论著

文章编号:1000-5404(2010)06-0520-05

大鼠海马神经干细胞的扩增及与三维微小凹图式复合的研究

吕艳玲[1],吴泽志[1],张利光[1],宋兆全[1],于 婷[1],文 灿[2],阴金波[3],陈景龙[4] (400044 重庆,重庆大学生物工程学院,生物流变科学与技术教育部重点实验室[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部外科应用解剖与手术学教研室[2];400037 重庆,第三军医大学新桥医院神经外科,全军癫痫病诊治中心[3]; Division of Molecular Biosciences, The John Curtin School of Medical Research, The Australian National University, Canberra, ACT 2601, Australia[4])

[摘要] **目的** 比较2种培养基下海马神经干细胞(neural stem cells,NSCs)的生长特性,进而实现海马NSCs扩增的优化及其与聚乳酸(poly-L-lactide, PLLA)三维微小凹图式的复合。**方法** 分离大鼠胚胎海马细胞并采用Neurobasal为基础的培养基和DMEM/F12为基础的培养基进行扩增。以四甲基氮唑蓝(MTT)比色法及神经球数目统计法评价2种培养基下细胞增殖行为。采用紫外光光刻、硅蚀刻及软光刻技术制备PLLA三维微小凹图式并实现海马NSCs与微小凹图式的复合。**结果** 原代分离的海马细胞呈神经干细胞标志物阳性并能向神经元系和胶质细胞系分化。在30 d的扩增时间内,海马NSCs在以Neurobasal为基础的培养基中缓慢扩增聚集成神经球,少见细胞贴壁及分化;在以DMEM/F12为基础的培养基中海马NSCs扩增迅速,但易贴壁和分化。培养第25天时后者神经球数量为前者的4.7倍。微加工制备的微小凹图式结构清晰、稳定,具有高纵横结构比(≥1)。扩增的海马NSCs能在三维微小凹图式上成功复合生长。**结论** 以DMEM/F12为基础的培养基有利于大鼠海马NSCs的扩增,以Neurobasal为基础的培养基利于海马NSCs的纯化。序贯应用2种培养基可有效扩增海马NSCs并实现其与三维微小凹图式的复合。

[关键词] 海马神经干细胞;神经球;原代培养;扩增;聚乳酸;微加工

[中图法分类号] R318;R322.81;R329-33 **[文献标志码]** A

Population expansion of rat hippocampal neural stem cells and their integration with three-dimensional microwell patterns

Lu Yanling[1], Wu Zezhi[1], Zhang Liguang[1], Song Zhaoquan[1], Yu Ting[1], Wen Can[2], Yin Jinbo[3], Chen Jinglong[4] ([1]Key Laboratory of Biorheological Science and Technology of Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400044, China; [2]Department of Surgical Applied Anatomy and Operative Surgery, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China; [3]Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China; [4]Division of Molecular Biosciences, The John Curtin School of Medical Research, The Australian National University, Canberra, ACT 2601, Australia)

[Abstract] **Objective** To compare the growth behaviors of rat hippocampal neural stem cells (NSCs) cultured in 2 medium conditions to optimize the proliferation condition, and to achieve integration of hippocampal NSCs with our fabricated three-dimensional (3-D) poly-L-lactide (PLLA) microwell patterns. **Methods** Rat hippocampal cells, obtained with mechanical separation, were expanded in either Neurobasal- or DMEM/F12-based culture medium. Proliferation behaviors of the isolated hippocampal cells were evaluated with neural sphere counting and the methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay. PLLA microwell patterns were fabricated with UV lithography, silicon etching and soft lithography and then integrated with the expanded NSCs. **Results** Immunocytochemistry and immunofluorescence showed that the isolated hippocampal cells were positive for neural stem cell marker nestin and were capable of differentiating to the neuronal and glial lineages. In a period of 30 days' expanding, hippocampal NSCs proliferated slowly forming neural spheres in Neurobasal-based culture medium, with few cells attached to substrates and differentiated morphologically. In contrast, cells in DMEM/F12-based medium proliferated rapidly, with significant cell attachment and morphological differentiation. On

[基金项目] 国家自然科学基金(30870570);教育部留学回国人员科研启动基金(2009);教育部"春晖计划"科研启动基金(Z2008-1-63003);教育部国家外专局生物力学与组织修复学科创新引智基地(111计划)资助项目(B0623);重庆大学"211工程"三期创新人才培养计划建设项目(S-09104)

