

詹思意, 杜韶鹏, 吴长敏, 等. 不同途径移植骨髓间充质干细胞治疗犬 I 型糖尿病的疗效研究 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (10): 111-119.
Zhan S Y, Du S P, Wu C M, et al. Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted via different routes on canine type I diabetes mellitus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (10): 111-119.

不同途径移植骨髓间充质干细胞治疗犬 I 型糖尿病的疗效研究

詹思意, 杜韶鹏, 吴长敏, 刘境娟, 李函霖, 严玉霖*

(云南农业大学动物医学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 旨在探讨骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 移植对犬 I 型糖尿病 (IDDM) 的治疗效果, 比较静脉输注与腹直肌鞘注射 2 种移植途径的疗效差异。通过手术切除 85%~90% 胰腺组织, 建立犬 IDDM 模型, 将 12 只模型犬随机分为阳性对照组、BMSCs 静脉输注组和腹直肌鞘注射组, 每组 4 只, 另将 4 只健康中华田园犬作为阴性对照组。BMSCs 治疗 8 周, 监测血糖、C 肽、生化指标及组织学变化。结果: 2 种移植方式均显著降低血糖水平, 腹直肌鞘注射效果更佳; 移植后, 治疗组犬糖代谢能力增强, 血糖趋于正常, 肝脏和胰腺功能改善, 胰岛结构部分恢复, β 细胞修复并增加。综上, BMSCs 移植通过调控血糖、恢复胰岛功能及促进组织修复, 可有效治疗犬 I 型糖尿病, 为临床治疗犬 IDDM 提供了理论依据和技术支持, 具有较好的临床应用价值。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 犬 I 型糖尿病; 细胞移植; 血糖调控; 腹直肌鞘注射; 静脉输注

中图分类号: S856.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2026)10-0111-09

Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted via different routes on canine type I diabetes mellitus

ZHAN Siyi, DU Shaopeng, WU Changmin, LIU Jingjuan, LI Hanlin, YAN Yulin*

(College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: This study investigated the therapeutic efficacy of bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) transplantation in canine insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), by comparing the therapeutic effects of intravenous infusion versus rectus sheath injection. A canine IDDM model was established by surgically removing 85%–90% of pancreatic tissue. Twelve model dogs were randomly divided into a positive control group, a BMSC intravenous infusion group, and a rectus sheath injection group, with four dogs in each group. A negative control group consisting of four healthy Chinese native dogs was also established. The BMSC treatment lasted for 8 weeks, with monitoring of blood glucose, C-peptide, biochemical indicators, and histological changes. The results showed that both the transplantation methods significantly reduced blood glucose levels in the dogs, with the rectus sheath injection yielding superior efficacy. Post-transplantation, the treated dogs exhibited enhanced glucose metabolism, normalized blood glucose levels, improved liver and pancreatic function, partial restoration of islet structure, and increased β -cell repair and proliferation. These findings indicated that BMSC transplantation effectively treated canine IDDM by regulating blood glucose, restoring islet function, and promoting tissue repair. The results provided theoretical and technical support for clinical treatment of canine IDDM, demonstrating a significant clinical application value.

Keywords: bone marrow mesenchymal stem cells; canine type I diabetes; cell transplantation; blood glucose regulation; rectus abdominis sheath injection; intravenous infusion

犬骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 是骨髓中的多能干细胞, 具备自我更新和多向分化能力, 可分化为骨、软骨、脂肪、肌腱和肌肉等多种组织。在体外,

BMSCs 需特定诱导剂 (如地塞米松、胰岛素) 激活其成骨、成脂和成软骨分化。BMSCs 具有显著的免疫调节功能, 能抑制 T 细胞增殖, 下调促炎因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 表达, 减轻炎症反应^[1]。它们还能分泌生长因子如血管内皮生长因子 (VEGF)、肝细胞生长因子 (HGF), 支持血管新生和细胞存活, 促进胰岛 β 细胞再生, 改善胰腺微环境^[2]。随着人们生活水平的提高, 犬饲养条件的改善, 近年来老年犬的疾病较多发, 其中就包括犬 I 型糖尿病 (insulin-dependent

收稿日期: 2025-10-14; 修回日期: 2026-07-23

基金项目: 香格里拉市农民院士科技服务站项目 (云科协联 20239); 云南香格里拉藏香猪科技小院项目 (云教发 202414); 云南省科技厅科技计划项目 (202502AE090059)

