

· 论 著 ·

体外诱导小鼠胎肝间充质干细胞向胰岛 B 样细胞分化的研究

余 卫, 张 涇*, 何冬梅 (暨南大学医学院血液病研究所, 广州 510632)

[摘要] **目的:** 体外分离和定向诱导小鼠胎肝间充质干细胞向胰岛 B 样细胞分化。**方法:** 无菌条件下从正常 C57BL/6J 胎鼠肝中分离出间充质干细胞, 体外培养传 3 代后用高浓度葡萄糖培养基以及碱性纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和尼克酰胺诱导分化, 观察胎肝间充质干细胞诱导前后形态变化; 用 RT-PCR 检测细胞诱导前后胰十二指肠同源异型基因盒 1(pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1)、胰岛素原 1(proinsulin-1, INS-1)、葡萄糖转运子 2(glucose transporter-2, GLUT-2)表达情况; 胰岛素免疫细胞化学染色鉴定诱导后细胞胰岛素的表达; 在形成胰岛样细胞簇后, 用双硫脲做胰岛 B 细胞特异性染色。**结果:** RT-PCR 显示诱导 5 d 后 PDX-1、INS-1、GLUT-2 均有表达, 而诱导前的细胞则没有检测到表达; 胰岛素免疫细胞化学表明细胞簇内的细胞胰岛素染色强阳性; 细胞簇双硫脲染色阳性(每个 T-25 培养瓶有 80~120 个)。**结论:** 从胎肝中分离出的间充质干细胞在体外可以定向诱导分化为胰岛 B 样细胞。

[关键词] 间充质干细胞; 胎肝; 胰岛 B 样细胞; 细胞分化

[中图分类号] Q 254 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-375X(2004)08-0827-04

In vitro differentiation of mouse fetal liver mesenchymal stem cells into islet B-like cells

YU Wei, ZHANG Huan*, HE Dong-Mei (Institute of Hematology, College of Medicine, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To isolate mesenchymal stem cells (MSCs) from mouse fetal liver and induce them differentiate into islet B-like cells. **Methods:** MSCs were isolated from C57BL/6J mouse fetal liver and were induced with high concentration of glucose, basic fibroblast growth factor (bFGF), and nicotamine medium. The gene expressions related to islet B cells such as pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1), proinsulin-1 (INS-1), and glucose transporter-2 (GLUT-2) were detected by RT-PCR. Insulin in the treated cells was examined by immunocytochemistry. The insulin clusters were stained with dithizone (DTZ), a zinc-chelating agent known to selectively stain pancreatic B cells. **Results:** RT-PCR showed that the treated cells expressed PDX-1, INS-1 and GLUT-2, while the undifferentiated cells did not. After approximately 10 d of treatment, the fetal liver cells formed DTZ-stained cell clusters in flasks (80-120 clusters in a flask 25 cm² in area). Immunocytochemistry also confirmed that these aggregates were strongly positive for insulin. **Conclusion:** MSCs derived from fetal liver can be induced into islet B-like cells *in vitro*.

[KEY WORDS] mesenchymal stem cells; fetal liver; islet B-like cells; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 827-830]

利用干细胞生成新的胰岛 B 细胞, 然后移植到糖尿病患者体内, 弥补患者体内胰岛素分泌细胞的不足, 是糖尿病治疗的新希望^[1]。最近, 不同的研究小组在胚胎干细胞^[2]和成体干细胞^[3,4]向胰岛素分泌细胞诱导分化以及鉴定方面作出了一些成功的探索。但是在这些研究中还没有诱导胎肝间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)向胰岛 B 样细胞分化的报道。胎肝具有多种原始干细胞, 除了肝干细胞外, 还包含丰富的造血干细胞、MSC^[5], 是干细胞研究较理想的细胞库。胎肝 MSC 是一种具有多向分化潜能的干细胞, 它可以向多种结缔组织及部分来源于外胚层的组织分化, 形成骨、软骨、骨骼肌、腱、韧带、真皮、脂肪、骨髓基质和神经^[6]。本实验探索了胎肝 MSC 向胰岛 B 样细胞分化的条件, 有助于进一步了解胎肝 MSC 横向分化能力, 同时为糖

尿病治疗提供新的种子细胞。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 C57BL/6J 孕小鼠 1 只(广州医学院实验动物中心), 孕期为 14.5 d。DMEM/HEPES/F12 (Sigma 公司), 胎牛血清(FBS, 杭州四季青公司), 尼克酰胺(Sigma 公司), 碱性纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF 或 FGF-2, Pepro Tech 公司), TRIzol Reagent (Gibco 公司), RT-PCR 试剂盒(上海申能博彩公司), 引物合成(北京赛百胜生物技术公司), 双硫脲(Sigma 公司), 胰岛素抗体(Santa Cruz 公司), EnVision Kit

