

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.02.004

人脐带间充质干细胞体外诱导分化 胰岛样细胞及形态学观察*

袁丽丽¹ 张炳强² 王玮玮^{3▲} 李蒙^{3▲} 张嘉澍^{3▲} 胡鑫童^{3▲}

(¹ 济宁医学院基础医学院, 济宁 272067; ² 卫生部细胞移植重点实验室临床中心, 青岛 266000; ³ 济宁医学院, 济宁 272029)

摘要 **目的** 构建人脐带间充质干细胞(human umbilical cord derived mesenchymal stem cells, HUMSCs)体外培养体系,并诱导其向胰岛样细胞分化。**方法** 体外分离培养 HUMSCs,采用流式细胞术(flow cytometry, FCM)对 HUMSCs 特异标记物进行检测;先后加入 β-巯基乙醇及高糖的分步诱导法诱导 HUMSCs 向胰岛样细胞分化,采用 RT-PCR、双硫腙染色对诱导后细胞进行胰岛样细胞鉴定。**结果** FCM 结果显示 HUMSCs 表达 CD29、CD73、CD90 及 CD105,不表达或低表达 CD45、CD86、HLA-DR 及 CD34;诱导的胰岛样细胞表达 PDX-1 和 Insulin,双硫腙染色阳性。**结论** HUMSCs 可经分步诱导法分化为胰岛样细胞,能为细胞移植治疗糖尿病提供丰富的种子细胞。

关键词 人脐带间充质干细胞;分化;胰岛样细胞

中图分类号:R329.2 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2017)04-093-06

Morphological study of umbilical cord derived mesenchymal stem cells differentiating into islet-like cells in vitro

YUAN Lili¹, ZHANG Bingqiang², WANG Weiwei³, LI Meng³, ZHANG Jiashu³, HU Xintong³

(¹ School of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China;

² Key Laboratory of Cell Transplantation, Ministry of Health, Qingdao, 266000, China;

³ Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Objective To establish a cell line of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells (HUMSCs) and induce them differentiating into islet-like cells in vitro. **Methods** In vitro, mesenchymal stem cells were isolated and cultivated from human umbilical cord. Flow cytometry (FCM) was used to analyze the specific markers of mesenchymal stem cells. The HUMSCs were induced to differentiating into islet-like cells conducted by stepwise, firstly β-mercaptoethanol, and then high glucose. RT-PCR and dithizone staining were applied for identifying the islet-like cells. **Results** CD29, CD73, CD90, and CD105 were expressed in the mesenchymal stem cells, while there was no expression or low expression of CD45, CD86, HLA-DR, CD34. PDX-1 and Insulin were detected by RT-PCR. The dithizone staining was positive in the induced cells. **Conclusion** It shows a stable cell line of HUMSCs, which successfully gains islet-like cells by the following induced treatments of β-mercaptoethanol and high glucose. It could provide abundant seeding cells for cell transplantation on treating diabetes.

Keywords: HUMSCs; Differentiation; Islet-like cell

I 型糖尿病的治疗一直是医疗卫生组织的难

题。目前主要用胰岛素注射治疗进行血糖控制,这给患者和社会带来沉重的负担。近几年科学家提出胰岛细胞移植是一种比较可靠的根治糖尿病的方法。而用于移植的胰岛细胞极其匮乏使得这项研究受到限制。人脐带间充质干细胞(human um-

* [基金项目] 济宁医学院教师指导学生科研项目 (2015ZDXS-8)

▲王玮玮,李蒙:济宁医学院临床医学院 2013 级学生;
张嘉澍,胡鑫童:济宁医学院临床医学院 2014 级学生

bilical cord derived mesenchymal stem cells, HUMSCs)具有多向分化的潜能,本实验先分离新生儿脐带 HUMSCs 并鉴定,而后先加入含 EGF、β-巯基乙醇的 DMEM /F12 培养基再加入高糖培养基诱导其向胰岛细胞分化,希望通过本实验建立稳定的 HUMSCs 体外培养体系,提供 HUMSCs 向胰岛样细胞分化的方法,为临床细胞移植治疗糖尿病提供胰岛细胞来源。