[通信作者] 吴泽志,电话:(023)65102507,E-mail:zzwu@cqu.edu.cn

the day 25 of expanding, neural sphere number in DMEM/F12-based medium was 4.7 times as much as that in Neurobasal-based medium. The microwell patterns were well defined, of high aspect ratio (≥1) and stable under culture conditions. Population expanded hippocampal NSCs were successfully integrated with the 3-D PLLA microwell patterns. **Conclusion** DMEM/F12-based medium is favorable to population expansion of rat hippocampal cells while Neurobasal-based medium is conducive to purification of hippocampal NSCs. Sequential use of DMEM/F12- and Neurobasal-based medium can thus result in expansion of hippocampal NSCs and successful integration of the NSCs with 3-D PLLA microwell patterns.

[Key words] hippocampal neural stem cells; neural spheres; primary culture; population expansion; poly-L-Lactide; microfabrication

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870570), the Starting Funds of Scientific Research for Personnel Returning From Overseas of Ministry of Education (2009); the Starting Funds of Scientific Research for "Chunhui Projects" of Ministry of Education (Z2008-1-63003), the National 111 Program (B0623) and the Innovative Talent Training Project of the 3rd Stage of "211 Project" of Chongqing University (S-09104). Corresponding author: Wu Zezhi, Tel: 86-23-65102507, E-mail:zzwu@cqu.edu.cn

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是来源于中枢神经系统的多潜能干细胞,在神经发育及损伤的修复中发挥重要作用,也是神经退引性疾病替代治疗的重要移植细胞[1]。但其相关研究的关键在于干细胞的取得及有效扩增方法的建立。神经干细胞的扩增包括普通培养条件下的扩增以及在特定条件下于三维支架材料上的扩增。文献[2]报道神经干细胞在三维支架材料上的扩增、形态及离子通道功能表达均不同于普通二维培养条件下的行为特征,且更接近于体内条件下的功能特点。因此,构建细胞三维微环境并进而研究神经干细胞与材料三维构型相互作用的特点,是神经组织工程及基于神经干细胞的细胞微系统构建的重要环节与研究内容。

海马是富含干细胞的部位之一,是分离神经干细胞的主要脑组织。原代 NSCs 的分离、纯化方法中的反复传代法具有简单易行,在纯化干细胞的同时细胞群体可以得到大规模扩增的优点。NSCs 的扩增多采用无血清培养基进行,而 DMEM/F12 为基础的培养基和 Neurobasl 为基础的培养基是干细胞培养的 2 种最重要的培养基[3,4]。以这 2 种培养基为基础的 NSCs 大规模扩增方法也基本成熟。本研究以机械分离法从孕 16 d 大鼠胚胎获得海马 NSCs,通过比较 2 种培养基下海马 NSCs 生长扩增特性,寻求其的优化扩增条件。并以此为基础,采用紫外光光刻、硅蚀刻及软光刻技术制备聚乳酸[poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLLA)]三维微小凹图式并实现海马 NSCs 与微小凹图式的复合,旨在为后续有关研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

孕 16 d SPF 清洁级 SD 大鼠,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。DMEM/F12 (Invitrogen, USA. REF: C11330500BT), Neurobasal™ Medium (Invitrogen, USA. Cat No: 21103-049), B27 (Invitrogen, USA. Cat No: 17504-044), bFGF(Invitrogen, USA. Cat No:400-29),EGF(Invitrogen, USA. Cat No: 400-25), 一抗:大鼠抗小鼠 Nestin 单克隆抗体(1∶100,Santa Cruz,sc-33677),兔抗鼠 GFAP 多克隆抗体(1∶500, Abcam, ab7779),兔抗鼠 NF200 多克隆抗体(1∶500, Abcam, ab8135), 二抗:羊抗兔 TRITC(1∶100,Bioworld TeCH, BS10250),羊抗小鼠 FITC(1∶100,Keygen, KGAA25-1), MTT 试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司,胰蛋白酶购自德国 HyClone 公司。免疫组化试剂盒由中国晶美生物工程有限公司提供。DMEM/F12 为基础的培养基(以下简称 D 培养基)由 DMEM/F12 基础培养液添加 2% B27、2 ng/ml bFGF 和 2 ng/ml EGF 组成。Neurobasal 为基础的培养基(以下简称 N 培养基)由 Neurobasal 基础培养液添加 2% B27 和 2 ng/ml bFGF 组成。

