文章编号:1000-5404(2006)09-0903-04

论著

胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞分化的体外诱导

周光纪[1],屈纪富[2],徐海伟[1],阮怀珍[3],杨 丽[1],唐 军[1],赵明亮[1],李达兵[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生理学教研室;[2]西南医院急诊科,[3]基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞分化诱导的途径和方法,为阐明胰岛β-细胞的发育机制和糖尿病的细胞移植治疗奠定基础。**方法** 将传统的多步诱导法改良为两步诱导法,将胚胎干细胞诱导为胰岛素分泌细胞,并与传统的多步法进行比较。**结果** 经过两步诱导,胚胎干细胞被诱导成了胰岛素分泌细胞,越过了先将胚胎干细胞诱导为神经前体细胞,再进一步诱导为胰岛素分泌细胞的传统模式,使诱导时间缩短,诱导方法简化,所得胰岛素分泌细胞数量与传统方法所得相当。**结论** 多阶段和两阶段诱导均可将胚胎干细胞诱导为胰岛素分泌细胞。

关键词:胚胎干细胞;分化;胰岛素分泌细胞;糖尿病
中图法分类号:R321;R322.57;R329.21 **文献标识码**:A

Induction of embryonic stem cells differentiating into insulin-producing cells *in vitro*

ZHOU Guang-ji[1], QU Ji-fu[2], XU Hai-wei[1], RUAN Huai-zhen[3], YANG Li[1], TANG Jun[1], ZHAO Ming-liang[1], LI Da-bing[1] ([1]Department of Physiology, [3]Department of Neurobiology, College of Medicine, [2]Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the pathways and methods of inducing embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells *in vitro* to elucidate the developmental mechanism of pancreatic islet β cells and to ground the cell-transplantation-therapy of diabetes. **Methods** The classic multi-step inducing method was modified to two-step method to induce embryonic stem cells differentiate into insulin-producing cells, and the two methods were compared. **Results** Embryonic stem cells were induced into insulin-producing cells by the modified two-step method. It leaped over a classic phase——the neural precursor cells phase, and culture time reduced and process was simplified. The yield of insulin-producing cells by two-step method was similar to that of the classic method. **Conclusion** Embryonic stem cells could be induced into insulin-producing cells by multi-step and modified two-step method.

Key words: embryonic stem cell; differentiation; insulin-producing cell; diabetes

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)能在体外诱导分化为胰岛素分泌细胞(insulin-producing cell, IPCs),可望用于糖尿病的治疗。但由于对胰岛β-细胞的发育调控机制还不清楚,IPCs的体外分化诱导还处于探索阶段。将ES细胞向IPCs分化的诱导,目前一般多沿用Lumelsky等[1]首先报道的多阶段诱导法。多阶段诱导实验周期长,方法复杂,得到的IPCs数量少,功能差,不利于临床运用。因此,多方面探索ES细胞向IPCs分化的实验方法,不但有助于了解胰岛β-细胞的发育和ES细胞的分化机制,还有助于简化实验方案,缩短实验周期,提高IPCs的数量和功能,对糖尿病的细胞移植治疗有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM高糖培养基(GIBCO)。DMEM/F12培养基(Hyclone)。优级胎牛血清(Hyclone)。优级新生小牛血清(兰州民海生物公司)。胰蛋白酶、N2、B27、碱性成纤维细胞生长因子(GIBCO)、二硫脲、纤维连接蛋白、多聚鸟氨酸、烟酰胺均为Sigma公司产品。活化素A,β-细胞素和肝细胞生长因子为Merck公司产品。重组人白血病抑制因子(LIF)为Chemicon产

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200129)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30200129)
作者简介:周光纪(1960-),男,云南省楚雄市人,博士研究生,副教授,主要从事干细胞与组织工程方面的研究。现在广东医学院生理学教研室工作。电话:(0759)2388579
通讯作者:屈纪富,电话:(023)68773047
徐海伟,电话:(023)68752254-269
收稿日期:2005-09-29;**修回日期**:2006-01-10

