

大鼠骨髓间充质干细胞培养、鉴定与成胰岛样 β 细胞诱导

王鹤霏 任宇 呼啸 张飞旭 李晓聪 仓明 刘东军*

(内蒙古大学国家动物转基因技术研究中心, 呼和浩特 010070)

摘要 为治疗糖尿病寻找新的胰岛 β 细胞替代物, 该研究对大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)进行了体外分离培养、鉴定及成胰岛样 β 细胞诱导。应用全骨髓离心贴壁培养法分离大鼠BMSCs, 进行培养、传代、表面标志物检测, 利用DMSO和高糖环境对BMSCs进行胰岛样 β 细胞诱导。结果显示, 大鼠BMSCs体外培养细胞形态呈成纤维细胞样, 可以稳定传代; CD13、CD44和CD106表达呈阳性, CD49d呈阴性。在成胰诱导条件下, BMSCs可形成胰岛样圆形细胞团, 双硫腙染色呈棕红色, PDX1(pancreatic duodenal homeodomain 1)、CK19(cytokeratin 19)、巢蛋白、胰岛素免疫组化染色均呈阳性; 经RT-PCR检测发现, 成胰诱导后的BMSCs中表达胰岛素、PDX1和glucagon基因; 经q-PCR检测发现, 成胰诱导后的BMSCs中胰岛素mRNA水平是大鼠胰腺成体干细胞(pancreas adult stem cells, PASCs)的1.09倍($P>0.05$); 同时, 有相应量的胰岛素合成。结果表明, 分离得到大鼠BMSCs体外生长稳定, 能转分化为胰岛样细胞, 该研究结果为糖尿病治疗提供了新的实验依据。

关键词 骨髓间充质干细胞; 体外分离培养; 细胞鉴定; 成胰岛 β 细胞分化

Cultivation, Identification and Islet β Cells Induction of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Rats

Wang Hefei, Ren Yu, Hu Xiao, Zhang Feixu, Li Xiaocong, Cang Ming, Liu Dongjun*

(National Research Center for Animal Transgenic Bio-technology, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China)

Abstract To find new substitution of islet β cells for treating diabetes, rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated, cultured, identified and induced into islet β cells *in vitro*. Isolation of rat BMSCs by the whole bone marrow centrifugation and adherence method, then BMSCs were cultured, subcultured, detected cell surface markers and induced into islet β cells by DMSO and high glucose environment. The results showed that the morphology of BMSCs was fibroblast like, with active passage ability. CD13, CD44 and CD106 antigens were detected, but CD49d antigen was negative. Under the condition of islet β cells induction, BMSCs could form islet-like round cell mass, dithizone staining was brownish red, PDX1, CK19, nestin and insulin antigens were positive using immunohistochemistry staining. BMSCs induction into islet β cells expressed insulin, PDX1 and glucagon

收稿日期: 2016-01-25 接受日期: 2016-03-17

转基因生物新品种培育重大专项(批准号: 2014ZX08008-002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4992553, E-mail: nmliudongjun@sina.com

Received: January 25, 2016

Accepted: March 17, 2016

This work was supported by the Major Projects for New Varieties of Genetically Modified Organisms (Grant No.2014ZX08008-002)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4992553, E-mail: nmliudongjun@sina.com

网络出版时间: 2016-05-19 16:58:50

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160519.1658.004.html>

detected by RT-PCR. The expression quantity of insulin mRNA in differentiated BMSCs was 1.09 times ($P>0.05$) than that of in pancreas adult stem cells (PASCs) detected by q-PCR. At the same time, differentiated BMSCs had the corresponding expression of insulin protein. The results demonstrated that rat BMSCs grow stably *in vitro*, and can be converted into islet-like cells, providing new experimental basis for diabetes treatment.

Keywords bone marrow mesenchymal stem cell; cell separation and cultivation *in vitro*; cell identification; islet β cells differentiation

糖尿病是一种代谢紊乱疾病,主要分为I型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)、II型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)以及其他原因引起的继发性糖尿病。国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)的调查显示,全世界糖尿病患者预计到2030年将达到5.52亿^[1]。T1DM是胰岛β细胞渐进破坏引起胰岛素缺乏和高血糖症的自身免疫性疾病^[2-3]。因此,针对T1DM保护胰岛β细胞免于破坏,寻找新方法替代胰岛β细胞尤为重要。

胰岛移植有望治愈T1DM^[4-5],但供体不足和免疫排斥限制了其应用于糖尿病的临床治疗。BMSCs具有取材方便、不被异体免疫排斥的特点,是有多向分化潜能和良好植入组织能力的成体干细胞^[6-11],已逐渐成为胰岛β细胞替代物的新资源和干细胞移植治疗糖尿病的主要种子细胞。BMSCs能诱导分化为胰岛素分泌细胞^[12-15],在体内归巢到受损伤组织从而修复组织^[16],在糖尿病治疗方面具有无限潜力^[17-20]。Bhansali等^[21]研究表明,自体骨髓间充质干细胞移植(autologous bone marrow-derived stem cell transplantation, ABMSCT)使得糖尿病患者对胰岛素剂量需求显著降低,并伴随C-肽水平提高。同时,BMSCs在受伤器官的功能修复作用中日益显著。Li等^[22]将BMSCs胰内移植入T1DM模型中触发了一系列分子和细胞事件,包括BMSCs直接朝着胰腺分化,以营造微环境触发内源胰腺再生,改善了由链脲佐菌素(streptozocin, STZ)引起的低胰岛素血症和高血糖症。本研究体外分离大鼠骨髓间充质干细胞,并对其进行定向分化为胰岛β细胞,为利用骨髓间充质干细胞治疗糖尿病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用试剂有:DMEM/F12培养基(SH30023.01B,

