

## 三维立体培养 MIN-6 $\beta$ 细胞调节 I 型糖尿病小鼠血糖水平的实验研究

朱沙俊<sup>1,2</sup>,袁骁祺<sup>3</sup>,王雷<sup>1</sup>,王志伟<sup>1</sup>,钱海鑫<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南通大学附属医院普外科,江苏 南通 226001;<sup>2</sup>苏州大学附属第一医院普外科,江苏 苏州 215001;<sup>3</sup>上海市第十人民医院普外科,上海 200070)

**[摘要]** 目的:探讨 MIN-6  $\beta$  细胞经人工合成丝素-IV 型胶原支架三维立体培养后用于移植治疗 I 型糖尿病的新方法。方法:冷冻干燥法制备丝素-IV 型胶原支架并检测,将 MIN-6  $\beta$  细胞种植于丝素-IV 型胶原支架中三维培养,观察细胞定植及细胞活力。将种植有 MIN-6  $\beta$  细胞复合培养的丝素-IV 型胶原支架移植入 I 型糖尿病小鼠腹腔,监测对比其血糖变化情况和胰岛素的表达。结果:丝素-IV 型胶原支架为不规则片层结构与多孔相结合的结构,各支架三维培养组效果均明显优于传统二维平面培养组,差异存在统计学意义( $P < 0.05$ ),各支架复合培养组移植入糖尿病动物体内后的降血糖效果与作用时间均要优于无支架组,差异存在统计学意义( $P < 0.05$ )。移植组中 MIN-6  $\beta$  细胞胞浆内存在有特异性棕黄色受染区域,证实存在胰岛素表达。结论:丝素-IV 型胶原支架有良好的生物相容性且有利于 MIN-6  $\beta$  细胞的生长定植及功能表达。

**[关键词]** 丝素蛋白;IV 型胶原;糖尿病;胰岛素

**[中图分类号]** R318.14

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)02-176-06

doi:10.7655/NYDXBNS20160210

## The study of controlling T1D Mice's blood glucose by co-culturing MIN-6 $\beta$ cells on the 3D scaffold

Zhu Shajun<sup>1,2</sup>, Yuan Xiaoqi<sup>3</sup>, Wang Lei<sup>1</sup>, Wang Zhiwei<sup>1</sup>, Qian Haixin<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001; <sup>2</sup>Department of General Surgery, the First Affiliated of Soochow University, Suzhou 215001; <sup>3</sup>Department of General Surgery, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the new method of curing the type I Diabetes by cultivating and trans-planting the composite artificial scaffold of MIN-6  $\beta$  cells. **Methods:** Silk-collagen type IV scaffold was prepared by the method of freeze-drying. We implant MIN-6  $\beta$  cells on the silk-collagen type IV scaffold and then observe the distribution situation of the growing cells and the vitality differences between those cells that growing on the ordinary plane and the composite scaffold. Reaction difference between those cells was compared. After transplantation, the change of the blood glucose level was monitored and the function of cell secretion was tested. **Results:** More  $\beta$  structure appeared after the silk-collagen type IV scaffold cross-linked by the methanol. The vitality of those cells cultivated on the scaffold was obviously better than those on the ordinary plane ( $P < 0.05$ ). Both groups had a good stimulation reaction on both low & high concentration glucose, and the scaffold groups had a better cell secretory function than that of the ordinary plane groups ( $P < 0.05$ ). MIN-6  $\beta$  cells were dyed to brown and the cells still had a nice insulin secretory function. **Conclusion:** MIN-6  $\beta$  cells which are three-dimensionally cultivated by the silk-collagen type IV scaffold have better vitality and relatively long-lasting insulin secretory function.

**[Key words]** silk protein; silk-collagen type IV; diabetes; insulin

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(02):176-181]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81471801)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: qianhaixin@hotmail.com

糖尿病是严重危害人类健康的代谢性疾病,胰岛细胞移植能有效控制糖尿病患者血糖水平及并发症,甚至为其治愈提供了可能<sup>[1]</sup>,然而临床应用中胰岛供体来源短缺、胰岛的提取效率不足、炎症介

