

组织工程预血管化处理对胰岛移植的影响

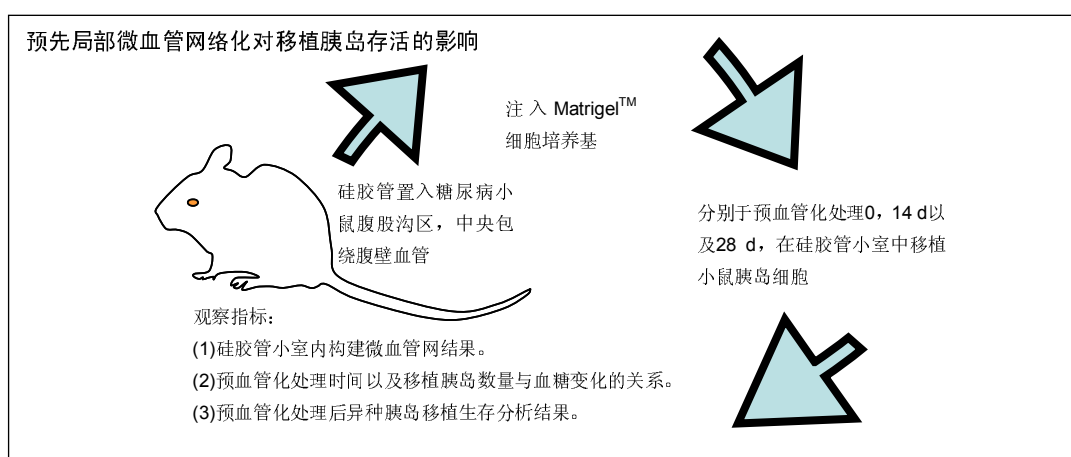
赵高平^{1,2}, 邓绍平¹, 黄孝伦², 杨卯竹², 魏玲玲², 李姝蓉², 魏亮²(¹四川省医学科学院·四川省人民医院, 电子科技大学医学院附属医院胃肠外科, 四川省成都市 610072; ²器官移植转化医学四川省重点实验室, 四川省成都市 610072)

引用本文: 赵高平, 邓绍平, 黄孝伦, 杨卯竹, 魏玲玲, 李姝蓉, 魏亮. 组织工程预血管化处理对胰岛移植的影响[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(24):3562-3567.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.24.010

ORCID: 0000-0001-8546-0871(赵高平)

文章快速阅读:



赵高平, 男, 1974年生, 陕西省宝鸡市人, 四川大学华西临床医学院毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事胃肠外科、小肠移植以及器官移植免疫耐受方面研究。

通讯作者: 邓绍平, 博士, 教授, 器官移植转化医学四川省重点实验室, 四川省成都市 610072

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2016)24-03562-06

稿件接受: 2016-04-09

文题释义:

异种胰岛移植: 指将来源不同物种的动物胰腺分离出胰岛细胞, 通过门静脉系统、大网膜、脂肪、肌肉间等途径移植到另一物种体内, 同时使用免疫抑制剂以延长移植胰岛存活时间或达到不排斥状态。胰岛移植是治疗1型糖尿病的有效方法, 但由于捐献的胰腺器官日益缺乏, 科学家将目光投向有稳定胰腺来源的动物。由于猪胰岛与人胰岛结构相似, 所以动物实验用异种胰岛常来源于幼猪。对于异种胰岛的研究必将会对未来的临床应用有一定的意义。

组织工程血管化策略: 主要有两类, 第一类是基于内皮细胞等构建新的血管, 在这个过程中生长因子也有促进新生血管的作用。第二类是基于支架技术, 包括天然生物衍生的支架和人工合成支架。以上两种策略没有明显界限, 而是相互重叠。

摘要

背景: 临床门静脉系统胰岛移植后局部缺氧导致大量胰岛细胞凋亡, 影响移植效果。

目的: 分析组织工程方法预先在局部形成微血管网络化对移植胰岛存活的影响以及异种胰岛移植的可行性。

方法: 将5 mm长圆柱形中空硅胶管置入糖尿病小鼠腹股沟区, 中央包绕腹壁血管, 注入Matrigel™细胞培养基。分别于预血管化处理0, 14以及28 d在硅胶管小室中移植同基因300个胰岛当量(IEQ)小鼠胰岛细胞, 观察血糖恢复至正常时间。另在28 d于硅胶管小室内分别移植100 IEQ、200 IEQ以及300 IEQ小鼠胰岛细胞, 检测血糖变化。最后将1 000 IEQ人胰岛细胞分别移植到已血管化的硅胶管小室或小鼠肾脏包膜下, 并用抗CD45RB或/和抗CD40L(MR-1)抗体治疗, 比较人胰岛细胞在两者中的生存情况。

