

# 大鼠胃浆膜下间隙胰岛移植的存活率 及其功能的实验研究

刘新农,胡三元,张光永,韩海峰,胡春晓,王磊

(山东大学齐鲁医院普外科,山东 济南 250012)

**摘要:**目的 探讨大鼠胃浆膜下间隙胰岛移植的可行性及其移植效果。方法 应用 Lewis 近交系雄性大鼠,采用链脲菌素诱导糖尿病模型;同种系大鼠体外胰岛分离、纯化,将一定数量的胰岛植入糖尿病大鼠胃浆膜下间隙(胃组),同期将同等数量的胰岛植入肾被膜下间隙(肾组)作为对照,评估移植后糖尿病大鼠的血糖水平、腹腔葡萄糖耐量试验及胰岛移植存活率。结果 胰岛移植术后前3周,胃组和肾组内糖尿病大鼠的血糖水平较移植前均明显下降( $P < 0.05$ ),两组大鼠间血糖水平无差异、糖耐受功能良好( $P > 0.05$ );两移植部位的胰岛被免疫组织化学染色有效确认,移植胰岛周围有少量炎性细胞浸润,肾组织样本内胰岛周围的炎细胞浸润更明显。肾组和胃组糖尿病大鼠血糖水平分别于胰岛移植术后第5、4周开始升高。术后第6周两组大鼠血糖水平均升高且糖耐量减低,免疫组织化学染色检查显示,两移植部位内仅残余散在的胰岛细胞。结论 胃浆膜下间隙胰岛移植的短期效果与肾被膜下胰岛移植相同,但其血糖控制效果比肾被膜下胰岛移植更佳,而其长期效果有待进一步证实。

**关键词:** 胰岛移植;胃浆膜下间隙;肾被膜下间隙;大鼠,近交 Lew

中图分类号:R587.1

文献标志码:A

## Experimental study of survival rate and function of stomach subserous transplanted islets in inbred rats

LIU Xinnong, HU Sanyuan, ZHANG Guangyong, HAN Haifeng, WU Chunxiao, WANG Lei

(Department of General Surgery, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To explore the feasibility of transplanting islets into the stomach subserous space in diabetic inbred rats. **Methods** Lewis inbred male rats were enrolled as islets donors and recipients. Diabetes was induced by the administration of streptozotocin. Equal numbers of fresh islets were transplanted into the stomach subserous space and into the renal subcapsular space, respectively. The glucose level, intraperitoneal glucose tolerance and survival rate of islets transplanted were detected afterwards. **Results** The glucose level of all diabetic rats receiving islets in stomach subserous or renal subcapsular space significantly decreased 3 weeks after transplantation ( $P < 0.05$ ). All rats had good glucose tolerance, and there was no significant difference in the glucose level between the two groups ( $P > 0.05$ ). The islets transplanted into those two sites were identified by immunohistochemical detection using anti-insulin antibody, with a few of inflammatory cells infiltrating around the islets. The infiltration was more obvious around islets located in the renal subcapsular space. The glucose level of rats with islets transplanting into renal subcapsular space and stomach subserous space gradually increased again at the 5th and 4th weeks after transplantation, respectively. The glucose level of all the rats in the two groups significant increased with a reduced glucose tolerance and the immunohistochemical detection showed that there were only dispersed islets left in the two sites at the 6th week after transplantation. **Conclusion**

Islet transplantation into stomach subserous space is technically feasible and owns a better effect in improving the

glucose of diabetic rats than that into renal subcapsular space in the early state. However, the long-term effects remain to be confirmed by other studies.