导的宿主反应以及自体免疫性疾病的复发等问题严重影响其临床推广。近年来通过胰岛素分泌细胞移植治疗糖尿病成为新的热点,经基因工程构建胰岛素分泌细胞,体外培养后移植治疗糖尿病能够有效缓解胰岛供体来源短缺问题。虽然目前体外培养技术一再改进,但是细胞移植前培养时的细胞死亡丢失和移植后细胞的功能及活力的逐渐减弱仍然是胰岛素分泌细胞移植治疗 I 型糖尿病的一大阻碍<sup>[2]</sup>。胰岛素分泌细胞移植领域目前面临的问题有如下几方面:首先,基因工程制备胰岛素分泌细胞功能不够完善;其次是移植后细胞周围组织间的血管不易形成;另外移植后炎症的发生以及自身免疫介导的细胞破坏对细胞效能发挥存在着极大的影响。

近年来,通过将细胞载入人工或者生物材料后移植可以大大提高移植细胞效能的发挥。生物材料支架可以为细胞生长提供三维培养环境,便于细胞间营养物质的传输、生长因子的供给和免疫反应的抑制<sup>[3-4]</sup>。丝素蛋白是一种具有良好生物相容性和生物降解性的细胞外基质材料,能够为细胞的定植、生长、繁衍、新陈代谢、新组织形成提供支持。丝素蛋白支架的降解产物不会对细胞繁殖产生不利的影响;其降解速度与细胞的增殖速度相匹配;具有一定的柔韧性,同时又能与机体组织紧密贴合,又不会对机体组织造成机械损伤,是构建体外生物支架的良好材料。

本实验将 MIN-6  $\beta$  细胞和丝素-IV 型胶原复合支架构建体外细胞三维培养体系,观察  $\beta$  细胞的定植生长及其胰岛素分泌功能的变化,并监测 MIN-6  $\beta$  细胞定植入复合人工支架三维培养后再移植对 I 型糖尿病小鼠血糖水平的控制,为糖尿病的细胞移植治疗提供有益的探索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康成年 C57BL/6J 小鼠,体重 25~30 g[南通大学实验动物中心提供,动物许可证号:SYXK(苏)2012-0031,实验符合动物实验标准]。生丝、IV 型胶原蛋白、四甲基偶氮唑盐 MTT, Sigma 公司,美国), DMEM 低糖培养基(Hyclone 公司,美国);胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco 公司,美国),小鼠超敏胰岛素 ELISA 试剂盒(Mercodia),抗小鼠胰岛素抗体(Abcam 公司,英国),细胞培养皿、培养瓶(Corning 公司,美国),真空冷冻干燥机(Thermo 公司,美国),扫描电镜、台式冷冻离心机(HITACHI 公司,日本),

Nexus870 型傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet 公司,美国),电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司,中国),高压灭菌机、超低温冰箱(SANYO 公司,日本),正置、倒置显微镜(Olympus 公司,日本),CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(Nuair 公司,美国),体视显微镜(Leika 公司,德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 丝素-IV 型胶原支架(SF-C)的制备与检测

生丝脱胶后得到纯丝素纤维,干燥后得到丝素蛋白纤维,制备 2 wt% 丝素溶液(SF)。加入 IV 型胶原蛋白 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  得到 SF-C1 混合溶液。同法加入 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IV 型胶原蛋白得到 SF-C2 混合溶液,制成相同大小的支架组。将经过甲醇交联处理的支架置于烘箱烘干,粘帖样本,喷金后行扫描电镜观察并拍照,取 10 个不同视野,每张照片测 10 处孔径,分别根据所得数据计算得孔径平均值和标准偏差。本实验中孔隙率的测定采用液体替换法。

#### 1.2.2 胶原支架与小鼠 MIN-6 $\beta$ 细胞共培养及电镜观察

小鼠胰岛  $\beta$  细胞株 MIN-6 继代培养于含 10% FBS、2 mmol/L 谷氨酰胺的 DMEM 培养基(37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱),每日换液,倒置显微镜观察其生长情况。培养皿中细胞基本达到 80% 时胰酶消化,15 mL 离心管离心。行细胞计数以确定细胞种植量,用吸管加入至预处理的支架上,放入 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱孵育 2 h。取出各加入 150  $\mu\text{L}$  的培养基,放入 37 $^{\circ}\text{C}$  温箱培养,隔天半量换液。共培养第 7 天取出支架,PBS 轻洗 3 次,4% 戊二醛固定 24 h。生理盐水漂洗 3 遍。1% 锇酸固定 2 h。生理盐水轻洗 3 遍。酒精梯度脱水后干燥粘帖样本后喷金。扫描电镜观察并拍照记录。

