

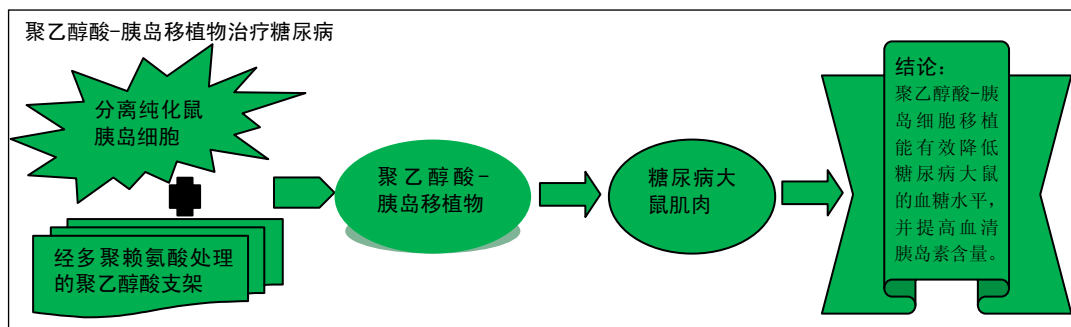
聚乙醇酸-胰岛移植埋植大鼠腿部肌肉治疗糖尿病

谢万均¹, 魏 争², 宋 纯² (¹大连市友谊医院, 辽宁省大连市 116021; ²哈尔滨医科大学附属第一临床医学院卫生部细胞移植重点实验室, 黑龙江省哈尔滨市 150000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0984

ORCID: 0000-0001-5388-7299(谢万均)

文章快速阅读:



谢万均, 女, 1980年生, 黑龙江省佳木斯市人, 汉族, 副主任医师, 主要从事糖尿病方面的研究。

通讯作者: 宋纯, 硕士生导师, 哈尔滨医科大学附属第一临床医学院卫生部细胞移植重点实验室, 黑龙江省哈尔滨市 150000

中图分类号: R318

文献标识码: A

稿件接受: 2018-05-28



文题释义:

聚乙醇酸: 是典型的合成可降解聚合物, 由乙交酯开环聚合制取, 降解后生成羟基乙酸; 由于羟基乙酸是三羧酸循环的中间代谢物, 吸收和代谢机制明确, 并且有可靠的生物安全性, 因此聚乙醇酸及其共聚物作为组织工程支架材料具有良好的生物相容性, 生物可降解性和降解可调性, 而且可诱导某些基因的上调转录。

聚乙醇酸-胰岛移植: 将胰岛种植在经多聚赖氨酸处理的聚乙醇酸支架上, 聚乙醇酸支架可为胰岛提供一个能附着的框架和代谢场所, 延长胰岛在体外的存活时间, 同时聚乙醇酸支架还可为胰岛体外生存提供良好的三维培养环境。

摘要

背景: 胰岛移植是一种比较有效的糖尿病治疗方法, 运用生物医学工程技术将生物材料引入胰岛移植, 可保持胰岛活力, 提高移植效率。

目的: 将培养的聚乙醇酸-胰岛移植到糖尿病受体大鼠肌肉内, 观察聚乙醇酸-胰岛移植治疗糖尿病的效果。

方法: 取 Wistar 大鼠 18 只, 采用腹腔注射链脲菌素方法建立糖尿病模型, 建模成功后即刻随机分 3 组干预, 对照组腿部肌肉注射生理盐水, 实验 1 组腿部肌肉注射异种胰岛细胞, 实验 2 组腿部埋植聚乙醇酸-异种胰岛细胞移植。移植后 3, 7, 14, 21, 30 d, 检测各组大鼠血糖及胰岛素水平; 移植后 14, 30 d, 取实验组移植标本, 进行扫描电镜观察。

结果与结论: ①实验 1 组、实验 2 组移植后 3, 7 d 的血糖值明显低于对照组 ($P < 0.05$), 实验 2 组移植后 14, 21, 30 d 的血糖值低于实验 1 组 ($P < 0.05$); ②实验 1 组、实验 2 组移植后 3, 7 d 的胰岛素水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 实验 2 组移植后不同时间点的胰岛素水平明显高于实验 1 组 ($P < 0.05$); ③扫描电镜显示, 移植后 14 d, 实验组可见较多形态良好的胰岛细胞仍黏附于聚乙醇酸纤维支架上, 胰岛细胞间可见呈细纤维交织成网状的细胞外基质形成, 在胰岛细胞周围可见少量红细胞; 随着埋植时间的延长, 聚乙醇酸纤维支架开始降解, 纤维支架逐渐断裂, 长的纤维降解为短的纤维, 30 d 后最终支架层层脱落成碎片; ④结果表明, 聚乙醇酸-胰岛细胞移植能有效降低糖尿病大鼠的血糖水平, 并提高血清胰岛素水平。

