

·实验研究 Experiment research·

糖尿病犬经肝动脉肝内移植微囊化猪胰岛细胞的安全性和有效性

叶 斌, 王 维, 刘 晟

【摘要】 目的 评估移植于 I 型糖尿病犬肝脏中的微囊化新生猪胰岛细胞(NPI)的生物相容性、免疫学特性及生理学特性。方法 I 型糖尿病犬分为 A、B 两组, 每组 15 只, A 组每只犬分别经肝动脉灌注微囊化新生猪胰岛细胞 40 ~ 60 万个, B 组每只犬分别经肝动脉灌注未微囊化新生猪胰岛细胞 40 ~ 60 万个, 两组动物移植后均不使用免疫抑制治疗。移植前后分别测量移植受体的肝脏功能及淋巴细胞 CD4⁺/CD8⁺ 比值。移植 6 个月后所有移植受体的肝脏均进行病理学检查。结果 移植后 A 组外源性胰岛素用量从移植前的 22 u 逐渐降至 5 u, B 组所需外源性胰岛素从移植前的 24 u 下降至 10 u。移植后 2 ~ 3 周 B 组胰岛素用量恢复到移植前的水平, 而 A 组的部分动物的胰岛素剂量继续减至 8 u。B 组受体移植后血的 CD4⁺ 较移植前升高, 而 A 组的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞移植后无明显变化。移植后所有受体的肝功能及组织结构未见异常。结论 微囊化的新生猪胰岛细胞在受体犬的肝脏中有很好的生物相容性。微囊可以延长移植物的存活, 且异种移植微囊化的新生猪胰岛细胞能够纠正糖尿病犬的高血糖状态。

【关键词】 微囊化; 胰岛; 异种移植; 肝动脉

中图分类号: R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-794X(2006)-10-0607-04

The safety and availability of xenotransplanted encapsulated newborn porcine islets into the diabetic dog's liver via hepatic artery YE Bin, WANG Wei, LIU Sheng. The Third Xiangya Hospital of Central-South University, Changsha 410013, China

【Abstracts】 **Objective** To evaluate the biocompatibility, immunology and physiologic features of encapsulated Newborn Porcine Islets (NPI) in the liver of the recipient dogs with type I diabetes. **Methods** Type I diabetic dogs were perfused with 400 000 - 600 000 encapsulated NPI (group A, $n = 15$) or unencapsulated NPI (group B, $n = 15$) through the hepatic artery without immunosuppressive treatment. Liver function and CD4/CD8 in the recipients were measured before and after the transplantation. The livers from all NPI recipient dogs were analyzed by histopathology 6 months after transplantation (Tx). **Results** Insulin dose administrated to group A was reduced gradually within one week after Tx, from 22 u before Tx to 5 u after Tx, exogenous insulin required for group B was decreased from 24 u to 10 u. However, 2 to 3 weeks after Tx, the insulin dose given to group B returned to the original level before Tx. In contrast, the amount of insulin administrated to group A was continually reduced to 8 u. Moreover, CD4⁺ cells in the blood of group B recipients were higher than that before Tx, whereas no significant alteration of CD4⁺ cells and CD8⁺ cells in the blood of group A after Tx. All NPI recipient dogs demonstrated a normal function and structure of the liver after Tx. **Conclusion** Microencapsulated NPI has a good biocompatibility in recipients livers providing prolongation of xenograft survival, and correcting the hyperglycemia of diabetic canines. (J Intervent Radiol, 2006, 15: 607-610)

【Key words】 Microencapsulation; Hepatic; Xenotransplantation; Islets

异种胰岛细胞移植是有效治疗 I 型糖尿病的

方法之一, 其面临的一个重大问题是免疫排斥反应未能完全解决。具有生物相容性的生物膜免疫隔离技术是当今较为先进的抗免疫排斥方法之一, 它为解决这个问题提供了可能。本实验利用介入导管技术将微囊化新生猪胰岛细胞(NPI)经肝动脉移植于