**Key words:** Islet transplantation; Stomach subserous space; Renal subcapsular space; Rats, inbred Lew

胰岛移植是最有可能治愈、且符合生理的治疗1型糖尿病的方法之一<sup>[1]</sup>。自Edmonton方案问世以来,胰岛移植的短期移植效果得以大幅提高,但后续研究发现其长期效果并不理想,5年生存率不足10%<sup>[2-3]</sup>。胰岛移植部位是影响胰岛移植效果的重要因素之一。1972年,Ballinger和Lacy首先证实经门静脉肝内胰岛移植能够降低糖尿病大鼠血糖水平,随后诸如前房、睾丸、肾被膜下、肌肉、大网膜等部位亦被用作胰岛移植部位,然而肝脏是目前为止最为常用的移植部位<sup>[4-6]</sup>。理论上,门静脉内氧分压低、固有免疫反应强、血糖浓度及免疫排斥药物浓度高、移植胰岛接触血液后易引发急性血液介导的炎症反应(instant blood-mediated inflammatory response, IBMIR),这些因素都不利于移植胰岛的存活,研究证实IBMIR是早期胰岛丧失最为主要的原因<sup>[7]</sup>;此外,经门静脉肝内胰岛移植还潜在出血、门静脉高压及感染的并发症。理想的移植部位,不但可以避免胰岛移植与血液的直接接触,而且可以提供丰富的血液供应。目前,未见大鼠胃浆膜下间隙胰岛移植的报道<sup>[8]</sup>。本研究采用Lewis近交系雄性大鼠,初步探索胃浆膜下间隙胰岛移植的可行性及移植效果。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 近交系Lewis雄性成年大鼠32只均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养于SPF级动物房(温度22~25℃,湿度55%~65%,光照12h/12h昼夜交替),24h提供固体棒状饲料及自来水。近交系Lewis雄性成年大鼠(250~300g)作为胰岛供体;200~250g同种系雄性成年大鼠作为胰岛受体,采用Streptozotocin(美国Sigma公司)55mg/kg一次性腹腔内注射方法将受体大鼠诱导为1型糖尿病模型<sup>[7]</sup>。胰岛受体大鼠随机分为胃浆膜下间隙胰岛移植组(胃组, $n=20$ )和肾被膜下间隙胰岛移植组(肾组, $n=12$ )。注射链脲菌素后,连续2d均在固定时间(8:00~10:00,AM)经尾静脉采血检测其血糖水平,如2次血糖检测结果均大于300mg/kg的大鼠视为制作糖尿病模型成功并纳入后续研究,胰岛移植后血糖水平小于200mg/kg视为胰岛移植有效。

**1.2 胰岛分离与纯化** 10%水合氯醛(3mL/kg,腹腔内注射)麻醉大鼠后,将其仰卧位固定。在其腹部做一倒“人”字形切口,暴露胆总管,在肝门部用动脉夹夹闭胆总管近端,远端穿入2条7号丝线(其中1条用于结扎胆总管远端,另1条用于固定穿刺针),将连接有10mL注射器的26G针头逆行刺入胆总管后固定。然后将大鼠破心处死,待胰腺血色退去后,经穿刺针注入10mL、1mg/mL胶原酶溶液(Sigma公司,USA)。将膨胀的胰腺切除、并修剪其周围的脂肪、淋巴组织后,于37℃水浴锅内孵育17min。最后采用Histopaque1077淋巴细胞分离液(Sigma公司,USA)在离心力250×g条件下离心21min,取出胰岛层液体,人工拣出胰岛,计数后备用<sup>[9]</sup>。

**1.3 胰岛移植** 选取约1000个直径大于50μm的胰岛细胞放入1.5mL盛有生理盐水的EP管内,待其自然下沉,用连有23G针头的1mL注射器,将胰岛注入胃浆膜下间隙。胃浆膜下间隙部位的选择及穿刺:10%水合氯醛(3mL/kg;腹腔内注射)麻醉大鼠后,暴露胃远端。用无损伤组织镊机械牵拉大鼠的胃壁,待胃节律收缩后在其形成的肌间沟明显处穿刺,首先注入约0.5mL空气,待穿刺部位的胃浆膜下间隙充分扩张,然后使用1mL注射器经上述穿刺部位注入备用胰岛细胞,拔出针头后用干的无菌棉棒按压穿刺部位约1min,穿刺完毕,逐层缝合大鼠腹壁。同期,将相同数量的胰岛细胞移植入肾组大鼠的肾被膜下间隙内。

