基础研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0033-04

移植胰岛血管内皮细胞 GIPR 表达的实验研究

尹昌生,杜成友

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科、重庆市器官移植中心肝脏移植外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究葡萄糖依赖性胰岛素刺激多肽受体(Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor,GIPR)在移植胰岛血管内皮细胞的表达情况。方法:用胰管内灌注、V 型胶原酶消化,Ficoll-400 梯度离心纯化的方法,获取较纯胰岛后通过门静脉途径移植到糖尿病大鼠肝脏,术后每天给于免疫抑制剂他可莫斯(Tacrolimus,FK506)和氯芬酸酯(Mycophenolate mofetil,MMF)灌胃。移植模型分别饲养 7、14、40、60 d 后取材,用免疫组化方法研究 GIPR 在胰岛血管的表达。结果:移植胰岛内部分血管内皮细胞表达 GIPR。结论:GIPR 阳性内皮细胞参与了移植物血管重建;新生的胰岛血管具备肝脏血管某些特征,能够被 GIP 影响。

【关键词】胰岛;移植;血管再生;GIPR

【中国图书分类法分类号】R587 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-12-29

The expression of GIPR in vasculature endothelial cell in transplanted islets

YIN Chang-sheng ,et al

(*Department of Hepatobiliary Surgery & Liver Transplantation, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of GIPR in vasculature endothelial cells in transplanted islets. *Methods*: Pancreas of SD rat were digested by collagenase V after the common bile ductal injection of collagenase V. Islets were purified by Ficoll discontinuous density gradient-centrifugation. Then the high-quality islets were immediately transplanted intraportally into the liver of recipient SD rats with streptozotocin-induced diabetes.The recipient rats were randomly devided into 4 groups based on time points that recipients were killed : group A(7 days)、group B(14 days)、group C (40 days), and group D (60 days). The immunosuppressive tacrolimus (FK506) and mycophenolate mofetil(MMF) were administered to recipients by intragastric administration aftertransplantation.

作者介绍:尹昌生(1980-),男,硕士,
研究方向:器官移植,肝胆外科。

通讯作者:杜成友,男,教授,E-mail:duchengyou@126.com。

基金项目:重庆市教委课题(编号:KJ070306)。

significance of maspin in pancreatic ductal adenocarcinoma: tissue microarray analysis of 223 surgically resected cases[J]. Modern Pathology, 2007,20: 570-578.

[17] Zou Z,Gao C,Nagaich A K,et al. P53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin[J]. J Biol Chem,2000,275: 6051-6054.

[18] Ito R,Nakayama H,Yoshida K,et al. Loss of maspin expression is associated with development and progression of gastric carcinoma with p53 abnormality[J]. Oncol Rep,2004,12:985-990.

[19] Machtens S,Serth J,Bokemeyer C,et al. Expression of the p53 and maspin protein in primary prostate cancer: correlation with clinical features[J]. Int J Cancer,2001,95:337-342.

[20] Boltze C,Schneider-Stock R,Meyer F,et al. Maspin in thyroid cancer: its relationship with p53 and clinical outcome[J]. Oncol Rep,2003, 10:1783-1787.

[21] Umekita Y,Ohi Y,Sagara Y,et al. Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients[J].Int J Cancer,2002,100: 452-455.

[22] Catzavelos C,Bhattacharya N,Ung YC,et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 inhibitor protein: prognostic implications in primary breast cancer[J]. Nat Med,1997,3:227-230.

[23] Esposito V,Baldi A,De Luca A,et al. Prognostic role of the cyclin dependent kinase inhibitor p27 in non-small lung cancer[J]. Cancer Res, 1997,57:3382-3385

[24] Loda M,Cukor B,Tam S W,et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas[J]. Nat Med,1997,3:231-234

[25] Mori M,Mimori K,Shiraidhi T,et al. p27 expression and gastric carcinoma[J]. Nat Med,1997,36:593.

[26] Guo Y,Sklar G N,Borkowsky A,et al. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in human prostate cancer correlates with tumor grade[J]. Clin Cancer Res,1997,3:2269-2274.

[27] Li J Q,Wu F,Masaki T,et al. Correlation of Skp2 with carcinogenesis,invasion,metastasis,and prognosis in colorectal tumors[J]. Int J Oncol,2004,25:87-95.

(责任编辑:冉明会)

Concentrations of blood glucose in recipient were determined with monitor .The groups were respectively killed at different time points, then islet grafts and the expression of GIPR in vasculature endothelial cells were observed morphologically. *Results*: GIPR was found to be expressed in parts of the microvascular endothelial cells, *Conclusion*: GIPR-positive endothelial cells take part in microvascular reconstruction in islet grafts. The neogenetic islet endothelial cells might acquire some common characteristics with those of liver.

