

两种不同纯化大鼠胰岛细胞方法的比较

李晓航, 张佳林, 李乐, 康铁利, 程颖, 石蕊, 赵宁, 刘永锋

(中国医科大学附属第一医院普通外科教研室, 肝胆外科暨器官移植科, 沈阳 110001)

摘要 目的 比较分析 OptiPrep 和 Ficoll 两种介质纯化大鼠胰岛细胞的效果。方法 将 24 只 SD 大鼠随机分成 2 组, 采用明尼苏达大学改良方法提取大鼠胰岛细胞, 消化分离胰岛细胞后, 分别采用不连续密度梯度 Ficoll 离心法和 OptiPrep 离心法纯化胰岛细胞, 比较纯化后胰岛细胞数量、纯度、存活率及功能, 观察 OptiPrep 和 Ficoll 两种介质对大鼠胰岛细胞纯化效果的影响。结果 与 Ficoll 组相比, OptiPrep 组胰岛细胞的产量(分别为 304±13.57 和 346±9.09)和纯度(分别为 88.25%±2.22%和 94.00%±0.82%)均显著增加($P < 0.05$)。OptiPrep 组与 Ficoll 组胰岛细胞的存活率(分别为 93.50%±1.29%和 91.50%±1.29%)和功能(胰岛素释放指数分别为 3.04±0.05 和 3.02±0.06)的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 OptiPrep 法纯化大鼠胰岛细胞比传统的 Ficoll 法更有优势, 而且 OptiPrep 价格相对便宜, 可以作为纯化大鼠胰岛的常规方法。

关键词 胰岛细胞; 纯化; 分离; 大鼠

中图分类号 R587.1 文献标志码 A 文章编号 0258-4646(2012)02-0108-04

doi CNKI:21-1227/R.20120117.1125.025

网络出版地址 <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1227.R.20120117.1125.025.html>

Comparison between Two Methods for Purification of Rat Islets

LI Xiao-hang, ZHANG Jia-lin, LI Le, KANG Tie-li, CHENG Ying, SHI Rui, ZHAO Ning, LIU Yong-feng

(Department of General Surgery, The First Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract **Objective** To compare the effects of OptiPrep and Ficoll on the purification of rat islets. **Methods** Islets were isolated from the pancreata of 24 SD rats by means of modified University of Minnesota's method. After an successful enzymatic digestion, the digested tissue was randomly purified by Ficoll and OptiPrep. Compared the islet yield, purity, survival and function between the two groups after purification and the effects of two media on the purification of rat islets. **Results** Compared with the Ficoll group, yield and purity of islets were significantly higher in the OptiPrep group (304±13.57 vs 346±9.09, 88.25% ± 2.22% vs 94.00% ± 0.82%, $P < 0.05$), there were no significant differences between the two groups in survival and function of islets (93.50% ± 1.29% vs 91.50% ± 1.29%, SI 3.04 ± 0.05 vs 3.02 ± 0.06, $P > 0.05$). **Conclusion** The purification method using OptiPrep has some advantages over the traditional purification method using Ficoll. Owing to its cheap price, OptiPrep can be used as an conventional method for purification of rat islets.

Key words islets of langerhans; purification; isolation; rat

自 2000 年埃德蒙顿方案^[1]实施以来, 胰岛移植取得了突破性进展, 胰岛移植治疗 1 型糖尿病也得到普遍认可和广泛应用。但是在胰岛分离纯化过程中胰岛细胞丢失较多, 从 1 个胰腺中提取达到临床应用标准的胰岛细胞的几率只有 40%左右, 要达到术后胰岛素不依赖, 2~3 个供体提取的胰岛才能满足 1 个受体的需求。因此, 改善胰岛分离纯化技术, 提高胰岛产量, 在一定程度上可以降低对供体胰腺数量的需求。传统的胰岛纯化方法是密度梯度 Ficoll 离心法, Wisconsin 大学曾报道应用 OptiPrep

纯化猪胰岛可以减少胰岛细胞丢失^[2]。本研究拟对 Ficoll 和 OptiPrep 在纯化大鼠胰岛中的效果进行比较, 以明确 OptiPrep 是否可以应用于大鼠胰岛的纯化。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 雄性大鼠, 6~8 周龄, 体质量 200~250 g, 购自中国医科大学实验动物中心。胶原酶 型(C-9263)、Ficoll-400(F8363)、双硫脲(dithizone, DTZ)、吖啶橙(acridine orange, AO)和碘化丙啶(propidium iodide, PI)均购于美国 Sigma 公司; Hank's 液、Kreb's-Hank's 液、RPMI 1640 培养液、胎牛血清、HEPES 均购于美国 Gibco 公司; ELISA 试剂盒, 购自美国 RD 公司; OptiPrep, 购自挪威 AXIS-SHIELD 公司; UW 液, 购自美国 Bristol-Myers Squibb 公司。