关键词:

聚乙醇酸; 胰岛; 糖尿病; 扫描电镜; 生物材料; 国家自然科学基金

主题词:

聚乙醇酸; 糖尿病; 胰岛; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(30570931)

Xie Wan-jun, Associate chief physician, Dalian Friendship Hospital, Dalian 116021, Liaoning Province, China

Corresponding author: Song Chun, Master's supervisor, Key Laboratory of Cell Transplantation, Ministry of Health, Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China

Polyglycolic acid-islet compound transplantation into rat leg muscles as diabetes treatment

Xie Wan-jun¹, Wei Zheng², Song Chun² (¹Dalian Friendship Hospital, Dalian 116021, Liaoning Province, China; ²Key Laboratory of Cell Transplantation, Ministry of Health, Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Islet transplantation is an effective method for diabetes treatment. Using biomedical engineering technology to introduce biomaterials into islet transplantation can maintain the vitality of islet and improve the efficiency of transplantation.

OBJECTIVE: To transplant the cultured polyglycolic acid (PGA)-islet into the muscle of diabetic recipient rats and to observe the effect of PGA-islet in the treatment of diabetes mellitus.

METHODS: A diabetic model was established in 18 Wistar rats by the method of intraperitoneal injection of streptozotocin, and the model rats were randomly assigned into three groups. In the control group, normal saline was injected into the muscle of the rat leg. In the experimental group 1, allogeneic islet cells were intramuscularly injected into the rat leg. In the experimental group 2, PGA-allogeneic islet cell graft was intramuscularly injected into the rat leg. At 3, 7, 14, 21 and 30 days after transplantation, blood glucose and serum insulin levels were detected in each rat. At 14 and 30 days after transplantation, graft specimens were taken from the experimental groups and observed by scanning electron microscopy.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) At 3 and 7 days after transplantation, the blood glucose levels in the two experimental groups were significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$), while the serum insulin levels in the two experimental groups were significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). Compared with the experimental group 1, the blood glucose level in the experimental group 2 was significantly lower at 14, 21 and 30 days after transplantation, while the serum insulin level in the experimental group 2 was significantly higher at each time point after transplantation ($P < 0.05$). Under the scanning electron microscope, in the experimental groups, plenty of well-formed islet cells were adhered to the PGA fiber scaffold at 14 days after transplantation; a visible network of extracellular matrix with fine fibers formed in islet cells; and a small number of red blood cells were visible around the islet cells. With the extension of embedded time, PGA fiber scaffolds began to degrade and crack. Long fibers degraded into short fibers, and after 30 days, the scaffold layer was broken into pieces finally. All these findings indicate that the transplantation of PGA-islet can effectively reduce the blood glucose level and increase the serum insulin level in diabetic rats.

Subject headings: Polyglycolic Acid; Diabetes Mellitus; Islets of Langerhans; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 30570931

0 引言 Introduction

糖尿病是一种全球性疾病, 国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)的最新数据显示, 截至2015年全球共有4.15亿人患有糖尿病, 其中中国约占1/4, 达1.09亿人^[1]。众所周知, 通过口服药物治疗、胰岛素治疗、血糖检测、控制饮食、适当运动及糖尿病教育, 能够使血糖达标, 可在一定程度上避免糖尿病急性并发症的出现, 延缓糖尿病慢性并发症的发生和发展, 然而严格的血糖控制也会增加低血糖的风险。此外, 长期使用胰岛素还会引起体质量增加、高胰岛素血症等不良反应。传统的治疗方法不能有效控制1型糖尿病或胰岛功能差的2型糖尿病患者的代谢紊乱, 血糖波动还会加重慢性并发症的发生及发展。对于1型和一些胰岛功能差的2型糖尿病患者, 胰岛移植是一种比较有效的治疗方法^[2-4]。

胰岛细胞移植可增加糖尿病患者体内胰岛素水平, 有效控制血糖水平, 避免血糖过高或波动较大, 避免急性并发症的出现及延缓慢性并发症的发展, 提高患者生活质量, 延长生存期, 进而达到根治糖尿病的目的。胰岛移植后, 可根据血糖水平释放胰岛素, 这样就可避免使用外源性胰岛素治疗所带来的低血糖和胰岛素抵抗。采用胰岛移植治疗糖尿病的疗效已被大家接受且认可, 进行胰岛移植需要大量的胰岛细胞, 这是进行这项治疗首先需要解决的难题。胰岛细胞要经过体外分离纯化后才能用于糖尿病的治疗, 此时的胰岛细胞已失去了正常细胞间的网络结构, 所以科研人员始终无法使移植的胰岛细胞能长期存活下去。