[作者简介] 余 卫 (1979-), 男(汉族), 硕士生。

*Corresponding author. E-mail: tzyuan@jnu.edu.cn

(GeneTech 公司),DAB(GeneTech 公司)。

1.2 胎肝 MSC 的获取和培养 参照 Campagnoli 等^[7]胎肝 MSC 贴壁筛选法,无菌条件下取出胎龄 14.5 d 的 C57BL/6J 胎鼠,PBS 洗 2 次后,取出胎肝,置于 8 ml 4℃含 2%FBS 的 Hank's 平衡盐溶液中,用眼科剪将肝组织剪成 1 mm³ 左右小块,加入 DMEM/HEPES/F12 (含 10%FBS) 培养液反复吹打,过 4 号针头制成单细胞悬液。按密度 1×10⁶/cm² 接种在 T-25 塑料培养瓶(Corning 公司)中,10%FBS 的 DMEM/HEPES/F12 培养液(含 100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素),37℃、饱和湿度的 5%CO₂ 孵箱培养。3 d 后首次半量更换培养液,弃去未贴壁细胞,2~3 d 换液 1 次,接近融合的胎肝贴壁细胞用 0.25%胰酶 37℃消化 1~5 min,加入新鲜培养基终止消化,吸管吹打成单细胞悬液,按 1:2 比例传代培养。

1.3 定向诱导胎肝 MSC 向胰岛 B 样细胞分化 体外细胞培养传 3 代后开始进行诱导,诱导分为两步:第一步诱导出现细胞簇;传至第 3 代的细胞达到 60%~70%融合时,移出旧培养液,在新的 DMEM/HEPES/F12 中添加葡萄糖(葡萄糖终浓度为 25 mmol/L,10%FBS)和 10 ng/ml bFGF,每 3 d 换 1 次液直到出现胰岛样细胞团。第二步促进胰岛 B 样细胞增殖和胰岛素的表达;DMEM/HEPES/F12 (葡萄糖浓度为 25 mmol/L,10%FBS,10 ng/ml bFGF)加入尼克酰胺 10 mmol/L,继续诱导。在倒置相差显微镜下观察细胞诱导后的形态变化。

1.4 RT-PCR 鉴定胰岛 B 细胞特异基因的表达 用 TRIzol Reagent 说明书提取诱导组(第一步诱导 5 d 后的细胞)和对照组(体外细胞培养传 3 代后诱导前的细胞)的总 RNA。普通琼脂糖凝胶(0.8%)和紫外分光光度仪检测 RNA 质量。按 RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA。逆转录条件为 37℃逆转录 60 min,95℃灭活 5 min。然后 PCR 扩增胰岛素原 1 (proinsulin-1,INS-1),胰十二指肠同源异型基因盒 1 (pancreatic duodenal homeobox-1,PDX-1),葡萄糖转运子 2 (glucose transporter-2, GLUT-2) 以及内对照 β-actin 的 cDNA。引物设计:INS-1 正义 5'-CCA GCT ATA ATC AGA GAC CA-3',反义 5'-GTG TAG AAG AAG CCA CGC T-3'(197 bp); PDX-1 正义 5'-ACC ATG AAC AGT GAG GAG CA-3',反义 5'-TCC TCT TGT TTT CCT CGG GT-3'(451 bp);GLUT-2 正义 5'-CCA CCC AGT TTA CAA GCT C-3',反义 5'-TGT AGG CAG

TAC GGG TCC TC-3' (325 bp);β-actin 正义 5'-AGC TTG CTG TAT TCC CCT CCA TCG TG-3',反义 5'-AAT TCG GAT GGC TAC GT A CAT GGC TG -3'(324 bp)。PCR 产物在加有溴化乙啶(EB)的 2.0%的琼脂糖凝胶中电泳,以紫外凝胶扫描仪观察结果并拍照。

1.5 细胞内胰岛素免疫细胞化学染色 按照 En-Vision Kit 说明书进行免疫细胞化学染色:细胞爬片用-20℃预冷甲醇固定 10 min,PBS 洗涤。0.1% Triton、3%H₂O₂ 孵育 10 min,阻断内源性过氧化物酶。PBS 洗 3 次后加一抗(1:150 稀释),室温下孵育 30 min,PBS 洗 3 次,加 EnVision 工作液室温孵育 30 min,PBS 洗 3 次,DAB 显色 10 min。然后在光学显微镜下拍照。阴性对照组用 PBS 代替一抗,其他操作相同。