第一作者: 詹思意, 女, 硕士研究生

*通信作者: 严玉霖, 教授, 研究方向: 动物干细胞研究与临床应用, E-mail: yanyulin333@163.com。

diabetes mellitus, IDDM)。IDDM 是一种由自身免疫介导的胰岛 β 细胞破坏导致的慢性代谢性疾病。其危害不仅源于胰岛素绝对缺乏引起的代谢紊乱,更体现在多系统并发症的累积负担上,病理特征包括胰岛萎缩、胰腺组织炎症浸润(巨噬细胞浸润但缺乏 $CD3^+$ T 细胞浸润)和继发性并发症(如酮症酸中毒、低血糖)^[3-4],临床表现为多饮、多尿、体重下降,需依赖外源性胰岛素维持血糖稳定。尽管胰岛素替代治疗是 IDDM 管理的基石,但其应用存在多重局限性,不仅影响疗效,更带来新的健康风险。外源性胰岛素注射难以精确模拟健康胰腺的生理性分泌模式,导致血糖水平在一天中剧烈波动。这种“过山车式”的血糖变化不仅难以达到理想的控制效果,本身也增加了并发症的风险^[5]。在治疗过程中剂量计算错误、注射后进食不足或运动量突然增加都可能导致血糖过低。严重的低血糖会引发虚弱、抽搐、昏迷甚至死亡^[6]。长期使用外源性胰岛素,机体可能会产生抗胰岛素抗体,或细胞对胰岛素的敏感性下降,导致治疗效果减弱^[7]。因此恢复内源性 β 细胞功能的干细胞疗法,被视为 IDDM 治疗领域最具潜力的前沿方向之一。研究显示, BMSCs 在体外成功分化为胰岛素分泌细胞(IPCs),移植至 I 型糖尿病大鼠体内后,显著降低血糖水平并提升血清胰岛素浓度,并且试验表明即使少量移植细胞也能有效控制高血糖,且效果优于直接注射胰岛素^[8];兔 ADSCs 经肝动脉或静脉移植后,成功改善 I 型糖尿病模型的高血糖状态,并分化为胰岛素分泌细胞^[9];2024 年研究首次在非人灵长类动物中实现无需免疫抑制的胰岛移植。恒河猴胰岛细胞成功治疗 I 型糖尿病^[10]。鉴于上述在大鼠、兔及非人灵长类中取得的疗效, BMSCs 有望在犬 I 型糖尿病模型中进一步验证其应用的安全性与有效性,然而目前在犬中尚无相关研究报道和临床应用。因此,本研究探索 BMSCs 移植对犬 I 型糖尿病的治疗效果,比较静脉输注和腹直肌鞘注射 2 种移植途径的疗效差异,研究 BMSCs 移植对血糖调控、胰岛功能恢复、肝脏和胰腺组织修复以及整体健康状况的影响。

1 材料与方法

1.1 试验动物和细胞

从昆明某犬场购入 16 只健康中华田园犬,体重 12~15 kg, 9~12 月龄。试验前适应性饲养 7 d,环境清洁通风,喂常规日粮。试验前 1 周内完成体格检查、实验室检查和口服葡萄糖耐量试验(OGTT),所有指标均正常。

本研究所用犬 DMSCs 由云南农业大学动物医学

院病理实验室提供(已通过鉴定)^[11-13]。

1.2 主要试剂和仪器设备

犬 C 肽试剂检测盒购自上海臻科生物科技有限公司;苏木素染液、苏木素分化液、苏木素返蓝液、组化试剂盒 DAB 显色剂均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;三磷酸腺苷购自陕西本禾生物工程有限公司;辅酶 A 购自上海源叶生物科技有限公司。

IHIY-99 型微型高速离心机购自广州正仪生物技术有限公司;Beckman 低温超速离心机购自美国 Beckman 公司;Countess II 自动细胞计数仪购自赛默飞世尔科技公司;血糖检测仪购自优利特医疗电子有限公司;兽用 B 超机购自德瑞康医疗科技有限公司。

1.3 手术切除犬胰腺建立 I 型糖尿病模型

术前 48 h 起,试验犬改为流质饮食;术前 24 h 测量体重,并完成血常规、血糖及生化检测。为减少术中呕吐与误吸风险,术前禁食 12 h、禁水 6 h。

静脉注射丙泊酚(0.5 mL/kg)诱导麻醉后,进行气管插管建立人工呼吸通路。使用兽用呼吸麻醉机(吸入异戊烷),并通过多参数监护仪持续监测心率、呼吸频率、血氧饱和度及体温。经前肢头静脉置入留置针建立静脉通路,术中输注生理盐水或乳酸钠林格液(30~50 mL/kg),并于术中及术后监测血糖。

试验犬仰卧位固定,腹部术区备皮消毒,铺无菌巾。取腹部正中切口(8~10 cm)进腹,上翻大网膜进入小网膜腔,显露胰腺上下段并测量其长度。仔细游离胰腺,自十二指肠上动脉至胰角部开口间切除 85%~90%的胰腺组织(保留 10%~15%胰头及部分主胰管)。电凝止血后,将大网膜覆盖胰腺断面,缝合后腹膜并固定十二指肠,逐层缝合腹腔。手术未放置引流管,切除组织以 4%多聚甲醛固定备检。

术后 3 d 内,适量通过肌肉注射美洛昔康,缓解试验犬疼痛。禁食、禁水、静脉补液消炎 3 d。术后第 4 天起逐步恢复饮食,由流质过渡至半流质,随后正常饲喂,不给予胰酶制剂,每日 2 次,食量与成分同术前。监测空腹及随机血糖,术后 1 周行口服葡萄糖耐量试验,10~14 d 拆线。

模型成功标准为连续 7 d 空腹血糖>11.1 mmol/L, C 肽显著降低,葡萄糖耐量试验峰值>11.1 mmol/L ($P<0.05$),并出现多饮、多尿、体重显著下降等典型糖尿病症状($P<0.05$),视为 IDDM 模型建立成功。

1.4 动物分组

16 只试验犬随机分为阴性对照组(NC 组, $n=4$)和模型组($n=12$)。NC 组仅行假手术,暴露胰腺后逐层缝合,不切除胰腺。模型组行胰腺切除术,切除 85%~90%的胰腺,诱导 I 型糖尿病。连续监测