细胞及细胞外基质组成了机体的组织和器官, 细胞外基质不仅对组织细胞起支持、保护、营养作用, 而且还与细胞的增殖、分化、代谢、识别、黏着、迁移等基本生命活动密切相关, 所以人们越来越重视对于细胞外基质的研究^[5]。此次研究将作为人造细胞外基质的聚乙醇酸细胞支

架与胰岛细胞共培养, 并移植在糖尿病大鼠腿部肌肉内, 利用聚乙醇酸的纤维网状结构、良好的生物相容性和高分子材料的降解性, 为胰岛细胞提供临时的黏附生长和代谢活动框架, 使细胞有效存活并分泌胰岛素, 通过观察其治疗糖尿病的疗效, 探索一种简单、安全且损伤较小的胰岛移植治疗糖尿病有效方法。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 对比观察动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2007年3月至2008年2月在哈尔滨医科大学附属第一临床医学院卫生部细胞移植重点实验室完成。

1.3 材料

实验动物: 体质量150~200 g的Wistar大鼠, 雌雄不拘, 由哈尔滨医科大学附属一院实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(黑)2008004; 体质量250~300 g的SD大鼠, 雌雄不拘, 由北京维通利华生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK(京)2006-0009。

实验主要材料、试剂与仪器: 聚乙醇酸(美国Synthecon公司); 链脲菌素(Sigma公司); 戊巴比妥钠(Shanghai chemical reagent Inc. China); 胶原酶 V (Sigma, Inc.USA); RPMI-1640、胎牛血清(Hyclon, Inc.USA); 胰岛素放免试剂盒(Linco, Inc.USA); 1%青霉素-链霉素-两性霉素B(Amresco, Inc.USA); 血糖仪(强生, Inc.USA); 扫描电镜(S-3400N, 日本日立公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 建立糖尿病模型 选择18只Wistar大鼠, 禁食12 h, 按照70 mg/kg的剂量将1%链脲菌素溶液注射于Wistar大鼠的腹腔内, 4 d后监测血糖及血清胰岛素浓度, 连续2次测得非空腹血糖 >16.7 mmol/L 及血清胰岛素浓度 <

0.5 μg/L为造模成功。

1.4.2 聚乙醇酸支架培养前准备 聚乙醇酸支架纤维直径15 μm, 网孔为100–150 μm, 空隙率为97%, 厚度为1.0–2.0 mm。细胞培养前将支架浸泡入体积分数75%乙醇溶液中30 min, PBS冲洗3次, 超净台内吹干, 然后放入10 g/L多聚赖氨酸中浸泡30 min, 在超净台内吹干, 再经紫外灯照射消毒1 h后, 准备进行细胞培养。

1.4.3 胰岛细胞的分离与纯化 取SD大鼠, 术前禁食12 h, 用0.5%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉, 放在实验台上, 固定四肢, 使大鼠仰卧位, 胸腹区备皮, 碘伏消毒3次, 铺无菌单, 做“个”字型切口, 进腹, 将十二指肠牵向下方, 暴露胰管及胆总管, 将胆总管近十二指肠端结扎, 用儿科4号套管针插入胆总管, 抽出针芯, 可见黄绿色胆汁回流, 此时剪破心脏放血, 然后快速经套管针向胰管注入预冷的0.25%胶原酶V溶液8–10 mL, 使整个胰腺完全膨胀后, 迅速摘取胰腺, 用眼科镊子修剪胰腺后, 移入装有6 mL预冷Hank's液的50 mL刻度离心管中。放入38 °C水浴震荡容器内, 震荡消化10–15 min, 当胰腺呈细小颗粒时, 加入4 °C含体积分数20%胎牛血清的RPMI-1640培养液30 mL, 终止消化。室温下放置5–10 min, 然后用500 μm的不锈钢丝网过滤, 将过滤后的胰岛悬液放入50 mL刻度离心管中, 4 °C 1 000 r/min离心5 min, 弃去上清液, 沉淀物加入4 °C Hank's液洗涤, 采用反复静置沉降法进行纯化, 最终沉淀物为所获得的胰岛。通过双硫脲(DTZ)染色进行胰岛计数及纯度估计, 通过AO-PI染色来检测胰岛的存活率^[6–9]。

1.4.4 胰岛细胞培养和移植 建模成功后即刻将糖尿病模型鼠随机分成3组, 对照组、实验1组和实验2组, 每组6只。

移植前准备: 实验1组, 将含体积分数20%胎牛血清、1%青霉素-链霉素-两性霉素B及10 mmol/L HEPES的RPMI-1640培养液与胰岛细胞共培养5 d; 实验2组, 将经多聚赖氨酸处理的无菌聚乙醇酸与 1×10^4 胰岛细胞共培养5 d, 培养基为体积分数20%胎牛血清、1%青霉素-链霉素-两性霉素B及10 mmol/L HEPES的RPMI-1640培养液。

