

GLP-1、Betacellulin、Activin A、bFGF 和 Nicotinamide 联合诱导小鼠胚胎干细胞分化为胰岛素分泌细胞

吴木潮, 陈黎红, 徐明彤, 程 桦

(中山大学附属第二医院内分泌科, 广东 广州 510120)

摘要: 【目的】探讨体外联合应用 GLP-1、betacellulin、activin A、bFGF 和 nicotinamide 5 种生长因子能否将小鼠胚胎干细胞(ES 细胞)诱导分化为胰岛素分泌细胞。【方法】以 GLP-1、betacellulin、activin A、bFGF 和 nicotinamide 5 种生长因子诱导 E14.1 小鼠 ES 细胞 30 d 后,应用 RT-PCR、DTZ 染色和免疫组化检测分化细胞胰岛素表达,以流式细胞仪检测胰岛素分泌细胞的分化率,用 RIA 法测定培养液中胰岛素水平。【结果】分化细胞可检测到胰岛素 mRNA 表达,DTZ 染色和胰岛素免疫组化染色阳性,胰岛素分泌细胞的分化率平均为 $13.6\% \pm 3.7\%$,在 5.6 mmol/L 和 25 mmol/L 葡萄糖浓度作用下培养液中胰岛素水平分别为 (0.04 ± 0.01) ng/mL 和 (0.09 ± 0.02) ng/mL。【结论】体外联合应用 GLP-1、betacellulin、activin A、bFGF 和 nicotinamide 5 种生长因子能将小鼠 ES 细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞,但胰岛素分泌功能较差。

关键词:干细胞,胚胎;生长因子;胰岛素分泌细胞

中图分类号:R451.7

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2004)05-0426-05

Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Insulin-secreting Cells Induced by GLP-1, Betacellulin, Activin A, bFGF and Nicotinamide

WU Mu-chao, CHEN Li-hong, XU Ming-tong, CHENG Hua

(Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To induce mouse embryonic stem cells (ES cells) to differentiate into insulin-secreting cells by GLP-1, betacellulin, activin A, basic fibroblast growth factor (bFGF) and nicotinamide *in vitro*. 【Methods】E14.1 mouse ES cells were treated by glucagon-like peptide 1 (GLP-1), betacellulin, activin A, bFGF, and nicotinamide for 30 days, then insulin expression was examined by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR), DTZ-staining, and immunohistochemistry. The percentage of insulin-secreting cells in differentiated cells were evaluated by flow cytometry and insulin level in the medium was measured by RIA. 【Results】The mRNA for insulin was detected in the differentiated cells. DTZ-staining and immunohistochemical staining for insulin were observed in the parts of the differentiated cells. $13.6\% \pm 3.7\%$ of the differentiated cells was insulin-secreting cells. In the presence of 5.6 mmol/L and 25 mmol/L glucose, the insulin levels in the medium were (0.04 ± 0.01) ng/mL and (0.09 ± 0.02) ng/mL, respectively. 【Conclusion】Mouse ES cells can be induced to differentiate into insulin-secreting cells by GLP-1, betacellulin, activin A, bFGF and nicotinamide *in vitro*, however, the function of insulin-secreting cells is rather poor.

Key words: stem cells, embryonic; growth factors; insulin-secreting cells

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(5): 426 - 430]

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)是从早期胚胎分离出来的多潜能干细胞,在适当的条

件下可以分化为各种类型的组织细胞。国外的研究显示,ES 细胞可在体外被诱导分化为胰岛素分泌

收稿日期:2004-04-25

基金项目:中山大学附属第二医院重点扶持专科基金资助项目(F002002003)

作者简介:吴木潮(1966-),男,广东潮州人,博士研究生,主治医师。

细胞,如 Soria 等^[1]和 Assady 等^[2]分别将小鼠 ES 细胞和人 ES 细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞。但目前有关 ES 细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞的研究只是刚刚开始,而且在国内很少有 ES 细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞的报道。在此,我们研究体外联合应用胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1)、betacellulin, 激活素 A (activin A), 碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 和尼克酰胺 (nicotinamide) 等 5 种生长因子能否将小鼠 ES 细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞。

