

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.011.002
文章编号: 1005-8982 (2018) 011-0005-05

胃浆膜下层与门静脉胰岛移植治疗 糖尿病大鼠的实验研究

刘国涛¹, 郭栋¹, 刘全达², 程宇¹, 周丁华²

(1. 锦州医科大学火箭军总医院研究生培养基地, 辽宁 锦州 121001; 2. 中国人民解放军火箭军总医院, 北京 100088)

摘要: **目的** 通过比较胃浆膜下层与门静脉胰岛移植治疗糖尿病大鼠的功效, 探讨胰岛移植的最适宜部位。**方法** 链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠, 将其分为胃浆膜组、门静脉组、对照组, 每组 6 只; 经胆总管灌注胶原酶 XI 消化胰腺组织, 分离、纯化胰岛, 采用双硫腍 (DTZ) 特性染色并计数胰岛当量 (IEQ) 及纯度, 台盼蓝染色判断胰岛活性; 同期分别将 500 IEQ 大鼠胰岛移植入胃浆膜下层和门静脉, 对照组输注等量 RPMI 1640 液体, 移植后分别检测大鼠的血糖浓度, 腹腔葡萄糖耐量实验, 评判胰岛功能。**结果** 每只大鼠可获取胰岛 (310 ± 42) 个, DTZ 染色显示胰岛纯度为 (89.00 ± 4.52) %; 台盼蓝染色显示胰岛活性良好 [(89.08 ± 3.76) %]; 胰岛移植后胃浆膜组、门静脉组大鼠血糖较之前下降 ($P < 0.05$), 与对照组血糖浓度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 胃浆膜组与门静脉组胰岛移植后大鼠血糖浓度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 胃浆膜组与门静脉组大鼠有效控制血糖时间分别为 (18.0 ± 1.9) 和 (11.6 ± 2.5) d, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。胃浆膜组与门静脉组大鼠腹腔葡萄糖耐量实验提示糖耐受功能良好。**结论** 短期内, 胃浆膜下层胰岛移植治疗糖尿病大鼠的疗效优于门静脉移植; 与门静脉相比, 胃浆膜下层胰岛移植操作简单, 安全性高, 是胰岛移植的最适宜部位之一。

关键词: 糖尿病大鼠; 胰岛移植; 胃浆膜下层; 门静脉

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

Experimental study on gastric subserosa and portal vein islet transplantation for treatment of rat diabetes

Guo-tao Liu¹, Dong Guo¹, Quan-da Liu², Yu Cheng¹, Ding-hua Zhou²

(1. Graduate Training Base of the Rockets Army General Hospital, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. The Rockets Army General Hospital of PLA, Beijing 100088, China)

Abstract: Objective To explore the most suitable transplant site for islet transplantation by comparing the efficacy of gastric subserosal transplantation and portal vein islet transplantation in the treatment of diabetic rats. **Methods** Streptozotocin-induced diabetic rats were divided into gastric subserous group ($n = 6$), portal vein group ($n = 6$) and control group ($n = 6$). Type XI collagenase was injected through choledoch to digest the pancreas, and the islets were isolated and purified. The specificity of the islet was judged by dithizone (DTZ) staining, and IEQ and islets purity were counted. The activity of islets was determined by trypan blue test. 500IEQ fresh islets were transplanted into the gastric subserosa and into the portal vein, respectively. The control group was infused with the same amount of RPMI 1640. After islet grafting in the diabetic rats, the changes in blood glucose and intraperitoneal glucose tolerance were evaluated to assess the function of islets. **Results** The number of islets was (310 ± 42) in each transplanted rat, and the purity of islets was (89 ± 4.52)% obtained by DTZ staining and the activity of islets

收稿日期: 2017-08-22

[通信作者] 周丁华, E-mail: zhoudh@sina.com; Tel: 18910883003

was $(89.08 \pm 3.76)\%$ obtained by trypan blue staining. The glucose levels in the gastric subserous and portal vein groups were significantly decreased after transplantation compared with those before transplantation ($P < 0.05$) and significantly different from that in the control group ($P < 0.05$). After transplantation the average blood glucose level of the gastric subserous group was significantly lower than that of the portal vein group ($P < 0.05$). The time of effective control of blood glucose in the gastric subserous group and the portal vein group was (18.0 ± 1.9) d and (11.6 ± 2.5) d ($P < 0.05$). The rats of the gastric subserous and portal vein groups had good intraperitoneal glucose tolerance. **Conclusions** In the short term, the effect of gastric subserous islet transplantation for treatment of rat diabetes is better than that of portal vein islet transplantation. Compared with portal vein islet transplantation, the operation of gastric subserous pancreatic islet transplantation is simple and safe, and gastric subserosa can be considered as one of the most suitable parts of islet transplantation.