基金项目: 国家自然科学基金(39770233)

作者单位: 410013 湖南长沙 中南大学湘雅三医院放射科

通讯作者: 王 维

胰岛移植的重要位点肝脏(犬)内。比较了微囊化 NPI 与未微囊化 NPI 移植于 I 型糖尿病犬体内后的差异,探讨经肝动脉移植微囊化新生猪胰岛细胞生理功能以及不良反应,阐明海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠(alginate-polylysine-alginate, APA)构成的生物膜免疫隔离安全有效。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性成年犬,新生猪(5 日龄内),均为合格动物。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病动物模型制作 于健康成年雄性犬静脉注入四氧嘧啶及链脲霉素,24 h 后血糖达到 11.1 ~ 20.1 mmol/L;维持在 11.1 mmol/L 以上 2 周即认为已形成 I 型糖尿病模型。将糖尿病犬 30 只随机分为 A、B 两组,每组 15 只。

1.2.2 猪胰岛细胞的分离、纯化和培养 新生猪用氯胺酮麻醉后,无菌状态下剖腹取胰。去除可见的胰外组织,将胰腺剪成约 0.5 ~ 1.0 mm³ 的组织块,用 0.5 mg/ml 的 V 型胶原酶(collagenase V, Sigma 公司)消化后终止。加入含 20% 小牛血清、青霉素 100 u/ml,链霉素 100 u/ml,1% 谷氨酰胺增补 RPMI 1640 液于 37℃,5%CO₂ 和 95% 空气培养箱内培养。第 2 天换培养液 1 次,以后每隔 24 h 换 1 次培养液,第 4 天收集细胞。

1.2.3 微囊化猪胰岛细胞的制备 在无菌条件下,收集培养及纯化后的胰岛细胞(纯度为 80%),与 1.5%(w/v)海藻酸钠溶液(Sigma 公司)混匀。经自制微囊发生器形成含有胰岛细胞的凝胶小滴,收集小滴,用生理盐水、0.1% 2-N-环正己胺乙烷磺酸(2-N-cyclohexylaminoethane sulfonic acid, CHES Sigma 公司)冲洗,悬浮于 0.05% 的多聚-L-赖氨酸(MW17000 - 20000, Sigma 公司)中。用 0.1% CHES 液和生理盐水冲洗后,悬浮于 0.15% 的海藻酸钠溶液中,再在 0.05 mol/L 柠檬酸溶液中(pH7.4)反应,最后用生理盐水冲洗,培养基培养 24 h 后移植。微囊化胰岛移植前形态学表现采用光学显微镜观察及电子显微镜观察。

1.2.4 体外微囊化胰岛功能实验 用 Hanks 液分别配制含 2.7 mmol/L 葡萄糖的低糖培养液,16.5 mmol/L 葡萄糖的高糖培养液及无糖培养液。提取分离、纯化后培养 3 d 的胰岛细胞均分成二等份,其中一份微囊化后均分为三等份。另一份直接均分为

三等份,将它们分别加入等量上述 3 种(两组)培养基中,于培养箱中孵育 24 h 后分别收集培养液测定胰岛素含量,胰岛素测量采用放射免疫法。本研究重复进行了 5 次胰岛素释放实验,以了解微囊对胰岛素通透性的稳定程度。

1.2.5 猪胰岛细胞的移植 A 组每只犬采用血管介入技术经肝动脉肝内移植微囊化猪胰岛细胞 40 万 ~ 60 万个, B 组每只犬同样方法移植同等数量的未微囊化猪胰岛细胞。移植前 24 h 测量犬模型空腹血糖,移植后每日测尿糖,每周测量空腹血糖和体重;测量血清 C 肽浓度变化。移植前后检测动物丙氨酸转氨酶(ALT)及门脉压力。移植后实验动物不使用任何免疫抑制剂。

