·基础研究·

人牙龈间充质干细胞通过减少滤泡 B 细胞比例预防非肥胖糖尿病小鼠糖尿病

郭义文[1,2,3]，刘宝宁[4,5]，余　加[1,2,3]，常鑫华[1,2,3]，陈茂根[1,2,3]，马　毅[1,2,3]，邓素雄[1,2,3]，邓荣海[1,2,3]
（1. 中山大学附属第一医院器官移植中心，广东 广州 510080；2. 广东省器官捐献与移植免疫重点实验室，广东 广州 510080；3. 广东省国际科技合作基地，广东 广州 510080；4. 广州中医药大学第一临床医学院，广东 广州 510080；5. 中山大学实验动物中心，广东 广州 510080）

摘　要：【目的】1 型糖尿病是由于慢性免疫炎症破坏了胰岛 β 细胞，导致血糖升高。间充质干细胞可以预防及治疗糖尿病及其并发症的发生，然而对牙龈间充质干细胞（GMSCs）预防糖尿病的效果和潜在机制知之甚少。本研究旨在研究 GMSCs 在预防小鼠 1 型糖尿病的机制，寻找临床治疗糖尿病的靶点。【方法】我们将人 GMSCs 注射到 NOD 小鼠体内，观察血糖的变化趋势，通过免疫组化染色观察胰岛 β 细胞的存活情况，并通过流式分析检测小鼠脾脏中 T 细胞、B 细胞及巨噬细胞的比例变化。最后，将 NOD 小鼠脾脏淋巴细胞回输至 NOD-SCID 小鼠，观察 NOD-SCID 小鼠的血糖水平及糖尿病发病率。【结果】GMSCs 明显降低了 NOD 小鼠的糖尿病发病率，对照组小鼠在 27 周龄时有 64% 患糖尿病，而 GMSC 组只有 35%，P=0.013。GMSCs 处理的小鼠脾脏中滤泡 B 细胞比例从（52.2±4.1）%下降到（43.2±5.3）%，P =0.008，而其他类型的免疫细胞没有明显变化。免疫组化结果显示，GMSCs 可以有效地提高胰岛 β 细胞的存活率，使其能够持续产生胰岛素以控制血糖。最后，我们发现患病小鼠脾脏淋巴细胞回输治疗能够促进 NOD-SCID 小鼠糖尿病的发生。【结论】GMSCs 可以通过减少脾脏中的滤泡 B 细胞比例来预防 NOD 小鼠的糖尿病发生。

关键词：间充质干细胞；1 型糖尿病；滤泡 B 细胞；NOD 小鼠；血糖
中图分类号：R587.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-3554（2023）06-0958-07
DOI：10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ（med.sci）.2023.0609

Human Gingival Stem Cells Prevent Diabetes in NOD Mice by Reducing Follicular B Cells

GUO Yi-wen[1,2,3], LIU Bao-ning[4,5], YU Jia[1,2,3], CHANG Xin-hua[1,2,3], CHEN Mao-gen[1,2,3], MA Yi[1,2,3], DENG Su-xiong[1,2,3], DENG Rong-hai[1,2,3]
（1. Organ Transplant Center, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Organ Donation and Transplant Immunology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Guangdong Provincial International Cooperation Base of Science and Technology (Organ Transplantation), The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 4. The First Clinical School of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510080, China; 5. Experimental Animal Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China）
Correspondence to: DENG Rong-hai; E-mail: M.D.drh81@163.com

Abstract:【Background】Type 1 diabetes is caused by a chronic immune response that destroys islet beta cells, resulting in elevated blood glucose. Mesenchymal stem cells can prevent and treat the development of diabetes and its compli-

收稿日期：2023-03-13
基金项目：国家自然科学基金（81401324，81770410），广东省自然科学基金（2018A030313611），广东省器官捐献和移植免疫重点实验室（2013A061401007，2017B030314018，2020B1212060026）
作者简介：郭义文，第一作者，研究方向：器官移植免疫耐受和肝脏缺血再灌注损伤；邓荣海，通信作者，副主任医师，E-mail：M.D.drh81@163.com

