

• 实验研究 •

联合移植的脂肪间充质干细胞对胰岛移植功能及生存的影响

焦自钊¹ 薛武军¹ 安茂竹² 范晴² 李杨¹ 李凤楼² 张作华²

¹西安交通大学第一附属医院肾脏病医院肾移植科 710061; ²济宁医学院附属日照市人民医院血液净化科 276800

焦自钊现在济宁医学院附属日照市人民医院血液净化科 276800

通信作者:薛武军, Email: xwujun@126.com

【摘要】 目的 探讨联合移植的脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal stem cells, AMSCs)对胰岛移植功能及生存的影响。**方法** 分离纯化人的 AMSCs 和胰岛,移植于雄性 Balb/c 糖尿病裸鼠背部皮下,设联合 AMSCs 胰岛移植组、单纯胰岛移植组、PBS 对照组及正常对照组 4 组。免疫组化双染观察胰岛细胞活性、凋亡状况及胰岛移植血管化程度,并比较各组糖尿病裸鼠血糖、胰岛素水平及胰岛移植存活时间。**结果** 多元分析糖尿病裸鼠血糖、血清胰岛素水平,联合 AMSCs 胰岛移植组优于单纯胰岛移植组($P < 0.01$);联合 AMSCs 胰岛移植组胰岛移植于移植术后平均存活时间(mean survival time, MST)为(81.33 ± 7.58)d,经 Log-rank 检验长于单纯胰岛移植组的(58.17 ± 6.91)d($P < 0.05$)。胰岛移植后第 7 天,免疫组化双染,联合 AMSCs 胰岛移植组胰岛移植物的胰岛素染色强度高于单纯胰岛移植组,自杀相关因子(factor associated suicide, Fas)的表达密度则低于单纯胰岛移植组;血管计数显示联合 AMSCs 胰岛移植组胰岛移植物及周围微血管密度(microvascular density, MVD)为 21.8 ± 5.6,显著高于单纯胰岛移植组的 14.6 ± 4.1($P < 0.05$)。**结论** 联合移植的 AMSCs 具有改善胰岛移植功能、延长移植存活时间及促进移植血管再生的作用。

【关键词】 胰岛移植;脂肪间充质干细胞;糖尿病

基金项目: 国家自然科学基金(81400677);山东省医药卫生科技发展计划项目(2017WS114);济宁医学院国家自然科学基金培育项目(JYP201742)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.07.011

Adipose mesenchymal stem cells promote the function and survival of islet graft during co-transplantation

Jiao Zizhao¹, Xue Wujun¹, An Maozhu², Fan Qing², Li Yang¹, Li Fenglou², Zhang Zuohua²

¹Section of Renal Transplantation, Department of Nephropathy, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; ²Department of Blood Purification, Affiliated Rizhao People's Hospital, Jining Medical College, Rizhao 276800, China

Jiao Zizhao is working currently at Department of Blood Purification, Affiliated Rizhao People's Hospital, Jining Medical College

Corresponding author: Xue Wujun, Email: xwujun@126.com

【Abstract】 **Objective** To explore the function and survival of islet grafts during co-transplantation with adipose mesenchymal stem cells (AMSCs) in diabetic mice. **Methods** After human AMSCs and islet cells were isolated, purified and then subcutaneously co-transplanted into nude mice with diabetes mellitus. Four groups of AMSCs + islet co-transplantation, islet transplantation alone, phosphate buffered solution (PBS) and normal control mice were designated. Islet cell activity and apoptosis/revascularization degree of islet grafts were observed by immunohistochemical double staining of insulin, factor associated suicide (Fas) and CD31 antibody. The blood glucose and serum insulin levels of mice and the survival time of islet grafts were compared. **Results** The blood glucose and serum insulin levels of diabetic mice analyzed by multivariate analysis in AMSCs + islet co-transplantation group were better than those in islet transplantation alone group ($P < 0.05$). The mean survival time (MST) of islet grafts was longer in AMSCs + islet co-transplantation group than that in islet transplantation alone group [(81.33 ± 7.58) vs. (58.17 ± 6.91) days] ($P < 0.05$). At Day 7 post-transplantation, insulin staining intensity of islet grafts was higher in AMSCs + islet co-transplantation group than that in islet transplantation alone group while Fas staining intensity of islet grafts was lower. And mean microvascular density (MVD) of islet grafts

per square millimeter was higher in AMSCs + islet co-transplantation group than that in islet transplantation alone group [(21.8 ± 5.6) vs. (14.6 ± 4.1)] ($P < 0.05$). **Conclusions** Co-transplantation with AMSCs may improve the function of islet grafts, prolong its survival and promote its revascularization.

