



三种不同免疫抑制剂对胰岛细胞功能的影响

胰岛细胞移植是近年来糖尿病研究领域的一个热点。对于伴有严重代谢并发症的1型糖尿病患者来说,胰岛细胞移植是一种非常有前景的治疗方法。但是由于受移植中胰岛细胞活性的限制,移植能够成功1年以上的比例只有6%~8%[1]。影响成功的主要因素包括胰岛细胞的活性、移植部位感染、同种或自身免疫反应、免疫抑制剂对胰岛细胞的毒性作用等[2]。EDMONTON方案已经证实免疫抑制剂的毒性大小对于胰岛移植成功与否起着重要作用[3]。本研究主要以体外培养的胰岛细胞为对象,应用噻唑蓝法动态观察不同免疫抑制剂在胰岛细胞损伤中的作用,为临床胰岛细胞移植免疫抑制的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验仪器、试剂和实验对象

550型自动酶标分析仪(BIO-RAD公司,日本)。daclizumab(Dacb)和胶原酶P购自Roche公司,雷帕霉素和MTT购自Sigma公司,FTY720为珠江医院孙尔维教授惠赠,RPMI-1640为Gibco公司产品,Ficoll-400为Pharmacia-Upjoin公司产品,HC-A器官保存液为上海长征医院产品。SD大鼠购自珠江医院动物中心。

1.2 方法

1.2.1 胰岛细胞分离和培养 体质量100~150 g的SD大鼠麻醉后,取腹壁正中切口打开腹腔,将D-HBSS液20 ml缓慢逆行注入胰管内,使胰腺充分膨胀。迅速摘取胰腺,以4℃的D-HBSS充分漂洗3次,用眼科剪剪成2~3 mm大小的碎片,置于含1.5 g/L的胶原酶P的D-HBSS液中,(37±1)℃水浴振荡消化15 min。用含10%小牛血清的HC-A器官保存液终止消化,以Ficoll-400不连续密度梯度离心法进行纯化。纯化后的胰岛细胞接种于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中,在5% CO₂、37℃恒温培养箱中培养。

1.2.2 免疫抑制剂对胰岛细胞功能的影响 免疫抑制剂选用临床上当前使用或即将使用的药物和药物浓度根据其血浆药物浓度的最大值和最小值来确定。具体如下:雷帕霉素为0、0.1、0.5、1.0、50.0和100.0 ng/ml;Dacb为0、0.1、0.5、1.0、100.0和1 000.0 μg/ml;FTY720为0、0.1、0.5、1.0、100.0和1 000.0 ng/ml。免疫抑制剂浓度为0时分别作为不同免疫抑制剂的对照组。雷帕霉素溶于二甲亚砜中,Dacb和FTY720溶于四蒸水中,制成免疫抑制剂母液。解剖镜下手工挑取18组,每组10个大小介于250~300 μm之间的胰岛细胞团,加入96孔板中,分别与含上述浓度免疫抑制剂的RPMI-1640培养24 h。

1.2.3 MTT法测定 各组弃去原培养液,加入5 g/L的MTT 20 μl,置温箱4 h,最后加入甲月赞溶解液100 μl,室温振荡10 min,待其完全溶解后于酶联反应仪上测量570 nm处的Dλ值。

1.2.4 统计学处理 采用SPSS10.0进行统计分析,行方差分析(ANOVA),组间比较用LSD法。

2 结果

6组不同浓度(0、0.1、0.5、1.0、50.0和100.0 ng/ml)雷帕霉素作用胰岛细胞24 h后, $D\lambda$ 值分别为 192.1 ± 6.8 、 189.4 ± 5.9 、 184.8 ± 8.2 、 101.9 ± 6.5 、 64.7 ± 9.4 和 42.9 ± 3.4 。低浓度组(0.1、0.5 ng/ml)与对照组相比无显著差异, 高浓度组(1.0、50.0和100.0 ng/ml)与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

6组不同浓度(0、0.1、0.5、1.0、100.0和1 000.0 $\mu\text{g/ml}$)Dacb作用胰岛细胞24 h后, $D\lambda$ 值分别为 191.9 ± 4.4 、 189.4 ± 14.4 、 180.1 ± 18.9 、 180.3 ± 27.6 、 196.6 ± 9.3 和 196.2 ± 13.5 , 所有浓度组与对照组相比均无明显差别。

6组不同浓度(0、0.1、0.5、1.0、100.0和1 000.0 ng/ml)FTY720作用胰岛细胞24 h后, $D\lambda$ 值分别为 189.2 ± 7.1 、 189.5 ± 16.3 、 193.0 ± 10.6 、 194.0 ± 11.0 、 193.3 ± 12.2 和 188.4 ± 9.6 , 所有浓度组与对照组相比均无明显差别。

