

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.14.013 [http://www.crter.org]

杨锐, 马昭杰, 陈容平, 王梅, 张振, 蔡德鸿, 陈宏. 间充质干细胞诱导糖尿病小型猪同种异体胰岛移植的免疫耐受[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(14):2558-2562.

间充质干细胞诱导糖尿病小型猪同种异体胰岛移植的免疫耐受*^{*}

杨 锐, 马昭杰, 陈容平, 王 梅, 张 振, 蔡德鸿, 陈 宏

南方医科大学珠江医院内分泌科, 广东省广州市 510282

文章亮点:

骨髓间充质干细胞联合骨髓细胞输注能有效延长骨髓细胞诱导的移植免疫耐受, 并较长时间维持胰岛移植物的正常功能。实验通过骨髓细胞联合骨髓间充质干细胞输注的新方法进一步优化了胰岛移植免疫耐受的诱导方案。

关键词:

干细胞; 干细胞移植; 骨髓间充质干细胞; 胰岛; 移植; 同种异体胰岛移植; 免疫耐受; 骨髓细胞; 胰岛细胞; 糖尿病小型猪模型; 小型猪; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

摘要

背景: 胰岛移植为有望根治糖尿病的一种方法, 而移植排斥问题阻碍了移植的开展, 诱导受体对供体移植物的免疫耐受是解决同种异体移植排斥反应的关键。

目的: 观察骨髓间充质干细胞输注对糖尿病小型猪同种异体胰岛移植存活时间的影响。

方法: 无菌条件下抽取动物骨髓, 离心弃上清。取单核细胞层, 洗涤后加入 L-DMEM 培养基, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。培养 48 h 后换液去除未贴壁的细胞, 依据贴壁培养法分离和扩增间充质干细胞。取第 5 代细胞作为移植供源, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$ 。四氧嘧啶制备糖尿病小型猪模型, 随机分为骨髓细胞组和干细胞+骨髓细胞组, 经肝门静脉分别植入胰岛细胞、骨髓细胞, 胰岛细胞、骨髓细胞和骨髓间充质干细胞。

结果与结论: 骨髓间充质干细胞联合骨髓细胞输注较单纯骨髓细胞输注能显著延长同种异体小型猪胰岛移植存活时间($P < 0.05$), 同时受体血清胰岛素能较长时间维持较高水平。提示骨髓间充质干细胞输注能显著延长猪胰岛移植存活时间, 并促进胰岛移植正常功能的发挥。

杨锐^{*}, 男, 1977 年生, 广东省广州市人, 汉族, 2010 年南方医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 讲师, 主要从事糖尿病胰岛移植应用基础研究。
yangrui91@163.com

通讯作者: 陈宏, 博士, 主任医师, 教授, 南方医科大学珠江医院内分泌科, 广东省广州市 510282

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)14-02558-05

收稿日期: 2012-07-13
修回日期: 2012-08-13
(20120513005/W · S)

Immune tolerance induced by bone marrow mesenchymal stem cells after islet allotransplantation in diabetic minipigs

Yang Rui, Ma Zhao-jie, Chen Rong-ping, Wang Mei, Zhang Zhen, Cai De-hong, Chen Hong

Department of Endocrinology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Islet transplantation is a promising method used to radically cure diabetes mellitus. The immune rejection caused by transplantation hinders the development of transplantation. The immune tolerance of recipients to donor grafts is a key to solving the problem of allotransplantation rejection reaction.

OBJECTIVE: To investigate the influence of infusion of bone marrow mesenchymal stem cells on the survival time of islet allograft in the minipigs after islet allotransplantation.

METHODS: Under sterile condition, minipig bone marrow was taken and the supernatant was discarded after centrifugation. After washed with L-DMEM culture medium, mononuclear cells were adjusted to be $1 \times 10^9/\text{L}$. After 48-hour culture, nonadherent cells were discarded and mesenchymal stem cells were isolated and amplified. Passage 5 cells were taken as donors and cell concentration was adjusted to be

Yang Rui★, Master, Attending physician, Lecturer, Department of Endocrinology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China yangrui91@163.com

Corresponding author: Chen Hong, M.D., Chief physician, Professor, Department of Endocrinology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30570884*

