

学校编码: 10384

分类号_____ 密级_____

学号: 24520121153160

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

三氧化二砷在以药物诱导型1型糖尿病小鼠为
受体的异种胰岛移植模型中的作用研究

Study of Arsenic Trioxide in Islet Xenotransplantation
with drug-induced type 1 diabetic mice

赵斌

指导教师姓名: 齐忠权教授

专业名称: 生理学

论文提交日期: 2015年4月

论文答辩日期: 2015年5月

2015年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（免疫抑制剂）课题（组）的科研成果，获得（齐忠权教授）课题（组）经费或实验室资助，在（厦门大学器官移植研究所）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不做特别声明。

声明人（签名）：

2014年5月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国硕士、博士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其他方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

2014年 月 日

摘要

目的：胰岛移植目前被视为1型糖尿病患者可能的治愈方案之一，目前基于埃德蒙顿方案的临床胰岛移植方案取得了很大成功，使众多1型糖尿病患者脱离了对外源性胰岛素的依赖，但是大部分患者在接受胰岛移植治疗后仍然无法长时间的维持理想的血糖控制效果，且其为了对抗移植排斥反应所服用的免疫抑制剂本身也有相当的毒副作用。除此之外，胰岛移植的发展也严重受限于同种供体来源不足的问题，临床供受体比例现为2/1。虽然异种来源的供体胰岛细胞可以充足供应，但异种移植物移植入人体后相较于同种异体移植面临的免疫排斥反应更加剧烈，排斥机制也更加复杂。目前，异种移植的免疫排斥机制仍未完全明确，对同种异体移植有效的免疫抑制剂无法直接应用到异种移植，因此，开发新的异种移植免疫抑制剂方案，成为异种胰岛移植所需要解决的重要课题之一。

方法：我们使用STZ对C57BL/6小鼠诱发1型糖尿病，然后建立Lewis大鼠到1型糖尿病C57BL/6小鼠的异种胰岛移植模型。我们随后将模型鼠依照用药方案不同分为四组，分别为CONTROL（不用药），Lef组(来氟米特10mg/kg/d)，As组（As₂O₃,5mg/kg/d),以及Lef+As组（来氟米特,10mg/kg/d;As₂O₃,5mg/kg/d）。最后，我们将各组体内体外实验结果交叉比较，进而研究As₂O₃在异种胰岛移植模型中对移植物及受体免疫系统所产生的作用。

结果：As₂O₃单用组(As)中位生存期为13天，较对照组（CONTROL)8天延长5天。移植部位检测：As组CD4+T、CD8+T细胞水平，及IL-2、IL-4、IFN- γ 水平低于CONTROL组，Foxp3+及TGF- β 水平高于CONTROL组。淋巴结检测：As组CD4+T、CD8+T细胞比例低于CONTROL组，Foxp3+Treg比例高于CONTROL组。脾脏检测：CD4+T、CD8+T细胞比例低于CONTROL组，B细胞的绝对数量低于CONTROL组。血清检测：As组IL-2、IL-4、IFN- γ ，IgM、IgG2a水平低于CONTROL组。As₂O₃与来氟米特联合用药组（Lef+As)在本次实验中录得最好的生存期，中位生存期为29天，且在各项检测中Lef+As组IL-2、IFN- γ 、IgM、

IgG2a,IgG水平为各组最低, Foxp3⁺和TGF- β 水平为各组最高。数据间的差异均有统计学意义(P<0.05)

结论: As₂O₃通过降低移植术后细胞免疫水平, 提高Foxp3⁺调节性T细胞水平, 并降低血清中部分抗体水平来延长异种胰岛移植物的生存期。As₂O₃与来氟米特联合用药, 有协同用药效果。

关键词: 异种胰岛移植 免疫抑制剂 三氧化二砷

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Objective: Islet transplantation is one of the possible solutions to cure type 1 diabetes. Now clinical islet transplant's regimen which based on the Edmonton protocol has been a great success, Many patients with type 1 diabetes do not have daily injections of insulin. However, most patients still can not keep the normal blood sugar levels in long time after islet transplantation. And transplantation immunosuppressant also have toxic side effects. In addition, the development of islet transplantation is also seriously limited by the shortage of human donor. Although xenogeneic islet cells can achieve an adequate supply, compared with allograft, xenograft transplant immune rejection more intense, and exclusion mechanism more complex. now xenotransplantation immune rejection mechanisms are not yet fully clear. Allograft immunosuppressant can not be applied directly to xenotransplantation. Therefore, to develop new immunosuppressant for xenotransplantation, become an important issue to be solved.