Keywords: diabetic rat; islet transplantation; gastric subserosa; portal vein

I 型糖尿病是由于胰岛 β 细胞缺失引起的自身免疫性疾病。精密的血糖监测和频繁的外源性胰岛素给药延迟了微血管疾病的进展,包括视网膜病变和神经病变,但并不能完全阻止这些并发症^[1]。如何治疗和预防 I 型糖尿病及并发症的发展,已成为迫切需要解决的任务。胰岛移植是治愈 I 型糖尿病最有希望的方法^[2]。但是,国内外对胰岛移植的部位还没有统一认识,选择较多的移植部位是门静脉、肾包膜等。因此,本实验通过比较胃浆膜下层和门静脉胰岛移植来观察糖尿病大鼠的治疗效果,寻找更为理想的移植部位,为临床应用提供实验和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8 ~ 10 周龄 SD 雌性大鼠 40 只(军事医学科学院实验动物中心)。

1.1.2 实验试剂 链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ)、胶原酶 XI、Hanks 液、Ficoll 400、RPMI 1640、台盼蓝购自美国 Sigma 公司,双硫腙 (Dithizone, DTZ) (北京国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 STZ 诱导糖尿病大鼠模型 取 8 周龄 SD 雌性大鼠 18 只,禁食 24 h (不禁水)。在黑暗环境中,将 STZ 粉末溶于柠檬酸缓冲液中 ($\text{pH } 4.2 \sim 4.6$)。采用 55 mg/kg STZ 腹腔一次给药,将受体大鼠诱导为 I 型糖尿病。注射后 72 h 检测非空腹血糖,连续 5 d 在固定时间 (上午 8 : 00 ~ 10 : 00) 检测大鼠非空腹血糖 $>16.7 \text{ mmol/L}$,并出现多尿、多饮、多食、体重下降等糖尿病症状,表明糖尿病大鼠模型复制成功。按照随机数字表法,将糖尿病大鼠分为胃浆膜组、门

静脉组、对照组,每组 6 只。

1.2.2 胰岛分离与纯化 10% 水合氯醛通过腹腔注射麻醉大鼠,取仰卧位固定。切开腹部,暴露胆总管。用动脉夹夹住胆总管上部,以及胆总管与十二指肠交汇处。穿刺胆总管,灌注 1 mg/ml 胶原酶 XI 溶液 $3 \sim 4 \text{ ml}$ 。胰腺充盈良好后 (见图 1),将胰腺组织完整切除,去除胰腺周围的脂肪和淋巴组织。将胰腺组织剪碎至约 1 mm 大小后移入离心管中,置于 38°C 水浴缸中消化 20 min ,轻微振荡 1 min ,见胰腺组织呈泥沙状,加入冷 RPMI 1640 液体 20 ml 终止消化。60 目不锈钢丝网过滤后,将细胞悬液于 4°C 、 $1\,000 \text{ r/min}$ 离心 5 min (标准加速度 $=9$,减速度 $=9$),弃上清,洗涤 3 次后均分到 15 ml 离心管中, 4°C 、 $1\,500 \text{ r/min}$ 离心 2 min 。向离心管中加入 25% Ficoll 4 ml 与沉淀物混匀,依次添加 23%、20% 和 11% Ficoll 各 2 ml , 4°C 、 $2\,000 \text{ r/min}$ 离心 15 min (标准加速度 $=5$,减速度 $=2$)。离心后将 20% ~ 23% 和 23% ~ 25% 界面的胰岛吸出,RPMI 1640 液洗涤 2 次,将分离出的胰岛移入 RPMI 1640 培养基,备用。

