

BALF 中 TP 含量明显增高, BALF 表面活性明显降低, BALF 的表面活性不仅与 TP、DSPC 含量相关, 还与 SP-A 的含量呈显著正相关, 提示哮喘时 SP-A 下降可使 PS 活性更易被血浆蛋白抑制, 而表面活性降低, 间接导致气道阻力增加。

此外, SP-A 属于胶原凝集素家族, 胶原样凝集素能够与细菌或病毒等病原表面的特异性碳水化合物结合, 起调理素的作用。完整的 SP-A 是由 6 个三聚体亚基共 18 条肽链组成的巨分子, 是天然免疫的重要成分。研究发现 SP-A 可与各种病原, 如病毒、细菌、真菌结合<sup>[4]</sup>, SP-A 还可调节肺局部的炎症或免疫反应。有关 SP-A 对免疫细胞的调节作用的研究逐渐增多, SP-A 可在抗原结合及抗原提呈、调节过敏效应细胞释放炎症介质等多环节抑制过敏性炎症<sup>[5]</sup>。很可能哮喘时 SP-A 的减少可进一步使哮喘时的炎症反应放大, 尤其是在重症哮喘。但体内 SP-A 在过敏性炎症中起何作用还不明确, 仍需深入研究和探讨。此外, 研究已证实 SP-A 在肺部的防御功能, 哮喘时 SP-A 的下降会使呼吸道感染易感性增加, 这可能是哮喘患者易患呼吸道感染的原因之一。

哮喘时引起 SP-A 表达下降的机制可能与以下几方面有关: 哮喘时肺泡 II 型细胞受损, 功能下降, 导致 SP-A 分泌减少。本研究免疫组化结果也显示哮喘组大鼠肺内 SP-A 表达明显降低, 不仅细胞内的免疫阳性染色明显减弱, 而且阳性 II 型细胞数明显减少。此外, 哮喘时明显增加的炎症介质

也可抑制 SP-A 的合成。也有学者<sup>[6]</sup>认为哮喘发作时气道及肺泡腔内渗出的血浆蛋白, 使局部区域的蛋白含量升高, 可以抑制 SP-A 的合成与分泌。SP-A 在哮喘过敏性炎症中的作用究竟如何, 还有待于今后进一步探索。

#### [参考文献]

- [1] 孙雨, 方凤, 满立新, 等. 肺表面活性物质对哮喘大鼠白细胞介素-4 的影响[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(5): 446
- [2] Cheng G, Ueda T, Sugiyama K, et al. Compositional and functional changes of pulmonary surfactant in a guinea-pig model of chronic asthma[J]. *Respir Med*, 2001, 95(3): 180-186
- [3] Korfhagen TR, Levine AM, Whitsett JA. Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1408(2-3): 296-302
- [4] Hawgood S, Poulain FR. The pulmonary collectins and surfactant metabolism[J]. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 495-519
- [5] Wang JY, Shieh CC, Yu CK, et al. Allergen-induced bronchial inflammation is associated with decreased levels of surfactant proteins A and D in a murine model of asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2001, 31(4): 652-662
- [6] van de Graaf EA, Jansen HM, Lutter R, et al. Surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluid[J]. *J Lab Clin Med*, 1992, 120(2): 252-263

[收稿日期] 2004-05-26

[修回日期] 2004-09-01

[本文编辑] 曹静

## · 实验研究 ·

# 西罗莫司和 FTY720 对大鼠胰岛细胞体外分泌功能的影响

Effects of FTY720 and sirolimus on in vitro insulin secretion of rat islet cells

蔡锦全<sup>1</sup>, 谭建明<sup>1</sup>, 董维平<sup>2</sup>, 王煜菲<sup>2</sup>, 王鉴波<sup>2</sup>

(1. 南京军区福州总医院泌尿外科, 福州 350025; 2. 上海市第一人民医院糖尿病研究室, 上海 200080)

[摘要] 目的: 探讨西罗莫司(sirolimus)和 FTY720 对大鼠胰岛细胞体外分泌胰岛素功能的影响。方法: 将大鼠胰岛细胞分别与西罗莫司和 FTY720 共培养后进行糖刺激胰岛素释放试验, 用 ELISA 方法检测培养液中胰岛素含量并进行比较研究。结果: FTY720 和西罗莫司对大鼠胰岛细胞胰岛素分泌无明显影响。结论: FTY720 和西罗莫司对大鼠胰岛细胞及分泌功能无明显影响, FTY720 和西罗莫司有可能作为临床胰岛细胞移植的主要免疫抑制剂使用。

