

人源脐带间充质干细胞移植通过 Chi311 抑制 M1 型巨噬细胞极化减轻 1 型糖尿病小鼠的炎症反应

刘新新¹, 徐迎芮², 盛红娜³, 刘昊¹

¹山东大学附属山东省立第三医院检验科, 山东 济南 250031; ²南京中医药大学养老服务与管理学院, 江苏 南京 210023; ³天津医科大学第二医院产科, 天津 300211

摘要:目的 探究 Chi311 调控人源脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)治疗 1 型糖尿病(T1DM)中的重要作用。方法 通过慢病毒载体构建稳定低表达 Chi311 的 hUC-MSCs(sh-Chi311-MSCs), 经流式细胞术及成脂、成骨诱导分化鉴定其干细胞特性; 采用链脲佐菌素诱导 T1DM 小鼠模型, 分别给予 sh-NC-MSCs 和 sh-Chi311-MSCs 治疗, 监测小鼠临床表现、血糖、体质量变化, 苏木精-伊红染色(HE)评价胰腺组织病理变化, 免疫组化与免疫荧光检测胰岛内胰岛素含量和巨噬细胞浸润; 体外共培养实验诱导骨髓巨噬细胞极化, 流式细胞术检测 M1 和 M2 比例, 采用 qPCR 检测巨噬细胞标志分子 iNOS、Arg-1 和炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-13、IL-1 β 转录水平表达。结果 sh-Chi311-MSCs 仍保持 MSCs 的特性, 但对 T1DM 小鼠治疗效果变差; 免疫荧光结果显示 sh-Chi311-MSCs 治疗组小鼠胰腺组织中巨噬细胞含量要高于 sh-NC-MSCs 治疗组($P < 0.05$); 体外巨噬细胞诱导分化实验结果表明, sh-Chi311-MSCs 抑制 M1 型巨噬细胞极化能力降低, 同时促进 M2 型产生的能力也降低。qPCR 结果表明, sh-Chi311-MSCs 组中巨噬细胞 M1 型标志分子 iNOS 及相关的炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表达升高($P < 0.05$), 而 M2 型巨噬细胞标志分子 Arg-1 及分泌的细胞因子 IL-13 和 IL-10 降低($P < 0.05$)。结论 hUC-MSCs 通过 Chi311 抑制 M1 型巨噬细胞产生, 从而减轻 T1DM 模型小鼠的炎症反应。

关键词: 人源脐带间充质干细胞; Chi311; M1 型巨噬细胞极化; 1 型糖尿病

Human umbilical cord mesenchymal stem cell grafting alleviates inflammatory response in type 1 diabetic mice by suppressing M1 macrophage polarization through Chi311

LIU Xinxin¹, XU Yingru², SHENG Hongna³, LIU Hao¹

¹Department of Laboratory Medicine, Shandong Provincial Third Hospital, Shandong University, Jinan 250031, China; ²Elderly Care Services and Management, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; ³Department of Obstetrics, Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

Abstract: Objective To explore the role of Chi311 in human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUC-MSCs) therapy of type 1 diabetes. **Methods** hUC-MSCs with stable Chi311 knockdown (sh-Chi311-MSCs) were constructed using a lentiviral vector and characterized by flow cytometry and adipogenic and osteogenic induction. In adult C57BL/6J mouse models of streptozotocin-induced T1DM, the therapeutic effects of sh-NC-MSCs and sh-Chi311-MSCs grafting were evaluated by observing changes in clinical manifestations, blood glucose, body weight and pancreatic tissue pathologies. Insulin content and macrophage infiltration in the islets were detected using immunohistochemistry and immunofluorescence staining. The effects of these two stem cells on induced polarization of co-cultured mouse bone marrow macrophages were assessed using flow cytometry by detecting the mRNA expressions of iNOS, Arg-1, TNF- α , IL-6, IL-10, IL-13, and IL-1 β using qPCR. **Results** The constructed sh-Chi311-MSCs retained the characteristics of MSCs but showed reduced therapeutic efficacy in T1DM mice. Immunofluorescence staining showed that the number of macrophages in the pancreatic tissue of the mice treated with sh-Chi311-MSCs was higher than that in MSCs treatment group. In the co-culture experiments, sh-Chi311-MSCs exhibited a lowered capacity to suppress M1 polarization of the macrophages and a reduced efficacy to promote differentiation of M2-type macrophage subset. Analysis with qPCR showed that the expressions of M1 macrophage marker iNOS and the inflammatory factors TNF- α , IL-6, and IL-1 β increased, while the expressions of M2 macrophage marker Arg-1 and the cytokines IL-13 and IL-10 were decreased significantly in sh-Chi311-MSCs group. **Conclusion** In T1DM mouse models, hUC-MSCs mitigate inflammatory responses by suppressing the production of pro-inflammatory M1-type macrophages *via* Chi311.

Keywords: human umbilical cord mesenchymal stem cells; Chi311; M1-type macrophage polarization; type 1 diabetes mellitus

1 型糖尿病(T1DM)是一种自身免疫性疾病,特征是 T 淋巴细胞和巨噬细胞等免疫细胞对胰腺 β 细胞的严重破坏,导致胰岛素分泌不足,患者血糖升高,使患者终生依赖外源性胰岛素^[1,2],约占儿童期各型糖尿病总

数的 90%,严重影响患儿的身心健康^[3,4],因此需要寻找一种安全、有效的治疗方法,从根本上治疗 1 型糖尿病。

间充质干细胞(MSCs)是一种具有低免疫原性的成体干细胞,具有强大免疫调控能力,不仅可以抑制 T 细胞、NK 细胞杀伤功能,也可调控树突状细胞、巨噬细胞等专职抗原呈递细胞^[5],在 T1DM 治疗中显示出良好的治疗效果,但其机制一直未完全解释清楚。近年来新的证据表明,MSCs 可以通过调节组织巨噬细胞极化从

收稿日期:2025-04-21

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划(202211000867)

作者简介:刘新新,医师,硕士,E-mail: 1165462226@qq.com

通信作者:刘昊,主管技师,硕士,E-mail: 13651138303@163.com

而延缓T1DM进展。巨噬细胞是一种固有免疫细胞,分为促炎巨噬细胞(M1型)和抗炎巨噬细胞(M2型),促炎M1型通过分泌IL-6和IL-1 β 并介导炎症反应,而抗炎M2型分泌IL-10和其他抗炎因子并执行组织修复功能,二者间的平衡在保护机体免受病原体入侵、修复受损组织、抑制机体炎症发生起着重要作用^[6]。研究表明,T1DM病人体内M1/M2巨噬细胞的比例呈失调状态,主要表现在M1巨噬细胞极化和促炎细胞因子表达增加,使胰腺组织长期处于炎症浸润状态^[7]。研究发现MSCs对巨噬细胞极化具有调节作用,具有促进M1型向M2型转化,发挥抑制炎症反应作用,从而维持病理部位微环境稳态,这一效应在糖尿病等多种疾病的治疗中发挥着重要作用^[8]。

