

· 基础研究 ·

从人胚胎胰腺中分离获得巢蛋白表达阳性的细胞*

夏修金 鲍卫汉 陈东明 洪天配^① 郑宗梅 张玲^① 陆爱丽^② 王淑玲^②

北京大学第三医院成形外科研究中心(北京, 100083)

【摘要】目的 探讨从人胚胎胰腺组织分离巢蛋白(Nestin)阳性细胞并进行体外传代培养的方法。方法 取引产的 16、18、20 周人胚胎胰腺组织,分离胰岛样细胞簇(Islet-like cell clusters, ICCs),进行体外培养。用免疫组织化学和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测巢蛋白、胰十二指肠同源盒基因-1(Pancreatic and duodenal homeobox gene-1, PDX-1/IPF-1)以及胰岛内分泌激素胰岛素和胰升糖素(Glucagon)的表达。结果 ICCs 经体外培养可获得巢蛋白表达阳性细胞,这种细胞可进一步形成球状细胞簇。除有巢蛋白阳性细胞外,还有 PDX-1、胰岛素和胰升糖素表达阳性的细胞,并且细胞可连续传代。结论 从人胚胎胰腺组织中可分离获得巢蛋白表达阳性细胞,这种细胞可在体外增殖并有向胰岛内分泌细胞分化的能力。

【关键词】胚胎 胰腺 胰腺干细胞 巢蛋白

中图分类号 R622+.9

文献标识 A

文章编号 1009-6604(2003)02-0174-03

Nestin-positive cells isolated from human fetal pancreases Xia Xiujin, Bao Weihan, Chen Dongming, et al. Research Center of Plastic Surgery, Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China

【Abstract】Objective To investigate whether nestin-positive cells can be isolated from human fetal pancreases and cultured *in vitro* for passages. Methods The islet-like cell clusters (ICCs) were isolated from pancreases of induced human fetuses at 16, 18, 20 gestational weeks and cultured subsequently. Immunohistochemical staining and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the expression of the nestin, pancreatic and duodenal homeobox gene-1 (PDX-1/IPF-1), islet endocrine hormone insulin and glucagon. Results Nestin-positive cells, which may further transform into sphere cell clusters that include PDX-1, insulin and glucagon expressing cells, as well as nestin-positive cells, were isolated from the ICCs *in vitro* and cultured with several passages. Conclusions The nestin-positive cells can be isolated from fetal pancreases, and may have the capability to proliferate and differentiate into islet endocrine cells.

【Key Words】Fetus Pancreas Pancreatic stem cell Nestin

目前,胰岛移植被认为是一种较有前景的糖尿病治疗方法。胰岛移植可以为患者提供胰岛素分泌细胞,有效地控制血糖代谢,减少和改善糖尿病的并发症,进而达到根治糖尿病的目的。但目前的分离技术,进行 1 例移植至少需要 1~2 个供体胰腺,供体严重不足是胰岛移植发展的最大障碍^[1]。理论上,胰岛干细胞可在体外大量扩增并可经诱导分化为胰岛细胞,成为解决这一问题希望所在。最近有报道从成年大鼠和成人胰岛中分离到巢蛋白表达阳性细胞,具有干细胞特性^[2],为胰岛干细胞的研究提供新思路。但迄今为止,从人胚胎胰腺分离得到巢蛋白阳性细胞尚未见报道。本研究探讨 16、18、20 周人胚胎胰腺经体外培养获得巢蛋白表达阳性细胞的可行性,这种细胞可在体外增殖并可能有一定的分化能力,从而为胰岛干细胞移植研究奠定基础。

材料和方法

一、人胚胎胰腺的来源

药物引产的人胚胎胰腺 5 例,其中 16 周 2 例、18 周 1 例、20 周 2 例。胎龄判定根据临床资料,并通过测量胚胎的头围、顶臀长、手长、脚长四组数据,查对《中国人胚胎发育时刻表》^[3]进一步确认。引产药物为米索。孕妇自愿终止妊娠,胚胎的使用得到孕妇本人同意。

二、胰岛样细胞簇(Islet like cell clusters, ICCs)的分离

无菌条件下取出胚胎胰腺,每例胰腺分别进行原代培养。去除周围组织,用 D-Hank's 液洗(3~5)次后,将组织剪碎成约 1mm³ 的小块,加入适量的 V 型胶原酶(200U/ml),

37℃ 水浴,充分震荡(3~5)分钟。加入冷的 D-Hank's 液终止消化,200 目细胞筛滤过,得到含有 ICCs 结构和其它细胞的悬液。离心去上清,加入含 10% 胎牛血清、1mmol/L 丙酮酸钠、71.5μmol/L β-巯基乙醇、20ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)、20ng/ml 表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)、100u/ml 青霉素、100ug/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基。接种到 60mm 培养皿中,37℃,5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

