

共表达PDX1和BTC间充质干细胞对转分化胰岛素分泌细胞的影响

蒋锦杏¹ 李丽莎¹ 谢洪彬¹ 周淑艳¹ 张晓丹¹ 李富荣^{1,2} 齐 晖^{1*}

(¹暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院临床医学研究中心, 深圳 518020; ²深圳市老年医学研究所, 深圳 518020)

摘要 该文通过Tet调控下共表达PDX1与BTC的骨髓间充质干细胞系(PDX1⁺BTC⁺MSCs), 探讨PDX1和BTC共表达对骨髓间充质干细胞分化为胰岛素分泌细胞(IPCs)的效率及成熟度的影响。采用两步法对PDX1⁺BTC⁺MSCs细胞系诱导分化成IPCs, 第一步Dox诱导7天检测到Nestin、CK19表达; 第二步再诱导7天后形成DTZ染色阳性的胰岛样结构, *Ngn3*、*Nkx6.1* mRNA水平和PDX1、Insulin、Glucagon的蛋白表达阳性。分化后的IPCs在葡萄糖刺激下能产生胰岛素和C肽, 但仍不能达到正常胰岛水平。提示利用Tet-On体系调控PDX1和BTC共表达对骨髓间充质干细胞进行修饰, 能有效诱导骨髓间充质干细胞分化为胰岛素分泌细胞, 但分化成熟度仍然与天然胰岛细胞功能存在差距。

关键词 间充质干细胞; PDX1; BTC; 分化; 胰岛素分泌细胞

埃德蒙顿(Edmonton)方案在临床试用中获得突破性成功后, 胰岛移植后完全不依赖胰岛素的比例从之前的8%~10%, 提高到短期内的100%, 胰岛移植被认为是最具希望治愈糖尿病的方法之一^[1], 但供体来源的严重不足及免疫抑制剂的使用影响治疗效果和应用。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)由于取材方便、体外易大量扩增及定向诱导分化、可转分化为胰岛样细胞等优点, 成为最具可能临床治疗糖尿病的成体干细胞。但目前体外间充质干细胞转分化为胰岛样细胞的效率低, 成熟度差, 无法满足临床需求^[2]。本研究共转染胰腺发育中的两个关键转录因子, 胰腺十二指肠同源盒-1(pancreas duodenum homeobox-1, *PDX1*)基因和Betacellulin(*BTC*)基因在骨髓间充质干细胞中表达, 通过Tet-on基因表达系统进行调控, 观察对促进干细胞转分化的效率和成熟度的影响, 为糖尿病的细胞治疗提供实验基础与理论依据。

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞株

质粒pTet-On、pTRE2hyg-PDX1、pTRE2hyg-BTC和Tet调控*PDX1*和*BTC*共表达的BMMSCs细胞系(PDX1⁺BTC⁺MSCs)^[3]为本实验室前期构建鉴定后保存。

1.2 主要试剂

RPMI1640、DMEM/F12(1:1)、FBS(GIBCO), Trizol(Invitrogen), 小鼠抗insulin单克隆抗体、小鼠抗glucagon单克隆抗体、小鼠抗PDX1单克隆抗体(Santa), 兔抗CK-19单克隆抗体、兔抗nestin多克隆抗体(Chemicon), 抗体FITC标记的羊抗小鼠多抗、FITC标记的羊抗兔多抗(Jackson ImmunoResearch), CY3标记的羊抗兔多抗(Rockland), 大鼠胰岛素ELISA试剂盒、大鼠C肽ELISA试剂盒(Mercodia), PCR引物合成(上海生工), RT-PCR Kit II、Marker DL 2000(Takara), Doxycycline、Exendin-4、Activin-A、NIC、Gln、ITS、KGF、DTZ(Sigma)。

