

新生儿小鼠胰岛分离纯化方法的研究

朱嘉瑜, 王晓兢, 张勤凤, 徐一力, 武晓泓*

(南京医科大学第一附属医院内分泌科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨新生儿小鼠胰岛分离纯化方案。方法:采用胰腺局部充盈、胶原酶V消化,对比不同消化时间及单纯显微镜下手挑胰岛或 Histopaque-1077 纯化对胰岛得率的影响,并通过胰岛素/胰高血糖素双染后流式细胞术检测胰岛 β 和 α 细胞构成比例。结果:在1 mg/ml 酶浓度下,1周和3周小鼠胰岛的最适消化时间分别为23 min(胰岛/胰腺 38.11 ± 2.78)和25 min(胰岛/胰腺 66.06 ± 2.61)。1周以直径 $< 50 \mu\text{m}$ 胰岛居多($P < 0.01$),而3周以 $50\sim 99 \mu\text{m}$ 者居多($P < 0.01$)。单纯手挑组胰岛得率显著高于 Histopaque-1077 纯化组($P < 0.05$)。所得胰岛存活率和纯度均 $> 90\%$,且存在 β 和 α 细胞构成比例的动态变化($P < 0.05$)。结论:胰腺局部充盈、胶原酶V消化后镜下手挑胰岛是一种较好的新生儿小鼠胰岛分离纯化方法,消化时间和纯化方法是其重要影响因素。

[关键词] 新生儿;小鼠;胰岛;分离纯化

[中图分类号] R329.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)06-766-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130610

Isolation and purification of mice pancreatic islets during neonatal period

Zhu Jiayu, Wang Xiaojing, Zhang Qinfeng, Xu Yili, Wu Xiaohong*

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the isolation and purification of mice pancreatic islets during neonatal period. **Methods:** Pancreases of mice at neonatal stage were injected and digested by collagenase V. The yield of islets was compared among different digestion time and hand-picked under microscope or Histopaque-1077 purification. The islets were stained with anti-glucagon antibody and anti-insulin antibody, and then identified by flow cytometry. **Results:** The optimal digestion time of islets from 1-week and 3-week old mice was 23 min ($38.11 \pm 2.78/\text{pancreas}$) and 25 min ($66.06 \pm 2.61/\text{pancreas}$). The diameters of most islets were less than $50 \mu\text{m}$ at 1 w ($P < 0.01$), and between $50\sim 99 \mu\text{m}$ at 3 w ($P < 0.01$). The yield of islets purified by hand-picked under microscope was much higher than that of Histopaque-1077 ($P < 0.05$). The purity and survival rate of islets were above 90%, and the ratio of β and α cells within mice islets changed during neonatal period ($P < 0.05$). **Conclusion:** Local injection and digestion of pancreas with collagenase V and hand-picked under microscope is an effective method for mice islet isolation during neonatal period, and the digestion time and purification methods are important.

[Key words] neonatal period; mice; pancreatic islets; isolation and purification

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 766-770]

无论是胰岛素绝对缺乏的1型糖尿病还是胰岛素相对分泌不足的2型糖尿病,胰岛在血糖稳态调控中的核心作用已毋庸置疑。近年研究发现,新生

期胰岛存在重塑过程, β 细胞数量明显增加并且功能逐步完善^[1-3]。如何获得足够数量和较高质量的胰岛是深入开展新生儿胰岛相关研究的前提。虽然啮齿类动物胰岛分离的方法早已建立,并进行多次改良,但是由于使用供体、试剂、分离纯化的方法不同,至今获得胰岛的数量和质量仍有很大差异。新生儿小鼠相对成年小鼠胰腺体积小,胰腺相关解剖结构细微且耐受力差,因此胰岛分离纯化方法存在差异且难度较大。本研究拟观察胰岛制备过程中理化因

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30971404, 81070621, 81261120566);江苏省国际科技合作计划(BZ2011042);江苏省医学重点人才项目(RC2011068);江苏省“六大人才高峰”项目(苏人社发[2011]582号)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: drxhwu@njmu.edu.cn

