

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.06.001  
文章编号: 1005-8982(2020)06-0001-08

基础研究·论著

## 胰腺干细胞和胰岛细胞在糖尿病大鼠治疗中的疗效观察\*

刘智伟<sup>1</sup>, 张冲<sup>2</sup>, 王进<sup>2</sup>, 吕伟<sup>2</sup>, 周丁华<sup>2</sup>

(1. 锦州医科大学 火箭军特色医学中心研究生培养基地, 辽宁 锦州 121001; 2. 中国人民解放军火箭军特色医学中心 肝胆外科, 北京 100088)

**摘要:** **目的** 探讨大鼠胰腺干细胞与胰岛细胞移植在大鼠糖尿病治疗中的疗效。**方法** 通过链脲菌素复制1型糖尿病大鼠模型并随机分为胰岛细胞组和胰腺干细胞组。用胶原酶V分别消化新生和成年大鼠胰腺, Percoll梯度离心分离胰岛细胞和胰腺干细胞。采用Bonner-Weir法诱导胰腺干细胞分化, DTZ染色检测移植植物纯度, AO/PI检测移植植物活性。分别记录手术前后大鼠血糖水平、胰岛素水平及移植植物存活时间; 高糖刺激实验和腹腔糖耐量评价移植植物功能; 取各组大鼠移植部位标本行HE染色和免疫组织化学染色, 观察组织形态学变化。**结果** 胰岛细胞组和胰腺干细胞组血糖分别在术后3和5d恢复正常( $P < 0.05$ ), 两组大鼠术后不同时间点的血糖有差异( $P < 0.05$ ), 胰腺干细胞组的降糖能力强于胰岛细胞组( $P < 0.05$ )。两组大鼠移植后7d血清胰岛素水平均较术前升高( $P < 0.05$ )。高糖刺激实验表明, 各组移植后15和65d高糖刺激后的C肽水平较刺激前升高( $P < 0.05$ ), 胰岛细胞组移植后65d高糖刺激后C肽水平低于胰腺干细胞组( $P < 0.05$ ), 胰岛素和C肽水平监测结果表明胰腺干细胞组移植植物胰岛素分泌维持时间长于胰岛细胞组。移植后腹腔糖耐量实验结果表明移植植物均功能良好。胰岛细胞组和胰腺干细胞组移植物的中位存活时间分别为73和88d, Kaplan-Meier曲线分析提示胰腺干细胞组移植植物生存时间较胰岛细胞组延长( $P < 0.05$ )。HE染色提示肝脏门静脉移植区域可见新生血管包绕的胰岛细胞团, 免疫组织化学染色证实细胞团胰岛素阳性。**结论** 胰腺干细胞分化后经门静脉移植能安全有效地发挥降糖作用, 疗效优于胰岛细胞移植。

**关键词:** 胰腺干细胞; 胰岛细胞; 移植; 糖尿病; 疗效比较研究

**中图分类号:** R617

**文献标识码:** A

## Therapeutic effect of pancreatic stem cells and islet cells in the treatment of diabetic rats\*

Zhi-wei Liu<sup>1</sup>, Chong Zhang<sup>2</sup>, Jin Wang<sup>2</sup>, Wei Lü<sup>2</sup>, Ding-hua Zhou<sup>2</sup>

(1. Postgraduate Training Base of PLA Rocket Force Characteristic Medical Center, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, PLA Rocket Force Characteristic Medical Center, Beijing 100088, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the efficacy of pancreatic stem cell and islet cell transplantation in the treatment of diabetes mellitus in rats. **Methods** The rat model of type 1 diabetes was induced by streptozotocin and randomly divided into islet cell and pancreatic stem cell groups. The pancreas of neonatal and adult rats were digested by collagenase V, and pancreatic cells and pancreatic stem cells were isolated by Percoll gradient centrifugation. The differentiation of

收稿日期: 2019-09-23

\*基金项目: 军队后勤科研项目重点项目(No: BWS11C056)

[通信作者]周丁华, E-mail: zhoudh@sina.com; Tel: 18910883003

pancreatic stem cells was induced by Bonner-Weir method. Dithizone detects graft purity and AO/PI detects graft activity. The blood glucose, insulin concentration and graft survival time of rats preoperative and postoperative were recorded; high glucose stimulation test and intraperitoneal glucose tolerance test evaluation of graft function; HE staining and insulin immunohistochemical staining were performed on the transplanted sites of rats in each group to observe the changes of histomorphology. **Results** Blood glucose in islet cell group and pancreatic stem cell group returned to normal 3 and 5 days after operation, respectively ( $P < 0.05$ ). The blood glucose of the two groups was different at different time points after operation. The hypoglycemic ability of the pancreatic stem cell group was better than that of the islet cell group ( $P < 0.05$ ). At 7 days after transplantation, the serum insulin levels of the two groups were higher than those before operation ( $P < 0.05$ ), suggesting that the insulin secretion function of the graft was good. The results of high glucose stimulation test showed that the level of C peptide was significantly higher in each group after 15 and 65 days postoperatively than before ( $P < 0.05$ ) and the level of C peptide was lower after 65 days postoperatively than that of pancreatic stem cells group ( $P < 0.05$ ). The results of insulin and C-peptide index monitoring showed that the insulin secretion capacity of the pancreatic stem cell group was better than that of the islet cell group. The results of intraperitoneal glucose tolerance test in rats after transplantation showed that the graft function of both groups was good. The median survival time was 73 days in the islet cell group grafts and 88 days in the pancreatic stem cell group grafts. Kaplan-Meier curve analysis showed that the survival time of the pancreatic stem cells was longer than that of the islet cell group ( $P < 0.05$ ). HE staining showed pancreatic islet cell mass surrounded by neovascularization in the portal tracts of the liver, and immunohistochemical staining showed positive insulin in the cell mass. **Conclusions** After differentiation of pancreatic stem cells, portal vein transplantation can safely and effectively reduce blood glucose and its efficacy is superior to that of islet cell transplantation.

