

甲基丙烯酸酯化明胶 / 富血小板血浆复合水凝胶构建仿生微环境促进小鼠胰岛瘤细胞 MIN6 功能

朱必文^{1,2,3}, 王东芝^{1,2,3}, 吴迪^{1,2,3}, 龚天成^{2,3}, 潘昊鹏², 陆玉华^{1,2,3}, 郭益冰^{2,3}, 王志伟^{1,2,3}, 黄葵^{1,2,3}

https://doi.org/10.12307/2023.082

投稿日期: 2021-12-24

采用日期: 2022-02-18

修回日期: 2022-05-09

在线日期: 2022-05-30

中图分类号:

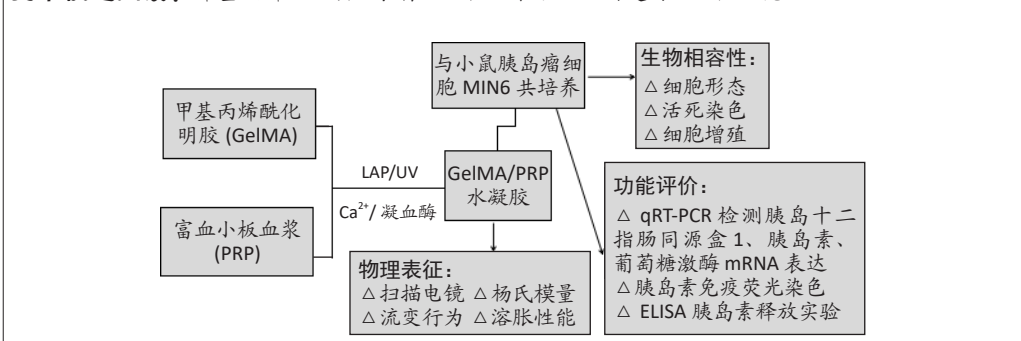
R459.9; R318.08; R657.5

文章编号:

2095-4344(2023)12-01824-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 甲基丙烯酸酯化明胶 / 富血小板血浆水凝胶构建的仿生微环境



文题释义:

甲基丙烯酸酯化明胶: 由明胶经甲基丙烯酸酯化制备而成, 具有良好的理化性能和生物相容性, 在细胞培养、组织工程等领域具有广泛应用, 可通过模拟细胞外基质构建细胞仿生微环境, 促进细胞的黏附、存活和功能发挥。

富血小板血浆: 经梯度离心制备, 血小板含量较全血高2-8倍, 由Ca²⁺/凝血酶激活后释放大量的具有独特促细胞增殖和分化功能的生长因子及细胞因子, 主要包括血小板源性生长因子、转化生长因子β、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子等, 目前主要应用于肌肉再生、创面修复等方面, 效果显著。

摘要

背景: 构建仿生微环境促进胰岛素分泌细胞存活及功能发挥, 是胰腺组织工程的热点与难点。

目的: 基于甲基丙烯酸酯化明胶/富血小板血浆水凝胶构建仿生微环境, 促进小鼠胰岛瘤细胞MIN6存活和功能表达。

方法: 将体积分数10%, 30%, 50%的富血小板血浆溶液分别与50 g/L的甲基丙烯酸酯化明胶混合, 经Ca²⁺与凝血酶活化及紫外光照射固化成水凝胶, 分别记为G+10P、G+30P、G+50P, 同时制备单纯的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶(记为G), 检测4组水凝胶的孔隙率、杨氏模量、溶胀性能与流变行为。将4组水凝胶分别与小鼠胰岛瘤细胞MIN6共培养, 检测细胞形态与增殖活性, 并进行qRT-PCR检测、胰岛素免疫荧光染色及胰岛素释放实验。

结果与结论: ①复合成分水凝胶的孔隙率小于单一成分水凝胶、杨氏模量高于单一成分水凝胶, 并且随着富血小板血浆浓度的增加, 复合成分水凝胶的孔隙率与杨氏模量降低; G+30P、G+50P组溶胀率低于G组、G+10P组(P < 0.05); 复合成分水凝胶的储能模量、耗能模量均大于单一成分水凝胶(P < 0.05); ②光镜下可见, 单一成分水凝胶表面的细胞呈团块样且散在分布, 复合成分水凝胶表面的细胞呈团状, 但生长速度更快、细胞团之间连接紧密; 活死染色显示, 各组水凝胶可促进细胞存活, 其中G+30P组、G+50P组死细胞数量明显少于G+10P组、G组; CCK-8检测显示, 复合成分水凝胶促进细胞增殖效果强于单一成分水凝胶, 并且随着富血小板血浆浓度的增加, 促增殖效果更明显; ③qRT-PCR检测显示, 与单一成分水凝胶比较, 复合成分水凝胶可明显上调胰岛十二指肠同源盒1、胰岛素、葡萄糖激酶的mRNA表达, 其中以G+30P组最明显; 免疫荧光与胰岛素释放实验显示, 与单一成分水凝胶比较, 复合成分水凝胶可促进胰岛素蛋白的表达及胰岛素释放; ④结果表明, 甲基丙烯酸酯化明胶/富血小板血浆复合水凝胶可用于模拟胰岛素分泌细胞微环境, 能够显著提高其存活和功能发挥。

关键词: 甲基丙烯酸酯化明胶; 富血小板血浆; 水凝胶; 胰岛素; 小鼠胰岛瘤细胞; 仿生微环境; 糖尿病

Biomimetic microenvironment constructed from gelatin methacrylamide/platelet-rich plasma hydrogel promotes the function of insulinoma cell line MIN6 in mice

Zhu Biwen^{1,2,3}, Wang Dongzhi^{1,2,3}, Wu Di^{1,2,3}, Gong Tiancheng^{2,3}, Pan Haopeng², Lu Yuhua^{1,2,3}, Guo Yibing^{2,3}, Wang Zhiwei^{1,2,3}, Huang Yan^{1,2,3}

¹First Department of Hepatic and Splenic Surgery, ²Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China; ³Medical School of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zhu Biwen, Master candidate, First Department of Hepatic and Splenic Surgery, and Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China; Medical School of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

南通大学附属医院, ¹肝胆胰脾外科一, ²临床医学研究中心, 江苏省南通市 226001; ³南通大学医学院, 江苏省南通市 226001

第一作者: 朱必文, 男, 1996年生, 江苏省盐城市人, 汉族, 南通大学在读硕士, 主要从事生物材料在类胰岛构建中的应用研究。

通讯作者: 黄葵, 博士, 主治医师, 南通大学附属医院, 肝胆胰脾外科一, 临床医学研究中心, 江苏省南通市 226001; 南通大学医学院, 江苏省南通市 226001

并列通讯作者: 王志伟, 教授, 主任医师, 博士生导师, 南通大学附属医院, 肝胆胰脾外科一, 临床医学研究中心, 江苏省南通市 226001; 南通大学医学院, 江苏省南通市 226001

https://orcid.org/0000-0003-2725-0360 (朱必文)

基金资助: 国家自然科学基金(82001977), 项目负责人: 黄葵; 江苏省自然科学基金(BK20201445), 项目负责人: 黄葵

引用本文: 朱必文, 王东芝, 吴迪, 龚天成, 潘昊鹏, 陆玉华, 郭益冰, 王志伟, 黄葵. 甲基丙烯酸酯化明胶 / 富血小板血浆复合水凝胶构建仿生微环境促进小鼠胰岛瘤细胞 MIN6 功能 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(12):1824-1831.



Corresponding author: Huang Yan, MD, Attending physician, First Department of Hepatic and Splenic Surgery, and Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China; Medical School of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Co-corresponding author: Wang Zhiwei, Professor, Chief physician, Doctoral supervisor, First Department of Hepatic and Splenic Surgery, and Research Center of Clinical Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China; Medical School of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: In the field of pancreatic tissue engineering, constructing biomimetic microenvironment to promote the survival and functional exertion of insulin-secreting cells remains difficult point and hot problem.

