维普资讯 http://www.cqvip.com

Relationship between ambulatory blood pressure and urinary albumin excretion rate in NIDDM

Liu Dongfang, et al
Department of endocrinology, the second college of clinical medicine

The blood sugar、plasma lipids、HbA1C、ambulatory blood pressure (AMBP) were measured on 68 NIDDM patients and 36 healthy controls. The patients were divided into three groups according to the 24hour mean urinary albumin excretion rate (UAER):the normoalbuminric group、the microalbuminric and the clinical diabetic nephropathy group. We found that the increase of AMBP preceded the abnormalities of UAER in NIDDM. When the severity of nephropathy was increased、the AMBP、ambulatory heart rate (AHR)were higher. their percentages of day.night changes were lower, and these factors were more significantly related to UAER . Multiple linear regression suggested that blood pressure、HbA1C and duration of disease were significantly related to UAER. Our study demonstrate that the elevated blood pressure plays an important role in initiation and progression of DN

KEY WORDS NIDDM; AMBP; DN

24-27

(8)

微囊化垂体瘤细胞移植的实验研究

R736.4
R73-352

临床学院神经外科 谢延风* 郑履平

提 要 本实验企图通过移植前的垂体GH腺瘤细胞培养，测定培养液及移植鼠术前、后血中的垂体激素水平和对移植后微囊化的GH腺瘤细胞的光、电镜观察，了解经微囊化后的GH腺瘤细胞是否能存活并正常分泌GH，是否会在受体动物中造成高催乳素(PRL)血症以及微囊包膜完整性能维持多久。结果发现：移植术后12周，微囊化的GH腺瘤细胞存活良好并具分泌功能，大多数微囊包膜结构仍然完整，术前体外GH腺瘤细胞培养液中，PRL浓度相当高，但移植后动物血中PRL和GH浓度与术前无显著性差异。提示微囊化的GH腺瘤细胞，在选择性垂体移植中作为供体来源的前景良好。

垂体肿瘤

关键词 微囊包膜; 免疫隔离; 垂体移植; 细胞培养
中图分类号 R617; R651.13

本实验旨在观察微囊膜在受体内的完整期，移植物的功能存活情况和有无高催乳素血症发生，为今后临床应用提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 供体选择 选择有典型肢端肥大症表现，血中生长激素显著升高、头颅CT扫描或MRI提示垂体腺瘤，并经术后病理检查证实为垂体GH腺瘤的患者。将其术中被切下的垂体腺瘤在体外进行肿瘤细胞培养，筛选出所需的GH腺瘤细胞作为供体。

1.2 受体来源 实验动物选用重庆医科大学实验动物中心健康雌性Wistar大鼠共25只。

1.3 体外瘤细胞培养 将手术中取出的6例垂体腺瘤组织立即放入1640培养液中，在无菌条件下，采用机械刮取法分离肿瘤细胞，离心、计数。每一培养瓶内种植1×10^7个细胞，并加入含10%小牛血清的1640培养液10ml。置37℃、含

* 男，1965－02出生，主治医师

维普资讯 http://www.cqvip.com

5%CO_2的培养箱中培养。分别于培养后2天、4天、6天取培养上清液测PRL水平，取细胞离心制备涂片，HE染色，光镜观察，并取培养前、后的瘤细胞作常规电镜观察。

1.4 **瘤细胞微囊化** 将在体外已培养2天的瘤细胞，倒入海藻酸钠溶液内混匀，通过一种特制的微囊形成器具，将细胞悬液滴入氯化钙溶液中形成圆珠，以后用CHES进行洗涤，并再用0.1%聚－L－赖氨酸氢溴酸盐中包膜。

