

# 小鼠骨髓干细胞有诱导分化为胰岛素分泌细胞的可能性

陈黎红,程桦,严励,吴木潮,杨川,傅祖植  
(中山大学附属第二医院内分泌,广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】探讨小鼠骨髓干细胞有无被诱导分化为胰岛素分泌细胞的可能性。【方法】培养小鼠骨髓干细胞,采用含 GLP-1 和 nicotinamide 的无血清培养液诱导分化,在培养过程中,检测有关基因的表达。【结果】培养的小鼠骨髓干细胞具有与文献报道相似的生物学特性;在诱导分化第 7 天,有 *ngn3* 和 *pdx-1* 基因表达;在诱导分化第 14 天,有 *nkx2.2*、*pdx-1* 和 *ins2* 基因表达。【结论】小鼠骨髓干细胞有诱导分化为胰岛素分泌细胞的可能性,值得进一步研究。

关键词:小鼠骨髓干细胞;诱导分化;胰岛素分泌细胞;基因表达

中图分类号:R451.7

文献标识码:A

文章编号 1672-3554(2004)06-0538-04

## Possibility of Mouse Adult Bone Marrow-derived Stem Cells to be Induced into Insulin-secreting Cells

CHEN Li-hong, CHENG Hua, YAN Li, WU Mu-chao, YANG Chuan, FU Zu-zhi

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

**Abstract:** 【Objective】 To study whether the mouse bone marrow-derived stem cells have the possibility to be induced into insulin-secreting cells. 【Methods】 The mouse bone marrow-derived stem cells were plated on the serum-free DMEM/F12 medium with GLP-1 and nicotinamide. The process was observed and the expression of the transcription factors such as *ngn3*, *nkx2.2*, *pdx-1*, and *insulin2* genes were detected at day 7 and day 14. 【Results】 The expression of *ngn3* and *pdx-1* were observed at day 7; while *nkx2.2*, *pdx-1*, and *insulin2* presented at day 14. 【Conclusion】 The mouse bone marrow-derived stem cells have the possibility to be induced into insulin-secreting cells.

**Key words:** mouse bone marrow-derived stem cells; differentiation; insulin-secreting cell; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(6): 538 - 541]

糖尿病是严重危害人民身体健康的常见病。胰岛素分泌功能减退是其发生的重要环节。通过细胞移植,重建内源性胰岛素分泌系统,是治愈糖尿病的希望。移植物匮乏是细胞移植治疗糖尿病的主要障碍之一<sup>[1]</sup>。干细胞是具有自我更新和多潜能分化能力的细胞。诱导分化干细胞为胰岛素分泌细胞,将为细胞治疗糖尿病提供丰富的细胞来源。已有研究显示,胚胎干细胞可以诱导分化为胰岛素分泌细

胞,但由于胚胎干细胞来源受伦理限制,人们希望寻找到来源丰富、容易获得的干细胞。骨髓中除了含有造血干细胞外,还有间充质干细胞等。骨髓干细胞具有较其它的成体干细胞更强的分化潜能,能分化为内皮细胞、神经元样细胞、上皮细胞、脂肪细胞等来源于不同胚层的各种细胞。能否分化为胰岛素分泌细胞尚未见报道。本文培养小鼠骨髓干细胞,并探讨其诱导分化为胰岛素分泌

收稿日期 2004-07-08

基金项目 广东省卫生厅科研基金资助项目(A2004043)

作者简介 陈黎红(1969-),女,广东澄海人,博士生,主治医师;傅祖植,教授,博士生导师,通讯作者。E-mail: chenlh96@yahoo.com.cn

细胞的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

BABL/c 小鼠, 3 周龄, 购于中山大学医学实验动物中心。

### 1.2 培养基及主要试剂

DMEM- 低糖培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium-low glucose, DMEM-LG, Gibco), MCDB-201 培养基 (Sigma), 胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒 (insulin-transferrin-selenium, ITS, Sigma), 亚油酸 - 牛血清白蛋白 (linoleic acid bovine serum albumin, LA-BSA, Sigma), 地塞米松, 2- 磷酸抗坏血酸, 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS, 杭州四季青) 纤连蛋白 (fibronectin, FN, Sigma), 重组人表皮生长因子 (recombinant human epidermal growth factor, rhEGF, R & D System), 重组人血小板衍生生长因子 BB (recombinant human Palatelet rhPDGF-BB, rhPDGF-BB, R & D System), 白血病抑制因子 (leukemia inhibitor factor, LIF, Chemicon), 大鼠抗小鼠 CD13、CD44、CD45、MHC-II (BD Pharmingen), DMEM/F12 (DMEM/HamF12, Gibco), 胰高糖素样多肽 -1 (glucagonlike peptide, GLP-1, Sigma), 烟酰胺, 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)。

