

冷冻保存后成人胰岛细胞与小肠黏膜下层的共培养

侯军, 薛武军, 冯新顺, 田小辉, 庞新路, 滕焱

侯军, 薛武军, 冯新顺, 田小辉, 庞新路, 滕焱, 西安交通大学医学院第一附属医院肾移植科 陕西省西安市 710061

通讯作者: 薛武军, 710061, 陕西省西安市健康路1号, 西安交通大学医学院第一附属医院肾移植科. xuewujundocor@sina.com

电话: 029-85324033 传真: 029-85324033

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-27

Co-culture of post-cryopreserved human pancreatic islet cells with small intestinal submucosa

Jun Hou, Wu-Jun Xue, Xin-Shun Feng, Xiao-Hui Tian, Xin-Lu Pang, Yan Teng

Jun Hou, Wu-Jun Xue, Xin-Shun Feng, Xiao-Hui Tian, Xin-Lu Pang, Yan Teng, Department of Renal Transplantation, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Wu-Jun Xue, Department of Renal Transplantation, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, 1 Jiankang Road, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. xuewujundocor@sina.com

Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-27

Abstract

AIM: To investigate the supportive and protective effect of the small intestinal submucosa (SIS) on the post-cryopreserved human pancreatic islet cells.

METHODS: The purified human islet cells were divided into SIS and control group after they were cryopreserved for 1 mo. The recovery rate of the islet cells was determined after they were cultured in RPMI-1640 for 1 wk. The morphological features and insulin excretion after stimulation were assessed *in vitro*.

RESULTS: The recovery rate of the islet cells in SIS group was significantly higher than that in the control group ($90.5 \pm 1.8\%$ vs $62.7 \pm 3.6\%$, $P < 0.05$), and the cells were well shaped. After stimulation, the insulin secretion in the SIS group was markedly higher than that in the control group (25.8 ± 1.7 mU/L vs 14.6 ± 1.3 mU/L, $P < 0.05$). When the islet cells were placed in the high glucose solution containing theophylline, the calculated stimulation index in SIS group was about 3 times as high as that in the control group.

CONCLUSION: The co-culture of post-cryopreserved human pancreatic islet cells with small intestinal submucosa is a promising way to increase recovery rate

and improve the function of the post-cryopreserved islets.

Key Words: Cryopreservation; Recovery rate; Islet; Small intestinal submucosa

Hou J, Xue WJ, Feng XS, Tian XH, Pang XL, Teng Y. Co-culture of post-cryopreserved human pancreatic islet cells with small intestinal submucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2697-2699

摘要

目的: 探讨猪小肠黏膜下层 (SIS) 对冷冻保存后的胰岛细胞的支持和保护作用。

方法: 分离纯化后的成人胰岛细胞经冷冻保存1 mo后分为SIS组 and 对照组, 在RPMI-1640培养液培养1 wk后分别测定两组的胰岛细胞回收率, 观察胰岛细胞形态并进行胰岛素刺激释放试验。

结果: SIS组胰岛细胞回收率为 $90.5 \pm 1.8\%$, 较游离组 $62.7 \pm 3.6\%$ 显著提高 ($P < 0.05$), 胰岛形态较对照组完整。在高糖刺激下, SIS组胰岛素分泌量较游离组增高 (25.8 ± 1.7 mU/L vs 14.6 ± 1.3 mU/L, $P < 0.05$)。在含有茶碱的高糖溶液中, 微囊组的刺激指数为游离组的3倍。

结论: SIS作为一种天然的细胞外基质材料, 可显著提高胰岛细胞冷冻保存后的回收率, 并改善胰岛细胞的功能。

关键词: 冷冻保存; 回收率; 胰岛功能; 小肠黏膜下层

侯军, 薛武军, 冯新顺, 田小辉, 庞新路, 滕焱. 冷冻保存后成人胰岛细胞与小肠黏膜下层的共培养. *世界华人消化杂志* 2005;13(22):2697-2699

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2697.asp>

0 引言

虽然糖尿病的治疗在上个世纪取得了显著的进步, 但是该病的发病率和死亡率仍较高。预计到2030年, 全世界糖尿病患者将从2000年的1.71亿上升至3.66亿^[1]。胰岛移植作为根治糖尿病的方法受到了广泛关注。随着临床胰岛移植的不断开展, 胰岛的冷冻保存成为重要的研究领域。胰岛的冷冻保存可以为临床胰岛移植工作提供许多便利, 例如长途运输胰岛及建立胰岛细胞库^[2]。但目前胰岛的冷冻保存不可避免的在冷冻过程中会使胰岛细胞受到损害, 从而使复温后的胰岛细胞活性及功能大大降低^[3]。冷冻损伤主要发生在胰岛的冻融

过程中. 虽然使用甘油或二甲基亚砷 (DMSO) 作为冷冻保护剂, 但冷冻后胰岛细胞的回收率只有67-89%^[4]. 猪的小肠黏膜下层 (small intestinal submucosa, SIS) 作为一种细胞外基质, 具有支持细胞生长, 促进伤口愈合、组织再生的功能. 我们将冷冻保存1 mo后的成人胰岛细胞与SIS共培养1 wk, 探讨SIS对胰岛细胞的支持和保护作用.

