

肾脏-胰岛序贯移植治疗终末期糖尿病肾病 1 例 并文献复习

刘永 范昱 包尔敦 邱建新 秦燕 谭建明 唐孝达

摘要 目的:探讨国人接受肾脏-胰岛序贯移植的可行性,分析临床应用免疫抑制方案的安全性和有效性。方法:1型糖尿病性尿毒症患者1例,在10个月内先后接受1次肾脏移植和2次胰岛输注,肾脏移植于右侧髂窝,胰岛经门静脉系统注入肝脏。术前应用抗胸腺球蛋白(ATG)或Campath-1H诱导治疗,术后联合应用骁悉、雷帕霉素和低剂量普乐可复预防排斥反应。随访期间观察血清肌酐、血糖水平及其排斥反应、感染等并发症。结果:肾脏移植后移植肾恢复顺利,功能正常,血肌酐维持在 $66 \sim 87 \mu\text{mol/L}$,治疗期间未发生急性排斥反应,2次胰岛移植期间移植肾功能稳定。第一次胰岛输注后,胰岛素用量明显减少,由术前 54 IU/d 降至 18 IU/d ,C肽水平升高,第二次输注后,胰岛素用量进一步降低,现为 12 IU/d ,随访16个月血糖、糖化血红蛋白维持在正常水平,未发生低血糖及其相关的严重并发症。结论:初步结果显示国人行肾脏-胰岛序贯移植是可行的,所用免疫治疗方案安全有效,近期效果良好。

关键词 糖尿病 肾脏 胰岛移植 免疫抑制剂

糖尿病是危害人类健康的主要疾病之一,一旦发展至肾功能不全阶段将加剧内环境的紊乱,降低患者的生存质量和生存时间。临床上,胰岛素可以控制体内血糖水平,但难以与时刻变化的生理需求相适应,低血糖等并发症时常发生;胰腺移植可以治愈糖尿病,但是手术复杂,创伤大,感染及外科并发症等严重限制其深入开展。2000年加拿大Alberta大学报道成人胰岛移植的成功经验^[1],并提出成人胰岛移植的免疫抑制措施-Edmonton方案。为了探索终末期糖尿病肾病治疗手段,验证肾脏-胰岛序贯移植的可行性和有效性,在10个月内我们对1例糖尿病性尿症患者实施1次肾移植和2次胰岛移植,随访16个月显示移植肾脏、胰岛功能良好,现将治疗体会和临床相关的国际进展报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者女,33岁。1992年确诊为1型糖尿病,2003年发现血清肌酐升高达 $414 \mu\text{mol/L}$ 。发病后先后接受口服降糖治疗,术前胰岛素平均用量为 54 IU/d ,空腹血糖波动在 $13.0 \sim 15.0 \text{ mmol/L}$ 之间。术前4个月开始血液透析治疗。糖化血红蛋白 8.5% ,自身抗胰岛素抗体阴性。2次手术(第一、二次胰岛移植)术前群体反应抗体皆为阴性,淋巴毒实验为 $(1\%, 2\%)$ 、 $(1\%, 3\%)$ (各为2个供者)。

1.2 方法

1.2.1 胰岛的制备、纯化和鉴定

1.2.1.1 胰岛的制备与纯化 胰岛的分离和纯化按照Ricordi等^[2]方法加以改进。尸体胰腺原位灌注整块切取,置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ UW保存液中保存、运输。超净工作台内, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下完成对非胰组织清除,胰腺灌注和分割。消化罐内温度 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$,手动振荡循环消化胰岛组织,待大部分胰岛消化分离后以冷RPMI-1640降温、稀释终止消化。收集消化物,COBE机离心,收集纯化的胰岛,镜检后取样鉴定和计数。将消化、纯化的胰岛于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养24h后,改为 $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养备用。

1.2.1.2 胰岛的鉴定 取样双硫脲(DTZ)染色计数胰岛的数量和纯度、AO-PI染色胰岛活性,胰岛数量单位为胰岛当量(IEQ,直径为 $150 \mu\text{m}$ 的胰岛团块计为1个IEQ)。

1.2.2 成人肾-胰岛序贯移植 按照常规方法实施肾脏移植。移植肾开放血供36h后经门静脉肝内移植胰岛。取上腹部经腹直肌切口,分离出胃网膜右静脉,静脉内置管测压,输入胰岛悬液 100 mL ,然后以 50 mL 冲洗液冲洗输液管道及输液袋,再次静脉测压,确定胰岛组织已输入门静脉系统后,关闭切口。第一次胰岛移植后10个月时完成第二次胰岛移植。其中第一次移植69万胰岛当量(约为 1.57 万 IEQ/kg),第二次为45万胰岛当量(约为 1.00 万 IEQ/kg)。