Hyclone公司)、FBS(SH30079.03, Hyclone公司)、青链霉素(SV30010, Hyclone公司)、I型胶原酶(C0130, Sigma公司)、DMEM Low Glucose(10567-014, Gibco公司)、4.5 g/L D-Glucose DMEM(1×)(11965-092, Gibco公司)、Dithizone(D5130, Sigma公司)、DMSO(042-21765, Wako公司)、DAPI(D9542, Sigma公司)、FITC(ab97050, Abcam公司)、抗胰岛素抗体(H-86)(sc-9168, Santa Cruz公司)。

1.2 仪器及实验动物

实验所用仪器有:倒置(荧光)显微镜(Observer. A1, ZEISS公司)、q-PCR仪(CFX Manager V2.1, Bio-Rad公司)、共聚焦显微镜(A1R, Nikon公司)。

5~6周龄Wistar大鼠购自内蒙古大学国家动物转基因技术研究中心。

1.3 BMSCs分离培养、传代及鉴定

1.3.1 BMSCs原代分离培养 颈椎脱臼法将5~6周龄Wistar大鼠处死,75%乙醇全身浸泡消毒。无菌条件取股骨,含2×青链霉素(20 000 U/mL青霉素; 20 000 μg/mL链霉素)的PBS清洗3~4次。剪掉股骨的骨骺端,露出骨髓腔,用添加1×青链霉素(10 000 U/mL青霉素; 10 000 μg/mL链霉素)和20% FBS的DMEM/F-12(1:1)培养基冲出骨髓(3~4次),反复吹打;将冲出的骨髓制成单细胞悬液,2 000 r/min离心8 min,弃上清,重悬沉淀并将细胞悬液接种于100 mm培养皿中,置37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养。原代培养过程中,48 h后全量更换培养基,以后每3 d全量更换新鲜培养基。

1.3.2 BMSCs传代培养 待细胞密度长至70%~80%汇合时,用0.25%胰蛋白酶消化,按1:2的比例进行传代培养。

1.3.3 BMSCs表面标志鉴定 免疫组织化学法检测细胞表面标志物:将P3代生长状态良好的细胞接种于24孔板中,当细胞密度达80%后,首先加入

4%多聚甲醛室温进行固定, 30 min后更换为渗透液(0.5% Triton X-100), 室温渗透1 h, 接着加入封闭液(PBS+2% BSA+10%山羊封闭血清)室温封闭1 h, 然后各孔依次分别滴加1:200的CD13(兔抗大鼠多克隆抗体, BA0718, 武汉博士德生物工程有限公司)、CD44(兔抗大鼠多克隆抗体, BA0321, 武汉博士德生物工程有限公司)、CD106(兔抗大鼠多克隆抗体, BA0406, 武汉博士德生物工程有限公司)和CD49d(兔抗大鼠多克隆抗体, BA1640, 武汉博士德生物工程有限公司), 同时设置阴性对照组(不加一抗), 37 °C孵育1 h。将多余的一抗清洗(PBS+2% BSA)干净后, 加入1:300山羊抗兔FITC标记二抗37 °C孵育1 h。最后, 清洗二抗(PBS+2% BSA)并使用DAPI复染细胞核。共聚焦显微镜观察细胞染色情况。

1.4 BMSCs成胰岛样β细胞诱导及检测

1.4.1 BMSCs成胰岛样β细胞诱导 取P3代的BMSCs, 待其汇合度达到80%~90%时, 首先在含1% DMSO的DMEM Low Glucose培养基中诱导3 d, 然后在含10% FBS的4.5 g/L D-Glucose DMEM培养基中诱导7 d, 完成胰岛样β细胞诱导。诱导过程在37 °C、5% CO₂饱和湿度培养箱中进行。

1.4.2 双硫腍染色 用10 mg/mL的双硫腍贮存液(双硫腍粉末溶于DMSO中, 充分溶解后1 000 r/min离心5 min, 保留上清作为工作液, 过滤并分装贮存于-20 °C), 按照100:1(培养基:贮存液)的比例向培养基中加入双硫腍贮存液, 置37 °C孵育30 min, 弃去培养基, 用PBS洗3次, 显微镜下观察细胞着色情况。