血糖水平，空腹血糖持续 7 d 高于 11.1 mmol/L、C 肽值显著下降、葡萄糖耐量检测结果显示血糖峰值超过 11.1 mmol/L 且出现多饮、多尿、体重减轻等典型糖尿病症状，视为 IDDM 模型成功。模型成功后，将 12 只 IDDM 犬随机分为：阳性对照组（PC 组， $n=4$ ）、BMSCs 静脉输注组（试验 I 组， $n=4$ ）和 BMSCs 腹直肌鞘注射组（试验 II 组， $n=4$ ）。各治疗组按 1×10^7 cells/mL、每千克体重注射 1 mL 移植细胞，每 2 周移植 1 次。

1.5 治疗方法

1.5.1 BMSCs 静脉输注

将体外培养、扩增并完成鉴定的 BMSCs 用无菌生理盐水重悬，制备成浓度 1×10^6 cells/mL 的单细胞悬液，置于无菌输液袋中备用。通过试验犬的前肢头静脉或其他适宜的表浅静脉，埋置留置针，建立静脉通道。为确保生物安全性与相容性，输注前静脉给予适量抗过敏药物（如地塞米松）。将装有 BMSCs 悬液的输液袋连接至静脉通路，使用输液泵或通过重力滴注，在 30~60 min 内缓慢、匀速地将细胞悬液输入体内。

1.5.2 BMSCs 腹直肌鞘注射

将体外培养、扩增并完成鉴定的 BMSCs 用无菌生理盐水重悬，制备成浓度 1×10^6 cells/mL 的单细胞悬液，吸入 1 mL 注射器内备用。将试验犬仰卧位固定，剃除腹部毛发。准确触诊定位腹白线及两侧的腹直肌鞘区域。对术区进行常规消毒。操作者持注射器，与皮肤表面呈一定角度，刺穿皮肤及腹直肌前鞘，将针尖送入腹直肌鞘腔内。轻微回抽注射器，确认无血液回流后，缓慢将 BMSCs 悬液注入鞘内。注射完毕后快速拔出针头，对注射点轻微按压止血。

1.6 治疗及观察指标

1.6.1 血糖检测

使用宠物血糖仪动态监测犬的随机血糖与空腹血糖。OGTT 可评估血糖调控能力。为系统评估血糖调节能力，分别在术前 1 周、术后 1 周及治疗第 4、8 周进行 OGTT。试验犬禁食 12 h 后，按 1 g/kg 剂量口服葡萄糖溶液，分别在 0、30、60、120 min 采集静脉血测定血糖。正常与糖尿病犬的糖耐量判定标准见表 1。

表 1 葡萄糖耐量试验判定标准				mmol/L
类型	空腹	服糖后 60 min	服糖后 120 min	
正常糖耐量	3.9~6.1	6.7~9.4	<7.8	
糖尿病性糖耐量	≥7.0	>11.1	≥11.1	

1.6.2 血常规、生化指标检测

从头静脉采集试验犬血液样本至 2 mL 抗凝管，3 500 r/min 离心 10~15 min，吸取上层淡黄色血清，弃去下层不溶物。将血清按 100 μL 分装至新离心管，于-80 ℃冻存储备用。全血样品直接用于血常规检测，离心后的血清按生化试剂盒（成都斯马特科技股份有限公司）说明操作，移液至生化测试盘后，放入生化检测仪测定生化指标。

1.6.3 犬 C 肽检测

犬 C 肽检测流程包括试剂准备、试验操作和结果计算。试验前，将试剂盒从冷藏环境中取出回温至室温，并按 1：20 稀释洗涤缓冲液备用。测定后，以标准品 OD 值为横坐标、浓度为纵坐标绘制标准曲线，获得回归方程，代入样品 OD 值计算浓度。根据犬正常 C 肽参考范围（0.5~2.86 ng/mL）判断结果是否异常。

1.6.4 组织样采集、石蜡切片制备与 HE 染色

治疗结束后，通过头静脉注射丙泊酚和氯化钾对 IDDM 试验犬实施安乐死。沿腹中线打开腹腔，取出胰腺并剪取 0.5 cm³ 组织块，放入 4% 多聚甲醛中，4 ℃ 固定 24 h 以上。固定后标记组织块，切成 5 μm 厚切片，贴于载玻片，进行 HE 染色。

1.6.5 免疫组化（IHC）染色

对犬胰腺组织进行 IHC 染色。切片二甲苯 I 30 min、II 10 min 脱蜡，梯度乙醇（100%→70%）各 5 min 脱水；pH=9.0 抗原修复液加热，自然冷却，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；阻断酶 25 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；3% BSA 室温封闭 30 min；37 ℃ 一抗 30 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；室温二抗 30 min，PBS 洗涤 3 次，每次 5 min；新鲜 DAB 显色 10 min，水洗后苏木素复染 2 min、返蓝；逆向乙醇脱水各 3 min，二甲苯 II-I 各 2 min；中性树脂封片、拍照。

1.7 体况评估检查

在建立 IDDM 犬模型及细胞移植治疗过程中，持续监测试验犬的体重变化，并采用 5 分制综合评分对其体况进行动态评估，评分维度包括行为活动、精神状态、食欲和饮欲，评判标准见表 2。