品;巢蛋白（Nestin）抗体为 Pharmergen 产品，cy3 免疫荧光组化试剂盒为武汉博士德产品。小鼠 ES 细胞系 MESPU13 由北京大学生命科学院引进，本实验室保存。本实验使用传代 30 代次以内的 ES 细胞，经形态学和碱性磷酸酶染色鉴定。

1.2 方法

1.2.1 ES 细胞的培养、扩增及鉴定 按照本实验室常规方法培养、扩增 ES 细胞，根据 ES 细胞集落的特殊形态和碱性磷酸酶染色进行 ES 细胞的鉴定[2]。

1.2.2 ES 向 IPCs 分化的诱导

1.2.2.1 传统的多阶段诱导法 参照 Lumelsky 等[1]报道的方法进行多阶段诱导，首先将 ES 细胞诱导为拟胚体（embryoid bodies，Ebs），再将拟胚体贴壁培养，诱导分化为神经前体细胞（neural precursor cells，NPCs）。NPCs 选择性培养基为无血清的 DMEM/F12（1∶1）培养基，添加有 N2、B27、碱性成纤维细胞生长因子（100 μg/L）和纤维连接蛋白（50 μg/L）。NPCs 作形态学观察和 Nestin 免疫组化染色鉴定。Ebs 经 4～5 d 的诱导培养后形成 NPCs，再诱导为胰岛素分泌细胞（IPCs）。IPCs 诱导培养基为无血清的 DMEM/F12（1∶1）培养基，含活化素-A、β-细胞素和肝细胞生长因子各 20 μg/L，烟酰胺 20 mmol/L。每 2 天更换 1 次新鲜培养液，至第 4 天，培养液中添加 10 mmol/L 浓度的葡萄糖，24 h 后更换为含葡萄糖 20 mmol/L 的新鲜诱导培养液，继续诱导 24 h 后进行 IPCs 的鉴定。

1.2.2.2 改进的 2 步诱导法

1.2.2.2.1 预诱导 将扩增培养 3～4 d 后的 ES 细胞消化为单细胞，悬浮培养于含 20% 小牛血清的 DMEM 高糖拟胚体培养基中（不含白血病抑制因子），添加烟酰胺 10 mmol/L；β-细胞素、活化素-A 和肝细胞生长因子各 10 μg/L，悬浮培养，阻止拟胚体贴壁，培养 3～4 d 后收集拟胚体。

1.2.2.2.2 贴壁诱导 拟胚体转移至经多聚鸟氨酸和纤维连接蛋白处理过的 6-孔培养板中，培养基为不含血清的 DMEM/F12，添加 B27。烟酰胺浓度增加为 20 mmol/L；β-细胞素、活化素-A 和肝细胞生长因子浓度增加为 20 μg/L，贴壁培养 4 d 后在培养基中添加葡萄糖 10 mmol/L，12 h 后葡萄糖浓度增加到 20 mmol/L、继续培养 12 h 后作 IPCs 的鉴定。

1.2.3 IPCs 的鉴定 NPCs 为典型的神经元样形态，nestin 染色阳性。随着 NPCs 培养基更换为 IPCs 选择性培养基后，神经元样细胞周边长出细小的圆形细胞，以后神经元样细胞消失，圆形细胞增多。故从形态上可以辨别出 NPCs 和 IPCs 是两种不同的细胞。进一步的 IPCs 鉴定用二硫腙（dithizone，DTZ）染色[3]。

2 结果

2.1 小鼠 ES 细胞的体外培养扩增

ES 细胞接种于饲养细胞后增殖迅速，3～4 d 可形成典型集落。集落呈致密圆形或椭圆形，边界清楚，碱性磷酸酶染色阳性。

2.2 拟胚体的形成

ES 细胞在无粘附性的细菌培养皿中悬浮培养 3～4 d 后，可形成由数百个细胞组成的大小不同的拟胚体。拟胚体呈球形，表面不光滑，光镜下见多个结节状突起（图 1）。