**Keywords:** pancreatic stem cells; islet cells; transplantation; diabetes mellitus; comparative study

1 型糖尿病 (type-1 diabetes mellitus, T1DM) 是机体接触病毒、药物及化学物质后由淋巴细胞介导的自身免疫性疾病。临床以免疫性胰岛炎、胰岛  $\beta$  细胞永久损伤、胰岛素绝对缺乏和糖代谢失调为特点<sup>[1]</sup>。有统计显示,我国 <14 岁儿童 T1DM 年均发病例数从 0.51/10 万跃升至 1.93/10 万<sup>[2]</sup>。1/3 患者治疗不理想,严重低血糖、糖尿病酮症酸中毒及糖尿病肾病等并发症发病率升高。注射外源性胰岛素是 T1DM 基本治疗方法,但不能模拟正常的胰岛素分泌方式。胰岛细胞移植作为胰岛  $\beta$  细胞替代疗法,可在体内释放胰岛素降低血糖,但临床应用存在供体短缺、免疫排斥及移植存活时间短等问题<sup>[3]</sup>。因此, T1DM 需要一种长期、稳定且安全的治疗方法。干细胞作为一类特殊细胞,在体内具有增殖、分化和自我更新的潜能。最新研究指出,胰腺干细胞可在体外诱导分化为胰岛  $\beta$  细胞,并且能够形成分泌胰岛素的类胰岛细胞团<sup>[4]</sup>。本研究将体外培养分化的胰腺干细胞与胰岛细胞移植在糖尿病大鼠的门静脉内,以探讨胰腺干细胞的降糖疗效与应用价值,为临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验组:8 周龄清洁级 SD 大鼠 60 只,体重 300 ~ 400 g,雌雄不限;供体组:新生 SD 大鼠 92 只(3 ~ 4 d),

成年 SD 大鼠 63 只(8 ~ 10 周)均购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2016-0002。12 h 昼/夜循环照明,饲养温度 20 ~ 26℃,相对湿度 40% ~ 65%,自由进水、摄食。

### 1.2 实验试剂和仪器

链脲菌素 (Streptozotocin, STZ)、胶原酶 V、D-Hank's、RPMI 1640、DMEM/F12 及胰岛素-转铁蛋白-硒均购自美国 Sigma 公司, Percoll 分离液购自美国 GE Healthcare 公司,他克莫司购自日本 Fujisawa 株式会社,超净工作台、离心机购自美国 Sigma 公司,显微镜购自日本 Olympus 株式会社,血糖仪及试纸购自瑞士罗氏公司,手术器械购自上海医疗器械有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 糖尿病大鼠模型的复制及分组** 实验组大鼠禁食 24 h 后,采用 1% STZ 溶液 (60 mg/kg) 腹腔注射复制 T1DM 模型。模型复制成功标准:非禁食状态下大鼠尾静脉血糖  $\geq 16.7$  mmol/L,维持 2 d 并出现多饮、多食、多尿和体重降低等症状<sup>[5]</sup>。将模型鼠随机分为胰岛细胞组和胰腺干细胞组,每组 30 只。

**1.3.2 胰腺干细胞分离与鉴定** 采用 20% 乌拉坦 (5 ml/kg) 腹腔注射麻醉供体组大鼠,胶原酶 V 逆行灌注消化大鼠胰腺,收集细胞悬液置于不同密度的 Percoll 梯度离心管,1 500 r/min 离心 20 min,收

集 1.096/1.068 界面细胞并加入到含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养瓶中, 37℃、5% 二氧化碳 CO<sub>2</sub> 条件下培养, 胰腺干细胞分离完成<sup>[6]</sup>。培养 7 d 后, 改用含 10% 胎牛血清, 20 ng/ml 表皮生长因子, 20 ng/ml 碱性成纤维生长因子, 1 mmol/L 丙酮酸钠, 71.5 μmol/L β-巯基乙醇, 10 mmol/L HEPES, 0.1 g/L 链霉素及 100 u/ml 青霉素的 RPMI 1640 培养基进行细胞扩增<sup>[7]</sup>。使用免疫荧光法检测胰腺干细胞 CK19 蛋白的表达。