1.2.3 移植后免疫抑制方案 肾脏移植当日及术后第1天应用抗胸腺细胞球蛋白 100 mg 诱导治疗,术后第1天单剂甲基泼尼松龙 240 mg ,同时应用骁悉 1.0 g/d ,雷帕霉素 2 mg/d ,普乐可复 2 mg/d 。术后普乐可复谷值浓度维持于 $2 \sim 5 \text{ ng/mL}$ 以下,雷帕霉素初期谷值浓度维持于 $7 \sim 10 \text{ ng/mL}$,3个月后为 $5 \sim 7 \text{ ng/mL}$,并依据浓度调整免疫抑制剂的剂量,维持性

作者单位:200080 上海市第一人民医院移植泌尿外科(刘永,范昱,包尔敦,邱建新,秦燕,唐孝达);350025 南京军区福州总医院泌尿科(谭建明)

免疫抑制方案不含激素。胰岛移植术后 12 d 因切口感染停用骁悉, 术后 1 个月雷帕霉素剂量调整为 1 mg/d, 普乐可复 1 mg/d。

第二次胰岛移植及术后第 1 天分别予以 Campath-1H 15 mg 诱导治疗, 骁悉为 0.75 g/d, 雷帕霉素和普乐可复用法同第一次移植。

1.2.4 临床指标检测 移植术后至开放饮食前, 每 2 h 检测血糖 1 次, 记录 24 h 液体出入量。开放饮食后, 每天三餐前及睡前检测血糖, 并记录胰岛素用量变化。根据血糖水平调整胰岛素用量。每周测定外周血中 C 肽、胰岛细胞抗体、肝肾功能及普乐可复和雷帕霉素谷值浓度。

2 结果

2.1 胰岛鉴定 两次胰岛移植, 各为 2 个供胰。胰腺经过分离、纯化后共获得 69 万及 45 万 IEQ 胰岛, 经 DTZ 染色鉴定纯度为 95%, AO-PI 荧光染色鉴定活率为 98%。胰岛细胞培养细菌学检查与真菌涂片皆为阴性, 胰岛细胞低糖与高糖刺激试验合格。

2.2 临床疗效

2.2.1 移植肾功能 术后移植肾维持良好功能, 未出现急性排斥反应征象, 血清肌酐水平变化如表 1 所示。二次胰岛移植未对移植肾功能造成任何不良影响, 现血清肌酐为 87 $\mu\text{mol/L}$ 。随访期间尿蛋白始终为阴性。

表 1 移植术后不同时期患者肾脏、胰岛功能变化

移植后 时间	血肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	空腹血糖 (mmol/L)	C 肽(餐前/餐后 2 h) (pmol/L)	胰岛素用量 (IU/d)
1 个月	66	7.4	175/308	29
3 个月	71	6.8	223/367	22
6 个月	82	7.9	480/1 206	18
10 个月	78	7.2	266/333	18
16 个月	87	6.4	396/503	12

注: * 第二次胰岛移植

2.2.2 胰岛功能 移植后不同时期空腹血糖、空腹及餐后 2 h C 肽水平、胰岛素用量见表 1。术后 10 个月时, 空腹血糖水平维持在 7 mmol/L 左右, 胰岛素用量减少到移植前 1/3 水平, 空腹及餐后 2 h C 肽水平较移植前明显升高。第二次胰岛移植术后胰岛素用量逐步减少, 现每天为 12 U。糖化血红蛋白在正常范围内, 胰岛细胞抗体和 IA-2 自身抗体皆为阴性。在整个随访期间未发生严重低血糖等不良事件。

2.2.3 其他临床相关并发症 第一次术后移植肾切口局部感染, 清创后切口二期愈合; 术后 1 个月时出现霉菌感染, 经调整免疫抑制剂和抗霉菌治疗, 患者痊愈。第二次胰岛移植未出现明显外科及感染等并发症。

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病患者的主要并发症, 一旦发

展至尿毒症期将严重影响患者的生存质量和预期寿命。在外科领域, 与单纯肾脏移植比较, 胰-肾联合移植能够更好地纠正和控制此类患者体内紊乱的内环境, 甚至可逆转肾脏基底膜增厚、系膜蓄积等病变, 改善内皮细胞功能^[3-5]。为此 2000 年、2003 年美国糖尿病协会推荐胰-肾联合移植治疗糖尿病性尿毒症。但胰腺移植手术创伤大、并发症多、患者术后须接受较大剂量的免疫抑制剂限制了其推广。Shapiro 等^[6]在成人胰岛移植方面的尝试和成功, 极大促进了胰岛移植领域的发展, 经过近 5 年的临床验证, 尽管还存在许多亟需解决的问题, 胰岛移植的微创、可重复治疗、较低的免疫干预及良好的近期效果等特点受到临床医师和患者的重视, 代表今后糖尿病替代治疗的方向。