cations. However, little is known about the effects and potential mechanisms of Gingival mesenchymal stem cells (GMSCs) in preventing diabetes. The aim of this study is to investigate the mechanism of GMSCs in preventing type 1 diabetes in mice and to find targets for clinical treatment of diabetes.【Methods】We injected human GMSCs into NOD mice to observe the trend of blood glucose, observed the survival of pancreatic β-cells by immunohistochemistry, and detected the change of immune cells in the spleen of mice by flow analysis. Finally, the immune cells in NOD mice were transfused into NOD-SCID mice to observe the onset of diabetes in NOD-SCID mice.【Results】GMSCs significantly reduced the incidence of diabetes in NOD mice, with 64% of control mice developing diabetes at 27 weeks of age compared with 35% in the GMSC group, P=0.013. The percentage of Follicular B cells (FO B cell) in the spleen of GMSCs-treated mice decreased from (52.2±4.1)% to (43.2±5.3)%, P=0.008, while other types of immune cells did not change significantly. The immunohistochemical results showed that GMSCs could effectively improve the survival of pancreatic β-cells, which could continuously produce insulin to control blood glucose. Finally, we found the spleen cells transfusion could prevent the development of diabetes in NOD-SCID mice.【Conclusion】GMSCs can reduce diabetes in mice by reducing FO B cells in the spleen.

Key words: mesenchymal stem cell; type 1 diabetes; follicular B cell; NOD mice; blood glucose

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2023,44(6):958-964]

糖尿病是全世界死亡和致残的主要原因之一。1型糖尿病主要发生在青少年中，占全世界20岁以下青年糖尿病的85%以上，主要是由于慢性免疫炎症破坏了胰岛β细胞，导致胰岛素分泌不足，血糖升高[1-2]。NOD小鼠由于自身免疫反应，导致胰岛β细胞功能丧失，通常被用于1型糖尿病的研究[3]。B细胞在1型糖尿病的发病过程中起着重要作用，靶向B细胞能改变B细胞分化和免疫球蛋白的产生，抑制T细胞介导的自身免疫反应，预防和逆转1型糖尿病[4-5]。牙龈间质干细胞(gingival mesenchymal stem cells, GMSCs)是从牙龈固有层中分离出来的。GMSCs的增殖、组织再生和免疫调节能力都优于其他间充质干细胞[6-9]。既往研究报道，人脂肪间充质干细胞可以预防癌症治疗相关糖尿病的发生，其分泌的外泌体可以促进糖尿病的伤口愈合[10-11]，同时间充质干细胞移植可以暂时逆转NOD小鼠的1型糖尿病，然而，人牙龈间充质干细胞对糖尿病的预防作用及相关机制鲜有研究[12-15]。在这项研究中，我们将人GMSCs注射进NOD小鼠体内，研究GMSC在预防糖尿病方面的作用和机制。

1　材料与方法

1.1　实验动物

25只6~7周龄(20~25g)雌性NOD和40只6周龄(20~25g)雌性NOD-SCID小鼠购自常州卡文斯实验动物中心，生产许可证：SCXK(苏)2016-0010，使用许可证：SCXK(苏)2016-0010。小鼠被饲养在中山大学的SPF设施中，12：12 h的昼夜循环，相对湿度在40 %~70 %之间，喂食无菌的饲料和水。所有动物实验获得中山大学伦理委员会的批准(批准号：SYSU-IACUC-2022-000838)。

1.2　GMSCs小鼠输注模型

根据之前报道的方法[16]，提取和纯化从健康志愿者捐赠的人类牙龈间质干细胞培养3天后，用胰蛋白酶消化细胞，500 ×g离心后按1:3的比例扩增，直到细胞数量足够用于输注。台盼蓝溶液染色显示活细胞比例在95%以上。待小鼠达到9周龄后，将细胞重悬于PBS中，调整细胞浓度到10^7个细胞/mL，经尾静脉注射200 μL细胞重悬液(2×10^6个细胞)，随后继续饲养，监测小鼠血糖变化，当小鼠出现糖尿病时进行后续实验，最后于28周龄时处死全部小鼠。

1.3　流式分析

使用The FACS Calibur仪器(BD Biosciences, San Jose, CA)和FlowJo(Tree Star Inc., Palo Alto, CA)分析小鼠脾脏中各种B细胞比例。CD45R(BV570)、B220(AF700)、CD21/CD35(PC7)、Tim1(PE)和IgM(BV421)的荧光偶联抗体购自BD Bioscience。根据B220的表达来定义总B细胞。在所有B细胞中，根据CD21/35的表达水平，将过渡性B细胞(IgM+ CD21/35低)和融合性B细胞(IgM+ CD21/35高)分为两组。用Tim-1是否表达来鉴定调节性B细胞(Breg)。