几丁质酶3样蛋白1(Chi311),又被称为YKL40,由多种细胞合成和分泌,包括巨噬细胞、中性粒细胞、滑膜细胞、软骨细胞、成纤维细胞样细胞、平滑肌细胞和肿瘤细胞。它在组织损伤、炎症、组织修复和重塑反应中起主要作用^[9]。Chi311与炎症过程有关,包括细胞凋亡、树突状细胞积累和M2巨噬细胞分化,在巨噬细胞分化的晚期可被强烈诱导,同时发现分离的M2巨噬细胞及其培养上清液中的Chi311蛋白显著上调^[10]。研究发现Chi311在人源脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)同样高表达^[11],但发挥作用尚未完全阐明,为此本文提出实验假设,MSCs是否能通过Chi311调节M1型巨噬细胞向M2型巨噬细胞极化从而减轻T1DM模型小鼠的炎症反应,通过对T1DM模型小鼠进行MSCs治疗,进一步探讨MSCs调控巨噬细胞极化、减轻T1DM小鼠炎症反应的作用机制,补充MSCs治疗T1DM的分子机制,有助于发现新的治疗靶点,对推动儿童期糖尿病防治研究及应用具有重要的现实意义。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

hUC-MSCs及配套培养基(中国上海中乔新舟公司)、sh-NC/sh-Chi311慢病毒悬液(中国上海吉凯基因科技有限公司);hUC-MSCs成骨诱导分化培养基(中国武汉普诺赛公司);链脲佐菌素(中国上海麦克林公司);柠檬酸钠(中国国药试剂公司);0.25%胰蛋白酶、茜素红S染液、Trizol、油红O、地塞米松、胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、丙酮酸、 β -磷酸甘油、维生素C磷酸盐和碱性磷酸酶(Sigma);抗人流式抗体(FITC-CD14、PE-CD73、FITC-CD34、PE-CD90、FITC-CD45、PE-CD105、APC-F4/80、PE-CD16/32、FITC-CD206)、蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂、BCA蛋白定量工作液(Thermo Fisher Scientific);Trizol RNA提取试剂盒(Invitrogen);缓冲液Reverse Transcriptase M-MLV、

反转录酶试剂(M-MLV)、RNA酶抑制剂(TaKaRa);2 \times Mltra Master Mix、不含RNA酶的水、二硫苏糖醇(DTT)和dNTP(中国康为世纪有限公司);PVDF膜(Merck Millipore);脱脂奶粉(BD);兔抗小鼠胰岛素抗体、HRP-山羊抗兔IgG抗体、F4/80抗体、兔抗小鼠Chi311抗体(Abcam);ECL发光显色液(Merck Millipore);细胞培养瓶、培养板(Corning);血糖试纸和血糖仪(强生);倒置相差显微镜、正置显微镜(Nikon);CO₂细胞培养箱、Micro17R高速冷冻离心机、7500 Fast Real-Time PCR System荧光定量PCR仪(Applied Biosystems);高速冷冻离心机、梯度PCR仪(Thermo Fisher);常温离心机(中国安徽中科中佳科学仪器有限公司)。引物由中国上海生工合成,序列见表1。

1.2 实验动物

实验选用6周龄雄性C57BL/6J小鼠,购自北京维通利华实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK-(京)2016-0006。所有小鼠均饲养于天津医科大学第二医院实验动物中心的SPF级屏障环境,室温恒定(20~26) $^{\circ}$ C、12 h光暗循环。每笼饲养5只小鼠,自由摄取标准颗粒饲料及灭菌饮水。本研究方案经天津医科大学第二医院动物伦理委员会批准(伦理批号:KY2022K090)。

1.3 方法

1.3.1 hUC-MSCs培养及鉴定 hUC-MSCs在专用生长培养基培养,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂,待hUC-MSCs密度增长至80%~90%,采用0.25%胰蛋白酶消化法进行传代,使用含有sh-Chi311-RNA(75489-1):5'-CAGCAGCTATGACATTGCCAA-3'的慢病毒转染hUC-MSCs,作为sh-Chi311 MSCs组,制备稳定敲低Chi311的hUC-MSCs和转染空载慢病毒的hUC-MSCs(sh-NC-MSCs)作为阴性对照组,继续传代培养。

将对数期生长的sh-Chi311-MSCs和sh-NC-MSCs接种至6孔板(2 \times 10⁴/孔,3复孔/组),分别用成脂、成骨诱导分化培养基及成脂、成骨诱导分化操作方法培养。成脂诱导分化体系为:地塞米松1 μ mol/L、胰岛素10 μ g/L、IBMx 0.5 mmol/L和吡哆美辛0.5 mmol/L,培养约10 d,油红O染色液染色20 min,倒置显微镜观察测脂滴分布并拍照。成骨诱导分化体系为:地塞米松0.1 μ mol/L, β -磷酸甘油10 mmol/L和维生素C磷酸盐50 μ mol/L,培养约14 d,丙酮溶液固定1 min,0.1%茜素红S染液染色20 min,倒置显微镜观察产生的矿化结节并拍照。

将sh-Chi311-MSCs和sh-NC-MSCs采用0.25%胰蛋白酶消化后,1000 r/min离心5 min,弃上清;1 \times PBS缓冲液重悬细胞,分装到EP管中,流式细胞术检测各组MSCs细胞表型,所用流式抗体为抗人流式抗体各1 μ L(FITC-CD14、PE-CD73、FITC-CD34、PE-CD90、FITC-

表1 qPCR引物序列
Tab.1 Primer sequences for qPCR

| Primer | | Sequence (5'→3') |
|--------|----------|---|
| GAPDH | Forward: | ACACTCCAGCTGGGGCTGTACTGACTTGATG |
| | Reverse: | CTCAACTGGTGTCTGGAGTCG GCAATTCAGTTGAGCATCAGAT |
| Chi311 | Forward: | AAGCAACGATCACATCGACAC |
| | Reverse: | TCAGGTTGGGGTTCCTGTTCT |
| iNOS | Forward: | CCAACAATACAAGATGACCCT |
| | Reverse: | TTCTGGAACATTCTGTGCTG |
| Arg-1 | Forward: | GAAGTAAAGGAAAGTTCCCA |
| | Reverse: | AATGTACACGATGTCTTTGGC |
| TNF-α | Forward: | GGCAGGTCTACTTTFFAGTCATTGC |
| | Reverse: | ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG |
| IL-6 | Forward: | TACCACTTCACAAGTCGGA |
| | Reverse: | AATTGCCATTGCACAACCTC |
| IL-10 | Forward: | TTAATAAGCTCCAAGACCAAGG |
| | Reverse: | CATCATGTATGCTTCTATGCAG |
| IL-13 | Forward: | TCCCTCAAGTTCTTTGTTCG |
| | Reverse: | CGCACCTTTCTGGTTACAC |
| IL-1β | Forward: | CCTCAAAGGAAAGAATCTATACCTG |
| | Reverse: | CTTGGGATCCACACTCTCC |