1.3 实验动物

SD雄性大鼠SPF级, 体重150~200 g, 购自广州南方医科大学实验动物中心。

1.4 PDX1⁺BTC⁺MSCs细胞系向胰岛样细胞分化

诱导分化按两步法进行。第一步基础培养基培养: DMEM, FBS 10%, HEPES 10 mmol/L。PDX1⁺

收稿日期: 2010-12-29 接受日期: 2011-01-24

国家973前期专项(No.2007CB516811, No.2004CCA01500)和广东省自然科学基金(No.6027540)资助项目

*通讯作者。Tel: 0755-25533000-2947, E-mail: qihui214@hotmail.com

BTC⁺MSCs增殖至80%~90%时, 加入1 μg/L Dox诱导7天; 第二步更换诱导分化培养基: DMEM/F12, Gln 2 mmol/L, ITS 1 g/L, KGF 10 ng/ml, NIC 10 mmol/L, Exendin-4 10 nmol/L, 葡萄糖8 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, Activin A 100 ng/ml。每3天换液一次, 定期于倒置显微镜下观察。

1.5 RT-PCR检测胰腺发育相关基因

取第一步和第二步诱导细胞, 以及常规方法分离获得的SD大鼠天然胰岛细胞^[4], Trizol提取总RNA, 使用软件Primer Premier 5.0设计胰腺相关基因PCR引物, 由上海生工合成(表1), RT-PCR反应体系和条件按说明书进行。PCR产物经2%琼脂糖电泳, 凝胶成像系统下观察结果。

1.6 免疫细胞荧光检测

不同诱导时间的PDX1⁺BTC⁺MSCs细胞用4%多聚甲醛固定10 min; 0.3% Triton X-100处理10 min; 5%的牛血清白蛋白37 ℃封闭1 h; 加入一抗, 4 ℃湿盒过夜; PBS洗5 min×3次; 加上相应的荧光标记二抗, 37 ℃作用30 min; PBS洗5 min×3次; 10 μg/ml DAPI复染细胞核5 min; PBS洗5 min×3次; 荧光显微镜下观察和摄片。

1.7 转分化胰岛素分泌细胞功能学检测

将转分化的IPCs、天然胰岛和BMMSCs分别培养于3.3 mmol/L葡萄糖的DMEM/F12+Gln(2 mmol/L)低糖培养基和16.7 mmol/L葡萄糖的高糖培养基中, 37 ℃、5% CO₂培养箱中孵育2 h后, 收集培养液, 离

表1 RT-PCR引物序列
Table 1 RT-PCR primers sequences

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences	片段长度 Augmentation length
<i>PDX1</i>	F 5'-GAG GAC CCG TAC AGC CTA CA-3' R 5'-CGT TGT CCC GCT ACT ACG TT-3'	201 bp
<i>Ngn3</i>	F 5'-CTG CGC ATA GCG GAC CAC AGC TTC-3' R 5'-CTT CAC AAG AAG TCT GAG AAC ACC AG-3'	324 bp
<i>Nkx6.1</i>	F 5'-ATG GGA AGA GAA AAC ACA CCA GAC-3' R 5'-TAA TCG TCG TCG TCC TCC TCG TTC-3'	280 bp
<i>Insulin</i>	F 5'-CCT GCC CAG GCT TTT GTC AA-3' R 5'-CTC CAG TGC CAA GTC TGAA-3'	187 bp
<i>Glut-2</i>	F 5'-TTA GCA ACT GGG TCT GCA AT-3' R 5'-GGT GTA GTC CTA CAC TCA TG-3'	342 bp
<i>β-actin</i>	F 5'-CGT AAA GAC CTC TAT GCC AA-3' R 5'-AGC CAT GCC AAA TGT CTC AT-3'	349 bp

心后取上清用ELISA试剂盒检测胰岛素和C-肽水平, 每份样品设计3孔。

1.8 统计学处理

统计方法为样本均数比较的*t*检验, 采用SPSS13.0统计学软件进行分析。

2 结果

2.1 PDX1⁺BTC⁺MSCs诱导过程中细胞形态学变化

诱导前PDX1⁺BTC⁺MSCs形态均一, 呈长梭形(图1A)。第一步诱导中, PDX1⁺BTC⁺MSCs体积较前变大, 呈多角形、鹅卵石样形态排列, 类似于胰腺上皮细胞(图1B)。第二步诱导过程中可见小圆形细胞