三、ICCs 的培养和细胞传代

ICCs 在培养条件下,有部分贴壁。吸出悬浮的 ICCs,接种到新的培养皿中。重新接种的 ICCs 结构贴壁后,形成片状的单层上皮样细胞。细胞 80% 汇合后,0.02% EDTA (Ethylenediaminetetra-acetic acid, 乙二胺四乙酸)消化,传代培养。

四、RT-PCR 反应

TRIZOL 试剂一步法提取细胞 RNA 后,用 M-MLV 逆转录试剂盒反转录成 cDNA。试剂均购于美国 Life Technologies 公司,按照操作说明书完成。PCR 反应以人 G3PDH 基因为内参照。引物的核苷酸序列和扩增产物大小为:G3PDH, 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3' 和 5' ATG TCG TTG TCC CAC CAC CT 3' 452 bp;胰岛素, 5' CAC ACC TCG TGG AAG CTC TC 3' 和 5' ACA ATG CCA CGC TTC TGC 3' 178bp;胰升糖素, 5' ATG AAC GAG GAC AAG CGC 3' 和 5' TTC ACC AGC CAA GCA ATG 3' 236bp;PDX-1, 5' GTC CTG GAG GAG CCC AAC 3' 和 5' GCA GTC CTG CTC AGG CTC 3' 360bp;巢蛋白, 5' AGC GTT GGA ACA GAG GTT GGA 3' 和 5' TGT TTC CTC CCA CCC

* 国家自然科学基金资助项目(批准号 30170443,项目类别 A)

① 内分泌科数据

② 北京大学干细胞研究中心(北京, 100083)

TGT GTC T 3' 549bps

PCR 反应条件:反应运行循环数和每个循环运行条件分别为:94℃ 30s 50℃ 30s 72℃ 30s;胰岛素 25 个循环 94℃ 1min 55℃ 1min 72℃ 1min;胰升糖素 23 个循环 94℃ 1min 59℃ 1min 72℃ 1min;PDX-1 35 个循环, 94℃ 30s 55℃ 45s 72℃ 45s;巢蛋白 35 个循环, 94℃ 30s, 55℃ 30s 72℃ 30s。PCR 产物用 1% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,凝胶成相系统照相。

五、免疫组织化学染色

1. 抗体 小鼠抗人巢蛋白抗体(1:100,美国 BD Transduction Laboratories 公司);小鼠抗人胰岛素抗体(1:200,美国 Neomarkers 公司);兔抗人胰升糖素抗体(1:500,英国 Serotec 公司);兔抗胰十二指肠同源盒基因-1(Pancreatic and duodenal homeobox gene-1, PDX-1/IPF-1)抗体(1:1000,丹麦 Hagedorn 研究所 Ole Madsen 教授惠赠)。

2. 染色 吸出球状细胞簇,切成 7μm 冰冻切片。用体积比 1:1 的丙酮甲醇溶液-20℃ 固定后, PBST (0.1M PBS PH7.4/0.3% Triton-X-100)洗净,加入 3% 双氧水(H₂O₂),孵育 30min。使用 SP1000 通用型免疫组织化学试剂盒(美国 Zymed 公司)进行免疫组化染色。羊血清工作液封闭后,加入适当体积比稀释的一抗抗体,4℃ 冰箱孵育 18h~24h。二抗为生物素标记的羊抗小鼠、兔、大鼠和豚鼠 IgG 工作液,室温孵育 30min。再加入辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育 30min。以上每步反应后均用 PBST 漂洗 5min 3 次。抗体稀释用含有 2% 牛血清白蛋白的 PBST。H₂O₂-DAB (Di-aminobenzidine tetrahydrochloride, 四盐酸 3,3'-二氨基联苯胺)

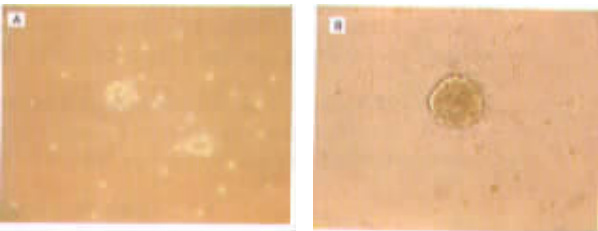


图 1 胰岛样细胞簇(Islet-like cell clusters, ICCs)的生长和球状细胞簇的形成。A:胚胎胰腺组织原代培养贴壁的 ICCs; B:典型的球状细胞簇。(×100)

表 1 球状细胞簇中巢蛋白、PDX-1 和胰升糖素阳性细胞的百分数(n=10, $\bar{x} \pm s$)

