: To investigate the therapeutic effect and immunomodulatory mechanism of 3D cultured UC-MSCs in type 1 diabetes mellitus mice.

METHODS: UC-MSCs were separated by tissue-attached method and cultured in 3D system. Cell morphology was detected by scanning electron microscope and surface markers were assayed by flow cytometry. A mouse model of type 1 diabetes mellitus was made via injection of streptozotocin. Mice in stem cell transplantation group were given injection of UC-MSCs on the 7th day after modeling, and those in model group and control group were injected the same volume of normal saline. Fasting blood glucose level in each group was detected once a week, for continuous 4 weeks. Mouse spleen mononuclear cells suspension was prepared at the 30th day after injection, T cell subset changes were detected by flow cytometry, and expression levels of serum cytokines, interleukin (IL)-4, IL-10, IL-2 and interferon- γ were measured by ELISA kits.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) UC-MSCs cultured in the 3D system grew well and highly expressed surface markers CD44, CD73, CD90, CD105. (2) The blood glucose level was reduced significantly at 2-4 weeks after stem cell injection, and there was a significant difference compared with the model group ($P < 0.05$). The blood glucose level in the 3D cultured stem cell transplantation group was lower than that in the 2D cultured stem cell transplantation group, and there was significant difference at the 4th week ($P < 0.05$). (3) Compared with the model group, Th1 cell percentage declined, Th2 cell and Treg percentages increased significantly in the stem cell transplantation group ($P < 0.01$); compared with the 2D cultured stem cell transplantation group, Th1 cell percentage declined, Th2 cell and Treg percentages increased significantly in the 3D cultured stem cell transplantation group ($P < 0.05$). (4) Compared with the model group, the levels of IL-2 and interferon- γ in the stem cell transplantation group decreased, while the levels of IL-4 and IL-10 increased significantly; compared with the 2D system stem cell transplantation group, the IL-2 level in 3D system stem cell transplantation group decreased, while the levels of IL-4 and IL-10 increased significantly ($P < 0.05$). These results indicate that 3D cultured stem cell transplantation in the treatment of type 1 diabetes mice has better curative effects than 2D cultured stem cell transplantation, and the possible mechanism may be related to upregulate Treg cells and maintain Th1/Th2 balance in the body.

Subject headings: Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Diabetes Mellitus, Type 1; Blood Glucose; Immunomodulation; Tissue Engineering

0 引言 Introduction

1型糖尿病是由于胰岛 β 细胞遭受淋巴细胞介导的自身免疫性攻击而选择性被破坏的一种疾病^[1-2],已成为危害青少年健康的主要慢性病之一,中国目前约有至少200万1型糖尿病患者,如治疗不善将发生严重后遗症如失明、肾衰竭、心脏病、肠病等^[3]。当前各种胰岛素剂型和人工智能胰岛素泵仍无法实现血糖生理性调控,不能解决严重低血糖、血糖波动不稳等问题。基于改善胰岛功能的细胞治疗为此病治愈带来曙光,代表着1型糖尿病治疗领域的前沿。

脐带间充质干细胞具有极强的自我更新能力和多项分化潜能,被证实可以分化成胰岛 β 细胞^[4-6],目前已被用于移植治疗1型糖尿病,并取得了一定疗效^[7-9]。由于1型糖尿病是T细胞介导的胰岛 β 细胞破坏的自身免疫性疾病,而脐带间充质干细胞具有免疫调节作用,可以抑制抗原递呈细胞的成熟和反应性T淋巴细胞的增殖^[10-12]。因此,研究脐带间充质干细胞移植对患者的免疫调节机制是非常重要的。最新研究发现,3D培养的干细胞具有更好的分泌能力、体内存活性能和免疫调控能力等^[13-15]。3D培养体系可为干细胞提供适宜的微环境,重建细胞的结构和功能,促进细胞黏附与组织形成^[16-18]。为此,实验利用微载体为脐带间充质干细胞提供3D培养环境,探索一种更有效的培养方法。同时探讨3D培养的脐带间充质干细胞对糖尿病小鼠血糖的影响和免疫调节作用,为脐带间充质干细胞治疗1型糖尿病提供实验数据和理论指导。

