

## · 基础研究 ·

## 紫外线对大鼠胰岛树突状细胞的影响\*

陈东明 唐军民<sup>①</sup> 周茂华 鲍卫汉 唐岩<sup>①</sup> 朱洪荫

北京大学第三医院成形外科研究中心(北京 100083)

【摘要】 目的 探讨紫外线对大鼠胰岛树突状细胞(Dendritic cell, DC)结构和功能的影响。方法 分离大鼠胰岛经紫外线照射后利用免疫组织化学(ABC)方法显示胰岛 $Ia^{+}DC$ ,透射电镜观察其超微结构,同时将处理的胰岛移植于糖尿病小鼠模型。结果 分离胰岛经紫外线照射后内分泌细胞变化不明显, $Ia^{+}DC$ 的突起缩短,着色变浅,电镜观察胞质中形成抗原肽-MHC II 复合物的小泡状结构及吞饮小泡减少,异种移植实验胰岛移植存活期 $10.54 \pm 2.06$ 天,紫外线照射组存活期 $17.58 \pm 1.88$ 天,差异有显著性( $P < 0.05$ )。结论 适量的紫外线照射对胰岛内分泌细胞无明显损伤,DC结构受损,功能受到抑制。异种移植实验表明紫外线照射后胰岛移植存活期延长。

【关键词】 胰岛 树突状细胞 移植

The effect of ultraviolet on dendritic cell of pancreatic islet of rats\* Chen Dongming, Tang Junmin<sup>①</sup>, Zhou Maohua, et al. Research Center of Plastic Surgery, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China. \* Department of Histology and Embryology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of ultraviolet on structure and function of dendritic cell(DC) of pancreatic islet of rats. Methods After islets were radiated by ultraviolet  $Ia^{+}DC$  were showed under avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) method and ultrastructure was observed by electron microscopy(EM), finally, islet were transplanted into mice with diabetes. Results After pancreatic islet of rats were radiated by ultraviolet, the endocrine cells showed intact morphology and normal structure under light and electron microscopy, but dendrite of  $Ia^{+}DC$  changed from long to short and color of  $Ia^{+}DC$  stained by ABC method was from dark to light. DC showed a decrease in vesiculate structure where antigen peptide-MHC-II complex was formed. The survival stage was  $10.54 \pm 2.06$  days in pancreatic islet group,  $17.58 \pm 1.88$  days in ultraviolet radiated group during transplantation experiment. There was a significant difference ( $P < 0.05$ ). Conclusions A proper amount of ultraviolet might not introduced to damage endocrine cell, but may impair structure and function of DC. The results of survival stage of transplantation has been prolonged for another a few day.

【Key words】 Pancreatic Islet Dendritic Cell Transplantation

胰腺和胰岛移植治疗 I 型糖尿病虽取得一定的效果,但创伤较大、供体来源和排斥反应尚需进一步解决<sup>[1]</sup>。近年来异种微囊化胰岛细胞移植治疗 I 型糖尿病愈来愈受到人们的关注,利用穿刺、注射等方式将异种胰岛细胞或微囊化胰岛细胞植入穴位或皮下、腹腔、静脉等处<sup>[2,3]</sup>,具有创伤小、供体来源较多的特点,但异体免疫排斥反应仍存在<sup>[2,3]</sup>。

树突状细胞(Dendritic cell, DC)是抗原呈递功能最强的抗原呈递细胞(Antigen-Presenting Cells, APC),通过活化 T 细胞而激活移植排斥反应供体 DC 的迁移特性利于免疫信息在淋巴样组织和非淋巴样组织中的传递,引起排斥反应的发生<sup>[4,5,6]</sup>。如在移植前利用一些方法控制 DC 引起的免疫反应可能会延长胰岛移植物的存活期。本实验根据 DC 易受理化因素影响的特点<sup>[5,6]</sup>,利用紫外线照射供体胰岛研究紫外线对胰岛 DC 结构的影响,同时进行胰岛异种移植探讨紫外线对胰岛 DC 功能的影响,

