

## 工程化同种胰岛移植治疗 1 型糖尿病小鼠的实验研究

顾晓<sup>1</sup> 杨进<sup>1</sup> 赵鸿<sup>2△</sup> 周广臣

(<sup>1</sup>扬州大学第一临床医学院泌尿外科 扬州 225001; <sup>2</sup>美国路易维尔大学细胞治疗研究所 路易维尔 40202)

**【摘要】** 目的 将外源蛋白 FasL 修饰的供者胰岛移植于糖尿病小鼠肾包膜下,观察其治疗 1 型糖尿病的效果。方法 采用 ProtEx™ 技术将嵌合蛋白 SA-FasL 修饰于供者小鼠胰岛,流式细胞检测蛋白的表达;以近交系小鼠 BALB/c 和 C57BL/6 分别为胰岛移植的供受者,进行同种小鼠胰岛移植,部分受者联合免疫抑制剂雷帕霉素(rapamycin,RPM)治疗,从手术当日开始应用 RPM(0.2 mg/kg),连续治疗 10 天。根据移植胰岛的不同及有无联合 RPM 治疗将受者分为 5 组:(1)SA-FasL 修饰组(FasL 组,  $n = 33$ );(2)SA-FasL 修饰 + RPM 治疗组(FasL-RPM 组,  $n = 31$ );(3)SA 修饰组(SA 组,  $n = 27$ );(4)SA 修饰 + RPM 治疗组(SA-RPM 组,  $n = 30$ );(5)未修饰胰岛组(Islet 组,  $n = 20$ )。术后连续 3 天测定血糖,其后每周测定尿糖 3 次。若受者尿糖阳性并连续 2 天血糖  $\geq 250$  mg/dL 为移植排斥反应,尿糖阴性超过 100 天为移植胰岛长期存活。结果 激光共聚焦显微镜观察生物素呈绿色,FasL 蛋白呈红色表达于胰岛表面,胰岛细胞的平均生物素化效率为  $(90.8 \pm 0.9)\%$ ,FasL 蛋白平均表达率为  $(82.6 \pm 2.2)\%$ 。FasL 组中 28% 受者的移植胰岛获得长期存活,联合应用 RPM 之后(FasL-RPM 组)长期存活率提高到 92%,两组间差异有显著统计学意义( $P < 0.05$ );SA 组于术后 25 天全部受者均发生排斥反应,移植胰岛平均存活时间(mean survival time,MST)为  $(16 \pm 1.5)$  天,联合应用 RPM 之后(SA-RPM 组)21% 受者的移植胰岛获得长期存活,但显著低于 FasL-RPM 组的存活率( $P < 0.05$ )。Islet 组于术后 22 天全部受者均发生排斥反应,移植胰岛 MST 为  $(14 \pm 1.7)$  天。结论 表达 FasL 嵌合蛋白的工程化胰岛移植于糖尿病小鼠并联合短程免疫抑制剂治疗,有可能诱导移植胰岛长期存活,对 1 型糖尿病的治疗具有潜在的临床意义。

**【关键词】** 蛋白; FasL; 胰岛; 移植免疫; 糖尿病; 小鼠

**【中图分类号】** R 392 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2011.01.010

## Experimental study of engineered allo-islet transplantation for treating type 1 diabetes in mice

GU Xiao<sup>1</sup>, YANG Jin<sup>1</sup>, ZHAO Hong<sup>2△</sup>, ZHOU Guang-chen

(<sup>1</sup>Department of Urology, the First Clinical Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Institute for Cellular Therapeutics, the University of Louisville, Louisville 40202, USA)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of treatment of type 1 diabetes by transplanting allo-islets decorated with exogenous FasL protein into diabetic mice. **Methods** Chimeric SA-FasL protein was decorated on cellular membrane of donor islets by ProtEx™ technology and its expression was tested by flowcytometry. Allo-islet transplantation was performed from inbred BALB/c mice to C57BL/6 mice. Rapamycin (RPM) was administered for selected recipients for ten consecutive days from the day of surgery at dose of 0.2 mg/kg. According to the different perioperative treatments, recipients were divided into 5 groups: FasL group ( $n = 33$ ), FasL-RPM group ( $n = 31$ ), SA group ( $n = 27$ ), SA-RPM group ( $n = 30$ ) and islet group ( $n = 20$ ). Islet and SA groups were set as no treatment control and protein control respectively. Rejection was identified while urine test was positive and blood glucose value was over 250 mg/dL for two consecutive days. Urine test negative over 100 days was regarded as graft long-termed survival. **Results** Biotin (green) and FasL (red) were detected on the surface of

