

文章编号:1005-6947(2006)11-0866-03

· 简要论著 ·

# 一种简易经济的大鼠胰腺腺泡细胞分离提纯方法

何忠野, 郭仁宣

(中国医科大学第一临床学院 普通外科, 辽宁 沈阳 110001)

**摘要:**为探索一种简易而经济的大鼠胰腺腺泡细胞分离、纯化的方法,笔者采用低浓度 I 型胶原酶溶液作为细胞分离液,经胰胆管逆行注射,然后将剪碎的胰腺组织置于细胞分离液中消化;经过过滤、离心,提取胰腺腺泡细胞的单细胞悬液。结果显示平均每只 Wistar 大鼠可获得  $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  个细胞,纯度达 70% ~ 80%,与经典方法相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。这种方法具有耗酶量少、技术难度小的特点,可认为是一种简易、经济的大鼠胰腺腺泡细胞分离、纯化方法。

**关键词:**胰腺/细胞学;腺泡细胞;细胞分离/方法

**中图分类号:**R322.491;R446.113

**文献标识码:**B

目前胰腺腺泡细胞的分离、纯化仍沿用 Williams 等于 1978 年创建的经典方法<sup>[1]</sup>。该经典方法虽然稳定、可靠、重复性好,但实验步骤烦琐,对实验条件和设备要求极高,且需要大量昂贵的胶原酶,不便于大范围应用。本研究参照 Williams 等的方法,结合胰岛细胞的分离、纯化技术<sup>[2]</sup>,拟建立一种简单、经济、比较稳定的改良的胰腺腺泡细胞分离、纯化方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠,体重 200 ~ 250g (中国医科大学动物实验中心)。

1.1.2 试剂 I 型胶原酶 (Sigma),使用时以新鲜配制的 HBSS-DVC 液配制为 2mg/mL 浓度的细胞分离液。牛血清白蛋白 (V) (Sigma),使用时以新鲜配制的 HBSS-DVC 液配制为 4% 浓度。F12 组织培养液 (上海生物工程公司) 中加 20% 小牛血清 (上海生物工程公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 胰腺腺泡细胞的分离、纯化 大鼠 10 只,

实验前禁食 12h,自由饮水。乙醚麻醉动物后将其浸于 75% 乙醇中 30min 消毒。无菌条件下,固定动物于超净工作台上,在手术显微镜下剖腹,于肝门处以动脉夹阻断胆胰管,在胆胰管汇合处穿刺缓慢逆行注入细胞分离液,即 2mg/mL 的 I 型胶原酶,3 ~ 5mL。见胰腺组织肿胀变白后静止 3min (图 1),然后迅速切取胰腺,去除脂肪和淋巴置于 4℃ 的 20% F12 组织培养液中。将胰腺组织剪碎为约 1 ~ 3mm<sup>3</sup> 小块后,加入预热的细胞分离液,在 37℃ 水浴箱中搅动 120r/min,消化 10min。用无菌尼龙筛 (孔径 40μm) 过滤上清液,用新鲜的消化液重复该过程 1 次,可见胰腺组织几乎全部消化分离出来。用孔径 20μm 尼龙筛再次过滤细胞悬液,轻轻加到 4% 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液表面,120r/min 离心 5min;去除上清并重复此过程 1 次。收集细胞置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱内。

1.2.2 细胞计数 吸取少量细胞悬液,加到细胞计数板上,在倒置显微镜下 (10×物镜) 计数细胞数。按公式计算,细胞数目 = (4 大格细胞数之和 / 4) × 10<sup>4</sup> × 细胞原液量 (mL)。

1.2.3 细胞活性测定 (台盼蓝排斥实验) 吸取 9 滴细胞悬液加入 1 滴 0.4% 台盼蓝,混匀后在 3min 内计数活细胞和死细胞数目,计算细胞活性率。

1.2.4 腺泡细胞纯化率鉴定 将细胞悬液调整

收稿日期:2006-03-10; 修订日期:2006-06-13。

作者简介:何忠野,男,辽宁沈阳人,中国医科大学第一临床学院副主任医师,主要从事胆胰,胰外科方面的研究。

通讯作者:郭仁宣 E-mail:hzy-1971@163.com。

到  $10^5 \sim 10^6$  个/mL 浓度后,在离心涂片仪上进行细胞离心涂片(1 000 r/min, 10 min),制成细胞切片,分别给予 HE 染色和酶原颗粒的亚甲蓝染色。方法如下:切片用亚甲蓝溶液染色后,以 0.2 N 醋酸盐缓冲液分色并用 4% 钼酸胺溶液处理后观察,计算出腺泡细胞纯化率。

### 1.3 统计学处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示(率的比较经正态性转换),统计采用 SPSS 软件包用  $t$  检验方法。

## 2 结果

### 2.1 细胞计数

平均每只大鼠可提取细胞数量为  $(4.7 \pm 0.6) \times 10^7$  个,与经典方法相比较无统计学差异<sup>[3]</sup>(附表)。

### 2.2 细胞活性率

蓝染者为死细胞。计算活细胞率为

$(91 \pm 7)\%$ ,与经典方法相比较无统计学差异<sup>[3]</sup>(附表)(图 2)。

### 2.3 腺泡细胞纯化率

亚甲蓝染色后腺泡细胞内的酶原颗粒呈鲜蓝色而背景不着色。分别计数 10 个高倍视野的 HE 切片上的细胞数和亚甲蓝染色切片上的细胞数,计算出腺泡细胞纯化率。应用经典方法腺泡细胞纯化率为  $70\% \sim 80\%$ <sup>[4]</sup>。本实验所得腺泡细胞纯化率为  $(76 \pm 10)\%$  与经典方法相比较无统计学差异(附表)(图 3,4)。

