

简便快捷的小鼠胰岛分离纯化方法研究

合 湫¹⁾, 苏 恒¹⁾, 李 超¹⁾, 沈 涛²⁾, 严新民²⁾, 薛元明¹⁾

(1) 昆明医科大学附属昆华医院, 云南省第一人民医院内分泌科; 2) 基础研究所, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨小鼠胰岛分离与纯化的方法. **方法** 采用多点注射灌注胶原酶法消化胰腺, 不连续密度梯度离心联合人工挑取的方法分离、纯化胰岛. 双硫脲特异性染色后计算胰岛产量及纯度. 葡萄糖刺激后测定培养上清液胰岛素水平检测胰岛功能. **结果** (1) 每只小鼠采用上述分离、纯化法平均得到 (114 ± 15) 个胰岛, 平均纯度为 $(77.12 \pm 3.23) \%$, 胰岛细胞存活率 $> 90\%$; (2) 分离、纯化的胰岛培养上清液中胰岛素水平在无糖、低糖 (2.8 mmol/L) 和高糖 (22.2 mmol/L) 刺激下分别为 (23.80 ± 3.52) mIU/L、 (67.57 ± 4.04) mIU/L 和 (164.32 ± 10.75) mIU/L, 各组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 两两比较, 低糖组的胰岛素水平为无糖组的 2.84 倍 ($P < 0.05$), 高糖组的胰岛素水平为低糖组的 2.43 倍 ($P < 0.05$), 高糖组的胰岛素水平为无糖组的 6.90 倍 ($P < 0.05$). **结论** 采用多点注射灌注胶原酶法消化胰腺, 不连续密度梯度离心联合人工挑取的方法分离、纯化的小鼠胰岛产量及纯度较高, 形态完整, 不同浓度葡萄糖刺激后胰岛素分泌反应良好, 是一种简便、快捷的小鼠胰岛分离方法.

[关键词] 小鼠胰岛; 多点注射; 分离纯化

[中图分类号] R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 08 - 0006 - 04

A Convenient and Efficient Method of Mouse Pancreatic Islet Isolation and Purification

HE Qiu¹⁾, SU Heng¹⁾, LI Chao¹⁾, SHEN Tao²⁾, YAN Xin - min²⁾, XUE Yuan - ming¹⁾

(1) Dept. of Endocrinology; 2) Basic Research Institute, The Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Medical University, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate a convenient and efficient method of mouse pancreatic islets isolation and purification. **Methods** The isolation of mouse pancreatic islets was carried out by stationary digestion after multi-point injection of collagenase IV solution into the pancreas. A discontinuous Histopaque solution (1119, 1110, 1080 and 1060) was applied for the purification of the islets. Islet cell purity and viability were determined by dithizone (DTZ) and Trypan blue staining. The islets were cultured overnight and stimulated with different concentration of glucose (0, 2.8 and 22.2mmol/L) for 1 hour. Supernatants were collected for insulin assays by an insulin RIA kit. **Results** (1) By this optimized islets isolation and purification protocol, each mouse pancreas could yield (114 ± 15) islets, with an average purity of $(77.12 \pm 3.23) \%$ and viability more than 90%; (2) The insulin level in 0, 2.8 and 22.2 mmol/L glucose stimulation groups were (23.80 ± 3.52) mIU/L, (67.57 ± 4.04) mIU/L and (164.32 ± 10.75) mIU/L, respectively. There was a statistically significant difference among groups ($P < 0.05$). Compared with 0 mmol/L glucose group, the insulin level in 2.8 mmol/L glucose group was 2.84 times higher ($P < 0.05$) and the insulin level in 22.2 mmol/L glucose group was 6.90 times higher ($P < 0.05$). Compared with 2.8 mmol/L glucose group, the insulin level in 22.2 mmol/L glucose group was 2.43 times

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目(2005C0002R);云南省中青年学术技术带头人后备人才项目(2007PY01-32)

[作者简介] 合湫 (1986~), 女, 云南昭通市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事胰岛功能研究工作.

