

# 人脐带干细胞移植对大鼠糖尿病足及 BDNF 表达的影响\*

王 瑛<sup>1</sup>, 周 宁<sup>1</sup>, 王庆萍<sup>1</sup>, 金醒昉<sup>1</sup>, 侯宗柳<sup>1</sup>, 彭葆坤<sup>1</sup>, 但齐琴<sup>2</sup>, 王廷华<sup>2,3</sup>

1. 昆明医科大学延安附属医院(昆明 650051); 2. 昆明医科大学 神经科学研究所(昆明 650031)  
3. 四川大学华西医院 转化神经科学中心(成都 610041)

**【摘要】** 目的 探讨人脐带间充质干细胞(HUMSC)移植对大鼠糖尿病足溃疡及脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。**方法** 成年SD大鼠分为正常组、糖尿病足溃疡组和 HUMSC 治疗组,每组 12 只。后两组大鼠用高能饲料喂养结合链脉佐菌素腹腔注射诱导糖尿病模型,模型诱导成功后通过坐骨神经损伤制作大鼠糖尿病足溃疡模型,然后将培养鉴定的 HUMSC 移植入溃疡周及表面。治疗后 2 周测定各组溃疡面积、感觉功能恢复程度(温痛觉);PCR 检测溃疡组织 BDNF 基因表达变化,免疫组化确定 BDNF 细胞定位及 BDNF 灰度值变化。**结果** HUMSC 移植组足溃疡面积较糖尿病足溃疡组缩小,后肢温、痛觉功能有一定程度恢复( $P < 0.05$ );溃疡组织 BDNF 基因和蛋白水平表达较糖尿病足溃疡组上调( $P < 0.05$ )。**结论** HUMSC 移植可促进糖尿病足溃疡修复,其分子机制可能与 BDNF 表达有关。

**【关键词】** 糖尿病大鼠 足溃疡 人脐带间充质干细胞 BDNF 表达

## Effect of Human Umbilical Mesenchymal Stromal Cells Implantation on The BDNF Expression in Diabetic Foot Rats

WANG Ying<sup>1</sup>, ZHOU Ning<sup>1</sup>, WANG Qing-ping<sup>1</sup>, JIN Xing-fang<sup>1</sup>, HOU Zong-liu<sup>1</sup>, PENG Bao-kun<sup>1</sup>, DAN Qi-qin<sup>2</sup>, WANG Tin-hua<sup>2,3</sup>. 1. Yan-an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650051, China; 2. Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming 650031, China; 3. Institute of Neurological Disease and Translation Neuroscience Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China.

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of human umbilical mesenchymal cells (HUMSCs) implantation on the brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression in diabetic foot rats. **Methods** SD rats were divided into three groups ( $n=12$ ): normal group, diabetic foot model group and HUMSC treatment group. Diabetic foot model in rats was established, then prepared HUMSC were implanted on the diabetic foot ulcers in rats, and control ones were administrated with saline only. The area of ulceration, sensory function, BDNF expression and its localization were determined by using morphology, physiological function measurement, RT-PCR and immunohistochemistry assay. **Result** Significantly decreased area of ulceration in diabetic foot rats of HUMSC implantation group was observed. This was simultaneously companied with the sensory function improvement ( $P < 0.05$ ). RT-PCR showed that BDNF mRNA expression was significantly up regulated ( $P < 0.05$ ). BDNF immunostaining was located in epithelia tissue and the protein level of BDNF was markedly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** HUMSC implantation maybe an effective strategy on the treatment of ulceration in diabetic foot rats, and the possible mechanism may involve in BDNF expression.

**【Key words】** Diabetic rats Foot ulceration HUMSC BDNF

糖尿病是临床内分泌科常见的疾病<sup>[1]</sup>。糖尿病足是因糖尿病引起神经病变后导致神经终末功能障碍所致的足部疾病<sup>[2]</sup>。糖尿病足一旦发生,长期迁延且难于愈合,寻找其有效的治疗手段仍是基础和临床工作者面临的科学问题。

细胞移植治疗是一种促进创面修复的有效手段。人脐带干细胞(human umbilical mesenchymal stromal cells, HUMSC)是来源于脐带间充质的多潜能细胞,具有增殖能力强、能分化为靶组织细胞的能力<sup>[3-5]</sup>。HUMSC 在疾病治疗中有广阔的应用前景,既往文献报道 HUMSC 可用于脑外伤<sup>[6,7]</sup>、脑缺

