

新生仔兔胰腺干细胞的分离培养 及横向诱导分化研究*

冯若鹏, 张慧茹, 窦忠英

(西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 对新生仔兔胰腺干细胞的分离、培养方法进行了研究,并检测了其横向诱导分化为心肌、成骨、神经细胞的潜能。结果表明,分离到的新生仔兔胰腺干细胞为上皮样细胞,在传代过程中该细胞的生长特性未发生改变,并始终表达导管源胰腺干细胞的标志CK-19、PDX-1;新生仔兔胰腺干细胞经诱导可分化为心肌、神经和成骨细胞,经免疫组化染色鉴定显示,心肌样细胞表达 α -actin、神经样细胞表达NF-200而不表达GFA P、成骨样细胞茜素红染色呈阳性。证明该细胞具有多潜能性,是一种亚全能干细胞。

[关键词] 新生仔兔; 胰腺干细胞; 诱导分化

[中图分类号] Q 813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)06-0016-05

干细胞按照来源可以分为胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞可在体外无限增殖并保持未分化状态,可以分化为所有成体组织中的所有细胞。与胚胎干细胞相比,成体干细胞分化潜能相对较弱,但也有大量的研究认为^[1-4],成体干细胞同样具有横向分化的潜能。Shen等^[5]通过转入C/EBP β 基因,将已建系AR42J-B13胰腺细胞转分化成肝细胞,Yang等^[6]通过流式细胞仪分离到的Thy-1.1阳性肝卵圆细胞,在高糖环境诱导下形成三维胰岛细胞簇并表达胰岛细胞分化相关标记和内分泌激素,同时丢失肝细胞蛋白Her-par的表达。

胰腺干细胞属于成体干细胞范畴,其来源主要有胰腺导管上皮源、胰岛源以及外分泌部来源。其中关于导管源胰腺干细胞的研究是目前胰腺干细胞研究的一个热点。Bonner-Weir等^[7]与Katdare等^[8]分别从人和小鼠胰腺中分离到CK-19阳性的胰腺导管上皮源胰腺干细胞,这些细胞经诱导分化后可以分泌胰岛素。但在采用胰腺干细胞诱导分化后进行移植的探索过程中,对胰腺干/祖细胞分离方法和培养体系的研究多在人和鼠中进行,对实验动物兔胰腺干细胞的分离培养却鲜见报道。

本研究对新生仔兔胰腺干细胞进行了分离培养和横向诱导分化研究,检测了其横向分化为其他胚

层细胞的能力,以为成体干细胞,特别是胰腺干细胞的横向分化研究及临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 1~9日龄新西兰杂种雄性仔兔,由西北农林科技大学国家干细胞工程技术研究中心陕西分中心实验动物场提供。

1.1.2 试剂 EDTA,胰蛋白酶,IV型胶原酶均购于 invitrogen 公司;低糖-DMEM 购于 GBCO 公司;新生牛血清(Neonatal bovine serum,NBS)购于郑州佰安生物工程有限公司;表皮生长因子(Epithelium growth factor,EGF)购于R&D公司;明胶,烟碱(Nicotinamide,Nic),5-氮胞苷(5-azacytidine,5-Aza), β 巯基乙醇(β mercaptoethanol, β Me),地塞米松(dexamethasone,Dex),抗坏血酸盐(ascorbate-2 phosphate), β 甘油磷酸钠(β Glycerophosphate disodium)和茜素红(Alizarin Red S)购于Sigma公司;噻唑兰(Thiazolyl blue MTT),十二烷基磺酸钠(1-Dodecanesulfonic acid sodium salt,SDS)均购于华美公司;人胰十二指肠同源异型盒基因(pancreatic and duodena-1 homeobox1,PDX-1)单克隆抗体购于Chemicon公司;鼠细胞角

* [收稿日期] 2005-12-12

[基金项目] 国家“863”计划项目(2005AA219050);教育部重大项目(03160)

