

两种微囊化大鼠胰岛异种移植于糖尿病小鼠的疗效比较

徐琦, 窦科峰, 宋振顺, 张福琴

[摘要] 目的 将大鼠胰岛分别用两种不同的免疫隔离材料微囊化移植到糖尿病小鼠肾包膜下, 对它们的疗效进行比较。方法 尾静脉注射 3 % 链脲佐菌素建立小鼠糖尿病模型。成模小鼠随机分为 4 组: 海藻酸钡微囊化胰岛移植组、琼脂糖-聚苯乙烯磺酸微囊化胰岛移植组、未微囊化胰岛移植组和空白对照组, 每只小鼠肾包膜下植入 300 个相应大鼠胰岛。结果 4 组糖尿病小鼠移植前血糖水平无显著差异, 移植后 1 周分别为: 海藻酸钡微囊化胰岛移植组 (7.26 ± 1.56) mmol/L、琼脂糖-聚苯乙烯磺酸微囊化胰岛移植组 (7.14 ± 1.04) mmol/L、未微囊化胰岛移植组 (7.42 ± 1.52) mmol/L、空白对照组 (22.54 ± 1.24) mmol/L, 前 2 组与后 2 组相比有显著性差异, 生存期也明显长于后 2 组; 海藻酸钡微囊化移植组维持正常血糖时间及生存期 (分别为 76 d 和 92 d) 明显长于琼脂糖微囊化移植组 (分别为 41 d 和 56 d)。结论 用海藻酸钡和琼脂糖-聚苯乙烯磺酸制备的微囊化大鼠胰岛均可存活于糖尿病小鼠体内并发挥生物功能, 海藻酸钡微囊优于琼脂糖-聚苯乙烯磺酸。

[关键词] 糖尿病; 微囊化; 海藻酸钡; 琼脂糖-聚苯乙烯磺酸; 异种移植; 胰岛; 大鼠; 小鼠

Comparison of the Efficacy for Diabetic Mice Xenotransplanted with Two Types of Microencapsulated Rat Islets XU Qi, DOU Ke-feng, SONG Zhen-shun, et al. Department of Surgery of Liver and Gallbladder, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China

[Abstract] Objective To observe and compare the efficacy of two types of microencapsulated rat islets xenotransplanted into diabetic mice. Methods The mice diabetic model made with injecting 3 % Streptozotocin through tail vein. Four groups were assigned: control group, naked islet transplantation group, alginate-BaCl₂ microencapsulated islet transplantation group, agarose-PSSa microencapsulated islet transplantation group. 300 islets were transplanted under the renal envelope of each diabetic mice respectively. Results There were no significant difference in mean level of the blood glucose before transplantation among four groups. One week after transplantation, the respective mean level of the blood glucose in four groups were (7.26 ± 1.56) mmol/L in alginate-BaCl₂ microencapsulated islet transplantation group, (7.14 ± 1.04) mmol/L in agarose-PSSa microencapsulated islet transplantation group, (7.42 ± 1.52) mmol/L in naked islet transplantation group and (22.54 ± 1.24) mmol/L in control. There were significant difference between the two encapsulated islet groups and the other two groups. The survived period of the two encapsulated islet transplantation groups were longer than that of the other two groups. The survived period of the alginate-BaCl₂ microencapsulated islet transplantation group was longer than that of the agarose-PSSa microencapsulated islet transplantation group (92 d vs 56 d), the same as the time of keeping normal blood glucose level (76 d vs 41 d). Conclusion Microencapsulated rat islets with this two materials can survive in diabetic mice with their biological activity, and the alginate-BaCl₂ microcapsules are better than the agarose-PSSa microcapsules.

[Key words] diabetes mellitus; microencapsulation; alginate-BaCl₂; agarose-PSSa; xenotransplantation; islet; rat; mouse

中图分类号: R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)05-0383-02

[本文著录格式] 徐琦, 窦科峰, 宋振顺, 等. 两种微囊化大鼠胰岛异种移植于糖尿病小鼠的疗效比较[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(5): 383-384.

