

- 382.
- [9] Bole D. G., et al., 1986, *J. Cell Biol.*, 102: 1558.
- [10] Kang P. L., et al., 1990, *Nature*, 348: 137.
- [11] Yalovsky S., et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. USA.*, 89: 5616.
- [12] McMullin T. W. and Hallberg R. L., 1988, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 371.
- [13] Georgopoulou C. and Ang D., 1990, *Semin. cell Biol.*, 1: 19.
- [14] Van Dyk T. K., et al., 1989, *Nature*, 342: 451.
- [15] Martin J., et al., 1991, *Nature*, 352: 36.
- [16] Creighton T. E., 1990, *Biochem. J.*, 270: 1.
- [17] Ellis J., 1990, *Science*, 250: 954.
- [18] Hemmingsen S. M., et al., 1988, *Nature*, 333: 330.
- [19] Cheng M., et al., 1989, *Nature*, 337: 620.
- [20] Yaffe M. B., et al., 1992, *Nature*, 358: 245.
- [21] Lewis V. A., et al., 1992, *Nature*, 358: 249.
- [22] Craig E. A. A., 1988, *Rev. Genet.*, 22: 631.
- [23] Wiech H., et al., 1992, *Nature*, 358: 169.
- [24] Landry S. L., et al., 1992, *Nature*, 355: 455.
- [25] Schein C. H., 1989, *Bio/Technology*, 7: 1141.
- [26] Blum P., et al., 1992, *Bio/Technology*, 10: 301.
- [27] Buchner J., et al., 1992, *Bio/Technology*, 10: 682.

## 胰岛冷冻保存方法研究进展

孙 洵 田志刚

(山东省医学科学院山东肿瘤生物治疗研究中心 济南 250001)

胰岛移植已给众多的胰岛素依赖型糖尿病患者带来了希望。但由于胰岛来源不足,在短期内收集十几个供体为同一个受体移植比较困难,同时存在胰岛移植中的排斥反应问题,从而限制了胰岛移植的推广和应用。自从1976年开始研究用冷冻的方法保存胰岛,试图通过冻存胰岛来满足胰岛移植量的要求,并在移植前进行HLA配型,以降低排斥反应,迄今已有许多学者成功地长期冻存了胰岛和胰腺组织<sup>[1-4]</sup>。我们在前人研究的基础上,成功地分离、纯化、培养人胚胎胰岛<sup>[5]</sup>,并且成功地冻存了人胚胎胰岛,临床实验研究取得明显疗效<sup>[6]</sup>,为大规模进行胰岛移植奠定了基础。本文综述了近年来国内外胰岛冻存方法的研究进展。

### 一、胰岛冻存前的体外培养

在胰岛移植中由于不能在短期内获得足够数量的胚胎胰岛,胰岛的体外培养是重要的。

但是胰岛在冻存前是否需要进行体外培养,特别是对其分泌功能有无影响是应该首先考虑的问题。Warnock等<sup>[7]</sup>进行了这方面的研究。实验结果提示新鲜分离的胰岛、直接冻存胰岛和体外培养48小时后冻存胰岛均在移植后使糖尿病小鼠的各项指标恢复正常。但冷冻保存胰岛移植后各项指标的恢复相应推迟,这可能与胰岛冻存复苏中的可逆性损伤的恢复有关。在冻存前经过培养与直接冻存,其胰岛活性的差别无显著性。

