

DMSO联合高糖体外诱导兔骨髓间充质干细胞 分化为胰岛样细胞的研究

于文浩 王亚丹 虎 啸 张 宁 薛永康 朱邯豫 赵玉玺 王新庄*

(河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

摘要 该研究旨在探索二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO)联合高糖体外诱导日本大耳白兔(*Lepus brachyurus*)骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)分化为胰岛样细胞的可行性及其调控机制。采用不含血清的DMSO联合高糖诱导P3代兔BMSCs分化为胰岛样细胞。倒置显微镜下观察细胞的形态变化; 双硫腙染色和免疫荧光染色检测细胞分化; RT-qPCR检测胰岛细胞相关基因 [*Foxa2*(forkhead box A2)、*Nestin*(neuroepithelial stem cell protein)、*Pax6*(paired box gene 6)、*Pdx-1*(pancreatic duodenal homeobox-1)、胰岛素]的表达, 并以诱导培养前(0 d)细胞、兔骨髓细胞、P3代BMSCs和胰腺组织中胰岛细胞相关基因表达情况作为参照。结果表明, *Foxa2*、*Nestin*和*Pax6*基因不能作为兔BMSCs向胰岛样细胞诱导分化成功的标志基因。DMSO能够激活*Pdx-1*基因的表达, 促进兔BMSCs分化为可分泌胰岛素的胰岛前体细胞。高糖能够促进兔BMSCs分化为胰岛样细胞, 并可显著促进*Pdx-1*和*Foxa2*基因的表达。

关键词 兔; 骨髓间充质干细胞; 二甲基亚砷; 高糖; 分化; 胰岛样细胞

Study of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiating into Islet-Like Cells by DMSO Combined with High Glucose *In Vitro*

Yu Wenhao, Wang Yadan, Hu Xiao, Zhang Ning, Xue Yongkang, Zhu Hanyu, Zhao Yuxi, Wang Xinzhuang*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract The aim of this study was to explore the feasibility and regulation mechanism of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) differentiating into islet-like cells. Rabbit BMSCs were induced into islet-like cells by dimethyl sulphoxide (DMSO) combined with high glucose and without serum. The morphological changes of cells were observed under the inverted microscope. The differentiated cells were detected by dithizone (DTZ) staining and immunofluorescence staining. The changes of the expression of islet cell related genes [*Foxa2* (forkhead box A2), *Nestin* (neuroepithelial stem cell protein), *Pax6* (paired box gene 6), *Pdx-1* (pancreatic duodenal homeobox-1), *Insulin*] were detected by RT-qPCR, and the expression of islet cell related genes in cells before induction (0 d), rabbit bonemarrow cells, P3 BMSCs and rabbit pancreatic tissues were used as references. The results showed that *Foxa2*, *Nestin* and *Pax6* genes couldnot be used as the marker genes for rabbit BMSCs differentiating into islet-like cells successfully. DMSO could activate the expression of

收稿日期: 2016-05-13 接受日期: 2016-09-14

国家高新技术研究发展计划(863计划)(批准号: 2008AA101010)和河南省基础与前沿技术研究计划基金(批准号: 092300410081)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0371-63558180, E-mail: happywang169@sohu.com

Received: May 13, 2016 Accepted: September 14, 2016

This work was supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No.2008AA101010) and the Foundation and Advanced Technology Research Program of Henan Province of China (Grant No.092300410081)

*Corresponding author. Tel: +86-371-63558180, E-mail: happywang169@sohu.com

网络出版时间: 2016-11-18 14:24:38

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161118.1424.002.html>

Pdx-1 and promote rabbit BMSCs to differentiate into islet precursor cells which can secrete insulin. High glucose could promote rabbit BMSCs to differentiate into islet-like cells and could significantly promote the expression of *Pdx-1* and *Foxa2* genes.

Keywords rabbit; BMSCs; DMSO; high glucose; differentiation; islet-like cells

糖尿病是由于胰岛素相对缺乏或绝对缺乏而引起的高血糖为主要特征的一种营养代谢病^[1-2], 严重危害人类健康。目前, 临床上主要通过注射胰岛素或口服降糖药物来治疗糖尿病, 但都无法从根本上治愈糖尿病, 不能避免一系列并发症的发生, 还会产生一定的副作用并引起胰岛素抵抗, 给患者带来痛苦, 对家庭和社会造成沉重负担。胰腺移植或胰岛移植是治疗糖尿病的重要手段, 但胰腺移植手术创伤大, 移植后并发症发生率和死亡率高; 胰岛的功能会在胰岛移植后半年到几年内逐渐消失, 并且胰腺移植或胰岛移植存在供体不足和免疫排斥的问题^[3]。近年来, 大量的研究表明, 骨髓间充质干细胞在特定的条件下可以分化为胰岛素分泌细胞, 分化后的胰岛素分泌细胞移植入糖尿病动物模型后可有效降低其血糖水平, 从而达到治疗糖尿病的目的^[4-5]。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是成体干细胞的一种, 具体来说, 是一类来自于骨髓中的具有高度增殖能力及多向分化潜能的非造血干细胞。BMSCs取材方便、易于体外培养、免疫原性低、避免了利用胚胎干细胞涉及的伦理道德问题和诱导性多潜能干细胞存在的技术安全性问题, 且具有多向分化潜能^[6]。Jahr等^[4]使用尼克酰胺诱导大鼠BMSCs分化为胰岛素分泌细胞。Tang等^[5]将小鼠BMSCs分别于低糖和高糖环境中培养2~4个月, 然后加入尼克酰胺和enendin4分别诱导7 d和5~7 d, 最终证实终末分化细胞为胰岛素分泌细胞, 并发现长期处于高糖环境中有利于BMSCs向胰腺内分泌细胞分化。

