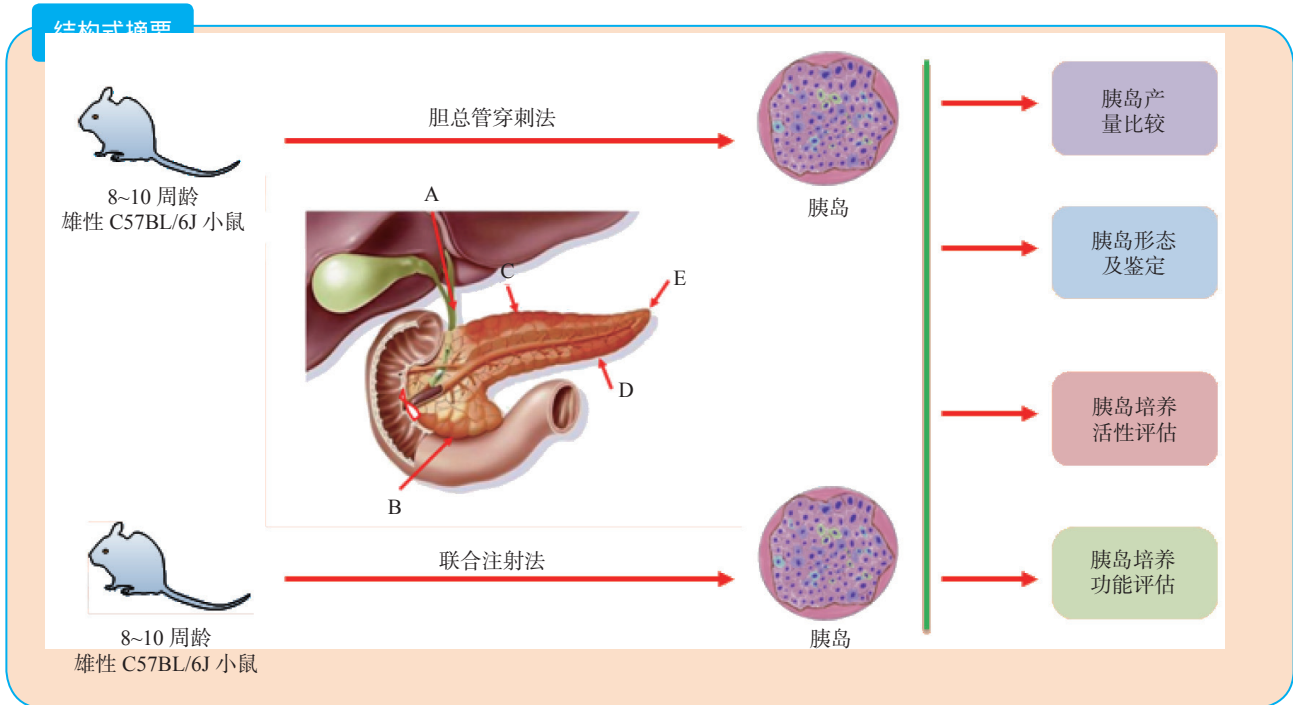


## 小鼠胰岛提取方法改良的实验研究

曾文 刘坤莹 林楚文 林硕 彭航娅 李海成 曾龙驿



**【摘要】** 目的 探讨小鼠胰岛提取方法的改良及效果。方法 根据胰岛提取方法不同，将小鼠随机分为胆总管穿刺组和胆总管穿刺联合胰腺原位注射组（联合注射组），每组各 100 只。胰岛提取的改良方法采用胆总管穿刺联合胰腺原位注射法灌注胰腺，体视显微镜下挑选并纯化胰岛。鉴定胰岛的形态和纯化情况，统计两组的胰岛产量及胰岛提取成功率。分析胰岛在体外培养 1 周内的存活情况，并评估体外培养 24 h 和 4 d 后胰岛的胰岛素分泌功能。**结果** 与胆总管穿刺组比较，联合注射组提取胰岛的产量显著增高（ $P < 0.001$ ）。两组胰岛提取成功率均为 83%，差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。胆总管穿刺联合胰腺原位注射法所提取的胰岛形态完好、纯度高、活性好。新鲜分离的胰岛体外培养 24 h 后胰岛存活率接近 100%；体外培养 1~5 d，胰岛细胞存活情况良好；体外培养 6 d 开始，胰岛出现中心性死亡。体外培养 24 h 和 4 d 后，给予高葡萄糖刺激胰岛后，小鼠胰岛功能均正常。**结论** 胆总管穿刺联合胰腺原位注射法可以提高胰岛的产量，且获取的胰岛细胞活性和功能良好。

