

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.15.004

SD 大鼠原代胰岛细胞分离、纯化及培养技术的改进 *

丁和远 徐东丽 王 芳 查兵兵 盛 励 徐 炯 刘 军[△]

(复旦大学附属上海市第五人民医院内分泌科 上海 200240)

摘要 目的:探讨大鼠胰岛细胞分离、纯化及培养的方法,并评价其生物学功能。**方法:**选用 8~10 周龄健康 SD 大鼠,采用胆总管逆行注射预冷胶原酶 P 溶液,37℃ 水浴静止消化,30 目不锈钢筛网过滤,Ficoll400 非连续密度梯度离心纯化。分离后的胰岛用 DTZ 染色计算胰岛产量,胰岛素释放试验评价其生物学功能。**结果:**胰岛细胞分布于 Ficoll400 浓度为 23%~20%和 20%~11%的界面之间。DTZ 染色呈红色细胞团,胰岛产量为(606±56)IEQ/胰腺。纯度高达 80~90%,活率≥90%,胰岛素释放功能良好。**结论:**胶原酶 P 溶液原位消化,Ficoll400 纯化是一种高效简便的胰岛分离方法,分离的胰岛细胞数量多、纯度高及活性好。

关键词:SD 大鼠;胰岛细胞培养;胰岛素

中图分类号:Q95-3;R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)15-2816-03

Isolation, Purification and Culture of Islet Cells from SD Rat*

DING He-yuan, XU Dong-li, WANG Fang, CHA Bing-bing, SHENG Li, XU Jiong, LIU Jun[△]

(Department of Endocrinology, Shanghai Fifth People's Hospital, Fudan University, Shanghai, 200240, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method of isolation, purification and culture of rat islet cells and evaluate their biological characteristics. **Methods:** 8~10 week-old healthy adult SD rats were selected. Pre-cooling duct retrograde injection of collagenase P solution, 37℃ water bath stationary digesting, 30 mesh stainless steel screen filter and Ficoll400 discontinuous density gradient centrifugation were used for isolation and purification. The purified cells were detected for islet equivalent by DTZ staining, and their biological function was evaluated by insulin release test. **Results:** Islets distributed in the interfaces between Ficoll400 concentration of 23% and 20% as well as between 20% and 11%. DTZ staining showed red cell mass; islet yield was (606 ± 56) IEQ / pancreas with up to 80~90% purity; viability was ≥ 90% and the islet cells showed well release of insulin. **Conclusion:** In situ digestion by collagenase P followed by Ficoll400 purification is an efficient and easy method of islet isolation, yielding cells of large quantity, high purity and good activity.

Key words: SD rats; Islet cell culture; Insulin

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R587.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)15-2816-03

前言

随着社会的发展,人们饮食习惯及环境的改变,糖尿病的发病率日益升高,与心脑血管疾病和恶性肿瘤一起成为严重威胁人类健康的重大难题,目前临床对于糖尿病的治疗没有特别有效的方法,多数为饮食控制、运动降糖,同时给予药物刺激胰岛分泌胰岛素或者补充人工合成的胰岛素,胰岛细胞替代治疗及胰岛移植是根治 1 型糖尿病和依赖胰岛素治疗的 2 型糖尿病的最有效手段^[1-4],因此改进胰岛细胞的分离、纯化及培养技术,获得数量多、功能好的胰岛仍然是胰岛移植及相关科研工作的前提和重点。但是通常的胰岛细胞培养往往获得的胰岛细胞数量比较少,而且纯度比较低,不能满足胰岛移植和实验研究的需要。本实验旨在探讨一种简单、有效的大鼠胰岛细胞培养方法,为糖尿病研究寻找最合适的研究对象。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠,8~10 周龄,体重 250~300 g,封闭群,清洁级,购自复旦大学上海医学院动物房。

