维普资讯 http://www.cqvip.com

微囊化胰岛细胞移植治疗糖尿病的实验研究

方立峰 （郑州市第一人民医院消化科，河南 郑州 450004）

［摘 要］ **目的** 观察微囊化大鼠胰岛细胞移植治疗糖尿病小鼠的疗效。**方法** 将糖尿病小鼠随机分为三组：生理盐水注入组、未囊化胰岛细胞移植组和微囊化胰岛细胞移植组。将生理盐水、纯化大鼠胰岛细胞和囊化大鼠胰岛细胞分别移植于三组糖尿病小鼠腹腔。**结果** 分离的胰岛细胞对刺激反应良好，微囊化和未囊化胰岛细胞移植后均可纠正糖尿病小鼠的高血糖状态，但微囊化胰岛细胞移植组可维持正常血糖水平更长时间。**结论** 微囊化胰岛细胞移植治疗糖尿病小鼠具有良好的效果，微囊具有较好的免疫隔离作用。

［关键词］微囊；胰岛细胞移植；糖尿病
［中图分类号］R332；R587.1 ［文献标识码］A ［文章编号］1672-5042(2008)04-0235-02

Experimental treatment of diabetes with microencapsulated rat islet cells transplantation

FANG Li-feng (Department of Gastroenterology, the 1st People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou Henan 450004, China)

Abstract: Objective To observe the effect of treating diabetic mice with microcapsulated rat islet cell transplantation. **Methods** Diabetic mice were randomly divided into 3 groups: control group, no-microencapsulated islet cells transplantation group and microencapsulated islet cells transplantation group. Normal saline, pared rat islet cells and microcapsulated islet cells were respectively transplantated into abdominal cavity of three groups of diabetic mice. **Results** The isolated islet cells had a good reaction for glucose stimulation. Both the microcapsulated islet cell transplantation and non-microcapsulated islet cell transplantation could be decreased the high blood glucose level, and the former one kept longer. **Conclusion** It is believed that microcapsulated islet cell transplantation exerts good effect on diabetic mice and the microcapsules have good immuno-isolating function.

Keywords: microcapsulation; islet cell transplantation; diabetes

胰岛移植不仅可以纠正糖尿病的高血糖状态，而且可以防止或延迟糖尿病并发症的发生和发展。异种胰岛远比人源胰岛来源丰富，但是严重的免疫排斥反应限制了异种移植。应用生物材料制作的海藻酸钠－多聚赖氨酸－海藻酸钠（APA）微胶囊，其半通透性的囊膜将细胞包裹，只允许小分子的营养物和细胞分泌物自由通过，限制大分子的免疫成分和细胞进入，从而达到延长移植物存活的免疫隔离作用[1-2]。本实验将微囊化、未囊化的大鼠胰岛细胞分别异种移植到糖尿病模型小鼠体，以观察两种移植控制糖尿病小鼠血糖的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

采用SD大鼠（180～220 g）、昆明小鼠（20～25 g），雌雄不拘，由郑州大学实验动物中心提供。多聚赖氨酸、海藻酸钠、Histopaque-1077、胶原酶、链脲霉素均为Sigma公司产品。RPMI1640为Gibco公司产品。胰岛素测定放免试剂盒为天津德普公司生产。京都2型血糖仪。

1.2 动物模型制作

小鼠腹腔注射链脲霉素（160 mg/kg）制作糖尿病小鼠模型，血糖连续2次高于16.5 mmol/L者定为糖尿病鼠。将糖尿病小鼠随机分为如下3组（每组5只）进行观察：①生理盐水注入组；②未囊化胰岛细胞移植组；③微囊化胰岛细胞移植组。

1.3 胰岛分离与纯化

SD大鼠腹腔内注射10%水合氯醛（500 mg/kg）麻醉，经胆总管插管注入胶原酶溶液（1 mg/mL）至胰腺完全充盈，迅速摘取胰腺置37 ℃水浴消化20～25 min，加入4 ℃ MHBSS缓冲液终止消化，震荡数次。180 × g 离心2 min，过300～400目滤网，将400目滤网反冲收集网上物，180 × g 离心2 min，连续2次，吸净上清液。向所得胰腺组织每管加入10 mL Histopaque-1077分离液，震荡使胰腺组织与分离液混匀，再缓慢加入等体积的RPMI1640培养液，4 ℃ 900 × g 离心20 min，收集界面处的胰岛细胞，用MHBSS缓冲液洗涤3次。

1.4 胰岛刺激试验

倒置显微镜下挑选100～300 μm的胰岛细胞置24孔板中，30个/孔。分别加入含2.75 mmol/L，16.5 mmol/L葡萄糖及16.5 mmol/L葡萄糖加0.5 mmol/L茶碱的RPMI1640培养液，37 ℃培养24 h后取上清液，用胰岛素放免试剂盒测定胰岛素分泌量。

［作者简介］方立峰（1962－），男，江苏省沛县人，副主任医师，主要从事消化性疾病方面的研究。电话：13838149916，E-mail：fanglifeng@sina.com

［收稿日期］2008-04-01 ［修回日期］2008-05-15

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS13.0 统计分析软件进行 F 检验法统计学分析。$P<0.05$ 为统计学差异显著。

2 结果

2.1 葡萄糖刺激胰岛素分泌实验

静止葡萄糖刺激试验显示所收获的胰岛细胞对葡萄糖刺激反应良好。在2.75 mmol/L 和 16.5 mmol /L 葡萄糖及 16.5 mmol/L 葡萄糖加0.5 mmol/L 茶碱作用下，平均每孔24个胰岛的胰岛素分泌量见表1，表明所收获的胰岛细胞具有调节性的胰岛素分泌功能。将分离的大鼠胰岛进行 APA 微囊化，所得微囊呈球形，表面光滑，直径在200～400 μm，每个囊内包裹有1～2个胰岛。将微囊胰岛进行胰岛素刺激释放实验，结果表明在上述的低糖、高糖和高糖加茶碱条件下其胰岛素分泌每24个胰岛分泌量见表1。表明微囊化大鼠胰岛仍维持较好的功能，且微囊及未微囊胰岛的胰岛素分泌无差异（见表1）。