1.2 方法

1.2.1 海马 NSCs 的原代分离 取孕 16 d 的 SD 大鼠,脱颈处死,取大鼠胚胎体。剥离胚胎大鼠大脑皮层,取出海马组织,缓冲液中清洗后置 D-Hanks 液中剪成 0.2 mm×0.2 mm 大小的碎片,然后用吸管吹打约 20 次,单层纱布过滤,用 N 培养基将悬浮单细胞调整为 5×10^5/ml 的密度接种入 50 ml 培养瓶,4 h 后,将其分成 3 组,1 组继续用 N 培养基,另 1 组换用 D 培养基置于 37 ℃、5% CO_2 的孵箱中培养,第 3 组序贯应用 2 组培养基。

1.2.2 海马 NSCs 的培养 单纯应用 2 种培养基:原代分离的第 3 天,弃去培养瓶底贴壁的细胞及一些组织碎片,将上层悬浮细胞转移至新培养瓶中半量换液。以后 5 周,悬浮细胞逐渐聚集成球且神经球逐渐长大。待一半以上的神经球直径超过约 300 μm 时,吹打成直径小于约 150 μm 的小神经球进行传代。序贯应用 2 种培养基:原代分离细胞后用 DMEM/F12 为基础的培养基培养 25 d,再换用 N 培养基培养 10 d。

1.2.3 海马 NSCs 的鉴定 原代分离的第 8 天,将得到的神经球接种在预先涂有多聚赖氨酸的玻片上,24 h 后行免疫组化(IHC)及免疫荧光(IF)鉴定。Nestin 免疫组化步骤参考免疫组化 ABC 试剂盒。Nestin IF 染色依照常规染色步骤进行。

原代分离的第 12 天,添加 10% 的胎牛血清诱导细胞分化。贴壁 7 d 后,依照 IF 常规染色法对分化的细胞行 GFAP 和 NF200 鉴定。

1.2.4 海马 NSCs 的活力情况及其鉴定 海马 NSCs 活力的测定:原代分离培养第 14 天,用 MTT 比色法分别测定 2 种培养

基下细胞增殖能力。细胞以 1×10^4/孔浓度接种于96孔板，每组7复孔，置37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养24 h，Model-680多孔酶标仪测定各孔光密度值，测定波长550 nm，参考波长570 nm[5]。以光密度值作为细胞活度评价的定量指标。

海马NSCs增殖速度的测定 原代分离的第9、13、17、21、25天，将每个培养瓶(25.0 cm^2)平分为16小格，统计2种培养基下所获得直径≥约150 μm神经球的总数目。

1.2.5 PLLA三维微小凹图式的加工及其与海马NSCs的复合

PLLA三维微小凹图式的制备过程包括光掩模的设计及加工、紫外光光刻、硅蚀刻、以聚二甲基硅氧烷(PDMS)为基础的软光刻以及微浮雕加工等过程[6]。制备得到PLLA三维微结构图式后经紫外光照射30 min，以磷酸缓冲液(PBS)和N培养基各清洗2次，每次5 min。然后将其置放入35 mm^2的平面培养皿(FALCON，USA)。

序贯应用2种培养基扩增的海马NSCs以约 10^6/ml 的细胞密度接种于每一含三维微结构图式的培养皿。接种2 d后加入10%的胎牛血清诱导分化。以Olympus CKX41倒置显微镜和Canon PC1200数码相机拍摄相差显微照片监测细胞的生长行为。

1.3 统计学处理

MTT法测得的光密度值以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用两样本均数的 t 检验进行统计学分析。2种培养基条件下的神经球计数行双因素方差分析的 F 检验。

