doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.16.005

人脐带间充质干细胞移植对糖尿病大鼠血清学的影响 *

毕长龙[1] 胡玉华[1] 栾 嵩[1] 王吉锡[2] 李 波[1△]

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001 ;2 黑龙江中医药大学 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 目的:观察人脐带间充质干细胞(huMSCs)移植对糖尿病大鼠血糖、胰岛素和血清因子表达的影响。**方法:**随机选择 12 只 Wistar 大鼠通过腹腔注射链脲佐菌素 50 mg/kg，血糖高于 16.7 mmol/L 者定为糖尿病大鼠，再将其随机分为糖尿病组和干细胞组,每组 6 只,同时选择 6 只雄性 Wistar 大鼠为正常组。干细胞组大鼠腹腔注射 huMSCs 细胞悬液,糖尿病组注射 PBS 液。分别于注射 2 周、4 周和 6 周后测定和比较各组大鼠的血糖、血清胰岛素、肿瘤坏死因子 (TNF- α)和白介素 -6(IL-6)的表达。**结果:**与正常组比较,糖尿病组和干细胞组大鼠的血糖水平均显著升高,胰岛素水平均显著降低(P<0.01)。与糖尿病组比较,干细胞组大鼠注射 huMSCs 后的血糖水平明显降低，胰岛素水平明显升高 (P<0.05)，血清 TNF-α 和 IL-6 mRNA 水平均显著降低 (P<0.01)。**结论:** huMSCs 移植能显著降低糖尿病大鼠的血糖,促进其胰岛素分泌,同时降低血清 TNF-α 和 IL-6 的表达。

关键词:人脐带间充质干细胞;糖尿病;大鼠;血清学

中图分类号:Q95-3;R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)16-3019-03

Study on the Effect of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Serology of Diabetes in Rats*

BI Chang-long[1], HU Yu-hua[1], LUAN Song[1], WANG Ji-xi[2], LI Bo[1△]

(1 Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell (humscs) transplantation on serology of diabetes in rats. **Methods:** 12 male Wistar rats were randomly selected and were injected with streptozotocin (50 mg/kg) intraperitoneally. The blood glucose of successful diabetic rat was higher than 16.7 mmol/L. 12 rats were randomly divided into diabetic group (n=6) and stem cell group (n=6). At the same time, 6 male Wistar rats were selected as normal group. The rats of stem cell group and diabetic group were injected with huMSCs cell suspension and PBS solution respectively. The levels of blood glucose, serum insulin, tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and interleukin -6 (IL-6) were measured and compared at 2 weeks, 4 weeks and 6 weeks after transplantation. **Results:** The blood glucose levels of rats were significantly higher in diabetic group and stem cell group than that in normal group, while the insulin level of both groups were significantly lower (P<0.01); compared with that in diabetic group, the blood glucose level was obviously reduced in rats of stem cell group after injection with huMSCs, while the insulin level was significantly elevated and the expression of TNF-α and IL-6 mRNA were markedly decreased (P<0.05). **Conclusions:** The transplantation of huMSCs could evidently reduce the blood glucose of diabetic rats, increase the insulin secretion, and decrease the serum TNF-α and IL-6 levels.

Key words: Human umbilical cord mesenchymal stem cells; Diabetes; Rat; Serology

Chinese Library Classification(CLC):Q95-3; R587.1 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2015)16-3019-03

前言

糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢性疾病。高血糖则是由于胰岛素分泌缺陷或其生物作用受损,或两者兼有所致。糖尿病患者长期存在的高血糖可导致各种组织,特别是眼、肾、心脏、血管、神经的慢性损害和功能障碍[1]。糖尿病最根本的治疗方法是胰腺或胰岛移植,但其来源匮乏且需终生服用免疫抑制剂,因此需要寻找更好的治疗方法。近年来研究发现,人脐带间充质干细胞(huMSCs)在体外可以分化为血管内皮细胞、胰岛素样细胞、神经细胞,并且具有临床应用及时、低免疫原性、免疫耐受和受遗传因素影响少等优点[2]。此外,研究证实血清因子如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF- α)和白介素 -6(interleuki-6, IL-6)等在糖尿病及其并发症中起着重要作用[3]。因此,本实验通过经大鼠腹腔注射 huMSCs,观察了其对糖尿病大鼠血糖、血清胰岛素、TNF-α 和 IL-6 水平的影响,以期为 huMSCs 应用于治疗糖尿病提供更多的实验依据。

