

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.19.002
文章编号: 1005-8982(2018)19-0007-05

自体胰岛细胞移植治疗大鼠全胰十二指肠 切除术后糖尿病的研究

郭栋¹, 刘全达², 刘国涛¹, 于永红¹, 叶进冬², 叶华虎³, 王启伟³

(1. 锦州医科大学火箭军总医院研究生培养基地, 辽宁 锦州 121001; 2. 中国人民解放军火箭军总医院 肝胆外科, 北京 100088; 3. 中国人民解放军军事医学科学院, 北京 100850)

摘要: **目的** 探讨全胰十二指肠切除术后大鼠血糖变化及自体胰岛细胞移植治疗术后糖尿病的可行性和有效性。**方法** 将SD大鼠随机分成对照组、手术组和实验组(手术+自体胰岛移植), 每组10只大鼠。对照组未做任何处理; 手术组和实验组均行全胰十二指肠切除术; 实验组全胰切除后分离、纯化自体胰岛细胞, 将胰岛细胞通过门静脉回植入肝脏。术后各组分别监测血糖、C肽、糖化血红蛋白, 以判断单纯手术后复制模型的有效性, 及实验组移植后的胰岛功能。**结果** 全胰切除后手术组第1天大鼠血糖即升高为(20.58±2.00) mmol/L; 手术组与对照组血糖比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 手术组血糖高于对照组; 实验组自体胰岛细胞移植后血糖与手术组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 实验组血糖下降。术后持续4个月监测血清糖化血红蛋白, 第4个月, 手术组与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 手术组升高; 实验组与手术组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 全胰十二指肠切除术是复制大鼠糖尿病模型的安全可靠途径; 自体胰岛细胞移植是治疗大鼠全胰切除术后糖尿病的有效方式。

关键词: 自体胰岛移植; 全胰十二指肠切除术; 糖尿病

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Autologous islet cell transplantation for rats with diabetes mellitus after total pancreaticoduodenectomy

Dong Guo¹, Quan-da Liu², Guo-tao Liu¹, Yong-hong Yu¹, Jin-dong Ye², Hua-hu Ye³, Qi-wei Wang³
(1. Graduate Training Base of General Hospital of the PLA Rocket Force, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of the PLA Rocket Force, Beijing 100088, China; 3. Military Academy of Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To explore the changes of blood glucose after total pancreaticoduodenectomy and the feasibility and effectiveness of autologous islet cell transplantation in the treatment of postoperative diabetes. **Methods** SD rats were randomly divided into a control group, an operation group and an experimental group (operation+autologous islet transplantation), each group had 10 rats. The rats of the control group did not have any treatment, while the rats of the operation group and the experimental group were treated with total pancreaticoduodenectomy. The pancreatic islet cells were isolated and purified from the pancreas after total pancreatectomy. The autologous islet cells were implanted into the liver through the portal vein. Blood glucose, C-peptide and glycosylated hemoglobin were monitored in each group to determine the islet function after transplantation. **Results** Blood glucose was significantly increased [(20.58 ± 2.00) mmol/L] on the 1st day after total pancreatectomy in the operation group compared with the control group ($P < 0.05$). After autologous islet

收稿日期: 2017-12-11

[通信作者] 刘全达, E-mail: liuquanda@sina.com

cell transplantation, the blood glucose of the experimental group decreased significantly compared to the simple operation group ($P < 0.05$). Detection of the serum levels of glycosylated hemoglobin 4 months after operation showed that compared with the control group, the serum glycosylated hemoglobin level of the operation group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). There was a significant difference in the serum level of glycosylated hemoglobin between the experimental group and the operation group ($P < 0.05$). **Conclusions** Total pancreaticoduodenectomy is a safe and reliable way to establish the rat diabetic model. Autologous islet cell transplantation is an effective way to treat rat diabetes after total pancreatectomy. This experiment provides experimental basis for clinical application.