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 于2015年3月至2016年6月在滨州市中

医医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 雄性清洁级C57小鼠36只,6-8周龄,体质量20-24 g,购自山东大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK鲁DOB0009。

1.3.2 脐带 取12例健康足月新生儿脐带,产妇和新生儿无遗传性疾病和传染性疾病,并征得产妇和家属同意。

1.3.3 实验用主要试剂及仪器 链脲菌素(Streptozotocin, Sigma公司);淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);胎牛血清(Gibco公司); α -MEM培养基、青霉素&链霉素(Hyclone公司);荧光标记的流式抗体和同型对照(BD公司);Cephex 细胞培养微载体(滨州贝尔凯瑞生物技术有限公司);ELISA试剂盒(白细胞介素4,白细胞介素10,白细胞介素2, γ -干扰素)(武汉博士德生物工程有限公司)。酶标仪(Bio-Rad公司);流式细胞仪(Millipore公司);自动生化分析仪(Roche公司);倒置显微镜(OLYMPUS公司);微量血糖测定仪(美国强生公司);CO₂培养箱(上海力申科学仪器有限公司);扫描电镜(日本日立公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 脐带间充质干细胞的分离培养 用含青链霉素的生理盐水冲洗脐带四五次,洗去表面血液,用手术镊剥离脐动脉及静脉,将脐带剪成1 mm³的小块,均匀平铺于细胞培养瓶中,加入含体积分数为10%胎牛血清的 α -MEM培养基,放置于37 °C、体积分数为5%CO₂培养箱中培养。5-7 d后全量换液,小心去除非贴壁细胞,显微镜下观察细胞形态及生长情况,长至70%-80%融合时,吸弃培养基,生理盐水洗2遍,加入0.25%胰蛋白酶-EDTA,放入培养箱消化1 min,加入培养基终止消化,计数,按照5 \times 10⁴/cm²

传代, 第3代细胞用于3D培养, 第3-5代细胞用于后续实验和检测。

1.4.2 脐带间充质干细胞的3D培养 上述分离培养的细胞按照 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 传代, 接种于96孔细胞培养板(每个孔提前放置3片Cephex微载体)。每天全量换液, 第5天将微载体转入15 mL离心管, 加入0.25%胰蛋白酶-EDTA, 放入培养箱消化1 min, 加入培养基终止消化, 40 μm 无菌筛网过滤, 1 200 r/min离心8 min收集细胞, 进行后续实验及检测。

1.4.3 扫描电镜观察3D细胞形态 用2%戊二醛在4 $^{\circ}\text{C}$ 下固定细胞12 h, PBS洗2次, 每次10 min; 加入预冷的1%锇酸固定90 min, ddH₂O洗2次; 梯度乙醇脱水, 临界点干燥; 样本在离子溅射仪中镀铂, 扫描电镜观察细胞生长状态并拍照。

1.4.4 细胞表面标记物检测 收集细胞悬液, 1 200 r/min离心8 min, 弃上清, PBS洗2次, 1 200 r/min离心8 min, 弃上清, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 每管0.2 mL, 分别加入PE标记的鼠抗人CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105抗体及同型对照5 μL , 室温避光孵育30 min; 离心弃上清, PBS洗2次, 离心收集细胞, 加入0.2 mL PBS重悬, 上机检测细胞表面标记物。

1.4.5 制备1型糖尿病小鼠模型 C57小鼠36只随机分为4组, 分别为对照组、模型组、2D干细胞移植组、3D干细胞移植组, 每组9只。小鼠禁食12 h后, 称质量并检测空腹血糖, 按照70-80 mg/kg剂量腹腔注射链脲佐菌素(溶解在0.1 mmol/L柠檬酸盐缓冲液中), 对照组腹腔注射等容量柠檬酸盐缓冲液, 连续4 d。注射后每2 d尾静脉采血测定血糖, 血糖水平连续2次高于16.7 mmol/L为造模成功。采血部位以碘伏消毒, 防止感染。