1 材料与方法

1.1 ES 细胞的培养

E14.1 小鼠 ES 细胞 (由本院儿科黄绍良教授惠赠)在 DMEM 高糖培养液中,于 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。培养液含 100 mL/L 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、0.1 mmol/L β 巯基乙醇和 0.1 mmol/L 必需氨基酸 (以下 ES 细胞诱导所用培养液均含有这些成分),同时加入 1 000 U/mL 小鼠白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF, 购自 Chemicon 公司)以抑制 ES 细胞的分化。每天换液 1 次,每 2 d 消化传代。

1.2 ES 细胞的诱导

以 0.25% 胰酶/0.04% EDTA 将 ES 细胞消化后,置于没有 LIF 而含有 20 nmol/L GLP-1、1.5 nmol/L betacellulin、1.5 nmol/L activin、10 ng/L bFGF 和 10 mmol/L nicotinamide 等的 DMEM 高糖培养液中 (以下所用的培养液均含有这 5 种生长因子, GLP-1、betacellulin 和 activin A 购自 Sigma 公司, bFGF 购自 Chemicon 公司, nicotinamide 购自 Aldrich 公司),以悬滴法形成胚胎体 (embryonic bodies, EBs),即将 ES 细胞制成悬滴 (每滴 25 μL, 约含 500 个 ES 细胞),置于细菌培养皿盖子内面 (底面平皿含少许 PBS 溶液),3 d 后形成的细胞集落称为 EBs。然后将 EBs 转入直径 100 mm 细菌培养皿中悬浮培养 3 d。再将 EBs 转入 6 孔板中 (每个孔放置 20 个 EBs),让 EBs 贴壁和向外生长,继续诱导 24 d 后进行以下试验。每天换液 1 次,每天于倒置显微镜下观察 EBs 的生长和形态变化。

另在无生长因子和 LIF 的 DMEM 高糖培养液中,以同样方法将 ES 细胞形成 EBs 和培养 EBs30

d,以此作为阴性对照。

1.3 HE 染色

用 PBS 溶液冲洗细胞 3 遍,以 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min,再用刮匙将细胞刮下,放于 40 g/L 多聚甲醛中。石蜡包埋,切片,苏木素和伊红染色,显微镜下观察。

1.4 RT-PCR

提取细胞总 RNA 后,用两步法合成 cDNA 和 PCR 扩增。胰岛素引物序列 (产物 212 bp):上游为 CCCTGCTGGCCCTGCTCTT,下游为 AGGTCTGAA GGTACCTGC;以 β-actin 为内参照,引物序列 (产物 568 bp):上游为 ATGGATGACGATATCGCTG,下游为 ATGAGGTAGTCTGTACAGGT。引物由上海生物工程公司合成。PCR 扩增条件为 94 °C,1 min,60 °C,1 min,72 °C,1 min,共进行 33 个循环;72 °C 延伸 7 min。PCR 产物以 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

1.5 双硫腙 (diphenylthiocarbazone, DTZ) 染色

PBS 溶液冲洗细胞 3 遍,向每个培养孔中加入 1 mL 的培养液和 10 μL DTZ (10 mg/mL, 购自 sigma 公司),于 37 °C 培育 10 min, PBS 溶液冲洗 3 遍,立体显微镜下观察。

1.6 免疫组化检查

细胞的收集和石蜡包埋与切片同 HE 染色。正常兔血清封闭液,室温 37 °C 20 min,1:100 的胰岛素抗体 (购自 R&D systems 公司)4 °C 过夜,加兔抗大鼠 IgG,室温 37 °C 30 min, DAB 显色。