结果与结论: ①硅胶管小室在构建28 d后可建立丰富的微血管网。②糖尿病小鼠血糖恢复至正常水平所需的时间与预血管化处理时间以及植入的胰岛数量均呈负相关。③移植至硅胶管小室的人胰岛细胞经抗CD45RB抗体治疗后无一例长期存活, 加用MR-1抗体后7只中有1只长期存活, 与肾包膜下移植组($n=8$, 平均生存时间 >71 d)比较生存时间差异无显著性意义($P>0.05$)。在胰岛移植之前通过组织工程方法预血管化处理可显著延长移植物的存活时间。将异种胰岛移植在血管化的硅胶管小室内或为以后的临床应用提供有意义的探索。

Zhao Gao-ping, M.D.,
Associate chief physician,
Department of
Gastrointestinal Surgery,
Sichuan Academy of
Medical Science & Sichuan
Provincial People's
Hospital, the Affiliated
Hospital of University of
Electronic Science and
Technology of China,
Chengdu 610072, Sichuan
Province, China; Sichuan
Provincial Key Laboratory
for Translational Medicine
of Organ Transplantation,
Chengdu 610072, Sichuan
Province, China

Corresponding author:
Deng Shao-ping, M.D.,
Professor, Department of
Gastrointestinal Surgery,
Sichuan Academy of
Medical Science & Sichuan
Provincial People's
Hospital, the Affiliated
Hospital of University of
Electronic Science and
Technology of China,
Chengdu 610072, Sichuan
Province, China

关键词:

组织构建; 组织工程; 血管化网络; 硅胶管小室; 人胰岛; 糖尿病小鼠; 移植术; 国家自然科学基金

主题词:

糖尿病; 胰岛移植; 存活率

基金资助:

国家自然科学基金面上项目(81172832); 四川省杰出青年基金(2013JQ0020); 四川省青年科技创新研究团队(2014TD0010); 四川省卫生厅项目(110190)

Effects of pre-vascularization of tissue-engineered constructs on the survival of transplanted pancreatic islets

Zhao Gao-ping^{1,2}, Deng Shao-ping¹, Huang Xiao-lun², Yang Mao-zhu², Wei Ling-ling², Li Shu-rong², Wei liang² (¹Department of Gastrointestinal Surgery, Sichuan Academy of Medical Science & Sichuan Provincial People's Hospital, the Affiliated Hospital of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610072, Sichuan Province, China; ²Sichuan Provincial Key Laboratory for Translational Medicine of Organ Transplantation, Chengdu 610072, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Pancreatic islet transplantation *via* portal vein system leads to the apoptosis of a number of islet cells due to local hypoxia, thereby affecting transplant outcomes.

OBJECTIVE: To explore the effect of pre-microvascularization network of tissue-engineered constructs on the survival of transplanted islets and the feasibility of xenogenic islet transplantation.

METHODS: A 5-mm-long cylindrical silicone tube filled with Matrigel TM matrix surrounding the superficial epigastric vessel was placed in the groin of diabetic mice. After the syngeneic islets with 300 islet equivalents (IEQ) were transplanted into the silicone chamber on days 0, 14 and 28 post-chamber implantation, respectively, the recovery time of blood glucose was observed. The islets with the quantity of 100 IEQ, 200 IEQ and 300 IEQ, respectively, were transplanted on day 28 post-implantation and then the blood glucose level was determined. Moreover, the survival of human pancreatic islets with 1 000 IEQ transplanted into the pre-vascularized chamber or under the renal capsule of diabetic mice, followed by the treatment of anti-CD45RB and/or anti-CD40L (MR-1) was analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: An abundant micro-vascularized network was established in the silicone chamber on day 28 post-implantation. The time of the blood glucose returning to normal level in diabetic mice was negatively correlated with the time required for pre-vascularization and the number of implanted islets. No islet grafts implanted in the silicone chamber and treated by anti-CD45RB survived for long term. However, one of seven (14.3%) grafts survived for long term, which was not significantly different from the transplantation under the renal capsule group ($n=8$, MST > 71 days, $P > 0.05$). The tissue-engineered pre-vascularization network markedly extends the survival time of the islet grafts before transplantation. The transplantation of the xenogenic pancreatic islets into the vascularized silicone chamber might be a promising method in the future clinical application.

