

# 胰腺导管单克隆上皮样干细胞的蛋白表达特征

王瑞阳 李延伟 兰瑞霞 许英梅 效梅\* 安立龙\*

(广东海洋大学动物科学与医学系, 湛江 524088)

**摘要** 该文研究1例源于成年大鼠的胰腺导管单克隆上皮样干细胞系的蛋白表达特征、染色体核型及致瘤性。RPMI-1640有血清扩增培养源于成年大鼠的胰腺导管单克隆上皮样干细胞至单层, 分别采用流式细胞术或免疫荧光反应检测干细胞蛋白水平的表达特征。常规法制备染色体标本, 采用Adobe Photoshop CS6软件进行核型分析。将干细胞移植在裸鼠体内, 观察其致瘤性。结果显示, 该源于成年大鼠的胰腺导管单克隆上皮样干细胞在蛋白水平表达CK19、NeuroD2、Oct4、PCNA及Nanog, 不表达Pdx1、Pax4、Pax6、MafA、Ptf1a、Ngn3、nestin、Sox2、CD34、CD45、insulin、glucagon、ghrelin、somatostatin及secretin。细胞是正常的二倍体细胞(2n=42), 无致瘤性。这表明, 该源于成年大鼠的胰腺导管单克隆上皮样干细胞系共表达CK19、NeuroD2、Oct4、PCNA及Nanog蛋白。

**关键词** 胰腺导管干细胞; 蛋白表达; 染色体核型; 致瘤性; 大鼠

## Protein Expression of Monoclonal Epithelia Stem Cells Derived from Pancreatic Duct

Wang Ruiyang, Li Yanwei, Lan Ruixia, Xu Yingmei, Xiao Mei\*, An Lilong\*

(Department of Animal Science and Medicine, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract** In this study, expression characteristics, karyotype and tumorigenicity of a monoclonal epithelia stem cell line derived from pancreatic duct of an adult rat were researched. Monoclonal epithelia stem cells derived from pancreatic duct of an adult rat were proliferated to a layer in serum supplemented RPMI-1640 medium. Expression characteristics of stem cells were determined using flow cytometry and immunofluorescence reaction. Chromosome sets of stem cells were examined using conventional method, and karyotype was analysed with Adobe Photoshop CS6 software. Tumorigenicity was observed by transplanting stem cells into nude mice. The results showed that monoclonal epithelia stem cells derived from pancreatic duct of a adult rat were positive for the CK19, NeuroD2, Oct4, PCNA and Nanog, and were negative for the Pdx1, Pax4, Pax6, MafA, Ptf1a, Ngn3, nestin, Sox2, CD34, CD45, insulin, glucagon, ghrelin, somatostatin and secretin protein expression. Stem cells were normal diploid (2n=42). And these stem cells had no oncogenicity. Here a monoclonal epithelia stem cell line derived from pancreatic duct of an adult rat that co-expressed the CK19, NeuroD2, Oct4, PCNA and Nanog protein was determined.

**Keywords** pancreatic duct stem cell; protein expression; karyotype; oncogenicity; rat

收稿日期: 2017-07-14 接受日期: 2017-10-30

广东省自然科学基金(批准号: 10152408801000023)、教育部留学基金(批准号: 教外司留[2010]1561)、广东省创新强校项目(批准号: 粤教高函[2014]97、[2017]54)和国家大学生创新创业训练计划(批准号: 201310566013、201310566005)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0759-2383347, E-mail: xiao0812@126.com; Tel: 0759-2396022, E-mail: anlilong@126.com

Received: July 14, 2017 Accepted: October 30, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No.10152408801000023), the Scientific Research Foundation of the Education Ministry for Returned Chinese Scholars (Grant No.[2010]1561), the Innovation and Develop University Program of Guangdong Province (Grant No.[2014]97, [2017]54) and the National Innovative Project for University Student (Grant No.201310566013, 201310566005)

\*Corresponding authors. Tel: +86-759-2383347, E-mail: xiao0812@126.com; Tel: +86-759-2396022, E-mail: anlilong@126.com

网络出版时间: 2018-01-05 17:44:30 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180105.1744.006.html>