【Key words】 Islet of Langerhans transplantation; Adipose mesenchymal stem cells; Diabetes mellitus

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81400677); Medical Science & Technology Development Plan Project of Shandong Province (2017WS114); National Natural Science Foundation Cultivation Project of Jining Medical University (JYP201742)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.07.011

目前胰岛移植的广泛临床应用还受到诸多限制,其中包括:胰岛经历分离纯化过程的细胞性、非细胞性损伤后,由于胰岛移植后移植物无法短时间内生成血管恢复血液供应,致使胰岛细胞易于因缺血、缺氧而发生凋亡丢失及功能障碍^[1-5]。研究发现,包括脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal stem cell, AMSCs)在内的间充质干细胞对受损组织具有营养支持、抗凋亡及促进血管生成等作用,并且 AMSCs 还具有来源充足、取材方便的优点^[6-8]。我们以往在 AMSCs 与胰岛细胞体外联合培养的研究中发现,AMSCs 不仅能够分泌肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种细胞因子,而且还能够通过其分泌的细胞因子改善体外培养的胰岛细胞的存活及功能^[9]。在此,我们拟在前期研究基础上,继续通过 AMSCs 联合胰岛的体内移植实验,观察与胰岛联合移植的 AMSCs 对胰岛移植物活性及功能的影响,期望利用 AMSCs 分泌的 HGF 等营养生长因子来改善胰岛细胞的功能及生存,并利用 AMSCs 分泌的 VEGF 等促血管生长因子促进移植胰岛的血管再生,以减轻胰岛移植物的缺血缺氧性损伤。

材料与方法

一、实验材料

胶原酶 P 及胶原酶 I 购自 Roche 公司,胎牛血清(FBS)及 RPMI 1640 培养基购自 Gibico 公司, Ficoll 400 购自华美生物工程公司,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的兔抗人 CD31、CD44 抗体、藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的兔抗人 CD34、CD49d 抗体、链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、双硫腙(dithizone, DTZ)染色剂及 4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)荧光染色剂购自 Sigma 公司,成人间充质干细胞成骨及成脂诱导分化培养基购自赛业生物科技有限公司;胰岛素 ELISA 试剂盒购自

Bender 公司,兔抗人胰岛素单克隆抗体、羊抗人自杀相关因子(factor associated suicide, Fas)、CD31 单克隆抗体及生物素标记的驴抗兔、抗羊的二抗购自北京中杉公司。

胰腺组织及脂肪组织取自器官捐献供者;取标本前经西安交通大学第一附属医院伦理委员会及供者家属同意,供者家属签署同意书;标本于 4℃,无菌枸橼酸盐嘌呤器官保存液(HcA)中保存运输,热缺血时间 < 12 min,冷缺血时间 4~10 h。

雄性 Balb/c 裸鼠,体重 20~25 g,西安交通大学医学部实验动物中心提供。

二、实验方法

1. AMSCs 的分离、培养与鉴定:按文献[7,9]方法进行 AMSCs 的分离、培养与鉴定。无菌条件下取 10 g 人的脂肪组织,应用胶原酶 I 消化分离 AMSCs,置于含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,37℃、饱和湿度、含体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,并于传代培养过程中应用差速贴壁法纯化 AMSCs;应用免疫荧光法检测 CD31、CD34、CD44、CD49d 等 AMSCs 的表面相关抗原,1 ng/ml DAPI 荧光染色液标记细胞核;并对 AMSCs 进行成脂、成骨等多项诱导分化鉴定。

2. 胰岛分离、纯化:按文献[9]方法分离、纯化胰岛。无菌称取人的胰腺组织 30 g,剔除周围的脂肪、血管与结缔组织,寻找胰管,结扎渗漏,含 1 mg/ml 胶原酶 P(PH 值 7.4)的 Hanks 液 60 ml 经胰管逆行灌注胰腺组织,并剪碎至 1 mm³ 左右,再次加入 1 mg/ml 胶原酶 P Hanks 液 60 ml 在 38℃ 条件下振荡消化 20 min, Ficoll 400 液非连续密度梯度离心法纯化。以 DTZ 染色阳性的胰岛细胞团数占细胞团总数的比例计算胰岛纯度;以胰岛直径类别与换算指数换算成直径 150 μm 的胰岛当量(IEQ)。

