

实验动物胰岛细胞的分离纯化

李芬^{①②} 夏雪培^③ 刘光伟^① 赵勇^{①*}

(① 中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室 北京 100080 ;
② 湖南农业大学动物科技学院 长沙 410128 ;③ 北京海淀医院内分泌科 北京 100080)

摘要 :胰岛移植作为治疗 1 型糖尿病的有效方法 ,临床应用前景较好。但是 ,由于在胰岛移植手术中 ,有功能的胰岛细胞数量较少 ,而严重影响其治疗效果。因此 ,如何提高胰岛分离纯化效果 ,获取尽可能多的高质量胰岛 ,成为胰岛移植手术成败的关键。本文仅就在采用实验动物分离和纯化胰岛方面的实验经验作以简要介绍。

关键词 大鼠 小鼠 猪 胰岛 分离纯化

中图分类号 :Q952 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2005)06-63-04

Islet Isolation and Purification in Experimental Animals

LI Fen^{①②} XIA Xue-Pei^③ LIU Guang-Wei^① ZHAO Yong^①

(① *Transplantation Biology Division ,State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology ,Institute of Zoology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ;*
② *College of Animal Science Technology ,Hunan Agricultural University ,Changsha 410128 ;*
③ *Department of Endocrinology ,Beijing Haidian Hospital ,Beijing 100080 ,China*)

Abstract Islet transplantation is an effective method for curing type1 diabetes mellitus. But effectual islet numbers are limited ,which severely limits its treatment effects. Therefore ,how to improve the effect of islet isolation and purification and how to get more high-quality islets have become the key of islet transplantation. This paper will summarize our ideas on islet isolation and purification in experimental animals.

Key words :Rat ; Mouse ; Porcine ; Islet ; Isolation and purification

1 型糖尿病主要因为胰岛细胞迅速被破坏 ,机体胰岛素分泌不足所致。患者必须长期依赖外源性胰岛素治疗 ,同时常伴有各种并发症。胰岛移植作为治疗 1 型糖尿病方法之一 ,有着简捷、安全及有效等优点 ,其临床应用前景可观。然而 ,胰岛移植手术效果 ,并不是很理想 ,一个重要的原因就是可供移植的有功能的胰岛细胞数量不足及胰腺来源困难^[1-3]。为此 ,如何有效分离纯化胰岛 ,一直是器官移植领域研究热点 ,本文仅就本实验室采用实验动物分离纯化胰岛方面的经验作以简要介绍。

1 小实验动物胰岛细胞的分离、纯化

同系、同种异体胰岛移植的研究现处于实验阶段。实验动物大鼠和小鼠是使用最多的动物 ,并且对这两种动物胰岛的分离纯化日渐成熟。大鼠和小鼠的胰腺如树枝状地分散在十二指肠肠系膜上 ,大鼠的胰腺呈肉色 ,小鼠的胰腺

基金项目 中国科学院引进海外杰出人才“百人计划”(2003) ,
国家杰出青年基金(No. 30425026) ,中国博士后基金(No. 30020040300) ,
中科院王宽诚博士后科研基金(2004)资助 ;

* 通讯作者 ,E-mail :zhaoy@ioz.ac.cn ;

第一作者介绍 李芬 硕士研究生 ,主要从事移植生物学研究。

收稿日期 2005-04-12 ,修回日期 2005-09-07

呈粉红色^[4]。胰腺是由内分泌部的胰岛和外分泌部的胰腺腺泡组成。胰岛分散分布于胰腺的腺泡实质中,其总体积仅占整个胰腺的1%~2%。实验动物大鼠和小鼠的胰腺比人体胰腺小,实验室研究中很少采用自动循环分离纯化仪器。本实验室主要是采用人工方法进行,其实验方法如下。