Subject headings: Diabetes Mellitus; Islets of Langerhans Transplantation; Survival Rate

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81172832; Sichuan Youth Science and Technology Foundation, No. 2013JQ0020; Special Program for Sichuan Youth Science and Technology Innovation, No. 2014TD0010; a grant from Health and Family Planning Commission of Sichuan Province. No. 110190

Cite this article: Zhao GP, Deng SP, Huang XL, Yang MZ, Wei LL, Li SR, Wei L. Effects of pre-vascularization of tissue-engineered constructs on the survival of transplanted pancreatic islets. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(24):3562-3567.

0 引言 Introduction

1型糖尿病(type I diabetes mellitus, T1DM)又称胰岛素依赖型糖尿病, 主要与患者胰岛素分泌不足有关, 是一种严重危害人类健康的代谢性疾病^[1]。胰岛移植是目前治疗1型糖尿病的有效方法, 但目前仍需要2个或2个以上的胰腺才能达到一次足够的胰岛移植量, 其主要

原因是经门脉系统到达肝窦着床的胰岛细胞, 往往在移植早期由于局部的缺血缺氧而导致大量的细胞凋亡^[2-3]。

目前临床胰岛移植常通过门静脉系统输注细胞至肝窦驻扎^[4], 但胰岛再血管化最早在移植后2-4 d才开始, 最长需要10-14 d才能完全血管化^[5], 所以在移植的最初期, 胰岛细胞团与周围组织尚未建立血管网络^[6-7],

暴露在局部缺氧、炎性的微环境里往往会导致细胞大量凋亡,这就需要更多的胰腺捐献才能满足一次临床移植所需胰岛细胞量,所以在移植早期就已建立一个血管化网络是胰岛移植成功的关键。

实验拟预先构建组织工程微血管网络结构,观察同种同基因及异种移植胰岛的存活情况,以期为临床胰岛移植提供有意义的探索。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 胰岛移植动物体内实验。

1.2 时间及地点 于2012年1月至2014年12月在四川省医学科学院·四川省人民医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 供、受体均为雄性C57BL/6J小鼠16只,体质量20–30 g,由四川省医学科学院实验动物研究所提供。

胰岛移植实验用试剂和材料:

试剂及材料	来源
大鼠抗小鼠CD45RB抗体 (克隆号HB220)	美国Bio X Cell公司
抗CD40L抗体(克隆号MR-1)	美国abcam公司
链脲霉素以及Ficoll 400	美国Sigma-Aldrich公司
胶原酶RI 及胶原酶P	美国Roche公司
硅胶管	美国Dow-Corning公司
内径为3.35 mm, Matrigel™	美国BD公司

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠胰岛的分离和纯化 采用已有的方法分离纯化C57BL/6J小鼠的胰岛。供体小鼠经戊巴比妥麻醉开腹后,逆行胆管插管,用0.25 g/L的胶原酶RI缓慢灌注胰腺使其充分膨胀。完整切取胰腺后,置入含相同浓度胶原酶的缓冲液中,37℃恒温水浴震荡对胰腺进行消化处理15–20 min。消化的胰腺组织离心,经80目不锈钢筛网过滤后,采用不连续的Ficoll梯度密度离心纯化后在RPMI-1640(含体积分数10%胎牛血清,谷氨酸和抗生素)中培养,收集移植所需的胰岛数量备用。

1.4.2 人胰岛的分离纯化 采用改良的Rocordi方法分离和纯化人胰岛^[4]。完整切除胰腺后(人胰腺捐献经患者家属书面同意并为四川省人民医院伦理委员会批准),修剪胰腺周围脂肪及结缔组织,经总胰管插管,灌注胶原酶P/Hank's溶液使胰腺充分膨胀。剪碎胰腺后开始在37℃恒温条件下震荡加速消化。然后采用Hanks溶液灌

流后过筛收集过滤细胞,过滤细胞用Hanks溶液离心洗涤,然后在COBE 2991离心机上以连续密度梯度离心法纯化胰岛。分离后的胰岛细胞培养2 d后用于小鼠胰岛移植。