1.4.6 干细胞移植 2D干细胞移植组和3D干细胞移植组于造模7 d后尾静脉注射脐带间充质干细胞(5×10^6 /只), 对照组和模型组小鼠在相应位点注射等体积生理盐水。小鼠接受移植后在清洁级环境中饲养, 正常饮食饮水。

1.4.7 血糖水平监测 移植后每周取血检测小鼠空腹血糖水平(禁食过夜后每天早上8:00取血), 观察动物状态, 连续4周并记录。

1.4.8 T细胞亚群检测 移植后30 d脱颈白法处死各组小鼠, 无菌获取小鼠脾脏淋巴细胞, 制备单个脾细胞悬液, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 每管0.2 mL, 按T细胞亚群配对方法分别加入CD4-APC、CD8-PerCP和CD25-FITC单克隆抗体及同型对照5 μL , 室温避光孵育30 min; 加入40 g/L多聚甲醛固定20 min, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清; 加入IFN-FITC、IL-4-PE单克隆抗体及同型对照各5 μL , 室温避光孵育30 min, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, PBS洗2次, 离心收集细胞, 加入0.2 mL PBS重悬, 上机检测。

1.4.9 小鼠血清细胞因子表达水平检测 移植后30 d, 处死小鼠之前采用断尾法取血, 1 000 r/min离心10 min, 分

离血清, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。ELISA试剂盒检测各组小鼠血清中细胞因子白细胞介素4、白细胞介素10、白细胞介素2、 γ -干扰素水平。

1.5 主要观察指标 ①脐带间充质干细胞的形态和细胞表型; ②小鼠血糖水平变化; ③T细胞亚群变化; ④小鼠血清中白细胞介素4, 白细胞介素10, 白细胞介素2, γ -干扰素水平。

1.6 统计学分析 采用SPSS 11.0软件对数据进行统计学分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 脐带间充质干细胞形态 原代培养1 d, 细胞开始贴壁, 7 d后可见贴壁细胞呈长梭形。细胞融合度达到80%时进行传代, 细胞增殖较快, 多以纺锤状或涡旋状生长, 细胞可传15代以上, 细胞形态无明显变化(图1A)。扫描电镜下可观察到微载体呈网状结构, 在载体的空隙中可见脐带间充质干细胞呈均匀分布, 成团或成簇生长(图1B)。

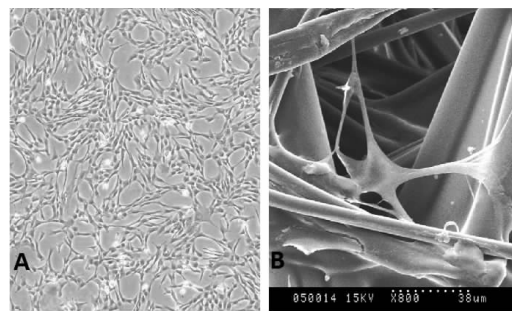


图1 脐带间充质干细胞形态

Figure 1 Morphology of umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: 图中A为2D培养脐带间充质干细胞($\times 100$); B为3D培养脐带间充质干细胞(标尺为15 μm)

2.2 脐带间充质干细胞表面标志物表达 流式细胞仪结果显示3D培养的脐带间充质干细胞表面标志物CD44、CD73、CD90和CD105呈高表达, CD34和CD45呈低表达, 与2D培养的脐带间充质干细胞相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。

2.3 各组小鼠血糖水平 模型组小鼠出现饮水量、尿量、进食量明显增加的现象, 而且体毛无光泽, 活动减少, 体质量下降, 说明造模成功。模型组与对照组相比, 血糖明显升高, 差异具有显著性意义($P < 0.05$)。移植1周后, 2D和3D干细胞移植组小鼠血糖与模型组相比差异不明显($P < 0.05$), 移植后2-4周, 小鼠血糖水平下降明显, 与模型组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。3D干细胞移植组血糖水平从2周起低于2D干细胞移植组, 4周出现显著性差异($P < 0.05$), 见表2。