1.2 主要仪器和试剂

超净工作台(苏州市净化设备有限公司),倒置相差显微镜(Olympus 公司),CO₂ 培养箱(NAPCO Model 5410),离心机(Eppendorf 公司),胶原酶 P(Roche 公司),Ficoll400(Pharmacia 公司),双硫腙(DTZ)、γ 吡啶橙(AO)、碘丙啶(PI)、HEPES(Sigma 公司),胎牛血清(Gibco 公司),RPMI1640(Gibco 公司),胰岛素检测试剂盒(Mercodia 公司),其他试剂均为进口或国产分析纯。

* 基金项目:上海市卫生局青年基金(2010Y042);闵行区科委自然科学基金(2010MHZ026)

作者简介:丁和远(19-),复旦大学上海医学院博士研究生,主治医师,研究方向:2 型糖尿病发病机理研究,电话:021-24289500

△ 通讯作者:刘军,硕士,主任,研究方向:2 型糖尿病发病机理研究

(收稿日期:2013-12-28 接受日期:2014-01-25)

1.3 大鼠胰岛细胞的分离

健康成年 SD 大鼠, 雄性, 250~300 g, 禁食, 10% 水合氯醛 4 μ L/g 腹腔注射麻醉。固定四肢成仰卧位, 酒精全身消毒, 胸腹部备皮后常规碘伏、酒精消毒。剖腹分层进入腹腔, 暴露胆总管及胰管, 丝线于胰管近肠壁处结扎。胆总管内插入头皮针, 丝线结扎固定。切开胸腔, 破心放血处死, 止血钳夹紧远端胆总管, 逆行注入预冷的 0.9 mg/mL 胶原酶 P 溶液 8~10 mL, 使胰腺膨胀, 迅速分离整个胰腺, 剪除脂肪和淋巴结, 移入加有 6 mL Hank's 液的玻璃消化瓶中, 封口膜密封, 37℃ 水浴静止消化 10 分钟, 机械分离使其呈细砂状, 30 目不锈钢筛网过滤, 加入 4℃ 洗涤液 (含 10% NBS 的 HBSS) 终止消化, 离心洗涤 3 次, 弃去上清液^[5,6]。

1.4 大鼠胰岛细胞的纯化

采用非连续密度梯度 Ficoll400 离心法纯化胰岛, 沉淀物加 25% Ficoll 4 mL 混匀, 再依次小心加入 23%、20%、11% Ficoll400 溶液和 Hank's 液各 2 mL, 4℃ 800×g 离心 15 分钟, 吸出位于 23%~20% 及 20%~11% 界面的胰岛, 4℃ 离心洗涤 2 次, 接种于细胞培养皿中, 放在 5% CO₂ 培养箱中培养^[7]。

1.5 大鼠胰岛细胞的形态学观察

DTZ 染色: DTZ 用无水乙醇配制, 将 10 mg 的 DTZ 溶于 3 mL 无水乙醇 (含 50 μ L 浓 NH₄OH 水) 中, 待全部溶解后加 Hank's 液 12 mL, 此为储存液, 临用时用 Hank's 液 (pH7.8) 1:100 稀释, 0.22 μ m 孔径滤膜过滤。与胰岛制备物混合, 室温 10 min 后, PBS 冲洗 3 遍, 倒置显微镜观察。

1.6 胰岛细胞产量、纯度、存活率分析

胰岛当量计数: 用 50 μ L 加样器在胰岛悬液中重复取样三次, 分别镜检测量 DTZ 阳性细胞团数和直径, 按以下公式计数胰岛: 胰岛数 = 3 次阳性总数 $3 \times 20 \times$ 样本量 (mL), 将 1 个直径 150 μ m 的胰岛团块称为 1 个胰岛当量 (islet equivalent, IEQ)。活性鉴定: 采用 AO/PI 染色法, 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, 绿色标记的为活细胞, 红色标记的为死细胞, 再计算绿色荧光胰岛所占的百分比^[8,9]。