近年来,研究者已分离培养源于人、小鼠、大鼠等的胰腺导管干细胞,并对其蛋白表达等生物学特性进行了探讨<sup>[1-5]</sup>。例如,有报道源于人胎儿的胰腺导管干细胞表达细胞角蛋白19(cytokeratin 19, CK19)、胰十二指肠同源盒1(pancreatic and duodenal homeobox 1, Pdx1)、胰高血糖素(glucagon)和神经上皮干细胞蛋白(nestin)<sup>[6]</sup>;源于小鼠的胰腺导管末端/泡心干细胞表达胰腺特异转录因子1a(pancreas specific transcription factor 1a, Ptf1a)、性别决定相关同源盒9(sry related HMG box 9, Sox9)、nestin、干细胞抗原1(stem cell antigen 1, Sca1)、基质细胞源性因子-1(stromal cell derived factor-1, Sdf1)及肝细胞生长因子受体(c-hepatocyte growth factor receptor, c-Met)<sup>[7]</sup>。但是,目前有关胰腺导管干细胞表达特征报道各异,胰腺导管干细胞的特异性蛋白标志物还不确定。本实验室已建立1例源于成年大鼠的胰腺导管单克隆上皮样干细胞系,在此基础上,本研究拟对其蛋白表达特征、染色体核型和致瘤性进行探讨,旨在为进一步确定胰腺导管干细胞的生物学特性提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

为本实验室分离培养的1例源于成年大鼠的胰腺导管单克隆上皮样干细胞系。部分细胞保存在中国典型培养物保藏中心。

### 1.2 主要试剂、仪器

流式荧光抗体小鼠抗人增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)(货号: 11-9910-41)、金黄地鼠抗小鼠肌腱膜纤维肉瘤癌基因同源盒A(musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A, MafA)(货号: 11-5893-80)、小鼠抗人周期蛋白34(cycle protein 34, CD34)(货号 11-0349-41)和周期蛋白45(CD45)(货号: 12-9459-41)、免疫荧光抗体小鼠抗人细胞角蛋白19(cytokeratin 19, CK19)(货号: 11-9898-80)和小鼠抗人胰十二指肠同源盒1(pancreatic and duodenal homeobox 1, Pdx1)(货号: 51-6500-80)均购自eBioscience公司;流式抗体兔抗人八聚体转录因子4(octamer-binding transcription factor 4, Oct4)(货号: 356479)、兔抗大鼠配对盒6(paired box 6, Pax6)(货号: 500385)、免疫荧光抗体兔抗人干细胞关键蛋白(Nanog)(货号: 536544)、兔抗大鼠神经源性分化

因子2(neurogenic differentiation factor 2, NeuroD2)(货号615436)、兔抗人性别决定相关同源盒(sry related HMG box 2, Sox2)(货号: 290735)、兔抗人生长激素抑制素(somatostatin)(货号: 543118)和山羊抗兔荧光二抗(货号: 425144)均购自Epitomics公司;免疫荧光抗体小鼠抗人胰腺特异转录因子1a(pancreas specific transcription factor 1a, Ptf1a)(货号: ab57257)、小鼠抗人神经原素3(neurogenin 3, Ngn3)(货号: ab87108)、小鼠抗人食欲刺激素(ghrelin)(货号: ab57222)和兔抗人肠促胰液素(secretin)(货号: ab8495)均购自Abcam公司;免疫荧光抗体小鼠抗大鼠胰岛素(insulin)(货号: BM0080)和兔抗大鼠胰高血糖素(glucagon)(货号: BA0058)购自Boster公司;免疫荧光抗体小鼠抗大鼠神经上皮干细胞蛋白(nestin)(货号: NBP1-92717)和山羊抗小鼠荧光二抗(货号: NB720-F)购自Novus公司;流式抗体兔抗人配对盒4(Pax4)(货号: AP6690c)购自Abgent公司。FACSCanto II流式细胞仪购自美国贝克曼公司。

### 1.3 流式细胞术检测

根据所购特异性抗体是否带荧光标记,采用直接免疫荧光标记法或间接免疫荧光标记法检测。

1.3.1 直接免疫荧光标记法 PBS缓冲液稀释干细胞至 $1 \times 10^6$ /mL,取EP管,分别加入1 mL细胞悬液,1 000 r/min离心5 min。弃上清,分别加入200  $\mu$ L含1% BSA的PBS缓冲液稀释的荧光素标记抗体(1:20稀释的PCNA、1:400稀释的MafA、1:20稀释的CD34和1:20稀释的CD45),混匀,4  $^{\circ}$ C孵育30 min,1 000 r/min离心5 min。弃上清,PBS缓冲液洗涤细胞2次,1 000 r/min离心5 min,以除去未结合的多余抗体。每管分别加0.5 mL PBS缓冲液重悬细胞,FACSCanto II流式细胞仪检测阳性细胞比例。阴性对照加PBS缓冲液。