2.4 各组小鼠T细胞亚群变化 流式细胞术检测各组小鼠T细胞亚群百分比, 结果见表3和图2。模型组与对照组相比, Th1细胞亚群($\text{CD4}^+ \text{IFN } \gamma^+$)百分比明显升高($P < 0.01$),

表 2 脐带间充质干细胞移植后各组小鼠血糖水平变化

($\bar{x} \pm s$, n=9, mmol/L)

Table 2 Changes of blood glucose levels after transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice

组别	移植前	移植后 1 周	移植后 2 周	移植后 3 周	移植后 4 周
对照组	7.18±1.85	7.23±1.57	6.88±1.29	7.74±1.63	6.56±1.04
模型组	22.89±4.15 ^a	22.47±3.85 ^a	24.65±4.30 ^a	23.62±2.96 ^a	24.08±3.47 ^a
2D 干细胞移植组	23.09±3.68	20.38±3.04	17.57±3.76 ^{bd}	16.14±3.02 ^{bd}	16.03±2.95 ^{bd}
3D 干细胞移植组	23.99±4.21	20.63±3.55	16.48±3.57 ^{bd}	14.46±2.78 ^{bd}	12.64±2.30 ^{bce}

表注: 与对照组相比, ^aP < 0.05; 与模型组相比, ^bP < 0.05; 与 2D 干细胞移植组相比, ^cP < 0.05; 与同组移植前相比, ^dP < 0.05, ^eP < 0.01。

表 1 2D 和 3D 培养的脐带间充质干细胞表面标志物表达

($\bar{x} \pm s$, n=5, %)

Table 1 Surface markers of umbilical cord mesenchymal stem cells in 2D and 3D systems

标志物	2D 培养干细胞	3D 培养干细胞
CD34	0.68±0.35	2.01±0.74 ^a
CD44	80.36±3.07	83.47±3.55
CD45	2.56±0.73	5.64±1.20 ^a
CD73	94.72±4.28	95.08±3.84
CD90	95.64±3.44	94.92±4.05
CD105	75.28±7.65	70.37±6.02

表注: 与 2D 培养干细胞组相比, ^aP < 0.05。

表 3 脐带间充质干细胞移植后各组小鼠 T 细胞亚群变化

($\bar{x} \pm s$, n=9, %)

Table 3 Changes of T lymphocyte subsets after transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice

组别	Th1 细胞亚群	Th2 细胞亚群	Treg 细胞
对照组	0.18±0.04	16.55±3.84	23.49±6.47
模型组	4.35±1.02 ^a	3.76±0.91 ^a	3.71±0.85 ^a
2D 干细胞移植组	2.96±0.77 ^b	7.03±3.28 ^c	12.34±2.70 ^c
3D 干细胞移植组	1.48±0.55 ^{cd}	10.53±3.79 ^{cd}	16.08±4.93 ^{cd}

表注: 与对照组相比, ^aP < 0.01; 与模型组相比, ^bP < 0.05, ^cP < 0.01; 与 2D 干细胞移植组相比, ^dP < 0.05。

表 4 脐带间充质干细胞移植后各组小鼠血清细胞因子水平

($\bar{x} \pm s$, n=9, ng/L)

Table 4 Serum levels of cytokines after transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice

组别	白细胞介素 2	γ -干扰素	白细胞介素 4	白细胞介素 10
对照组	58.56±17.33	29.44±7.89	42.08±16.05	32.35±8.94
模型组	142.39±34.65 ^a	95.38±20.15 ^a	63.58±20.47 ^a	106.44±21.23 ^a
2D 干细胞移植组	91.84±23.67 ^b	64.31±16.93 ^b	107.67±26.98 ^b	154.81±23.95 ^b
3D 干细胞移植组	70.32±18.50 ^{cd}	55.44±13.29 ^b	135.38±30.75 ^{cd}	196.37±40.50 ^{cd}

表注: 与对照组相比, ^aP < 0.05; 与模型组相比, ^bP < 0.05, ^cP < 0.01; 与 2D 干细胞移植组相比, ^dP < 0.05。

