

骨髓细胞移植联合环磷酰胺诱导胰腺移植大鼠免疫耐受的实验研究

罗琪¹, 卢明珠¹, 罗凌涛², 傅毓玲¹, 傅锦波¹, 黄正接^{1△}

1. 厦门大学附属中山医院 普通外科 (厦门 361004); 2. 厦门大学医学院 临床专业 2006 级 (厦门 361005)

【摘要】 目的 研究骨髓细胞(BMC)移植联合短期使用环磷酰胺(CTX)对诱导糖尿病大鼠胰腺移植免疫耐受的作用。方法 采用链脲霉素(STZ)45 mg/kg 腹腔一次性注射法诱导建立 BN 大鼠 1 型糖尿病模型。以 SD 大鼠为供体, 糖尿病 BN 大鼠为受体, 制作转基因大鼠胰腺移植动物模型。20 只 BN 大鼠 1 型糖尿病模型随机分为 4 组, 每组 5 只。I 组: 单纯行胰腺移植; II 组: 胰腺移植术后第 1 d 按 150 mg/kg 腹腔注射 CTX; III 组: 胰腺移植时经门静脉注射供体 BMC 2.0×10^8 个; IV 组: 胰腺移植时经门静脉注射供体 BMC 2.0×10^8 个, 移植术后第 1 d 按 150 mg/kg 腹腔注射 CTX。术后监测血糖, 记录大鼠功能性存活期。术后 2 周取外周血, 制备单细胞悬液, 用流式细胞仪检测 $V\beta 11^+$ T 细胞的水平和嵌合体形成率。结果 I 组大鼠功能性存活期为 (7.8 ± 1.2) d, II 组功能性存活期为 (8.2 ± 1.6) d, III 组功能性存活期为 (8.8 ± 1.4) d, 而 IV 组功能性存活期为 (18 ± 2.2) d, 与其它各组比较, 存活时间延长 ($P < 0.05$)。IV 组 $V\beta 11^+$ T 细胞的水平 $(2.5 \pm 0.3)\%$, 低于其它各组 ($P < 0.05$), IV 组糖尿病大鼠外周血液中可以检测到供体骨髓源性细胞, 嵌合率为 $(10.0 \pm 2.3)\%$, 其它 3 组均未检测到供体骨髓源性细胞。结论 BMC 移植联合短期使用 CTX 可促进嵌合体形成, 诱导免疫耐受, 延长大鼠胰腺移植术后功能性存活期。

【关键词】 骨髓细胞 免疫抑制剂 胰腺移植 嵌合体 免疫耐受

Immune Tolerance Induced by Bone Marrow Cell Transplantation Combined with Use of Cyclophosphamide in Diabetic Rats with Pancreatic Transplantation

LUO Qi¹, LU Ming-zhu¹, LUO Ling-tao², FU Yu-ling¹, FU Jin-bo¹, HUANG Zheng-jie^{1△}. 1. Department of General Surgery, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, China; 2. Department of Clinical Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China

△ Corresponding author, E-mail: h74zj@126.com

【Abstract】 Objective To study the immune tolerance induced by bone marrow cell transplantation combined with short term use of cyclophosphamide after pancreatic transplantation in diabetic rats. **Methods** Type I diabetes mellitus was induced in BN rats with streptozotocin (STZ) intraperitoneal injection at a single dose of 45 mg/kg. Pancreatic transplantations were performed with the SD rats as donors and the diabetic BN rats as recipients. Twenty BN rats with type I diabetes mellitus were randomly divided into four groups. The BN rats in Group I received pancreas transplantations only. The BN rats in Group II received intraperitoneal injection of 150 mg/kg cyclophosphamide on the first day after pancreas transplantations. The BN rats in Group III received injection of 2.0×10^8 donors' bone marrow cells via the portal vein during the pancreas transplantations. The BN rats in Group IV received injection 2.0×10^8 donors' bone marrow cells via the portal vein during the pancreas transplantations and an intraperitoneal injection of 150 mg/kg cyclophosphamide on the first day after pancreas transplantations. The blood glucose of the rats was measured after transplantations. The graft functional survival time (GFST) was recorded. Peripheral blood was obtained two weeks after the transplantations to prepare single cell suspension for detecting chimera formation rate and the level of $V\beta 11^+$ T cell by flow cytometry. **Results** The average GFST of group IV was (18 ± 2.2) d, significantly longer than those of group I (7.8 ± 1.2) d, group II (8.2 ± 1.6) d, and group III (8.8 ± 1.4) d ($P < 0.05$). The rats in group IV had significant lower level of $V\beta 11^+$ T cells $(2.5 \pm 0.3)\%$ than those in the other groups ($P < 0.05$). Donors' bone marrow derived cells could be detected in the peripheral blood of diabetic rats in group IV, with a chimeric rate of $(10.0 \pm 2.3)\%$. No donors' bone marrow derived cells were detected in the rats in other groups. **Conclusion** Bone marrow cell transplantation combined with short term use of cyclophosphamide promote chimerism formation and induce immune tolerance in rats with pancreatic transplantations, which prolongs pancreatic graft functional survival time.