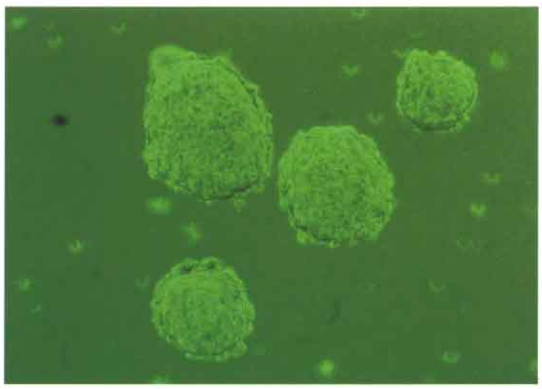


图 1 悬浮培养 4 d 的拟胚体 （相差显微镜 ×100）

2.3 拟胚体向 NPCs 分化的诱导

收集培养 4～5 d 的拟胚体作贴壁培养。12 h 后大部分拟胚体贴壁生长，72 h 内胚胎体中央的圆形细胞大量死亡、脱落，拟胚体周边长出单层大而扁平的上皮样细胞。此后，上皮样细胞逐步分化为多突起的神经元样细胞，这些细胞经免疫组化染色检测，nestin 阳性细胞（图 2）占 86.5%，说明大部分细胞为神经前体细胞。