血<sup>[8,9]</sup>治疗。脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)是一种重要的神经营养因子<sup>[10-13]</sup>,其在 HUMSC 治疗糖尿病足中的变化尚未见报道。本实验拟探索 HUMSC 治疗糖尿病足的效果,并探讨其治疗作用是否与 BDNF 有关,为今后临床应用 HUMSC 治疗糖尿病足及其探讨与 BDNF 的关系提供实验依据。

## 1 方法

### 1.1 大鼠糖尿病模型制作

成年 SD 大鼠购于昆明医科大学实验动物中心。随机分为正常对照组,糖尿病足溃疡组和 HUMSC 治疗组,每组 12 只大鼠,其中 5 只用于免

\* 云南省自然科学基金(No. 2009CD203)资助

疫组化,7组用于PCR。后两组大鼠采用腹腔内注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)制作大鼠糖尿病模型。STZ能选择性损伤胰岛 $\beta$ 细胞,引起实验性糖尿病。给大鼠腹腔注射STZ(25 mg/kg)后1~2 h,STZ抑制胰岛释放致血糖水平升高,出现早期高血糖相;随后由于胰岛 $\beta$ 细胞破坏,大量胰岛素释放导致血糖显著降低,持续约6~10 h,称为低血糖相。24 h后出现稳定的高血糖相即糖尿病阶段,此时大部分胰岛 $\beta$ 细胞已呈现不同程度的损伤和破坏。一周后再1次性腹腔注射STZ 40 mg/kg,于下一周连续3 d测血糖 $>16.7$  nmol/L为造模成功。

### 1.2 制作糖尿病足模型

将造模组在双侧肢后肢分离臀部的肌肉而暴露坐骨神经,用血管钳夹挫伤使神经受损并在足背开一小切口后涂抹金黄色葡萄球菌3 d,诱导足部溃疡坏疽的发生。

### 1.3 HUMSC的培养和鉴定

人脐带5根,取自足月健康新生儿,由昆明市延安医院提供,经产妇同意和伦理委员会论证后用于科学研究。采用组织块贴壁法获取消化HUMSC。将脐带剪碎,无菌条件下浸入DMFM/F12培养基中制备组织块,接种于含10%FB、25 mmol/L谷胺酰胺、10  $\mu$ L/mL青霉素,100  $\mu$ g/mL链霉素,并置37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养。待HUMSC从组织中迁出(大约1周)后,去除组织块更换培养基继续培养。以后每3 d换液1次,细胞长到80%时,用0.25%胰蛋白酶和0.29/L EDTA混合液进行消化传代。以 $10 \times 10^5$ 个细胞/mL进行接种培养,5 d左右传代。本实验中传5代细胞用于组织化学染色鉴定。分别于原代第7 d、传代后第5 d观察细胞形态变化。按文献<sup>[6]</sup>方法用SP二步法染色鉴定HUMSC。所用抗体为CD44和CD34(Santa Cruz, 1:500)。常规DAB染色,棕色反应显色后于显微镜下观察阳性产物部位。

### 1.4 HUMSC治疗

将之前培养的HUMSC( $10^5$ /mL)注入HUMSC治疗组大鼠足溃疡边缘3个点,每点体积15  $\mu$ L。2周后用方格测量溃疡面积,用免疫组化、PCR技术研究BDNF的表达变化。

### 1.5 温痛觉敏感度实验

HUMSC治疗两周后,观察HUMSC治疗组和糖尿病足溃疡组大鼠后肢温痛觉变化。

足底温疼觉测试:使用YLS-12A红外线照射

温度刺激测痛仪。将大鼠固定后用一束红外光照射足底产生集热效应,使局部升温产生疼痛,当超过动物忍耐痛阈时,动物就产生有效抬腿逃避,以此方法来判断动物对热产生的疼痛反应情况。设定热辐射温度为42  $^{\circ}$ C。热辐射刺激22 s后未出现甩尾,则停止试验,甩尾潜伏期按20 s计算以防烫伤。每次测试前先给大鼠一个预适应的刺激,不计入结果内,同样的方法重复3次,结果取平均值。

