

实验技术

人胎胰岛分离与培养的研究

梁志成 黄永昌 陈淑群 刘思远 林诚斌

(暨南大学生物系医学遗传室)

从人胎儿胰腺分离纯化胰岛和培养胰岛细胞,对糖尿病患者进行移植治疗,以及通过细胞工程大量增殖胰岛细胞,制备人的胰岛素,已为国内外学者广泛关注^[1,2]。我们用胶原酶酶解, Ficoll 梯度离心分离胰岛,进行细胞培养,激动因子刺激细胞的生长和分泌,测定胰岛素含量,并以细胞杂交研究胰岛细胞传代增殖,为胰岛细胞移植治疗与生物制备胰岛素探索新的途径。

材料与 方法

一、胰岛的分离与细胞培养^[3,4]

取中止妊娠、早产或水囊引产的胎儿 20 例,胎龄为 18—38 周,胎儿首先放入 0.1% 新洁而灭溶液中 10 分钟灭菌,在无菌室用碘酒,酒精局部消毒,解剖取胰腺,离体后除去胰腺外膜, Hank's 液清洗两次去除血球,用眼科剪子剪碎组织成 1 mm 大小,然后按每 0.5 克胰腺组织加入含有胶原酶 1500U/3 ml (Sigma XI) 或 2000 U/3 ml (上海医工院) Hank's 液中,充分打匀,放到 37℃ 水浴中快速摇动,使胶原酶与组织充分接触,温育 15 分钟至组织酶解完全后,随即加 2 ml RPMI 1640 培养液中中止酶解作用。1500 rpm 离心 10—15 分钟,去上清液,沉淀物用 Hank's 液洗两次,再充分打匀,将悬浮液轻轻地沿离心管壁注在预先做好 Ficoll 400 (Pharmacia 产品) 梯度分离层的上层, Ficoll 的梯度为 1.085, 1.075, 1.045, 1.035。以 3000 rpm 离心 10 分钟,则见梯度各界面清晰层次,分别取各层胰腺样品观察,选择胰岛含量多的一层,用 Hank's 液洗两次及培养液洗一次,将 Ficoll 洗涤干净,分离的胰岛接种培养。

培养液为 RPMI 1640 (日本株式会社), 或 Ham F 10 加 20% 胎牛血清和 10 mmol/L Hepes, pH 7.0—

7.2, 每瓶 5 ml 培养液接种 150—200 个胰岛进行培养。胰岛接种方法: 先滴入两滴小牛血清在培养瓶的接种面, 均匀接种胰岛, 于 37℃ 培养 2—3 小时后, 才加入培养液, 使胰岛易于贴壁生长, 样品在 CO₂ 培养箱内, 37℃ 静置培养四天开始换培养液, 每次换出 3/4 培养液, 密封贮于 -20℃ 冰箱内待测胰岛素。

二、胰岛细胞传代与冷冻保存

胰岛培养 7—12 天, 细胞生长密布培养瓶, 用器械直接刮取细胞或用 EDTA—0.25% 胰酶 (Defico 产品) 消化脱落细胞, 转移到新培养瓶继代培养。胰岛细胞冷冻贮存, 是在细胞生长旺盛密布时, 用 EDTA 胰酶消化脱壁, 新鲜培养液冲脱细胞, 中止胰酶的作用, 离心去上清液, 然后加入含 10% 二甲亚砜 (DMSO), 20% 小牛血清, 庆大霉素 40 单位/ml 的培养液, 轻轻吹打成细胞悬浮液, 分装在 1 ml 安瓿瓶, 按常规逐步降温, 最后放到 -196℃ 液氮中保存。贮放两个月的细胞取出迅速放入 37℃ 水浴中复苏, 加入适量培养液, 离心去上清液, 重复一次, 再用新鲜培养液进行培养观察。

三、激动因子对胰岛细胞的作用

培养 10 天的胰岛细胞, 加入葡萄糖激动因子, 以促进胰岛细胞的生长与分泌, 其浓度为 5.5 mmol/L, 11.1 mmol/L, 16.7 mmol/L, 观察其刺激效应。

四、细胞杂交^[5]

