促胰素对大鼠胰岛细胞增殖及功能的影响*

徐艳花[1]，王洪敏[2]，张 振[1]，蔡德鸿[1]，于静雯[1]，吴礼凤[1]，陈道明[2]，陈 宏[1]

Effect of pancreatotrophin on the proliferation and function of islet cells in rats

Xu Yan-hua[1], Wang Hong-min[2], Zhang Zhen[1], Cai De-hong[1], Yu Jing-wen[1], Wu Li-feng[1], Chen Dao-ming[1], Chen Hong[1]

Abstract

BACKGROUND: Studies have reported to promote proliferation, differentiation and regeneration of β-cells is a potential treatment for patients with type 2 diabetes.

OBJECTIVE: To investigate the effects of pancreatotrophin on the proliferation and function of rat islet cells *in vitro*.

METHODS: The rat islet cells were isolated and purified by collagenase digestion and tissue-culture, followed with the detection of purity and activity. The islet cells were divided into blank control group and experimental group. Normal culture medium was added in the blank control group, pacreatotrophin in different concentrations were put in the experimental groups (100, 200, 300, 400 mg/L respectively). CCK-8 detection was performed to test the proliferous activity after 1, 3 and 5 days. After 5 days of culture, insulin release test was carried out in the condition of low-glucose and high-glucose.

RESULTS AND CONCLUSION: Along with the increase of the pancreatotrophin concentration, the proliferate activity of islet cells was in a dose-dependent manner ($P < 0.05$), but it demonstrated that there was no obvious time-dependent; In addition to 100 mg/L group and 200 mg/L group, the volume of insulin secretion in 300 mg/L group and 400 mg/L group were significantly higher than that in the blank control group ($P < 0.05$). It demonstrates that the concentrations of pancreatotrophin in 300 mg/L and 400 mg/L can not only promote cell proliferation, but also can significantly enhance the function of islet cells to secrete insulin.

Xu YH, Wang HM, Zhang Z, Cai DH, Yu JW, Wu LF, Chen DM, Chen H. Effect of pancreatotrophin on the proliferation and function of islet cells in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(5): 871-874.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

[1]Department of Endocrinology, Affiliated Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China;
[2]Center of Liver Disease, the 458 Hospital of Chinese PLA, Guangzhou 510600, Guangdong Province, China

Xu Yan-hua★, Studying for master's degree, Department of Endocrinology, Affiliated Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
xyylvls@163.com

Correspondence to: Chen Hong, Chief physician, Department of Endocrinology, Affiliated Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
rubychq@163.com

Received: 2011-10-28
Accepted: 2011-12-16

摘要

背景：有研究报道，促进胰岛β细胞增殖分化和再生是2型糖尿病患者一种潜在的治疗方案。

目的：观察促胰素对体外培养大鼠胰岛细胞增殖及功能的影响。

方法：采用胶原酶消化和组织培养法分离纯化大鼠胰岛细胞，检测其纯度和活性，将胰岛细胞分为空白对照组和实验组，空白对照组加入普通培养基，实验组培养基中加入不同质量浓度(100，200，300，400 mg/L)促胰素，培养1，3，5 d后CCK-8法检测细胞增殖活性；培养5 d后行低糖和高糖刺激胰岛素释放实验。

结果与结论：随着促胰素质量浓度的增高，胰岛细胞增殖活性呈剂量依赖性增加($P < 0.05$)，但无明显时间依赖性。除100，200 mg/L组外，300，400 mg/L两组胰岛素分泌量均显著高于空白对照组($P < 0.05$)。表明300，400 mg/L促胰素不仅可促进胰岛细胞增殖，而且可显著增强胰岛细胞分泌胰岛素的功能。

关键词：促胰素；胰岛细胞；增殖；胰岛功能；胰岛分离；纯化
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.05.027

徐艳花，王洪敏，张振，蔡德鸿，于静雯，吴礼凤，陈道明，陈宏. 促胰素对大鼠胰岛细胞增殖及功能的影响[J].中国组织工程研究，2012，16(5): 871-874. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