Received: 2012-07-13
Accepted: 2012-08-13

$1 \times 10^{10}/L$. Minipig models of alloxan-induced diabetes mellitus were prepared and then randomly divided into two groups: bone marrow cells and bone marrow cells + mesenchymal stem cells. In the bone marrow cells group, islet cells and bone marrow cells were infused. In the bone marrow cells + mesenchymal stem cells group, islet cells, bone marrow cells and bone marrow mesenchymal stem cells were infused.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with infusion of simple bone marrow cells, infusion of bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow cells significantly prolonged the survival time of islet allografts ($P < 0.05$) and maintained high serum insulin level for a longer time in diabetic minipigs. These findings suggest that bone marrow mesenchymal stem cell infusion can significantly prolong the survival time of islet allografts and contribute to the normal function of islet allografts in diabetic minipigs.

Key Words: stem cells; stem cell transplantation; bone marrow mesenchymal stem cells; islet; transplantation; islet allotransplantation; immune tolerance; bone marrow cells; islet cells; minipig model of diabetes mellitus; minipig; National Natural Science Foundation of China; stem cell photographs-containing paper

Yang R, Ma ZJ, Chen RP, Wang M, Zhang Z, Cai DH, Chen H. Immune tolerance induced by bone marrow mesenchymal stem cells after islet allotransplantation in diabetic minipigs. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(14):2558-2562.

0 引言

Edmonton方案成功后, 胰岛移植成为有望根治糖尿病的一种方法, 而终身应用免疫抑制剂给患者带来了诸多不良反应并增加了感染、易患肿瘤等潜在危险性的概率。目前普遍认为: 诱导受体对供体移植物的免疫耐受是解决同种异体移植排斥反应的关键。最近研究发现骨髓间充质干细胞具有免疫抑制特性。作者在传统骨髓细胞输注基础上, 对受体联合骨髓间充质干细胞输注, 以期寻找一种更为安全有效的诱导胰岛移植免疫耐受的新方法。在前期小动物实验基础上^[1], 进一步探讨骨髓间充质干细胞在诱导小型猪胰岛移植免疫耐受中的作用。

1 材料和方法

设计: 分组对比观察。

时间及地点: 实验于2010年2月至2011年1月在南方医科大学珠江医院中心实验室完成。

材料:

实验动物: 雄性4-6个月西藏小型猪6只, 体质量15-25 kg, 南方医科大学动物中心提供, 四氧嘧啶建立小型猪糖尿病模型。

间充质干细胞诱导糖尿病小型猪同种异体胰岛移植的免疫耐受实验用试剂:

Main drugs and reagents:

药品及试剂	来源
胶原酶 V、双硫脲、胰蛋白酶、Ficoll-400、红细胞裂解液、环孢素 A、四氧嘧啶	Sigma 公司
胰岛素检测试剂盒	北京原子高科技应用股份有限公司
HC-A 器官保存液	上海长征医院
胰腺半自动消化分离装置、推进式离心管	自制

实验方法:

小型猪骨髓间充质干细胞培养、扩增及鉴定: 麻醉动物后无菌条件下抽取骨髓20 mL, 离心获取单核细胞层, 贴壁培养, 48 h后换液去除未贴壁细胞, 此后每三四天换液1次, 依据贴壁培养法分离和扩增骨髓间充质干细胞。用FITC标记兔抗猪的CD29、CD34、CD44、CD45, 按1 μg抗体/ 10^6 细胞分别标记细胞, 于室温避光保存30 min。取出后PBS洗涤离心2次, 加入PBS 500 μL重悬成单细胞悬液, 流式细胞仪检测。取第5代细胞作为移植供源, 调整细胞浓度 $1 \times 10^{10} L^{-1}$ 。

骨髓细胞悬液的制备: 获取的骨髓液离心弃上清后, 加入红细胞裂解液去除红细胞, 离心洗涤后加入RPMI1640培养基培养, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 锥虫蓝染色计数检测活细胞率。