**1.3.3 胰腺干细胞诱导分化** 将扩增的胰腺干细胞换用含 2 g/L 牛血清白蛋白, 10 μg/L 肝细胞生长因子, 10 mmol/L 尼克酰胺, 8 mmol/L 葡萄糖, 1 g/L 胰岛素-转铁蛋白-硒, 0.1 g/L 链霉素及 100 u/ml 青霉素的无血清 DMEM/F12 培养液进行诱导分化<sup>[8]</sup>。4 周后在倒置显微镜下采用血球计数板计数类胰岛细胞团, 细胞直径 > 150 μm 为 1 个胰岛当量 (IEQ), DTZ 染色后计算类胰岛细胞纯度, 类胰岛细胞纯度 = DTZ 阳性细胞数 / 细胞总数 × 100%; AO/PI 染色计算类胰岛细胞存活率, 类胰岛细胞存活率 = AO 阳性细胞数 / 细胞总数 × 100%。

**1.3.4 胰岛细胞分离与纯化** 参照胰腺干细胞分离方法收集供体组成成年大鼠胰腺细胞悬液, 随后置于 Percoll 梯度离心管, 收集 1.118/1.096 界面细胞<sup>[6]</sup>。将细胞移入 RPMI 1640 培养瓶, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 计算每只供体可获取的胰岛细胞 Q、胰岛细胞纯度及胰岛细胞存活率。

**1.3.5 移植** 实验组大鼠麻醉成功后, 取腹部正中切口, 分离胃结肠韧带, 暴露门静脉, 用 1 ml 注射器针头穿刺门静脉分支处, 胰岛细胞组缓慢推注胰岛细胞 800 IEQ, 胰腺干细胞组推注等量类胰岛细胞 (见图 1)。移植后, 轻压穿刺点至无出血、渗出后逐层关闭腹腔。两组大鼠术后 3 d 肌内注射青霉素钠 (0.12 g/ml) 抗感染治疗; 腹腔注射他克莫司 1 mg/(kg·d)<sup>[9]</sup>。各组大鼠术后自由进食进水。



图 1 移植物经门静脉移植

## 1.4 观察指标

**1.4.1 体外胰岛素** 倒置显微镜下挑选类胰岛细胞团和胰岛细胞团, 并分别接种于 6 孔板, 每孔 100 IEQ, 每孔含 5.5 mmol/L 葡萄糖的无血清 RPMI 1640 培养液 (基础相), 37℃ 孵育 2 h; 换用含 25 mmol/L 葡萄糖的无血清 RPMI 1640 培养液 (高糖相), 37℃ 孵育 2 h, 收集培养液上清用放射免疫法测定胰岛素水平, 每孔重复 5 次。

**1.4.2 血糖和胰岛素水平** 术前 3 d 及术后 1 周每天监测两组大鼠血糖水平; 术后 2 ~ 13 周监测随机血糖, 3 d/次。移植物功能正常标准: 连续 2 d 非空腹血糖 < 11.10 mmol/L; 移植物功能失活标准: 随机血糖 > 16.70 mmol/L, 记录失活时间<sup>[10]</sup>。术前 1 d 及术后每 7 天检测血胰岛素水平。

**1.4.3 高糖刺激实验** 术后 15 和 65 d 高糖刺激实验检测大鼠刺激前后血清 C 肽水平, 两组大鼠禁食 14 h 后, 尾静脉取血, 采用放射免疫法测定刺激前血清 C 肽水平; 两组大鼠 50% 葡萄糖溶液 (10 ml/kg) 灌胃, 10 min 后复测血清 C 肽水平。

**1.4.4 腹腔葡萄糖耐量功能** 术后 19 d 行腹腔葡萄糖耐量实验。两组大鼠禁食 14 h 后, 每只大鼠腹腔注射 50% 葡萄糖溶液 4 ml/kg, 测定注射后 0、5、10、15、30、45、60、90 及 120 min 血糖。

**1.4.5 组织病理学** 两组术后 58 d 各随机处死 1 只大鼠, 取肝脏组织行 HE 和免疫组织化学染色, 观察标本组织形态和移植物活性。

## 1.5 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, 比较用 *t* 检验或重复测量设计的方差分析; Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 比较用 Log-rank  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 实验动物情况

胰腺干细胞组 1 只大鼠于术后 17 d 死亡, 胰岛细胞组 3 只大鼠分别于术后 15、53 及 61 d 死亡, 两组术后 58 d 各随机处死 1 只大鼠行病理学观察。最终, 胰腺干细胞组和胰岛细胞组分别有 28 和 26 只大鼠纳入本实验。

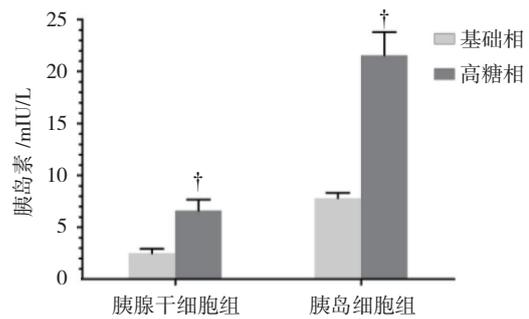
### 2.2 两组胰岛素释放水平比较

胰岛细胞组基础相胰岛素为 (7.79 ± 0.52) mIU/L,

高糖相为  $(21.54 \pm 2.25)$  mIU/L, 经配对  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 34.778, P = 0.000$ )。胰腺干细胞组诱导分化形成的类胰岛细胞基础相胰岛素为  $(2.49 \pm 0.42)$  mIU/L, 高糖相为  $(6.61 \pm 1.06)$  mIU/L, 经配对  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 24.967, P = 0.000$ ), 表明移植物均有分泌胰岛素的功能。见图 2。