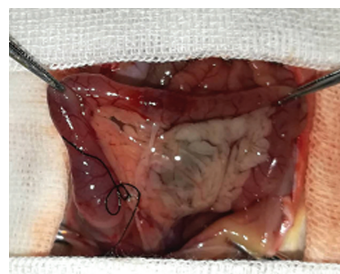


图 1 胰腺胶原酶 XI 灌注

1.2.3 胰岛当量 (islet equivalent, IEQ) 和纯度测定 对胰岛进行特异性染色,显微镜下 DTZ 阳性细胞染成猩红色,其他胰腺组织不着色。胰岛细胞直径 $>150 \mu\text{m}$ 为 1 IEQ^[3]。胰岛纯度 (%) = (DTZ 阳性细胞

数/细胞总数) $\times 100\%$ ^[4]。

1.2.4 胰岛活性测定 0.4% 台盼蓝染色判断胰岛细胞活性,正常活胰岛不着色;死细胞或细胞膜不完整的胰岛可被台盼蓝染成蓝色。胰岛细胞成活率(%) = $(1 - \text{死细胞数}) / \text{细胞总数} \times 100\%$ ^[4]。

1.2.5 胰岛移植 10% 水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉糖尿病大鼠,取仰卧位固定。上腹部正中切口,暴露大鼠胃远端,用无损伤组织镊固定胃远端,待胃节律性收缩后,将装有 1 ml 胰岛的注射器针头,穿刺进入胃浆膜下层,将备用的 500 IEQ 注入胃浆膜下层。穿刺完毕后,拔出针头,用干净无菌棉签按压穿刺部位 2 min,直到穿刺部位无液体渗出后,逐层关闭腹腔。术后肌内注射 20 万 u 青霉素钠,预防感染。同时按上述方法将同等数量的胰岛注入门静脉。对照组则将相同体积的 RPMI 1640 注射到胃浆膜下层和门静脉。

1.2.6 血糖监测 STZ 模型复制成功后连续 5 d 非空腹监测糖尿病大鼠血糖浓度,求其平均值。移植后 1 周内每天在固定时间(上午 8:00 ~ 9:00)监测血糖。以后监测血糖 3 次/周。非空腹血糖持续 ≤ 11.1 mmol/L 为移植胰岛功能正常的标准,非空腹血糖连续 2 d > 11.1 mmol/L 为移植胰岛功能丧失的标准^[5]。

1.2.7 腹腔葡萄糖耐量实验 移植后 10 d,禁食 12 ~ 18 h 后测量大鼠血糖浓度。每只动物腹腔内注射葡萄糖 2 g/kg,并在第 0、5、10、15、30、60、90 和 120 min 测量血糖浓度。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件,计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较采用 t 检验或方差分析,方差分析的两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰岛分离、纯化及活性判断

分离、纯化后的胰岛呈圆形或椭圆形细胞团(见图 2A);DTZ 染色后显微镜下观察胰岛呈猩红色,内含大量粗糙颗粒(见图 2B);选取直径 $\geq 150 \mu\text{m}$ 胰岛,每只大鼠可以获取 (310 ± 42) IEQ,纯度达 $(89.00 \pm 4.52)\%$ 。胰岛经台盼蓝染色后,可见胰岛周边被染成蓝色(见图 2C),胰岛存活率为 $(89.08 \pm 3.76)\%$ 。

2.2 胰岛移植前后血糖变化

胰岛移植后胃浆膜组和门静脉组大鼠血糖在 48 h 内降至正常,经 t 检验,差异有统计学意义($t = 6.081$ 和 11.837 , $P = 0.002$ 和 0.000)。移植前后,3 组大鼠平均血糖浓度比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验,门静脉组胰岛移植后的平均血糖浓度低于对照组($P < 0.05$);胃浆膜组胰岛移植后的平均血糖浓度低于门静脉组($P < 0.05$)。胃浆膜组和门静脉组大鼠胰岛移植前后血糖浓度比较,经 t 检验,差异有统计学意义($t = 6.406$ 和 7.086 , 均 $P = 0.000$),两组移植后血糖浓度低于移植前。见表 1。

