

- 10 王东旭, 李伟. 食管癌病因学进展. 世界华人消化杂志 2000;8:1029-1030
- 11 Youssef EM, Hasuma T, Morishima Y, Takada N, Osugi H, Higashino M, Otani S, Fukushima S. Overexpression of cyclin D1 in rat esophageal carcinogenesis model. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:18-25
- 12 Wang QS, Sabourin CL, Wang H, Stoner GD. Overexpression of cyclin D1 and cyclin E in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1996;17:1583-1588
- 13 Anayama T, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Positive correlation between p27Kip1 expression and progression of human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;79:439-443
- 14 Matsumoto M, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Comparison of deregulated expression of cyclin D1 and cyclin E with that of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK2 in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999;80:256-261
- 15 Chetty R. p27 Protein and cancers of the gastrointestinal tract and liver: an overview. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:23-27
- 16 Shibata H, Matsubara O, Wakiyama H, Tanaka S. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Res Pract* 2001;197:157-164
- 17 Yasunaga M, Tabira Y, Nakano K, Iida S, Ichimaru N, Nagamoto N, Sakaguchi T. Accelerated growth signals and low tumor-infiltrating lymphocyte levels predict poor outcome in T4 esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1634-1640
- 18 Shamma A, Doki Y, Tsujinaka T, Shiozaki H, Inoue M, Yano M, Kawanishi K, Monden M. Loss of p27 (KIP1) expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2000;58:152-158
- 19 Kagawa Y, Yoshida K, Hirai T, Toge T. Significance of the expression of p27Kip1 in esophageal squamous cell carcinomas. *Dis Esophagus* 2000;13:179-184
- 20 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

成年猪胰岛分离纯化方法的改良

黄跃南, 郭欣, 田素礼, 吴德全, 单世光

黄跃南, 田素礼, 吴德全, 单世光, 哈尔滨医科大学附属二院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
郭欣, 哈尔滨市中医医院外科 黑龙江省哈尔滨市 150076
通讯作者: 黄跃南, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 246 号, 哈尔滨医科大学附属二院普外科, dr-huangyuanan@163.com
电话: 0451-86605575
收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 改良成年猪胰岛分离纯化技术, 以优化胰岛制备方法。

方法: 采用体、尾部区段猪胰腺胰管内灌注复合胶原酶震荡消化(胶原酶 V+DNA 酶)和改进的 Dextran 不连续密度梯度离心法分离纯化猪胰岛, 并进行生物学活性测定和形态学观察。

结果: 胰腺被消化组织平均 15 ± 3.4 g, 消化后胰岛获得量 4130 ± 976 IE/g 胰腺组织, 纯化后胰岛获得量为 2320 ± 669 IE/g 胰腺组织, 胰岛纯度 80% 左右。胰岛素释放试验结果显示分离纯化后胰岛功能良好。病理切片, HE 染色显示细胞团结构完整, 细胞核清晰可见, 胞质丰富。

结论: 经本方法分离纯化获得的猪胰岛具有较高的产量和纯度、结构完整、功能良好, 可满足大动物移植实验和临床移植的需要。

黄跃南, 郭欣, 田素礼, 吴德全, 单世光. 成年猪胰岛分离纯化方法的改良. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1912-1914
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1912.asp>

0 引言

异种胰岛移植是近年来应用胰岛移植治疗胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)的一个研究热点, 同种移植^[1]和干细胞移植^[2]有其较多的局限性, 而猪就成为最有希望的临床异种胰岛移植的动物供体。成年猪的胰岛缺少完整的包膜环绕, 分离和纯化过程较为复杂, 胰岛结构和功能完整性极易在此过程中被破坏, 因此需进一步研究和改进成年猪胰岛分离纯化技术, 以获得足量结构完整、功能良好的胰岛细胞, 从而满足大动物移植实验和临床移植的需要。本研究旨在探讨和改良成年猪胰岛分离纯化技术^[3-4], 以优化胰岛制备方法。

1 材料和方法

1.1 材料 成年杂种猪, 猪龄 12 mo, 体质量 150 kg 左右, 由哈尔滨市肉联厂提供。猪被屠宰放血后, 在相对无菌条件下迅速取出胰腺, 保存于 4℃ Hanks 液中送至实验

室,热缺血时间少于10 min,冷缺血时间少于90 min. 胶原酶V, 512 ku/mg (Sigma 公司), DNA 酶(包头生物制剂公司), 胎牛血清(Gibco 公司), RPMI1640 培养液(Gibco 公司), Dextran (Pharmacia 公司), Hanks 平衡盐溶液(Gibco 公司).

