



SD大鼠乳鼠胰岛细胞体外培养方法探讨

原代胰岛细胞的分离、纯化、培养中存在成纤维细胞过度生长、胰岛细胞数量较少等问题。原因之一是成纤维细胞的过度生长消耗了培养液中的营养成分,使胰岛细胞无法正常贴壁生长[1]。为限制成纤维细胞的生长,目前一般采用Chick等[2]的方法,但效果不甚理想。为了获得足量、纯化和功能良好的原代胰岛细胞,我们采用胶原酶对胰腺组织进行分次短时间消化,利用成纤维细胞和胰岛细胞贴壁速度差异,在细胞接种18 h时将未贴壁的细胞转入另一个培养板中。结果成纤维细胞污染明显减少,胰岛细胞贴壁成活率提高,分别检测胰岛素、淀粉酶含量及葡萄糖刺激下的胰岛素分泌水平,并对胰岛细胞活体染色及免疫组化染色等进行研究,证实培养的胰岛细胞生物学功能稳定,适合实验研究。

1 材料和方法

1.1 实验试剂和实验对象

V型胶原酶(Sigma公司),双硫脲(dithizone, DTZ, Sigma公司),胎牛血清(杭州四季青公司),PRMI1640培养基(Gibco公司),免疫组化SABC-POD试剂盒(博士德公司),胰岛素放免测定药盒(中国原子能科学研究院同位素研究所)。SD乳鼠购自第一军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 胰岛细胞分离、纯化和培养 参考Lambert[3]、朱铁虹[4]、程宝鸾[5]等人介绍的方法并进行改进,具体程序如下:取出生1~3 d SD大鼠,常规消毒,剖腹暴露术野,无菌取出胰腺,清除胰外网膜、脂肪组织后,经4 ℃ Hanks液漂洗2~3次。用眼科剪将胰腺剪成0.5 mm³大小组织碎块, Hanks液漂洗3次后,加入5倍体积3 g/L V型胶原酶(pH 7.4)混匀,37 ℃水浴中振荡消化6~8 min。至消化液浑浊时,自然沉淀后吸取上层消化浊液,用4 ℃ Hanks液终止消化。剩余未消化组织补加消化液继续消化,按上述操作重复4~5次,直至胰腺组织基本消化完毕。收集各次消化浊液,1 000 r/min离心5~7 min,沉淀细胞接种于内含15%胎牛血清的PRMI1640培养液的T75瓶,细胞移至37 ℃、5% CO₂-95%空气完全湿化的CO₂培养箱内进行培养。细胞培养18 h时观察细胞生长状态。当细胞明亮、折光性强、培养液颜色变浅时,指示细胞生长良好。根据细胞贴壁速度差异,将细胞从瓶底轻轻吹下,低速离心,沉淀细胞加入新的培养液,以5×10⁵/孔细胞数接种于24孔培养板,每2 d换液1次,继续培养7~11 d,细胞充分铺开形成良好的胰岛单层细胞。

1.2.2 胰岛细胞活体染色 DTZ是一种锌螯合剂,SD大鼠的内分泌细胞含有锌,因此DTZ是胰岛细胞特异性染料,能使SD大鼠的胰岛细胞着色。光镜下DTZ染色的胰岛细胞呈现猩红色。取生长良好的单层胰岛细胞,轻柔吹打,加入Hanks液制成细胞悬液。将细胞悬液与DTZ工作液1:1混合,室温孵育10 min后,光镜下计数DTZ阳性细胞数,计算胰岛细胞获得率:胰岛细胞获得率=(DTZ阳性细胞数/细胞计数总和)×100%[6]。细胞活力的测定用锥虫兰染色法。细胞悬液和0.5%锥虫兰染液按1:1体积混匀,光镜下计数。凡折光性强而不着色的为活细胞,染上兰色的为死细胞,细胞活力=(活细胞数/总细胞数)×100%。

1.2.3 胰岛素、淀粉酶及葡萄糖刺激的胰岛素水平的检测 胰岛素是胰岛β细胞释放的激素,测定胰岛

素释放量可以判断胰岛 β 细胞的功能。收集不同时间的单层细胞培养液及低糖(2.8 mmol/L)、高糖(27.8 mmol/L)刺激1 h的孵育液,分装,-20 °C保存,利用 ^{125}I 标记的胰岛素标准品,根据抗原与其特异性抗体竞争结合的原理,采用放射免疫双抗体法,通过 γ -计数器对胰岛素进行定量分析。应用淀粉酶诊断试剂测定淀粉酶含量。

1.2.4 免疫组织化学染色 培养第7天,0.25%胰蛋白酶消化贴壁胰岛细胞,低速离心收集细胞,经漂洗丙酮固定后,按照试剂盒说明操作,进行免疫组织化学染色,POD标记,DAB显色,一抗为大鼠抗人Ins抗体,二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠抗体,阳性细胞的胞浆染色为棕褐色。

