

骨髓间充质细胞联合 PDMS 支架构建移植胰岛微环境的实验研究

陈津^{1,2,3} 付云峰^{1,2} 赵红州^{1,2} 陈俊秋^{1,2} 程远航^{1,2} 黄梁浒^{1,2,3} 朱凌峰^{1,3} 林娜^{1,2}
施小华^{1,2} 王水良^{1,2,3} 吴卫真^{1,2,3} 谭建明^{1,2,3}

【摘要】 目的 为了提高移植胰岛的活性和功能,构建适合移植胰岛生存的微环境。方法 采用聚二甲基硅氧烷(PDMS)和氯化钠晶体构建三维支架,联合骨髓间充质细胞(MSCs)、纤维蛋白和胰岛共同构建迷你“人工胰腺”。采用链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠移植模型评价效果,将“人工胰腺”移植到糖尿病大鼠大网膜内,对照组行假手术,术后隔天监测移植大鼠血糖水平;数据采用 *t* 检验和曼-惠特尼 *U* 检验。结果 用 PDMS 构建的三维巨孔支架,支架内可见大量不规则孔洞空间。胰岛和 MSCs 可成功装载入支架内,HE 染色结果显示,支架孔内存在胰岛,胰岛周围围绕有 MSCs。糖尿病大鼠大网膜内移植结果显示,移植后各时间点(1, 3, 5, 7 d),“人工胰腺”移植组糖尿病大鼠血糖水平分别为(278.70±86.06) mg/dl、(323.50±44.29) mg/dl、(283.30±74.00) mg/dl、(304.80±13.33) mg/dl,较假手术对照组(606.00±52.40) mg/dl、(589.70±55.78) mg/dl、(615.00±54.84) mg/dl、(630.30±48.17) mg/dl 均降低,差异具有统计学意义($t = 7.96, 9.15, 8.82, U = 0.00, P < 0.01$)。结论 MSCs 联合 PDMS 三维支架构建的微环境,可为移植胰岛提供生存的环境,为临床开展胰岛移植提供新的策略。

【关键词】 间充质细胞; 聚二甲基硅氧烷; 胰岛移植; 糖尿病

Engineer a microenvironment for islet transplantation with bone marrow mesenchymal stroma cells and PDMS scaffold Chen Jin^{1,2,3}, Fu Yunfeng^{1,2}, Zhao Hongzhou^{1,2}, Chen Junqiu^{1,2}, Cheng Yuanhang^{1,2}, Huang Lianghu^{1,2,3}, Zhu Linfeng^{1,3}, Lin Na^{1,2}, Shi Xiaohua^{1,2}, Wang Shuilian^{1,2,3}, Wu Weizhen^{1,2,3}, Tan Jianming^{1,2,3}. ¹Organ Transplant Institute, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China; ²Fujian Key Laboratory of Transplant Biology, Dong Fang Hospital, Xiamen University, Fuzhou 350025, China; ³Department of Urology Surgery, Fuzhou General hospital, Clinical Medical Institute of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China

Corresponding author: Chen Jin, Email: kingchen81@qq.com

【Abstract】 Objective The study was aimed to engineer a suitable microenvironment for islets survival. **Methods** The three-dimensional macroporous scaffold was constructed with polydimethylsiloxane (PDMS) and sodium chloride crystal. The mini "artificial pancreas" was engineered with PDMS scaffold, bone marrow mesenchymal stroma cells (MSCs), fibronectin and islets. The artificial pancreases were transplanted into the omentum of STZ-induced diabetic rats, while the control group underwent sham operation. The blood glucose level of the rats was monitored every other day; the data was analyzed by *t* test and Kolmogorov-Smirnov test/Mann-Whitney test. **Results** The PDMS scaffolds were constructed successfully with a large number of macro-pores. Islets and MSCs can be loaded into the scaffolds. HE staining showed that there were islets in the scaffold pores with surrounding MSCs. At each time point after transplantation (1, 3,

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2018.06.002

基金项目: 国家自然科学基金(81601618); 福建省自然科学基金(2016J01582, 2016J01580, 2018J01349); 福建省引导性项目(2018Y0070); 福建省科技创新联合资金重大项目(2017Y9127)