1.2 方法

1.2.1 胰岛分离^[5] 胰腺取回后,置于超净工作台上,快速去除胰周组织、脂肪、血管及外科被膜,保留固有被膜.从胰头、胰体交界部横断胰腺,找到主胰管^[6],用20 G 套管针插入,缝合线结扎,尾部远端亦结扎切断^[7],每次均取约15-20 g 组织,注入4℃含Ca²⁺ Hanks 液配制的复合胶原酶溶液(1.5 g/L,内含DNA 酶0.3 g/L),注入量 = 胰质量×2,注射速度7 mL/min,3-4 min 内完成,置入玻璃容器内,在38.5±0.1℃水浴中震荡消化,震速100 r/min,在消化过程中间断加入0.1 mmol/L 的NaOH,使消化液pH 值尽可能维持在7.8左右,从消化20 min 开始每间隔4 min 取样一次,双硫腺染色镜检,当胰腺组织被消化裂解成细沙状,镜检见大部分结构完整的胰岛从外分泌组织中脱落出来,立即用4℃冷Hanks 液(含100 mL/L 胎牛血清)终止消化,充分混匀后,用40 目钢网过滤,收集消化后组织,4℃离心洗涤2次,去除脂肪等杂质细胞,取样镜检计数和观察消化后胰岛分离情况.

1.2.2 胰岛纯化 用Dextran 配制成密度为1.037, 1.054, 1.070, 1.096, 1.11 kg/L 的不连续密度梯度液,依次将不连续密度梯度液各10 mL 加入50 mL 离心管中,最后将洗涤后的消化组织每0.5 mL 与1.037 kg/L 密度梯度液10 mL 混匀,小心移至离心管中液体上层,形成不连续密度梯度.将2-4 个离心管置入低温离心机中,先800 r/min 离心5 min,然后2 500 r/min 离心15 min,离心后在1.096-1.054 kg/L 之间收集纯化的胰岛,4℃离心洗涤2次.分别取样镜检计数,估计纯度和行生物学活性及组织学鉴定.

1.2.3 胰岛计数和纯度测定^[8] 分离纯化后的组织悬液用双硫腺(双硫腺10 mg,无水乙醇3 mL,250 g/L 氨水50 μL)进行染色,光镜下胰岛细胞团染成腥红色或红色,外分泌组织不着色,呈圆形、椭圆形或不规则形.在显微镜下计数直径≥50 μm 的胰岛算出每克胰腺组织分离的胰岛当量数,纯度用内、外分泌组织量的比值来估计.

1.2.4 胰岛生物学活性鉴定 将纯化后胰岛细胞悬液放置在显微镜下,用巴氏吸管吸取胰岛放入培养板中,每10个胰岛当量(每1个胰岛当量相当于直径150 μm 的胰岛细胞团,IE)的成年猪胰岛(APIs)置入一个培养孔,6孔为1组,共4组.每组分别置入无糖培养基、含5.6 mmol/L 葡萄糖(低糖)、16.7 mmol/L 葡萄糖(高糖)、16.7 mmol/L 葡萄糖+10 mmol/L 茶碱(高糖+茶碱)的RPMI1640 培养液中,置于37℃、含50 mL/L CO₂ 的培养箱中孵育4 h,收集培养液,用胰岛素放免试剂盒(中科院原子能研究所)测定胰岛素含量.

1.2.5 胰岛组织学检查 离心纯化后胰岛细胞悬液,收集胰岛组织,用无水酒精固定,石蜡包埋切片,HE 染色检查胰岛组织结构完整性.

统计学处理 所得数据以mean ± SD 表示,组间均数差异用 *t* 检验比较, *P* < 0.05 为有差异.

2 结果

2.1 分离纯化后的胰岛产量和纯度 18只成年杂种猪胰腺被消化组织平均15 ± 3.4 g,消化后胰岛获得量4 130 ± 976 IE/g 胰腺组织.纯化后胰岛获得量为2 320 ± 669 IE/g 胰腺组织,胰岛纯化后纯度80%左右,进一步于检检出外分泌组织后可达95%以上.

2.2 胰岛形态学观察 消化后猪胰岛经双硫腺染色后,在倒置显微镜下可见大量圆形、椭圆形或不规则形红色或腥红色细胞团,透明度较好,触之易碎,包膜不明显,也有散在单个染色细胞.外分泌组织不着色,透明度差,二者容易区分.纯化后胰岛直径比消化后减小,多呈圆形或椭圆形,直径多在50-200 μm 之间,散在的单个细胞数量亦增多.