### 2.3 移植物计数、纯度及活性

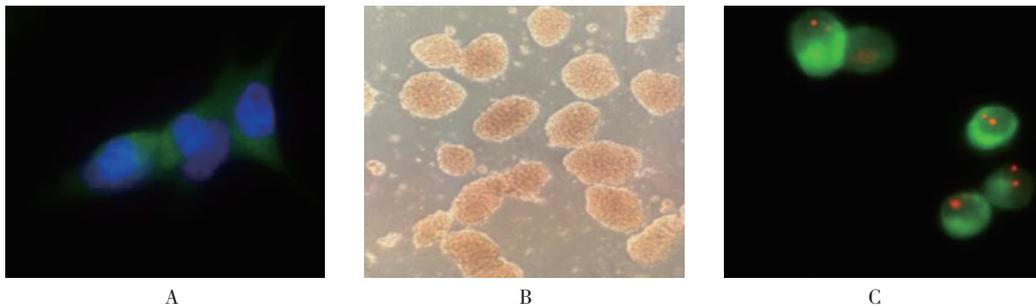
免疫荧光染色结果显示, 胰腺干细胞呈长梭形, 细胞膜表面 CK-19 蛋白染色阳性, 阳性率为  $(89.27 \pm 3.86)\%$  (见图 3A)。类胰岛细胞经 DTZ 染色后呈猩红色, 非胰岛细胞不显色 (见图 3B)。AO/PI 染色后经荧光显微镜观察, 正常细胞呈绿色荧光, 凋亡或坏死细胞呈红色或强红色荧光 (见图 3C)。每只新生大鼠胰腺干细胞经分化后可获取类胰岛细



† 与同组基础相比较,  $P < 0.05$ 。

图 2 两组胰岛素释放水平比较 ( $n = 30, \bar{x} \pm s$ )

胞团 ( $264.46 \pm 29.61$ ) IEQ, 类胰岛细胞团纯度为  $(75.72 \pm 4.92)\%$ , 存活率为  $(91.02 \pm 3.03)\%$ 。每只成年大鼠可获得胰岛细胞 ( $386.87 \pm 38.59$ ) IEQ, 胰岛细胞纯度为  $(90.11 \pm 3.39)\%$ , 存活率为  $(91.32 \pm 2.55)\%$ 。



A: 胰腺干细胞 (免疫荧光  $\times 100$ ); B: 类胰岛细胞 (DTZ 染色  $\times 10$ ); C: 胰岛细胞 (AO/PI 染色  $\times 10$ )。

图 3 移植物形态

### 2.4 两组大鼠移植前后血糖水平比较

两组大鼠移植前 1 d 血糖水平比较, 差异无统计学意义 ( $t = -0.515, P = 0.609$ ), 且两组大鼠血糖均  $\geq 16.7$  mmol/L。胰岛细胞组大鼠血糖在移植后 3 d 恢复正常, 胰腺干细胞组大鼠血糖移植后 5 d 恢复正常, 两组分别与移植前 1 d 比较, 经独立样本  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 31.144$  和  $38.135$ , 均  $P = 0.000$ )。

两组移植后不同时间点大鼠血糖水平比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的血糖水平有差异 ( $F = 241.148, P = 0.000$ ); ②两组大鼠血糖水平有差异 ( $F = 43.758, P = 0.000$ ); ③两组大鼠血糖水平变化趋势有差异 ( $F = 30.046, P = 0.000$ )。胰岛细胞组大鼠移植后 85 d 与移植前 2 d 血糖水平比较, 经配对样本  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $t = 2.019, P = 0.054$ ); 胰腺干细胞组大鼠移植后 85 d 与移植前 2 d 血糖水平比较, 经配对样本  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 14.106, P = 0.000$ )。见表 1 和图 4。

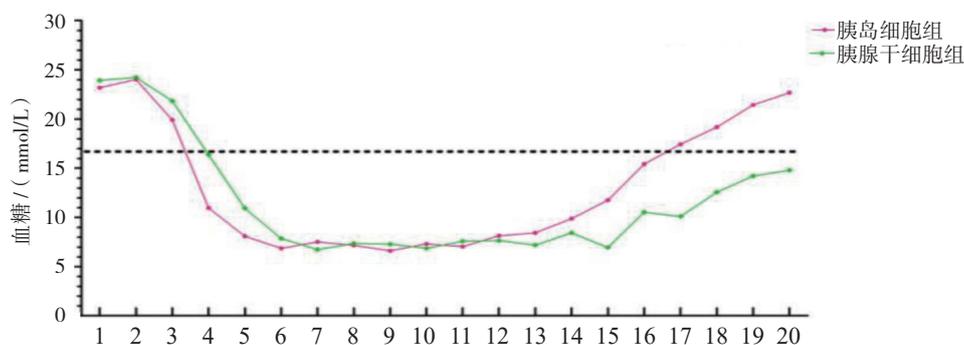
### 2.5 两组大鼠移植前后胰岛素水平比较

两组大鼠移植前 1 d 胰岛素水平比较, 经独立样本  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $t = 0.477, P = 0.636$ )。胰岛细胞组和胰腺干细胞组大鼠移植后 7 d 与移植前 1 d 胰岛素水平比较, 差异有统计学意义 ( $t = -19.380$  和  $-21.205$ , 均  $P = 0.000$ ), 移植后 7 d 较移植前高。