1.6 双硫脲染色 将 50 mg 双硫脲溶于 5 ml DM-SO 溶液中,过滤,配成双硫脲工作液。用长嘴吸管头刮动细胞簇,使细胞簇悬浮在培养液中,培养液及细胞簇转移到 6 孔板中,加 50 μl 双硫脲工作液(1%,V/V),37℃孵育 10 min,4 号针头吸去培养液,加入 PBS 洗 2 次,在倒置显微镜下观察。

2 结果

2.1 胎肝 MSC 诱导前后的形态变化 采用 DMEM/HEPES/F12 (含 10%FBS) 培养基培养胎肝细胞,大部分细胞于 24 h 内即贴壁,倒置显微镜下,贴壁细胞成圆形。72 h 后,大多数细胞有胞质突起,原代培养 1 周后细胞 80%融合,可见上皮样细胞和梭形细胞(图 1A)。第 2 代培养 1 周后以梭形细胞为主,细胞成平行排列生长(图 1B)。细胞平均每 7 d 传一次代。第一步诱导 10 d 后,部分细胞形态逐渐变圆,并有 3~10 个圆形细胞聚集体出现,15 d 后可见直径 60~120 μm 的椭圆形细胞簇出现,平均 80~120 个/瓶。改用第二步诱导,7 d 后,细胞簇数目上升为 150~200 个/瓶,直径增大为 100~300 μm,形态逐渐变为圆形。

2.2 RT-PCR 鉴定胰岛 B 细胞相关基因的表达 诱导前的胎肝细胞的总 RNA 经 RT-PCR 扩增后,INS-1、PDX-1 和 GLUT-2 基因无特异目的条带(图 2A)。而胎肝细胞经诱导液诱导 5 d 后的总 RNA 分别经 INS-1、PDX-1 和 GLUT-2 基因特异引物 RT-PCR 扩增,电泳显示均产生预期大小的特异目的条带(图 2B)。

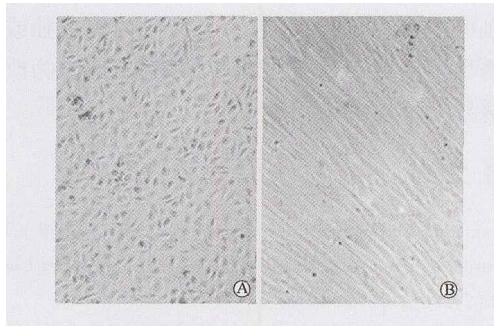


图1 胎肝原代贴壁细胞(A)和传代后的MSC(B)

Fig 1 Primary plastic-adherent cells derived from fetal liver(A) and MSC derived from fetal liver after passage(B)(x100)

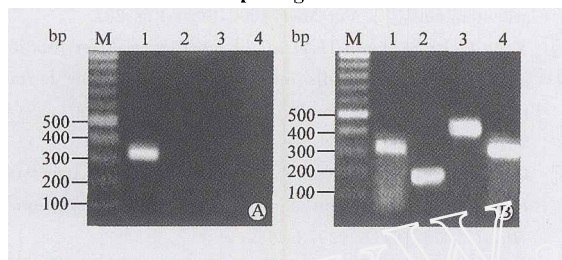


图2 RT-PCR检测对照细胞(A)和诱导组细胞(B)胰岛B细胞相关基因的表达

Fig 2 RT-PCR detection of gene expression related to islet beta cells in control group(A) and treated group(B)

M: Marker; 1: beta-actin; 2: INS-1; 3: PDX-1; 4: GLUT-2

2.3 细胞内胰岛素免疫细胞化学染色 第一步诱导10 d后形成的由3~10个圆形细胞聚集成的细胞簇,细胞簇内的细胞出现棕褐色阳性颗粒,有大量的显色成分,周围单层细胞中有很多细胞胰岛素染色呈淡黄色,细胞核蓝色(图3A)。第二步诱导7 d后,细胞簇直径变大,细胞簇内的细胞增多,细胞胞质中出现深黄色阳性颗粒,有大量的显色成分,周围单层细胞中阳性细胞较少,以无色为主(图3B)。对照组未列出。