2.3 胰岛素释放试验 胰岛素释放试验结果显示,猪胰岛在高糖加茶碱刺激条件下胰岛素释放量为805.7 ± 55.7 mIU/(L·20IE),在高糖刺激条件下为472.7 ± 102.3 mIU/(L·20IE),在低糖刺激条件下为314.2 ± 34.45 mIU/(L·20IE),而无糖对照组胰岛素释放量为143.2 ± 87.5 mIU/(L·20IE);在高糖加茶碱刺激条件下胰岛素释放量为低糖组的1.51倍和2.56倍,为对照组的3.31倍和5.63倍.统计学均有显著性差异(*P* < 0.01),提示分离纯化后胰岛功能良好.

2.4 胰岛组织学检查 纯化后胰岛组织石蜡切片HE染色显示细胞团结构完整,细胞核清晰可见,胞质丰富.

3 讨论

由于供体来源困难,猪胰岛作为异种组织供体来源受到重视,因为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,特别从1990年以来,使用猪胰岛进行异种移植的研究已成为热门课题之一.猪胰岛的分离和纯化比较困难,主要有以下几个方面^[9]: (1)成年猪胰腺结构复杂,结缔组织较多,内分泌腺与外分泌腺关联紧密,胰岛周围缺乏基质,因此很难分离. (2)猪胰岛周围缺乏被膜保护,这样就使猪胰岛在分离过程中非常脆弱,极易溶解破碎. (3)猪的胰腺结构较复杂,猪胰管寻找比较困难,成功插管是进行胰岛分离纯化的前提条件. (4)猪的品系、年龄及冷热缺血时间均是影响胰岛产量的主要因素.猪胰岛细胞外基质主要成分为胶原I、III、IV和Laminin、Fibronectin,因此选用胶原酶V和DNA 酶混和^[10]进行消化,可以建立起可靠、可重复的胰岛分离方法.我们采用了胶原酶V(1.5 g/L,含一

定量的酪蛋白酶、纤维蛋白酶)和DNA酶(0.3 g/L)混合震荡消化法.每次实验均取胰体尾部15 g左右组织进行区段性灌注消化分离胰岛,此种改进使实验有所简便,又节约大量资金,取得了较好的实验效果.

在本实验中发现热缺血时间和猪的年龄对胰岛分离纯化结果产生明显影响.热缺血时间越长,分离获得结构功能完整的胰岛越少,胰岛多裂解成单个细胞.若时间超过15 min以上则很难获得足量结构完整、功能良好的胰岛细胞团.大于10月龄的成年猪分离获得胰岛结构更完整,以圆形胰岛为多,胰岛素释放试验显示功能良好,这可能与成年猪随年龄增长胰腺中圆形胰岛增加有关,同其他形态胰岛相比,圆形胰岛在物理机械作用下更不易破碎.

实验中恒温水浴箱温度^[11]设为38.5℃并取部分而不是全部胰腺组织进行消化,可以使被消化组织温度从4℃迅速升至胶原酶进行有效消化的最适温度,并使胰腺组织被均匀消化.在消化过程中使用含7.5 mmol/L Ca^{2+} 的胶原酶溶液和不断加入碱性溶液(0.1 mmol/L 氢氧化钠溶液)以对抗不断酸化的消化液,使其PH值尽可能维持在一定范围(7.8±0.1),可以明显减少胶原产生和使胶原酶达到最佳活性,提高消化效果.在消化结束后迅速用冷Hanks终止消化,防止胶原酶过度消化,保证消化下来的大量胰岛细胞团结构和功能免受破坏.猪胰岛的分离和纯化比较困难,成年猪胰腺结构复杂,结缔组织较多,胰岛周围缺乏被膜保护,猪的品系、年龄及冷热缺血时间消化过程中胶原的产生均是影响产量的主要因素^[12].通过对温度的迅速调控、使用含钙胶原酶和碱性溶液维持消化液pH值在一定范围之内以及对消化时间的适时控制,消化后所得的胰岛产量有明显提高,胶原的产生明显减少.与国内外同类研究相比较^[13-14],处于较高水平.