**1.4 血糖和腹腔葡萄糖耐量试验** 血糖检测:胰岛移植术前3天,每天检测其血糖水平,求得三者平均值并将其作为基线水平。胰岛移植术后第1周隔日检测其血糖,第2~6周,每周检测2次,大鼠血糖水平均在每天固定时间(8:00~10:00,AM)检测。腹腔葡萄糖耐量试验(intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT):在胰岛移植术后第2、6周,将大鼠禁食16h,每只大鼠腹腔内注射葡萄糖2g/kg,分别于注射时及注射后第15、30、60、120min,经尾静脉采血检测其血糖水平并予以记录。

**1.5 胰岛细胞的组织学及免疫染色检测** 在胰岛移植术后第2、6周分别获取受体大鼠胃和肾脏组织标本,4%甲醛溶液固定24h后,经石蜡包埋,制成4μm的组织切片;用小鼠单克隆抗胰岛素抗体

(Sigma 公司, USA) 及免疫组织化学二抗试剂盒(北京中杉金桥公司)进行免疫组织化学染色, 评估胰岛移植物的组织学变化, 实验步骤按其说明书逐步进行。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间计量数据处理采用独立样本  $t$  检验方法, IPGTT 数据采用单因素重复测量的 ANOVA,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 糖尿病大鼠血糖水平变化 见表1。胰岛移植后前3周, 胃组大鼠的血糖水平较移植前明显下降, 且其血糖水平与肾组大鼠无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 第4周时肾组大鼠血糖水平开始升高, 且明

表1 胃浆膜下与肾被膜下间隙胰岛移植后不同时间血糖水平变化( $\bar{x} \pm s$ , mg/dL)

组别	0周	1周	2周	3周	4周	5周	6周
胃组	358.8 ± 38.4	176.9 ± 35.4	179.6 ± 22.6	189.9 ± 24.4	201.3 ± 46.3	224.8 ± 38.1	241.6 ± 32.4
肾组	346.3 ± 37.8	176.4 ± 31.2	176.3 ± 15.6	194.2 ± 40.4	234.4 ± 43.3	249.9 ± 44.5	258.3 ± 29.5
$t$	0.90	0.04	0.46	-2.13	-1.13	0.20	0.32
$P$	0.37	0.97	0.65	0.24	0.04	0.05	0.72

显高于胃组大鼠的血糖水平 ( $P < 0.05$ ); 第5周开始胃组大鼠血糖水平逐渐升高, 直至胰岛移植后第6周, 两组大鼠血糖水平均较移植早期明显升高, 且两组间血糖水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.2 糖尿病大鼠的腹腔葡萄糖耐量试验 胰岛移植后第2、6周, 两组糖尿病大鼠的 IPGTT 结果见图1。第2周两组大鼠糖耐受功能无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 两组大鼠在各时间点糖耐受较好, 腹腔注射葡萄糖后30、60 min 时间点时, 肾组大鼠糖耐受功能优于胃组大鼠, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 第6周, 两组大鼠腹腔葡萄糖耐受功能均较前(第2周)下降 ( $P < 0.05$ ), 且肾组大鼠在30 min 时腹腔葡萄糖耐受功能明显低于胃组大鼠 ( $P < 0.05$ ), 120 min 时间点时血糖值明显高于0 min 时的血糖值 ( $P < 0.05$ )。

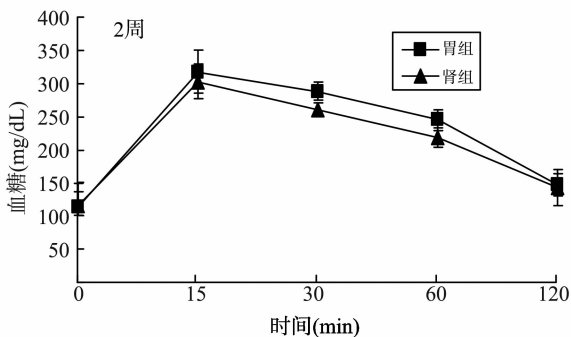
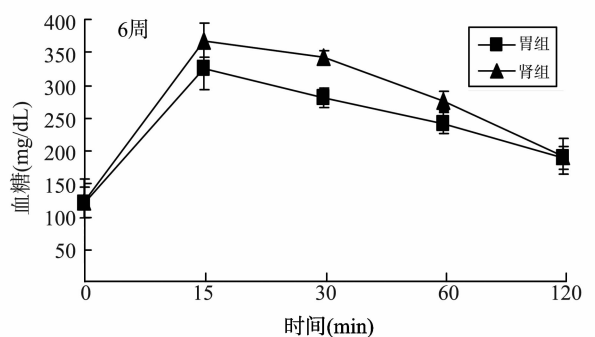