[作者简介] 冯若鹏(1980-),男,内蒙古包头人,在读硕士,主要从事哺乳动物胰腺干细胞研究。E-mail: fengruopeng@163.com

[通讯作者] 窦忠英(1939-),男,陕西兴平人,教授,博士生导师,主要从事哺乳动物胚胎工程和干细胞工程研究。E-mail: douzhongying@china.com

蛋白 19 (cytokeratin-19, CK-19) 单克隆抗体, 鼠 α -actin 多克隆抗体, 人神经丝蛋白-200 (Neurofilament-200, NF-200) 多克隆抗体, 兔胶质纤维酸性蛋白 (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) 单克隆抗体和 HistoStain™-Plus Kits 免疫组化染色试剂盒均购于北京中山生物技术有限公司。

1.2 新生仔兔胰腺干细胞的分离与培养

将 1~9 日龄的仔兔于体积分数 75% 酒精中溺死, 无菌采取胰腺组织。在含青、链霉素各 100 U/mL 的无钙、镁的磷酸盐缓冲液 (PBS-) 中浸泡 30 min 后, 剪去组织周围脂肪、血管和被膜, 并用 PBS- 冲洗后, 剪成 1~2 mm³ 的碎块, 用 1 mg/mL IV 型胶原酶于 37 °C 消化 15~20 min。用含体积分数 10% NBS 的低糖-DMEM 溶液加入消化液中中止消化, 孔径 0.5 μ m 滤纱过滤, 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀重悬后重复离心 2 次以除去胶原酶和血细胞。细胞用含体积分数为 10% NBS 和 10 mmol/L Nic 的低糖-DMEM 贴壁培养液悬浮后, 以 5×10^5 /孔接种在铺有 10 g/L 明胶的六孔板上, 37.5 °C, 体积分数 5% CO₂ 条件下培养 48 h 后, 换含 10 ng/mL EGF 和体积分数为 10% NBS 的低糖-DMEM 扩增培养液继续培养。以后每隔 1 d 换 1 次培养液, 直至细胞铺满 70% 的血底后, 以含 0.4 g/L EDTA 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后, 以 2×10^5 /孔接种于六孔板上传代, 传代过程中采取分次消化法和分次贴壁法对胰腺导管上皮源胰腺干细胞进行纯化, 倒置显微镜下观察不同代次细胞形态变化。传代后, 部分细胞继续培养, 部分细胞进行诱导分化, 部分细胞进行冷冻保存。

1.3 免疫组化染色鉴定

分别取第 5, 10, 15 代培养细胞进行胰腺干细胞特征性标志 PDX-1, CK-19 免疫组化染色。免疫组化染色方法均按照 HistoStain™-Plus Kits 免疫组化染色试剂盒说明进行。一抗分别为: 人 PDX-1 单克隆抗体 (1:1 000 倍稀释), 鼠 CK-19 单克隆抗体 (1:1 000 倍稀释); 二抗为生物素标记的羊抗兔、鼠、人的多克隆抗体。同时以兔成纤维细胞为阴性对照进行染色。

1.4 新生仔兔胰腺干细胞生长曲线的绘制

取第 5, 10, 15 代新生仔兔胰腺干细胞, 分别接种于铺有明胶的 96 孔板中, 每孔 1 000 个细胞, 24 h 后用 MTT^[9] 法测定细胞增殖能力, 每天测 1 次, 每次测 12 孔 (即每天 12 个重复), 共测 8 d。测定时每孔加 180 μ L 培养液与 20 μ L MTT 继续培养 3.5 h,

之后吸去 100 μ L 培养液, 加入等量的 SDS 并吹打均匀, 随后将培养板放入培养箱内继续孵育, 30 min 后取出培养板, 在酶标仪上分别于 450 nm 与 630 nm 波长处测其光吸收值 (OD 值), 对照为空气, 共测 8 d。求所得 OD 值的平均值, 以 OD 平均值为纵坐标, 培养时间为横坐标绘制生长曲线。