1.7 胰岛素分泌细胞计数

将细胞消化后制成单细胞悬液,以胰岛素抗体和 FITC 标记的兔抗大鼠 IgG (购自 Vector 公司)作用后,以流式细胞仪进行胰岛素分泌细胞计数。

1.8 胰岛素水平的检测

用 PBS 溶液冲洗细胞 3 遍,先后分别加入 5.6 mmol/L 和 25 mmol/L 葡萄糖浓度无血清的培养液 1 mL,各于 37 °C 作用 2 h,后收集培养液 (两次不同试验中间用 PBS 溶液冲洗 3 遍),以 RIA 方法检测培养液胰岛素水平 (胰岛素试剂盒购自 Linco 公司,为高敏胰岛素试剂盒,检测范围为 0.02 ~ 1.00 ng/mL)。

2 结果

2.1 ES 细胞的诱导

E14.1 小鼠 ES 细胞在含 LIF 的培养液中生长良好(图 1)。EBs 形成及悬浮培养后(6 d),将其转移到 6 孔板,第 2~3 天 EBs 即贴壁,细胞不断增殖,EBs 变大,约 2 d 后,包膜破裂,开始向外生长,

以后 EBs 细胞不断生长。诱导 30 d 后 HE 染色可见多数细胞大小较一致,少数细胞大小及形态不一(图 2)。

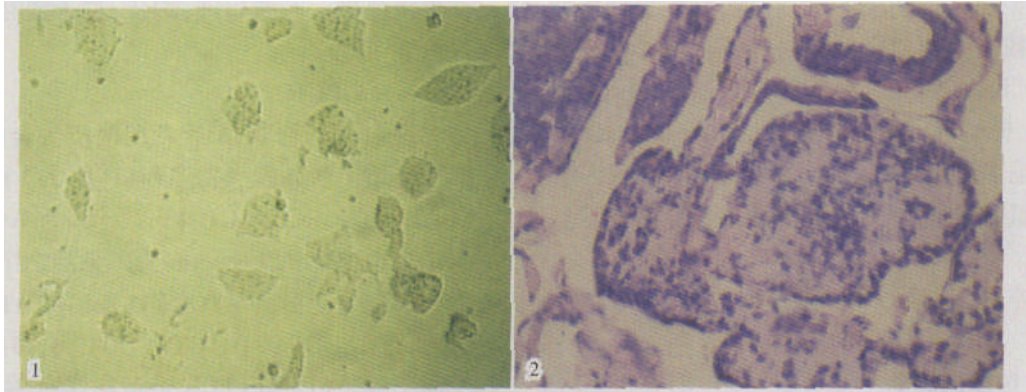


图 1 在含 LIF 培养液中生长的 ES 细胞

图 2 生长因子诱导的分化细胞的组织学染色

Fig. 1 ES cells cultured in the presence of LIF (100 ×)

Fig. 2 Histological staining of differentiated cells from ES cells induced by growth factors (HE 400 ×)

2.2 胰岛素分泌细胞的鉴定

ES 细胞被诱导 30 d 后,RT-PCR 检测结果显示阴性对照细胞未见有胰岛素表达,而阳性对照的胰岛细胞和以五种生长因子作用的细胞有胰岛素表达(图 3)。DTZ 染色显示阴性对照细胞未见被染色(图 4A),而生长因子作用细胞中的部分细胞被染成鲜红色(图 4B)。免疫组化结果显示阴性对照细胞呈阴性(图 5A),而生长因子作用细胞中的部分细胞呈阳性(图 5B)。