四氧嘧啶制备糖尿病小型猪模型: 在胰岛移植前10 d左右, 观察小型猪的健康情况, 记录体质量、进食量、饮水量和尿量, 所有动物禁食12 h后, 于耳源静脉注射5%的四氧嘧啶(200 mg/kg)。四氧嘧啶溶液用新鲜的生理盐水配制, 采用涡旋混匀器充分混匀, 避光保存。现用现配, 尽量在5-8 min内注射完毕。按编号注射, 注射72 h后取耳缘静脉血以微量血糖测定仪测定各实验小型猪的血糖水平, 若连续2次空腹血糖超过7.0 mmol/L者即糖尿病模型建模成功。

猪胰岛细胞的分离及纯化: 胰管内灌注胶原酶V, 经自制的半自动胰腺消化装置消化^[2], 胰腺消化物用自制的推进式离心管结合HCA-Ficoll单一密度梯度液(1.096 g/mL)纯化^[3], 双硫脲(DTZ)对胰岛进行特异性染色, 检测胰岛细胞量和纯度, 并利用胰岛素释放试验检测胰岛细胞的功能。

实验分组和同种异体胰岛移植: 动物随机分为单纯骨髓细胞输注组(骨髓细胞组), 骨髓间充质干细胞联合骨髓细胞输注组(干细胞+骨髓细胞组), 每组各3头。在无菌条件下, 将 5×10^4 胰岛细胞、 1×10^{10} 骨髓细胞和/或 1×10^8 骨髓间充质干细胞混匀, 经肝门静脉移植入受体, 移植后第2和第5天肌肉注射环孢素A作预处理, 移植后监测血糖、胰岛素等的变化。

移植物生存时间判断: 移植后第1周每天受体小型猪耳缘静脉取血以微量血糖测定仪测血糖1次, 从第2周开始隔日测1次血糖, 连续2次血糖水平 $\geq 11.1 \text{ mmol/L}$, 以第1次时间认为排斥反应发生, 即细胞死亡, 判断为移植物生存时间。

主要观察指标: 细胞形态学观察、胰岛细胞获取量及细胞活率、移植物存活时间、动物模型血糖水平、动物模型血清胰岛素水平。

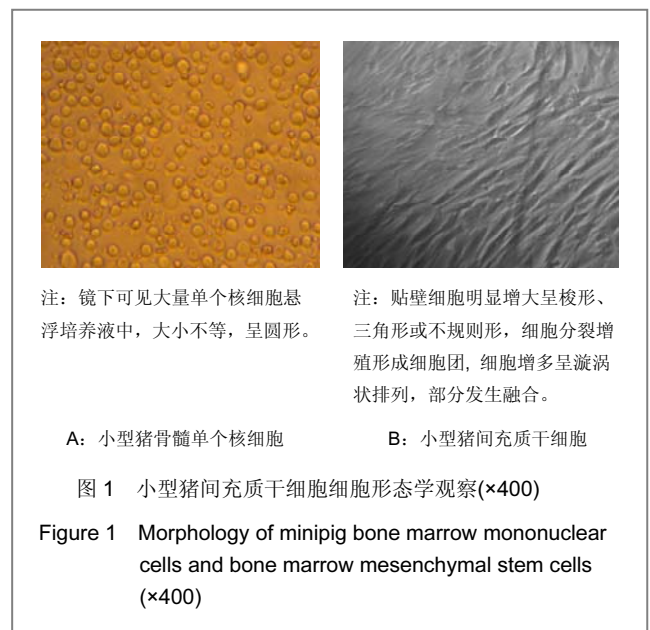
统计学分析: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 13.0进行方差分析, 两独立样本均数 t 检验, 两两比较采用LSD法, 生存分析用Kaplan-Meier法绘制生存曲线, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用小型猪6只, 分为2组, 无脱失, 进入结果分析6只。