OBJECTIVE: To construct a biomimetic microenvironment based on gelatin methacrylamide/platelet-rich plasma hydrogel to promote the survival and cellular functional of MIN6.

METHODS: 10%, 30% and 50% platelet-rich plasmas were mixed with 50 g/L final concentration of gelatin methacrylamide, gelation by the activation of Ca^{2+} /thrombin and ultraviolet irradiation (abbreviated as G+10P, G+30P, G+50P). Simultaneously, pure gelatin methacrylamide hydrogel was prepared (denoted as G). The porosity, Young's modulus, swelling properties and rheological behavior of hydrogels of the four groups were tested. MIN6 cells were seeded on the gel surface, and cell morphology and proliferation were detected, followed by qRT-PCR, immunofluorescence and release assays of insulin.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The porosity of the composite-component hydrogel was smaller than that of the single-component hydrogel, and the Young's modulus was higher than that of the single-component hydrogel. Furthermore, the porosity and Young's modulus of the composite hydrogel decreased with the increase of the platelet-rich plasma concentration. The swelling rate of the G+30P and G+50P groups was lower than that of the G and G+10P groups ($P < 0.05$). The storage modulus and dissipation modulus of the composite hydrogels were higher than those of the single-component hydrogels ($P < 0.05$). (2) Under the light microscope, the cells on the surface of the monocomponent hydrogel were clumpy and scattered; the cells on the surface of the composite-component hydrogel were clumps, but grew faster and the cell clusters were tightly connected. Live-dead staining showed that the hydrogels in each group could promote cell survival; the number of dead cells in G+30P and G+50P groups was significantly less than that in G+10P and G groups. The CCK-8 assay displayed that the composite-component hydrogel had a stronger promoting effect on cell proliferation than the monocomponent hydrogel. Moreover, with the increase of platelet-rich plasma concentration, the promoting effect on proliferation was more obvious. (3) qRT-PCR demonstrated that compared with the monocomponent hydrogel, the composite-component hydrogel could significantly up-regulate the mRNA expression levels of islet-duodenum homeobox 1, insulin, and glucokinase; among them, the G+30P group was the most obvious. Immunofluorescence and insulin release assays exhibited that compared with monocomponent hydrogels, composite-component hydrogels could promote insulin protein expression and insulin release. (4) The results confirm that the gelatin methacrylamide/platelet-rich plasma hydrogel can be used to simulate the microenvironment of insulin-secreting cells and can significantly improve their survivals and functions.

Key words: gelatin methacrylamide; platelet-rich plasma; hydrogel; insulin; mouse insulinoma cells; biomimetic microenvironment; diabetes mellitus

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 82001977 (to HY); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK20201445 (to HY)

How to cite this article: ZHU BW, WANG DZ, WU D, GONG TC, PAN HP, LU YH, GUO YB, WANG ZW, HUANG Y. Biomimetic microenvironment constructed from gelatin methacrylamide/platelet-rich plasma hydrogel promotes the function of insulinoma cell line MIN6 in mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2023;27(12):1824-1831.

0 引言 Introduction

糖尿病是一种慢性代谢性疾病, 预计到 2045 年将影响全球 6.29 亿人^[1]。在过去 30 年中, 胰岛移植作为一项有望彻底根除糖尿病的战略, 已进入临床研究阶段, 1 型糖尿病和晚期 2 型糖尿病患者术后可获得相对稳定的血糖调控能力。然而, 胰岛移植仍面临 β 细胞破坏导致低存活率、较低的胰岛素存储和葡萄糖刺激的胰岛素分泌等问题^[2-3]。细胞外基质是 β 细胞赖以生存的微环境, 对其增殖、分化等生物学行为有重要影响, 胶原酶分离胰岛过程中大量细胞外基质丢失, 而细胞外基质中糖胺聚糖的丢失又进一步引起生长因子的缺乏, 加速 β 细胞破坏, 限制了胰岛移植的广泛开展^[4-6]。因此, 构建仿细胞外基质微环境促 β 细胞存活, 成为当前胰腺组织工程亟需解决的难点。MIN6 是源于小鼠胰岛素瘤的细胞系, 具有与胰腺 β 细胞相似的形态特征, 同时呈现与健康小鼠胰岛相当的葡萄糖诱导胰岛素分泌功能^[7], 被广泛用于胰腺 β 细胞功能和糖尿病研究^[8-9]。现有研究常用 MIN6 细胞作为工具 β 细胞, 评估构建的仿细胞外基质微环境。BEENKEN-ROTHKOPF 等^[10] 通过多种细胞外基质含有的蛋白质聚合形成水凝胶仿细胞外基质微环境, 促进 MIN6 细胞的活性和功能; 另有研究者选择 4 个细胞外基质来源的细胞黏附配体构建仿生微环境, MIN6 细胞在微环境中表现出对葡萄糖反应的胰岛素分泌增加, 同时形成 β 细胞簇^[11]。上述研究证实构建仿细胞外基质微环境的可行性, 然而这些构建方法

复杂且成本高昂, 未将具有活性功能的生长因子引入仿细胞外基质微环境构建。

富血小板血浆是全血经离心得到的血小板浓缩物, 源于自体, 可有效避免排斥和交叉感染^[12-14]。更重要的是, 富血小板血浆经 Ca^{2+} 或凝血酶激活后能释放大量的生长因子和细胞因子, 主要包括血小板源性生长因子、转化生长因子 β 、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子等^[15-17], 这些因子又具有独特的增益作用。PULCINI 等^[18] 证实富血小板血浆中富含的血小板源性生长因子、血管内皮生长因子等生长因子能刺激前骨细胞的增殖和分化; 同时有研究表明, 水凝胶负载的富血小板血浆可以缓释生长因子血小板源性生长因子、转化生长因子 β , 促进成纤维细胞的增殖和迁移, 改善糖尿病小鼠伤口愈合^[19]。富血小板血浆还具有优异的兼容性, 赋予其与聚乙二醇或透明质酸等构建复合材料的能力, 发挥组合互补优势^[20-21]。

甲基丙烯酰化明胶作为近些年来兴起的光固化凝胶, 具有高含水量、可调性、低抗原性和低胶凝点等性质, 同时含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸三肽 (RGD 序列), 有利于细胞黏附、扩散和功能表达, 其含有的基质金属蛋白酶结合位点支持酶降解, 并在伤口愈合和组织修复中发挥关键作用^[22-23]。此外, 甲基丙烯酰化明胶由于其高成本效益和生物相容性^[24], 作为一种仿细胞外基质支架材料被广泛用于组织工程中。SHIN 等^[25] 以甲基丙烯酰化明胶为基础构建仿心肌细胞细胞

外基质微环境,结果显示在复合甲基丙烯酸酯化明胶支架上培养的心肌细胞表现出更优的生物活性,如细胞活力、增殖和成熟,以及更强的收缩性和更快的自发搏动速率;另有研究者基于甲基丙烯酸酯化明胶构建仿细胞外基质微环境,可实现血管生成因子高效运输并促进细胞增殖^[26]。然而,目前基于甲基丙烯酸酯化明胶在胰腺组织工程中的研究鲜有报道。

此次实验通过具有低免疫原性的甲基丙烯酸酯化明胶和富含多种细胞因子、自体来源的富血小板血浆构建仿细胞外基质微环境,为负载细胞提供理想的“壁龛”,促进其黏附、增殖及细胞功能。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 11 月至 2021 年 11 月在南通大学附属医院临床医学研究中心完成。