作者单位: 350025 福州总医院器官移植研究所¹; 350025 福州, 厦门大学附属东方医院福建省移植生物学重点实验室²; 350025 福州, 福建医科大学附属福总临床医学院(福州总医院)泌尿外科³

通信作者: 陈津, Email: kingchen81@qq.com

5, 7 days), the blood glucose levels of diabetic rats in artificial pancreas transplantation group were (278.70±86.06) mg/dl; (323.50±44.29) mg/dl; (283.30±74.0) mg/dl; and (304.80±13.33) mg/dl respectively, which were significantly decreased than those in the control respectively group (606.00±52.40) mg/dl, (589.70±55.78) mg/dl, (615.00±54.84) mg/dl, (630.30±48.17) mg/dl, ($t = 7.96, 9.15, 8.82, U = 0.00, P < 0.01$). **Conclusion** The microenvironment engineered with bone marrow MSCs and PDMS scaffold could provide a suitable environment for transplanted islets and provide a new strategy for clinical islet transplantation.

【Key words】 Mesenchymal stroma cells; PDMS; Islet transplantation; Diabetes

胰岛功能完全衰竭的脆性糖尿病(brittle diabetes),患者血糖水平极其不稳定,频繁出现酮症酸中毒或严重低血糖等危及生命的并发症,严重影响患者的生活质量^[1]。胰岛移植是治疗脆性糖尿病的最有效方法,通过胰岛移植可以改善患者血糖水平,避免严重低血糖发生,提高C肽水平^[2]。虽然很多临床研究证实了胰岛移植的效果,但是胰岛移植还存在许多障碍需要解决。目前胰岛主要采用门静脉肝内移植的方式,移植的胰岛在肝内直接暴露于血液之中,承受非自然的机械压力,可引起强烈的免疫排斥反应和炎症反应,导致大量移植的胰岛在移植初期就发生凋亡或失去功能,严重影响了胰岛移植的治疗效果^[3]。构建一个适合移植胰岛生存的微环境,隔离胰岛与血液的直接接触,阻止血液系统的免疫细胞、抗体、补体等对胰岛的攻击,从而提高胰岛的存活。

间充质细胞(mesenchymal stroma cells, MSCs)是再生医学重要的种子细胞,是许多微环境的重要组成部分。它能够分泌多种细胞因子,具有调节免疫和促进血管生成等属性,在许多疾病的治疗中呈现出令人振奋的治疗效果^[4-5]。聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)是一种有机硅材料,无毒无味,具有良好的生理惰性、化学稳定性、生物相容性等优点,广泛的应用于药品、化妆品、食品等各领域^[6]。本研究通过PDMS构建支架,为胰岛提供一个相对稳定的物理空间,再联合MSCs和胞外基质,构建适合移植胰岛生存的微环境,提高移植胰岛的活性,并探讨其在糖尿病大鼠的治疗中的应用。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物: SD大鼠购自福州总医院动物实验中心,雄性,200~300 g。所有试验在符合动物实验伦理要求下进行。

2. 主要试剂及仪器: PDMS(美国Dow Corning

公司),分析纯氯化钠(中国国药),凝血酶(湖南一格);链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司);胶原酶P(美国Sigma公司);Percoll(美国Pharmacia公司);1640基础培养基、DMEM-低糖基础培养基(美国Hyclone公司),胎牛血清、胰蛋白酶(美国Gibco公司),细胞培养皿、培养瓶(美国Corning公司),PE标记抗小鼠单克隆抗体CD29, CD34, CD45, CD90(美国BD公司),CO₂培养箱(日本Sanyo公司),血糖试纸(德国Bayer公司)。

二、方法

1. PDMS支架构建: 分别用40目和150目筛网筛取颗粒大小为100~400 μm的干燥NaCl晶体,与PDMS按取质量比9:1进行混合均匀后,倒入模具中,正向压力1000 PSI压缩固化4 h;将形成的支架从模具中取出,放入去离子蒸馏水中淘洗2 d,将NaCl完全淘洗除去;然后将支架放入2 mol/L NaOH中50 °C孵育24 h;蒸馏水清洗3次后,烘干,高温高压灭菌待用。