CD45、PE-CD105、APC-F4/80、PE-CD16/32、FITC-CD206), 室温避光孵育 20 min, 1×PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次, 流式细胞仪上机检测。

收取各组 MSCs, Trizol 法提取 MSCs 总的 mRNA, 评价 sh-Chi311-RNA 敲低效率, 采用 2 μg 定量逆转录生成 cDNA, qPCR 检测基因表达量, 反应体系为 cDNA 1 μL, PCR 上下游引物 (10 μmol/L) 1 μL, qPCR Master Mix 10 μL 和无 RNA 酶水 8 μL; 反应条件为 95 °C 10 min, (95 °C 15 s, 60 °C 1min) 40 个循环。GAPDH 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示待测基因 mRNA 表达水平。同时向收取的 MSCs 中加入 100 μL 蛋白裂解液和 1 μL 蛋白酶抑制剂混匀, 置冰上振荡裂解 30 min 吸取上清液, 100 °C 水浴中煮沸 5 min, BCA 蛋白定量工作液测定样品浓度, 同时制备 10% 分离胶和 5% 凝缩胶, 将提取的蛋白质和标准品加入孔中, 电泳, 并转移到 PVDF 膜上, 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 洗涤 3 次后孵育一抗 Chi311 (1:1000) 及 GAPDH (1:1000) 过夜, 洗涤 3 次后加入二抗山羊抗兔 IgG (1:5000) 室温孵育 1 h, 洗 3 次后配制 ECL 发光显色液进行显影成像。

1.3.2 T1DM 小鼠模型制备和 MSCs 治疗 雄性 C57BL/6j 小鼠 (6 周) 适应性喂养 5 d 后随机分为 2 组: 正常对照组 (n=10) 和 T1DM 组 (n=30)。建模前 8~10 h 将小鼠禁食、水, 称量小鼠体质量、打耳号, T1DM 组每只腹腔注射 200 μL STZ (50 mg/kg) 柠檬酸钠缓冲液, 对照组每

只腹腔注射 200 μL 柠檬酸钠缓冲液, 1 次/d, 连续注射 5 d。12~14 d 通过尾静脉取血测随机血糖, 血糖平均值 ≥16.7 mmol/L 即为建模成功^[8, 12, 13]。将建模成功的小鼠随机分为 3 组: T1DM 模型组、sh-NC-MSCs 治疗组和 sh-Chi311-MSCs 治疗组, 10 只/组。分组后第 1 天和第 15 天, sh-NC-MSCs 治疗组和 sh-Chi311-MSCs 治疗组分别由尾静脉注射相应 sh-NC-MSCs 和 sh-Chi311-MSCs 细胞, 5×10⁵/只, T1DM 模型组注射 PBS 缓冲液; 每周监测小鼠随机血糖和体质量。实验节点为实验的第 42 天, 安乐法 (二氧化碳吸入法) 处死所有小鼠, 留取胰腺用于病理检测。

1.3.3 HE 染色检测 T1DM 小鼠胰腺组织病理变化 建模 4 周后安乐处死小鼠, 取胰腺组织, 立即置于 10% 中性甲醛溶液中固定, 固定 24 h 放入脱水盒内进行脱水, 石蜡包埋后制作切片, 依次将切片放入二甲苯 I、II 中各 20 min, 无水乙醇 I、II 中各 5 min, 再浸泡 75% 的酒精中 5 min, 水洗 1 遍后进行苏木素染色, 3~5 min, 分化液分化, 返蓝液返蓝, 放入伊红染液中染色 5 min, 切片依次放入无水乙醇 I、II、III、二甲苯 I、II 中各 5 min, 中性树胶封片。显微镜下观察胰腺中胰岛组织形态。

1.3.4 免疫组化检测 T1DM 小鼠胰岛素胰腺组织胰岛素分泌 胰腺组织切片脱水后, 将内源性过氧化物酶阻断剂滴加在组织上灭活内源性过氧化物酶, 室温孵育 10 min 后清洗, 放入 EDTA 抗原修复液进行抗原修复,

微波炉中大火加热、冷却各 8 min,重复 1 次后滴加 5% BSA 封闭液,37 °C 孵育 30 min。滴加配好胰岛素抗体 (1:500),4 °C 过夜。取出后 37 °C 复温 30 min,洗涤 3 次后滴加聚合 HRP 抗兔 IgG 30 min 后洗涤 3 次,组化圈内滴加 DAB 显色液,水洗后滴加苏木素复染细胞核,碱性溶液返蓝,中性树脂封片,显微镜观察结果及拍照。

1.3.5 采用免疫荧光检测胰腺组织中巨噬细胞 (F4/80) 数量 胰腺组织切片脱水后,分别滴加 200 μ L 0.25% Triton X-100,室温孵育 15 min 进行细胞破膜, PBS 洗 3 次,滴加复合修复液,室温孵育 15 min 后 PBS 洗 3 次,滴加山羊血清封闭液进行封闭,滴加稀释 (1:200) 后一抗 (F4/80、胰岛素),4 °C 过夜。取出后 37 °C 复温 30 min, PBS 洗 5 min \times 3 次,滴加 DyLight 488 荧光素标记羊抗兔 (1:2000),37 °C 孵育 45 min, PBS 洗 5 min \times 3 次,滴加 DAPI 染色液进行复染,封片后直接在荧光显微镜下观察拍照。

1.3.6 骨髓来源的巨噬细胞诱导分化 骨髓来源的巨噬细胞培养方法参照已报道的培养方法^[14,15],首先分离获取小鼠骨髓细胞,裂红后 PBS 清洗 2 遍,用 1640 完全培养基重悬,接种至 6 孔板,6 \times 10⁶/孔,含 GM-CSF (100 ng/mL) 培养基培养 10 d,2 d 次更换新鲜的培养基。

MSCs 上清诱导巨噬细胞极化具体方法如下: M1 型巨噬细胞细胞诱导培养基含 LPS (100 ng/mL) 和 IFN- γ (30 ng/mL) 的 1640 完全培养基, M2 型巨噬细胞诱导培养基含 IL-4 (20 ng/mL) 的 1640 完全培养基,其中 sh-NC-MSCs 组加入 200 μ L 浓缩的 sh-NC-MSCs 细胞培养上清, sh-Chi311-MSCs 组加入 200 μ L 浓缩的 sh-Chi311-MSCs 细胞培养上清,正常对照组则加入相应体积培养基,继续培养诱导 48 h,收集细胞用于流式检测和提取总的 RNA 用于基因检测。