对照组、胃浆膜组、门静脉组在胰岛移植后 1、3、5、7、11、14、18、21、25 和 28 d 的非空腹血糖浓度比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的血糖浓度有差异($F = 162.803$, $P = 0.000$);②3 组大鼠血糖浓度有差异($F = 2546.796$, $P = 0.000$),胃浆膜组和门静脉组的血糖浓度较对照组低,胃浆膜组和门静脉组胰岛移植后大鼠血糖控制较好;③3 组大鼠血糖浓度变化趋势有差异($F = 1591.211$, $P = 0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验,胃浆膜组和门静脉组大鼠 18 d 时血糖浓度与 21、25 和 28 d 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);21 和 25 d 血糖浓度与 28 d 比较,差异有统计学意义($P = 0.000$)。见表 2 和图 3。

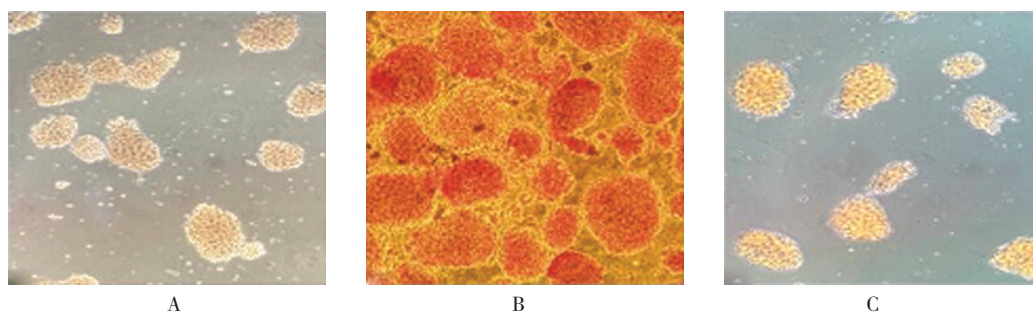


图 2 胰岛分离、纯化及活性判断 ($\times 10$)

2.3 胰岛移植后有效控制血糖时间比较

胰岛移植后胃浆膜组与门静脉组有效控制血糖时间分别为 (18.0 ± 1.9) 和 (11.6 ± 2.5) d,经 t 检验,差异有统计学意义($t=4.571$, $P=0.002$),胃浆膜组比门静脉组控制血糖时间更长。见图 4。

2.4 糖耐受功能比较

胰岛移植后 10 d, 对照组、胃浆膜组、门静脉组大鼠在空腹状态下行腹腔葡萄糖耐量实验。分别于腹腔注射 2 g/kg 葡萄糖后 0、5、10、15、30、60、90 和 120 min 监测血糖变化,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点血糖浓度有差异($F=285.789$, $P=0.000$);②3 组大鼠血糖浓度有差异($F=2131.676$, $P=0.000$),门静脉组和胃浆膜组的血糖浓度较对照组低,门静脉组和胃浆膜组糖耐受功能较好;③3 组大鼠血糖浓度变化趋势有差异($F=835.737$,

$P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验,30 min 时,3 组大鼠血糖浓度比较差异有统计学意义($P<0.05$),胃浆膜组糖耐受功能较对照组好,门静脉组糖耐受功能较胃浆膜组好。见表 3 和图 5。

表 1 3 组大鼠移植前后血糖浓度比较

($n=6$, mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	移植前	移植后
对照组	24.70 ± 0.67	26.74 ± 0.98
胃浆膜组	25.80 ± 1.46	$11.35 \pm 4.89^{1)2)}$
门静脉组	25.74 ± 1.15	$13.50 \pm 6.59^{1)2)3)}$
F 值	13.536	2546.796
P 值	0.001	0.000

注:1)与移植前比较, $P<0.05$; 2)与对照组比较, $P=0.05$; 3)与胃浆膜组比较, $P<0.05$

表 2 3 组大鼠移植后不同时间点的血糖浓度比较 ($n=6$, mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	移植后 1 d	移植后 3 d	移植后 5 d	移植后 7 d	移植后 11 d	移植后 14 d	移植后 18 d	移植后 21 d	移植后 25 d	移植后 28 d
对照组	24.78 ± 0.72	25.00 ± 1.35	26.30 ± 1.58	26.92 ± 0.98	27.46 ± 1.25	25.88 ± 0.98	27.90 ± 0.97	27.42 ± 1.03	27.40 ± 1.10	26.98 ± 1.29
胃浆膜组	17.54 ± 0.61	8.34 ± 1.14	7.64 ± 0.98	7.60 ± 1.06	8.98 ± 1.13	9.38 ± 1.99	9.20 ± 1.25	10.82 ± 1.00	18.82 ± 1.17	23.22 ± 0.53
门静脉组	12.52 ± 1.96	9.46 ± 0.55	8.04 ± 1.23	7.28 ± 0.58	9.86 ± 2.06	11.06 ± 1.53	17.68 ± 1.45	22.94 ± 1.65	24.01 ± 0.81	24.42 ± 0.66