抗原	阳性细胞百分数(%)
巢蛋白	47.1 ± 12.7
PDX-1	61.5 ± 28.3
胰升糖素	35.5 ± 16.4

三、RT-PCR 检测

形成球状细胞簇的细胞中除巢蛋白外,还有胰岛素、胰升糖素、PDX-1 mRNA 的表达,而未形成空泡样结构的汇合细胞中只有巢蛋白的表达。胚胎皮肤成纤维细胞无巢蛋白的表达(图 3)。

讨 论

目前,胰岛移植主要采用内窥镜肝内门静脉直接注入的方法,手术操作简单安全,创伤小,患者即可恢复出院。2000 年加拿大 Edmonton 的 Shaprio 实验室连续 7 例胰岛移植全部取得成功,患者不依赖胰岛素的时间均超过一年^[4]。制约胰岛移植的最大障碍之一就是胰岛供体来源的严重不足,胰岛干细胞为解决这一问题提供新的思路。已有报道,从小鼠胰腺导管中分离胰岛干细胞,体外诱导后进行移植,可纠正糖尿病动物的高血糖^[5]。从成人胰腺导管中也分离到胰岛干细胞,体外培养经诱导后也有一定的功能^[6]。最近胰岛干细胞研究取得很大进展,有研究认为胰腺中巢蛋白表达阳

(体积分数为 5%)显色。苏木精复染,二甲苯透明,中性树脂封片。方法特异性阴性对照均采用 PBST 代替一抗,其余步骤相同。

3. 免疫组化染色阳性细胞计数 显微镜下随机选取十个球状细胞簇,分别计数巢蛋白、PDX-1 和胰升糖素阳性细胞的数目,同时分别计数每个球状细胞簇的总细胞数目,计算每种抗原阳性细胞的百分比。

结 果

一、人胚胎胰腺细胞的培养

人胚胎胰腺组织经部分消化,在体外培养条件下(1~2)天形成典型的 ICCs 结构,呈圆形,边界光滑的细胞簇外观(图 1A)。部分 ICCs 贴壁,其余仍维持悬浮状态。将 ICCs 吸出重新接种(1~2)天开始出现贴壁,并有上皮样细胞从其周边向外生长。随细胞的长出 ICCs 逐渐消失(3~5)天后上皮样细胞开始汇合,形成单层上皮细胞,细胞间排列紧密。经传代后,90% 细胞死亡,余细胞贴壁(5~7)天后,贴壁的细胞开始迅速增殖。经(3~5)天,细胞汇合,并在局部区域形成空泡样结构。在空泡结构一侧开始有球状细胞簇的形成(2~3)天形成典型的球状细胞簇(图 1B)。细胞已传至 13 代。

二、免疫细胞化学染色

1. 从 ICCs 结构向外周生长出的单层上皮样细胞中有巢蛋白表达阳性细胞(图 2A)。传代后的细胞为巢蛋白表达阳性细胞(图 2B)。

2. 球状细胞簇可检测到巢蛋白、PDX-1 和胰升糖素的表达。各阳性细胞所占的百分数如表 1 所示。

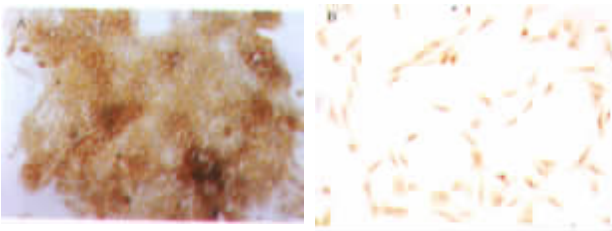


图 2 免疫细胞化学染色。A:从 ICCs 生长出的单层上皮,部分细胞巢蛋白染色阳性; B:单层上皮样细胞传代后,增殖细胞巢蛋白染色阳性。(×100)

性细胞是胰腺干细胞^[2]。

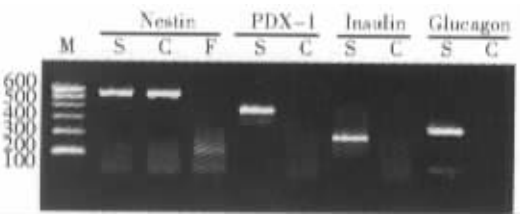


图 3 RT-PCR 检测结果。含有球状细胞簇的细胞有巢蛋白(Nestin 549bp)、胰十二指肠同源盒基因-1(PDX-1 360bp)、胰岛素(Insulin 178bp)和胰高血糖素(Glucagon 236bp)的表达,不含有球状细胞簇的细胞中只有巢蛋白表达;胚胎成纤维细胞无巢蛋白表达。M, 100bp marker; S, 含有球状的细胞簇的细胞; C, 不含有球状细胞簇的细胞; F, 胚胎成纤维细胞。