【Key words】 Bone marrow cell Immunosuppressor Pancreatic transplantation Chimerism Immune tolerance

对于胰岛 β 细胞自身免疫破坏引起的 1 型糖尿病, 现有的治疗方法尚无法治愈, 也不能防止并发症

△ 通讯作者, E-mail: h74zj@126.com

的产生。胰腺移植能够给糖尿病患者提供稳定且符合生理需要的胰岛素,不但能够控制血糖,而且能够预防、改善甚至逆转糖尿病的并发症^[1]。目前影响胰腺移植效果的因素除了手术操作技术外,主要是免疫排斥^[2]。诱导免疫耐受是目前解决器官移植排斥的重要课题,研究表明通过骨髓移植形成嵌合体是诱导免疫耐受的有效手段^[3]。本实验通过门静脉将供体骨髓细胞(BMC)输入胰腺移植大鼠,并短期使用环磷酰胺(CTX)促进嵌合体形成,探讨供体BMC联合CTX对诱导大鼠胰腺移植免疫耐受的作用。

1 材料和方法

1.1 实验药品及器材

链尿霉素(STZ)购自SIGMA公司, FITC标记的抗RT1B单抗HIS19购自美国Bioscience公司, FITC标记的抗V β 11⁺单克隆抗体购自Immunotech公司,无水乙醚购自国药集团化学试剂有限公司,医用无创伤缝合线(针)购自杭州华威医疗用品有限公司,显微外科手术器械购自上海手术器械厂。

1.2 实验动物及分组

同月龄、雄性、清洁级SD大鼠20只,体质量180~200g;同月龄、雌性、清洁级BN大鼠20只,体质量200~220g。均购自上海斯莱克实验动物有限公司。

BN大鼠禁食12h,按45mg/kg腹腔1次性注射STZ,注射后每3d测一次血糖,血糖连续2次 \geq 16.7mmol/L,具有多饮、多食、多尿,且体质量减轻者判定为糖尿病诱导成功,作为移植受体。20只BN大鼠1型糖尿病模型随机分为4组,每组5只。I组(对照组):单纯行胰腺移植;II组(CTX组):胰腺移植术后第1d按150mg/kg腹腔注射CTX;III组(BMC组):胰腺移植时经门静脉注射供体BMC 2.0×10^8 个;IV组(BMC联合CTX组):胰腺移植时经门静脉注射供体BMC 2.0×10^8 个,移植术后第1d按150mg/kg腹腔注射CTX。

20只SD大鼠亦随机分为4组,每组5只,作为供体对应每只受体BN大鼠,供体BMC和供体胰腺取自同一只供体大鼠。

1.3 BMC的制备

供体SD大鼠于750mL/L乙醇中浸泡10min,取股骨、胫骨,剪去两端骨垢,用磷酸缓冲液(PBS)溶液冲出骨髓,200目钢筛过滤制成单细胞

悬液,红细胞裂解液去除红细胞,PBS离心洗2次,台盼蓝染色检测细胞活力在98%以上,制备成单细胞悬液,调整浓度为 1.0×10^8 /mL。

1.4 大鼠糖尿病模型的胰腺移植和BMC输注

按文献^[4]方法行大鼠胰腺移植,在胰腺移植时将BMC悬液2mL经门静脉输注到受体。麻醉清醒后喂饲5%糖水,术后次日正常喂食。

1.5 观测指标

1.5.1 大鼠移植胰腺功能性存活期的测定 受体大鼠移植胰腺后1周内尾静脉取血,每天定时检测非空腹血糖,1周后隔日定时测定。以血糖低于11.2mmol/L作为移植胰腺功能正常的标准,血糖连续2d超过11.2mmol/L判定为移植胰腺发生排斥。若第1次血糖 > 11.2 mmol/L的日期在移植后1周内,则该日期前推1日判定为糖尿病复发日期;若第1次血糖 > 11.2 mmol/L的日期在移植1周后,则该日期前推两日判定为糖尿病复发日期。大鼠胰腺移植结束日期与糖尿病复发日期之间判定为大鼠移植胰腺功能性存活期。