1.5 **实验分组** Wistar大鼠25只共分成三个实验组：a组，空包囊组5只；b组，未包裹的瘤细胞组5只；c组，微囊化瘤细胞组15只。

1.6 **移植方法** a、b两组采用空针直接注射空包裹或未包裹的瘤细胞悬液入大鼠腹腔内每只2ml；c组术前于大鼠腹腔内注射氯胺酮，麻醉显效后于下腹正中备皮，常规消毒铺巾，切开腹壁，将预先制备的微囊化瘤细胞植入大鼠腹腔，缝合切口。

1.7 **术后处理** 全部实验大鼠术后未使用抗菌素和免疫抑制剂。在术前、术后1、2、4、8、12周分别经尾静脉切开取血，分离血清，低温冰箱冻存；并于术后2、4、8、12周分别处死微囊化瘤细胞移植组大鼠2～3只，解剖腹腔，寻找微包囊；同时取腹腔内脏器表面的微包囊瘤细胞，作常规电镜观察。

全部血清标本同一批RIA测定GH，ELISA测定PRL。

1.8 **数据处理** 各组术前、术后血清GH和PRL的变化，均采用二因素重复测定设计的方差分析。全部数据由我校卫生统计学教研室计算机处理。

2 结果

2.1 组织形态学观察

2.1.1 体外培养瘤细胞

光镜观察 垂体GH腺瘤细胞，体外培养2天，细胞大小不等，轮廓清楚。胞核大而圆，可见双核，染色较浅。胞浆丰富，呈嗜酸性。而体外培养6天、胞浆嗜酸性消失，细胞融合，轮廓不清。胞核内可见凝固小体，大部分核淡染，模糊，说明细胞逐渐崩溃解体。

电镜观察 垂体GH腺瘤细胞，体外培养2天，其形态结构正常，核异染色质边集；分泌颗粒的数量、大小和密度，基本上同培养前。但随着培养时间延长，粗面内质网扩张，线粒体肿胀，分泌颗粒数量减少。

2.1.2 移植的微囊化瘤细胞

肉眼观察 移植术后第2周，Wistar大鼠的肝、脾、肾脏表面有完整的微包囊，部分游离于腹腔，部分粘附于大网膜及肠壁，小球形的微包囊散在或堆积在一起；术后4周和8周，观察结果类似；术后12周，仍可在肝、脾、大网膜和肠壁上找到一些完整的微包囊。

电镜观察 移植术后第2周和第4周，可见微囊膜，囊内有一至数个GH腺瘤细胞，和培养2天的瘤细胞形态结构相同；术后8周、12周，微囊膜内瘤细胞分泌颗粒电子密度变浅，可见分泌颗粒空泡变性和髓样结构。

2.2 垂体激素水平变化

2.2.1 体外瘤细胞培养液PRL水平(见表1)

表1 垂体GH腺瘤细胞培养液PRL水平(ng/ml)

培养时间	病例1	病例2	病例3	病例4	病例5	病例6
2d	2223.5	1184.5	22.57	119.35	>2500	129
4d	>2500	1426	396.23	44.18	>2500	342

2.2.2 Wistar大鼠血清PRL变化(见表2)

采用二因素重复测定设计的方差分析，其总$F=0.99, P>0.05$无差别，说明Wistar大鼠血清PRL变化不明显，未发生高PRL血症。

2.2.3 Wistar大鼠血清GH变化(见表3)

采用二因素重复测定设计的方差分析，其总$F=1.82, P>0.05$无差别，说明Wistar大鼠血清GH变化不明显。

表2 Wistar大鼠血清PRL变化($\bar{x}\pm s$)

组别	术前	术后1周	2周	4周	8周	12周
a组	2.63±0.69	2.99±0.62	2.39±0.74	2.93±0.60	2.67±0.53	2.56±0.63
b组	2.68±0.73	2.85±0.94	2.28±0.49	1.98±0.65	2.26±1.12	2.47±1.39
c组	2.61±0.52	2.88±1.64	2.70±0.94	2.39±0.74	2.82±1.78	2.95±1.44