本实验室对鼠胰岛的分离方法主要采用的步骤是原位整体灌注消化液 37℃水浴消化,中止消化并过滤消化液。用此方法可分离得到300~400个胰岛细胞团/胰腺(小鼠)。通过机械剪碎后消化酶消化法与原位整体灌注消化液消化法相比较,前者可获得胰岛数达 10^6 以上,但是大部分胰岛是单细胞,并且细胞团块的大小与机械剪碎的大小相关,胰腺剪切得越小,获得单细胞的可能性越大。单细胞对于移植后分泌胰岛素功能的发挥比胰岛细胞团效果差。我们认为,采用原位整体灌注方法分离胰岛具有以下优势:①可以缩短热缺血时间;②该方法使胰腺组织迅速降温,可以保证胰腺组织功能的完整性;③也可以减少转运过程中胰管内胰液对组织的消化;④另外,该方法操作与机械剪碎的操作相比较,其难度在于导管插管的准确性,但是在灌注后的后续操作比其他的方法简单、容易。

采用原位整体灌注消化液消化法必须注意灌注量、灌注压力及温度等三方面因素。灌注量的多少与胰腺的膨胀程度及胰腺的消化时间密切相关。过渡膨胀则消化时间要缩短;膨胀不完全,不仅要延长消化时间(可达15 min以上)而且消化时间一旦超过15 min,会使部分胰岛细胞团过度消化而成单细胞或者形成胶状物质,最后造成过滤过程中团块物质带走大量的胰岛细胞。各种大鼠、小鼠灌注量在本实验室的研究结果是: BALB/c 小鼠是0.4~0.5 ml/胰腺; C57BL/6 小鼠是0.3~0.4 ml/胰腺; 昆明白小鼠是1.8~2.0 ml/胰腺; SD 大鼠是4.0~5.0 ml/胰腺。关于灌注压力,我们的经验表明,首先应排尽导管里所有气体,然后快速推注小部分液体,使液体尽快且可能到达胰支管末梢,

再放慢速度使液体缓慢充盈胰腺。温度主要包括两个方面:消化的温度严格控制在37℃;灌注时及洗涤消化液的温度,严格控制在4℃,尤其在中止消化时,一定需要大量的4℃的Hank's液使反应中止,避免过度消化。

总之,原位整体灌注最重要的是,必须尽量使胰尾、胰体部膨胀且保证完整摘取胰腺。因为胰尾部含有大量丰富胰岛细胞(约占90%),且胰尾、胰体与胰头部相比,胆汁污染的机会较少。

对于灌注后胰腺的消化在胰岛细胞分离纯化中也是至关重要的,我们有以下几点体会:①应大面积的消化,使腺体及时充分达到消化所需温度(37℃);②对于消化过程中所出现的粘稠胶状物,是因为胰腺过度消化,胰岛基质中胶原形成胶原纤维并聚集,会带走很多的胰岛细胞。所以,应减少或避免胶状物的出现。要避免此现象可以采取的办法是:①用最少量胶原酶消化;②pH值保持在(7.8±0.1),以减轻酸性环境对胰岛细胞的损害;③增加温育液的容积;④避免过度膨胀;⑤消化液中加入脱氧核糖核酸酶。

在胰岛细胞分离过程中,难度较大的是导管的插管术。实验动物的胰腺胰管较小,尤其是小鼠的胰腺胰管较其他动物的胰管细且薄。我们的经验是在插管时,尽量夹闭肝胆胰管开口处,从十二指肠肠壁胰管开口处进针。这种方法的优点是会减少胆汁被推注进胰体及胰尾,方便进针,减少胰管扎坏的机会。本实验室采用此方法,插管灌注无一例失败。而Takashi等^[5]报道从胆总管插管成功率虽高,可能其实验操作难度会增加。

对分离后胰岛细胞的纯化,本实验室采用Eurocollin-Ficoll液,不连续密度梯度离心,离心后吸出在1.096~1.069 g/ml之间界面的细胞团,加Hank's液洗涤。在纯化过程中要注意以下几点:①胰岛消化液要与最高密度的Eurocollin-Ficoll液充分混合,但避免过度的吹打,不能涡旋太长的时间;②依次轻轻加入各层Eurocollin-Ficoll液,避免剧烈添加,造成纯化