1.5.2 V β 11⁺的T细胞和嵌合体的测定 受体大鼠移植胰腺后2周取外周血,裂解红细胞,制备单细胞悬液,调整浓度为 1.0×10^6 /mL,加入FITC标记的抗RT1B的单抗HIS19或FITC标记的抗V β 11⁺单克隆抗体,用流式细胞仪(Beckman Coulter EPICS XL型)检测受体外周血V β 11⁺的T细胞水平和供体来源细胞的嵌合水平。

1.6 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠移植胰腺功能性存活期

4组糖尿病大鼠在胰腺移植术后第1d血糖均恢复正常。各组糖尿病大鼠在2周内均无死亡。I、II、III组大鼠术后1~14d血糖逐步上升,最终血糖 > 11.2 mmol/L,糖尿病复发;IV组大鼠术后1~14d血糖维持在11.2mmol/L之内。IV组的移植胰腺功能性存活期16~28d,平均 (18 ± 2.2) d,与其它各组比较,存活时间延长($P < 0.05$)。而II组 $[(8.2 \pm 1.6)$ d]、III组 $[(8.8 \pm 1.4)$ d]的移植胰腺功能性存活期与I组 $[(7.8 \pm 1.2)$ d]比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

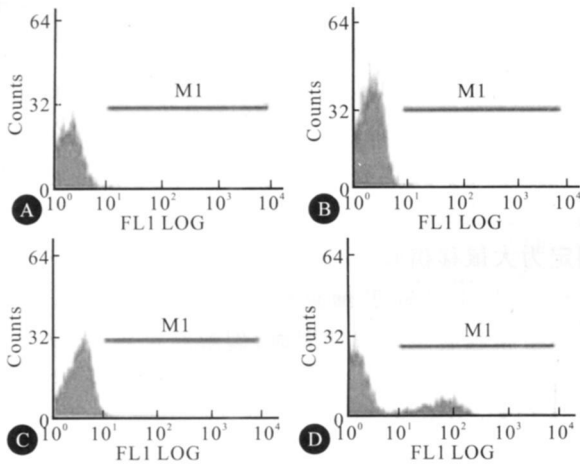
2.2 外周血V β 11⁺的T细胞水平

胰腺移植术后2周,IV组外周血V β 11⁺的T细

胞水平为 $(2.5 \pm 0.3)\%$, 与 I 组 $(4.8 \pm 0.4)\%$ 、II 组 $(4.7 \pm 0.1)\%$ 、III 组 $(4.3 \pm 0.3)\%$ 大鼠相比, $\text{V}\beta 11^+$ 的 T 细胞水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明供体 BMC 联合短期使用 CTX 能抑制 T 细胞增殖。

2.3 嵌合体的检测

胰腺移植术后 2 周, IV 组的糖尿病大鼠外周血中可以检测到供体骨髓源性的 RT1B 阳性细胞, 嵌合率为 $(10.0 \pm 2.3)\%$, 其它 3 组均未检测到供体骨髓源性细胞(附图)。提示输注供体 BMC 并短期使用 CTX 能诱导嵌合体的形成, 单纯采用该剂量的 CTX 或输注供体 BMC 不能诱导嵌合体的产生。



附图 供体骨髓源性 RT1B 阳性细胞的流式细胞仪检测

Fig Flow cytometry shows donors' bone marrow derived RT1B positive cells

A: Control group; B: Cyclophosphamide group; C: Bone marrow cell group; D: Bone marrow cell combined with cyclophosphamide group