Th2 细胞亚群(CD4⁺IL-4⁺)和 Treg 细胞(CD4⁺CD25⁺)百分比均显著下降(P < 0.01)。2D 和 3D 干细胞移植组与模型组相比, Th1 细胞亚群百分比明显降低(P < 0.05), Th2 细胞亚群和 Treg 细胞百分比均显著升高(P < 0.01), 说明脐带间充质干细胞可以上调糖尿病小鼠的 Treg 细胞表达。3D 干细胞

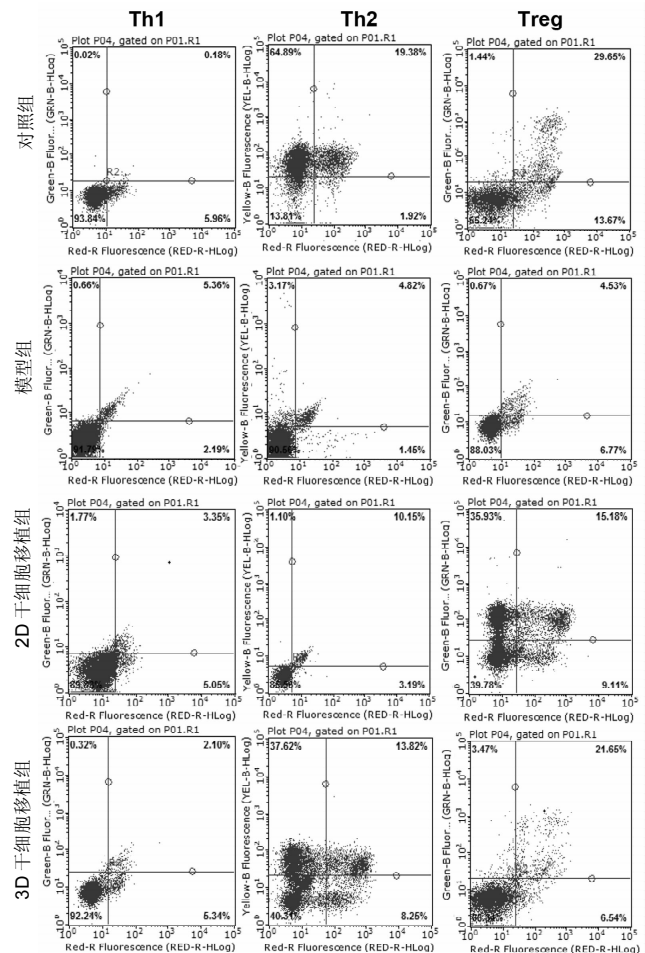


图 2 脐带间充质干细胞移植后各组小鼠 T 细胞亚群百分比

Table 2 Percentage of T lymphocyte subsets after transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice

移植组与 2D 干细胞移植组相比, Th1 细胞亚群百分比降低, Th2 细胞亚群和 Treg 细胞百分比明显升高(P < 0.05)。

2.5 各组小鼠血清细胞因子水平 如表 4 所示, 模型组与对照组相比, 白细胞介素 2、 γ -干扰素、白细胞介素 4 和白细胞介素 10 的表达水平均显著升高, 差异有显著性意义(P < 0.05)。2D 和 3D 干细胞移植组 Th1 型细胞因子白细胞介素 2 和 γ -干扰素的表达水平与模型组相比显著降低, 而 Th2 型细胞因子白细胞介素 4 和白细胞介素 10 的表达水平显著升高, 差异有显著性意义(P < 0.05)。3D 干细胞移植组与 2D 干细胞移植组相比, 白细胞介素 2 表达水平显著降低, 白细胞介素 4 和白细胞介素 10 的表达水平显著升高(P < 0.05), γ -干扰素的变化不明显。