临床上, 应用肾脏-胰岛联合移植治疗糖尿病性尿毒症的工作刚刚开始^[7-9]。在欧美国家, 受者多为已行肾脏移植或胰肾联合移植后移植肾功能维持良好但移植胰腺失功的患者, 免疫抑制措施主要为 Edmonton 方案。我中心结合既往单纯胰岛移植的成功经验, 对 1 例 1 型糖尿病性尿毒症患者实施肾-胰岛序贯移植, 在 10 个月的时间内完成 1 次肾脏移植和 2 次胰岛输注, 术后移植肾发挥良好功能, 受者体内内环境维持于正常水平。在治疗方案中, 我们根据 Edmonton 和 Minnesota^[9]的经验, 应用 ATG、Campath-1H 等强效长程的抗体替代抗 CD25 单抗进行诱导治疗, 提高对移植物的免疫保护作用; 加入骁悉进一步降低普乐可复、雷帕霉素等药物的初始(负荷)剂量和治疗窗浓度, 在保证有效免疫抑制的同时, 最大限度减少普乐可复、雷帕霉素对肾脏和胰岛功能的影响。经过 16 个月的临床观察, 患者移植肾功能良好、稳定, 未出现国外报道胰岛移植后蛋白尿的现象^[10]; 空腹及餐后血糖控制良好, C 肽水平较移植前明显提高, 糖化血红蛋白在正常范围内, 未出现针对移植胰岛的自身抗体。第二次胰岛移植对移植肾未造成任何功能的影响。初步提示在我国终末期糖尿病肾病患者中采用序贯方式进行肾脏-胰岛移植治疗糖尿病性尿毒症是安全、有效和可行的。

根据国外经验及我们的初步体会, 我们认为序贯移植优势在于: (1) 在有限的窗口期(国内肾脏移植和第一次胰岛输注间隔时间较短, 我们通常为相隔 36 h 左右)内可以应用大剂量强效免疫抑制剂(如单克隆或多克隆抗体, 甚至是单剂大剂量糖皮质激素), 形成对移植肾的免疫保护作用, 预防近期发生急性排斥反应; 可降低普乐可复、雷帕霉素等药物的初始剂量, 减轻了药物对肾脏、胰岛组织的毒副作用; 有利于诱导针对胰岛组织的免疫低反应状态。(2) 通过培养可以促进胰岛功能的恢复, 剔除低活性的胰岛组织, 在培养过程中可加入蛋白或抗氧化剂则可调节胰岛组织的炎症状态, 提高胰岛对抗缺氧、炎症反应的能力, 有

利于移植组织的植入^[11]。

自 2000 年 Edmonton 方案报道以来,在世界范围内超过 40 个移植中心完成了约 500 例胰岛或(和)其他器官的联合移植,尽管受到分离、纯化等因素的影响,5 年的移植物存活仍欠完美,但良好的耐受性、较高的 1~3 年存活率^[12],显示作为替代治疗有广阔的发展前景。我们的初步尝试也提示肾-胰岛序贯移植是治疗糖尿病性尿毒症的一种有效手段。综合国内外资料,为了进一步提高肾-胰岛移植的临床效果,特别是移植胰岛的功能,下面几个问题将是今后临床和基础研究的重点:(1)现有的技术在分离、纯化过程中有大量的胰岛丢失,总体得率低于 50%,为了提高移植成功率有时 1 个受者就需要 2~3 个供体胰腺,而目前供体严重匮乏,进一步优化胰岛分离、纯化技术提高胰岛得率是关键。在胶原酶 NB 中加入一定比例中性蛋白酶,其内毒素更低,胰岛产量、纯度、活性较 Liberase 更好,有望取代 Liberase^[13]。非离子造影剂碘克沙醇作为梯度介质纯化胰岛的效果优于 Ficoll,也有取代 Ficoll 的趋势^[14]。(2)在胰岛分离、植入过程中,由于氧化应激、炎症损伤,大量胰岛发生凋亡,也是降低移植效率的一个重要因素。实验研究显示茶多酚表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate)^[15]及五肽 V5(pentapeptide V5)^[16]可抑制胰岛细胞凋亡,促进胰岛素的分泌;利用基因技术导入 XIAP、A20^[17-18]可提高胰岛细胞对抗氧化反应和局部炎症损伤,减少胰岛应用数量,提高移植的成活率。(3)优化免疫抑制方案。目前临床上多以 Edmonton 方案为蓝本,尽管已减少普乐可复、雷帕霉素等免疫抑制剂的用量,根据其报道的药物治疗窗浓度,药物的相对用量仍然不低,这或许是造成移植后部分患者出现蛋白尿的原因。不仅如此,最近文献报道^[19],雷帕霉素具有抑制胰岛 B 细胞增殖的不良作用,故改用或联合应用 FTY720、骁悉等无胰岛、肾脏毒性的药物可能是今后发展方向。相信随着胰岛分离、纯化技术的进步、免疫抑制方案的完善,其安全性和有效性将得到进一步验证和巩固,更好地造福于患者。