1.3 材料 甲基丙烯酸酯化明胶购自苏州永沁泉智能设备有限公司;小鼠胰岛瘤细胞 MIN6 购自中国细胞资源库。

1.3.1 主要试剂 胰蛋白酶、DMEM/F12 培养基(美国 Gbico 公司);胎牛血清(德国 Capricorn 公司);PBS(pH=7.4)、青/链霉素双抗(美国 Hyclone 公司);甲基丙烯酸酯化明胶裂解液(苏州永沁泉智能设备有限公司);无水乙醇(常熟市鸿盛精细化工有限公司);异丙醇(上海沃凯生物技术有限公司);氯仿(江苏永华化学科技有限公司);反转录试剂盒、Trizol(美国赛默飞公司);CCK-8 试剂盒(日本同仁);活/死染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);单克隆兔抗胰岛素一抗(美国 CST 公司);多克隆驴抗兔二抗(美国 Abcam 公司);DAPI 染色剂、ProlongTMGold 封固剂(北京索莱宝公司);小鼠胰岛素酶联免疫吸附实验试剂盒(瑞典 Mercodia 公司)。

1.3.2 主要仪器 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);FA2004 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);-80℃超低温冰箱、二氧化碳细胞培养箱、多功能酶标仪及旋转流变仪(美国 Thermo 公司);电热恒温水浴箱(上海精宏实验设备有限公司);正置、倒置显微镜(德国莱卡公司);台式冷冻离心机(日本 HITACHI 公司);PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司);荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);制冰机(日本 HOSHIZAKI 公司);万能电子拉伸机(上海拓丰仪器科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 富血小板血浆及其活化剂的制备 取健康人全血(南通大学附属医院健康成年人捐献,供者对实验知情同意)置于含抗凝剂管中,4℃低温梯度离心,先以 2 500 r/min 离心 10 min,吸取全部上清至交界面下 1 mm 至新无菌离心管中,再次以 3 200 r/min 离心 8 min,弃 3/4 上清及底部红细胞,余下即为富血小板血浆,加入终浓度 5% 的二甲基亚砷混匀,存于 -80℃ 备用。2 000 IU 的凝血酶粉末溶于 4 mL(20 g/L)CaCl₂ 溶液制得活化剂,每毫升富血小板血浆用 80 μL 活化剂活化。

1.4.2 单一成分与复合成分水凝胶的制备 将甲基丙烯酸酯化明胶固体置于 2.5 g/L LAP 中,60℃ 加热溶解得 100 g/L 的甲基丙烯酸酯化明胶溶液,分别与含有体积分数 20%, 60%, 100% 富血小板血浆的 LAP 溶液等体积混合,紫外光均匀照射 30 s 固化成胶,获得复合成分水凝胶,依次记为 G+10P、G+30P、G+50P。同理,制备单一成分的甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶,记为 G。水凝胶制作流程,见图 1。

1.4.3 水凝胶的结构及物理表征

宏观及微观结构:光学相机拍摄各组水凝胶宏观形态,扫描电镜观察水凝胶超微结构,利用 ImageJ 软件测量水凝胶平均孔径大小。

孔隙率计算:各组冻干水凝胶样品为圆柱体,测量底面圆的半径为 *r*,高为 *h*, $\rho(\text{水})=1\text{ g/cm}^3$, $m=\rho\pi r^2h$ 。冻干的样品质量为 m_1 ,将样品放入双蒸水中 1 h,取出称质量为 m_2 ,计算孔隙率,孔隙率(%)= $(m_2-m_1)/m_1\times 100\%$,每组重复 3 次实验。

杨氏模量测量:将各组水凝胶样品放入万能拉伸机固定,待压板与凝胶接触开始测量,凝胶碎裂时结束测量,可得到应力-应变曲线,在凝胶碎裂前取 5 组应力相近的数值,杨氏模量=应力/应变,每组重复测 3 次。

溶胀性能测试:采用常规称重法测量各组水凝胶的溶胀性能。凝胶冻干后质量为 m ,然后将冻干的样品完全浸没于 37℃ 的 PBS 中,于 10 min、30 min、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、8 h、12 h、18 h、24 h、36 h 时间节点测量各组质量为 m_n ,计算溶胀率,溶胀率= $(m_n-m)/m\times 100\%$ 。每组重复 3 次实验。

流变性能的测量:将各组水凝胶溶液在室温下分别置入旋转流变仪,开启紫外照射,时间设定为 10 min。每组重复测量 3 次。

1.4.4 水凝胶的生物相容性 用 DMEM/F12 基础培养基浸泡各组水凝胶,置于细胞培养箱中 30 min,吸净完培养基,紫外灭菌过夜,体积分数 75% 乙醇浸泡 2 h, PBS 清洗后完 DMEM/F12 浸泡;6 h 后将 500 μL MIN6 细胞悬液接种至各组水凝胶上,细胞数量为 3×10^4 。以单独培养的细胞为对照。

细胞形态:接种第 3 天,光学显微镜下观察细胞形态。

细胞增殖性检测:设置对应的接种时间点,加入 CCK-8 试剂孵育 2 h,酶标仪测定上清在 450 nm 和 630 nm 处的吸光度值,记录吸光度值,绘制细胞增殖曲线。

细胞活死染色:接种第 3 天,采用活死染色试剂盒检测检测细胞活力及生长情况。钙黄绿素-AM 是一种对活细胞进行荧光标记的细胞染色试剂,呈绿色荧光;碘化丙啶(PI)则对死细胞进行荧光标记,呈红色荧光。使用试剂盒双重染料配置染色液,将各组细胞在染色液中孵育 15 min, PBS 清洗后,倒置荧光显微镜下拍片。

1.4.5 水凝胶上的细胞功能性检测 用 DMEM/F12 基础培养基浸泡各组水凝胶,置于细胞培养箱中 30 min,吸净完培养基,紫外灭菌过夜,体积分数 75% 乙醇浸泡 2 h, PBS 清洗

后完 DMEM/F12 浸泡; 6 h 后将 500 μL MIN6 细胞悬液接种至各组水凝胶上, 细胞数量为 3×10^4 。以单独培养的细胞为对照。

细胞相关功能基因的 mRNA 表达: 以下过程均在冰上进行。

①总 RNA 提取: 取接种 5 d 后的细胞, PBS 洗涤 2 次, 对照组加入 1 mL Trizol, 静置 5 min, 其余组加入甲基丙烯酰化明胶裂解液, 静置 2 min, 均移入 1.5 mL EP 管, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 $11\,000 \times g$ 离心 10 min; 将上清置入 1.5 mL EP 管中, 加入 200 μL 氯仿, 静置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 $12\,000 \times g$ 离心 15 min; 取上清, 加入 500 μL 异丙醇, 静置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 $12\,000 \times g$ 离心 15 min; 弃上清, 加入 1 mL 体积分数 75% 乙醇, 充分洗涤沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 $7\,500 \times g$ 离心 5 min; 弃上清, 晾干, 待总 RNA 呈微湿啫喱状时加入 30 μL DEPC 水混匀, 测定总 RNA 浓度后保存于 -80°C 备用。②配制反转录反应体系 (20 μL 体系): RNA 1 000 ng, 5 \times PrimerScript Buffer 4 μL , dNTP Mix 2 μL , RNase Inhibitor 1 μL , RevertAid Reverse Transcriptase 1 μL , Oligo(dT)1 μL , DEPC 水补足至 20 μL 。反转录按 42 $^{\circ}\text{C}$ 5 min \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 min \rightarrow 4 $^{\circ}\text{C}$ 进行, 将获得的 cDNA 置于 -20°C 保存备用。③ qRT-PCR 反应: 检测胰岛素、胰岛十二指肠同源盒 1 及葡萄糖激酶的 mRNA 表达, II 引物序列详见表 1。配制 20 μL RT-PCR 反应体系 (SYBR[®] Premix Ex Taq II 10 μL , 上引物 1 μL , 下引物 1 μL , cDNA 3 μL , DEPC 水 5 μL)。RT-PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 40 次循环。④数据分析: $\Delta\text{Ct}=\text{Ct}(\text{目的基因})-\text{Ct}(\text{GADPH})$, $\Delta\Delta\text{Ct}=\Delta\text{Ct}(\text{实验组})-\Delta\text{Ct}(\text{对照组})$, 实验组目的基因的相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