### 1.3 小鼠骨髓干细胞培养及生物学特性鉴定

1.3.1 细胞培养 3 周龄小鼠 (每次  $n = 5$  只), 断颈处死, 体积分数 75% 酒精浸泡 1 min, 无菌条件下, 解剖出带转子的胫骨和股骨, *D-Hank's* 液冲出骨髓细胞,  $800 \times g$  离心 5 min, 弃上清, 加入红细胞裂解液裂解红细胞,  $800 \times g$  离心 5 min, 弃上清, 无血清 DMEM 基础培养液重悬细胞, 洗涤两次, 细胞计数, 以  $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6 / \text{cm}^2$  种于  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶中, 条件培养液, 体积分数 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养箱中培养, 1 d 后换液, 弃去未贴壁细胞, 以后每 3 d 换液 1 次。细胞长至 50% ~ 60% 融合时, PBS 洗涤 2 次, 2.5 g/L 胰酶 / 0.04 % EDTA 消化液 1 ~ 2

mL  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  消化 4 ~ 5 min, 用吸管吹打使细胞完全脱落, 离心, 弃上清, 无血清 DMEM 基础培养液洗涤 2 次, 干细胞培养液重悬细胞, 以  $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4 / \text{cm}^2$  重新接种于  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶中。干细胞培养液: 60% DMEM-LG, 40% MCDB-201,  $1 \times \text{ITS}$ ,  $1 \times \text{LA-BSA}$ ,  $10 \text{ nmol/L}$  地塞米松,  $0.1 \text{ mmol/L}$  2- 磷酸抗坏血酸, 体积分数 2% FCS,  $1 \text{ mg/L}$  FN,  $10 \text{ } \mu\text{g/L}$  rhEGF,  $10 \text{ } \mu\text{g/L}$  rhPDGF-BB,  $1 \times 10^6 \text{ U/L}$  LIF, 常规加入双抗。

1.3.2 细胞生物学特性的鉴定 细胞形态: 倒置相差显微镜下观察细胞生长情况, 并拍照。流式细胞仪检测细胞表面标志: 将 P2 代骨髓干细胞消化, PBS 多次洗涤后, 分别加入荧光标记的抗体,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 30 min, PBS 洗去未标记的抗体,  $10 \text{ g/L}$  多聚甲醛固定, 应用 FACSscan 流式细胞仪分析样本中  $1 \times 10^4$  个细胞的相应标记抗原的阳性表达率, 每个样本用 FITC 或 PE 标记, 同型 IgG 作为相应的阴性对照 ( $n = 3$ )。

### 1.4 胰岛素分泌细胞的诱导分化

1.4.1 细胞的诱导分化 取 P2 或 P3 代生长良好、待诱导分化的细胞, 用含  $25 \text{ } \mu\text{g/L}$  rhEGF 的 RMP11640 (体积分数 10% FCS) 预诱导处理 24 h, 加入无血清 DMEM/F12 诱导液中培养, 其中  $2 \text{ g/L}$  BSA,  $10 \text{ mmol/L}$  烟酰胺,  $25 \text{ } \mu\text{g/L}$  rhEGF,  $100 \text{ nmol/L}$  GLP-1, 每 3 d 换液。于第 7 天 ( $n = 6$ )、第 14 天 ( $n = 6$ ) 取细胞作有关基因 mRNA 检测。对照组 ( $n = 6$ ) 加预诱导处理液, 不进行诱导分化处理。每天倒置显微镜下观察细胞形态改变、细胞生长情况。

1.4.2 基因检测 根据 RT-PCR 说明书进行。待检测的细胞弃上清, PBS 洗涤多次, 每  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶加入 1 mL Trizol, 按一步法提取总 RNA; 采用 PromegaRT 试剂盒,  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  5 min 预解链,  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 60 min 以合成 cDNA, PCR 过程  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 2 min, 33 个循环扩增 ( $94 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $52 \text{ }^\circ\text{C}$  60 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  60 s), 最后  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 5 min,  $\beta$ -actin (699 bp) 为内参照。

基因	上游引物	下游引物	扩增片段长度(bp)
nkx2.2	5'-GTGCTTTCCGAGAAGAGA-3'	3'-GTGTCGGGAAGGTCCA-5'	293
ngn3	5'-CAAGTGTCCCAGAGACA-3'	3'-GTTACCCGCTTGGGAGA-5'	493
pdx-1	5'-GGAAGTCTCCGACA-3'	3'-CTTCTCCAGCTCCAGCA-5'	298
ins2	5'-GTTCCACCTGCTGGA-3'	3'-AGCAGATGCTGGTGCA-5'	191