1.8 数据处理方法

试验数据均采用 Excel 2010 软件进行汇总整理，用 SPSS 27.0 软件进行分析，试验数据均采用“均值±标准差”表示。

表 2 犬体况评估标准

分数	行为、精神状态	食欲	饮欲
1	犬不走动，也不能以躺着的姿势进行排便	完全拒绝进食	饮水量明显高于正常水平，且饮水频繁
2	犬仅在排便或排尿的时候走动	进食量极少，需强迫才吃少量食物	饮水量明显高于正常水平
3	犬不愿走路，仅站立，对外界刺激的反应差	食欲一般，进食量有所减少	饮水量稍高于正常范围
4	犬对行走和外界刺激的基本不产生反应，睡眠时间延长	食欲正常，能正常进食	饮水量在正常范围内
5	犬走路轻快，能够积极响应外界的刺激（包括主人的呼唤、对触觉的反应等）	食欲旺盛，进食积极	饮水量正常且主动饮水

2 结果

2.1 犬 I 型糖尿病模型的建立

通过手术切除 8 只试验犬 85%~90% 的胰腺组织，成功建立了犬 I 型糖尿病模型。在建模后的第 3、6、9、12、15 天，测定 IDDM 模型组（ $n=12$ ）和 NC 组（ $n=4$ ）的空腹血糖，连续观察 15 d。结果显示，IDDM 组平均空腹血糖在第 3 天明显上升，第 6 天突破 11.1 mmol/L，并在后续时间持续维持在 11.1 mmol/L 以上。术后 1 周，对 NC 组和 IDDM 模型组试验犬进行 OGTT。2 组犬一次性口服葡萄糖溶液后，在 0、30、60、120 min 采集静脉血，检测血糖变化，评估血糖调节能力。结果显示，0 min 时，IDDM 组高达（ 11.69 ± 0.37 ）mmol/L；60 min 和 120 min 时，IDDM 组血糖异常升高且恢复缓慢，平均值 ≥ 11.1 mmol/L。在建模前（0 d）和术后第 15 天，测定 NC 组和 IDDM 模型组的空腹 C 肽水平，IDDM 模型组术后 15 d C 肽水平显著下降。在试验期间，动态监测 2 组试验犬的体重，并在第 3、6、9、12、15 天记录结果。IDDM 模型组自第 6 天起体重开始下降，第 9~15 天下降显著。临床观察显示，IDDM 模型犬出现多饮、多尿和体重减轻等典型糖尿病症状。结果表明犬 IDDM 模型建立成功。

2.2 移植细胞对犬 IDDM 的治疗效果

2.2.1 移植细胞对犬血糖的调控

在 8 周的犬 IDDM 治疗中，使用 BMSCs 进行移植，每周检测 1 次随机血糖，共 8 次（表 3）。结果显示，试验 I 组和 II 组的随机血糖显著低于 PC 组。第 6 周时，试验 I 组与 II 组差异极显著（ $P<0.001$ ）；第 8 周时，试验 I 组与 II 组有显著差异（ $P<0.05$ ），试验 II 组下降幅度最大。

表 3 治疗期各组随机血糖变化（ $n=4$ ）mmol/L

时间/周	NC 组	试验 I 组	试验 II 组	PC 组
1	5.26±0.44	10.68±0.25	10.48±0.18	13.50±0.55
2	5.19±0.35	9.83±0.27	9.48±0.31	14.00±0.51
3	5.15±0.20	8.99±0.28	8.72±0.36	14.46±0.48
4	5.25±0.39	8.05±0.27	7.80±0.36	15.14±0.53
5	5.15±0.32	7.67±0.30	7.26±0.33	15.63±0.50
6	5.19±0.33	7.23±0.39	6.07±0.24***	16.18±0.35
7	5.21±0.20	6.52±0.49	5.59±0.32**	16.85±0.25
8	5.20±0.22	5.82±0.38	5.15±0.14*	17.72±0.26

注：试验 II 组与 I 组相比，* 表示 $P<0.05$ ，** 表示 $P<0.01$ ，*** 表示 $P<0.001$ 。下同。

在治疗周期的第 4 周、第 8 周，对各组试验犬进行了 OGTT 检测，结果见表 4。第 4 周时，试验 I 组和 II 组的血糖下降趋势减缓，在 120 min 时 2 组差异显著（ $P<0.01$ ）。第 8 周时，I 组和 II 组的空腹血糖显著降低，120 min 时血糖水平分别为（ 7.59 ± 0.46 ）

mmol/L 和（ 6.46 ± 0.33 ）mmol/L，试验 II 组更接近正常范围，在 60 min 时 2 组差异极显著（ $P<0.001$ ）。这表明 8 周 BMSCs 移植治疗后，试验 I 组和 II 组的空腹血糖和糖代谢能力均显著改善。

表 4 治疗期试验犬口服葡萄糖耐量试验					mmol/L
治疗时间/周	采集时间/min	NC 组	试验 I 组	试验 II 组	PC 组
4	0	5.46±0.52	9.98±0.38	9.99±0.13	14.59±0.45
	30	8.29±0.39	12.92±0.16	12.51±0.27	17.75±0.56
	60	6.54±0.42	12.13±0.52	11.48±0.31	16.39±0.60
	120	5.49±0.55	10.97±0.60	9.91±0.30**	15.90±0.65
8	0	5.33±0.25	6.62±0.26	6.59±0.43	14.77±0.26
	30	8.02±0.36	9.04±0.22	8.39±0.32*	18.65±0.24
	60	6.68±0.39	8.35±0.27	7.02±0.37***	17.48±0.26
	120	5.39±0.20	7.59±0.46	6.46±0.33***	16.84±0.16