1 材料与方

1.1 实验材料

取足月妊娠行剖宫产手术健康新生儿的脐带 8 条,每条约取 20cm。

DMEM/F12(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);bFGF(美国 Sigma 公司);EGF(美国 Sigma 公司);β-巯基乙醇(上海试剂四厂)。高糖 DMEM(H-DMEM)培养基(美国 Hyclone 公司);β-巯基乙醇(上海试剂四厂);双硫脲(美国 Sigma 公司);DMSO(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HUMSCs 的分离和传代 无菌环境下取正常足月剖宫产娩出的健康新生儿的脐带约 20cm,用 0.01mmol/L PBS 缓冲液充分冲洗,然后剥离脐带外侧的羊膜及其内侧的脐动、静脉,取剩余组织,用眼科剪将组织剪成 1mm 的小块,加入 2.5 g/L 的胰酶,37 °C 消化 30 min,再以终浓度为 1.0 g/L IV 型胶原酶 37 °C 消化 60min。200 目铜网过滤,制成单细胞悬液,1500 rpm 离心 10min 收集细胞,台盼蓝染色行活细胞计数,以 5 × 10⁵ 个/mL 的细胞浓度分装于 75 mL 培养瓶中。培养基采用 DMEM/F12(1:1)培养基。将培养瓶置于 37 °C、饱和湿度、体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱中培养 2 ~ 3d 后,全量换液,丢弃未贴壁细胞,根据细胞生长情况,每 3 ~ 4 天全量换液 1 次。待细胞生长至 70% ~ 80% 融合时,用 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化。消化过程中,用倒置显微镜观察细胞消化情况,待细胞大部分胞体回缩、变圆,即终止消化,然后分为 2 ~ 3 份行传代培养,记为 P1 代。传代培养每 3 d 全量换液,在贴壁细胞彼此融合铺满瓶底后,再重复上述操作,传为 P2 代继续培养,以此类推。每日观察细胞形态,适时拍照。

1.2.2 HUMSCs 的鉴定 取培养 P2 代的贴壁细

胞加入胰蛋白酶消化后,用含体积分数为 1% 小牛血清白蛋白 PBS 调整细胞浓度至 1 × 10⁴/μL。分别加入 FITC 标记的下列鼠抗人单克隆抗体:CD29、CD73、CD90、CD105、CD34、CD86、CD45、HLA-DR,直标单抗流式细胞仪检测细胞表面标记物的表达。空白对照组,以 PBS 代替一抗,加入 FITC 二抗。

1.2.3 HUMSCs 向胰岛样细胞的诱导分化 待传至 P1 代细胞达 70% ~ 80% 融合时进行诱导。移出原来脐带间充质干细胞培养基,2.5g/L 胰蛋白酶消化后收集 P2 代细胞,实验组用含有 10ng/mL EGF 及 1mmol/Lβ-巯基乙醇的 DMEM/F12(不含 FBS)培养基诱导 6d,之后吸去旧培养基,PBS 洗细胞 2 次,接着加入含 5% FBS 的 H-DMEM 继续诱导,细胞生长至 70% ~ 80% 融合时,胰酶消化传代,传代得到的细胞记为 P1 代,随后继续加入 5% FBS 的 H-DMEM 继续诱导并适时传代。在倒置显微镜下观察细胞形态的变化并拍照。另设对照组不加 EGF 和 β-巯基乙醇。培养方法同上。

1.2.4 RT-PCR 检测 HUMSCs 诱导后细胞中 Insulin 及 PDX-1 表达情况 收集 P2,P4,P6 代 HUMSCs 诱导后的细胞,参照 Trizol(美国 Invitrogen 公司)提取不同代次实验组和对照组细胞各自的总 RNA,取 1μg RNA 合成 cDNA PCR 鉴定人 Insulin 及 PDX-1 表达的方法按照 RNA PCR 试剂盒(北京天根生化科技公司)说明书操作。基因引物的设计用 primer 5 软件,由 Invitrogen 公司合成,引物序列见表 1。