1.7 大鼠胰岛细胞的功能鉴定

胰岛素释放试验: 分别在培养第 1、2、3、7 天进行胰岛素释放试验。胰岛用 PBS 洗涤两次, 置于 EP 管中, 每管 10 IEQ (设 3 个复孔), 每管加 1.67 mmol/L 低糖培养液 1 mL, 37℃ 孵育 2 小时, 收集培养液; 然后每管加 16.7 mmol/L 高糖培养液 1 mL, 37℃ 孵育 2 小时, 收集培养液。采用 ELISA 法测定胰岛素浓度。

1.8 统计学处理

所有数据用均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 Prism5 软件进行统计分析, 两组间差异的比较使用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 胰岛的形态学观察

新分离的胰岛细胞团大小不一, 直径从 50 μ m 到 600 μ m 不等, 呈圆形或卵圆形, 形态规则, 透亮, 胰岛细胞胞浆丰富, 大多数胰岛细胞团胞膜完整, 折光性好, 如图 1 为我们培养 2h 后的

胰岛细胞; 分离纯化后的胰岛细胞被中性红 DTZ 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, 显示我们分离的细胞为胰岛细胞 (图 2)。

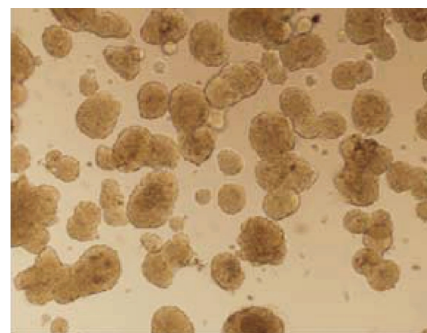


图 1 新鲜分离胰岛 ($\times 100$)

Fig.1 The islet separated freshly

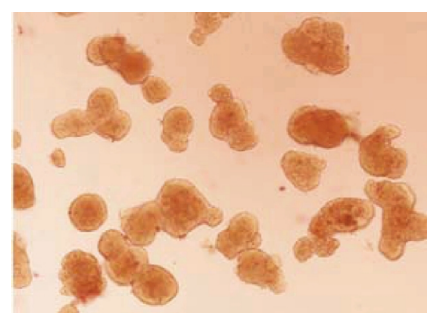


图 2 胰岛细胞 DTZ 染色 ($\times 100$)

Fig.2 The islet cells stained with DTZ

2.2 胰岛的产量、纯度及存活率

Ficoll400 纯化后的胰岛产量为 (606 ± 56) IEQ/胰腺, 用 AO/PI 荧光染色法判定胰岛细胞活性和纯度。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 3 次, 取其平均值表示, 本研究分离的胰岛细胞纯度 80~90%, 细胞存活率 90% 以上 (图 3)。

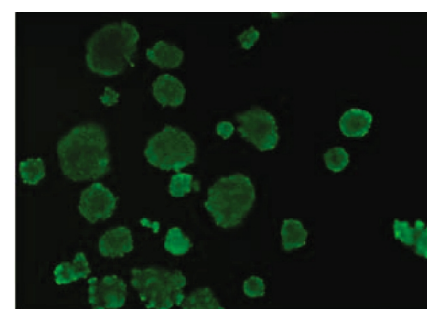


图 3 胰岛细胞 AO-PI 染色 ($\times 100$)

Fig.3 The islet cells stained with AO-PI

2.3 胰岛细胞的功能鉴定

胰岛素释放试验是一项对胰岛细胞的功能进行鉴定的试验, 当胰岛细胞处于高糖的环境中, 就可以促进胰岛细胞分泌胰岛素, 从而加速糖分的代谢, 从而达到降低糖浓度的作用, 我们的实验结果显示高糖组胰岛细胞的上清液的胰岛素浓度显