1.2.6 移植前后动物 CD4⁺/CD8⁺比值 CD4⁺淋巴细胞及 CD8⁺淋巴细胞采用免疫组化染色计数(试剂由 Serotec 公司生产,澳大利亚悉尼大学国家胰岛移植研究所赠送)。

1.2.7 动物的一般表现 观察动物进食、活动情况、精神状态以及体重的变化。

1.2.8 病理检查 实验动物移植后喂养 6 个月,分别取肝脏和胰腺标本行病理切片检查,取样方法为多点取材(每个器官取 10 个点)。标本切片 HE 染色。

1.3 统计学处理

本研究统计数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表达,统计学方法使用配对设计的两样本均数比较的 *t* 检验。

2 结果

2.1 微囊化胰岛细胞形态学表现

倒置显微镜下微囊成球形,微囊直径 0.3 ~ 0.5 mm,外形完整,大小均匀,表面光滑,其内可见包有胰岛细胞。电镜观察见胰岛被 APA 膜包裹,胰岛内见大量圆形分泌颗粒(图 1A、B)。

2.2 微囊化胰岛细胞胰岛素释放试验

体外用葡萄糖刺激胰岛素释放,测定胰岛素量,结果见表 1。

胰岛素释放试验显示葡萄糖可刺激胰岛细胞释放胰岛素,在微囊化胰岛细胞组与非微囊化胰岛组之间差异无显著性(无糖 $P = 0.066$, 低糖 $P = 0.124$, 高糖 $P = 0.115$),但两组间胰岛素释放量,高糖与低糖、无糖比较差异有显著性($P < 0.01$)。

2.3 移植后 1 周

A、B 两组糖尿病犬的外源性胰岛素均开始降低;但移植后 2 ~ 3 周 B 组的胰岛素用量逐渐恢复到移植前水平,而 A 组胰岛素用量则继续减少。(图 2)

2.4 移植前后血清 C 肽浓度变化 移植前模型动物血清内不能测到猪 C 肽,移植后(5 d、30 d、90 d、120 d、150 d 和 180 d)B 组动物血清猪 C 肽迅速升高,然后快速下降,移植后 14 ~ 21 d 就已不能测到血清猪 C 肽;相反在 A 组移植后 180 d 仍能测到。(图 3)

2.5 动物一般情况变化 成模后,出现明显多饮、多尿、多食及体重下降等糖尿病症状,体重较制模前平均下降 20%。移植后,所有动物糖尿病症状逐渐减轻,直至基本消失,体重恢复到术前水平。

2.6 移植前后 ALT 移植前后 ALT 分别为 (28 ±

7.07)U 和 (27.5 ± 11.2)U,均于正常范围内。

2.7 CD4/CD8 比值 移植后 B 组糖尿病犬血中的 CD4 细胞较移植前明显升高,而 A 组移植前后 CD4/CD8 比值无明显变化。(见表 2)

2.8 病理改变 移植 6 个月后取实验动物肝脏病理检查发现,肝脏表面光滑,呈鲜红色,未见淤斑及梗死后缺血样变;肝细胞大小形态正常,无缺血坏死,未见肝纤维化(图 4A)。胰腺病理检查见其小叶清晰,其胰岛萎缩,未见再生胰岛细胞,外分泌腺结构未见异常(图 4B)。

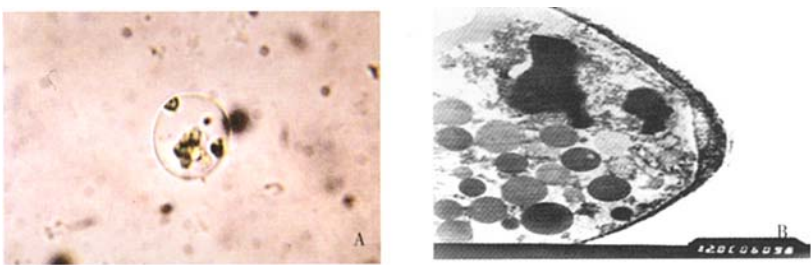


图 1 微囊化胰岛细胞形态学改变 A:光镜下的体外微囊成球形,表面光滑,内包胰岛(×100);B:微囊化胰岛电镜下胰岛外包有 APA 膜,胰岛内见大量分泌颗粒(×5000)