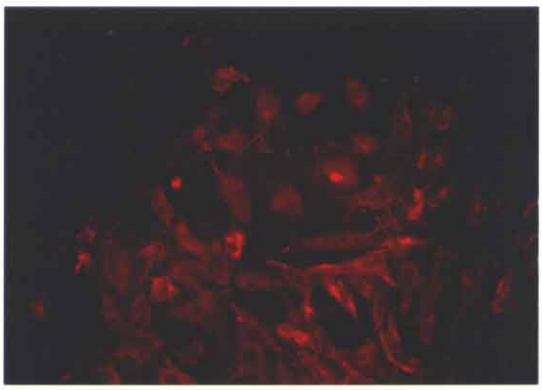


图 2 诱导培养 5 d 的神经前体细胞 （cy3 荧光显色 ×200）

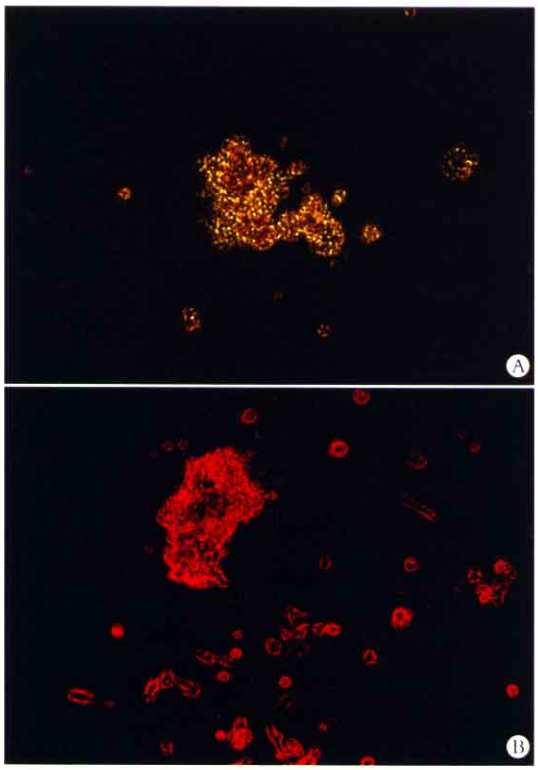
2.4 NPCs 向 IPCs 的分化

NPCs 在 IPCs 选择性培养基中培养 2 d 左右，多突起的 NPCs 边缘长出少量细小的圆形细胞。继续培养后，圆形细胞进一步增多，细胞体积无明显增大。诱导第 3 天，多突起的 NPCs 减少，圆形细胞逐渐增多并积聚成团。至第 4 天，神经元样细胞基本消失，此时在培养液中添加葡萄糖（10 mmol/L），继续培养。24 h 后，葡萄糖浓度增加至 20 mmol/L。见细胞体积变大，细胞数量增加，集落进一步增大。24 h 后作二硫腙染色，集落中央大部分细胞被染成红色的二硫腙染色阳性细胞，说明这些细胞具有胰岛 β-细胞的染色特征（图 3A）。

2.5 简化的 2 步诱导法

扩增 4～5 d 的 ES 细胞消化为单细胞后，在拟胚体培养液中添加低浓度烟酰胺、β-细胞素、活化素-A 和肝细胞生长因子。

与传统的拟胚体培养方法比较，添加上述细胞因子的拟胚体在形态上于传统方法培养的无明显差别。培养4～5 d的拟胚体转移至经多聚鸟氨酸和纤维连接蛋白处理过的6-孔培养板中作贴壁培养。此时添加的烟酰胺、β-细胞素、活化素-A和肝细胞生长因子浓度较前一阶段增加1倍。12 h后见部分拟胚体贴壁生长。贴壁生长的拟胚体无上皮样细胞分化现象，拟胚体贴壁后逐步散开，拟胚体中央部分大量致密细胞松散、脱落，附着生长的细胞保持存活，缓慢增殖。贴壁培养4～5 d后，随着培养液的更换，大部分细胞脱落，有部分细胞成灶性贴壁生长。此后在培养基中添加葡萄糖，并逐步增加葡萄糖浓度，细胞体积明显增大，细胞质增多，细胞数量增加。葡萄糖刺激24 h后进行二硫腙染色，大部分细胞为阳性（图3B）。



A：多步法；B：两步法

图3　两种方法培养的IPCs　（二硫腙染色×100）

3　讨论

ES细胞是一种起源于胚胎内细胞团的原始细胞，具有分化为内、中、外3个胚层组织的潜能，理论上可分化为机体的任何一种组织细胞，因而被认为是“全能”型细胞，也是组织工程的“万能”种子细胞。人为地控制这些种子细胞的分化条件，使之按人们的意图增殖分化，形成人们希望得到的组织或细胞，用于修复、替代病损的组织器官，是再生医学的最大希望所在[4]。但由于胚胎发育和细胞分化的机制仍不清楚，目前这方面的工作仍处于探索研究阶段。

2001年，Lumelsky等[1]经过6个阶段共约25 d的连续诱导，将小鼠ES细胞诱导成了胰岛样细胞团。此后，这方面的研究基本以Lumelsky的分阶段诱导为模式。有人认为，在整个分化诱导过程中，ES细胞向NPCs分化的中间步骤似乎是必需的，NPCs的多寡，还直接影响到最终的IPCs的数量[5]。我们采用无血清培养、分阶段诱导，经过14～15 d的连续培养诱导，也获得了具有胰岛β-细胞特征的二硫腙染色阳性细胞，其中，被认为是影响IPCs获得率的NPCs的纯度达到了85%以上，全部诱导时间仅14～15 d，比Lumelsky报道的缩短了10 d左右，但所得到的IPCs总数不多，依然是其临床应用的重要制约因素。