islets by laser confocal microscopy. Flowcytometric study further indicated that the mean expression rate of biotin and FasL was  $(90.8 \pm 0.9)\%$  and  $(82.6 \pm 2.2)\%$  respectively. FasL engineered allo-islet achieved prolonged survival, with 28% survived above 100 days. When administered with rapamycin, 92% of allo-islet in FasL-RPM group survived above 100 days ( $P < 0.05$ ), exhibiting a synergistic effect on graft survival. SA engineered allo-islet grafts were all rejected within 25 days with mean survival time (MST) of  $(16 \pm 1.5)$  days. Concurrent RPM treatment failed to protect SA engineered islet from rejection, with a long-termed survival rate of 28%, which was significantly lower than the rate of FasL-RPM group ( $P < 0.05$ ). All recipients in islet group were encountered rejection within 22 days postoperatively with a MST of  $(14 \pm 1.7)$  days. **Conclusions** FasL engineered allo-islets enjoyed indefinite survival under the transient cover of rapamycin, thereby providing strategic therapy for type 1 diabetes.

**【Key words】** protein; FasL; islet; transplant immunology; diabetes; mice

外源胰岛素补充和胰岛或胰腺移植是目前针对1型糖尿病最主要的治疗方法,但两者均有较大的局限性。胰岛素即使能良好控制血糖水平,也不能完全预防糖尿病相关并发症的发生;尽管应用了优化的免疫抑制方案,同种胰岛和胰腺移植仍不能完全免受移植排斥反应;长期应用免疫抑制剂还存在毒副作用大及价格昂贵的问题。胰腺移植手术创伤较大,围手术期并发症较多。因此,诱导同种胰岛移植的免疫耐受,避免长期应用胰岛素和免疫抑制药物,是有效治疗1型糖尿病的重要课题。Fas/FasL是一对在免疫自稳、移植和肿瘤中发挥调节作用的关键分子,两者相互作用产生凋亡信号,诱导T淋巴细胞发生活化的细胞死亡(activation-induced cell death, AICD)<sup>[1]</sup>。本课题采用一种新颖的外源蛋白修饰技术——ProtEx™,作为基因治疗的一种替代疗法,将FasL嵌合蛋白直接修饰于供者胰岛,观察其表达情况;通过建立小鼠胰岛移植模型,观察工程化供者胰岛移植后的存活与功能情况,以及免疫抑制剂雷帕霉素(rapamycin, RPM)对它的影响。

## 材料和方法

**试剂和器材** 生物素(美国Pierce公司),SA-FasL嵌合蛋白和SA链霉亲和素蛋白(美国ApoImmune公司),自由酶(美国Roche公司),DMEM培养液、RPMI 1640培养液、PBS溶液和胎牛血清(美国GIBCO公司),中性蛋白酶(美国Roche公司),IV型胶原酶和链脲菌素STZ(美国Sigma公司),雷帕霉素(美国LC公司),小鼠单克隆荧光抗体(美国BD Bioscience公司):抗SA-APC、MFL4-APC(抗FasL抗体)和avidin-FITC;流式细胞仪(FACS Calibur,美国BD公司),手术显微镜和CTR6500激光共聚焦显微镜(德国Leica公司),显微手

术器械(美国ASSI公司)。

**实验动物** 近交系小鼠BALB/c和C57BL/6分别为胰岛移植的供受者,均为8~12周龄的雄性小鼠,体重16~25g。所有实验动物均购于美国Harlan Sprague-Dawley动物中心,饲养条件符合SPF标准。

### 实验方法

**1型糖尿病小鼠模型** C57BL/6小鼠尾静脉单次注射链脲菌素(streptozotocin, STZ, 200 mg/kg)诱导1型糖尿病。

**供者胰岛和脾脏细胞的制备** 经胆总管向供者BALB/c小鼠的胰腺灌注浓度为0.35 mg/mL的自由酶2~3 mL,自由酶为胶原酶和嗜热菌蛋白酶的混合物。切取胰腺于37℃温箱孵育,经梯度离心法获取胰岛,置于含10%胎牛血清和抗生素的RPMI 1640培养液中孵育过夜备用。同时手术切取同一供者小鼠脾脏,置于DMEM培养液中,研磨、吹打脾脏组织并以30 μmol/L尼龙网过滤;溶解红细胞,制成单个脾脏细胞悬液,作为衡量蛋白修饰成功与否的内参照,实现每一次修饰过程的质量控制。