糖尿病是由多种原因引起的胰岛β细胞功能减退或衰竭，导致胰岛素绝对或相对不足，机体出现糖代谢紊乱，进而造成全身多器官损害的一种内分泌代谢性疾病。近年来，在世界范围内糖尿病的发病率均有着明显的增加，在第20届世界糖尿病大会上，研究者指出，到2025年，全世界的糖尿病患者将达到3.8亿，在中国，根据杨文英[1]教授在新英格兰杂志上发表的研究数据，20岁以上成年人的糖尿病发病率已经达到了9.7%。糖尿病俨然已成为严重威胁人类健康的疾病之一。那么在糖尿病的治疗措施中，人们一方面不断开发新药，希望通过药物治疗能控制血糖、延缓糖尿病进展，而另一方面，对于1型和部分2型糖尿病患者，进行胰岛细胞移植，以获取正常的胰岛，替代已失去功能的细胞。但胰岛细胞来源匮乏和移植后免疫排斥反应一直限制着胰岛细胞移植的开展。因此探讨胰岛β细胞体内外扩增的条件以期通过增殖来获得足量功能的胰岛细胞和降低其免疫原性，使临床胰岛移植将可能达到理想的效果具有重大的现实意义[2-3]。此外，有研究报道，促进胰岛β细胞增殖分化和再生亦是2型糖尿病患者一种潜在的治疗方案[4-6]。本实验所用的促胰素是从幼龄小猪新鲜胰脏中提取的小分子活性物质溶液，提取液为澄清液体，pH值为6.0~7.0，每1 mL提取液中含多肽不少于15 mg，且不含胰岛素。此动物胰腺提取物是

[1] 南方医科大学附属珠江医院内分泌科，广东省广州市 510282; [2]解放军第四五八医院全军肝病中心，广东省广州市 510600

徐艳花★，女，1985 年生，江西省九江市人，汉族，南方医科大学在读硕士，主要从事胰岛再生与移植研究。
xyylvls@163.com

通讯作者：陈宏，主任医师，南方医科大学珠江医院内分泌科，广东省广州市 510282
rubychq@163.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:1673-8225(2012)05-00871-04

收稿日期: 2011-10-28
修回日期: 2011-12-16
(20111028011/GW·C)

以糖尿病发生的源头器官胰腺为靶点，选择动物胰腺为原料，通过现代工艺加工而成，以期能促进胰岛细胞增殖分化。

1 材料和方法

设计：对照观察细胞学实验。

时间及地点：于2010-07-20/2011-05-10在广州珠江医院移植免疫研究所完成。

材料：

实验动物：清洁级成年雄性SD大鼠，体质量250~300 g，由南方医科大学实验动物中心提供。

实验试剂及仪器：

试剂及仪器	来源
猪促胰素	解放军第四五八医院全军肝病中心提供
Ficoll-400	美国 Pharmacia 公司
胶原酶 P、RPMI 1640 培养基、胎牛血清、细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒及双硫腙	美国 Sigma 公司
胰岛素放射免疫分析药盒	北京北方生物技术研究所
艾塞那肽	礼莱公司惠赠
倒置相差显微镜	Nickon eclipse TS100，日本
低温离心机	Hettich 公司，德国
电子移液器	Brand 公司，德国
酶标检测仪	BIO-RAD 公司，美国
CO_2 恒温培养箱	Thermo 公司，美国