3 讨论

MTT法用于测定细胞存活和增殖, 由于淡黄色MTT经活细胞中线粒体脱氢酶的消化, 生成不溶于水的兰紫色甲月赞结晶, 因此通过测定细胞内结晶含量的高低, 能很好地反应细胞群体中细胞活力与细胞受损伤程度。Janjic等[4]认为MTT法是评价胰岛细胞代谢和活力的快速、简便方法。

本研究结果为雷帕霉素对胰岛细胞有毒性作用, 而Dacb和FTY720对胰岛细胞无明显毒性作用。雷帕霉素通过阻断白细胞介素-2(IL-2)来减少T细胞的增殖, 从而发挥其免疫抑制作用。既往体外实验研究表明, 胰岛细胞与雷帕霉素共同培养72 h后, 胰岛素的释放减少[5]。这表明胰岛细胞的功能、活力受到损害, 与我们的结果基本一致。Dacb是重组并人源化的Ig G1 (G亚型免疫球蛋白) 抗Tac抗体, 其功能类似于IL-2受体拮抗剂, 与高亲和力的IL-2受体复合物(在激活的T细胞表面表达)的 α -亚单位或Tac亚单位高特异性结合, 从而抑制IL-2的结合和生物活性, 即抑制了移植排斥过程中细胞免疫反应的关键通道。我们的研究结果认为Dacb对胰岛细胞无明显损伤作用, 与Paty等[6]的报道是一致的。因此, 对于胰岛细胞移植来讲, Dacb是一种非常有前景的药物。FTY720是一种新合成的免疫抑制剂, 由冬虫夏草抽提物中具有免疫抑制作用的成分ISP-I经结构改造而成, 其可能机制有两个方面: 一是诱导淋巴细胞凋亡; 二是诱导淋巴细胞归巢。虽然目前还没有FTY720对胰岛细胞功能影响的报道, 但我们的研究结果提示, 它对大鼠胰岛细胞的活力无明显损害作用。因此, 如果今后在活体及临床实验中能够进一步验证我们的结论, FTY720无疑将具有良好的临床应用前景。

总之, 由于免疫抑制剂对于胰岛细胞移植成功与否起着非常关键的作用, 鉴于雷帕霉素的毒性作用, 寻求更高效、低毒的替代药物来与其他成熟的免疫抑制剂组合, 可能会为胰岛细胞移植的抗排斥治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Hering MD, Brendel BJ, Schultz AO. International islet transplant registry newsletter[M]. Giessen: Justus-Liebig-University of Giessen, 1999. 1-20.
- [2] Robertson RP, Davis C, Larsen J, et al. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes[J]. Diabetes Care, 2000, 23(1): 112-6.
- [3] Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen[J]. N Engl J Med, 2000, 343(4): 230-8.
- [4] Janjic D, Wollheim CB. Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay[J]. Diabetologia, 1992, 35(5): 482-5.
- [5] Fabian MC, Lakey JR, Rojotte RV, et al. The efficacy and toxicity of rapamycin in murine islet transplantation: in vitro and in vivo studies[J]. Transplantation, 1993, 56(5): 1137-42.
- [6] Paty BW, Harmon JS, Marsh CL, et al. Inhibitory effects of immunosuppressive

drugs on insulin secretion from HIT-T15 cells and Wistar rat islets[J]. Transplantation, 2002, 73(3): 353-7.

参考文献:

- [1] Hering MD, Brendel BJ, Schultz AO. International islet transplant registry newsletter[M]. Giessen: Justus-Liebig-University of Giessen, 1999. 1-20.
- [2] Robertson RP, Davis C, Larsen J, et al. Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes[J]. Diabetes Care, 2000, 23(1): 112-6.
- [3] Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen[J]. N Engl J Med, 2000, 343(4): 230-8.
- [4] Janjic D, Wollheim CB. Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay[J]. Diabetologia, 1992, 35(5): 482-5.
- [5] Fabian MC, Lakey JR, Rojotte RV, et al. The efficacy and toxicity of rapamycin in murine islet transplantation: in vitro and in vivo studies[J]. Transplantation, 1993, 56(5): 1137-42.
- [6] Paty BW, Harmon JS, Marsh CL, et al. Inhibitory effects of immunosuppressive drugs on insulin secretion from HIT-T15 cells and Wistar rat islets[J]. Transplantation, 2002, 73(3): 353-7.