1.4 免疫组织化学染色

将28周龄的小鼠脱颈处死,腹部十字切口打开腹腔,沿脾脏边缘剥离下胰腺,胰腺用40 g/L多聚甲醛固定24 h,石蜡包埋,切片(5 μm厚),二甲苯脱蜡,浓度梯度乙醇水化,抗原修复,非特异性抗原阻断,胰岛素一抗孵育,二抗孵育,DAB显色,苏木精再染色,盐酸酒精分化,无水乙醇及二甲苯脱水,中性树脂封片,并扫描分析。

1.5 脾脏淋巴细胞输注治疗

小鼠被处死后,取脾脏放置于PBS中,于超净台内使用70 μm滤网磨成细胞悬液,裂解红细胞后使用Countstar Biolab实验室细胞计数仪(上海睿钰生物)计数淋巴细胞数量,得到的淋巴细胞用PBS重悬为5×10^6细胞/mL。每只小鼠经尾静脉注射200 μL细胞重悬液(10^6个细胞),并继续维持饲养,监测血糖。

1.6 静脉葡萄糖耐量试验

在注射GMSCs后的第7天,我们对小鼠进行静脉葡萄糖耐量试验(Intravenous glucose tolerance test, IVGTT),小鼠禁食4~6 h后静脉注射葡萄糖(2 g/kg)以测试葡萄糖耐量[17]。注射葡萄糖后,每隔15 min从尾部静脉采集血样,持续2 h,用血糖仪测定血糖水平。

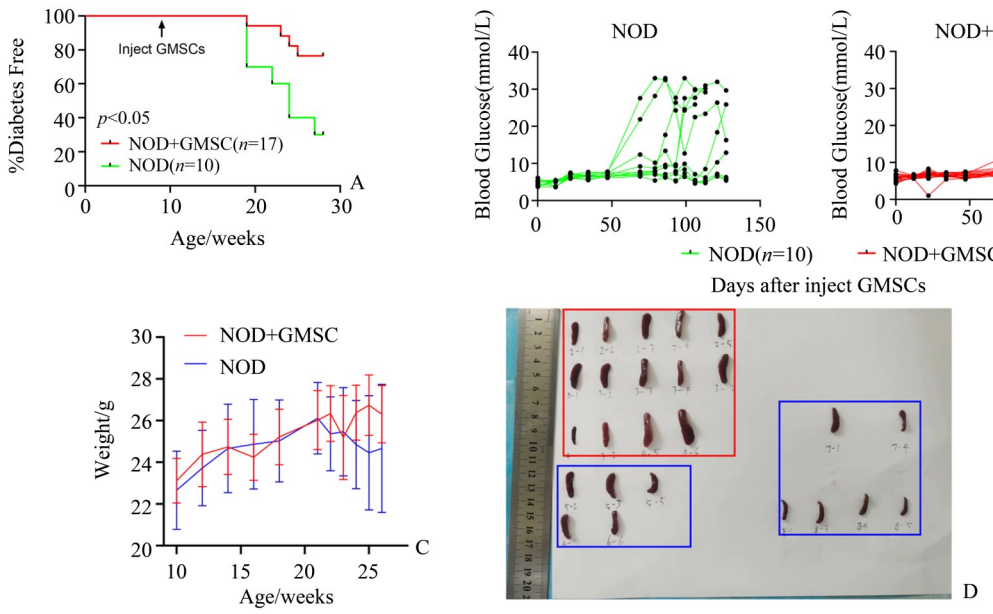
1.7 统计学分析

不同组的血糖数据以均值±标准差表示。连续变量均进行了正态分布检验及方差齐性检验,均符合正态性及方差齐性,因此采用t检验进行比较,分类变量采用卡方检验,Kaplan-Meier法分析糖尿病发病曲线。$P<0.05$的值被认为具有统计学意义。统计分析使用PRISM9.5软件(Graphpad Software Inc., La Jolla, CA)进行。