1 材料和方法

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531319)

作者简介:毕长龙(1979-),男,医学硕士,主治医师,主要研究方向:干细胞移植,电话:0451-82576735,E-mail:bcl163@163.com

△通讯作者:李波,E-mail:libo82576735@163.com

(收稿日期:2015-01-09 接受日期:2015-01-30)

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 18 只，体重 180± 20 g，由哈尔滨医科大学实验动物中心提供。本实验所有操作及实验动物的使用和饲养遵守哈尔滨医科大学伦理委员会颁布的实验动物使用伦理规范。

1.2 试剂及材料

DMEM/F12 培养基和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司，胰蛋白酶 /EDTA 消化液购自美国 Invitrogen 公司。链脲佐菌素购自美国 Sigma 公司，反转录试剂盒购自美国 Fermentas 公司，Real-time PCR SYB Green 试剂购自日本 TaKaRa 公司。PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.3 huMSCs 细胞的培养

细胞复苏后放置在 37℃ 、5% CO_2 培养箱内培养。3~4 天换液 1 次。待细胞长至 80%~90%融合时使用消化液进行传代培养。

1.4 糖尿病大鼠模型的制备及 huMSCs 细胞的移植

将 18 只大鼠随机分为对照组 (6 只) 和糖尿病造模组(12 只)，大鼠禁食 12 小时，造模组单次腹腔注射链脲佐菌素 50 mg/kg，对照组腹腔注射等体积生理盐水，每隔 3 d 从尾静脉采血测空腹血糖。以 3 次血糖高于 16.7 mmol/L 定义为糖尿病造模大鼠。糖尿病大鼠造模成功后，将其随机分为糖尿病组和干细胞组，每组 6 只大鼠。干细胞组大鼠通过腹腔注射 huMSCs 细胞悬液 0.5 mL (细胞数 2.5× 10^6 个)，糖尿病组注射等量的 PBS 液。

1.5 血糖、胰岛素水平的测定

分别于注射后 2 周、4 周和 6 周取大鼠尾静脉血，采用瑞士罗氏血糖仪检测大鼠血糖水平，放射免疫法检测血清胰岛素水平。

1.6 血清学指标的测定

注射 4 周后 [5]，取大鼠尾静脉血，采用 Trizol 法提取总 RNA，进行反转录 PCR。Real-time PCR 方法检测各组大鼠血清因子的变化，内参 GAPDH(NM_017008)上游引物 5'-TGTTGCCATCAACGACCCCTT-3'，下游引物 5'-CTCCACGACATACTCAGCA-3'；TNF-α (NM_012675) 上游引物 5'-TCTTCTCATTCCTGCTCGTGG- 3'，下游引物 5'-GGTCTGGGCCATGGAACTGA-3'；IL-6 (NM_012589) 上游引物 5'-GCCCTTCAGGAACAGCTATG 3'，下游引物 5'- GCAGTGGCTGTCAACAACA- 3'[4]。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用 t 检验，以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时点血糖、胰岛素水平的比较

18 只大鼠均进入结果分析，中途无脱落。与正常组(normal group)比较，糖尿病组(diabetic group)和干细胞组(stem cells group) 大鼠在注射 2 周、4 周和 6 周后的血糖水平均较正常组显著升高，胰岛素水平较正常组均显著降低(P<0.01)；与糖尿病组比较，干细胞组在注射 2 周、4 周和 6 周后血糖水平明显降低，胰岛素水平显著升高(P<0.05)，见表 1。

表 1 细胞移植后不同时间点各组大鼠血糖和胰岛素水平的比较

Table 1 Comparison of the blood glucose and serum insulin levels at different time points after cell transplantation between rats from different groups