3 讨论 Discussion

1型糖尿病是一类自身免疫疾病,与遗传和环境因素相关,但主要是由于抗原特异性的T淋巴细胞选择性攻击胰岛β细胞,造成胰岛素分泌不足使血糖升高,进而引发肾病、心脏病、白内障等严重后遗症^[3]。1型糖尿病一旦发病,终身都需要依赖胰岛素,给患者带来了生活和经济上的负担,长期服用胰岛素还会产生耐受。尽管胰岛移植可以克服以上的困难,但供体缺乏和免疫排斥反应限制了其在临床的广泛应用。为了研究1型糖尿病的发病机制及治疗方法,学者们研究出了多种动物模型,包括C57小鼠, NOD小鼠, SD大鼠等^[19-21]。C57小鼠比较容易获得,而且建模方法简单,是研究1型糖尿病较理想的动物模型。实验连续注射链脲佐菌素4 d,每2 d监测小鼠血糖,发现C57小鼠达到建模标准。

近年来,3D培养系统已逐渐应用在组织工程领域,在疾病治疗和研究中发挥越来越重要的作用。传统2D细胞培养系统分离培养的脐带间充质干细胞呈单层生长,移植后容易发生血管栓塞,以及其他的缺陷^[22]。3D培养系统可为间充质干细胞提供更为适宜的微环境,重建细胞结构和功能,细胞增殖更快^[23-25]。为此,实验成功建立了一种适合脐带间充质干细胞的3D培养体系,培养的脐带间充质干细胞高表达CD44, CD73, CD90和CD105,细胞生长良好。将3D培养的脐带间充质干细胞移植治疗1型糖尿病小鼠,移植2-4周后血糖水平显著下降,与2D干细胞移植组相比,差异有显著性意义($P < 0.05$),说明3D培养的干细胞注入体内后,可以更快地分泌胰岛素,降低血糖水平。这可能与3D培养的干细胞可以更好地传递信号和维持细胞代谢相关。因为在3D培养环境中,细胞可以相互聚集并与细胞基质紧密接触,为细胞提供了更为适应的微环境^[26-28],同时,细胞外基质中富含胶原蛋白,是构建细胞三维生存环境的重要物质^[29-30]。刘锐等^[31]研究结果也表明3D环境有利于肌源性干细胞的聚集和增殖,并促进肌源性干细胞在相同诱导条件下更多的分化成胰岛素分泌细胞。

Th细胞受抗原刺激后可分化为功能不同的两个亚群Th1和Th2细胞,它们互相调节其分化以维持动态平衡^[32-34]。Th1/Th2平衡失调在1型糖尿病发病中起着重要的作用,Th2细胞分化直接抑制1型糖尿病的发展^[35-36]。调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)是一类具有免疫抑制性和免疫无能性的T细胞亚群, Sakaguchi等1995年首次报道清除天然Treg细胞可导致自身免疫疾病,而补充这种细胞又可以防止自身免疫疾病的发生^[37]。研究显示器官特异性自身免疫的抑制与Treg细胞的抗原特异性密切相关^[38]。近年来对1型糖尿病的研究表明,诱导Treg细胞能重建自身免疫性糖尿病的免疫耐受^[39]。有文献报道通过上调Treg细胞的数量可改变Th1/Th2细胞的比例,促进Th2细胞因子分泌并抑制Th1细胞因子分泌,进而阻止胰岛细胞损伤^[40]。实验结果显示,脐带间充质干细胞可上调糖尿病小鼠的Treg细胞和Th2细胞百分比,下调Th1细胞百分比。ELISA实验结果进

一步显示,脐带间充质干细胞移植后可降低Th1型细胞因子白细胞介素2和γ-干扰素水平,增加Th2型细胞因子白细胞介素4和白细胞介素10水平,这提示脐带间充质干细胞可能通过上调Treg细胞,纠正Th1/Th2平衡,进而保护胰岛并降低血糖水平。同时,与2D干细胞移植组相比,3D干细胞移植组Treg细胞和Th2细胞百分比更高,Th1细胞百分比更低,说明3D培养的脐带间充质干细胞对机体的免疫调节功能强于2D培养的脐带间充质干细胞。

