

• 胰岛移植专题 •

大鼠间充质干细胞联合猪小肠黏膜下层支架
胰岛移植治疗糖尿病大鼠的效果研究王丹¹ 李杨² 王颖² 郑瑾² 薛武军² 丁小明²¹内蒙古医科大学附属医院泌尿外科,呼和浩特 010050;²西安交通大学第一附属医院肾脏病医院肾移植科 710061

通信作者:丁小明,Email:xmding1970@163.com

【摘要】目的 构建间充质干细胞(MSC)联合小肠黏膜下层(SIS)支架,评估其对胰岛移植治疗糖尿病大鼠的效果。**方法** 分离纯化大鼠胰岛,获取大鼠骨髓间充质干细胞和猪小肠黏膜下层,构建 MSC-SIS 支架。18 只 SD 大鼠制备糖尿病模型后,分为单纯胰岛组、SIS 组、MSC-SIS 组。各组背部皮下植入相对应胰岛细胞,移植后第 14 d 免疫荧光检测各组移植植物胰岛素和 CD31 的表达情况,蛋白芯片检测各组血清细胞因子水平。采用单因素方差分析比较各组移植效果。**结果** MSC-SIS 组胰岛素及 CD31 表达高于其他两组,且血清中的 VEGFA 水平升高, TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明 MSC-SIS 这种生物支架材料,可明显提高移植物的功能,促进胰岛素和 CD31 的表达,其机制可能与 MSC 分泌的相关细胞因子促进血管生成、降低炎症反应等作用相关。**结论** MSC 联合 SIS 支架可提高胰岛移植效果,为糖尿病的治疗提供新的参考方法和理论基础。

【关键词】 胰岛移植; 间充质干细胞; 小肠; 支架**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81970670, 81970668); 陕西省自然科学基金研究计划(2019JM-116); 内蒙古自治区自然科学基金(2019BS08004)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.09.004

Study on diabetic rat therapy by islet transplantation with rat mesenchymal stem cells and scaffold of pig small intestinal submucosalWang Dan¹, Li Yang², Wang Ying², Zheng Jin², Xue Wujun², Ding Xiaoming²¹Department of Urology, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China; ²Department of Renal Transplantation, Center of Nephropathy, First Affiliated Hospital, Medical of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Corresponding author: Ding Xiaoming, Email: xmding1970@163.com

【Abstract】Objective Engineer a scaffold with mesenchymal stem cells and small intestinal submucosal to evaluate the effect of islet transplantation in diabetic rats. **Methods** MSC and pancreatic islets were isolated from Sprague-Dawley rats, and SIS was isolated from Bamei pigs. MSC were seeded on the SIS to construct MSC-SIS scaffold. The STZ-induced diabetic rats were divided into three groups: islets, SIS, and MSC-SIS. The expressions of insulin and CD31 were detected by immunofluorescence on the 14th day after transplantation, and serum cytokines were detected by protein microarray. One-way ANOVA was used to compare the transplantation effect of each group. **Results** In MSC-SIS group, the expressions of insulin and CD31 were significantly higher than those in the other two groups. Cytokines of VEGFA were increased while TNF- α , IFN- γ and IL-6 decreased, showing a significant difference ($P < 0.05$). These results suggest that MSC-SIS scaffold significantly improve graft function and promote the expression of insulin and CD31, which may be related to the angiogenesis and anti-inflammatory effects of MSC. **Conclusions** Mesenchymal stem cells combined with intestinal submucosal scaffold can improve the effect of islet transplantation and provide a new method for the treatment of diabetes.

【Key words】 Islet transplantation; Mesenchymal stem cells; Small intestine; Stent**Fund program:** National Nature Science Foundation of China (81970670, 81970668); Natural Science Basic Research Program of Shaanxi (2019JM-116); Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region(2019BS08004)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.09.004

随着社会经济的发展和人类饮食习惯的改变,糖尿病的发病率逐年上升。据世界糖尿病联合会(IDF)

报道,预计到 2045 年,全球糖尿病患者将高达 6.93 亿。虽然临床胰岛移植为糖尿病治愈带来了希望,但

仍面临供体来源不足、移植物功能低下和血管重建缓慢等问题。我们前期研究发现^[1], 小肠黏膜下层(SIS)包被间充质干细胞(MSC), 可保护胰岛功能、提高移植细胞的存活时间, 但相关机制有待进一步研究。基于前期研究, 本实验拟构建间大鼠 MSC 联合猪小肠黏膜下层(SIS)支架, 为移植胰岛提供适合的微环境, 探讨其治疗糖尿病大鼠的作用机制, 为胰岛移植的临床应用奠定理论基础。