**供者胰岛和脾脏细胞的蛋白修饰** 将生物素配制成浓度为5 μmol/L的溶液,以每500枚胰岛需用0.5 mL生物素溶液(每 $100 \times 10^6$ 个脾脏细胞需要1 mL生物素溶液)计算出所需生物素溶液的总量,在室温中与胰岛(脾脏细胞)一起孵育使之生物素化,再以每500枚胰岛(每 $1 \times 10^6$ 个脾脏细胞)需要200 ng SA-FasL或50 ng SA蛋白,将SA-FasL或SA蛋白和胰岛于室温中(脾脏细胞于4℃中)孵育,将蛋白修饰于胰岛(脾脏细胞)表面。以浓度为0.7 mg/mL的中性蛋白酶(Dispase)将胰岛处理为单个细胞,流式细胞术检测胰岛和脾脏细胞表面的生物素和SA-FasL蛋白表达。

**胰岛移植与分组** 建立同种小鼠肾包膜下胰岛移植模型,将500枚供者胰岛移植于受者小鼠左侧肾脏包膜下,部分受者联合RPM进行治疗。从手术当日开始应用RPM(0.2 mg/kg),每日相同时间腹腔注射1次,连续治疗10天。根据移植胰岛的不同及有无联合RPM治疗将受者分为5组:(1)SA-FasL修饰组(FasL组,  $n = 33$ );(2)SA-FasL修饰+RPM治疗组(FasL-RPM组,  $n = 31$ );(3)SA修饰组(SA组,  $n = 27$ );(4)SA修饰+RPM治疗组(SA-RPM组,  $n = 30$ );(5)未修饰胰岛组(Islet组,  $n = 20$ )。术后连续3天测定血糖,其后每周测定尿糖3次。若受者尿糖阳性并连续2天血糖 $\geq 250$  mg/dL为移植排斥反应,尿糖阴性超过100天为移植胰岛长期存活。

**统计学处理** 采用SPSS 13.0软件进行计数资

料的 $\chi^2$ 检验, Kaplan-Meier生存分析。以双侧 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水平,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

**供者胰岛与脾脏细胞表达FasL蛋白** 激光共聚焦显微镜显示 avidin-FITC与胰岛表面的生物素结合呈现绿色, MFL4-APC与胰岛表面的FasL结合呈现红色(图1)。胰岛细胞的平均存活率为 $(91.7 \pm 5.2)\%$ , 生物素化的平均效率为 $(90.8 \pm 0.9)\%$ , FasL蛋白平均表达率为 $(82.6 \pm 2.2)\%$ (图2)。同期质控脾脏细胞经SA-FasL修饰后平均存活率为 $(93.0 \pm 5.2)\%$ , 生物素化的平均效率为 $(99.2 \pm 0.6)\%$ , FasL蛋白平均表达率为 $(94.5 \pm 4.3)\%$ 。

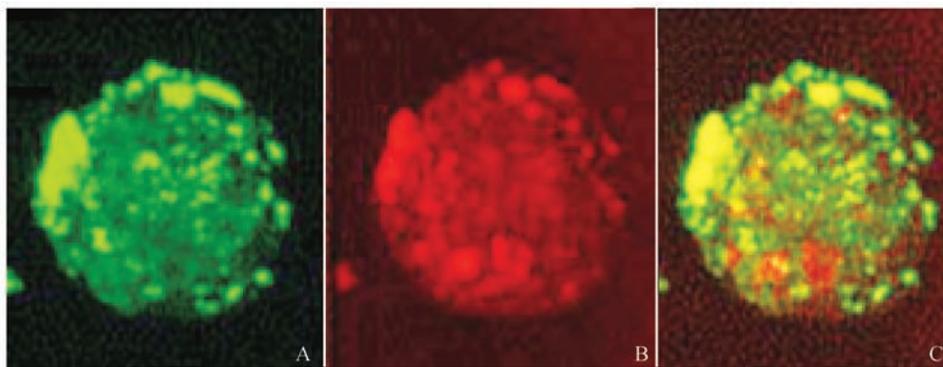


图1 激光共聚焦显微镜显示生物素和FasL蛋白共表达于小鼠胰岛表面( $\times 250$ )