图1 胰岛移植后2周 IPGTT 试验趋势图

Fig. 1 The IPGTT trend of recipient diabetic rats 2 weeks after islet transplantation



2.3 免疫组织化学检测 术后第1周, 两组大鼠均可确认大量的胰岛组织, 周围见少量的炎症细胞浸润, 肾组大鼠移植胰岛周围炎细胞浸润更加明显(图2); 第6周结果显示, 胃和肾组织样本中仅残余散在的胰岛细胞, 且直径小于  $50 \mu\text{m}$  (图3)。

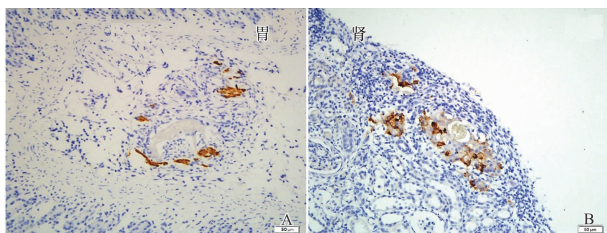


图2 术后第2周胃(A)与肾(B)组织胰岛被胰岛素抗体鉴定( $\times 20$ )

Fig. 2 The islets in the stomach (A) subserous space and renal (B) subcapsular space were identified by insulin antibody 2 weeks after islet transplantation ( $\times 20$ )

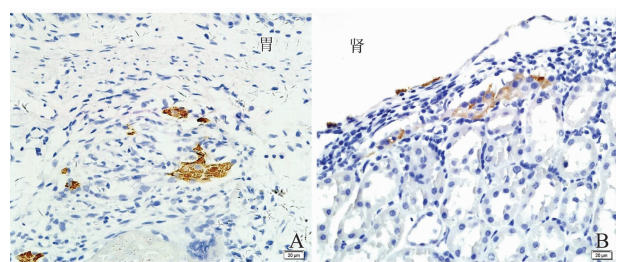


图3 术后6周胃(A)和肾(B)组织内胰岛被胰岛素抗体鉴定( $\times 40$ )

Fig. 3 The islets in the stomach (A) subserous space and renal (B) subcapsular space were identified by insulin antibody 6 weeks after islet transplantation ( $\times 40$ )

## 3 讨论

一直以来, 胰岛存活率是胰岛移植最为重要的



目标,胰岛移植部位是影响其存活率的重要因素之一。自胰岛移植技术问世以来,肝脏和肾被膜下是临床胰岛移植最为常用的移植部位,基础与临床研究发现,肝脏和肾被膜下并不是最理想的胰岛移植部位<sup>[10-11]</sup>。理论上,胃肠道具有血液供应丰富、胃浆膜下间隙较大、血液经门静脉回流入肝、与胰腺具有相同的胚胎源性、便于再次移植及术后随访等优势<sup>[12]</sup>。通过文献检索发现,目前未见胃浆膜下间隙胰岛移植的研究报道,本研究将胰岛移植到胃浆膜下间隙内,初步探索大鼠胃浆膜下胰岛移植的效果。