材料与方法

一、实验动物与主要试剂

1. 实验动物: MSC 来源于雄性 SD 大鼠, 3~4 周龄, 体重为 40~60 g; 胰岛供鼠和受鼠均为雄性 SD 大鼠, 8~10 周龄, 体重为 200~250 g, 供受鼠体重相差不超过 10 g。所有大鼠均为无固定病原体(SPF)级别, 由西安交通大学实验动物中心提供。小肠黏膜下层(SIS)来源于雄性西北八眉猪, 10 月龄, 体重 50~60 kg, 由市场购其新鲜近段空肠。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

2. 主要试剂: MSC 培养基购自北京赛业生物科技公司, 胎牛血清、RPMI 1640 培养基购自 GIBCO 公司, 胰岛素单克隆抗体及 CD31 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司, Alexa 488 荧光抗体及 Cy3 荧光抗体购自 Jackson 公司, 蛋白芯片购自广州锐博公司, 胶原酶 P 购自 Roche 公司, Histopaque-1077、STZ 购自 sigma 公司。

二、胰岛的分离和鉴定

大鼠麻醉开腹后暴露胆总管, 剪心放血后, 胆总管内灌注胶原酶 P, 迅速摘除胰腺; 37 °C 水浴消化 12 min, 充分震荡至泥沙状终止消化; 再用 Histopaque-1077 淋巴细胞分离液体纯化胰岛, 经双硫脲染色鉴定纯度、吡啶橙/碘化丙啶染色鉴定活性。

三、MSC-SIS 支架的制备和鉴定

1. MSC 与 SIS 的获取: SD 大鼠颈椎脱位处死后取股骨骨髓, 分离培养出 P3 代骨髓间充质干细胞, 采用流式细胞仪对其表面标志 CD90、CD45 进行鉴定; 将猪小肠按文献^[2]方法去除细胞成分, 获得实验所需的无菌 SIS。

2. MSC-SIS 支架的制备: 将上述获取的 SIS 裁剪成 22 mm×22 mm 大小, 将 P3 代 MSC 以 1×10^6 细胞数量种植于 SIS 上, 放入温度 37 °C、CO₂ 体积浓度 5 %、饱和湿度的培养箱中共培养 48 h, 形成 MSC-SIS 支架。

3. MSC-SIS 支架的鉴定: 制备好的支架分别用

扫描电镜和透射电镜进行鉴定: 2.5 % (质量分数) 戊二醛 4 °C 固定过夜, 用 0.01 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液洗涤后, 1 % 锇酸 4 °C 固定 1 h。丙酮(质量分数 35 %、55 %、75 %、85 %、95 %) 梯度脱水, 一部分室温下乙酸异戊酯(质量分数 100 %) 中置换 2 h, 经液态 CO₂ 干燥粘托后喷金扫描电镜观察; 另一部分用环氧树脂 Epon812 包埋, 切片后醋酸双氧铀及枸橼酸铅双染色透射电镜观察。

四、STZ 诱导大鼠糖尿病模型及胰岛移植

1. STZ 诱导大鼠糖尿病模型: 18 只 SD 大鼠禁食不禁水 3 h 后, 分别称重, 按每只 50 mg/kg 快速腹腔注射 STZ, 然后再每 2 d 测定 1 次随机血糖和体重。当连续 3 d 随机血糖 > 16.7 mmol/L, 为糖尿病大鼠造模成功。

2. 胰岛移植: 所有 SD 大鼠 10 % (质量分数) 水合氯醛按照 0.3~0.6 ml/100g 腹腔注射麻醉后, 背部皮肤备皮、消毒。随机分为以下 3 组(每组 6 只):

(1) 单纯胰岛组(A 组): 将 1000 IEQ 的胰岛输入背部皮下。

(2) SIS 组(B 组): SIS 缝合成囊袋状后将 1 000 IEQ 胰岛输入其中。背部皮下切开长约 2 cm 的切口, 植入 SIS 囊袋后缝合包扎。

(3) MSC-SIS 组(C 组): 同法将 MSC-SIS 材料制备囊袋, 输入 1000 IEQ 胰岛后植入大鼠背部皮下。

3. 移植效果评价

(1) 血糖测定: 移植前测定大鼠随机血糖水平, 为降低血糖波动形成的组间误差, 移植后每日上午 9:00~10:00 尾静脉采血, 血糖仪检测血糖水平, 绘制变化曲线。