1.3.2 间接免疫荧光标记法 PBS缓冲液稀释干细胞至 $1 \times 10^6$ /mL,取EP管,分别加入1 mL细胞悬液,1 000 r/min离心5 min。弃上清,分别加入200  $\mu$ L含1% BSA的PBS缓冲液稀释的无荧光素标记的一抗(1:100稀释的Oct4、1:50稀释的Pax4和1:500稀释的Pax6),混匀,4  $^{\circ}$ C孵育30 min,1 000 r/min离心5 min。弃上清,PBS缓冲液洗涤细胞2次,1 000 r/min离心5 min,以除去未结合的多余抗体。弃上清,加入200  $\mu$ L含1% BSA的PBS缓冲液稀释的羊抗兔荧光素标记二抗(1:100稀释),混匀,4  $^{\circ}$ C孵育30 min,1 000 r/min离心5 min。弃上清,PBS缓冲液洗涤细胞2次,1 000 r/min

离心5 min, 以除去未结合的多余抗体。每管分别加0.5 mL PBS缓冲液重悬细胞, 流式细胞仪检测阳性细胞比例。阴性对照加PBS缓冲液。

#### 1.4 免疫荧光反应

对于购买不到流式细胞术检测的抗体, 则购买免疫荧光反应抗体检测。

干细胞按 $1 \times 10^5$ /mL细胞密度接种在放有盖玻片的培养皿中, 当细胞生长至80%融合时, 4%多聚甲醛室温固定细胞15 min。PBS缓冲液洗涤细胞2次, 1% Triton X-100穿孔30 min, 1% BSA封闭45 min。洗掉多余的封闭液, 加入含1% BSA的PBS缓冲液稀释的一抗(20  $\mu$ g/mL稀释的CK19、20  $\mu$ g/mL稀释的Pdx1、3  $\mu$ g/mL稀释的Ptf1a、1:100稀释的Ngn3、1:300稀释的nestin、1:300稀释的NeuroD2、1:100稀释的Nanog、1:100稀释的Sox2、1:500稀释的insulin、1:500稀释的glucagon、1:100稀释的somatostatin、5  $\mu$ g/mL稀释的ghrelin和1:100稀释的secretin), 4  $^{\circ}$ C过夜。PBS缓冲液洗涤3次, 每次3 min。加入含1% BSA的PBS缓冲液1:1 000稀释的羊抗小鼠荧光二抗或1:100稀释的羊抗兔荧光二抗, 37  $^{\circ}$ C孵育1 h。PBS缓冲液漂洗3次, 每次3 min。甘油封片。荧光显微镜下观察, 拍照。阴性对照加PBS缓冲液。

#### 1.5 染色体标本制备

按常规方法进行。分别扩增第10、20、30、50代干细胞, 当干细胞贴壁生长至80%融合时, 加入终浓度为0.1  $\mu$ g/mL的秋水仙素作用4 h, 0.25%胰蛋白酶、0.04% EDTA·2Na消化液消化。收集细胞, 0.4% KCl低渗30 min, 甲醇-冰醋酸(1:3)固定液固定, 滴片, Giemsa染色。显微镜下选择分散良好的染色体标本观察, 拍照, 并采用Adobe Photoshop CS6软件进行核型分析。

#### 1.6 荷瘤试验

RPMI-1640培养液分别稀释胰腺导管干细胞、mESC(西北农林科技大学华进联教授赠送)至 $1 \times 10^6$ /mL, 6只裸鼠背部皮下分别移植0.2 mL胰腺导管干细胞悬液, 3只阳性对照裸鼠相同部位分别移植0.2 mL mESC悬液, 3只阴性对照裸鼠相同部位分别注射0.2 mL RPMI-1640培养液, 进行为期25 d的荷瘤试验。每天观察裸鼠的精神状态和活动力, 每5 d测量一次饮食量和体重。实验结束时, 解剖裸鼠, 观察是否有肿瘤组织产生。动物实验在广东省医学实验动物中心完成并经广东海洋大学伦理委员会批准。