素对新生期小鼠胰岛获得量的影响,旨在建立一种稳定、高效的新生期胰岛分离纯化方法,为进一步开展胰岛相关研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

选用出生后 1 周(约 3.5 g)、3 周(约 7 g)、8 周(约 22 g)清洁级 C57BL/6 雄性小鼠,由南京医科大学实验动物中心(许可证号:苏动质 2002-0031)提供。实验符合动物实验标准。

体视显微镜(Leica 公司,德国),流式细胞仪(BD 公司,美国),V 型胶原酶(Sigma 公司,美国),RPMI1640 培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶-EDTA(Gibco 公司,美国),HBSS 粉(Hyclone 公司,美国),兔抗胰高血糖素抗体(CST 公司,美国),豚鼠抗胰岛素抗体(Abcam 公司,美国),FITC 标记的羊抗豚鼠荧光二抗、APC 标记的羊抗兔荧光二抗(Santa Cruz 公司,美国),FIX & PERM 细胞破膜试剂盒(ADG 公司,奥地利)。

1.2 方法

1.2.1 胰岛分离

10%水合氯醛麻醉小鼠后手术区消毒,V 字型打开腹腔。8 周小鼠夹闭十二指肠乳头,穿刺胆总管,破心处死动物,注入 2.0~2.5 ml 冷胶原酶 V 消化液(1 mg/ml),胰腺充盈完全后迅速分离,放入含 1 ml 消化液的离心管中。1 周和 3 周小鼠直接分离取下胰腺,局部灌注冷胶原酶 V 消化液,充盈完全后放入含消化液的离心管中。37℃水浴箱中静止消化 21~25 min,震荡至细沙状,用含 5%胎牛血清的冷 D-Hanks 液 20 ml 终止消化,混匀后用 30 目细胞筛网过滤,4℃ 2 000 r/min 离心 5 min,15 ml 冷 D-Hanks 液洗涤 2 次。

1.2.2 胰岛纯化

用 10 ml Histopaque-1077 重悬沉淀,均匀分于 2 只 15 ml 离心管中(5 ml/管),用 5 ml 注射器沿管壁缓慢注入冷 D-Hanks 液 5 ml,4℃、2 000 r/min 离心 20 min,吸取分离界面的悬浮细胞,D-Hanks 液洗涤 2 次,4 ml 冷 D-Hanks 液加 1 ml 1640 营养液(含 10%胎牛血清)重悬沉淀,显微镜下挑取胰岛;冷 D-Hanks 液洗涤后,直接用 4 ml 冷 D-Hanks 液加 1 ml 1640 营养液(含 10%胎牛血清)重悬沉淀,显微镜下挑取胰岛。

1.2.3 胰岛存活率

用 0.4%锥虫蓝进行染色,活胰岛不着色,死亡

胰岛呈蓝色。胰岛存活率=活胰岛/胰岛总数。

1.2.4 单细胞悬液的制备

取 800 个左右胰岛,用 0.05%胰蛋白酶消化,在 37℃、5%CO₂ 培养箱中孵育 10 min,细胞呈单个圆形悬浮时加 5 ml 1640 营养液(含 10%胎牛血清)终止消化,4℃ 2 000 r/min × 7 min,冷 PBS 洗涤 2 次。

1.2.5 胰岛素/胰高血糖素双染后流式细胞术检测胰岛细胞构成比例

用 Fix A 液 100 μl 重悬胰岛细胞,室温下固定 30 min。2 ml PBS 洗,1 500 r/min 离心 5 min。80 μl B 液、16 μl 1%BSA-PBS、胰岛素和胰高血糖素一抗各 2 μl 混合后重悬沉淀,4℃过夜。PBS 洗涤后,加含 96 μl 1%BSA-PBS、FITC 标记的胰岛素荧光二抗和 APC 标记的胰高血糖素荧光二抗各 2 μl 的混合液,室温下避光孵育 30 min。PBS 洗,用 400 μl 1%多聚甲醛-PBS 固定细胞,流式细胞仪上机检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。符合参数检验要求的数据:多组数据比较采用单因素方差分析,采用最小差异显著性分析法进行两两比较;两组数据间采用独立样本 *t* 检验进行比较。不符合参数检验要求的两组数据间采用两独立样本的非参数检验进行比较, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体重、胰腺重量以及胰岛形态的动态变化