为微囊化胰岛异种移植奠定理论基础。

## 材料和方法

一、胰岛的分离与纯化<sup>[3]</sup> 选 90 只 2~3 个月、体重 250~300g 雄性 Wistar 大鼠,由北京大学医学实验动物科学部提供,一级动物。随机分为紫外线照射组 30 只和对照组 60 只,打开腹腔,于近肝门处胆总管插入细硅胶管至胰管,开胸放血处死大鼠。经硅胶管注入 10ml V 型胶原酶(0.5mg/ml),迅速摘取胰腺,37℃消化 10 分钟,经 23%、20%、11% Ficoll 密度梯度离心纯化后,收集胰岛,用 Dithizone 染色并鉴定。

二、紫外线照射实验 分离提纯胰岛悬液于培养皿中用 SMZ 型紫外线荧光灯照射,波长 2537Å,照射剂量为 0.108 J/cm<sup>2</sup>。对照组不照射。

三、胰岛标本制备 ① Bouin 固定,石蜡切片,HE 和醛品红-Mallory 染色观察胰岛细胞的改变。② 冰冻切片 利用免疫组织化学方法(ABC 法)显示胰岛中  $Ia^{+}DC$ 。③ 1.25% 戊二醛固定超薄切片透射电镜

\* 国家自然科学基金资助项目 编号 39070827

① 北京大学医学部组织学与胚胎学系 北京 100083



观察胰岛内分泌细胞及 DC 的超微结构。

四、糖尿病模型的制备与分组 选体重 200 ~ 250g 雄性 C57BL/6 小鼠 30 只。按 270mg/kg 腹腔注射 0.88% 链脲霉素 (Sigma, pH4.2 ~ 4.5 柠檬酸缓冲液)。48 小时后测空腹血糖 (澳大利亚 Glucostix 血糖测量仪), 血糖 > 21.50 mmol/L 为实验性糖尿病小鼠。随机分为胰岛移植组、紫外线照射胰岛移植组和对照组, 每组 10 只。

五、胰岛异种移植及移植物的排斥 胰岛移植组和紫外线照射组的糖尿病模型小鼠麻醉后在无菌条件下于其右侧开腹, 分离至肾, 在肾腹侧面分离被膜, 分别置入已制备好的各组胰岛。对照组糖尿病模型小鼠不移植。移植后 3 天测定血糖。血糖降至 14.00 mmol/L 以下为有效。血糖不降低或连续两次血糖 > 15.00 mmol/L 以第一次血糖升高为排斥反应的开始。

## 结 果

一、紫外线照射对分离大鼠胰岛 DC 的影响 Ia 阳性细胞胞体为不规则形或椭圆形, 有 2 ~ 4 条初级突起, 初级突起再分支形成较细的次级突起, 胰岛 Ia 阳性细胞类似于淋巴结、脾脏等淋巴器官 Ia<sup>+</sup> DC 的结构<sup>[4,5]</sup> (图 1 见封二)。透射电镜观察 DC 分布于血管周边, 细胞体为椭圆形, 核较大, 不规则, 一侧可见较多的切痕, 染色质多位于核膜内侧, 核仁明显, 细胞质较少, 可见线粒体、核糖体, 粗面内质网及大小不等的吞饮小泡, 未见 Birbeck 颗粒, 但有大量的圆形小泡状结构分布于细胞膜附近 (图 2 见封二)。经紫外线照射后大鼠胰岛 DC 的突起缩短, 胞体变化不明显 (图 3 见封二)。胞质内线粒体、粗面内质网数量明显减少, 核糖体较丰富, 分布于细胞膜周边的圆形小泡状结构减少 (图 4 见封二)。

二、异种移植后的效果及移植物功能存活时间 糖尿病小鼠在移植前血糖均为  $23.34 \pm 2.96$  mmol/L。移植有效的胰岛移植组与紫外线照射组均在移植后第 2 ~ 3 天血糖开始下降。胰岛移植组平均存活  $10.54 \pm 2.06$  天, 紫外线照射组平均存活  $17.58 \pm 1.88$  天, 紫外线照射组较胰岛移植组移植物存活期延长 ( $t = 11.224, P < 0.05$ )。