附表 细胞分离 3 指标的数据( $\bar{x} \pm s$ )

方法	细胞数( $10^7$ )	活性率(%)	纯化率(%)
改良方法	$4.7 \pm 0.6$	$91 \pm 7$	$76 \pm 10$
经典方法	7.5	90	75
$P$	$>0.05$	$>0.05$	$>0.05$

A:注射分离液前

B:注射分离液后

图 1 注射分离液前后胰腺的大体比较(箭头所指为胰腺组织)

图 2 胰腺活细胞和死细胞( $\times 20$ )(黑色箭头为活细胞,红色箭头为死细胞)

### 3 讨论

随着对急性胰腺炎研究的深入,在该领域内的实验性研究已从实验动物的大体水平逐渐转移到单细胞水平。这就需要一种简单、节省、稳定可靠的胰腺腺泡细胞的分离、纯化方法,以为科研工作提供一个平台。但传统的经典方法操作步骤烦琐、花费昂贵,不适于广泛开展。为此,本研究结合国内、外一些经验,建立了一种大鼠胰腺腺泡细胞的分离、纯化的改良方法。

在胰腺细胞的分离中,Amsterdam 和 Jamieson<sup>[5]</sup>采用了将胶原酶和透明质酸酶混合溶液向胰腺实质中注射的方法,结果大大减少了胶原酶的用量。而张桦等<sup>[6]</sup>向胰胆管内注射大量 Hank's 液,以机械方法分离胰腺细胞,也同样减少了胶原酶的用量。但向实质内直接注射时,细胞分离液在胰内的分布不均匀,而经胰胆管快速、高压注射液体对胰腺腺泡细胞损伤较大。基于此,本研究将两种方法结合起来,经胰胆管缓慢、低压注入低浓度的胶原酶细胞分离液。这样既可以使细胞分离液在胰实质内均匀分布,又最大限度地保护了胰腺腺泡细胞。实验证明应用本方法提取的胰腺腺泡细胞,无论在数量还是在纯度上都与传统的经典方法无明显差异,而胶原酶的用量却减少了 10~30 倍,并且因消化充分,减少了细胞分离离心次数,降低了细胞污染和损伤的几率。另外,本方法采用细胞悬液直接离心涂片制备细胞切片,同经典方法需要在水浴箱内旋转聚集细胞 2~24h 相比,简化了实验步骤、节省了实验时间,同时降低了细胞污染机会。特别需要指出的是,本方法可以直接制备单细胞悬液,更便于施加处理因素,并有利于进行免疫印迹(Western-

blotting)和逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)等电泳实验。

应用本方法时须严格执行无菌原则;在经胰胆管注射时应保证从十二指肠壁进针,切勿刺入十二指肠腔内以免造成污染。使用手术显微镜和应用显微外科手段大大增加了实验的成功率。此外,向胰胆管注射细胞分离液时应遵循“低压、少量、缓慢、低浓度、短时间”的原则,在确保分离液均匀分布于胰腺实质内的同时尽量减少对胰腺腺泡细胞的损伤。本方法无需进行胰腺细胞培养却可以直接得到大量单细胞,非常适合于急性胰腺炎早期(12h内)胰腺腺泡细胞病理、生理变化的研究。

#### 参考文献:

- [1] Williams JA, Kore M, Dormer RL. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini [J]. *Am J Physiol*, 1978, 253(8): E517-524.
- [2] Van Der JA, Meloche RM, Field MJ, *et al.* Pancreatic islet isolation in rats with ductal collagenase distention, stationary digestion, and dextran separation [J]. *Transplantation*, 1998, 45(2): 493-495.
- [3] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 修订版, 西安: 世界图书出版公司, 2004. 100-103.
- [4] 鄂征. 组织培养技术[M]. 第2版, 北京: 人民卫生出版社, 1993. 126-130.
- [5] Amsterdam A, Jamieson JD. Structure and functional characterization of isolated pancreatic exocrine cells [J]. *Pro Nat Acad Sci, USA*. 1991, 69(2): 3028.
- [6] 张桦, 蔡德鸿, 徐春生, 等. 一种简易高效的大鼠胰岛分离纯化方法[J]. *第一军医大学学报*, 2001, 21(2): 119-131.

## 2007年《中国药学文摘》征订启事

《中国药学文摘》(ISSN1003-3521/CN11-2529/R)是由国家食品药品监督管理局主管,国家食品药品监督管理局信息中心主办,国内外公开发行的医药科技性专业期刊。月刊,16开本,每期280页左右,每期约80万字。是国内药学期刊中唯一的综合性文摘类刊物。刊载国内外公开发行的700余种药学相关学科期刊中的精粹文献。全年定价:476元。