3. 糖尿病裸鼠模型的建立:选择雄性 Balb/c 裸鼠建立糖尿病裸鼠模型,于无特定病原体(SPF)级实验室内无病原条件饲料培养,自由饮食。按 150 mg/kg 体重单剂量经腹腔注射 20 mg/ml STZ,注

射前后每天(清晨 8:00~9:00)尾静脉采血测定血糖浓度,空腹血糖连续 2 次 >11.1 mmol/L 或随机血糖浓度连续 ≥ 16.7 mmol/L 并维持 3 d 以上,且出现多饮、多食、多尿及消瘦症状者定义为成功的 1 型糖尿病裸鼠模型^[10]。

4. 胰岛移植:18 只糖尿病模型裸鼠数字随机分为 3 组,联合 AMSCs 胰岛移植组裸鼠经背部皮下联合注射 2×10^7 人的 AMSCs 及 6 000 IEQ/kg 人的胰岛;单纯胰岛移植组裸鼠经背部皮下注射 6 000 IEQ/kg 人的胰岛;PBS 对照组裸鼠经背部皮下注射等剂量 PBS 液。并设 6 只非糖尿病雄性 Ba1b/c 裸鼠为正常对照组。

5. 胰岛存活的判定:分别于胰岛移植前及移植后每 2 d(清晨 8:00~9:00)测尾静脉血糖浓度,同时尾静脉采血 0.5 ml, -20°C 保存,ELISA 试剂盒测定血清胰岛素浓度。空腹血糖浓度连续 2 次 ≤ 11.1 mmol/L 定义为移植胰岛存活,空腹血糖连续 2 次 > 11.1 mmol/L 或随机血糖连续 2 次 > 16.7 mmol/L 定义为移植胰岛功能丧失^[11]。记录每组胰岛移植平均存活时间(mean survival time, MST)。

6. 胰岛移植物的免疫组化检查:取移植后第 7 天的胰岛移植体,4 g/L 的多聚甲醛中固定 24 h,然后制作 $4 \mu\text{m}$ 的石蜡切片,行兔抗人胰岛素单克隆抗体、羊抗鼠 CD31 单克隆抗体及生物素标记的驴抗兔、抗羊的二抗免疫组化双染;兔抗人胰岛素单克隆抗体、羊抗人 Fas 单克隆抗体及生物素标记的驴抗兔、抗羊的二抗免疫组化双染。在 200 倍光镜下记录 5 个视野内胰岛数及胰岛直径并换算成 IEQ,同时记录胰岛素及 Fas 染色阳性胰岛细胞数,计算阳性表达率(阳性胰岛细胞数/IEQ)。微血管密度(microvascular density, MVD)的测量参照 Sakata 等^[12] 报道的实验方法,根据移植体 CD31 免疫组化染色,在 100 倍光镜下记录 5 个视野内 CD31 阳性血管的数目,计算单位面积的平均 MVD。

三、统计学处理

应用 SPSS 19.0 软件分析处理,数据以 Mean \pm SD 表示,采用 One-way ANOVA 伴随 LSD-*t* 检验分析各组数据,血糖及血清胰岛素变化采用多元分析,胰岛移植后对移植效果进行 Kaplan-Meier 生存分析和 Log-rank 检验。 $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

结 果

一、AMSCs 的形态与鉴定

原代 AMSCs 形态多样,呈贴壁克隆样生长,形态混杂;经 3~5 次传代,逐渐呈典型的均一的长梭形纤维细胞样形态,漩涡状或辐射状生长,与文献报道的间充质细胞形态相符(图 1A)。AMSCs 经 CD31、CD34、CD44、CD49d 抗体荧光染色检测其表面相关抗原,荧光显微镜下观察分析,结果如下:CD31、CD34 呈阴性反应,CD44、CD49d 呈阳性反应,符合文献报道的 AMSCs 表面相关抗原谱状况(图 1B~E)。AMSCs 体外多向诱导分化见 AMSCs 向脂肪细胞诱导分化 6 d,部分细胞形态发生明显改变,从长梭形类成纤维细胞外观逐渐变圆,并且开始出现充满脂滴的细胞,成脂诱导 10 d,充满脂滴的细胞进一步增多,油红 O 染色阳性;AMSCs 向成骨细胞诱导分化 4 d,部分细胞形态由长梭形变为扁圆形,胞膜有多个伪足伸展,细胞外基质有少量钙盐沉积,成骨诱导 14 d,钙盐沉积增加,茜素红染色阳性(图 1F、G)。

