

微囊化甲状旁腺兔-鼠移植****

王东¹, 翟博¹, 刘颖新², 武林枫²

Xenotransplantation of microencapsulated rabbit parathyroid tissue into rats

Wang Dong¹, Zhai Bo¹, Liu Ying-xin², Wu Lin-feng²

Abstract

BACKGROUND: Microencapsulation has been widely used in various experimental studies. Microencapsulated parathyroid transplantation has become a hot issue, but the better transplantation site and the mechanism underlying failed transplantation are urgently to be solved.

OBJECTIVE: To investigate the therapeutic effects of xenotransplantation of microencapsulated parathyroid tissue on treatment of hypoparathyroidism in Wistar rats and to determine the optimal transplantation site and the mechanism underlying failed transplantation.

METHODS: Wistar rat models of hypoparathyroidism were developed. At 4 weeks after model establishment, rat models were randomly allocated to four groups: renal adipose capsules, chest sternocleidomastoid muscle, and empty microcapsule control groups. Microencapsulated parathyroid tissues were transplanted into renal adipose capsules and chest sternocleidomastoid muscle in renal adipose capsules group and chest sternocleidomastoid muscle group respectively. Empty microcapsules without parathyroid were transplanted into renal adipose capsules in empty microcapsule group. Total serum calcium was measured every other week. In the 16th week, transplant beds were retrieved and subjected to electron microscopic examination.

RESULTS AND CONCLUSION: There was no significant difference in serum calcium level between renal adipose capsule group and chest sternocleidomastoid muscle group during 16 weeks ($P > 0.05$). The serum calcium level in the chest sternocleidomastoid muscle group decreased between 16–20 weeks. There were many fiber tissues surrounding the microencapsules in the chest sternocleidomastoid muscle group. Parathyroid tissues can be protected successfully from Aliginate-Ba capsules and then survive functionally for a long time. The renal adipose capsule is the better transplantation site than chest sternocleidomastoid muscle.

Wang D, Zhai B, Liu YX, Wu LF. Xenotransplantation of microencapsulated rabbit parathyroid tissue into rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(44): 8251-8254. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 微囊化移植技术已经普遍应用于各种实验, 为解决甲状旁腺移植免疫排斥反应的热点领域, 但最佳移植部位及其移植失效机制仍是当前亟待解决的问题。

目的: 观察微囊化异种甲状旁腺组织移植对 Wistar 大鼠甲状旁腺功能低下的治疗作用, 并探讨最佳移植部位及其失效机制。

方法: 制备甲状旁腺功能低下 Wistar 大鼠模型, 建模 4 周后随机分为肾包囊组、胸锁乳突肌组, 空囊组, 肾包囊组、胸锁乳突肌组分别将微囊包裹兔甲状旁腺移入鼠肾包囊和胸锁乳突肌, 空囊组仅于肾包囊移植空囊。移植后每隔 2 周取血测血钙, 移植后第 16 周取移植植物进行透射电镜检查。

结果与结论: 肾包囊组、胸锁乳突肌组 16 周内血钙水平差异无显著性意义($P > 0.05$), 16~20 周胸锁乳突肌组血钙呈下降趋势。胸锁乳突肌组微囊周围有大量纤维包裹。提示海藻酸-钡交联微囊可对甲状旁腺组织起到有效的保护作用, 使甲状旁腺组织较长时间存活并发挥正常功能。肾包囊是较佳移植部位。

关键词: 微囊; 甲状旁腺; 组织移植; 移植; 异种

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.44.021

王东, 翟博, 刘颖新, 武林枫. 微囊化甲状旁腺兔-鼠移植[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(44):8251-8254. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of General Surgery, Fourth Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China; ²Department of General Surgery, First Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Wang Dong★, Master, Attending physician, Department of General Surgery, Fourth Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China doctorwd1975@163.com

Correspondence to: Zhai Bo, Master, Attending physician, Department of General Surgery, Fourth Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China zaibo1999@yahoo.com.cn

Supported by: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D01-13*; Science and Technology Research Program of Education Department of Heilongjiang Province, No. 11551208*; Scientific Research Program of Health Department of Heilongjiang Province, No. 2010-147*