纯化过程中,本实验改进了将消化后胰岛组织悬液和最高密度梯度液混合离心纯化的传统方法^[15],采用最低密度梯度液和消化后胰岛组织悬液均匀混合离心纯化.此种改进有以下优点:(1)低密度Dextran液黏稠度低,易于和胰岛细胞悬液均匀混合.(2)在混合过程中胰岛细胞分散好,不易破碎,有利于保持其完整性.(3)在离心过程中,密度高的外分泌组织首先离心沉淀下去,不会出现传统方法因细胞堆积使密度低的胰岛细胞被密度较高的外分泌组织挤压住,无法离心上去的现象,使纯化更充分、更有效.

改良后的方法所得胰岛具有较高的产量和纯度、结构完整、功能良好,可满足大动物移植实验和临床移植的需要.本实验室将此种方法作为标准的猪胰岛分离纯化

的实验方法进行推广,已获得更多的实验数据验证此方法的有效性和可靠性,为进一步实现临床异种胰岛移植奠定了坚实的基础.

4 参考文献

- Matsumoto S, Tanaka K, Strong DM, Reems JA. Efficacy of human islet isolation from the tail section of the pancreas for the possibility of living donor islet transplantation. *Transplantation* 2004;78:839-843
- Trivedi N, Hollister-Lock J, Lopez-Avalos MD, O'Neil JJ, Keegan M, Bonner-Weir S, Weir GC. Increase in beta-cell mass in transplanted porcine neonatal pancreatic cell clusters is due to proliferation of beta-cells and differentiation of duct cells. *Endocrinology* 2001;142:2115-2122
- O'Neil JJ, Stegmann JP, Nicholson DT, Gagnon KA, Solomon BA, Mullen CJ. The isolation and function of porcine islets from market weight pigs. *Cell Transplantation* 2001;10:235-246
- Swanson CJ, Olack BJ, Goodnight D, Zhang L, Mohanakumar T. Improved methods for the isolation and purification of porcine islets. *Hum Immunol* 2001;62:739-749
- 黄跃南, 田素礼, 郭欣, 吴德全, 单世光, 齐忠全. 异种胰岛移植联合应用免疫抑制剂FK506和LEF的实验研究. *世界华人消化杂志* 2004;12:1868-1871
- van der Vliet JA, Meloche RM, Field MJ, Chen DJ, Kaufman DB, Sutherland DE. Pancreatic islet isolation in rats with ductal collagenase distention, stationary digestion, and dextran separation. *Transplantation* 1988;45:493-495
- Sutton R, Peter M, McShane P, Gray DW, Morris PJ. Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. *Transplantation* 1986;42:689-691
- Krickhahn M, Meyer T, Buhler C, Thiehe A, Ulrichs K. Highly efficient isolation of porcine islets of langerhans for xenotransplantation: numbers, purity, yield and in vitro function. *Ann Transplant* 2001;6:48-54
- Bugliani M, Lupi R, Del Guerra S, Boggi U, Marselli L, Sbrana S, Vistoli F, Torri S, Del Chiaro M, Signori S, Filipponi F, Del Prato S, Campa M, Corsini V, Campatelli A, Di Candio F, Mosca F, Marchetti P. An alternative and simple method to consistently prepare viable isolated human islets for clinical transplantation. *Transplant Proc* 2004;36:605-606
- 贺德, 詹文华, 蔡世荣, 陈创奇, 汪建平, 兰平. 三种消化酶在犬鼠胰岛分离纯化中的效果比较. *中华实验外科杂志* 2003;20:434-435
- 张雷, 吴德全, 孙岩, 单世光. 大鼠胰岛分离的影响因素. *中华内分泌代谢杂志* 2002;18:491-492
- Nielsen TB, Yderstraede KB, Beck-Nielsen H. Isolation, transplantation, and functional studies of adult porcine islets of Langerhans. *Comp Med* 2002;52:127-135
- Kerr-Conte J, Pattou F, Hober C, Ple A, Riquier M, Proye C, Lefebvre J. Induction of cerebral death in slaughterhouse pigs facilitates pancreas harvesting for islet isolation. *Transplant Proc* 1994;26:614-615
- Nano R, Clissi B, Melzi R, Calori G, Maffi P, Antonioli B, Marzorati S, Aldrighetti L, Freschi M, Grochowicki T, Socci C, Secchi A, Di Carlo V, Bonifacio E, Bertuzzi F. Islet isolation for allotransplantation: variables associated with successful islet yield and graft function. *Diabetologia* 2005;48:906-912
- 陈创奇, 詹文华, 汪建平, 蔡世荣, 兰平, 吴小剑, 贺德. 多种分离纯化大鼠胰岛细胞的实验方法比较. *中山医科大学学报* 2002;23:118-120