二、胰岛数量及纯度

纯化后的胰岛形态完整,80%胰岛直径为 100~350 μm ,直径为 $(172 \pm 84) \mu\text{m}$ 。平板计数法计算单位质量胰腺收获的胰岛数量为 $(2\ 681 \pm 473)$ 个/g 胰腺,换算成每克胰腺的当量为 $(4\ 135 \pm 1\ 328)$ IEQ。计算收获胰岛的纯度为 $(76.52 \pm 6.79)\%$ 。

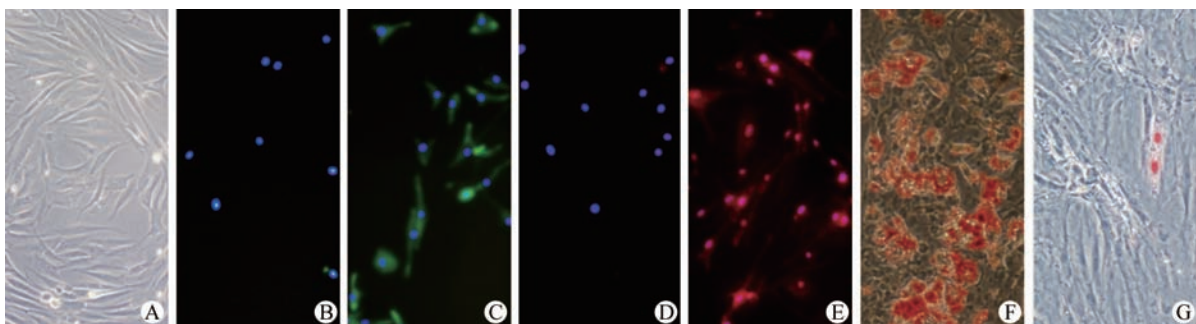


图 1 脂肪间充质干细胞形态、免疫荧光及鉴定($\times 200$) A. 3 代 AMSCs 形态呈均一长梭形,呈漩涡状生长;B. AMSCs 的 FITC-CD31 染色阴性;C. AMSCs 的 FITC-CD44 染色阳性;D. AMSCs 的 PE-CD34 染色阴性;E. AMSCs 的 PE-CD49d 染色阳性;F. AMSCs 成脂分化诱导 10 d,油红 O 染色阳性;G. AMSCs 成骨诱导 14 d,茜素红染色阳性

三、糖尿病裸鼠胰岛移植后血糖和胰岛素水平

多元分析结果显示,胰岛移植后,联合 AMSCs 胰岛移植组裸鼠血糖及血清胰岛素浓度与单纯胰岛移植组比较,差异均有统计学意义(表 1、2, $P < 0.01$),其中联合 AMSCs 胰岛移植组优于单纯胰岛移植组。糖尿病裸鼠血糖浓度于胰岛移植术后第 1 天均开始下降,联合 AMSCs 胰岛移植组血糖浓度下降 7 d 后,波动于 7.1~11.4 mmol/L 低水平;单纯胰岛移植组血糖浓度下降 3 d 后即不再下降,波动于 9.9~13.4 mmol/L 的相对较高水平。糖尿病裸鼠血清胰岛素浓度于胰岛移植术后第 1 天均开始上升,联合 ECs 胰岛移植组血清胰岛素浓度上升 7 d 后保持在 9.2~10.8 mU/L 的高水平;单纯胰岛移植组血清胰岛素浓度上升 3 d 后即不再上升,维持在 5.5~7.6 mU/L 的相对较低水平。

四、移植胰岛的生存分析

联合 AMSCs 胰岛移植组胰岛移植术后胰岛移植植物 MST 为(81.33 ± 7.58)d,单纯胰岛移植组胰岛移植术后胰岛移植植物 MST 为(58.17 ± 6.91)d。经 Log-rank 检验,联合 AMSCs 胰岛移植组胰岛移植植物 MST 与单纯胰岛移植组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