(2) 胰岛素水平: 移植前每只大鼠尾静脉针刺后采血, 移植后每隔 7 d 采血一次(上午 9:00~10:00 之间)。血样离心后取血清, 酶联免疫吸附测定法测定血清胰岛素水平, 绘制胰岛素变化曲线。

(3) 采用免疫荧光检测各组移植物胰岛素和 CD31 的表达情况。移植后 14 d 各组移植物制备冰冻切片。使用 1:1 的混合一抗(兔抗大鼠 INS 和小鼠抗大鼠 CD31) 4 °C 过夜后, 滴加 1:1 的混合二抗(Alexa 488 驴抗兔和 Cy3 驴抗小鼠), 洗片后 4' 6-二脒基-2-苯基吡啶复染。暗室内激光共聚焦下观察拍照, 采用 Image plus6 软件计算平均荧光强度(MFI)

五、细胞因子水平

采用蛋白芯片检测各组大鼠血清细胞因子水平。移植后 14 d 各组大鼠取血清, 按照说明书进行样品透析, 孵育后加入荧光剂-链霉亲和素, 洗片后

暗室内激光扫描仪扫描信号,采用 532 nm 绿色通道激发,观察拍照。采用AAR-BLG-1数据处理。

六、统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件处理数据,所有统计数据用 Mean ± SD 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、胰岛的鉴定

胰岛经胶原酶 P 消化和 Histopaque-1077 纯化后,经 DTZ 染色,可见胰岛细胞呈猩红色,圆形或椭圆形,表面呈颗粒状,大小不一,而周围腺泡细胞不染色。经 AO/PI 染色后,大部分活细胞呈绿色荧光,少部分外周凋亡细胞呈红色荧光(图 1),证明获取胰岛成功。

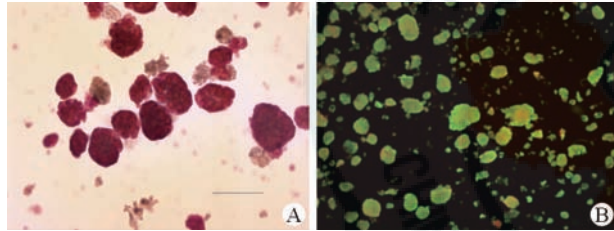


图 1 胰岛的鉴定(DTZ×100, AO/PI×100, 标尺 50 μm) A 为 DTZ 染色的胰岛细胞;B 为经 AO/PI 染色后的活细胞

二、骨髓间充质干细胞的鉴定

选取经培养、纯化后的 P3 代大鼠骨髓间充质干细胞,进行 PE-CD90、FITC-CD45 荧光染色后,经流式细胞仪检测,可见其高表达 CD90,不表达 CD45(图 2),证明所获得的 MSC 符合实验要求。

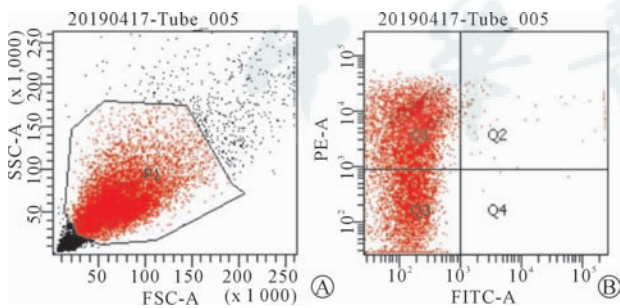


图 2 骨髓间充质干细胞的鉴定(PE-CD90 阳性, FITC-CD45 阴性) A 为流式细胞仪选取的门;B 为间充质干细胞 PE-CD90, FITC-CD45 染色后经流式细胞分析

三、MSC-SIS 支架的鉴定

制备好的 MSC-SIS 支架分别用扫描电镜和透射电镜进行鉴定,扫描电镜下可见条索样 SIS 纤维的孔隙中, MSC 细胞拥挤重叠,呈现簇状生长;透射电镜

下可见 SIS 纤维中包裹椭圆形的 MSC(图 3)。证明制备 MSC-SIS 支架符合进一步实验要求。

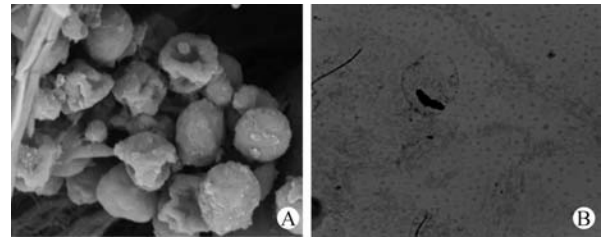


图 3 MSC-SIS 支架的鉴定 A 为扫描电镜下 MSC-SIS(×10 K, 标尺 10 μm);B 为透射电镜下 MSC-SIS(×5 K, 标尺 5 μm)
注: MSC-SIS 为间充质干细胞联合小肠黏膜下层支架