METHODS: We used STZ in C57BL / 6 mice to induced type 1 diabetes. Then we establishment the islet xenograft model with LEWIS rats to C57BL/6 mice. Accordance with different regimen, the mice divided into four groups, namely "CONTROL" group (without medication), "Lef" group (leflunomide, 10mg/kg/d), "As" group (As₂O₃, 5mg/kg/d), and "Lef+As" group (LEF, 10mg/kg/d; As₂O₃, 5mg/kg/d). Finally, We analyze the vivo and vitro data for each group, in order to study the role of As₂O₃ in islet xenograft model.

Results: The median survival in the As group was 13 days, compared with the CONTROL group's 8 days, extension five days. Graft site: As group CD4+T, CD8+T cell levels, and IL-2, IL-4, IFN- γ levels lower than CONTROL group, Foxp3 + and TGF- β levels higher than CONTROL group. Lymph node: As group CD4+T, CD8 + T cell ratio lower than CONTROL group, Foxp3+Treg ratio is higher than CONTROL group. Spleen: CD4 + T, CD8 + T cell ratio lower than CONTROL group, the absolute number of B cells is less than CONTROL group. Sera: As group IL-2, IL-4, IFN- γ , IgM, IgG2a levels lower than CONTROL group. Lef+As group in this experiment were recorded best survival, The median survival is 29 days, Lef+As

group IL-2, IFN- γ , IgM, IgG2a, IgG have lowest level and Foxp3+and TGF- β levels was the highest in the experiment. the Differences data between the groups have statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion: As₂O₃ by reducing cell transplantation immunity, improve Foxp3 + regulatory T cells, and reduce serum part of antibody levels to prolong survival of islets graft. Arsenic trioxide combined with leflunomide have synergistic effect.

Keywords: islet xenotransplantation, Immunosuppressants, Arsenic trioxide

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘要	III
Abstract	V
第一章 前言	1
1.1 胰岛移植	2
1.2 异种移植	2
1.2.1 超急性排斥反应	3
1.2.2 迟发性异种移植排斥反应	4
1.2.3 细胞型排斥反应	4
1.2.4 慢性排斥反应	4
1.3 现有的临床免疫抑制剂方案	4
1.3.1 赛尼哌	4
1.3.2 FK506	5
1.3.3 雷帕霉素	5
1.4 来氟米特	5
1.4.1 来氟米特作用机制	6
1.5 三氧化二砷	7
1.6 研究目的, 意义与内容	8
第二章 材料与方	10
2.1 实验材料	10
2.1.1 实验动物	10
2.1.2 实验仪器	10
2.1.3 试剂	10
2.2 实验方法	12
2.2.1 大鼠胰岛的分离与纯化过程	12
2.2.2 胰岛DTZ染色	13
2.2.3 胰岛细胞活性检测	13
2.2.4 糖尿病小鼠模型建立	14
2.2.5 胰岛肾被膜下移植	14
2.2.6 用药方案	15
2.2.7 细胞免疫学研究方法	16