1.5 新生仔兔胰腺干细胞横向诱导分化试验

1.5.1 向心肌细胞诱导分化 取第 10 代新生仔兔胰腺干细胞, 以 5×10^4 /孔接种于四孔板上培养, 待细胞长满 70%~80% 皿底时, 将扩增培养液换为体积分数 10% NBS 和 10 mmol/L 5-Aza 的低糖-DMEM 诱导培养液培养^[10], 24 h 后再换回原扩增培养液继续培养, 10 d 后取培养物, 用多聚甲醛固定, 按试剂盒说明书进行心肌细胞标志 α -actin 染色, 其中一抗为鼠 α -actin 多克隆抗体 (1:100 倍稀释), 二抗为羊抗鼠多克隆抗体。同时设兔成纤维细胞对照组。

1.5.2 向成骨细胞诱导分化 采用的细胞同上, 诱导液为含体积分数 10% NBS, 10^{-4} mmol/L Dex, 10 mmol/L β 甘油磷酸钠和 50 mg/L 抗坏血酸盐的低糖-DMEM 诱导培养液^[3], 隔天换液。用该培养液培养 14 d 后, 取培养物, 以多聚甲醛固定, 进行茜素红染色。同时设兔成纤维细胞对照组。

1.5.3 向神经细胞诱导分化 采用的细胞同上, 用含体积分数 5% NBS, 1 mmol/L β Me^[4] 的低糖-DMEM 培养液先进行 24 h 预诱导, 之后换为含 5 mmol/L β Me 的无血清低糖-DMEM 培养液进行正式诱导培养, 每小时照相 1 次。4 h 后取培养物, 以多聚甲醛固定, 按试剂盒说明书进行 NF-200, GFAP 染色, 其中一抗分别为人 NF-200 多克隆抗体 (1:500 倍稀释), 兔 GFAP 单克隆抗体 (1:1 000 倍稀释), 二抗为羊抗人、兔多克隆抗体。同时设兔成纤维细胞对照组。

2 结果与分析

2.1 新生仔兔不同代次胰腺干细胞生长曲线及形态

新生仔兔第 5, 10, 15 代胰腺干细胞的生长趋势基本一致, 在细胞接入培养皿的 1~2 d 出现一个增殖峰, 3~5 d 时增殖较快, 6~8 d 时生长较为平稳 (图 1)。显微镜下观察发现, 在传代过程中上皮样细胞逐渐增多 (图 2A, B)。

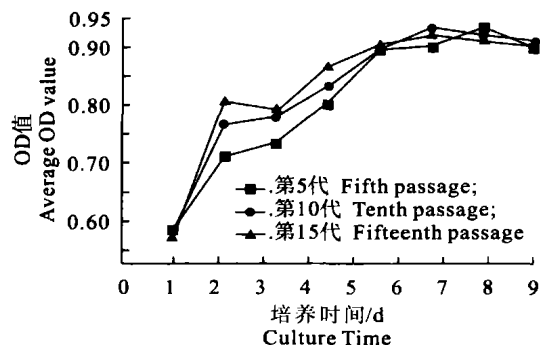


图1 新生仔兔不同代次胰腺干细胞生长曲线

Fig. 1 Growth curves of neonatal rabbit pancreatic stem cells in different passages

2.2 传代细胞干细胞标志染色结果

通过免疫组化染色可以观察到, 传代过程中新生仔兔胰腺干细胞一直表达CK-19与PDX-1(图

3), 说明该细胞的来源为胰腺导管上皮, 并在传代过程中一直保持未分化状态。

2.3 新生仔兔胰腺干细胞诱导分化结果

2.3.1 向心肌细胞诱导分化 新生仔兔胰腺干细胞经含体积分数10% NBS和10 mmol/L 5-Aza的低糖-DMEM培养液诱导24 h后, 继续培养于原扩增培养液中3~5 d内细胞生长停滞, 7 d以后诱导细胞又开始恢复生长, 细胞形态逐渐拉长, 至10 d时可见部分细胞变细长。免疫组化染色显示, 细胞呈 α -actin 阳性(图4A)。