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3 Wistar大鼠血清GH变化($\bar{x}\pm s$)

组别	术前	术后1周	2周	4周	8周	12周
a组	2.18±0.92	1.71±0.70	2.24±1.14	2.23±0.92	2.24±0.89	2.25±1.25
b组	2.17±0.71	2.57±1.21	3.15±2.18	2.82±1.24	2.48±1.69	2.87±1.34
c组	2.13±1.04	2.65±1.90	2.67±1.62	2.79±1.20	3.04±0.87	3.29±1.13

3 讨论

垂体移植可作为治疗垂体功能低下的有效疗法。但目前垂体移植，特别是选择性垂体移植仍处于动物实验和临床探索阶段，尚有许多与之有关的问题有待解决。

免疫排斥反应是垂体移植应用于临床所面临的主要问题之一。微包囊是一种较有效的免疫隔离材料[1-3]，系采用无毒的高分子材料聚－L－赖氨酸、海藻酸凝胶制成的具有半透膜性质的小球囊。被移植的细胞包裹于球囊内而成人工细胞。囊内细胞可通过此膜获得各种营养成分，并排出所分泌的分子量较小具有生物活性的物质。而具有免疫活性的大分子物质如免疫球蛋白、免疫活性细胞等，则被隔离于微包囊之外。将这种人工细胞移植于宿主体内，可隔离宿主对移植物的排斥反应；移植物可在宿主体内长期存活、并行使其分泌功能。

微囊包膜完整期长短与移植物存活时间紧密相关。本组实验，通过解剖Wistar大鼠腹腔和微包囊的电镜观察，发现移植术后12周，大鼠体内微包囊仍保持其形态结构完整，囊内GH腺瘤细胞功能存活，显示有较好的生物相容性和免疫屏障作用。微包囊的完整期达12周，这可能与我们制备微包囊所选择的海藻酸钠和氯化钙的浓度及浸泡聚－L－赖氨酸氢溴酸盐的时间有关[4]。而凝胶——多聚赖氨酸——凝胶三层夹膜在制备过程中，由于用柠檬酸钠溶液液化囊内的海藻酸钙胶体，使微包囊的硬度降低，因而微囊包膜保持完整的时间短，容易破碎。在肿瘤细胞的微囊化中，微包囊膜破裂较早，可能与肿瘤细胞分裂增殖较正常细胞快得多有关，适当提高微囊包膜硬度也许是解决问题的关键。

垂体GH腺瘤细胞若不使用免疫隔离方法，在异体间移植，将很快被宿主排斥，不可能长期存活。GH腺瘤细胞微囊化后，一旦微囊破裂，囊内的肿瘤细胞也将因被宿主的免疫系统攻击排斥，而不会在移植区形成一个GH腺瘤。另外，微囊包膜或未包膜的垂体腺瘤细胞，体外培养研究表明，两者激素的分泌量相等，微囊包膜对腺瘤细胞的分泌功能无影响[5]。所以，垂体GH腺瘤细胞微囊化后可作为选择性垂体移植的供体。

由于垂体腺瘤细胞的非单一性[6~7]，即一种瘤细胞可分泌两种垂体激素或两种瘤细胞混合，因此移植就互有影响。现已发现，GH和PRL起源于同一先祖干细胞，在雌激素或下丘脑生长激素释放因子作用下，GH细胞可分泌PRL或转化为PRL细胞的稀疏颗粒型；泌乳生长素细胞是一种能同时分泌PRL和GH的分化成熟的转化型细胞。因而，移植微囊化GH腺瘤细胞，有造成高催乳素血症的可能。

我们在移植实验前，先进行了体外瘤细胞培养。从表1中可以看出，大多数病例，体外瘤细胞培养液中，PRL浓度相当高，并随培养时间延长而无明显降低，与Ishibashi等结果相似[8]，说明这些GH腺瘤是非单一性的。PRL浓度高，可能与体外培养的瘤细胞脱离下丘脑催乳素抑制因子的作用有关、亦可能与培养液量较少，PRL浓度相对较高有关。6例瘤细胞培养液中PRL水平相差较大，可能与标本混有血细胞的量不等及瘤细胞的非单一性有关。

