

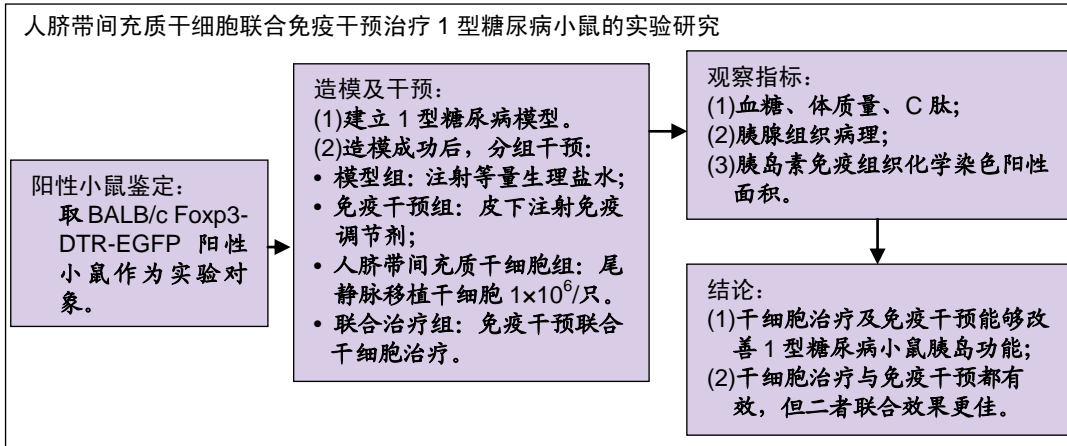
人脐带间充质干细胞联合免疫干预治疗1型糖尿病小鼠的实验研究

郭波¹, 刘佳¹, 崔晓兰², 时瀚¹, 张社毅¹, 王嘉¹, 山霞¹, 王意忠¹ (¹北京大学航天临床医学院血液内分泌科, 北京市 100049; ²中国中医科学院中药研究所药理学室, 北京市 100700)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1676

ORCID: 0000-0002-3419-4566(王意忠)

文章快速阅读:



郭波, 男, 1989 年生, 河南省安阳市人, 汉族, 2019 年北京大学毕业, 在读硕士, 主要从事干细胞基础与临床应用方面的研究。

通讯作者: 王意忠, 博士, 主任医师, 北京大学航天临床医学院血液内分泌科, 北京市 100049

文献标识码:A

稿件接受: 2018-12-24



文题释义:

免疫干预: 通过免疫制剂、生物制剂、免疫细胞等外在方法, 改变或者修正, 正常或者异常的机体免疫应答, 也包括改变或者修正免疫调节的进程, 从而实现疾病的预防及治疗的目的。在此次实验中指的是“皮下注射地塞米松(注射液)+胰岛素(注射液)”。

BALB/c Foxp3-DTR-EGFP 小鼠: 是一种靶向敲除“调节性 T 细胞”的转基因小鼠, 特点是在内源性 Foxp3(叉状头转录调控因子)的调控下, 调节性 T 细胞表达白喉毒素受体(DTR)。因此, 当白喉毒素(DT)打入小鼠体内, 白喉毒素与白喉毒素受体结合, 实现靶向敲除“调节性 T 细胞”的目的。

摘要

背景: 1 型糖尿病是一种以 T 细胞介导的胰岛 β 细胞损伤为特征的自身免疫性疾病, 实验拟针对其免疫机制进行干预, 并用干细胞修复受损的胰岛 β 细胞, 探索治疗 1 型糖尿病的新方法。

目的: 观察人脐带间充质干细胞联合免疫干预治疗 1 型糖尿病小鼠的疗效。

方法: 取 BALB/c Foxp3-DTR-EGFP 阳性小鼠 50 只, 随机选择 6 只作为正常对照组, 剩余小鼠通过腹腔注射链脲佐菌素及白喉毒素制备 1 型糖尿病模型, 造模成功后, 随机分为 4 组: 模型组给予等量生理盐水; 免疫干预组皮下注射地塞米松(10 μ g)+胰岛素(10 μ g)混合液; 人脐带间充质干细胞组经尾静脉移植人脐带间充质干细胞 1×10^6 /只; 联合治疗组采用以上两种治疗方法。治疗后 4 周, 观察各组小鼠血糖、C 肽及体质量变化, 胰腺组织病理及胰岛素染色阳性面积。

结果与结论: ①与正常对照组对比, 模型组血糖升高($P < 0.01$), C 肽及体质量均下降($P < 0.01$), 胰岛严重萎缩, 胰岛细胞减少, 胰岛素染色阳性面积减小; ②与模型组对比, 免疫干预组血糖有所下降但差异不显著($P > 0.05$), C 肽及体质量改变不显著($P > 0.05$), 胰岛细胞增多, 胰岛素阳性面积增大; ③与模型组对比, 人脐带间充质干细胞组及联合治疗组血糖降低, 但差异不显著($P > 0.05$), C 肽及体质量均升高($P < 0.05$), 胰岛细胞增多, 胰岛素染色阳性面积增大; ④结果表明, 人脐带间充质干细胞、免疫干预均能改善 1 型糖尿病小鼠的胰岛功能, 联合治疗效果更佳。