表1 微囊及未微囊大鼠胰岛的胰岛素分泌比较（$\bar{x} \pm s$，μIU）

组别	低糖	高糖	高糖加茶碱
未微囊胰岛组	37.1±2.2	77.6±5.9	125.1±7.3
微囊胰岛组	36.3±4.9*	78.6±9.6*	121.6±8.7*

*：与未微囊胰岛组比较，$P>0.05$

2.2 胰岛细胞移植对糖尿病小鼠血糖水平的影响

胰岛细胞移植前糖尿病小鼠血糖浓度为 20.3～26.7 mmol/L。将所收获的胰岛细胞植入腹腔后，未移植组小鼠在观察期内呈持续高血糖状态，生理盐水注入组小鼠高血糖无明显改变，未囊化胰岛细胞移植组可使小鼠血糖降低持续3 d，而微囊化胰岛细胞移植组小鼠血糖降低可持续30 d以上（最长达100 d），见表2。

表2 糖尿病小鼠异体移植大鼠胰岛细胞前后的血糖变化（$\bar{x} \pm s$，mmol/L）

组别	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	30 d
生理盐水组	24.1±2.8	23.7±4.6	23.5±3.3	24.1±3.6	23.8±3.8	22.2±3.8	23.8±3.1	
未囊化移植组	23.8±3.1	10.8±1.8	12.3±1.9	14.5±2.1	18.1±1.9	22.2±3.1	23.8±3.5	
微囊化移植组	20.1±2.5	9.8±1.1	8.6±0.8	9.6±1.1	9.7±0.9	9.5±1.0	10.2±1.5	11.1±1.8

3 讨论

由于胰岛移植可提供接近生理性的胰岛素分泌，对控制糖尿病慢性并发症具有积极意义。异种胰岛与人源胰岛相比具有丰富的来源，但是异种胰岛移植存在严重的免疫排斥反应。1980年，有作者发明了免疫隔离 APA 微胶囊，用其包裹异种胰岛后进行移植，可明显延长异种胰岛的存活和功能维持时间。最近该实验室以 APA 微囊化猪胰岛异种移植治疗自发性糖尿病猴的研究表明，通过1～3次移植，可使7只糖尿病猴在停用胰岛素的情况下，使禁食、血糖水平维持正常达120～804 d[2-4]。

胰岛细胞移植可提供接近生理性的胰岛素分泌，对控制糖尿病慢性并发症具有积极的意义，是治疗糖尿病较理想的方法。我们在引进微囊制作技术的基础上，又改进了 APA 微囊制作技术，可根据胰岛细胞团的大小制出相应体积的微囊以减少机械性死腔，更有利于囊内胰岛细胞存活。通过采用一步法纯化胰岛细胞以缩短纯化时间，可减少梯度纯化对胰岛细胞的损伤[4-6]。本实验表明：未囊化胰岛细胞移植组糖尿病小鼠移植的大鼠胰岛细胞在3 d内可发挥降低血糖作用，3 d后因异体免疫排斥反应而丧失功能，使小鼠血糖上升至移植前水平。而微囊化胰岛细胞移植组小鼠血糖降低可持续30 d以上，最长一只达100 d，明显长于未囊化移植组[7-9]。移植30 d后，从小鼠腹腔回收的微囊大部分表面光滑、完整，证明 APA 微囊化胰岛细胞移植可在异种体内长期存活，APA 微囊具有良好的生物相容性和免疫隔离作用，初步表明了 APA 微囊作为细胞系移植工具的可行性。

[参考文献]

[1] 郭俊召，陈 兵，别 平. 胰岛细胞移植治疗糖尿病现状与进展[J]. 第三军医大学学报，2006，28(6)：610－612.

[2] Tang TH, Li CL, Li X, et al. Immune tolerance in pancreatic islet xenotransplantation[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(10): 1457－1461.

[3] 晏 辉，张胜兰，姜兆顺，等. 人胎胰岛细胞移植对Ⅰ型糖尿病的远期治疗效果[J]. 前卫医药杂志，2000，17(2)：76－78.

[4] 徐 刚，袁敏生，Weir GC. 胰岛细胞移植的现状[J]. 中国糖尿病杂志，2001，9(3)：188－190.

[5] 邱 立，李富荣，杨雪菲. 周汉新乌司他丁在大鼠胰岛分离中的抗凋亡作用[J]. 广东医学，2007，28(1)：28－30.

[6] 袁 超，于立新，杜传福，等. 免疫抑制剂对糖尿病小鼠胰岛细胞移植长期存活效果的研究[J]. 中国现代医药杂志，2006，8(8)：1－4.

[7] 罗 芸，薛毅珑，李雁凌，等. 微囊化大鼠胰岛细胞移植治疗糖尿小鼠的实验研究[J]. 标记免疫分析与临床，2006，13(1)：38－39.

[8] 姚燕丹，章乐虹，胡以则. 猪胰岛细胞移植治疗糖尿病临床应用研究[J]. 广州医学院学报，2000，28(1)：83－86.

[9] 罗 芸，薛毅珑，李崇辉. 应用淋巴细胞分离液纯化大鼠胰岛的实验研究[J]. 军医进修学院学报，2004，25(4)：299－300.

（编辑：郭光金）