2. 大鼠胰岛分离及鉴定: 按照笔者先前报道的方法^[7],大鼠麻醉下沿腹中线开腹,充分暴露腹腔;结扎靠近肠壁的胰胆管末端;分离肝下胆总管,头皮针穿刺并固定。破心放血后,经穿刺灌注胶原酶P约10 ml,分离灌注好的胰腺,转移入消化瓶中,37 °C水浴消化10 min,充分振摇,加入5 ml小牛血清终止消化;经40目滤网过滤后,行Percoll(11%, 20%, 23%, 25%)不连续密度梯度离心纯化胰岛,获得的胰岛DTZ染色鉴定纯度,经AO/PI染色鉴定胰岛活性。胰岛培养于含10%胎牛血清的1640培养基中培养备用。

3. 大鼠MSCs分离培养及鉴定: 按照先前报道的方法^[7-8],无菌条件下,分离获取大鼠股骨和胫骨,冲洗出骨髓腔内的骨髓,经全骨髓贴壁培养法培养,48 h后弃去非贴壁血细胞,每2~3天换液1次。待细胞长至80%~90%融合时,用含EDTA的0.25%胰蛋白酶消化传代,经流式鉴定间充质细胞表面标志物的表达。

4. 胰岛微环境构建: 分别抽取大鼠促凝血和肝素抗凝血, 分离获得大鼠血清和血浆; 将获得的PDMS 支架用含 10 % 大鼠血清的 PBS 缓冲液浸泡过夜; 然后将支架放入培养皿中, 加入大鼠骨髓 MSCs 的细胞悬液(2×10^6 个/ml) 培养过夜。取出含间充质细胞的支架, 放入新的培养皿中。将分离的 SD 大鼠胰岛浓缩于 50 μ l 的 1640 培养基中。将胰岛悬液装载入支架中。取 SD 大鼠血浆, 按体积比 10 : 1 加入凝血酶(2 000 IU/ml), 混合均匀后, 迅速滴加于支架外围, 形成一层包绕支架的纤维蛋白胶, 即制备得到含有 MSCs、胰岛细胞、胞外基质保护膜组成的移植胰岛微环境——“人工胰腺”。

5. STZ 诱导糖尿病大鼠模型: 按照先前报道的方法诱导 SD 大鼠糖尿病模型^[7]。腹腔注射链脲佐菌素 50 mg/kg, 2 d 后监测大鼠血糖、体重, 当连续监测 3 d 血糖 > 300 mg/dl (16.6 mmol/L) 为糖尿病模型。

6. “人工胰腺”移植: SD 大鼠在 1 % 戊巴比妥钠麻醉下, 在腹部切开 1 个小口, 在胃大弯下找到大网膜, 将大网膜铺展开, 并将“人工胰腺”装载在大网膜上, 用大网膜将其包裹, 加入新鲜配制的纤维

蛋白胶; 将大网膜回纳入腹腔后缝合大鼠肌肉和皮肤; 假手术对照组按手术步骤行假手术不植入“人工胰腺”; 术后分别对大鼠血糖情况进行监测。

三、统计学分析方法

采用 Graphpad Prism 6.0 软件进行统计分析, 血糖值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验组与假手术对照组血糖水平经方差齐性分析, 方差齐采用 *t* 检验, 方差不齐则采用曼-惠特尼 *U* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