两组大鼠移植后不同时间点大鼠胰岛素水平比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的胰岛素水平有差异 ( $F = 125.119, P = 0.000$ ); ②两组大鼠胰岛素水平有差异 ( $F = 22.314, P = 0.000$ ); ③两组大鼠胰岛素水平变化趋势有差异 ( $F = 34.032, P = 0.000$ )。胰岛细胞组移植后 70 d 与移植前 1 d 胰岛素水平比较, 经配对样本  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $t = -0.673, P = 0.507$ ); 胰腺干细胞组移植后 70 d 与移植前 1 d 胰岛素水平比较, 经配对样本  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = -10.115, P = 0.000$ )。见表 2。

表 1 两组大鼠移植前后血糖水平比较 (mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	移植前 2 d	移植前 1 d	移植后 1 d	移植后 3 d	移植后 5 d
胰岛细胞组	26	23.18 ± 1.14	24.02 ± 1.81	19.91 ± 2.01	10.95 ± 1.48	8.07 ± 1.28
胰腺干细胞组	28	23.93 ± 1.48	24.23 ± 1.36	21.83 ± 1.42	16.36 ± 1.24	10.92 ± 0.91
组别	n	移植后 7 d	移植后 13 d	移植后 19 d	移植后 25 d	移植后 31 d
胰岛细胞组	26	6.85 ± 1.08	7.50 ± 1.03	7.16 ± 1.01	6.60 ± 0.91	7.30 ± 0.98
胰腺干细胞组	28	7.86 ± 0.89	6.73 ± 0.94	7.34 ± 0.45	7.28 ± 1.11	6.85 ± 0.96
组别	n	移植后 37 d	移植后 43 d	移植后 49 d	移植后 55 d	移植后 61 d
胰岛细胞组	26	7.02 ± 1.65	8.13 ± 2.25	8.43 ± 2.99	9.87 ± 3.30	11.74 ± 3.53
胰腺干细胞组	28	7.56 ± 1.05	7.65 ± 1.20	7.17 ± 1.88	8.43 ± 2.46	6.94 ± 2.61
组别	n	移植后 67 d	移植后 73 d	移植后 79 d	移植后 85 d	移植后 91 d
胰岛细胞组	26	15.42 ± 3.02	17.43 ± 1.79	19.17 ± 2.95	21.43 ± 4.32	22.67 ± 3.64
胰腺干细胞组	28	10.52 ± 2.41	10.10 ± 3.18	12.56 ± 3.78	14.20 ± 3.74	14.79 ± 3.93



1: 移植前 2 d; 2: 移植前 1 d; 3: 移植后 1 d; 4: 移植后 3 d; 5: 移植后 5 d; 6: 移植后 7 d; 7: 移植后 13 d; 8: 移植后 19 d; 9: 移植后 25 d; 10: 移植后 31 d; 11: 移植后 37 d; 12: 移植后 43 d; 13: 移植后 49 d; 14: 移植后 55 d; 15: 移植后 61 d; 16: 移植后 67 d; 17: 移植后 73 d; 18: 移植后 79 d; 19: 移植后 85 d; 20: 移植后 91 d。

图 4 两组大鼠移植前后血糖变化趋势

表 2 两组大鼠移植前后胰岛素水平比较 (mIU/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	移植前 1 d	移植后 7 d	移植后 14 d	移植后 21 d	移植后 28 d
胰岛细胞组	26	11.57 ± 0.86	21.95 ± 2.63	20.91 ± 2.10	20.61 ± 2.14	21.15 ± 1.78
胰腺干细胞组	28	11.46 ± 0.78	18.57 ± 1.57	21.00 ± 1.84	19.64 ± 1.58	22.05 ± 1.70
组别	n	移植后 42 d	移植后 56 d	移植后 70 d	移植后 84 d	移植后 91 d
胰岛细胞组	26	20.51 ± 2.51	15.75 ± 2.91	11.94 ± 2.69	11.33 ± 3.13	9.57 ± 2.79
胰腺干细胞组	28	20.48 ± 1.64	20.31 ± 2.59	17.63 ± 3.06	14.39 ± 4.08	13.47 ± 3.95