1 材料和方法

1.1 材料 胰腺取自脑死亡供者, 热缺血时间 <5 min, 冷却血时间 <4 h; 微机生物降温仪 (上海理工大学低温生物工程研究所研制); 倒置式显微镜 (日本Olympus公司); 荧光显微镜 (日本Olympus公司, 型号VANOX); 液氮罐; 细胞培养箱 (美国NAPCC公司, 5100型); 二甲亚砷 (DMSO, Sigma, USA); Hanks液 (作为冷冻保护剂); RPMI-1640培养液 (美国Gibco公司); 双硫脲 (DTZ) 溶液等 (美国Sigma公司).

1.2 方法

1.2.1 胰岛细胞的分离与纯化 胰腺取回后, 置于4 °C Hanks液中. 在超净工作台下, 快速去除胰腺周围脂肪组织、血管和被膜. 经胰管注入预温至37 °C胶原酶消化液. 将灌注过的胰腺组织放入锥形瓶中. 38 °C恒温水浴振荡箱消化约20-25 min, 约10倍体积的4 °C Hanks液 (含100 mL/L小牛血清) 中止消化, 消化液用300 μ m不锈钢筛网过滤, 所得滤过液即为胰岛悬液. 50 mL离心管, 依次加入250 mL/L、200 mL/L、110 mL/L Ficoll分离液各10 mL, 其上方缓慢加入制备的胰岛悬液. 4 °C 2 000 r/min、离心20 min, 分层. 吸出11-20%界面细胞, 用不含小牛血清RPMI-1640液4 °C 1 500 r/min、离心5 min, 洗涤, 沉淀制成细胞悬液, 备用.

1.2.2 冻存与复温 按照文献[5]所载方法进行. 分离纯化的成人胰岛置于0.2 mL RPMI-1640液中, 移入冷冻管内, 然后向冷冻管内缓慢注入二甲亚砷(30 min)至2.0 mmol/L. 标本首先快速降温至-7.4 °C, 然后缓慢(0.25 °C/min)降至-40 °C, 投入液氮内保存1 mo. 冻存时间到后标本置于37 °C水浴复温, 使用0.75 mmol/L蔗糖析去二甲亚砷.

1.2.3 SIS的制备 参照Badyalak *et al*^[6]的方法进行. 经过检疫的成猪空肠洗去内容物, 翻转后使黏膜面朝外, 用特制

刀片刮去最上层黏膜, 直至黏膜下层完全显露; 复原到正常解剖结构, 用刀片除去浆膜层和肌层. 清洗剩下的小肠黏黏下层, 完全去除小肠黏膜下层上的残留组织. 制成的小肠黏膜下层厚度约为80-100 μ m, 延长轴剪开, 洗涤后进行脱细胞和消毒、灭菌处理.

1.2.4 胰岛细胞培养 复温后胰岛分为两组: SIS组置于铺有片状SIS的细胞培养孔中, 加入RPMI-1640培养液, 对照组胰岛直接放入含有RPMI-1640培养液的细胞培养孔. 两组胰岛细胞均放入37 °C, CO₂含量为50 mL/L的培养箱中培养1 wk.

1.2.5 胰岛形态和回收率 双硫脲染色后在装有标尺的显微镜下, 计数胰岛细胞, 换算出相当于150 μ m直径胰岛细胞数量. 比较冷冻保存前后胰岛细胞数量即得出回收率.

1.2.6 胰岛功能的测定 在SIS及对照组中各取8份样本(20个胰岛), 测定胰岛素释放量. 胰岛先置于含有2.7 mmol/L葡萄糖的RPMI-1640培养液37 °C孵育45-50 min. 随后胰岛分别置于含有2.7 mmol/L、16.7 mmol/L、16.7 L mmol/L、葡萄糖和10 mmol/L茶碱的RPMI-1640培养液中各孵育45 min. 每次孵育结束后, 弃去上清液, 使用放射免疫法测定胰岛素分泌量(mU/L).