**【关键词】** 胰岛；胰岛移植；胆总管穿刺；原位注射；胰岛素；胰高血糖素；胶原酶 P；双硫脲

**【中图分类号】** R617, R587.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2020) 05-0007-06

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2020.05.007

基金项目：国家自然科学基金面上项目（51873071）；广东省自然科学基金重点项目（2018B030311012）

作者单位：510630 广州，中山大学附属第三医院内分泌与代谢病科（曾文、刘坤莹、林楚文、林硕、彭航娅、李海成、曾龙驿）；广东省糖尿病防治重点实验室（曾文、刘坤莹、林楚文、彭航娅、李海成、曾龙驿）

作者简介：曾文，女，1988 年生，博士，住院医师，研究方向为糖尿病，Email: 543149311@qq.com

通信作者：曾龙驿，男，1964 年生，博士，教授，研究方向为糖尿病，Email: zengly@mail.sysu.edu.cn

**Experimental study of a modified extraction method of mouse islets** Zeng Wen\*, Liu Kunying, Lin Chuwen, Lin Shuo, Peng Hangya, Li Haicheng, Zeng Longyi. \*Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author: Zeng Longyi, Email: zengly@mail.sysu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the improvement and effect of the method of islet extraction in mice. **Methods** According to different islet extraction methods, all mice were randomly divided into the common bile duct puncture group ( $n=100$ ) and common bile duct puncture combined with *in situ* pancreatic injection group (combined injection group,  $n=100$ ). Common bile duct puncture combined with *in situ* pancreatic injection was utilized as the modified method. The islets were selected and purified under stereomicroscope. The morphology and purification of islets were identified. The islet yield and success rate of islet extraction were statistically compared between two groups. The survival of islets after 1 week culture *in vitro* was analyzed, and the insulin secretion function of islets after 24 h and 4 d culture *in vitro* was evaluated. **Results** Compared with the common bile duct puncture group, the islet yield in the combined injection group was significantly increased ( $P<0.001$ ). The success rate of islet extraction in both groups was 83% with no statistical significance ( $P>0.05$ ). The islets extracted by common bile duct puncture combined with *in situ* pancreatic injection had intact morphology, high purity and high activity. The survival rate of newly isolated islets was nearly 100% after 24 h culture *in vitro*. After 1~5 d culture *in vitro*, the islet cells survived well. After 6 d culture *in vitro*, the islets showed central death. After culture *in vitro* for 24 h and 4 d, the islet function of the mice was normal after high glucose stimulation. **Conclusions** Common bile duct puncture combined with *in situ* pancreatic injection can increase the islet yield, and the obtained islet cells have high activity and proper function.

**【Key words】** Islet; Islet transplantation; Common bile duct puncture; *In situ* injection; Insulin; Glucagon; Collagenase P; Dithizone

胰岛 $\beta$ 细胞数目减少及功能衰竭是影响糖尿病发病的主要因素<sup>[1-2]</sup>。目前,针对糖尿病的病因治疗仍在探索阶段。因此,成功提取高活性、高纯度的胰岛是胰岛移植治疗糖尿病研究领域的关键技术<sup>[3]</sup>。目前,已有多种实验方法提取啮齿类动物和人类胰岛<sup>[4-7]</sup>。1985年Gotoh等<sup>[8]</sup>建立了经胆总管注射胶原酶、消化胰腺、Ficoll密度梯度离心分离胰岛的方法。但是,正确的胆总管穿刺是能否成功提取胰岛的决定性因素,对操作者技术要求极高,存在一定的失败率,且胰岛产量仍有待提高。本研究对胰岛提取的方法进行改良,采用胆总管穿刺联合胰腺原位注射法以期提高胰岛的提取成功率和产量,旨在为糖尿病的基础研究和胰岛移植的临床应用提供更好的技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与主要试剂