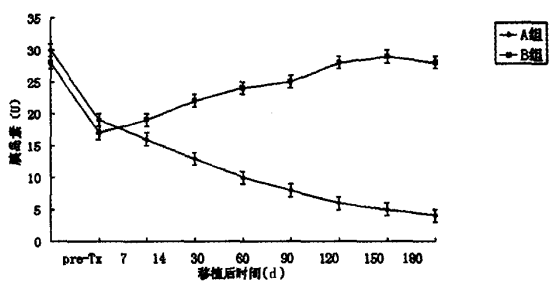


图 2 移植前后 A、B 两组外源性胰岛素用量的变化

表 1 胰岛素释放试验各组结果比较(mU·L⁻¹)

次数	微囊化胰岛细胞			单纯胰岛细胞		
	无糖	低糖	低糖	无糖	低糖	低糖
1	96.7	187.8	274.7	100.1	208.0	281.5
2	78.4	138.6	230.7	80.1	139.0	240.5
3	89.3	157.4	250.1	93.2	160.3	248.3
4	85.4	159.4	236.1	88.5	162.5	247.6
5	79.1	142.7	232.4	82.3	150.4	241.2
均数(±)	85.78	157.18	244.8	88.84	164.04	251.82
标准差(s)	7.597	19.348	18.374	8.141	26.277	16.971

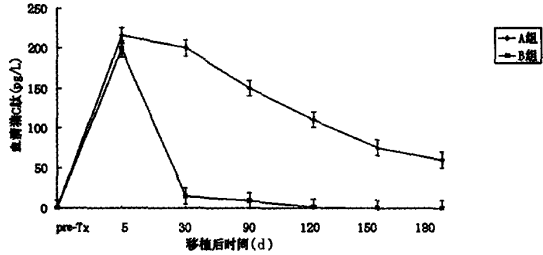


图 3 移植前后 A、B 两组血清猪 C 肽的变化

表 2 糖尿病犬移植前后 CD4/CD8 的比较

CD4/CD8	A 组	B 组
移植前	1.14 ± 0.04	1.15 ± 0.03
移植后	1.16 ± 0.02	1.23 ± 0.05

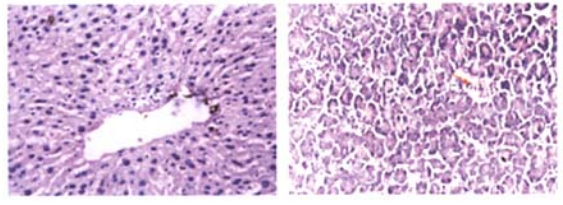


图 4 糖尿病犬移植微囊化猪胰岛细胞 6 个月后 A:犬肝小叶结构清晰,未见变性及坏死(HE × 100);B:胰腺可见胰岛萎缩,稀少,胰腺外分泌组织正常(HE × 400)

3 讨论

目前的研究认为异种胰岛细胞移植治疗糖尿病是一种有效的治疗方法^[1],但免疫排斥反应使得植入的细胞存活及发挥功效的时间不能令人满意^[2]。微囊化技术利用生物半透膜隔绝了抗体及免疫细胞对移植物的攻击,是控制免疫排斥反应的有效方法之一。目前微囊所用 APA 具有较好的生物相容性,可减少邻近细胞过度生长^[3],这样形成的半透膜包裹在移植用胰岛细胞周围,使其能够在受体内有效发挥生物功效同时,抵御受体的免疫排斥,而 APA 半透膜并不影响氧、葡萄糖、胰岛素等低分子物质的通过,从而延长移植物的寿命。微囊化胰岛移植大动物腹腔腔内的实验已取得了较满意的结果。肝脏具有相对免疫隔离区的解剖生理特点,是胰岛移植的最好位点。