## 2.6 两组大鼠术后不同时间高糖刺激前后 C 肽水平比较

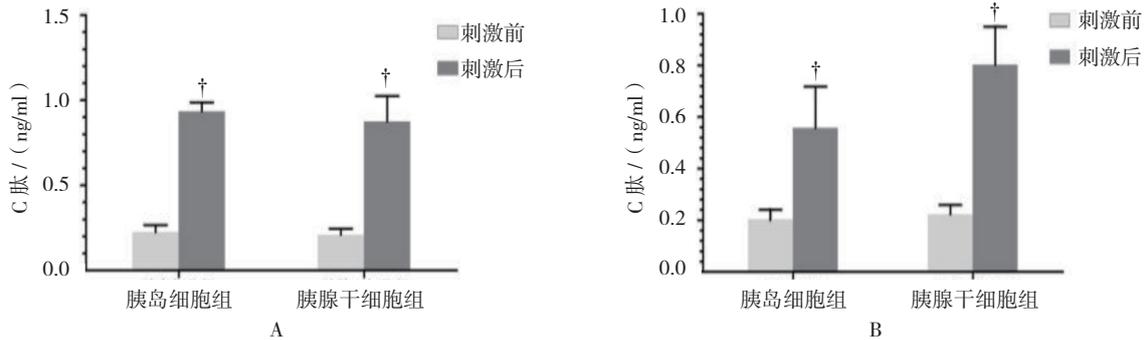
术后 15 d, 两组大鼠高糖刺激前血清 C 肽水平比较, 经独立样本 *t* 检验, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 高糖刺激后两组 C 肽水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。术后 15 d, 两组大鼠高糖刺激前后血清 C 肽水平比较, 经配对样本 *t* 检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 刺激

后升高, 提示各组移植物功能正常。见表 3 和图 5A。

术后 65 d, 两组大鼠刺激前血清 C 肽水平比较, 经独立样本 *t* 检验, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 高糖刺激后两组血清 C 肽水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。术后 65 d, 两组大鼠刺激前后血清 C 肽水平比较, 经配对样本 *t* 检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示各组移植物功能正常。见表 3 和图 5B。

表 3 两组大鼠术后不同时间高糖刺激前后 C 肽水平比较 (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	术后 15 d		t 值	P 值	术后 65 d		t 值	P 值
		刺激前	刺激后			刺激前	刺激后		
胰岛细胞组	26	0.225 ± 0.043	0.934 ± 0.053	-56.732	0.000	0.205 ± 0.036	0.557 ± 0.161	-11.118	0.000
胰腺干细胞组	28	0.209 ± 0.037	0.874 ± 0.149	-22.836	0.000	0.223 ± 0.037	0.801 ± 0.149	-19.657	0.000
t 值		1.397	1.931			-1.797	-5.799		
P 值		0.168	0.059			0.078	0.000		



A: 术后 15 d; B: 术后 65 d。† 与同组刺激前比较,  $P < 0.05$ 。

图 5 两组大鼠术后不同时间高糖刺激前后 C 肽水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.7 两组大鼠腹腔葡萄糖耐量实验的血糖水平比较

两组大鼠血糖水平在腹腔注射葡萄糖 15 min 达到峰值, 随后平稳下降, 直至正常水平。两组不同时间点血糖水平比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的血糖水平有差异 ( $F = 1114.507$ ,

$P = 0.000$ ); ②两组大鼠血糖水平有差异 ( $F = 3.939$ ,  $P = 0.002$ ); ③两组大鼠血糖水平变化趋势有差异 ( $F = 66.721$ ,  $P = 0.000$ )。两组大鼠 120 min 的血糖水平比较, 经独立样本  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $t = -0.873$ ,  $P = 0.386$ )。表明各组大鼠移植物功能良好。见表 4 和图 6。

表 4 两组大鼠腹腔葡萄糖耐量实验的血糖水平比较 (mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min
胰岛细胞组	26	5.36 ± 0.57	10.66 ± 1.25	12.33 ± 0.81	14.37 ± 0.58	12.65 ± 0.67
胰腺干细胞组	28	5.67 ± 0.46	11.32 ± 0.94	13.02 ± 0.75	15.19 ± 0.41	13.73 ± 0.60

组别	n	45 min	60 min	90 min	120 min
胰岛细胞组	26	11.04 ± 0.59	9.22 ± 0.70	8.08 ± 0.72	6.32 ± 0.55
胰腺干细胞组	28	12.25 ± 0.76	9.54 ± 0.65	8.39 ± 0.78	6.46 ± 0.57

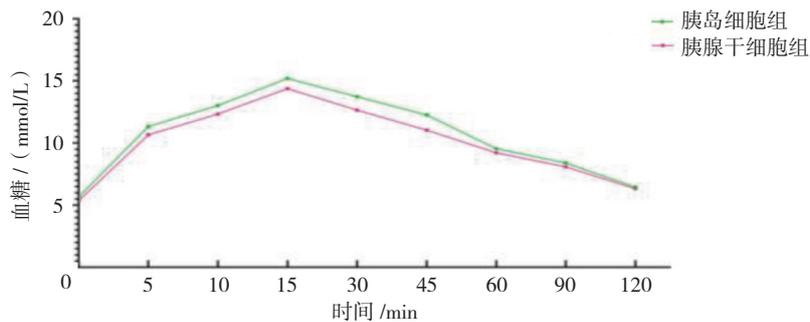


图 6 两组大鼠腹腔葡萄糖耐量实验的血糖水平变化趋势

## 2.8 两组移植物存活时间及生存率比较

胰岛细胞组移植物平均生存时间(70.12±2.39)d,中位生存时间73d;胰腺干细胞组移植物平均生存时间(83.82±1.79)d,中位生存时间为88d。胰岛细胞组和胰腺干细胞组存活率分别为11.54%和50.00%。经Log-rank  $\chi^2$ 检验,差异有统计学意义( $\chi^2=18.301, P=0.000$ )。见图7。