本研究选用DMSO(dimethyl sulphoxide)联合高糖于体外诱导兔BMSCs向胰岛样细胞分化, 观察诱导过程中细胞的形态变化, 双硫腍染色和细胞免疫荧光染色鉴定分化细胞类型, RT-qPCR检测诱导过程中胰岛细胞相关基因表达的变化。其中, 以P3代兔BMSCs和胰腺组织中胰岛细胞相关基因表达情况作为参照, 探讨DMSO联合高糖体外诱导兔BMSCs分化为胰岛样细胞的调控机制, 为充分利用兔BMSCs作为细胞学研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

1月龄雄性日本大耳白兔5只(购自河南省实验动物中心)。

1.2 主要试剂

胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司。DMEM/F12干粉培养基、H-DMEM培养液购自Gibco公司。DMSO、4%多聚甲醛、Triton X-100、正常山羊血清、DAPI染核剂、抗荧光衰减淬灭剂购自Solarbio公司。生物素标记山羊抗兔IgG、HRP标记链霉亲和素、DAB显色试剂盒、改良型苏木素购自北京华肽先锋生物科技有限公司。兔抗兔CD34、CD44、CD90抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。生物素标记的山羊抗兔IgG、FITC标记的山羊抗小鼠IgG购自北京鼎国生物技术有限公司。双硫腍染色剂购自Sigma公司。小鼠抗兔胰岛素抗体购自Novus公司。逆转录试剂盒、DL500 DNA Marker、荧光定量酶购自TaKaRa公司。2×Taq Plus Master Mix购自Vazyme公司。

1.3 主要仪器

实验所用主要仪器有: BDS300-FL倒置荧光显微镜(重庆奥特光学仪器有限公司)、PCR仪(Labnet)、电泳仪(JY300C)、电泳凝胶成像分析系统(BioDoc-It 220 Imaging System)、Real-time PCR扩增仪(Eppendorf AG 22331 Hamburg)。

1.4 兔BMSCs的分离培养

用陆眠宁将1月龄日本大耳白兔麻醉, 无菌条件下分离股骨和胫骨, 剔除脂肪和肌肉, PBS液反复冲洗。剪短两侧干骺端, 无血清DMEM/F12培养液冲洗骨髓腔于10 mL离心管内, 直至骨髓腔发白, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清。吸取2 mL含10% FBS的DMEM/F12培养液重悬细胞, 接种至25 cm²培养瓶, 补足培养液至5 mL, 轻柔吹打均匀, 置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。24 h后首次半量换液, 以后每2 d换1次培养液。待细胞生长汇合至80%左右时进行传代, 0.25%胰蛋白酶+0.02% EDTA消化, 以1:2的比例进行传代培养。

1.5 免疫细胞化学法鉴定兔BMSCs

收集全骨髓贴壁法分离培养得到的P3代细胞,以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于6孔板中,每孔接种2 mL细胞悬液,轻柔吹打均匀,静置5 min,然后置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。2~3 d后细胞长满,弃去旧培养液,PBS浸洗细胞爬片3遍,每次3 min。4%多聚甲醛固定30 min,PBS浸洗3遍,每次3 min;0.2% Triton X-100室温下作用15 min,PBS浸洗3遍,每次3 min。10%山羊血清封闭液在 37°C 、5% CO_2 培养箱中封闭30 min,弃去多余液体,不浸洗。分别滴加稀释400倍的一抗(CD34、CD44、CD90), 4°C 过夜,PBS浸洗3遍,每次5 min。滴加稀释400倍的生物素标记山羊抗兔IgG,在 37°C 、5% CO_2 培养箱中作用1 h,PBS浸洗3遍,每次5 min。加入SABC液, 37°C 作用30 min,PBS浸洗3遍,每次5 min。新鲜配制的DAB显色液,镜下控制显色2~10 min,蒸馏水冲洗中止。苏木素复染1~3 min,自来水冲洗,中性树脂封片,于倒置显微镜下观察细胞并拍照。

1.6 DMSO联合高糖于体外诱导兔BMSCs向胰岛样细胞的分化

待生长良好的P3代兔BMSCs汇合至80%时,用胰蛋白酶消化,离心后,用含10% FBS的DMEM/F12培养液重悬细胞。以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种至预先铺有25 mm直径细胞爬片的6孔板中,每孔接种2 mL细胞悬液,接种时动作要轻柔,沿着细胞爬片中心缓缓滴加,尽量避免产生气泡。接种后置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养3 d,吸除旧培养液和未贴壁的细胞,用PBS液轻轻浸洗2~3次,即可进行下一步试验。实验分为诱导组 and 对照组。诱导组分二阶段进行诱导,共诱导11 d。第一阶段用含1% DMSO的无血清DMEM/F12培养液诱导3 d;第二阶段用无血清H-DMEM培养液(葡萄糖浓度为25 mmol/L)诱导8 d。诱导组于第3、5、7、9 d换液。对照组用含10% FBS的DMEM/F12培养液培养11 d,于第3、5、7、9 d换液。

1.7 双硫腙染色检测分化细胞

取诱导组和对照组诱导培养3、7、9、11 d的细胞,吸除其所在培养孔中旧培养液和未贴壁的细胞,用PBS浸洗3次,每次3 min。按照100:1(Hanks液:双硫腙贮存液)的比例配制成双硫腙工作液,加入细胞中,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育15 min后,吸除双硫腙工作液,用PBS液浸洗3次,每次3 min。于倒置显微镜下观察细胞着色情况。

1.8 细胞免疫荧光染色检测分化细胞

取诱导组和对照组诱导培养11 d的细胞,PBS液浸洗3次,每次3 min。4%多聚甲醛固定15 min,PBS浸洗3次,每次5 min。0.2% Triton X-100室温浸泡30 min,PBS浸洗3次,每次5 min。10%山羊血清封闭液在 37°C 、5% CO_2 培养箱中封闭1 h,不浸洗。加入小鼠抗兔胰岛素抗体(一抗),PBS代替一抗作为阴性对照, 4°C 湿盒孵育过夜,PBS浸洗3次,每次5 min。加入FITC标记的山羊抗小鼠IgG,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育2 h,PBS浸洗3次,每次5 min。DAPI染核液室温作用10 min,PBS浸洗3次,每次5 min;加入适量抗荧光衰减淬灭剂封片,于倒置荧光显微镜下观察细胞并作拍照记录。