Fig 1 Laser confocal microscopy shows biotin and FasL co-expressed on the surface of islet in mice ( $\times 250$ )

A: Avidin-FITC conjugated with biotin on the surface of islet shows green; B: MFL4-APC conjugated with FasL on the surface of islet shows red; C: Laser confocal microscopy shows red and green overlapping on the surface of islet.

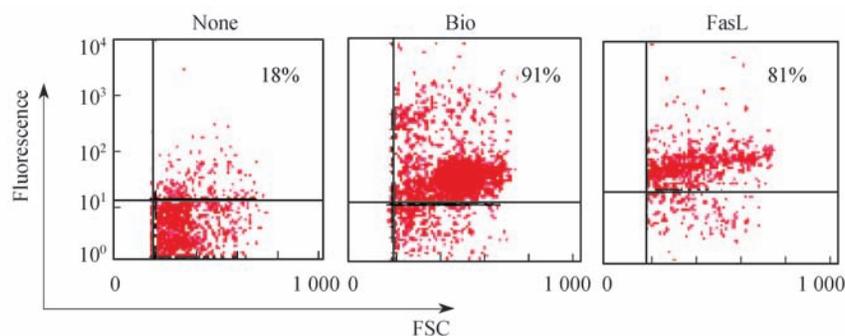


图2 流式细胞检测小鼠单个胰岛细胞表达生物素和FasL嵌合蛋白

Fig 2 Expression of biotin and FasL on the single islet cell in mice tested by flowcytometry

Using SA-APC as a marker, 18% no-decorated islets show positive, 91% biotinized islets show positive, 81% FasL engineered islets show positive.

**不同治疗组移植胰岛的存活率** FasL组中28%受者的移植胰岛获得长期存活,联合应用RPM之后(FasL-RPM组)长期存活率提高至92%,两组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );SA组于术后25

天全部受者均发生排斥反应,移植胰岛平均存活时间(mean survival time, MST)为 $(16 \pm 1.5)$ 天,联合应用RPM之后(SA-RPM组)21%受者的移植胰岛获得长期存活,但仍显著低于FasL-RPM组的存活