糖尿病是一种最常见的内分泌代谢疾病。许多研究已证明, 胰岛移植可有效逆转糖尿病慢性高血糖状态, 并能防止或延缓糖尿病并发症的发生。免疫排斥是胰岛移植的最大障碍, 而近年来发展的微囊化免疫隔离技术较好的解决了移植免疫排斥反应和移植物来源稀少两大难题。制作微囊的材料很多, 其中最常用的是海藻酸钠微囊和琼脂糖微囊。本试验采用改良的海藻酸钠-氯化钡微囊和琼脂糖-聚苯乙烯磺酸微囊将大鼠胰岛异种移植于糖尿病小鼠, 对这两种材料的免疫隔离效果进行比较。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性 Balb/c 小鼠, 体重 20 ~ 25 g, 雄性 SD 大鼠, 体重 200 ~ 250 g: 本校实验动物中心。链脲佐菌素 (STZ)、V 型胶原酶: Sigma 公司。Ficoll 400: Pharmacia 公司。海藻酸钠、琼脂糖粉、聚苯乙烯磺酸

(PSSa)、双硫腙染料 (DTZ): 化学纯。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病小鼠模型的建立 随机选取 Balb/c 小鼠, 术前晚禁食。次日晨, 尾静脉采血测空腹血糖并称重。用 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH = 4.4) 将链脲佐菌素配制成 3 % 溶液, 220 mg/kg 经尾静脉一次性给药。给药后 48 h 用微量血糖仪测空腹血糖, 以后每天测 1 次空腹血糖, 连续两次血糖 > 16.8 mmol/L 者表示成模。成模小鼠皮下注射长效胰岛素 40 U/kg · d, 维持血糖在正常范围内。

1.2.2 大鼠胰岛的分离和纯化 将 SD 大鼠麻醉后开腹, 游离胆总管, 绕过胆总管穿一丝线, 将一带有软管的头皮针穿入胆总管后结扎丝线。经注射器注入少量 Hanks 液排空肝外胆道内胆汁, 然后夹闭胆总管汇入十二指肠的部位。再经注射器注入含 V 型胶原酶 1 g/L 的 Hanks 液 5 ~ 6 ml, 使胰腺充分膨胀, 切取胰腺。4 ℃ 环境消化 30 min, 37 ℃ 恒温振荡水浴消化 25 min, 至光镜下有较多完整的胰岛呈游离状态时, 4 ℃ Hanks 液终止消化。消化产物用 100 目铜网过滤后, 4

作者单位: 第四军医大学西京医院肝胆外科, 陕西西安市 710032。

作者简介: 徐琦 (1976-), 男, 甘肃兰州市人, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 肝脏肿瘤与移植。通讯作者: 宋振顺。

℃ Hanks 液洗涤 2 次。将胰腺消化沉淀物与事先配好的 25 % Ficoll 5 ml 混合,然后按非连续性密度梯度依次缓慢加入 23 %、20 %、11 % 的 Ficoll 各 5 ml,最后加 Hanks 液 5 ml,4 ℃ 下 1280 r/min 离心 12 min,吸出各浓度界面的细胞团,经 Hanks 液洗涤 2 次,过 0.45 μm 滤网,除掉单细胞和不完整的胰岛组织,即得到纯化的胰岛。将纯化胰岛经双硫腙(DTZ)染色后镜下观察并计数,最后将胰岛置 24 孔培养板,加入含 10 % 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,37 ℃,5 % CO₂ 培养箱中培养备用。

1.2.3 大鼠胰岛微囊化 ①将 1800 个培养 48 h 的大鼠胰岛加入 1.5 % 海藻酸钠溶液 1.5 ml 中,配成 2 ml 胰岛悬液。将此悬液用气体吹喷法喷入 30 mmol/L BaCl₂ 溶液 50 ml 中,制成海藻酸钡微囊,微囊用生理盐水洗涤 3 次,离心吸出上清液。②另将 1800 个培养 48 h 的大鼠胰岛加入 5 % 的琼脂糖溶液 1.5 ml 中,配成 2 ml 胰岛悬液。将此悬液用气体吹喷法喷入 50 ml 无菌矿物油中形成的微胶珠,生理盐水洗涤 3 次后置入 5 % 聚苯乙烯磺酸溶液中制成琼脂糖-聚苯乙烯磺酸微囊。将微囊分别浸入聚凝胶溶液和羧甲基纤维素溶液以防止聚苯乙烯磺酸渗漏并增强微囊的生物相容性。最后将微囊用生理盐水洗涤 3 次,离心吸出上清液。

将上述制成的微囊化胰岛置入 24 孔培养板,加含 10 % 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液 1 ml,在 37 ℃、5 % CO₂ 的空气培养箱中培养过夜。

1.2.4 微囊化胰岛肾包膜下移植 将糖尿病小鼠随机分为 4 组:海藻酸钡微囊化胰岛移植组、琼脂糖-聚苯乙烯磺酸微囊化胰岛移植组、未微囊化胰岛移植组和空白对照组,每组 6 只。移植前测小鼠空腹血糖,各鼠麻醉消毒后取左腹纵行切口,能显露左肾。每只小鼠按组别于左肾包膜下穿刺植入海藻酸钡微囊化胰岛、琼脂糖-聚苯乙烯磺酸微囊化胰岛、未微囊化胰岛 300 个,空白对照组以等量生理盐水代替。移植后缝合切口。