2.3.2 向成骨细胞诱导分化 加入诱导液后3 d内细胞增殖正常, 4~5 d时生长减慢, 出现一个死亡期, 细胞总数减少50%以上, 7~8 d后逐渐恢复生长, 细胞形态转变为立方状或三角形, 体积增大; 随着诱导时间延长, 细胞不断增多聚集成团。14 d后茜素红染色呈阳性(图4B)。

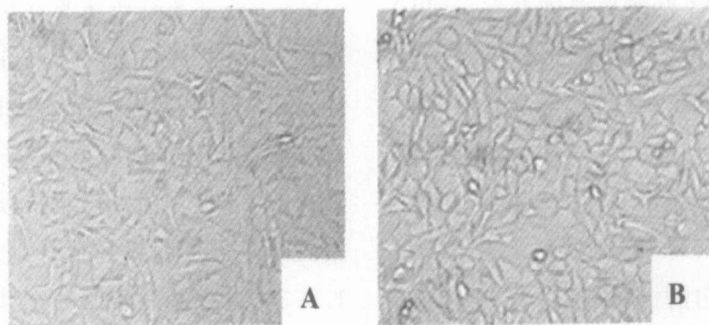


图2 新生仔兔胰腺干细胞形态(×100)

A. 纯化前期(第2代)混合生长的上皮样细胞与成纤维细胞; B. 纯化后期(第5代)混合生长的上皮样细胞与成纤维细胞

Fig. 2 Shape of neonatal rabbit pancreatic stem cell (×100)

A. Mixing cells (the second passage) of fibroblast and epithelium in earlier stage purification; B. mixing cells (the fifth passage) of fibroblast and epithelium in later stage purification

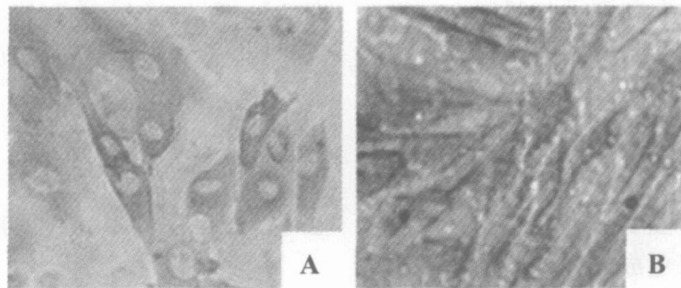


图3 新生仔兔胰腺干细胞免疫组化染色结果(×200)

A. 第10代细胞CK-19 阳性; B. 第10代细胞PDX-1 阳性

Fig. 3 Immunohistochemical staining results of neonatal rabbit pancreatic stem cells (×200)