表 1 PCR-引物序列

基因	序列	大小/bp
GAPDH	F:5' GCAACTAGGATGGTGTGGCT 3'	582
	R:5' TCCCATTCCCCAGCTCTCATA 3'	
Insulin	F:5' GAAACTTGGTGGCATCGT3'	112
	R:5' CTCAGTGAAGCCCCAGAGG3'	
PDX-1	F:5' TGGCTATCCACTCCTGCTCT 3'	746
	R:3' GGTACTGGGGAGGCACTAGA 5'	

1.2.5 双硫脲染色鉴定胰岛 β 细胞 取 HUMSCs 诱导培养后的 P2 代细胞团和未诱导的对照组细胞,吸除培养基,PBS 洗细胞 2 次后,各加入 5ml PBS 及 50μl 双硫脲工作液(终浓度 1%,V/V),放置 37 °C 孵育箱中,15min 后移出液体,PBS 洗细胞 2 次,倒置显微镜下观察细胞着色情况并拍照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计学软件处理数据,各组率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 HUMSCs 形态学观察

分离脐带胰蛋白酶等消化后得到的单细胞,行台盼蓝活细胞计数 >96%。培养基中,细胞在接种 4 h 后陆续开始贴壁,2 d 后细胞完全贴壁。6 ~ 7d 后倒置显微镜下细胞像成纤维细胞样呈现长梭形形态,生长均匀,大致平行排列,呈现成纤维样细胞形态。见图 1。

2.2 HUMSCs 流式细胞仪分析结果

取培养 P2 代贴壁的 HUMSCs,加入 FITC 标记的下列鼠抗人单克隆抗体: CD29、CD73、CD90、CD105、CD34、CD86、CD45、HLA-DR, 直标单抗流

式细胞仪检测细胞表面标记物的表达。流式细胞仪分析结果显示,从脐带分离培养的细胞高表达 CD29、CD73、CD90、CD105,不表达 CD86,极低表达 CD45、HLA-DR、CD34。见图 2。

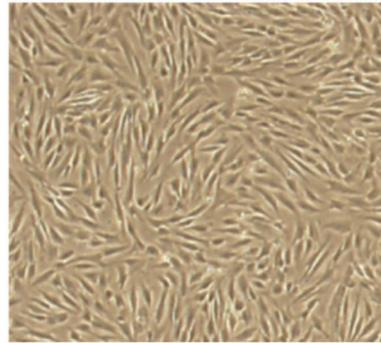
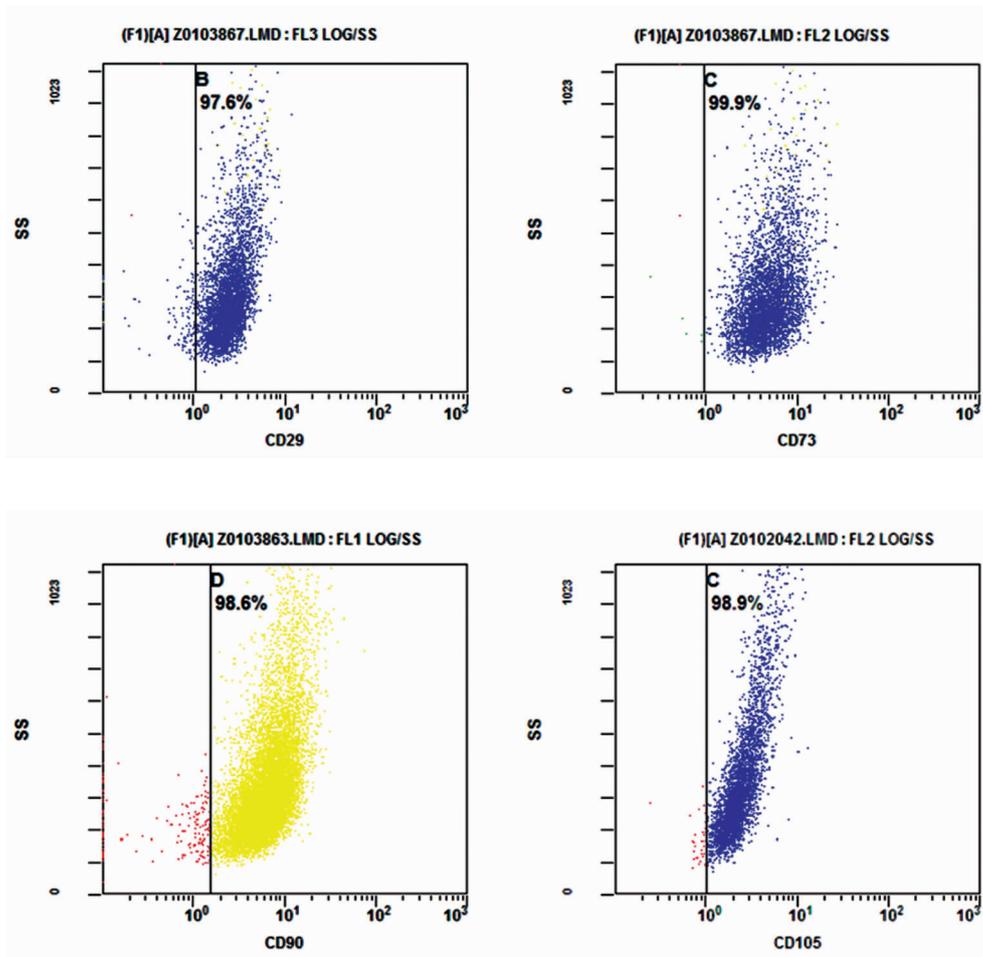