【Key words】Islet; Transplantation; Revascularization; GIPR

2000 年 Shaprio 教授等报道的 Edmonton 方案，能够有效抑制胰岛移植的免疫排斥反应，使临床移植胰岛长期存活成为可能[1]。但人们发现在胰岛移植后，移植物的功能和数量都会有所下降，长期移植效果不太理想。Ryan 等[2]发现 80%的移植病人移植后 5 年有 C 肽分泌，但仅有 10%左右移植胰岛病人不依赖外源性胰岛素。有研究表明：即使在完成了血管再生之后，移植物胰岛的血管密度也是明显低于正常胰岛，氧分压只有正常胰岛的 15%~20%。血管生成不足、密度低、血液供应不足是导致移植胰岛大量死亡和功能下降的主要原因之一[3]。已有的研究表明供体胰岛血管内皮细胞和移植部位的血管内皮细胞均参与了移植胰岛新微血管网的重建，移植部位的血管内皮细胞上表达的某些分子可能参加调控移植胰岛新微血管网的功能。葡萄糖依赖性胰岛素刺激多肽受体(Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor, GIPR)是在肝脏血管表达的一种表面标记物，本实验首次研究 GIPR 在肝脏中胰岛移植物血管内皮细胞的表达情况。

1 材料和方法

1.1 动物和材料

供体、受体均为成年 SD(Sprague Dawley)大鼠(重庆医科大学实验动物中心)，雄性，体重 200~250 g，普通级；V 型胶原酶(Sigma)、Ficoll-400(Sigma)、小牛血清(杭州四季青)、FK506(Fujisawa Ireland Ltd)、氯酚酸酯(Roche)、链脲佐菌素(Sigma)、GIPR 抗体(Abcam)，SABC 免疫组化试剂盒(武汉晶美)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠糖尿病模型的建立 SD 大鼠禁食 12 h(不禁水)，链脲佐菌素(STZ)新鲜溶于 0.1 mol/L(pH=4.5)的柠檬酸缓冲液，立即进行腹腔注射，剂量为 60 mg/kg 体重。术后血糖仪测定大鼠尾静脉静脉血糖浓度，连续 3 d 超过 11.1 mmol/L 者为成功糖尿病模型。

1.2.2 胰岛的分离纯化 胰岛分离按 Burghen 等[4]报道的方法加以修改。SD 大鼠 2%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔内注射麻醉，剖腹，结扎邻近十二指肠的远端，插针的近端套线，于肝门处胆总管剪一小口，向远端插入 $6\frac{1}{2}$ 钝头注射针，结扎固定针头，然后打开胸腔，破心放血处死。将预温的含有 0.5 g/L 胶原酶、7.5 mmol/L Ca^{2+} 和体积分数为 2.5%甘油的 Hanks 液 6 ml(pH7.8)，从插针逆行注入胰管内，使胰膨胀，破坏腺泡组织，迅速完整摘除胰腺，置于上述 Hanks 液 8 ml 中，38℃水浴轻摇 10 min。取出后用眼科小镊子将胰轻轻撕碎，去除脂肪、血管和淋巴结，稍静置，吸取上层悬液于离心管中，加 10%小牛血清和 Hanks 液终止消化，沉淀的大块组织移入消化瓶中，加酶液 5 ml 后置入 38℃水浴中轻轻振摇消化 5 min。取出，立即加入 4℃小牛血清 10 ml 和 Hanks 液 40 ml 终止消化。用不锈钢丝网(60 目)过滤，800 r/min 4℃离心 3 min，弃上清，用 4℃Hanks 液洗涤两次，沉淀，弃上清。在离心管中加入 25% Ficoll-400 溶液，巴氏吸管轻轻吹打混匀，后在其上小心加入 23% Ficoll-400、Hanks 液体。2 200 r/min 离心 10 min。巴氏吸管吸出 23%~25%界面胰岛置于另一含上述 Hanks 液的试管中。用上述方法洗涤两次，弃上清，加入 2 ml Hanks 液混匀备用。

1.2.3 移植 2 只供体大鼠胰岛细胞移植入 1 只受体(>1 200 胰岛单位)。2%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔内注射麻醉。取正中切口剖腹，以 $5\frac{1}{2}$ 针置入门静脉，缓慢输注胰岛细胞悬液 2 ml。输注完毕后拔去针头，用脱脂小棉签轻压针眼处片刻。缝合皮肤各层。术后当日及以后每日给予 FK506：0.1 mg/(kg·d)，MMF：60 mg/(kg·d)，生理盐水稀释后灌胃。术后动物于普通环境中饲养，不限食物和饮水。