胰岛细胞传至三代, 细胞就退化不能继续传代, 为了互补这缺点, 我们选用具有生长增殖快的人良性瘤 Hep 细胞进行杂交。细胞融合剂 PEG 的分子量 4000, 灭菌后与 RPMI 1640 培养液配成 50% 的 PEG 溶液。用以杂交的两种细胞各含量约 5×10^6 , 两种细胞充分混匀, 离心去上清液, 即加入 1 ml 已制备温热

* 本研究为中国科学基金资助课题。

的50% PEG融合剂, 吸管吹打1分钟使细胞混合, 然后加入9 ml 1640培养液打匀, 离心去上清液以除去PEG, 再加入10 ml培养液接种在2—3个培养瓶内培养及观察。

五、放射免疫测定胰岛素

胰岛细胞培养液, 采用同位素¹²⁵I双抗体标记抗原(放射盒为上海生物制品所生产)冷冻离心放射免疫饱和分析法, 与待测物的非标记抗原对特异性抗体进行竞争性结合反应, 在LKB 1260型γ液闪计数器测定胰岛素的含量。

六、透射电子显微镜观察

取培养的胰岛细胞, 经Hank's液清洗, 用2.5%戊二醛及1%锇酸固定, 乙醇、丙酮分级系列脱水, Epon 812包埋, 在LKB-V机进行60 nm超薄切片, 置于铜网用醋酸双氧铀及柠檬酸铅染色, JEOL-100 CX II型透射电子显微镜观察与照相。

结 果

一、胰岛的密度梯度分离及细胞培养

经胶原酶及胰酶消化的胰腺组织悬浮液离心后, 观察到四个清晰的界面层, 最上层为乳白色匀浆及少量细胞; 第二层(1.045)为白色微粒胰岛层, 胰岛呈圆形和椭圆形, 胰岛内细胞结构清楚(图版图1), 由于不同胎龄胰腺发育分化不同, 而所含的胰岛有不同, 在一个胰腺可收集300多至400多个胰岛; 第三层(1.075)为细小组织碎块及少量胰岛夹在其中; 而底层(1.085)为未消化好的胰腺组织块和絮状结缔组织物。用胰酶加胶原酶或单独胶原酶处理比较, 胰岛的分离前者稍好些, 但无显著差异。倘若胶原酶浓度2000 U/2 ml处理20分钟, 就会造成胰腺组织成絮状团块, 而胰岛粘附在内分离不出来。

培养3—4天的胰岛, 边缘出现分生细胞, 5—6天形成生长晕(图版图2), 并有些细胞散落在远离胰岛的周围。胰岛细胞呈棱形或三角形等形态, 有别于成纤维细胞, 胞浆内含物充实, 结构致密(图版图3), 8—9天细胞生长最好, 密布瓶壁, 就及时传代, 但我们的实验只能传至第三代。若原代继续培养至14天以后, 细胞逐渐老化, 内含物稀少, 出现空泡与成片细

胞脱落或凝集成团, 呈灰色溶解状态(图版图4), 这现象一直延至一个多月无多大变化。

我们把培养8—10天生长旺盛的胰岛细胞, 在液氮保存两个月, 经复温培养5—7天, 有部分细胞贴壁生长较好, 但复苏的细胞生活力较差, 测培养液的胰岛素含量只有 54 ± 510 uu/ml, 8天以后细胞生长趋于停滞。

二、葡萄糖激动因子对胰岛素释放的影响

培养12天左右的胰岛细胞, 胰岛素分泌下降, 这时分别加入葡萄糖对激发细胞生长与分泌是有效的, 观察到5.5 mmol/L浓度诱导作用与对照水平相近, 而11.1 mmol/L, 16.7 mmol/L浓度均有较好的诱导作用, 但以11.1 mmol/L最佳, 胰岛素含量可达3010 uu/ml, 将在各为种诱导因子作用比较的另文报道。

三、细胞杂交

Hep细胞与胰岛细胞在PEG作用下, 两种细胞开始粘连, 随后细胞融合, 大多两个细胞融合, 但也有三个或多个细胞融合现象, 杂种细胞的染色体为四倍体或亚四倍体(86—92个), 细胞体积较大(图版图5)。经PEG处理的细胞生长较好, 杂种细胞经6—7次传代, 取其培养液检测仍含有550.368—565.672 uu/ml的胰岛素, 说明通过细胞杂交来建立具有分泌胰岛素而又生长快的细胞系是可探索的途径。