关键词:

人脐带间充质干细胞; 1 型糖尿病; 免疫干预; 胰岛素; 地塞米松; 自身免疫性疾病; BALB/c Foxp3-DTR-EGFP 阳性小鼠; C 肽

主题词:

糖尿病, 1 型; 干细胞移植; 免疫疗法; 干细胞

中图分类号: R394.2

基金资助:

北京大学航天临床医学院科研基金资助项目(YN201806), 课题名称: 间充质干细胞联合免疫佐剂治疗 1 型糖尿病小鼠的研究, 项目负责人: 王意忠

Guo Bo, Master candidate, Department of Hematology and Endocrinology, Aerospace Clinical Medical College of Peking University, Beijing 100049, China

Corresponding author: Wang Yizhong, MD, Chief physician, Department of Hematology and Endocrinology, Aerospace Clinical Medical College of Peking University, Beijing 100049, China

Human umbilical cord mesenchymal stem cells combined with immunotherapy for the treatment of type 1 diabetic mice

Guo Bo¹, Liu Jia¹, Cui Xiaolan², Shi Han¹, Zhang Sheyi¹, Wang Jia¹, Shan Xia¹, Wang Yizhong¹ (¹Department of Hematology and Endocrinology, Aerospace Clinical Medical College of Peking University, Beijing 100049, China; ²Pharmacology Laboratory, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract

BACKGROUND: Type 1 diabetes mellitus is a T cell-mediated autoimmune disease resulting in pancreatic islet cell damage. In this study, immunotherapy was used to deal with type 1 diabetes mellitus and stem cell transplantation was used to repair damaged islet β cells, attempting to explore a new treatment for type 1 diabetes mellitus.

OBJECTIVE: To observe the efficacy of human umbilical cord mesenchymal stem cells combined with immunotherapy for the treatment of type 1 diabetic mice.

METHODS: Fifty BALB/c Foxp3-DTR-EGFP positive mice were selected, six of which were randomly selected as normal control group and the remaining of which were intraperitoneally injected with streptozotocin and diphtheria toxin to prepare an animal model of type 1 diabetes mellitus. After successful modeling, randomization was performed in model mice and there were four groups: model group (normal saline), immunotherapy group (subcutaneous injection of dexamethasone (10 μ g) and insulin (10 μ g) mixture), cell transplantation group (injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells (1×10^6 cells per mouse) through the tail vein, and combined treatment group (the combination of immunotherapy and cell transplantation as described above). At 4 weeks after treatment, changes in blood glucose, C-peptide, body mass, pancreatic histopathology and insulin-positive area were observed in each group.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the normal control group, the blood glucose level of the model group increased ($P < 0.01$), the C peptide level and body mass decreased ($P < 0.01$), and the islet was severely atrophied, with decreased number of islet cells and reduced insulin-positive area. (2) Compared with the model group, the blood glucose level of the immunotherapy group decreased ($P > 0.05$), the C-peptide level and body mass did not change significantly ($P > 0.05$), the islet cells increased in number, and the insulin-positive area increased. (3) Compared with the model group, the blood glucose level of the cell transplantation group and the combined treatment group decreased ($P > 0.05$), the C peptide level and body mass increased ($P < 0.05$), the islet cells increased in number, and the insulin-positive area increased. These findings reveal that either human umbilical cord mesenchymal stem cells or immunotherapy can improve the islet function of type 1 diabetic mice, and the combination treatment has better outcomes.

Subject headings: Diabetes Mellitus, Type 1; Mesenchymal stem cell Transplantation; Immunotherapy; Stem Cells

Funding: the Scientific Research Fund Project of the Aerospace Clinical Medical College of Peking University, No. YN201806 (to WYZ)

0 引言 Introduction

1型糖尿病是一种自身免疫性疾病,以T细胞介导的胰岛 β 细胞损伤为特征^[1-3],最终导致机体胰岛素严重缺乏、血糖升高。目前临床上治疗以注射外源性胰岛素为主,但是该治疗方法并不能从根本上解决问题。长久以来,研究者对延缓胰岛 β 细胞损伤、促进胰岛 β 细胞再生及胰岛 β 细胞的替代治疗做了大量研究,其中包括干细胞治疗、免疫干预、胰腺移植等。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUC-MSCs)具有自我更新及多向分化的能力,不仅能被诱导分化为胰岛素分泌细胞^[4-6],而且还可以分泌多种生长因子、细胞因子等,这些因子可能有助于促进血管生成、调节机体炎症^[7-8]。人脐带间充质干细胞还具有易获取、低免疫原性、不涉及伦理等优点^[9-11]。地塞米松是一种有效的抗炎和免疫抑制剂,广泛用于治疗炎症、过敏性疾病和自身免疫性疾病^[12],低剂量的地塞米松可以阻止病毒诱导的1型糖尿病的发生^[13];胰岛素则能够诱导机体免疫耐受,延缓1型糖尿病的进展^[14-15]。