1.2.4 移植后观察项目 尾静脉采血，血糖检测仪测早晨非空腹血糖浓度。移植第 2 日起每天测 1 次，连续 3 d，然后 1 次/3 d。非空腹血糖持续<14.0 mmol/L，作为移植物功能存活的标准；非空腹血糖连续 2 d>14.0 mmol/L，作为移植物功能丧失的指标，以出现第一次升高的时间为排斥时间。受体血糖多在第 3~5 d 恢复正常水平。移植后分别在 7、14、40、60 d 处死受体大鼠，取材。

1.2.5 移植胰岛形态学观察 移植后不同时间点，分别处死大鼠，各取 6 只，取其肝脏，用 4%多聚甲醛液固定 24 h，石蜡包埋，5 μm 厚切片。免疫组化简要过程：切片常规脱蜡水化；3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶；蒸馏水漂洗；微波抗原修复；PBS 漂洗；滴加一抗，4℃过夜；PBS 漂洗；滴加生物素二抗；PBS 漂洗；滴加试剂 SABC；DAB 显色；蒸馏水漂洗；苏木素复染；二甲苯透明，中性树胶封片。另以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 统计学分析

所得数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，不同时间点血管平均密度的比较用秩和检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

免疫组化染色阳性表达为棕褐色。胰岛素免疫阳性物质染色显示较大胰岛多位于肝脏内门静脉分支，单个胰岛细胞存留于肝血窦。胰岛移植物内部有部分血管内皮细胞表达 GIPR，呈强阳性，而胰腺内胰岛血管并不表达 GIPR（见图 1,2）。移植后 GIPR 阳性血管密度逐渐增加（图 3），7、14、40 d，各组两两比较有统计学意义，$P<0.05$。

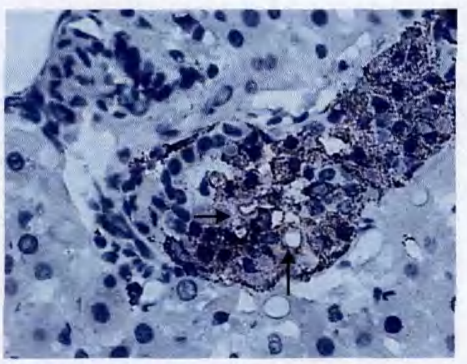


图 1 GIPR 表达于胰岛移植物的血管内皮细胞箭头示（SABC×400）

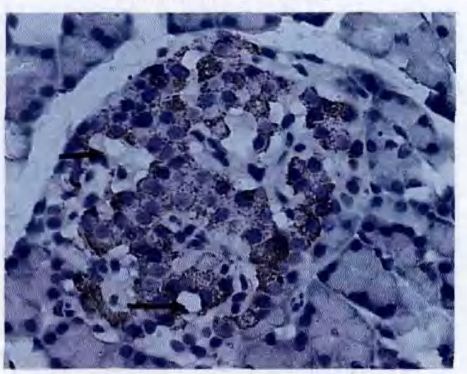


图 2 胰腺内胰岛血管无 GIPR 表达箭头示（SABC×400）

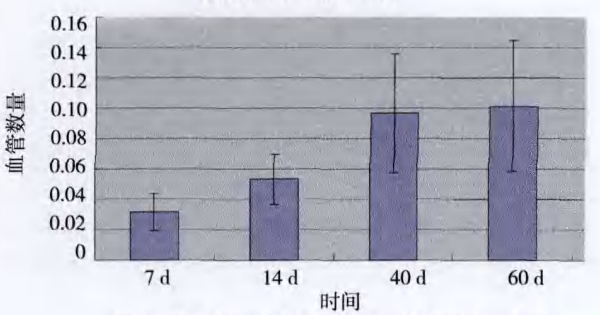


图 3 不同时间点 GIPR 阳性血管密度均值比较

3 讨 论

葡萄糖依赖性促胰岛素多肽（Glucose-dependent insulinotropic polypeptide，GIP）是餐后由小肠 K 细胞分泌的肠降血糖素之一，进食能够刺激它的分泌。GIP 受体是 G 蛋白偶联受体，广泛分布于周围器官，包括胰腺、胃、肠、肾上腺皮质、心、肺、脑、脂肪组织和骨组织。GIP 受体表达于血管内皮细胞。