传统观点认为，胰岛组织起源于胚胎内胚层，与外胚层起源的神经组织在发生学上相距较远。但近年来发现胰岛内分泌细胞和神经细胞在发育上有许多相似之处，起源于胰腺导管上皮的胰岛干细胞表达与NPCs相同的巢蛋白分子标志[6]。成年大鼠脑组织中也发现了能分泌胰岛素的细胞[7]，还有人直接从来源于大脑组织的NPCs诱导出具有胰岛素分泌功能的细胞[8]，这些发现似乎提示中枢神经和胰腺内分泌细胞的发育有着某些相似的机制。那么，NPCs一定是IPCs发育的必经途径吗？是否可用其他的方法和途径将ES细胞直接诱导为IPCs？我们的研究提示有这种可能性。在传统的拟胚体形成阶段即对ES细胞进行预诱导，再将经过预诱导的拟胚体转移至培养板作贴壁培养。在含较高浓度烟酰胺、活化素-A、β-细胞素和肝细胞生长因子的无血清低糖培养基中进行贴壁培养，进一步诱导。此时不出现细胞形态的明显改变，不出现大而扁平的上皮样细胞和多突起的神经样细胞，贴壁生长的细胞保持细小圆形。诱导培养4 d后，在培养基中添加葡萄糖，12 h后，存活的细胞形态变大，细胞质增多，细胞增殖迅速。此后将葡萄糖浓度增加1倍，12 h后观察，细胞数量进一步增多，呈团块状分布，作二硫腙染色见大部分细胞为阳性细胞。这些现象提示，NPCs不是ES细胞向IPCs分化的必经阶段。两步诱导法从ES细胞直接诱导IPCs，跳过了拟胚体向NPCs分化的传统诱导阶段，ES细胞没有经过NPCs阶段而直接分化成了IPCs，诱导过程简化，时间缩短（13 d），得到的IPCs与传统的多阶段诱导法所得相当。

在诱导策略上，我们采用了细胞因子的预诱导和葡萄糖浓度的梯度增加，目的是让分化中的ES细胞对细胞因子和葡萄糖的变化有一个逐步“适应”的过程。文献[9]报道，烟酰胺能够诱导原始的胰腺前体细胞向胰岛内分泌细胞的定向分化，并能阻止β-细胞的凋亡。活化素-A，β-细胞素和肝细胞生长因子除了

对胰腺前体细胞向胰岛内分泌细胞的定向分化有协同促进作用外，它们还是β-细胞的丝裂原，能促进β-细胞增殖[10]。在预诱导阶段，各种细胞因子的浓度较低，目的是促进原始的ES细胞向胰岛内分泌细胞分化的定向，同时防止细胞的过早、过度增殖。后阶段使用较高浓度的细胞因子，希望能维持已经定向分化细胞的存活，并保持增殖。有实验显示，高浓度葡萄糖可诱导β-细胞的凋亡，而适当浓度的葡萄糖能刺激β-细胞增殖，并刺激胰岛素的分泌[11]。在低糖的DMEM/F12培养基递增葡萄糖浓度后，细胞体积明显增大，细胞质丰富，增殖加速，说明梯度增加的葡萄糖激活了IPCs。

胰岛β-细胞是一种富含锌离子的细胞，二硫腙是一种锌离子螯合剂，能特异性地和β-细胞中的锌离子结合，使β-细胞呈红色，此方法是一种传统的胰岛β-细胞染色鉴定法[3]。我们所观察的细胞在最后诱导阶段出现了二硫腙染色阳性细胞，说明这些细胞已经具有胰岛β-细胞的染色特性，但要直接证明其功能，还需进一步观察，这方面的工作正在进行中。

我们的上述实验表明，NPCs不是ES细胞向IPCs分化诱导的必经阶段。2步法诱导ES细胞向IPCs分化，时间短，方法简化，所得细胞与传统的多步法无明显差异。但所得细胞数量不够多依然是目前存在的问题。还有，这些细胞的胰岛素分泌功能如何？移植后对糖尿病的治疗能否安全有效？都是要进一步明确的问题，目前正在进一步观察中。

参考文献：

[1] 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.

[2] XU H, FAN X, WU X, *et al*. Neural precursor cells differentiated from mouse embryonic stem cells relieve symptomatic motor behavior in a rat model of Parkinson's disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(1): 115-122.