## 2 结果

### 2.1 蛋白表达特征

流式细胞术检测和免疫荧光反应显示, 该源于成年大鼠的胰腺导管单克隆上皮样干细胞在蛋白水平表达PCNA、Oct4、CK19、NeuroD2和Nanog, 不表达Pdx1、Ngn3、MafA、Ptf1a、Pax4、Pax6、nestin、Sox2、CD34、CD45、insulin、glucagon、ghrelin、somatostatin及secretin(图1A~图1E), 图1F为阴性对照。

### 2.2 干细胞染色体核型分析

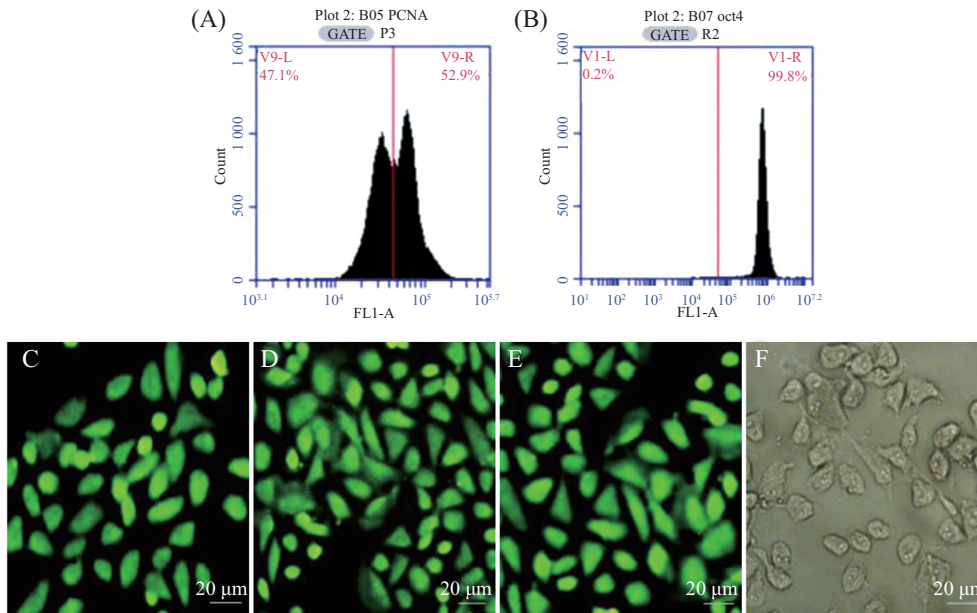
染色体核型分析发现, 第10、20、30、50代干细胞均为正常的二倍体细胞( $2n=42$ )。其中, 第50代干细胞核型为中着丝粒染色体6对, 近中着丝粒染色体3对, 近端着丝粒染色体4对, 末端着丝粒染色体7对, 性染色体1对(图2A和图2B)。这表明, 该源于成年大鼠的胰腺导管上皮样干细胞系是正常的二倍体细胞系。

### 2.3 干细胞的致瘤性

荷瘤试验结果显示, 6只移植干细胞的裸鼠、3只注射RPMI-1640培养液的阴性对照裸鼠均未长出瘤状物, 而3只移植mESC的阳性对照裸鼠均皮下荷瘤(图3A和图3B)。饲养期间, 裸鼠精神状态良好, 活动力敏捷, 未出现异常情况。这表明, 该源于成年大鼠的胰腺导管单克隆上皮样干细胞无致瘤性。

## 3 讨论

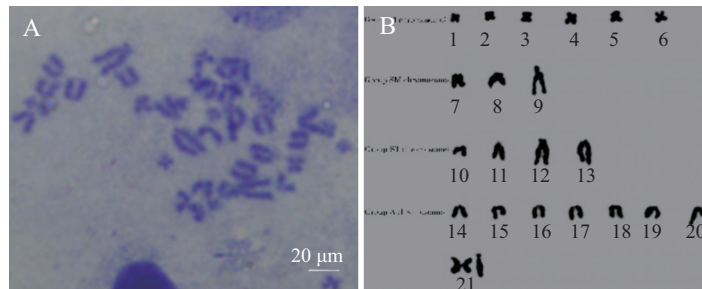
虽然胰腺导管干细胞的特征性蛋白标记物还不确定, 但已有的研究显示, 该类干细胞均表达胰腺导管细胞表达物CK19, 共表达胰腺发育过程中的一些决定因子如Pdx1、Ptf1a、Ngn3等, 还共表达干/祖细胞表达物Oct4、PCNA、Nanog等, 或表达胰岛细胞表达物glucagon、insulin等及神经细胞表达物NeuroD、nestin等<sup>[8-11]</sup>。例如, 有报道指出, 结扎成年小鼠部分胰腺导管, 可引起胰腺导管干细胞增殖。消化分离胰腺细胞后, 流式细胞术分选, 获得Lgr5阳性胰腺导管干细胞。体外培养, 这些上皮样干细胞扩增10个月。免疫荧光反应表达CK19、Pdx1、Sox9和mucin-1。核型分析表明, 细胞染色体数正常<sup>[4]</sup>。采用Ricordi分离法获得源于成年人的胰腺导管细胞, 贴壁培养, 上皮样干细胞扩增形成单层, 免疫反应表明, 干细胞表达CK19, 少量散在的干细胞表达insulin和Pdx1<sup>[12]</sup>。消化去除胰岛后剩余的成人胰腺组织, 经流式细胞术分选获得CD133阳性的胰腺导管干细