2.2.2 移植细胞对犬肝脏、胰脏组织的相关生化指标的影响

犬肝脏和胰腺相关生化指标对评估 I 型糖尿病的病情控制、发展趋势、并发症风险及治疗效果至关重要。本研究在治疗期未开始前（0 周）、治疗期 4 周、治疗期 8 周 3 个时间点检测天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）、淀粉酶（AMY）、脂肪酶（LPS）等犬肝脏、胰脏组织相关的生化指标的变化，结果见表 5。

由表 5 可知，I 组和 II 组的 AST 值在治疗期间（0~8 周）均低于 PC 组。在治疗 4 周时，试验 I 组和 II 组的 AST 值差异极显著（ $P<0.001$ ）。治疗 8 周时，试验 I 组和 II 组的 AST 值分别为（ 87.50 ± 12.97 ）U/L 和（ 48.25 ± 14.36 ）U/L，差异极显著

（ $P<0.001$ ），其中 II 组更接近正常水平。

ALT 指标的变化趋势与 AST 相似。治疗 4 周后，试验 I 组和 II 组 ALT 值差异显著（ $P<0.01$ ）。治疗 8 周时，试验 II 组 ALT 值降至（ 88.25 ± 7.09 ）U/L，极显著低于试验 I 组（ $P<0.001$ ），且处于正常范围。

AMY 和 LPS 值是评估胰腺损伤与修复的关键指标。治疗 8 周时，试验 II 组 AMY 值降至（ $1\,500.00\pm102.08$ ）U/L，极显著低于试验 I 组（ $P<0.001$ ），且接近正常范围。LPS 值的变化同样显著。治疗 4 周时，试验 II 组 LPS 值极显著低于试验 I 组（ $P<0.001$ ）。治疗 8 周时，试验 II 组 LPS 值降至（ 214.00 ± 15.12 ）U/L，在正常范围。

治疗期间，NC 组肝脏和胰腺生化指标保持正常水平。

表 5 治疗期试验犬相关生化指标检测结果					U/L
生化指标	组别	治疗 0 周	治疗 4 周	治疗 8 周	
AST	NC	26.50±7.14	25.00±5.48	25.75±6.18	
	试验 I	157.00±3.65	138.00±4.83	87.50±12.97	
	试验 II	156.25±11.12	112.75±11.35**	48.25±14.36***	
	PC	157.75±9.43	207.00±8.29	247.50±4.80	
ALT	NC	63.50±19.36	65.00±20.70	65.00±21.48	
	试验 I	162.50±10.47	152.25±10.81	124.00±9.35	
	试验 II	161.75±9.74	108.00±13.52***	88.25±7.09**	
	PC	183.25±14.97	187.75±11.32	235.25±7.14	
AMY	NC	1\,161.25±192.10	1\,077.50±112.35	1\,119.00±137.86	
	试验 I	2\,907.50±94.04	2\,733.00±69.94	2\,389.50±292.59	
	试验 II	2\,912.00±223.71	2\,418.00±305.94	1\,500.00±102.08***	
	PC	2\,889.50±126.94	3\,445.00±224.37	3\,898.75±101.24	
LPS	NC	79.00±23.93	82.25±24.10	82.50±26.10	
	试验 I	359.50±38.23	341.25±37.85	268.75±45.91	
	试验 II	360.75±22.20	263.00±25.26**	214.00±15.12	
	PC	369.00±47.21	440.00±15.43	509.75±12.28	

注：AST 参考值为 0~50 U/L，ALT 参考值为 5~125 U/L，AMY 参考值为 400~1\,500 U/L，LPS 参考值为 0~216 U/L。