2.2.8 分子生物学研究方法	20
2.3 统计学分析.....	25
第三章 结果与讨论.....	26
3.1 胰岛移植用药组间生存期以及胰岛活性差异。	26
3.1.1 胰岛移植生存期	26
3.1.2 胰岛移植功能及活性	27
3.2 移植部位受到的免疫排斥水平检测.....	29
3.2.1 病理学检测.....	29
3.2.2 免疫因子检测	31
3.2.3 淋巴细胞浸润检测.....	31
3.3 脾脏与淋巴结的T淋巴细胞检测.....	33
3.3.1 淋巴细胞分型检测.....	33
3.3.2 血清中细胞因子及Th1 Th2细胞比例检测.....	34
3.4 不同用药组间调节性T细胞检测.....	36
3.4.1 Foxp3 ⁺ Treg细胞比例及相关免疫因子检测	36
3.5 B细胞及相关抗体检测.....	37
3.5.1 脾脏B细胞比例及绝对数量检测	37
3.5.2 血清抗体水平检测.....	38
第四章 结论与展望.....	39
4.1 结论.....	39
4.2 展望.....	39
附录	41
附录一: 图表索引	41
附录二: 缩略语及中英文对照	42
附录三: 攻读硕士期间发表和待发表的学术论文	45
参考文献	46
致谢	49

Table of Contents

Abstract	V
Chapter I Introduction	1
1.1 islet transplantation	2
1.2 xenotransplantation	2
1.2.1 hyperacute rejection	3
1.2.2 Delayed xenograft rejection	4
1.2.3 cellular rejection	4
1.2.4. Chronic rejection	4
1.3 clinical immunosuppressant plan	4
1.3.1 Zenapax	4
1.3.2 FK506	5
1.3.3 rapamycin	5
1.4 leflunomide	5
1.4.1 mechanism of leflunomide	6
1.5 Arsenic trioxide	7
1.6 Research purpose and meaning	8
Chapter II Materials and Methods	10
2.1 Experimental Materials	10
2.1.1 Laboratory Animal	10
2.1.2 Laboratory Instrument	10
2.1.3 Reagents	10
2.2 Methods	12
2.2.1 islet isolation and purification	12

2.2.2 DTZ transfer color	13
2.2.3 islet cell activity	13
2.2.4 Diabetic Mouse Model	14
2.2.5 islet transplantation	14
2.2.6 regimen	15
2.2.7 cellular immunology research Remedies	16
2.2.8 Methodology of Molecular Research	20
2.3 Statistical analysis	25
Chapter III Results and discussion	27
3.1 difference between survival and insulin activity	27
3.1.1 islet transplantation survival	27
3.1.2 islet function and activity	28
3.2 immune rejection.....	30
3.2.1 pathologic examination	30
3.2.2 Cytokines.....	32
3.2.3 lymphocytic infiltration detection	32
3.3 spleen and lymph node of T lymphocyte detection.....	34
3.3.1 lymphocytes genotyping	34
3.3.2 serum cytokines and Th1 Th2 cell ratio detection	35
3.4 Regulatory T Cells.....	37
3.4.1 Foxp3+Treg ratio and immune factors detection	37
3.5 B cell and antibody detection.....	38
3.5.1 B cells ratio and absolute number detection	38
3.5.2 serum antibody detection.....	39
Chapter IV Conclusions and Outlook	40

4.1 Conclusion	40
4.2 Outlook	40
Accessories	42
References	46

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

1型糖尿病（T1DM）也被称作胰岛素依赖型糖尿病或幼年型糖尿病，是一种由于自身免疫系统攻击分泌胰岛素的胰岛beta细胞，导致胰岛素绝对缺乏而使血液和尿液中的葡萄糖含量增多的一类糖尿病分型，经典的症状为多尿（尿频），烦渴（口渴），多食（饥饿）和体重减轻[1]。1型糖尿病病例数占糖尿病总病例数的比例为5%-10%。在全球范围内，一型糖尿病患者总数并无可靠资料，据估计，每年约有80,000儿童罹患该病，在美国，该病患者人数应为100万至300万人之间[2]。

目前，1型糖尿病病因尚不明确，可能的病因主要为：遗传易感性、糖尿病相关基因触发活化以及与外源性抗原的共同作用，1型糖尿病与其他糖尿病可以从2型自身抗体的检测加以区分，也可以通过C-肽测定法，测量内源性胰岛素分泌情况加以区分[3]。