实验方法：

大鼠胰岛细胞分离、纯化和培养：参照张桦等[7]介绍方法的基础上稍加改良，取清洁级成年SD大鼠，0.8 g/L胶原酶P溶液10 mL胆总管内顺行灌注后(见图1)，完整摘取胰腺，移入预置6 mL Hank's液的血清瓶中，39 ℃恒温水浴静止消化至组织呈泥沙状，迅速加入预冷的小牛血清6 mL终止消化，80目不锈钢筛网过滤后静置3 min，吸尽上清液，沉淀物加入含体积分数10%胎牛血清的PBS液，离心(1 200 r/min、4 ℃、3 min)，弃上清液，沉淀物加25%Ficoll溶液8 mL吹打混匀，其上依次加入23%，20%，11%Ficoll溶液和PBS各4 mL，8 00 r/min，4 ℃离心5 min，吸出23%~25%界面及25%层面的胰岛于另一50 mL离心管中，加入含体积分数10%胎牛血清的PBS液30 mL吹打混匀，离心(1 200 r/min、4 ℃、3 min)，弃上清，加入含体积分数20%胎牛血清RPMI-1640培养液吹打混匀后，调整细胞至适宜浓度，接种于培养板后置37 ℃、含体积分数5%CO_2培养箱中进行培养、观察。

Figure 1 Pancreas of a SD rat after intraductal collagenase P injection
图 1 胶原酶 P 胆总管灌注后的 SD 大鼠胰腺

胰岛细胞鉴定：双硫腙是一种锌螯合剂，SD大鼠的内分泌细胞含有锌，因此双硫腙是胰岛细胞特异性染料。将双硫腙10 mg溶于3 mL无水乙醇中，加入50 μL浓氨水，完全溶解后加入Hank's液10 mL即为双硫腙储存液[8]。取纯化后的细胞悬液0.1 mL加入Hank's溶液0.9 mL，然后加入双硫腙储存液100 μL混匀，室温孵育10 min，倒置显微镜下观察细胞形态，同时计算纯化后胰岛的纯度。

纯度=双硫腙染色阳性的胰岛个数/细胞团总数×100%

胰岛细胞功能鉴定：即胰岛素释放实验：在显微镜下挑50个直径100~150 μm的胰岛细胞团，分别置低糖(3.3 mmol/L)、高糖(16.7 mmol/L)无血清RMPI-1640培养液中，在37 ℃、体积分数5%CO_2的饱和湿度培养箱中孵育2 h，放射免疫法测定溶液中胰岛素浓度，计算刺激指数[9]。

刺激指数(SI)=高糖时胰岛素浓度/低糖时胰岛素浓度

细胞活力的测定：取少许纯化的细胞经锥虫蓝染色后，死细胞被染成淡蓝色，而活细胞拒染，计算成活率。

细胞成活率=未染色细胞数/总细胞数×100%

实验分组与处理：将分离、培养的胰岛细胞分为6组：①空白对照组：含体积分数20%胎牛血清RPMI-1640培养液培养。②~⑤组培养液中分别加入100，200，300，400 mg/L促胰素。

胰岛细胞增殖的测定：96孔板中每组细胞分别设5个复孔，分别培养1，3，5 d后进行干预[10]。每孔分别加入10 μL CCK-8试剂，培养箱中孵育1~4 h，酶联仪检测细胞的D450波长的*A*值，反映细胞的增殖活性。

放射免疫试剂盒检测胰岛素分泌量：各组细胞干预5 d后，用不含葡萄糖的KRBH液洗涤2次，孵育30 min后弃上清。分别加入1 mL含3.3 mmol/L葡萄糖的KRBH液37 ℃孵育2 h，取上清，离心，−20 ℃保存，用于检测基础胰岛素分泌。再分别加入含16.7 mmol/L葡萄糖的KRBH液37 ℃孵育2 h，取上清，离心，−20 ℃保存，放射免疫法检测葡萄糖刺激后的胰岛素分泌量。

主要观察指标：胰岛细胞增殖活性及胰岛素分泌量。

统计学分析：实验数据采用SPSS 13.0软件进行统计学分析，数据以$\bar{x}$±s表示。采用随机单位组析因方差分析方法进行主效应和交互效应的分析，组间比较采用One-way ANOVA，组间两两比较采用LSD法，以$P < 0.05$为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 分离培养胰岛细胞的镜下观察 SD大鼠胰腺组织经胶原酶消化后可获得分散较好的胰岛细胞团，在倒置显微镜下观察，纯化前见大量的外分泌腺细胞散杂有染成猩红色的胰岛，胰岛细胞胞浆丰富，呈圆形或者卵圆形，大部分胰岛包膜完整折光性好，见图2；纯化后可见大片的胰岛细胞团，大量的腺泡组织被去除，见图3。