1.3 观测指标 尾静脉采血测各鼠空腹血糖,观察维持正常血糖时间及生存时间。

1.4 统计学方法 各组数值以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 SPSS 11.0 进行 *t* 检验。

2 结果

空白对照组小鼠造模后 72 h 空腹血糖为(22.60 ± 1.53) mmol/L,移植术后 1 周时为(22.54 ± 1.24) mmol/L,此后测血糖均远高于 16.8 mmol/L,无自然缓解现象。小鼠于 2 周内全部死亡,平均存活时间(9.27 ± 3.45) d。

未微囊化胰岛移植组小鼠造模后 72 h 空腹血糖为(22.71 ± 1.72) mmol/L,移植术后 1 周时为(7.42 ± 1.52) mmol/L,维持正常血糖的时间为 1 周左右,

此后血糖逐渐升高,小鼠于 1 月内全部死亡,平均存活时间(20.64 ± 7.42) d。

海藻酸钡微囊化胰岛移植组小鼠造模后 72 h 空腹血糖为(22.50 ± 1.33) mmol/L,移植术后 1 周时为(7.26 ± 1.56) mmol/L,2 周时为(7.08 ± 2.56) mmol/L,3 周时为(7.36 ± 1.47) mmol/L。维持正常血糖的时间(76.3 ± 12.45) d,平均存活时间(92.53 ± 11.47) d。

琼脂糖-聚苯乙烯磺酸微囊化胰岛移植组小鼠造模后 72 h 空腹血糖为(19.32 ± 1.42) mmol/L,移植术后 1 周时为(7.14 ± 1.04) mmol/L,2 周时为(7.07 ± 1.67) mmol/L,3 周时为(7.44 ± 1.28) mmol/L。维持正常血糖的时间(40.75 ± 10.22) d,平均存活时间(56.83 ± 12.03) d。

4 组糖尿病小鼠胰岛移植前血糖水平无明显差异($P > 0.05$),移植后前 2 周所测血糖海藻酸钡微囊化移植组及琼脂糖-聚苯乙烯磺酸微囊化胰岛移植组与其他 2 组相比有非常高度显著性差异($P < 0.001$),且生存期明显延长($P < 0.01$)。而 2 组微囊化胰岛移植组相比,海藻酸钡组较琼脂糖-聚苯乙烯磺酸组维持正常血糖时间及生存时间延长($P < 0.05$)。

3 讨论

制作胰岛移植微囊的材料最常用的是海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠(APA)微囊,但研究发现,海藻酸钠与多聚赖氨酸的化学结合易碎,易导致囊周纤维化,囊内胰岛因营养障碍而坏死^[1],目前已很少单纯使用。其改良方法,如 Valerie 等在 APA 中加入氯化钡减弱了囊外纤维化^[2];左石等采用一步固化法制成海藻酸钡微囊,具有较好的牢固度及生物相容性^[3]。选用较多的其他材料是琼脂糖。1989 年, Iwata 等开始以 5 % 琼脂糖作为微囊材料包裹胰岛进行移植,实验证明,用琼脂糖制作的微囊可以有效地防止糖尿病动物模型的自体免疫反应^[4]。Kin 等用琼脂糖和聚硫酸混合材料制备的微囊化猪胰岛移植到狗身上取得了成功,未发生免疫排斥^[5]。这两种材料哪个更为理想目前还不能确定。

本实验结果显示,两种微囊化组在移植后早期降血糖水平接近,但海藻酸钡组维持正常血糖的时间及生存期均明显长于琼脂糖-聚苯乙烯磺酸组。

[参考文献]

- [1] Soon S, Feldman E, Nelson R, et al. Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets [J]. Transplantation, 1992, 54: 769 - 772.
- [2] Valerie F, Kali D, Omer A, et al. Complete protection of islets against allorejection and autoimmunity by a simple barium alginate membrane [J]. Weir Diabetes, 2001, 50(8): 1698 - 1705.
- [3] 左石, 孙诚谊, 胡韵, 等. 海藻酸钠-氯化钡微囊对大鼠胰岛体外胰岛素分泌功能的影响 [J]. 肝胆外科杂志, 2003, 11(4): 306 - 308.
- [4] Iwata H, Takagi T, Amemiya, et al. Agarose for a bioartificial pancreas [J]. Biomed Mater Res, 1992, 26: 967 - 969.
- [5] Kin T. Xenotransplantation of pig islets in diabetic dogs with use of a microcapsule composed of agarose and polystyrene sulfonic acid mixed [J]. Pancreas, 2002, 25(1): 94 - 100.

(收稿日期: 2006-03-25)