1.4.3 构建组织工程预血管化移植物 组织工程预血管化过程参考Cronin等^[5-6]的方法。用12.5%三溴乙醇麻醉小鼠后常规消毒铺巾,沿腹股沟纵形切开1 cm切口显露股血管以及分支腹壁血管。将5 mm长的圆柱形中空硅胶管(体积44 mL)包绕腹壁血管,一端用腹壁血管附属脂肪垫封闭,另一靠近股血管端用骨蜡封闭。往这个硅胶管小室内注入Matrigel™培养基,构建成一个组织工程预血管化移植物,缝合手术切口(图1)。

1.4.4 胰岛移植及抗体治疗 在C57BL/6J小鼠腹腔内注入200 mg/kg链脲霉素,建立糖尿病模型,如果连续2 d测量血糖水平大于19.4 mmol/L,证实造模成功,可作为实验用糖尿病小鼠。

预血管化时间与血糖的关系: 实验分为3组,按照前述组织工程方法构建预血管化移植物,分别在0, 14以及28 d往硅胶小室内用细针注入300胰岛当量(IEQ)小鼠胰岛细胞记录小鼠血糖恢复至正常的时间。

移植胰岛数量与血糖关系: 实验分为3组,在埋置移植物28 d后分别在硅胶小室内注入100 IEQ、200 IEQ以及300 IEQ小鼠胰岛细胞。测量血糖水平变化。

异种胰岛移植实验: 将1 000 IEQ人胰岛细胞分别移植到已血管化的硅胶管小室(28 d)或小鼠肾脏包膜下,并用抗CD45RB(分别在胰岛移植后0, 1, 3, 5, 7 d腹腔内注射100 µg)或/和抗CD40L(在胰岛移植当天腹腔注射1 mg,其后分别在第2, 4, 7, 14天注射0.5 mg)治疗,移植后每周采集2次尾静脉血,以血糖<11.1 mmol/L判定移植胰岛存活,以此来比较人胰岛细胞在两者中的生存情况。

1.4.5 组织形态学检查 于移植后特定天数取出小鼠的组织工程预血管化标本,大体观察,显微镜下整体观察以及切片苏木精-伊红染色观察组织内新生微血管情况。

1.5 主要观察指标 ①硅胶管小室内构建微血管网的结果。②预血管化处理时间以及移植胰岛的数量与血糖变化的关系。③预血管化处理后异种胰岛移植生存分析结果。

1.6 统计学分析 组间生存时间比较采用Kaplan-Meier生存分析,其他数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据由GraphPad Prism(美国GraphPad软件公司)软件处理, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

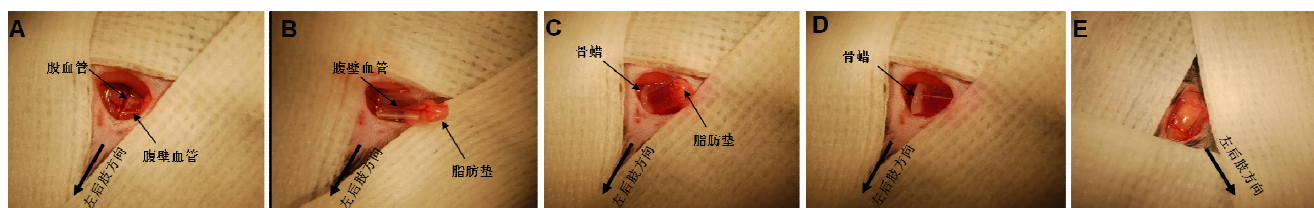


图1 预血管化移植构建过程示意图

Figure 1 Schematic diagram of the process of the prevascularized graft chamber

图注: 图A 显露腹股沟区股血管及其分支-腹壁血管; B 将腹壁血管置入硅胶管中央; C 显示硅胶管一端用脂肪垫封闭, 另一端用骨蜡封闭, 构成一个小室; D 为将注入培养基的硅胶管置入皮下; E 为硅胶管小室放置 28 d 后大体外观。

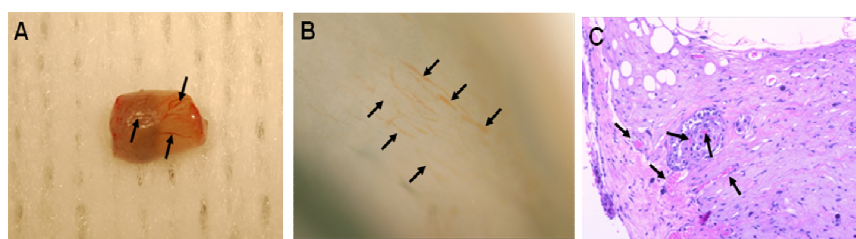


图2 组织工程预血管化小室胰岛移植物的形态学观察(箭头所指为新生血管)