移植实验: 对照组大鼠腿部肌肉内注射1 mL生理盐水; 实验1组腿部肌肉内注射1 mL(1×10^4)胰岛细胞悬液; 实验2组腿部肌肉内埋植聚乙醇酸-胰岛移植物。该基金项目分体外实验及体内实验两部分, 体外实验已证明聚乙醇酸-胰岛复合物的形态及功能良好^[6–9]。

1.5 主要观察指标

血糖及血清胰岛素水平测定: 移植后每天取大鼠尾静脉血测血糖, 移植后3, 7, 14, 21, 30 d测血清胰岛素浓度, 当非空腹血糖浓度 ≤ 11.1 mmol/L持续超过2 d, 胰岛素质量浓度 ≥ 0.5 μg/L, 说明移植物功能存活, 反之说明移植物功能丧失。

扫描电镜下观察: 移植后14, 30 d, 每个时间点每组

处死3只动物取少许移植物, 用3%戊二醛固定聚乙醇酸-胰岛细胞复合物标本, 2 h后用蒸馏水冲洗, 随后以1%锇酸进行固定, 2 h后分别以体积分数50%, 70%, 90%的乙醇脱水操作15 min、体积分数100%乙醇10 min, 然后进行冷冻、干燥及镀膜, 制片后在扫描电镜下进行观察。在移植14 d时, 取实验1组的标本进行电镜下观察, 观察不到胰岛细胞团, 虽然仍能够测得胰岛素的浓度, 考虑与胰岛细胞死亡、崩解, 释放胰岛素有关, 因此未记录此组结果。

1.6 统计学分析 采用SAS 9.1软件处理数据, 各组糖尿病大鼠5个时间点上血糖及血清胰岛素水平采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用多变量分析方法来检验3组之间有差别即 $P < 0.05$, 在进行两两比较时调整检验水准并获得了 $\alpha' = \frac{\alpha}{3} = \frac{0.05}{3} = 0.017$, 则认为两组血糖及血清胰岛素含量均值向量比较 $P < 0.017$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 对照组未予任何治疗干预, 7 d后由于血糖过高, 达到30 mmol/L以上, 逐渐出现死亡, 到下一观察点之前(造模14 d)全部死亡, 考虑与糖尿病急性并发症有关, 如糖尿病酮症酸中毒及肾衰竭等; 实验1组与实验2组12只动物造模后全部存活。

2.2 血糖及血清胰岛素水平测定 移植前, 各组大鼠血糖及血清胰岛素水平比较均无差异($P > 0.05$)。移植后, 3组间血糖及血清胰岛素水平差异显著($P < 0.05$), 根据wilks' Lambda 检验分析的结果表明, 3组5个时间点上血糖和胰岛素均值向量分析差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1, 2。

2.3 扫描电镜观察 移植前, 聚乙醇酸-胰岛细胞移植物经过5 d的体外培养, 从图1可看到较多的胰岛细胞团黏附于聚乙醇酸纤维支架上。

移植后14 d, 实验2组可见较多形态良好的胰岛细胞仍黏附于聚乙醇酸纤维支架上, 胰岛细胞间可见到呈细纤维交织成网状的细胞外基质的形成, 在胰岛细胞的周围还可见到少量的红细胞; 随着埋植时间的延长, 聚乙醇酸纤维支架开始降解, 纤维支架逐渐断裂, 长的纤维降解为短的纤维, 最终支架层层脱落成碎片, 见图2。

3 讨论 Discussion

目前, 临床主要依靠药物控制糖尿病及其并发症的发展, 而不能治愈糖尿病, 近些年, 外科减重手术应用于临床治疗糖尿病, 但因有严格的适应证且产生近期或远期并发症, 限制了其发展。胰腺移植可使糖尿病患者脱离外源性胰岛素^[10], 但胰腺供体来源匮乏和移植后并发症等风险限制了其临床应用。

胰岛移植是一种安全性高、创伤性小的微创手术, 通过注射方法完成移植, 达到精确控制血糖水平、脱离胰岛素治疗的目的, 是治愈糖尿病的有效方法之一。与胰腺移

表 1 移植后不同时间点各组大鼠血糖值的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, mmol/L)
Table 1 The blood glucose levels of rats at five time points under three different conditions