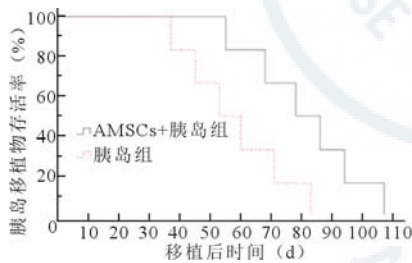


图 2 胰岛移植植物生存分析,经 Log-rank 检验,联合 AMSCs 胰岛移植组与单纯胰岛移植组比较, $P < 0.05$

五、胰岛移植物的组化检查

移植后第 7 天,CD31 和胰岛素免疫组化双染结果显示(图 3A、4B):分泌胰岛素的活性胰岛细胞被染成棕色,表达 CD31 的 ECs 被染成蓝色;联合 AMSCs 胰岛移植组胰岛移植植物及周围有大量 CD31 阳性的血管内皮细胞(ECs),可见大量血管腔形成;单纯胰岛移植组胰岛移植植物及周围蓝色的 ECs 密度低于联合 ECs 胰岛移植组,血管腔数量少于联合 AMSCs 胰岛移植组。光镜下 CD31 阳性血管计数结果显示,联合 AMSCs 胰岛移植组每平方毫米移植植物微血管密度(MVD)为 21.8 ± 5.6 ,显著高于单纯胰岛移植组的 14.6 ± 4.1 ($P < 0.05$)。

移植后第 7 天,Fas 和胰岛素免疫组化双染结果显示(图 3C、4D):分泌胰岛素的活性胰岛细胞被染成棕色,表达 Fas 的凋亡细胞被染成蓝色;联合 AMSCs 胰岛移植组移植植物胰岛素染色强度高于单纯胰岛移植组,联合 AMSCs 胰岛移植组移植植物内胰岛素阳性表达细胞数为(617.4 ± 42.8)/IEQ,大于单纯胰岛移植组的(326.7 ± 25.4)/IEQ ($P < 0.01$);单纯胰岛移植组移植植物凋亡胰岛细胞密度高于联合 AMSCs 胰岛移植组,并可见部分胰岛毁损;单纯胰岛移植组移植植物内凋亡胰岛细胞数为(584.3 ± 32.6)/IEQ,大于联合 AMSCs 胰岛移植组的(265.9 ± 21.2)/IEQ ($P < 0.01$)。

讨论

随着临床胰岛移植的进展,亦发现了许多制约胰岛移植发展的因素^[1-2]。其中研究发现,胰岛在分离及纯化过程中,由于缺血、缺氧及胰腺消化后释放的各种消化酶,均可引起胰岛的细胞性及非细胞性损伤并破坏胰岛赖以生存的微环境,导致胰岛细胞凋亡;同时由于胰岛的分离纯化过程破坏了其内部

表 1 糖尿病大鼠胰岛移植后血糖比较(Mean ± SD, mmol/L)

组别	例数	移植前	移植后										
			第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 42 天	第 60 天	第 80 天	第 100 天	第 120 天
AMSCs+胰岛组	6	24.6 ± 1.3	15.6 ± 1.9	7.1 ± 0.9	7.2 ± 0.9	7.4 ± 1.0	8.1 ± 0.8	8.6 ± 0.6	9.5 ± 0.7	10.1 ± 0.8	10.7 ± 0.3	11.1 ± 0.3	11.4 ± 0.3
胰岛组	6	24.7 ± 1.1	16.9 ± 1.4 ^a	9.9 ± 0.8 ^a	9.9 ± 0.5 ^a	10.2 ± 0.5 ^a	10.5 ± 0.4 ^a	10.7 ± 0.3 ^a	10.9 ± 0.3 ^a	11.5 ± 0.4 ^a	11.9 ± 0.6 ^a	12.6 ± 0.9 ^a	13.4 ± 1.3 ^a
PBS 对照组	6	25.4 ± 1.5	25.1 ± 1.4 ^a	24.8 ± 1.6 ^a	25.0 ± 1.1 ^a	24.7 ± 1.6 ^a	24.3 ± 1.3 ^a	25.2 ± 1.6 ^a	24.9 ± 1.8 ^a	24.8 ± 1.5 ^a	24.6 ± 1.6 ^a	24.6 ± 1.4 ^a	24.5 ± 1.3 ^a
正常对照组	6	6.2 ± 0.9	6.1 ± 0.8 ^a	6.2 ± 0.9 ^a	6.0 ± 0.7 ^a	6.1 ± 0.8 ^a	6.2 ± 0.6 ^a	6.1 ± 0.8 ^a	6.1 ± 1.0 ^a	6.0 ± 0.8 ^a	6.1 ± 0.7 ^a	6.1 ± 0.6 ^a	6.0 ± 0.7 ^a

注:^a与联合脂肪间充质干细胞(AMSCs)胰岛移植组比较 $P < 0.01$

表 2 糖尿病大鼠胰岛移植后血清胰岛素浓度比较(Mean ± SD, mU/L)