3 讨论

排斥反应是胰腺移植治疗糖尿病目前面临的主要问题。为解决移植排斥, 长期使用免疫抑制剂会带来严重的不良作用, 而且无法有效解决慢性排斥; 对受体进行强烈的预处理, 如化学毒性药物处理、照射等, 在临床上又难以接受。近年来, 通过移植供者造血干细胞到受体中, 建立稳定的嵌合体, 诱导长期稳定的免疫耐受, 即受体对供体抗原不产生免疫应答, 而对第三者抗原仍具有正常的免疫应答反应, 为器官移植领域解决免疫排斥提供了良好的前景^[5,6]。嵌合状态与免疫耐受密切相关, 如何采取安全、简便及可靠的方法建立稳定的嵌合体来诱导持续的免疫耐受是器官移植的重大课题之一^[7]。要使供体造血干细胞顺利嵌入受体, 则必须先清除受

体成熟 T 细胞。CTX 是常用的免疫抑制剂, NK 细胞及增殖 T 细胞的 DNA 对 CTX 高度敏感。

造血干细胞绝大部分存在于骨髓中, 本研究采用供体 BMC 移植联合短期使用 CTX 建立嵌合体, 在胰腺移植时经门静脉注射供体 BMC, 移植术后第 1 d 腹腔注射 CTX, 术后 2 周用流式细胞仪检测, 外周血 $\text{V}\beta 11^+$ 的 T 细胞水平为 $(2.5 \pm 0.3)\%$, 并检测到供体来源的 RT1B 阳性的细胞, 嵌合率为 $(10.0 \pm 2.3)\%$ 。输注供体 BMC 并短期使用 CTX 能诱导嵌合体的形成, 机制在于免疫抑制剂 CTX 能抑制 NK 细胞活性, 杀死增殖的 T 细胞克隆, 促进供体 BMC 的植入, 诱导形成嵌合体。BMC 联合 CTX 组的移植胰腺功能性存活期比其它 3 组长 ($P < 0.05$), 同时其它 3 组均未检测到供体来源的细胞, 提示嵌合体形成率与移植胰腺功能性存活期可能存在一定的相关性, BMC 联合 CTX 通过促进嵌合体的形成, 诱导免疫耐受, 从而延长移植胰腺功能性存活期。

CTX 能抑制 NK 细胞活性, 杀死增殖的 T 细胞克隆, 但在单纯短期应用 CTX 的大鼠中, 胰腺移植术后 2 周, 其外周血 $\text{V}\beta 11^+$ 的 T 细胞水平为 $(4.7 \pm 0.1)\%$, 与 I 组 $(4.8 \pm 0.4)\%$ 、III 组 $(4.3 \pm 0.3)\%$ 大鼠相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 可能是由于本实验 CTX 的剂量过小以及使用的时间过短, 同时没有联合移植骨髓细胞, 未能形成嵌合体, 使大鼠胸腺发育成熟 T 细胞补充得到恢复, 导致移植排斥, 最终未能延长移植胰腺功能性存活期。而单纯输注 BMC 组没有明显延长移植胰腺功能性存活期, 原因是受体 BN 大鼠自身成熟完善的免疫系统能够识别异己的供体 BMC 并予以破坏清除, 导致供体 BMC 无法通过形成嵌合体来诱导免疫耐受。

对于啮齿类动物模型, 非清髓性干细胞移植是目前诱导免疫耐受方案中比较成熟的一种, 与清髓性移植方案比较, 其毒性明显降低, 但操作较为繁琐^[8]。本实验简化方案采用供体 BMC 联合短期使用 CTX, 较为简便易行, 研究结果表明本方案能够在糖尿病 BN 大鼠中建立嵌合体, 诱导免疫耐受, 达到抑制急性排斥反应, 延长移植胰腺功能性存活期, 分泌胰岛素控制血糖的目的。但是本研究仅根据移植胰腺的内分泌功能判定移植胰腺功能性存活期, 难以判断急性排斥反应发生的程度, 而且建立嵌合体的效率不高, 仅为 $(10.0 \pm 2.3)\%$, 尚需进一步研究探索。

(下转第 124 页)

的 DR-GMs 符合 TACE 要求。目前仍需对此种微球的血管内栓塞降解过程进行动态观察, 对其体内生物相容性以及交联度与体内降解时间的关系做进一步的研究, 从而为这种新型肝动脉化疗栓塞剂的临床应用提供理论及实验依据。