Keywords: autologous islet transplantation; whole pancreaticoduodenectomy; diabetes mellitus

目前, 欧美部分医院利用全胰腺切除联合自体胰岛细胞移植治疗慢性胰腺炎已经非常成熟^[1-4], 在胰岛细胞移植的途径上通过门静脉移植普遍优于其他移植部位^[5-6]。而国内临床利用此手术方式治疗慢性胰腺炎的案例较少^[7]。本实验利用大鼠全胰十二指肠切除术复制糖尿病模型, 模拟临床自体胰岛细胞移植治疗大鼠糖尿病, 为其正式应用于临床提供实验研究基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

8 周龄 SD 雄性大鼠 30 只购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心(生产许可证号: SCXX-军)。实验室光照为 12 h 昼夜交替, 动物的饲养环境温度控制在 25 ~ 28℃, 相对湿度为 45% ~ 60%, 自由进水及摄食。

1.2 实验试剂和仪器

胶原酶 XI、平衡盐溶液、双硫脲 DTZ、Ficoll 400、RPMI 1640 培养基、台盼蓝(均购自美国 Sigma 公司), 血糖仪(瑞士罗氏公司), ELISA 试剂盒(天津德普 DPC 公司), 糖化血红蛋白仪(美国 Primus 公司), 超净台(美国 Sigma 公司), 低温离心机(美国 Sigma 公司), 显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 方 法

1.3.1 实验分组 将 8 周龄 SD 雄性大鼠随机分成对照组、手术组和实验组, 每组 10 只。对照组未作任何

手术及药物处理, 手术组行全胰十二指肠切除术, 实验组行全胰十二指肠切除联合自体胰岛细胞移植术。

1.3.2 模型复制 糖尿病大鼠模型复制方式借鉴 LEE 氏法^[8-11], 选取 8 周龄 SD 雄性大鼠, 禁食水 24 h。10% 的水合氯醛 8 ml 行腹腔注射麻醉并备皮, 固定大鼠后 75% 酒精腹部消毒。大鼠腹部正中约 10 cm 切口, 探查胰腺被胃十二指肠、横结肠及脾脏包绕, 眼科镊提起胃脾及横结肠, 离断周围韧带充分游离胰腺及周围脏器。分离胰腺组织与横结肠系膜直至暴露门静脉及脾静脉根部, 分离胰腺组织与门静脉黏合部, 结扎胰十二指肠动静脉及脾静脉。按缺血线离断十二指肠(见图 1)。远端十二指肠做荷包缝合进行闭合, 于近端空肠做侧面切口为吻合口。丝线肠道间断缝合做肠道吻合。于吻合口远端 1 cm 处做小切口, 将提前放置胆道的硅胶管放入十二指肠做胆肠吻合, 用 7-0 丝线将胆道周围结缔组织与十二指肠浆膜缝合。

1.3.3 胰岛分离纯化 将胰腺完整从标本剪下(所有过程均在冰上操作, 降低胰腺组织新陈代谢), 平衡盐溶液清洗后加入青霉素、胎牛血清及 1640 培养基, 无菌眼科剪尽可能剪碎胰腺。将灌洗好的胰腺碎片组织加入 2 ml 浓度为 1 mg/ml 胶原酶 XI, 放置在 38℃ 的水浴中消化 25 min, 肉眼下未见到成块的胰腺组织, 加入 4℃ 的平衡盐溶液终止消化^[12-13]。离心机 4℃ 下 1 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液, 洗涤 2 次后 1 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液。纯化采用传统的密度梯度离心法^[14-17], 将 4 ml 浓度为 25% 的



A 胰腺全切除后



B 肠道吻合前及放置的胆道支撑管

图 1 全胰十二指肠切除

Ficoll 400 溶液 (25 g Ficoll 400 加入 100 ml 平衡盐溶液) 与沉淀组织进行混匀, 然后逐层加入 2 ml 浓度为 23.0%、20.5%、11.0% 的 Ficoll 400, 以 2 000 r/min 速度离心 15 min, 离心结束后取 20.5% ~ 23.0% 及 20.5% ~ 11.0% 颗粒介质为纯化的胰岛。加入青霉素、胎牛血清及 1640 培养基 0.5 ml 混悬胰岛。

1.3.4 胰岛计数 以双硫脲对胰岛细胞进行特异性染色, 显微镜下胰岛细胞染成猩红色, 非胰岛细胞不着色, 胰岛细胞直径 >150 μm 为 1 个胰岛当量 (islet equivalent quantity, IEQ)^[18]。胰岛细胞纯度 (%) = (双硫脲染色阳性细胞数 / 细胞总数) × 100%^[19]。