1.3.7 实时荧光定量 PCR 法检测巨噬细胞标志分子和炎症因子 mRNA 表达 提取巨噬细胞的总 RNA,并反转录为 cDNA,采用 qPCR 法检测巨噬细胞标志分子 iNOS、Arg-1 和炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-10、IL-13、IL-1 β 转录水平表达 (参照 1.3.1)。引物序列见表 1。

1.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.00 软件绘制图标及统计学分析, Image J 对蛋白免疫印迹、免疫荧光进行量化分析,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 敲除 Chi311 的 MSCs 鉴定

培养的 sh-NC-MSCs 和 sh-Chi311-MSCs 形态均呈纤维样、长梭形、贴壁且旋涡状生长 (图 1A、D); 成脂诱导分化后经油红 O 染色,可见大量脂滴分布于细胞表面或周围 (图 1B、E),成骨诱导分化后经茜素红 S 染色,可

观察到明显的矿化结节产生 (图 1C、F); 流式细胞术检测细胞表型,结果表明,培养的 Chi311 敲低后 MSCs 表面标志物依然是 CD73⁺/CD90⁺/CD105⁺/CD14⁻/CD34⁻/CD45⁻ (图 1G),鉴定结果仍然符合国际细胞治疗协会 (ISCT) 提出的 MSCs 标志物鉴定标准。使用实时荧光定量 PCR 法检测 Chi311 的 mRNA 水平相对表达量,蛋白免疫印迹检测 Chi311 蛋白水平变化,发现 sh-Chi311-MSCs 胞内 Chi311 的 mRNA 表达水平以及蛋白水平较 sh-NC-MSCs 降低 ($P < 0.01$, 图 1H、I)。

2.2 Chi311 敲低影响 MSCs 治疗 T1DM 小鼠的疗效

T1DM 小鼠模型接受 sh-NC-MSCs 治疗 1 周后血糖较糖尿病组逐渐降低,治疗后 2 周血糖存在明显差异 ($P < 0.05$, 图 2A); 治疗后 4 周, sh-NC-MSCs 治疗组血糖较 T1DM 组降低 ($P < 0.001$, 图 2A),部分小鼠血糖已将至 16.7 mmol/L 以下,而 sh-Chi311-MSCs 的治疗效果较 sh-NC-MSCs 组疗效变差,血糖较高,体质量增加缓慢,而植入两种 MSCs 的 T1DM 小鼠,体质量增加较 T1DM 组明显增加 ($P < 0.05$, 图 2B); HE 染色结果显示, T1DM 模型组小鼠胰腺组织中很难找到形态完整的胰岛,多数程闭锁状,而 sh-NC-MSCs 组胰腺组织中胰岛形态较 T1DM 组明显改善, sh-Chi311-MSCs 组胰岛形态较 T1DM 组改善,但仍可见闭锁的胰岛,改善程度不如 sh-NC-MSCs 组 (图 2C)。免疫组化结果表明,与 T1DM 组相比, sh-NC-MSCs 组胰岛素分泌明显升高,而 sh-Chi311-MSCs 组胰岛素分泌较 sh-NC-MSCs 组胰岛素分泌少 (图 2D)。

2.3 Chi311 影响参与 hUC-MSCs 调控 T1DM 小鼠胰腺中巨噬细胞数量

用 F4/80 对巨噬细胞标记,通过免疫荧光检测发现在 NC 组小鼠胰腺组织中含有少量驻足巨噬细胞 (红色),胰岛完整且胰岛素 (绿色) 含量丰富,而 T1DM 组小鼠胰腺组织内巨噬细胞数量较 NC 组明显增加 ($P < 0.001$, 图 3A、C),同时胰岛内胰岛素 (绿色) 明显减少 ($P < 0.01$, 图 3A、B),而通过 MSCs 进行治疗后,胰腺组织内巨噬细胞数量较 T1DM 组减少,胰岛内胰岛素得到更好的保留,这对维持小鼠血糖稳定具有重要的作用,但敲低 Chi311 基因后, MSCs 治疗效果明显降低,巨噬细胞数量较 sh-NC-MSCs 组增多 ($P < 0.05$, 图 3A、C),胰岛素含量也较 sh-NC-MSCs 组减少 ($P < 0.05$, 图 3A、B)。

2.4 Chi311 介导 hUC-MSCs 调控巨噬细胞极化

与正常诱导组相比, sh-NC-MSCs 培养上清干预下 M1 型巨噬细胞比例下降 ($P < 0.01$, 图 4A),而 sh-Chi311-MSC 组 M1 型巨噬细胞比例高于 sh-NC-MSCs 组 (图 4A, $P < 0.05$)。正常诱导组 M2 型巨噬细胞比例最低, sh-NC-MSCs 培养上清干预下 M2 型巨噬细胞比例明显升高 ($P < 0.05$, 图 4B),而 sh-Chi311-MSCs 组 M2 型