1.2 方法

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30371359, 30870644), 国家自然科学基金专项基金资助项目(31140059)

作者简介 李晓航(1982 -), 男, 讲师, 博士。

通讯作者 张佳林, E-mail: jlz2000@126.com

收稿日期 2011-11-10

网络出版时间 2012-01-17 11:25

采用明尼苏达大学改良方法,原位灌注消化、分离纯化大鼠胰岛^[3],纯化介质分别选用 Ficoll 和 OptiPrep。

1.2.1 胰岛分离:未禁食的SD大鼠24只,10%水合氯醛0.6 mL腹腔内注射麻醉,常规消毒后经腹中线开腹,暴露胆管,寻找胆管穿过胰腺进入十二指肠处,3-0血管缝合线缝合结扎胆管末端。将胃和脾脏向外牵拉,充分暴露胰尾,并游离胰腺周围韧带。在肝门胆管分叉处逆行胆管插管,妥善固定,剪开下腔静脉和腹主动脉,充分放血后缓慢(1 mL/min)灌注含胶原酶(胶原酶型,1.5 mg/mL)的冷Hank's液10~12 mL,使胰腺完全膨胀。尽可能完整、快速摘取胰腺,尽量剔除脂肪和淋巴组织。将摘取的胰腺放入装有2 mL冷胶原酶溶液的50 mL离心管中,37℃水浴消化12~15 min,间断振荡离心管。消化过程中不断观察胰腺消化情况,当胰腺消化产物呈现“小米粥”外观时,迅速加入50 mL冷Hank's液终止消化。消化的胰腺组织经振荡后低温离心(4℃,800 r/min离心2 min),清洗2次。经80目不锈钢筛网过滤。将过滤后的细胞悬液再次离心(4℃,1 000 r/min离心3 min),尽量去除上清液,沉淀物为胰岛细胞和外分泌腺的混合物,冰浴备用。

1.2.2 胰岛纯化:将24只大鼠随机分为2组。采用不连续密度梯度Ficoll离心法组:介质为Ficoll和Hank's液的混合物,浓度分别为25.0%、23.0%、20.5%和11.0%。将上述分离的胰岛沉淀物与4 mL的25.0% Ficoll混合,而后逐层沿管壁缓慢加入23.0%(3 mL)、20.5%(2 mL)和11.0%(2 mL)Ficoll,形成4层梯度离心柱。4℃下2 400 r/min离心10 min后,吸取25.0%和23.0%界面间以及23.0%和20.5%界面间的胰岛细胞,用Hank's液清洗(4℃离心,1 000 r/min离心2 min)2次。RPMI 1640培养液稀释备用。采用不连续密度梯度OptiPrep离心法组:将上述分离的胰岛沉淀物加入10 mL密度为1.125 g/mL的OptiPrep-UW液,充分混匀,随后依次缓慢加入密度为1.110 g/mL(10 mL)和1.070 g/mL(10 mL)的OptiPrep-UW液,最后加入UW液5 mL(密度为1.035 g/mL),形成4层梯度离心柱。4℃下1 750 r/min离心5 min后,吸取1.035~1.070界面间及1.070~1.110界面间的细胞团,用Hank's液清洗(4℃离心,1 000 r/min离心2 min)2次。RPMI 1640培养液稀释备用。

1.3 大鼠胰岛产量、纯度和功能的测定

1.3.1 胰岛计数:胰岛用双硫腙DTZ染色。按以下

公式计数^[4]:用加样器在胰岛悬液中重复取3次,每次50 mL,分别计数DTZ染色阳性的细胞团,胰岛细胞数=3次样品中DTZ阳性细胞团数÷3×20×样本总量(mL)。1个直径为150 μm的胰岛细胞计为1个胰岛当量。

1.3.2 胰岛纯度:为胰岛细胞占胰岛细胞和外分泌腺细胞总数的百分比。

1.3.3 胰岛活性:采用AO/PI荧光染色法判定胰岛细胞活性。AO/PI溶液配制:用Hank's液配制储存液AO 670 μmol/L,PI 750 μmol/L,4℃避光保存。临用前取0.01 mL AO储存液与1 mL PI储存液混和,用Hank's液10倍稀释,过滤除菌,与胰岛制备物混和10 min,在荧光显微镜下用490 nm激发光滤光片、510 nm光栅滤光片可同时见到绿色(AO)和红色(PI)荧光,绿色标记的为存活细胞,红色标记的为死细胞。计算胰岛细胞存活率。每份标本重复计算3次,取平均值。