Received:2011-06-21
Accepted:2011-09-19

0 引言

传统以应用钙剂为主的甲状旁腺功能低下症治疗方式并发症较多, 长期应用会导致脑、肾钙质沉积^[1]。甲状旁腺移植成为治疗甲状旁腺功能低下症的优先选择。本实验应用微囊化免疫隔离技术进行甲状旁腺组织异种移植, 通过组织学观察、电镜检查及免疫组织化学染色观察移植效果, 探寻甲状旁腺移植新供源及最佳移植部位。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2010-02/2011-01在哈尔滨医科大学附属第一医院完成。

材料: 供体为成年雌性日本大耳白兔15只, 体质量2 000~2 500 g; 受体为成年雌性纯系Wistar大鼠30只, 体质量170~230 g, 由哈尔滨医科大学第一临床医学院实验动物中心提供。

¹ 哈尔滨医科大学
附属第四医院普
通外科, 黑龙江省
哈尔滨市
150001; ² 哈尔
滨医科大学附属
第一医院普通外
科, 黑龙江省哈尔
滨市 150001

王东★, 男, 1975
年生, 黑龙江省哈
尔滨市人, 汉族,
2004 年哈尔滨医
科大学毕业, 硕士
生, 主治医师, 主
要从事普通外科
基础与临床的研
究。
doctorwd1975@
163.com

通讯作者: 翟博,
硕士, 主治医师,
哈尔滨医科大学
附属第四医院普
通外科, 黑龙江省
哈尔滨市
150001
zaibo1999@
yahoo.com.cn

中图分类号: R617
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2011)44-08251-04

收稿日期: 2011-06-21
修回日期: 2011-09-19
(20110621017/WL-S)

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
3%海藻酸钠溶液	德国Sigma-aldrich公司, A0682
BaCl ₂ 溶液	美国Aldrich公司, 202738
胎牛血清、细胞凋亡 检测试剂盒	美国Sigma公司
RPMI1640培养液	美国Invitrogen公司
全自动生化分析仪	美国

实验方法:

甲状旁腺功能低下大鼠模型建模方法: 参照段秀庆等^[1]的建模方法, 建模后行普通饮食, 切取的甲状旁腺行苏木精-伊红染色, 病理学证实为甲状旁腺。建模后每周测血清钙, 若4次所测血清钙均低于1.9 mmol/L则认为建模成功。Wistar大鼠血清钙正常值为2.2~2.6 mmol/L。

甲状旁腺获取: 家兔静脉麻醉后, 取颈正中切口逐层切开。兔甲状旁腺大多是一对呈卵圆形或纺锤形腺体, 约0.01 g。位于甲状腺后部紧贴于甲状腺动脉根部气管的两旁, 色红, 质软, 大体可辨别。切取的组织经过组织学检查证实为甲状旁腺。将家兔甲状旁腺组织剪成约1 mm × 1 mm的小块, 生理盐水冲洗后于37℃, 含体积分数为5%CO₂的无菌培养箱中培养2 d备用。成囊前行透射电镜扫描证实组织活性。

成囊方法: 培养后家兔甲状旁腺组织块与3 mL 3%海藻酸钠溶液混匀经自制微囊发生器滴入20 mmol/L的BaCl₂溶液中固化7 min, 经含体积分数为5%胎牛血清的RPMI 1640培养液冲洗3遍后移植。调整气流使每个囊内含1块组织, 微囊直径1.2~1.5 mm。

实验分组及移植方法: 30只建模4周模型鼠随机分为肾包囊组、胸锁乳突肌组, 空囊组, 每组10只。将每只兔提供的一对甲状旁腺制备的微囊移给2只模型鼠。空囊组移植相当于实验组数量(三四个)不含甲状旁腺组织块的海藻酸-钡交联微囊于肾包囊。肾包囊组、胸锁乳突肌组分别取切口移入, 以外科缝线缝合关闭切口。

结果测定: 移植后每2周测定一次血钙, 至全部鼠都移植失效(血清钙低于1.9 mmol/L)。移植后10, 16周每组随机选取1只鼠取移植物行苏木精-伊红染色病理学检查、透射电镜检查。实验中对失效鼠取移植物同样行苏木精-伊红染色病理学检查、透射电镜检查。

主要观察指标: ①移植后血清钙水平变化。②移植后10, 16周苏木精-伊红染色观察移植物形态学变化及透射电镜检查。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 12.0软件完成统计处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组移植后不同时间血钙测定 移植前血钙水平为(1.62±0.04) mmol/L, 空囊组无任何治疗作用($P > 0.05$)。肾包囊组、胸锁乳突肌组移植前后血钙水平差异有显著性意义($P < 0.05$), 两组20周内未发现低血钙鼠, 16周内血钙水平差异无显著性意义($P > 0.05$), 16~20周后胸锁乳突肌组血钙呈下降趋势, 两组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图1。20周后肾包囊组、胸锁乳突肌组大鼠逐渐出现低血钙, 至24周所有受体鼠皆出现低血钙。