雄性C57BL/6J小鼠200只,8~10周龄,体重(25±5)g,均为无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级,购自中国广东省实验动物中心,饲养于中山大学北校区动物实验中心。饲养环境舒适,

饲养温度为22~26℃,湿度为60%~70%。根据胰岛提取方法不同,将小鼠随机分为胆总管穿刺组和胆总管穿刺联合胰腺原位注射组(联合注射组),每组各100只。本实验已通过中山大学附属第三医院实验动物伦理委员会伦理审查。

主要试剂:胶原酶P购自瑞士Roche公司,双硫腙(dithizone, DTZ)购自美国Sigma-Aldrich公司, Hank's平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS溶液)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid, HEPEs)(1 mol/L)、胎牛血清、低糖改良Eagle培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)购自美国Hyclone公司,其它常规试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 试剂配制

1 L HBSS溶液中加入1 mol/L的HEPEs 10 mL(需0.22  $\mu$ m孔径滤器过滤除菌),得到含10 mmol/L HEPEs的HBSS洗涤液。用洗涤液溶解胶原酶P并配制为0.5 g/L的胶原酶P消化液。在洗涤液中加入10%的胎牛血清配制为消化终止液。

称取 50 mg DTZ 溶于 5 mL 二甲基亚砷配制为 10 mg/mL 的 DTZ 储存液。取 10  $\mu$ L DTZ 储存液加入 1 mL 的培养基中, 配制为 0.1 mg/mL 的 DTZ 工作液。

### 1.3 原代胰岛提取方法及改良

麻醉后脱颈处死小鼠, 打开腹腔, 暴露手术野。充分暴露胆总管与十二指肠, 在胆总管进入 Oddi 括约肌处, 紧贴十二指肠壁分离胆总管后, 用 1 号手术缝线紧贴十二指肠壁结扎胆总管。在胆总管的起始处以 30 G 针头插入, 缓慢灌注胶原酶 P (0.5 mg/mL) 约 3 mL, 见胰尾充盈, 阻力明显增加时停止注射 (图 1A)。随后, 联合胰腺原位注射, 在胰腺多个部位, 包括胰头附着于胃部 (图 1B)、十二指肠部 (图 1C)、胰体部 (图 1D) 及胰尾部 (图 1E) 4 处注射胶原酶 P 至充分膨胀, 尤其是胰尾部, 以达到胰腺充分膨胀的效果 (图 1F)。

### 1.4 检测指标及方法

1.4.1 胰岛提取成功率及产量 统计两组的胰岛产量及胰岛提取的成功率。

1.4.2 胰岛形态的鉴定 在分离胰腺、体视显微镜下提取和纯化胰岛后, 对联合注射组的胰岛进行 DTZ 染色。DTZ 工作液经 0.22  $\mu$ m 的滤器过滤后, 与分离纯化的胰岛及培养液以 1:1 混合。置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱孵育 10 min 后, 显微镜下观察鉴定胰岛形态和纯化情况。体外培养 4 d 后, 对胰岛进行包埋, 并做冰冻切片, 采用胰岛素及胰高血糖素双荧光染色法鉴定分离纯化的胰岛。

1.4.3 胰岛体外培养存活情况及胰岛素分泌功能评估 采用 Hoechst 33342-碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色检测联合注射组胰岛在体外培养 1 周内的存活情况; 采用葡萄糖刺激胰岛素分泌 (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS) 实验评估体外培养 24 h 和 4 d 后联合注射组胰岛的胰岛素分泌功能: 将胰岛放入平衡溶液中适应性培养 2 h 后, 弃上清, 加

