

文章编号:1005-6947(2008)11-1102-04

· 基础研究 ·

# 低温微重力培养对大鼠胰岛细胞质量影响的实验

邢军<sup>1</sup>, 陈艳波<sup>1</sup>, 吴舰宇<sup>2</sup>, 周毅<sup>2</sup>, 宋纯<sup>2</sup>, 宋春芳<sup>2</sup>

(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院 1. 腹部外科 2. 卫生部细胞移植重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:**目的 研究低温微重力对大鼠胰岛移植质量的影响,以期减少体外培养对胰岛活性和数量的影响,提高胰岛移植质量。方法 将分离纯化的大鼠胰岛分为3组:大鼠新鲜胰岛移植组(于移植前在普通培养基中培养21 d,对照组);实验1组(大鼠新鲜胰岛在37℃ RCCS中培养21 d);实验2组(新鲜大鼠胰岛在26℃ RCCS中培养14 d后复温至37℃继续在37℃ RCCS中培养7 d)。观察各种培养液中的胰岛素含量。并将上述3个实验组不同条件培养的胰岛分别以2000IEQ胰岛移植量植入糖尿病大鼠体内,并观察10周。结果 实验2组的胰岛存活率、胰岛素分泌水平及胰岛素刺激指数均高于对照组和实验1组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。21 d时实验2组胰岛存活率高达 $(67.4 \pm 4.6)\%$ ,而对照组和实验1组胰岛存活率分别降至 $(28.1 \pm 3.3)\%$ 和 $(50.3 \pm 3.5)\%$ ,3组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。给糖尿病大鼠移植实验1,2组的胰岛后均能控制血糖至正常水平,但实验2组胰岛移植对糖尿病大鼠7 d内血糖控制优于实验1组;对照组血糖控制差,3组间两两比较均有统计学差异(均 $P > 0.05$ )。结论 大鼠胰岛经低温微重力培养后移植,可以明显提高1型糖尿病大鼠的治疗效果。  
[中国普通外科杂志,2008,17(11):1102-1105]

**关键词:** 胰岛/移植; 细胞培养,低温; 微重力;

**中图分类号:** R 617 **文献标识码:** A

## Effect of transplantation of rat islets improved by low temperature microgravity culture

XING Jun<sup>1</sup>, CHENG Yanbo<sup>1</sup>, WU Jianyu<sup>2</sup>, ZHOU Yi<sup>2</sup>, SONG Shun<sup>2</sup>, SONG Chunfang<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, 2. the Cell Transplantation Key Laboratory of National Health Ministry, the Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of transplantation of rat islets which cultured in hypothermia microgravity rotary cell culture system (HRCCS) on rats with diabetes mellitus. **Methods** The isolated and purified rat islets were divided into three groups: Temperature (37℃) culture for 21 days in flask-culture (control group); temperature (37℃) culture for 21 days in RCCS (experimental group 1, E1); after low temperature (26℃) culture for 14 days in HRCCS, then temperature (37℃) culture for 7 days in RCCS (experimental group 2, E2). Survival rate of islets in three transplanted groups was measured by AO-PI double-staining. Cultured islets were identified by dithizone (DTZ) staining, and insulin contents of different culture liquids were measured by radioimmunoassay. Then the cultured islets was implanted into rat recipients and the transplantation effect was observed for 10 weeks. **Results** Survival rate of islets in group E2 ( $67.4 \pm 4.6\%$ ) was higher than that in group E1 ( $50.3 \pm 3.5\%$ ) and control group ( $28.1 \pm 3.3\%$ ) (all  $P < 0.05$ ). The insulin content and insulin stimulation index in group E2 were higher than those in and group E1 and control group. The survival rate of islets in group E2 ( $67.4 \pm 7.6\%$ ) was higher than that in group E1 ( $28.1 \pm 3.3\%$ ) and control group ( $50.3 \pm 3.5\%$ ) (all  $P < 0.05$ ). Transplantation

收稿日期:2008-03-29; 修订日期:2008-10-28。

作者简介:邢军,男,哈尔滨医科大学附属肿瘤医院副主任医师,主要从事胃胰外科基础和临床方面的研究。

通讯作者:邢军 E-mail:junxing08@hotmail.com

of group E1 and E2 islets into diabetes rats could be restored blood glucose to normal in all recipients within one week, and all recipients maintained normal glucose-tolerant curve throughout the observation time. But the effect of group E2 islets transplantation on diabetes rats was better than that in group E1 islets transplantation; and the effect of control group islets transplantation for controlling blood glucose is not so good. **Conclusions** Rat islets cultured in 26 °C microgravity rotary cell culture system (26 °C-RCCS) could improve the effect of islet transplantation. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (11): 1102 - 1105]