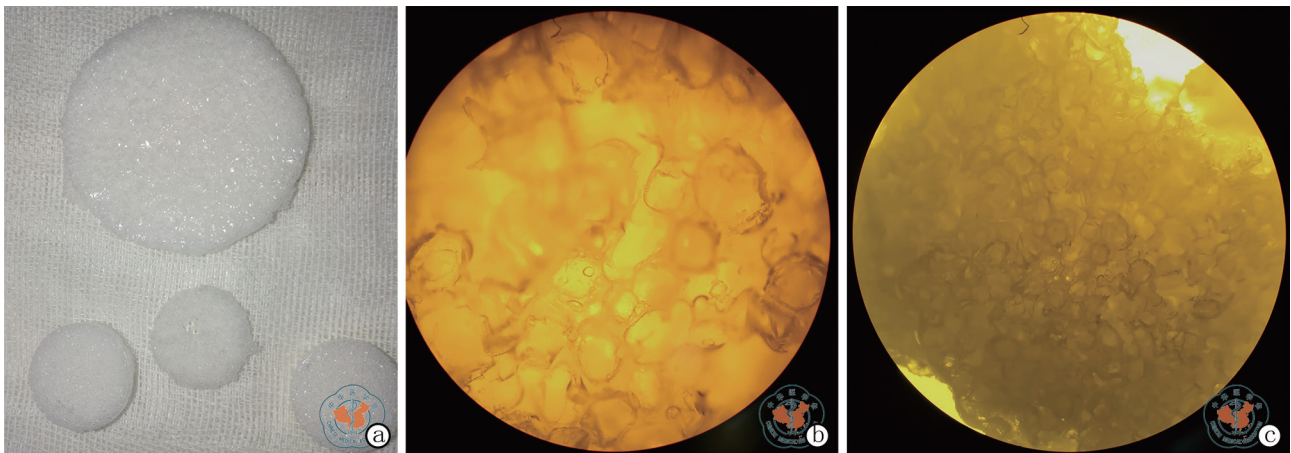
结 果

一、PDMS 三维支架构建结果

根据磨具不同生成不同的三维巨孔支架。NaCl 晶体被淘汰后, 留下相应大小的孔洞。显微镜下可见大量不规则孔洞空间(图 1)。

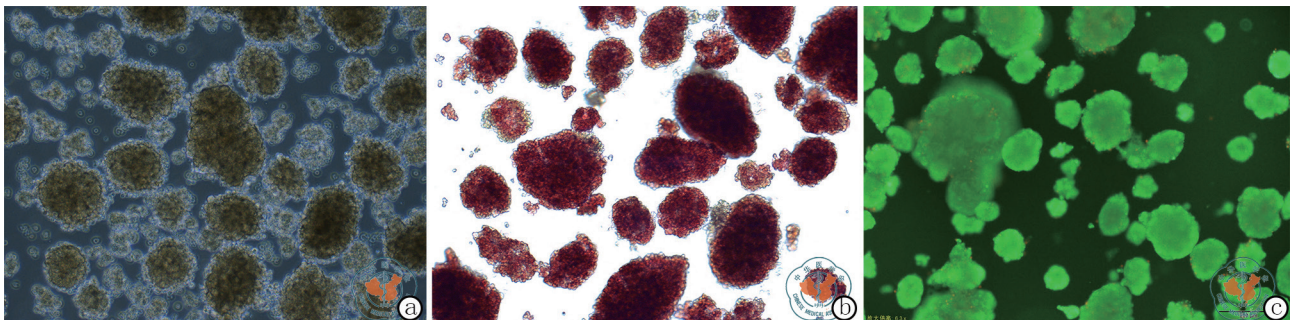
二、大鼠胰岛分离鉴定结果

经酶消化和不连续密度梯度离心, 可获得较纯的胰岛, 经 DTZ 染色, 胰岛呈猩红色, 腺泡细胞不染色。经 AO/PI 染色显示, 获得的胰岛活性 > 90 % (图 2)。



注: a 图为正常视野下不同大小磨具形成的三维支架; b、c 图均为显微镜下支架孔洞, 可见大量不规则孔洞空间, b 图放大倍数为 400, c 图放大倍数为 100

图 1 构建 PDMS 三维多孔支架结果



注: a 图为大鼠胰岛($\times 100$); b 图观察胰岛纯度, 猩红色的为胰岛(DTZ 染色, $\times 100$); c 图观察胰岛活性, 活的胰岛染成绿色荧光, 凋亡胰岛为橙红色荧光(AO/PI 染色, $\times 100$)

图 2 倒置相差显微镜观察大鼠胰岛分离纯化鉴定结果

三、大鼠 MSCs 分离鉴定结果

全骨髓法贴壁培养 3 d 后,可见成纤维状细胞小集落生成,扩增培养后可获得较均一的成纤维样,鱼群状细胞群(图 3)。经流式鉴定表达 CD29, CD90; 不表达造血系统的标志物 CD34, CD45 等(图 4)。