四、培养液的胰岛素含量放免测定

胰岛细胞培养4—8天胰岛素含量持续递增, 到第9天含量就逐步下降趋势, 随着培养时间越长, 胰岛素含量越低, 在20例胎儿胰岛培养4—30天的胰岛素水平统计结果如下:

人胎胰岛培养的培养液中胰岛素含量($\bar{X} \pm S$)

培养天数	培养液中胰岛素含量(uu/ml)
4	1980.10 ± 158
5	2477.62 ± 277
8	2784.05 ± 187
12	2197.10 ± 210
14	2007.53 ± 130
20	376.00 ± 610
30	216.00 ± 380

五、透射电子显微镜观察细胞的结构

取培养不同时间的胰岛细胞进行亚显微结构比较,生长旺盛的细胞,细胞核长圆形,核内缘异染色质多,核周围线粒体多,嵴结构清楚,内质网良好,分布很多核糖体,细胞质致密,有许多高电子密度大小圆形胞浆颗粒。而培养14天以后老化的胰岛细胞,线粒体较少,嵴结构不清楚,内质网呈解体状,核糖体较稀少,高电子密度的胞浆颗粒极少,并有大小不等的空泡(图版图6),整个细胞呈现代谢障碍解体退化的状态。

讨 论

当前糖尿病药物治疗,是应用猪牛胰腺生物提取胰岛素,但不如人的胰岛素高效,因为猪牛和人的胰岛素在肽链结构上有3个氨基酸不同,对有些糖尿病患者产生免疫反应。因此,有必要探索制备人的胰岛素的新途径。自从重组DNA技术发展后,就用基因工程方法生产胰岛素,但工艺复杂、难度大、成本高,尤其是人胰岛基因在工程菌中表达不稳定,胰岛素原(Preinsulin)有毒性,不能直接用于临床。故通过人胎胰岛培养大量增殖胰岛细胞,进行对糖尿病患者细胞移植治疗或提取胰岛素是一种新方法探索。近年来国内外学者一致认为胰岛移植是治疗糖尿病较理想的措施,但还存在胰岛的纯化和活性问题,以及由于供体与受体的基因型不同,组织移植引起免疫排斥反应,而经过胰岛纯化和培养胰岛细胞移植,就可以降低免疫作用。据Lafferty等^[6]认为胰岛细胞不带Ia抗原,但胰腺中的白细胞、淋巴细胞与树状细胞则带抗原,能诱发异种组织移植的排斥。若经胰岛培养处理,去除非胰岛细胞,就能减弱或消除受体对移植物的免疫排斥反应,达到移植有效的治疗效果。同时,若把胰岛细胞以注射方法引入患者体内,可免受组织移植开刀手术之苦和不受人胎胰腺来源限制。

人胎胰岛细胞培养12天以后,细胞老化,

胞浆出现空泡,内质网与线粒体逐渐解体,胞浆的酶原颗粒减少,胰岛素分泌下降和难于继代培养,这可能胰岛细胞有内在特殊机理。但细胞过密的接触抑制,以及培养时间长而培养液中胰岛素含量多对细胞反馈作用有关。因此,保持一定细胞密度和较好的分泌力,适时传代,加激动因子的刺激是必要的;葡萄糖是调节胰岛素分泌和刺激胰岛素释放的重要生理性底物^[7],因 β 细胞膜上有特定的葡萄糖受体,葡萄糖本身作为信使,它既是促进胰岛素的合成,又引进钙离子,从而激活微小管系统,把分泌颗粒转到细胞表面,通过细胞吐溢作用,释放胰岛素。我们加入11.1 mol/L葡萄糖培养比对照组细胞在生长与分泌胰岛素均较好,说明适当葡萄糖对 β 细胞有促进胰岛素的合成与释放作用。

胰岛细胞至今仍没有能解决细胞传代建株的问题。为了探索既能延续胰岛细胞生长而又具有分泌胰岛素的新细胞系,我们选择生长快的人HeP细胞与胰岛细胞杂交,观察到杂种细胞能延续传代至6—7代以上,仍然分泌一定量胰岛素,而胰岛细胞则只能传3代就生长停滞,所以进行细胞杂交来探讨胰岛细胞传代,这种方法可能有成效的。尽管在细胞移植临床治疗现在不一定能应用,但这种探索研究是有意义的。