### 二、抗冻剂二甲基亚砜(DMSO)浓度的选择

已有研究表明,抗冻剂DMSO在不适当条件下对细胞具有毒性作用。胰岛在暴露于高浓度的DMSO后,可造成胰岛膜的损伤,使胰岛

本文经崔正言研究员审阅。

素大量释放<sup>[8]</sup>。因此 DMSO 最佳浓度的确定是胰岛冻存成败的关键因素之一。Tze 等<sup>[9]</sup>进行了不同浓度 DMSO 对胰岛活性影响的研究。结果表明, 胰岛内分泌细胞和胰岛瘤细胞均以 10% DMSO 浓度最佳, 成活率可达 80% 以上。张洪德等<sup>[10]</sup>也进行了这方面的研究。Norman 等<sup>[11]</sup>研究了逐步加入 DMSO 对胰岛活性的影响。他首先将培养 24 小时的胰岛悬浮在 0.9 ml 细胞培养液中然后加 1.5 ml 2 mol/L DMSO, 25℃ 放置 5 分钟, 再加 0.5 ml 2 mol/L DMSO, 25℃ 平衡 25 分钟, 再加 2 ml 3 mol/L DMSO, 0℃ 平衡 15 分钟进行梯度降温冻存。复苏后活性测定表明胰岛成活率为冻存前的 94.2±3.5%, 糖刺激试验与未刺激胰岛相比, 在新鲜胰岛胰岛素升高 7.7±1.8 倍, 在冻存胰岛为 6.2±0.8 倍, 总胰岛素分泌为冻存前的 66%。Debra 等<sup>[12]</sup>也采用逐步加 DMSO 的方法冻存小鼠胰腺组织碎片, 复苏后每 mg 胰腺组织胰岛素释放与新鲜胰腺组织没有显著差异。我们使用浓度为 10% DMSO 冻存液冻存人胚胎胰岛, 复苏后胰岛成活率为冻存前的 95% 以上<sup>[6]</sup>。

上述结果提示, 在胰岛冻存中 DMSO 以 10% 浓度 (1.5 mol/L) 效果最佳, 此浓度可以使胰岛少受破坏, 达到有效的保护作用。逐步加 DMSO 可使胰岛成活率稍高于 10% 浓度, 这可能对大的胰岛能更有效地发挥保护作用。

### 三、胰岛冻存降温速度的选择

**1. 加入 DMSO 后平衡温度的选择** Norman 等<sup>[11]</sup>将胰岛加入 DMSO 后, 分别置 0℃ 和 25℃ 平衡 15 分钟后冻存, 结果发现在 0℃ 平衡的胰岛成活率高, 特别是对于大的胰岛的中心区域的保护更为有利。我们曾将分离好的人胚胎胰岛加入细胞冻存液后, 分别置 28℃、4℃ 平衡 30 分钟后冻存, 同时一组置 -30℃ 直接冻存, 复苏后用苔盼蓝染色, 发现在 28℃ 平衡的胰岛几乎全部破碎, 在 4℃ 平衡的胰岛成活率在 85% 以上, -30℃ 组的胰岛成活率在 30%<sup>[6]</sup>。

Kemp 等<sup>[13]</sup>报道了胰岛在 1.5 mol/L DMSO 浓度中室温平衡 60 分钟, 冻存复苏后活性只有 50%。Rajotte 等<sup>[14]</sup>也报道了 DMSO 在 0℃ 时对胰腺组织没有毒性。上述结果均提示低温平衡可显著减低 DMSO 对胰岛细胞的毒性作用。

**2. 快速降温冻存胰岛** Foreman 等<sup>[15]</sup>将小鼠胰岛以 -70℃/分的速率降温, 连续观察冻存前后胰岛素的分泌状况, 结果发现快速冻存胰岛仍然有分泌胰岛素的功能, 但与非冻存胰岛相比分泌能力降低。作者认为使用快速冻存胰岛比缓慢冻存能更有效地使过客淋巴细胞选择性地受到破坏, 从而降低排斥反应。上海张洪德等<sup>[10]</sup>用鼠胰岛作快速降温冻存, 分别置 4℃、-10℃、-30℃ 各 30 分钟后投入液氮, 同时设缓慢降温组作比较, 结果表明缓慢降温组 2 天内胰岛素释放量为 442.5±81.0 μU, 而快速降温组为 145.0±129.3 μU。我们将人胚胎胰岛直接置 -70℃ 3 小时, 然后投入液氮, 复苏后胰岛几乎全部破碎, 提示缓慢降温对保护冻存胰岛的活性较快速降温好。

**3. 慢速降温速率的选择** 慢速降温是胰岛冻存研究中最多种的一种, 其降温速率各不相同, 但基本按 -0.2—-0.5℃/分的缓慢速度<sup>[16-19]</sup>, 目的是最大限度地保护胰岛的活性。Tze 等<sup>[9]</sup>用小鼠内分泌细胞和胰岛瘤细胞悬浮在 10% DMSO 冻存液中, 分别以 -0.3℃/分和 -0.5℃/分速率降到 -70℃, 然后投入液氮, 复苏 1 小时后检测细胞活性。结果表明, 以 -0.3℃/分缓慢降温的细胞成活率优于 -0.5℃/分降温速度, 成活率分别为 70% 和 80% 以上。Flesch 等<sup>[20]</sup>将小鼠胰岛采用三种方法冻存: A. -0.5℃/分降温到 -35℃, 再以 -1℃/分降温到 -100℃, 投入液氮; B. -2℃/分降温到 -35℃, 再以 -6℃/分降温到 -100℃, 投入液氮; C. -0.25℃/分降温到 -40℃, 投入液氮。经 PAP 免疫组化染色和间接免疫荧光试验发现 A 组是最佳冻存程序, 细胞成活率最高, 而且发现 MHC II 类抗原明显降低。Rajotte 等<sup>[18]</sup>和 Norman 等<sup>[11]</sup>是将小鼠和狗的胰岛在逐