由于该病导致内源性胰岛素的绝对缺乏，目前，对于该病，外源性胰岛素的无限期持续补充是必不可少的。通常情况下，患者可以通过一定的训练自行独立完成胰岛素注射进行血糖控制。但是，这本身也存在许多风险。胰岛素注射如果剂量不足可引起多种糖尿病并发症：急性并发症包括糖尿病酮症酸中毒和非酮症高渗性昏迷。较严重的长期并发症包括糖尿病心血管疾病，中风，肾衰竭，足溃疡及眼部损伤。胰岛素注射过量则可产生低血糖症状。

因为人工胰岛素在治疗一型糖尿病方面的无法完全模拟正常胰岛功能，因此以胰岛移植为首选的重建体内的胰岛素分泌能力及分泌模式的治疗方案在理论上是治愈1型糖尿病最理想的治疗方法[4]。虽然2000年后，胰岛移植取得了重大突破，但是胰岛移植目前临床所采用的治疗方案面临着供体不足及免疫排斥两大问题，现有免疫抑制方案的副作用也不容忽视[5, 6]。近年来，传统医药免疫抑制剂因为廉价，低毒的特点，其开发和应用成为热点。本章将对胰岛移植、移植免疫排斥以及目前临床免疫抑制剂应用现状进行回顾，并进一步引出研究目的。

1.1 胰岛移植

胰岛移植是指从供体胰腺中分离出胰岛细胞，并移植入受体体内的过程。是一种治疗1型糖尿病的方案。

胰岛移植的概念很早就被提出[7]。英国外科医生Charles Pybus于20世纪早期就已经试图通过移植胰腺组织的方法治疗糖尿病。1967年，Paul Lacy的研究小组采用了一种新型胶原酶成功的在胰腺中提取了胰岛细胞，为将来在体外和体内胰岛实验奠定基础[8]。随后的研究表明，胰岛移植可逆转啮齿动物和非人类灵长类动物的糖尿病[9, 10]。经胰岛提取方法和免疫抑制方案的持续改进，1990年在匹兹堡大学成功进行了第一例胰岛移植实验[11]。2000年，James Shapiro 改进了胰岛提取方法，并采用不含糖皮质激素的新型免疫抑制剂方案，使同种异体胰岛移植成功率大为提高，被称为Edmonton方案，采用该方案后，实验中全部7例患者均实现了无需注射胰岛素即可达到长期血糖稳定，并未发生严重低血糖(4.4~14.9月)[12]。该方案的成功引起了近年来胰岛移植研究的热潮。

但是相较于其他实体器官移植，胰岛移植目前面临更严重的供体短缺的问题。如果要恢复人体正常的胰岛素供应，一个患者需要移植大量胰岛（8000当量/kg体重），因此，胰岛移植的临床供受体比例为2-3:1[12]。而且，不同于肝、肾等器官可进行活体器官移植，胰岛移植供体目前只能取自尸体器官，这使移植供体供应进一步紧张。目前，改进胰岛移植胰岛分离方法，和寻找新的胰岛移植供体来源，成为胰岛移植研究领域的热点。

1.2 异种移植

异种移植是将一个物种活的器官，组织，细胞移植给另一个物种的方法。异种移植被医学关注的主要原因是临床移植器官数量面临严重短缺，约20-35%的需要器官移植的病人死于等待合适移植器官期间[13]。异种移植是一种针对这种情况的解决方案。来源于猪，或某些灵长类的异种器官大小，形态，功能与人类相近，且数量较多，如果寻找到合适的治疗方案使其长期在人类体内生

存，可以极大的解决临床供体器官短缺问题[14-16]。历史上现代意义上第一列异种移植发生在美国，1984年 Loma Linda大学医学中心将一个成年狒狒的心脏移植给一位左心室发育不全综合症的女婴，术后心脏功能正常，但21天后，女婴死亡，死后尸检显示女婴死于因ABO血型不符引起的体液型移植排斥反应[17]。