1.3 统计学处理

采用SPSS10.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 分离培养的胰岛细胞镜下观察与免疫组化鉴定

SD大鼠乳鼠胰腺组织经胶原酶反复消化后可获得分散较好的胰岛细胞和胰岛细胞团,活力达90%以上。倒置显微镜下观察,接种18 h时,成纤维细胞已贴壁生长,球形胰岛细胞尚未贴壁,将其转入新的塑料培养板中。胰岛细胞在新板上7~11 d铺展生长形成细胞单层。单层胰岛细胞为上皮样细胞,呈圆形或椭圆形,形态较均一,胞质颗粒丰富,部分细胞胞质较透明,可见胞核与核仁(图1)。经免疫组织化学染色,胰岛素阳性细胞胞质为棕褐色。

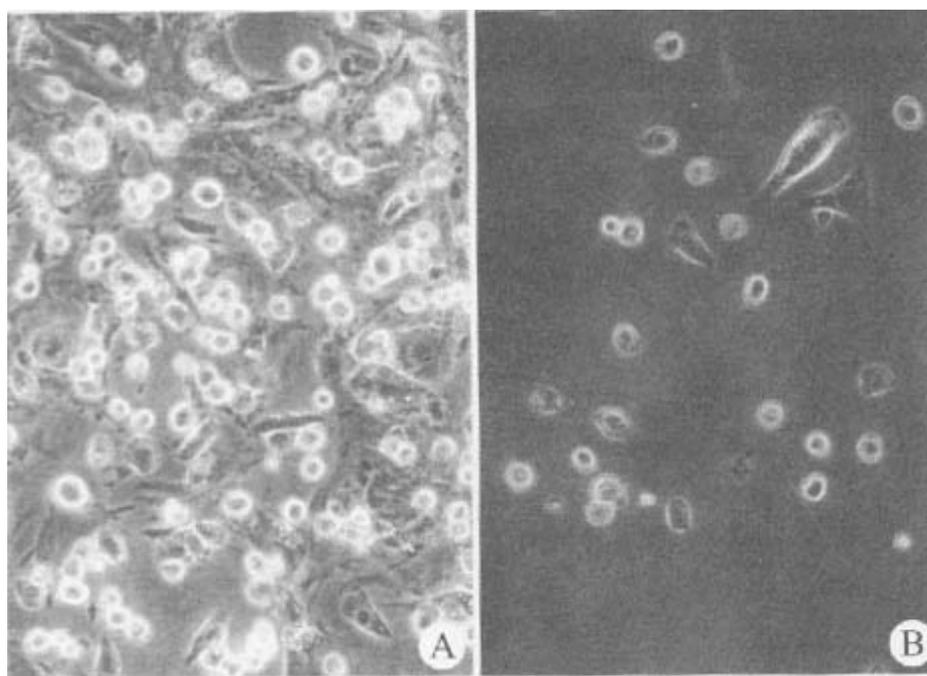


图1 培养7 d的胰岛细胞(原放大倍数: $\times 400$)

Fig.1 Islet cells cultured for 7 d (Original magnification: $\times 400$)

A: Cells without being transferred to new culture plate; B: Cells after transfer to the new culture plate

2.2 胰岛细胞鉴定

DTZ染色结果:光镜下胰岛细胞呈现猩红色,可染率达85%~90%。同时,用锥虫兰染色法测定细胞活力为90%以上。

2.3 胰岛细胞分泌功能的鉴定

动态检测胰岛素分泌量结果显示,培养7~11 d的胰岛细胞分泌功能稳定。培养第7天的胰岛细胞葡萄糖刺

激实验显示, 27.8 mmol/L葡萄糖组与 2.8 mmol/L葡萄糖组的胰岛素分泌量[分别为(7.17±0.25)和(4.85±0.44) mIU·L⁻¹·h⁻¹]相比, 差异显著(P<0.05), 提示胰岛细胞对葡萄糖刺激的反应能力良好。外分泌腺细胞活性鉴定, 胰淀粉酶释放量迅速降低, 其检测值第9天时为0, 可见所获得的是较纯化的胰岛细胞。

3 讨论

目前, 国内外用于体外胰岛功能研究的细胞模型系统主要有三大类: 第一类是正常人、动物胰腺组织分离的胰岛细胞的原代培养; 第二类是由胰岛β细胞瘤直接克隆产生的胰岛细胞系; 第三类是表达hIAPP转基因鼠胰岛细胞。原代培养的胰岛细胞离体时间短, 其生物学特征与体内生理状态相似, 适合研究胰岛细胞功能及药物对胰岛细胞生物学毒性作用, 不足之处是获得的细胞量较少, 又常有成纤维细胞污染。从胰岛β细胞瘤克隆出来的胰岛细胞及表达hIAPP转基因鼠胰岛细胞纯度虽高, 但存在对各种刺激反应弱化的缺点, 不能如实地反映正常胰岛细胞的功能。随着对胰岛细胞形态和功能研究的深入, 如何更科学、更经济、更方便地建立胰岛细胞生物模型成为一个新的课题。