冷冻保存细胞是避免由于长期培养过程导致细胞退化的重要手段,我们进行胰岛细胞在液氮保存,复苏后仍能生长,证明这种方法对难于传代的胰岛细胞保存是有效的。

摘 要

取人胎儿胰腺经胶原酶酶解, Ficoll 梯度离心分离胰岛,培养7—8天的胰岛细胞生长最旺盛,胰岛素分泌量最高。此后随培养时间的延长,细胞老化,胞浆出现空泡,内质网、线粒体等呈解体状,胰岛素分泌量下降,这时

加入葡萄糖激动因子对细胞有激动作用。采用生长快的 Hep 细胞与胰岛细胞杂交, 获得杂种细胞传多代仍含有一定量的胰岛素, 用这种方法探索研究胰岛细胞延续传代可能是有效的。胰岛细胞经过两个月冷冻保存, 复苏后仍有部分细胞生长较好。

参 考 文 献

[1] 胡远峰等, 1988, 中华器官移植杂志,

9(3):102。

[2] Mandel TE. 1984, World J. Surg, 8:158.

[3] Burghen G. A. 1989, Diabetes, 38(Suppl. I):129.

[4] Warnock G. L. et al., 1989, Diabetes, 38 (Suppl. I):136.

[5] Takaki R. 1987, Advances in cell culture. 5:1.

[6] Lafferty KJ. 1983, Ann. Rev. Immunol. 1:143.

[7] Shimizu T. et al., 1988, Diabetes. 37: 1524.

人 体 骨 髓 细 胞 长 期 培 养 的 建 立

陈志哲 李觉民 洪华山 卓光生

(福建省血液病研究所)

Z Berneman M. Peetermans

(比利时安特卫普大学血液学中心)

骨髓细胞长期培养(Long-term culture of bone marrow, LTCBM)是指骨髓细胞在体外培养体系中造血活性能维持2—3个月以上。1679年More等报告在人体骨髓细胞培养中, 集落形成细胞的活性可维持一个月^[1], 此后对人体骨髓细胞的长期培养进行了许多深入的研究^[2-4]。国内迄今报告的多为小鼠LTCBM。本文介绍我们建立的人体LTCBM的培养体系及方法, 并就人体LTCBM方法学的有关问题作了探讨。

材 料 与 方 法

一、骨髓细胞的采集与制备

10例骨髓细胞均以髂后上嵴骨髓穿刺吸取。抽取骨髓的10ml针筒含1ml的RPMI-1640和5%小牛血清以及不含防腐剂的肝素166u/ml。

5例正常供者的骨髓在采集后, 加入等量RPMI-1640作1:1稀释, 然后再加入预先37℃温浴的2.25%甲基纤维素。每10ml RPMI稀释的髓液加0.45ml甲基纤维素混和后, 在室温中静置30min。吸取上层髓液以RPMI-1640洗涤两次后加入小牛血清制备骨髓细胞悬液, 计数。

5例新鲜尸体(因颅脑外伤和颅内出血死亡半小时内)的髓液加入等量RPMI-1640作1:1稀释, 在5ml淋巴细胞分离液中(比重1.077)轻轻加入8ml RPMI-1640稀释的髓液, 400g离心30min。采集交界面的单个核细胞层, 以RPMI-1640洗涤三次后, 加入小牛血清配制成骨髓细胞悬液, 计数。

二、培养液

Iscove's modified Dulbecco's medium	80%
小牛血清	10%
马血清	10%
氢化考的松	$5 \times 10^{-7} M$

三、培养方法

5例正常供者的骨髓细胞培养于25cm²T培养瓶中, 将 20×10^6 骨髓有核细胞植入8ml上述培养液, 置于二氧化碳孵箱中, 5%CO₂, 饱和湿度, 33℃恒温。5例新鲜尸体骨髓细胞置于6孔培养板中, 细胞浓度为 $2 \times 10^6/ml$, 每孔植入2ml。

四、培养的维持

培养开始后每周更换培养液。先将培养瓶轻轻摇动, 使非粘壁层的细胞均匀分布, 吸取4ml含有非粘壁细胞的上层培养液, 而后注入4ml新鲜培养液。吸出含有非粘壁细胞的培养液, 作细胞计数并测定CFU-GM。细胞离心涂片可作细胞分类、细胞化学、细胞