著高于经过低糖处理的胰岛细胞的上清液的胰岛素浓度($P < 0.001$),而且高糖处理组的胰岛细胞分泌胰岛素的浓度随着时间的推移逐渐增加,于第3天达到最高值,之后胰岛素释放显著下降(图4、表1)。

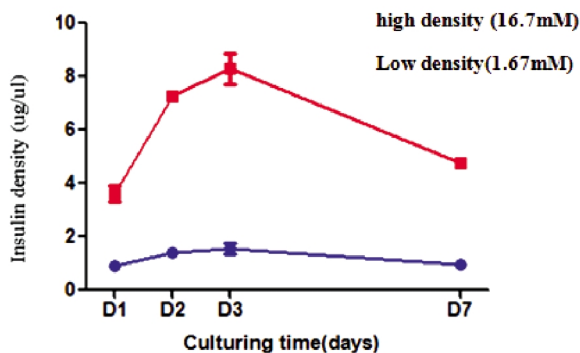


图4 胰岛素释放试验

Fig.4 Insulin releasing test

表1 胰岛素释放试验比较高糖和低糖对胰岛细胞释放胰岛素的影响

Table 1 The effect of high and low concentration of glucose on insulin release of islet cells

Group	Concentrations of released insulin($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)			
	D1	D2	D3	D7
High sugar	3.21 $\pm$ 0.21*	7.05 $\pm$ 0.19*	8.11 $\pm$ 1.42*	5.52 $\pm$ 0.40*
Low sugar	0.92 $\pm$ 0.31	1.43 $\pm$ 0.12	1.89 $\pm$ 0.61	0.81 $\pm$ 0.11
T	17.29	70.73	23.75	32.11
P	0.00	0.00	0.00	0.00

Note: Comparison with low sugar group, * $P < 0.05$

胰岛的纯化目前多用密度梯度离心法,分离剂有蔗糖、Ficoll400、Dextran、Histopaque等。本研究采用Ficoll400作为梯度离心介质,不仅能够提供一个较好的渗透环境,而且也能较好的保持胰岛活性^[16,17]。本方法分离的胰岛成活率可达90%。

纯化后的胰岛给予高浓度葡萄糖刺激后胰岛素分泌量显著增加,培养第3天胰岛素浓度达高峰,随着培养时间的延长,胰岛素浓度显著下降。所以胰岛细胞分离培养后第一周是进行实验研究的最佳时期^[18-20]。

本研究证实胶原酶P溶液原位消化及Ficoll400纯化的原代胰岛细胞分离纯化方法仍然是一种简便、稳定的方法,可以获得足量纯度高、活性好的原代胰岛细胞,为了进一步为糖尿病的移植治疗及相关免疫学机制研究奠定基础。

参考文献(References)

- [1] White SA, Shaw JA, Sutherland DE. Pancreas transplantation [J]. Lancet, 2009, 373(9677): 1808-1817
- [2] Jamiolkowski RM, Guo LY, Li YR, et al. Islet transplantation in type I diabetes mellitus [J]. Yale J Biol Med, 2012, 85(1): 37-43
- [3] Avinash Agarwal, Kenneth L. Brayman. Update on Islet Cell Transplantation for Type 1 Diabetes [J]. Semin Intervent Radiol, 2012, 29(2): 90-98
- [4] 刘永锋,程颖,孟一曼,等. 成人胰岛移植治疗2型糖尿病三例 [J]. 中华器官移植杂志, 2011, 32(3): 156-158
- [5] Liu Yong-feng, Cheng Ying, Meng Yi-man, et al. Three cases of

3 讨论

胰岛移植是治疗1型糖尿病和依赖胰岛素治疗的2型糖尿病的最有效方法,胰岛的分离、纯化及培养仍是当前研究的热点,在糖尿病治疗及科研领域占有非常重要的地位。但是胰岛分离数量和质量不足,限制其应用。分离大鼠胰岛的方法不同,分离效果差异显著,尤其实验操作人员技术熟练程度直接影响到胰岛的得率与纯度。理想的胰岛细胞制备方法应该能够提供数量多、纯度高及功能好的胰岛细胞^[10,11]。

