

体外诱导脐血间充质干细胞向胰岛 β 样细胞分化的初步研究

迟作华 陆 琰¹ 张 涸^{1*}

(广东药学院临床医学院附属第一医院血液内科, 广州 510310; ¹暨南大学医学院血液病研究所, 广州 510632)

摘要 探讨脐血间充质干细胞能否在体外向胰岛 β 样细胞分化, 并探索其诱导条件。在无菌条件下采集正常产妇脐血, 用羟乙基淀粉沉淀法分离脐血中的有核细胞, 进而采用贴壁筛选法获得脐血间充质干细胞。纯化后的脐血间充质干细胞用表皮生长因子、 β -巯基乙醇、高糖、激活素 A 和肝细胞生长因子进行诱导。观察诱导后的细胞形态变化, 采用胰岛素免疫荧光染色对诱导后的细胞进行鉴定, 定量检测胰岛素分泌水平及其对葡萄糖刺激的反应性。结果发现, 经过诱导后, 细胞形态发生明显变化, 形态变圆而且聚集成团; 诱导后细胞的胰岛素免疫荧光染色为阳性; 而且细胞能分泌少量胰岛素, 并对糖刺激具有反应性。由此提示, 在体外, 脐血间充质干细胞具有向胰岛 β 样细胞分化的潜能。

关键词 脐血; 间充质干细胞; 分化; 胰岛; 糖尿病

成体干细胞的分化潜能是目前干细胞研究领域的热点之一。利用成体干细胞的可塑性, 将其定向诱导为胰岛样细胞, 可以为细胞移植治疗糖尿病提供新的种子细胞来源。最近的研究表明, 小鼠骨髓贴壁细胞, 大鼠骨髓间充质干细胞以及人骨髓间充质干细胞在体外都具有向胰岛素分泌细胞分化的潜能^[1-3]。最近的研究证实, 脐血中除了富含造血干细胞, 也含有多潜能干细胞——间充质干细胞。脐血中的间充质干细胞与骨髓间充质干细胞不仅在形态和细胞表面标志方面十分相似, 而且都具有非常相似的分化潜能, 可以向内、中、外三个胚层的组织细胞分化^[4-6]。与其他成体干细胞相比, 脐血间充质干细胞来源丰富, 易于采集保存, 采集过程对产妇及新生儿均不造成伤害, 不涉及伦理问题, 免疫源性相对较低, 外源性污染少, 因而更具有研究价值。目前, 干细胞 β 样细胞分化的研究报道较多, 但未见脐血间充质干细胞向胰岛 β 样细胞分化的研究报道。因此, 本实验旨在探讨脐血间充质干细胞能否在体外向胰岛 β 样细胞分化, 为进一步的动物实验和临床研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 分离培养扩增脐血间充质干细胞

无菌条件下采集 40~100 ml 孕 32~41 周顺产或剖宫产的胎儿脐血, 20 U/ml 肝素抗凝, 孕妇无传染性疾病, 胎儿无畸形, 并征得家属及孕妇同意。培

养及鉴定方法参照文献^[7]。

1.2 体外向胰岛 β 样细胞诱导

细胞培养至 3 代, 细胞达 70%~80% 汇合后开始诱导。移出旧培养基, 用含有 10 ng/ml EGF、1 mmol/L β -巯基乙醇的 DMEM/F12 (不含 FBS) 诱导 7 天; 7 天后移出旧培养基, 用 PBS 洗涤两次, H-DMEM 培养基添加 3 ng/ml 活化素 A (activin A) (Pepro Tech 公司) 和 10 ng/ml HGF (Pepro Tech 公司) 继续诱导, 倒置相差显微镜下观察细胞诱导后的形态变化。

1.3 诱导细胞的胰岛素免疫荧光染色

收获诱导培养的细胞(0.25% 胰蛋白酶溶液消化细胞), PBS 洗涤 1 次。将细胞悬液滴于预处理过的玻片上, 均匀涂片, 快速风干, -20°C 预冷甲醇固定 15 min, PBS 洗涤 1 次。0.1% Triton X-100、3% H_2O_2 温育 10 min, 阻断内源性过氧化物酶。山羊非免疫血清室温封闭 20 min, 倾去血清, 加一抗(兔抗胰岛素多克隆抗体 1:150 稀释, Santa Cruz 公司), 4°C 过夜, PBS 洗涤。加山羊抗兔 -Cy3 荧光抗体(1:50, Sigma)室温作用 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。10 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst33258 均匀覆盖细胞面, 室温作用 10~15 min, 蒸馏水冲洗 3 次, 每次 5 min。缓冲甘油封片, 在