统计学处理 结果以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示. 不同组间差别采用SPSS10.0 进行 t 检验, $P<0.05$ 认为有统计学差异.

2 结果

胰岛的冷冻保存主要涉及三个过程: 在浅冷冻期胰岛细胞进入冷休克, 深冷冻期胰岛承受渗透压和内部热量释放的压力; 复温期胰岛内部结构由固态转化为液态^[7]. 在这三个过程中, 胰岛细胞膜易受到损害, 导致细胞死亡. 本研究中, 冷冻保存后培养1 wk后SIS组胰岛的回收率为90.5 \pm 1.8%, 对照组为62.7 \pm 3.6%, 两组间存在统计学差异($P<0.05$). 显微镜下观察, SIS组胰岛细胞(图1A)较游离组(图1B)结构完整, 染色均匀. 胰岛功能测定采用胰岛素释放试验. 游离组与微囊组在低糖刺激下的基础胰岛素分泌无显著差别; 而在高糖刺激下, 微囊组胰岛素分泌量较游离组显著增加; 当在高糖内加入茶碱时最大胰岛素分泌量微囊

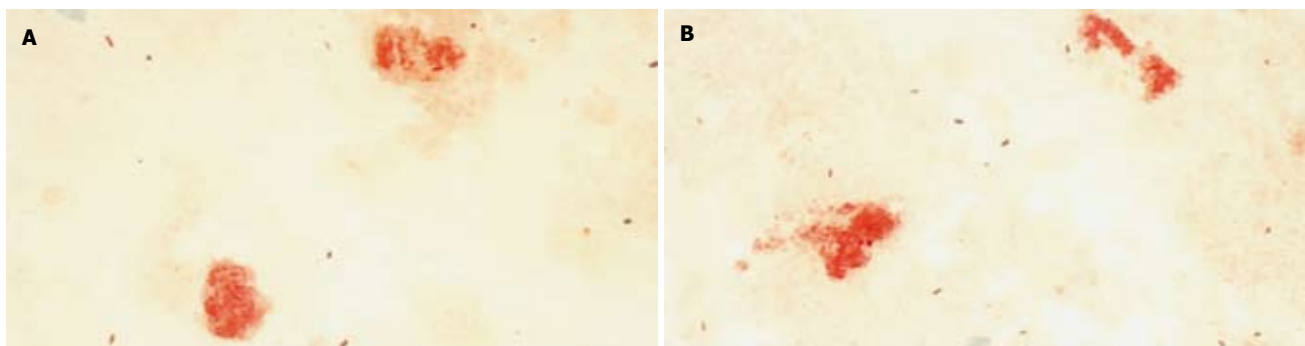


图1 冷冻保存后培养1 wk胰岛细胞形态. A: 冷冻保存后和SIS共培养1 wk的成人胰岛细胞; B: 冷冻保存后仅与RPMI-1640共培养1 wk的成人胰岛细胞.

组明显高于游离组,由此得出的刺激指数(SI)微囊组约为游离组的3倍(表1)。

表1 SIS组和游离组在不同刺激下胰岛素分泌量

组别	低糖 (2.7 mmol/L)	高糖 (16.7 mmol/L)	高糖+茶碱	SI
SIS组	8.2 ± 0.6	25.8 ± 1.7 ^a	76.6 ± 3.4 ^a	9.5 ± 0.3 ^a
游离组	7.9 ± 0.4	14.6 ± 1.3	26.1 ± 1.9	3.3 ± 0.2

^a*P* < 0.05 vs 游离组。

3 讨论

胰岛细胞的保存一直是人们关注的问题,胰岛的体外培养可以延长保存时间,但不宜过长,否则会出现纤维组织过度增生,导致移植失败^[8]。而建立胰岛细胞库则需冷冻保存胰岛。胰岛细胞库的建立可以更灵活的选择供受者,使胰岛移植的临床应用变得可行。Rojotte将冷冻保存的胰岛移植给糖尿病患者,成功的使其停用胰岛素2 a之久。但是在冷冻保存和复温过程中,不可避免会损伤胰岛细胞,虽然采用二甲基亚砷和甘油作为冷冻保护剂,冷冻保存复温后胰岛细胞的回收率也只有60±7%^[3]~78±5%^[9,10]。更为重要的是,冷冻保存后的胰岛在体外环境中对高糖刺激明显减弱^[9],说明其功能也受到损害,会严重影响移植效果。Rich *et al*^[9,10]研究认为,冷冻后胰岛会损失其功能的38%。因此,如何避免和减少胰岛细胞的冷冻损伤引起许多学者的关注。