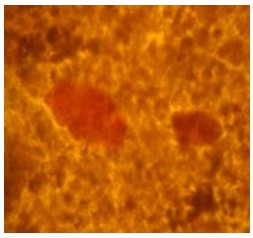

Figure 2 Dithizone staining of early isolated islet cell mass of rats (×200)
图 2 初分离大鼠胰岛细胞团的双硫腙染色(×200)

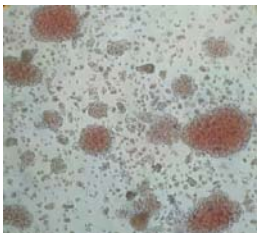

Figure 3 Dithizone staining of purified islet cell mass of rats (×200)
图 3 纯化后 SD 大鼠胰岛细胞团的双硫腙染色(×200)

2.2 胰岛细胞的鉴定 双硫腙染色结果：光镜下胰岛细胞团呈现猩红色，可染率达85%~95%。同时，用锥虫蓝染色法测定细胞活力为90%以上。

2.3 胰岛素释放实验 高糖刺激后胰岛素释放量为低糖的2.35倍[分别为(12.30±1.18) IU/mL和(5.20±0.53) IU/mL，$P < 0.05$]，提示胰岛β细胞功能良好。

2.4 促胰素对大鼠胰岛细胞增殖的影响 各组胰岛细胞增殖活性见表1。

表 1 不同干预因素对大鼠胰岛细胞增殖活性的影响
Table 1 Effect of different intervention factors on proliferation activity of rat islet cells ($\bar{x}$±s, n=5, A)

Group	1 d	3 d	5 d	F	P
A	0.25±0.03	0.27±0.03	0.27±0.03	0.832	0.444
B	0.26±0.04	0.31±0.05	0.29±0.07	3.129	0.057
C	0.26±0.04	0.31±0.02[a]	0.03±0.06[ab]	3.320	0.049
D	0.33±0.03[cde]	0.34±0.06[cde]	0.36±0.06[cde]	1.063	0.357
E	0.47±0.07[cdef]	0.49±0.05[cdef]	0.54±0.08[cdef]	3.131	
F	96.089	128.251	136.568	(F=111.044, P=0.000)	
P	0	0	0		

A: Blank control; B: 100 mg/L pancreatotrophin; C: 200 mg/L pancreatotrophin; D: 300 mg/L pancreatotrophin; E: 400 mg/L pancreatotrophin. [a]$P < 0.05$, *vs.* 1 d group; [b]$P < 0.05$, *vs.* 3 d group; [c]$P < 0.05$, *vs.* A group; [d]$P < 0.05$, *vs.* B group; [e]$P < 0.05$, *vs.* C group; [f]$P < 0.05$, *vs.* D group

析因方差分析显示：不同时间细胞增殖活性差异有显著性意义(F=24.782，P=0)。干预1，3，5 d，5组间细胞增殖活性差异均有显著性意义(F=96.089，P=0；F=128.251，P=0；F=136.568，P=0)。固定时间，各组单独效应及多重比较显示：1，3，5 d时，除100，200 mg/L促胰素组外，其余两组细胞增殖活性显著高于空白对照组(P均< 0.05)，各组间两两比较差异均有显著性意义($P < 0.05$)。析因方差分析显示：不同处理细胞增殖活性差异有显著性意义(F=356.281，P=0)。除200 mg/L促胰素组外，其他4组在不同干预时间细胞增殖活性差异均无显著性意义(P均> 0.05)。

2.5 促胰素对大鼠胰岛细胞胰岛素分泌的影响 见表2。

表 2 不同干预因素处理后大鼠胰岛细胞葡萄糖刺激实验结果
Table 2 Glucose test results of islet cells after treated with different intervention factors ($\bar{x}$±s, n=5)