[关键词] 胰岛; 细胞移植; 免疫抑制剂

[中图分类号] R 587.1

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)11-1257-02

\* 胰岛细胞移植是治疗 1 型糖尿病的一种有效方法, 移植的胰岛细胞可提供内分泌的胰岛素, 维持机体糖代谢稳定, 防止糖尿病严重并发症的发生和发展。然而, 临床成人胰岛细胞移植效果并不理想, 其主要原因包括: 移植的胰岛细胞无功能; 移植部位的炎症反应造成胰岛细胞破坏; 同种异体排斥反应、自身免疫性疾病再发引起胰岛细胞的破坏; 免疫抑制剂对胰岛细胞的毒性作用等<sup>[1-4]</sup>。近年来, 新型无激素免疫抑制剂方案成功应用于成人胰岛细胞移植, 取得了令人满意的治疗效果, 亦说明免疫抑制剂的毒性作用是导致胰岛细胞移植失败的主要原因之一<sup>[5]</sup>。本研究通过大鼠胰岛细胞分别与不同浓度的 FTY720 和西罗莫司(sirolimus)共培养,

旨在探讨免疫抑制剂对胰岛细胞的毒性作用及对胰岛素分泌功能的影响。

### 1 材料和方法

1.1 材料与试剂 胶原酶 P (Roche); FicoII 400 (Pharmacia); RPM I 1640 (Gibco); FTY720 (华东制药有限公司); 西罗莫司(惠氏-白宮制药有限公司); 超敏大鼠胰岛素检测试剂盒(Mercodia); 成年雄性 SD 大鼠 2 只(8~10 周

\* [基金项目] 福建省重大科技项目(2002Y007)。

[作者简介] 蔡锦全(1966-), 男(汉族), 硕士, 副主任医师

龄, 体质量 250~300 g), 购自中科院上海实验动物中心。

1.2 大鼠胰岛细胞的分离与纯化 大鼠胰岛细胞的分离与纯化按文献[6]方法进行。将分离纯化所得的大鼠胰岛细胞置入 RPM I 1640 培养液(含 20% 胎牛血清+ 40 U/ml 庆大霉素)中, 37、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

1.3 不同浓度 FTY720 和西罗莫司分别与大鼠胰岛细胞共培养 将 RPM I 1640 培养液加入制备好的胰岛细胞中, 调整细胞数后加入 24 孔培养板中, 每孔 1 ml, 每孔 30 个胰岛, 37、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 取出后更换培养液, 每孔中分别加入不同浓度的 FTY720 和西罗莫司, 根据临床用药血浆浓度来确定培养液中的药物浓度, FTY720、西罗莫司的培养浓度分别为 0、3、6、15 ng/ml。培养液中不加免疫抑制剂作为对照。37、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h, 取出后吸尽培养液, 用 Hanks 液洗涤 3 次, 先后分别加入低糖(3.3 mmol/L)和高糖(16.7 mmol/L + 10 mmol/L 茶碱)无血清培养液, 37、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中各孵育 2 h, 分别收集各孔培养液的上清液, -80 保存待测。

1.4 大鼠胰岛细胞培养液中胰岛素含量测定 用超敏大鼠胰岛素 ELISA 试剂盒测定, 按试剂盒说明书进行。胰岛素含量用 pmol/30 islets 表示。

1.5 统计学处理 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间显著性差异采用两样本均数 *t* 检验, 显著性差异水平设定为  $P < 0.05$ , 由 SPSS10.0 统计软件完成。

## 2 结果

在无免疫抑制剂作用的情况下, 大鼠胰岛细胞在低糖(3.3 mmol/L)和高糖(16.7 mmol/L + 10 mmol/L 茶碱)刺激作用下, 胰岛素含量分别为(0.33 ± 0.03)和(1.82 ± 0.41) pmol/30 islets, 高糖刺激后胰岛素释放量是低糖刺激的 5.45 倍, 两者比较具有显著性差异( $P < 0.05$ ), 表明分离的大鼠胰岛细胞功能良好。在不同浓度 FTY720 和西罗莫司存在的情况下, 在低糖作用下, 不同免疫抑制剂之间及同一免疫抑制剂不同浓度之间相比较, 大鼠胰岛细胞胰岛素释放量无显著性差异。与对照组比较, 亦无显著性差异。在高糖刺激作用下, FTY720 和西罗莫司均未对大鼠胰岛细胞胰岛素分泌产生明显影响, 与对照组比较, 无显著性差异。见表 1。