已有研究表明,尾静脉注射人脐带间充质干细胞能降低初发1型糖尿病小鼠的高血糖,改善胰岛功能^[16]。静脉注射人脐带间充质干细胞能够保护1型糖尿病患者胰岛功能、减少胰岛素的用量^[17];皮下注射地塞米松+胰岛素能预防1型糖尿病的发生^[18];然而,关于人脐带间充质干细胞联合免疫干预治疗1型糖尿病的研究几乎未见报道。在此次研究中,选择BALB/c Foxp3-DTR-EGFP阳性小鼠作

为实验对象,采用链脲佐菌素损伤胰岛 β 细胞联合白喉毒素敲除Treg细胞的方法建立1型糖尿病模型。与传统单独链脲佐菌素造模方法不同的是,该方法通过靶向敲除Treg细胞放大胰岛炎症反应进行造模,成模过程跟临床1型糖尿病患者的发病过程更加相似。在研究中,将初步探索人脐带间充质干细胞联合免疫干预对1型糖尿病小鼠的治疗效果,进一步探索治疗1型糖尿病的新方法,同时为临床应用提供依据。

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2017年11月至2018年8月在中国中医科学院中药所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 6-8周龄BALB/c Foxp3-DTR-EGFP阳性转基因小鼠,体质量15-20 g,复旦大学王宾教授惠赠。实验方案经航天中心医院伦理委员会批准,批准号为20171206-YN-10。

1.3.2 细胞 人脐带间充质干细胞由北京大学航天临床医学院中心实验室提供。

1.3.3 主要试剂及仪器 血糖仪及血糖试纸(Roche公司);柠檬酸和柠檬酸钠、白喉毒素、链脲佐菌素(Sigma公司);小鼠C肽ELISA试剂盒(Alpco公司);鼠抗人单克隆抗体 CD44、CD90、CD14、CD34、CD105、HLA-DR(BD公司);流式细胞仪FACS Calibur(BD公司);

抗胰岛素单克隆抗体(CST公司), 通用型试剂盒、DAB显色试剂盒、柠檬酸盐修复液(中杉金桥)。

1.4 实验方法

1.4.1 人脐带间充质干细胞的表型鉴定

人脐带间充质干细胞的表型鉴定

细胞来源: 北京大学航天临床医学院中心实验室提供

细胞传代: 取第3代人脐带间充质干细胞, PBS洗2遍, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^8 L^{-1}$

细胞鉴定: 每管中加入200 μL 细胞浓度为 $5 \times 10^8 L^{-1}$ 人脐带间充质干细胞悬液, 分别加入流式抗体: anti-human CD44、anti-human CD90、anti-human CD105、anti-human CD14、anti-human CD34、anti-human HLA-DR 各10 μL , 常温避光静置30 min, PBS洗涤2遍后流式细胞仪检测其表型

伦理学批准: 实验方案经航天中心医院伦理委员会批准, 批准号为20171206-YN-10

1.4.2 BALB/c Foxp3-DTR-EGFP阳性小鼠的鉴定 取四五周龄小鼠, 雌雄分笼, 尾巴标号; 然后经眼眶采血50 μL /只, 加450 μL 抗凝剂, 充分混匀。加1 mL PBS洗去抗凝剂, 1 500 r/min离心3 min, 弃上清; 加1 mL红细胞裂解液裂红, 重悬后, 静置5 min, 待液体变的清澈透亮, 加500 μL 的PBS终止裂红, 1 500 r/min离心3 min, 弃上清; 加1 mL PBS重悬后离心(1 500 r/min, 3 min), 弃上清后转至96孔板, 1 500 r/min离心3 min后弃上清, 每孔依次加入流式抗体: anti-Mouse CD4 PerCP-Cyanine5.5, 常温避光静置30 min, PBS洗涤2次后, 流式细胞仪进行鉴定。

1.4.3 造模及分组 BALB/c Foxp3-DTR-EGFP阳性小鼠50只, 随机取6只作为正常对照组, 余44只进行造模。小鼠自由饮食, 连续3 d经腹腔注射链脲佐菌素50 mg/kg, 第4天注射白喉毒素0.5 μg /只。每3 d监测一次血糖, 连续2次血糖 ≥ 15 mmol/L, 认为造模成功。最终31只小鼠造模成功, 造模成功后随机分为: 模型组6只、免疫干预组6只、人脐带间充质干细胞组8只、联合治疗组8只。

1.4.4 干预方法 造模成功后, 免疫干预组小鼠皮下注射“地塞米松(10 μg)+胰岛素(10 μg)”的混合液进行免疫干预; 人脐带间充质干细胞组小鼠尾静脉移植第3代人脐带间充质干细胞悬液200 μL /只, 细胞浓度 $5 \times 10^9 L^{-1}$; 联合治疗组则进行免疫干预+干细胞治疗; 模型组在相同条件下注射等量的生理盐水。模型组在治疗期间未进行降糖干预。其中免疫干预每周1次, 连续治疗3周; 干细胞治疗每2周1次, 共2次。以造模完成后为第0周。