收稿日期: 2007-10-15 接受日期: 2008-01-14

国家自然科学基金(No.0670902)、广东省自然科学基金(No.06300546)、广东药学院博士科研启动基金(No.2006LCY03)资助项目

* 通讯作者。Tel: 020-85226787, E-mail: tzyuan@jnu.edu.cn

荧光显微镜下以351 nm, 568 nm分别激发Hoechst33258和Cy3, 并拍照, 以仪器内部软件将二者进行合图。阴性对照组用PBS代替一抗, 其他操作相同。

1.4 化学发光免疫分析法检测胰岛素分泌水平

取未诱导脐血间充质干细胞的培养上清液及诱导至35~40天形成胰岛样细胞团的培养上清, -20℃保存待测。用化学发光免疫分析法(试剂盒及仪器均来自Abbott AxSYM System)检测各培养上清液中胰岛素含量, 按说明书进行操作。

1.5 胰岛素释放

诱导至35~40天的胰岛样细胞团, 去除旧培养基, 用PBS洗涤2次, 加入无血清L-DMEM(含5.5 mmol/L

葡萄糖), 温育2 h后取上清液; 移出L-DMEM, PBS洗涤1次, 加入无血清H-DMEM(含25 mmol/L葡萄糖), 温育2 h取上清液, -20℃保存待测。用化学发光免疫分析法(试剂盒及仪器均来自Abbott AxSYM System)检测各上清中胰岛素含量, 按说明书进行操作。

2 结果

2.1 脐血间充质干细胞诱导前后的形态变化

原代细胞多数呈梭形, 平行排列, 局部形成漩涡状排列, 混有圆形细胞, 原代培养时间在30~50天左右; 传代后生长速度加快, 5~8天传代一次; 传至第3代细胞形态比较均一, 呈长梭形, 折光性好(图1A)。

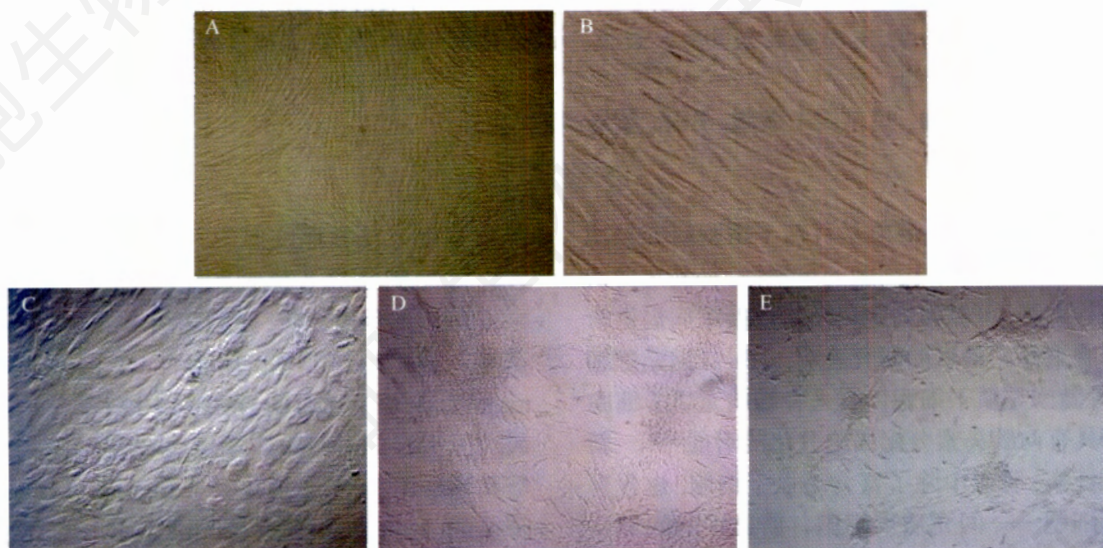


图1 脐血间充质干细胞诱导前后的形态变化(100×)

A: 第3代的脐血间充质干细胞, 形态均一, 呈长梭形, 平行排列或漩涡状排列; B: 经EGF、 β -巯基乙醇诱导后, 大部分细胞立体感增强, 由长梭形变为短梭形; C: 改用无血清并添加活化素A和HGF, 诱导至10天左右, 细胞表现为胞体缩小, 胞质向核周收缩, 由原来的梭形变为圆形; D: 继续诱导至14~16天, 细胞开始出现聚集; E: 细胞继续聚集, 形成胰岛样细胞团。