出生后,小鼠胰腺重量增长速度大于体重增长速度:与 1 周相比,3 周时胰腺重量增长至 4.3 倍 [(71.74 ± 0.36) mg vs (16.65 ± 0.20) mg, $P < 0.01$],体重增长至 2 倍 [(7.06 ± 0.05) mg vs (3.51 ± 0.03) mg, $P < 0.01$];8 周时,胰腺重量增长至 19 倍 [(317.71 ± 1.45) mg vs (16.65 ± 0.20) mg, $P < 0.01$],而体重增长至 6.21 倍 [(21.80 ± 0.23) mg vs (3.51 ± 0.03) mg, $P < 0.01$]。小鼠胰腺灌注胶原酶消化液后,充盈良好,呈无色透明水泡状。显微镜下见胰岛细胞膜光滑完整,圆形或椭圆形,呈棕黄色,大小不一,散在分布于外分泌腺碎片中:1 周小鼠胰岛较小,以直径 < 50 μm 者居多 ($P < 0.01$),包含细胞数少,颜色较浅,其中可见不规则形状者;3 周小鼠胰岛体积增大,以 50~99 μm 者居多 ($P < 0.01$),所含细胞数增加,颜色变深,不规则形状胰岛减少代之以规则圆形或椭圆形胰岛,每只小鼠所得胰岛量是 1 周的 1.7 倍 ($P < 0.01$);8 周小鼠胰岛为棕黄色圆形

或椭圆形大颗粒,直径主要介于100~200 μm,其中以150~199 μm者最多($P < 0.01$),胰岛量是1周的5.4倍($P < 0.01$,图1,表1)。胰岛存活率均达90%以上。

2.2 胰岛的获得量

本实验采用V型胶原酶,在1 mg/ml的酶浓度

基础上调整消化时间(21 min,23 min和25 min),结果显示:1周小鼠在消化23 min时胰岛获得量最高,显著高于21 min和25 min(38.11 ± 2.78 胰岛/胰腺, $P < 0.01$);3周和8周小鼠均是在25min时胰岛获得量最高(分别为 66.06 ± 2.61 胰岛/胰腺、 204.33 ± 11.84 胰岛/胰腺, $P < 0.01$,表2)。

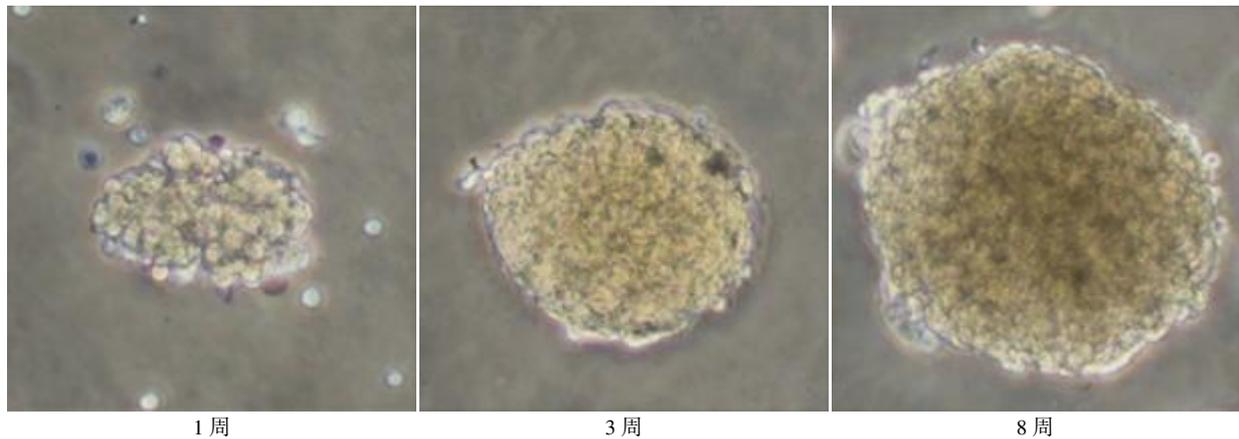


图1 各阶段小鼠胰岛($\times 100$)