1.3.4 胰岛功能:采用葡萄糖刺激胰岛素分泌实验评价胰岛细胞功能。计数20胰岛当量胰岛细胞,用含有2.8 mmol/L和16.7 mmol/L葡萄糖的Kreb's-Hank's液(含有10 mmol/L HEPES和0.5% BSA)分别孵育2 h和1 h,分别收集第2小时和第3小时的培养液上清,采用ELISA法测定胰岛素含量。计算胰岛素释放指数(secretion index, SI) SI=第3小时(高糖环境)的胰岛素含量/第2小时(低糖环境)的胰岛素含量。

1.4 统计学方法

所有实验数据均为计量资料,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析,各组数据的比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

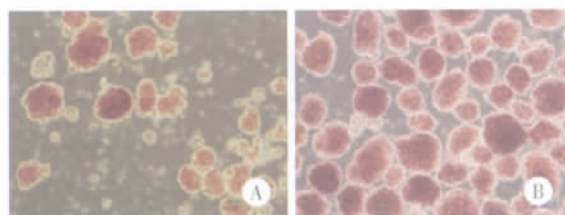
2.1 纯化后2组胰岛细胞产量的比较

分离纯化后的胰岛细胞被DTZ染成猩红色,镜下表现为圆形或卵圆形细胞团,而外分泌腺不着色(图1)。OptiPrep组胰岛细胞产量显著高于Ficoll组(分别为 346 ± 9.09 和 304 ± 13.57 , $P < 0.05$)。

2.2 纯化后2组胰岛细胞纯度及存活率的比较

OptiPrep组胰岛细胞的纯度显著高于Ficoll组(分别为 $94.00\% \pm 0.82\%$ 和 $88.25\% \pm 2.22\%$, $P < 0.05$),OptiPrep组胰岛细胞的存活率虽高于Ficoll组(分别为 $93.50\% \pm 1.29\%$ 和 $91.50\% \pm 1.29\%$),但差异无统计学意义($P > 0.05$),见图2。

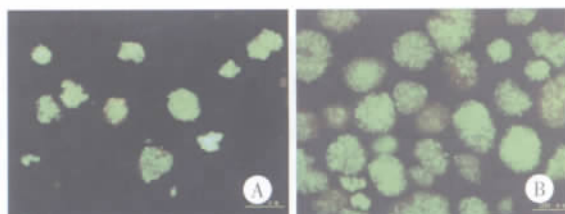
2.3 纯化后2组胰岛细胞功能的比较



A, purification by Ficoll; B, purification by OptiPrep.

图 1 纯化后的大鼠胰岛 DTZ 染色 × 100

Fig.1 The purified islets stained by dithizone × 100



A, purification by Ficoll; B, purification by OptiPrep.

图 2 纯化后的大鼠胰岛 AO/PI 染色 × 100

Fig.2 The islets stained by AO/PI × 100

葡萄糖刺激胰岛素分泌实验提示, Ficoll 组和 OptiPrep 组胰岛细胞在低糖刺激下胰岛素分泌量分别为 38.06 ± 2.40 和 38.87 ± 1.71 , 高糖刺激下胰岛素分泌量分别为 12.61 ± 0.65 和 12.77 ± 0.38 , SI 分别为 3.02 ± 0.06 和 3.04 ± 0.05 , 3 者的差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

胶原酶消化胰腺后, 胰岛细胞和外分泌腺细胞混杂在一起, 此时通过纯化技术可以将胰岛从外分泌腺细胞中分离开, 减少混杂外分泌腺细胞的数量, 从而降低通过门静脉输注胰岛移植物时发生并发症如门静脉高压或门静脉栓塞的风险。胰岛纯化是胰岛分离过程中关键的一步, 纯化后移植中胰岛的数量和纯度是决定移植能否成功的重要因素^[5], 因此在胰岛分离条件保持不变的情况下, 通过改进纯化条件有望进一步改善胰岛分离结果。胰岛纯化有许多方法, 包括组织培养^[6]、通过低渗性溶解选择性破坏腺泡细胞^[7]、荧光激活细胞分选^[8]、包被抗腺泡细胞单克隆抗体的磁珠分选^[9]等, 但上述方法都在某种程度上存在纯化效率低或费用昂贵等缺陷。因为胰岛和外分泌腺细胞的密度不同, 所以最常用的纯化方法是密度梯度离心。