1.5 主要观察指标 ①造模成功后, 每周检测一次血糖和体质量; ②利用酶联免疫双抗体夹心法测定小鼠空腹及餐后2 h血清C肽水平; ③胰腺组织病理观察: 治疗后4周, 以颈椎脱位法处死小鼠, 迅速取出胰腺, 用体积分数10%甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋。将石蜡包埋组织行连续切片, 常规苏木精-伊红染色观察胰岛形态; ④胰岛素免疫组织化学染色: 观察胰岛素染色阳性面积大小及分

布。

1.6 统计学分析 采用SPSS 21.0软件进行统计学分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数对比采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人脐带间充质干细胞的表型鉴定结果 如图1所示, 流式细胞仪检测结果: CD44-FITC(99.9%)、CD90-APC(98.9%)、CD105-PE(99.9%)高表达, CD14-FITC(0.081%)、CD34-PE(0.43%)、HLA-DR-APC(0.024%)低表达, 细胞表型符合人脐带间充质干细胞的表型特征。

2.2 BALB/c Foxp3-DTR-EGFP阳性小鼠的流式鉴定结果 取四五周龄小鼠, 经眼眶采血进行流式鉴定, 共鉴定115只小鼠, 其中阳性小鼠59只, 阳性率51.3%, 图2A为阳性结果, 图2B为阴性结果。

2.3 BALB/c Foxp3-DTR-EGFP阳性小鼠Treg细胞敲除 BALB/c Foxp3-DTR-EGFP阳性小鼠经腹腔注射白喉毒素后24 h, 再次通过流式细胞仪对小鼠进行鉴定, 结果如图2C所示, Q2象限细胞群消失, Treg细胞被成功敲除。

2.4 各组小鼠血糖、体质量、C肽变化

2.4.1 血糖变化 治疗后4周, 正常对照组小鼠血糖仍维持在正常范围内, 模型组小鼠血糖在基线水平上升高, 两组对比差异有统计学意义($P < 0.01$); 免疫干预组、人脐带间充质干细胞组及联合治疗组小鼠血糖均有不同程度的下降, 但与模型组对比差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 治疗前后各组小鼠血糖及体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 Changes in blood glucose level and body mass in mice before and after treatment

组别	血糖(mmol/L)		体质量(g)	
	0周	4周	0周	4周
正常对照组	6.8 \pm 0.5	6.8 \pm 0.1	19.9 \pm 1.1	21.2 \pm 0.2
模型组	28.7 \pm 1.1 ^b	29.6 \pm 0.8 ^b	16.9 \pm 1.9 ^b	16.6 \pm 0.5 ^b
免疫干预组	29.5 \pm 3.1 ^b	24.4 \pm 5.1 ^b	16.3 \pm 1.5 ^b	16.6 \pm 1.7 ^b
人脐带间充质干细胞组	27.8 \pm 1.2 ^b	23.7 \pm 3.9 ^b	17.1 \pm 0.3 ^a	18.3 \pm 0.6 ^{bc}
联合治疗组	29.7 \pm 2.6 ^b	25.7 \pm 8.1 ^b	16.9 \pm 2.4 ^b	18.8 \pm 1.2 ^{bd}

表注: 与正常对照组对比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与模型组对比, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ 。

2.4.2 体质量变化 治疗后4周, 正常对照组小鼠体质量明显增加, 模型组小鼠体质量下降, 两组对比差异有统计学意义($P < 0.01$); 免疫干预组、人脐带间充质干细胞组、联合治疗组小鼠体质量均有不同程度的增加, 但与模型组对比, 免疫干预组小鼠体质量变化不显著($P > 0.05$); 人脐带间充质干细胞组、联合治疗组小鼠体质量明显升高, 与模型组对比差异有统计学意义($P < 0.05$), 其中联合治疗组体质量升高更加显著($P < 0.01$), 人脐带间充质干细胞组和联合治疗组小鼠体质量增量接近正常对照组水平。见表1。

2.4.3 C肽变化 治疗后4周, 正常对照组小鼠C肽水平在

合适范围内, 模型组小鼠C肽水平明显下降, 两组对比差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组对比, 免疫干预组小鼠血清C肽水平变化不显著($P > 0.05$); 人脐带间充质干细胞组及联合治疗组小鼠血清C肽水平显著升高, 与模型组对比差异有统计学意义($P < 0.01$); 其中联合治疗组小鼠血清C肽水平改善最明显, 接近正常对照组水平。见表2。

表2 各组小鼠空腹及餐后2h的C肽水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, ng/L)
Table 2 Fasting and 24-hour postprandial C-peptide levels in mice

组别	0 h	餐后2 h
正常对照组	392±33	477±35
模型组	115±38 ^b	223±19 ^b
免疫干预组	115±11 ^b	211±8 ^b
人脐带间充质干细胞组	241±92 ^{bc}	321±75 ^{bd}
联合治疗组	282±59 ^{ad}	401±32 ^d