## 2 结果

### 2.1 细胞形态

接种 24 h 后细胞贴壁生长,初时细胞较小,圆形,10~14 d 左右,一些贴壁小细胞死亡,剩下的细胞胞体变大,细胞以生长良好的细胞为中心,呈克隆样生长,形态为类圆形,少许不规则突出(图 1)。

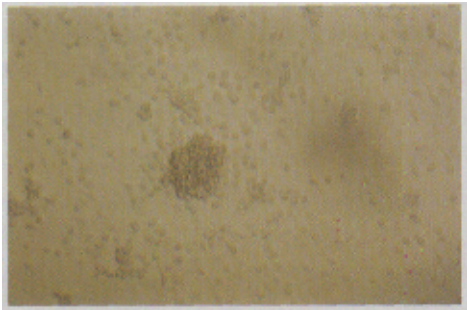


图 1 小鼠骨髓干细胞原代培养

Fig.1 The primary culture of mouse bone marrow-derived stem cells

Day 14, inverted phase contrast microscopy (x40)

### 2.2 流式细胞仪检测细胞表面标志

细胞表面 CD13 +、CD44-、CD45-、MHC II-。

### 2.3 诱导分化过程细胞形态改变

分化过程中细胞逐渐由圆形变扁平,胞核变小,胞浆变丰富,并融合,有一小部分伸出伪足(图 2)。未诱导分化组(对照组)无胰岛素分泌细胞有关基因 ngn3, nkx2. 2, pdx-1, ins2 表达。

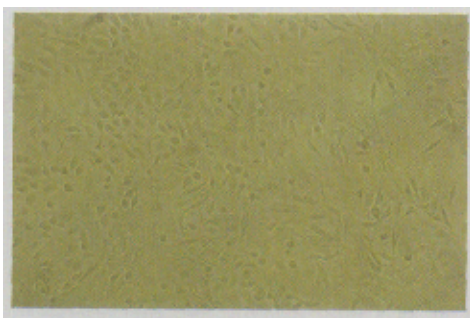


图 2 诱导分化过程细胞形态改变

Fig.2 The morphology change during differentiation

Day 14, inverted phase contrast microscopy (x40)

### 2.4 诱导分化后胰岛素分泌细胞有关基因

分化后 7 d 检测胰岛素分泌细胞 ngn3, pdx-1 基因有表达(图 3),分化后 14 d 检测胰岛素分泌细胞 nkx2. 2, pdx-1, ins2 基因有表达(图 4)。

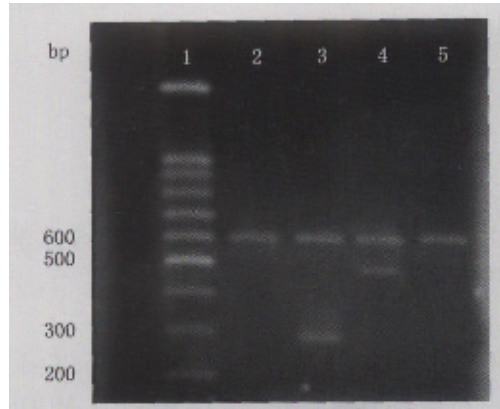


图 3 诱导分化第 7 天基因表达情况

Fig.3 The gene expression during differentiation at day 7

Lane 1: Marker; lane 2: nkx2. 2; lane 3: pdx-1; lane 4: ngn3; lane 5: insulin 2

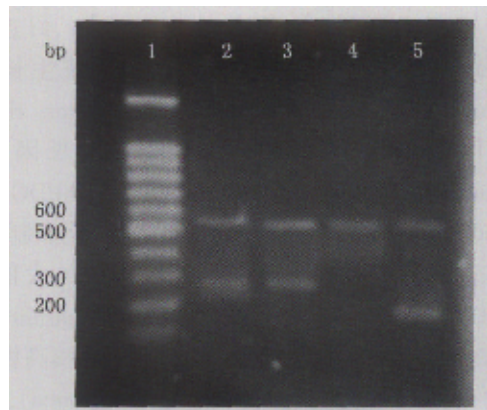


图 4 诱导分化第 14 天基因表达情况

Fig.4 The gene expression during differentiation at day 14

Lane 1: Marker; lane 2: nkx2. 2; lane 3: pdx-1; lane 4: ngn3; lane 5: insulin 2

## 3 讨论

干细胞通过诱导分化得到胰岛素分泌细胞带来了新的希望,成为近年来研究的热点。胚胎干细胞分化潜能较高,其诱导分化为胰岛素分泌细胞可能性很大。但其来源受伦理的限制,潜在的成瘤性也使人们对其应用的安全性存在疑虑。