[通讯作者] 苏恒. E-mail:su_hen@hotmail.com

higher ($P < 0.05$). **Conclusions** Multi-point injection of collagenase IV solution into the pancreas, followed by discontinuous density gradient separation and manually picking up is a convenient and efficient mouse islet isolation and purification method. The islets isolated and purified by this optimized protocol can maintain functional insulin secretion potential in response to glucose stimulation.

[**Key words**] Mouse islets; Multi-point injection; Isolation and purification

随着经济的发展, 城市化生活方式的改变, 目前糖尿病的发病率日益增加, 已成为严重威胁人类健康的常见疾病, 但其病理生理过程尚未完全明确. 胰岛 β 细胞破坏在糖尿病的发生、发展中发挥重要作用, 获得纯度、存活率较高且具有良好功能的胰岛是探讨糖尿病发病机制及胰岛移植治疗的基础^[1,2]. 尽管已有较多小鼠胰岛分离、纯化的方法报道, 但部分方法操作要求高, 影响因素较多^[3,4]. 本研究以 Xu L^[5]等分离、纯化小鼠胰岛的方法为基础, 探讨多点注射灌注胶原酶消化胰腺, 不连续密度梯度离心联合人工挑取的方法分离、纯化小鼠胰岛, 并对体外培养的胰岛葡萄糖刺激下胰岛素分泌功能进行评价.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 昆明小鼠, 8~12 周龄, 体重 30~50 g, 雌雄不限, 购自昆明医科大学实验动物中心, 在清洁环境下喂养.

1.1.2 试剂 低糖 DMEM 培养液 (Hyclone 公司, 葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L), 胎牛血清 (Bioind 公司), 胶原酶 IV (Sigma 公司), Dnase I (10 μ g/mL, Fermentas 公司), Histopaque 1119 溶液 (Sigma 公司), Hanks 缓冲液 (Hyclone 公司), 牛血清白蛋白 BSA (Sigma 公司), 青、链霉素 (国产), 胰岛素放射免疫检测试剂盒 (50T, 原子高科股份有限公司).

1.1.3 主要试验仪器 恒温细胞培养箱 (美国 Forma Scientific 公司) 倒置相差显微镜 (NICON 公司, 806020 型) 超净工作台 (吴江市绿岛净化设备厂, SW-CJ-1F 型) 低温高速离心机 (日立, CR22G) 37 $^{\circ}$ C 水浴箱 (北京光明医疗仪器厂).

1.2 方法

1.2.1 小鼠胰岛的分离 小鼠断颈处死, 无菌条件下打开腹腔及胸腔, 暴露心脏, 破心放血. 肝脏外展暴露胃、十二指肠及胰腺. 胰腺内多点注入胶原酶 IV 溶液 (2 mg/mL) 约 2 mL, 使其均匀膨胀. 分离胰腺组织, 置于含胶原酶 IV 溶液 2 mL 的尖底

离心试管中, 37 $^{\circ}$ C 水浴静止消化 30 min. 消化结束后振荡分散胰腺组织, 加入预冷的含 0.5% BSA 的终止液终止消化. 1 200 rpm 离心 2 min, 弃上清. 无菌纱布过滤, 收集沉淀组织.

1.2.2 小鼠胰岛的纯化 分离后的胰腺组织内加入 10 mL Histopaque 1119 溶液, 振荡混匀. 依次沿管壁小心缓慢加入 Histopaque 1110、Histopaque 1080、Histopaque 1060 溶液各 10 mL, 保证分层完好, 2 000 r/min 水平离心 25 min. 离心后吸取 Histopaque 1110 至 Histopaque 1080 界面上的絮状细胞层 (此层内含有大量的胰岛). 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基 (11.1 mM 葡萄糖) 洗涤 1 次, 2 500 r/min 离心 15 min, 弃上清, 保留沉淀. 加入完全培养基吹打混匀制成胰岛悬液, 分入 6 cm 培养皿中, 双硫腙 (dithizone, DTZ) 对胰岛细胞进行特异性染色, 倒置显微镜下胰岛细胞为猩红色, 非胰岛细胞不着色, 计算胰岛产量及纯度:

$$\text{纯度} = \frac{\text{DTZ 染色阳性的细胞团数目}}{\text{细胞团总数}} \times 100\%$$

0.4% 台盼蓝染色后计算胰岛细胞存活率 (死细胞被染成蓝色, 而活细胞拒染呈无色透明状),

$$\text{活细胞率} (\%) = \frac{\text{未染色的细胞数}}{\text{观察的细胞总数}} \times 100\%$$

倒置显微镜下用微量取样器选取包膜完整、形态正常、大小基本相等的胰岛种于 24 孔板中 (含 DMEM 完全培养基, 20 个胰岛/孔), 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中过夜培养, 备试验.

1.2.3 小鼠胰岛葡萄糖刺激下胰岛素分泌功能分离、纯化后的胰岛经过夜培养用于本实验. 培养于 24 孔板中的胰岛换无血清无糖含 0.1% BSA 的 KRBH 液^[6] (NaCl 129 mmol/L, KCl 4.8 mmol/L, NaHCO_3 5 mmol/L, MgSO_4 1.2 mmol/L, CaCl_2 2 mmol/L) 培养 1 h, 收集上清. 分别换低糖、高糖 KRBH 液 (含 2.8、22.2 mmol/L 葡萄糖) 培养 1 h, 收集上清. 放射免疫法测定上清液中胰岛素浓度.

1.3 统计学处理

采用 SPSS 软件对研究数据进行统计学分析, 正态分布计量数据 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 One-Way ANOVA 分析, 两组间比较采用 LSD 的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 小鼠胰岛的分离、纯化

小鼠胰腺经多点注射灌注胶原酶后,胰腺充盈良好呈无色水泡样。静止消化后胰腺分散成絮状消化物及少数未完全消化的胰腺组织、淋巴结等。经不连续密度梯度离心后,各层面均较清亮,大量的外分泌腺和杂质沉在离心管底部,在 Histopaque1110 至 Histopaque1080 梯度分界面有大量细胞团絮状分布,此为胰岛和胰岛碎片及少量的杂质成分。

分离、纯化的小鼠胰岛细胞团大小不一,呈圆形或卵圆形,胰岛细胞胞浆丰富,大多数胰岛细胞团胞膜完整,折光性好(见图 1)。胰岛细胞团中混杂着部分腺泡组织,每只小鼠平均得到 (114 ± 15) 个胰岛细胞,0.4% 台盼蓝染色后胰岛活细胞率 $>90\%$,DTZ 染色后,80% 的细胞团染成深棕色,腺泡细胞未着色,其中 90~100 个高质量的胰岛可用于体外培养,人工挑取后,腺泡细胞及杂质被去除(见图 2)。



图 1 分离纯化后的胰岛 (10×10)

Fig 1 Islet cells group after isolation and purification (10×10)

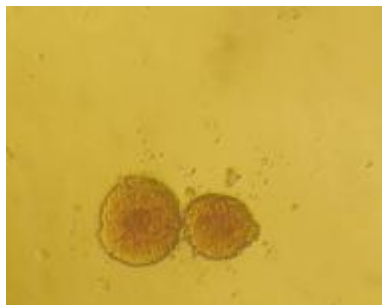


图 2 手工挑取后的胰岛 (10×40)

Fig. 2 Islet cells group after manually picking up (10×40)

2.2 小鼠胰岛葡萄糖刺激下胰岛素分泌功能

分离、纯化的胰岛体外培养下,无糖组胰岛素分泌水平为 (23.80 ± 3.52) mIU/L,低糖 (2.8 mmol/L) 和高糖 (22.2 mmol/L) 组胰岛素的分泌水平分别为 (67.57 ± 4.04) mIU/L 和 (164.32 ± 10.75) mIU/L,各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3。两两比较,低糖组的胰岛素水平为无糖组的 2.84 倍 ($P < 0.05$),高糖组的胰岛素水平为低糖组的 2.43 倍 ($P < 0.05$),无糖组的 6.90 倍 ($P < 0.05$)。