1.9 RT-PCR检测胰岛细胞相关基因的表达

收集诱导组和对照组诱导培养3、11 d的细胞,各4个样品重复,提取总RNA,逆转录成cDNA。采用普通PCR检测胰岛细胞相关基因的表达,同时检测胰岛细胞相关基因在诱导培养前(0 d)的细胞、兔骨髓细胞、兔P3代BMSCs、兔胰腺组织中的表达,作为参照。普通PCR反应体系为: Mix 12.5 μL , 上、下游引物各1 μL , cDNA模板1 μL , ddH₂O 9.5 μL , 总体积25 μL 。反应条件为: 94°C 预变性5 min; 94°C 变性30 s, 58°C 退火30 s, 72°C 延伸30 s,共35个循环; 72°C 延伸10 min。所用引物见表1。

1.10 荧光定量PCR检测胰岛细胞相关基因表达量的变化

收集诱导组第一阶段末(3 d)和第二阶段末(11 d)的细胞cDNA,各4个样品重复,采用荧光定量PCR检测胰岛细胞相关基因表达量的变化。荧光定量PCR反应体系为: SYBR酶5 μL , 上、下游引物各0.1 μL , cDNA模板1.25 μL , ddH₂O 3.55 μL , 总体积10 μL 。反应条件为: 95°C 预变性2 min; 95°C 变性15 s, 60°C 退火20 s, 72°C 延伸20 s,共40个循环。荧光信号在每个循环结束时检测,每个样品4个点样重复,以GAPDH基因作为内参基因。

1.11 统计分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算兔胰岛细胞相关基因在各细胞样品中的相对表达量。利用SPSS 20.0软件对实验数据作单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 被认为差异显著,具有统计学意义。采用GraphPad Prism 5软件进行图形处理,最终数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $\Delta\Delta Ct = (\text{诱导组目的基因Ct均值} - \text{诱导组})$

内参基因Ct均值)-(对照组目的基因Ct均值-对照组内参基因Ct均值)。

2 结果

2.1 兔BMSCs的生物学鉴定

刚接种时,全骨髓法分离获得的兔骨髓细胞均未贴壁,呈圆形,大小一致,折光性强,BMSCs与周围的红细胞等细胞混杂分布,不能区分。培养24 h后,首次半量换液,可见有少量细胞贴壁,呈圆形、椭圆形、梭形等。随着培养的继续,大量细胞贴壁,出现典型的BMSCs细胞集落。P3代细胞呈梭形生长,细胞形态大小均一,杂细胞很少(图1)。用免疫细胞化学法鉴定P3代细胞,结果显示,抗原CD44、CD90呈阳性,表现为胞质呈棕色或棕褐色,细胞核周围最明显(图2A和图2B),造血干细胞标志抗原CD34呈阴性(图2C),符合BMSCs表面分子标志特征。

2.2 诱导分化过程中细胞的形态学变化

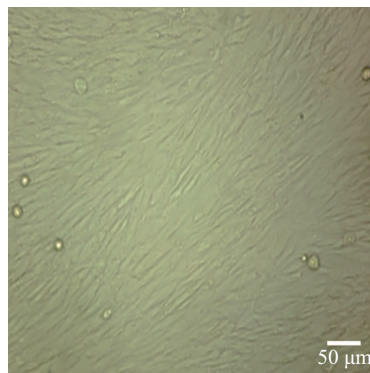
诱导3 d后,诱导组细胞呈圆形和梭形散落分布,细胞界限清晰(图3A)。对照组细胞形态没有明显变化,继续呈长梭形生长,细胞界限较为清晰(图3B)。诱导7 d后,部分细胞之间聚集开始形成细胞团簇。诱导9 d后,大量细胞之间聚集,团簇数量增多,直径增大,细胞团簇边缘开始突起。诱导11 d后,细胞之间聚集得更加紧密,细胞团簇边缘突起更加明显,形成胰岛样结构(图3C)。对照组细胞排列紧密,但始终未出现细胞团簇(图3D)。

2.3 DTZ染色检测结果

双硫腠染色后,诱导组诱导3 d(图4A)、7 d、9 d、11 d(图4B)均有细胞着色,呈现猩红色,提示细胞质内产生富含锌离子的胰岛素。而对照组培养3 d(图4C)、7 d、9 d和11 d(图4D)细胞经双硫腠染色后,均没有明显的颜色的变化,没有猩红色显现。

表1 引物序列
Table 1 The primer sequences

基因 Gene	引物序列(5'→3') Prime sequence (5'→3')	片段大小(bp) Fragment length (bp)
<i>GAPDH</i>	F: ATG TTT GTG ATG GGC GTG AA R: GGG GGC TAA GCA GTT GGT G	90
<i>Foxa2</i>	F: CCC CAA CAA GAT GCT GAC GC R: CGC AGG TAG CAG CCG TTC T	225
<i>Nestin</i>	F: ATT GCT GCT TCT GAT GTG GA R: TTA GCC TCT GGA CTG GGA TG	248
<i>Pax6</i>	F: CCC GTC CAT CTT TGC TTG R: CGC CCA TCT GTT GCT TTT	134
<i>Pdx-1</i>	F: CCT TCA TCT GCT CGG AAC ACA R: CAC AGG ACG CTT GAA ATC GC	92
<i>Insulin</i>	F: TTT TTT ATA CAC CCA AGT CCC G R: AAC ACT GCT CCA CGA TGC C	144