悬浮生长呈聚集趋势(图1C), 14天时小圆形细胞明显聚集, 可见到胰岛样细胞团。100倍镜视野下可见3~6个约50~150 μm大小的细胞团(图1D)。胰岛样细胞DTZ染色阳性(图1E), 天然胰岛为对照(图1F)。

2.2 诱导前后胰腺发育相关基因表达的检测

第一步诱导结束后RT-PCR检测到*Ngn3*和*PDX1*的表达; 第二步诱导完成后, 可见*Glut-2*、*Nkx6.1*、*Insulin* mRNA表达; 天然胰岛为阳性对照(图2)。

2.3 细胞免疫荧光染色检测相关蛋白的表达

第一步Dox诱导第7天, PDX1⁺BTC⁺MSCs Nes-tin、CK-19免疫荧光染色阳性(图3A和图3B)。两步诱导14天后, 对形成的胰岛团样结构进行免疫荧光染色, 显示PDX1和Insulin强阳性, Glucagon弱阳性

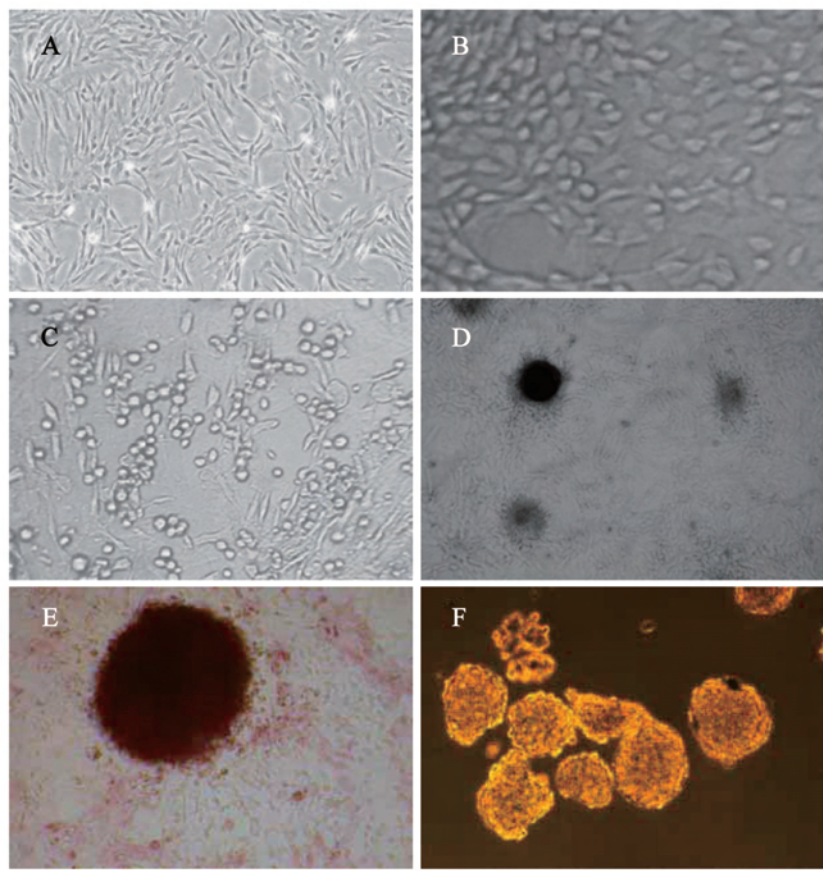


图1 PDX1⁺BTC⁺MSCs诱导过程中细胞形态学变化及DTZ染色

A: 诱导前的BMMSCs; B: 第一阶段Dox诱导7天的胰腺上皮样细胞; C: 小圆形细胞聚集; D: 诱导14天, 形成胰岛样结构; E: 胰岛样结构DTZ染色; F: 天然胰岛DTZ染色。

Fig.1 Morphologic analysis of PDX1⁺BTC⁺MSCs and DTZ staining

A: BMMSCs; B: on day 7, PDX1⁺BTC⁺MSCs appeared epithelium-like; C: on day 10, round PDX1⁺BTC⁺MSCs were aggregating; D: on day 14, islet-like spheroids were formed ; E: islet-like spheroids DTZ staining; F: pancreas islet.