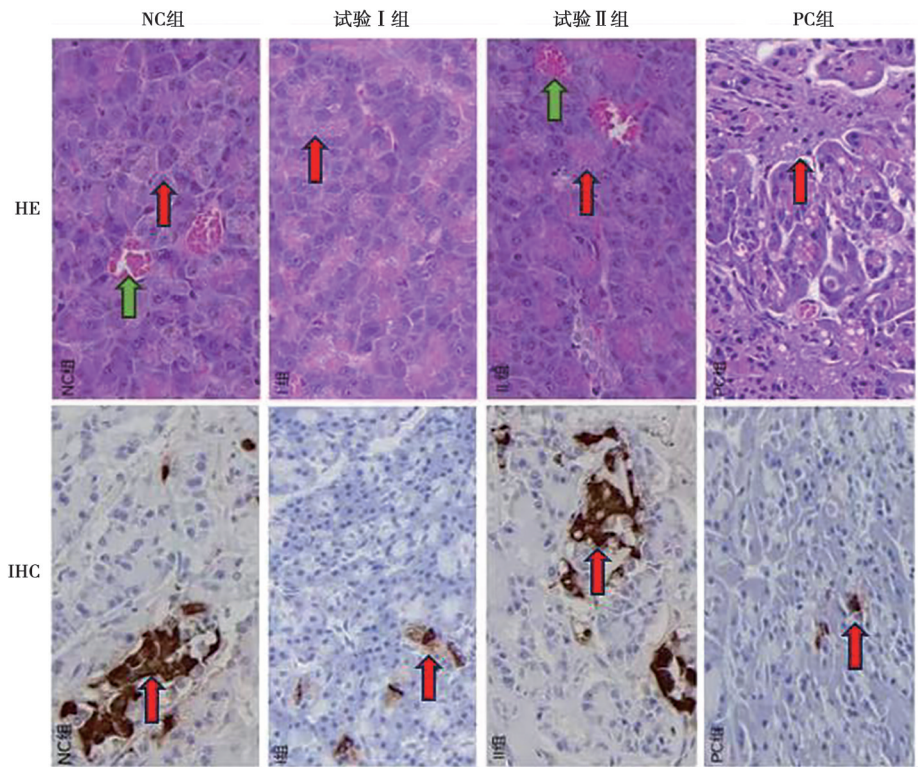
2.2.3 移植细胞对犬胰岛功能的影响

在治疗4周和8周时，对试验犬进行C肽检测以评估BMSCs移植对胰岛功能的改善。C肽是评价胰岛β细胞功能的关键指标，其水平变化直接反映胰岛功能恢复程度，表6为各组试验犬的C肽值检测结果。结果显示，治疗4周时，试验I组和II组C肽水平平均高于PC组。治疗8周后，试验I组和II组C肽水平进一步升高，且试验II组极显著高于试验I组($P<0.001$)。与PC组相比，试验I组和II组C肽水平在治疗期间均显著升高，表明BMSCs移植有效促进胰岛β细胞功能恢复。值得注意的是，试验II组在治疗8周时C肽水平已接近NC组正常水平，表明长期治疗效果更为显著。而PC组C肽水平持续低下，治疗8周时降至 (0.14 ± 0.04) ng/mL。

治疗结束后，对NC组、试验I组、试验II组和PC组试验犬的胰腺组织进行采样，经预处理后进行HE染色和胰岛素IHC分析(图1)。从HE染色图中可以看出，NC组胰腺结构清晰，无异常；PC组胰岛细胞数量减少、排列紊乱、萎缩，腺泡细胞水肿；试

验I组和II组胰岛结构部分恢复，多数胰岛边界清晰，胰岛细胞数量逐渐上升，胰岛内细胞排列趋于有序。根据胰岛素IHC结果可知，NC组可见胰岛内大量细胞被染成棕褐色呈阳性反应，反之，PC组胰岛β细胞的胰岛素表达显著减少，极少数胰岛细胞呈棕褐色阳性反应。通过治疗的试验I组，其胰岛内呈现胰岛素阳性的β细胞数量相比PC组有所增多。试验II组犬的胰岛β细胞的胰岛素表达有所增加，部分胰岛内细胞呈棕褐色阳性反应。由此可见，相较于试验I组，试验II组犬的胰腺组织功能恢复状况较好。

表6 治疗后试验犬C肽值检测结果			ng/mL
组别	治疗4周	治疗8周	
NC	2.48±0.18	2.49±0.23	
试验I	1.19±0.16	1.47±0.16	
试验II	1.44±0.17	2.21±0.33***	
PC	0.31±0.05	0.14±0.04	



注：红色箭头指示胰岛细胞，绿色箭头指示血管。

图1 各组试验犬胰腺组织HE染色与IHC结果(100×)

2.2.4 移植细胞对犬机体的影响

通过血常规检测白细胞(WBC)和红细胞(RBC)值的变化，分析BMSCs移植对犬机体的影

响。在治疗前(0周)、治疗期4周和治疗期8周时对各组试验犬进行测定(表7)。

WBC检测显示，治疗4周时，试验I组和II组

分别为 $(27.40 \pm 1.65) \times 10^9/L$ 和 $(24.06 \pm 2.43) \times 10^9/L$, 均低于 PC 组。治疗 8 周时, 试验 I 组和 II 组 WBC 值进一步下降, 试验 II 组接近正常范围 ($6 \times 10^9 \sim 17 \times 10^9/L$), 与试验 II 组差异极显著 ($P < 0.001$)。

RBC 检测显示, 治疗 4 周时, 试验 I 组与 II 组差异显著 ($P < 0.01$)。治疗 8 周时, 试验 I 组和 II 组 RBC 值分别为 $(4.16 \pm 0.39) \times 10^{12}/L$ 和 $(5.40 \pm 0.50) \times 10^{12}/L$, 试验 II 组接近正常范围 ($5.10 \times 10^{12} \sim 8.50 \times 10^{12}/L$)。

表 7 治疗期试验犬血常规结果

检测指标	组别	治疗 0 周	治疗 4 周	治疗 8 周
WBC/ ($10^9 \cdot L^{-1}$)	NC	11.02±2.18	10.54±1.48	10.57±0.96
	试验 I	29.49±1.66	27.40±1.65	24.08±1.67
	试验 II	29.81±1.52	24.06±2.43	18.10±1.94***
	PC	30.08±1.46	39.88±2.63	27.01±1.80
RBC/ ($10^{12} \cdot L^{-1}$)	NC	6.47±0.61	6.30±0.42	6.47±0.59
	试验 I	4.15±0.42	4.12±0.57	4.16±0.39
	试验 II	4.93±0.27*	5.17±0.34**	5.40±0.50***
	PC	4.17±0.48	3.61±0.20	3.18±0.18