入低糖 (2.8 mmol/L) 培养 1 h, 离心后取上清, 再用高糖 (16.7 mmol/L) 中培养 30、60、120 min, 在每个时间点分别离心取上清。上清胰岛素水平测定按照小鼠胰岛素酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immune absorbent assay, ELISA) 检测试剂盒步骤操作进行检测。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 对于符合正态分布的计量资料以均数  $\pm$  标准差表示, 组间比较采用独立样本  $t$  检验。采用 logistic 回归分析法进行单因素分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 两组胰岛提取成功率和产量的比较

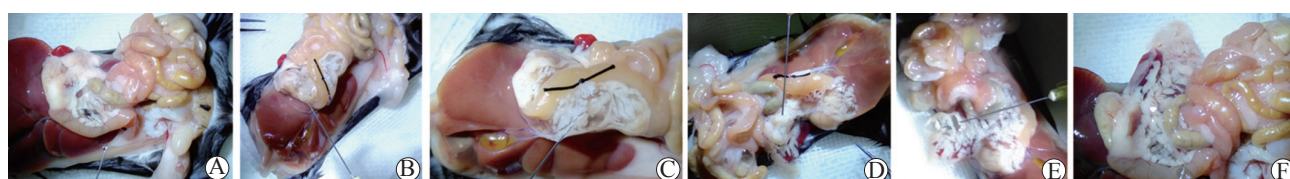
胰岛提取实验结果显示, 与胆总管穿刺组比较, 联合注射组提取胰岛的产量显著增高 [(189  $\pm$  6) 个比 (233  $\pm$  6) 个], 差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。两组胰岛提取成功率均为 83%, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 联合注射组胰岛的形态鉴定

DTZ 染色结果表明, 胆总管穿刺联合胰腺原位注射法所提取的胰岛形态完好, 纯度高 (图 2A、B)。荧光显微镜下, 提取的胰岛表达大量胰岛素, 活性良好 (图 2C~E)。胰岛素和胰高血糖素双荧光染色结果显示, 纯化所得胰岛外周主要为  $\alpha$  细胞, 而中心主要为  $\beta$  细胞, 符合正常小鼠胰岛细胞的分布 (图 3)。

### 2.3 联合注射组胰岛体外培养存活情况及胰岛素分泌功能评估

Hoechst 33342-PI 染色结果表明, 新鲜分离的胰岛, 外周黏附有死亡细胞 (PI 染色红色, 图 4A), 并可随换液被清除, 24 h 后胰岛存活率接近 100% (图 4B)。体外培养 1~5 d, 胰岛细胞存活良好 (图 4A~F)。体外培养 6 d 开始, 胰岛出现中心性死亡,



注: A 图为胆总管穿刺成功后, 胰腺充盈; B 图为联合胰腺原位注射胰头; C、D 图为联合胰腺原位注射胰体; E 图为联合胰腺原位注射胰尾; F 图为联合胰腺原位注射后胰腺充分膨胀。

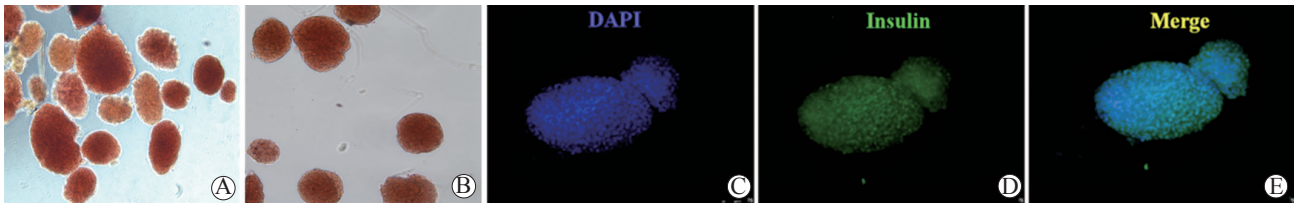
图 1 胆总管穿刺联合胰腺原位注射法的操作过程

Figure 1 Operation procedure of common bile duct puncture combined with *in situ* injection of pancreas