我们在实验中发现，胰岛中 GIPR 只在内分泌细胞表达，而其它胰腺组织包括血管并不表达，与文献报道一致[5]。但移植到肝脏的胰岛移植物部分血管内皮细胞同样表达 GIPR。由此，可以明确排除GIPR 是胰岛原位内皮细胞表达物的可能性，并因此可以断定 GIPR 阳性血管是胰岛移植后新生血管。GIPR 阳性内皮细胞可能来自于肝脏，亦可能 是胰岛内源性内皮细胞受肝脏微环境影响而发生表型改变，表达 GIPR。

3.1 GIPR 表达与血管形成的关系

由图表 1 可以看出，GIPR 阳性血管在移植后前 40 d 尤其 14~40 d 之间增长最快，各个时间点胰岛 GIPR 阳性血管密度相比有差异性（$P<0.05$），而在 40~60 d 之间，GIPR 阳性血管密度没有明显变化，两组统计学比较没有差异性（$P>0.05$）。

有研究发现[6]，移植到肝脏后 2~4 d 胰岛仅靠渗透维持胰岛的代谢需要，其氧供也明显不足。之后由移植胰岛携带的 Intraislet endothilial cells 和肝动脉血管内皮细胞（Hipatic artery endothilial cells，HAECs）开始增生、移动生成血管新芽，同时血管周细胞、血管平滑肌细胞或者壁细胞包绕血管内皮细胞，表现为胰岛内长出毛细血管芽和窦状小囊的血管结构；第 7 d 时长出的毛细血管芽互相连接、形成有血液灌注的血管网；第 10~14 d 完成再血管化，显示出小球样毛细血管网，有动脉性血供，毛细血管的输入袢以及静脉回流，其血管系统的结构类似于胰腺的原位胰岛。时间的长短取决于移植的是单个胰岛，还是胰岛聚集体，以及移植的部位。一些研究提示胰岛移植至少到几个月后才能形成完整的血管结构。我们的试验发现 GIPR 阳性血管的出现时间和上述报道相似，但在移植后 14 d GIPR 阳性血管仍在继续出现直到 40 d 时，比报道的时间长。我们推测 GIPR 阳性内皮细胞是在胰岛血管再生过程中出现的，由于胰岛分离和移植过程中血管破坏太多，前 40 d 是大量新血管快速形成的时间，大量的 GIPR 阳性内皮细胞是参与血管形成的主要内皮细胞，因此其在这一段时间增长速度最快；40 d 之后的缓慢增长可能是由于胰岛内源性内皮细胞生理性凋亡后被新生内皮细胞替代，由于血管内皮细胞更新周期较长，约为 1 年，因此，当 GIPR 阳性内皮细胞再生与胰岛内源性内皮细胞凋亡速度达到平衡后，就表现为 GIPR 阳性血管的缓慢增长。

3.2 GIPR 对血管和胰岛的影响

GIP 又名肠抑胃肽，其有多种异变体，在不同的血管内皮细胞可能分布不同的异变体，能够产生各异的作用效果。这也是 GIP 对不同血管产生不同作用的原因。GIP 灌注能增加门静脉血流而减少肝动脉血流。最近的研究表明[7]，GIP 刺激能增加肝动脉内皮细胞（HAECs）的细胞内钙离子浓度，刺激 HAECs 分泌内皮素 -1（ET-1），收缩 HAECs，降低肝动脉血流；而 GIP 刺激门静脉内皮细胞（Portal vein endothilial cells，PVECs），分泌一氧化氮使 PVECs 舒张。

由于 GIP 对血管的特殊作用，使得我们有必要研究其对

胰岛新生血管的影响。在不同血管床内皮细胞的 GIP 受体异变体与细胞内不同的信号转导途径相联系。现认为 GIP 主要激活 cAMP 信号途径和 PI-PLC 依赖的 Ca^{2+} 信号通路[8]。有学者[9]提出参与肝脏移植胰岛血管再生的主要是来源于肝脏的动脉微血管内皮细胞，形成的血管是动脉性的。而 GIP 对 HAECs 的作用主要是细胞内钙离子浓度，收缩 HAECs，降低肝动脉血流，同样的，GIPR 可能对胰岛的新生血管有相同的作用。这样，就有可能使机体在进餐后需要血管扩张促进胰岛素大量合成释放时，反而由于机体在食物刺激下分泌 GIP，与胰岛血管 GIPR 结合，导致血管收缩。这种机制的存在，使胰岛血流量下降，一方面造成了氧和营养物质缺乏，另一方面也降低了高血糖对胰岛生长和功能维持的正向刺激，导致胰岛功能和复制能力下降。随着时间延长，必将导致移植胰岛功能下降甚至死亡。