表 1 | MIN6 细胞相关功能基因引物序列

Table 1 | Primer sequences of MIN6 cell-related functional genes

| 基因 | 碱基序列 (5'-3') |
|-------------|--------------------------------------|
| 胰岛十二指肠同源盒 1 | 上游引物 CCC CAG TTT ACA AGC TCG CT |
| | 下游引物 CTC GGT TCC ATT CCG GAA AGG |
| 胰岛素 | 上游引物 ACT AGC TAC AAT CAG AGG CCG |
| | 下游引物 GCC ATG ATG GAA CAG TGA CGT A |
| 葡萄糖激酶 | 上游引物 ACC AAG CCG TAT CAG CAT GTG |
| | 下游引物 TGG ACT TCT CTG TGA TTG GCA |
| GAPDH | 上游引物 CGG AGT CAA CCG ATT TGG TCG TAT |
| | 下游引物 AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC |

胰岛素免疫荧光: 接种 5 d 后, 40 g/L 多聚甲醛固定细胞 20 min, PBS 清洗 10 min \times 2 次; 10%BSA 封闭 60 min; 加入单克隆兔抗胰岛素一抗 (1 : 500 稀释比), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 清洗 15 min \times 3 次; 加入多克隆驴抗兔二抗 (1 : 500 稀释比), 常温、避光孵育 2 h, PBS 清洗 15 min \times 3 次; 1 g/L DAPI 避光孵育 5 min, PBS 清洗 15 min \times 2 次; ProlongTMGold 封固, 倒置荧光显微镜下采集图像。DAPI 荧光激发后显蓝色, 胰岛素显红色, 利用 Image-J 软件量化统计染色核数量及胰岛素免疫荧光强度。

ELISA 法检测胰岛素释放: 接种 5 d 后, 吸取细胞培养上清至 96 孔板, 每组样本一式 3 份, 每孔加入 100 μL 酶结合溶液, 室温置于摇床 (700-900 r/min) 孵育 2 h; 之后每孔快速加 300 μL 洗涤缓冲液冲洗 6 次, 每次冲洗后紧贴吸水纸敲击数次, 去除多余液体; 每孔再次加入 200 μL 基底液, 摇

床室温孵育 15 min, 最后每孔加入 50 μL 终止液摇匀。利用酶标仪读取 450 nm 处吸光度值, 代入定量曲线算出胰岛素分泌量。

1.5 主要观察指标 复合成分水凝胶的物理性质、生物相容性及对 MIN6 细胞功能的影响。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 对数据进行分析绘图, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 当 $P < 0.05$ 时认为差异有显著性意义。统计学方法已经南通大学医学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

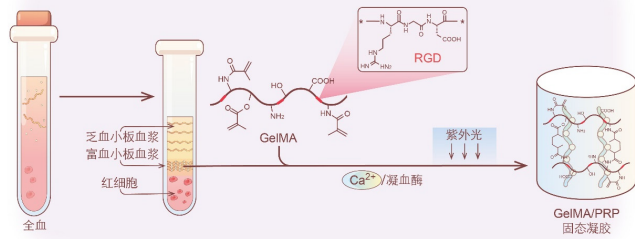
2.1 各组水凝胶的形貌 纯甲基丙烯酰化明胶水凝胶呈透明状, 随着富血小板血浆比例的增加, 复合成分水凝胶呈淡黄色并逐渐加深, 见图 2A; 扫描电镜显示各组呈疏松多孔结构, 且随加入富血小板血浆比例增加呈致密趋势, G 组、G+10P 组、G+30P 组及 G+50P 组水凝胶孔径大小分别为 (172.1 \pm 25.7), (152.5 \pm 12.6), (135.2 \pm 33.5), (84.4 \pm 31.7) μm , 见图 2B。G 组水凝胶孔隙率为 (71.5 \pm 2.3)%, 随加入富血小板血浆比例升高, 复合成分水凝胶孔隙率呈下降趋势, G+10P 组、G+30P 组及 G+50P 组水凝胶孔隙率分别为 (63.3 \pm 2.8)%, (60.6 \pm 1.6)% 及 (53.5 \pm 3.1)%, 见图 2C, 与扫描电镜观察结果一致。

2.2 各组水凝胶的杨氏模量与溶胀性能 G 组、G+10P 组、G+30P 组、G+50P 组水凝胶的杨氏模量分别为 (15.2 \pm 0.1), (24.0 \pm 0.5), (21.7 \pm 0.8), (19.0 \pm 0.2) kPa, 复合水凝胶的杨氏模量均大于单一成分水凝胶 ($P < 0.05$), 随着加入富血小板血浆比例的增加, 复合水凝胶的杨氏模量降低, 见图 2D。各组水凝胶具有良好的吸水性能, G 组、G+10P 组、G+30P 组、G+50P 组水凝胶的溶胀率分别为 (2 473.7 \pm 213.7)%, (2 507.7 \pm 296.6)%, (1 866.0 \pm 37.7)%, (1 758.3 \pm 134.1)%, 随着富血小板血浆比例的升高, 复合水凝胶的溶胀率呈下降趋势 ($P < 0.05$), 各组均在 18 h 后达溶胀平衡, 见图 2E。

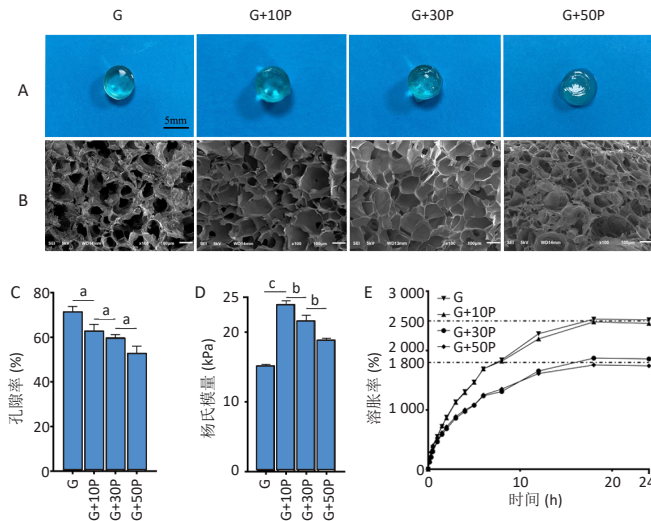
2.3 各组水凝胶的流变行为 见图 3。

各组水凝胶展现出良好的流变行为, G 组、G+10P 组、G+30P 组、G+50P 组水凝胶的储能模量分别为 (943.2 \pm 0.2), (1 282.2 \pm 0.4), (1 644.6 \pm 2.4), (1 605.6 \pm 2.2) Pa, 损耗模量分别为 (1.7 \pm 0.1), (2.4 \pm 0.2), (5.4 \pm 0.2), (4.6 \pm 0.2) Pa, 各组水凝胶的储能模量 G' 均远高于损耗模量 G'' ($P < 0.001$); 并且随加入富血小板血浆比例的增加, 水凝胶的储能模量和损耗模量均呈先上升后降低的趋势。

