

不同冷冻速率对冻存胰岛活性的观察

周 莉 孙向伟 周明非 黄云中 张中兴
(北京军事医学科学院基础医学研究所)

主题词: 胰岛冻存、糖尿病。

内容提要: 报道了不同冷冻速率对胰腺冷冻保存后胰岛活力的影响, 通过对胰碎片胰岛素含量测定的观察表明, 微机控制的慢降温 ($1^{\circ}\text{C} \sim 3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 和快复温 (37°C 水浴, $30''$), 可使胰碎片的冷冻保存获得良好效果。

胰岛移植治疗胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM), 已逐渐地应用于临床。然而, 有关移植的关键问题之一, 即供胰的长期保存问题, 尚未解决, 特别是对于供胰长期保存的研究报告甚少。因此, 我们研究了供胰的冷冻保存方法。从功能上观察了不同冷冻和复温速率对胰腺胰岛活性的影响, 并使用放免测定技术对胰岛进行了定量的研究。

一、材 料 和 方 法

1. 实验动物和分组: 健康 Wistar 1 日龄大鼠 (我院动物中心提供) 144 只, 随机分为六组, 每组 24 只。I 组为新鲜组; II 组为 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降温组; III 组为 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降温组; IV 组为 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降温组; V 组为 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 为降温组; VI 组为 $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降温组。

2. 冷冻保存

(1) 胰腺的制备及添加冷冻保护剂: 无菌条件下取出乳鼠胰腺, 立即在 4°C Hanks' 液中漂洗, 剪成 1.0mm^3 左右的碎片。每 4 只乳鼠的胰碎片放入一个安瓿 (每组共有 6 个安瓿), 每只安瓿内加入 2ml 含 10% 二甲基亚砜 (DMSO) 的 RPMI1640 培养冷冻液, 立即封口, 放入碎冰中。

(2) 降温与复温: I 组为新鲜样品, 不冷冻。其它四个组使用 WKL-4 型程控降温仪, 以不同的速率降至 -80°C 。

II 组以 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降到 4°C , 平衡 30 min; $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 从 4°C 到 -20°C , 停 5 分钟; $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 从 -20°C 到 -40°C , 停 5 min, 以 $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 从 -40°C 到 -80°C 。

III 组以 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降到 4°C , 平衡 30 min; $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 从 4°C 到 -20°C , 停 5 min; $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 从 -20°C 到 -80°C 。IV 组以 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降到 -80°C 。V 组以 $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降到 -80°C 。VI 组以 $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降到 -80°C 。

各冷冻组在 -80°C 停留 5 min 后, 投入液氮。15~30 天后, 在 37°C 水浴中快速复温。

(3) 去除冷冻保护剂: 复温后用吸管吸出冷冻液, 用 4°C Hanks' 液吸洗二次。

3. 胰组织活性观测

培养液胰岛素含量测定: 将冻存后安瓿内的胰碎片和新鲜胰碎片分别放入培养瓶内, 加入 5ml RPMI1640 培养液。在 CO_2 孵育箱内, 37°C , 5% CO_2 和 95% 空气, 培养 48h, 取培养液用胰岛素放射免疫药盒 (中国原子能科学研究院生产) 测胰岛素含量。

1991 年 1 月 30 日收到, 第一作者邮编 100850, 第二作者工作单位为解放军 201 医院。

4. 统计学处理: 两样本均数间的 t 检验。

二、结 果

新鲜和不同冷冻组培养液中胰岛素含量:

在表1中可见新鲜组(I组)胰岛素含量明显高于Ⅲ—Ⅵ组。经统计处理差别显著($P < 0.01$), I组胰岛素含量虽也高于Ⅱ组, 但差别不显著($P > 0.05$)。表1中还可可见Ⅱ组的胰岛素含量明显高于Ⅲ—Ⅵ组, 经统计处理差别显著($P < 0.05 \sim 0.01$)。

表1 新鲜和不同冷冻组培养液中胰岛素含量($M \pm SD$)

分 组	胰岛素含量 (uu/ml)	P①	P②
(I) 新鲜组	2805.00 ± 534.19		> 0.05
(II) $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 组	1984.85 ± 659.35	> 0.05	
(III) $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 组	961.07 ± 341.53	< 0.01	< 0.05
(IV) $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 组	845.21 ± 317.61	< 0.01	< 0.05
(V) $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 组	524.72 ± 307.17	< 0.01	< 0.05
(VI) $50^\circ\text{C}/\text{min}$ 组	191.58 ± 134.20	< 0.01	< 0.01

①与I组相比(t)检验; ②与II组相比(t)检验

三、讨 论

纠正代谢紊乱, 防止糖尿病性微血管病变的发生和发展, 是治疗糖尿病的关键, 而胰岛移植可以达到此目的。但是, 目前异体胰岛移植的临床效果仍不尽人意, 其中重要问题之一是移植物的保存问题未能妥善解决。为了解决上述问题, 有人提出使用低温保存技术保存胰岛, 可使胰岛组织长期存活, 并在移植中纠正糖尿病症状。

胰碎片冷冻保存的过程是较为复杂的, 其中降温 and 复温速率与冻存后的胰岛活力密切相关。此时, 胰碎片经历的理化改变最为激烈, 往往发生冷冻损伤, 所以, 要想胰碎片保存成功, 选择最佳降温和复温速率是十分重要的。我们的实验证明, 不同冷冻速率冷冻保存后胰岛的活性是不同的。新鲜组和不同冷冻组培养液中胰岛素含量的测量说明, $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 冷冻组的胰岛素含量明显高于其它四个冷冻组($P < 0.05 \sim 0.01$), 虽然 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 冷冻组的胰岛素含量低于新鲜组, 但经统计处理差别不显著($P > 0.05$), 而其它四个冷冻组胰岛素的含量明显低于新鲜组($P < 0.01$)。上述结果证明我们在 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 冷冻组中使用微机控制的速率冷冻技术是成功的, 胰岛组织经过长时间低温保存后的活性与新鲜胰组织的活性相差不多, 这与Ishihara等和我们实验室的先前研究的结果是一致的。

近年来, 在胰腺或胰岛冷冻保存的研究中, 对降温和复温速率的选择颇有争论, 但多数学者认为慢降温($1^\circ\text{C} \sim 3^\circ\text{C}/\text{min}$)与快复温比较理想, 并认为冷冻损伤的主要原因是在降温过程中, 由于冰晶形成的溶质效应所产生的渗透压、 pH 和电解质浓度的改变, 作用于细胞膜脂质, 导致了细胞膜的渗漏。在复温时这种渗漏使大量水份进入细胞内, 导致细胞水肿和死亡, 有人称之为渗透性休克。再有, 冷冻后保存和复温时, 由于温度的变化, 可产生重结晶和热逸出的损伤。在我们的实验中, $1^\circ\text{C}/\text{min}$ 组的效果之所以较其它三个冷冻组好, 是因为慢降温能减少细胞内冰晶形成所引起的损伤, 减少了“溶质效应”的影响, 而快速复温历时很短, 则可以减少或避免渗透性休克和重结晶损伤。

综上所述, 我们认为采用微机控制的慢降温($1^\circ\text{C} \sim 3^\circ\text{C}/\text{min}$)和快复温(37°C 水浴, $30''$), 可使胰碎片的冷冻保存获得良好的效果。