图 1 脐带间充质干细胞培养光镜图(×400)



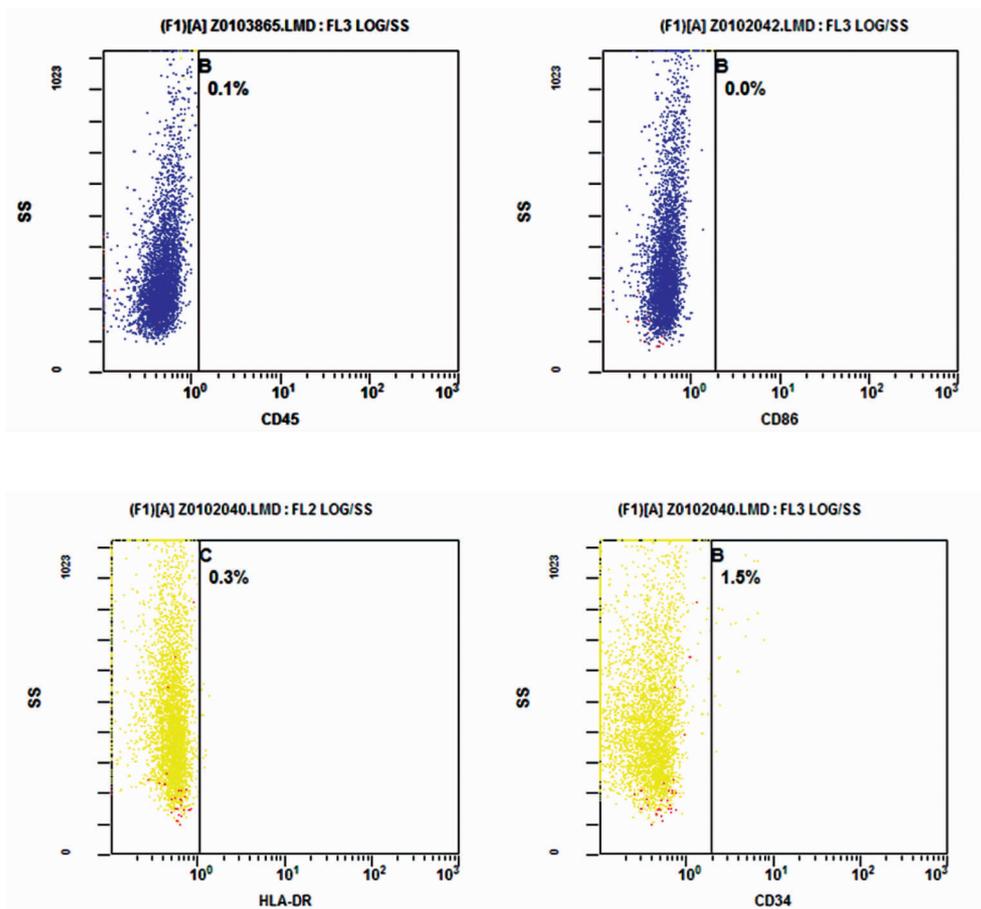


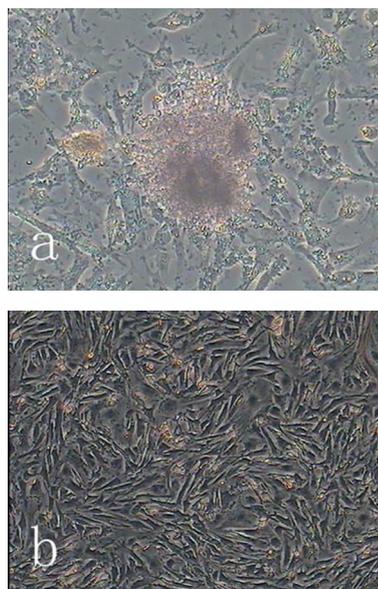
图 2 流式细胞仪检测特异细胞标记物的表达

2.3 HUMSCs 向胰岛样细胞诱导分化光镜观察结果

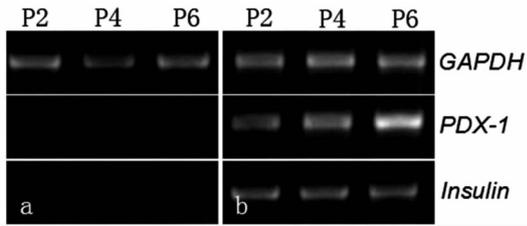
先加入含有 EGF 及 β -巯基乙醇的 DMEM / F12 (不含 FBS) 培养基 6d, 而后加入高糖培养基诱导后, 细胞透亮折光较好, 形态开始出现变化, 由原来的成纤维状逐渐开始转变成类圆形, 多角形以及不规则形状, 部分细胞逐渐变成细胞团状, 而对照组变化不大。见图 3。

2.4 HUMSCs 诱导后 PDX-1 及 Insulin 表达情况

取 P2、P4 和 P6 实验组及对照组 HUMSCs 经 EGF、 β -巯基乙醇诱导 6d 后, 实验组细胞(右)可检测到 PDX-1 的阳性表达而对照组(左)不表达 PDX-1; 加入高糖培养基继续诱导 6d 后实验组胰岛素基因 Insulin 呈阳性表达, 而对照组 Insulin 不表达。见图 4。



注: a. 诱导分化 12d 实验组细胞光镜照片, b. 诱导分化 12d 对照组细胞光镜照片
图 3 HUMSCs 的诱导分化(×400)