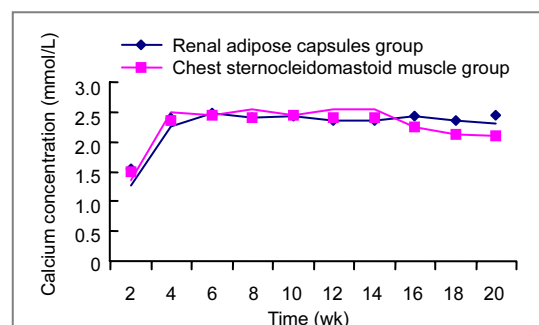


Figure 1 Concentration of serum calcium at different time points after transplantation in renal adipose capsules group and chest sternocleidomastoid muscle group
图1 肾包囊组和胸锁乳突肌组移植不同时间血钙水平

2.2 苏木精-伊红染色观察移植物形态变化 移植后10周移植物活性良好, 中心无坏死, 胞核和核膜完整; 移植后16周肾包囊组可见中心少量坏死, 囊周少量纤维包裹, 而胸锁乳突肌组仅组织块边缘存在少量存活组织, 囊周大量纤维包裹, 见图2。

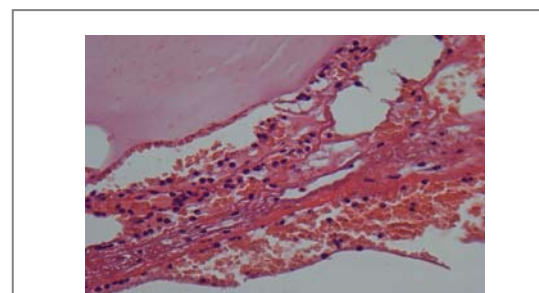


Figure 2 Microcapsule paraffin section of chest sternocleidomastoid muscle group at 16 wk after transplantation (Hematoxylin-eosin staining, × 400)
图2 胸锁乳突肌组移植后16周取回移植物石蜡切片(苏木精-伊红染色, × 400)

移植后失效鼠检测显示微囊内无组织存活。空囊组取回微囊囊周无纤维包裹。

2.3 透射电镜观察移植物形态变化 移植后10周肾包囊组、胸锁乳突肌组甲状旁腺细胞胞膜与核膜完整,线粒体与粗面内质网结构清晰,分泌颗粒较丰富,见图3。

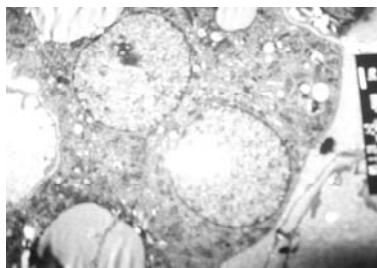


Figure 3 Transmission electron microscope examination in microcapsule control group at 10 wk after transplantation ($\times 5\,000$)

图3 微囊组移植后10周取回移植物透射电镜观察($\times 5\,000$)

移植后16周肾包囊组分泌颗粒仍较丰富,而胸锁乳突肌组仅边缘有少量存活甲状旁腺细胞,胞浆稀疏,细胞膜皱缩,线粒体肿胀,粗面内质网与糖原颗粒及分泌颗粒明显减少,可见凋亡小体。失效鼠不可见正常组织结构。

3 讨论

持续甲状旁腺功能低下是甲状腺外科中严重致命并发症,由于甲状旁腺激素的多种代谢功能,传统治疗手段并发症多、治疗手段本身不及时、痛苦性大、耐受性差,甲状旁腺移植成为可望治愈甲状旁腺功能低下症的理想方法^[2]。1980年Lim和Sun^[3]首次采用微囊免疫隔离技术进行胰岛微囊化移植研究。二十几年来随着微囊化免疫隔离技术研究的深入,已不乏临床应用的良好实例^[4-8],但同种供体缺乏成为限制临床应用的主要障碍,适时开展异种移植研究,开拓新供源成为解决该问题的可行途径^[9]。近10年的研究表明移植中强烈的排斥反应及可能出现的人-畜共患病是开展临床异种移植的主要障碍^[10-11]。