Ding[10]等人证明了 GIP 是一种促分裂原，它能够促进血管内皮细胞增殖。这种作用可能是通过促使分裂原 ET-1 分泌或者是胸腺脱氧嘧啶核苷的合成来实现的。这种增殖还与内皮细胞的种类有关，在不同的内皮细胞之间存在很多差异性。原因之一是由于在不同的内皮细胞上有不同的 GIPR 异变体，从而受血糖、细胞因子等影响的结果不同；另一原因则可能是不同内皮细胞上的 GIPR 被激活所需要的 GIP 的浓度不一样，而使体内部分内皮细胞处在增殖阶段，而另外的则相对静止。如果这种机制在胰岛血管上同样存在，那我们便可以通过 GIPR 来调控胰岛血管的再生。

近年来，人们还发现存在内皮细胞——内分泌细胞轴，两者可以互相影响。有研究[11]发现胰岛前体细胞能够分泌成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor，FGF)，而 FGF 能够通过内皮细胞表面的 FGF 受体上调 GIPR 基因的表达[12]，GIPR 与 GIP 结合可以促进内皮细胞的增殖。由此可以推定，在胰岛和血管内皮细胞之间通过 GIPR 存在一定的联系，胰岛有可能在一定程度上促进内皮细胞 GIPR 的表达。当然，这可能只是众多影响方式中的一种，也许还存在着其它未知的方式。但我们现在还不清楚 GIPR 阳性细胞是否能够通过某种途径反向对胰岛内分泌细胞产生影响，以及这种影响产生的机制。

目前，国内外进行了大量的胰岛移植研究，但最终没有得到临床大规模开展。移植胰岛血管生长能力差、血管密度低是临床胰岛移植失败的原因之一。长期以来，众多研究者致力于移植胰岛血管再生的研究。GIPR 在肝脏中胰岛移植物血管内皮细胞表达的发现，给我们展现了一个崭新的研究方向。随着研究的深入，GIPR 可能成为血管内皮细胞再生及血管调控的重要媒介，从而为成功临床胰岛移植开启一扇大门。

参 考 文 献

[1] Shapiro A M, Ryan E A, Rajotte R, et al. Improved function of islet grafts under steroid-free immunosuppression: will graft work forever[J]? Transplantation, 2002, 73(9): 1528.

[2] Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation[J]. Diabetes, 2005, 54(7): 2060-2069.

[3] Couzin J. Islet transplants face test of time[J]. Science, 2004, 306 (5693): 34-37.

[4] Burghen GA, Murrell LR. Factors influencing isolation of islets of Langerhans[J]. Diabetes, 1989; 38(Sup 1): 129-132.

[5] Lewis J T, Dayananda B, Habener J F, et al. Glucose-Dependent insulinotropic polypeptide confers early phase insulin release to oral glucose in rats: demonstration by a receptor.antagonist[J].Endocrinology, 2000, 141(10): 3710-3716.

[6] Sandberg J O, Margulis B, Jansson L K, et al. Transplantation of fetal porcine pancreas to diabetic or normoglycemic nude mice: evidence of a rapid engraftment process demonstrated by blood flow and heat shock protein 70 measurements[J]. Transplantation, 1995, 59(20): 1665-1669.

[7] Lacroix Andr é, N'Diaye Nina, Tremblay Johanne. Ectopic and abnormal hormone acceptors in adrenal Cushing's Syndrome[J]. Endocr. Rev, 2001, 22(1): 75-79.

[8] Ding K H, Zhong Q, Xu J, et al. Glucose-dependent insulinotropic peptide: differential effects on hepatic artery vs portal vein endothelial cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004, 286(5): E773-779.

[9] Zhong Q, Bollag RJ, Dransfield DT, et al. Glucose-dependent insulinotropic peptide signaling pathways in endothelial cells [J]. Peptides, 2000, 21(9): 1427-1432.

[10] Ding K H, Zhong Q, Isales C M.Glucose-dependent insulinotropic peptide stimulates thymidine incorporation in endothelial cells: role of endothelin-1[J].Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003, 285(6): 390-396.

[11] Johasson M, Mattsson G, Andersson A, et al. Islet enodothelial cell and pancreatic β-cell proliferation: studies in vitro and during pregnancy in adult rat[J]. Endocrynology, 2006, 147(5): 2315-2324.

[12] Hardikar A A, Marcus-Samuels B, Geras-Raaka E, et al. Human pancreatic precursor cells secrete FGF-2 to stimulate clustering into hormone-expressing islet -like cell aggregates[J]. PNAS, 2003, 100(12): 7117-7122.

(责任编辑：关蕴良)