较大的胰岛更为显著 (图 4G、H)。

GSIS 实验结果显示, 体外培养 24 h 和 4 d 后, 相对于给予 2.8 mmol/L 葡萄糖, 给予 16.7 mmol/L 葡萄糖刺激胰岛, 均可引起 2 倍以上的胰岛素释放增加,

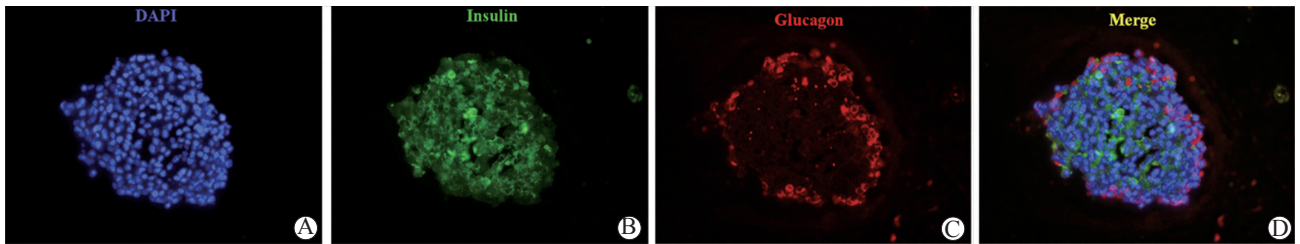
胰岛素的分泌规律也提示小鼠胰岛功能正常, 且可维持至体外培养 4 d (图 5)。与体外培养 24 h 的胰岛比较, 体外培养 4 d 后的胰岛的胰岛素分泌水平稍有下降。



注: A 图为 DTZ 染色提取的小鼠原代胰岛 (DTZ, ×100); B 图为 DTZ 染色纯化后的小鼠原代胰岛 (DTZ, ×100); C~E 图为纯化后的小鼠胰岛的胰岛素免疫荧光染色图 (免疫荧光, ×200)。

图 2 分离纯化后的小鼠胰岛形态

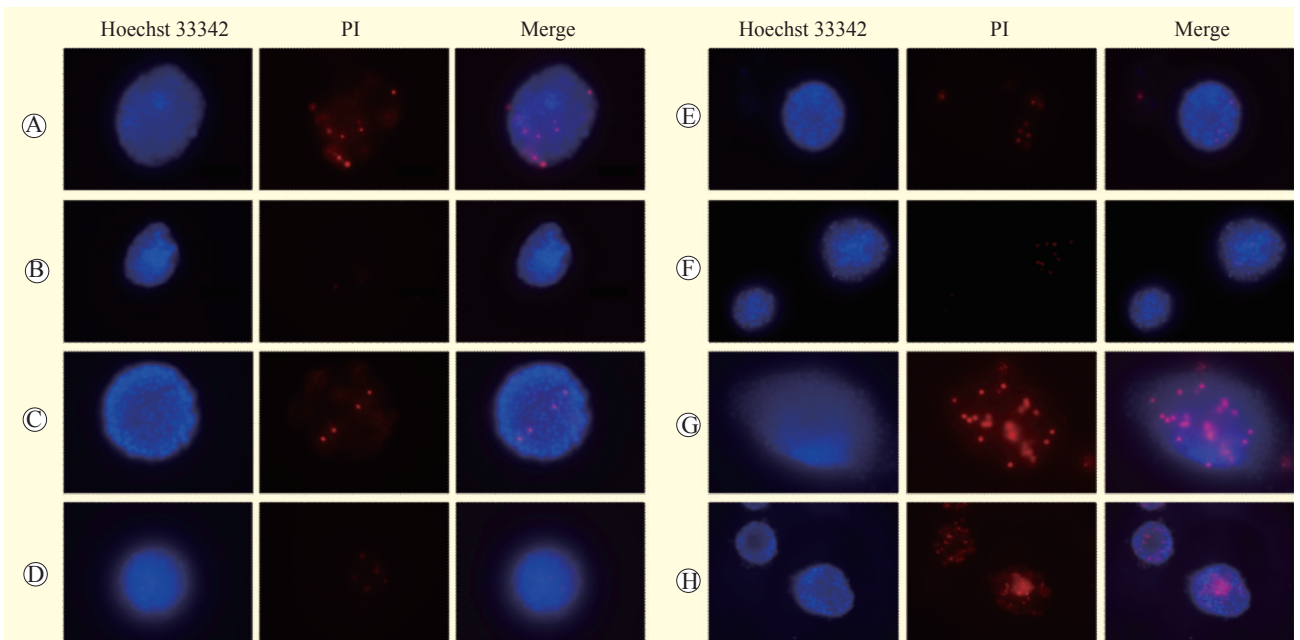
Figure 2 Morphology of mouse islets after separation and purification



