

多种分离纯化大鼠胰岛细胞的实验方法比较

陈创奇, 詹文华, 汪建平, 蔡世荣, 兰平, 吴小剑, 贺德

(中山大学附属第一医院胃肠胰外科, 广东广州 510080)

摘要: 【目的】采用不同的分离或消化方法, 探讨如何提高大鼠胰岛细胞分离纯化后的收获量和质量。【方法】将 25 只供体 SD 雄性大鼠依胰腺分离或消化的方法不同随机地分为 5 组: ① A 组: 胆总管灌注胶原酶 P; ② B 组: 胆总管灌注 Hanks 液; ③ C 组: 胆总管不灌注液体; A、B、C 3 组胰腺直接分次消化; ④ D 组: 胆总管不灌注, 胰腺剪碎后分次消化; ⑤ 对照组: 胆总管灌注胶原酶 P, 胰腺直接单次消化。将分离的胰岛沉淀物用 Ficol1-400 纯化并培养, 再把胰岛细胞移植于糖尿病裸鼠受体腹腔内。【结果】纯化后的胰岛细胞在收获量上 A 和 B 组明显多于对照组或 C 组, 而 D 组最低; A、B 和 D 3 组的纯度均高于对照组或 C 组; 在胰岛成活率方面, A、B、C 3 组均高于对照组或 D 组。移植于糖尿病裸鼠受体体内的大鼠胰岛细胞均可逆转高血糖状态。【结论】经胆总管灌注胶原酶后的大鼠胰腺用分次消化的方法可提高胰岛细胞的收获量、纯度和活性。

关键词: 胰岛细胞; 分离; 纯化; 大鼠; 裸鼠; 异种移植

中图分类号: R657.5; R617; Q959.837

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)02-0118-03

Experimental Comparisons of Several Methods for Isolating and Purifying of Rat Islets of Langerhans CHEN

Chuang-qi, ZHAN Wen-hua, WANG Jian-ping, CAI Shi-rong, LAN Ping, WU Xiao-jian, HE De. (Department of Gastrointestinal and Pancreatic Surgery, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To investigate how to improve the yield and quality of rat islets in isolation and purification. 【Methods】25 male SD rats (islet donors) were randomly divided into 5 groups based on different methods of separation or collagenase digestive approach. ① Islets were isolated using two times digestion by pancreatic ductal injection of collagenase P (group A). ② Hanks solution was injected through the common bile duct into the pancreas, and the distended pancreas directly digested by collagenase P for two times (group B). ③ There was no solution to be injected through the common bile duct into the pancreas, and the pancreas digested directly by collagenase P for two times (group C). ④ The common bile duct didn't need to be injected. The pancreas was directly cut into small pieces and digested by collagenase P for two times (group D). ⑤ The pancreas was directly digested by collagenase P for one time after pancreatic ductal injection of collagenase P (control group). Islets were purified by Ficol1-400 density gradient and cultured, and transplanted into the abdominal cavity of diabetic nude mice. 【Results】The yield of purified islets was much more in group A or B than in group C or control group, and that was the least in group D. The purity of group A, B and D was significantly higher than that of control group or group C, respectively. The survival rate of islets in group A, B and C was significantly higher than that of control group or group D, respectively. Transplanted rat islets could reverse hyperglycemia in the diabetic nude mice. 【Conclusion】After injection of collagenase, the distended pancreas is removed and digested by collagenase for two times. This method can improve the yield, purification and viability of purified rat islets.

Key words: islets of langerhans; separation; purification; rat; nude mice; xenotransplantation

自胰岛素应用以来, 糖尿病死于急性并发症已大为减少, 但慢性并发症却逐渐增多, 病人常因此而致残、致死, 影响劳动力和寿限^[1]。胰岛细胞移植是治愈 1 型糖尿病的一种简单、安全、有效的理想方法, 但目前临床疗效尚不理想, 主要原因在于经分离和纯化后必须有足够数量的活性胰岛细胞以及防治移植后的免疫排斥反应^[2]。近几十年来, 胰岛细胞分离与纯化技术正在不断地得到改善, 但所获得的胰岛细胞在收获量、活性及纯度上仍然不