表注: 与正常对照组对比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与模型组对比, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ 。

2.5 苏木精-伊红染色观察胰腺组织形态变化 正常对照组小鼠胰岛形态规则, 呈圆形或者椭圆形细胞团, 边界清楚, 胰岛数及胰岛内细胞数量多, 排列致密, 胰岛细胞大小一致, 细胞胞体饱满, 胞质丰富, 呈嗜酸性, 核染色清晰呈卵圆形; 模型组小鼠胰岛明显萎缩, 轮廓不规则、扭曲、变形, 边界模糊, 胰岛数及胰岛内细胞数量明显减少, 排列紊乱, 分布稀疏; 免疫干预组、人脐带间充质干细胞组、联合治疗组小鼠胰岛细胞受损程度较轻, 胰岛轻度萎缩, 胰岛形态较规则, 界限清晰, 胰岛内细胞数量较多, 尤其是联合治疗组, 部分小鼠胰岛形态完整接近正常组小鼠胰岛。见图3。

2.6 小鼠胰岛素免疫组织化学染色 正常对照组小鼠胰岛素染色阳性面积占满整个胰岛, 分布均匀; 模型组小鼠胰岛素染色阳性面积仅占胰岛小部分, 且分布紊乱; 免疫干预组、人脐带间充质干细胞组、联合治疗组小鼠胰岛素染色阳性面积占胰岛的大部分, 且分布较均匀; 与模型组对比, 人脐带间充质干细胞组及联合治疗组小鼠胰岛素染色阳性面积变化显著, 其中部分人脐带间充质干细胞组及联合治疗组小鼠胰岛素染色阳性面积接近正常组。见图4。

3 讨论 Discussion

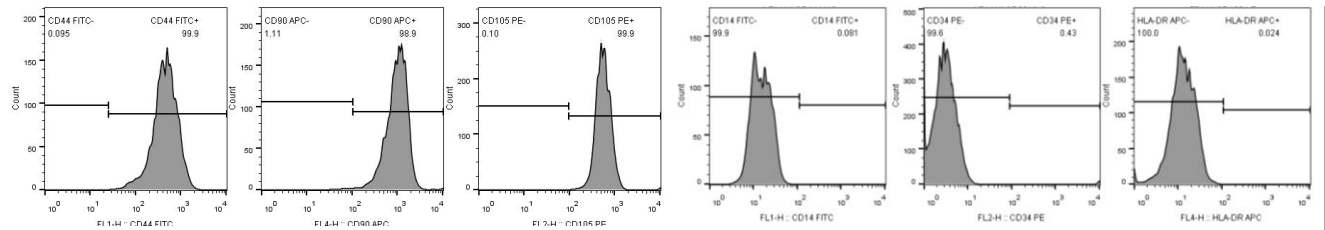
1型糖尿病是一种由自身反应性T细胞和炎症引起的胰腺β细胞严重损失的慢性自身免疫性疾病。胰岛炎是1型糖尿病的病理标志, 是由胰岛周围和内部的免疫细胞浸润组成的炎性病变^[19]。越来越多的证据表明, 炎症和胰岛β细胞功能障碍可能是最初疾病产生的重要发病机制^[20-23]。T细胞在1型糖尿病的诱导中起重要作用, 其中CD8⁺T细胞是胰岛炎性病变中最主要的细胞群, 其次是巨噬细胞、CD4⁺T细胞、B淋巴细胞和浆细胞^[24]。Treg细胞是外周免疫耐受的主要调控因子^[25], 而且已证明Treg细胞通过下调

CD4⁺或CD8⁺T细胞的功能在预防自身免疫和控制免疫反应中发挥核心作用^[26-28]。已有报道, 1型糖尿病患者外周血Treg细胞百分比显著减少, 并存在功能缺陷^[29-30]。因此, Treg细胞的减少, 自身免疫耐受被打破, 自身反应性T细胞过度活化和聚集可能在1型糖尿病的发病过程中发挥重要作用。1型糖尿病的发病原因可以归结为2点: ①自身抗原的释放, 由病毒或者化学药物导致; ②自身免疫耐受被打破。最常用的1型糖尿病模型是NOD小鼠, 其发病机制与人相似, 但仍有很多不足: ①NOD小鼠主要是由CD4⁺T细胞介导发病, 而1型糖尿病患者主要是由CD8⁺T细胞介导^[31]; ②很多能够成功逆转NOD糖尿病小鼠的药物, 对1型糖尿病患者效果差^[32]。基于此, 以BALB/c Foxp3-DTR-EGFP阳性小鼠为实验对象, 首先通过腹腔注射链脲佐菌素损伤胰岛β细胞释放自身抗原, 再使用白喉毒素敲除Treg细胞打破机体免疫耐受建立新型1型糖尿病模型, 更加符合临床1型糖尿病患者的发病过程。并采用免疫干预诱导免疫耐受、抑制自身免疫反应, 干细胞修复损伤胰岛β细胞的方法治疗1型糖尿病小鼠以观察其疗效。