注: 绿色为胰岛素, 红色为胰高血糖素。

图 3 小鼠胰岛体外培养后的胰岛素和胰高血糖素双免疫荧光染色图 (免疫荧光, ×400)

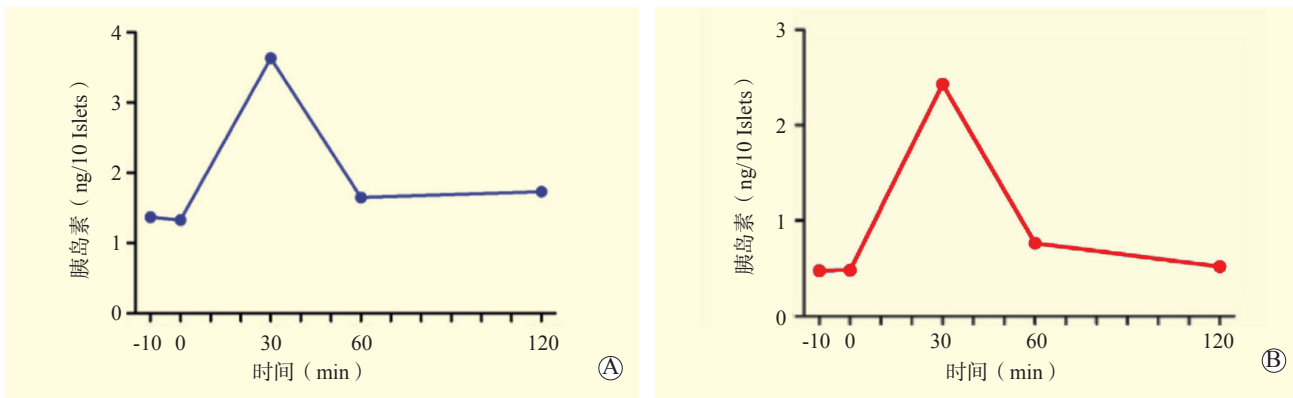
Figure 3 Double immunofluorescence staining images of insulin and glucagon of mouse islet after *in vitro* culture



注: A、B、C、D、E、F、G、H 图分别为体外培养 0 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d 后, 通过 Hoechst 33342-PI 荧光染色的原代胰岛细胞。

图 4 小鼠胰岛体外培养后的活性评估 (免疫荧光, ×400)

Figure 4 Activity evaluation of mouse islets after *in vitro* culture



注: A 图为小鼠胰岛体外培养 24 h 后葡萄糖刺激下的胰岛素分泌曲线; B 图为小鼠胰岛体外培养 4 d 后葡萄糖刺激下的胰岛素分泌曲线。

图 5 小鼠胰岛体外培养后的胰岛素功能评估

Figure 5 Insulin functional evaluation of mouse islets after *in vitro* culture

### 3 讨论

胰岛的大批量提取、分离纯化是糖尿病学及胰岛移植基础研究实验中的重要技术。原代胰岛的提取方法主要包括胰腺切碎消化法<sup>[9-11]</sup>、胆囊注射法<sup>[12-13]</sup>、脾静脉注射法<sup>[14]</sup>、肝管胆总管交叉点穿刺法等<sup>[15-17]</sup>，但这些方法均有其局限性。胰腺切碎消化法较胆囊灌注法的胰岛获得率低，且容易损伤胰岛的结构和功能<sup>[18-19]</sup>。普遍使用的胆总管穿刺注射对手术操作要求极高，有一定的失败率，且在胰岛提取成功与否中起决定性作用，对后续研究的进行影响极大<sup>[20-21]</sup>。目前，为稳定获得研究所需胰岛，提高成功率及获取率，研究者在不断改进胰岛提取的方法<sup>[22-25]</sup>。