1.4.3 免疫组化鉴定成胰岛样β细胞诱导后PDX1、CK19、巢蛋白和胰岛素基因的表达 将诱导后的

BMSCs进行免疫组织化学法检测4种抗体: PDX1、CK19、巢蛋白和胰岛素, 共聚焦显微镜观察细胞染色情况。

1.4.4 RT-PCR RNAiso试剂(TaKaRa公司)裂解成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs, 氯仿抽提总RNA溶于无酶水(无DNA酶、无RNA酶)中, 利用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA进行PCR。引物由大连宝生物公司合成(表1)。PCR参数: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性5 s, 52 °C退火5 s, 72 °C延伸10 s, 43个循环; 72 °C延伸5 min, 4 °C保存。

1.4.5 q-PCR 根据NCBI提供的大鼠胰岛素基因的mRNA序列(*Rattus norvegicus insulin*), 设计一对跨内含子的特异性引物, 引物由TaKaRa公司合成(表2)。在不同细胞中, 使用q-PCR分析胰岛素基因的mRNA水平。以2^{-ΔΔCt}法分析相对差异, 其中以P3代PASCs的胰岛素基因mRNA水平为正常校准样本, 以诱导后的BMSCs为实验样本, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)为内参基因。Ct值为每个反应管内荧光信号达到设定阈值时经历的循环数。

q-PCR反应体系为: 10 μL SYBR green I mixture (TaKaRa公司), 0.8 μL正反引物混合液, 2 μL模板DNA, 7.2 μL ddH₂O。反应程序: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 57 °C 30 s, 50个循环。通过溶解曲线判断是否有唯一的产物峰。

1.4.6 Western blot 诱导后的BMSCs提取细胞总蛋白作为Western blot的实验材料(同时PASCs提取细胞总蛋白作为对照), 用Lowry法测定蛋白质浓度, 上样量为(45 μg/孔)。蛋白质经SDS-聚丙烯酰胺凝胶

表1 RT-PCR引物
Table 1 Primers used in RT-PCR

引物名称 Primer name	引物顺序(5'→3') Primer sequence (5'→3')	大小(bp) Size (bp)
<i>GAPDH</i>	Forward: TGA ACG GGA AGC TCA CTG G	360
	Reverse: TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	
<i>Insulin</i>	Forward: TAC AAT CAT AGA CCA TCA GCA	235
	Reverse: CAG TTG GTA GAG GGA GCA GAT	
<i>PDX1</i>	Forward: TAC AAG CTC GCT GGG ATC ACT	268
	Reverse: GCA GTA CGG GTC CTC TTG TT	
<i>Glucagon</i>	Forward: GAC CGT TTA CAT CGT GGC GG	199
	Reverse: CGG TTC CTC TTG GTG TTC ATC AAC	

表2 q-PCR引物
Table 2 Primers used in q-PCR

引物名称 Primer name	引物顺序(5'→3') Primer sequence (5'→3')	大小(bp) Size (bp)
GAPDH	Forward: GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G	143
	Reverse: ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA	
Insulin	Forward: AGC GTG GCA TTG TGG ATC AG	117
	Reverse: TCA AAG GCT TTA TTC ATT GCA GAG G	

电泳分离后转移到硝酸纤维素膜(NC膜)上(200 mA 电流, 室温转膜2 h), 剪下带有相应蛋白Marker条带的膜, 用含5%脱脂奶粉的TBS-T室温封闭2 h, 将稀释后的一抗胰岛素(H-86, sc-9168, Santaz公司)敷于膜上, 4 ℃过夜。清洗一抗(TBS-T)后, 1:10 000加入山羊抗兔IgG-HRP(ab136817, Abcam公司), 室温孵育1 h, 清洗二抗(TBS-T)后, 用ECL化学发光反应进行显色。在暗室中将X光片放入膜上曝光, 再进行显影、定影反应。将胶片进行扫描, 用ImageJ软件测定蛋白条带灰度, 复制数据到Excel表中分析蛋白表达量差异。

1.5 统计学分析

所有数据均进行至少3次独立实验, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据分析用SPSS 17.0统计分析软件。组间比较选用LSD法, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