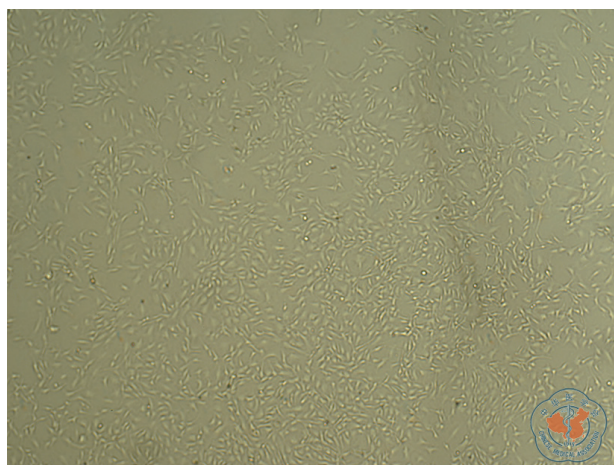
四、“人工胰腺”构建结果

PDMS 支架装载胰岛后,显微镜下可见 PDMS 孔内存在胰岛。病理组化 HE 染色结果显示,胰岛周围存在明显的瘦长型 MSCs 包绕,而不含 MSCs 组对照未见有瘦长型细胞包绕。见图 5 箭头所示。

五、“人工胰腺”大网膜移植治疗糖尿病大鼠结果

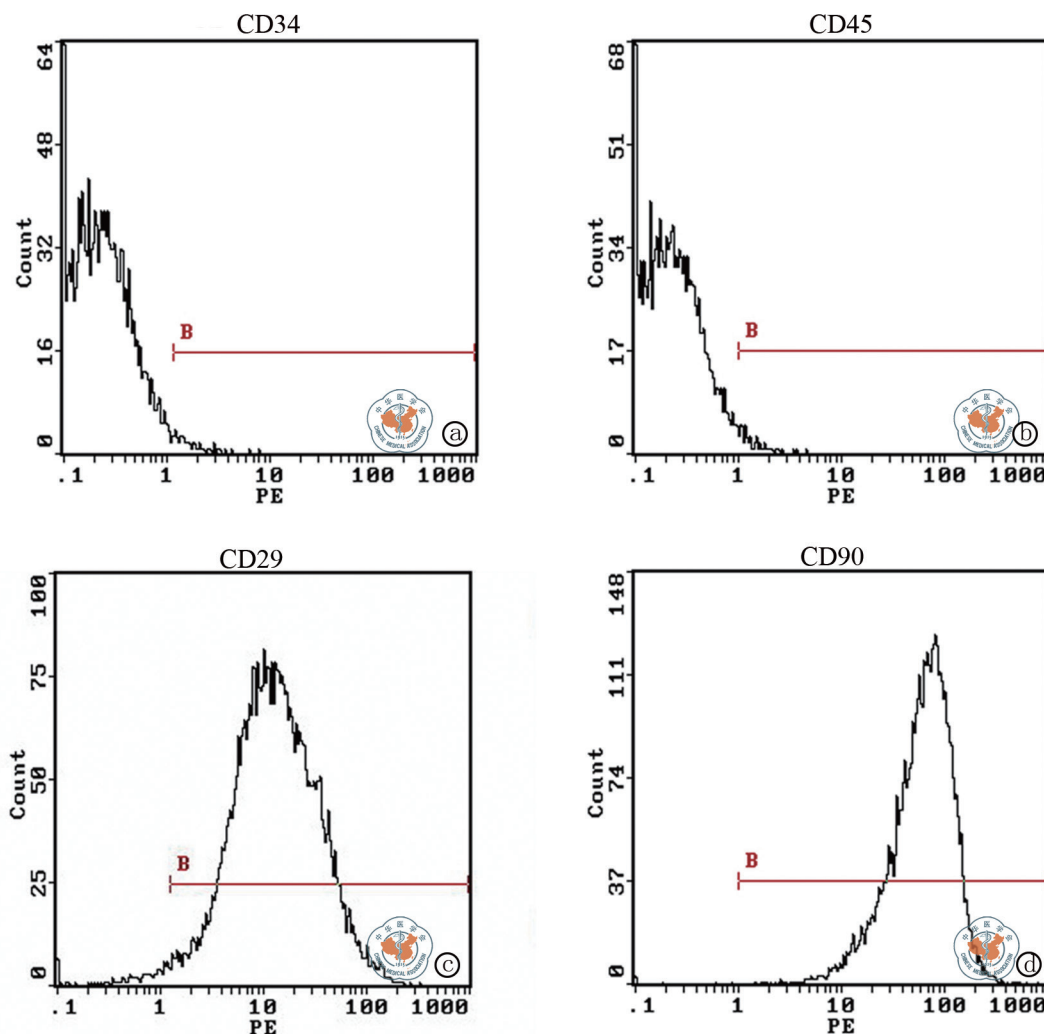
“人工胰腺”大网膜移植过程如图 6。移植前和移植后糖尿病大鼠血糖水平见表 1。移植后“人工胰腺”移植组与假手术对照组相比血糖水平下调,差异均具有统计学意义($t=7.96, 9.15, 8.82,$