1.3.5 胰岛回输 用 1 ml 注射器抽取纯化好的胰岛细胞混悬液, 以 3 ml/min 匀速注入大鼠肠系膜上静脉中, 使最终定植入肝脏, 注射完毕后棉签按压穿刺点 5 min。

1.3.6 血糖、C 肽、糖化血红蛋白监测 术后大鼠随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 出现多饮、多尿、多食、体重下降等糖尿病症状即模型复制成功^[20-21]。术后各组血糖连续监测 15 d, 实验组每周监测 2 次, 连续 4 个月。术后各组糖化血红蛋白连续监测 4 个月 (每个月监测 1 次)。实验组在术后 15 d 进行高糖刺激, 分别监测刺激前、后的血糖和 C 肽变化。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组多时间比较采用重

复测量设计的方差分析, 组间比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

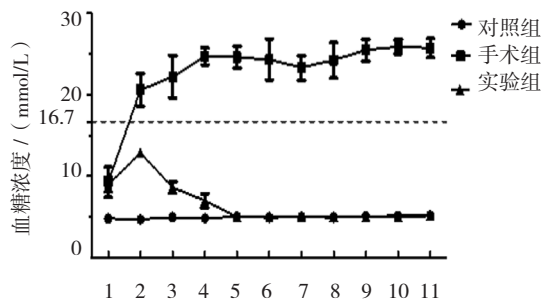
2.1 糖尿病模型的可靠性

3 组大鼠术后 6 h~15 d 的血糖变化比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的血糖有差异 ($F = 8.650, P = 0.000$); ②3 组的血糖有差异 ($F = 125.995, P = 0.000$), 实验组和对照组血糖浓度较手术组低, 实验组胰岛移植后血糖控制较好; ③3 组的血糖变化趋势有差异 ($F = 1119.277, P = 0.000$)。进一步两两比较经 LSD-t 检验, 实验组大鼠血糖浓度与手术组大鼠血糖浓度差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而与空白组大鼠血糖比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

对手术组的大鼠血糖进行监测, 第 5 天手术组大鼠血糖 (24.30 ± 2.51) mmol/L 与对照组大鼠血糖 (4.94 ± 0.39) mmol/L 比较, 差异有统计学意义 ($t = -17.008, P = 0.000$)。第 10 天手术组大鼠血糖 (25.48 ± 1.37) mmol/L 与对照组大鼠血糖 (5.10 ± 0.29) mmol/L 比较, 差异有统计学意义 ($t = -32.370, P = 0.000$)。从连续的血糖监测发现, 大鼠的血糖水平保持持续高值状态 (见图 2), 且在术后日常观察中发现大鼠有饮水量、尿量明显增多等症状。因此, 本研究通过全胰十二指肠切除术复制大鼠糖尿病模型成功。

表 1 3 组大鼠不同时间点的血糖浓度比较 ($n = 10, \text{mmol/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	术后 6 h	术后 1 d	术后 2 d	术后 3 d	术后 4 d	术后 5 d	术后 6 d	术后 7 d	术后 10 d	术后 13 d	术后 15 d
对照组	4.81 ± 0.37	4.72 ± 0.34	4.96 ± 0.46	4.84 ± 0.30	5.06 ± 0.45	4.94 ± 0.39	5.02 ± 0.33	4.94 ± 0.42	5.10 ± 0.29	5.14 ± 0.19	5.18 ± 0.37
手术组	9.28 ± 1.87	20.58 ± 2.00	22.20 ± 2.60	24.70 ± 1.04	24.60 ± 1.35	24.30 ± 2.51	23.22 ± 1.51	24.24 ± 2.19	25.48 ± 1.37	25.88 ± 0.86	25.72 ± 1.18
实验组	8.95 ± 0.88	12.85 ± 0.57	8.62 ± 0.69	7.01 ± 0.85	4.98 ± 0.44	5.11 ± 0.23	5.11 ± 0.21	5.04 ± 0.24	5.03 ± 0.26	5.06 ± 0.34	5.14 ± 0.30



1: 6 h; 2: 1 d; 3: 2 d; 4: 3 d; 5: 4 d; 6: 5 d; 7: 6 d; 8: 7 d; 9: 10 d; 10: 13 d; 11: 15 d