尽人意^[3]。多数作者从胰岛细胞分离与纯化技术的某一方面作改进并报告其结果, 尽管大鼠胰岛细胞在收获量和质量上较为满意, 但由于没有同时在相同的实验条件下作相关的比较, 其结论的说服力不够强。因此, 本实验将对此作一探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 雄性大鼠作为胰岛细胞供体, 体质量为

收稿日期: 2001-11-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770726); 中山医科大学科研启动基金资助项目(200027)

作者简介: 陈创奇(1969-), 男, 广东普宁市人, 博士生, 主治医师。

200~250 g,由本校动物实验中心提供。雄性裸鼠作为胰岛细胞受体,体质量为20~25 g,由本校肿瘤防治中心动物实验楼提供。Hanks液自行配制,中性红、Ficoll-400、链脲霉素(STZ)、吖啶橙(AO)和碘丙啶(PI)均购于美国Sigma公司,胶原酶P和Hepes购于德国Boehringer Mannheim公司,RPMI 1640培养基、胎牛血清购于Gibco公司。血糖用罗氏公司乐康全2血糖检测仪测定,尿糖用广州市越秀区东方新科技研究所尿糖试剂带测定。

1.2 方法

1.2.1 胰岛细胞分离 SD大鼠用乙醚吸入性麻醉后,心内注射2 g/L中性红5 mL,开腹后找到胆总管。将25只大鼠依胰腺的剪取或消化方法不同随机分为5组,每组5只:①A组:术中钳闭胆总管进入十二指肠处,从胆总管注入1 g/L胶原酶P 6~8 mL,当胰腺肿胀时迅速剪下胰腺。②B组:从胆总管灌注Hanks液6~8 mL后剪取胰腺。③C组:不经胆总管灌注,直接剪取胰腺。上述3组的胰腺组织均先经解剖显微镜下仔细清除脂肪组织、血管和淋巴结,再用眼科镊将其撕成小块,但不剪碎。④D组:胆总管不灌注,胰腺直接剪取后清除脂肪组织,再剪碎成约1 mm×1 mm×1 mm大小。然后分别将4组的胰腺组织采用分次消化的方法进行消化,即把胰腺置入含1 g/L胶原酶P的培养瓶中,于37℃恒温水浴箱中边振荡边消化20~25 min,直至成小颗粒状时,加入4℃含10 mmol/L Hepes的Hanks洗液稀释并终止消化,吸取上层细胞悬液离心收集,而尚未消化的大块组织再转移至0.5 g/L胶原酶P 5 mL中继续消化20~25 min,直至组织呈沙粒状,再终止消化并离心。将先后消化所收集的组织洗3遍。⑤对照组:按照胶原酶P使用说明书的胰岛细胞分离纯化方法作为标准(单次消化方法),即剪取胰腺方法同A组,但不同的是将胰腺置入含1 g/L胶原酶P的培养瓶中于37℃恒温水浴箱中消化45~50 min,直至组织呈沙粒状,再按上述方法终止消化和洗涤。

1.2.2 胰岛细胞纯化 将上述分离的胰岛沉淀物加入3 mL的250 g/L Ficoll-400,充分混匀,随后不连续地缓慢依次加入230 g/L(3 mL)、200 g/L(2 mL)、110 g/L(2 mL)的Ficoll-400,最后加入Hanks洗液3 mL,800 g×10 min离心,吸取110~200 g/L及200~230 g/L界面上的细胞,Hanks洗液洗涤3遍。纯化的胰岛细胞悬浮于含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基中,在37℃、体积分数为

5% CO₂培养箱中培养48 h。每份标本取一定量的悬浮液在倒置显微镜下计数,若见有由两个以上组成的细胞团时则按单个细胞数计算,每份标本重复计算4次,取其平均值;再将平均值换算成整份悬浮液内的胰岛细胞数。