本研究使用胆总管穿刺联合胰腺原位注射法，可以使胰腺充分膨胀。与目前的胆总管穿刺法比较，可以使胰腺消化更充分，获得更高的胰岛产量。另外，该法弥补了胆总管穿刺失败导致的实验胰岛缺失问题，补救性进行单纯的胰腺原位注射仍可获得一定量的胰岛，保证了后续研究的进行。而且，通过 DTZ 染色和免疫荧光染色，可以观察到本方法提取的胰岛纯度较高，活性好，培养 4 d 后的 GSIS 实验也说明提取的胰岛细胞功能良好。但是，本研究也存在一定的局限性，虽然可以解决胆总管穿刺失败无法获取胰岛的问题，但获取率仍偏低。而且，手工纯化胰岛耗时长，工作量大。另外，长期的体外培养，胰岛中心性死亡的问题仍有待解决。

综上所述，胆总管穿刺联合胰腺原位注射法可以弥补穿刺失败导致的胰岛缺失，增加了胰岛的产量，且获取的胰岛细胞活性和功能良好，适用于糖尿病及

胰岛移植相关实验研究。

#### 参考文献：

- [1] WESTERMARK P, ANDERSSON A, WESTERMARK GT. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus[J]. *Physiol Rev*, 2011,91(3):795-826. DOI:10.1152/physrev.00042.2009.
- [2] HU F, QIU X, BU S. Pancreatic islet dysfunction in type 2 diabetes mellitus[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2018:1-7. DOI:10.1080/13813455.2018.1510967.
- [3] OTHONOS N, CHOUDHARY P. Who should be considered for islet transplantation alone? [J]. *Curr Diab Rep*, 2017,17(4):23. DOI:10.1007/s11892-017-0847-6.
- [4] QI M, VALIENTE L, MCFADDEN B, et al. The choice of enzyme for human pancreas digestion is a critical factor for increasing the success of islet isolation[J]. *Transplant Direct*, 2015,1(4):e14. DOI:10.1097/TXD.0000000000000522.
- [5] JIN SM, LEE HS, OH SH, et al. Adult porcine islet isolation using a ductal preservation method and purification with a density gradient composed of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and iodixanol[J]. *Transplant Proc*, 2014,46(5):1628-1632. DOI:10.1016/j.transproceed.2014.03.004.
- [6] HARA Y, TANIGUCHI H, YAMASHIRO Y, et al. An improved method for the isolation of islets from the rat pancreas[J]. *Exp Clin Endocrinol*, 1988,91(2):171-175. DOI:10.1055/s-0029-1210740.
- [7] SALIBA Y, BAKHOS JJ, ITANI T, et al. An optimized protocol for purification of functional islets of Langerhans[J]. *Lab Invest*, 2017,97(1):70-83. DOI:10.1038/labinvest.2016.123.
- [8] GOTOH M, MAKI T, KIYOIZUMI T, et al. An improved method for isolation of mouse pancreatic