2 结果

2.1 细胞及神经球的形态

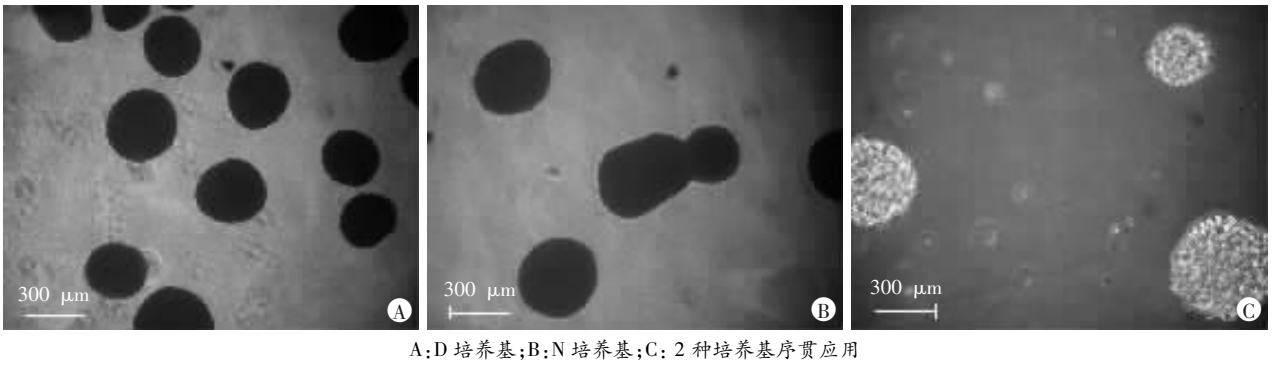
原代分离得到的单个悬浮细胞边界折光率强，细胞活力好。培养3 d后海马细胞开始聚集，形成大小不一的神经球。继续培养10 d后，N培养基中绝大部分细胞聚集成的神经球悬浮于培养液中，几乎没有贴壁细胞，但总的神经球数目少；D培养基中细胞扩增速度快，神经球的数量多，培养第25天时统计神经球数量为用N培养基的4.7倍(图1A、B)，但其中的神经球易贴壁。序贯应用2种培养基获得的细胞或神经球的数量多，且呈悬浮状态，无贴壁现象(图1C)。

2.2 海马细胞干细胞特性的鉴定

在培养基中扩增8 d的神经球呈Nestin IHC染色阳性(图2A)。IF染色同样显示了神经球表达干细胞标志物Nestin(图2B)。诱导分化7 d后，IF染色结果显示，贴壁细胞呈胶质细胞系标志物GFAP(图2C)和神经元系标志物NF200(图2D)阳性，且贴壁的神经细胞呈放射状向外周迁移铺展，并形成神经突起(图2D)。与图2所示结果类似，单纯的N培养基或序贯应用2种培养基时扩增的海马神经球及细胞亦为Nestin阳性，诱导分化后呈GFAP和NF200阳性。

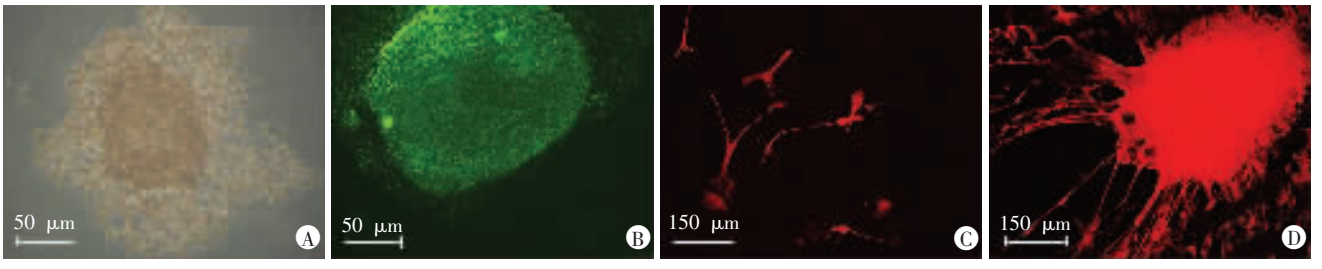
2.3 海马NSCs的增殖能力

培养扩增的海马NSCs经神经球计数及MTT法评价2种培养基下细胞的增殖能力。原代分离细胞扩增的第9、13、17、21、25天，N培养基中神经球数量分别为126、186、248、322和406个；D培养基中分别为182、362、718、1 208和1 890个。细胞扩增的第9天，2种培养基中神经球的数量相差不大。但随着扩增时间的延长，神经球于D培养基中扩增速度明显快于N培养基中的扩增速度，细胞扩增至第25天，前者神经球数目是后者的4.7倍。在D培养基中神经球数平均倍增时间为4.7 d，在N培养基中神经球数平均倍增时间为9.2 d。双因素方差分析第9、13、17、21、25天时的神经球数目发现有显著差异($F=20.481\ 6$，$P<0.05$)。原代分离细胞的第14天，MTT法测定