**Key words:** Islet of Langerhans/transpl; Hypothermia; Recovery; Microgravity; Cell Culture

**CLC number:** R 617

**Document code:** A

大量实践和研究证明,胰岛移植成功的关键之一是移植胰岛的足够数量和良好功能。本实验用低温微重力培养的方法旨在减少胰岛数量和功能的丢失,提高胰岛移植的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与试剂

供受者均为雄性 Wistar 大鼠,由本校第一临床医学院动物室提供。体重 200 ~ 300 g。供者 81 只(鼠龄 10 ~ 12 周),受者鼠 27 只(鼠龄 7 ~ 8 周)。释放酶, RPMI1640 培养基,胎牛血清(FBS),二甲基亚砷(DMSO)均购自美国 Gibco 公司;Ficoll 液,链脲酶素(STZ),二苯硫卡巴脲(DTZ),吡啶橙(AO),碘化丙啶(PI)均购自美国 Sigma 公司;微重力培养仪(RCCS)购自美国 Synthecon 公司,胰岛素放射免疫试剂盒购自中国原子能科学研究院同位素研究所。

### 1.2 实验方法

1.2.1 大鼠胰岛的分离、纯化与分组 用贺德<sup>[1]</sup>的方法消化收集纯化后获得胰岛。培养前后对胰岛悬液进行微生物学检测。对照组:大鼠新鲜胰岛于移植前在普通培养基中培养,培养时间 21 d。实验 1 组:大鼠新鲜胰岛在 37 °C RCCS 中培养 21 d。实验 2 组:大鼠新鲜胰岛在 26 °C RCCS 中培养 14 d 后复温至 37 °C,继续在 37 °C RCCS 中培养 7 d。将上述 3 组不同条件培养的胰岛分别以 2000 胰岛当量(IEQ)胰岛移植量植入糖尿病大鼠体内,并观察 10 周。

#### 1.2.2 胰岛计数及胰岛细胞相关活性检测

(1)胰岛计数:获取的胰岛细胞取 100  $\mu$ L,经 DTZ 染色计数。以 50  $\mu$ m 为直径,测量各数量级胰岛细胞分布(重复取样 2 次,取平均值),并计算胰岛获取数、存活率、当量和纯度。IEQ = ( $\Sigma$  各直径范围胰岛数  $\times$  相应系数)  $\times$  稀释倍数<sup>[2]</sup>。DTZ 染色对大鼠胰岛进行计数。(2)胰岛细胞活性测

定:培养前后胰岛存活率用胰岛活细胞占有胰岛细胞总数的百分比表示。(3)培养液中胰岛素水平:分别收集各组培养不同天数的胰岛细胞培养液,用放射免疫法测定胰岛素含量。(4)胰岛素刺激试验:通过将培养一定数量的胰岛连续在含有 2.8 mmol/L 葡萄糖(低糖)和 20 mmol/L 葡萄糖(高糖)的培养基中各培养 60 min,然后收集检测胰岛 AO-PI 染色检测素分泌水平。胰岛素刺激指数(ISI):在高糖溶液中收集的胰岛素数值除以低糖溶液中数值的比值。

1.2.3 胰岛光镜电镜观察 将胰岛细胞以 1 000 r/min 离心 10 min,2% 的戊二醛固定,制成光镜电镜标本观察胰岛细胞结构,并拍摄照片。

1.2.4 糖尿病模型的制备和胰岛移植 进行胰岛移植前大鼠通过静脉注入 65 mg/kg 链脲酶素以诱导形成糖尿病动物模型。每周 3 次剪尾测血糖,连续 2 次血糖水平高于 20 mmol/L 确定为糖尿病鼠。然后分别将 2000 IEQ 不同条件培养的胰岛移植入受体大鼠肾包囊内,并观察 10 周。

1.2.5 移植后功能评价 测定受体非禁食血糖监测移植后胰岛的存活和功能情况。第 1 周每天监测 1 次,以后每周测 3 次。非禁食血糖连续 2 次高于 11.1 mmol/L 作为移植物受排斥、功能丧失的指标。

### 1.3 统计学处理

数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,以 SAS8.0 统计学软件进行方差分析及两两比较。

## 2 结果

### 2.1 胰岛生长情况和存活率

(1)培养 7 d:AO-PI 和 DTZ 染色检测发现对照组少数胰岛中央细胞红染,部分胰岛分散为单个细胞,折光性减弱,出现细胞碎片;实验 1 组和实验 2 组细胞生长状况良好,绿染,胰岛的团索状结构保持完整,立体结构鲜明,呈黄色。(2)培养