A、B: 流式细胞术检测干细胞表达PCNA和Oct4; C~E: 荧光免疫反应显示, 干细胞表达CK19、NeuroD2和Nanog; F: 荧光免疫反应阴性对照。  
A,B: flow cytometry identified stem cells expressed PCNA and Oct4; C-E: immunofluorescence reaction showed that stem cells expressed CK19, NeuroD2 and Nanog; F: negative control of immuno-fluorescence reaction.

图1 胰腺导管单克隆上皮样干细胞的蛋白表达特征

Fig.1 Protein expression of the monoclonal epithelia stem cells from pancreatic duct

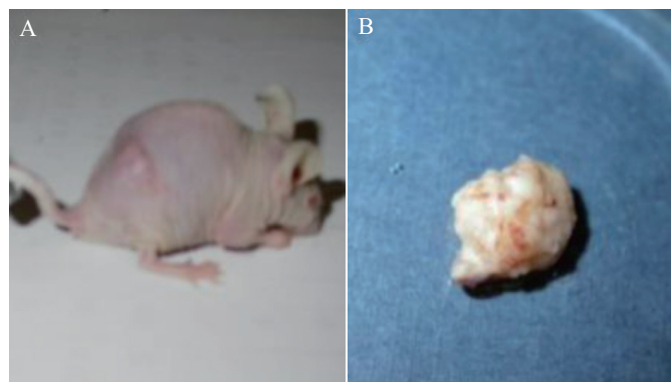


A: 染色体标本; B: 染色体核型。

A: the chromosome sample; B: the karyogram.

图2 第50代胰腺导管单克隆上皮样干细胞的染色体

Fig.2 Chromosome of the 50<sup>th</sup> passage monoclonal epithelia stem cells from pancreatic duct



A: mESC移植裸鼠荷瘤; B: mESC分化形成的肿瘤物。

A: nude murine with tumor implanted the mESC; B: the mESC differentiated into tumor.

图3 阳性对照mESC移植裸鼠皮下荷瘤

Fig.3 Positive control nude murine with tumor subcutaneously implanted the mESC

胞, RT-PCR检测发现还共表达CK19<sup>[13]</sup>。采用磁珠分选法, 通过CD90抗原抗体反应, 获得表达CK19的成年人胰腺导管上皮样干细胞<sup>[14]</sup>。1例源于成年小鼠的胰腺导管干细胞系, 扩增培养了3个月以上, 表达CK19、Pdx1和GLP1<sup>[15]</sup>。源于大鼠的胰腺导管干细胞表达Pdx1、CD29、CD73、CD90及CD105<sup>[16]</sup>。之前我们分离培养的1例源于人胎儿的胰腺导管干细胞系在蛋白水平共表达CK19、Pdx1、glucagon及nestin<sup>[6,17]</sup>。与上述这些研究结果相类似, 本次分离培养的这例源于成年大鼠的胰腺导管干细胞系表达CK19, 共表达干/祖细胞表达物(如Oct4、PCNA、Nanog)及神经细胞表达物(如NeuroD)。这也证实该细胞系是1例源于胰腺导管、与神经组织密切相关的干/祖细胞系。此外, 一些研究表明, 胚胎干细胞和源于胎儿的胰腺干细胞具有较高的致瘤性, 移植在体内自然分化时, 多形成肿瘤组织<sup>[6,18-19]</sup>。而我们建立的这例干细胞系是正常的二倍体细胞, 移植在裸鼠体内无致瘤性。这表明, 定向诱导源于成年胰腺导管干细胞分化形成功能性胰岛并移植治疗糖尿病, 具有更可靠的安全性。