Group	Concentration of insulin (mIU/L)		Insulin stimulation index
	Low-glucose	high-glucose	
Blank control	65.72±9.34	80.67±8.96	1.179±0.126
100 mg/L pancreatotrophin	69.56±8.03	83.05±10.48	1.175±0.132
200 mg/L pancreatotrophin	68.60±9.93	81.58±9.69	1.179±0.141
300 mg/L pancreatotrophin	82.02±7.14[abc]	96.67±6.87[abc]	1.189±0.116[abc]
400 mg/L pancreatotrophin	83.86±4.72[abc]	96.60±6.65[abc]	1.186±0.126[abc]
P	0.003	0.000	0.011

[a]$P < 0.05$, *vs.* blank control group; [b]$P < 0.05$, *vs.* 100 mg/L pancreatotrophin group; [c]$P < 0.05$, *vs.* 200 mg/L pancreatotrophin group

经不同干预因素处理5 d后，低糖刺激后胰岛素的分泌量5组间差异有显著性意义(F=4.904，P=0.003)，

多重比较结果显示：除100，200 mg/L促胰素组外，其余两组胰岛素分泌量均显著高于空白对照组(P均< 0.05)，且300 mg/L促胰素组与400 mg/L促胰素组比较差异无显著性意义(P > 0.05)。高糖刺激后胰岛素的分泌量5组间差异有显著性意义(F=8.574，P=0)，多重比较结果显示：除100 mg/L促胰素组和200 mg/L促胰素组外，其余两组胰岛素分泌量均显著高于空白对照组(P均< 0.05)，且300 mg/L促胰素组与400 mg/L促胰素组比较差异无显著性意义(P > 0.05)。

高糖与低糖之间比值即胰岛素释放指数是反映胰岛细胞功能的一项指标，本实验中胰岛素刺激指数5组间差异有显著性意义(F=5.387，P=0.011)，多重比较结果显示：除100 mg/L促胰素组和200 mg/L促胰素组外，其余两组胰岛素分泌量均显著高于空白对照组(P均< 0.05)，且300 mg/L促胰素与400 mg/L促胰素组比较差异无显著性意义(P > 0.05)。

3 讨论

本实验结果显示，在CCK-8比色法测定中，300 mg/L促胰素和400 mg/L促胰素组吸光度值显著高于空白对照组，提示至少在体外培养条件下促胰素可增加胰岛细胞的数量。同时观察到大鼠胰岛细胞经促胰素干预5 d后，低糖与高糖刺激的胰岛素水平除100，200 mg/L促胰素组外，其余两组胰岛素分泌量均显著高于空白对照组。这表明300 mg/L和400 mg/L促胰素不仅可促进胰岛细胞增殖，而且可显著增强胰岛细胞分泌胰岛素的功能。促胰素促进β细胞增殖可能通过以下途径：磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)及其下游的细胞外信号调节激酶(ERK)1/2和p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)或蛋白C(PKC)；cAMP/蛋白激酶A(PKA)介导的pdx-1的转录[11]。

现有的研究表明促进胰岛细胞体内增殖分化与再生可能是治疗2型糖尿病的一种潜在的方案，同时胰岛移植治疗糖尿病亦将显示巨大的临床价值和前景，但供体来源、免疫排斥反应以及移植物存活率仍是当前面临的主要问题。随着干细胞研究的深入，分子生物学的发展，新型免疫诱导及抑制剂的研发，胰岛移植必将成为1型糖尿病和部分2型糖尿病治疗的有效手段，然而，众所周知，胰岛在移植前体外培养是个极其复杂的环境，胰岛分离、纯化、培养、低氧和移植环境中非特异性炎症因子等应激都可以使胰岛细胞发生凋亡而影响胰岛移植物的存活[12]。因此，在目前仅有的科研及医疗条件下，寻找具有促进胰岛β细胞增殖、抗凋亡作用的细胞因子，不仅为治疗2型糖尿病提供了更多的选择方案，同时也为1型糖尿病胰岛移植成功提供了必要的前提。本实验显示促胰素有促进胰岛细胞增殖的作用，并能显著增强胰岛细胞分泌胰岛素的功能。