综上所述,实验成功建立了一种脐带间充质干细胞的3D培养体系,并进行了鉴定。将脐带间充质干细胞移植到1型糖尿病小鼠体内,结果发现,脐带间充质干细胞可通过调节T细胞亚群和Treg细胞,保护胰岛并降低血糖。同时,3D培养的脐带间充质干细胞治疗1型糖尿病小鼠效果更佳,免疫调节功能更强。该研究为3D培养的脐带间充质干细胞治疗1型糖尿病提供了重要的实验基础和理论依据,但是脐带间充质干细胞如何调节Treg细胞的数量和功能,进而影响Th1/Th2细胞平衡,还需要进一步的研究和探讨。

作者贡献: 刘可娜负责实验设计、操作、数据分析与文章撰写;李栋负责构建动物模型;杨光升负责文章修改和校正。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验方案经山东大学齐鲁医院动物实验伦理委员会批准,批准号为 KYLL-2015(KS)-077。实验过程遵循了国际兽医编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在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。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

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端行为承担责任。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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Handorf AM, Sollinger HW, Alam T. Insulin gene therapy for type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Transplant*. 2015;13 Suppl 1:37-45.
- [2] Morgan E, Halliday SR, Campbell GR, et al. Vaccinations and childhood type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia*. 2016;59(2):237-243.
- [3] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004;27 Suppl 1:S5-S10.
- [4] 郝永蕾,朱旅云,王更银,等.体外诱导人脐带间充质干细胞分化为胰岛样细胞实验研究[J].临床误诊误治,2010,23(9):804-807.
- [5] 申义,王意忠,时瀚,等.人脐带间充质干细胞分化胰岛样细胞过程中胰岛素和巢蛋白的表达[J].中国组织工程研究,2016,20(50):7500-7506.