四、移植物功能评价

1. 移植后血糖和胰岛素的水平变化:3 组移植后第 1 d 血糖均下降到正常,此后缓慢升高(图 4)。A 组 7 d 升至(15.8 ± 3.21)mmol/L, 14 d 恢复到移植前水平;B 组 28 d 超过正常达(18.14 ± 2.24)mmol/L, 56 d 升高至移植前水平;C 组血糖维持正常水平最长,56 d 超过正常达到(20.23 ± 1.78)mmol/L。多元分析结果显示,各组间平均血糖水平差异有统计学意义($P < 0.05$),C 组血糖水平最佳。

血清胰岛素变化与血糖相似(图 4),3 组移植后第 1 d 胰岛素水平均明显升高, A 组(6.04 ± 1.02) mU/L, B 组(6.5 ± 1.34) mU/L, C 组(6.18 ± 0.94) mU/L。A 组 7 d 降至(4.1 ± 1.01) mU/L, 14 d 降低至移植前水平;B 组 7 d 维持在(5.82 ± 1.06) mU/L, 28 d 降至移植前水平;C 组 7 d 轻度上升,达到(7.08 ± 0.82) mU/L, 60 d 时降低至移植前水平。多元分析结果显示,各组间胰岛素差异有统计学意义($P < 0.05$),C 组胰岛素水平维持最佳。

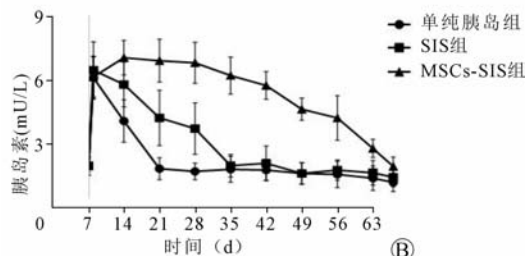
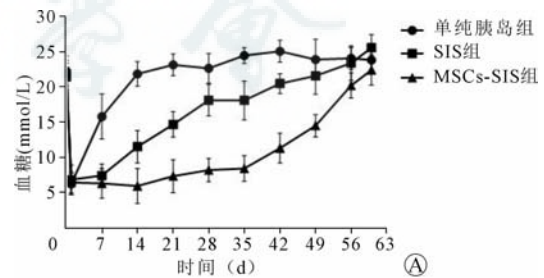


图 4 移植后血糖(A)和胰岛素(B)水平

2. 移植物胰岛素和 CD31 的表达情况: 移植后 14 d, 免疫荧光染色可见各组胰岛细胞核呈现蓝色荧光, 胰岛素呈现绿色荧光, CD31 呈现红色荧光。三组胰岛细胞均可表达胰岛素和 CD31。计算平均荧光强度(MFI), 可知 B、C 两组胰岛素表达量高于 A 组($P < 0.05$), 且 C 组高于 B 组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); C 组 CD31 表达量高于其他两组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而 A、B 两组间差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 1)。以上结果表明, C 组移植效果明显优于 A、B 组, 提示 SIS-MSC 在一定程度上保护胰岛形态结构, 提高胰岛细胞分泌胰岛素的功能, 且 MSC-SIS 支架提高移植物分泌胰岛素功能, 促进移植物血管生成。

表 1 各组移植后胰岛素及 CD31 的平均荧光强度(Mean \pm SD)

组别	胰岛素	CD31
单纯胰岛组	70.0 \pm 2.1	55.0 \pm 2.2
SIS 组	81.0 \pm 2.4 ^a	54.0 \pm 2.7
MSC-SIS 组	95.0 \pm 2.0 ^{ab}	78.0 \pm 2.3 ^{ab}

