基础研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0033-04

胰腺干细胞转分化前、后 PDX-1 的表达研究

王威巍,王济明,杜成友
(重庆医科大学附属第一医院肝胆暨肝移植外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:利用干细胞和非干细胞生长对血清的不同要求,获取大鼠胰岛中所含的干细胞并探讨转分化前后 PDX-1 的表达差异。方法:将雄性 SD 大鼠采用胶原酶 V 型通过胰管对胰腺进行灌注,切取胰腺,消化、离心获得胰岛细胞沉淀物。将细胞悬液首先接种于含 10%胎牛血清 Ham's F-10 培养液中连续培养 36 h;然后改用无血清 Ham's F-10 培养液培养 14 d。最后以含 KGF、BSA 及 ITS 的无血清 DMEM/F12(8 mmol/l 葡萄糖)培养液连续培养 28 d。在无血清 Ham's F-10 培养液培养第 14 d 以及含 KGF、BSA 及 ITS 的无血清 DMEM/F12(8 mmol/l 葡萄糖)培养液培养第 28 d 分别加入双硫腙染色观察三维细胞团,同时取部分贴壁细胞应用免疫细胞化学分析所获得干细胞的胰十二指肠同源框(PDX-1)的表达。结果:经双硫腙染色,转分化培养后的部分细胞呈红色;免疫组化结果显示经转分化培养后,PDX-1 在胞核表达更加明显。结论:胰腺干细胞经转分化培养后部分细胞可表现出胰岛细胞的性质; 不同纯度胰岛所携带的干细胞经转分化培养后的子代细胞仍然保持干细胞的特征;KGF 可能具有促进 PDX-1 表达的作用。

【关键词】胰岛;PDX-1;大鼠;干细胞
【中国图书分类法分类号】R587 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-29

The expression of stem cell pdx-1 in different purity pancreatic islets before and after transdifferentiated culture

WANG Wei-wei, et al
(*Departments of Hepatobiliary Surgery& Liver transplantation, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To obtain the stem cells in different pancreatic islets purity utilizing free-serum culture medium and investigate the PDX-1 mRNA expression distinction before and after transdifferentiation culture. *Methods*: Pancreatic islets of male SD rats (islet donors) were isolated by injection of collagenase into pancreatic ducts, and maintained in serum Ham's F-10 for 36h. Then the cells were kept in free-serum Ham's F-10 for 14 days.The last stage was to shift culture media from free-serum Ham's F-10 to free-serum DMEM/F12 that contained KGF, BSA , glucose and ITS. On the 28d, Dithizon was added into the culture flask for observation of 3D cell. The PDX-1 positive cells was investigated by immunocytochemistry. *Results*: After transdifferentiation culture, some 3D cells were red. The pdx-1 was remarkable in cell nucleus. *Conclusion*: After transdifferentiation culture, some pancreatic stem cell display the character of islet cell. The daughter cells of pancreatic stem cells have character of stem cells after transdifferentiation. KGF may have effect on promoting the expression of PDX-1.

【Key words】Donor islets; PDX-1; Rat; Stem cells

胰岛移植作为一种治疗糖尿病的方法得到了全球的认可,然而供体来源短缺以及移植后胰岛细胞的丢失、排斥反应等问题未完全解决,使其长期处于实验及临床研究阶段。胰腺干细胞可以转分化为胰岛素分泌细胞已为许多学者所证实,通过研究胰腺干细胞的表面标志物可以了解干细胞的来源,进而通过基因调控等方法诱导或控制干细胞的定向分化,从而拓宽研究糖尿病治疗方案的道路。PDX-1 是已知最早表达的胰腺 β 细胞标记蛋白,是胰腺发育及胰岛素基因转录表达的早期关键性转录因子,对胰腺萌芽的生长分化起重要作用[1],同时也是具有多向潜能分化的胰腺干细胞的标志物。本实验拟于在体外培养的条件下,以 PDX-1 为标志物观察对胰岛细胞悬液所携带的干细胞进行诱导培养以后

作者介绍:王威巍(1982-),男,硕士,
研究方向:肝胆外科;器官移植。
通讯作者:杜成友,男,教授,E-mail:duchengyou@126.com。
基金项目:重庆市卫生局科研基金资助(项目号:04-2-121)。