Figure 1 Pancreatic islets of mice at three stages($\times 100$)

表1 各阶段小鼠胰岛大小和数量

Table 1 Yields of mice islets at three stages

($\bar{x} \pm s$)

组别	胰岛直径(μm)	胰岛数量(胰岛/胰腺)		
		1周	3周	8周
1	<50	30.49 ± 6.68	$9.91 \pm 1.11^*$	-
2	50~99	07.62 ± 1.67^a	$49.55 \pm 5.53^{a*}$	$30.65 \pm 4.32^{*#}$
3	100~149	-	6.61 ± 0.74^{ab}	$65.39 \pm 9.28^{b#}$
4	150~199	-	-	91.95 ± 13.05^{bc}
5	200~250	-	-	16.35 ± 2.32^{cd}
6	>250	-	-	-
合计		38.11 ± 8.32	$66.06 \pm 7.38^*$	$204.33 \pm 29.00^{*#}$

各年龄段不同胰岛直径区间胰岛/胰腺的比较:与第1组相比, $^*P < 0.01$;与第2组相比, $^bP < 0.01$;与第3组相比, $^cP < 0.01$;与第4组相比, $^dP < 0.01$;各胰岛直径区间不同年龄段胰岛/胰腺的比较:与1周相比, $^*P < 0.01$;与3周相比, $^bP < 0.01$ 。

表2 不同消化时间下各阶段小鼠胰岛获得量

Table 2 Yields of mice islets at three stages after different digestion time (胰岛/胰腺, $\bar{x} \pm s$)

组别	1周	3周	8周
21 min	24.02 ± 1.79	27.25 ± 1.87	102.86 ± 9.99
23 min	38.11 ± 2.78^a	35.90 ± 2.07^a	171.08 ± 13.65^a
25 min	21.64 ± 0.69^b	66.06 ± 2.61^{ab}	204.33 ± 11.84^a

与21 min相比, $^aP < 0.01$;与23 min相比, $^bP < 0.01$ 。

在相同的消化条件下,不同的纯化方法对胰岛的获得量有重要影响:采用Histopaque-1077纯化后挑取的1周、3周及8周小鼠胰岛纯度较高,但是数量均明显低于单纯手挑组($P < 0.05$,表3)。

表3 不同纯化条件下各阶段小鼠胰岛的获得量

Table 3 Yields of mice islets at three stages under different purification conditions (胰岛/胰腺, $\bar{x} \pm s$)

组别	1周	3周	8周
Histopaque 纯化组	25.61 ± 1.17	55.64 ± 1.82	163.20 ± 6.04
单纯手挑组	38.11 ± 2.63^b	66.06 ± 2.61^a	204.33 ± 11.84^a

与Histopaque 纯化组相比, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ 。

2.3 胰岛β和α细胞构成比例

胰岛素/胰高血糖素双染后流式细胞术检测结果显示:从1周、3周至8周,α细胞及双阳性细胞所占比例逐渐下降($P < 0.05$),而β细胞比例明显上升($P < 0.05$,表4)。其中双阴性细胞(δ细胞、PP

细胞等)加上杂质的总比例均低于 15%,提示所得胰岛的纯度可达 90%以上。

表 4 各阶段小鼠胰岛细胞构成比例变化

Table 4 Architecture of mice islets at three stages

($\bar{x} \pm s$)

组别	胰高血糖素阳性细胞	胰岛素阳性细胞	双阳性细胞	双阴性细胞及杂质
1 周	19.30 ± 0.71	53.33 ± 0.52	13.46 ± 1.39	13.91 ± 0.63
3 周	15.19 ± 0.24 ^b	63.70 ± 0.35 _b	8.33 ± 0.25 ^b	12.77 ± 0.18
8 周	13.25 ± 0.62 ^{bc}	68.44 ± 0.48 ^{bc}	5.81 ± 0.26 ^b	12.50 ± 0.64