步加入抗冻剂 DMSO 后置  $-7.9^{\circ}\text{C}$  的酒精浴中 12 分钟, 然后以  $-0.25^{\circ}\text{C}/\text{分}$  缓慢降温到  $-40^{\circ}\text{C}$ , 投入液氮。结果表明胰岛成活率在 94% 以上, 胰岛素分泌与非冻存胰岛组差异无显著性。Evans 等<sup>[21]</sup>将纯化的狗胰岛以  $-0.25^{\circ}\text{C}/\text{分}$  降温到  $-40^{\circ}\text{C}$ , 投入液氮, 复苏后移植给胰腺切除的狗, 同时设移植新鲜胰岛作为对照, 结果均表现出满意的疗效。在移植后 3 个月, 冻存组和对照组血糖浓度分别为  $89 \pm 3$  和  $92 \pm 3$ , 均在正常范围内, 说明冻存胰岛仍保持着良好的活性。我们将人胚胎胰岛在  $4^{\circ}\text{C}$  平衡 30 分钟后, 以  $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$  降温到  $-30^{\circ}\text{C}$ , 再以  $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$  降温到  $-70^{\circ}\text{C}$ , 在距液氮面 10 cm 处停留 30 分钟后投入液氮。复苏后的胰岛成活率达 85% 以上, 移植给 8 例糖尿病病人后, 有效率为 88%, 具有与新鲜胰岛完全相似的临床效果<sup>[6]</sup>。上述结果提示, 在胰岛冻存过程中以缓慢降温 ( $-0.25^{\circ}\text{C}/\text{分}$ — $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ) 到  $-70^{\circ}\text{C}$  再投入液氮, 可以减少冻存过程中对胰岛的损伤。

#### 四、冻存胰岛的复苏

复苏方法对保持胰岛的成活性和功能至为重要。Norman 等<sup>[11]</sup>在冻存胰岛复苏时,  $37^{\circ}\text{C}$  水浴迅速解冻, 升温速率为  $200^{\circ}\text{C}/\text{分}$ , 然后在  $4^{\circ}\text{C}$  400 X g 离心 2 分钟后将胰岛重悬在 2.5 ml 含有  $0.7\text{mol/L}$  蔗糖的培养液中, 置  $4^{\circ}\text{C}$  30 分钟后在  $25^{\circ}\text{C}$  逐步加入 2.5 ml、2.5 ml、5.0 ml 和 10 ml 培养液, 每次平衡 5 分钟。用这种方法复苏的胰岛成活率在 95% 以上。Debra<sup>[12]</sup>将冻存的胰腺组织碎片复苏时采用与 Norman 基本相同的方法, 将迅速解冻的胰腺组织碎片悬浮在 1.0 ml 含  $0.75\text{mol/L}$  蔗糖培养液中, 冰浴 30 分钟后, 在室温下逐步倍比稀释加培养液。Rajotte 等<sup>[3]</sup>也证明用完全平衡的复苏方法逐步透析出 DMSO, 是使胰岛成活率高的最优方法。我们将冻存的人胚胎胰岛置  $38^{\circ}\text{C}$  水浴迅速解冻后, 在冰浴中以倍比稀释方式逐步加入含  $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$  的 Hanks 液, 每次加入液体后平衡

5 分钟, 以 1000 rpm 15 分钟离心后, 将细胞再以同样的倍比稀释方式加入 Hanks 液, 最后将细胞用 Hanks 液洗涤 2 次后种入培养瓶。切片结果表明胰岛及细胞结构完整, 电镜检查可见明显的分泌颗粒。而且胰岛素分泌、糖刺激实验以及胰岛素抽提与冻存前比较均无显著差异<sup>[6]</sup>。目前国内外研究均趋向快速复温, 升温速率在  $200^{\circ}\text{C}/\text{分}$ , 以倍比稀释的方式在冰浴逐步加入 Hanks 液/培养液, 这样有利于透出大胰岛中心区域的 DMSO, 从而最低限度地减少 DMSO 对胰岛的毒性作用。