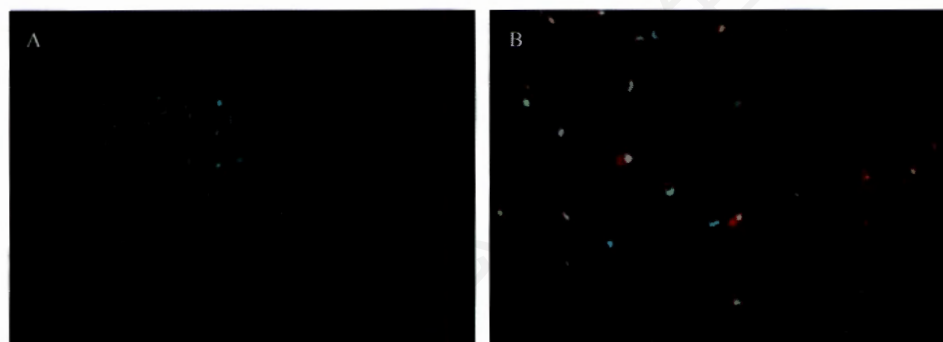


图2 细胞诱导前后的胰岛素免疫荧光染色(200×)

A: 未诱导的细胞仅见细胞核呈蓝色荧光, 未见胞浆有红色Cy3阳性荧光信号; B: 诱导后的细胞可见部分细胞胞浆呈红色Cy3荧光信号, 为胰岛素阳性表达。

表1 化学发光免疫分析法检测胰岛素分泌水平及胰岛素释放

	上清液中胰岛素分泌水平($\mu\text{U/ml}$)*	胰岛素释放($\mu\text{U/ml}$) [#]	
		5.5 mmol/L 葡萄糖	25 mmol/L 葡萄糖
未诱导	0	0	0
诱导后	0.43 $\pm$ 0.15	0.47 $\pm$ 0.15	0.97 $\pm$ 0.23

* $n=3$, [#] $n=3$ 。

经第一阶段诱导一小部分细胞漂浮死亡,大部分细胞立体感增强,折光性增强,由长梭形变为短梭形(图1B);第二阶段改用无血清并添加活化素A和HGF,诱导至10天左右,细胞表现为胞体缩小,胞质向核周收缩,由原来的梭形变为圆形,折光性增强(图1C);继续诱导至14~16天,细胞开始出现聚集(图1D);20天左右出现胰岛样细胞团(islet-like clusters, ILCs),数量在40个左右(图1E);35~40天左右细胞团的数量可增加至70~100个左右。

2.2 胰岛素免疫荧光结果

诱导后的细胞进行胰岛素免疫荧光染色,可见其细胞浆中胰岛素染色阳性,胞浆中有很强的Cy3红色荧光信号(图2B);未诱导组仅见细胞核被Hoechst33258染成的淡蓝色荧光信号,胞浆无红色Cy3荧光信号(图2A)。

2.3 化学发光免疫分析法检测胰岛素分泌水平及胰岛素释放

脐血间充质干细胞的培养上清液中检测不到胰岛素,经过诱导分化后的胰岛样细胞团可检测到一定量的胰岛素,分泌胰岛素浓度为(0.43 $\pm$ 0.15) $\mu\text{U/ml}$ (表1)。诱导后的细胞分别经25 mmol/L和5.5 mmol/L葡萄糖刺激2 h后,刺激指数为2.1,说明对葡萄糖的刺激均有反应(表1)。

3 讨论

由以上实验结果可知,经过诱导后,细胞发生明显的形态变化,逐渐变圆并聚集成团,形成胰岛样细胞团。诱导后的细胞经胰岛素免疫荧光染色检测,呈阳性反应。而且,诱导后的细胞能分泌少量胰岛素,并对糖刺激具有一定的反应性。

目前,对干细胞定向诱导分化为胰岛素分泌细胞一般可选择三种诱导策略:(1)基因工程改造细胞;(2)改变细胞生存的微环境;(3)转基因方法和体外诱导结合。在本实验中,我们采用了第2种策略,通过添加一些对细胞生长或者分化有作用的细胞因子,营养物质,或者化学物质等进行诱导。

EGF作为一种生长因子对多种表皮细胞和上皮

细胞的生长有刺激作用,参与损伤的修复,EGF信号途径通过c-erbB受体发挥作用。 β -巯基乙醇是常用还原剂,有抗氧化作用,可以促进谷胱甘肽的合成,清除氧自由基,难以培养的细胞在培养过程中加入小量的 β -巯基乙醇可以提高培养成功的几率,有人甚至认为它可部分替代血清的作用。常常被用来作为向神经细胞的诱导分化剂,本课题组的研究人员在几年前已经通过视黄酸(RA)和 β -巯基乙醇联合将人及小鼠胎肝间充质干细胞诱导分化为神经细胞,在此我们利用这两种成分组合来诱导其向胰岛 β 样细胞分化,应用7天后,细胞变得很有立体感,似乎是外界的某种信号改变了细胞,但细胞究竟发生了何种改变,我们尚不清楚,具体的作用机制尚有待进一步研究。