- islets[J]. *Transplantation*, 1985,40(4):437-438. DOI:10.1097/00007890-198510000-00018.
- [9] YANG J, LOU S, KONG D, et al. Surface engineering of pancreatic islets with a heparinized starPEG nanocoating[J]. *J Vis Exp*, 2018(136):56879. DOI:10.3791/56879.
- [10] BÖTTICHER G, STURM D, EHEHALT F, et al. Isolation of human islets from partially pancreatectomized patients[J]. *J Vis Exp*, 2011(53):2962. DOI:10.3791/2962.
- [11] HUANG C, GU G. Effective isolation of functional islets from neonatal mouse pancreas[J]. *J Vis Exp*, 2017(119):55160. DOI:10.3791/55160.
- [12] SZOT GL, KOUDRIA P, BLUESTONE JA. Murine pancreatic islet isolation[J]. *J Vis Exp*, 2007(7):255. DOI:10.3791/255.
- [13] 祁小平, 马宝骊. 小鼠胰岛的分离及胰岛移植[J]. *中华器官移植杂志*, 2001,22(3):176-178. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2001.03.018.  
QI XP, MA BL. An improved method for isolation of mouse islets and islet transplantation[J]. *Chin J Organ Transplant*, 2001,22(3):176-178. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2001.03.018.
- [14] BRANDÃO IR, ZINI E, REUSCH CE, et al. Establishment of a protocol for the isolation of feline pancreatic islets[J]. *Physiol Behav*, 2018,186:79-81. DOI:10.1016/j.physbeh.2018.01.012.
- [15] LI F, JIANG X, LI Y, et al. Isolation of mouse islet by collagenase perfusion through the splenic vein[J]. *Transplantation*, 2013,96(12):e88-e89. DOI:10.1097/01.TP.0000437180.95701.7b.
- [16] RAMÍREZ-DOMÍNGUEZ M. Isolation of mouse pancreatic islets of Langerhans[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016,938:25-34. DOI:10.1007/978-3-319-39824-2\_3.
- [17] LI DS, YUAN YH, TU HJ, et al. A protocol for islet isolation from mouse pancreas[J]. *Nat Protoc*, 2009,4(11):1649-1652. DOI:10.1038/nprot.2009.150.
- [18] VILLARREAL D, PRADHAN G, WU CS, et al. A simple high efficiency protocol for pancreatic islet isolation from mice[J]. *J Vis Exp*, 2019(150). DOI:10.3791/57048.
- [19] 高戈, 冯喆. 小鼠胰岛分离与纯化的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2014,31(3):553-555. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2014.03.036.
- GAO G, FENG Z. The experiment study of islet isolation and purification from mice pancreas[J]. *Chin J Exp Surg*, 2014,31(3):553-555. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2014.03.036.
- [20] MOHAMMADI AYENEHDEH J, NIKNAM B, HASHEMI SM, et al. Introducing a new experimental islet transplantation model using biomimetic hydrogel and a simple high yield islet isolation technique[J]. *Iran Biomed J*, 2017,21(4):218-227. DOI:10.18869/acadpub.ijb.21.4.218.
- [21] ANDRADES P, ASIEDU C, RAY P, et al. Islet yield after different methods of pancreatic liberase delivery[J]. *Transplant Proc*, 2007,39(1):183-184. DOI:10.1016/j.transproceed.2006.10.016.
- [22] 李睿, 董红丽, 刘宝林. 新型胰岛分离液对小鼠胰岛分离效果的研究[J]. *器官移植*, 2018,9(3):188-193. DOI:10.3969/j.issn.1674-7445.2018.03.004.  
LI R, DONG HL, LIU BL. Study of isolation efficiency of new islet isolation solution for mouse islets[J]. *Organ Transplant*, 2018,9(3):188-193. DOI:10.3969/j.issn.1674-7445.2018.03.004.
- [23] SHIMA H, INAGAKI A, IMURA T, et al. Collagen V is a potential substrate for clostridial collagenase G in pancreatic islet isolation[J]. *J Diabetes Res*, 2016:4396756. DOI:10.1155/2016/4396756.
- [24] YEH CC, WANG LJ, MCGARRIGLE JJ, et al. Effect of manufacturing procedures on human islet isolation from donor pancreata standardized by the north American islet donor score[J]. *Cell Transplant*, 2017,26(1):33-44. DOI:10.3727/096368916X692834.
- [25] THOMPSON EM, SOLLINGER JL, OPARA EC, et al. Selective osmotic shock for islet isolation in the cadaveric canine pancreas[J]. *Cell Transplant*, 2018,27(3):542-550. DOI:10.1177/0963689717752947.

(收稿日期: 2020-05-17)

(本文编辑: 王维莘 吴秋玲)