Figure 2 Morphology of pancreatic islet grafts in tissue-engineered chamber

图注: 图A 为大体观察可见移植体内新生较粗血管; B 为显微镜下直接观察移植体, 可见大量微小血管网($\times 50$); C 为组织切片苏木精-伊红染色示意图($\times 100$)。

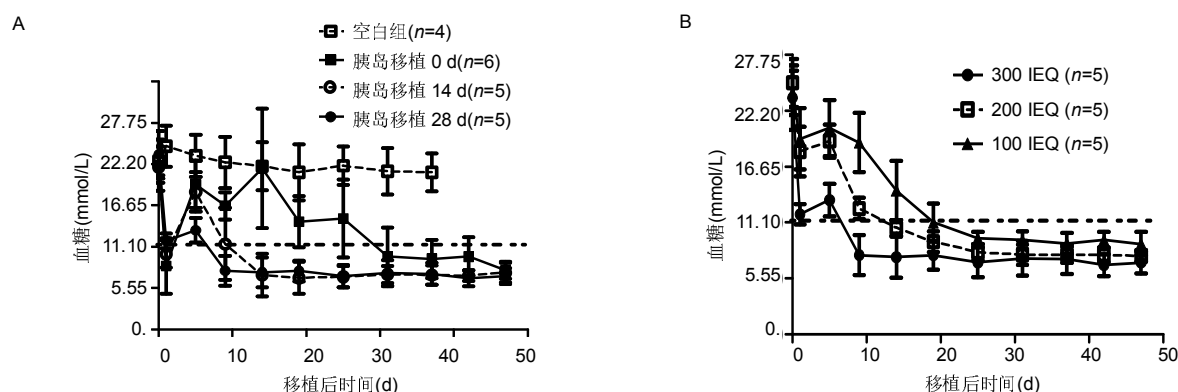


图3 预血管化处理时间以及胰岛数量与血糖变化的关系

Figure 3 The relationship between the duration of prevascularization or the number of transplanted islets and the change of blood glucose level

图注: 图A 为预血管化处理 0, 14 和 28 d 移植胰岛, 血糖下降至正常所需时间逐渐减少($P < 0.05$); B 显示预血管化处理 28 d 移植胰岛后, 血糖降至正常所需时间与移植胰岛数量呈反比。

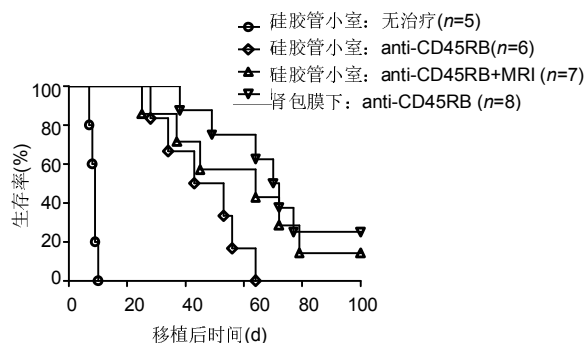


图4 预血管化处理后异种胰岛移植生存时间

Figure 4 The survival time of the xenogenic islets after pre-vascularization

图注: 小鼠肾包膜下人胰岛细胞移植生存率与预血管化处理硅胶管小室移植组差异无显著显著性意义($P > 0.05$)。

2 结果 Results

2.1 硅胶管小室内构建微血管网结果 组织工程构建预血管化28 d后大体观察、显微镜下可见移植体中新丰富较粗血管及微小血管网络(图2A, B)。图2C为移植体切片苏木精-伊红染色后显示胰岛细胞团块内部及周围大量的新生血管, 说明胰岛细胞微环境供血供氧丰富, 组织工程预血管化成功建立了适宜胰岛细胞生长的血管网络(图2)。

2.2 预血管化处理时间以及移植胰岛数量与血糖变化的关系 分别于预血管化处理0, 14以及28 d在硅胶管移植体中注入小鼠胰岛细胞, 结果显示, 没有移植胰岛的空白组小鼠血糖值一直保持在高血糖水平。在植入硅胶管移植体当天同时移植胰岛细胞组(0 d)所有小鼠血