图 2 术后血糖变化趋势比较

2.2 自体胰岛细胞移植后的血糖变化

自体胰岛细胞移植术后第 1 天, 实验组与手术组血糖水平比较, 差异有统计学意义 ($t = 8.154, P = 0.000$), 实验组下降 (见图 2); 实验组大鼠随机血糖浓度 <11 mmol/L 可持续至术后 4 个月。

3 组大鼠术后 4 个月的血清糖化血红蛋白比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的血清糖化血红蛋白有差异 ($F = 4.857, P = 0.025$); ②3 组的血清糖化血红蛋白有差异 ($F = 7.858, P = 0.000$), 实验组和对照组血糖浓度较手术组低, 实验

组胰岛移植后血糖控制较好；③ 3 组血清糖化血红蛋白变化趋势有差异 ($F = 2287.632$, $P = 0.000$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 实验组大鼠血糖浓度与手术组大鼠血糖浓度差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而与空白组大鼠血糖比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

持续 4 个月监测 3 组大鼠血清糖化血红蛋白, 第 4 个月手术组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 手术组升高; 实验组血清糖化血红蛋白水平维持在 (5.28 ± 0.19)%, 与对照组血清糖化血红蛋白水平 (5.23 ± 0.28)% 比较, 差异无统计学意义 ($t = -1.114$, $P = 0.298$), 而与手术组血清糖化血红蛋白 (14.70 ± 1.01)% 比较, 差异有统计学意义 ($t = -20.978$, $P = 0.000$)。见图 3。

表 2 3 组大鼠不同时间点的血清糖化血红蛋白比较
($n=10$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	术后 1 个月	术后 2 个月	术后 3 个月	术后 4 个月
对照组	5.10 ± 0.30	5.22 ± 0.56	4.98 ± 0.63	5.23 ± 0.28
手术组	12.96 ± 1.65	13.20 ± 2.56	13.54 ± 3.75	14.07 ± 4.10
实验组	5.24 ± 0.43	5.01 ± 0.51	5.30 ± 0.11	5.28 ± 0.19

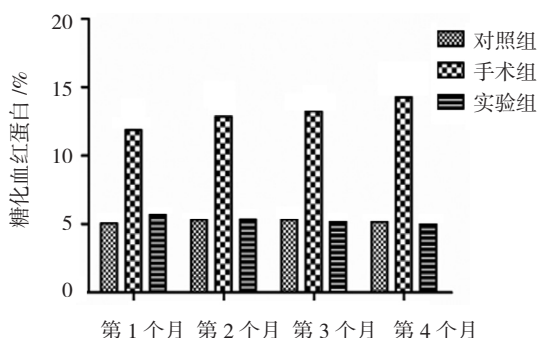
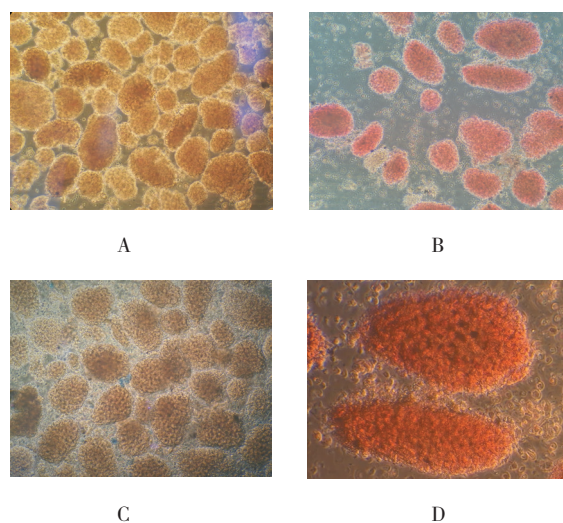


图 3 术后糖化血红蛋白水平比较

2.3 自体胰岛细胞的活性

分离纯化后的胰岛细胞呈类圆形 (见图 4A); 双硫脲染色后胰岛细胞呈猩红色 (见图 4B); 台盼蓝染色后胰岛细胞未着色, 胰岛细胞团结构完整 (见图 4C、D); 胰岛细胞纯度 $>95\%$ 。