率( $P < 0.05$ )。Islet 组于术后 22 天全部受者均发生排斥反应,移植胰岛 MST 为( $14 \pm 1.7$ )天(图 3)。

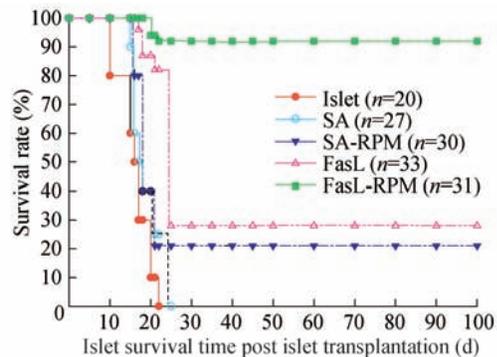


图 3 不同治疗组胰岛移植术后受者移植胰岛的存活情况

Fig 3 Islet survival rate after islet transplantation with different treatments

## 讨 论

FasL 在体内以 3 种不同的形式存在,膜结合型、泡内型和可溶型,具有不同的免疫学功能,前两者具有诱导凋亡的功能,而可溶型与膜结合型 FasL 竞争性结合 Fas 配体,发挥抗凋亡作用<sup>[2]</sup>。通过淋巴细胞表面 Fas/FasL 的相互作用产生 AICD,诱导供者抗原特异性淋巴细胞发生凋亡,有可能诱导和维持免疫耐受。睾丸支持细胞因其表达 FasL 而具有免疫保护功能,Han 等<sup>[3]</sup>报道大鼠睾丸支持细胞与胰岛经微重力共培养后形成结合体,移植于糖尿病大鼠肾包膜下,术后 60 天时有超过 90% 的胰岛存活并发挥正常功能。该研究表明,FasL 对胰岛的免疫保护能够预防移植排斥反应的发生,但这一方法需要获取供者支持细胞和微重力培养系统。我们采用更为简便高效的外源蛋白修饰技术(ProtEx<sup>TM</sup>),将 FasL 直接表达于胰岛表面,进行免疫调节,诱导供者胰岛的长期存活。这一技术通过制备链霉菌素嵌合的 FasL 蛋白,根据链霉菌素能与生物素(Biotin)紧密链接的原理,将生物素标记于靶细胞,链霉菌素嵌合的 FasL 蛋白将与生物素链接后表达于胰岛<sup>[4]</sup>。这一技术有可能替代转基因技术,因其克服了当今转基因技术仍存在的某些不足<sup>[5]</sup>,如:基因表达效率较低;机体对基因转染系统的载体具有免疫反应性;病毒载体对机体具有一定的危险性;此外费用高和耗时长,不易在临床推广应用。

以往报道的外源蛋白修饰技术仅限于体外实验,目的蛋白表达于靶细胞时间短,可能与蛋白和细胞膜间的化学作用较弱有关;有的方法过于繁琐或干扰蛋白的功能<sup>[6-7]</sup>。本研究所用的 ProtEx<sup>TM</sup> 技术

利用生物素与亲和素之间的非共价性高亲和力将目的蛋白结合于靶细胞,从处理靶细胞至完成蛋白修饰所需时间 $< 2$  h,靶细胞存活率高,目的蛋白表达效率高,在体内 FasL 嵌合蛋白表达于靶细胞的半衰期 $> 3.5$  天<sup>[5]</sup>。我们通过荧光染色显示目的蛋白 FasL 表达于胰岛表面,流式细胞检测显示胰岛和脾脏细胞表达 FasL 蛋白效率高且重复性良好。因将胰岛处理成单个细胞标记荧光抗体后方能通过流式细胞检测其蛋白表达,难以在胰岛移植之前了解其蛋白修饰效果,因此以同期脾脏细胞蛋白修饰作为质量控制,间接表明 FasL 蛋白在胰岛的表达。有研究表明<sup>[8]</sup>,通过转基因技术能够使供者抗原提呈细胞中等程度表达 FasL,注入受者体内后,由于金属蛋白酶的裂解作用,FasL 表达减弱,影响了供者细胞的免疫调节作用,但本研究选择具有强效凋亡活性的膜结合型 FasL,它缺乏金属蛋白酶的裂解位点,直接修饰于供者胰岛表面,诱导移植胰岛在受者体内的长期存活,这一免疫调节功能可能与所用 FasL 的形式、移植供者胰岛的数量及其表达 FasL 的数量有关。

体外实验已表明,游离 FasL 嵌合蛋白和表达于胰岛或脾脏细胞表面的 FasL 嵌合蛋白均保存了诱导凋亡的功能,与可溶性 FasL 蛋白一样可以在体外高效诱导淋巴细胞的凋亡<sup>[4]</sup>。本研究将 500 枚表达 FasL 蛋白的工程化胰岛移植于受者肾包膜下,28% 受者体内的移植胰岛获得长期存活,明显高于未修饰蛋白组和对照蛋白治疗组(SA 组);联合短程小剂量使用 RPM,各组胰岛长期存活比例均有显著增高,FasL-RPM 组 92% 受者的胰岛长期存活并发挥正常功能,对 1 型糖尿病的治疗具有潜在的临床意义。这一初步研究结果预示移植术后受者有可能获得局部免疫耐受状态,避免长期使用免疫抑制剂产生的严重毒副作用和经济负担。结合以往的相关研究<sup>[9]</sup>,我们认为其可能机制是通过移植表达 FasL 的供者胰岛对受者进行免疫调节,移植术后受者体内产生同种反应性 T 淋巴细胞并使 Fas 表达上调,与移植胰岛表面的 FasL 相互作用,诱导同种反应性 T 细胞的凋亡,获得同种小鼠移植胰岛的长期存活。Yolcu 等<sup>[9]</sup>将 FasL 嵌合蛋白修饰的工程化供者脾脏细胞在围手术期多次输注给大鼠心脏移植受者,70% 受者成功诱导了免疫耐受状态,其内在机制还与诱导扩增了调节性 T 淋巴细胞(Treg)有关。RPM 本身具有使 Treg 细胞选择性扩增的作用<sup>[10]</sup>,我们的联合治疗方案使受者移植胰岛长期存活率明显增高,可能与 FasL 和 RPM 协同发挥作用诱导 Treg 细胞扩增有关,但如何优化 RPM 的剂量与疗