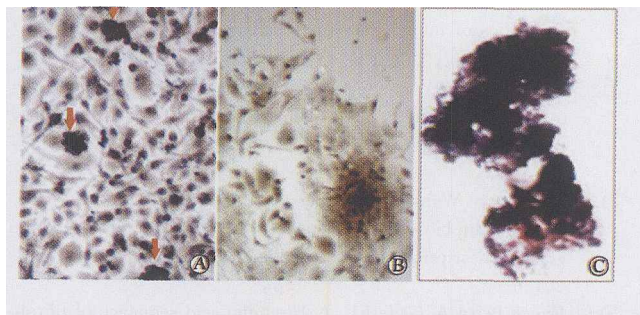


图3 免疫细胞化学染色和双硫脲染色鉴定胰岛样细胞簇

Fig 3 Identification of islet-like clusters by immunocytochemistry and dithizone

A: Immunocytochemistry for insulin in islet-like cell aggregates (positive DAB staining, x200);

B: Immunocytochemistry for insulin in islet-like cluster (positive DAB staining, x200);

C: Stained islet-like cluster with dithizone(x400)

2.4 双硫脲染色 诱导20 d后取出细胞簇,倒置显微镜下观察,背景为PBS液,无色透明,悬浮于PBS的细胞簇呈圆形或椭圆形,细胞紧密结合在一起,细胞簇在光镜下呈黑色,边缘部分黑色较淡,可见圆形细胞形态。用体积分数为1%双硫脲37℃活细胞染色10 min后,细胞簇变为紫红色,而未诱导细胞则不染色,表明细胞内含有高浓度锌(图3C)。

3 讨论

RT-PCR检测胰岛B细胞的细胞标志^[8]包括:(1)胰岛素原基因INS-1;(2)胰岛B细胞发育相关的转录因子PDX-1;(3)胰岛B细胞功能相关的基因GLUT-2。INS-1是胰岛B细胞表达胰岛素的重要基因,与胰岛素表达水平密切相关。PDX-1的表达出现在胰腺发育的早期,是胰岛素基因转录激活子。GLUT-2的表达产物是葡萄糖转运蛋白,在胰岛B细胞膜上表达,是胰岛B细胞调节血糖功能重要的蛋白。本实验检测到这3种基因的表达,表明胎肝MSC在诱导的早期开始向胰岛B细胞分化。

本实验免疫组化结果可以同时看到细胞簇和单层细胞的胰岛素染色情况,而在过去的研究^[2~4]中,很多研究者只重视细胞簇却忽视了单层细胞。从我们免疫组化的结果可以看出:在诱导的早期(诱导10 d后),单层细胞中有胰岛素染色阳性的细胞,而阴性对照却不染色(资料未列出),这表明分化早期的胰岛B样细胞并没有直接形成细胞簇,而是单层贴壁生长。到了分化的晚期,单层细胞中阳性细胞较少,而出现较大的细胞簇,其中的细胞胰岛素染色强阳性。这一现象我们认为可能的解释是干细胞先分化为胰岛B样细胞,此时的细胞不够成熟。而在后期分化成熟过程中,细胞开始表达一些黏附分子从而聚集成簇。

锌是胰腺B细胞形成2-锌-胰岛素六聚体不可分割的部分^[9],因此胰岛B样细胞内高浓度锌是调节血糖所必须的基本条件之一,对锌的鉴定具有重要意义。双硫脲能特异性地和锌离子螯合成紫红色络合物,使细胞显色^[8]。本实验显示胰岛样细胞簇染色阳性,使我们更加确信胰岛B样细胞与胰岛B细胞存在很大的相似之处。

来自于胎骨髓和胎肝的MSC倍增时间分别为50 h和30 h^[10],这说明胎肝MSC比胎骨髓MSC在体外更容易扩增。此外,胎肝MSC不表达或低表达HLA II类抗原^[11],可以避免移植后发生免疫排斥,较适合作组织工程的种子细胞。目前分离MSC的方法主要是贴壁筛选法^[12],该方法利用MSC较强

的贴壁能力和生存能力,在细胞培养中逐渐淘汰贴壁能力差和生存能力差的非 MSC 细胞。贴壁筛选法最初是用在骨髓 MSC 分离上的,随后发现在胎肝 MSC 的分离中也同样是非常有效的^[7]。本实验在 DMEM/HEPES/F12(10%FBS)培养体系中进行胎肝 MSC 培养时,发现原代培养的胎肝细胞较杂,传代后胎肝非 MSC 会随着培养时间的延长而逐渐破碎、消失,而 MSC 则不断的增殖,最后得到较为均一的胎肝 MSC。