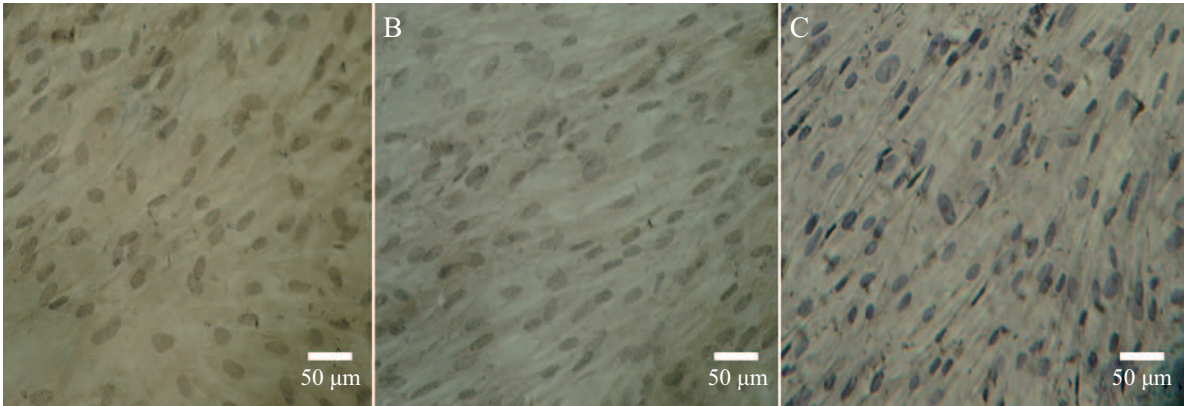


兔BMSCs P3代细胞呈梭形生长,细胞形态大小均一。

Rabbit BMSCs P3 cells grew in fusiform shape and the cell morphology and size were uniform.