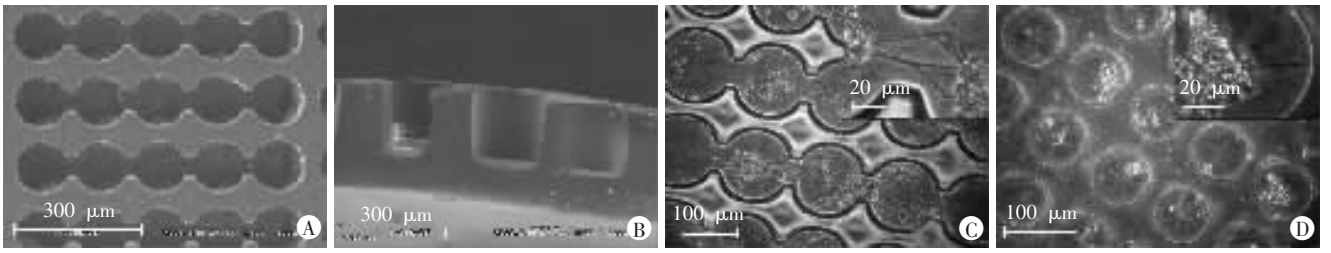
A：D培养基；B：N培养基；C：2种培养基序贯应用

图1 不同培养基中原代分离得到的海马细胞及扩增的海马神经球 (倒置相差显微镜)



A：扩增8 d悬浮神经球Nestin IHC染色(ABC，倒置相差显微镜)；B：扩增8 d悬浮神经球的Nestin的IF染色(间接法，倒置荧光显微镜)；C：诱导分化7 d后贴壁细胞的GFAP(红色)IF染色(间接法，激光共聚焦显微镜)；D：诱导分化7 d后贴壁细胞的NF200(红色)IF染色(间接法，激光共聚焦显微镜)

图2 在DMEM/F12为基础的培养基中扩增的海马细胞干细胞特性的鉴定



A:PLGA 微小凹图式正面(扫描电子显微镜);B:PLGA 微小凹图式侧面(扫描电子显微镜);C: 海马 NSCs 在类似 A 所示的 PLLA 图式复合 7 d(分化 5 d)后的生长情况(倒置相差显微镜);D:海马 NSCs 在类似 B 所示的 PLLA 图式复合 7 d(分化 5 d)后的生长情况(倒置相差显微镜)

图 3 微浮雕法加工的微小凹图式的扫描电子显微镜观察及海马 NSCs 在 PLLA 三维微小凹图式上的生长情况

细胞的相对增殖能力显示 N 培养基中扩增的细胞 MTT 光密度值(0.680 ±0.078),与 D 培养基中扩增的细胞 MTT 光密度值(0.907 ±0.053)相比具有显著性差异($P < 0.05$)。这一结果与神经球计数的结果一致,提示在以 D 培养基中细胞扩增速度更快。

2.4 三维微小凹图式的制备及大鼠海马 NSCs 与微小凹图式的复合

依据文献[6]可以制备结构规整清晰、性能稳定、三维高纵横结构比(≥1)的微小凹图式(图 3A、B)。图 3A 示 PLGA 微小凹图式的正面扫描电子显微图,小凹名义直径 120 μm,小凹间通道名义宽度 40 μm、名义长度 20 μm。图 3B 示一种无通道的 PLGA 微小凹图式的侧面扫描电子显微图,小凹名义直径 80 μm,高度约 80 μm。采用 1.2.5 中描述的方法同样可以制备类似图 3A、B 所示的 PLLA 三维微小凹图式(图 3C、D)。

细胞培养实验显示所制备的微小凹图式可在培养条件下维持稳定的结构达 2 周以上。图 3C 示海马 NSCs 于分化后第 5 天(接种后第 7 天)在有通道的 120 μm 微小凹图式的生长情况。可见神经细胞几乎全部分布于微小凹中,神经突起沿通道方向延伸(图 3C 插图);图 3D 示海马 NSCs 于分化后第 5 天(接种后第 7 天)在无通道的 80 μm 微小凹图式的生长情况。可见神经细胞分布于微小凹内并同时部分分布于微小凹外,微小凹内神经突起短而稀少(图 3D 插图)。