Geng等^[33]研究显示, 用免疫干预药物(地塞米松+胰岛素)对NOD小鼠糖尿病模型进行治疗, 能够提高Treg细胞的百分比, Treg细胞通过抑制自身反应性细胞毒性CD8⁺T细胞阻止1型糖尿病的发生。低剂量的地塞米松可以下调炎症、阻止病毒诱导的1型糖尿病的发生^[13, 34]。在此次实验中, 免疫干预组小鼠皮下注射地塞米松+胰岛素混合液后, 与模型组对比, 1型糖尿病小鼠血糖下降, 胰岛及胰岛细胞增多, 胰岛素化学染色阳性面积增大, 而小鼠血清C肽水平变化不显著, 可能跟免疫耐受诱导周期、给药频率和剂量有关。研究表明, 人脐带间充质干细胞可分化成多种组织, 在体外和体内均具有独特的免疫调节作用^[35], 可以抑制T淋巴细胞活化下调自身免疫反应^[36-37], 促进Treg细胞增殖及功能增强^[38-41]。脐带间充质干细胞还能改善1型糖尿病大鼠的高血糖、延缓其胰岛β细胞损伤、促进胰岛再生^[42], 这与此次实验结果相似。在此次研究中, 小鼠尾静脉移植人脐带间充质干细胞后, 与模型组对比, 1型糖尿病小鼠血糖下降, 血清C肽水平显著增加, 胰岛及胰岛细胞显著增多, 胰岛素免疫组织化学染色阳性面积显著增大, 这些数据表明人脐带间充质干细胞可能通过延缓胰岛β细胞损伤、修复受损的胰岛β细胞来改善1型糖尿病小鼠的胰岛功能。除此以外, 作者还对人脐带间充质干细胞联合免疫干预治疗1型糖尿病小鼠的疗效进行了探索, 目前还未看到相关的报道和研究, 结果显示联合治疗的效果要优于单独免疫干预及干细胞治疗。该实验数据扩充了之前的研究结果^[35, 43], 并支持了输注脐带间充质干细胞通过保护胰岛β细胞功能改善血糖代谢的观点, 而保护胰岛β细胞功能、控制血糖水平对减少和预防糖尿病并发症至关重要。

总之, 人脐带间充质干细胞联合免疫干预可能通过延缓胰岛β细胞的进一步损伤、促进胰岛β细胞修复及再生的方式来保护 1 型糖尿病小鼠的胰岛功能、改善 1 型糖尿病小鼠的血糖, 其中联合治疗的效果可能会更好。虽然该研究丰富了 1 型糖尿病的治疗方法, 为干细胞的临床应用提供了数据支持, 但其样本量较小, 且随访观察时间

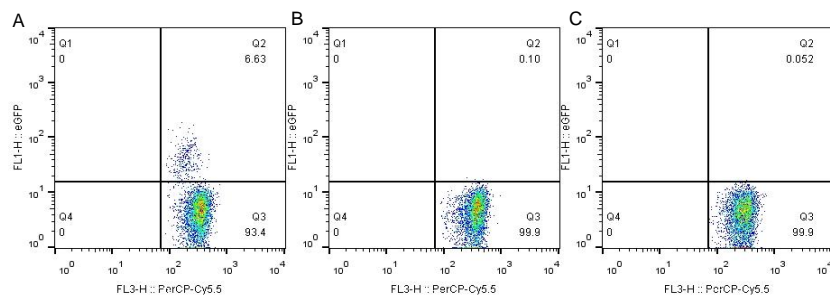
间太短、给药次数少、未检测酮体、缺乏相关机制的研究等, 因此, 今后将进一步延长疗效观察时间、增加给药次数以验证研究结果, 并检测酮体等相关指标, 观察高血糖、酮症对机体的损害, 为临床应用提供更加有力的证据。



图注: 取第 3 代人脐带间充质干细胞进行流式鉴定, CD44-FITC、CD90-APC、CD105-PE 高表达, CD14-FITC、CD34-PE、HLA-DR-APC 低表达, 符合脐带间充质干细胞的表型特征。

图 1 人脐带间充质干细胞的表型鉴定

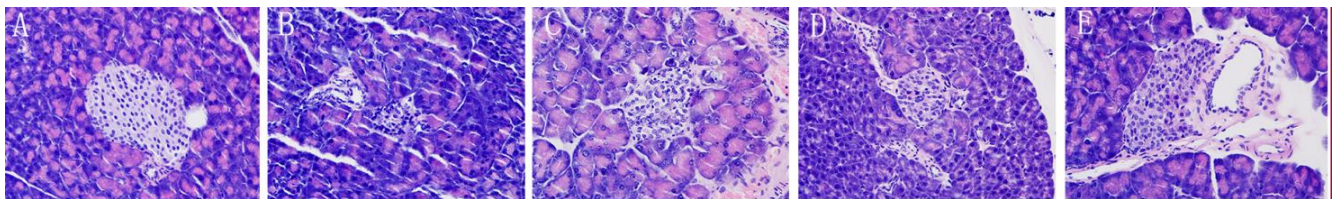
Figure 1 Phenotypes of human umbilical cord mesenchymal stem cells