A. The tenth passage cells positive for CK-19; B. The tenth passage cells positive for PDX-1

2.3.3 向神经细胞诱导分化 用含体积分数5% NBS, 1 mmol/L β Me的低糖-DMEM诱导液预诱

导后, 细胞形态无明显变化。正式诱导1 h后, 细胞胞体变得细长, 2~3 h后胞体更细长, 4 h后可见胞

体伸出少量长丝状突起(图4C)。免疫组化染色结果显示,诱导的神经样细胞不表达GFA P 而表达

NF-200(图4D)。对照组细胞形态未改变。

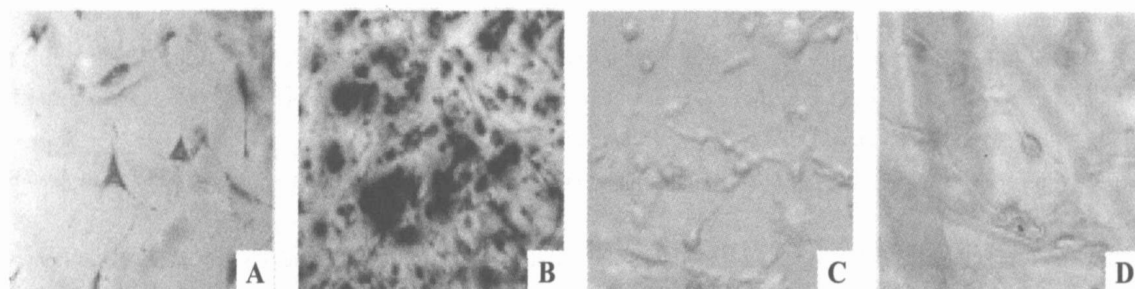


图4 诱导分化中的新生仔兔胰腺干细胞($\times 100$)

A. 向心肌细胞诱导 α -actin 阳性的仔兔胰腺干细胞; B. 向成骨细胞诱导的茜素红染色阳性仔兔胰腺干细胞;
C. 向神经细胞诱导4 h 时的仔兔胰腺干细胞; D. 向神经细胞诱导的NF-200 阳性仔兔胰腺干细胞

Fig. 4 Neonatal rabbit pancreatic stem cells in induction ($\times 100$)

A. The α -actin positive myocardial induced cell; B. The alizarin red positive osteoblast induced cells;

C. The morphology of neuro induced cells; D. The NF-200 positive neuron induced cells

3 讨论

胰腺导管上皮细胞一直被认为是胰腺干细胞的主要来源之一^[7],国内外许多关于胰腺干细胞的试验研究,均是建立在分离纯化导管上皮样细胞的基础之上。本实验在传代培养过程中,依据上皮细胞与成纤维细胞贴壁特性的不同,采取分次消化与分次贴壁的方法纯化导管上皮来源的胰腺干细胞。经3~4次纯化后,上皮样细胞明显增多,但该细胞至今尚未达到100%的纯化,仍混有少量成纤维细胞,这主要是由于实验中采用的培养方法为群体培养而不是单克隆培养。为排除成纤维细胞对实验结果的影响,在诱导分化实验中设兔成纤维细胞为对照。张慧茹等^[11]采用该方法分离到的新生仔兔胰腺干细胞经鉴定为导管上皮来源胰腺干细胞,诱导后可以形成 β 细胞或胰岛团,并可在高糖刺激作用下释放胰岛素。本实验结果显示,在含有EGF的传代培养液中新生仔兔胰腺干细胞增殖速度一直较快,第5,10,15代细胞生长特征一致,并一直维持未分化状态,细胞现已传至19代。Corentin等^[12]的研究结果显示,EGF具有促进胚胎期胰腺内皮细胞增殖并使其维持未分化状态的作用。所以本实验结果的获得与EGF的作用是密不可分的。

Zulewski等^[13]将小鼠胰腺干细胞诱导分化为

肝细胞; Kruse等^[14]将小鼠和人胰腺干细胞经悬液培养后形成“类器官体”,并使其自分化为平滑肌细胞、神经胶质细胞、软骨细胞、上皮细胞; Seaberg等^[15]通过克隆方法从成年小鼠胰腺分离得到多潜能的祖细胞,这些细胞分化后可形成神经元与神经胶质细胞的克隆。以上研究结果证实,在胰腺中确实存在具有多潜能的干细胞,即亚全能干细胞。张慧茹等^[11]在实验中并未检测新生仔兔胰腺干细胞的多潜能性。本实验采用定向诱导方法,将新生仔兔胰腺干细胞诱导成为心肌细胞、成骨细胞以及神经细胞,证明该细胞具有向其他胚层细胞分化的潜能。Yuichi Hori等^[16]诱导人神经干细胞分化为产胰岛素的细胞,并对其进行了功能检测认为,神经干细胞可成为胰岛移植的一个潜在来源。胰腺细胞与神经细胞这两种细胞本身在发育过程中就有一定的联系,其在体外条件下能够相互转分化的结果表明,这两种细胞之间关系的研究,可能成为运用移植方法治疗糖尿病与退行性神经系统疾病研究的一个热点。