压爪试验:使用YLS-3E电子压痛仪,采用尖形探针进行鼠爪压力试验。探针施压在鼠爪上,压力逐渐增加,直至出现尖叫或逃避动作后,记录结果。如果压力达到250 g仍无尖叫或逃避动作,则停止试验,按250 g计算以防鼠爪损伤。每次测试前先给大鼠一个预适应的刺激,不计入结果内,同样的方法重复3次,结果取平均值。

### 1.6 样本获取

将动物灌注麻醉。按1 mL/100 mg的剂量腹腔注射3.6%的水合氯醛,动物麻醉后,打开胸腔。在右心耳用开剪口,将大号针头-输液带-生理盐水插入动物的左心室,深入主动脉,并灌注生理盐水。等血液被冲洗干净后,灌注200~300 mL 40 g/L多聚甲醛。灌注后不久,鼠尾开始僵硬,肝脏变白。等到全身僵硬即可停止灌注,开始取双足背组织。免疫组化用标本置4  $^{\circ}$ C冰箱备用。PCR用样本活体取材后置-80  $^{\circ}$ C冰箱贮藏备用。

### 1.7 免疫组化染色

按文献<sup>[6]</sup>方法用SP二步法染色。HUMSC鉴定抗体为CD44和CD34(Santa Cruz, 1:500)。BDNF抗体购自Chemicon公司,工作浓度1:1000,二抗为羊抗兔IgG,常规DAB染色,棕色反应显色后于显微镜下观察阳性产物部位。BDNF阳性为胞浆棕黄色染色。每组取3个( $\times 400$ 倍)镜下视野,用图像分析软件(Image)测量阳性反应物光密度值。

### 1.8 PCR

用Trizol试剂盒(宝生物)提取相应标本总RNA,按照试剂盒说明书逆转录为cDNA模板。利用Primer Premier 5.0软件设计BDNF引物,以 $\beta$ -actin为内对照,送生物公司合成。 $\beta$ -actin上游:5'-GTAAAGACCTCTATGCCA ACA-3',下游:5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3',片段长度:227 bp。BDNF上游:5'-TCCCTGGCTGACACTT

TT-3', 下游: 5'-ATTGGGTAGT TCGGCATT-3', 片段长度: 466 bp。根据常规 PCR 建立 PCR 反应体系: 2 × PCR Master Mix 12.5 μL, PCR water nucle-free 10.5 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, 样本 1 μL, 总体积为 25 μL。震荡, 离心混匀 10 s 后, 放入 PCR 仪, 按以下反应条件进行 PCR 扩增: 预变性: 94 °C, 5 min; 变性: 94 °C, 1 min; 退火温度 BDNF 50 °C, β-actin 52.5 °C; 延伸: 72 °C, 1 min; 共 30 个循环; 总延伸: 72 °C, 10 min。将 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳, 并用 BIO-RAD 凝胶自动成像系统曝光成像, 用 ImageJ 测定各个样本 PCR 产物电泳条带光密度值, 所测的目的条带光密度值/β-actin 条带光密度值所得比值用于统计。

1.9 统计学方法

组间比较用 χ<sup>2</sup> 检验, 两组间比较用 t 检验, α = 0.05。

2 结果

2.1 HUMSC 移植对糖尿病足溃疡的修复作用

结果显示, HUMSC 治疗组大鼠足溃疡面积 (0.196 ± 0.015) cm<sup>2</sup> 较糖尿病足溃疡组面积 [(0.296 ± 0.023) cm<sup>2</sup>] 缩小, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。

2.2 HUMSC 移植对大鼠肢体感觉功能的影响

通过比较各组大鼠后肢温、痛觉敏感度实验发现, HUMSC 治疗组大鼠下肢温度刺激抬足时间和针刺抬足时间均分别比糖尿病足溃疡组缩短, 差异有统计学意义 (P < 0.05), 见图 1。