#### 1.2.3 MTT 细胞活力检测

分别在共培养第 3、7、10 天时按组分别吸去培养基,PBS 洗 2 遍。每孔加入 MTT 100  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h。吸除反应液,再每孔加入二甲亚砷 100  $\mu\text{L}$ ,室温振荡 10 min。多功能酶谱仪 490 nm 检测,重复 3 次。

#### 1.2.4 葡萄糖刺激试验

胶原支架与小鼠 MIN-6  $\beta$  细胞共培养第 7 天吸去培养液,加入 KRB 缓冲液,37 $^{\circ}\text{C}$  预培养 1 h。吸去缓冲液,加入不同浓度的 KRB 缓冲液(低糖含 2.5 mmol/L 葡萄糖无血清培养基及高糖含 16.7 mmol/L 葡萄糖无血清培养基)继续 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 1 h。将缓冲液收集放入-80 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存待用。测试前 30 min 将收集液和试剂盒取出,平衡至室温。以

1:10 配好酶结合物稀释液,以 1:20 配好双蒸水稀释洗涤液。96 孔板中每孔加入 10  $\mu\text{L}$  标准品和样本。每孔加入酶结合物稀释液 100  $\mu\text{L}$ ,在室温下摇床反应 2 h。每孔 350  $\mu\text{L}$  洗涤液洗 6 遍。每孔加入 200  $\mu\text{L}$  显色液并避光孵育 15 min。每孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止液并充分混匀。多功能酶谱仪 450 nm 测量结果。

### 1.2.5 支架及细胞移植治疗糖尿病小鼠并检测

取 12~16 周重约 24 g 左右的 C57BL/6J 小鼠 45 只,其中 23 只为雄鼠,随机分为 9 组( $n=5$ ),将 160 mg/kg 的 STZ 注射入各组小鼠腹腔,健康组不予处理,72 h 后开始监测血糖,以 7 d 后空腹血糖达到 20 mmol/L 为 I 型糖尿病小鼠模型。移植前小鼠以 3%戊巴比妥钠按 50 mg/kg 腹腔注射麻醉。糖尿病小鼠麻醉后固定消毒,手术进腹。第 III 组模型小鼠按照预定细胞量直接将细胞悬液注射至肝左叶包膜下。同样麻醉方法于 IV、V、VI、VII、VIII、IX 组,手术进腹,将体外共培养 7 d 的支架分别种植于腹腔。移植后前 3 d 每日测定糖尿病小鼠空腹血糖,第 4

天开始每 3 d 测定 1 次糖尿病小鼠空腹血糖。移植后第 10 天处死实验小鼠,取出移植物,常规行石蜡包埋切片,EnVision 试剂盒(HRP/R)免疫组化,DAB 显色 8~12 min。苏木素染色,热水蓝化。吹干后,树脂封片,显微镜镜检。

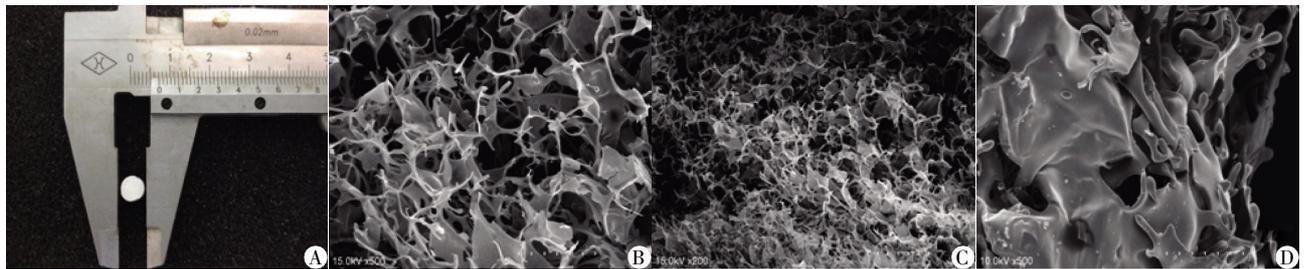
### 1.3 统计学方法

所有数据均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS19.0 软件进行单因素方差分析和重复测量方差分析。以  $P \leq 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 丝素-IV 胶原支架的物理参数

以 96 孔板为模具,按分组制备支架,得大小约 0.15  $\text{cm}^3$  圆柱体(图 1A),扫描电镜观察结果示:支架微孔孔径为  $(40 \pm 23) \mu\text{m}$ ,孔隙率  $(73.50 \pm 3.69)\%$ ,分布均匀,形态不规则多边形,横截面与纵截面基本无差别,去薄膜的支架顶层结构与支架侧面结构有明显差异(图 1)。