全胰十二指肠切除联合自体胰岛细胞移植术后 15 d, 对实验组大鼠进行高糖刺激, 刺激后大鼠血糖水平 (实验前 5.28 ± 0.30 mmol/L、实验后 10 min 7.74 ± 0.65 mmol/L) 未出现明显波动; 刺激后血清 C 肽水平 (实验前 0.23 ± 0.02 ng/ml、实验后 10 min 0.71 ± 0.07 ng/ml) 成倍升高。



A: 纯化的胰岛; B: 双硫脲染色后的胰岛; C: 台盼蓝染色后的胰岛; D: 20 倍镜下单个胰岛

图 4 各状态下的胰岛

3 讨论

自 1977 年明尼苏达大学医学院首用全胰切除联合自体胰岛细胞移植术以来, 国外多数医院已成功地将此技术应用于临床^[22-24]。而国内临床自体胰岛细胞移植术的应用报道不足, 某些疾病如慢性胰腺炎手术切除全胰腺后导致糖尿病治疗基本依赖皮下注射胰岛素^[25]。自体胰岛细胞移植术后可以更加精确地控制血糖, 不仅可以有效降低血糖, 而且可以较长时间稳定的控制血糖, 防止因血糖的不稳定性导致术后并发症的发生, 对提高慢性胰腺炎等疾病患者术后的生活质量有显著效果^[26-27]。

本研究结果表明, 大鼠全胰十二指肠切除术后, 血糖在术后第 1 天即出现明显升高, 并且在持续 15 d 的血糖监测中均表现出高血糖状态, 同时伴有多饮、多尿等糖尿病症状, 表明全胰十二指肠切除术复制糖尿病模型安全可靠。目前国内外对手术切除全胰腺复制大鼠糖尿病模型描述较少, 本次实验为复制大鼠糖尿病模型提供新方法, 同时为自体胰岛细胞移植的长期大量研究提供实验基础。

自体胰岛细胞移植术后实验组大鼠血糖与手术组大鼠血糖相比下降明显, 并且维持正常稳定状态持续 4 个月, 表明移植后胰岛功能良好。术后出现的短暂血糖升高, 考虑移植的自体胰岛处于功能恢复期, 胰岛移植 2 ~ 3 d 后血糖逐步平稳。自体胰岛移植术后, 实验组的糖化血红蛋白与对照组差异无统计学意义, 表明自体胰岛移植后血糖控制良好。术后 15 d 对

实验组大鼠进行静脉高糖刺激, 发现刺激后 10 min 检测的血清 C 肽较刺激前成倍增长, 说明自体胰岛移植后胰岛细胞的活性良好。胰岛细胞移植入肝脏后依然持续稳定发挥功能, 与解剖关系、血供、胚胎学有较大关联。解剖学上, 胰腺组织与肝脏门静脉毗邻密切, 胰岛 β 细胞可以通过毗邻的门静脉系统可以及时密切监测并控制血糖, 因此经门静脉移植入肝脏后, 同样可以密切监测血糖变化。血供方面, 由于胰腺胰岛属于高耗氧组织, 而植入门静脉系统后也同样可以汲取门静脉血液中的氧分子。胚胎学方面, 自体胰岛细胞虽然没有排斥反应的发生, 但是细胞环境的变化也会给细胞生存带来或多或少的影响, 而从本研究监测大鼠血糖及糖化血红蛋白的结果, 甚至术后一定时间进行的高糖刺激分析, 自体胰岛细胞功能较为稳定且持久, 可能和肝脏、胰腺在胚胎期同源源于内胚层有一定的关联。

全胰十二指肠切除后自体胰岛细胞移植术治疗大鼠糖尿病效果较好, 但本实验使用样本数量较少, 其结论仍需大量样本加以论证。

参 考 文 献:

- [1] KESSELI S J, SMITH K A, GARDNER T B. Total pancreatectomy with islet autologous transplantation: the cure for chronic pancreatitis[J]. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 2015, 6(73): 1-8.
- [2] SRINATH C, MELENA D B, SARAH J S. Total pancreatectomy and islet autotransplantation in children for chronic pancreatitis[J]. *Annals of Surgery*, 2014, 260: 56-64.
- [3] FAZLALIZADEH R, MOGHADAMYEGHANEH Z, DEMIRJIAN A N, et al. Total pancreatectomy and islet autotransplantation: A decade nationwide analysis[J]. *World J Transplant*, 2016, 6(1): 233-238.
- [4] MICHIIHIRO M, TAKASHI K, NAOTAKE A. A review of autologous islet transplantation[J]. *Cell Medicine*, 2013, 5: 59-62.
- [5] YIN Z Z, WANG S S. Gastric submucosa is inferior to the liver as transplant site for autologous islet transplantation in pancreatectomized diabetic beagles[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol*, 2016, 36(4): 529-533.
- [6] W J J, BELLIN, TB D. Proposed thresholds for pancreatic tissue-volume for safe intraportal islet-autotransplantation after total-pancreatectomy[J]. *Am J Transplant*, 2013, 13(12): 3183-3191.
- [7] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 慢性胰腺炎诊治指南 2014[J]. *中华实用外科杂志*, 2015, 3(35): 277-282.
- [8] SUN L, KENNETH S. TUNG K. Pancreaticoduodenal transplantation in rat[J]. *Transplantation*, 1972, 13(4): 421-425.
- [9] MA Y, GUO Z.Y. Use of surgical techniques in the rat pancreas transplantation model[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008, 7(2): 156-160.
- [10] 王杰, 顾永平. 大鼠胰十二指肠移植动物模型的显微外科技术改进[J]. *东南大学学报(医学版)*. 2002, 2(21): 153-154.
- [11] ZHONG R, GRANT D. Refined technique for intestinal transplantation in the rat[J]. *Microsurgery*, 1991, 12: 268-274.
- [12] MANI. Rodents islets isolation[J]. *Last Revised*, 2009, 9(17): 1-5.
- [13] MARZORATI S, RAMIREZ-DOMINGUEZ M. Mouse islet isolation[J]. *Dordrecht Springer*, 2015, 2(21): 83-107.
- [14] MIRIAM R D. Isolation of mouse pancreatic islets of langerhans[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, 4(11): 25-33.
- [15] LI D, YUAN Y, TU H. A protocol for islet isolation from mouse pancreas[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(11): 49-52.
- [16] GOTOH M, MAKI T, KIYOZUMI T. An improved method for isolation of mouse pancreatic islets[J]. *Transplantation*, 1985, 40(4): 437-439.
- [17] COLLEEN B K, LIBBY A B, JOHN A. C. Isolation of islets of langerhans from rodent pancreas[J]. *Endocrinology*, 2001, 1(38): 5301-5307.
- [18] LEMBERT N, WESCHE J, PETERSEN P. Areal density measurement is a convenient method for the determination of porcine islet equivalents without counting and sizing individual islets[J]. *Cell Transplant*, 2003, 12(1): 33-41.
- [19] 刘定志, 罗诗樵, 杜成友, 等. 移植部位对移植胰岛长期存活的影响力[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2012, 32(3): 257-261.
- [20] 张巨彪, 苏秀兰, 欧阳晓辉. 1 型糖尿病模型的建立及观察. 医学综述, 2013, 2(12): 1-4.
- [21] 常利民, 董佳生, 徐华. SD 大鼠 1 型糖尿病动物模型建立[J]. *山西医药杂志*, 2009, 6(3): 5-7.
- [22] MELENA D. B. Total pancreatectomy with islet autotransplantation (tpiat): summary of an niddk workshop[J]. *Pancreas*, 2014, 43(8): 1163-1171.
- [23] PIOTR W, OMID S, JEFFREY B. Islet autotransplantation and total pancreatectomy[J]. *Adv Surg*, 2014, 3(48): 223-233.
- [24] NEIL H. B, LAURA M. E, JENNIFER L. M. Morbidity of total pancreatectomy with islet cell auto-transplantation compared to total pancreatectomy alone[J]. *HPB*, 2014, 3(16), 522-527.
- [25] ZHAO X, CUI N, WANG X. Surgical strategies in the treatment of chronic pancreatitis: An updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(9): 622-628..
- [26] JANOT M S, BELYAEV O, KERSTING S, et al. Indications and early outcomes for total pancreatectomy at a high-volume pancreas centre[J]. *HPB Surg*, 2010, 686-702.
- [27] MICHAL R, AMER H Z. Total pancreatectomy and islet cell autotransplantation: outcomes, controversies and new techniques[J]. *J Pancreas (Online)*, 2015, 16(1): 1-10.

(张蕾 编辑)