2.3 BDNF mRNA 表达变化

PCR 分析显示, BDNF mRNA 在各组足组织均有表达。HUMSC 治疗组大鼠足溃疡组织 BDNF mRNA 水平较糖尿病足溃疡组升高, 差异

有统计学意义 (P < 0.05), 见图 2。

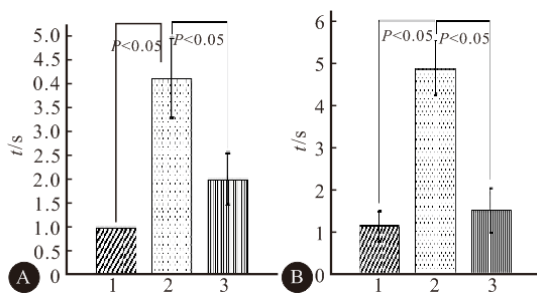


图 1 温度(A)和针刺(B)对抬足时间的影响

Fig 1 Effect of thermal (A) and needle (B) stimulation on the time of foot escape

1: Control group; 2: Diabetic foot model group; 3: HUMSC treatment group

2.4 BDNF 免疫组化染色结果

免疫组化染色显色, BDNF 在糖尿病足溃疡组大鼠足上皮组织明显表达, HUMSC 治疗明显增强上皮细胞 BDNF 免疫染色。光密度值分析比较两组间差异有统计学意义 (P < 0.05), 见图 3。

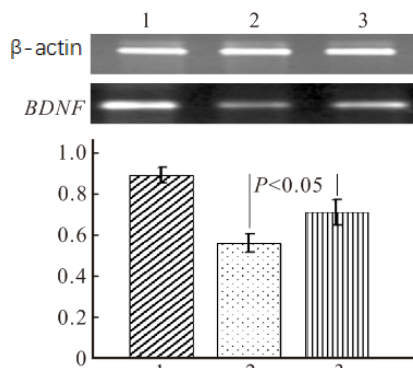


图 2 各组 BDNF mRNA 表达变化

Fig 2 Changes of BDNF mRNA in each group

1: Control group; 2: Diabetic foot model group; 3: HUMSC treatment group

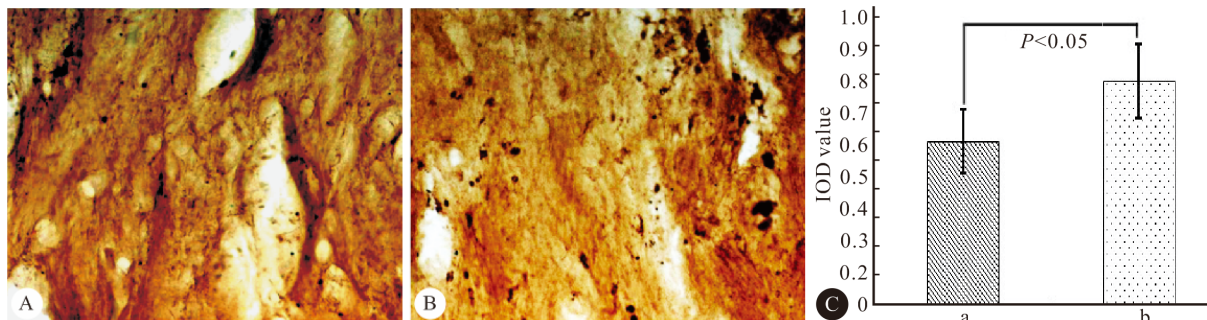


图 3 BDNF 在足上皮组织呈阳性反应。SP × 400

Fig 3 BDNF positive staining in epithelia of foot. SP × 400

A, a; Diabetic foot model group; B, b; HUMSC treatment group; C: IOD value between two groups

### 3 讨论

本实验通过建立 SD 大鼠糖尿病足溃疡模型,培养 HUMSC,观察其对大鼠糖尿病足的影响,证实 HUMSC 移植对糖尿病大鼠足溃疡有一定修复效果,且其分子机制可能与 BDNF 有关。

#### 3.1 HUMSC 移植对糖尿病足的修复作用

本实验发现,HUMSC 移植能有效促进糖尿病大鼠足溃疡修复,并改进温、痛觉。HUMSC 是一类来源于人脐带的间充质、有自我增殖和分泌为靶组织细胞能力的干细胞<sup>[3-5]</sup>。由于脐带为分娩胎儿的废弃物,易于获得,其在糖尿病足溃疡治疗中有良好的开发空间的价值。至今,HUMSC 用于其他疾病如脑外伤治疗等已有报道<sup>[6-9]</sup>。HUMSC 移植促进糖尿病足修复及改善温、痛觉是新的发现,该结果为今后将其用于人糖尿病足治疗提供了支持。