A: 支架大体结构示意图;B: SEM 内部微孔结构示意图;C: SEM 支架顶部结构示意图;D: SEM 支架侧面结构示意图。

图 1 丝素-IV 型胶原支架的化学结构表征(B、D,  $\times 500$ ; C,  $\times 200$ )

Figure 1 the characterization of the silk-collagen type IV Scaffold(B、D,  $\times 500$ ; C,  $\times 200$ )

丝素蛋白  $\beta$  折叠的酰胺 I 吸收带为 1 640~1 620  $\text{cm}^{-1}$ ,酰胺 II 为 1 529~1 517  $\text{cm}^{-1}$ ,IV 胶原蛋白的特征性吸收带在 1 700~1 400  $\text{cm}^{-1}$ 。甲醇交联处理促进了支架中蛋白二级  $\beta$  折叠结构的形成(图 2)。

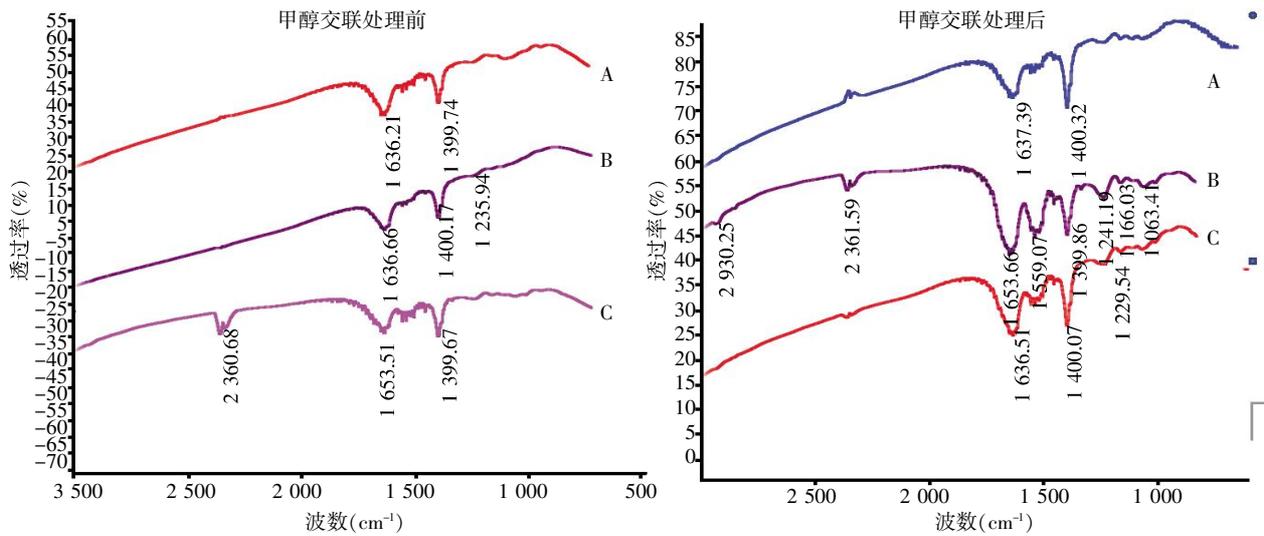
### 2.2 MIN-6 $\beta$ 细胞与支架三维共培养及检测

图 3 所示第 7 天时与各组支架共培养的 MIN-6  $\beta$  细胞行扫描电镜观察,可见细胞增殖较明显,在支架上仍保持良好的细胞形态,细胞紧密黏附并沿支架微结构生长。

分别为以细胞量  $2 \times 10^4$ /孔及  $4 \times 10^4$ /孔种植于各支架组于 3、7、10 d 行 MTT 检测所得细胞活力值,经重复测量方差分析结果显示,各组别 3 个时间点的细胞活力不同,不同浓度的 3 个时间点的细胞活力也不同, $P$  值均  $< 0.01$ (图 4)。各组别、各浓度单因素方差分析结果显示各组三维支架复合培养的 MIN-6