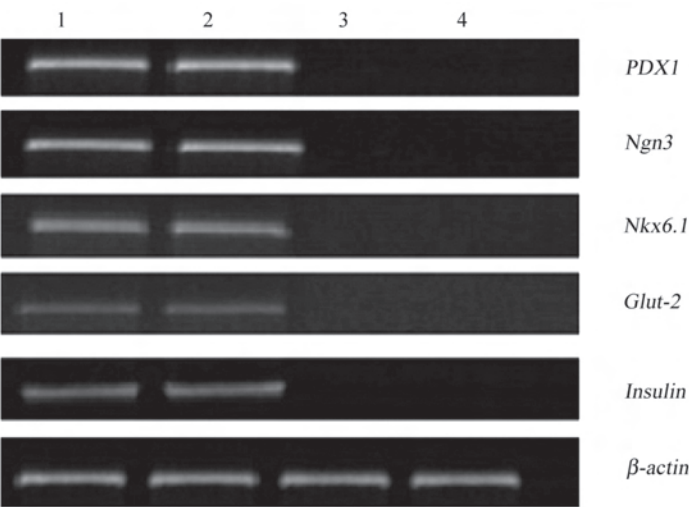


图2 RT-PCR检测相关基因mRNA的表达

1: 天然胰岛; 2: Dox诱导PDX1⁺BTC⁺MSCs; 3: 无Dox诱导的PDX1⁺BTC⁺MSCs; 4: BMMSCs; 2~4经过两步法方案诱导14天。

Fig.2 RT-PCR analysis of mRNA expression related to pancreatic differentiation on day 14

1: pancreatic islets; 2: PDX1⁺BTC⁺MSCs with Dox; 3: PDX1⁺BTC⁺MSCs without Dox; 4: BMMSCs.

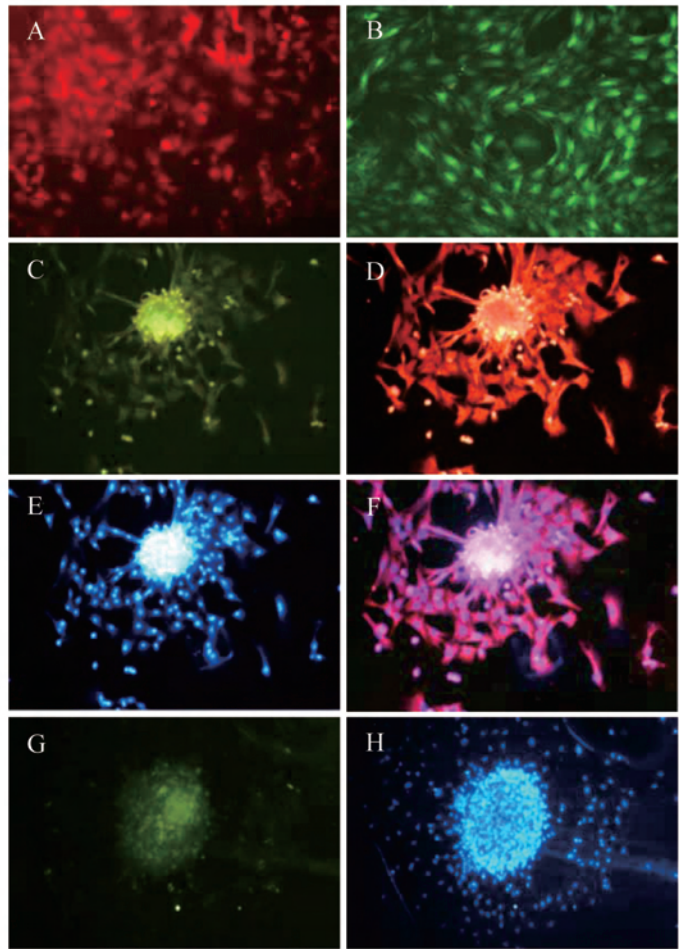


图3 细胞免疫荧光分析PDX1⁺BTC⁺MSCs胰腺相关蛋白质表达

A: Nestin; B: CK19; C: Insulin; D: PDX1; E: DAPI; F: C、D、E图叠加; G: Glucagon; H: DAPI。A和B在第一步Dox诱导的第7天，C~G在第二步分化诱导培养的第7天 (×100)。

Fig.3 Immunofluorescent analysis of proteins expression related to pancreatic development of PDX1⁺BTC⁺MSCs.