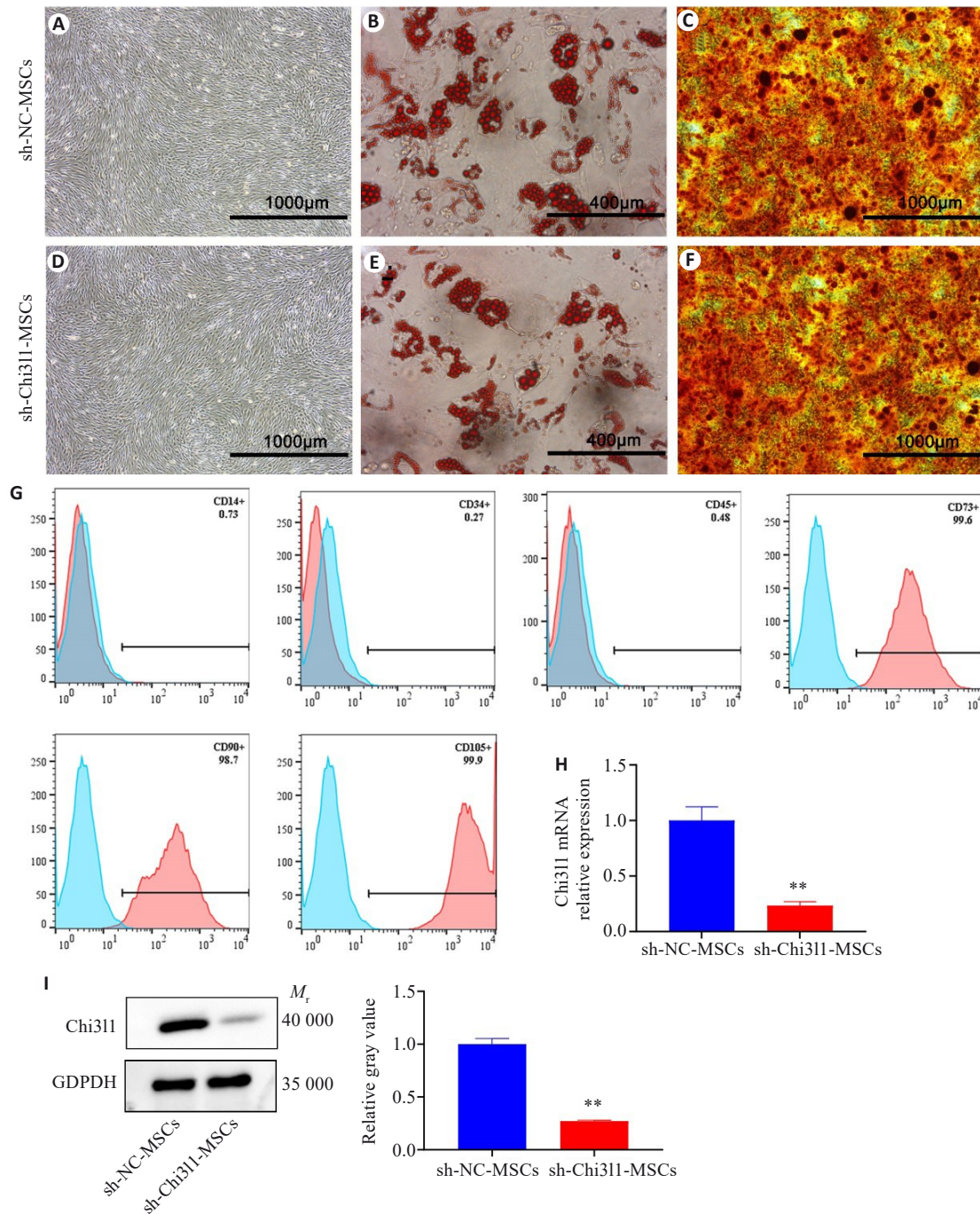


图1 敲低Chi311的MSCs的鉴定

Fig.1 Identification of MSCs with stable Chi311 knockdown. A: Morphology of sh-NC-MSCs. B: Oil Red O staining of sh-NC-MSCs after adipogenic induction. C: Alizarin Red S staining of sh-NC-MSCs after osteogenic induction. D: Morphology of sh-Chi311-MSCs. E: Oil Red O staining of sh-Chi311-MSCs after adipogenic induction. F: Alizarin Red S staining of sh-Chi311-MSCs after osteogenic induction. G: Detection of surface markers on sh-Chi311-MSCs by flow cytometry. H: Chi311 mRNA expression level in sh-Chi311-MSCs. I: Protein level of Chi311 in sh-Chi311-MSCs detected by Western blotting. ** $P < 0.01$ vs sh-NC-MSCs.

巨噬细胞比例低于 sh-NC-MSCs 组 ($P < 0.05$, 图 4B)。qPCR 结果表明, sh-NC-MSCs 组的 M1 型巨噬细胞标志分子 iNOS 的 mRNA 表达低于 sh-Chi311-MSCs 组和正常诱导组 ($P < 0.05$, 图 4C), 而 sh-NC-MSCs 组表达的 M2 型巨噬细胞分子 Arg-1 的表达则高于 sh-Chi311-MSC 组和正常诱导组 ($P < 0.05$, 图 4E)。M1 和 M2 型巨噬细胞表达相关炎症因子检测结果表明, 在 M1 巨噬

细胞诱导体系下, sh-NC-MSCs 组表达的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 低于正常诱导组 ($P < 0.05$, 图 4D), 而 sh-Chi311-MSCs 组上述因子表达高于 sh-NC-MSCs 组 ($P < 0.05$); 在 M2 巨噬细胞诱导体系下, sh-NC-MSCs 组表达的 IL-13 和 IL-10 高于正常诱导组 ($P < 0.01$, 图 4F) 和 sh-Chi311-MSCs 组 ($P < 0.05$, 图 4F)。

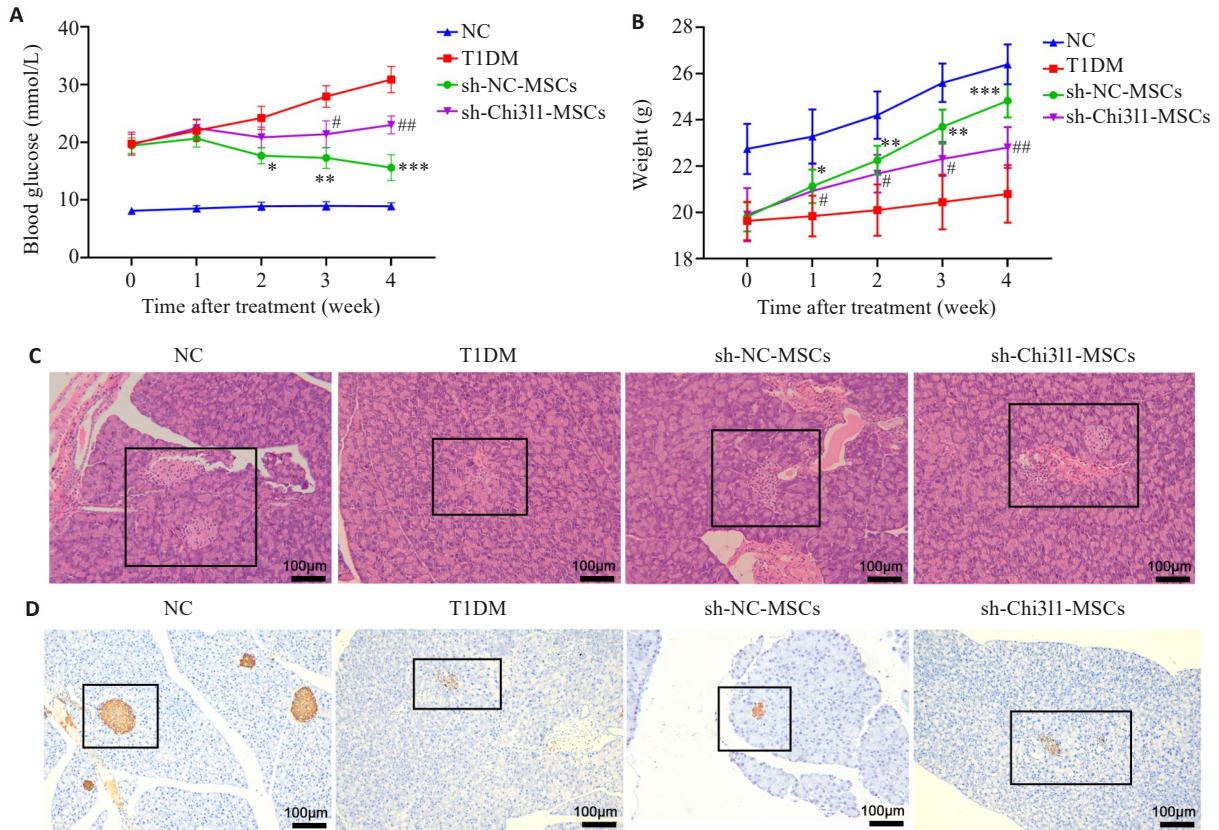


图2 Chi311 敲低影响MSCs治疗T1DM小鼠的疗效

Fig.2 Chi311 knockdown attenuates therapeutic efficacy of MSCs in T1DM mice. **A:** Blood glucose levels of the mice in each group over the course of treatment. **B:** Body weight changes of the mice in each group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs T1DM group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs sh-NC-MSCs group). **C:** Pancreatic pathological changes in each group (HE staining, original magnification: $\times 100$). **D:** Insulin content in the pancreas of the mice in each group detected by immunohistochemical staining ($\times 100$).