组别	移植后 3 d	移植后 7 d	移植后 14 d	移植后 21 d	移植后 30 d
对照组	27.52±1.68	33.95±1.63	-	-	-
实验 1 组	6.73±0.40 ^a	8.38±1.08 ^a	10.60±1.85	13.87±1.74	29.80±1.77
实验 2 组	6.88±0.45 ^a	8.23±0.84 ^a	9.27±0.80 ^b	10.82±0.76 ^b	16.83±3.08 ^b

表注: -表示动物死亡; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与实验组 1 组比较, ^b $P < 0.05$ 。对照组、实验 1 组大鼠腿部肌肉内分别注射 1 mL 生理盐水、1 mL (1×10^4) 胰岛细胞悬液; 实验 2 组大鼠腿部肌肉内埋植聚乙醇酸-胰岛移植。

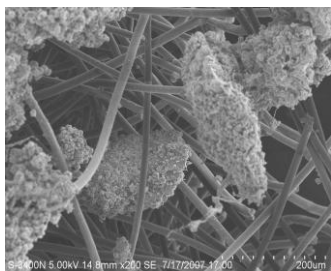


图 1 聚乙醇酸-胰岛细胞移植物体外培养 5 d(扫描电镜, 标尺为 200 μ m)

Figure 1 *In vitro* culture of polyglycolic acid-islet cell graft under scanning electron microscope (scale bar=200 μ m)

图注: 聚乙醇酸网状结构中有许多的胰岛细胞团, 胰岛细胞团呈三维立体生长并黏附于聚乙醇酸支架上。

植相比, 胰岛移植能够避免手术引起的感染、出血、血栓形成等并发症的发生^[11]。胰岛移植的主要部位包括肾包膜、胰腺、腹膜、大网膜、脾、胃肠壁、睾丸、胸腺、肌肉、皮下、门静脉、眼前房、骨髓、脑室等^[12-14]。目前, 胰岛移植在治疗 1 型糖尿病中的应用已取得了一定的临床效果^[15-18]。国际胰岛移植登记处的数据显示, 移植后胰岛素撤离比例逐年上升^[19]。临床研究表明, 高达 60% 的患者可在胰岛移植后 5 年仍然不依赖胰岛素治疗^[20]。2016 年发布的首项胰岛移植 III 期临床试验结果也证实了胰岛移植治疗 1 糖尿病患者的疗效^[21]。

目前胰岛移植治疗糖尿病的疗效已被全世界认可, 但能满足供移植治疗需要的胰岛细胞数量却是全球科学家急切要解决的难题。有些人认为, 异种胰岛移植是解决这一问题的有效手段^[22]。而异种胰岛移植进入临床还需要解决生理功能一致性、免疫排斥和防止跨种系感染发生 3 大关键问题^[23]。胰岛要经过体外分离纯化后, 才能用于糖尿病患者的治疗, 此时的胰岛已失去了正常的细胞间网络结构, 所以科研人员始终无法使被移植的胰岛细胞长期存活下去。

细胞是生物体基本组成单位, 细胞外基质是由细胞合成并分泌到胞外、分布在细胞表面或细胞之间的大分子物质, 主要是一些多糖和蛋白, 或者是蛋白聚糖, 形成精密有序的网状结构, 使细胞与细胞、细胞与基质之间紧密联

表 2 移植后不同时间点各组血清胰岛素水平的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, μ g/L)
Table 2 The serum insulin levels of rats at five time points under three different conditions

组别	移植后 3 d	移植后 7 d	移植后 14 d	移植后 21 d	移植后 30 d
对照组	0.17±0.06	0.17±0.04	-	-	-
实验 1 组	4.50±0.52 ^a	4.13±0.34 ^a	0.66±0.48	0.32±0.08	0.21±0.07
实验 2 组	5.09±0.63 ^{ab}	4.99±0.50 ^{ab}	2.96±0.62 ^b	0.97±0.31 ^b	0.26±0.06 ^b

表注: -表示动物死亡; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与实验 1 组比较, ^b $P < 0.05$ 。对照组、实验 1 组大鼠腿部肌肉内分别注射 1 mL 生理盐水、1 mL (1×10^4) 胰岛细胞悬液; 实验 2 组腿部肌肉内埋植聚乙醇酸-胰岛移植。

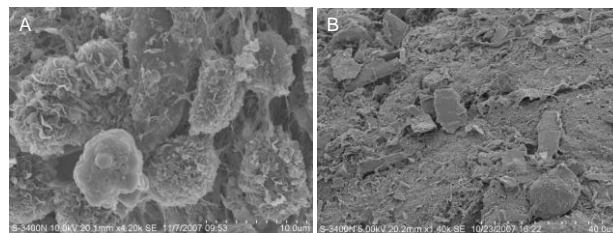


图 2 移植后不同时间点糖尿病大鼠肌肉内的聚乙醇酸-胰岛细胞移植(扫描电镜)