在治疗期 0、4、8 周时, 统计了各组试验犬的体重 (表 8)。结果显示, 治疗 4 周和 8 周时, 试验 I

组与 II 组体重有显著差异 ($P < 0.05$), 且均高于 PC 组。

表 8 治疗期试验犬的体重变化kg

治疗期/周	NC 组	试验 I 组	试验 II 组	PC 组
0	13.45±0.50	11.33±0.69	11.33±0.74	11.25±0.31
4	13.93±0.46	11.73±0.65	12.75±0.37*	10.60±0.44
8	14.25±0.47	12.28±0.55	13.35±0.19*	9.98±0.62

在治疗期 0、4、8 周时对 5 组试验犬的行为、精神状态、食欲和饮欲进行了体况评估。结果显示 (表 9), 试验 I 组和 II 组在行为、精神状态和食欲方面评分均为 4 分, 显著优于 PC 组 (2 分)。在饮欲评分上, 试验 I 组和 II 组在治疗 4 周和 8 周时均为 4 分, 也显著优于 PC 组。这表明 BMSCs 移植显著改善了糖尿病犬的整体健康状况。

治疗结束后, DR 检测显示试验 I 组和 II 组试验犬未见增生或肿瘤, 证实细胞移植安全。在治疗 的 8 周内, 各组试验犬均未死亡, 全部存活。

2.2.5 移植细胞治疗犬 IDDM 的并发症

在 8 周治疗期间, NC 组、试验 I 组和 II 组犬均未出现皮肤病变, 但 PC 组部分犬出现皮肤破溃和溃烂, 尤其是足部溃烂严重。对 PC 组患犬皮肤患处每周涂抹一次 BMSCs 细胞液进行治疗, 治疗 1 周后, 患犬耳部皮肤逐渐愈合, 足部溃烂处已基本结痂, 伤口趋于愈合。详见图 2、3。

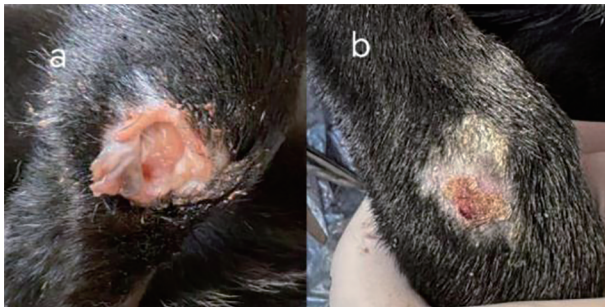
表 9 各组试验犬体况评估分值分

评估指标	组别	治疗 0 周	治疗 4 周	治疗 8 周
行为、精神状态	NC	5	5	5
	试验 I	4	4	4
	试验 II	4	4	4
	PC	4	3	2
食欲	NC	5	5	5
	试验 I	4	4	4
	试验 II	4	4	4
	PC	4	3	2
饮欲	NC	5	5	5
	试验 I	3	4	4
	试验 II	3	4	4
	PC	3	2	1



a. 治疗前; b. 治疗后。

图2 PC组试验犬耳部皮肤治疗效果



a. 治疗前; b. 治疗后。

图3 PC组试验犬足部皮肤治疗效果

3 讨论

本研究通过手术切除犬 85%~90% 的胰腺组织,成功构建了稳定的 I 型糖尿病模型。在 BMSCs 移植过程中,细胞输注途径对治疗效果具有重要影响。静脉输注使 BMSCs 随血液循环广泛分布于胰腺、肝脏和肾脏等靶器官,促进胰岛 β 细胞功能恢复并改善糖尿病相关肾损伤。研究表明,BMSCs 在胰腺内可以分化为胰岛素生成细胞,并且能够减少肾小球系膜的增厚以及巨噬细胞的浸润^[14]。此外,与静脉注射相比,直接将 BMSCs 注射至腹直肌鞘可以有效避免“肺首过效应”(静脉注射时约 80% 的细胞会被肺截留),从而显著提高胰腺局部的细胞浓度^[15]。这种局部高浓度的细胞分布可增强旁分泌效应,促进胰腺微环境的重建,并延长细胞在体内的存活时间。

在为期 8 周的 BMSCs 移植治疗后,静脉与腹直肌鞘两种途径均能显著降低血糖水平,且腹直肌鞘组效果更优。OGTT 结果显示,治疗组犬糖代谢能力增强,血糖水平趋于正常。已有研究表明,BMSCs 可通过旁分泌机制分泌多种细胞因子,如血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素-1(ANG-1)、肝细胞生长因子(HGF)和转化生长因子- β (TGF- β)等,