3 讨论

T1DM是青少年和儿童中常见的一种自身免疫性疾病,发病原因众多,主要病因是患者体内胰岛 β 细胞被破坏,导致胰岛素绝对缺乏,严重影响患者的生活质量^[16,17]。目前针对1型糖尿病的治疗方式较为有限,主要是胰岛素替代疗法,但该方法不能从根本上恢复胰岛功能^[18,19]。本研究发现,Chi311通过调控巨噬细胞极化过程参与MSCs治疗1型糖尿病,补充了MSCs治疗糖尿病的新机制。

巨噬细胞是先天免疫的关键组成部分,在体内平衡炎症性疾病中起着至关重要的作用,尤其在T1DM的发病机制中起关键作用^[20]。在疾病的初始阶段,常驻胰岛的抗原呈递细胞(巨噬细胞和树突状细胞)吸收自身抗原并迁移至胰腺淋巴结^[21],启动适应性免疫应答的级联反应。具体机制表现为:该过程通过IL-12的释放激活CD4⁺T淋巴细胞,促使其分化为Th1细胞亚群并分泌IL-2和IFN- γ 等重要细胞因子。这些效应分子可进一步刺激局部巨噬细胞和树突状细胞产生IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子,形成正反馈调节环路。在此过程中,细胞毒性CD8⁺T细胞在趋化因子作用下向胰岛定

向迁移,同时局部活化的巨噬细胞与T淋巴细胞在胰岛内持续聚集,共同构成促炎微环境。这种免疫细胞的协同作用最终导致胰岛 β 细胞程序性死亡^[21,22]。值得注意的是,研究证据表明巨噬细胞不仅参与T1DM的初始致病环节,还在胰岛炎症反应的持续进展中发挥关键调控作用^[23]。M1巨噬细胞通过分泌炎症细胞因子加剧炎症反应来驱动糖尿病的进展^[24,25]。因此探究巨噬细胞极化对治疗T1DM重要意义。

研究发现MSCs作为炎症反应的调节剂,通过分泌细胞因子诱导促炎M1表型巨噬细胞转向抗炎M2表型^[26],此外,MSCs可以减少巨噬细胞产生的促炎细胞因子,从而发挥抑制炎症反应,维持微环境稳态的效应^[27,28]。在脓毒血症中,MSCs分泌的TGF- β 使巨噬细胞M1样表型向M2样表型转化,并通过激活LPS刺激的巨噬细胞中的Akt/FoxO1通路降低促炎细胞因子水平^[29]。脂肪组织来源的MSCs在与巨噬细胞共培养时释放IL-10、血管内皮生长因子、IL-4和IL-13等促进M2型极化。更有趣的是M2型巨噬细胞分泌的相关细胞因子可以反过来支持MSCs的生长,而与M1巨噬细胞相关的细胞因子抑制MSCs的生长^[30]。同时大量研究