## 2.9 两组移植物组织形态学变化

两组大鼠移植部位标本经HE染色显示肝脏门静脉汇管区有新生血管包绕的胰岛细胞团,经免疫组织化学染色显示细胞团胰岛素阳性,细胞状态良好。见图8。

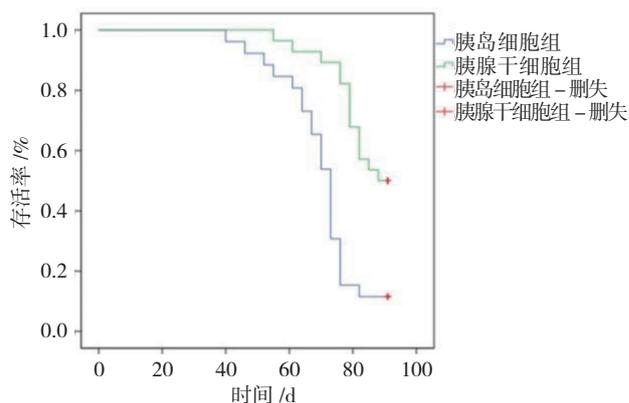
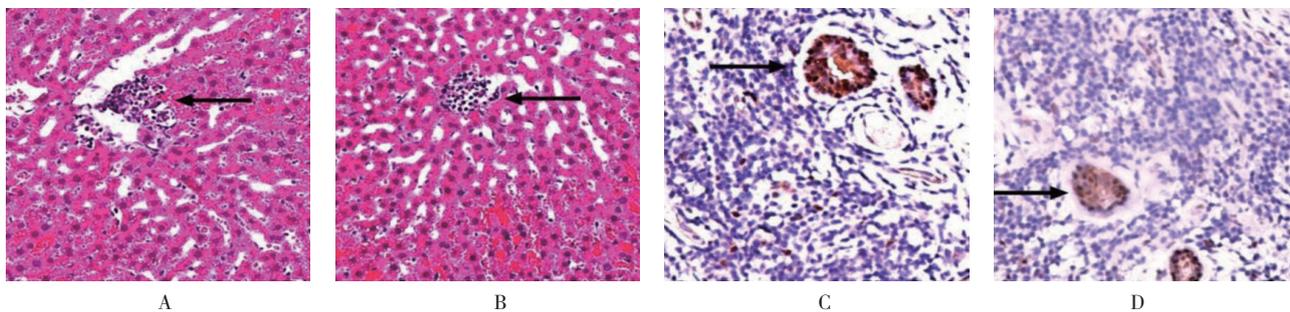


图7 两组移植物的生存曲线



A: 胰腺干细胞组胰岛 HE 染色; B: 胰岛细胞组胰岛 HE 染色; C: 胰腺干细胞组胰岛免疫组织化学染色; D: 胰岛细胞组胰岛免疫组织化学染色。

图8 大鼠移植物 HE 染色和免疫组织化学染色 (×20)

## 3 讨论

目前, T1DM 治疗的方法有外源胰岛素注射、胰腺移植、胰岛细胞移植和胰腺干细胞移植。外源性胰岛素注射难以模拟正常的胰岛素分泌方式,同时胰腺供体的缺乏也制约着胰岛移植的发展<sup>[11]</sup>。由于干细胞具有定向分化和自我增殖的潜能,在体外经诱导分化能获取相应的成体细胞,从而解决胰岛细胞不足的问题;同时,将胰岛细胞移植到门静脉符合胰岛素生理分泌途径,可以较好地控制血糖<sup>[12]</sup>。

本研究从新生 SD 大鼠胰腺提取 CK-19 阳性的胰腺干细胞,经 Bonner-Weir 方法诱导形成类胰岛细胞团<sup>[8, 13]</sup>。体外胰岛素高糖刺激实验表明 2 种细胞均能释放胰岛素,但分化后的类胰岛细胞胰岛素释放量低于胰岛细胞。有研究表明,体外胰腺干细胞分化形成的类胰岛细胞成熟度较天然胰岛细胞低<sup>[14]</sup>。本研究中血糖监测结果表明,胰岛细胞组在术后 3 d 即恢复正常血糖,胰腺干细胞组在术后 5 d 血糖降至正常水平,术后 13 d 血糖相对稳定,提示分化后的类胰岛细胞在术后早期的降糖作用弱于胰岛细胞。监测体内胰岛素

水平进一步发现,胰腺干细胞组的胰岛素分泌量在早期低于胰岛细胞组,但是,随着类胰岛细胞在体内的进一步分化成熟,两组胰岛素分泌量相近;在移植晚期,胰腺干细胞组胰岛素分泌量高于胰岛细胞组。结合 KIM 等<sup>[15]</sup>的研究认为,胰腺干细胞的分化、发育受其所处环境及供体内生长因子调控,并在受体内进一步分化成为功能成熟的胰岛细胞。