传统的 Ficoll 离心法在人、猪和鼠类胰岛纯化中应用广泛, 但是 Ficoll 对胰岛细胞有一定的毒性, 配制好的 Ficoll 溶液密度不稳定, 这些都对胰岛分离结果包括数量、纯度和活性产生不利影响。而且

Ficoll 价格昂贵, 限制了一些规模较小的实验室开展胰岛移植。因此, 我们尝试采用 OptiPrep 来纯化大鼠胰岛。OptiPrep 是一种含有碘克沙醇的等渗液, 具有无毒性、黏稠度低和价格相对低廉等优点。通过比较, 我们发现 OptiPrep 纯化的胰岛细胞产量和纯度均显著高于 Ficoll, 虽然 OptiPrep 纯化的胰岛细胞存活率也高于 Ficoll, 但差异无统计学意义, 二者在高、低浓度葡萄糖刺激下胰岛素分泌量上无显著差别。这与 Noguchi 等^[10]的研究相符, 只不过他们比较的是人胰岛细胞纯化结果。Dellé 等^[11]也比较了 OptiPrep 和 Ficoll 在纯化大鼠胰岛中的作用, 其得出的结果与我们一致, 但其并未比较二者在胰岛存活率和功能方面的差异。

密度梯度纯化结果是否理想主要取决于腺泡细胞的密度, 有许多因素影响腺泡细胞的密度。首先是腺泡细胞的分泌状态, 其次是胶原酶消化胰腺时形成的腺泡聚集物的大小, 最后是腺泡细胞的肿胀程度。后者是最重要的因素。在胰岛分离纯化过程中, 胶原酶消化、机械性损伤和长时间低温均可导致腺泡细胞不同程度的肿胀。肿胀的腺泡细胞密度减低, 在梯度离心时移动至与其密度接近的那层介质中, 导致最终纯化产物中混有大量外分泌腺细胞, 降低移植率。因此在分离提取胰岛过程中, 应掌握好消化胰腺的时间, 及时终止, 防止过度消化, 振荡胰腺消化产物不宜用力过猛, 尽量缩短操作时间。

虽然我们的研究表明 OptiPrep 纯化的胰岛细胞存活率与 Ficoll 无明显差别, 但 OptiPrep 相对于 Ficoll 仍有许多优势。Ficoll 的高渗透压导致消化产物中的细胞皱缩, 导致胰岛和外分泌腺细胞的密度接近, 从而增加纯化的难度。与 Ficoll 相比, OptiPrep 具有密度高、渗透压低等特点, 通过与 UW 液按一定体积混合可以配制出适合纯化的各种密度梯度的等渗溶液, 避免了 Ficoll 高渗透压对胰岛细胞的不利影响。另外, 因为 OptiPrep 黏滞性低, 所以纯化时所需离心力 ($1\ 750\ \text{r/min}$) 小于 Ficoll ($2\ 400\ \text{r/min}$), 降低了对胰岛的剪切应力, 从而减轻对胰岛的破坏。Mita 等^[12]的研究表明 OptiPrep 纯化产物中促炎性反应因子的含量明显低于 Ficoll。因此, 我们有理由相信 OptiPrep 作为纯化介质在一定程度上可以改善胰岛细胞的活性。

总之, 通过上述实验我们发现 OptiPrep 纯化的胰岛细胞产量及纯度更高, 胰岛细胞的存活率及功能也不低于 Ficoll。另外 OptiPrep 价格低廉, 黏滞性低, 相对容易配制, 溶液密度稳定, 可以代替 Ficoll

常规用于纯化大鼠胰岛。

参考文献：

- [1] 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.
- [2] van der Burg MP, Basir I, Bouwan E. No porcine islet loss during density gradient purification in a novel iodixanol in University of Wisconsin solution[J]. *Transplant Proc* 1998, 30(2) :362-363.
- [3] Guroi AO, Yillar G, Kursun AO, et al. A modified automated method for isolation of viable pancreatic islets in laboratory animals [J]. *Transplant Proc* 2004, 36(5) :1526-1527.
- [4] Shiroi A, Yoshikawa M, Yokota H, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone[J]. *Stem Cells* 2002, 20(4) :284-292.
- [5] Nano R, Clissi B, Melzi R, et al. Islet isolation for allotransplantation : variables associated with successful islet yield and graft function [J]. *Diabetologia* 2005, 48(5) :906-912.
- [6] Matas AJ, Sutherland DE, Kretschmer G, et al. Pancreatic tissue culture depletion of exocrine enzymes and purification of islets for