液混合;③离心后的胰岛细胞团的洗涤要充分,残留的 Eurocollin-Ficoll 液对胰岛细胞有损

害,且影响移植效果。分离纯化后的胰岛细胞见图 1,可见其周围完整包膜。

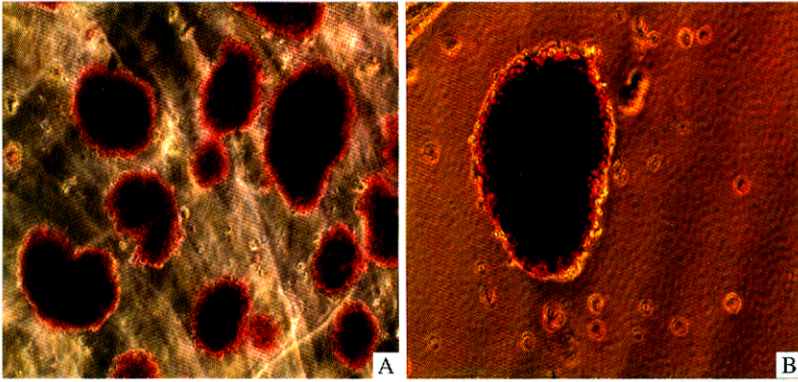


图 1 相差倒置显微镜观察双硫脲(DTZ)染色后胰岛细胞团

A. 纯化后的胰岛细胞团(4×10); B. 纯化后单一胰岛细胞团(10×10)。

采用羟乙基淀粉-collins (HES-collins) 溶液纯化胰岛细胞,在产量与纯度上都有很大的改善,并且胰岛细胞的活力与功能都比 Eurocollin-Ficoll 溶液纯化的胰岛细胞长效,建议有条件的实验室可以采用此纯化液^[6]。在胰岛细胞的分离纯化过程中,除注意上述的几点以外,还需要注意冷缺血时间、胶原酶的质量、供体的品系及体重等。另外,大鼠的品系不同,胰岛细胞的产量不一样。AO 大鼠分离的胰岛细胞数明显高于 Wistar 和 Lewis 大鼠,而且体重重些的大鼠分离的胰岛细胞释放胰岛素能力明显比体重轻些的大鼠低^[3],这与我们的实验结果一致。年龄小、体重轻的小鼠分离纯化的胰岛细胞数比年龄大、体重重的小鼠分离的胰岛细胞数少,但幼龄动物的胰管细,插管难度大。

胶原酶是一种金属酶,常含有从溶组织梭形芽孢杆菌中纯化的胶原酶、梭菌蛋白酶、类胰蛋白酶及中性蛋白酶。胶原酶通过分解胶原蛋白等分散胰腺组织和胰岛细胞,其活性的发挥需金属离子锌和钙。因此必须在消化液中加入钙成分,但是如果是分离单细胞,细胞在纯化后用不含钙离子的溶液洗涤。需要注意的是,不同批次的胶原酶的质量差异很大,并且可能存在内毒素的污染。因此,在实验时应注意尽量采用同一批次的产品,并且每更换一批胶原酶,

其分离纯化的条件需要重新摸索。韩礼欧等^[7]报道认为,在胶原酶分离消化胰岛时应严格控制酶中蛋白酶的含量,含量少消化不完全,而含量过多却会使基质中的蛋白完全水解,破坏胰岛与周围细胞的连接,影响胰岛细胞的完整性。这与我们的实验结果一致,通过对纯化后的胰岛细胞团的分离,发现胰蛋白酶的浓度高且作用时间长,会使胰岛细胞团迅速分离,但是对胰岛细胞的活性影响大。为了减少消化液即胶原酶对胰岛细胞的毒性作用,对胶原酶进行了很大的改进,Swanson 等许多研究者分别报道^[8-11],采用 Sigma 胶原酶(胶原酶 XI 与蛋白酶抑制剂混合物)、重组体胶原酶、胶原酶 NB1 中加入中性蛋白酶、胶原酶 NB1 中加入中性蛋白酶 NB 等类型的胶原酶使胰岛细胞的存活率提高,或者使胰岛当量减少,但形态保持完整。