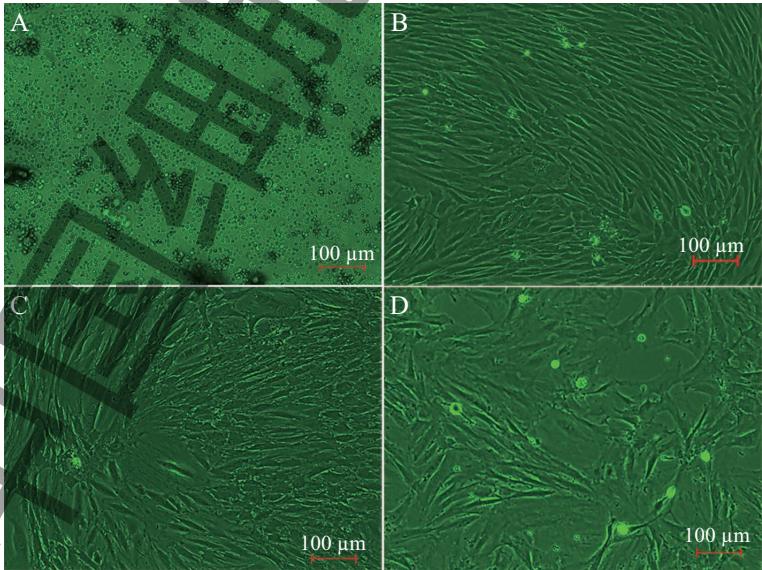
2 结果

2.1 BMSCs形态特征

刚接种的BMSCs细胞呈圆形, 6~8 h后开始贴壁, 细胞呈纺锤状或类圆形, 大小不均匀。48 h后细胞基本完成贴壁, 换液清除大量悬浮的造血干细胞, 4 d后部分区域形成集落, 细胞呈成纤维细胞样, 随后集落逐渐扩展, 8~10 d后细胞达到80%~90%汇合度。传代后, BMSCs很快贴壁, 刚传代细胞生长迅速, 形态以梭形为主, 经过2、3次传代后, 细胞呈放射状或平行排列, 形态趋于一致(图1A~图1D)。

2.2 BMSCs成胰岛样β细胞诱导后形态特征

BMSCs在含1% DMSO的DMEM Low Glucose培养基中诱导3 d后, 细胞形态无明显变化, 仍为梭形或多角形, 细胞核清晰可见。在含10% FBS的4.5 g/L D-Glucose DMEM培养基中诱导3 d后, 细胞开始发

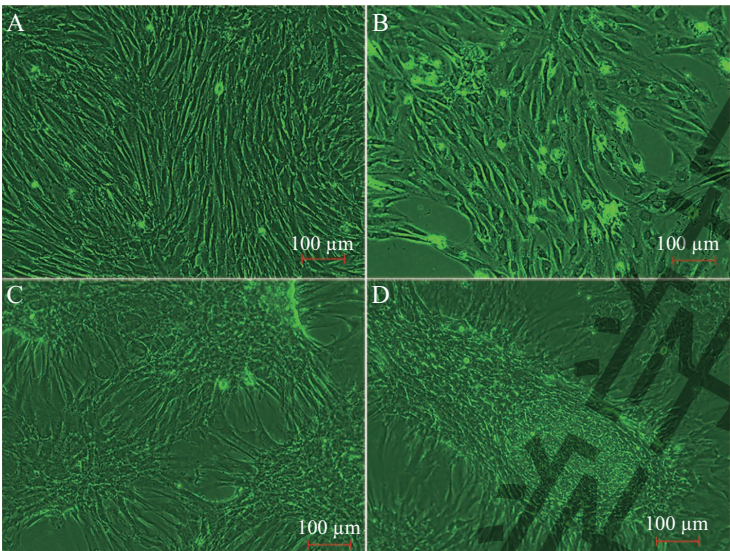


A: 刚分离大鼠BMSCs; B: 原代大鼠BMSCs; C: P2代大鼠BMSCs; D: P7代大鼠BMSCs。

A: separated rat BMSCs; B: primary rat BMSCs; C: P2 rat BMSCs; D: P7 rat BMSCs.

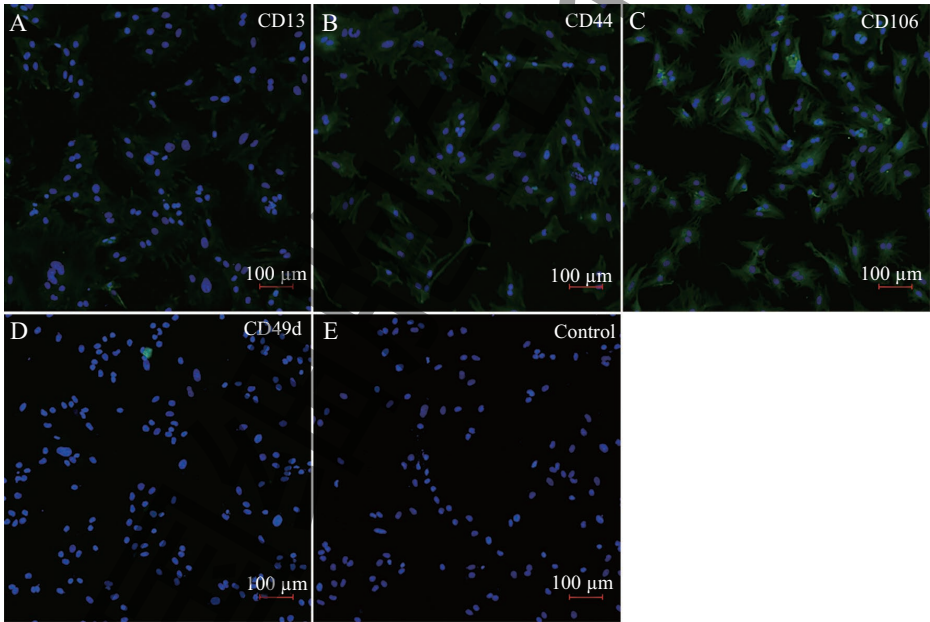
图1 BMSCs的形态观察

Fig.1 Morphology of rat BMSCs



A: 成胰岛β细胞诱导前的大鼠BMSCs; B: 低糖DMEM诱导3 d后; C: 高糖DMEM诱导3 d后; D: 高糖DMEM诱导7 d后。
A: pre-induction differentiation of rat BMSCs into islet β-cells; B: induced with DMEM low glucose after three days; C: induced with 4.5 g/L D-Glucose DMEM after three days; D: induced with 4.5 g/L D-Glucose DMEM after seven days.