[3] 李艳华，白慈贤，谢 超，等. 成人骨髓间充质干细胞体外定向诱导分化为胰岛样细胞团的研究[J]. 自然科学研究进展，2003，13(6)：593-597.

[4] REUBINOFF C. Human embryonic stem cells-potential applications for regenerative medicine[M]//DAYA S, HARRISSON R, KEMPERS R. Advances in fertility and reproductive medicine, 1266. Proceedings of the 18th World Congress on Fertility and Sterility held. Montreal, Canada, 2004: 45-53.

[5] BLYSZCZUK P, CZYZ J AND KANIA G, *et al*. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(3): 998-1003.

[6] LECHNER A, NOLAN A L, BLACKEN R A, *et al*. Redifferentiation of insulin-secreting cells after *in vitro* expansion of adult human pancreatic islet tissue[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(2): 581-588.

[7] 姚忠祥，李 巍，李成仁，等. 体外培养神经干细胞分化为类胰岛样组织的研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(1)：26-28.

[8] GEROZISSIS K. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions[J]. Cell Mol Neurobiol, 2003, 23(1): 1-25.

[9] VACA G, BERNA G, MARTIN F, *et al*. Nicotinamide induces both proliferation and differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells[J]. Transplant Proc, 2003, 35(5): 2021-2023.

[10] BEATTIE G M, RUBIN J S, MALLY M I, *et al*. Regulation of proliferation and differentiation of human fetal pancreatic islet cells by extracellular matrix, hepatocyte growth factor, and cell-cell contact [J]. Diabetes, 1996, 45(9): 1223-1228.

[11] SJOHOLM A. Glucose stimulates islet beta-cell mitogenesis through GTP-binding proteins and by protein kinase C-dependent mechanisms [J]. Diabetes, 1997, 46(7): 1141-1147.

（编辑 薛国文）

（上接895页）

毒性的1/200，其主要的毒性作用是致甲状腺机能减退[2]，表现为反应迟钝、表情淡漠等。此患者中毒症状不典型，血压不降反而升高，与中毒症状尚属早期、SNP耐受有关。

3 讨论

SNP是铁氰化合物亚硝酸盐，其亚硝基可与红细胞和组织的硫基直接结合而释放出CN，经肝内硫氰酸合成酶转化为SCN，由肾脏排泄。SNP的毒性反应主要来自于代谢产物CN，CN与血红蛋白结合形成氰化铁血红蛋白，使之失去携氧能力，导致组织缺氧。使用SNP出现的CN毒性反应与直接吸入或吞服CN有较大区别，当CN为SNP的代谢产物时，停止用药，中毒症状会迅速改善。此例患者SNP中毒的防范与教训：①肾功能不全时易造成SNP中毒。②若SNP用量加大而血压控制困难时，应考虑药物耐受，应慎重。③如须长期使用SNP，则应同时静脉输注硫代硫酸钠[1]，监测血中CN浓度，以预防CN中毒。④若出现CN中毒，立即停用SNP，给予硫代硫酸钠、大量维生素C、吸氧等处理。

关键词：肾移植术；硝普钠；氰化物中毒；护理
中图法分类号：R473.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 黄超杏. 静脉滴注硝普钠的安全性护理体会[J]. 广西医学，2003，25(5)：872-873.

[2] 万 通，高晓梅. 硝普钠的毒副作用及防治[J]. 赣南医学院学报，2000，20(4)：402-404.

[3] 张象麟. MCDEX药物临床信息参考[M]. 成都：四川科学技术出版社，2005：491-492.

[4] JOHANNING R J, ZASKE D E, TSCHIDA S J, *et al*. A retrospective study of sodium nitroprusside use and assessment of the potential risk of cyanide poisoning[J]. Pharmacotherapy, 1995, 15(6): 773-777.

（编辑 张大春）