- transplantation[J]. *Transplant Proc* 1977, 9(1) :337-339.
- [7] Liu C, McGann LE, Gao D, et al. Osmotic separation of pancreatic exocrine cells from crude islet cell preparations[J]. *Cell Transplant* , 1996, 5(1) :31-39.
- [8] Jiao L, Gray DW, Gohde W, et al. In vitro staining of islets of Langerhans for fluorescence-activated cell sorting [J]. *Transplantation* , 1991, 52(3) :450-452.
- [9] Fujioka T, Terasaki PI, Heintz R, et al. Rapid purification of islets using magnetic microspheres coated with anti-acinar cell monoclonal antibodies[J]. *Transplantation* ,1990, 49(2) :404-407.
- [10] Noguchi H, Ikemoto T, Naziruddin B, et al. Iodixanol-controlled density gradient during islet purification improves recovery rate in human islet isolation[J]. *Transplantation* 2009, 87(11) :1629-1635.
- [11] Dellê H, Saito MH, Yoshimoto PM, et al. The use of iodixanol for the purification of rat pancreatic islets [J]. *Transplant Proc* 2007, 39 (2) :467-469.
- [12] Mita A, Ricordi C, Miki A, et al. Purification method using iodixanol (OptiPrep)-based density gradient significantly reduces cytokine chemokine production from human islet preparations leading to prolonged beta-cell survival during pretransplantation culture[J]. *Transplant Proc* 2009, 41(1) :314-315.

(编辑 陈 姜 英文编辑 赵传胜)

(上接第 103 页)

致囊泡破裂。并且我们发现,粘连分解时的过度牵拉会使病灶生长受到影响,不宜用于实验研究。我们也在直肠子宫陷凹处采用常规造模方法建立了大鼠 DIE 模型,由于病灶位于盆腔深处病灶观测时难度较大,且直肠子宫陷凹处 DIE 病灶多和周围肠管及组织形成粘连,需分离粘连才可以观测病灶,部分粘连严重致使分离困难,不便于测量大小,分离时的牵拉也会对病灶生长造成影响,给继续试验带来很大的难度。

本研究中我们改良了造模方法,在常规手术方式基础上用双极电凝器切除宫旁游离脂肪,发现改良组子宫膀胱间 DIE 病灶粘连程度与常规手术方式建立的子宫膀胱间 DIE 模型和直肠子宫陷凹处 DIE 模型相比明显减轻($P < 0.05$);且移植病灶暴露良好,便于观察和测量,为动物实验的进行提供了可能。改良组手术过程中我们采用双极电凝器切除脂肪组织,避免了丝线结扎引起的盆腔过度粘连,虽然有些病灶周围的还是有粘连形成,但粘连程度较其他 2 组大大减轻。此外,改良组在建模成功率上和病灶体积上和其他 2 组相比无统计学差异,提示子宫膀胱间可以作为一个移植点建立大鼠 DIE 模型,

且应用改良术式优于常规手术方式。

通过上述实验,我们认为在大鼠直肠子宫陷凹、子宫膀胱间这两个部位通过自体移植均可以成功建立 DIE 模型。从模型成功率、粘连程度及实验重复性等方面考虑,我们认为改良的子宫膀胱间 DIE 模型操作简单、病灶成功率高、病灶粘连轻,适用于药物治疗及机制研究实验。

参考文献：

- [1] 周琴琴,姚慧娇,韩婵娜,等. 自体移植深部浸润型子宫内膜异位症大鼠模型的建立[J]. *浙江临床医学* 2010, 12(3) :231-234.
- [2] Vernon MW, Wilson EA. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat [J]. *Fertil Steril* ,1985, 44(5) :684-694.
- [3] 邱培伦. 肠粘连的复制 [M]//郭鹑. 人类疾病的动物模型. 北京: 人民卫生出版社, 1990 :182-185.
- [4] Koninckx PR, Meuleman C, Demeyere S, et al. Suggestive evidence that pelvic endometriosis is a progressive disease, whereas deeply infiltrating endometriosis is associated with pelvic pain[J]. *Fertil Steril* , 1991, 55(4) :759-765.
- [5] Cornillie FJ, Oosterlynck D, Lauweryns JM, et al. Deeply infiltrating pelvic endometriosis: histology and clinical significance [J]. *Fertil Steril* ,1990, 53(6) :978-983.

(编辑 陈 姜 英文编辑 赵传胜)