图2 成胰岛样β细胞诱导后BMSCs的形态观察
Fig.2 Morphology of rat BMSCs induced islet β cells

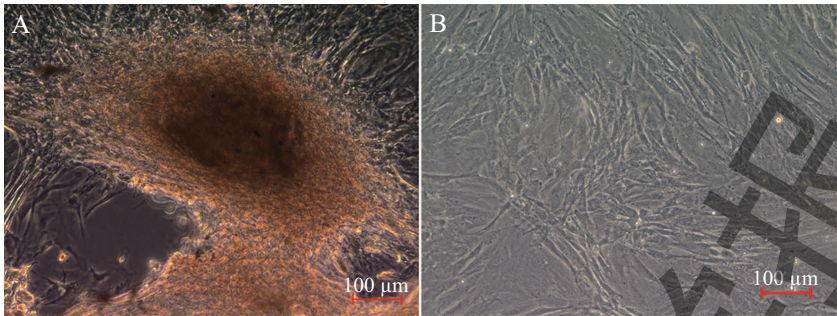


A: 大鼠BMSCs免疫组化染色CD13; B: 大鼠BMSCs免疫组化染色CD44; C: 大鼠BMSCs免疫组化染色CD106; D: 大鼠BMSCs免疫组化染色CD49d; E: 对照组。
A: CD13 staining of rat BMSCs; B: CD44 staining of rat BMSCs; C: CD106 staining of rat BMSCs; D: CD49d staining of rat BMSCs; E: control group of rat BMSCs.

图3 BMSCs免疫组织化学染色结果
Fig.3 Results of rat BMSCs by immunofluorescence staining

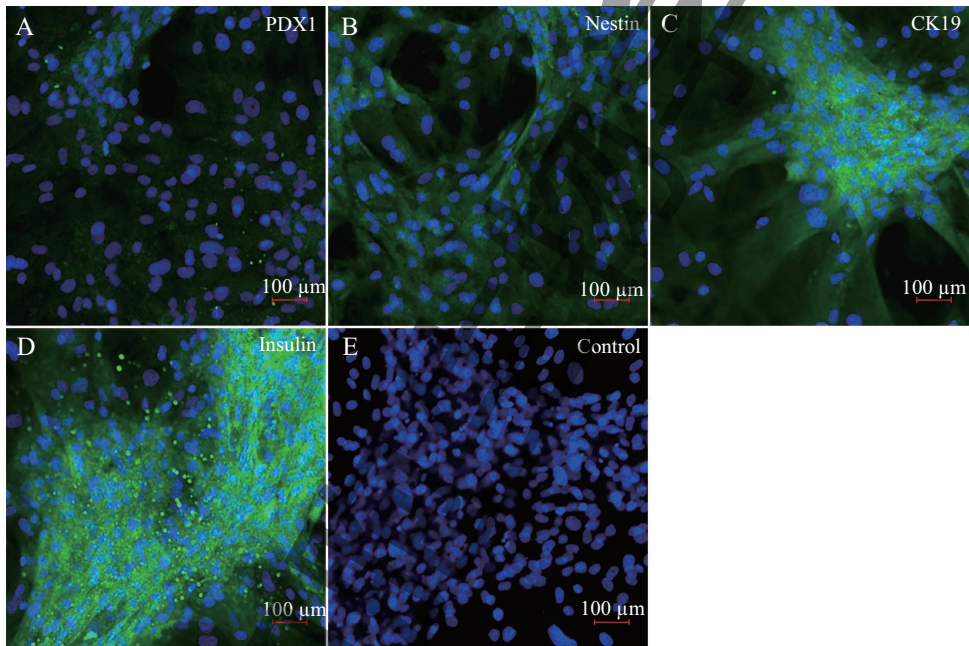
生聚集现象, 诱导5 d后, 细胞生长密集, 出现圆形细胞团, 折光性明显增强。到达7 d后, 大部分细胞形成细胞团(图2A~图2D)。

2.3 BMSCs表面标志鉴定
P3代BMSCs中4种表面标志物CD13、CD44和CD106均呈阳性, 且CD13表达量较弱, CD106表达量



A: 大鼠BMSCs成胰岛β细胞诱导; B: 大鼠BMSCs。
A: rat BMSCs induced islet β cells; B: rat BMSCs.

图4 BMSCs的双硫脲染色
Fig.4 Dithizone staining of BMSCs



A: 大鼠BMSCs成胰岛β细胞诱导后免疫组化染色PDX1; B: 大鼠BMSCs成胰岛β细胞诱导后免疫组化染色巢蛋白; C: 大鼠BMSCs成胰岛β细胞诱导后免疫组化染色CK19; D: 大鼠BMSCs成胰岛β细胞诱导后免疫组化染色胰岛素; E: 对照组。
A: PDX1 staining of induced differentiation of rat BMSCs into islet β-cells; B: Nestin staining of induced differentiation of rat BMSCs into islet β-cells; C: CK19 staining of induced differentiation of rat BMSCs into islet β-cells; D: insulin staining of induced differentiation of rat BMSCs into islet β-cells; E: control group of induced differentiation of rat BMSCs into islet β-cells.