2.4 各组水凝胶的生物相容性 光镜下可见, 对照组细胞呈椭圆状, G 组细胞呈团块样且散在分布, G/P 组细胞也呈团状生长, 但细胞之间连接更紧密, 部分融合成团, 见图 4A。细胞活死染色显示, 对照组活细胞数量最少, G+30P 组、G+50P 组死细胞明显少于 G+10P 组、G 组和对照组, 见图 4B-D。细胞增殖性量化分析曲线显示, 各组细胞数量都在随着时间的推移而增加, G+30P 组、G+50P 组细胞增殖能力

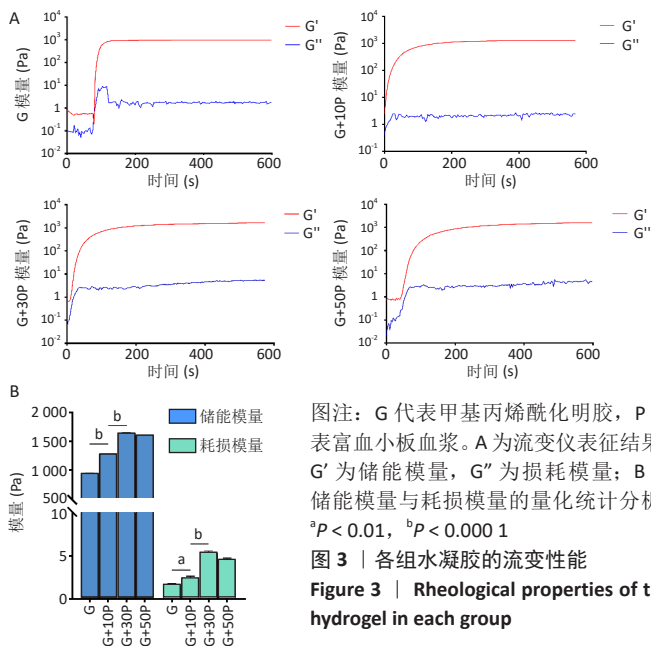


图注: GelMA 为甲基丙烯酸酯化明胶, PRP 为富血小板血浆
图 1 | 甲基丙烯酸酯化明胶 / 富血小板血浆水凝胶制备流程示意图
Figure 1 | Flow chart of the preparation process for gelatin methacrylamide/platelet-rich plasma hydrogel



图注: G 代表甲基丙烯酸酯化明胶, P 代表富血小板血浆。A 为水凝胶的宏观图, G 组水凝胶呈透明状, G+10P 组、G+30P 组、G+50P 组水凝胶呈淡黄色并逐渐加深; B 为水凝胶的扫描电镜图, 各组呈疏松多孔结构, 且随加入富血小板血浆比例增加呈致密趋势, 标尺 = 100 μm ; C 为水凝胶的孔隙率; D 为水凝胶的杨氏模量; E 为水凝胶的溶胀率。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.0001$

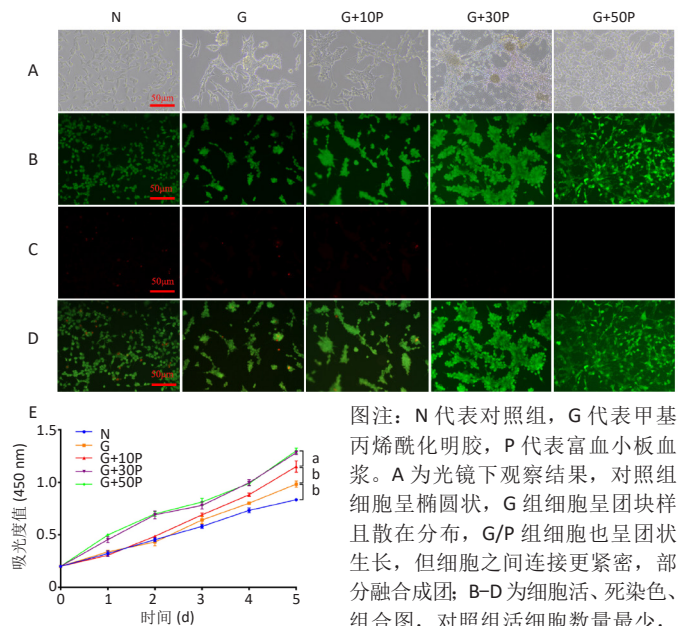
图 2 | 各组水凝胶的形貌与物理性能表征
Figure 2 | Gross morphology and physical characterization of the hydrogel in each group



图注: G 代表甲基丙烯酸酯化明胶, P 代表富血小板血浆。A 为流变仪表征结果, G' 为储能模量, G'' 为损耗模量; B 为储能模量与损耗模量的量化统计分析, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.0001$

图 3 | 各组水凝胶的流变性能
Figure 3 | Rheological properties of the hydrogel in each group

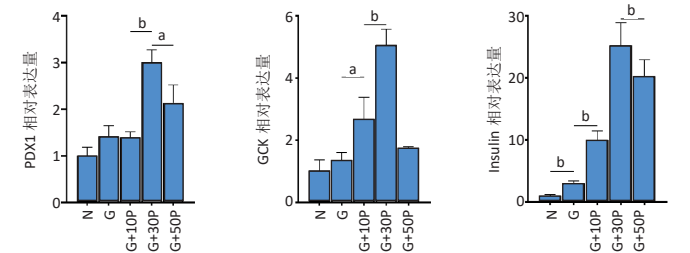
相近且增殖吸光度值始终大于 G+10P 组、G 组和对照组 ($P < 0.05$); 前 3 d 时, 对照组、G 组和 G+10P 组增殖吸光度值相近; 第 5 天时, 细胞增殖吸光度值大小为: G+10P 组 > G 组 > 对照组 ($P < 0.05$), 见图 4E。以上结果说明, 单一成分与复合成分水凝胶均具有良好的生物相容性。



图注: N 代表对照组, G 代表甲基丙烯酸酯化明胶, P 代表富血小板血浆。A 为光镜下观察结果, 对照组细胞呈椭圆状, G 组细胞呈团块样且散在分布, G/P 组细胞也呈团状生长, 但细胞之间连接更紧密, 部分融合成团; B-D 为细胞活、死染色、组合图, 对照组活细胞数量最少, G+30P 组、G+50P 组死细胞明显少于 G+10P 组、G 组; E 为 CCK-8 法检测细胞增殖, ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.0001$

图 4 | 各组水凝胶的生物相容性评价
Figure 4 | Biocompatibility evaluation of hydrogel in each group

2.5 各组水凝胶上细胞功能性评价 G 组、G+10P 组、G+30P 组、G+50P 组胰岛十二指肠同源盒 1 mRNA 表达量分别是对照组的 1.4 倍、1.4 倍、3.0 倍、2.1 倍, 葡萄糖激酶 mRNA 表达量分别是对照组的 1.4 倍、2.7 倍、5.1 倍、1.8 倍, 胰岛素 mRNA 表达量分别是对照组的 3.0 倍、10.0 倍、25.3 倍、20.3 倍; G/P 组 3 种基因相对表达量均高于对照组、G 组 ($P < 0.05$), 其中以 G+30P 组相对表达量最高, 见图 5。