2 结 果

2.1 间充质干细胞降低非肥胖糖尿病小鼠糖尿病发病率

将人牙龈间质干细胞注射到9周龄的NOD小鼠体内,每周记录一次非空腹血糖,直到血糖超过16.7 mmol/L(300 mg/dL),在接下来的2 d继续监测血糖。当连续3次非空腹血糖的结果>16.7 mmol/L时,即诊断为糖尿病[18]。对照组在19周龄时,部分小鼠确诊糖尿病,27周龄时有64%的小鼠确诊糖尿病,而注射人GMSCs的小鼠的糖尿病发病率明显降低,27周龄时只有35%的小鼠发生糖尿病($\chi^2=6.149$, $P=0.013$;图1)。



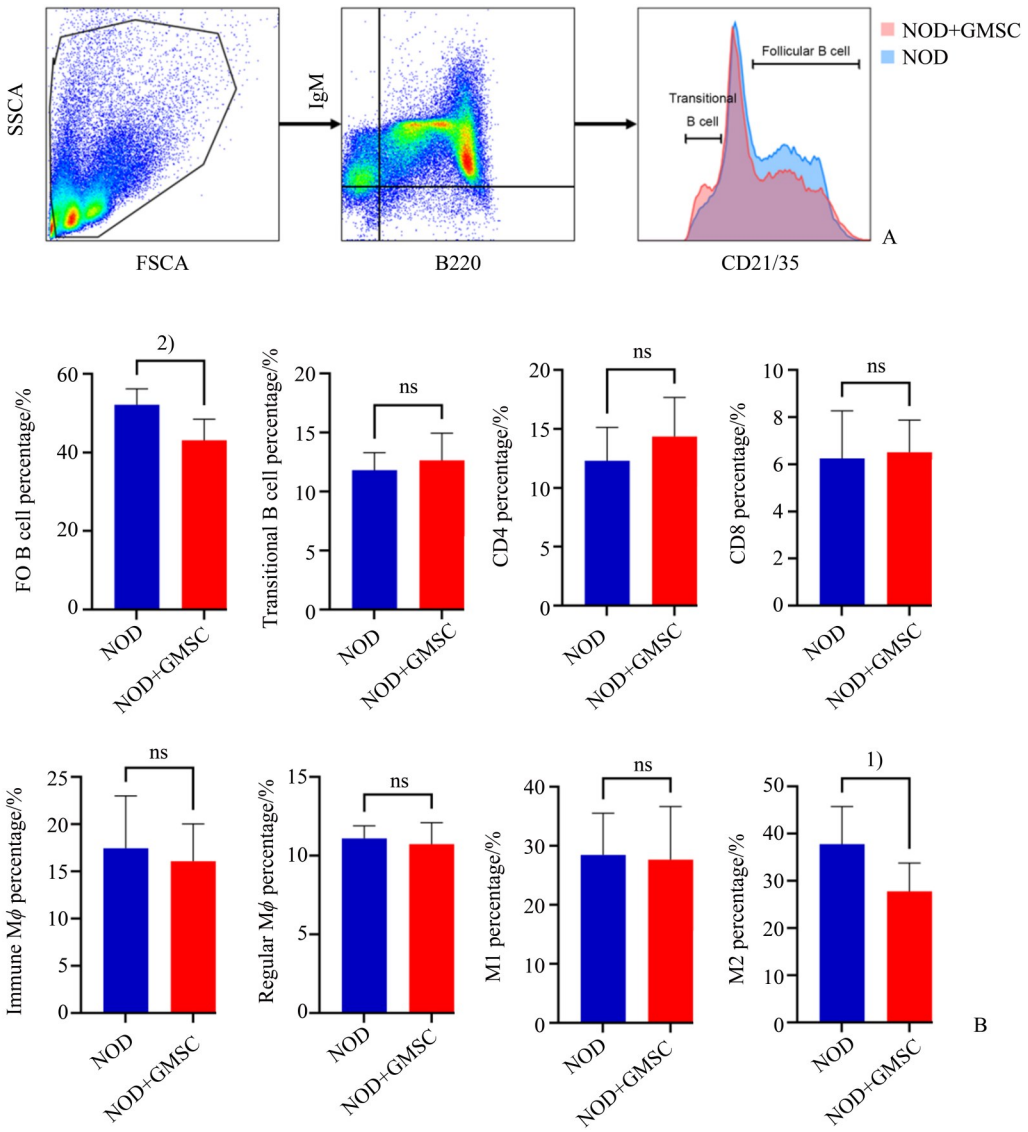
A: Diabetes onset curve in recipient mice after GMSCs injection (n=27, P=0.013). B: Blood glucose levels in recipient mice after GMSCs injection (n=27). C: Body weight in recipient mice after GMSCs injection (n=27). D: Gross morphology of the spleen at the time of sampling; the red rectangle is the NOD+GMSC group and the blue rectangle is the NOD group.