图5 BMSCs成胰岛样β细胞诱导后免疫组织化学染色
Fig.5 Results of rat BMSCs induced islet β cells by immunofluorescence staining

较强, CD49d呈阴性。以不加一抗为对照组细胞, 对照组染色呈阴性(图3A~图3E)。说明本实验中分离到较纯的BMSCs。

2.4 BMSCs成胰岛样β细胞诱导的检测

2.4.1 双硫脲染色 BMSCs经成胰岛样β细胞诱导后, 经双硫脲染色, 光学显微镜下观察发现, 大部分细胞团被染成棕红色, 表明细胞胞质中富含锌离子, 证明胰岛素分泌细胞的存在(图4A)。阴性对照

BMSCs经双硫脲染色后, 没有被染成棕红色(图4B)。

2.4.2 免疫组化 BMSCs成胰岛样β细胞诱导后, PDX1、CK19、巢蛋白和胰岛素4种抗体染色均呈阳性, 且PDX1表达量较弱, CK19、巢蛋白和胰岛素表达量较强, 不加一抗的对照组呈阴性(图5A~图5E)。以上结果说明, BMSCs已成功向胰岛样β细胞转分化。

2.4.3 BMSCs成胰岛样β细胞诱导后胰岛素、PDX1

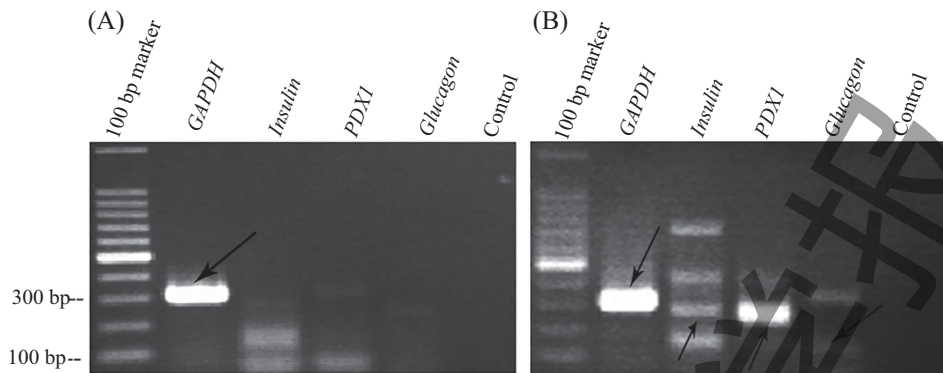


图6 BMSCs和BMSCs成胰岛样β细胞诱导后的电泳结果

Fig.6 Electrophoresis of rat BMSCs (A) and BMSCs induced islet β cells (B)

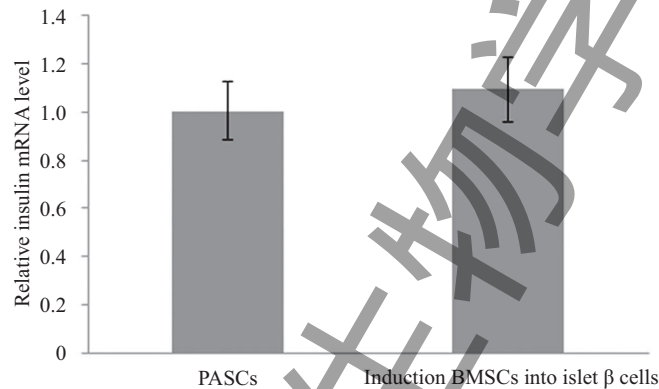


图7 PASCs与成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs胰岛素基因的mRNA水平

Fig.7 The insulin mRNA levels in rat PASCs and BMSCs induced islet β cells

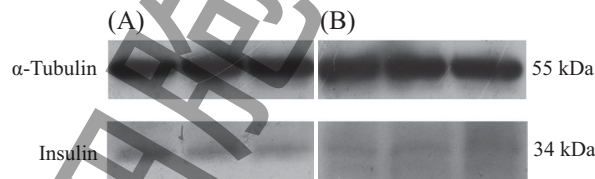


图8 成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs(A)与PASCs(B)胰岛素蛋白水平

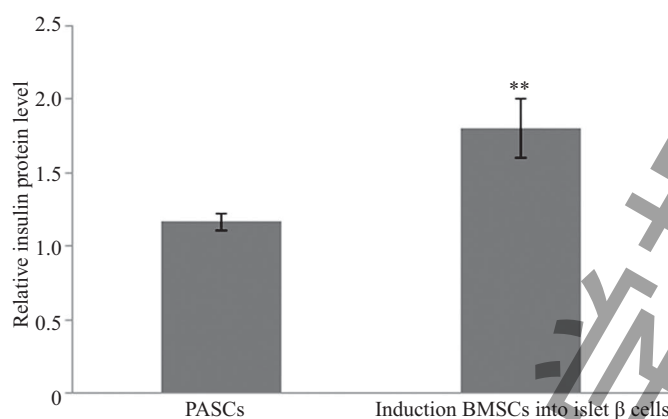
Fig.8 Insulin protein levels in rat BMSCs induced islet β cells (A) and PASCs (B)