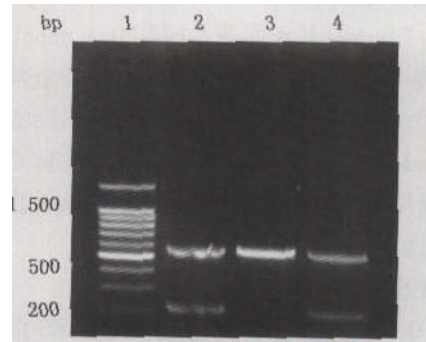


图 3 胰岛素基因的表达

Fig. 3 Expression of insulin gene

1. DNA marker; 2. positive control; 3. negative control; 4. PCR product

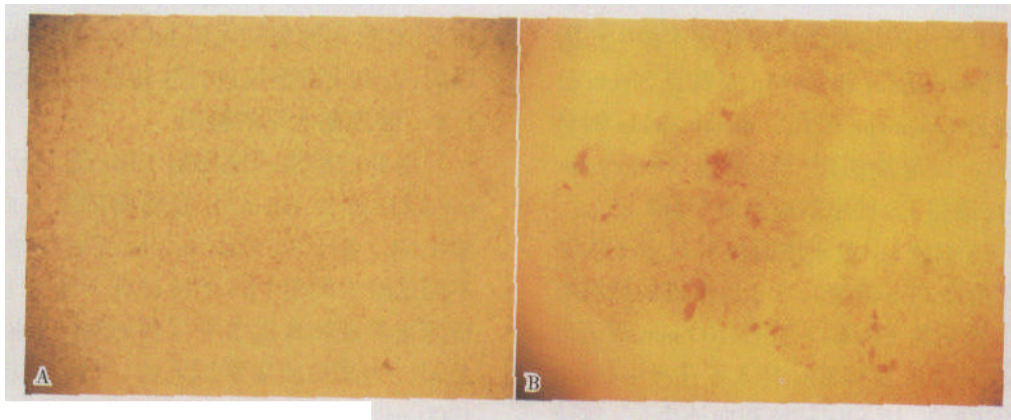


图 4 DTZ 染色

Fig. 4 DTZ staining of differentiated cells from ES cells (100 ×)

A : differentiated cells from ES cells in the absence of growth factor ; B : differentiated cells from ES cells in the presence of growth factors

2.3 胰岛素分泌细胞计数

流式细胞仪检测显示阴性对照的分化细胞中

胰岛素表达阳性细胞为 3.66% ± 1.4% (n = 6, 图 6A),生长因子诱导的分化细胞中胰岛素表达阳性

细胞为 $13.6\% \pm 3.7\%$ ($n = 6$, 图 6B)。

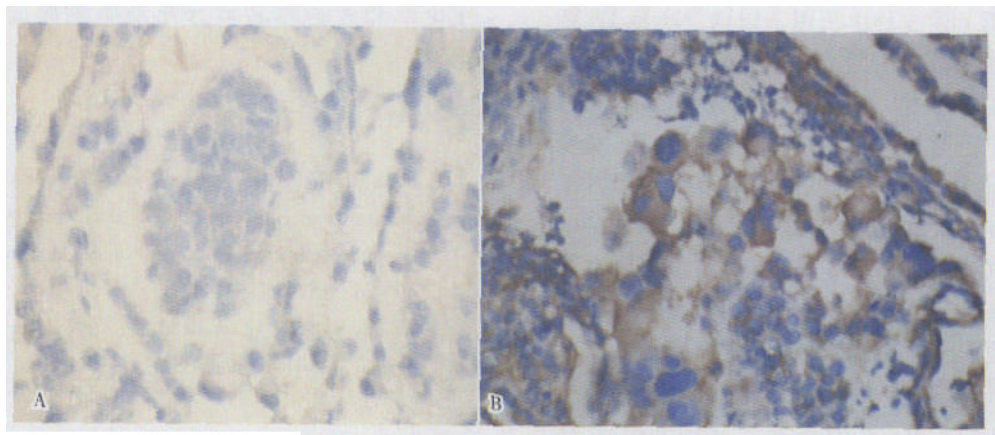


图 5 免疫组化染色

Fig. 5 Immunohistochemical staining of insulin of differentiated cells from ES cells (400 ×)

A : differentiated cells from ES cells in the absence of growth factor ; B : differentiated cells from ES cells in the presence of growth factors