本研究中高糖刺激实验表明,各组大鼠刺激前后 C 肽水平有差异,表明各组移植物内分泌功能正常。C 肽和胰岛素由胰岛  $\beta$  细胞等量分泌至体循环。相较于单一使用外源胰岛素,胰腺或胰岛移植可使内源性胰岛素和 C 肽恢复,并改善糖尿病肾病进展<sup>[16]</sup>。行腹腔葡萄糖耐量实验 2 h 后,大鼠血糖均降至正常水平,表明各组大鼠移植物功能正常。

本研究显示,大鼠使用他克莫司后移植物平均存活时间(83.82±1.79)d,较本课题组未使用免疫抑制剂的移植实验平均存活时间长<sup>[17]</sup>。同种异体胰岛细胞移植后受体均会不可避免地发生免疫排斥反应,而免疫抑制剂能不同程度地抑制 T 细胞增殖,从而减少免疫

排斥反应, 延长移植存活时间<sup>[18]</sup>。虽然他克莫司和西罗莫司对人胰岛细胞产生毒性作用, 但短时间应用糖皮质激素能有效减少炎症反应。因此, 免疫抑制剂的用量及类型仍需进一步探究。

综上所述, 本实验结果显示胰腺干细胞体外诱导分化并经门静脉移植可有效降低糖尿病大鼠血糖, 移植存活时间长, 疗效优于胰岛细胞。胰腺干细胞可作为胰岛细胞移植治疗 T1DM 的新替代方案。此外, 还可进一步改善胰腺干细胞体外诱导方案, 促进胰岛细胞体外成熟度, 并结合生物支架提高移植疗效。

#### 参 考 文 献:

- [1] HARREITER J, RODEN M. Diabetes mellitus-definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2019)[J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2019, 131(1): 6-15.
- [2] 翁建平. 我国 1 型糖尿病的流行病学研究与疾病负担 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2018, 48(8): 834-839.
- [3] MOBARRA N, SOLEIMANI M, PAKZAD R, et al. Three-dimensional nanofibrous PLLA/PCL scaffold improved biochemical and molecular markers hiPS cell-derived insulin-producing islet-like cells[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(3): S685-S692.
- [4] TAN J, LIU L, LI B. Pancreatic stem cells differentiate into insulin-secreting cells on fibroblast-modified PLGA membranes[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 97: 593-601.
- [5] YANG Z J, WANG H R, WANG Y L, et al. Myricetin attenuated diabetes-associated kidney injuries and dysfunction via regulating nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2 and nuclear factor- $\kappa$ B signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 647.
- [6] 陈自力, 孙诚谊, 潘耀振, 等. 胰岛干细胞分离及诱导分化的实验研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(8): 40-45.
- [7] 陈海燕, 张强, 吴英, 等. 成年大鼠胰腺导管干细胞的体外分离、培养及鉴定 [J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2008, 28(3): 273-277.
- [8] BONNER-WEIR S, TANEJA G, WEIR GC, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(14): 7999-8004.
- [9] MARZORATI S, MELZI R, CITRO A, et al. Engraftment versus immunosuppression: cost-benefit analysis of immunosuppression after intrahepatic murine islet transplantation[J]. *Transplantation*, 2014, 97(10): 1019-1026.
- [10] SAEKI Y, ISHIYAMA K, ISHIDA N, et al. Role of natural killer cells in the innate immune system after intraportal islet transplantation in mice[J]. *Transplant Proc*, 2017, 49(1): 139-144.
- [11] FANG Q, ZHAI M, WU S, et al. Adipocyte-derived stem cell-based gene therapy upon adipogenic differentiation on microcarriers attenuates type 1 diabetes in mice[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 36-46.
- [12] 张博雅, 裴广辉, 张雅敏, 等. 经皮经肝门静脉穿刺胰岛移植术后并发出血 1 例 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(8): 750-751.
- [13] YANG C, WANG J M, DU C Y, et al. Expression of stem cell markers CK-19 and PDX-1 mRNA in pancreatic islet samples of different purity from rats[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(5): 544-548.
- [14] 李富荣, 龙爱梅, 齐晖, 等. 胰岛干细胞转分化胰岛样细胞与天然胰岛功能的比较 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(25): 4833-4836.
- [15] KIM Y, KIM H, KO U, et al. Islet-like organoids derived from human pluripotent stem cells efficiently function in the glucose responsiveness in vitro and in vivo[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: DOI: 10.1038/srep35145.
- [16] YARIBEYGI H, MALEKI M, SATHYAPALAN T, et al. The effect of C-peptide on diabetic nephropathy: a review of molecular mechanisms[J]. *Life Sciences*, 2019, 237: DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116950.
- [17] 程宇, 周丁华, 闫涛, 等. 大鼠肠系膜与肾被膜下移植胰岛治疗糖尿病的疗效对比 [J]. *暨南大学学报 (自然科学与医学版)*, 2019, 40(2): 157-164.
- [18] GUO M, HAN S, LIU Y, et al. Inhibition of allogeneic islet graft rejection by VISTA-conjugated liposome[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(3): 914-920.

(李科 编辑)

本文引用格式: 刘智伟, 张冲, 王进, 等. 胰腺干细胞和胰岛细胞在糖尿病大鼠治疗中的疗效观察 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(6): 1-8.