与 1 周相比, ^b $P < 0.01$; 与 3 周相比, ^c $P < 0.05$ 。

3 讨论

胰腺由内分泌腺和外分泌腺组成,胰岛仅占整个胰腺的 1%~4%。如何获得足够数量和质量的胰岛是在体外深入开展胰岛相关研究的基础。1965 年 Lacy 等^[4]首创标准组织切碎消化技术提取胰岛,随后被 Lakey 等^[5]提出的胆总管内胶原酶注射静止法所取代,国内外学者^[6]在此基础上对胰岛分离技术进行了多次改良,但是由于影响胰岛获得的因素贯穿整个胰岛分离纯化过程,所以目前仍没有一个统一的标准方案。

首先,胶原酶的选择是一个重要因素,不同类型的胶原酶,甚至是同一厂家的不同批次都会影响胰岛的获得量^[7-8]。本实验组预实验采用胶原酶 V 和胶原酶 XI 进行比较,发现胶原酶 XI 所得的新生期胰岛数量相对低于胶原酶 V 且稳定性稍差,所以选择胶原酶 V。

其次,胰腺的充盈好坏是关键。新生期 1 周和 3 周小鼠与成年 8 周小鼠不同,其胆总管纤细甚至难以辨识,不能采用传统的胆总管穿刺灌注胶原酶方法,只能取下小鼠胰腺后局部充盈,使之完全充盈呈透明果冻状。整个充盈过程应在冰上操作,防止温度过高引起酶过早消化。同时,应尽量避免反复在多个部位进行穿刺导致胰腺结构破坏。并且灌注胶原酶速度不宜过快,以免消化液大量外溢,导致充盈不完全。此外,摘取胰腺时,应尽量分离干净,以减少非胰腺组织对消化的影响。

适宜的消化酶浓度、消化时间和温度是影响胰岛得率和纯度的重要因素^[9]。消化不足时,胰岛难以从外分泌组织中分离出来影响得率;消化过度时,胰岛的细胞结构破坏,导致大量胰岛丢失,此外还容易形成胶状物缠绕在胰岛上,影响最终的得率。本实验组预实验时分别以 0.5 mg/ml、1.0 mg/ml、1.5 mg/ml 3 个酶浓度进行消化,发现 1.0 mg/ml 为较适合的胶原酶浓度。因为在此浓度时,胰岛在 21~25 min 内被缓和地释放,分离的胰岛结构完整且得率稳定。

1 周、3 周和 8 周小鼠由于胰腺体积、耐受性均有差异,因此所需的消化时间各不相同。本研究发现,在 1.0 mg/ml 酶浓度下,1 周小鼠在消化 23 min 时胰岛获得量最大,而 3 周和 8 周小鼠均在消化 25 min 时获得最大胰岛量。在此消化过程中,需注意消化温度该严格控制在(37 ± 0.1)℃。及时有效的用大量冷的、含 5%胎牛血清的 D-Hanks 溶液终止消化是控制消化时间的保证,速度太慢或用量太小均不能有效的终止消化,最终影响胰岛产量。

国内有研究报道^[10-11]采用 Histopaque 纯化后手挑胰岛,可以获得数量较多、纯度较高的胰岛且操作简便。但是,其缺点是 Histopaque 对胰岛细胞有毒性损害,且胰岛容易丢失。本研究对比 Histopaque 纯化组与单纯手挑组,结果显示, Histopaque 纯化组所得 1 周、3 周和 8 周胰岛纯度较高,但是数量均明显低于单纯手挑组,上清液及沉淀中都可见残存的胰岛。可见,对于新生期小鼠而言,单纯手挑法更加合适。