本实验诱导条件之一是高浓度葡萄糖。葡萄糖不仅仅是一种营养物质,而且是胰岛素基因的主要生理调节剂。在较短的时间内,高浓度葡萄糖不仅可以增强胰岛 B 细胞胰岛素基因的表达^[13],还可以刺激干细胞向胰岛 B 样细胞分化^[4]。我们将培养基中的葡萄糖浓度由正常浓度 5 mmol/L 提高到高浓度 25 mmol/L,在诱导的第 5 天发现 INS-1、PDX-1 和 GLUT-2 均有表达。这表明葡萄糖在干细胞向胰岛 B 样细胞分化起着重要作用。

bFGF 在体内参与组织修复、刺激内皮细胞, MSC 等多种细胞的生长。与其他生长因子不同,它缺少引导分泌的序列,不能分泌。通常认为细胞死亡、物理化学损伤、辐射或感染引起的细胞膜损伤或溶解而被释放到胞外^[14]。因此在诱导液中加入 bFGF,可以给 MSC 发出组织发生损伤,需要修复的信号,促使干细胞进行分化,这可能有助于激活干细胞的分化潜力。10 mmol/L 尼克酰胺可以促使胎胰中幼稚胰岛细胞的成熟^[15]。这两种诱导因子在高浓度葡萄糖诱导干细胞向胰岛 B 样细胞分化的过程中起着辅助作用。除此之外,我们发现其他因素如培养液中的酸碱度、氧含量等对细胞分化的影响也很重要(资料未列出)。

总之,本实验结果说明:胎肝 MSC 在上述诱导剂作用下诱导出的胰岛 B 样细胞具有胰岛 B 细胞调节血糖所必须的一些基本条件,包括关键基因的表达、胰岛素的表达和细胞内高浓度锌。但是胰岛 B 样细胞并不一定是治疗糖尿病所需的胰岛 B 细胞。因为真正的胰岛 B 细胞是与体内的周围神经、激素、血糖环境相互调节的,胰岛 B 样细胞在体外做的测试只能验证它的部分特征,需要进一步证明移植到糖尿病动物体内可以使血糖恢复到正常值,才能最终确定胎肝 MSC 分化是否得到真正的胰岛 β 细胞。此外,从干细胞到分化成熟的细胞是一个很大的跨度,需要充分的时间和条件,必须不断的摸索才能得到功能完全的胰岛 B 细胞。下一步我们的实验将在体内进行,观察诱导出的胰岛 B 样细胞在糖尿病动物模型中是否具有

调节血糖的作用,从而为进一步探讨体外单独或联合哪些诱导因子更有利于向胰岛 B 细胞分化,为改善体外的诱导条件提供依据。

[参 考 文 献]

- [1] Yamaoka T. Regeneration therapy of pancreatic β cells; towards a cure for diabetes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(5):1039-1043.
- [2] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets[J]. *Science*, 2001, 292(5520):1389-1394.
- [3] Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, et al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells[J]. *Nat Med*, 2000, 6(3):273-282.
- [4] Yang L, Li S, Hatch H, et al. *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12):8078-8083.
- [5] Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, et al. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Blood*, 2003, 101(8):2973-2982.
- [6] Gerson SL. Mesenchymal stem cells: no longer second class marrow citizens[J]. *Nat Med*, 1999, 5(3):262-264.
- [7] Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow[J]. *Blood*, 2001, 98(8):2396-2402.
- [8] Shiroy A, Yoshikawa M, Yokota H, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone[J]. *Stem Cells*, 2002, 20(4):284-292.
- [9] Chausmer AB. Zinc, insulin and diabetes[J]. *J Am Coll Nutr*, 1998, 17(2):109-115.
- [10] 呼莹, 马丽, 马冠杰, 等. 成人和胎儿骨髓间充质干细胞的比较研究[J]. *中华血液学杂志*, 2002, 23(12):645-648.
Hu Y, Ma L, Ma GJ, et al. Comparative study of human fetal and adult bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. *Zhonghua Xueyexue Zazhi (Chin J Hematol)*, 2002, 23(12):645-648.
- [11] Götherström C, Ringdén O, Tammik C, et al. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(1):239-245.
- [12] Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow estrogenic stem cells; *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers[J]. *Cell Tissue Kinet*, 1987, 20(3):263-272.
- [13] Leibiger B, Wahlander K, Berggren PO, et al. Glucose-stimulated insulin biosynthesis depends on insulin-stimulated insulin gene transcription[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(39):30153-30156.
- [14] Ray J, Baird A, Gage FH. A 10-amino acid sequence of fibroblast growth factor 2 is sufficient for its mitogenic activity on neural progenitor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(13):7047-7052.
- [15] Otonkoski T, Beattie GM, Molly MI, et al. Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells[J]. *J Clin Invest*, 1993, 92(3):1459-1466.

[收稿日期] 2004-05-08

[修回日期] 2004-06-28

[本文编辑] 尹 茶