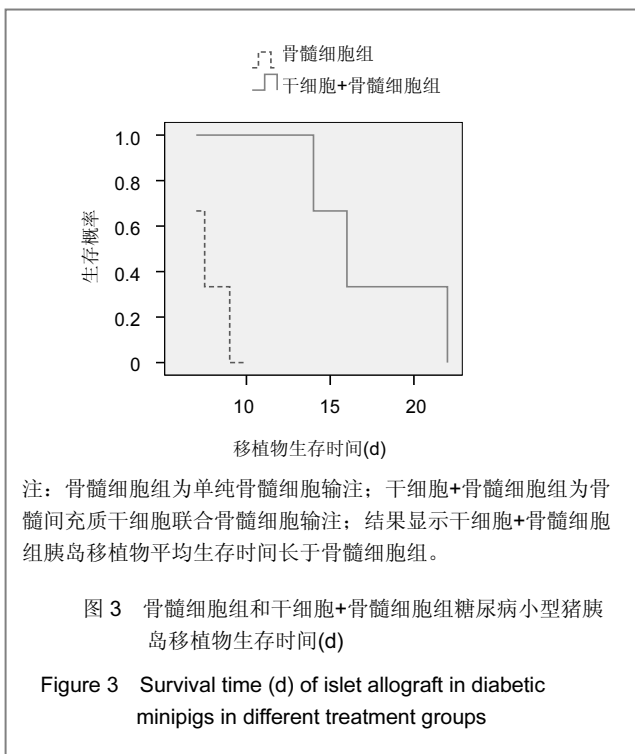
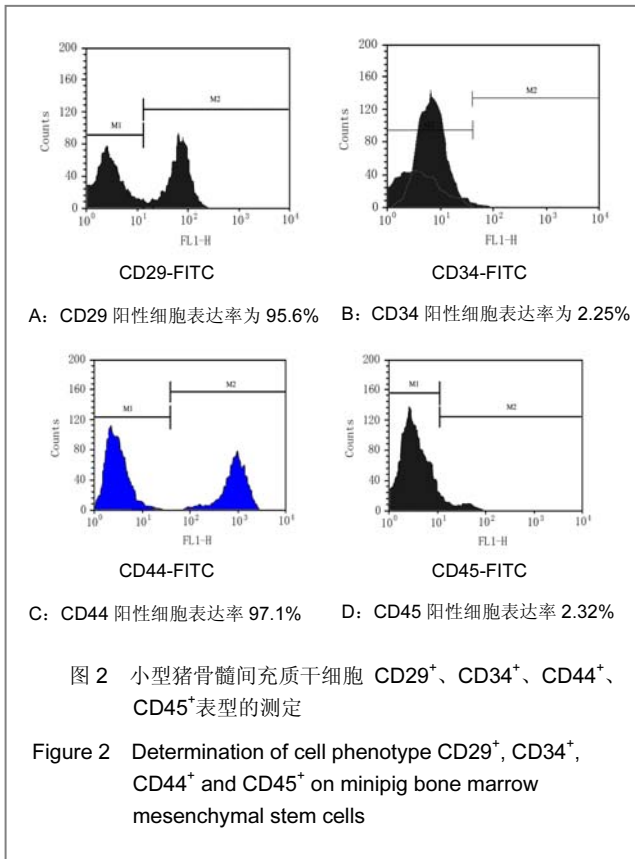
2.2 小型猪胰岛生物学活性 纯化后, 平均每头小型猪消化胰腺(15.62 ± 1.09) g组织, 平均每克小型猪胰腺组织可获得胰岛细胞团($3\ 025.83 \pm 350.28$) IEQ, 胰岛纯度为(75.97 ± 3.15)%。纯化后的胰岛细胞高糖时胰岛素的释放量为(35.31 ± 2.09) mIU/L, 为低糖时(12.87 ± 0.94) mIU/L的2.74倍($P < 0.05$), 提示纯化后胰岛细胞功能良好。

2.3 小型猪间充质干细胞细胞形态学观察 原代骨髓单个核细胞接种后, 因培养液中含有未完全清除的其他细胞如红细胞和细胞碎片等, 镜下观察比较混浊, 可见大量的单个核细胞悬浮培养液中, 大小不等, 呈圆形, 见图1A; 接种24 h后有部分细胞开始贴壁生长, 少许细胞开始变形, 48 h首次换液后, 贴壁细胞明显增大呈梭形、三角形或不规则形, 开始有细胞分裂增殖形成散在的细胞团。经过3次换液后, 悬浮细胞已基本清除, 贴壁细胞明显增多呈漩涡状排列, 部分发生融合。融合达80%时传代。传代后细胞生长迅速, 均匀分布, 细胞排列更加有序, 见图1B; 连续四五次传代后细胞可被纯化, 呈均匀有序的成纤维母细胞形态。