微囊免疫隔离技术即将生物活性物质包裹在具有半透膜功能的微囊内。微囊可阻止免疫细胞、免疫球蛋白等免疫成分自由通过或/和可以中和宿主抗移植物的免疫成分,而允许囊内移植物所需的营养成分及其所分泌的生物活性物质自由通过,从而对移植物起到保护作用,减轻排斥反应,在不用免疫抑制剂的前提下,保证较佳的移植效果、减少免疫抑制剂的不良反应。

微囊化移植最佳部位是众多学者研究的对象,Zimmermann等^[12]认为肌肉血供丰富,氧供好,易回收,是较好的移植部位。实验结果显示胸锁乳突肌组血钙水

平16周后有下降趋势,较肾包囊组维持正常血钙水平时间短。16周组织学检查胸锁乳突肌组较肾包囊组有较多囊周纤维化和中心坏死区,细胞活性差,可以认为肾包囊是较好的移植部位。分析其原因可能为肌肉内有较大压力,对微囊有较大机械破坏作用,而肾包囊区域为免疫豁免区,且周围血管化程度高,氧供丰富。实验中观察到空囊组囊周无纤维化,而肾包囊组、胸锁乳突肌组囊周纤维化随着移植时间的延长纤维数量逐渐增加,可见囊材料并不是引起纤维化的因素,囊内分泌的异种抗原才是刺激纤维包裹的最终原因。既往研究表明囊周纤维化是阻碍氧和营养物质通过微囊的主要因素^[13-15],可见囊周纤维化是本实验中肾包囊组、胸锁乳突肌组主要失效机制。

总之,虽异种组织分泌物抗原性强,较同种移植囊周纤维化严重,但本实验方法保证了移植物较长时间存活,证实了微囊化异种移植的意义,随着基础科研不断深入,微囊化异种甲状旁腺组织移植可望成为治疗甲状旁腺功能低下症的有效措施。

4 参考文献

- [1] Duan XQ, Song C, Song CF, et al. Jieyou Kexue Jinzhan. 2003; 9(3):227-229.
段秀庆,宋纯,宋春芳,等.大鼠甲状旁腺的切取及功能测定[J].解剖科学进展,2003,9(3): 227-229.
- [2] Kulseng B, Skjak-Braek G, Ryan L, et al. Transplantation of alginate microcapsules. Transplantation. 1999;67(7):978-984.
- [3] Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. Science. 1980;210(4472):908-910.
- [4] Duvivier-Kali VF, Omer A, Parent RJ, et al. Complete protection of islets against allojection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane. Diabetes. 2001;50(8):1698-1705.
- [5] Kobayashi T, Aomatsuu Y, Iwata H, et al. Indefinite islet protection from autoimmune destruction in nonobese diabetic mice by agarose microencapsulation without immunosuppression. Transplantation. 2003;75(5):619-625.
- [6] Kobayashi T, Aomatsu Y, Kanehiro H, et al. Protection of NOD islet isograft from autoimmune destruction by agarose microencapsulation. Transplant Proc. 2003;35(1):484-485.
- [7] Schrezenmeier J, Hyder A, Vreden M, et al. Oxygen profile of microencapsulated islets: effect of immobilized hemoglobin in the alginate matrix. Transplant Proc. 2001;33(7-8):3511-3516.
- [8] Rayat GR, Rajotte RV, Ao Z, et al. Microencapsulation of neonatal porcine islets: protection from human antibody/complement-mediated cytotoxicity in vitro and long-term reversal of diabetes in nude mice. Transplantation. 2000;69(6):1084-1090.
- [9] Aomatsu Y, Nakajima Y, Ohyama T, et al. Efficacy of agarose/polystyrene sulfonic acid microencapsulation for islet xenotransplant. Transplant Proc. 2000;32(5):1071-1072.
- [10] O'Shea GM, Sun AM. Encapsulation of rat islets of langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice. J Am Diabetes Assoc. 1986;35(8):943-946.
- [11] Zhang WJ, Laue C, Hyder A, et al. Purity of alginate affects the viability and fibrotic overgrowth of encapsulated porcine islet xenografts. Transplant Proc. 2001;33(7-8):3517-3519.
- [12] Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, et al. Towards a medically approved technology for alginate2based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. J Mater Sci Mater Med. 2005;16(6):491-501.
- [13] Robitaille R, Dusseault J, Henley N, et al. Insulin-like growth factor II allows prolonged blood glucose normalization with a reduced islet cell mass transplantation. Endocrinology. 2003; 144(7):3037-3045.
- [14] De Vos P, Van Straaten JF, Nieuwenhuizen AG, et al. Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth? Diabetes. 1999;48(7):1381-1388.
- [15] Wu LF, Zhai B. Guowai Yixue: Shengwu Yixue Gongcheng Fence. 2005;28(1):37-39.
武林枫,翟博.微囊化移植的研究进展[J].国外医学: 生物医学工程分册,2005,28(1):37-39.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 黑龙江省自然科学基金(D01-13); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11551208); 黑龙江省卫生厅科研课题(2010-147)。