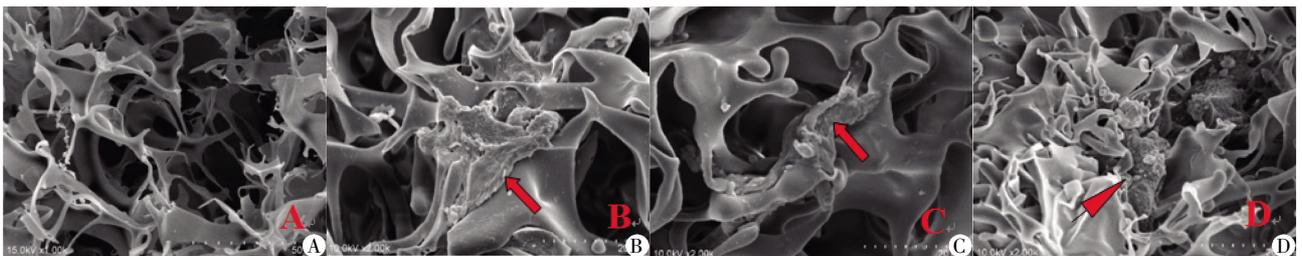
$\beta$  细胞的细胞活力要明显优于传统平面培养的细胞活力值( $P < 0.05$ ),其中,细胞量为  $2 \times 10^4$ /孔的亚组的 OD 值 3、7、10 d 呈持续上升趋势,而在细胞量为  $4 \times 10^4$ /孔的亚组中,其 OD 值在 3、7 d 呈上升趋势,但是从第 10 天开始无明显上升趋势,此外,各组平面培养的细胞其 OD 值呈下降趋势。

将 MIN-6  $\beta$  细胞种植于各组支架后第 7 天行葡萄糖刺激试验,并与传统二维平面培养的 MIN-6  $\beta$  细胞相比较。以细胞量  $2 \times 10^4$ /孔种植于各支架组,分别经浓度为 2.5 mmol/L 和 16.7 mmol/L 的葡萄糖 KRB 缓冲液孵育,小鼠超敏胰岛素试剂盒检测胰岛素释放量。结果显示,各组均能对低浓度和高浓度的葡萄糖有良好的刺激反应,支架组与二维平面培养组相比较有明显差异( $P < 0.05$ ,图 5)。



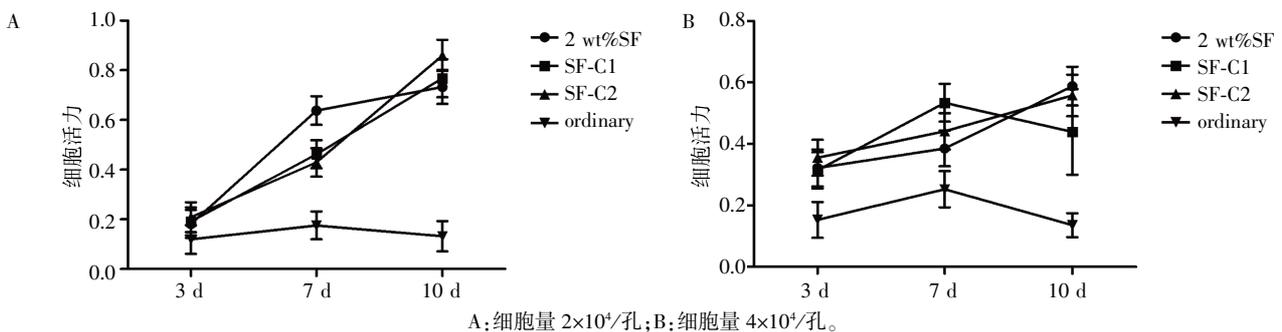
A: 2 wt% 丝素蛋白(SF) 支架; B: 加入 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IV 型胶原蛋白的 2 wt% 丝素-IV 胶原支架(SF-C2); C: 加入 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IV 型胶原蛋白的 2 wt% 丝素-IV 型胶原支架(SF-C1)。

图 2 甲醇交联处理前后各支架的红外光谱图  
Figure 2 The infrared spectra results of the scaffolds



A: 未种植细胞的空白对照支架组, 支架为 2 wt% SF 支架( $\times 1000$ ); B: MIN-6  $\beta$  细胞种植于 2 wt% SF 支架( $\times 2000$ ); C: MIN-6  $\beta$  细胞种植于 SF-C1 支架( $\times 2000$ ); D: MIN-6  $\beta$  细胞种植于 SF-C2 支架( $\times 2000$ )。箭头所指处为种植于支架上的 MIN-6  $\beta$  细胞。

图 3 第 7 天行扫描电镜观察 MIN-6  $\beta$  细胞在支架生长情况  
Figure 3 Scanning electron microscopy of the MIN-6  $\beta$  cell in the scaffolds