Miller 等^[12]通过胰腺切片免疫荧光染色方法,发现小鼠出生 1~21 d,新生期 β 细胞的增殖速度远远超过 α 细胞,因此 β 细胞所占比例逐渐上升而相应的 α 细胞比例则逐渐下降。至成年时,β 细胞比例明显升高而 α 细胞比例则明显下降。本研究采用新鲜分离的胰岛,经免疫荧光染色、流式细胞术检测,结果显示:从 1 周、3 周至 8 周,α 细胞及双阳性细胞所占比例逐渐下降,而 β 细胞比例明显上升。此变化趋势进一步验证了 Miller 等的研究结果。1 周、3 周和 8 周小鼠胰岛细胞中双阴性细胞(δ 细胞、PP 细胞等)加上杂质的总比例均低于 15%。鉴于胰岛 δ 细胞、PP 细胞、ε 细胞约占胰岛总细胞的 5~10%^[13-15],可见本实验分离所得胰岛的纯度可达 90%以上。

总而言之,胰岛分离纯化过程的每一个环节都至关重要。除上述影响因素外,小鼠的种系^[16]、外界温度等都对小鼠胰岛的获得量和质量有影响。本研究建立的一种稳定、高效的新生期小鼠胰岛分离纯化方法,为进一步开展关于新生期胰岛增殖、凋亡、新生等调控机制的研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Rieck S, Kaestner KH. Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21(3):151-158

[2] Lee YC, Nielsen JH. Regulation of beta cell replication [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 297(1-2): 18-27

[3] Meier J J, Butler AE, Saisho Y, et al. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans [J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1584-1594

[4] Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas [J]. *Diabetes*, 1967, 16(1): 35-39

[5] Lakey JR, Burridge PW, Shapiro AM. Technical aspects of islet preparation and transplantation [J]. *Transpl Int*, 2003, 16(9):613-632

[6] Carter JD, Dula SB, Corbin KL, et al. A practical guide to rodent islet isolation and assessment [J]. *Biol Proced Online*, 2009, 11(1):3-31

[7] Balamurugan AN, Breite AG, Anazawa T, et al. Successful human islet isolation and transplantation indicating the importance of class 1 collagenase and collagen degradation activity assay [J]. *Transplantation*, 2010, 89(8):954-961

[8] Brandhorst H, Brandhorst D, Hesse F, et al. Successful human islet isolation utilizing recombinant collagenase [J]. *Diabetes*, 2003, 52(5):1143-1146

[9] 李明, 陈栋, 李永海, 等. 小鼠胰岛的分离与纯化 [J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(2): 206-208

[10] 张梅, 刘超, 徐书杭, 等. 不同体重供体及理化因素对小鼠胰岛分离的影响 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2006, 26(8):728-731

[11] 刘翠萍, 徐宽枫, 武晓泓, 等. 大鼠胰岛分离纯化和功能分析的研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2007, 27(3):242-245

[12] Miller K, Kim A, Kilimnik G, et al. Islet formation during the neonatal development in mice [J]. *PLoS One*, 2009, 4(11):e7739

[13] Hohmeier HE, Newgard CB. Cell lines derived from pancreatic islets [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 228(1-2): 121-128

[14] Steiner DJ, Kim A, Miller K, et al. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition [J]. *Islets*, 2010, 2(3):135-145

[15] Kim A, Miller K, Jo J, et al. Islet architecture: A comparative study [J]. *Islets*, 2009, 1(2):129-136

[16] de Haan BJ, Faas MM, Spijker H, et al. Factors influencing isolation of functional pancreatic rat islets [J]. *Pancreas*, 2004, 29(1):e15-e22

[收稿日期] 2013-04-17

热烈庆祝 The Journal of Biomedical Research (JBR) 成功进入 PubMed 数据库。PubMed 是美国国立卫生院 (NIH) 主办的生物医学文献数据库，为全球生物医学研究者和临床医生提供免费的科技文献检索服务。自 2013 年起读者可以从 PubMed 上检索并免费下载 JBR 创刊以来的全部文献。成功进入 PubMed 意味着 JBR 有了一个出色的国际检索和交流平台。JBR 是综合性生物医学期刊，欢迎广大作者投稿。

JBR 在 PubMed 的主页链接如下：[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22J+Biomed+Res%22\[jour\]](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22J+Biomed+Res%22[jour])

JBR 投稿网址：<http://mc03.manuscriptcentral.com/jbrint>