一直以来都有很多的研究在寻找可能被诱导分化为胰岛素分泌细胞的成体干细胞细胞。其中较早、研究得较多的是胰腺导管上皮细胞。也有人在悬浮培养的 SD 大鼠、人胰腺组织中,分离出 nestin (神经巢蛋白)阳性祖细胞<sup>[2]</sup>;有报道在胰腺再生的动物模型中能分离出 ngn3 + 细胞;还有研究从肝卵圆细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞。但上述各种

细胞在体内存在的量极少,难以成为来源丰富的种子细胞。有大量的研究提示所有维持器官组织修复再生的干细胞均来源于骨髓。骨髓干细胞包括了多种干细胞成分:造血干细胞、间充质干细胞、旁群细胞等。以前一直认为造血干细胞只能分化为血细胞,而最新的研究显示它也有分化为其它各种组织细胞的能力。造血微环境由基质细胞组成。其中主要的干细胞是间充质干细胞<sup>[3]</sup>。它具有黏附特性,易分离、扩增及体外操作简单,来源丰富。现已知其在不同的理化环境和细胞因子的诱导下具有多系分化潜能,能被诱导分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞<sup>[4]</sup>及神经元样细胞<sup>[5]</sup>等。

在分离培养骨髓间充质干细胞过程中,分离出骨髓成体多能干细胞,较以往的骨髓干细胞具有更强的自我更新能力和更高的分化潜能<sup>[6]</sup>。流式细胞仪检测发现此类细胞表面CD13<sup>+</sup>、CD44<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、c-kit<sup>-</sup>、MHC I<sup>-</sup>、MHC II<sup>-</sup>,而且这类细胞能表达胚胎干细胞中存在的oct-4基因。oct-4基因在未分化的胚胎干细胞中表达,是干细胞具有多分化潜能的标志之一。本研究采用类似的培养条件,培养出来的骨髓干细胞呈类圆形,其细胞表面CD13<sup>+</sup>、CD44<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、MHC II<sup>-</sup> mRNA水平检测表达oct-4基因,具有与文献报道相类似的生物学特性,但在本研究中,多次传代,细胞形态会发生改变,有分化现象,增殖能力下降,与文献报道可传代100次以上有差异,可能与本文在原代培养后未能进行进一步筛选,以纯化细胞有关。本文中的骨髓干细胞可能包括了造血干细胞、间充质干细胞、成体多能干细胞等多种干细胞成分。

将干细胞诱导分化为具有某种特定功能的细胞,是模拟胚胎发育的过程,创造一个类似胚胎发育条件的环境。胰高糖素样多肽-1 (GLP-1)能增加pdx-1的表达<sup>[7]</sup>。很多的研究认为nicotinamide(烟酰胺)也有这样的作用。本研究采用以往在胚胎干细胞中成功诱导分化胰岛素分泌细胞的方法<sup>[8]</sup>,尝试应用于骨髓干细胞中。结果显示,在诱导分化的早期,细胞出现了ngn3、pdx-1转录因子的表达。在培养的后期,有胰岛素基因的表达。ngn3是胰腺发育过程中,早期出现的基因,是胚胎向胰腺4种内分泌细胞发育的关键因子。在胚胎发育的早期,pdx-1的表达,是胰腺开始发育的标志,在胚胎发育的后期及成体中,pdx-1基因再次表达,与维持B细

胞的功能有关。nkx2.2是胚胎发育过程中,决定向胰岛素分泌细胞分化的因子。提示骨髓干细胞有被诱导分化为胰岛素分泌细胞的可能性。

但是,能否真正诱导分化为功能更好的胰岛素分泌细胞,尚有待进一步研究。随着对胰腺发育过程了解的深入,将为优化体外诱导分化的环境提供可能。胰腺发育的过程很复杂,时间和空间上有许多的因子参与,难以真正在体外模拟一个类似的环境。建立一个有利于诱导分化的体内模型,也是今后研究的一个方向。

#### 参考文献:

- [1] Shapiro A, Lakey J, Ryan E, *et al.* Islet transplantation in patients with diabetes using glucocorticoid-free immunosuppression[J]. *New Engl J Med*, 2001, 343(4): 230-8.
- [2] 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.
- [3] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-7.
- [4] 华平,熊利华,张华,等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25(4): 68-9, 76.
- [5] 项鹏,夏文杰,王连荣,等. 丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元细胞[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(6): 321-3.
- [6] Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt K K, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-9.
- [7] Hui H, Wright C, Perfetti R, *et al.* Glucagon-like peptide 1 induce differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells[J]. *Diabetes*, 2001, 50(4): 785-96.
- [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.

(编辑 张恩健)