图注: 图 A 的 Q2 象限有明显细胞群, 属于 BALB/c Foxp3-DTR-EGFP 阳性小鼠; 图 B 的 Q2 象限无细胞群分布属于阴性小鼠; 图 C 为阳性小鼠腹腔注射白喉毒素 24 h 后, 再次进行鉴定, Q2 象限的细胞群消失, 即 Treg 细胞被敲除。

图 2 BALB/c Foxp3-DTR-EGFP 小鼠鉴定及 Treg 细胞敲除

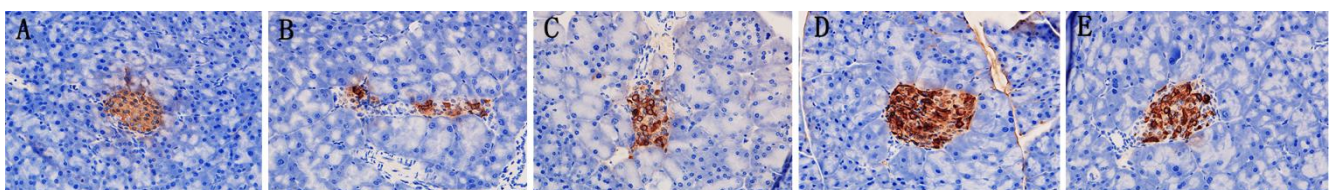
Figure 2 BALB/c Foxp3-DTR-EGFP mouse identification and Treg cell knockout



图注: 图 A-E 分别为正常对照组、模型组、免疫干预组、人脐带间充质干细胞组、联合治疗组。

图 3 各组小鼠胰腺组织形态变化(苏木精-伊红染色, ×400)

Figure 3 Morphological changes of the mouse pancreas in each group (hematoxylin-eosin staining, ×400)



图注: 图 A-E 分别为正常对照组、模型组、免疫干预组、人脐带间充质干细胞组、联合治疗组。

图 4 各组小鼠胰岛素免疫组化染色(×400)

Figure 4 Insulin immunohistochemical staining in mice (×400)

致谢: 感谢北京大学航天临床医学院中心实验室老师在细胞培养方面给予的帮助以及病理科老师在免疫组化、病理切片等方面给予的帮助; 感谢中国中医科学院中药研究所姚荣妹、徐英莉在动物取材等方面给予的帮助。

作者贡献: 设计为通讯作者和第一作者, 资料收集为第一作者, 评估为第三、四作者, 通讯作者审核, 第一作者对文章负责。

经费支持: 该文章接受了“北京大学航天临床医学院科研基金资助项目(YN201806)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究 and 文章撰写过程中不

存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经航天中心医院伦理委员会批准, 批准号为 20171206-YN-10。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在颈椎脱臼法猝死小鼠后进行取材, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经北京中医药大学生物统计学专家审核。