组别	例数	移植前	移植后										
			第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 42 天	第 60 天	第 80 天	第 100 天	第 120 天
AMSCs+胰岛组	6	2.1 ± 0.3	2.9 ± 0.5	8.2 ± 1.3	10.8 ± 1.1	10.8 ± 1.0	10.7 ± 1.2	10.1 ± 1.3	9.8 ± 1.2	9.6 ± 1.5	9.5 ± 1.4	9.3 ± 1.5	9.2 ± 1.4
胰岛组	6	2.2 ± 0.4	2.4 ± 1.3 ^a	7.6 ± 1.1 ^a	7.2 ± 0.9 ^a	6.8 ± 0.9 ^a	6.6 ± 1.0 ^a	6.2 ± 0.9 ^a	5.9 ± 1.1 ^a	5.8 ± 1.0 ^a	5.7 ± 1.2 ^a	5.6 ± 0.3 ^a	5.5 ± 1.2 ^a
PBS 对照组	6	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.2 ^a	1.9 ± 0.2 ^a	1.8 ± 0.3 ^a	1.6 ± 0.3 ^a	1.7 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.5 ^a	1.7 ± 0.4 ^a	1.7 ± 0.6 ^a	1.6 ± 0.4 ^a	1.6 ± 0.5 ^a	1.6 ± 0.4 ^a
正常对照组	6	12.7 ± 1.5	12.8 ± 1.4 ^a	11.9 ± 1.1 ^a	12.0 ± 0.9 ^a	11.8 ± 1.0 ^a	12.5 ± 1.2 ^a	12.8 ± 1.3 ^a	12.1 ± 1.1 ^a	12.6 ± 1.2 ^a	12.4 ± 1.1 ^a	11.9 ± 0.9 ^a	12.7 ± 1.4 ^a

注:^a与联合脂肪间充质干细胞(AMSCs)胰岛移植组比较 $P < 0.01$

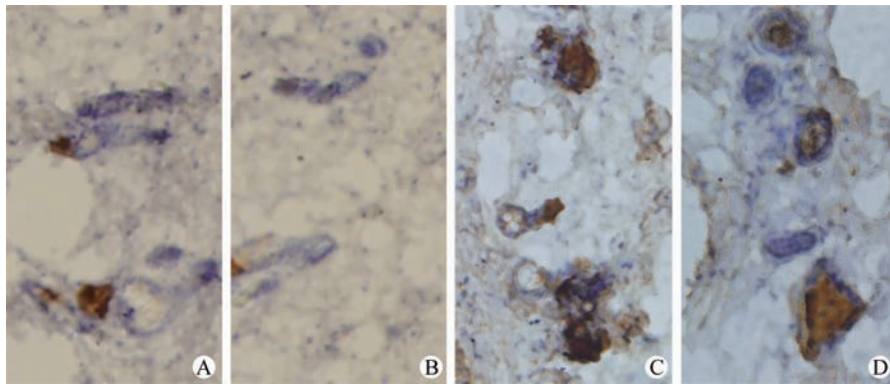


图3 胰岛移植组胰岛素、CD31 和 Fas 表达的免疫组化检测($\times 200$) A. 脂肪间充质干细胞(AMSCs) + 胰岛移植组 CD31 和胰岛素免疫组化酶双染; B. 单纯胰岛移植组 CD31 和胰岛素免疫组化酶双染; C. AMSCs + 胰岛移植组 Fas 和胰岛素免疫组化酶双染; D. 单纯胰岛移植组 Fas 和胰岛素免疫组化酶双染

微循环血管的连续性,导致胰岛移植后无法像胰腺移植那样立即恢复血运,而重建血运系统需要相当长的时间,因此胰岛细胞处于长期缺血、缺氧状态,这必将加重胰岛细胞的缺血性及非缺血性凋亡,影响胰岛细胞的存活及功能^[3-5]。因此,为移植的胰岛创造一个适宜的生存微环境以保持其生物活性,并促进其血管再生已成为胰岛移植面临的一个重要课题。