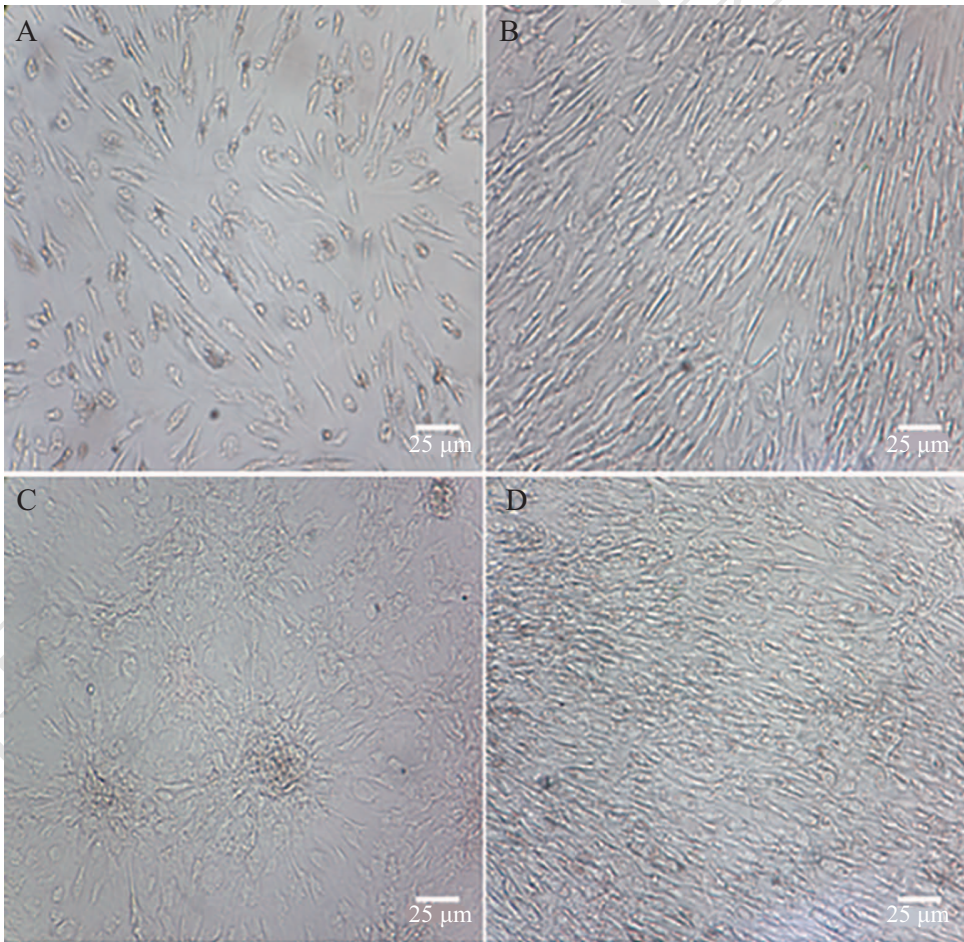
图1 P3代细胞形态特征

Fig.1 The morphology of P3 cells



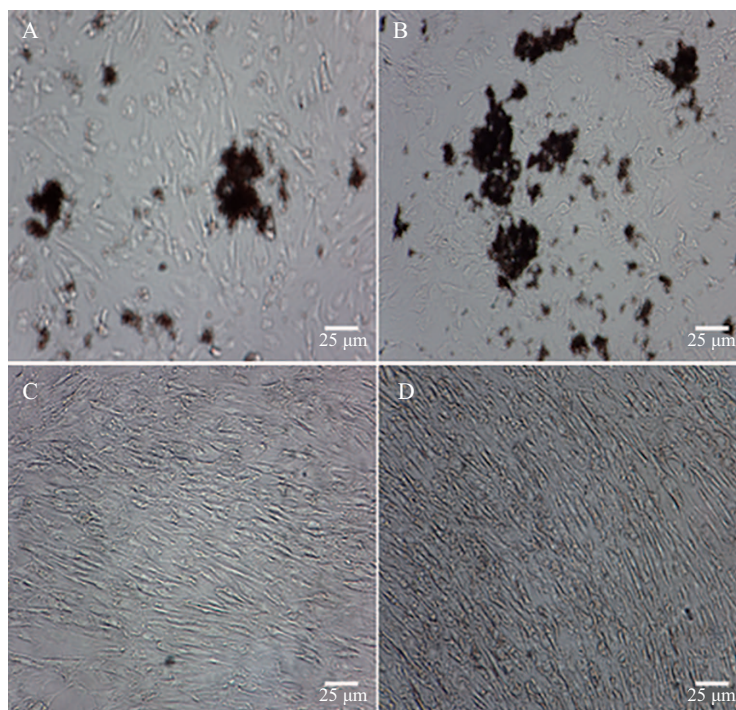
A: 兔BMSCs P3代细胞, CD44阳性表达; B: P3代细胞, CD90阳性表达; C: P3代细胞, CD34阴性表达。
A: Rabbit BMSCs P3 cells, CD44 positive; B: P3 cells, CD90 positive; C: P3 cells, CD34 negative.

图2 免疫细胞化学染色鉴定兔BMSCs
Fig.2 Rabbit BMSCs identified by immunocytochemistry



A: 诱导组诱导3 d细胞。部分细胞呈圆形和梭形散落分布, 细胞界限清晰。B: 对照组培养3 d细胞。细胞呈长梭形生长。C: 诱导组诱导11 d细胞。细胞之间聚集紧密, 细胞团簇边缘突起明显, 形成胰岛样结构。D: 对照组培养11 d细胞。细胞排列紧密, 但始终未出现细胞团簇。
A: the cells induced for 3 days of the induction group. Partial cells were scattered around in circular and fusiform shape and the cell boundary were clear. B: the cells cultured for 3 days of the control group. The cells were growing in long fusiform shape. C: the cells induced 11 days of the induction group. The cells gathered together closely, the protuberances on the edge of cell clusters were obvious, and cell clusters looked like islet-like structure. D: the cells cultured 11 days of the control group. The cells arranged closely, but no cell clusters appeared from beginning to end.

图3 诱导分化过程中细胞的形态学变化
Fig.3 The morphological changes of cells in the process of differentiation

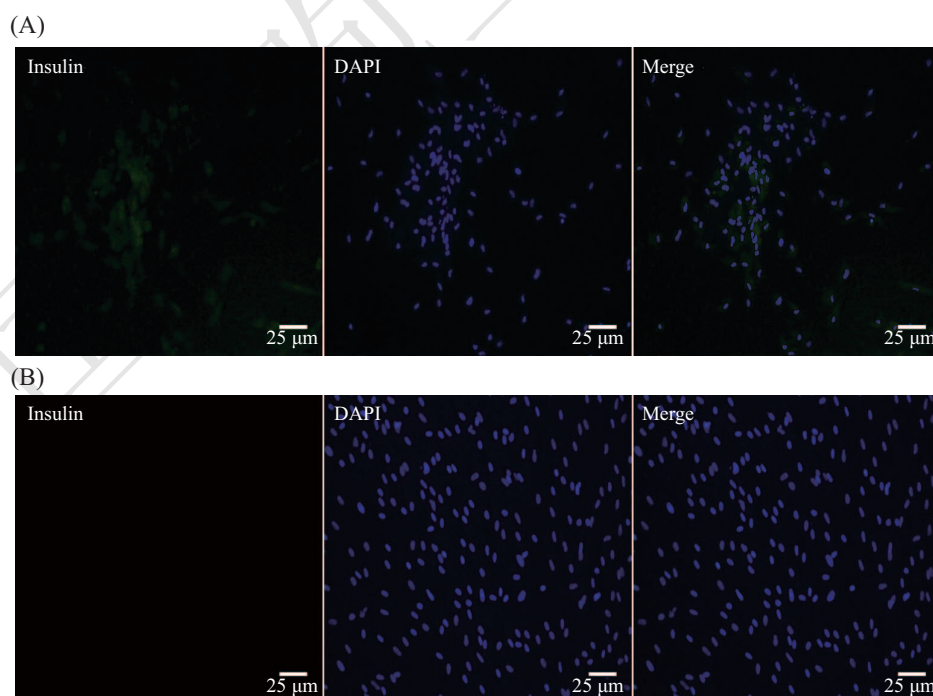


A: 诱导组诱导3 d细胞, DTZ染色阳性; B: 诱导组诱导11 d细胞, DTZ染色阳性; C: 对照组培养3 d细胞, DTZ染色阴性; D: 对照组培养11 d细胞, DTZ染色阴性。

A: the cells induced for 3 days of the induction group were stained positively by dithizone; B: the cells induced for 11 days of the induction group were stained positively by dithizone; C: the cells cultured for 3 days of the control group were stained negatively by dithizone; D: the cells cultured for 11 days of the control group were stained negatively by dithizone.

图4 双硫腙染色鉴定终末分化细胞

Fig.4 The terminally differentiated cells identified by dithizone staining

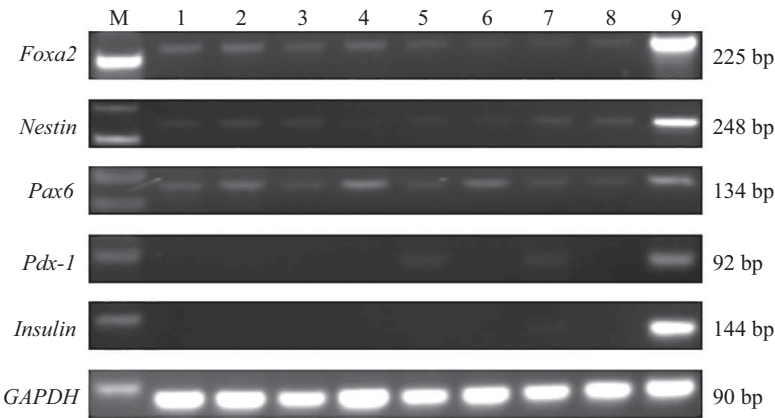


A: 诱导组诱导11 d细胞, 胰岛素阳性染色(绿色); B: 对照组培养11 d细胞, 胰岛素阴性染色。DAPI复染细胞核(蓝色)。

A: the cells induced for 11 days of the induction group were stained positively for insulin (green); B: the cells cultured for 11 days of control group were stained negatively for insulin. Nuclei were counter stained with DAPI (blue).