2.4 小型猪间充质干细胞表型测定 流式细胞仪检测骨髓间充质干细胞中CD29、CD44阳性细胞的表达率分别为95.6%、97.1%, CD34、CD45阳性细胞的表达率分别为2.25%、2.32%, 见图2。

2.5 移植物生存时间 见图3, 表1, 骨髓间充质干细胞联合骨髓细胞输注组胰岛移植生存时间较单纯骨髓细胞输注组显著延长($P < 0.05$), 平均生存时间为17 d。



2.6 糖尿病小型猪血清胰岛素水平的测定 见表2, 骨髓间充质干细胞联合骨髓细胞输注组移植后7, 14 d猪血清胰岛素水平较移植前明显增高($P < 0.05$), 排斥后胰岛素水平回落。单纯骨髓细胞输注组移植后7d胰岛素水平亦明显增高($P < 0.05$)。

表 1 各处理组小型猪胰岛移植物的生存时间

Table 1 Survival time of islet allograft in diabetic minipigs in different treatment groups (n=3, d)

组别	生存时间	$\bar{x} \pm s$
骨髓细胞组	7, 8, 10	8.33±1.53
干细胞+骨髓细胞组	14, 16, 22	17.33±4.16
<i>F</i>		12.356
<i>P</i>		0.025

注: 骨髓细胞组为单纯骨髓细胞输注; 干细胞+骨髓细胞组为骨髓间充质干细胞联合骨髓细胞输注。

表 2 各处理组糖尿病小型猪血清胰岛素水平

Table 2 Serum insulin levels of diabetic minipigs in different treatment groups ($\bar{x} \pm s$, mIU/L)

时间	骨髓细胞组	干细胞+骨髓细胞组	<i>F</i>	<i>P</i>
移植前	7.03±0.73	6.79±0.67	0.172	0.700
移植后 7 d	12.61±1.13	12.42±0.70	0.061	0.817
移植后 14 d	7.15±0.69	14.04±0.90	112.050	0.000
排斥后	-	6.91±0.35		
<i>F</i>	86.169	88.791	230.435 ^a	60.265 ^b
<i>P</i>	0.001	0.000	0.000 ^a	0.000 ^b

注: 骨髓细胞组为单纯骨髓细胞输注; 干细胞+骨髓细胞组为骨髓间充质干细胞联合骨髓细胞输注; a 主效应 *F* 统计量和 *P* 值; b 交互效应统计量 *F* 和 *P* 值。

3 讨论

通过在受体内建立混合嵌合体诱导免疫耐受已成为胰岛移植领域诱导免疫耐受研究较多的方法之一。许多实验提示嵌合状态的形成是移植存活的基础, 多种动物模型实验也已证实诱导稳定的混合嵌合体能够形成终生的供体特异性耐受^[4]。

传统的骨髓细胞输注虽能在短期内达到混合嵌合状态, 但很快随着嵌合率的下降, 耐受状态难以维持。近年来也有许多研究者通过多次特异性输血或供体淋巴细胞输注的方法来达到更持久的嵌合状态, 然而这样却增加了移植抗宿主病的发生率, 且对受体进行的各种预处理也带来了许多的临床风险^[5]。可以抑制异种胰岛移植大鼠的排斥反应^[6]。

最近研究发现骨髓间充质干细胞具有免疫调节和免疫抑制的特性^[7], 能通过调控调节性T细胞来发挥免疫

调控作用^[8]。在混合淋巴细胞反应的初期或第3天, 加入狍狍的骨髓间充质干细胞, 能够抑制进行中的异基因混合淋巴细胞反应, 使其增殖活性下降50%以上^[9]。许多实验室对上述骨髓间充质干细胞抑制淋巴细胞增殖反应的机制进行了广泛的研究, 除细胞间的直接接触外^[10], 骨髓间充质干细胞还可能通过产生可溶性细胞因子发挥其抑制作用^[11]。通过释放可溶性因子直接或间接调控T细胞相关受体或配体在体内外均有调节作用^[12-13]。