14 d:对照组绝大多数胰岛分散为小团或单个细胞,折光性减弱,近50%细胞红染;实验1组和实验2组细胞生长状况较好,个别胰岛出现萎缩和红染,胰岛存活率呈缓慢下降趋势。(3)培养21 d:对照组细胞碎片明显增多,细胞变暗,折光性差,胰岛团上黑色小斑点明显增多,呈现明显的退化状态,胰岛存活率大幅度下降至 $(28.1 \pm 3.3)\%$ 。对照组与实验1组的 $(50.3 \pm 3.5)\%$ 和实验2组的 $(67.4 \pm 4.6)\%$ 相比,各时点差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。实验1,2组比较,各时点差异亦均有统计学意义( $P < 0.05$ )(表1)。

表1 各组不同培养时间胰岛存活率比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	培养3 d(%)	培养7 d(%)	培养14 d(%)	培养21d(%)
对照	78.2±3.0	63.8±4.7	48.3±3.6	28.1±3.3
实验1	83.1±4.2 <sup>1)</sup>	72.1±3.6 <sup>1)</sup>	62.4±5.4 <sup>1)</sup>	50.3±3.5 <sup>1)</sup>
实验2	89.3±3.8 <sup>1)</sup>	83.5±3.4 <sup>1)</sup>	73.5±4.1 <sup>1)</sup>	67.4±4.6 <sup>1)</sup>

注:1)与对照组相比较, $P < 0.05$ ;2)与实验1组相比较, $P < 0.05$

## 2.2 透射电镜观察

培养7 d,对照组可见凋亡细胞和坏死细胞;实验1组和实验2组可见凋亡细胞,少见坏死细胞。培养21d,对照组胰岛凋亡细胞较培养7d有所减少,坏死细胞明显增多,线粒体结构改变明显,胰岛素分泌颗粒明显减少;实验1组和实验2组多数细胞核结构多数完整;实验2组胰岛与实验1组胰岛相比,内分泌颗粒相对较多,细胞内线粒体和游离核蛋白体也较多。

## 2.3 不同培养时间的胰岛素水平

随培养时间的延长,各组胰岛素水平呈下降趋势。在培养14 d后实验2组中的胰岛素分泌水平 $(60.457 \pm 0.39) \mu\text{U}/\text{mL}$ 明显高于实验1组 $(48.58 \pm 0.34) \mu\text{U}/\text{mL}$ 和对照组 $(30.11 \pm 0.46) \mu\text{U}/\text{mL}$ ;21 d时对照组胰岛素分泌水平下降至 $(15.31 \pm 0.41) \mu\text{U}/\text{mL}$ ,实验1组下降至 $(31.17 \pm 0.43) \mu\text{U}/\text{mL}$ ,实验2组为 $(46.48 \pm 0.41) \mu\text{U}/\text{mL}$ ,3组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。胰岛素刺激释放实验(表2)显示,在低糖和高糖刺激下,胰岛素释放值实验2组 $>$ 实验1组 $>$ 对照组( $P < 0.05$ );尤其在低糖刺激下,实验2组和实验1组胰岛素释放值明显优于对照组。刺激指数(ISI):实验2组 $>$ 实验1组 $>$ 对照组,3组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )(表2)。

表2 胰岛素刺激释放实验( $\mu\text{U}/100\text{IE}/\text{mL}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	低糖(2.8 mmol/L)	高糖(20 mmol/L)	胰岛素刺激指数
对照	0.56±0.8	1.12±0.5	2.09±0.4
实验1	1.07±0.7 <sup>1)</sup>	3.76±0.8 <sup>1)</sup>	3.34±0.6 <sup>1)</sup>
实验2	1.31±0.4 <sup>2)</sup>	5.14±0.9 <sup>2)</sup>	5.13±0.6 <sup>2)</sup>

注:1)与对照组相比较, $P < 0.05$ ;2)与实验1组相比较, $P < 0.05$

## 2.4 移植后功能评价

胰岛植入糖尿病大鼠肾包囊后,实验2组( $n=6$ )在移植后24 h血糖即100%恢复血糖至正常值;实验1组( $n=6$ )48 h~72 h血糖才开始逐渐恢复至正常,至21 d时实验2组 $(13.45 \pm 8.32) \text{mmol}/\text{L}$ 血糖控制也优于实验1组 $(19.72 \pm 2.05) \text{mmol}/\text{L}$ 。对照组( $n=6$ )血糖控制差,且2例血糖始终高于正常水平,3组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组大鼠切除移植入胰岛的一侧肾脏后,又很快恢复到高血糖状态。