Figure 2 Observation of polyglycolic acid-islet cell grafts embedded in the muscle of diabetic rats under scanning electron microscope

图注: 图中 A 为移植后 14 d, 可见形态良好的胰岛细胞黏附在聚乙醇酸纤维支架上, 细胞间可见到呈细纤维交织成网状的细胞外基质(标尺为 10 μ m); B 为移植后第 30 天, 聚乙醇酸纤维降解, 出现纤维断裂, 纤维支架开始层层脱落, 形成碎片(标尺为 40 μ m)。

系, 构成了各种组织和器官。鉴于细胞外基质在生理和病理过程中的重要作用, 细胞外基质功能的研究已倍受关注。细胞外基质不仅仅包裹细胞, 还是细胞完成若干生理功能必需依赖的物质。已知细胞的形态、运动及分化均与细胞外基质有关。细胞外基质还能结合许多生长因子和激素, 给细胞提供众多信号, 调节细胞功能。细胞外基质为构成组织提供了支架, 是细胞附着的基本框架和代谢场所^[5]。运用生物医学工程技术将生物材料引入胰岛移植, 用来保持胰岛的活力和提高移植的效率^[24]。目前较成熟的胶囊胰岛封装技术仍无法解决胰岛内血管化^[25-26]。

随着胰岛组织工程研究成为新的热点, 将种子细胞种植在细胞生物支架上成为目前组织工程的研究内容之一^[27-28], 生物支架发挥了人造细胞外基质的作用^[29-32], 同时可承载细胞并构筑天然微环境, 以生理方式释放治疗药物和通过呈递物质引导细胞定向生长和增殖^[33-34]。人工的细胞外基质即组织工程细胞支架的生物材料, 一般必须具有以下性能: ①生物相容性好, 在体内不引起炎症反应和毒性反应; ②有可吸收性, 能彻底地被自身组织所取代; ③有可塑性, 可塑为任意的三维结构, 植入后在体内仍可保持特定形状; ④表面化学特性和表面微结构利于细胞的黏附和生长; ⑤降解速率可根据不同细胞的组织再生速率而进行调整; ⑥有一定的力学性、可加工性及可消毒性。由于组织工程中细胞支架的作用是为细胞增殖营造环境,

且应随着细胞的繁殖而逐渐降解、消失,将空间让位于细胞,在生理和体内环境下组成材料的高分子链能自动断裂,并由此形成的小分子能逐渐被机体代谢或吸收。一些高分子可降解生物材料,例如聚乳酸、聚乙醇酸及乳酸/乙醇酸共聚物等在组织工程中发挥了至关重要的作用^[35-41]。

此次研究即利用组织工程细胞支架的生物材料聚乙醇酸作为人造细胞外基质,与胰岛细胞共培养。为了使胰岛能更好地黏附于聚乙醇酸支架上,实验在聚乙醇酸支架上包被一层2 g/L多聚赖氨酸,可增加细胞黏附的内表面积,有利于细胞营养成分的渗入和代谢产物的排出,为胰岛在聚乙醇酸支架表面能黏附生长提供了适宜的微环境。多聚赖氨酸是由多个氨基酸片段通过共价键及范德华力等聚合而成,其良好的细胞吸附性已得到广泛应用,另外,氨基、羟基、酚胺基、羧基等有利于细胞的黏附与生长。所以利用多聚赖氨酸所含的氨基、羟基等模仿细胞外基质,可改善材料的表面活性及表面的黏附性,提高细胞的黏附能力,促进细胞的生长和繁殖。将纯度较高、细胞活性较好、并具有较高胰岛素分泌功能的胰岛细胞,在体外培养5 d(有支架组和无支架组),以降低胰岛细胞的免疫原性,减少胰岛细胞对宿主的免疫排斥反应^[42],然后移植到糖尿病受体大鼠腿部肌肉内,观察对糖尿病受体大鼠的治疗效果,在移植治疗过程中没有使用任何免疫抑制剂。

此次研究在3组糖尿病大鼠腿部肌肉中分别注射生理盐水、胰岛细胞悬液和聚乙醇酸-胰岛移植,结果发现聚乙醇酸-胰岛细胞移植后,糖尿病大鼠的血糖水平和胰岛素浓度都恢复了正常(即血糖 <11.1 mmol/L,胰岛素浓度 >0.5 μ g/L),治疗糖尿病的效果要优于对照组和实验1组。