另外,据文献报道活化素A是一种TGF超家族的细胞因子^[8,9],对细胞的增殖、分化、凋亡都起着重要作用,活化素A和它的受体在胚胎和成体的多种细胞中表达,如胰岛的 α 和 δ 细胞,活化素A和Betacellulin或HGF合用可以将胰腺外分泌细胞系AR42J转化为胰岛素产生细胞,可以诱导人胎儿胰腺内分泌细胞的分化,所有这些发现均支持活化素A在 β 细胞的分化发育中起重要作用,因此我们经过第一步的诱导后,第二步诱导改用无血清培养并添加10 ng/ml HGF和3 ng/ml活化素A继续诱导,发现细胞分化过程加快,诱导至10天左右,细胞表现为胞体缩小,胞质向核周收缩,35天左右细胞团的数量可达70~100个。

而且,在我们的诱导过程中发现,血清浓度大于5%时,细胞以增殖为主,很难将其进行定向分化,因此用无血清,或者低浓度血清进行诱导,Zalzman等^[10,11]先后在两篇文章中探讨过血清对转染了胰腺十二指肠同源框1(pancreatic duodenal homobox 1, PDX-1)基因的人胎儿肝细胞向胰岛样细胞分化能力的影响,认为无血清培养对胰岛细胞的分化绝对是必须的,血清完全抑制培养人胰岛芽(cultivated human islet buds, CHIBs)的形成。这可能是由于血清成分复杂,含有多种生长因子或者分化因子,在细胞分化过程中很难进行准确控制。

综上所述, 我们的实验初步证实了脐血间充质干细胞在体外具有向胰岛 β 样细胞分化的潜能, 为胰岛细胞移植提供了丰富的种子细胞来源。但是经诱导后的细胞分化效率低, 而且分化后的细胞并不成熟。在下一步的实验研究中, 我们考虑采用转基因方法和体外诱导相结合, 加快细胞诱导进程, 提高分化效率, 而且促进分化后的细胞更为成熟。

参考文献(References)

- [1] Tang DQ *et al.* *Diabetes*, 2004, **53**: 1721
- [2] Choi KS *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **330**: 1299
- [3] 李艳华等。 *自然科学进展*, 2003, **13**: 593
- [4] Hong SH *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **330**: 1153
- [5] Gang EJ *et al.* *Stem Cells*, 2004, **22**: 617
- [6] Fu YS *et al.* *J Biomed Sci*, 2004, **11**: 652
- [7] 迟作华等。 *基础医学与临床*, 2006, **26**: 319
- [8] Yasuda H *et al.* *Endocrinology*, 1993, **133**: 624
- [9] Demeterco C *et al.* *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, **85**: 3892
- [10] Zalzman M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 7253
- [11] Zalzman M *et al.* *Diabetes*, 2005, **54**: 2568

Preliminary Study on the Induction of Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells into Pancreatic Islet β -like Cells *in Vitro*

Zuo-Hua Chi, Yan Lu¹, Yuan Zhang^{1*}

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital, Medical College, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, China; ¹Institute of Hematology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood were induced with epidermal growth factor (EGF), β -mercaptoethanol, high concentration of glucose, activin A and hepatocyte growth factor (HGF). Insulin in the treated cells was examined by immunofluorescence. In addition, the quantity of insulin secretion and glucose-stimulated insulin release were examined by chemiluminescence immunoassay. Results demonstrated that most of the cells exhibited the change of morphology and produced islet-like cell clusters. Immunofluorescence assay showed insulin positive expression in the induced cells. In addition, chemiluminescence immunoassay demonstrated that induced cells had the reaction to the stimulation of high glucose. Therefore MSCs derived from umbilical cord blood have the potential to be differentiated into islet β -like cells *in vitro*.

Key words umbilical cord blood; mesenchymal stem cells; differentiation; islet; diabetes

Received: October 15, 2007 Accepted: January 14, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.0670902), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.06300546) and the Doctor Research Foundation of Guangdong Pharmaceutical University (No.2006LCY03)

*Corresponding author. Tel: 86-20-85226787, E-mail: tzyuan@jnu.edu.cn