A: 细胞量  $2 \times 10^4$ /孔; B: 细胞量  $4 \times 10^4$ /孔。  
图 4 不同支架组与平面培养组培养 MIN-6  $\beta$  细胞 MTT 检测结果  
Figure 4 MTT results of the MIN-6  $\beta$  cell cultured by different methods

### 2.3 移植治疗后对糖尿病小鼠血糖水平的影响

移植后 27 d 内连续监测实验组及对照组糖尿病小鼠的空腹血糖。将实验组数据合并后进行重复测量方差分析, 结果显示, 实验组与对照组糖尿病小鼠的血糖值在不同时间点上差异明显 ( $P < 0.01$ ), 各实验组之间小鼠的血糖值在不同时间点上也有存

在统计学差异。将  $4 \times 10^4$  MIN-6  $\beta$  细胞种植于肝包膜下的糖尿病小鼠血糖在移植 2 d 时开始下降 ( $P < 0.05$ ), 第 6 天开始血糖接近于正常小鼠血糖水平 ( $P > 0.05$ ), 但从第 15 天开始血糖水平逐渐上升 (18 d 时  $P < 0.05$ ); 各支架移植组 (细胞量  $2 \times 10^4$ /孔) 的糖尿病小鼠血糖水平 6 d 前下降速度不如直接移植组,

但是第 9 天起血糖水平开始下降并部分接近于正常水平,且在监测的 27 d 内未发现明显上升趋势(图 6)。

### 2.4 移植物的组织学检测

于移植后第 10 天将实验组小鼠处死并取出移植物。移植物已黏附固定于小鼠肠壁上,肉眼观周围组织无明显炎症坏死反应,组织切片行 HE 染色后可见少量微小血管附着,移植物周围包裹有少量炎症细胞及成纤维细胞。移植物行胰岛素免疫组化检测结果:移植物内 MIN-6  $\beta$  细胞与丝素-IV 型胶原支架相互结合生长,细胞周围有特异性胰岛素抗体受染区域(图 7)。可见 MIN-6  $\beta$  细胞与各组支架融合良好且沿支架生长,并有良好的胰岛素分泌功能。

## 3 讨论

在本实验中,制备了适合 MIN-6  $\beta$  细胞生长的

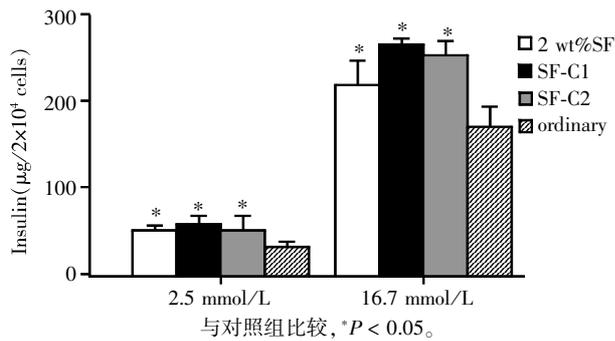


图 5 各组在不同浓度葡萄糖刺激下的胰岛素分泌量  
Figure 5 Cell response to the glucose stimulation at low and high concentration

三维培养支架,在扫描电镜下可见丝素-IV 型胶原支架具备良好的互相贯通的空隙和较高孔隙率,这些特征使得支架拥有相对较高的表面积。以往的细胞培养结果显示,经过 7 d 平面培养的 MIN-6  $\beta$  细胞生长空间拥挤,如不进行传代则将不利于其继续生长增殖从而影响其代谢及分泌功能。而植入丝素-IV 型胶原支架的 MIN-6  $\beta$  在体外培养 7 d 后,扫描电镜显示细胞与支架紧密连接,并沿着支架结构团簇生长,部分细胞爬出支架生长,细胞在三维支架中仍保持了其良好生长形态,细胞生长代谢的能力要优于传统的平面细胞培养。

正常胰腺组织中,胰岛细胞周围的细胞外基质通常含有 I 型胶原、IV 型胶原、层黏连蛋白和纤连蛋白等作为细胞外基质的结构支持,其作用主要是起到调节细胞的黏附能力和激活细胞内、细胞间信号传导通路<sup>[5-6]</sup>。传统的胰岛细胞移植之前必须先