$U=0.00, P$ 均 < 0.01)。说明人工胰腺内胰岛,具有分泌胰岛素,发挥调节血糖的作用。



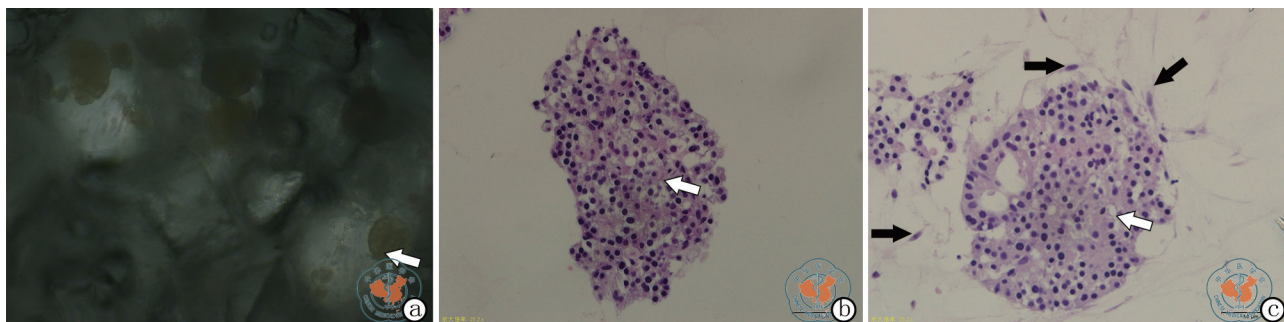
注: 见成纤维状细胞小集落生成, 扩增培养后可获得较均一的成纤维样, 鱼群状细胞群

图 3 倒置相差显微镜下观察全骨髓贴壁培养获得的大鼠 MSCs 形态($\times 40$)



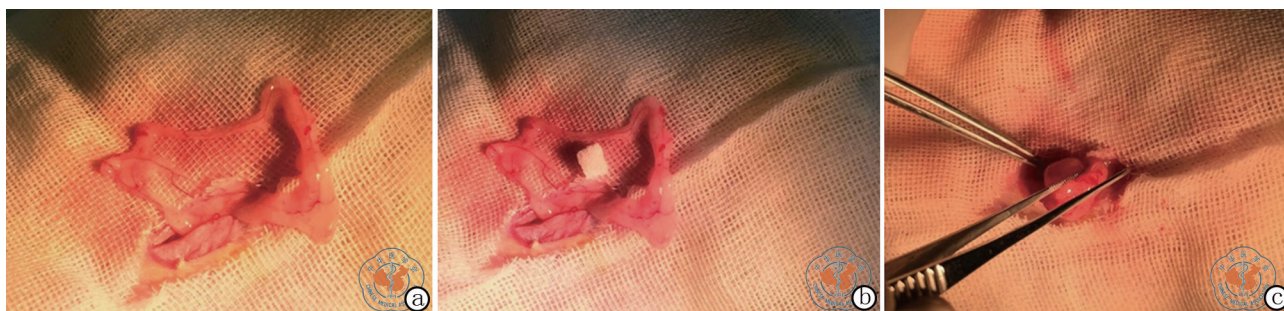
注: a、b 图为不表达造血系统的标志物 CD34, CD45 等; c、d 图为获得的 MSCs 表达 CD29, CD90

图 4 大鼠骨髓 MSCs 表面标志物表达流式鉴定结果



注: a 图为倒置显微镜下 PDMS 支架中的胰岛($\times 40$); b 图为正置光学显微镜观察单独胰岛组 HE 染色人工胰腺内胰岛结果($\times 400$); c 图为正置光学显微镜观察 HE 染色人工胰腺内胰岛结果($\times 400$)。黑色箭头所示为 MSCs 细胞,白色箭头所示为胰岛