2 大实验动物胰岛细胞的分离、纯化

临床上胰岛细胞移植,其胰腺来源困难,而猪胰岛作为异种组织供体来源,日益受到重视。猪胰岛素多年来用于治疗人类糖尿病患者,与人胰岛素结构相似,仅有一个氨基酸不同。目前,使用猪胰岛细胞进行异种移植的研究已成为研究热点之一。

猪的胰腺与鼠等小实验动物相比较,具有

其解剖生理特点^[4]。猪等大实验动物的胰腺是结实体,分胰头和左右两叶,胰管从右叶末端穿出,开口在胆总管开口之后,其周围结缔组织较多,内分泌腺与外分泌腺关联紧密,胰岛缺乏基质。其结构的特殊性造成猪胰岛细胞分离和纯化难度较大。与鼠等小实验动物的胰岛细胞分离和纯化相比较,其分离过程中有其特点,而胰岛细胞纯化方法基本相同。

本实验室对猪胚胎胰腺的分离方法与鼠胰腺分离方法的不同点是:无菌条件下取出整个胰腺,用4℃的Hank's液冲洗,从胰体狭窄处切开,找到胰管,把插管插入,进行区段性灌注。其他如灌注的压力、纯化方法等与鼠胰岛细胞分离纯化的方法一致。

总之,对实验动物胰岛细胞分离纯化,在尽量避免各种消化酶和有害物质损害的前提下,尽可能保证灌注时膨胀完全和消化完全,同时在纯化过程中对胰岛细胞团吹打要轻柔适度且有效,尽量避免损伤。这样,才有可能获得尽可能多量、高质的胰岛细胞团。

参 考 文 献

- [1] Edmond A R , Jonathan R L , Ray V R , *et al.* Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001 **40**(3) : 710 ~ 719.
- [2] Avila J G , Tsujimura T , Oberholzer J , *et al.* Improvement of pancreatic islet isolation outcomes using glutamine perfusion during isolation procedure. *Cell Transplant* 2003 **12**(2) : 877 ~ 881.
- [3] Haan B J , Faas M M , Spijker H , *et al.* Factors influencing isolation of functional pancreatic rat islets. *Pancreas* 2004 **29**(3) : 15 ~ 22.
- [4] 孙敬方. 动物实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2001, 45 ~ 82.
- [5] 黄跃南, 吴德全, 单世光等. 成年猪和大鼠胰岛分离纯化的实验研究. 哈尔滨医科大学学报, 2000, **34**(4) : 249 ~ 252.
- [6] Takashi K , Take H A , Kazuhiko J , *et al.* Effectiveness of hydroxyethyl starch or purification of pancreatic islets. *Journal S R* 2003 **11**(3) : 16 ~ 22.
- [7] 韩礼欧, 宋春芳. 胰岛分离与纯化的实验研究. 黑龙江医学 2002 **26**(5) : 342 ~ 343.
- [8] Swanson C J , Olack B J , Goodnight D , *et al.* Improved methods for the isolation and purification of porcine islets. *Hum Immunol* 2001 **62**(7) : 739 ~ 749.
- [9] Heide B , Daniel B , Friederike H , *et al.* Successful human islet isolation utilizing recombinant collagenase. *Diabetes* 2003 **52**(3) : 143 ~ 146.
- [10] Bucher P , Mathe Z , Bosco D , *et al.* Serva collagenase NB1 : a new enzyme preparation for human islet isolation. *Transplant Proc* 2004 **36**(4) : 143 ~ 144.
- [11] Bucher P , Mathe Z , Morel P , *et al.* Assessment of a novel two-component enzyme preparation for human islet isolation and transplantation. *Transplantation* 2005 **79**(1) : 91 ~ 97.