1968年Hilwig等[7]首次报道了体外胰岛细胞的单层培养法。经过多方面改进, 该技术成为目前胰岛细胞分离培养的主要方法。但是, 人及动物胰岛细胞培养中仍然存在成纤维细胞过度生长的问题。国内胡远峰[8]、汪锦林[1]、朱铁虹[4]等分别进行了人胎、大鼠胰岛细胞单层培养的研究, 获得的胰岛细胞具有正常形态和内分泌功能, 是一种探讨糖尿病病因、发病机制及防治的较理想的细胞模型。在实验研究过程中, 我们采取上述方法进行胰岛细胞分离培养, 发现这些方法所分离培养的胰岛细胞量少、活力较低, 成纤维细胞较多, 难以达到实验要求。

本实验研究在Lambert[3]及朱铁虹[4]等方法的基础上, 尝试用一种酶消化乳鼠胰腺组织, 及时转板, 减少了酶对胰岛细胞的损伤及成纤维细胞的污染, 获得纯化较好并且具有良好功能的胰岛细胞。细胞培养时, 选择出生1~3 d的乳鼠, 其胰岛内分泌细胞比例较成年鼠高, 细胞生长好, 成活率高, 成纤维细胞少。采用胶原酶多次短时间消化, 减轻了胰岛细胞的受损程度, 又可防止因消化过度形成的胶状物吸附大量的胰岛细胞。在细胞分离过程中, 掌握好消化条件尤为重要, 消化液的pH、Ca²⁺浓度及温度均可影响胶原酶效力。市售胶原酶中含有少量有毒性的梭菌蛋白酶、类胰蛋白酶等, 消化条件不合适时, 可明显影响胰岛细胞获得量及活力的稳定性[9]。根据实验, 我们认为胶原酶V型多次消化法适用胰岛细胞的分离, 消化时温度保持在(38±1)℃左右、pH 7.4~7.6, 消化6~8 min, 即可适时终止消化。胶原酶用含Ca²⁺的Hanks液配制, 随配随用。操作中注意选用的吸管头应平整, 避免对细胞的刺伤。混匀时吸管插入管底, 细管段液体轻轻混匀, 减少对细胞的损伤, 进一步提高细胞存活率。利用成纤维细胞贴壁快的特性, 采用转板培养纯化胰岛细胞的方法, 有效地减少成纤维细胞数量, 提高胰岛细胞贴壁生长率。

胰岛细胞分离后收获量的计算, 目前尚未标准化。以前用中性红染色计数胰岛团及胰岛细胞, 镜下胰岛细胞呈红色, 外分泌腺细胞不着色, 对比鲜明, 但需要活体血管内注射, 因而限制了应用。DTZ是胰岛细胞的特异性染料, 能与内分泌细胞内的锌离子形成红色复合物, 使胰岛细胞呈猩红色, 从而将胰岛细胞与外分泌腺细胞区分开来。DTZ既对新鲜分离的胰岛细胞着色, 也对长期培养的胰岛细胞特异性染色, 它能在体外染色, 可随时观察消化过程中胰岛细胞的分离情况, 并能随时了解培养过程中胰岛细胞的生长状况[6]。目前DTZ已广泛用于胰岛细胞的分离及培养鉴定中。本实验中, DTZ染色细胞占85%~90%, 亦有少部分细胞不着色, 可能是成纤维细胞。锥虫兰染色细胞存活率为90%以上, 在体外可维持约3~4周。检测胰岛素分泌量结果显示, 培养第7~11天, 胰岛细胞分泌功能稳定; 对葡萄糖刺激的反应能力良好, 细胞培养液中淀粉酶的含量第3天时最高, 以后逐渐降低, 第9天时测不出, 提示外分泌腺部分已完全退缩。与沈守祥等[10]的报道相近, 可见本实验法所获得的是较纯化的胰岛细胞, 适合实验研究。

(责任编辑: 黄开颜)

参考文献:

[1] 汪锦林, 朱文玉, 赵雅丽, 等. 新生大鼠胰岛细胞的体外单层培养及其胰岛素释放的研究[J]. 北京医科大学学报, 1987, 19(2): 79-81.

Wan JL, Zhu WY, Zhao YL, et al. Researches of monolayer culture in vitro and insulin secretion of newly born rat islet cells[J]. J Beijing Med Univ, 1987, 19(2): 79-81.