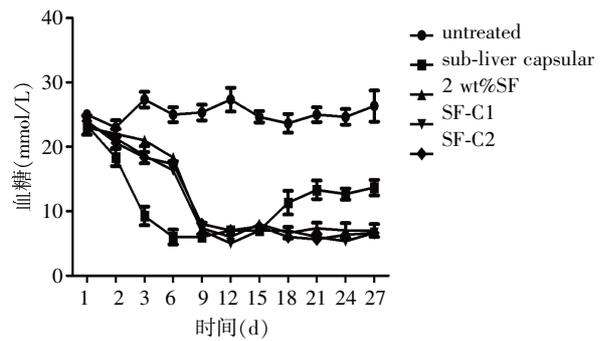
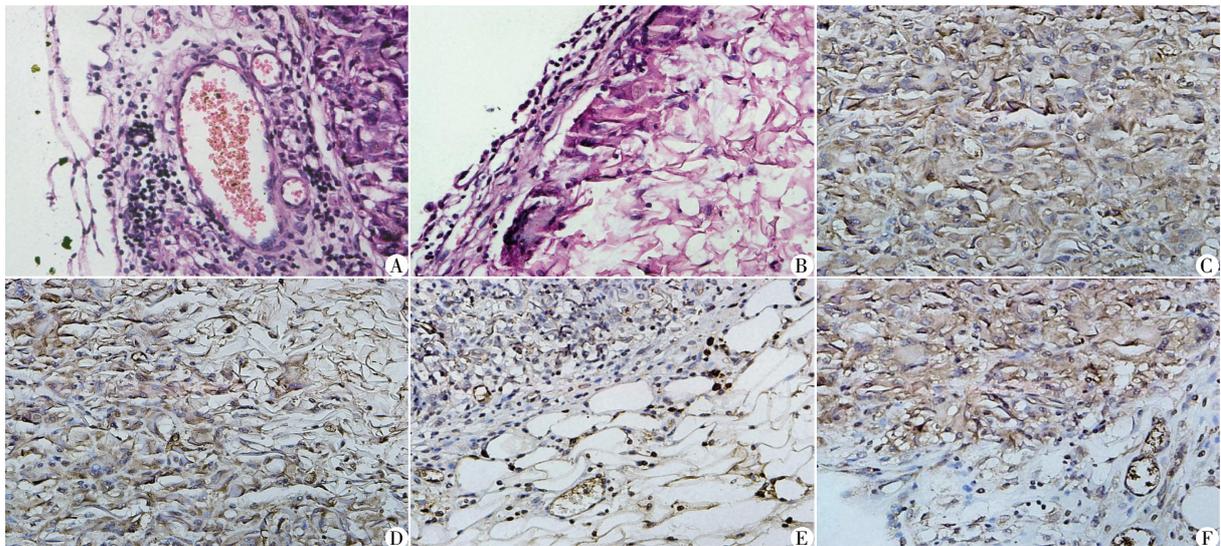


图 6 移植组和未移植组糖尿病小鼠 27 天的空腹血糖值  
Figure 6 The fasting glucose of the diabetic mice in different groups



A: 为移植物周围附着的新生微小血管;B: 移植物周围包裹的成纤维细胞及少量炎症细胞;C: SF 支架;D: SF-C1 支架;E: SF-C2;F: 无细胞种植的空白对照支架组。

图 7 移植区域免疫组化检测(A、B,  $\times 200$ ; C、D、E、F,  $\times 400$ )

Figure 7 The immunohistochemical detection results in the implanted area (A、B,  $\times 200$ ; C、D、E、F,  $\times 400$ )

胰岛细胞的分离纯化步骤,由于破坏了原有的脉管系统和细胞之间的连接,影响了细胞的生长代谢等功能,从而一定程度上降低了细胞移植的成功率。在各种细胞外基质中,IV型胶原蛋白作为主要成分,是促进细胞黏附、增殖、维护胰岛素分泌功能的关键因素<sup>[7-9]</sup>。因此,在本实验中加入IV型胶原蛋白到丝素蛋白溶液中以期望达到促进细胞黏附、生长代谢及胰岛素分泌功能。在葡萄糖刺激试验中,以低浓度和高浓度葡萄糖培养基为梯度,测得的结果中丝素-IV胶原支架组的胰岛素分泌量要明显高于其他各组。丝素-IV胶原支架组相对单纯丝素支架组所测得的胰岛素分泌量较高,其MIN-6 $\beta$ 细胞分泌功能的调节变化可能是与丝素氨基酸的特有机理以及添加的细胞外基质导致的整合蛋白信号的调节<sup>[10]</sup>的联合作用有关。此外,有研究表明,经生物材料封装后的胰岛细胞中的去分化因子要明显低于未封装的胰岛细胞<sup>[11]</sup>,所以丝素-IV型胶原支架从某种程度上起到了降低细胞去分化的作用,使其较平面培养组有更好且更长效的胰岛素分泌功能。