## 讨 论

一、胰岛 DC 的鉴定 根据非淋巴组织 DC 表面标志和形态与淋巴组织 DC 表面标志和形态相似、存在于非淋巴器官的间质中及所有 DC 均表达 Ia 抗原的特性<sup>[5,6]</sup>, 利用 ABC 法显示胰岛 Ia 阳性细胞。本实验结果表明胰岛中存有少量 Ia 阳性的树突样细胞, 分布于胰岛血管周围的间质中。电镜观察到的圆形小泡状结构可能是富含主要组织相容性复合体 (Major Histocompatibility complex, MHC) II 类抗原

的细胞内区室 (Major Histocompatibility complex class II compartment, MHC II C)<sup>[5,6,7]</sup>, MHC II C 的含量与抗原呈递功能的强弱有关<sup>[5,6]</sup>。胰岛 DC 小泡状结构与吞饮小泡较多可能是 DC 提呈抗原功能活跃的表现。近年来虽有文献报道胰岛中 DC 的存在, 但极少见到对 DC 结构的描述, 本实验详细的描述了胰岛 DC 的光电镜结构, 为胰岛 DC 研究奠定了基础。

二、适量的紫外线照射对胰岛内分泌细胞无明显损伤, DC 结构受损, 功能受到抑制。本实验根据紫外线照射剂量预实验的结果选用照射剂量 0.108L/cm<sup>2</sup> 为实验条件。

动物 Ia 抗原是人类 MHC II 类抗原, MHC II 类抗原分布于树突状细胞、巨嗜细胞、淋巴细胞, 在抗原呈递过程中起重要作用<sup>[5,6]</sup>。经紫外线照射后 Ia<sup>+</sup> DC 及 DC 胞质中吞饮小泡及小泡状结构的减少表明其结构发生了改变, 功能受到抑制。异种移植后, 紫外线照射组移植物存活期明显延长可能是由于供体胰岛 DC 结构的变化, 使受体介导的经胞吞 (receptor-mediated endocytosis) 和吞噬作用 (phagocytosis) 摄取的外源性抗原在 MHC II C 中降解、加工、并与 MHC-II 分子结合形成抗原肽-MHC II 复合物, 使其表达于细胞表面的抗原呈递能力<sup>[6,7]</sup>减弱, 引起宿主 (受体) 对异型抗原识别能力下降, 从而减缓了对移植物的排斥使其存活时间延长。当 DC 功能恢复后, 又可刺激宿主 T 淋巴细胞激活免疫反应而引起排斥反应的发生。这里不能排除胰岛内分泌细胞功能下降引起血糖和尿糖升高的因素。

DC 在呈递抗原的过程中分泌一些细胞因子如 TNF, IL-1, IL-2 等。TNF-介导胰岛 B 细胞的破坏使糖尿病加重, 在 I 型糖尿病的发生中 DC 起重要作用<sup>[4,8]</sup>。本实验探讨抑制 DC 呈递抗原的方法为胰岛细胞异种移植奠定理论基础。

## 参 考 文 献

- 1 江启俊. 胰腺与胰岛移植. 哈尔滨医科大学学报, 1983, 12: 85-88.
- 2 Zhou Maohua, Chen Dongming, Yao Qi, et al. Microencapsulation of rat prolongs xenograft survival in diabetic mice. Chinese Medical J, 1998, 111: 394-397.
- 3 江枫勤, 任青华, 张玉昆, 等. 微囊化胰岛移植与胰岛素注射对实验性糖尿病大鼠血液流变学的影响. 山东医科大学学报, 1999, 30: 295-297.
- 4 袁正隆. 树突状细胞与自身免疫性疾病的研究进展. 国外医学免疫学分册, 1998, 21: 318-322.
- 5 Banchereall J and Steinman RM. Dendritic cells and control of immunity. Nature 1998, 392: 245-242.
- 6 唐军民, 张薇. 树突状细胞. 解剖学报, 1993, 24: 332-336.
- 7 Peter PJ, Neefies JJ, Oorschot V, et al. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi Complex for transport to lysosome compartments. Nature, 1991, 349: 669-676.
- 8 谢志芳. 树突状细胞摄取加工外源性抗原的路径及机理研究进展. 国外医学免疫学分册, 1998, 21: 291-294.