本实验中分离得到的新生仔兔胰腺干细胞经诱导后可分化为其他胚层的细胞,证明在草食哺乳动物兔的胰腺内确实存在具有横向分化潜能的亚全能干细胞,至于对该细胞来源的分析仍需进一步的实验来探讨,以证明其是胚胎干细胞在成体中的残留或骨髓间充质干细胞在胰腺中分布的亚群。

[参考文献]

- [1] Blau H M, Brazelton T R, Weimann J M, et al The evolving concept of a stem cell: entity or function[J]. Cell, 2001, 105(7): 829-841.
- [2] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*[J]. Journal of Clinical Investi-

- gation, 1999, 103(5): 697-705
- [3] 康新勤, 臧伟进, 胥晓丽. 大鼠骨髓间充质干细胞定向成骨细胞分化中碱性磷酸酶的变化[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2004, 25(4): 366-368
- [4] Cavanaugh J E, Ham J, Heman M, et al. Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons[J]. The Journal of Neuroscience, 2001, 21(2): 434-443
- [5] Shen C N, Slack J M, Tosh D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver[J]. Nature Cell Biology, 2000, 2(12): 879-887.
- [6] Yang L ijun, L i Shi wu, Heather Hatch, et al. *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(12): 8078-8083
- [7] Bonner-Weir S, Taneja M, Weir G C, et al. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(14): 7999-8004
- [8] Katdare M R, Bhonde R R, Parab P B. Analysis of morphological and functional maturation of neo-islets generated *in vitro* from pancreatic ductal cells and their suitability for islet banking and transplantation[J]. Journal of Endocrinology, 2004, 182: 105-112
- [9] 辛国安, 苏子毅, 李国辉. MTT法快速测定人表皮细胞的生长增殖[J]. 江西医药, 2000, 35(5): 263-264
- [10] 孟自力, 沈振亚, 焦 鹏, 等. 体外诱导骨髓基质细胞向心肌细胞分化的实验研究[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2004, 24(4): 499-501
- [11] 张慧茹, 冯若鹏, 刘雨潇, 等. 兔胰腺干/祖细胞的分离培养和鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(6): 768-771
- [12] Corentin Cras-M'neur, Lynda Elghazi, Paul Czernichow, et al. Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells *in vitro*[J]. DIABETES, 2001, 50(7): 1571-1579
- [13] Zulewski H, Abraham E J, Gerlach M J, et al. Multipotent nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine and hepatic phenotypes[J]. Diabetes, 2001, 50(3): 521-533
- [14] Kruse C, Birth M, Rohwedel J, et al. Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas[J]. Applied Physics A: Materials Science and Processing, 2004, 79(7): 1617-1624
- [15] Seaberg, Raewyn M, Smukler, et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(9): 1115-1124
- [16] Yuichi Hori, Gu Xueying, Xie Xiaodong, et al. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells[J]. PloS Medicine, 2005, 2(4): 347-356

Isolation, culture and transdifferentiation of neonatal rabbit pancreatic stem/progenitor cells

FENG Ruo-peng, ZHANG Hui-ru, DOU Zhong-ying

(Shaanxi Branch Center of China Stem Cell Engineering & Technology Research Center,
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This research investigated the isolation and culture of neonatal rabbit pancreatic stem cells, examined the capacity of differentiation into myocardial-like cells, neurons osteoblasts. The results demonstrated that the cell isolated was epithelium cell, whose growth characteristic did not change in the process of subculture, and expressed the markers of ductal pancreatic stem cell of CK-19 and PDX-1. This cell can be induced to differentiate into myocardia, neurons, osteoblasts. It's positive for α actin and NF-200 but negative for GFA P by the method of immunohistochemical staining and Alizarin Red staining. The result proves that this cell is a type of subtotipotent stem cell resided in pancreas.

Key words: neonatal rabbit; pancreatic stem cell; induced differentiation