1.2.3 胰岛细胞活性判断 用AO/PI荧光染色法和糖尿病裸鼠受体行胰岛细胞移植法判定胰岛细胞活性。在AO/PI荧光染色时,胰岛活细胞染绿色,死细胞染成红色;胰岛细胞成活率用胰岛活细胞占有胰岛活细胞和死细胞总数的百分比表示,每份标本重复计算4次,取其平均值表示。

1.2.4 建立裸鼠糖尿病模型 向健康裸鼠腹腔内按220 mg/kg剂量注入20 g/L浓度的STZ,注药后1、2、4、6 d测血糖及尿糖,血糖连续超过16.8 mmol/L,尿糖持续(++++)者选为糖尿病模型。

1.2.5 胰岛细胞移植 与供体相对应将受体糖尿病裸鼠分为5组(A、B、C、D和对照组),每组3只。每只裸鼠腹腔内移植大鼠胰岛细胞450~550个。移植次日起第一周每天测1次,而后每周3次采尾静脉血测定血糖,并同时测定尿糖。非空腹血糖连续低于11.2 mmol/L及尿糖阴性,作为移植物功能存活的标准;否则作为移植物功能丧失的指标。

1.2.6 统计学方法 所有实验数据均为计量资料,用均数±标准差表示。用SPSS 8.0 for windows软件进行统计学分析,各组资料的比较采用方差分析F检验,组间比较采用LSD检验。

2 结果

2.1 胰岛细胞收获量、纯度及成活率估计

分离纯化后的胰岛细胞被中性红染成桔红色,镜下表现为大小不一的圆形或卵圆形细胞团和散在细胞,而外分泌组织不着色。纯度在镜下用胰岛细胞数量与外分泌组织量的百分比来估计^[4]。胰岛细胞收获量、纯度和成活率结果见表1。

2.2 胰岛细胞移植

糖尿病裸鼠接受大鼠胰岛细胞移植后,均可逆转术前的高血糖状态,并持续10 d以上,表明移植的胰岛细胞能恢复分泌胰岛素的功能,未受到免疫排斥,是有活性的细胞。

3 讨论

如何提高供体胰岛细胞分离纯化后的收获量和质量是胰岛细胞移植工作者一直追求的目标,也是决定其移植成功与否的关键性因素。当足够数

表 1 25 只 SD 大鼠经分离纯化后的胰岛细胞
收获量、纯度和成活率

Table 1 The yield, purity and survival rate of purified
islets in 25 SD rats

Group	n	Yield(islet)	Purity (%)	Survival rate (%)
Control	5	360±69	84.6±2.4	90.3±1.4
A	5	720±75 ¹⁾	92.9±2.4 ¹⁾	96.2±1.1 ¹⁾
B	5	516±81 ¹⁾	89.4±2.4 ¹⁾	93.6±2.5 ²⁾
C	5	355±66	87.2±3.1	93.6±2.8 ²⁾
D	5	269±25 ²⁾	88.4±2.5 ²⁾	90.6±3.1

One-way ANOVA statistics: 1) Compared with control group, $P < 0.01$; 2) compared with control group, $P < 0.05$

量的活性胰岛细胞植入糖尿病受体后有功能存活, 即能逆转糖尿病的高血糖状态, 并防止或缓解其并发症的发生和发展。自 Moskalewskis 最早创立了胶原酶消化分离胰岛细胞的方法以来, 经过众多学者的技术改进, 胰岛细胞在收获量和质量上有一定程度的提高, 有作者报道应用酶消化方法进行胰岛细胞的分离与纯化, 可取得每只大鼠胰岛细胞数为 $(1\ 012 \pm 231)$ 个, 纯度 90% 以上的好结果^[4]。