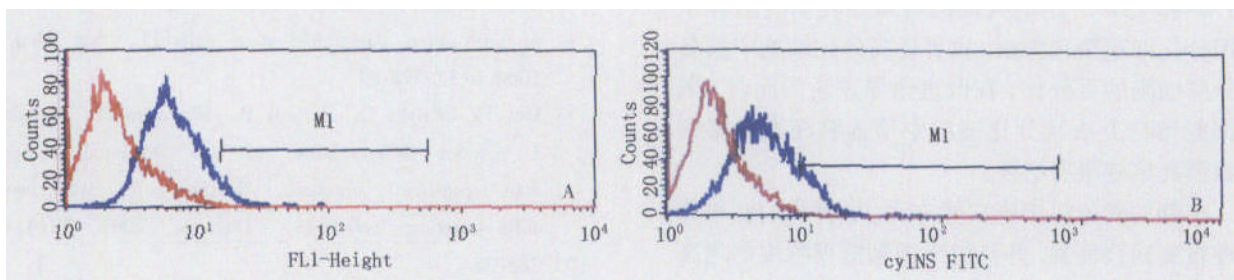


图 6 胰岛素分泌细胞的流式细胞仪检测

Fig. 6 Insulin positive cell counted by flow cytometry

A : differentiated cells from ES cells in the absence of growth factor ; B : differentiated cells from ES cells in the presence of growth factors

2.4 胰岛素水平检测

阴性对照细胞低糖 (6.6 mmol/L) 培养液和高糖 (25 mmol/L) 培养液中平均胰岛素水平均为 $(0.03 \pm 0.01) \text{ ng/mL}$ ($n = 6$), 生长因子诱导的细胞低糖培养液和高糖培养液平均胰岛素水平分别为 $(0.04 \pm 0.01) \text{ ng/mL}$ ($n = 6$) 和 $(0.09 \pm 0.02) \text{ ng/mL}$ ($n = 6$)。

3 讨论

ES 细胞为具有高度分化潜能的多能干细胞, 可在体外被诱导分化为各种类型的组织细胞, 如神经细胞、心肌细胞、造血细胞和胰岛素分泌细胞等。ES 细胞能被诱导分化胰岛素分泌细胞, 对于治愈 1 型糖尿病和部分 2 型糖尿病提供了广阔前景。

生长因子是体外诱导干细胞定向分化为胰岛素分泌细胞的重要工具之一。体内外的研究显示,

某些生长因子, 如 bFGF、肝细胞生长因子、GLP-1、exendin-4、表皮生长因子、转化生长因子、层粘连蛋白、胰岛素样生长因子、胃泌素、betacellulin、activin A、nicotinamide、血管内皮生长因子、INGAP (slet neogenesis-associated protein) 和角化蛋白生长因子等等, 能促进胰岛细胞的发育和分化^[3], 提示这些生长因子可能可作为体外干细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞的诱导剂。目前, 这些生长因子中的一些已被应用于干细胞分化为胰岛素分泌细胞的研究, 研究结果显示他们可促进干细胞向胰岛素分泌细胞分化, 如 GLP-1 能诱导小鼠、大鼠和人胰腺导管细胞等成体干细胞 (Adult stem cell, 简称 AS 细胞) 分化为胰岛素分泌细胞^[4, 5]; Activin A 和 betacellulin 可诱导胰岛 nesting 阳性细胞和大鼠 AR42J 细胞等 AS 细胞分化为胰岛素分泌细胞^[6, 7]; bFGF 和 nicotinamide 除能促进干细胞分化为胰岛素分泌细胞外, 因分别能促进干细胞的增殖和胰岛素分泌细胞的成熟, 两者已被许多研究者应用于 AS 细胞

和 ES 细胞分化为胰岛素分泌细胞的研究^[1, 2, 4, 6, 8]。

我们应用上述 5 种生长因子以诱导小鼠 ES 细胞分化为胰岛素分泌细胞,结果显示,分化细胞可见胰岛素 mRNA 表达。DTZ 是一种锌螯合剂,染色阳性提示细胞胞浆中可能有胰岛素分泌颗粒。免疫组化检查显示分化细胞中可见胰岛素染色阳性的细胞。上述结果说明,联合应用 GLP-1、betacellulin、activin A、bFGF 和 nicotinamide 5 种生长因子可以诱导 ES 细胞分化为胰岛素分泌细胞。