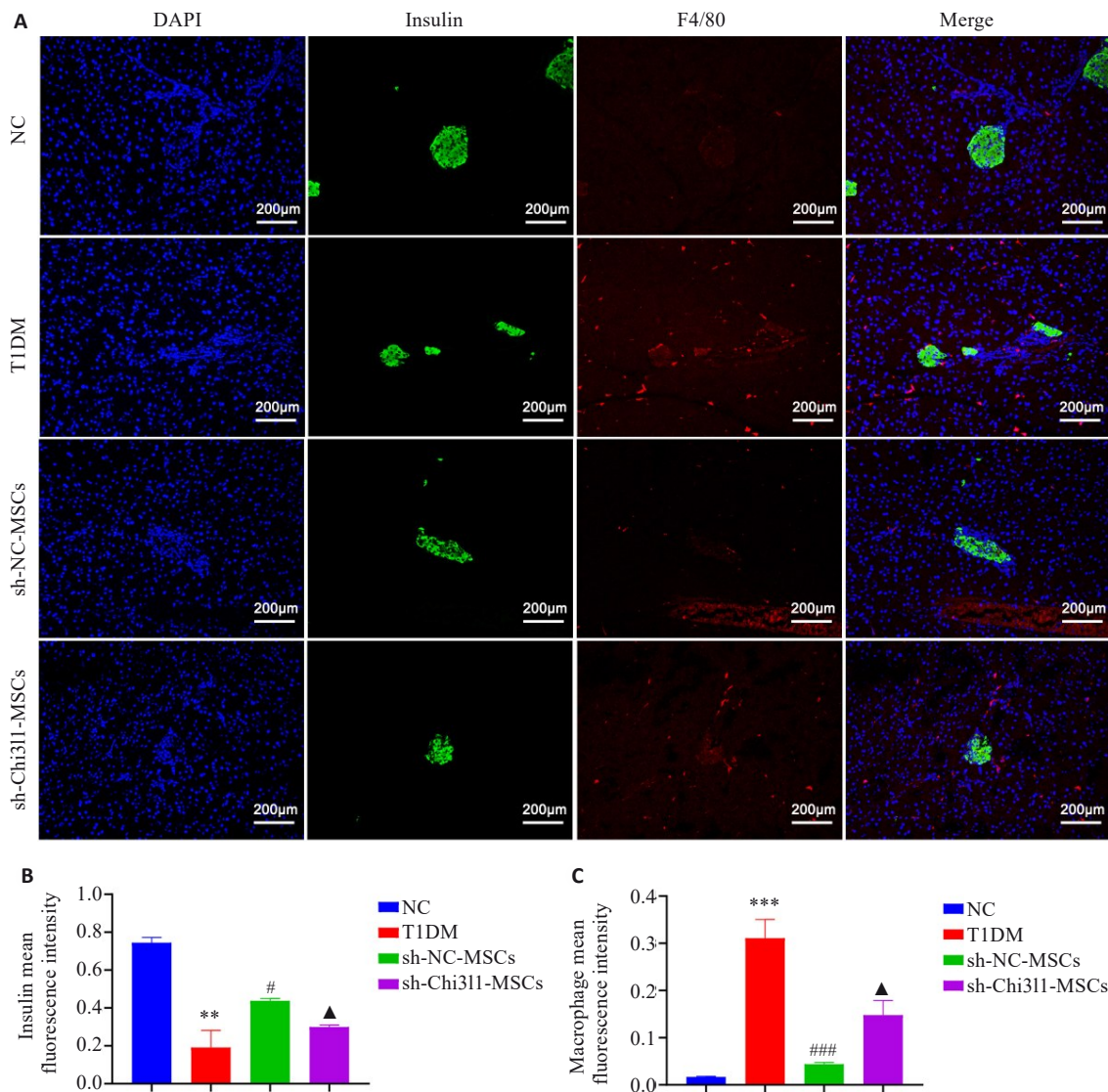


图3 小鼠胰腺组织内胰岛素含量及巨噬细胞数量变化

Fig.3 Changes in insulin content and macrophage infiltration in pancreatic tissues of mice. A: Insulin content (green) and macrophage infiltration (red) in pancreatic tissues of mice from each group detected by immunofluorescence staining (×200). B: Statistical analysis of insulin content within individual islets of mice in each group. C: Quantitative analysis of the mean immunofluorescence intensity of macrophages in pancreatic tissues across the groups. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NC group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs T1DM group; ▲ $P < 0.05$ vs sh-NC-MSCs group.

结果一致表明,巨噬细胞和Chi311在各种疾病中具有显著的生理关联,Chi311刺激M2巨噬细胞分化和TGF-β1的形成,并通过Sema7a/Chi311/IL-13Rα2轴调节黑色素瘤和乳腺癌的转移^[31]。同样在癌症相关成纤维细胞中特异性上调,敲低Chi311导致M2样巨噬细胞减少,CD8⁺T细胞增加,CD4⁺T细胞向Th1表型转变^[32]。

研究发现Chi311是hUC-MSCs免疫调节功能的关键介质^[11],但其具体机制尚未完全解释清楚,为进一步探究Chi311对MSCs的调控作用,我们首先将MSCs中Chi311基因敲低,通过培养发现敲低Chi311不影响hUC-MSCs的形态,仍保持纤维样、长梭形、贴壁且漩涡状生长的特性,同样对成脂和成骨的分化能力并未造成影响,表明标志物表达并未改变,但我们将敲低Chi311

的MSCs植入T1DM小鼠模型中,发现MSCs对T1DM的治疗效果变差,血糖控制不佳,并没有有效保护胰腺组织中胰岛功能,同时通过对小鼠胰腺组织中巨噬细胞监测发现,敲低Chi311基因使MSCs在小鼠体内对胰腺组织中巨噬细胞的调节作用减弱,胰腺组织内巨噬细胞数量较正常组MSCs增多。为进一步探究其机制,体外实验共培养实验结果表明,细胞上清中的Chi311可以调控巨噬细胞极化,通过对巨噬细胞标志分子检测发现,Chi311的缺失使MSCs抑制M1型巨噬细胞极化能力降低,同时促进M2型产生的能力也降低,炎症因子表达上升。基于上述的研究基础,本研究发现,Chi311是hUC-MSCs调控巨噬细胞极化的关键基因,但Chi311调控此过程的具体分子机制仍需进一步研究。

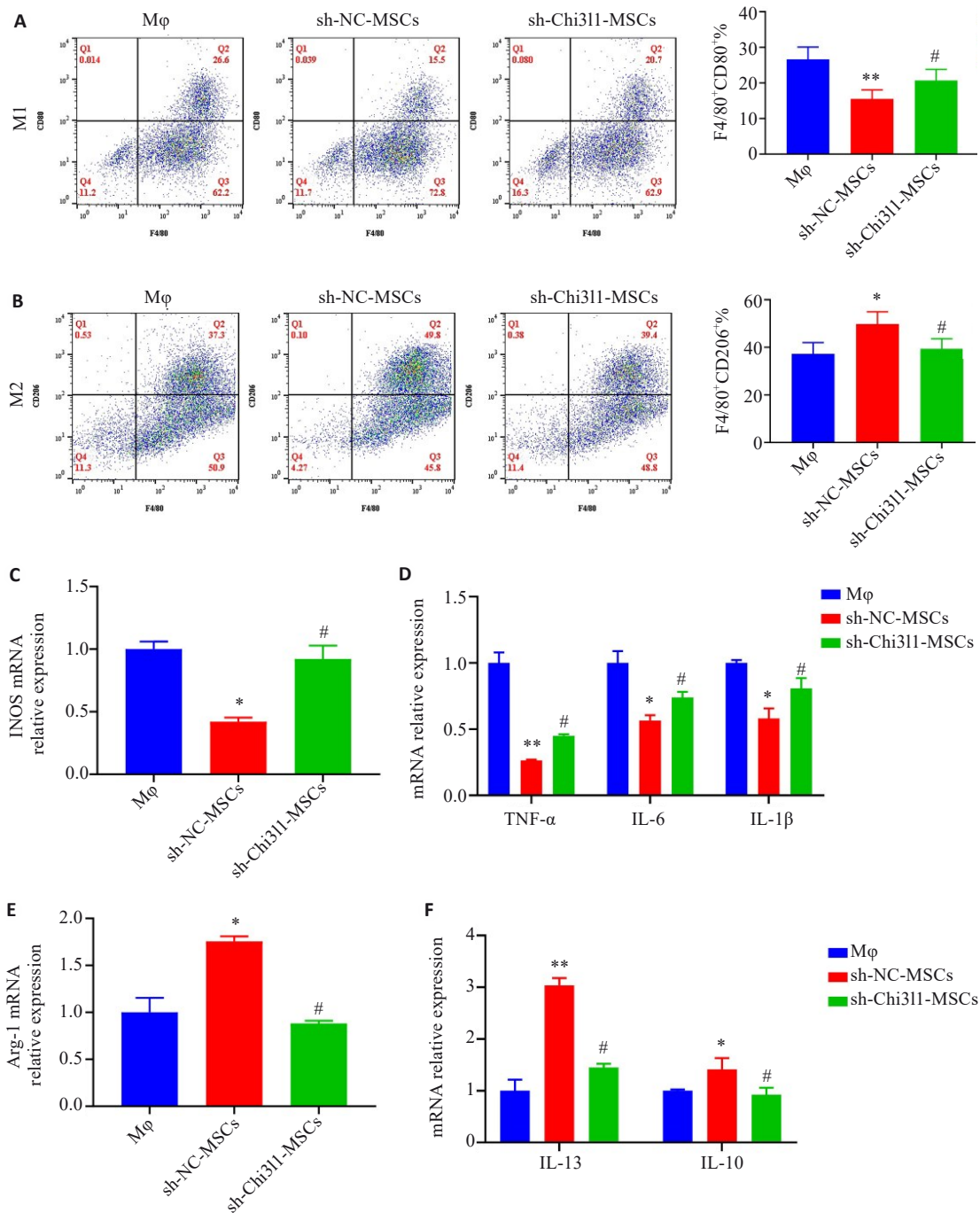


图4 Chi311影响hUC-MSCs调控巨噬细胞极化

Fig.4 Chi311 influences hUC-MSCs-mediated regulation of macrophage polarization. A: Frequency of M1-type macrophages analyzed using flow cytometry. B: Frequency of M2-type macrophages analyzed using flow cytometry. C: Expression of iNOS mRNA detected with qPCR. D: Expressions of mRNAs for inflammatory cytokines detected by qPCR. E: Expression of Arg-1 mRNA detected with qPCR. F: Expressions of mRNAs for anti-inflammatory cytokines detected by qPCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Mφ group; # $P < 0.05$ vs sh-NC-MSCs group.