Group	Number	2 weeks after injection		4 weeks after injection		6 weeks after injection	
		Blood glucose (mmol/L)	Serum insulin (mU/L)	Blood glucose (mmol/L)	Serum insulin (mU/L)	Blood glucose (mmol/L)	Serum insulin (mU/L)
Normal group	6	5.8± 0.5	19.1± 4.6	6.5± 0.3	18.2± 5.9	6.1± 0.4	20.3± 3.8
Diabetic group	6	23.7± 3.3[a]	9.6± 2.4[a]	22.9± 4.2[a]	10.4± 2.8[a]	22.1± 3.7[a]	11.5± 3.1[a]
Stem cells group	6	20.2± 5.6[ab]	14.2± 3.7[ab]	18.8± 4.7[ab]	14.5± 4.1[ab]	18.1± 3.9[ab]	15.6± 3.9[ab]

注：糖尿病组和干细胞组分别与正常组比较，[a]P<0.01；干细胞组与糖尿病组比较，[b]P<0.05。

Note: The diabetic group and stem cell group were compared with the normal group, [a]P<0.01; The stem cell group was compared with the diabetic group, [b]P<0.05.

2.2 各组大鼠血清 TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达水平的比较

注射 4 周后 [5]，糖尿病组和干细胞组大鼠血清 TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达水平均较正常组显著升高(P<0.01，P<0.05)，而干细胞组大鼠血清 TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达水平均显著低于糖尿病组(P<0.01)。

3 讨论

糖尿病以高发生率、高致残率和高死亡率严重影响患者的生活质量，甚至威胁其生命[6]。内、外科治疗方法主要停留在对症治疗和缓解症状等方面，因而寻找更为合理、有效的治疗方法是十分必要的。间充质干细胞(mesenchymal stem cell，MSC)具有多向分化潜能、免疫调控和自我复制能力，近年来在疾病治疗方面取得了较大的进展[7]。如由 MSC 诱导心肌细胞可以表达肌钙蛋白 I 和肌间蛋白，为心肌梗死的治疗开辟了方向[8]。体外传代大鼠及人的 MSC 在一定条件下可分化为神经元[9]。这些研究对于探索糖尿病及糖尿病并发症的治疗方法提供了一定理论和应用基础。

huMSCs 具有分化为心肌细胞、脂肪细胞、肌肉细胞、软骨细胞、神经细胞、胰岛素分泌细胞、血管内皮细胞的功能[10]，而且能分泌胰岛素分泌因子 IGF-I 和 IGF-I 联合蛋白，表皮生长因子等[11]，在产生胰岛素分泌样细胞的能力方面优于外周和骨髓干细胞[10]。huMSCs 在体外培养体系中能快速增殖，传代后 3~5 天能增殖 4 倍，10 代后的增殖能力仍然很强，并且维持其多向分化和免疫耐受特性，比外周血和骨髓干细胞更符合临床

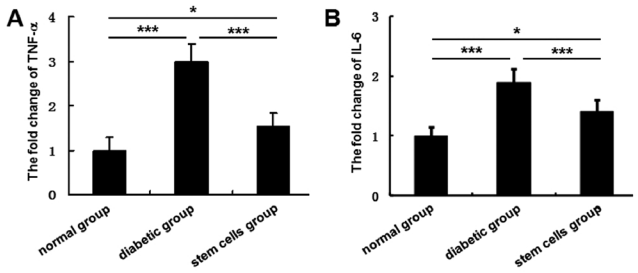

图 1 各组大鼠移植 4 周后血清 TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达水平的比较

Fig. 1 Comparison of the serum TNF-α and IL-6 mRNA levels at 4 weeks after cell transplantation between rats from different groups

A. **正常组、糖尿病组和干细胞组大鼠血清** TNF-α mRNA **的表达水平；** B. **正常组、糖尿病组和干细胞组大鼠血清** IL-6 mRNA **的表达水平，** *P<0.05，***P<0.01

A. The expression of TNF-α mRNA in rats serum of normal group, diabetic group and stem cells group; B. The expression of IL-6 mRNA in rats serum of normal group, diabetic group and stem cells group