- [6] Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(3):139-148.
- [7] Hu J, Yu X, Wang Z, et al. Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus. *Endocr J*. 2013;60(3):347-357.
- [8] 贾晓蕾,沈山梅,李莉蓉,等. 异体间充质干细胞移植治疗酮症起病1型糖尿病的临床疗效[J]. *中华糖尿病杂志*, 2015, 7(7):425-430.
- [9] He B, Li X, Yu H, et al. Therapeutic potential of umbilical cord blood cells for type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes*. 2015;7(6):762-773.
- [10] Liu S, Yuan M, Hou K, et al. Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. *Cell Immunol*. 2012;278(1-2):35-44.
- [11] Yang H, Sun J, Li Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells suppress proliferation of PHA-activated lymphocytes in vitro by inducing CD4(+)CD25(high)CD45RA(+) regulatory T cell production and modulating cytokine secretion. *Cell Immunol*. 2016;302:26-31.
- [12] Vellamy S, Sandrasaigaran P, Vidyadaran S, et al. Mesenchymal stem cells of human placenta and umbilical cord suppress T-cell proliferation at G0 phase of cell cycle. *Cell Biol Int*. 2013;37(3):250-256.
- [13] Braghirolli DI, Zamboni F, Acasigua GA, et al. Association of electrospinning with electrospinning: a strategy to produce 3D scaffolds with incorporated stem cells for use in tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:5159-5169.
- [14] González S, Mei H, Nakatsu MN, et al. A 3D culture system enhances the ability of human bone marrow stromal cells to support the growth of limb stem/progenitor cells. *Stem Cell Res*. 2016;16(2):358-364.
- [15] Rath SN, Noeaid P, Arkudas A, et al. Adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells display different osteogenic differentiation patterns in 3D bioactive glass-based scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016;10(10):E497-E509.
- [16] Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(3):211-224.
- [17] Ferlin KM, Prendergast ME, Miller ML, et al. Influence of 3D printed porous architecture on mesenchymal stem cell enrichment and differentiation. *Acta Biomater*. 2016;32:161-169.
- [18] Li SL, Liu Y, Hui L. Construction of engineering adipose-like tissue in vivo utilizing human insulin gene-modified umbilical cord mesenchymal stromal cells with silk fibroin 3D scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(12):E267-275.
- [19] Qin Y, He YH, Hou N, et al. Sonic hedgehog improves ischemia-induced neovascularization by enhancing endothelial progenitor cell function in type 1 diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;423:30-39.
- [20] Colomeu TC, Figueiredo D, Cazarin CB, et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). *Int Immunopharmacol*. 2014;18(1):106-115.
- [21] Grisé KN, Olver TD, McDonald MW, et al. High Intensity Aerobic Exercise Training Improves Deficits of Cardiovascular Autonomic Function in a Rat Model of Type 1 Diabetes Mellitus with Moderate Hyperglycemia. *J Diabetes Res*. 2016;2016:8164518.
- [22] 付清松, 夏玉军, 张明, 等. 三维球体间充质干细胞移植对大鼠缺血再灌注损伤脑组织TNF- α 及凋亡相关蛋白表达的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2015,36(8):845-850.
- [23] Antebi B, Zhang Z, Wang Y, et al. Stromal-cell-derived extracellular matrix promotes the proliferation and retains the osteogenic differentiation capacity of mesenchymal stem cells on three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21(2):171-181.
- [24] Occhetta P, Centola M, Tonnarelli B, et al. High-Throughput Microfluidic Platform for 3D Cultures of Mesenchymal Stem Cells, Towards Engineering Developmental Processes. *Sci Rep*. 2015;5:10288.
- [25] Papadimitropoulos A, Piccinini E, Brachet S, et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells from fresh bone marrow in a 3D scaffold-based system under direct perfusion. *PLoS One*. 2014;9(7):e102359.
- [26] Caron I, Rossi F, Papa S, et al. A new three dimensional biomimetic hydrogel to deliver factors secreted by human mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *Biomaterials*. 2016;75:135-147.
- [27] Li Y, Guo G, Li L, et al. Three-dimensional spheroid culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cell yield and stemness maintenance. *Cell Tissue Res*. 2015;360(2):297-307.
- [28] Rodina AV, Tenchurin TK, Saprykin VP, et al. Migration and Proliferative Activity of Mesenchymal Stem Cells in 3D Polylactide Scaffolds Depends on Cell Seeding Technique and Collagen Modification. *Bull Exp Biol Med*. 2016;162(1):120-126.
- [29] Zheng Z, Shen W, Le H, et al. Three-dimensional parallel collagen scaffold promotes tendon extracellular matrix formation. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2016;45(2):120-125.
- [30] Shami A, Gonçalves I, Hultgårdh-Nilsson A. Collagen and related extracellular matrix proteins in atherosclerotic plaque development. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(5):394-399.
- [31] 刘锐,刘畅,殷甜甜. 三维培养下化学方法诱导肌源性干细胞向胰岛分泌细胞分化的研究[J]. *辽宁医学学报*, 2016,37(1):4-7.
- [32] Zhang Y, Zhang Y, Gu W, et al. TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. *Adv Exp Med Biol*. 2014;841:15-44.
- [33] Perez-Mazliah D, Langhorne J. CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. *Front Immunol*. 2015;5:671.
- [34] Matsuzaki J, Tsuji T, Imazeki I, et al. Immunosteroid as a regulator for Th1/Th2 balance: its possible role in autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 2005;38(5):369-375.
- [35] Raz I, Eldor R, Naparstek Y, et al. Immune modulation for prevention of type 1 diabetes mellitus. *Trends Biotechnol*. 2005;23(3):128-134.
- [36] Heurtier AH, Boitard C. T-cell regulation in murine and human autoimmune diabetes: the role of TH1 and TH2 cells. *Diabetes Metab*. 1997;23(5):377-385.
- [37] Haritha C, Shankar V, Trivedi HL, et al. Mesenchymal Stem Cells Transplantation with Non-myeloablative Conditioning for Type I Diabetes Mellitus : Lab to Clinic. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2009; 75(3) :S486-S487.
- [38] Masteller EL, Tang Q, Bluestone JA. Antigen-specific regulatory T cells--ex vivo expansion and therapeutic potential. *Semin Immunol*. 2006;18(2):103-110.
- [39] Tan T, Xiang Y, Chang C, et al. Alteration of regulatory T cells in type 1 diabetes mellitus: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014;47(2):234-243.
- [40] Lee RH, Seo MJ, Reger RL, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(46):17438-17443.