A: Nestin; B: CK19; C: Insulin; D: PDX1; E: DAPI; F: Merge of C, D and E; G: Glucagon; H: DAPI; A and B are on day 7; C to G are on day 14 (magnification ×100).

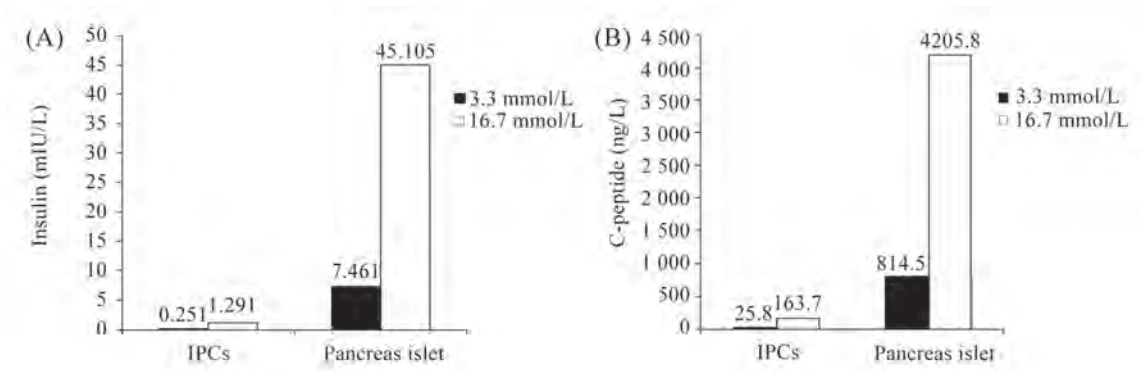


图4 葡萄糖刺激下PDX1⁺BTC⁺MSCs与天然胰岛释放的胰岛素和C肽(n=3)

A: 胰岛素(mIU/L); B: C肽(ng/L); $P<0.01$ 。

Fig.4 Insulin and C-peptide were determined in response to 3.3 mmol/L, 16.7 mmol/L glucose in PDX1⁺BTC⁺MSCs and islets by ELISA (n=3)

A: Insulin released (mIU/L); B: C-peptide released (ng/L); each value represents mean±SEM; $P<0.01$.

(图3C、图3D和图3F)。

2.4 诱导后胰岛素分泌细胞团与天然胰岛细胞功能学比较

将两步法诱导后的IPCs、天然胰岛细胞和相同方案诱导的BMMSCs细胞行葡萄糖刺激实验。胰岛素和C肽的含量随着葡萄糖浓度的增加而升高。在低糖(3.3 mmol/L)和高糖(16.7 mmol/L)刺激下, 胰岛分泌细胞团胰岛素的分泌量约为天然胰岛细胞的1/30和1/35(图4A), C肽分泌量为天然胰岛的1/32和1/26(图4B); 二者存在显著性差异($P<0.01$)。相同方案诱导的BMMSCs在低糖与高糖刺激下胰岛素和C肽分泌量非常低, 图中未标出。

3 讨论

糖尿病的治疗目前集中于细胞的替代疗法, 但面临的主要问题是供体器官短缺和免疫排斥严重。MSCs因低免疫性、易获取性及可定向诱导分化为胰岛素分泌细胞, 其作为生成胰岛素分泌细胞的来源成为可能, 为糖尿病的细胞治疗提供了新的思路^[5]。Chen等^[6]在诱导过程中先将MSCs诱导分化为Nestin阳性细胞, 再进一步诱导分化为成熟的胰岛样细胞获得成功。但其体外分化为胰岛效率及胰岛素分泌量低, 远远不能满足需要。