## 3 讨论

胰岛移植治疗糖尿病已取得了成功。成功的因素很多<sup>[3-4]</sup>,一次植入足够数量和活性的胰岛细胞是胰岛移植成功的主要原因之一<sup>[5-6]</sup>。以往胰岛移植前均是采用常温(37℃)普通二维培养方式培养。由于胰岛在胰腺取材、胶原酶消化、梯度离心等过程中,受到机械性、化学性、生物性的各种损伤,胰岛一般体积较大,直径达50~300  $\mu\text{m}$ ,甚至400  $\mu\text{m}$ ,非贴壁生长,加之培养容器中的营养物质、气体及代谢物质浓度不均一,细胞极易发生坏死和凋亡,尤以胰岛中心为著,最终导致胰岛细胞数量和功能下降,影响移植效果。三维微重力组织细胞旋转培养系统通过使细胞与培养液在容器内旋转,模拟微重力环境,重力向量被持续随机化,细胞以一个终速度连续自由落体的方式悬浮于培养基中,对培养细胞产生一种低剪切力,低涡流,从而减少培养液对细胞产生的机械损伤,并增加细胞营养的传递作用,有利于细胞的增殖与分化。另外,微重力旋转培养可以通过滤膜完成气体交换,使气体、营养成分和代谢废物能最佳扩散。这些优势都是静止培养无法达到的<sup>[7]</sup>。

本研究从电镜和光镜观察到普通二维培养胰岛细胞发生坏死和凋亡,与崔云甫等<sup>[8]</sup>观察结果相似。胰岛通过低温微重力旋转培养系统(the hypothermia rotary cell culture system, HRCCS)培养后胰岛细胞中央坏死和凋亡减少,细胞超微结构保持良好,内分泌颗粒相对较多,细胞内线粒体和游

离核蛋白体也较多。说明 HRCCS 阻止了胰岛细胞的减少并为胰岛细胞生长提供最适宜的生长环境。

本实验结果显示,经 HRCCS 培养的胰岛在培养 7 d,14 d 时胰岛存活率下降不明显,实验 2 组培养 21d 时的胰岛细胞存活率( $67.4 \pm 4.6$ )% 明显高于对照组培养的胰岛存活率( $28.1 \pm 3.3$ )%,而且也优于实验 1 组胰岛存活率( $50.3 \pm 3.5$ )% ( $P < 0.05$ )。说明 HRCCS 可以明显减轻各种原因引起的胰岛损害,延长胰岛细胞的存活。从胰岛素分泌水平及胰岛素刺激指数也反映出实验 2 组明显高于对照组和实验 1 组,证明 HRCCS 可为胰岛细胞生长提供最适的生长环境,从而可以较好的维持胰岛活性。再者,在微重力培养条件下,胰岛细胞团悬浮,空间自由度增大,有利于  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  等细胞之间、细胞培养液之间相互接触,利于化学信号传递和细胞分化与增殖,且不易形成中心性坏死,能最大程度地维持胰岛的数量和活性。从移植结果也可见,经 HRCCS 培养的胰岛移植效果明显,较早并且能长时间地改善糖尿病大鼠的高血糖状态。

本实验提示,低温微重力旋转培养减少胰岛的损害,有利于胰岛细胞的功能恢复和生长增殖,

并使胰岛具有更好的胰岛素分泌能力。本结论为胰岛移植前保存提供了可行的思路和方法。

#### 参考文献:

- [1] 贺德,詹文华,蔡世荣,等. 三种消化酶在大鼠胰岛分离纯化中的效果比较[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(5): 434-435.
- [2] Lakey JRT, Naoya Kobayashi, Shapiro AM, et al. Current human islet isolation protocol [M]. Medical Review Co. Japan, 2004, 80-81.
- [3] 赵刚,王芳,王春友. 免疫缺陷树突状细胞诱导异种胰岛细胞移植耐受[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(5): 347-350.
- [4] 杨蕾,刘永锋,程颖,等. 反义肽核酸阻断 CC 趋化因子受体 5 途径延长同种异体胰岛移植存活[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(5): 451-455.
- [5] 张伟杰,陈实. 胰岛移植进展[A]. 中华器官移植杂志, 2003, 24(3): 190-192.
- [6] Nagate N, Gu Y, Hari H, et al. Evaluation of insulin secretion of isolated rat islets cultured in extracellular matrix [J]. Cell Transplant, 2001, 10(4): 447-445.
- [7] 何川,邓廉夫,朱雅萍. 旋转系统下的三维培养成纤维细胞 PGA 复合物的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2003, 41(3): 214-217.
- [8] 崔云甫,王贵玉,孙续和,等. 胰岛分离后中央细胞损害的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(2): 182-183.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计:应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究);实验设计(应交代具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等);临床试验设计(应交代属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕 4 个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明,尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述:用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料,用  $M(Q_R)$  表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件以分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析,对具有重复实验数据的回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达:当  $P < 0.05$  (或  $P < 0.01$ ) 时,应说明对比组之间的差异有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别;应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等),统计量的具体值(如  $t = 3.45$ ,  $\chi^2 = 4.68$ ,  $F = 6.79$  等)应可能给出具体的  $P$  值(如  $P = 0.0238$ );当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 置信区间。