骨髓间充质干细胞的免疫调节特性在动物移植免疫耐受的研究中已取得一定成果。邓为民等^[14]证实小鼠移植同基因骨髓细胞的同时输入异基因骨髓间充质干细胞可形成稳定的嵌合体, 使供体源皮肤移植长期存活, 可以延长胰岛移植物的存活时间^[15-16]。本课题组前期研究也发现: 骨髓间充质干细胞联合骨髓细胞输注能有效的延长骨髓细胞诱导的移植免疫耐受, 并较长时间维持胰岛移植物的正常功能。本实验通过骨髓细胞联合骨髓间充质干细胞输注的新方法进一步优化了胰岛移植免疫耐受的诱导方案, 该实验为大动物实验, 为今后人胰岛移植免疫耐受的诱导方案提供了宝贵的实验数据参考。

基金资助: 国家自然科学基金项目(30570884)。

作者贡献: 通讯作者为课题的设计者, 第六作者为课题的评估者, 第一作者为课题的主要实施者, 采用盲法评估。

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。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Li M, Cai DH, Zhang H, et al. Jiefangjun Yixue Zazhi.2008; 33(3):269-272.
李明,蔡德鸿,张桦,等.间充质干细胞联合骨髓细胞输注诱导胰岛移植免疫耐受的研究[J].解放军医学杂志,2008,33(3):269-272.
- [2] Zhang H, Cai DH, Han JL, et al.Nanfang Yikedaxue Xuebao. 2007;27(6):824-826.
张桦,蔡德鸿,韩钧凌,等.半自动消化法分离纯化人胰岛细胞的实验研究[J].南方医科大学学报.2007,27(6):824-826.
- [3] Zhang H, Chen H, Sun J, et al.Guangdong Yixue.2007; 28(3): 349-351.
张桦,陈宏,孙嘉,等.推进式离心管结合单密度梯度法快速纯化大鼠胰岛[J].广东医学,2007,28(3):349-351.
- [4] Guo Z, Wu T,Sozen H,et al.A substantial level of donor hematopoietic chimerism is required to protect donor-specific islet grafts in diabetic NOD mice. Transplantation. 2003;75(7): 909-915.
- [5] Masak K,Yoshinori I,Shin M, et al.An irradiation-free nonmyeloablative bone marrow transplantation model : important of the balance between donor T-cell number and the intensity of conditioning.Transplantation. 2005;80(9): 1145-1152.
- [6] Zhang J, Zhang Q, Zhang YC, et al. Qiguan Yizhi. 2011;6(2): 350-353.
张剑,张琪,张英才,等.骨髓间充质干细胞对异种胰岛移植排斥反应的影响[J].器官移植,2011,6(2):350-353.
- [7] Ding Y, Xu D, Feng G, et al. Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogeneic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. Diabetes.2009;58: 1797-1806.
- [8] Zhao Y, Lin B, Darflinger R, Zhang Y, et al. Human cord blood stem cell modulated regulatory T lymphocytes reverse the autoimmune-caused type 1 diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice.PLoS One.2009;4(1):e4226.
- [9] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol.2002;30(1): 42-48.
- [10] Krampera M,Glennie S,Dyson J ,et al .Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the responses of naïve antigen specific T-cells to their cognate peptide.Blood. 2003; 101(9):3722-3729.
- [11] Aggarwal S, Pittenger F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood. 2005; 105(4): 1815-1822.
- [12] Park MJ, Shin JS, Kim YH,et al. Murine mesenchymal stem cells suppress T lymphocyte activation through IL-2 receptor α (CD25) cleavage by producing matrix metalloproteinases. Stem Cell Rev.2011;7:381-393.
- [13] Sioud M,Mobergslien A,Boudabous A,et al. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. Scand J Immunol. 2010;71(4): 267-274.
- [14] Deng WM, Han Q, You SG, et al. Zhonghua Jianshiyixue Zazhi.2003;26(8):466-469.
邓为民,韩钦,尤胜国,等.异基因骨髓间充质干细胞移植形成稳定的嵌合体并诱导免疫耐受的研究[J].中华检验医学杂志,2003, 26(8):466-469.
- [15] Zhang J,Li H,Jiang N,et al. Inhibition of rejection in murine islet xenografts by CTLA4lg and CD40Llg gene transfer.Chin Med J(Engl).2010;123(21):3106-3109.
- [16] Wang Y,Zhang A,Ye Z,et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit acute rejection of rat liver allografts in association with regulatory T-cell expansion. Transplant Proc.2009;41(8):4352-4356.