表 1 大鼠胰岛细胞分别与 FTY720 和西罗莫司培养后糖刺激胰岛素水平比较

药物	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	( $\bar{x} \pm s$ )		
		低糖 ( $n/\text{pmol}$ ) <sup>a</sup>	高糖 ( $n/\text{pmol}$ ) <sup>a</sup>	高糖/低糖
西罗莫司	3	0.33 ± 0.03	1.78 ± 0.38	5.36 ± 0.86
	6	0.32 ± 0.05	1.68 ± 0.44	5.24 ± 0.93
	15	0.29 ± 0.08	1.47 ± 0.57	4.99 ± 1.10
FTY720	3	0.33 ± 0.03	1.78 ± 0.38	5.41 ± 1.22
	6	0.31 ± 0.07	1.61 ± 0.49	5.25 ± 1.20
	15	0.31 ± 0.07	1.51 ± 0.54	4.93 ± 1.51
对照	0	0.33 ± 0.03	1.82 ± 0.41	5.45 ± 0.87

<sup>a</sup>: 为 30 个胰岛中的胰岛素含量

## 3 讨论

西罗莫司是一种大环内酯物, 主要是通过阻断细胞因子的信号转导来抑制细胞因子介导的 T 细胞增生反应。文献报道西罗莫司对胰岛细胞功能或糖代谢无明显不良作用, 并且可能有利于移植的胰岛细胞存活<sup>[7]</sup>。FTY720 是一种作用机制独特的新型免疫抑制剂, 它并不直接抑制淋巴细胞的激活和克隆增生, 而是调节淋巴细胞的再循环, 使外周淋巴细胞归巢进入淋巴结及集合淋巴组织<sup>[8]</sup>, 还可以抑制激活的淋巴细胞活性。因此, FTY720 可以有效地抑制排斥反应引起的胰岛细胞破坏, 有利于胰岛细胞的长期存活。有研究表明 FTY720 对胰岛细胞无毒性作用, 也不抑制胰岛素的分泌<sup>[9]</sup>。本研究采用不同浓度的 FTY720 和西罗莫司分别与大鼠胰岛细胞共培养, 经胰岛素释放试验检测胰岛细胞对低糖和高糖刺激的反应, 亦证实 FTY720 和西罗莫司并不影响大鼠胰岛细胞胰岛素的分泌。因此, FTY720 和西罗莫司有可能作为临床胰岛细胞移植的主要免疫抑制剂使用。

### [参考文献]

- [1] Ricordi C, Tzakis AG, Carroll PB, et al Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases[J]. *T ransplantation*, 1992, 53(2): 407-414
- [2] Federlin KF, Hering B, Bretzel RG. Islet transplantation: Clinical and experimental[J]. *H om M etab Res*, 1992, 26 (Suppl): 148-151.
- [3] Vorgars F, Vives-Pi M, Somoza N, et al Advantage of using a cell separator and metrizamide gradients for human islet purification[J]. *T ransplantation*, 1996, 61(11): 1562-1566
- [4] Robertson RP, Davis C, Larsen J, et al Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes[J]. *D iabetes Care*, 2000, 23(1): 112-116
- [5] Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(4): 230-238
- [6] 胡远锋, 张洪, 徐静娟, 等. 大鼠胰腺的胰岛分离与纯化[J]. *中华器官移植杂志*, 1990, 11(2): 50-52
- [7] Kneteman NM, Lakey JR, Wagner T, et al The metabolic impact of rapamycin in chronic canine islet graft recipients[J]. *T ransplantation*, 1996, 61(8): 1206-1210
- [8] Pinschewer DD, Ochsnein AF, Odematt B, et al FTY720 immunosuppression impairs effector T-cell peripheral homing without affecting induction, expansion [J]. *J Immunol*, 2000, 164(11): 5761-5770
- [9] Fu F, Hu S, Li S, et al FTY720, a novel immunosuppressive agent with insulinotropic activity, prolongs graft survival in a mouse islet transplantation model[J]. *T ransplant Proc*, 2001, 33(1-2): 672-673

[收稿日期] 2004-03-10

[修回日期] 2004-08-20

[本文编辑] 孙岩