本研究对经肝动脉肝内植入的微囊化新生猪胰岛细胞进行了体外功能检测,并在移植后对移植受体进行了较长时间的观察,结果表明,经微囊发生器喷出的以 APA 为膜成分的较小直径(0.3 ~ 0.5 mm)的微囊化胰岛细胞其分泌胰岛素的功能与单纯胰岛细胞之间无显著差别,两者在体外培养基中均能很好存活,并对外界糖浓度变化具有同等良好反应,提示微囊化胰岛细胞功能良好。研究结果与周茂华等^[4]的结论相同。

影响异种胰岛细胞在人体内存活的免疫排斥反应主要是 T 淋巴细胞介导的细胞免疫^[5],其中,CD4⁺细胞的增高是细胞免疫激活的重要指标。本组研究结论显示移植后 A 组糖尿病犬的 CD4⁺/CD8⁺淋巴细胞比值为 1.16 ± 0.02 ,移植前后比较无明显变化,而 B 组糖尿病犬的 CD4⁺/CD8⁺升高,表明 APA 半透膜可以有效制止 T 细胞免疫介导的免疫排斥反应^[6]。将培养后的微囊化胰岛移植于糖尿病犬肝内(A 组),在受体肝内不使用免疫抑制剂的情况下,能较长时间发挥其作用,降低糖尿病模型动物的血糖,血糖维持正常 > 180 d,减少胰岛素用量,减轻糖尿病症状,本研究中接受移植的动物移植 6 个月时,在维持血糖正常的前提下,有 2 只完全停

用胰岛素,其余均有显著降低,动物尿糖转阴,尿量恢复正常,体重增加,而 B 组则相反。动物模型移植前血清测不到猪 C 肽,移植后血清猪 C 肽水平升高,A 组动物于移植后 180 d 仍能测到血清猪 C 肽,而 B 组的血清猪 C 肽移植后升高然后很快下降至测不到,两者比较说明微囊对其内异种胰岛细胞有良好的保护作用。移植后动物胰腺病检未见胰腺胰岛再生,说明 C 肽水平及血糖水平的变化是植入微囊化胰岛的作用。受体肝脏病理学检查未见异常改变,肝细胞无坏死,汇管区结构正常,无纤维细胞过度增生,移植前后 ALT 无异常变化。说明微囊化胰岛具有良好的组织相容性,未发生明显肝细胞损害和显著免疫排斥反应。

综上所述,经肝动脉肝内植入微囊化胰岛细胞,不使用免疫抑制剂的情况下,不发生 T 淋巴细胞介导的细胞免疫排斥反应,胰岛素用量逐渐减少,实验犬的高血糖逐步纠正。APA 构成的生物膜免疫隔离安全有效。经肝动脉肝内植入微囊化胰岛细胞治疗糖尿病动物亦安全、有效。

【参考文献】

- [1] Garfinkel MR, Harland RC, Opara EC. Optimization of the microencapsulated transplantation[J]. J Surg Res, 1998, 76: 7-10.
- [2] Garfinkel MR, Harland RC, Opara EC. Optimization of the microencapsulated transplantation[J]. J Surg Res, 1998, 76: 7-10.
- [3] Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, et al. Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets[J]. Transplantation, 1992, 54: 769-774.
- [4] Zhou MH, Chen DM, Yao Q, et al. Microencapsulation of rat islets prolongs xenograft survival in diabetic mice[J]. Chin Med J, 1998, 111: 394-397.
- [5] 邵启祥,刘恭植. 移植排斥反应的监测[M]//. 见: 陈实主编, 移植免疫学. 武汉: 湖北科技出版社, 1998: 200.
- [6] Yi S, Feng X, Hawthorne W, et al. CD8⁺ T cells are capable of rejecting pancreatic islet xenografts[J]. Transplantation, 2000, 70: 896-906.

(收稿日期: 2005-08-08)