脂肪间充质干细胞(AMSCs)是从脂肪组织中分离获得的一种间充质干细胞,和骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)统计学意义比较,其在细胞增殖、多向分化潜能及表面抗原特性等方面差异没有统计学意义,但AMSCs相比BMSCs具有来源广泛、取材方便及对机体损伤小等优点^[6,13]。研究证实,和BMSCs一样,AMSCs不仅能够通过旁分泌产生大量的HGF、VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor-1, IGF-1)、基质衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)等营养因子及生长因子,而且还可以产生聚集素蛋白、胶原蛋白、层粘连蛋白等细胞外间质组分,这些营养因子、生长因子及细胞外间质组分除具有广泛的营养支持作用外,还直接参与细胞的黏附、组织结构的修复及细胞凋亡诱发相关基因表达的抑制等,从而可改善损伤局部的微环境,抑制细胞凋亡^[7-8,14-18]。我们前期在AMSCs与胰岛细胞体外联合培养的研究中已经发现,AMSCs能够通过其分泌的HGF、VEGF等多种细胞因子改善体外培养的胰岛细胞的存活及功

能^[9]。并且目前国内外胰岛移植研究中,间充质干细胞分泌的相关细胞因子对损伤胰岛的修复作用亦已得到证实。如Fiaschi-Taesch等^[19]研究证实,HGF与胰岛细胞HGF受体结合后,除可以通过PI-3K-PKB/Akt通路促进胰岛细胞存活、抑制胰岛细胞凋亡外,还可通过PI-3K-PKB/Akt通路调节胰岛素分泌、促进胰岛移植功能的改善。Hlavaty等^[20]应用持续释放营养因子IGF-1的聚丙交酯乙交酯共聚物[poly(lactide-co-glycolide), PLG]支架包裹胰岛体内移植的研究发现,含有IGF-1的PLG支架包裹胰岛较不含IGF-1的PLG支架包裹胰岛体内移植能够显著改善胰岛移植功能并延长其存活时间。至于VEGF,则是血管内皮细胞特异性的生长因子,具有显著促进血管内皮细胞增殖及新生血管形成的功能,尽管Kaiser等^[21]和Figliolini等^[22]研究发现,源自于移植胰岛细胞分泌的细胞外囊泡含有VEGF等促进血管生成的细胞因子,但其表达量仍不足以尽快恢复胰岛移植微循环的完整性。因此,根据AMSCs的细胞分泌特点,我们在前期AMSCs联合胰岛体外培养的研究基础上,应用AMSCs联合胰岛体内移植,以期利用AMSCs分泌的HGF等营养生长因子及细胞外间质组分来改善胰岛细胞的生存及功能,并利用AMSCs分泌的VEGF等促血管生长因子促进移植胰岛的血管再生,以减轻胰岛移植物的缺血缺氧性损伤。

本研究应用人的AMSCs联合胰岛于糖尿病裸鼠皮下移植时发现,胰岛移植后第7天,免疫组化双染结果显示联合AMSCs胰岛移植组胰岛移植物的胰岛素染色强度、胰岛移植组及胰岛周围结果显示MVD均高于单纯胰岛移植组,自杀相关因子(Fas)