#### 3.2 HUMSC 改善糖尿病足功能与 BDNF 表达有关

本实验发现,HUMSC 治疗组 BDNF 基因和蛋白水平均高于未移植 HUMSC 的糖尿病足溃疡组。揭示 HUMSC 移植促进了 BDNF 的表达,提示 BDNF 增加可能有利于促进上皮修复并改进其功能。文献报道,BDNF 能有效促进损伤细胞修复并维持其存活<sup>[14-16]</sup>。此外 BDNF 还能促进神经再生<sup>[17,18]</sup>。本实验中,BDNF 增加一方面可能通过促进上皮细胞增殖进而有利于溃疡修复,另一方面,增加的 BDNF 也可能引导神经再生,从而促进感觉功能恢复。至于 BDNF 促进溃疡修复的分子信号通路还有待进一步研究。

综上,本实验为应用 HUMSC 移植治疗糖尿病足提供了有用的实验资料,为 HUMSC 移植治疗糖尿病足及阐明其与 BDNF 的关系提供了实验依据。对未来应用 HUMSC 治疗糖尿病足提供了可能。

### 参 考 文 献

- Ouzzif Z, Derouiche M. Hereditary bisalbuminemia in a man with diabets mellitus and hypertension. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2002;60(6):707-710.
- Zubair M, Malik A, Ahmad J. Incidence, risk factors for amputation among patients with diabetic foot ulcer in a North Indian tertiary care hospital. *Foot (Edinb)*, 2012;22(1):24-30.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999;284(5411):143-147.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for

- nonhematopoietic tissues. *Science*,1997;276(5309):71-74.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981;292(5819):154-156.
- Hong SQ, Zhang HT, You J, *et al.* Comparison of transdifferentiated and untransdifferentiated human umbilical mesenchymal stem cells in rats after traumatic brain injury. *Neurochem Res*,2011;36(12):2391-2400.
- Zanier ER, Montinaro M, Vigano M, *et al.* Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells protect mice brain after trauma. *Crit Care Med*,2011;39(11):2501-2510.
- Lim JY, Jeong CH, Jun JA, *et al.* Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Res Ther*,2011;2(5):38.
- Lin YC, Ko TL, Shih YH, *et al.* Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke. *Stroke*,2011;42(7):2045-2053.
- McGinty JF, Bache AJ, Coleman NT, *et al.* The role of BDNF/TrkB signaling in acute amphetamine-induced locomotor activity and opioid peptide gene expression in the rat dorsal striatum. *Front Syst Neurosci*,2011;5:60.
- Hendriksen H, Meulendijks D, Douma TN, *et al.* Environmental enrichment has antidepressant-like action without improving learning and memory deficits in olfactory bulbectomized rats. *Neuropharmacology*, 2012; 62(1): 270-277.
- Stoll P, Plessow A, Bratke K, *et al.* Differential effect of clopidogrel and aspirin on the release of BDNF from platelets. *J Neuroimmunol*,2011;238(1-2):104-106.
- Shao SH, Shi SS, Li ZL, *et al.* Aging effects on the BDNF mRNA and TrkB mRNA expression of the hippocampus in different durations of stress. *Chin J Physiol*,2010;53(5):285-293.
- Heyden A, Ionescu MC, Romorini S, *et al.* Hippocampal enlargement in Bassoon-mutant mice is associated with enhanced neurogenesis, reduced apoptosis, and abnormal BDNF levels. *Cell Tissue Res*,2011;346(1):11-26.
- Constandil L, Aguilera R, Goich M, *et al.* Involvement of spinal cord BDNF in the generation and maintenance of chronic neuropathic pain in rats. *Brain Res Bull*,2011;86(5-6):454-459.
- Popova NK, Morozova MV, Naumenko VS. Ameliorative effect of BDNF on prenatal ethanol and stress exposure-induced behavioral disorders. *Neurosci Lett*,2011;505(2):82-86.
- Cheng PL, Song AH, Wong YH, *et al.* Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2011;108(45):18430-18435.
- Lindsley TA, Shah SN, Ruggiero EA. Ethanol alters BDNF-induced Rho GTPase activation in axonal growth cones. *Alcohol Clin Exp Res*,2011;35(7):1321-1330.

(2013-03-21 收稿,2013-06-17 修回)

编辑 汤 洁