作者贡献: 通讯作者进行实验设计, 实验实施为第一作者, 实验评估为第三作者, 资料收集为第一作者, 第一作者成文, 第四作者审核, 通讯作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

本文创新性: 以“microencapsulation, parathyroid glands, xenotransplantation, 微囊化, 甲状旁腺, 异种移植”为检索词, 检索 PubMed 数据库、万方数据库 1980/2011 的相关文献。实验创新性在于探讨了甲状旁腺移植最佳移植部位及失效机制。

2012-2015 年国家自然科学基金资助肝移植研究项目: 学术部

项目名称	负责人	单位	金额	时间
肝移植供受体白介素 10 基因单倍型与他克莫司代谢差异相关性及其机制研究	王兆文	上海交通大学	14	2012-01/2012-12
MiR-146a 在大鼠小体积肝移植中的作用	蒋维维	南京医科大学	22	2012-01/2014-12
Swiprosin-1 在移植肝缺血再灌注肝窦内皮细胞损伤与凋亡中的机制研究	夏春燕	解放军第二军医大学	23	2012-01/2014-12
eIF2 α 信号通路对小体积肝移植早期肝功能损伤的作用及机理研究	孔海莹	浙江大学	23	2012-01/2014-12
供肝 TCF7L2 基因多态性与肝移植术后新发糖尿病发生的关联性及其分子机制研究	凌琪	浙江大学	22	2012-01/2014-12
胆管细胞与成纤维细胞旁分泌在移植肝缺血型胆管病的实验研究	陈莉萍	解放军第 309 医院	20	2012-01/2014-12
HGF 基因活体靶向修饰 MSCs 治疗肝移植术后排斥反应及磁共振可视化研究	颜荣华	中山大学	21	2012-01/2014-12
MACC1 介导 HGF/Met 和 FAK 通路在肝癌肝移植术后肿瘤复发中的作用及内在机制研究	吴李鸣	浙江大学	22	2012-01/2014-12
干预免疫识别抑制大鼠肝移植排斥反应的实验研究	刘刚	天津医科大学	23	2012-01/2014-12
人工肝与肝移植治疗终末期肝病的基础应用研究	郑树森	浙江大学	600	2012-01/2014-12
Hippo 信号传导通路在肝移植后肝癌复发转移中的作用机制	李华	中山大学	55	2012-01/2015-12
肝脏树突状细胞依赖 IL-27 通路调控小鼠肝移植免疫耐受机制	蒋国平	浙江大学	55	2012-01/2015-12
smDCs 在小鼠 ESCs 来源的肝细胞移植中诱导免疫耐受及其作用机制	胡安斌	中山大学	55	2012-01/2015-12
多通路抑制树突状细胞 Toll 样受体信号途径诱导恒河猴肝移植免疫耐受的研究	陈鹏	昆明医学院	50	2012-01/2015-12
联合携 PGE2 基因骨髓间充质干细胞移植重塑 Kupffer 细胞表型诱导大鼠肝移植术后免疫耐受	刘作金	重庆医科大学	60	2012-01/2015-12
HBV 特异性免疫效应细胞预防肝移植术后乙肝复发的研究	沈中阳	天津市第一中心医院	60	2012-01/2015-12
IDO 酶阻断 TGF- β /Smad 信号通路抗纤维化对肝移植慢性排斥的双重保护作用	孙星	上海交通大学	62	2012-01/2015-12
补体活化通路及 CD59 在肝移植后系统性真菌感染致炎症反应和多脏器损伤中的作用	钟林	上海交通大学	50	2012-01/2015-12
缝隙连接介导的伤害信号传递在肝移植早期急性肾损伤的作用研究	黑子清	中山大学	60	2012-01/2015-12
miRNA-Foxp3 靶向机制在 CD4+CD25+Treg 介导的肝移植免疫调节中的作用研究	陆敏强	中山大学	60	2012-01/2015-12