图1 GMSCs诱导的小鼠糖尿病发病率下降

Fig. 1 Decreased incidence of diabetes in mice induced by GMSCs

2.2　间充质干细胞降低非肥胖糖尿病小鼠脾脏滤泡B细胞比例

为了研究GMSCs预防NOD小鼠糖尿病发病的潜在机制，我们收集28周龄NOD小鼠的脾脏细胞进行流式分析。流式分析的圈门逻辑见图2A。如图2B所示，我们主要观察脾脏淋巴细胞中滤泡B细胞（FO B细胞，B220+IgM+CD21/35hi）的比例。对照组小鼠的FO B细胞比例为（52.2±4.1）%，而注射了人GMSC的NOD小鼠的FO B细胞比例为（43.2±5.3）%，实验组的FO B细胞的比例明显比对照组低（t=3.301，P=0.008），同时M2巨噬细胞比例也出现下降（NOD：NOD+GMSC=（37.8±7.9）%：（27.8±6.0）%，t=2.458，P=0.034）。其他类型的免疫细胞，包括过渡性B细胞（NOD：NOD+GMSC=（11.8±1.5）%：（12.6±2.3）%，t=0.734，P=0.480）、CD4+T细胞（NOD：NOD+GMSC=（12.3±2.8）%：（14.4±3.3）%，t=1.147，P=0.278）、CD8+T细胞（NOD：NOD+GMSC=（6.3±2.0）%：（6.5±1.4）%，t=0.262，P=0.799）、M1巨噬细胞（NOD：NOD+GMSC=（28.4±7.1）%：（27.6±9.0）%，t=0.171，P=0.868）、免疫性巨噬细胞（NOD：NOD+GMSC=（17.4±5.6）%：（16.1±4.0）%，t=0.493，P=0.633）和调节性巨噬细胞（NOD：NOD+GMSC=（11.1±0.8）%：（10.7±1.4）%，t=0.569，P=0.582）都没有统计学差异。



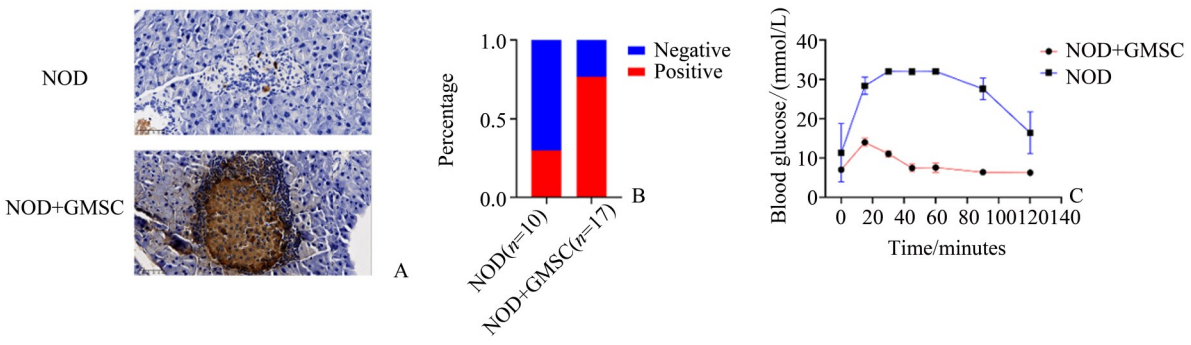
A: The flow analysis gate logic for follicular B cells. B: Statistical analysis of different types of immune cells (n=12). [1] P<0.05, [2] P<0.01.