#### 摘 要

本文就目前国内外所研究的胰岛及胰腺组织碎片冷冻保存方法进行了总结, 认为胰岛冻存前可进行 24 小时培养或不培养; 抗冻剂 DMSO 浓度以 10% ( $1.5\text{mol/L}$ ) 为佳;  $4^{\circ}\text{C}$  或  $0^{\circ}\text{C}$  平衡 30 分钟; 缓慢降温至  $-70^{\circ}\text{C}$ , 投入液氮; 快速复温 ( $200^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ) 后冰浴中倍比稀释透出 DMSO 为较理想的冻存和复苏模式。该模式可以最小限度地降低胰岛的损伤, 提高胰岛存活率及保持较高的胰岛素分泌功能。

#### 参 考 文 献

- [1] Rajotte, R. V. et al., 1981, *Cryobiology*, 18: 357.
- [2] Rajotte, R. V. et al., 1984, *World J. Surg.*, 8: 179.
- [3] Rajotte, R. V. et al., 1983, *Cryobiology*, 20: 269.
- [4] Payne, W. D. et al., 1983, *Cryobiology*, 20: 226.
- [5] 孙 洵等, 1992, 中国科协首届青年学术年会论文集(医科分册), 228-232. 中国科学技术出版社.
- [6] 崔正言等, 1993, 中华器官移植杂志, 待发表.
- [7] Warnock, G. L. et al., 1989, *Cryobiology*, 26: 103.
- [8] McKay, D. B. et al., 1983, *Cryobiology*, 20: 41.
- [9] Tze, W. J. et al., 1990, *Metabolism*, 39: 719.

- [10] 张洪德等, 1991, 中华器官移植杂志, 12: 72.
- [11] Norman, M. et al., 1989, *Diabetes*, 38: 386.
- [12] Deber, A. et al., 1989, *Diabetes*, 38: 448.
- [13] Kemp, J. A. et al., 1981, *Transplantation*, 32: 10.
- [14] Rajotte, R. V. et al., 1981, *Cryobiology*, 18: 17.
- [15] Foreman, J. et al., 1989, *Diabetes Res.*, 11: 149.
- [16] Shiogama, T. et al., 1987, *Transplantation*, 44: 602.
- [17] Rajotte, R. V. et al., 1990, *Horm Metab Res Suppl.*, 25: 72.
- [18] Ishiara, K. et al., 1989, *Diabetes Res Clin Pract.*, 6: 243.
- [19] Yaylor, M. J. et al., 1987, *Diabetes*, 36: 59.
- [20] Flesch, B. K. et al., 1991, *Horm Metab Res.*, 23: 1.
- [21] Evans, M. G. et al., 1990, *Transplantation*, 50: 202.

## 哺乳动物早期胚胎发育调控过渡研究的进展

李逸平 左嘉客

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

哺乳动物的发育进程与其他脊椎动物一样, 早在卵子发生期间, 即在卵母细胞生长和成熟过程中已经开始准备并积累一套为胚胎发育所需的母型 RNA 和蛋白质。胚胎发生则是随着受精作用而开始的, 由精子进一步激发卵子发生期间早已启动的发育程序。早期胚胎的发育是受贮存在卵母细胞内 mRNA 和蛋白质的调控, 简称母型调控(maternal regulation)。随着胚胎发育的继续推进, 它就必须依赖于胚胎自身的合子型基因组的调控, 简称合子型调控(zygotic regulation)。

由母型调控向合子型调控的转变, 常简称

调控过渡。各种哺乳动物早期胚胎进行这种过渡所处的发育时期不尽相同。在过渡阶段, 细胞水平上和分子水平上都发生着一系列深刻的变化。如果不能顺利实现这种过渡, 则出现发育阻滞。哺乳类早期胚胎发育阻滞的时间往往与发育调控过渡的时间相关联<sup>[1,2]</sup>。

本文将从细胞和分子水平的角度, 就哺乳类早期胚胎发育调控由母型向合子型过渡的特征及机制的研究现状作一概述。

### 一、核纤层 nuclear lamina 的变化

在哺乳动物发育过程中, 核纤层蛋白的表

表 1 胚胎不同发育时期核纤层中核纤层蛋白出现、消失和复现的情况

核纤层蛋白 胚胎发育期	动物种	小鼠	猪	牛
卵母细胞到 2 细胞期		A、B、C	A、B、C	A、B、C
4 细胞期		B	A、B、C	A、B、C
8 细胞期		B	B	A、B、C
16 细胞期		B	B	B
桑椹胚		B	B	B
囊胚		B	B	B
组织分化		A、B、C	A、B、C	A、B、C