4 参考文献

- [1] Shapiro A M, Lakey J R, Ryan E A, 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.
- [2] Ricordi C, Lacy P E, Finke E H, et al. Automated method for isolation of human pancreatic islets [J]. *Diabetes*, 1988, 37(4): 413-420.
- [3] Fioretto P, Steffes M W, Sutherland D E, et al. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation [J]. *N Engl J Med*, 1998, 339(2): 69-75.
- [4] Fiorina P, La Rocca E, Venturini M, et al. Effects of kidney-pancreas transplantation on atherosclerotic risk factors and endothelial function in patients with uremia and type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2001, 50(3): 496-501.
- [5] Jukema J W, Smets Y F, van der Pijl J W, et al. Impact of simultaneous pancreas and kidney transplantation on progression of coronary atherosclerosis in patients with endstage renal failure due to type 1 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2002, 25(5): 906-911.
- [6] Shapiro A M J, Ricordi C, Hering B J, et al. International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(13): 1318-1330.
- [7] Toso C, Baertschiger R, Morel P, et al. Sequential kidney/islet transplantation: efficacy and safety assessment of a steroid-free immunosuppression protocol [J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(5 Pt 1): 1049-1058.
- [8] Faradji R N, Froud T, Pileggi A, et al. Islet alone and islet after kidney transplantation at the university of miami: an update [J]. *Transplantation*, 2006, 82(1 Suppl 2): 340-341.
- [9] Hering B, Kandaswamy R, Ansite J, et al. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes [J]. *JAMA*, 2005, 293(7): 830-835.
- [10] Andres A, Toso C, Morel P, et al. Impairment of renal function after islet transplant alone or islet-after-kidney transplantation using a sirolimus/tacrolimus-based immunosuppressive regimen [J]. *Transpl Int*, 2005, 18(11): 1226-1230.
- [11] Marzotati S, Antonidi B, Nano R, et al. Culture medium modulates proinflammatory conditions of human pancreatic islets before transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(11): 2791-2795.
- [12] Feng S, Barr M, Roberts J, et al. Developments in clinical islet, liver thoracic, kidney and pancreas transplantation in the last 5 years [J]. *Am J Transplant*, 2006, 6(8): 1759-1767.
- [13] Bucher P, Mathe Z, Morel P, et al. Assessment of a novel two-component enzyme preparation for human islet isolation and transplantation [J]. *Transplantation*, 2005, 79(1): 91-97.
- [14] Shapiro A M, Ricordi C. Unraveling the secrets of single donor success in islet transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2004, 4(3): 295-298.
- [15] Hara Y, Fujino M, Takeuchi M, et al. Green-tea polyphenol(-)-epigallocatechin-3-gallate provides resistance to apoptosis in isolated islets [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2007, 14(5): 493-497.
- [16] Rivas-Carrillo J D, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, et al. Cell-permeable pentapeptide V5 inhibits apoptosis and enhances insulin secretion, allowing experimental single-donor islet transplantation in mice [J]. *Diabetes*, 2007, 56(5): 1259-1267.
- [17] Emamaullee J A, Rajotte R V, Liston P, et al. XIAP overexpression in human islets prevents early posttransplant apoptosis and reduces the islet mass needed to treat diabetes [J]. *Diabetes*, 2005, 54(9): 2541-2548.
- [18] Grey S T, Longo C, Shukri T, et al. Genetic engineering of a suboptimal islet graft with A20 preserves beta cell mass and function [J]. *J Immunol*, 2003, 170(12): 6250-6256.
- [19] Nir T, Melton D A, Dor Y. Recovery from diabetes in mice by cell regeneration [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(9): 2553-2561.

(收稿: 2008-01-14)