维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1993年第18卷第4期

新生猪胰岛分离及体外培养研究

第一医院内科 李佐强 何 军 舒昌达

提 要 本文介绍一种以国产胶原酶消化与组织培养获得新生猪胰岛样细胞团(ICC)的方法。每个新生猪胰腺经浓度为6mg/ml胶原酶消化7—9min，再体外培养8天后，可获取2000～3000ICC。同时，新生猪ICC内β细胞不但快速或慢速相胰岛素分泌功能良好，而且其超微结构亦正常，说明新生猪ICC可作为研究胰岛细胞分化与发育以及异种移植治疗糖尿病的新来源

关键词 胰岛样细胞团；胰岛素释放；胰岛素含量
中图分类号 R318

胰岛移植仍不失为临床治疗胰岛素依赖型糖尿病（IDDM）引人注目的一种有效方法。虽人胎胰岛样细胞团（ICC）已能获得大量生成[1]，但短时间内要得到足够数量的胎胰颇为困难，且因胎儿死亡时间较长而影响ICC产量及其活性，故临床使用人胎胰岛作同种移植治疗IDDM受到一定限制。然而，若采用新生猪胰做供体则可弥补以上不足，因为不但新生猪胰来源广且价格低，而且临床实践充分证明猪的胰岛素能有效地控制高血糖状态，为此本文就新生猪ICC生成的方法作一探讨研究。

材料和方法

1. **试剂** RPMI 1640培养液（美国Sigma公司），粗制型胶原酶（上海医药工业研究院药物生化研究室，以亮氨酸法测得该酶活性为800u/mg），胰岛素放免试盒（卫生部上海生物制品研究所），正常AB型血清及Hanks溶液均为本室分离或配制。

2. **新生猪ICC的制备和培养** 初生猪日龄为1—6天，体重1500～2000g，雌雄兼用，由北碚饲养场提供。处死新生猪后，即刻在无菌条件下剖腹取出胰腺，摒除血管及淋巴组织，用Hanks液冲洗三次，然后剪成约1～2mm³大小组织块，再以Hanks液洗涤三遍，放入新鲜配制浓度为6mg/ml胶原酶溶液，37℃振荡消化7～9min后，以冷Hanks液（4℃）洗涤三遍，将消化后胰腺组织均等分7份，各放入50mm培养皿，皿内含RPMI1640培养液4.5ml，灭活正常AB型血清0.5ml，青霉素100,000u/L，链霉素及L—谷酰胺各100mg/L。37℃普通培养箱，培养时间为8天，每隔48h更换培养液，留取标本并置于—20℃保存，以放免法作培养液内胰岛素含量测定。

3. **胰岛素释放试验** 培养8天后，用移液管吸出30个ICC，放入含0.25ml碳酸缓冲液的48孔平板小孔，葡萄糖浓度1.67mmol/L，37℃孵育60min，更换缓冲液，且改葡萄糖浓度为16.7mmol/L，再37℃孵育60min，留取标本—20℃保存，以放免法测定葡萄糖刺激ICC胰岛素释放水平。

4. **ICC内胰岛素含量** 释放试验结束后，将ICC研碎制备成组织匀浆，放入含0.2ml 0.18M盐酸—乙醇溶液的48孔平板小孔，4℃过液，留取提取液—20℃保存，以放免法作ICC内胰岛素含量测定。

5. **ICC标本制备** 用Hanks液将培养8天后的100～200ICC洗涤一遍，放入戊二醛磷酸缓冲液固定，环氧树脂包埋超薄切片，染色后电镜观察。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1　新生猪ICC培养液内胰岛素分泌情况

培养皿编号	培养液内胰岛素含量(μu/ml)			
	第一个48h	第二个48h	第三个48h	第四个48h
1	2200	2300	2050	1800
2	2300	2350	2150	1250
3	2100	2100	1600	1000
4	2150	1900	1500	1200
5	2200	2300	1800	1320
6	2100	1800	1800	1060
7	2300	2100	2150	1800
$X\pm SD$	2193±84	2107±197	1879±240**	1347±328▲▲

$P<0.001$，与第一个48h比较，$P<0.02$，与第一个48h比较，▲$P<0.02$，与第三个48h比较，▲▲$P<0.002$，与第二个48h比较

结　果

1. **培养特点**　培养24～48h后，可发现培养皿底有纤维细胞生成，而在其上面则有圆形或椭圆形细胞聚合体形成，这些聚合体大都自由浮动，仅少部分松散贴壁，至培养4～5天生长活动最旺盛，以后2～3天则未见有更多细胞团形成。

2. **超微结构**　电镜观察发现培养8天后的ICC内d细胞多于β细胞，β细胞和α细胞胞质中分泌颗粒清楚可见（图2）；而部分β细胞分泌颗粒呈杆状，胞质中粗面内质网和线粒体均十分发达（图3～4）。此外，ICC内可混杂有较多不明细胞，少量较大ICC中心可见小坏死灶。