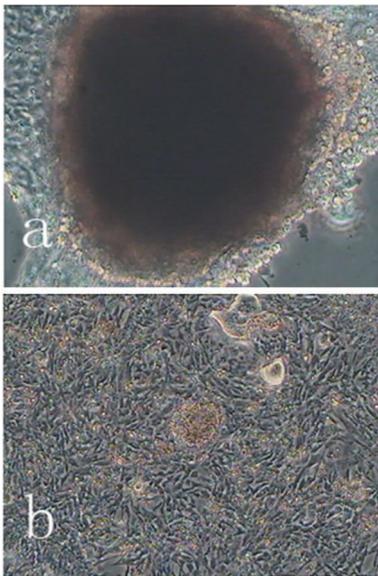


注:a. 对照组;b. 实验组

图 4 经 β -巯基乙醇及高糖诱导后 P2, P4, P6 代 PDX-1 及 Insulin 表达情况

2.5 双硫脲染色结果

P2 代 HUMSCs, 经 EGF、 β -巯基乙醇诱导及高糖培养基继续诱导培养, 取诱导后的 P2 代实验组细胞团和未诱导的对照组细胞, 双硫脲染色, 鉴别胰岛 β 细胞内锌离子螯合情况^[1]。实验组细胞部分细胞胞浆被染成棕红色, 呈双硫脲阳性染色(图 5-a), 提示 HUMSCs 经 EGF、 β -巯基乙醇及之后的高糖诱导后的细胞含锌离子, 对照组则不染色(图 5-b)。



注:a. 实验组($\times 400$); b. 对照组($\times 100$)

图 5 HUMSCs 诱导分化后双硫脲染色

3 讨论

HUMSCs 是指一种存在于新生儿脐带组织中的多功能干细胞, 可在体外进行分离、培养, 具有稳定的生物性能, 可多次传代扩增, 并能向许多种组织内的细胞分化。HUMSCs 取材方便, 易于收集、保存, 具有不受道德及法律的限制等优点, 是一种很好的干细胞来源。Schugar 等研究者采用了组织块法和酶消化法两种方法分别培养出脐带间充质

干细胞, 这也是目前较为常用的两种方法^[2-3]。本实验采用的是改良后的胰酶加 IV 型胶原酶消化法, 倒置显微镜下观察到细胞贴壁生长, 数日后像成纤维细胞样呈现长梭形形态与脐带间充质干细胞形态一致。HUMSCs 表达 CD29、CD59、CD105、CD44、CD73、CD90 等标记物, 不表达或低表达造血细胞的细胞标记物 CD14、CD33、CD34、CD28、CD45、CD217^[4]。本实验用流式细胞术鉴定从脐带分离培养的细胞, 高表达脐带间充质干细胞的细胞标记物 CD29、CD73、CD90、CD105, 造血细胞标记物 CD34、CD45 表达极低或不表达。这些标记物的表达都符合 HUMSCs 的标准, 认为本实验从脐带分离的细胞, 用改良后的胰酶加 IV 型胶原酶消化法培养也可以得到脐带间充质干细胞。

HUMSCs 向胰岛 β 细胞分化的诱导因素包括两大类: 一类为启动胰岛 β 细胞特异性转录因子的生物因子, 如 bFGF、肝细胞生长因子、尼克酰胺等。另一类为诱导 nestin 蛋白的表达, 如 β -巯基乙醇、DMSO 等。Nestin 属于第 6 类中间丝蛋白, 主要表达于神经系统发育中的神经干细胞和祖细胞, 可作为神经干细胞和祖细胞的特异性标记物^[5-6]。从胚胎发育的位置分析, 神经元细胞与胰腺内分泌细胞离得很近, 因此有报道尝试先将干细胞诱导分化为神经细胞前体, 然后再诱导其向胰岛样细胞分化, 取得了很好的效果^[7]。马桂霞等^[8]报道, 在 DMEM 培养基中先加入 β -巯基乙醇、尼克酰胺等先行诱导而后用高糖诱导脐带 HUMSCs, 获得了胰岛细胞。本实验在 DMEM / F12 培养基中先加入了 bFGF, EGF, β -巯基乙醇培养一段时间, 目的是用 β -巯基乙醇诱导 HUMSCs 向神经前体细胞转变, 而 bFGF 作为启动胰岛 β 细胞的特异性转录因子, 促进向胰岛 β 细胞分化, bFGF 也可促使细胞分裂增殖, 有利于获得更多的胰岛细胞。在较短时间内, 高浓度葡萄糖不仅可以增强胰岛 β 细胞胰岛素基因的表达, 还可以刺激干细胞向胰岛 β 样细胞分化。因此, 本诱导实验中随后加入高糖培养基, 诱导 HUMSCs 向胰岛样细胞分化。结果在倒置显微镜下观察到实验组细胞部分呈球团样生长, 与胰岛细胞的形态相似。

近年来研究发现 PDX-1 是胰腺发育的至关重要的基因, 可促进胰腺早期发育和晚期胰岛 β 细胞的分化, 还可促进胰岛素、葡萄(下转第 102 页)

1673-8225. 2003. 07. 015.