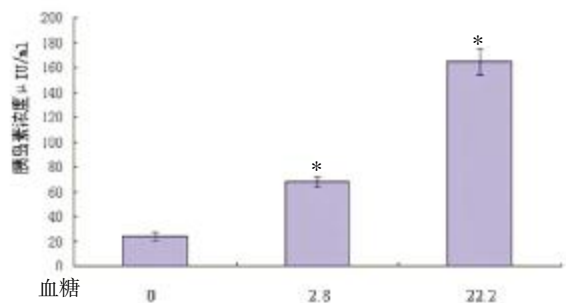


图 3 小鼠胰岛体外胰岛素释放实验

Fig. 3 Mouse islet glucose-stimulated insulin release in vitro experiments

与无糖组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

胰腺由内分泌部分胰岛和外分泌部分胰腺腺泡组成,胰岛散在于胰腺的腺泡实质中,其总体积仅占整个胰腺的 1%~2%。获得高纯度及高存活率的胰岛是探讨糖尿病发病机制及胰岛移植治疗的基础。胰岛分离、纯化受到很多因素的影响,文献报道的情况也不尽相同。标准组织切碎消化技术(切碎法)在 1965 年由 Moskalevski 首创,随后 Lacy 和 Kostianovsky 对其进行了改良。此方法很大程度上依赖于操作技术,对胰岛的破坏较大。Shapiro 于 1996 年提出了一种改良型静止消化技术,并将其与标准化组织切碎消化技术进行了双盲比较,结果显示胆总管内胶原酶注射静止法胰岛产量高出切碎法 47.5%,且胰岛功能保留方面亦优于切碎法^[7]。Gotoh 等于 1985 年建立的经胆总管注入胶原酶扩张、消化胰腺, Ficoll 密度梯度离心分离胰岛的方法多年来一直被多数研究者所采用^[8,9]。该方法的不足之处在于 Ficoll 的配制、除菌及密度梯度的形成比较复杂、影响因素多,且小鼠胰胆总管细而薄,胶原酶注射的操作难度较大,导致每次分离得到的胰岛数目、纯度和活细胞率

变化很大. 近年来有人尝试从胆囊管穿刺注射胶原酶, 虽有所改进但易于污染.

国内外用不同方法、不同类型的酶、不同消化条件得到的胰岛产量差别较大. 国内刘爽等^[10]报道, 胆总管穿刺注射胶原酶 P, 消化 20 ~ 30 min, 每只小鼠可获得 83 ~ 113 个胰岛. 一些研究显示, 与单纯不连续密度梯度离心法比较, 直接人工挑取法可以提高胰岛的产量及纯度^[11-13]. 本研究采用胰腺表面多点注入胶原酶 IV, 使其均匀膨胀的消化方法, 避免了传统切碎法消化不均匀的缺点, 且操作较胆总管内灌注胶原酶法简便、快捷, 结合 Histopaque 不连续密度梯度离心联合人工挑取法, 每只小鼠平均得到 (114 ± 15) 个胰岛, 其中 90 ~ 100 个高质量的胰岛可用于体外培养.

在本研究中发现, 胰腺消化是胰岛分离的关键步骤, 选择合适的酶浓度和控制消化时间尤为重要. 消化时间过短, 胰岛未能从外分泌腺泡中释放出来, 消化时间过长, 胰岛易破碎, 活性受损. 本研究采用胶原酶 IV (2 mg/mL), 37 °C 静止消化 30 min 获得了较好的效果. 多点灌注法使小鼠胰腺完全充分扩张也是胰岛分离的关键步骤, 若胰腺膨胀不佳, 胰岛产量将明显降低. 胰岛纯化目前多用密度梯度离心法. 与 Ficoll 不连续密度梯度离心法相比, 本研究采用的 Histopaque 可提供更好的渗透环境, 能更好地保持胰岛的活性与功能, 且可以再次纯化. 本研究对 Histopaque 不连续密度梯度离心法分离、纯化的胰岛进行手工挑拣, 可以显著提高胰岛纯度, 且保证获得的胰岛外膜完整, 边界光滑.