本组实验选择了一例体外培养液中PRL浓度较高的瘤细胞(病例1)作为供体，微囊包膜处理后移植于Wistar大鼠腹腔。结果提示血清PRL在正常范围内、未发生高催乳素血症，血清GH也在正常范围内。估计与实验动物未去垂体，下丘脑反馈调节仍存在有关。众所周知，在生理情况下，机体神经内分泌系统存在着反馈调节机制。即使功能性垂性腺瘤分泌GH和PRL，使血清浓度升高、但是由于体内负反馈系统的调节，抑制下丘脑激素的分

维普资讯 http://www.cqvip.com

泌，从而使该动物的垂体腺分泌GH和PRL减少。这可能是血清GH和PRL浓度变化不大的原因。此外，还可能与移植物量较少有关。

虽然在本实验中受体动物未产生高催乳素血症，但考虑到大多数体外瘤细胞培养液中含有高浓度PRL，且不随时间推移而减少，以此作为移植物仍有可能造成高催乳素血症。故GH瘤细胞作为供体来源时，应先行体外培养，选分泌GH高、PRL低的瘤细胞株作为移植物。

4 小结

4.1 垂体GH腺瘤可作为选择性垂体移植的供体。其应用前提是采用有效的免疫隔离技术。而微囊包膜技术则是一种较理想的解决移植排斥反应的免疫隔离方法。

4.2 垂体腺瘤细胞作为移植物，应在移植前先行体外瘤细胞培养，选择分泌所需激素的瘤细胞株，以防术后造成新的问题。

4.3 微囊化垂体瘤细胞移植治疗垂体功能低下具有较大的临床应用前景。因为移植手术十分简单，术后可不使用免疫抑制剂，并能移植于颅外许多部位。此外还可采用分次移植方法来提高移植效果。

参 考 文 献

1.Lim F, et al. Science. 1980;210:908
2.Goosen MFA, et al. Biotechnology and Bioengineering. 1985;27:146
3.Chen ZP, et al. Chinese Medical Journal. 1994;107(3):200
4.舒昌达，等.重庆医科大学学报 1986;11(2):123
5.Chen ZP, et al. Biotechnol. 1995;23(5):597
6.Serri D. Clin Endocrinol. 1987;27:675
7.Robert F, et al. Hum pathol, 1988;19(11):1327
8.Ishibashi M, et al. J Clin Invest, 1984;73:66

(收稿日期 1998－05－18)

An experimental study of microencapsulated pituitary adenoma cells transplantation

Xie Yanfeng, et al
Department of neurosurgery, college of clinical medicine

In this study, by culturing pituitary GH adenoma cells in vitro during pregrafting, determining pituitary hormone level in the culture media and the blood of the implanted rats during preoperation, postoperation, and observing microencapsulated GH adenoma cells under light and electron microscope at postgrafting, we tried to find whether microencapsulated GH adenoma cells could survive and secrete normal GH, or the receptor animal could have a high PRL blood concentration and how long the integrity of microencapsulation could maintain in vivo. The results showed that the microencapsulated GH adenoma cells remained viable and had secretion function, and most of the structure of the microencapsulation were normal in size 12 weeks after transplantation. The concentrations of PRL were fairly high in vitro GH adenoma cells culture media during preoperation but there were no significant differences of the concentrations of PRL and GH in the blood of animal at postgrafting compared with those of pregrafting. The results suggest that microencapsulated pituitary GH adenoma cells were used as a source of donors and its prospects are bright in the selective pituitary transplantation.

KEY WORDS Microencapsulation; Immunoisolation; Pituitary transplantation; Cell culture