致谢：衷心感谢导师陈宏教授的指导；感谢解放军第四五八医院全军肝病中心陈道明主任和王洪敏博士技术上的指导及帮助；感谢师兄张振硕士及珠江医院内分泌科全体工作人员，感谢吴礼凤硕士、于静雯硕士、郭南京博士等给予耐心的指导、无私的帮助和关心。

4 参考文献

[1] Yang W,Lu J,Weng J,et al.Prevalence of Diabetes among Men and Women in China. N Engl J Med.2010；362:1090-1101.
[2] Gianani R.Beta cell regeneration in human pancreas.Semin Immunopathol.2011;33(1):23-27.
[3] Chen S.Regeneration of Pancreaticβ-Cells In Vivo as a Potential Therapeutic Approach for Diabetes Mellitus. Endocr Metab Immune Drug Discov.2009;3(2):3000-3008.
[4] Trucco M.Regeneration of the pancreatic beta cell.J Clin Invest. 2005;115 (1): 5-12.
[5] Yamaoka T.Regeneration therapy of pancreatic beta cells: Towardsa cure for diabetes? BiochemBiophys Res Commun. 2002;296 (5):1039-1043.
[6] Suarez-Pinzon WL,Power RF,Yan Y,et al.Combination therapywith glucagon-like peptide-1 and gastrin restores normoglycemia indiabetic nod mice. Diabetes.2008;57: 3281-3288.
[7] Zhang H,Cai DH,Xu CS,et al.Diyi Junyi Daxue Xuebao. 2001; 21(2):129-131.
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):129-131.
[8] Li M,Chen D,Li YH,et al.Zhonghua Shiyan Waike Zazhi. 2011; 28(2):206-208.
李明,陈栋,李永海,等.小鼠胰岛的分离与纯化[J].中华实验外科杂志,2011,28(2):206-208.
[9] Hui XL,Wang HF,Liu JT,et al.Xian Jiaotong Daxue Xuebao. 2006; 27(2):30-33.
惠晓丽,王惠芳,刘惊涛,等.游离脂肪酸对大鼠胰岛细胞体外分泌功能的影响[J].西安交通大学学报,2006,27(2):30-33.
[10] Cui D,Liu C,Tang W,et al. Zhongguo Tangniaobing Zazhi. 2007; 15(5):310-312.
崔岱,刘超,唐伟,等.GLP-1对大鼠胰岛细胞增殖及凋亡的影响[J].中国糖尿病杂志,2007,15(5):310-312.
[11] Buteau J,Foisy S,Rhodes CJ,et al.Protein kinase C zeta activation mediates glucagon like peptide-1 induced pancreatic beta cell proliferation[J].Diabetes,2009;50:2237-2243.
[12] Shen YX.Zhongguo Shengwu Gongcheng Zazhi. 2010;31(1): 70-74.
沈益行.干细胞定向分化胰岛β细胞新进展[J].中国生物工程杂志, 2010, 31(1):70-74.

来自本文课题的更多信息--

作者贡献：实验设计者为徐艳花、张振、王洪敏，实验实施者为徐艳花，实验评估者为陈宏、蔡德鸿、陈道明，文章撰写者为徐艳花，资料收集者为于静雯、吴礼凤，审校者为陈宏，陈宏、徐艳花、张振对文章负责。

利益冲突：课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准：实验中对动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性：分别在Pubmed、SciencedDirect、Nature、EBSCO、中国期刊全文数据库、万方期刊全文数据库等国内外数据库上通过输入关键词“胰岛细胞”、“分离”、“纯化”、“促胰素”、“增殖”、“胰岛功能”等检索到60篇文章，进行仔细阅读后与导师交流学习心得，并对研究课题进行深入探讨最终认定实验具有先进性。实验首次将促胰岛细胞生长素用于大鼠胰岛细胞，探索其对胰岛细胞增殖分化及功能的影响，进一步探索其作用机制，为以后糖尿病的临床治疗提供更多的药物选择，同时为胰岛移植前的预处理提供更多选择方案。