图5 免疫荧光染色结果

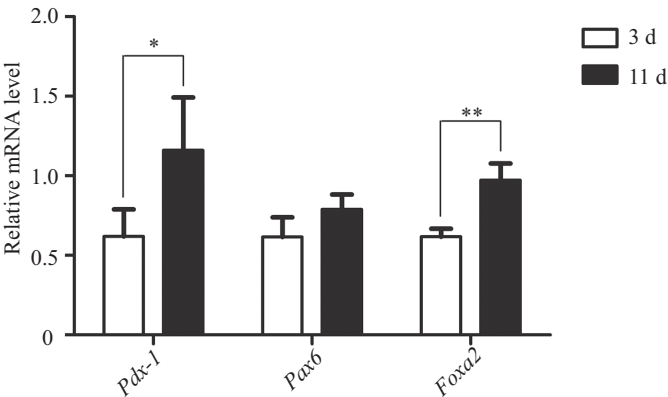
Fig.5 The results of immunofluorescence staining



M: DNA Marker DL500; 1: 兔骨髓细胞; 2: 兔P3代BMSCs; 3: 诱导组第0 d细胞; 4: 对照组第0 d细胞; 5: 诱导组第3 d细胞; 6: 对照组第3 d细胞; 7: 诱导组第11 d细胞; 8: 对照组第11 d细胞; 9: 兔胰腺组织。

M: DNA Marker DL500; 1: rabbit bone marrow cells; 2: rabbit P3 BMSCs; 3: the cells induced for 0 day of the induction group; 4: the cells cultured for 0 day of the control group; 5: the cells induced for 3 days of the induction group; 6: the cells cultured for 3 days of the control group; 7: the cells induced for 11 days of the induction group; 8: the cells cultured for 11 days of the control group; 9: rabbit pancreatic tissue.

图6 胰岛细胞相关基因的表达
Fig.6 The expression of islet cell related genes



* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图7 诱导过程中胰岛细胞相关基因表达量的变化
Fig.7 Changes of the expression of islet cell related genes in the process of induction

2.4 细胞免疫荧光染色检测结果

细胞免疫荧光染色结果表明, 终末分化细胞(11 d), 诱导组细胞胰岛素阳性染色(图5A), 证明诱导组细胞内合成了胰岛素, 其胞质内存在胰岛素; 而对照组细胞胰岛素阴性染色(图5B), 说明对照组细胞内没有合成胰岛素, 其胞质内不存在胰岛素。

2.5 RT-PCR检测胰岛细胞相关基因的表达

收集诱导组和对照组诱导培养3 d、11 d的细胞及诱导培养前(0 d)的细胞、兔骨髓细胞、兔P3代BMSCs和兔胰腺组织, 提取总RNA, 采用普通PCR检测胰岛细胞相关基因的表达。结果显示, 兔骨髓细胞、兔P3代细胞中均检测到*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*

基因的表达。诱导组第0 d细胞也检测到*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*基因的表达。第3 d细胞中检测到*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*、*Pdx-1*基因的表达, 未检测到胰岛素基因的表达。第11 d细胞中检测到*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*、*Pdx-1*、胰岛素基因的表达。对照组第0 d、3 d、11 d细胞中均检测到*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*基因的表达。兔胰腺组织中检测到*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*、*Pdx-1*、胰岛素基因均表达(图6)。

2.6 荧光定量PCR检测胰岛细胞相关基因表达量的变化

我们采用DMSO联合高糖对兔骨髓间充质干细胞进行诱导, 分别于诱导3 d和11 d进行胰岛细胞相

关基因的表达检测,我们选取*Pdx-1*、*Pax6*、*Foxa2*基因作为代表。荧光定量PCR结果显示,*Pdx-1*、*Pax6*、*Foxa2*基因于诱导11 d的表达量均高于诱导3 d的表达量。其中,*Pdx-1*基因的表达量差异显著($P<0.05$),*Pax6*基因的表达量差异不显著($P>0.05$),*Foxa2*基因的表达量差异极显著($P<0.01$)(图7)。

3 讨论

*Foxa2*基因在哺乳动物胚胎早期发育、器官发生阶段及成体体内代谢等诸多方面发挥重要作用^[7]。Besnard等^[8]研究证实,*Foxa2*基因在小鼠内胚层组织(如肝、肺、胰腺、胃、肠、前列腺和膀胱组织)和外胚层组织(如大脑结构、嗅上皮和中胚层组织如肾、阴道和子宫等)中均有表达,且其表达方式因小鼠胚胎发育阶段、新生儿及成体器官和细胞的不同而异。研究表明,*Nestin*基因在多种组织中均有表达^[9-12]。Frojdman等^[9]发现,*Nestin*基因在大鼠和小鼠的睾丸及中肾的发育过程中会短暂地表达。Terling等^[10]发现,*Nestin*基因在牙齿发育的各个阶段都有表达。此外,有研究证实,*Nestin*基因在皮肤和心血管再生过程中表达会增高^[11-12]。研究发现,*Pax6*基因是多种器官发生发育的必需条件^[13],也是一些功能维持的必要条件^[14]。*Pax6*基因在眼睛、中枢神经系统的发育过程和成体结构中均有表达^[15-16]。此外,有研究表明,*Pax6*基因在肠胃道表皮细胞^[17]、毛囊组织^[14]中也有表达。本研究发现,在兔胰腺组织中检测到*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*、*Pdx-1*、胰岛素基因均表达,证实了*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*、*Pdx-1*、胰岛素基因在胰腺中确有表达。同时,本试验研究发现,兔骨髓细胞和P3代BMSCs中均检测到*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*基因的表达,表明本研究所选用兔P3代BMSCs未发生分化,其本身就表达*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*基因,并推测*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*基因可能与BMSCs具有的多向分化潜能有关,在合适的定向分化诱导环境中,BMSCs易于分化为其他类型细胞。这也表明,*Foxa2*、*Nestin*和*Pax6*基因并不能作为兔BMSCs向胰岛样细胞诱导分化成功的标志基因。