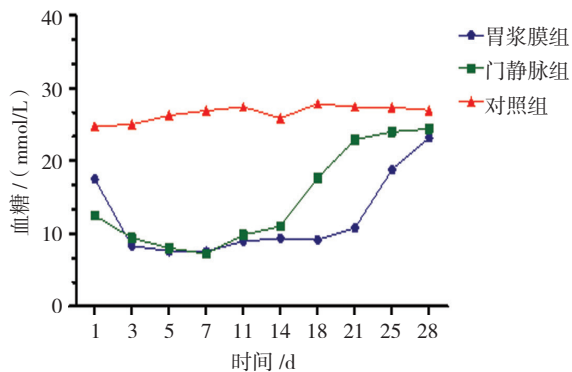


图 3 3 组大鼠胰岛移植后的血糖变化趋势

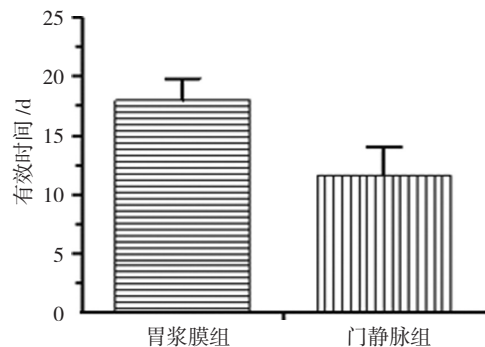


图 4 胃浆膜组与门静脉组大鼠胰岛移植后有效控制血糖时间比较 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

表 3 3 组大鼠葡萄糖耐量实验不同时间点的血糖浓度比较 ($n=6$, mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	注射后 0 min	注射后 5 min	注射后 10 min	注射后 15 min	注射后 30 min	注射后 60 min	注射后 90 min	注射后 120 min
对照组	12.90 ± 1.01	13.92 ± 0.73	15.66 ± 0.59	24.36 ± 0.77	21.14 ± 0.87	18.76 ± 0.79	17.54 ± 0.77	17.08 ± 0.35
胃浆膜组	8.26 ± 0.77	10.48 ± 0.60	13.36 ± 0.62	16.02 ± 0.58	12.64 ± 0.72	11.34 ± 0.86	9.58 ± 0.69	8.50 ± 0.45
门静脉组	6.76 ± 0.60	8.58 ± 0.42	9.70 ± 0.45	13.46 ± 0.80	11.76 ± 0.65	9.44 ± 0.79	7.84 ± 0.46	6.92 ± 0.32