[2] Chick WL. Pancreatic beta cell culture: preparation of purified mono- layers[J]. Endocrinology, 1975, 96(3): 637-43.

[3] Lambert AE, Blondel B, Kanazaway, et al. Monolayer cell culture of nonatal rat pancreas[J]. Endocrinology, 1972, 90(1): 239-48.

[4] 朱铁虹, 畅继武, 尹滩, 等. 大鼠胰岛细胞单层培养模型的建立和应用[J]. 天津医药, 1998, 26(7): 421-4.

Zhu TC, Chang JW, Ying W, et al. Establish and application of monolayer culture model of rat islet cells[J]. Med Tianjing, 1998, 26(7): 421-4.

[5] 程宝鸾. 动物细胞培养技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000. 57-63.

[6] Latif ZA, Noel J, Alejandro R. A simple method of staining fresh and cultured islets[J]. Transplantation, 1988, 45(4): 827-30.

[7] Hilwig I, Schuster S, Heptner W, et al. On the growth of the pancreatic cells of mammals as monolayer cultures. I. Culture methods, morphology and insulin content[J]. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1968, 90(3): 333-46.

[8] 胡远峰, 王煜名, 丁一明. 人胎胰岛细胞单层培养的研究[J]. 中华器官移植杂志, 1990, 11(4): 158-60.

Hu YF, Wang YM, Ding YM. Study of monolayer culture methods of human embryo pancreatic islet cells[J]. Chin J Organ Transplant, 1990, 11(4): 158-60.

[9] 蒋铁建, 胡敏. 啮齿类动物胰岛的分离与纯化[J]. 国外医学·内分泌学分册, 2001, 21(1): 36-8.

Jiang TJ, Hu M. Isolation and purification of rodent islet cells[J]. Foreign Med Endocrinol Sect, 2001, 21(1): 36-8.

[10] 沈守祥, 董砚虎, 逢力男, 等. SD大鼠胰岛细胞培养技术的研究[J]. 中华器官移植杂志, 1995, 16(4): 158-60.

Shen SX, Dong YH, Feng LN, et al. Research of islet cell culture technology of SD rats [J]. Chin J Organ Transplant, 1995, 16(4): 158-60.

参考文献:

[1] 汪锦林, 朱文玉, 赵雅丽, 等. 新生大鼠胰岛细胞的体外单层培养及其胰岛素释放的研究[J]. 北京医科大学学报, 1987, 19(2): 79-81.

Wan JL, Zhu WY, Zhao YL, et al. Researches of monolayer culture in vitro and insulin secretion of newly born rat islet cells[J]. J Beijing Med Univ, 1987, 19(2): 79-81.

[2] Chick WL. Pancreatic beta cell culture: preparation of purified mono- layers[J]. Endocrinology, 1975, 96(3): 637-43.

[3] Lambert AE, Blondel B, Kanazaway, et al. Monolayer cell culture of nonatal rat pancreas[J]. Endocrinology, 1972, 90(1): 239-48.

[4] 朱铁虹, 畅继武, 尹滩, 等. 大鼠胰岛细胞单层培养模型的建立和应用[J]. 天津医药, 1998, 26(7): 421-4.

Zhu TC, Chang JW, Ying W, et al. Establish and application of monolayer culture model of rat islet cells[J]. Med Tianjing, 1998, 26(7): 421-4.

[5] 程宝鸾. 动物细胞培养技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000. 57-63.

[6] Latif ZA, Noel J, Alejandro R. A simple method of staining fresh and cultured

islets[J]. Transplantation, 1988, 45(4): 827-30.

[7] Hilwig I, Schuster S, Heptner W, et al. On the growth of the pancreatic cells of mammals as monolayer cultures. I. Culture methods, morphology and insulin content[J]. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1968, 90(3): 333-46.

[8] 胡远峰, 王煜名, 丁一明. 人胎胰岛细胞单层培养的研究[J]. 中华器官移植杂志, 1990, 11(4): 158-60.

Hu YF, Wang YM, Ding YM. Study of monolayer culture methods of human embryo pancreatic islet cells[J]. Chin J Organ Transplant, 1990, 11(4): 158-60.

[9] 蒋铁建, 胡敏. 啮齿类动物胰岛的分离与纯化[J]. 国外医学·内分泌学分册, 2001, 21(1): 36-8.

Jiang TJ, Hu M. Isolation and purification of rodent islet cells[J]. Foreign Med Endocrinol Sect, 2001, 21(1): 36-8.

[10] 沈守祥, 董砚虎, 逢力男, 等. SD大鼠胰岛细胞培养技术的研究[J]. 中华器官移植杂志, 1995, 16(4): 158-60.

Shen SX, Dong YH, Feng LN, et al. Research of islet cell culture technology of SD rats [J]. Chin J Organ Transplant, 1995, 16(4): 158-60.

[回结果列表](#)