本研究采用胆总管内逆行灌注胶原酶P及Ficoll400非连续梯度离心方法纯化大鼠胰岛细胞。严格控制消化液pH在7.8,温度控制在 $38 \pm 1^\circ\text{C}$,有利于发挥胶原酶P的最大活性^[12]。胶原酶的种类及浓度直接影响胰岛细胞分离数量,浓度过低或过高效果均不理想^[13]。范宇等研究发现胶原酶P浓度保持在1 mg/mL消化效果最好,我们研究发现当胶原酶P浓度0.9 mg/mL消化结果最佳。成年SD大鼠胰腺消化纯化后获得 (606 ± 56) IEQ/胰腺,与国内外文献报道结果相似^[14,15]。

- adult islet transplantation to cure type 2 diabetes [J]. Journal of Chinese organ transplantation, 2011, 32(3): 156-158
- [5] Mahsa M. Amoli, Roohollah Moosavizadeh, Bagher Larijani. Optimizing Conditions for Rat Pancreatic Islets Isolation [J]. Cytotechnology, 2005, 48(1-3): 75-78
- [6] 刘定志,杜成友,罗诗樵,等. 三种消化酶分离胰岛对移植胰岛存活的影响 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2012, 32(5): 567-571
- [7] Liu Ding-zhi, Du Cheng-you, Luo Shi-qiao, et al. The influence of islets isolated by three kinds of digestive enzyme on the survival rate of transplanted islet [J]. Journal of Shanghai jiaotong university (medical edition), 2012, 32(5): 567-571
- [7] 范宇,石炳毅,钱叶勇,等. 胶原酶消化时间及质量浓度对大鼠胰岛细胞分离的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(20): 3811-3815
- [8] Fan Yu, Shi Bing-yi, Qian Ye-yong, et al. The influence of Collagenase digestion time and mass concentration on rat islet isolation [J]. Tissue engineering research and clinical rehabilitation in China, 2009, 13(20): 3811-3815
- [8] 李永翔,李戈,董维平,等. 大鼠胰岛分离纯化技术的改进 [J]. 复旦学报(医学版), 2006, 33(2): 266-268
- [9] Li Yong-xiang, Li Ge, Dong Wei-ping, et al. Technical improvement of the isolation and purification of rat islet [J]. Fudan journal (medical), 2006, 33(2): 266-268

(下转第2822页)