3 讨论

干细胞的扩增及与三维材料的复合是干细胞移植治疗、组织工程及有关细胞微系统的重要研究内容。经典的材料加工法(如液相分离法、盐类浸出法)已经能够制备若干三维材料构型以满足组织工程的需要。然而,其加工方法往往难于精确控制材料在微观尺度上的结构特征(如几何尺寸、强度等)进而导致细胞在材料上分布、组织形式与功能分化的随机性,细胞的生长和分化难于通过材料的结构得到有效的控制。同时,对于细胞微系统的构建而言,所制备的材料构型显然难于简单地小规模化(scaling down)用于构建三维细胞生物传感器平台[2]。随着微纳米科学与细胞培养技术的结合,bio-MEMS 的兴起,将微加工技术用于生物可降解材料进而有效控制材料在微观尺度的结构尺寸和特性,可望实现干细胞的有序生长与分化,对于干细胞生物学的研究和细胞微系统的构建具有重要的理论与应用意义。

神经干细胞的研究及应用首先取决于有效的神经干细胞分离方法。本研究中海马组织经机械剪碎、吹打成单个海马细胞后,采用了单层纱布过滤的方法。这一技术改进很大程度地降低了机械性细胞损伤,细胞分离效果优于 200 目金属网过滤的方法。原代分离的细胞经 IHC 和 IF 鉴定呈 NSCs 特异性标记物 Nestin 阳性。在 D 培养基中神经球经连续传 15 代后仍具有形成克隆的能力,显示了干细胞特异的自我更新能力。加血清诱导分化后细胞呈神经元分化标志物 NF200 阳性,星形胶质细胞分化标志物 GFAP 阳性,提示所分离的海马细胞具有向神经原系列和胶质细胞系列的分化潜能。上述结果证实了本研究分离海马 NSCs 方法的有效性。

根据文献[7-9]报道,原代分离的海马细胞经无血清培养基培养 7 d 后,悬浮细胞或神经球均呈干细胞特性。D 培养基虽然可以实现海马 NSCs 的大量扩增,但扩增出的神经球容易贴壁,进而导致神经球无序的分化趋势,因而不能很好维持所分离海马细胞的干细胞特性(图 1)。N 培养基虽可以使干细胞在短时间(10 d)内得到纯化,但细胞群体扩增缓慢,难于满足干细胞大规模扩增的要求。为此,我们建议序贯应 2 种培养基的方法实现海马 NSCs 有效的大规模扩增,所获得的海马 NSCs 性质稳定,呈悬浮状态,无贴壁现象(图 1C)。相比于传统的干细胞克隆方法[9],本方法可以获得类似的干细胞扩增效果,但操作更加简单易行。

本研究表明扩增的海马 NSCs 可以有效地与三维微小凹图式复合。初步的分化实验显示,在有通道的微小凹图式中,海马 NSCs 分化后胞体分布于微小凹中而微通道则有效引导神经突起的延伸;在无通道的微小凹图式中海马 NSCs 表现出不同的细胞分化行

为。这与采用阴性光刻胶 SU-8 及神经母细胞瘤细胞的研究结果[6,10]一致。采用微小凹图式进行神经细胞复合、扩增及分化的意义是,该材料构型可能影响神经细胞的黏附、铺展、几何形态及细胞相互作用,并进而影响到细胞的生长、分化和膜离子通道功能的表达[10],在有关神经组织工程及以神经干细胞为基础的三维细胞生物传感器构建中具有重要的应用前景。

干细胞特性的维持及分化的控制一直是神经干细胞研究的焦点。迄今这一领域的相关研究显然集中在以生化因子为代表微环境因素在这一过程中的调控作用[7,11]。本研究从培养基条件及材料构型角度进行的研究提示,不仅培养基条件影响海马 NSCs 的扩增与分化行为,材料构型也是影响细胞扩增与分化的不可忽略的因素。

志谢 衷心感谢实验期间本学院的刘万钱老师、戴小珍同学给予的指点及本实验室成员朱满根、林雨、罗美蓉同学等的大力协助!

参考文献:

[1] 郑学胜, 朱晓峰. 神经干细胞的特性与应用[M]//朱晓峰. 神经干细胞基础及应用. 北京: 科学出版社, 2005: 107 - 109.
[2] Cheng K, Lai Y, Kisaalita W S. Three-dimensional polymer scaffolds for high throughput cell-based assay systems[J]. Biomaterials, 2008, 29(18): 2802 - 2812.
[3] Paynter S J. Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells[J]. Brain Res Bull, 2008, 75(1): 1 - 14.
[4] O'Shaughnessy T J, Liu J L, Ma W. Passaged neural stem cell - derived neuronal networks for a portable biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 28(4): 2365 - 2370.
[5] 储卫华, 詹梦熊, 朱刚, 等. EDS 对新生 SD 大鼠海马神经干细胞增殖分化的作用J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(19): 1787 - 1790.
[6] 吴泽志, Kisaalita W S, Zhao Y P, 等. 三维微小凹图式的加工及其与人神经母细胞瘤细胞的复合[J]. 传感技术学报, 2009, 22(3): 297 - 302.
[7] Snyder E Y, Daley G Q, Goodell M. Taking stock and planning for the next decade: realistic prospects for stem cell therapies for the nervous system[J]. J Neurosci Res, 2004, 76(2): 157 - 168.
[8] Kong X, Li X, Cai Z, *et al*. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells[J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(4): 569 - 579.
[9] 王英, 董明敏, 杜英. 新生豚鼠神经干细胞的分离培养及鉴定和标记[J]. 中国临床康复, 2006, 10(29): 157 - 159.
[10] Wang L, Wu Z Z, Xu B, *et al*. SU-8 microstructure for quasi-three-dimensional cell-based biosensing[J]. Sens Actuators B Chem, 2009, 140(2): 349 - 355.
[11] Deierborg T, Soulet D, Roybon L, *et al*. Emerging restorative treatments for Parkinson's disease[J]. Progress in Neurobiology, 2008, 85(4): 407 - 432.

(**收稿**:2009-09-27;**修回**:2009-12-05)
(编辑 王小寒)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2010)06-0524-01

自体骨髓干细胞胰腺定向移植治疗糖尿病 1 例

隆 敏,郑宏庭,童 强,严 俊,段 炼,杨阎峙,徐梓辉 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院内分泌科)

[关键词] 糖尿病;骨髓;干细胞;移植
[中图法分类号] R587.105 **[文献标志码]** B

1 临床资料

患者,女性,39 岁。因反复口干、多饮、多尿、多食 10 余年,于 2009 年 5 月 26 日入我科。患者于 1996 年妊娠 5 个月时出现口干、多饮、多尿、多食,尿糖(++++)、空腹血糖 23 mmol/L,诊断为"妊娠糖尿病",经胰岛素治疗后空腹血糖控制在 7 ~ 8 mmol/L,产后患者口服"二甲双胍、格列本脲"治疗,但未监测血糖,1998 年因口干、多饮、多尿、多食加重,查空腹血糖 23 mmol/L,经相关检查后确诊为 1 型糖尿病,长期使用胰岛素泵控制血糖,基础量为 26 U,三餐前各追加 5 U,空腹血糖控制在 7 ~ 8 mmol/L。患者入院后予以胰岛素泵控制血糖,查肝肾功、凝血 4 项、性激素全套、甲功、肝炎 10 项、胸片、腹部超声等均未见明显异常。骨髓涂片:骨髓增生活跃,提示增生性骨髓象。腹部血管三维重建示:胰背动脉发育较短小。糖化血红蛋白 A1c(GHbA1c)7.5%、胰岛素自身抗体弱阳性、胰岛细胞抗体弱阳性、谷氨酸脱羧酶抗体阴性。馒头餐试验空腹、餐后 30 min、餐后 1、2 h 及 3 h,静脉血浆血糖分别为 7.2、8.24、12.62、18.26、19.25 mmol/L;血清胰岛素分别为 2.8、1.1、2.8、4.8、7.2 μU/ml;血清 C-肽分别为 0.51、0.43、0.69、1.11、1.61 ng/ml。

患者诊断 1 型糖尿病,为自体骨髓干细胞胰腺定向移植术的适应证,无手术禁忌证,经多个相关科室讨论后于 2009 年 6 月 7 日行移植术。移植前 3 d 预先皮下注射集落刺激因子动员骨髓。手术当日采取患者 400 ml 骨髓,并立即在层流实验室行骨髓单个核细胞分离,患者同时入介入手术室,寻找到供应胰腺的胰背动脉后,将骨髓干细胞缓慢均匀注射入胰背动脉。术后患者恢复良好,血糖稳定,未出现任何并发症。术后随访发现在空腹血糖 <6 mmol/L、餐后血糖 <8 mmol/L 的情况下,术后 1 月胰岛素泵基础量减少至 16 U,三餐前各 3 U,日胰岛素总量减少了 39.02%,术后 3 个月基础量减少至 11 U,三餐前各

[通信作者] 郑宏庭, E-mail: fnf7703@sina.com

(下转 532 页)