本研究发现 MSCs 通过 Chi311, 抑制 T1DM 模型小鼠的巨噬细胞向 M1 型极化的, 对于揭示 Chi311 新功能, 阐明 MSCs 治疗 T1DM 的机制具有重要的理论创新意义, 有助于发现新的治疗靶点, 对推动干细胞疗法治疗 T1DM 研究及应用具有重要的现实意义, Chi311 基因是否对巨噬细胞的迁移造成影响将成为下一步研究重点。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

[1] Zimmet P, Alberti KG, Magliano DJ, et al. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies[J]. Nat Rev Endocrinol, 2016, 12(10): 616-22.
 [2] Harjutsalo V, Maric-Bilkani C, Forsblom C, et al. Impact of sex and age at onset of diabetes on mortality from ischemic heart disease in

- patients with type 1 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2014, 37(1): 144-8.
- [3] Hummel S, Weiß A, Bonifacio E, et al. Associations of breastfeeding with childhood autoimmunity, allergies, and overweight: The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) study[J]. *Am J Clin Nutr*, 2021, 114(1): 134-42.
- [4] Rewers M, Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes[J]. *Lancet*, 2016, 387(10035): 2340-8.
- [5] Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells[J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, 164(1): 1-8.
- [6] Schwartz YS, Svistelnik AV. Functional phenotypes of macrophages and the M1-M2 polarization concept. Part I. Proinflammatory phenotype[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2012, 77(3): 246-60.
- [7] Coulson-Thomas VJ, Coulson-Thomas YM, Gesteira TF, et al. Extrinsic and intrinsic mechanisms by which mesenchymal stem cells suppress the immune system[J]. *Ocul Surf*, 2016, 14(2): 121-34.
- [8] 周娜, 刘伟江, 李苹, 等. 间充质干细胞通过调控巨噬细胞极化减轻1型糖尿病模型小鼠炎症反应[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(11): 876-84.
- [9] Zhao T, Su ZP, Li YC, et al. Chitinase-3 like-protein-1 function and its role in diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 201.
- [10] Chen YL, Zhang SY, Wang QZ, et al. Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein[J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 36.
- [11] Liu QL, Chen XY, Liu C, et al. Mesenchymal stem cells alleviate experimental immune-mediated liver injury via chitinase 3-like protein 1-mediated T cell suppression[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(3): 240.
- [12] Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats[J]. *Curr Protoc*, 2021, 1(4): e78.
- [13] Tang YJ, Zhang Z, Yan T, et al. Irisin attenuates type 1 diabetic cardiomyopathy by anti-ferroptosis via SIRT1-mediated deacetylation of p53[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2024, 23(1): 116.
- [14] Cho DI, Kim MR, Jeong HY, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages[J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46(1): e70.
- [15] Trouplin V, Boucherit N, Gorvel L, et al. Bone marrow-derived macrophage production[J]. *J Vis Exp*, 2013(81): e50966.
- [16] Pugliese A. Insulinitis in the pathogenesis of type 1 diabetes[J]. *Pediatr Diabetes*, 2016, 17Suppl 22(Suppl 22): 31-6.
- [17] Scherm MG, Wyatt RC, Serr I, et al. Beta cell and immune cell interactions in autoimmune type 1 diabetes: How they meet and talk to each other[J]. *Mol Metab*, 2022, 64: 101565.
- [18] Bottino R, Knoll MF, Knoll CA, et al. The future of islet transplantation is now[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2018, 5: 202.
- [19] Verhoeff K, Marfil-Garza BA, James Shapiro AM. Update on islet cell transplantation[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2021, 26(4): 397-404.
- [20] Li CH, Gao QY, Jiang H, et al. Changes of macrophage and CD4⁺ T cell in inflammatory response in type 1 diabetic mice[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 14929.
- [21] Höglund P, Mintern J, Waltzinger C, et al. Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes[J]. *J Exp Med*, 1999, 189(2): 331-9.
- [22] Mallone R, Brezar V, Boitard C. T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives[J]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 2011: 513210.
- [23] Coope A, Torsoni AS, Velloso LA. Mechanisms in endocrinology: Metabolic and inflammatory pathways on the pathogenesis of type 2 diabetes[J]. *Eur J Endocrinol*, 2016, 174(5): R175-87.
- [24] Calderon B, Suri A, Unanue ER. In CD4⁺ T-cell-induced diabetes, macrophages are the final effector cells that mediate islet beta-cell killing: studies from an acute model[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(6): 2137-47.
- [25] Wang FX, Sun F, Luo JH, et al. Loss of ubiquitin-conjugating enzyme E2 (Ubc9) in macrophages exacerbates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes by attenuating M2 macrophage polarization[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 892.
- [26] Sicco CL, Reverberi D, Balbi C, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects: endorsement of macrophage polarization[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(3): 1018-28.
- [27] Zhang CY, Han X, Yang L, et al. Circular RNA *circPPM1F* modulates M1 macrophage activation and pancreatic islet inflammation in type 1 diabetes mellitus[J]. *Theranostics*, 2020, 10(24): 10908-24.
- [28] Zhao JX, Li XL, Hu JX, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes attenuate myocardial ischaemia-reperfusion injury through miR-182-regulated macrophage polarization[J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(7): 1205-16.
- [29] Liu F, Qiu HB, Xue M, et al. MSC-secreted TGF- β regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage M2-like polarization via the Akt/FoxO1 pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 345.
- [30] Freytes DO, Kang JW, Marcos-Campos I, et al. Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(1): 220-9.
- [31] Ma B, Herzog EL, Lee CG, et al. Role of chitinase 3-like-1 and semaphorin 7a in pulmonary melanoma metastasis[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(3): 487-96.
- [32] Cohen N, Shani O, Raz Y, et al. Fibroblasts drive an immunosuppressive and growth-promoting microenvironment in breast cancer via secretion of Chitinase 3-like 1[J]. *Oncogene*, 2017, 36(31): 4457-68.

(编辑: 经 媛)