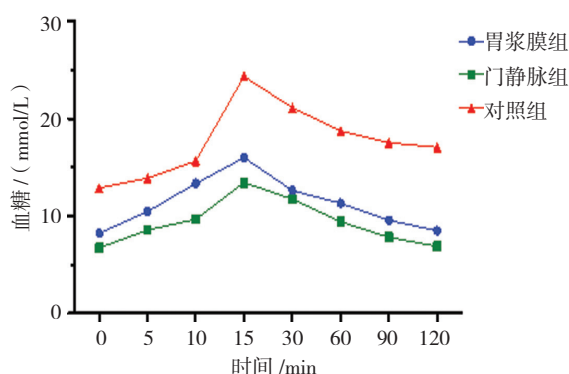


图 5 3 组大鼠胰岛移植后腹腔葡萄糖耐量实验的血糖变化趋势

3 讨论

胰岛移植是目前治愈 I 型糖尿病的重要方法之一。胰岛移植的成功受多种因素的影响, 不仅与胰岛高活性及高纯度有关, 合适移植部位也成为其能否移植成功的重要因素之一。刘定志等^[4]认为, 理想的移植部位要求移植手术操作方便、成功率高、并发症少、存活率高、易于活检等^[4]。目前, 胰岛移植的部位主要包括门静脉、肾包膜、脾、腹膜、大网膜、肌肉等^[6]。通过门静脉移植到肝脏已成为目前最常用的移植部位, 但研究发现其并不是最理想的移植部位^[7]。门静脉内氧分压低、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及移植后的胰岛栓塞, 阻滞门静脉血流, 发生缺氧和周围肝组织破坏, 这些都是影响胰岛存活的重要因素, 是移植前期胰岛丧失的主要原因^[8-9]。胃肠道被认为是胰岛移植的良好部位, 不仅可以提供密集的血管网络、血液经门静脉回流入肝, 而且与胰腺具有相同的胚胎源性, 便于移植^[10-12]。胃浆膜下层也可以有效地避免门静脉胰岛移植风险。本实验发现, 胰岛移植后胃浆膜组和门静脉组大鼠血糖浓度较移植前下降, 均在 48 h 内降至正常, 且低于对照组。胃浆膜组和门静脉组在移植后 21 和 14 d 血糖浓度开始升高, 表明胰岛功能开始减退; 门静脉组胰岛移植后 14 d 血糖开始升高, 表明胃浆膜下层胰岛移植血糖的有效控制时间比门静脉移植时间更长, 胃浆膜下层胰岛移植的效果要优于门静脉移植。腹腔葡萄糖耐量实验表明, 胰岛移植后胃浆膜组和门静脉组大鼠早期的糖耐受功能良好, 与对照组差异明显。

总之, 本实验结果表明, 胃浆膜下层胰岛移植比门静脉操作更简单, 安全性更高。且本实验发现, 胃浆膜下层胰岛移植的短期治疗效果更好。胃浆膜下层有望成为胰岛移植的最理想的部位之一。本实验也为胃浆膜下层胰岛移植在临床的应用提供了实验基础。但本实验只涉及 2 个部位且样本量较少, 还需进一步研究证实。

参考文献:

- [1] AGARWAL A, BRAYMAN K L. Update on islet cell transplantation for type 1 diabetes[J]. Semin Intervent Radiol 2012, 29(2): 90-98.
- [2] KARAKOSE M, PINARLI F A, ARSLAN M S, et al. Comparison of the ovary and kidney as sites for islet transplantation in diabetic rats[J]. Transplantation Proceedings, 2016, 48: 2216-2220.
- [3] 唐成佳, 杜成友, 刘定志, 等. 新鲜与短期培养胰岛细胞移植对移植胰岛存活的影响 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2013, 33(6): 763-767.
- [4] 刘定志, 罗诗樵, 杜成友, 等. 移植部位对移植胰岛长期存活的影响 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2012, 32(3): 257-261.
- [5] 杨顺良, 吴志贤, 叶永峰, 等. 大鼠胰岛细胞经门静脉肝内移植模型的建立 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 53(14): 9968-9972.
- [6] RAJAB A. Islet transplantation: alternative sites[J]. Curr Diab Rep, 2010, 10(5): 332-337.
- [7] NAZIRUDDIN B, IWAHASHI S, KANAK M A, et al. Evidence for instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical autologous islet transplantation[J]. Am J Transplant, 2014, 14(2): 428-437.
- [8] HWANG J W, JUNG H S, LEE D Y. Inhibition of platelet adhesion onto intrahepatically transplanted islets using PE-Gylation for attenuating instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR)[J]. J Control Release, 2011, 152(suppl 1): e213-e214.
- [9] OBENAU A, MACE J, PEVERINI R L, et al. Efficacy comparison between intraportal and subcapsular islet transplants in a murine diabetic model[J]. Transplantation Proceeding, 2009, 41(1): 346-349.
- [10] YIN Z Z, WANG S S, LI Q, et al. Gastric submucosa is inferior to the liver as transplant site for autologous islet transplantation in pancreatectomized diabetic beagles[J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2016, 36(4): 529-533.
- [11] LIU X N, ZHANG J H, LI Y, et al. Gastric subserous space islet transplantation: techniques and initial results in diabetic inbred lewis rats[J]. Ann Transplant, 2014, 19: 331-336.
- [12] LACKNER C, OFFNER F, NIZZE H. Small intestine, pancreas and islet cell transplantation[J]. Patholge, 2011, 32(2): 135-143.

(童颖丹 编辑)