扫描电镜下观察,聚乙醇酸纤维网状结构中有许多的胰岛细胞团,胰岛细胞团在纤维网状结构中成三维立体状态生长,使胰岛细胞能充分地吸收营养及排泄废物。作为人造的细胞外基质,聚乙醇酸纤维网状结构给胰岛细胞黏附生长提供了基本框架,起到支持和保护的胰岛细胞作用。移植后14 d,实验2组可见形态良好的胰岛细胞黏附在聚乙醇酸纤维支架上,细胞间可见到呈细丝状交织成网的细胞外基质形成,还可在胰岛细胞周围见到少量的红细胞,这是由于在移植时毛细血管被切断,从而使红细胞溢出的结果,同时也说明肌肉内的血液供应比较丰富,能够为支架上的胰岛细胞提供足够的营养;实验1组的胰岛细胞由于没有聚乙醇酸纤维支架的支持和保护,胰岛细胞团不能很好地分散而聚集成堆,使中心部位的胰岛细胞得不到营养的供应导致胰岛功能的丧失,移植后14 d电镜下未观察到胰岛细胞团。随着时间的延长,埋植后的聚乙醇酸纤维支架开始降解,纤维支架逐渐断裂,长的纤维降解为短的纤维,最终支架层层脱落成碎片,最终将代谢成为二氧化碳和水并排出体外。聚乙醇酸无毒,无刺激性,具有良好的亲水性生物相容性和控缓释性能。

关于胰岛移植部位的选择有很多,但大部分放置途径

具有侵入性,操作复杂且必须入腹腔^[22],因肌肉血液供应丰富、操作方便、易于愈合,故此次研究采用大鼠腿部肌肉作为移植部位,整个实验过程中未见感染。此次研究结果证明,聚乙醇酸-胰岛细胞移植治疗糖尿病的效果较好,选择大鼠腿部肌肉作为移植部位,操作简便、安全且损伤小。

致谢:感谢国家自然科学基金面上项目的基金资助,感谢哈尔滨医科大学电镜室及统计学教研室各位老师给予的指导及技术性帮助。

作者贡献:实验实施为谢万均,宋纯进行实验设计、撰写论文、审校,资料收集为魏争。

经费支持:该文章接受了“国家自然科学基金资助项目(30570931)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程,不存在利益冲突。

伦理问题:实验通过哈尔滨医科大学附属一院动物伦理委员会的批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

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外审,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良行为承担责任。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。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. 7th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2015.
- [2] O'Sullivan ES, Johnson AS, Omer A, et al. Rat islet cell aggregates are superior to islets for transplantation in microcapsules. *Diabetologia*. 2010;53(5):937-945.
- [3] Beck J, Angus R, Madsen B, et al. Islet encapsulation: strategies to enhance islet cell functions. *Tissue Eng*. 2007; 13(3):589-599.
- [4] Emamullee JA, Shapiro AMJ. Factors Influencing the Loss of β -Cell Mass in Islet Transplantation. *Cell Transplant*. 2007; 16(1):1-8.
- [5] 宋今丹, 杨恬, 李丰. 医学细胞生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [6] Chun S, Huang Y, Xie WJ, et al. Adhesive growth of pancreatic islet cells on a polyglycolic acid fibrous scaffold. *Transplant Proc*. 2008;40(5):1658-1663.
- [7] Hou Y, Song C, Xie WJ, et al. Excellent effect of three-dimensional culture condition on pancreatic islets. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009;86(1):11-15.