* * *

致谢: 由衷感谢四川大学华西医院核医学科李林主任和四川大学华西基础医学与法医学院寄生虫教研室陈建平教授慷慨提供实验场所和部分试剂。

参 考 文 献

- 1 Varela M, Real MI, Burrel M, *et al.* Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol*, 2007; 46(3): 474-481.
- 2 Brown DB, Cardella JF, Sacks D, *et al.* Quality improvement guidelines for transhepatic arterial chemoembolization, embolization, and chemotherapeutic infusion for hepatic malignancy. *J Vasc Interv Radiol*, 2006; 17(2): 225-232.
- 3 Nitta N, Ohta S, Tanaka T, *et al.* Gelatin microspheres: initial clinical experience for the transcatheter arterial embolization. *Eur J Radiol*, 2008; 67(3): 536-540.
- 4 Cortesi R, Esposito E, Osti M, *et al.* Dextran cross linked gelatin microspheres as a drug delivery system. *Eur J Pharm Biopharm*, 1999; 47(2): 153-160.
- 5 Wu H, Zhang ZX, Wu DC, *et al.* Preparation and drug release characteristics of pingyangmycin loaded dextran cross linked gelatin microspheres for embolization therapy. *J Biomed Mater Res B*, 2006; 78B(1): 56-62.

- 6 Liang HC, Chang WH, Lin KJ, *et al.* Genipin crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Biomed Mater Res A*, 2003; 65A(2): 271-282.
- 7 詹国平, 韩彦江, 谢恩伟. 阿霉素明胶微球的制备及体外释药. *中国医学工程*, 2005; 13(5): 483-488.
- 8 陆扬. 明胶微球的研究进展(二). *明胶科学与技术*, 2006; 26(3): 113-127.
- 9 孙瑞雪, 史京京, 郭燕川等. 明胶微球粒径控制的研究. *高分子学报*, 2008; 8: 779-784.
- 10 王如德, 怀燕, 程琮. SPSS13.0 在空白列正交试验设计及其数据处理中的应用. *中国卫生统计*, 2007; 24(8): 426-427.
- 11 Wei HJ, Yang HH, Chen CH, *et al.* Gelatin microspheres encapsulated with a nonpeptide angiogenic agent, ginsenoside Rg1, for intramyocardial injection in a rat model with infarcted myocardium. *J Control Release*, 2007; 120(1-2): 27-34.
- 12 历孟, 刘旭东, 刘兴炎. 京尼平与戊二醛交联明胶微球的性能比较. *中国修复重建外科杂志*, 2009; 23(1): 87-91.
- 13 国家药典委员会. *中华人民共和国药典*. 2005 年版第 2 部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 504-505.
- 14 Young S, Wong M, Tabata Y, *et al.* Gelatin as a delivery vehicle for controlled release of bioactive molecules. *J Control Release*, 2005; 109(1-3): 256-274.
- 15 Ohta S, Nitta N, Takahashi M, *et al.* Degradable gelatin microspheres as an embolic agent: an experimental study in a rabbit renal model. *Korean J Radiol*, 2007; 8(5): 418-428.

(2010-05-17 收稿, 2010-09-14 修回)

编辑 余琳

(上接第 108 页)

参 考 文 献

- 1 Sutherland DE, Gruessner RW, Gruessner AC. Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus. *World J Surg*, 2001; 25(4): 487-496.
- 2 孟令祥, 胡伟明, 张肇达等. AdCTLA-4g 基因导入对胰十二指肠移植大鼠免疫耐受的实验研究. *四川大学学报(医学版)*, 2007; 38(3): 374-377.
- 3 张文元, 杨亚冬, 房国坚等. 抗淋巴细胞血清联合脾细胞促进异基因骨髓细胞形成嵌合体诱导免疫耐受. *现代医药卫生*, 2008; 24(3): 319-320.
- 4 孟令祥, 张肇达, 李军杰等. 异基因大鼠胰十二指肠移植的体

- 会. *华西医学*, 2006; 21(2): 329-331.
- 5 Matthews JB, Ramos E, Bluestone JA. Clinical trials of transplant tolerance: slow but steady progress. *Am J Transplant*, 2003; 3(7): 794-803.
- 6 Claas F. Chimerism as a tool to induce clinical transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol*, 2004; 16(5): 578-583.
- 7 Sykes M. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity*, 2001; 14(4): 417-424.
- 8 金楠, 陈宝安. 非骨髓性转基因造血干细胞移植的基础实验及临床研究. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009; 13(10): 1955-1958.

(2010-03-25 收稿, 2010-08-27 修回)

编辑 汤洁