图2　GMSCs诱导的小鼠滤泡B细胞百分比下降

Fig. 2　GMSCs-induced decrease in the percentage of FO B cells in mice

2.3 间充质干细胞改善胰岛β细胞存活

NOD小鼠的胰岛β细胞功能丧失是糖尿病发展的主要原因,因此我们通过IVGTT评估胰岛B细胞功能,胰腺标本石蜡组织切片,进行HE染色观察胰岛形态及免疫组化染色测量小鼠的胰岛素分泌情况。使用抗胰岛素抗体(Ab181547)进行免疫组化染色(图3A)。NOD组的胰岛素染色明显低于NOD+GMSC组(χ^2=5.632,P=0.018;图3B)。同时,IVGTT也显示,与对照组相比,注射GMSC的小鼠的葡萄糖耐量有明显改善(图3C)。上述结果表明,人GMSCs可以防止NOD小鼠胰岛β细胞的破坏。



A: images show the immunohistochemical insulin staining of mouse islets after GMSCs injection (magnification 1 000×). B: Immunohistochemical staining percentage stacking histogram analysis of mouse pancreatic islets (n=27). C: IVGTT was performed on day 7 after GMSCs injection. The graph shows the blood glucose levels in different groups at the indicated time points after i.v. injection of glucose (n=20, P<0.05).