程,还有待进一步研究。

ProtEx™外源蛋白修饰技术简便高效,无需高端设备,将 FasL 嵌合蛋白修饰于供者胰岛,工程化胰岛移植联合小剂量免疫抑制剂短程治疗能够诱导移植胰岛长期存活,这一治疗策略具有潜在的临床应用价值,但其内在机制尚需深入研究。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Li XC, Strom TB, Turka LA, *et al.* T cell death and transplantation tolerance [J]. *Immunity*, 2001, 14 (4):407 - 416.
- [ 2 ] Zhang HG, Su X, Liu D, *et al.* Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen-presenting cells[J]. *J Immunol*, 1999, 162(3):1 423 - 1 430.
- [ 3 ] Han X, Qiu L, Zhang Y, *et al.* Transplantation of sertoli-islet cell aggregates formed by microgravity: prolonged survival in diabetic rats[J]. *Exp Biol Med*, 2009, 234(5):595 - 603.
- [ 4 ] Yolcu ES, Askenasy N, Singh NP, *et al.* Cell membrane modification for rapid display of proteins as a novel means of immunomodulation: FasL-decorated cells prevent islet graft rejection[J]. *Immunity*, 2002, 17 (6):795 - 808.
- [ 5 ] Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations[J]. *Nat Rev Genet*, 2000, 1(2):91 - 99.
- [ 6 ] Chen A, Zheng G, Tykocinski ML. Hierarchical costimulator thresholds for distinct immune responses: application of a novel two-step Fc fusion protein transfer method[J]. *J Immunol*, 2000, 164(2):705 - 711.
- [ 7 ] van Broekhoven CL, Parish CR, Vassiliou G, *et al.* Engrafting costimulator molecules onto tumor cell surfaces with chelator lipids: a potentially convenient approach in cancer vaccine development [J]. *J Immunol*, 2000, 164(5):2 433 - 2 443.
- [ 8 ] Min WP, Gorczynski R, Huang XY, *et al.* Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival [J]. *J Immunol*, 2000, 164(1):161 - 167.
- [ 9 ] Yolcu ES, Gu X, Lacelle C, *et al.* Induction of tolerance to cardiac allografts using donor splenocytes engineered to display on their surface an exogenous Fas ligand protein [J]. *J Immunol*, 2008, 181(2):931 - 939.
- [10] Valmori D, Tosello V, Naira E, *et al.* Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4<sup>+</sup> T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4<sup>+</sup> T cells [J]. *J Immunol*, 2006, 177(4):944 - 949.
- (收稿日期:2010-01-22;编辑:沈玲)
- 
- (上接第 37 页)
- [ 6 ] Billingsley KA, Backus SM, Ward OP. Effect of surfactant solubilization on biodegradation of polychlorinated biphenyl congeners by pseudomonas LB400 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52(2):255 - 260.
- [ 7 ] Churchill PF, Dudley RJ, Churchill SA. Surfactant-enhanced bioremediation[J]. *Waste Manag*, 1995, 15 (5/6):371 - 377.
- [ 8 ] Van den Brink HJM, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ, *et al.* Cytochrome P450 enzyme systems in fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 1998, 23(1):1 - 17.
- [ 9 ] Bernhardt R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts [J]. *J Biotechnol*, 2006, 124(1):128 - 145.
- [10] Acquaviva M, Bertrand JC, Gilewicz M. Effect of a synthetic surfactant on phenanthrene and n-eicosane utilization by two pure marine strains grown separately in batch cultures with or without sand particles[J]. *World J Microb Biotechnol*, 2001, 17(5):481 - 485.
- (收稿日期:2010-08-17;编辑:王蔚)