3. **培养液内胰岛素含量（表1）**

培养液内胰岛素含量因各培养皿中胰岛组织量稍不同而略有差别，但培养液内胰岛素含量随培养时间延长呈逐渐下降趋势，尤以培养第三和第四个48h降低为明显，培养第四个48h后胰岛素含量约为培养第一个48h的60%（$P<0.001$）。

4. **新生猪ICC胰岛素释放试验（表2）**

在葡萄糖浓度16.7mmol/L刺激作用下，ICC胰岛素释放量较葡萄糖浓度

表2　葡萄糖刺激新生猪ICC胰岛素释放

编号	胰岛素释放（uu/30ICC、60min）	
	1.67mmol/L葡萄糖	16.7mmol/L葡萄糖
1	30.0	45.0
2	40.0	45.0
3	37.5	47.5
4	32.5	32.5
5	37.5	37.5
6	35.0	42.5
7	37.5	40.0
$X\pm SD$	37.5±3.5	41.4±5.2*

*$P>0.05$，与1.67mmol/L葡萄糖组比较

1.67mmol/L刺激无显著差异，$P>0.05$，说明高糖对新生猪ICC胰岛素释放无明显刺激作用。此外，释放试验完毕后，新生猪ICC内胰岛素含量分别为250～375μu/30ICC，平均值为296.4μu/30ICC。

讨　论

由于猪的胰岛分化与发育成熟要到胚胎末期，甚至出生数月后才得以完成[2]，故不宜采用常规胶原酶消化分离大小鼠胰岛方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

以分离新生猪胰岛，为此，我们以新的技术已成功地分离获得新生猪ICC。

胶原酶消化新生猪胰腺组织块时应注意到适当的胶原酶浓度与消化时间，以保证使组织块消化成细沙状，如果浓度偏小而消化时间缩短，致使组织块较大，因营养液不能透过易产生中心性坏死；相反，若浓度过大或消化时间太长，致组织块太小，以使细胞聚合体形成减少。其次，新生猪日龄宜取一周以下，日龄越长，则会影响胶原酶消化及ICC产量。另外，本文资料表明，培养液中加入人血清使大部分ICC不贴壁生长而呈自由浮动，与胎猪ICC生长情况颇为相似，但若培养液内加入胎牛血清，胎猪ICC则大部贴壁生长[3]。胶原酶短时间消化后，一个新生猪胰腺组织块应分别置于7～10个培养皿为适宜，且培养时间5～7天，即可获取直径约为100～300μm的2000～3000个ICC(图1)。

本文结果说明，随培养时间延长ICC培养液中胰岛素分泌量呈逐渐下降趋势；培养结束后，新生猪ICC对高糖刺激β细胞胰岛素释放无明显增加，这与胎猪ICC对高糖刺激反应的结果相一致[3]；而且电镜亦观察到新生猪ICC内β细胞少于d细胞，故表明新生猪ICC胰岛素储备功能尚不完善。但如将微囊包膜新生猪ICC种植至链脲佐菌素诱发糖尿病大鼠腹腔内，能有效地使高血糖恢复到正常水平达半年之久；有将胎猪ICC种植于裸体小鼠肾包膜下四周后，采用葡萄糖溶液灌注种植ICC的肾脏发现，高浓度葡萄糖刺激使ICC胰岛素分泌量于数分钟内明显增加[3]，说明胎猪或新生猪ICC一旦移植到体内其β细胞分化与发育更趋于成熟。

综上所述，由于新生猪胰来源广，且采用胶原酶消化与组织培养方法可以获得形态结构和分泌功能正常的ICC；因此，新生猪ICC可供胰岛细胞分化与发育以及异种移植治疗糖尿病研究之用。

参 考 文 献

[1] Sandler S, et al. Diabetes, 1985; 34: 1113

[2] Alumets J, et al. Gastroenterology, 1983; 85:1359

[3] Korsgren O, et al. Transplantation, 1988; 45:509

(收稿日期 1993-04-01)

INVESTIGATIONS ON ISOLATION AND CULTURE IN VITRO OF NEWBORN PORCINE PANCREATIC ISLETS

Li Zuoqiang, et al

Dept. of Internal Medicine, The First Hospital

A method for the in vitro production of newborn porcine pancreatic isletlike cell clusters(ICC) by collagenase digestion and tissue culture was introduced in this paper. 2000-3000 ICC may be isolated from each newborn porcine pancreas which was digested by 6mg/ml collagenase concentration for 7-9 min and cultured for 8 days. Meanwhile, the functions both acute and chronic phase insulin secretion from the cells of the newborn porcine ICC were normal, also the fine structure of them were excellent. It has been demonstrated that the newborn porcine ICC may be as a potential source both the studies in islet cell growth and differentiation and xenograft transplantation in treatment of diabetes

KEY WORDS Isletlike Cell Clusters; Insulin Release; Insulin Content