图3 GMSCs诱导的小鼠胰岛β细胞存活

Fig. 3 GMSCs-induced survival of mouse pancreatic β-cells

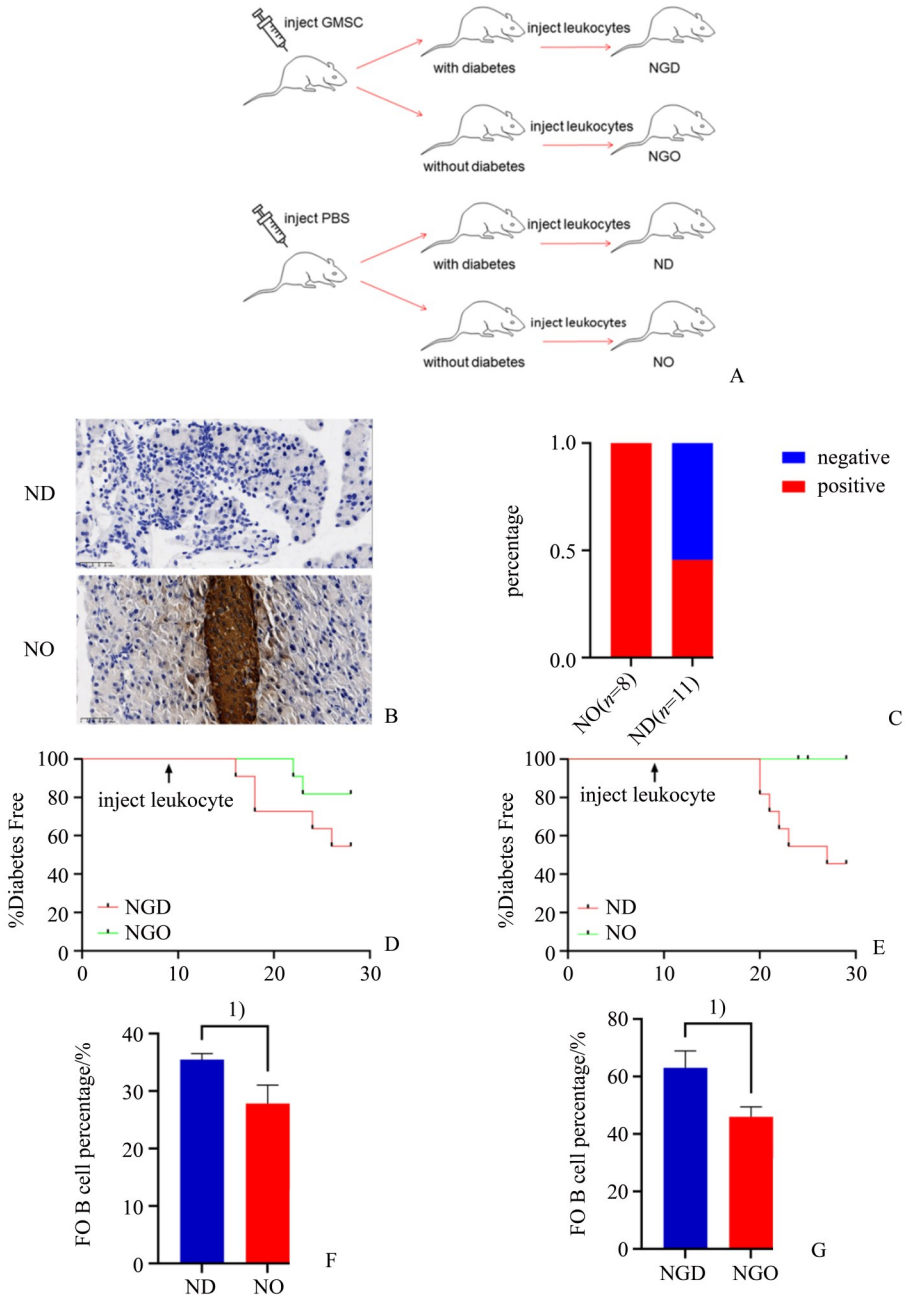
2.4 淋巴细胞回输影响NOD-SCID小鼠糖尿病发病

从上述小鼠中提取脾脏淋巴细胞并注射到NOD-SCID小鼠体内,观察NOD-SCID小鼠糖尿病的发病情况(图4A)。从患有糖尿病(NGD)和未患有糖尿病(NGO)的NOD+GMSC组中提取脾脏淋巴细胞,通过尾静脉注射到NOD-SCID小鼠体内,观察NOD-SCID小鼠的糖尿病发病情况。如图4D所示,NGD组的小鼠比NGO组的小鼠糖尿病发病早,病例多,不过两组之间没有统计学意义。提取NOD组糖尿病小鼠(ND)和正常小鼠(NO)的脾脏淋巴细胞,注射到NOD-SCID小鼠体内,监测NOD-SCID小鼠的糖尿病发病情况。ND组的糖尿病发病时间早于NO组,且发病病例数高于NO组,具有统计学意义(χ^2=5.554,P=0.018;图4E)。28周时处死NOD-SCID小鼠,收集脾脏细胞进行流式分析(图4F,4G)。与NGO组相比,NGD组的FO B细胞百分比更高(糖尿病:非糖尿病=63.0%:46.0%,t=6.115,P=0.000)。在NO和ND组同样观察到了FO B细胞的变化(糖尿病:非糖尿病=35.5%:27.8%,t=5.557,P=0.000)。NOD小鼠发生糖尿病有可能是由于免疫细胞比例失衡,特别是FO B细胞比例,并且通过淋巴细胞转移输注,可影响到健康NOD-SCID小鼠糖尿病的发生。

3 讨 论

我们在此报告,输注人GMSC可预防NOD小鼠糖尿病的发生。这是国内外首次报道人GMSC降低了FO B细胞的比例,从而抑制了NOD小鼠的自身免疫性糖尿病的发展。与以往的FO B细胞耗竭剂不同,GMSC在移植后并没有完全耗竭FO B细胞,而是维持在一个较低的水平,这使得小鼠能够保持对其他病原体的免疫能力。此外,在NOD-SCID小鼠的淋巴细胞回输治疗中证实,未处理的NOD小鼠发病原因主要是免疫细胞比例失衡,并且可通过转移输注影响到健康小鼠的糖尿病发生,而进行GMSCs输注治疗后,可以减少FO B细胞的比例,从而减轻免疫细胞失衡引起的胰岛细胞破坏。

我们目前的结果与既往文献报道相似[19],降低小鼠的FO B细胞比例可以预防糖尿病的早期发展,David等利用CD20抗体耗尽FO B细胞而不耗竭边缘B细胞,随后小鼠的糖尿病发病率出现降低,可能是由于FO B细胞是促成早期糖尿病发病的关键因素,而我们使用GMSCs预处理后也能降低FO B细胞的比例,同时也出现了糖尿病发病率降低的情况,因此FO B细胞对于糖尿病早期发病



A: Pattern of immune cell transition treatment in NOD-SCID mice. B: images show the immunohistochemical insulin staining of ND (n=11) and NO (n=8) pancreatic islets (magnification 1 000×). C: Immunohistochemical staining percentage stacking histogram analysis of ND (n=11) and NO(n=8) pancreatic islets. D and E: Diabetes onset curve in NGD (n=11), NGO (n=11), ND (n=11) and NO (n=8) group. F and G: Flow analysis of FO B cells in the spleen of ND (n=6), NO (n=6), NGD (n=6) and NGO (n=6) mice after immune cell transition treatment.[1)] P<0.001.