促进组织修复与血管生成,并通过上述机制减轻胰腺损伤和系统性炎症反应^[16]。此外,BMSCs 还可能通过外泌体携带的 miRNA(如 miR-21)保护 β 细胞免受凋亡,从而改善血糖调控能力^[17]。生化指标与组织学分析进一步证实,BMSCs 移植显著改善了肝脏与胰腺功能,AST、ALT 水平下降提示肝损伤缓解,AMY 与 LPS 值降低反映胰腺外分泌功能恢复。组织学观察进一步显示,BMSCs 治疗组胰岛结构部分恢复,胰岛细胞数量增加且排列有序,胰岛素阳性细胞数量明显增多。这表明 BMSCs 不仅能改善血糖水平,还能通过促进组织修复与再生,恢复胰腺内分泌功能,其作用机制可能与 BMSCs 分泌的 HGF、VEGF 等生长因子密切相关,这些因子促进血管生成与细胞增殖,加速受损组织的修复过程。此外,血常规结果显示 WBC 与 RBC 恢复至正常范围,提示 BMSCs 具有免疫调节与促进造血的作用。尤其是 WBC 水平的下降,可能反映了 BMSCs 对慢性炎症状态的抑制作用。试验犬体重增加,行为活动、精神状态及食欲评分均有所提升,这些变化可能与 BMSCs 的免疫调节与抗炎作用密切相关。有研究指出,BMSCs 可抑制促炎因子如肿瘤坏死因子 α 、白介素 6 等的释放,同时促进抗炎因子如白介素 10、TGF- β 等的分泌,从而减轻糖尿病引发的全身性炎症反应,改善机体代谢状态^[18]。在治疗过程中,未接受 BMSCs 移植的阳性对照组部分犬出现皮肤溃疡,而局部涂抹 BMSCs 培养液可加速创面愈合,表明其在糖尿病并发症治疗中具潜在价值。BMSCs 还可能通过调节局部免疫微环境,抑制炎症反应,为组织修复创造有利条件^[19]。这一发现提示其对糖尿病慢性并发症的治疗具有潜在应用价值。

综上,本研究证实 BMSCs 移植可通过调控血糖、修复胰岛结构、改善肝胰功能及调节免疫等机制,有效治疗犬 I 型糖尿病。腹直肌鞘注射因避免肺截留、局部浓度高、操作简便,展现出更优的代谢改善效果与临床转化潜力。未来结合基因编辑、生物材料或免疫调控策略,有望进一步提升 BMSCs 在 I 型糖尿病个体化治疗中的疗效。

参考文献:

- [1] Wu X, Jiang J, Gu Z, et al. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11 (1): 345.
- [2] Meng F B, Liu X Y, Li H T, et al. Regulation of blood glucose by administration of allogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells into diabetic rats through modulating regeneration of both α and β islet cells [J]. J Diab Res Clin Met, 2013, 2 (1): 7.

- [3] Shields E J, Lam C J, Cox A R, et al. Extreme beta-cell deficiency in pancreata of dogs with canine diabetes [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (6): e0129809.
- [4] Rhew S Y, Park S M, Li Q, et al. Efficacy and safety of allogenic canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cell therapy for insulin-dependent diabetes mellitus in four dogs: a pilot study [J]. *J Vet Med Sci*, 2021, 83 (4): 592-600.
- [5] Vrabelova D, Adin C A, Kenzig A, et al. Evaluation of a high-yield technique for pancreatic islet isolation from deceased canine donors [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2014, 47: 119-126.
- [6] Oliveira F C M, Voorbij A W Y, Pereira E C, et al. Treatment of canine type 1 diabetes mellitus: the long road from twice daily insulin injection towards long-lasting cell-based therapy [J]. *Organoids*, 2024, 3 (2): 67-82.
- [7] PÖPPL Á G. Estudos clínicos sobre os fatores de risco e a resistência à insulina na diabetes mellitus em cães [D]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.
- [8] Azeez S, Jafar S, Aziziaran Z, et al. Insulin-producing cells from bone marrow stem cells versus injectable insulin for the treatment of rats with type I diabetes [J]. *Cell Mol Biomed Rep*, 2021, 1 (1): 42-51.
- [9] 孙昱. 脂肪间充质干细胞移植治疗 1 型糖尿病的实验研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [10] Le Bras A. Cell therapy for type 1 diabetes in a nonhuman primate [J]. *Lab Anim*, 2024, 53 (4): 90.
- [11] 汪娅媛, 郭娟, 田仰清, 等. 异槲皮苷促进犬骨髓间充质干细胞 (cBMSCs) 的成骨分化及机理 [J]. *中国兽医学报*, 2021, 41 (11): 2190-2195.
- [12] 郭娟, 张迪, 李龙, 等. 细胞自噬对犬骨髓间充质干细胞干性的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51 (2): 365-373.
- [13] 田仰清, 郭娟, 汪娅媛, 等. JNK 信号通路对犬骨髓间充质干细胞多能性基因表达的影响 [J]. *动物医学进展*, 2022, 43 (7): 39-44.
- [14] Lee R H, Seo M J, Reger R L, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (46): 17438-17443.
- [15] Kengkla P. Therapeutic efficacy of subconjunctival injection of canine adipose-derived mesenchymal stem cells on canine spontaneous chronic corneal epithelial defect [D]. Bangkok, Thailand: Chulalongkorn University, 2022.
- [16] Qian D, Gong J, He Z, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repair necrotic pancreatic tissue and promote angiogenesis by secreting cellular growth factors involved in the SDF-1 α /CXCR4 axis in rats [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 306836.
- [17] Wang J, Wang J, Wang Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived miR-21-5p protects grafted islets against apoptosis by targeting PDCD4 [J]. *Stem Cells*, 2023, 41 (2): 169-183.
- [18] El-Sawah S G, Nabil A, Rashwan H, et al. Bm-mscs immunomodulatory, anti-inflammatory, anti-apoptotic and antioxidant capacity roles in modulating the altered tissues oxidative stress status in stz-diabetic rats: in comparison to the standard insulin treatment [J]. *IJAR*, 2020, 8 (8): 591-617.
- [19] Chen L, Tredget E E, Wu P Y, et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing [J]. *PLoS One*, 2008, 3 (4): e1886.