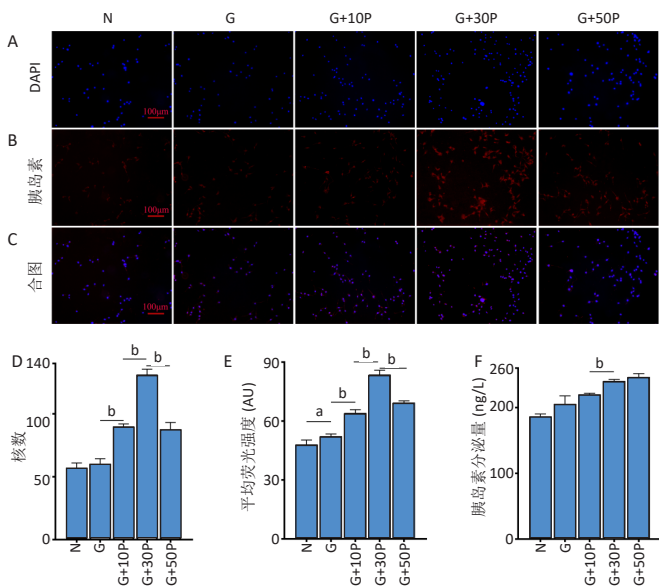


图注: N 代表对照组, G 代表甲基丙烯酸酯化明胶, P 代表富血小板血浆, PDX1 为胰岛十二指肠同源盒 1, GSK 为葡萄糖激酶, Insulin 为胰岛素。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 5 | 各组水凝胶上 MIN6 细胞胰岛素相关基因的表达
Figure 5 | Insulin-related gene expression of MIN6 cells on the hydrogel of each group

各组水凝胶上 MIN6 细胞的 DAPI 染色、胰岛素免疫荧光及组合图, 见图 6A-C。DAPI 染色统计结果显示, G/P 组核数量多于 G 组、对照组 ($P < 0.001$), G+30P 组核数量多于 G+10P 组、G+50P 组 ($P < 0.001$), 见图 6D。胰岛素免疫荧光

统计结果显示, G 组平均荧光强度大于对照组 ($P < 0.05$), G/P 组平均荧光强度大于 G 组 ($P < 0.05$), G+30P 组平均荧光强度最大 ($P < 0.001$), 见图 6E。胰岛素释放实验显示, 对照组、G 组、G+10P 组、G+30P 组、G+50P 组释放胰岛素量分别为 (186.5±0.4), (205.6±1.2), (220.1±0.2), (240.6±0.2), (246.6±0.5) ng/L, 胰岛素释放量随加入富血小板血浆比例的升高呈增加趋势, G+30P 组释放量高于 G+10P 组 ($P < 0.05$), 见图 6F。



图注: N 代表对照组, G 代表甲基丙烯酸酯化明胶, P 代表富血小板血浆。A 为 DAPI 染色, B 为胰岛素免疫荧光, C 为 DAPI 染色 + 胰岛素免疫荧光的组合图, D 为 DAPI 核数量的统计分析, E 为胰岛素荧光强度统计分析, F 为胰岛素释放实验。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$

图 6 | 各组水凝胶上 MIN6 细胞的胰岛素免疫荧光和释放实验

Figure 6 | Insulin immunofluorescence and release assays of MIN6 cells on the hydrogel in each group

3 讨论 Discussion

胰岛移植是少数能有效彻底治愈糖尿病的临床方法, 然而目前仍面临诸多问题, 首先供体来源严重不足, 通常获得可供一名患者移植的胰岛需要 3 名捐献者; 其次, 细胞外基质丧失、生长因子缺乏引起 β 细胞大量破坏, 导致胰岛低存活率, 使得移植后胰岛无法长期、稳定有效发挥作用^[3, 27]。目前, 针对改善移植胰岛 β 细胞生存问题已展开较多积极有效探索, 常见策略有: ①共培养: TERAMURA 等^[28] 将间充质干细胞与 β 细胞共培养, 结果显示 β 细胞量与面积较对照组都有明显增加, 表明共培养可为 β 细胞提供良好保护作用; ②假性胰岛构建: 有研究通过将 β 细胞和内皮细胞通过磁悬浮重组构成假胰岛, 具有有良好的葡萄糖反应性^[29]; ③仿生微环境: ZHU 等^[30] 用重组人胶原蛋白和碱性成纤维细胞生长因子构建的仿生微环境, 可提高胰岛细胞存活、功能和长期移植效率。然而上述策略各有局限, 共培养使移植体系趋于复杂, 可能增加排斥; 假性胰岛虽有良好的葡萄糖反应性和胰岛素释放能力, 但忽略了周围环境的影响; 而现有的仿生微环境策略往往聚焦于引入功能单一的蛋白或生长因子, 难以模拟复杂的胞外基质组成, 不能满足 β 细胞长期的生长

需要。除此之外, 尚有些策略因高昂的成本仅限于实验研究阶段, 无法大规模临床转化。此次实验拟在深入理解和分析 β 细胞生存环境的基础上构建简单易行的仿生微环境, 探讨其进一步应用于胰腺组织工程的可能性。

目前, 甲基丙烯酸酯化明胶因其光固化快速、稳定胶凝、可打印性、良好生物相容性和机械性能可调被广泛用作细胞外基质替代物, 用于细胞培养和组织修复重建。在基于干细胞治疗重建角膜领域, 有研究将兔/人来源角膜缘干/祖细胞经 3D 打印负载于甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶支架中, 结果显示甲基丙烯酸酯化明胶凝胶能够为细胞提供良好的生物和机械支持, 并依赖于细胞外基质特性, 呈活化或休眠状态^[31]。在研发用于全层皮肤缺损修复的功能性皮肤替代品领域, 通过 20% 甲基丙烯酸酯化明胶包裹人永生角质形成细胞 HaCaTs 构建表皮层, 1.5% 脱细胞真皮基质负载成纤维细胞作为真皮层, 载有人脐静脉内皮细胞的 10% 甲基丙烯酸酯化明胶构建血管网络; 3D 打印皮肤替代物经皮肤天然微环境重建, 显著促进细胞活力和增殖能力, 同时呈现保持微环境湿润和屏障功能^[32]。同时, 甲基丙烯酸酯化明胶合成过程简单稳定、成本低廉、易于批量制备、便于与其他材料混合构建复合材料、并可通过结合活性因子发挥协同优势^[33]。如在糖尿病患者临界骨缺损修复领域, 由甲基丙烯酸酯化明胶和四臂-聚乙二醇丙酸酯 (4 arm-PEG) 组成的复合生物墨水, 加载骨髓间充质干细胞、巨噬细胞 RAW264.7 和载有骨形态发生蛋白 4 的介孔二氧化硅纳米颗粒进行三维打印, 所制备支架具有较强力学性能, 同时经调节巨噬细胞 M2 极化和改善炎症微环境显著促进糖尿病患者的骨修复^[34]。综合考虑各种因素并结合预实验结果, 此次实验采用 100 g/L 甲基丙烯酸酯化明胶用于微环境构建。

富血小板血浆因可取于自体, 避免使用过程中免疫排斥反应产生而获得广泛关注, 其富含的生长因子在促血管生成、炎症调控以及组织修复方面具有显著增益效应。富血小板血浆自体疗法有望在脊柱疾病、骨关节炎以及慢性复杂和顽固性伤口等治疗应用中发挥积极辅助作用^[35]。此次实验采用改良 Apple 离心法获得富血小板血浆, 首次离心去除大部分红细胞和高比重物质, 二次离心获取富血小板血浆, 浓度为 (682.0±97.0)×10⁹ L⁻¹。虽然目前富血小板血浆的使用浓度尚无明确规定, 缺乏标准化, 在各项不同的研究中存在明显的异质性, 但在一项针对于此的综合评价中, 富血小板血浆的浓度范围在 (742.78±463.39)×10⁹ L⁻¹^[36]。因此, 此次实验获得的富血小板血浆浓度符合当前的主流实践标准。血小板血浆经 Ca²⁺ 或凝血酶活化后, 可形成具有一定机械性能及生长因子缓释功能的凝胶, 负载富血小板血浆的水凝胶支架微观上呈均匀疏松多孔结构, 增加 0.2 MPa 压力只引起 10% 的形变增加, 且显著促进软骨细胞增殖^[37-39]。血小板血浆直接应用时存在爆释现象, 70% 的生长因子会在 10 min 内释放^[19], 而水凝胶负载的血小板血浆可以在 14 d 内维持稳定释放^[19]。有研究显示, 富血小板血浆可促进人诱导多能干细胞向具有