应用要求[12]，是糖尿病治疗较为理想的干细胞材料。本研究对 huMSCs 移植治疗糖尿病进行了初步探讨，发现 huMSCs 经体外培养后通过腹腔注射移植糖尿病大鼠，可使其血糖水平降低，胰岛素水平明显升高，提示 huMSCs 移植用于治疗 2 型糖尿病具有广阔的前景。

糖尿病及其并发症的发病机制相当复杂，其中免疫和炎症的病理生理变化起重要的作用，血清因子 TNF-α 和 IL-6 等在多种组织中能影响胰岛素信号传导途径，与糖尿病发病及其并发症发生发展相关[13]。TNF-α 是一种多功能细胞因子，与炎症密切相关，机体脂肪细胞中的巨噬细胞是其主要来源，高水平的 TNF-α 可促进胰岛素抵抗的发生[14]。IL-6 成分是糖蛋白，由 184 个氨基酸残基组成，是 B 细胞终末分化因子，可诱导 B 细胞克隆、活化，高水平的 IL-6 可引起足部溃疡部位的免疫损伤[15]。而本组研究表明 huMSCs 移植处理糖尿病大鼠可使其血清因子 TNF-α 和 IL-6 水平降低，进而减轻其对机体的损伤作用，但有其具体的作用机制尚需进一步的研究。随着我们对 huMSCs 认识的增多，相信会为糖尿病的治疗提供更多的思路和方法。

参 考 文 献(References)

[1] Picard F, dos Santos P, Catargi B. Diabetes, obesity and heart complications[J]. Rev Prat, 2013, 63(6): 759-764

[2] Xu ZF, Pan AZ, Yong F, et al. Human umbilical mesenchymal stem cell and its adipogenic differentiation: Profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. World J Stem Cells, 2012, 4(4): 21-27

[3] Kontoangelos K, Papageorgiou CC, Raptis AE, et al. Boutati Ediabetes mellitus and psychopathology: a challenging combination [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2014, 35(2): 159-169

[4] Chen JF, Ni HF, Pan MM, et al. Pirfenidone inhibits macrophage infiltration in 5/6 nephrectomized rats[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2013, 304(6): F676-685

[5] H. Kirana, M. V. Jali, B. P. Srinivasan. The study of aqueous extract of Ficus religiosa Linn. on cytokine TNF-α in type 2 diabetic rats [J]. Pharmacognosy Res, 2011, 3(1): 30-34

[6] Rasekaba TM, Lim WK, Hutchinson AF. Effect of a chronic disease management service for patients with diabetes on hospitalisation and acute care costs[J]. Aust Health Rev, 2012, 36(2): 205-212

[7] El-Jawhari JJ, El-Sherbiny YM, Jones EA, et al. Mesenchymal stem cells, autoimmunity and rheumatoid arthritis [J]. QJM, 2014, 107(7): 505-514

[8] Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, et al. DNA vaccines [J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15: 617-648

[9] Black IB, Woodbury D. Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons[J]. Blood Cells Mol Dis, 2001, 27 (3): 632-636

[10] Wu LF, Wang NN, Liu YS, et al. Differentiation of Wharton's jelly primitive stromal cells into insulin-producing cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15(10): 2865-2873

[11] Alaminos M, Pé rez-Ké hler B, Garzó n I, et al. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells[J]. J Cell Physiol, 2010, 223(3): 640-647

[12] Nekanti U, Mohanty L, Venugopal P, et al. Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications[J]. Stem Cell Res, 2010, 5(3): 244-254

[13] Skundric DS, Lisak RP. Role of neuropoietic cytokines in development and progression of diabetic polyneuropathy: from glucose metabolism to neurodegeneration [J]. Exp Diabesity Res, 2003, 4(4): 303-312

[14] Yano W, Kubota N, Itoh S, et al. Molecular mechanism of moderate insulin resistance in adiponectin-knockout mice [J]. Endocr J, 2008, 55(3): 515-522

[15] Ahmad J, Zubair M, Malik A, et al. adiponectin, TNF-α, IL-6 and hsCRP plasma levels in subjects with diabetic foot and possible correlation with clinical variables: a multicentric study [J]. Foot (Edinb), 2012, 22(3): 194-199