- 1999, 18(8): 2119-2126
- [8] Eissner G, Kirchner S, Lindner H, et al. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages [J]. *J Immunol* 2000, 164(12): 6193-6198
- [9] Shi Wen-fang, Li Lin-yun, Xu Shi, et al. Inhibition of nuclear factor- κ B activation is essential for membrane associated TNF-induced apoptosis in HL-60[J]. *Immunology and Cell Biology*, 2006, 84(4):366-373
- [10] Dan Yan, Nalin Qin, Hailong Zhang, et al. Expression of TNF- α leader sequence renders MCF-7 tumor cells resistant to the cytotoxicity of soluble TNF- α [J]. *Breast cancer Res Treat*, 2009, 116(1): 91-102
- [11] 方凯, 张健, 郑芳, 等. TM-TNF 介导的反向信号对 NK 细胞杀伤功能的影响[J]. *中国免疫学*, 2007, 23(3): 195-198
- Fang Kai, Zhang Jian, Zhen Fang, et al. The effect of reverse signal mediated by tm-TNF α on NK cell killing function [J]. *Immunology*, 2007, 23(03): 195-198
- [12] Warren MA, Shoemaker SF, Shealy DJ, et al. Tumor necrosis factor deficiency inhibits mammary tumorigenesis and a tumor necrosis factor neutralizing antibody decreases mammary tumor growth in neu/erbB2 transgenic mice [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(9): 2655-2663
- [13] Storci G, Sansone P, Mari S, et al. TNF α up-regulates SLUG via the NF- κ B/HIF1 α axis, which imparts breast cancer cells with a stem cell-like phenotype [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 225(3): 682-691
- [14] Weichhaus M, Broom I, Bermano G. The molecular contribution of TNF- α in the link between obesity and breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(2): 477-483
- [15] Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(29): 7350-7360
- [16] Li Chen-tang, Wen Jin-yin, Gen Hong-di, et al. Unfavourable clinicopathological features and low response rate to systemic adjuvant therapy: results with regard to poor survival in young Chinese breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 122(1): 95-104
- [17] Soria G, Ogri-Shahak M, Haas I, et al. Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 130
- [18] Graham B, Gibson SB. The two faces of NF κ B in cell survival responses[J]. *Cell Cycle*, 2005, 4(10): 1342-1345
- [19] Choi YK, Cho SG, Woo SM, et al. Saussurea iappa clarke-derived costunolide prevents TNF α -induced breast cancer cell migration and invasion by inhibiting NF- κ B activity [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013: 936257
- [20] Zong H, Wang F, Fan QX, et al. Curcumin inhibits metastatic progression of breast cancer cell through suppression of urokinase-type plasminogen activator by NF- κ B signaling pathways [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4): 4803-4808
- [21] Connelly L, Barham W, Onishko HM, et al. Inhibition of NF- κ B activity in mammary epithelium increases tumor latency and decreases tumor burden[J]. *Oncogene*, 2011, 30(12): 1402-1412

(上接第 2818 页)

- [9] 侯续伟, 尹波, 任甫. SD 大鼠胰岛的分离纯化及培养 [J]. *解剖科学进展*, 2011, 17(2): 168-170
- Hou Xu-wei, Yin Bo, Ren Fu. The separation, purification and culture of SD rat islet [J]. *Anatomy of scientific progress*, 2011, 17(2): 168-170
- [10] Koh DS, Moody M, Jo J. Collection of islets of Langerhans using an equilibrium method[J]. *Biotechniques*, 2013, 55(1): 34-37
- [11] Fujio A, Murayama K, Yamagata Y, et al. Collagenase H is crucial for isolation of rat pancreatic islets [J]. *Cell Transplant*, 2013, 13 [Epub ahead of print]
- [12] Ramesh A, Chhabra P, Brayman KL. Pancreatic islet transplantation in type 1 diabetes mellitus: an update on recent developments[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2013, 9(4): 294-311
- [13] Halberstadt C, Williams D, Gores P. Isolation of human cadaveric pancreatic islets for clinical transplantation [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1001: 227-259
- [14] Liao YT, Jiang JX, Ye J, et al. A novel protocol for mouse islet isolation[J]. *Pancreas*, 2012, 41(7): 1134-1135
- [15] Naziruddin B, Matsumoto S, Noguchi H, et al. Improved pancreatic islet isolation outcome in autologous transplantation for chronic pancreatitis[J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(2-3): 553-558
- [16] Böttcher G, Sturm D, Ehehalt F, et al. Isolation of human islets from partially pancreatectomized patients[J]. *J Vis Exp*, 2011, 30: 53
- [17] Li Y, Yang Y. Progress of isolation and purification of pancreatic islets [J]. *Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*, 2010, 24(11): 1392-1396
- [18] Lechner A, Habener JF. Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284(13): 259-266
- [19] Randhorst H, Brandhorst D, Hesse F, et al. Successful human islet isolation utilizing recombinant collagenase [J]. *Diabetes*, 2003, 52(11): 1143-1146
- [20] Assady S, Maor G, Amit M, et al. Insulin production by human embryonic stem cells[J]. *Diabetes*, 2001, 50(22): 1691-1697