糖在(32.3±11.7) d后恢复到正常(低于11.1 mmol/L), 在预血管化处理14 d移植胰岛细胞组所有小鼠在(13.0±4.2) d后血糖值恢复正常, 而组织工程预血管化28 d再移植胰岛组所有小鼠在(7.4±3.6) d血糖值就恢复正常, 与前两者比较, 血糖恢复正常时间差异有显著性意义($P < 0.05$), 组织工程预血管化28 d组降血糖效果最明显。以上的结果表明, 组织工程预血管化对于胰岛移植有着良好的促进作用, 预血管化时间越长移植胰岛生存状况越好(图3A)。

在硅胶管小室预血管化处理28 d分别注入同种小鼠100, 200以及300 IEQ胰岛细胞, 观察到3组小鼠血糖降至正常所需要的时间分别为(20.4±4.7), (14.0±3.5), (7.4±3.6) d, 三者比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 表明胰岛细胞在充分血供情况下, 胰岛数量与血糖降至正常所需时间成反比(图3B)。

2.3 预血管化处理后异种胰岛移植生存分析结果 硅胶管小室预血管化处理28 d后移植入人胰岛细胞, 对照组无抗体治疗组所有移植胰岛在15 d被排斥, 抗CD45RB抗体治疗组胰岛细胞在65 d内被排斥, 若联合抗CD40L抗体治疗, 则7只中有1例(14.3%)长期存活(大于100 d)。肾脏包膜下胰岛移植是动物实验胰岛常规移植部位, 在实验中肾包膜下移植异种胰岛并用抗CD45RB治疗, 8只中有2只(25%)胰岛长期存活, 与双抗体治疗移植组比较差异无显著性意义($P > 0.05$) (图4)。

3 讨论 Discussion

实验通过组织工程方法构建具有丰富血管网络的硅胶管小室, 探讨了将胰岛细胞移植至该结构的可行性, 并对胰岛移植的新部位也做了有意义的探讨。利用微小硅胶管包绕小鼠腹壁血管, 在Matrigel™基质胶所含的促血管生长因子作用下使腹壁血管向基质中长出大量新生血管, 同时基质胶中层粘连蛋白和胶原酶IV对于胰岛β细胞的生长以及分化也非常关键。有研究报道在硅胶管小室植入的最早2周就可见毛细血管网络, 预血管化21 d后胰岛簇团内出现大量血管结构^[6]。

实验观察到在移植植物植入28 d可见明显的较粗血管以及丰富的毛细血管网, 在显微镜下可见大量的毛细血管在胰岛细胞团内部或周围。血管化时间越长, 则局部微环境越利于胰岛细胞生长和功能发挥。预血管化28 d, 糖尿病小鼠血糖下降至正常水平仅需要(7.4±3.6) d, 而血管化14 d则需(13.0±4.2) d, 未预血管化组所需时间

最长, 达到(32.3±11.7) d, 说明在预血管化4周内, 移植植物中已充分建立了血管网络, 形成的富氧微环境最适宜胰岛生存, 最利于胰岛发挥降血糖作用。

实验中将胰岛细胞移植入组织工程硅胶管小室模型并被埋置在小鼠皮下, 其他研究也探索将胰岛放置在动物身体的不同位置, 如大网膜^[8]、脾脏^[9-10]、胃黏膜下^[11]、附睾脂肪^[12]、肌肉组织间以及眼前房等等^[13-15]。虽然将胰岛放置在这些部位不同程度上能降低血糖, 但大部分放置途径均为侵入性, 操作复杂, 且必须入腹腔, 或虽放置途径表浅, 但胰岛移植后仍不能迅速血管化, 降糖效果欠佳。将小的硅胶管包绕小鼠腹壁血管, 放置在腹股沟区皮下, 并加入促进血管内皮以及胰岛生长的基质胶, 待硅胶管小室充分血管化后再移植入胰岛, 模型建立容易, 植入或取出都很容易, 降糖效果更明显。作者的研究中除1例移植植物因局部感染而取出外, 其他移植植物都能很好地为机体耐受, 表明皮下途径放置胰岛移植植物是安全、可行的。

临床胰岛移植是治疗1型糖尿病的方法之一, 但胰腺器官的短缺是目前限制临床大量开展的原因之一。理论上, 来源动物的异种胰岛可以解决器官短缺的问题, 但强烈的排斥反应以及移植部位的选择是未来需要解决的问题。