本方法分离、纯化的小鼠胰岛纯度及细胞存活率较高. 胰岛体外培养中葡萄糖刺激下胰岛素分泌功能显示: 分离、纯化后的胰岛在葡萄糖刺激下可分泌胰岛素, 且胰岛素分泌水平与葡萄糖刺激浓度成正比, 说明胰岛的功能良好.

综上所述, 经胰腺表面多点注射灌注胶原酶, 静止消化并以不连续密度梯度离心联合人工挑取的方案提高了胰岛的产量、纯度和活性, 简化了实验流程, 是一种简便、快捷的小鼠胰岛分离、纯化方法.

[参考文献]

- [1] SALAZAR-BANUELOS A, WRIGHT J R, SIGALET D, et al. Pancreatic islet transplantation into the bone marrow of the rat [J]. *Am J Surg*, 2008, 195 (5): 674 - 678.
- [2] SAKAI T, LI S, TANIOKA Y, et al. Intraperitoneal injection of oxygenated perfluorochemical improves the outcome of intraportal Islet transplantation in a rat model [J]. *Transplant Pro*, 2006, 38 (10): 3 289 - 3 292.
- [3] ZAWALICH W S, ZAWALICH K C, YAMAZAKI H. Divergent effects of epinephrine and prostaglandin E2 on glucose-induced insulin secretion from perfused rat islets [J]. *Metabolism*, 2007, 56 (1) : 12 - 18.
- [4] ANDRADES P, ASIEDU C K, GANSUVD B, et al. Pancreatic islet isolation variables in non-human primates [J]. *Diabetologia*, 2008, 51 (7): 1 236 - 1 244.
- [5] BUZZI F, XU L. Differential effects of protein kinase B/Akt isoforms on glucose homeostasis and islet mass [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30 (3): 601 - 612.
- [6] SMITH S J, ZHANG H, CLERMONT A O, et al. In vivo monitoring of pancreatic beta-cells in a transgenic mouse model [J]. *Mol Imaging*, 2006, 5 (2): 65 - 75.
- [7] LAKEY J R, BURRIDGE P W, SHAPIRO A M. Technical aspects of islet preparation and transplantation [J]. *Transplantation*, 2003, 16(9): 613 - 632.
- [8] NIKOLIC D M, DJORDJEVIC P B, DIMITRIJEVIC-SRECKOVIC V, et al. Influence of the purification of human adult pancreatic islets on insulin secretion [J]. *Vojnosanit Pregl*, 2010, 67(2): 128 - 131.
- [9] QIAN T L, WANG X H, LIU S, et al. Fentanyl inhibits glucose-stimulated insulin release from beta-cells in rat pancreatic islets [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15 (33) : 4 163 - 4 169.
- [10] 刘爽, 崔士华, 孙海晨. 一种改良的小鼠胰岛分离和移植模型 [J]. *首都医科大学学报*, 2009, 30(2): 259 - 261.
- [11] 徐小明, 林戈. 一种高效、快捷、经济的小鼠胰岛细胞分离纯化方法 [J]. *生命科学研究*, 2011, 15(1): 46 - 50.
- [12] 蒋铁建, 苏恒, 周智广. NOD 鼠胰岛分离与纯化的方法研究 [J]. *湖南医科大学学报*, 2002, 27(1): 85 - 87.
- [13] 李明, 蔡德鸿. 一种简易高效建立小鼠胰岛移植模型的方法 [J]. *广东医学*, 2008, 29(2): 207 - 209.

(2012 - 03 - 07 收稿)