本研究结果表明,Lewis近交系雄性大鼠胃浆膜下间隙胰岛移植前3周移植效果较好,糖尿病大鼠血糖均降至正常范围,且与肾被膜下胰岛移植大鼠的血糖水平无明显差别;移植后6周开始大鼠血糖水平逐渐升高,表明移植胰岛已经渐渐失去功能,而该研究中肾被膜下胰岛移植大鼠的血糖在胰岛移植后4周开始升高,此时胃浆膜下间隙胰岛移植的移植效果要优于肾被膜下移植胰岛。而有研究表明,大鼠肾被膜下间隙内胰岛移植的存活时间约为3个月<sup>[13]</sup>。分析其研究发现,上述研究采用的是Wistar大鼠,胰岛移植后采用了免疫移植方案治疗,本研究采用的近交系Lewis大鼠,术后并未给予免疫移植药物,这可能是其与本研究中胰岛存活率不同的原因之一。腹腔葡萄糖耐量试验表明,胃浆膜下间隙与肾被膜下胰岛移植组内大鼠的早期腹腔葡萄糖耐受功能良好,而在移植后6周两移植组大鼠的糖耐受功能较早期下降,且肾被膜下胰岛移植大鼠的糖耐受功能要低于胃浆膜下胰岛移植组大鼠,尤其在30 min时间点的糖耐受功能,明显低于胃浆膜下胰岛移植组大鼠。国内相关研究得出与该研究类似的结果<sup>[14]</sup>,即胃黏膜下层胰岛移植后,大鼠的糖耐受功能亦有明显改善,尤其在30 min时间点的糖耐受功能。免疫组织化学检测发现,移植后早期两组大鼠胃浆膜下间隙和肾被膜下间隙的胰岛被有效确认,重要的是我们发现肾被膜下胰岛周围炎症细胞浸润比胃浆膜下间隙胰岛周围更加明显,这可能与后期肾被膜下移植的胰岛存活时间相对较短有关,仍需更多研究进一步证实。在移植后6周免疫组织化学检测发现,两组大鼠胃浆膜下间隙及肾被膜下间隙内的胰岛基本消失,仅残余少量直径小于50 μm的胰岛细胞,这表明胰岛细胞渐渐凋亡而失去功能。

本研究结果还显示,胃浆膜下胰岛移植比肾被膜下胰岛移植更加简便易行,穿刺过程中出血较少,胃浆膜下间隙较肾被膜下间隙更大。与肝脏相比,

胃浆膜下间隙有移植简便、取材活检容易、便于再次移植等优势。且该研究采用的是近交系Lewis雄性大鼠,各大鼠间不存在免疫排斥反应,便于观察胃浆膜下间隙胰岛移植的效果。另外,近年来腹腔镜技术与消化道内镜技术的发展也使得胃浆膜下胰岛移植更加微创,这也基本符合胰岛移植微创理念这一原则<sup>[15]</sup>。胃浆膜下间隙有望成为胰岛移植理想的移植部位,而该研究为单中心、小样本研究,其结论可靠性需更多大样本、非近交系动物研究进一步证实。该研究仅涉及胃浆膜下间隙和肾被膜下间隙两个移植部位,此亦为该研究的不足之处。

#### 参考文献:

- [1] Dominguez-Bendala J, Ricordi C. Present and future cell therapies for pancreatic beta cell replenishment[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(47):6876-6884.
- [2] McCall M, Shapiro A M. Update on islet transplantation[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(7):a007823.
- [3] Ryan E A, Paty B W, Senior P A, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation[J]. *Diabetes*, 2005, 54(7):2060-2069.
- [4] Ballinger W F, Lacy P E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats[J]. *Surgery*, 1972, 72(2):175-186.
- [5] Perez V L, Caicedo A, Berman D M, et al. The anterior chamber of the eye as a clinical transplantation site for the treatment of diabetes: a study in a baboon model of diabetes[J]. *Diabetologia*, 2011, 54(5):1121-1126.
- [6] Van der Windt D J, Echeverri G J, Ljzermans J N, et al. The choice of anatomical site for islet transplantation[J]. *Cell Transplant*, 2008, 17(9):1005-1014.
- [7] Hwang J W, Jung H S, Lee D Y. Inhibition of platelet adhesion onto intrahepatically transplanted islets using PEGylation for attenuating instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR)[J]. *J Control Release*, 2011, 152(suppl 1):e213-214.
- [8] Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, et al. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation[J]. *Eep Diabetes Res*, 2012;256707. Epub 2012 Dec 30.
- [9] 肖芳,李文娟,侯新国,等. 大鼠胰岛分离及纯化方案的改进[J]. *山东大学学报:医学版*, 2012, 50(3):8-10.
- [10] Henriksen J, Lau J, Zang G, et al. Markedly decreased blood perfusion of pancreatic islets transplanted intraportally into the liver; disruption of islet integrity necessary for islet revascularization[J]. *Diabetes*, 2012, 61(3):665-673.