MIN-6 $\beta$ 细胞与各支架组复合培养后将其移植入I型糖尿病小鼠腹腔,发现单纯MIN-6 $\beta$ 细胞移植组对于糖尿病小鼠的降血糖作用时间约为15d左右,发挥降血糖的作用时间早于支架移植组,但15d后糖尿病小鼠又呈高血糖状态,这可能和移植的细胞量以及细胞种植时与种植后的细胞凋亡及免疫杀伤有关,而各支架移植组尽管在移植后6d才明显出现降血糖作用,但降低血糖作用均可维持至少27d,在以后的实验中将进一步摸索待移植细胞量与支架空间的关联性。10d时处死小鼠,将移植植物取出后行组织学检查我们发现,移植植物周围组织出现少量炎性细胞的聚集,但是能看到移植植物周围组织未发生严重炎性反应或坏死,说明我们选用的支架材料具有低毒性、与组织相容性良好和降解性能佳等优点。胰岛素免疫组化检测结果显示各支架组中所种植的MIN-6 $\beta$ 细胞仍具有较良好的胰岛素分泌功能,从而验证了MIN-6 $\beta$ 细胞能在丝素-IV型胶原支架中良好的生长并较平面培养组有更长效的胰岛素分泌功能。

本实验通过体内外实验均证明了冷冻干燥法制备的丝素-IV型胶原支架具有良好的三维微空间结构及生物相容性,适合MIN-6 $\beta$ 细胞的定植生长。三维立体培养的MIN-6 $\beta$ 细胞有更良好的细胞

活力和更长效的胰岛素分泌功能,MIN-6 $\beta$ 细胞与支架三维共培养后移植入I型糖尿病小鼠腹腔,能够有效控制糖尿病小鼠的血糖水平,且较单纯MIN-6 $\beta$ 细胞移植能发挥更长效的降血糖作用。通过本实验,有望为细胞移植治疗I型糖尿病的提供有益的探索。

#### [参考文献]

- [1] Monnier L, Colette C, Dejager S, et al. Magnitude of the dawn phenomenon and its impact on the overall glucose exposure in type 2 diabetes: is this of concern? [J]. *Diabetes Care*, 2013, 36(12): 4057-4062
- [2] Ahearn AJ, Parekh JR, Posselt AM. Islet transplantation for Type 1 diabetes: where are we now? [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2015, 11(1): 59-68
- [3] Mijke Buitinga, Roman Truckenmüller, Marten A Engelse et al. Microwell Scaffolds for the Extrahepatic Transplantation of Islets of Langerhans [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): 64772-64775
- [4] Pan MX, Hu PY, Cheng Y, et al. An efficient method for decellularization of the rat liver [J]. *J Formos Med Assoc*, 2014, 113(10): 680-687
- [5] Coronel MM, Stabler CL. Engineering a local microenvironment for pancreatic islet replacement [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(5): 900-908
- [6] Jun Y, Kang AR, Lee JS et al. Microchip-based engineering of super-pancreatic islets supported by adipose-derived stem cells [J]. *Biomaterials*, 2014, 35 (17): 4815-4826
- [7] Kaido TJ, Yebra M, Kaneto H, et al. Impact of integrin-matrix interaction and signaling on insulin gene expression and the mesenchymal transition of human beta-cells [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 224(1): 101-111
- [8] Sanlioglu AD, Altunbas HA, Balci MK, et al. Insulin gene therapy from design to beta cell generation [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2012, 14: e18
- [9] Yamamoto T, Mita A, Ricordi C, et al. Prolactin Supplementation to Culture Medium Improves Beta-Cell Survival Transplantation [J]. 2010, 89(11): 1328-1335
- [10] Riopel M, Wang R. Collagen matrix support of pancreatic islet survival and function [J]. *Front Biosci*, 2014, 19(1): 77-90
- [11] Khadra A, Schnell S. Development, growth and maintenance of  $\beta$ -cell mass: Models are also part of the story [J]. *Mol Aspects Med*, 2015, 42(1): 78-90

[收稿日期] 2015-07-19