胰岛素分泌功能特征的细胞转化, 提高分化成熟度和功能性胰岛 β 细胞特异性标记基因和相关蛋白表达, 较好响应葡萄糖刺激, 因此富血小板血浆在未来 β 细胞疗法中有着极大的潜力^[40]。

MIN6 细胞是小鼠来源的胰岛 β 细胞系, 具有与原代胰岛 β 细胞相似的特征, 包括较高的胰岛素含量、葡萄糖激酶和葡萄糖转运蛋白 2 表达, 作为一种成熟的 β - 细胞模型被广泛应用于胰腺 β 细胞信号传导、功能表达与糖尿病治疗及机制的研究中^[41-45]。

因此, 此次实验基于甲基丙烯酸酯化明胶 / 富血小板血浆构建仿细胞外基质微环境。单纯甲基丙烯酸酯化明胶成胶后呈透明状, 随着富血小板血浆的加入呈淡黄色并逐渐加深, 这可能与血清中富含的某些氨基酸、脂类物质、核酸衍生物等物质有关^[46]。甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶扫描电镜图呈疏松多孔样, 随着富血小板血浆比例的升高, G/P 组超微结构呈致密趋势。孔隙率通过影响氧气、营养物质的交换以及代谢废物的排出调控细胞的黏附、增殖行为^[47]。相较于纯甲基丙烯酸酯化明胶水凝胶, 甲基丙烯酸酯化明胶 / 富血小板血浆水凝胶的孔隙率有所下降, 但即便是 50% 富血小板血浆组的孔隙率也大于 50%, 这表明 G/P 组水凝胶良好的物质交换能力。杨氏模量体现凝胶抵抗外力变形的能力, G/P 组水凝胶的杨氏模量高于 G 组, 这说明复合凝胶有着更好的抗压能力, 可为负载细胞提供更好的保护作用, 而加入的富血小板血浆达到一定比例后杨氏模量下降, 可能由于血小板血浆加入后增加了光固化位点的位阻, 减少了交联程度。G/P 组凝胶能够短时间达到溶胀平衡, 有利于种植细胞营养摄取和存活。流变实验表明 G/P 各组的储能模量远远大于损耗模量, 具有良好的水凝胶稳定性。

MIN6 细胞光学成像显示, G/P 组细胞生长密度明显高于 G 组及对照组; CCK-8 增殖曲线表明, G/P 组增殖能力要明显优于对照组及 G 组, 有可能是富血小板血浆提供的生长因子有效促进了细胞生长; 活死染色证实 G/P 比甲基丙烯酸酯化明胶有更好的生物相容性。胰岛十二指肠同源盒 1 能促进胰腺发育及胰岛样分化, 是胰腺生长发育过程中重要的转录因子之一^[48]; 葡萄糖激酶是葡萄糖传感器, 在细胞内葡萄糖摄取和利用过程中发挥重要作用, 在血糖调控过程中扮演着核心角色^[49]。G+30P 组胰岛十二指肠同源盒 1、葡萄糖激酶及胰岛素的 mRNA 相对表达均最高, 胰岛素 mRNA 相对表达差异更为显著; 胰岛素免疫荧光及 DAPI 核染显示, G+30P 组核数最多且胰岛素荧光最强; ELISA 法胰岛素释放实验结果提示, 胰岛素释放量随富血小板血浆比例的升高而增加, G+50P 组胰岛素释放量比 G+30P 组略高, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。

综上所述, 甲基丙烯酸酯化明胶 / 富血小板血浆构建的仿生微环境, 能更好地促进 MIN6 细胞胰岛素分泌及功能表达, 较好地解决了仿生微环境构建的“组成问题”, 然而凝胶材料的力学性能、表面微图案、拓扑结构等对于其功能优化具有重要影响, 尚有待深入探索。胰岛由胰腺中提取, 含有 α 、

β 、 δ 、PP 等细胞, 体外无法自我增殖, 与 MIN6 细胞在形态与功能上仍有一定区别, 后续将进一步应用胰岛展开深入研究。此外, 甲基丙烯酸酯化明胶 / 富血小板血浆构建的仿生微环境, 可能的作用机制及长期功能评价尚有待后续研究。总之, 此次实验可为类胰岛构建及 3D 打印工程化胰腺组织研究领域提供可行的细胞外基质组成策略, 具有明显的转化应用价值和潜能。

作者贡献: 课题实施及文章撰写均主要由第一作者完成, 其他作者参与部分实验的实施与文章修改, 按研究贡献排序。通讯作者提出课题设想并全程参与课题指导、论文修改及审核。

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中不存在利益冲突。

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 4.0”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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] VANTYGHM MC, DE KONING EJP, PATTOU F, et al. Advances in β -cell replacement therapy for the treatment of type 1 diabetes. *Lancet*. 2019;394(10205):1274-1285.
- [2] SCHASCHKOW A, SIGRIST S, MURA C, et al. Glycaemic control in diabetic rats treated with islet transplantation using plasma combined with hydroxypropylmethyl cellulose hydrogel. *Acta Biomater*. 2020; 102(259-272).
- [3] SHAPIRO AM, POKRYWCZYNSKA M, RICORDI C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(5):268-277.
- [4] LLACUA LA, FAAS MM, DE VOS P. Extracellular matrix molecules and their potential contribution to the function of transplanted pancreatic islets. *Diabetologia*. 2018;61(6):1261-1272.
- [5] SMINK AM, DE VOS P. Therapeutic Strategies for Modulating the Extracellular Matrix to Improve Pancreatic Islet Function and Survival After Transplantation. *Curr Diab Rep*. 2018;18(7):39.
- [6] ZHANG F, ZHENG L, CHENG S, et al. Comparison of the Interactions of Different Growth Factors and Glycosaminoglycans. *Molecules*. 2019; 24(18):3360.
- [7] LI D, ZHANG W, CHEN X, et al. Proteomic profiling of MIN6 cell-derived exosomes. *J Proteomics*. 2020;224:103841.
- [8] YIN H, YAN H, QIN C, et al. Protective effect of fermented *Diospyros lotus* L. extracts against the high glucose-induced apoptosis of MIN6 cells. *J Food Biochem*. 2021;45(4):e13685.
- [9] HU S, KUWABARA R, DE HAAN B, et al. Acetate and Butyrate Improve β -cell Metabolism and Mitochondrial Respiration under Oxidative Stress. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4):1542.
- [10] BEENKEN-ROTHKOPF L, KARFELD-SULZER L, DAVIS N, et al. The incorporation of extracellular matrix proteins in protein polymer hydrogels to improve encapsulated beta-cell function. *Ann Clin Lab Sci*. 2013;43(2):111-121.
- [11] LIM D, ANTIPIENKO S, VINES J, et al. Improved MIN6 β -cell function on self-assembled peptide amphiphile nanomatrix inscribed with extracellular matrix-derived cell adhesive ligands. *Macromol Biosci*. 2013;13(10):1404-1412.