图4　淋巴细胞回输治疗NOD小鼠的糖尿病

Fig. 4　Immune cell transition treatment for diabetes in NOD mice

具有促进作用。然而,完全清除FO B细胞可能会影响NOD小鼠的免疫功能,引起其他疾病[20]。目前国内外未见GMSCs与FO B细胞相互作用的文献报道。值得一提的是,FO B细胞比例的减少如何影响NOD小鼠糖尿病的发病以及潜在机制仍需深入研究。

参考文献

[1] Bluestone JA, Herold K, GeneticsEisenbarth G., pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes[J]. Nature, 2010, 464(7293): 1293-1300.

[2] 龚洪平, 任妍, 查盼盼, 等. 17例成人暴发性1型糖尿病临床分析[J]. 四川大学学报(医学版), 2023, 54(3): 653-658.
Gong HP, Ren Y, Cha PP, et al. Clinical analysis of 17 adult patients with fulminant type 1 diabetes mellitus[J]. J Sichuan Univ (Med Sci), 2023, 54(3): 653-658.

[3] Pearson JA, Wong FS, Wen L. The importance of the non obese diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes [J]. J Autoimmun, 2016, 66: 76-88.

[4] Huang J, Peng J, Pearson JA, et al. Toll-like receptor 7 deficiency suppresses type 1 diabetes development by modulating B-cell differentiation and function [J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(2): 328-338.

[5] Ye S, Hua S, Zhou M. Transient B-cell depletion and regulatory T-cells mediation in combination with adenovirus mediated IGF-1 prevents and reverses autoimmune diabetes in NOD mice[J]. Autoimmunity, 2022, 55(8): 529-537.

[6] El-Sayed KM, Paris S, Graetz C, et al. Isolation and characterisation of human gingival margin-derived STRO-1/MACS (+) and MACS(-) cell populations[J]. Int J Oral Sci, 2015, 7 (2): 80-88.

[7] Zhang QZ, Nguyen AL, Yu WH, et al. Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells[J]. J Dent Res, 2012, 91(11): 1011-1018.

[8] Fawzy El-Sayed KM, Dörfer CE. Gingival mesenchymal stem/progenitor cells: a unique tissue engineering gem [J]. Stem Cells Int, 2016, 2016: 7154327.

[9] Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(3): 377-383.

[10] Kawada-Horitani E, Kita S, Okita T, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells prevent type 1 diabetes induced by immune checkpoint blockade [J]. Diabetologia, 2022, 65(7): 1185-1197.

[11] Shi R, Jin Y, Hu W, et al. Exosomes derived from mmu_circ_0000250-modified adipose-derived mesenchymal stem cells promote wound healing in diabetic mice by inducing miR-128-3p/SIRT1-mediated autophagy[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2020, 318(5): C848-c856.

[12] El-Badawy A, El-Badri N. Clinical efficacy of stem cell therapy for diabetes mellitus: a meta-analysis [J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0151938.

[13] 陈丽玲, 徐振健, 徐安平. 一种分离培养及鉴定小鼠牙龈间充质干细胞的方法[J]. 新医学, 2022, 53(5): 349-354.
Chen LL, Xu ZJ, Xu AP. A method for isolation, culture and identification of gingival mesenchymal stem cells from mice [J]. J New Med, 2022, 53(5): 349-354.

[14] Sordi V, Piemonti L. The contribution of hematopoietic stem cells to beta-cell replacement [J]. Curr Diab Rep, 2009, 9 (2): 119-124.

[15] Xie QP, Huang H, Xu B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation in vitro[J]. Differentiation, 2009, 77(5): 483-491.

[16] Huang F, Chen M, Chen W, et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells inhibit xeno-graft-versus-host disease via CD39-CD73-adenosine and IDO signals [J]. Front Immunol, 2017, 8: 68.

[17] Deng R, Khattar M, Xie A, et al. Anti-TCR mAb induces peripheral tolerance to alloantigens and delays islet allograft rejection in autoimmune diabetic NOD mice [J]. Transplantation, 2014, 97(12): 1216-1224.

[18] Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats [J]. Curr Protoc Pharmacol, 2015, 70: 5.47.1-5.47.20.

[19] Serreze DV, Chapman HD, Niens M, et al. Loss of intra-islet CD20 expression may complicate efficacy of B-cell-directed type 1 diabetes therapies[J]. Diabetes, 2011, 60(11): 2914-2921.

[20] Attanavanich K, Kearney JF. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells[J]. J Immunol, 2004, 172(2): 803-811.

(编辑 余 菁)