- [8] 宋纯, 黄玉东, 侯艳, 等. 聚乙醇酸生物支架与胰岛的共培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(16):3119-3123.
- [9] 宋纯, 黄玉东, 姜再兴, 等. PGA细胞支架在大鼠胰岛体外实验中的应用[J]. 化学与黏合, 2009, 31(2):28-32.
- [10] Kandaswamy R, Stock PG, Skeans MA, et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: pancreas. *Am J Transplant*. 2013; 13 Suppl 1:47-72.
- [11] 裴广辉, 王树森. 胰岛移植受术前评价与管理[J]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4(3):177-179.
- [12] Perez VL, Caicedo A, Berman DM, et al. The anterior chamber of the eye as a clinical transplantation site for the treatment of diabetes: a study in a baboon model of diabetes. *Diabetologia*. 2011;54(5):1121-1126.
- [13] Rajab A. Islet transplantation: alternative sites. *Curr Diab Rep*. 2010;10(5):332-337.
- [14] Salazar-Bafielos A, Benitez—Bribiesca L, Sigalet DL, et al. Bone marrow as a site for pancreatic islet transplantation. *Blood*. 2010;115(17):3643-3644.
- [15] 谢艳, 王树森, 刘蕾. 异种胰岛移植的现状[J]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4(6):350-354.
- [16] 程颖. 胰岛分离的研究进展[J]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4(6):345-349.
- [17] Rheinheimer J, Bauer AC, Silveiro SP, et al. Human pancreatic islet transplantation: an update and description of the establishment of a pancreatic islet isolation laboratory. *Arch Endocrinol Metab*. 2015;59(2):161-170.
- [18] Vantyghem MC, Defrance F, Quintin D, et al. Treating diabetes with islet transplantation: lessons from the past decade in Lille. *Diabetes Metab*. 2014;40(2):108-119.
- [19] Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010. *Diabetes Care*. 2012;35(7):1436-1445.
- [20] Turgeon NA, Avila JG, Cano JA, et al. Experience with a novel efalizumab-based immunosuppressive regimen to facilitate single donor islet cell transplantation. *Am J Transplant*. 2010;10(9):2082-2091.
- [21] Hering BJ, Clarke WR, Bridges ND, et al. Phase 3 Trial of Transplantation of Human Islets in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia. *Diabetes Care*. 2016;39(7):1230-1240.
- [22] 王维. 异种胰岛移植研究现状和走向临床的关键科学问题[J]. 器官移植, 2017, 8(6):413-416.
- [23] Denner J. Recent progress in xenotransplantation, with emphasis on virological safety. *Ann Transplant*. 2016;21:717-727.
- [24] Bowers DT, Botchwey EA, Brayman KL. Advances in Local Drug Release and Scaffolding Design to Enhance Cell Therapy for Diabetes. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015;21(6):491-503.
- [25] Barkai U, Rotem A, de Vos P. Survival of encapsulated islets: More than a membrane story. *World J Transplant*. 2016;6(1):69-90.
- [26] Farney AC, Sutherland DER, Opara EC. Evolution of islet transplantation for the last 30 years. *Pancreas*. 2016;45(1):8-20.
- [27] Mao GH, Chen GA, Bai HY, et al. The reversal of hyperglycaemia in diabetic mice using PLGA scaffolds seeded with islet-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biomaterials*. 2009;30(9):1706-1714.
- [28] Terada S, Yoshimoto H, Fuchs JR, et al. Hydrogel optimization for cultured elastic chondrocytes seeded onto a polyglycolic acid scaffold. *J Biomed Mater Res A*. 2005;75(4):907-916.
- [29] Kim M, Choi YS, Yang SH, et al. Muscle regeneration by adipose tissue-derived adult stem cells attached to injectable PLGA spheres. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;348(2):386-392.
- [30] Tanaka T, Hirose M, Kotobuki N, et al. Bone augmentation by bone marrow mesenchymal stem cells cultured in three-dimensional biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2009;91(2):428-435.
- [31] Lu HH, Kofron MD, El-Amin SF, Attawia MA, et al. In vitro bone formation using muscle-derived cells: a new paradigm for bone tissue engineering using polymer-bone morphogenetic protein matrices. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(4):882-889.
- [32] Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, et al. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*. 1998;19(15):1405-1412.
- [33] Yang EY, Kronenfeld JP, Stabler CL. Engineering biomimetic materials for islet transplantation. *Curr Diabetes Rev*. 2015;11(3):163-169.
- [34] Lesman A, Koffler J, Atlas R, et al. Engineering vessel-like networks within multicellular fibrin-based constructs. *Biomaterials*. 2011;32(31):7856-7869.
- [35] Lee SJ, Lim GJ, Lee JW, et al. In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials*. 2006;27(18):3466-3472.
- [36] Young CS, Abukawa H, Asrican R, et al. Tissue-engineered hybrid tooth and bone. *Tissue Eng*. 2005;11(9-10):1599-1610.
- [37] Hu X, Lui W, Cui L, et al. Tissue engineering of nearly transparent corneal stroma. *Tissue Eng*. 2005;11(11-12):1710-1717.
- [38] Lu HH, Cooper JA Jr, Manuel S, et al. Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. *Biomaterials*. 2005;26(23):4805-4816.
- [39] McBane JE, Battiston KG, Wadhvani A, et al. The effect of degradable polymer surfaces on co-cultures of monocytes and smooth muscle cells. *Biomaterials*. 2011;32(14):3584-3595.
- [40] Xue Y, Danmark S, Xing Z, et al. Growth and differentiation of bone marrow stromal cells on biodegradable polymer scaffolds: An in vitro study. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95(4):1244-1251.
- [41] Smink AM, de Haan BJ, Paredes-Juarez GA, et al. Selection of polymers for application in scaffolds applicable for human pancreatic islet transplantation. *Biomed Mater*. 2016;11(3):035006.
- [42] Lynne PR, Bilinski SA, Malgorzata K, et al. Microgravity culture condition reduces immunogenicity and improves function of pancreatic islets. *Transplantation*. 2002;74(1):13-21.