PDX1基因转染BMMSCs, 能提高BMMSCs体外诱导分化的定向性, 增加诱导效率。PDX1是胰腺内分泌细胞的发育过程所必需的, 促进胰腺的早期发育和较晚期 β 细胞的分化^[7]。PDX1基因转染肝细胞能诱导向胰腺前体细胞分化, 但未能表达成熟 β 细胞的相关基因, 进一步成熟为胰岛 β 细胞则需额外的因素刺激^[8]。PDX1和尼克酰胺(NIC)等多因子诱导胰岛导管细胞向胰岛 β 细胞分化, 并同时诱导Ngn3、NKX6.1、Pax4等多种重要转录因子表达^[9]。Karnieli等^[10]将PDX1转染入BMMSCs可诱导胰岛素表达和分泌, 并检测到HNF6等相关基因的表达, 但没有检测到Ngn3的表达。Yuan等^[11]则发现将PDX1转染入MSCs可检测到Ngn3的表达, 再经高糖刺激可表现为胰岛 β 细胞表型及分泌胰岛素, 且PDX1、Ngn3与胰岛素分泌的关系是平行的。PDX1基因转染的HepG 2与含BTC的分化培养基共培养后可转化为胰岛素分泌细胞, 其胰岛素mRNA的表达上调100倍^[12]。BTC是生长因子家族的成员, 胰腺中高表达, 已被证实能促进胰腺细胞的增殖和分化^[13]。Cho等^[14]

研究BTC作用时发现得到的分化细胞大多为同时表达胰高血糖素和胰岛素的多激素分泌细胞, 表现为 β 细胞不成熟, 也解释了分化细胞的胰岛素mRNA表达较正常胰岛低。本实验将PDX1和BTC共表达的BMMSCs, 在第二步诱导分化中加入尼克酰胺(NIC)、活化素(Activin)、Exendin-4^[15]等因子可促进胰岛前体细胞向胰岛素分泌细胞分化, 最终呈现较典型的胰岛样结构, 并能表现胰岛 β 细胞表型; 但分泌能力与正常胰岛相比仍旧偏低, 可能原因依然是 β 细胞成熟度不够。RT-PCR的结果显示两步法诱导的PDX1⁺ BTC⁺MSCs与BMMSCs相比, 有Ngn3、NKX6.1及Insulin的表达, 表明PDX1和BTC共表达在诱导骨髓间充质干细胞向胰岛素分泌细胞分化过程具有重要作用。

应用Tet-On基因表达系统, 能有效调控基因PDX1和BTC表达的时间和水平, 共表达PDX1、BTC对BMMSCs修饰后能有效提高Nestin表达, 分化培养基可诱导其进一步分化成熟分泌胰岛素。此方法能提高胰岛样细胞的产生效率, 有望为治愈糖尿病的细胞替代疗法提供新思路。但目前所获得的胰岛素分泌细胞团的功能仍不能达到天然胰岛水平, 如何改善转分化条件, 提高转分化后细胞的分泌功能, 是未来研究的主要方向之一。

参考文献(References)

- 1 Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, *et al.* Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343(4): 230-8.
- 2 Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim YS, Kim SB, Kim CW. *In vitro* trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330(4): 1299-305.
- 3 Li L, Li F, Qi H, Feng G, Yuan K, Deng H, *et al.* Coexpression of Pdx1 and betacellulin in mesenchymal stem cells could promote the differentiation of nestin-positive epithelium-like progenitors and pancreatic islet-like spheroids. *Stem Cells Dev* 2008; 17(4): 815-23.
- 4 李富荣, 邓春艳, 王新根, 齐 晖, 任莉莉, 周汉新. 骨髓间充质干细胞联合胰岛移植对受体鼠树突状细胞成熟和功能的影响. *细胞与分子免疫学杂志* 2010; 26(7): 646-9.
- 5 董学君, 孙 荷, 张国荣, 项黎新, 潘若浪, 陈 烨, 等. 骨髓间充质干细胞的多向分化潜能研究进展. *中国细胞生物学学报* 2010; 32(1): 49-55.
- 6 Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mes-

- enchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10(20): 3016-20.
- 7 Le Lay J, Stein R. Involvement of PDX-1 in activation of human insulin gene transcription. *J Endocrinol* 2006; 188(2): 287-94.
 - 8 Cao LZ, Tang DQ, Horb ME, Li SW, Yang LJ. High glucose is necessary for complete maturation of Pdx1-VP16-expressing hepatic cells into functional insulin-producing cells. *Diabetes* 2004; 53(12): 3168-78.
 - 9 Zhang T, Wang H, Saunee NA, Breslin MB, Lan MS. Insulinoma-associated antigen-1 zinc-finger transcription factor promotes pancreatic duct cell trans-differentiation. *Endocrinology* 2010; 151(5): 2030-9.
 - 10 Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S. Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells* 2007; 25(11): 2837-44.
 - 11 Yuan H, Li J, Xin N, Zhao Z, Qin G. Expression of Pdx1 mediates differentiation from mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. *Mol Biol Rep* 2010; 37(8): 4023-31.
 - 12 Li WC, Horb ME, Tosh D, Slack JM. *In vitro* transdifferentiation of hepatoma cells into functional pancreatic cells. *Mech Dev* 2005; 122(6): 835-47.
 - 13 Dahlhoff M, Dames PM, Lechner A, Herbach N, van Bürck L, Wanke R, *et al.* Betacellulin overexpression in transgenic mice improves glucose tolerance and enhances insulin secretion by isolated islets *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 299(2): 188-93.
 - 14 Cho YM, Lim JM, Yoo DH, Kim JH, Chung SS, Park SG, *et al.* Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic beta-cell differentiation in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366(1): 129-34.
 - 15 Li H, Lam A, Xu AM, Lam KS, Chung SK. High dosage of Exendin-4 increased early insulin secretion in differentiated beta cells from mouse embryonic stem cells. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 31(5): 570-7.

Studies on Coexpression of PDX1 and Betacellulin in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiating into Insulin-secreting Cells

Jin-Xing Jiang¹, Li-Sha Li¹, Hong-Bin Xie¹, Shu-Yan Zhou¹, Xiao-Dan Zhang¹, Fu-Rong Li^{1,2}, Hui Qi^{1*}

(¹Clinical Medical Research Center, Second Clinical Medical College Shenzhen People's Hospital, Jinan University, Shenzhen 518020, China; ²Shenzhen Institute of Gerontology, Shenzhen 518020, China)

Abstract Replacement of β cells by islet transplantation is a novel therapy for diabetes. Mesenchymal stem cells have been proved to be multipotent. This study evaluate the differentiating ability of rat MSCs into insulin-secreting cells by co-expression of PDX1 and BTC. PDX1 is a transcription factor involved in the early endocrine development. Betacellulin (BTC) is a growth factor involved in beta-cell maturation. Co-expression of PDX1 and BTC significantly increased the number of nestin-positive epithelium-like progenitors and islet-like spheroids which differentiated from BMMSCs, and the levels of *Insulin* and *Glut-2* mRNA were elevated significantly. In response to glucose, Pdx1⁺BTC⁺MSCs released insulin and C-peptide, but low compared with normal islets. It is concluded that genetic manipulation of Pdx1 and BTC by Tet-on system in combination with appropriate differentiating culture could induce BMMSCs into the pancreatic lineage *in vitro* and produce islet-like spheroids that could secrete increased levels of insulin in response to glucose. However, compared with the natural pancreas islet, insulin and C peptide secretion was still insufficient.

Key words mesenchymal stem cells; pdx1; BTC; co-expression; differentiation; insulin-secreting cells

Received: December 29, 2010 Accepted: January 24, 2011

This work was supported by the 973 Special Plan of China (No.2004CCA01500) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.6027540)

*Corresponding author. Tel: 86-755-25533000-2947, E-mail: qihui214@hotmail.com