巢蛋白是细胞内一种中间丝蛋白,在神经干细胞中特异性表达。有研究证实胚胎大鼠、成年大鼠和小鼠以及成人的胰岛中有巢蛋白表达阳性的细胞亚群^[2,7];另外,成年大鼠胰腺导管的局部区域也有巢蛋白表达阳性的细胞。从成人和成年大鼠的胰岛中分离得到的巢蛋白阳性细胞在体外培养有很强的增殖能力,并有多向分化潜能,能诱导分化成为有胰腺内分泌、外分泌、导管以及肝脏细胞。

PDX-1 为一种同源结构域蛋白,是调节胰岛素和生长抑素表达的转录因子。在胰腺发育早期^[8]和部分胰腺切除后再生的胰腺中表达^[9],是胰腺发育所必需^[10]。有人认为

表达 PDX-1 而不表达胰岛素的导管细胞是胰岛内分泌细胞的祖细胞^[11]。

ICCs 是将胚胎胰腺部分消化后得到的细胞团状结构,其中含有内分泌细胞和导管细胞以及未成熟细胞^[12]。本实验从人 16、18、20 周胚胎胰腺组织中分离到 ICCs,经体外培养,免疫组织化学染色证实由 ICCs 形成的单层上皮细胞中有巢蛋白阳性表达的细胞。单层上皮细胞经传代培养,有增殖能力的细胞为巢蛋白阳性。细胞汇合后可形成球状细胞簇。经 RT-PCR 检测,证实未形成球状细胞簇之前的汇合细胞和含有球状细胞簇的细胞都有巢蛋白表达。但在含有球状细胞簇的细胞中,PDX-1 表达阳性,提示有前体细胞的存在,同时还检测到胰岛素和胰升糖素的表达,而未形成球状细胞簇的汇合细胞没有检测到,排除了其中混有胰岛 α 细胞和 β 细胞的可能,说明球状细胞簇中已经有胰岛 β 细胞和 α 细胞的分化。此外,实验中同时原代培养人胚胎皮肤成纤维细胞,RT-PCR 结果证实没有巢蛋白的表达,从而排除传代增殖汇合的细胞为成纤维细胞。免疫组织化学染色结果进一步证实球状细胞簇中有巢蛋白、PDX-1 和胰升糖素的表达,故认为含有向内分泌细胞分化能力的细胞。但是免疫组化染色没有发现胰岛素表达的细胞,分析可能是胰岛素表达阳性细胞数目较少,需要进一步的体外诱导。这种细胞在体外可反复传代 10 代以上,说明有较强的增殖能力。

我们在实验中发现(12~14)周胎龄的胰腺组织较小,每次原代培养很难得到 ICCs,可能与此期胰岛细胞刚开始分化,胰岛数目较少有关。另外,还要保证材料的新鲜,并且不能使用雷弗诺尔引产的胚胎。

上述实验方法得到的球状细胞簇数目相对较少,还需要进一步优化培养条件,并进行适当的体外诱导,以得到数目较多并且有胰岛分泌功能的球状细胞簇结构,进行体外培养诱导和体内移植研究。

综上所述,可以从人胚胎胰腺组织中初步分离到巢蛋白阳性细胞,这种细胞可在体外扩增并可能有向胰岛内分泌细胞分化的能力,从而为进一步进行胰腺干细胞的移植研究奠定基础。

参 考 文 献

- 徐刚,袁敏生.胰岛细胞移植的现状与前景.中国糖尿病杂志,2001,9:45-51.
- Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. Diabetes, 2001, 50: 521-533.
- 高摄渊.中国人胚胎发育时刻表.见:谷华运主编.中国人胚胎发育时序和畸形预防.第1版.上海:上海医科大学出版社,1993. 86-87.
- Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med, 2000, 343: 230-238.
- Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, et al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. Nat Med, 2000, 6: 278-282.
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 7999-8004.
- Hunziker E, Stein M. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 271: 116-119.
- Edlund H. Transcribing pancreas. Diabetes, 1998, 47: 1817-1832.
- Sharma A, Zangen DH, Reitz P, et al. The homeodomain protein PDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. Diabetes, 1999, 48: 507-513.
- Habener JF, Stoffers DA. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. Proc Assoc Am Physicians, 1998, 110: 12-21.
- Kritzik MR, Jones E, Chen Z, et al. PDX-1 and Msx-2 expression in the regenerating and developing pancreas. J Endocrinol, 1999, 163: 523-530.
- Otonkoski T, Knip M, Panula P, et al. Morphology, yield and functional integrity of islet-like cell clusters in tissue culture of human fetal pancreata obtained after different means of abortion. Acta Endocrinol, 1988, 118: 68-76.

(2002-05-21 收稿)

(2002-09-09 修回)