流式细胞仪检测结果显示分化细胞中胰岛素分泌细胞平均为 $13.6\% \pm 3.7\%$,这较目前文献报道的为低,如 Kim 等^[9]和 Hori 等^[10]的研究显示,他们所诱导出来的胰岛样细胞簇(pancreatic islet-like cell clusters, PICCs)中胰岛素分泌细胞分别占 95%~97% 和 78%。他们共同的特点是在诱导过程中采用分化细胞筛选方法。故要提高分化细胞中胰岛素分泌细胞的百分比,在改进诱导方法的同时,采用细胞筛选方法从分化细胞中筛选胰岛素分泌细胞或胰岛细胞很有必要。

在胰岛素分泌细胞功能方面,尽管我们在培养液中检测到胰岛素,并且似乎随葡萄糖浓度的增高而增高,但胰岛素水平很低,提示胰岛素分泌细胞功能欠佳。胰岛素分泌细胞发育不成熟可能是胰岛素分泌细胞功能欠佳的主要原因。正常胰岛 β 细胞胰岛素的合成和释放涉及一系列的环节和复杂的机制,只有发育成熟的 β 细胞才能较好地完成这一复杂的功能。因此,在诱导 ES 细胞分化为胰岛素分泌细胞时,应该尽量研究出有效的方法促进胰岛素分泌细胞的成熟,这样才能确保诱导出来的胰岛素分泌细胞具有良好的胰岛素分泌功能。

目前胰岛发育以及体外 ES 细胞分化调控机制仍不清楚,这为诱导 ES 细胞分化为胰岛素分泌细胞的研究带来了一定的困难。很多问题,诸如如何合理选用生长因子(包括选用哪种生长因子、剂量如何、各种生长因子如何搭配、先后顺序怎样),采用什么诱导方法和细胞筛选方法才能达到最佳的效果等等仍在探索之中。我们的结果显示,体外联合应用 GLP-1、betacellulin、activin A、bFGF 和 nicotinamide 5 种生长因子可以诱导 ES 细胞分化为胰岛素分泌细胞,但胰岛素分泌细胞分化率较低,胰岛素分泌细胞功能欠佳。故在今后的研究中,

应进一步改进诱导方法,以提高胰岛素分泌细胞的分化率和改善胰岛素分泌细胞的胰岛素分泌功能。

参考文献:

- [1] Soria B, Roche E, Berna G, *et al.* Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Diabetes*, 2000, 49 (2) :157-62.
- [2] Assady S, Maor G, Amit M, *et al.* Insulin production by human embryonic stem cells[J]. *Diabetes*, 2001, 50(8) : 1691-7.
- [3] Soria B. In-vitro differentiation of pancreatic β -cell[J]. *Differentiation*, 2001, 68 (2) :205-19.
- [4] Ramiya V K, Maraist M, Arfors K E, *et al.* Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells[J]. *Nat Med*, 2000, 6(3) :278-82.
- [5] Hui H, Wright C, Perfetti R. Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells[J]. *Diabetes*, 2001, 50(4) : 785-96.
- [6] Zulewski H, Abraham E J, Gerlach M J, *et al.* Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes [J]. *Diabetes*, 2001, 50(3) :521-33.
- [7] Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, *et al.* Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(7) :1647-54.
- [8] 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) : 1389-94.
- [9] Kim D, Gu Y, Ishii M, *et al.* In vivo functioning and transplantable mature pancreatic islet-like cell clusters differentiated from embryonic stem cell[J]. *Pancreas*, 2003, 27(2) :34-41.
- [10] Hori Y, Rulifson I C, Tsai B C, *et al.* Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99(25) :16105-10.

(编辑 张恩健)