图 5 显微镜下观察“人工胰腺”构建结果



注: a 图为展开的大鼠大网膜; b 图为装载有胰岛的“人工胰腺”; c 图为大网膜包裹好的“人工胰腺”置入腹腔

图 6 “人工胰腺”大网膜移植过程

表 1 两组糖尿病大鼠“人工胰腺”大网膜移植前后血糖水平(mg/dl, $\bar{x} \pm s$)

分组	移植前	移植后 1 d	移植后 3 d	移植后 5 d	移植后 7 d
“人工胰腺”移植组	568.20 \pm 27.93	278.70 \pm 86.06	323.50 \pm 44.29	283.30 \pm 74.00	304.80 \pm 13.33
假手术对照组	566.00 \pm 47.63	606.00 \pm 52.40	589.70 \pm 55.78	615.00 \pm 54.84	630.30 \pm 48.17
<i>t</i> 值	0.10	7.96	9.15	8.82	0.00*
<i>P</i> 值	0.9253	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注: * 为 *U* 值,血糖检测值超出检测上限的,定为 650 mg/dl。移植前,移植后 1,3,5 d 数据方差齐,采用 *t* 检验,移植后 7 d 数据方差不齐,采用曼-惠特尼 *U* 检验

讨 论

肝内移植的微环境,并不是最适合胰岛生存的移植位点^[9]。研究者不断尝试不同的方法构建一个类似“人工胰腺”的胰岛移植微环境^[10-11]。构建“人工胰腺”微环境,需要解决几个关键的问题^[12-14]: (1) 为胰岛提供一个定植空间,保护胰岛免受机械压力损伤; (2) 减轻胰岛与血液直接接触触发的炎症反应造成的损伤; (3) 克服机体免疫细胞对胰岛的免疫攻击造成的损伤; (4) 快速血管化,保障胰岛的营养供应,使其在“人工胰腺”内的长期存活。

为解决胰岛定植空间问题,本研究利用 PDMS 与氯化钠晶体结合固化,通过淘洗融化氯化钠晶体后,形成含有大量孔洞的三维支架,可以为胰岛提供物理存在的空间。该支架可耐受高温高压、酸碱等,具有较强的生物稳定性。本研究在 PDMS 支

架中加入 MSCs 作为支架微环境重要组成部分,并利用胞外基质纤维蛋白,形成一层生物胶将胰岛和 MSCs 包裹于支架内,与免疫细胞等进行隔离,形成一个迷你“人工胰腺”。MSCs 因其具有分化潜能、免疫调控、分泌细胞因子等功能成为再生医学重要的种子细胞^[4,15]。MSCs 也是胰腺间质细胞的重要组成部分。先前的研究也证实, MSCs 在体内外均能促进胰岛的存活, MSCs 和胰岛共移植可以减少移植受体所需的胰岛量^[7,16-17]。MSCs 可以调节免疫,减轻炎症反应,促进胰岛血管生成等^[18-19]。此外胰腺基底膜含有多种胞外基质蛋白如层粘连蛋白和胶原蛋白,可以通过 $\beta 1$ 整合素受体支持 β 细胞功能^[20]。丰富的胞外基质是移植胰岛存活的必要条件,当胰岛培养在 ECM 蛋白中如纤维连接蛋白,胶原或层粘连蛋白中,存活率增加^[21-22]。甚至包括存在与许多 ECM 分子中的 RGD 序列都能通过降低

胰岛对凋亡的敏感性,提高胰岛的存活^[23]。

本研究将构建的“人工胰腺”移植于糖尿病大鼠大网膜上,结果显示,糖尿病大鼠血糖得到有效控制,说明构建的“人工胰腺”可在体内具有生物学功能。因此, MSCs 联合 PDMS 支架构建的微环境,可为胰岛移植提供生存的移植微环境,但其长期的效果和机制分析还有待于进一步的深入研究。