和glucagon基因的表达 RT-PCR结果显示, 普通培养的BMSCs中只表达GAPDH, 胰岛素、PDX1、glucagon基因均无明显条带, 阴性对照组没有条带(图6A)。而在成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs中, GAPDH、胰岛素、PDX1和glucagon基因均有表达, 阴性对照组没有条带(图6B)。结果表明, BMSCs已成功向胰岛样β细胞转分化, 表达标志基因胰岛素、PDX1和glucagon。

2.4.4 胰岛素基因在成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs和PASCs中mRNA的水平 实时定量PCR结果显示, 成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs中胰岛

素基因mRNA表达量为PASCs的1.09倍($P>0.05$)(图7)。结果表明, 成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs较PASCs的胰岛素基因的mRNA表达量差异不显著, 即二者之间胰岛素基因的mRNA水平相对强度相似。

2.4.5 Western blot Western blot结果表明, PASCs与成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs均表达α-Tubulin和胰岛素(图8), 胰岛素含量相对高低为成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs大于PASCs($P<0.01$)(图9)。此结果表明, 成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs可合成胰岛素, 且含量较PASCs高。



** $P < 0.01$, 与PASCs组比较。

** $P < 0.01$ vs PASCs group.

图9 PASCs与成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs中胰岛素含量比较

Fig.9 Comparison of insulin levels in rat PASCs and BMSCs induced islet β cells

3 讨论

BMSCs是具有自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞^[23-26]。本研究采用贴壁培养方法分离纯化BMSCs, 经免疫组化分析显示, CD13、CD44和CD106表达阳性, CD49d呈阴性, 与文献报道一致^[14,27], 表明分离到较纯的BMSCs。BMSCs能体外诱导分化产生胰岛素分泌细胞, 表达多种胰岛β细胞发育和功能相关的基因^[12,14,28]。胰腺十二指肠同源盒1(pancreatic duodenal homeodomain 1, PDX1)是胰岛分化发育的关键转录因子^[29], PDX1表达下调会导致胰岛素分泌减少^[30]。细胞角质蛋白19^[31]和巢蛋白(Nestin)^[32]是胰腺干细胞标志物。胰岛素(insulin)是由胰岛β细胞产生的调节血糖水平的重要激素。Takemitsu等^[33]研究表明, 共转染PDX1、Beta2和Mafa可诱导犬BMSCs中胰岛素产生。我们通过DMSO和高糖环境对BMSCs进行成胰岛样β细胞诱导^[14], 大部分细胞形成圆形细胞团, 且被双硫腙染成棕红色, 证明胰岛素分泌细胞的存在。BMSCs成胰岛样β细胞诱导后表达PDX1、CK19、巢蛋白和胰岛素, 同时表达相应标志基因*insulin*、*PDX1*、*glucagon*, 与前人研究结果一致, 说明BMSCs已成功向胰岛样β细胞分化。

本实验实时定量PCR结果表明, 成胰岛样β细胞诱导后的BMSCs中胰岛素mRNA水平为PASCs的1.09倍。Western blot结果表明, 诱导后的BMSCs可合成胰岛素, 且表达量较PASCs高。Chen等^[28]在含

尼克酰胺和β-巯基乙醇的条件下, 将BMSCs分化为胰岛样细胞团, 高糖刺激下可分泌微弱的胰岛素。本研究在mRNA和蛋白质水平检测到胰岛素基因表达, 是否在胰岛素分泌量方面有所变化, 还有待进一步研究。

虽然有不同的BMSCs向胰岛细胞分化的体外诱导方法^[15,34], 而我们应用的诱导方法相对经济、简单和快速, 在今后的研究中可在此方法的基础上向BMSCs中导入一些调控胰岛发育的基因^[35], 同时检测细胞外的胰岛素分泌量, 探讨BMSCs体外分化为胰岛β细胞的机制, 从而使之更加完善。Mehrjarjam等^[36]研究显示, 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)可利用新生小鼠胰腺提取物(mouse neonate pancreas extract, MPE)产生胰岛素分泌细胞(insulin producing cells, IPCs), 表达β细胞相关基因*PDX1*、*INS1*、*INS2*、*EP300*和*CREB1*, 并发现FOXA2和TCF7L2转录因子的相互作用; DNA-PK复合物、KAT2B与PDX1、CREB1、EP300相互作用, 导致诱导成IPCs并产生胰岛素。