注: 与单纯胰岛组比较, ^a $P < 0.05$; 与 SIS 组比较, ^b $P < 0.05$; SIS 为小肠黏膜下层; MSC 为间充质干细胞

3. 各组血清细胞因子水平: 为比较移植后各组血清细胞因子变化情况, 采用蛋白芯片检测分析, 数据处理后, 可知 C 组血清中的血管内皮生长因子 A (VEGFA) 高于 A、B 两组, 而肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素 6 (IL-6) 低于 A 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 表 2)。说明 MSC-SIS 支架可促进血管生成因子的表达, 降低相关炎症因子的水平。

表 2 各组移植后血清细胞因子差异倍数

组别	VEGFA	TNF- α	IL-6	IFN- γ
单纯胰岛组	1.00	1.00	1.00	1.00
SIS 组	1.17	0.82	0.25	0.37
MSC-SIS 组	2.95 ^a	0.77 ^a	0.80 ^a	0.12 ^a

注: VEGFA 为血管内皮生长因子 A; TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ; IL-6 为白细胞介素 6; IFN- γ 为干扰素 γ ; 与单纯胰岛组比较, ^a $P < 0.05$; SIS 为小肠黏膜下层; MSC 为间充质干细胞

讨 论

许多研究表明, MSC 在维持胰岛形态、保护分泌功能、阻止早期炎症反应等^[3]起到重要作用。而 SIS 作为一种安全的天然生物材料, 由于其良好的生物相容性、可降解性^[4]、和低免疫原性在移植领域受到关注^[5]。本研究中, 我们用 MSC 种植于 SIS 上, 构建 MSC-SIS 新型复合生物材料, 并评估其对糖尿病大鼠的胰岛移植后效果。结果表明, SIS 疏

松的孔隙结构, 一方面有利于 MSC 的粘附生长, 另一方面包裹胰岛后不影响其胰岛素的分泌排出, 且构建的 MSC-SIS 支架可明显增加移植物中胰岛素和血管内皮标志 CD31 的表达, 提示该支架具有保护移植胰岛、促进血管生成的作用。此外, MSC-SIS 组移植效果优于 SIS 组, 表明 MSC 对移植物的存活起关键作用。蛋白芯片检测结果发现, MSC-SIS 组 VEGFA 显著升高, 而 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 明显降低。VEGFA 可高效特异地作用于血管内皮生长因子可溶性受体, 促进血管的生成; IFN- γ 、TNF- α 会对 β 细胞造成毒性损伤, 使其凋亡信号明显增加, 造成移植后炎症反应增加移植物的损伤^[6-7]。提示 MSC 可能通过旁分泌细胞因子起促进血管生成、降低炎症反应的作用。综上所述, 本实验构建的 MSC-SIS 生物支架材料, 可明显提高移植物的功能, 促进胰岛素和 CD31 的表达, 其机制可能与 MSC 分泌的相关细胞因子促进血管生成、降低炎症反应等作用相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 王丹, 丁小明, 郑瑾, 等. 猪小肠黏膜下层包被共培养后大鼠间充质干细胞对胰岛移植的保护作用[J]. 中华器官移植杂志, 2015, 36(12): 709-713. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2015.12.002.
- [2] Badyalak SF, Lantz GC, Coffey A, et al. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dogs[J]. J Surg Res, 1989, 47(1): 74-80. DOI: 10.1016/0022-4804(89)90050-4.
- [3] Sumi S, Yanai G. Fusion of mesenchymal stem cells and islet cells for cell therapy[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1313: 107-113. DOI: 10.1007/978-1-4939-2703-6_7.
- [4] Niknamasl A, Ostad SN, Soleimani M, et al. A new approach for pancreatic tissue engineering: human endometrial stem cells encapsulated in fibrin gel can differentiate to pancreatic islet beta-cell[J]. Cell Biol Int, 2014, 38(10): 1174-1182. DOI: 10.1002/cbin.10314.
- [5] Costa RG, Lontra MB, Scalco P, et al. Poly(lactic acid) film versus acellular porcine small intestinal submucosa mesh in peritoneal adhesion formation in rats[J]. Acta Cir Bras, 2009, 24(2): 128-135. DOI: 10.1590/S0102-86502009000200010.
- [6] Yeung TY, Seeberger KL, Kin T, et al. Human mesenchymal stem cells protect human islets from pro-inflammatory cytokines[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e38189. DOI: 10.1371/journal.pone.0038189.
- [7] SoRelle JA, Itoh T, Peng H, et al. Withaferin A inhibits pro-inflammatory cytokine-induced damage to islets in culture and following transplantation[J]. Diabetologia, 2013, 56(4): 814-824. DOI: 10.1007/s00125-012-2813-9.

(收稿日期: 2019-05-21)