- [15] Harrison DC, Davis RP, Bond BC, et al. Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 89 (1-2): 133-146.

DOI:10.1016/S0169-328X(01)00058-4.

(收稿日期 2017-03-09)
(责任编辑:石俊强)

.....
(上接第 97 页)

糖转运蛋白-2 及胰岛淀粉样多肽的转录,甚至与胰岛的再生有关,因此,PDX-1 可作为胰腺干细胞的特异性标志之一^[9-10]。本实验用 RT-PCR 检测了第 2 代,第 4 代和第 6 代 HUMSCs 经 bFGF, EGF, β -巯基乙醇诱导后细胞 PDX-1 的表达,实验组均出现相应的 PDX-1 蛋白条带,对照组无 PDX-1 蛋白的表达,加入高糖培养基后检测到的胰岛素的表达也是如此。经双硫腍染色来鉴别细胞内锌离子螯合情况,实验组细胞部分细胞胞浆被染成棕红色,说明此部分细胞内有锌离子螯合情况。综上所述,在体外含有 bFGF, EGF, β -巯基乙醇及后来的高糖培养基的微环境中 HUMSCs 可诱导出具有胰岛素分泌功能的胰岛细胞。利用本实验方法得到的 HUMSCs 经诱导分化可以得到胰岛样细胞,但诱导得到的胰岛样细胞若植入体内后,是否能分泌合适的胰岛素等激素水平去发挥正常内分泌细胞的功能,仍需要深入研究。希望能通过努力为糖尿病病人从细胞水平提供一个较好的细胞来源。

参考文献:

- [1] Shiroi A, Yoshikawa M, Yokota H, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone[J]. Stem Cells, 2002, 20(4):284-292. DOI:10.1634/stemcells.20-4-284.
- [2] Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, et al. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue[J]. J Biomed Biotechnol, 2009, 2009:789526. DOI:10.1155/2009/789526.
- [3] 高彦琳,张宁坤,陈厚良,等.改良原代培养体系提高人脐带间充质干细胞的产量[J].中国组织工程研

究, 2015, 19 (10): 1477-1481. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2015.10.001.

- [4] Ma L, Feng XY, Cui BL, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells[J]. Chin Med J, 2005, 118(23):1987-1993.
- [5] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets[J]. Science, 2001, 292(5520):1389-1394. DOI:10.1126/science.1058866.
- [6] 袁丽丽,马登殿,孔佑华. EPO 促进胚胎神经干细胞向神经元分化的形态学研究[J]. 济宁医学院学报, 2014, 37 (5): 313-315. DOI: 10.3969/j.issn.1000-9760.2014.05.003.
- [7] Naujok O, Francini F, Picton S, et al. A new experimental protocol for preferential differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells[J]. Cell Transplant, 2008, 17 (10-11): 1231-1242. DOI: 10.3727/096368908787236549.
- [8] 马桂霞,何红燕,罗敏洁,等.人脐带间充质干细胞分化为胰岛 β 细胞的实验研究[J].实用儿科临床杂志, 2008, 23(8):618-620. DOI: 10.3969/j.issn.1003-515X.2008.08.022.
- [9] Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, et al. In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow[J]. Diabetes, 2004, 53(7):1721-1732. DOI:10.2337/diabetes.53.7.1721.
- [10] Cho YM, Lim JM, Yoo DH, et al. Betacellulin and nicotinamide sustain PDX1 expression and induce pancreatic beta-cell differentiation in human embryonic stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 366(1):129-134. DOI:10.1016/j.bbrc.2007.11.112.

(收稿日期 2016-11-22)
(责任编辑:石俊强)