本研究体外分离、培养、鉴定大鼠BMSCs, 通过DMSO和高糖环境对BMSCs进行成胰岛样β细胞诱导, 同时在mRNA和蛋白质水平检测成胰岛样β细胞分化后的BMSCs表达胰岛素, 进一步完善了这项简单而经济的诱导方法。本研究结果不但可以为今后利用BMSCs治疗糖尿病动物模型提供细胞来源, 也为糖尿病的临床治疗提供了新的实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Alam U, Asghar O, Azmi S, Malik RA. General aspects of diabetes mellitus. *Handb Clin Neurol* 2014; 126: 211-22.
- 2 Iancu AD, Stăvaru C. Double transgenic mice—a suitable model for studying oxidative stress in type 1 diabetes mellitus. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2012; 71(4): 201-20.
- 3 Morgan MA, Muller PS, Mould A, Newland SA, Nichols J, Robertson EJ, *et al.* The nonconventional MHC class II molecule DM governs diabetes susceptibility in NOD mice. *PLoS One* 2013; 8(2): e56738.
- 4 Pileggi A, Cobianchi L, Inverardi L, Ricordi C. Overcoming the challenges now limiting islet transplantation: A sequential, integrated approach. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1079: 383-98.
- 5 Nanji SA, Shapiro AM. Advances in pancreatic islet transplantation in humans. *Diabetes Obes Metab* 2006; 8(1): 15-25.
- 6 Encina NR, Billotte WG, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma. *Lab Invest* 1999; 79(4): 449-57.
- 7 Kirana S, Stratmann B, Lammers D, Negrean M, Stirban A, Minartz P, *et al.* Wound therapy with autologous bone marrow stem cells in diabetic patients with ischaemia-induced tissue ulcers affecting the lower limbs. *Int J Clin Pract* 2007; 61(4): 690-2.
- 8 Phinney DG. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: Clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle* 2007; 6(23): 2884-9.
- 9 Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008; 2(4): 313-9.
- 10 Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells* 2007; 25(11): 2896-902.
- 11 Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, *et al.* Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 9): 1827-35.
- 12 Jahr H, Bretzel RG. Insulin-positive cells *in vitro* generated from rat bone marrow stromal cells. *Transplant Proc* 2003; 35(6): 2140-1.
- 13 Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; 111(6): 843-50.
- 14 Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, LaPlante JM, Hatch HM, Petersen BE. Adult bone marrow-derived cells transdifferentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest* 2004; 84(5): 607-17.
- 15 Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, *et al.* *In vivo* and *in vitro* characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes* 2004; 53(7): 1721-32.
- 16 da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 11): 2204-13.
- 17 Najafi R, Sharifi AM. Deferoxamine preconditioning potentiates mesenchymal stem cell homing *in vitro* and in streptozotocin-diabetic rats. *Expert Opin Biol Ther* 2013; 13(7): 959-72.
- 18 Chhabra P, Brayman KL. Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: From hype to hope. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2(5): 328-36.
- 19 Tsai PJ, Wang HS, Lin CH, Weng ZC, Chen TH, Shyu JF. Intraportal injection of insulin-producing cells generated from human bone marrow mesenchymal stem cells decreases blood glucose level in diabetic rats. *Endocr Res* 2014; 39(1): 26-33.
- 20 Hao H, Liu J, Shen J, Zhao Y, Liu H, Hou Q, *et al.* Multiple intravenous infusions of bone marrow mesenchymal stem cells reverse hyperglycemia in experimental type 2 diabetes rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 436(3): 418-23.
- 21 Bhansali A, Asokumar P, Walia R, Bhansali S, Gupta V, Jain A, *et al.* Efficacy and safety of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized placebo-controlled study. *Cell Transplant* 2014; 23(9): 1075-85.
- 22 Li L, Li F, Gao F, Yang Y, Liu Y, Guo P, *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells improves type 1 diabetes mellitus. *Cell Tissue Res* 2016; 364(2): 345-55.
- 23 Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(19): 10711-6.
- 24 Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85(3): 221-8.
- 25 Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, *et al.* Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401(6751): 390-4.
- 26 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, *et al.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109(10): 1291-302.
- 27 Lévesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 2001; 98(5): 1289-97.
- 28 Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10(20): 3016-20.
- 29 Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, *et al.* Multipotent nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001; 50(3): 521-33.
- 30 Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patané G, Laybutt R, *et al.* Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic

- beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 1999; 274(20): 14112-21.
- 31 Piper K, Brickwood S, Turnpenny LW, Cameron IT, Ball SG, Wilson DI, *et al.* Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J Endocrinol* 2004; 181(1): 11-23.
- 32 Hunziker E, Stein M. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271(1): 116-9.
- 33 Takemitsu H, Zhao D, Ishikawa S, Michishita M, Arai T, Yamamoto I. Mechanism of insulin production in canine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Gen Comp Endocrinol* 2013; 189: 1-6.
- 34 Shakhov VP, Popov SV, Kokarev OV, Afanas'ev SA. *In vitro* formation of mesenchymal bone marrow islets. *Bull Exp Biol Med* 2004; 137(6): 625-7.
- 35 Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, Savatier P, Bosco D, *et al.* Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation *in vitro*. *Stem Cells* 2005; 23(4): 594-603.
- 36 Mehrfarjam Z, Esmaili F, Shabani L, Ebrahimie E. Induction of pancreatic β cell gene expression in mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2015; doi: 10.1002/cbin.10567.