非人灵长类被认为是异种移植供体较好的选择，黑猩猩的器官与人类相近，且与人类有较好的血型兼容性，但黑猩猩目前被列为濒危动物，数量上无法满足需求，而一些小型灵长类虽然数量较为丰富，但其器官尺寸与人体差异较大，也不能满足需求，更为重要的是，非人灵长类与人亲缘关系极近，因此有可能引发疾病传播的危险[18]。猪目前被认为是器官移植供体的最佳候选。由于与人类亲缘关系更远，因此，跨种疾病传播的风险较低[19]。而且他们与人类共同生活了上万年，在生理上与人存在一定相似型，且它们容易获得与繁殖，器官大小也与人相似[20]。

但是异种移植面临比同种移植更严重的移植排斥反应，异种移植排斥反应导致供体器官在受体体内失去功能，目前尚没有文献宣称已克服这些免疫障碍，因此突破异种免疫屏障成为异种移植的首要课题。目前已发现的异种移植排斥反应共分为以下四种类型。

1.2.1 超急性排斥反应

超急性排斥反应发生于移植后数分钟或数小时内，是由异种反应性天然抗体(XNAs)与供体的内皮结合，从而介导活化人类补体系统，导致移植物血管内皮损伤，炎症，形成并最终导致移植物的坏死的一种异种移植排斥反应[20]。其中的XNAs是一种人体循环血液中的存量抗体，是由定植于肠道的细菌细胞壁半乳糖基部分刺激产生的。大部分抗体为IgM类抗体，还包括一部分IgG和IgA。这种XNAs的目标是 α 半乳糖基转移酶产生的 α -1,3Gal[21]。猪的细胞表面普遍表达 α -1,3Gal，但大部分灵长类不含有这种糖蛋白，因此，猪到人的异种移植会被XNAs识别并介导排斥。[19]

1.2.2 迟发性异种移植排斥反应

这种类型的排斥反应发生于非协调性异种移植2-3天时。这个过程较复杂，目前原因尚未完全明确。是由供体血管内皮细胞和受体体内抗体，巨噬细胞和血小板之间的相互作用而产生的。该反应的特征为血管内血栓形成，血管壁纤维素样坏死，及移植部大量巨噬细胞和NK细胞及少量的T细胞浸润[21]。

1.2.3 细胞型排斥反应

细胞型排斥反应同时发生于同种及异种移植中，但因为较多异种抗原被识别为外来物，预计异种移植细胞型排斥反应较同种移植要强[18]。其机制为受体免疫细胞直接或间接识别移植物上的MHC分子，从而活化诱导自然杀伤细胞和T淋巴细胞在异种移植物聚集，并对移植物产生损伤[22]。

1.2.4. 慢性排斥反应

异种移植慢性排斥反应是一种缓慢，渐进性的排斥反应，其作用方法目前尚不完全清楚，因为很少移植物可以抵抗前面几种急性排斥反应，因此研究进展缓慢。目前已知XNAs和补体系统并不起到主要作用[21]。慢性排斥反应的结果是移植物纤维化，血管粥样硬化，并逐渐失去其功能。原因可能是：持续性的免疫排斥反应，相关细胞因子刺激成纤维细胞生成，急性排斥反应导致后的创伤愈合等[22]。此外，异种移植慢性排斥反应预计比同种移植更剧烈[16]。

1.3 现有的临床免疫抑制剂方案

目前，临床胰岛移植采用埃德蒙顿方案所推荐的不含糖皮质激素的免疫抑制用药方案来抑制胰岛移植的免疫排斥问题。该免疫抑制方案包括以下几种药物：

1.3.1 赛尼哌

赛尼哌(Daclizumab)是一种人源化抗CD25单克隆抗体，在埃德蒙顿方案中作免疫抑制诱导剂；赛尼哌的主要作用是预防器官移植的急性免疫排斥反应。它特异性的激活T细胞上白介素2 (IL-2)的 α 亚单位 (Tac/CD25)，通过竞争性的与IL-2受体结合，从而拮抗该通路所介导的T淋巴细胞增殖，从而发挥免疫抑制作

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.