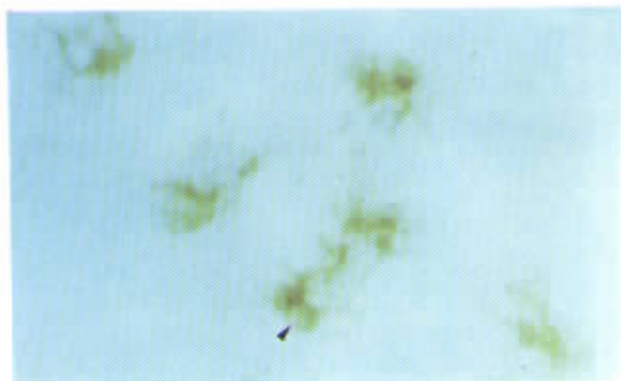


图1 分离提纯大鼠胰岛Ia树突状细胞(▲),ABC法,400 $\times$ 。

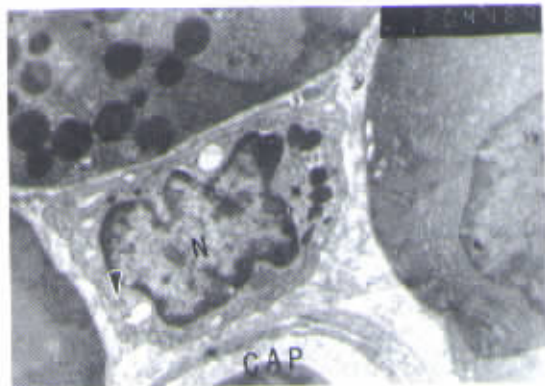


图2 分离提纯大鼠胰岛树突状细胞超微结构 CAP毛细血管,N细胞核,▲小泡状结构,透射电镜 7200 $\times$ 。

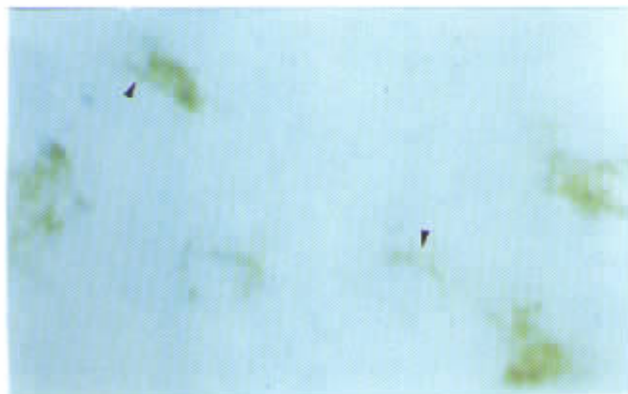


图3 紫外线照射后分离提纯大鼠胰岛Ia树突状细胞(▲),ABC法,400 $\times$ 。

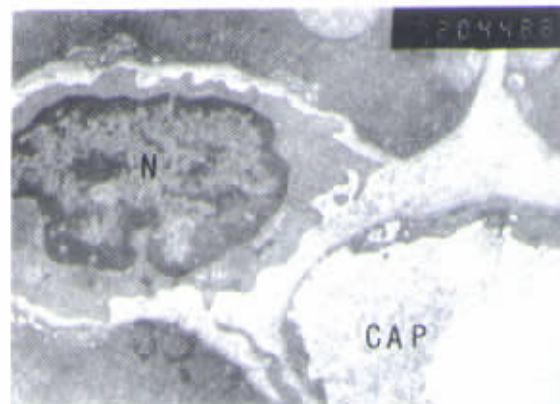


图4 紫外线照射后分离提纯大鼠胰岛树突状细胞超微结构。CAP毛细血管,N细胞核,透射电镜 7200 $\times$ 。

### 紫外线对大鼠胰岛树突状细胞的影响

万方数据

(此页见 245 页)