肾脏包膜下部位是研究啮齿类动物胰岛移植常选择的部位。在过去的研究里, 将人胰岛细胞移植到小鼠肾包膜下, 并用抗CD45RB治疗, 有25%胰岛可以长期存活^[16]。

实验中探索将人胰岛放置在更容易植入的皮下组织工程小室里, 用抗CD45RB联合抗CD40L治疗, 结果有14.3%胰岛长期存活, 生存率和存活时间与肾脏包膜下移植组无统计学差异。考虑到组织工程小室可以预血管化, 容易埋置及取出, 且可以多次反复小室内移植胰岛, 对于以后开展实验动物胰岛移植部位的选择以及未来的临床应用有一定的意义。

综上所述, 研究探讨了组织工程预血管化处理对移植胰岛的存活有重要的促进意义, 硅胶管小室预血管化有望成为胰岛移植较理想的治疗1型糖尿病的方法之一。

作者贡献: 实验设计为邓绍平、赵高平、黄孝伦, 实施为赵高平、杨卯竹、魏玲玲。成文为赵高平, 统计学分析为魏亮。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利

益冲突。

伦理问题: 人胰腺捐献经患者家属书面同意并为四川省人民医院伦理委员会批准。动物实验均按照四川省人民医院动物与实验伦理委员会规章执行。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲审核, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*.2004;27(5):1047-1053.
- [2] Suszynski TM, Avgoustiniatos ES, Papas KK. Intraportal islet oxygenation. *J Diabetes Sci Technol*. 2014;8(3):575-580.
- [3] Cantley J, Walters SN, Jung MH, et al. A preexistent hypoxic gene signature predicts impaired islet graft function and glucose homeostasis. *Cell Transplant*. 2013;22(11):2147-2159.
- [4] Deng S, Markmann JF, Rickels M, et al. Islet alone versus islet after kidney transplantation: metabolic outcomes and islet graft survival. *Transplantation*. 2009;88(6):820-825.
- [5] Menger MD, Jaeger S, Walter P, et al. Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes*. 1989;38 Suppl 1:199-201.
- [6] Hussey AJ, Winardi M, Han XL, et al. Seeding of pancreatic islets into prevascularized tissue engineering chambers. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15(12): 3823-3833.
- [7] Cronin KJ, Messina A, Knight KR, et al. New murine model of spontaneous autologous tissue engineering, combining an arteriovenous pedicle with matrix materials. *Plast Reconstr Surg*.2004;113(1):260-269.
- [8] Kin T, Korbitt GS, Rajotte RV. Survival and metabolic function of syngeneic rat islet grafts transplanted in the omental pouch. *Am J Transplant*. 2003;3(3):281-285.
- [9] Gustavson SM, Rajotte RV, Hunkeler D, et al. Islet auto-transplantation into an omental or splenic site results in a normal beta cell but abnormal alpha cell response to mild non-insulin-induced hypoglycemia. *Am J Transplant*. 2005;5(10):2368-2377.
- [10] Aoki T, Hui H, Umehara Y, et al. Intrasplenic transplantation of encapsulated genetically engineered mouse insulinoma cells reverses streptozotocin-induced diabetes in rats. *Cell Transplant*. 2005;14(6): 411-421.
- [11] Caiazzo R, Gmyr V, Hubert T, et al. Evaluation of alternative sites for islet transplantation in the minipig: interest and limits of the gastric submucosa. *Transplant Proc*. 2007;39(8):2620-2623.
- [12] Dufour JM, Rajotte RV, Zimmerman M, et al. Development of an ectopic site for islet transplantation, using biodegradable scaffolds. *Tissue Eng*. 2005; 11(9-10):1323-1331.
- [13] Weber CJ, Hardy MA, Pi-Sunyer F, et al. Tissue culture preservation and intramuscular transplantation of pancreatic islets. *Surgery*. 1978;84(1): 166-174.
- [14] Rafael E, Tibell A, Rydén M, et al. Intramuscular autotransplantation of pancreatic islets in a 7-year-old child: a 2-year follow-up. *Am J Transplant*. 2008;8(2): 458-462.
- [15] Speier S, Nyqvist D, Cabrera O, et al. Noninvasive in vivo imaging of pancreatic islet cell biology. *Nat Med*. 2008;14(5):574-578.
- [16] Zhao G, Moore DJ, Kim JI, et al. An immunosufficient murine model for the study of human islets. *Xenotransplantation* 2014; 21(6): 567-573.