### 参考文献 (References)

- Gomez DL, O'Driscoll M, Sheets TP, Hruban RH, Oberholzer J, McGarriple JJ, *et al.* Neurogenin 3 expressing cells in the human exocrine pancreas have the capacity for endocrine cell fate. *PLoS One* 2015; 10(8): e0133862.
- Tremblay JR, LeBon JM, Luo A. *In vitro* colony assays for characterizing tri-potent progenitor cells isolated from the adult murine pancreas. *J Vis Exp* 2016; 10(112): doi:10.3791/4016.
- Jin L, Feng T, Shih HP, Zerda R, Luo A, Hsu J, *et al.* Colony-forming cells in the adult mouse pancreas are expandable in matrigel and form endocrine/acinar colonies in laminin hydrogel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(10): 3907-12.
- Huch M, Bonfanti P, Boj SF, Sato T, Loomans CJ, van de Wetering M, *et al.* Unlimited *In vitro* expansion of adult bipotent pancreas progenitors through the Lgr5/R spondin axis. *EMBO J* 2013; 32(20): 2708-21.
- Han W, He X, Zhang M, Hu S, Sun F, Ren L, *et al.* Establishment of a porcine pancreatic stem cell line using T-REx™ system-inducible Wnt3a expression. *Cell Prolif* 2015; 48(3): 2301-10.
- Xiao M, An LL, Yang XY, Ge X, Qiao H, Zhao T, *et al.* Establishing a human pancreatic stem cell line and transplanting induced pancreatic islets to reverse experimental diabetes in rats. *Sci China C Life Sci* 2008; 51(9): 779-88.
- Rovira M, Scott SG, Liss AS, Jensen J, Thayer SP, Leach SD, *et al.* Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(1): 75-80.
- Sancho R, Gruber R, Gu G, Behrens A. Loss of Fbw7 reprograms adult pancreatic ductal cells into  $\alpha$ ,  $\delta$  and  $\beta$  cells. *Cell Stem Cell* 2014; 15(2): 139-53.
- Smukler SR, Arntfield ME, Razavi R, Bikopoulos G, Karpowicz P, Seaberg R, *et al.* The adult mouse and human pancreas contain rare multipotent stem cells that express insulin. *Cell Stem Cell* 2011; 8(3): 281-93.
- White MG, Al-Turaifi HR, Holliman GN, Aldibbiat A, Mahmoud A, Shaw JA. Pluripotency-associated stem cell marker expression in proliferative cell cultures derived from adult human pancreas. *J Endocrinol* 2011; 211(2): 169-76.
- Stevenson KS, McGlynn L, Hodge M, McLinden H, George WD, Davies RW, *et al.* Isolation, characterization, and differentiation of thy1.1-sorted pancreatic adult progenitor cell populations. *Stem Cells* 2009; 18(10): 1389-98.
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, *et al.* *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(14): 7999-8004.
- Lee J, Sugiyama T, Liu Y, Wang J, Gu X, Lei J, *et al.* Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. *Elife* 2013; 2: e00940.
- Hoesli CA, Johnson JD, Piret JM. Purified human pancreatic duct cell culture conditions defined by serum-free high-content growth factor screening. *PLoS One* 2012; 7(3): e33999.
- Noguchi H, Oishi K, Ueda M, Yukawa H, Hayashi S, Kobayashi N, *et al.* Establishment of mouse pancreatic stem cell line. *Cell Transplant* 2009; 18(5): 563-71.
- Chen XC, Liu H, Li H, Cheng Y, Yang L, Liu YF. *In vitro* expansion and differentiation of rat pancreatic duct-derived stem cells into insulin secreting cells using a dynamic three-dimensional cell culture system. *Genet Mol Res* 2016; 15(2): gmr.15028808.
- 效梅, 安立龙, 窦忠英. 单克隆人胰腺干细胞的形态和表达特征. *解剖学报(Xiao Mei, An Lilong, Dou Zhongying. Morphology and protein expression features of the mono-clone human pancreatic stem cell. Acta Anatomica Sinica)* 2009; 40(2): 55-8.
- Rezania A, Bruin J, Riedel M, Mojibian M, Asadi A, Xu J, *et al.* Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes* 2012; 61(8): 2016-29.
- Corritore E, Lee YS, Sokal EM, Lysy PA.  $\beta$ -cell replacement sources for type 1 diabetes: a focus on pancreatic ductal cells. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2016; 7(4): 182-99.