参 考 文 献

- Pelizza L, Bonazzi F, Scaltriti S, et al. Brittle diabetes: psychopathological aspects[J]. Acta Biomed, 2014, 85(1):18-29.
- Wu Q, Zhang M, Qin Y, et al. Systematic review and meta-analysis of islet autotransplantation after total pancreatectomy in chronic pancreatitis patients[J]. Endocr J, 2015, 62(3):227-234.
- Korsgren O, Lundgren T, Felldin M, et al. Optimising islet engraftment is critical for successful clinical islet transplantation[J]. Diabetologia, 2008, 51(2):227-232.
- 陈津, 郭子宽, 王立生, 等. 大规模间充质干细胞培养技术评估报告[J]. 中国医药生物技术, 2013, 8(4):274-284.
- 陈津, 马予洁, 郭子宽, 等. 临床级间充质干细胞培养规范[J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2013, 3(3):144-148.
- Pedraza E, Brady AC, Fraker CA, et al. Synthesis of macroporous poly(dimethylsiloxane) scaffolds for tissue engineering applications[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2013, 24(9):1041-1056.
- Chen J, Ye Y, Liao L, et al. Mesenchymal stem cells promote islet survival *in vitro* and function *in vivo*[J]. CellR4, 2013, 1(2): e382.
- 陈津, 马予洁, 王姿, 等. 凝血酶促进骨髓间充质干细胞增殖的作用与机制[J]. 中国实验血液学, 2014, 22(2): 485-490.
- Schaschkow A, Sigrist S, Mura C, et al. Extra-Hepatic islet transplantation: validation of the h-Omental matrix islet filliNG (hOMING) technique on a rodent model using an alginate carrier[J]. Cell Transplant, 2018, 27(8):1289-1293.
- De Vos P, Vegter D, De Haan BJ, et al. Kinetics of intraperitoneally infused insulin in rats. Functional implications for the bioartificial pancreas[J]. Diabetes, 1996, 45(8):1102-1107.
- Kasputis T, Clough D, Noto F, et al. Microporous polymer scaffolds for the transplantation of embryonic stem cell derived pancreatic progenitors to a clinically translatable site for the treatment of type I diabetes[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2018, 4(5):1770-1778.
- Smink AM, Faas MM, de Vos P. Toward engineering a novel transplantation site for human pancreatic islets[J]. Diabetes, 2013, 62(5):1357-1364.
- Rios PD, Skoumal M, Liu J, et al. Evaluation of encapsulating and microporous nondegradable hydrogel scaffold designs on islet engraftment in rodent models of diabetes[J]. Biotechnol Bioeng, 2018, 115(9):2356-2364.
- Smink AM, de Haan BJ, Lakey JRT, et al. Polymer scaffolds for pancreatic islet transplantation-Progress and challenges[J]. Am J Transplant, 2018, 18(9):2113-2119.
- Chen J, Ma Y, Wang Z, et al. Thrombin promotes fibronectin secretion by bone marrow mesenchymal stem cells via the protease-activated receptor mediated signalling pathways[J]. Stem cell Res Ther, 2014, 5(2): 36.
- Lee RH, Seo MJ, Reger RL, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(46): 17438-17443.
- Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB, et al. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2008, 14(6): 631-640.
- Ito T, Itakura S, Todorov I, et al. Mesenchymal stem cell and islet co-transplantation promotes graft revascularization and function[J]. Transplantation, 2010, 89(12):1438-1445.
- 陈俊秋, 陈津, 黄梁浒, 等. 间充质细胞外泌体促进小鼠胰岛内皮细胞血管生成的研究[J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2018, 8(4): 212-217.
- Nikolova G, Jabs N, Konstantinova I, et al. The vascular basement membrane: A niche for insulin gene expression and beta cell proliferation[J]. Dev Cell, 2006, 10(3):397-405.
- Sackett SD, Tremmel DM, Ma F, et al. Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):10452.
- Guruswamy Damodaran R, Vermette P. Decellularized pancreas as a native extracellular matrix scaffold for pancreatic islet seeding and culture[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2018, 12(5):1230-1237.
- Pinkse GG, Bouwman WP, Jiawan-Lalai R, et al. Integrin signaling via RGD peptides and anti-beta1 antibodies confers resistance to apoptosis in islets of Langerhans[J]. Diabetes, 2006, 55(2): 312-317.

(收稿日期:2018-07-11)

(本文编辑:蔡晓珍)

陈津, 付云烽, 赵红州, 等. 骨髓间充质细胞联合 PDMS 支架构建移植胰岛微环境的实验研究 [J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2018, 8(6):328-333.