本研究通过DMSO联合高糖对骨髓间充质干细胞进行诱导,国外仅1篇^[8]、国内仅2篇报道^[19-20],但其方法的细节、检测项目等与本研究不同。Sundari等^[21]研究发现,DMSO作为一种简便有效的材料,可以促进多潜能干细胞向多种细胞分化。Van等^[22]利

用DMSO将P19细胞分化为心肌样细胞。Deng等^[23]研究发现,DMSO能够促进人胎肝源性骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞。国内外研究者利用DMSO联合高糖成功将BMSCs诱导分化为能够分泌胰岛素的胰岛样细胞团^[18-20]。而且大多数研究者证实,1% DMSO是一个合适的诱导浓度,对细胞的毒性作用也最小^[18-20]。所以,本研究选择1% DMSO对兔BMSCs进行诱导。

*Pdx-1*基因是胰腺发育过程中表达的第一个分子标志,是胰岛前体细胞的标志基因^[24]。Gu等^[25]利用谱系示踪实验证实,成熟的胰腺细胞均来自于*Pdx-1*基因阳性表达前体细胞。本实验在诱导前(0 d),诱导组 and 对照组细胞中均仅检测到*Foxa2*、*Nestin*和*Pax6*基因的表达,表明此时BMSCs未发生分化,可进行下一步的诱导试验。在诱导3 d后,诱导组部分细胞呈圆形散落分布,检测到*Pdx-1*基因的表达,未检测到胰岛素基因的表达,DTZ染色阳性,这可能是由于胰岛素基因的表达量过低以致检测不到。对照组细胞形态没有明显变化,仍继续呈长梭形生长,类似骨髓间充质干细胞,未检测到*Pdx-1*和胰岛素基因的表达,DTZ染色阴性。这表明,DMSO能够激活*Pdx-1*基因的表达,从而起到促进兔BMSCs分化为可分泌胰岛素的胰岛前体细胞的作用。

葡萄糖不仅是细胞的营养物质,还在诱导分化中起重要作用。以往研究认为,葡萄糖是刺激细胞生长分化的重要因素,葡萄糖是胰岛 β 细胞的一种重要生长因子,葡萄糖不仅能促进 β 细胞的生长,还能促进 β 细胞的分化^[26-27]。高糖培养被认为是各种来源的干细胞诱导分化为胰岛样细胞过程中必不可少的一个环节。Zalzman等^[28]采用高糖培养16 d,能够激活转染*Pdx-1*基因的永生化人类胎儿肝脏祖细胞表达多种 β 细胞基因,合成、储存大量的胰岛素,以调节的方式分泌胰岛素,说明高糖能够促进胰岛 β 细胞的成熟。本研究将诱导3 d的阳性表达*Pdx-1*基因的BMSCs于高糖培养基中诱导8 d后,分化为胰岛样细胞团,DTZ染色阳性,细胞免疫荧光染色显示胰岛素阳性染色,RT-PCR检测到*Pdx-1*和胰岛素基因的表达,表明高糖能够促进兔BMSCs分化为胰岛样细胞。荧光定量PCR结果显示,诱导组诱导11 d *Pdx-1*、*Pax6*、*Foxa2*基因的表达量均高于诱导3 d。其中,*Pdx-1*基因的表达量差异显著,*Pax6*基因的表达量差异不显著,*Foxa2*基因的表达量差异极显著,表明高

糖可显著促进*Pdx-1*和*Foxa2*基因的表达。

综上,本研究探讨了DMSO联合高糖于体外诱导兔BMSCs向胰岛样细胞分化的可行性及调控机制。通过细胞形态的观察、双硫腙染色、细胞免疫荧光染色和RT-qPCR检测,得出以下结论:(1)*Foxa2*、*Nestin*、*Pax6*基因不能作为兔BMSCs向胰岛样细胞诱导分化成功的标志基因;(2)DMSO能够激活*Pdx-1*基因的表达,促进兔BMSCs分化为可分泌胰岛素的胰岛前体细胞;(3)高糖能够促进兔BMSCs分化为胰岛样细胞,并可显著促进*Pdx-1*和*Foxa2*基因的表达。同时,本研究为深入探讨BMSCs向胰岛样细胞诱导的分化机制和诱导条件奠定了基础,也为糖尿病治疗提供了新的潜在途径。本研究诱导成分简单、操作简便、周期短、成本低廉,有望在更加深入的研究成熟之后推广应用,具有重大的理论价值和临床应用前景。

参考文献 (References)