- [12] 潘钰. 富血小板血浆治疗安全, 有效 [J]. 江苏卫生保健, 2019(4):1.
- [13] 吕敏, 裴国献, 刘勇, 等. 富血小板血浆的制备现状及研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(27):5.
- [14] ANITUA E, PRADO R, ORIVE G. Allogeneic Platelet-Rich Plasma: At the Dawn of an Off-the-Shelf Therapy? Trends Biotechnol. 2017;35(2):91-93.
- [15] BARIA M, VASILEFF W, MILLER M, et al. Cellular Components and Growth Factor Content of Platelet-Rich Plasma With a Customizable Commercial System. Am J Sports Med. 2019;47(5):1216-1222.
- [16] OUDELAAR B, PEERBOOMS J, HUIS IN 'T VELD R, et al. Concentrations of Blood Components in Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems: A Review of the Literature. Am J Sports Med. 2019;47(2):479-487.
- [17] EPPLEY B, WOODDELL J, HIGGINS JJP, et al. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. Plast Reconstr Surg. 2004;114(6):1502-1508.
- [18] PULCINI S, MEROLLE L, MARRACCINI C, et al. Apheresis Platelet Rich-Plasma for Regenerative Medicine: An In Vitro Study on Osteogenic Potential. Int J Mol Sci. 2021;22(16):8764.
- [19] WEI S, XU P, YAO Z, et al. A composite hydrogel with co-delivery of antimicrobial peptides and platelet-rich plasma to enhance healing of infected wounds in diabetes. Acta Biomater. 2021;124:205-218.
- [20] SAMBERG M, STONE R, NATESAN S, et al. Platelet rich plasma hydrogels promote in vitro and in vivo angiogenic potential of adipose-derived stem cells. Acta Biomater. 2019;87:76-87.
- [21] DE ANGELIS B, D'AUTILIO M, ORLANDI F, et al. Wound Healing: In Vitro and In Vivo Evaluation of a Bio-Functionalized Scaffold Based on Hyaluronic Acid and Platelet-Rich Plasma in Chronic Ulcers. J Clin Med. 2019;8(9):1486.
- [22] BELLIS SJ. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. Biomaterials. 2011;32(18):4205-4210.
- [23] ROSE J, PACELLI S, HAJ A, et al. Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering. Materials(Basel). 2014;7(4):3106-3135.
- [24] YUE K, TRUJILLO-DE SANTIAGO G, ALVAREZ MM, et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. Biomaterials. 2015;73:254-271.
- [25] SHIN SR, ZIHLMANN C, AKBARI M, et al. Reduced Graphene Oxide-GelMA Hybrid Hydrogels as Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering. Small. 2016;12(27):3677-3689.
- [26] MODARESIFAR K, HADJIZADEH A, NIKNEJAD HJAC, et al. Design and fabrication of GelMA/chitosan nanoparticles composite hydrogel for angiogenic growth factor delivery. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018;46(8):1799-1808.
- [27] WU S, WANG L, FANG Y, et al. Advances in Encapsulation and Delivery Strategies for Islet Transplantation. Adv Healthc Mater. 2021;10(20):e2100965.
- [28] TERAMURA Y, OOMMEN O, OLERUD J, et al. Microencapsulation of cells, including islets, within stable ultra-thin membranes of maleimide-conjugated PEG-lipid with multifunctional crosslinkers. Biomaterials. 2013;34(11):2683-2693.
- [29] URBANCZYK M, ZBINDEN A, LAYLAND S, et al. Controlled Heterotypic Pseudo-Islet Assembly of Human β -Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells Using Magnetic Levitation. Tissue Eng Part. 2020;26:387-399.
- [30] ZHU Q, LU C, JIANG X, et al. Using Recombinant Human Collagen With Basic Fibroblast Growth Factor to Provide a Simulated Extracellular Matrix Microenvironment for the Revascularization and Attachment of Islets to the Transplantation Region. Front Pharmacol. 2019;10:1536.
- [31] ZHONG Z, BALYAN A, TIAN J, et al. Bioprinting of dual ECM scaffolds encapsulating limbal stem/progenitor cells in active and quiescent statuses. Biofabrication. 2021;13(4):044101.
- [32] JIN R, CUI Y, CHEN H, et al. Three-dimensional bioprinting of a full-thickness functional skin model using acellular dermal matrix and gelatin methacrylamide bioink. Acta Biomater. 2021;131:248-261.
- [33] VAN DEN BULCKE A, BOGDANOV B, DE ROOZE N, et al. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. Biomacromolecules. 2000;1(1):31-38.
- [34] SUN X, MA Z, ZHAO X, et al. Three-dimensional bioprinting of multicell-laden scaffolds containing bone morphogenic protein-4 for promoting M2 macrophage polarization and accelerating bone defect repair in diabetes mellitus. Bioact Mater. 2020;6(3):757-769.
- [35] EVERTS P, ONISHI K, JAYARAM P, et al. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. Int J Mol Sci. 2020;21(20):7794.
- [36] FADADU PP, MAZZOLA AJ, HUNTER CW, et al. Review of concentration yields in commercially available platelet-rich plasma (PRP) systems: a call for PRP standardization. Reg Anesth Pain Med. 2019 :rapm-2018-100356.
- [37] KLEIN M, KÄMMERER P, SCHOLZ T, et al. Modulation of platelet activation and initial cytokine release by alloplastic bone substitute materials. Clin Oral Implants Res. 2010;21(3):336-345.
- [38] HUBER S, CUNHA JÚNIOR J, MONTALVÃO S, et al. In vitro study of the role of thrombin in platelet rich plasma (PRP) preparation: utility for gel formation and impact in growth factors release. J Stem Cells Regen Med. 2016;12(1):2-9.
- [39] GAO X, GAO L, GROTH T, et al. Fabrication and properties of an injectable sodium alginate/PRP composite hydrogel as a potential cell carrier for cartilage repair. J Biomed Mater Res A. 2019;107(9):2076-2087.
- [40] ENDERAMI SE, MORTAZAVI Y, SOLEIMANI M, et al. Generation of Insulin-Producing Cells From Human-Induced Pluripotent Stem Cells Using a Stepwise Differentiation Protocol Optimized With Platelet-Rich Plasma. J Cell Physiol. 2017;232(10):2878-2886.
- [41] ANITUA E, DE LA SEN-CORCUERA B, ORIVE G, et al. Progress in the use of plasma rich in growth factors in ophthalmology: from ocular surface to ocular fundus. Expert Opin Biol Ther. 2022;22(1):31-45.
- [42] BYNIGERI RR, MITNALA S, TALUKDAR R, et al. Pancreatic stellate cell-potentiated insulin secretion from Min6 cells is independent of interleukin 6-mediated pathway. J Cell Biochem. 2020;121(1):840-855.
- [43] FURUKAWA A, TANAKA A, YAMAGUCHI S, et al. Using recombinase-mediated cassette exchange to engineer MIN6 insulin-secreting cells based on a newly identified safe harbor locus. J Diabetes Investig. 2021;12(12):2129-2140.
- [44] SCHULTZ J, WARKUS J, WOLKE C, et al. MiD51 Is Important for Maintaining Mitochondrial Health in Pancreatic Islet and MIN6 Cells. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:232.
- [45] BLESIA V, PATEL VB, AL-OBAIDI H, et al. Excessive Iron Induces Oxidative Stress Promoting Cellular Perturbations and Insulin Secretory Dysfunction in MIN6 Beta Cells. Cells. 2021;10(5):1141.
- [46] 石红梅, 张英兰, 侯小红, 等. 外观异常的血清标本对生化结果的影响 [J]. 实用医技杂志, 2003, 10(12):1495-1495.
- [47] SIBORO S, ANUGRAH D, RAMESH K, et al. Tunable porosity of covalently crosslinked alginate-based hydrogels and its significance in drug release behavior. Carbohydr Polym. 2021;260:117779.
- [48] 姜铤, 张涓, 李东升, 等. PDX1 与糖尿病 [J]. 湖北医药学院学报, 2008, 27(1):81-84.
- [49] 邹大进. 血糖稳态调控的核心酶: 葡萄糖激酶及其家族 [J]. 中华糖尿病杂志, 2019, 11(10):3.

(责任编辑: GW, ZN, ZJP)