本文通过采用不同的分离或消化方法, 在相同的实验条件下操作, 使得各组的实验结果具有可比性, 从而探讨哪种方法有利于提高大鼠胰岛细胞分离纯化后的收获量、纯度和活性。研究发现, 纯化后的胰岛细胞在收获量上 A 和 B 组明显多于对照组或 C 组, 其中 A 组胰岛细胞数最高, 而 D 组最低, 说明经胆总管灌注胶原酶或 Hanks 液可起到机械性扩张、破坏胰腺外分泌腺泡的作用, 同时胶原酶可对外分泌腺泡起初步的消化作用, 有利于胰岛细胞分离^[5]; 另外也说明胰腺分次消化的效果优于单次消化, 换句话说胰腺经过胶原酶的首次消化后将上层细胞悬液及时吸出, 把尚未消化的大块组织再转移至浓度较低的胶原酶中继续消化, 这样可减少胶原酶对已分离出的胰岛细胞的消化和破坏, 从而提高胰岛细胞的收获量^[4]。在胰腺单次消化时必须严格控制好消化时间, 否则可能因为消化时间过短导致分离的胰岛细胞量减少, 消化时间过长则可使胰岛细胞受破坏, 这些都不利于增加细胞的收获量^[5]。在纯度方面, A、B、D 3 组均高于对照组或 C 组, 其中 A 组纯度最高, 对照组最低, 这进一步说明胶原酶分次消化在胰岛细胞分离纯化上的作用总的优于单次消化, 其优点在于能够及早将已消化满意的胰岛细胞吸出, 而单次消化无论对胰岛细胞还是对外分泌组织均作用较为充分, 可能导致部分

已消化的碎片组织混杂在胰岛细胞中, 通过纯化过程难以被清除, 影响了胰岛的纯度。在胰岛细胞成活率方面, A、B、C 3 组均高于对照组或 D 组, 其中成活率最高为 A 组, 最低为对照组, 这也说明胶原酶分次消化作用对胰岛细胞成活率的影响总的优于单次消化, 避免或减轻了胶原酶对胰岛细胞的长时间消化和破坏, 从而提高了胰岛细胞的成活率。将胰岛细胞移植于糖尿病裸鼠上, 可逆转其高血糖状态, 由于此类裸鼠有严重的 T 细胞数目减少及 T 细胞功能缺陷, 不会对胰岛细胞移植产生免疫排斥反应, 使胰岛细胞得以长期存活, 这证明了所移植的胰岛细胞具有活性和分泌胰岛素的功能。因此, 经胆总管灌注胶原酶后剪取大鼠胰腺, 撕成小块后采用胶原酶分次消化, 有助于提高胰岛细胞的收获量、纯度和活性。

当然, 影响胰岛细胞分离纯化的因素较多^[3], 这些因素始终贯穿着整个胰岛细胞分离纯化的过程, 如分离纯化方法的差异、不同消化酶的应用、消化条件的不同程度掌握等都会影响胰岛细胞分离纯化后的收获量和质量。实验过程中, 如果胰腺消化时间过长, 可使胰腺过度消化, 极易产生粘稠的胶状物, 其内可含大量的胰岛细胞, 不利于胰岛细胞的纯化提取。因此, 减少或避免在消化过程中形成胶状物显得十分重要, 下面方法有助于减少胶状物的形成^[3]: ①经短时间分离就取出游离的胰岛细胞; ②消化液中加入 5% 甘油; ③用最小量胶原酶消化; ④pH 保持在 7.8 ± 0.1 , 以减轻酸性环境对胰岛细胞的损害; ⑤消化时温度保持 $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$; ⑥增加温育液的容积。另外, 经消化分离的胰岛沉淀物在加 Ficoll-400 进行纯化时, 应将两者充分混匀, 避免胰岛沉淀物成团成块, 这样有利于胰岛细胞的纯化和提取。

参考文献:

- [1] 余斌杰, 梁亦铨, 单济川. 糖尿病综合研究 15 年(1979~1994) [J]. 中山医科大学学报, 1995, 16(1): 1.
- [2] Mathieu C. Current limitations of islet transplantation [J]. Transplant Proc, 2001, 33(1-2): 1707.
- [3] 蒋铁建, 胡敏. 啮齿类动物胰岛的分离与纯化 [J]. 国外医学内分泌学分册, 2001, 21(1): 36.
- [4] 要秀, 保庭毅. 大鼠胰岛分离与纯化的实验研究 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(4): 383.
- [5] 周茂华, 陈东明, 唐军民, 等. 大鼠胰岛移植制备与异种移植. 中华器官移植杂志, 1998, 19(4): 200.

(编辑 张恩健)