胰岛在冷冻和复温的过程中细胞承受渗透压的巨大变化,如果是单个胰岛细胞可以承受这种压力,但胰岛实际上是一种多细胞结构,彼此依靠细胞外基质进行联系,冷冻-复温过程不可避免的会损害胰岛细胞间的这种联系,从而对胰岛细胞的结构和功能造成损害。

猪的小肠黏膜下层(SIS)作为一种天然的细胞外基质,由胶原,糖蛋白,蛋白聚糖,葡萄糖胺聚糖组成,并含有多种生长因子,如纤维母细胞生长因子(PGF-2),肿瘤生长因子(TGF),血管内皮细胞生长因子(VEGF),能促进细胞生长^[11]。SIS作为组织工程材料已进行了较为广泛的研究。Badylak *et al*^[6]首先使用SIS修复一段犬肾动脉取得成功,Lantz *et al*^[12]报道了使用SIS修复犬颈动脉和股动脉,2 mo后SIS在形态上和被修复组织已无区别。国内顾庭*et al*^[13]也报道了使用SIS替代兔跟腱肌获得成功。近年来,国外有学者认为SIS对体外培养的胰岛细胞也应具有支持和保护作用。Lakey *et al*^[14]报道分离纯化的犬胰岛细胞与SIS共培养后回收率和体外功能均有所提高。因此我们推测,SIS作为一种天然的细胞外基质,能够为冷冻

和复温后的胰岛细胞提供一定的支持和保护,从而使胰岛的形态和功能得到改善。

本研究中,我们将冷冻保存1 mo后的成人胰岛细胞置于放有SIS的细胞培养孔中,使用RPMI-1640培养液培养1 wk,结果显示:SIS组胰岛细胞的回收率较对照组显著提高,胰岛细胞形态较对照组完整;胰岛素释放试验也证实SIS组胰岛细胞功能较对照组明显改善。本研究说明SIS作为一种天然的细胞外基质,能够改善冷冻保存后的胰岛细胞的形态和体外胰岛素分泌功能。为长期保存胰岛细胞提供了一条新的路径。但胰岛细胞体外胰岛素分泌测试尚不能完全反映胰岛功能,下一步研究我们考虑将SIS组胰岛细胞移植于大鼠糖尿病模型,观察其对糖尿病的治疗作用。

4 参考文献

- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047-1053
- Jindal R, Gray D. Preservation and storage of pancreatic islets. *Transplantation* 1994; 57: 317-321
- Bodziony J, Schmitt P, Feifel G. *In vitro* function, morphology, and viability of cryopreserved rat pancreatic islets: comparison of vitrification and six cryopreservation protocols. *Transplant Proc* 1994; 26: 833-834
- Cattral MS, Lakey JR, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Effect of cryopreservation on the survival and function of murine islet isografts and allografts. *Cell Transplant* 1998; 7: 373-379
- Rajotte RV, Scharp DW, Downing R, Preston R, Molnar GD, Ballinger WF, Greider MH. Pancreatic islet banking: the transplantation of frozen-thawed rat islets transported between centers. *Cryobiology* 1981; 18: 357-369
- Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res* 1989; 47: 74-80
- Chen Y, Foote RH, Brockett CC. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* 1993; 30: 423-431
- 陈明, 吴德权. 胰岛移植. 哈尔滨医科大学学报 2005; 39: 95-97
- Rich SJ, Swift S, Thirdborough SM, James RF, Bell PR, London NJ. Islet cryopreservation: a detailed study of total functional losses. *Transplant Proc* 1994; 26: 823-824
- Rich SJ, Swift S, Thirdborough SM, Rumford G, James RF, London NJ. Cryopreservation of rat islets of Langerhans: a comparison of two techniques. *Cryobiology* 1993; 30: 407-412
- Luo JC, Yang ZM. Preparation and characteristics of small intestinal submucosa. *Zhongguo Xuefu Chongjian Waike Zazhi* 2003; 17: 425-428
- Lantz GC, Badylak SF, Coffey AC, Geddes LA, Blevins WE. Small intestinal submucosa as a small-diameter arterial graft in the dog. *J Invest Surg* 1990; 3: 217-227
- 顾庭, 戴冠戎. 猪小肠黏膜下层替代兔跟腱的实验研究. 中华医学杂志 2002; 82: 1279-1282
- Lakey JR, Woods EJ, Ziegler MA, Avila JG, Geary WA, Voytik-Harbin SL, Critser JK. Improved islet survival and *in vitro* function using solubilized small intestinal submucosa. *Cell Tissue Bank* 2001; 2: 217-224

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