蠕形螨专有的数据库,所以分子量位于 70 kD 和 15 kD 的蛋白也可能是蠕形螨特有蛋白。

本实验提取并分析了蠕形螨蛋白,并用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS),初步探索了蠕形螨蛋白的功能。

#### 参考文献:

- [1] Wesołowska M, Baran W, Szepietowski J, et al. Demodicidosis in humans as a current problem in dermatology[J]. *Wiad Parazytol*, 2005, 51(3):253-256.
- [2] Hom M M, Mastrotta K M, Schachter S E. Demodex[J]. *Optom Vis Sci*, 2013, 90(7):198-205.
- [3] 肖克源,郭淑玲,刘艳荣,等.蠕形螨 cDNA 文库的构建及鉴定[J]. *山东大学学报:医学版*, 2012, 50(5):15-19.
- [4] Ríos Yuil J M, Mercadillo Perez P. Evaluation of Demodex folliculorum as a risk factor for the diagnosis of Rosacea in skin biopsies. Mexico's General Hospital (1975-2010)[J]. *Indian J Dermatol*, 2013, 58(2):157.
- [5] Kosik Bogacka D I, Łanocha N, Łanocha A, et al. Demodex folliculorum and Demodex brevis in healthy and immunocompromised patients[J]. *Ophthalmic Epidemiol*, 2013, 20(3):159-163.
- [6] 苏磊,郭淑玲,冯玉新,等.流式细胞术测定蠕形螨基因组大小[J]. *山东大学学报:医学版*, 2013, 51(6):57-60.
- [7] Vargas Arzola J, Reyes Velasco L, Segura Salvador A, et al. Prevalence of Demodex mites in eyelashes among people of Oaxaca, Mexico[J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2012, 59(2):257-262.
- [8] Defty C, Breitenfeldt N, Dhital S K, et al. Demodex folliculorum: a parasite infection mimicking skin cancer[J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2013, 66(2):289-290.
- [9] 刘艳荣,刘付红,肖克源,等.蠕形螨 ISSR-PCR 的反应体系优化及引物筛选[J]. *山东大学学报:医学版*, 2012, 50(1):57-61.
- [10] Rather P A, Hassan I. Human demodex mite: the versatile mite of dermatological importance[J]. *Indian J Dermatol*, 2014, 59(1):60-66.
- [11] Yam J C, Tang B S, Chan T M, et al. Ocular demodicidosis as a risk factor of adult recurrent chalazion[J]. *Eur J Ophthalmol*, 2014, 24(2):159-163.
- [12] Luebbers H T, Lanzer M, Graetz K W, et al. Demodicidosis: an uncommon erythema after cranio-maxillofacial surgery[J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2013, 51(8):267-268.
- [13] Kaur T, Jindal N, Bansal R, et al. Facial demodicidosis: a diagnostic challenge [J]. *Indian J Dermatol*, 2012, 57(1):72-73.
- [14] 刘付红,郭淑玲,刘莹,等.两种人体蠕形螨足和外生殖器超微结构的观察[J]. *山东大学学报:医学版*, 2010, 48(2):142-145.
- (编辑:徐苗蓁)

(上接第 52 页)

- [11] Cantarelli E, Piemonti L. Alternative transplantation sites for pancreatic islet grafts [J]. *Curr Diab Rep*, 2011, 11(5):364-374.
- [12] Lackner C, Offner F, Nizze H. Small intestine, pancreas and islet cell transplantation[J]. *Pathologe*, 2011, 32(2):135-143.
- [13] TSUKADA M, Saito T, Ise K, et al. A model to evaluate toxic factors influencing islets during collagenase digestion; the role of serine protease inhibitor in the protection of islets[J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(2-3):473-482.
- [14] 宋京海,韦军民,陈剑,等.胃黏膜下层胰岛移植物的生存率与功能的实验研究[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2009, 15(7):531-533.
- [15] Mohan H M, O'Riordan J M, Winter D C. Natural-orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES): minimally invasive evolution or revolution? [J]. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 2013, 23(3):244-250.
- (编辑:张彩凤)