的表达密度则低于单纯胰岛移植组。多元分析糖尿病裸鼠血糖、胰岛素水平结果显示,联合 AMSCs 胰岛移植组的血糖控制水平及血清胰岛素的分泌水平优于单纯胰岛移植组($P < 0.01$)。胰岛移植生存分析显示,联合 AMSCs 胰岛移植组胰岛移植于移植术后平均存活时间长于单纯胰岛移植组($P < 0.05$)。根据以往的 AMSCs 联合胰岛体外培养实验结果及以上实验结果说明,AMSCs 联合胰岛体内移植能够通过 AMSCs 分泌的营养生长因子及细胞外间质组分改善胰岛移植物的生存及功能,减少胰岛细胞凋亡,并促进胰岛移植物的血管再生,至于 AMSCs 分泌的营养生长因子及细胞外间质组分改善胰岛移植生存及功能的具体机制,则需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Shapiro AM. Islet transplantation in type 1 diabetes: ongoing challenges, refined procedures, and long-term outcome[J]. Rev Diabet Stud, 2012, 9 (4): 385-406. DOI: 10.1900/RDS.2012.9.385.
- [2] Emamaullee JA, Shapiro AM. Factors influencing the loss of beta-cell mass in islet transplantation[J]. Cell Transplant, 2007, 16(1): 1-8. DOI: 10.3727/000000007783464461.
- [3] Molnár C, Essand M, Wennberg L, et al. Islet engraftment and revascularization in clinical and experimental transplantation[J]. Cell Transplant, 2013, 22 (2): 243-251. DOI: 10.3727/096368912X640637.
- [4] Komatsu H, Kandeel F, Mullen Y. Impact of oxygen on pancreatic islet survival[J]. Pancreas, 2018, 47(5): 533-543. DOI: 10.1097/MPA.0000000000001050.
- [5] Sakata N, Obenaus A, Chan NK, et al. Correlation between angiogenesis and islet graft function in diabetic mice: magnetic resonance imaging assessment[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2010, 17 (5): 692-700. DOI: 10.1007/s00534-010-0269-1.
- [6] Witkowska-Zimny M, Walenko K. Stem cells from adipose tissue[J]. Cell Mol Biol Lett, 2011, 16(2): 236-257. DOI: 10.2478/s11658-011-0005-0.
- [7] 焦自钊, 薛武军, 田晓辉, 等. ADSCs 与 HUVECs 体外共培养促进 HUVECs 增殖及成血管化作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2016, 37 (4): 493-499. DOI: 10.7652/jdyxb201604006.
- [8] Wlodarski KH, Wlodarski P, Galus R, et al. Adipose mesenchymal stem cells. Their characteristics and potential application in tissue repair[J]. Pol Orthop Traumatol, 2012, 77: 97-99.
- [9] 焦自钊, 薛武军, 田晓辉, 等. 共培养中成人脂肪干细胞促进胰岛细胞存活及功能的研究[J]. 中华器官移植杂志, 2015, 36 (9): 549-555. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2015.09.010.
- [10] Papas KK, Colton CK, Nelson RA, et al. Human islet oxygen consumption rate and DNA measurements predict diabetes reversal in nude mice[J]. Am J Transplant, 2007, 7 (3): 707-713. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01655.x.
- [11] Davalli AM, Perego L, Bertuzzi F, et al. Disproportionate hyperproinsulinemia, beta-cell restricted prohormone convertase 2 deficiency, and cell cycle inhibitors expression by human islets transplanted into athymic nude mice: insights into nonimmune-mediated mechanisms of delayed islet graft failure[J]. Cell Transplant, 2008, 17 (12): 1323-1336.
- [12] Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, et al. Strategy for clinical setting in intramuscular and subcutaneous islet transplantation[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2014, 30 (1): 1-10. DOI: 10.1002/dmrr.2463.
- [13] Zhu X, Shi W, Tai W, et al. The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells[J]. Cell Tissue Res, 2012, 350 (2): 277-287. DOI: 10.1007/s00441-012-1453-1.
- [14] Fu Y, Karbaat L, Wu L, et al. Trophic effects of mesenchymal stem cells in tissue regeneration[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2017, 23 (6): 515-528. DOI: 10.1089/ten.TEB.2016.0365.
- [15] Liang X, Ding Y, Zhang Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives[J]. Cell Transplant, 2014, 23 (9): 1045-1059. DOI: 10.3727/096368913X667709.
- [16] Shen T, Shen J, Zheng QQ, et al. Cell viability and extracellular matrix synthesis in a co-culture system of corneal stromal cells and adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. Int J Ophthalmol, 2017, 10 (5): 670-678. DOI: 10.18240/ijo.2017.05.02.
- [17] Zeng YL, Zheng H, Chen QR, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing MiR-21 efficiently repair myocardial damage in rats[J]. Oncotarget, 2017, 8 (17): 29161-29173. DOI: 10.18632/oncotarget.16254.
- [18] Zheng K, Wu W, Yang S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell implantation for the treatment of radioactivity induced acute skin damage in rats[J]. Mol Med Rep, 2015, 12 (5): 7065-7071. DOI: 10.3892/mmr.2015.4270.
- [19] Fiaschi-Taesch NM, Berman DM, Sicari BM, et al. Hepatocyte growth factor enhances engraftment and function of nonhuman primate islets[J]. Diabetes, 2008, 57 (10): 2745-2754. DOI: 10.2337/db08-1085.
- [20] Hlavaty KA, Gibly RF, Zhang X, et al. Enhancing human islet transplantation by localized release of trophic factors from PLG scaffolds[J]. Am J Transplant, 2014, 14 (7): 1523-1532. DOI: 10.1111/ajt.12742.
- [21] Kaiser R, Dubový P, Haninec P. Vascular endothelial growth factor[J]. Cesk Fysiol, 2011, 60(2): 48-51.
- [22] Figliolini F, Cantaluppi V, De Lena M, et al. Isolation, characterization and potential role in beta cell-endothelium cross-talk of extracellular vesicles released from human pancreatic islets[J]. PLoS One, 2014, 9 (7): e102521. DOI: 10.1371/journal.pone.0102521.

(收稿日期:2019-03-24)