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4.0”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] Battaglia M, Atkinson MA. The Streetlight Effect in Type 1 Diabetes. *Diabetes*.2015;64(4):1081-1090.
- [2] Gülden E, Palm N, Herold KC. MAIT Cells: A Link between Gut Integrity and Type 1 Diabetes. *Cell Metab*. 2017;26(6):813-815.
- [3] Atkinson MA, von Herrath M, Powers AC, et al. Current concepts on the pathogenesis of type 1 diabetes-considerations for attempts to prevent and reverse the disease. *Diabetes Care*.2015;38(6):979-988.
- [4] Wang HS, Shyu JF, Shen WS, et al. Transplantation of insulin-producing cells derived from umbilical cord stromal mesenchymal stem cells to treat NOD mice. *Cell Transplant*. 2011;20(3):455-466.
- [5] Qu H, Liu X, Ni Y, et al. Laminin 411 acts as a potent inducer of umbilical cord mesenchymal stem cell differentiation into insulin-producing cells. *J Transl Med*.2014;12:135.
- [6] 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.
- [7] Kuchrop P, Dave V, Vijayan A, et al. Paracrine factors secreted by umbilical cord-derived mesenchymal stem cells induce angiogenesis in vitro by a VEGF-independent pathway. *Stem Cells Dev*. 2015;24(4):437-450.
- [8] Shen C, Lie P, Miao T, et al. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Mol Med Rep*.2015;12(1):20-30.
- [9] Li T, Xia M, Gao Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin Biol Ther*.2015;15(9):1293-1306.
- [10] Ding D, Chang Y, Shyu W, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant*. 2015; 24(3):339-347.
- [11] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*.2006; 91(8):1017-1026.
- [12] Wilckens T, De Rijk R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunol Today*. 1997; 18(9):418-424.
- [13] Londono P, Komura A, Hara N, et al. Brief dexamethasone treatment during acute infection prevents virus-induced autoimmune diabetes. *Clin Immunol*.2010;135(3):401-411.
- [14] Harrison LC, Wentworth JM, Zhang Y, et al. Antigen-based vaccination and prevention of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep*.2013; 13(5):616-623.
- [15] Harrison LC, Honeyman MC, Steele CE, et al. Pancreatic beta-cell function and immune responses to insulin after administration of intranasal insulin to humans at risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(10):2348-2355.
- [16] 于文龙,高宏,余霄龙,等. 脐带间充质干细胞移植治疗初发1型糖尿病[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011,15(23):4363-4366.
- [17] 谭晓俊,王镇,李晓莹,等. 脐带间充质干细胞治疗1型糖尿病远期疗效观察三例报告[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2016,32(12):1030-1032.
- [18] Geng S, Zhang H, Zhou X, et al. Diabetes tolerogenic vaccines targeting antigen-specific inflammation. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(2): 522-530.
- [19] Campbell-Thompson ML, Atkinson MA, Butler AE, et al. The diagnosis of insulinitis in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2013; 56(11):2541-2543.
- [20] Krogvold L, Skog O, Sundstrom G, et al. Function of Isolated Pancreatic Islets From Patients at Onset of Type 1 Diabetes: Insulin Secretion Can Be Restored After Some Days in a Nondiabetogenic Environment In Vitro: Results From the DiViD Study. *Diabetes*.2015; 64(7):2506-2512.
- [21] Marhfouf I, Lopez XM, Lefkadtis D, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*.2012;55(9):2417-2420.
- [22] Imai Y, Dobrian AD, Morris MA, et al. Lipids and immunoinflammatory pathways of beta cell destruction. *Diabetologia*.2016;59(4):673-678.
- [23] Grzesik WJ, Nadler JL, Machida Y, et al. Expression pattern of 12-lipoxygenase in human islets with type 1 diabetes and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):E387-E395.
- [24] Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, et al. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2009; 155(2):173-181.
- [25] Visperas A, Vignali DA. Are Regulatory T Cells Defective in Type 1 Diabetes and Can We Fix Them?. *J Immunol*, 2016;197(10): 3762-3770.
- [26] D'Alessio FR, Tsushima K, Aggarwal NR, et al. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J Clin Invest*. 2009;119(10): 2898-2913.
- [27] Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med*. 2009;15(2):192-199.
- [28] Chen X, Zhou B, Li M, et al. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. *Clin Immunol*.2007;123(1):50-59.
- [29] Qiao YC, Shen J, Hong XZ, et al. Changes of regulatory T cells, transforming growth factor-beta and interleukin-10 in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Clin Immunol*. 2016;170:61-69.
- [30] Ghonaim MM, El-Edel RH, Kamal ES, et al. T-Regulatory Cell Subsets in Children with Type 1 Diabetes Mellitus: Relation to Control of the Disease. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2017; 17(3):238-245.
- [31] Lampeter EF, Signore A, Gale EA, et al. Lessons from the NOD mouse for the pathogenesis and immunotherapy of human type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1989;32(10): 703-708.
- [32] Lenzen S. Animal models of human type 1 diabetes for evaluating combination therapies and successful translation to the patient with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2017;33(7). doi: 10.1002/dmrr.2915.
- [33] Geng S, Zhang H, Zhou X, et al. Diabetes tolerogenic vaccines targeting antigen-specific inflammation. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(2): 522-530.
- [34] Zipris D. Innate immunity in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011;27(8): 824-829.
- [35] Hu J, Wang Y, Wang F, et al. Effect and mechanisms of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on type 1 diabetes in NOD model. *Endocrine*. 2015;48(1):124-134.
- [36] Wang D, Chen K, Du W T, et al. CD14+ monocytes promote the immunosuppressive effect of human umbilical cord matrix stem cells. *Exp Cell Res*. 2010;316(15): 2414-2423.
- [37] Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(5):125.
- [38] Tang RJ, Shen SN, Zhao XY, et al. Mesenchymal stem cells-regulated Treg cells suppress colitis-associated colorectal cancer. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:71.

- [39] Wang D, Huang S, Yuan X, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(5):423-431.
- [40] Montanucci P, Alunno A, Basta G, et al. Restoration of t cell subsets of patients with type 1 diabetes mellitus by microencapsulated human umbilical cord Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells: An in vitro study. *Clin Immunol.*2016;163:34-41.
- [41] 赵子艷,叶常青,罗建春,等. 脐带间充质干细胞移植对心力衰竭大鼠外周血CD₄⁺CD₂₅⁺Foxp₃⁺Treg细胞表达的影响[J]. 山东医药, 2015,55(41):13-15.
- [42] El-Hossary N, Hassanein H, El Ghareeb AW, et al. Intravenous vs intraperitoneal transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016; 21:102-111.
- [43] Sun X, Hao H, Han Q, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate insulin resistance by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in type 2 diabetes rats. *Stem Cell Res Ther.*2017;8(1):241.