- Rahmati S, Alijani N, Kadivar M. *In vitro* generation of glucose-responsive insulin producing cells using lentiviral based *Pdx-1* gene transduction of mouse (C57BL/6) mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 437(3): 413-9.
- Xu H, Tsang KS, Chan JC, Yuan P, Fan R, Kaneto H, *et al.* The combined expression of *Pdx-1* and *MafA* with either *Ngn3* or *NeuroD* improves the differentiation efficiency of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Cell Transplant* 2013; 22(1): 147-58.
- Hirshberg B. Lessons learned from the international trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *Curr Diab Rep* 2007; 7(4): 301-3.
- Jahr H, Bretzel RG. Insulin-positive cells *in vitro* generated from rat bone marrow stromal cells. *Transplant Proc* 2003; 35(6): 2140-1.
- 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.
- Guo-ping W, Xiao-chuan H, Zhi-hui Y, Li G. Influence on the osteogenic activity of the human bone marrow mesenchymal stem cells transfected by liposome-mediated recombinant plasmid pIRES-hBMP2-hVEGF165 *in vitro*. *Ann Plast Surg* 2010; 65(1): 80-4.
- Kaestner KH. The FoxA factors in organogenesis and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 2010; 20(5): 527-32.
- Besnard V, Wert SE, Hull WM, Whitsett JA. Immunohistochemical localization of *Foxa1* and *Foxa2* in mouse embryos and adult tissues. *Gene Expr Patterns* 2004; 5(2): 193-208.
- Frojdman K, Pelliniemi LJ, Lendahl U, Virtanen I, Eriksson JE. The intermediate filament protein *Nestin* occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse. *Differentiation* 1997; 61(4): 243-9.
- Terling C, Rass A, Mitsiadis TA, Fried K, Lendahl U, Wroblewski J. Expression of the intermediate filament *Nestin* during rodent tooth development. *Int J Dev Biol* 1995; 39(6): 947-56.
- Liu F, Uchugonova A, Kimura H, Zhang C, Zhao M, Zhang L, *et al.* The bulge area is the major hair follicle source of *Nestin*-expressing pluripotent stem cells which can repair the spinal cord compared to the dermal papilla. *Cell Cycle* 2011; 10(5): 830-9.
- Beguin PC, El-Helou V, Gillis MA, Duquette N, Gosselin H, Brugada R, *et al.* *Nestin*(+) stem cells independently contribute to neural remodelling of the ischemic heart. *J Cell Physiol* 2011; 226(5): 1157-65.
- Collinson JM, Quinn JC, Hill RE, West JD. The roles of *Pax6* in the cornea, retina, and olfactory epithelium of the developing mouse embryo. *Dev Biol* 2003; 255(2): 303-12.
- 杨珂, 杨恬, 姜自玲. *Pax6*基因和蛋白在大鼠触须毛囊中的表达. 第三军医大学学报(Yang Ke, Yang Tian, Jiang Ziling. *Pax6* expression in rat whisker hair follicle. *Acta Academiae Militaris Tertiae*) 2008; 30(13): 1296-8.
- 宋书娟, 刘英芝, 丛日昌, 张晓燕, 杨振江, 李凌松. *Pax6*基因突变能引起人脑结构异常. 北京大学学报(医学版)(Song Shujuan, Liu Yingzhi, Cong Richang, Zhang Xiaoyan, Yang Zhenjiang, Li Lingsong. *Pax6* mutation caused brain abnormalities in humans. *Journal of Peking University, Health Sciences*) 2005; 37(1): 48-9.
- Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ. Homology of the eyeless gene of drosophila to the small eye gene in mice and aniridia in humans. *Science* 1994; 265(5173): 785-9.
- 王秀, 王蔚, 王义权. *Pax*基因功能及其选择性剪接的研究进展. 生命科学(Wang Xiu, Wang Wei, Wang Yiquan. *Progress in the study of Pax gene family and its alternative splicing. Chinese Bulletin of Life Sciences*) 2008; 20(1): 125-30.
- Oh SH, Muzzonigro TM, Bae SH, La Plante JM, Hatch HM, *et al.* Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest* 2004; 84(5): 607-17.
- 张伟, 苏本利, 孟秀香, 刘苯, 刘丹丹, 王莺燕, 等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为胰岛素分泌细胞. 中国组织工程研究与临床康复(Zhang Wei, Su Benli, Meng Xiuxiang, Liu Ben, Liu Dandan, Wang Yingyan, *et al.* *In vitro* differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2008; 12(16): 3053-6.
- 何俊丹, 张志帅, 王新庄, 吕婧玉, 许晓婷, 蒋金航, 等. 兔骨髓间充质干细胞向胰岛细胞分化的研究. 畜牧兽医学报(He Jundan, Zhang Zhishuai, Wang Xinzhuang, Lü Jingyu, Xu Xiaoting, Jiang Jinhang, *et al.* *Study of inducing rabbit BMSCs into islet cells. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*) 2013; 44(4): 543-8.
- Chetty S, Pagliuca FW, Honore C, Kweudjeu A, Rezanian A, Melton DA. A simple tool to improve pluripotent stem cell differentiation. *Nat Methods* 2013; 4(10): 553-6.
- van der Heyden MA, van Kempen MJ, Tsuji Y, Rook MB, Jongsma HJ, Ophthof T. P19 embryonal carcinoma cells: A suitable model system for cardiac electrophysiological differentiation at the molecular and functional level. *Cardiovasc Res* 2003; 58(2): 410-22.

- 23 Deng F, Lei H, Hu Y, He L, Fu H, Feng R, *et al.* Combination of retinoic acid, dimethyl sulfoxide and 5-azacytidine promotes cardiac differentiation of human fetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank* 2016; 17(1): 147-59.
- 24 Pearl EJ, Bilogan CK, Mukhi S, Brown DD, Horb ME. *Xenopus* pancreas development. *Dev Dyn* 2009; 238(6): 1271-86.
- 25 Gu G, Brown JR, Melton DA. Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 2003; 120(1): 35-43.
- 26 Bonner Weir S. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 2000; 24(3): 297-302.
- 26 Soria B. *In-vitro* differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* 2001; 68(4/5): 205-19.
- 27 Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, *et al.* *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into Pancreatic endocrine hormone producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(12): 8078-83.
- 28 Zalzman M, Gupta S, Giri RK, Berkovich I, Sappal BS, Kamieli O, *et al.* Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(12): 7253-8.