的子代细胞的特征及其变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

选取健康雄性 SD 大鼠，体重 180～200 g，血糖检测均正常，由重庆医科大学动物实验中心提供。胶原酶 V 型，转铁蛋白，牛胰岛素及多聚赖氨酸（Sigma），双硫腙（上海化学试剂厂）、Ham's F-10 培养液及 Trizol 试剂（上海生工），DMEM/F12 培养基（Gibco），胎牛血清（杭州四季青），Matrigel 基膜（BD 公司），尼可酰胺（天津大茂），硒粉，BSA（ROCHE），KGF（PE-pro tech），兔抗鼠 PDX-1 多克隆抗体（Upstate 公司）。

1.2 实验仪器

倒置显微镜（Olympus），图像分析仪（美国），超净工作台（苏州），恒温培养箱（重庆）。

1.3 胰岛的分离和消化

参照 Hesse 的胶原酶胆管灌注方法灌注胰腺[2]，并加以改进。SD 大鼠麻醉后开腹，显露胆总管，用静脉留置针穿刺胆总管，破心放血。将 4℃胶原酶溶液 10 ml 缓慢逆行注入胰管内使得胰腺充分膨胀，去除脂肪、血管和淋巴结，迅速完整摘取胰腺，转入无菌 50 ml Falcon 塑料离心管。37℃水浴静止消化 25～30 min，振摇离心管，使胰腺组织分散成细沙粒状，以 4℃ Hank's 液终止消化。80 目滤网过滤，将细胞悬液转入玻璃离心管，洗涤 2 次。

1.4 胰腺干细胞的分离培养

将胰岛沉淀物用 Hank's 液洗涤，离心沉淀，以 10% 胎牛血清的 Ham's F-10 培养液制成细胞悬液。接种于 10% 胎牛血清的 Ham's F-10 培养液，培养瓶以 10% 多聚赖氨酸预处理。36 h 后换液，去除未贴壁细胞和细胞碎片，改用无血清 Ham's F-10 培养液，置于 37℃、5%CO_2 及 95%O_2 培养箱中连续培养 14 d，每 2 d 换液 1 次，丢弃未贴壁细胞。第 15 d 待贴壁细胞生长至瓶底 70% 左右时进行传代，按 5×10^5 个 / 瓶分瓶接种。

1.5 胰腺干细胞的鉴定

选用兔抗鼠 PDX-1 多克隆抗体，按常规细胞免疫组化方法鉴定胰腺干细胞的存在。

1.6 胰腺干细胞的转分化培养

将其中 1 瓶传代细胞在无血清 Ham's F-10 培养液培养结束后，更换为含 10 μg/l KGF、ITS 复合物（5 mg/L 硒粉、5 mg/L 转铁蛋白及 5 mg/L 牛胰岛素）、2 g/L BSA 及 10 mmol/L 尼可酰胺的无血清 DMEM/F-12 培养液。参照 Susan Bonner-Weir[3] 的方法，根据培养瓶面积，按 50 μl/cm^2 吸取 1∶10 Matrigel 基膜加入培养瓶，均匀铺于瓶底，置于培养箱中（5%CO_2 及 95%O_2），37℃过夜形成胶体。每 2 d 换液 1 次，连续培养 28 d。

1.7 转分化培养后 PDX-1 阳性细胞的检测

同转分化培养前 PDX-1 阳性细胞的检测。

1.8 新生三维细胞团鉴别

利用双硫腙能和胰岛 β 细胞胰岛素颗粒内的锌螯合使其呈红色的性质，鉴别新生三维细胞团是否含有胰岛素颗粒。

1.9 转分化培养前、后 PDX-1 阳性细胞的检测

用 PBS 代替一抗做阴性对照，以已知的阳性片做阳性对照，镜下观察细胞浆出现棕黄色的为阳性细胞。每张切片随机选 5 个视野用图像分析仪测其阳性反应部位的平均面密度值。

1.10 统计学处理

所有数据用均数 ± 标准差表示（$\bar{x}\pm s$），用统计软件 SPSS11.0 进行 t 检验分析。

2 结 果

2.1 胰腺干细胞的体外培养及形态学观察

胰岛细胞细胞悬液接种后，经含血清 Ham's F-10 培养液培养 24 h 后，可见瓶底有梭形和不规则形细胞贴壁生长。更换为无血清 Ham's F-10 培养液培养，可见有死亡细胞浮起，仍有贴壁细胞存活，但生长缓慢并有细胞集落形成。更换为无血清 DMEM/F12 培养液后 48 h，可见细胞增殖速度明显加快，所形成的细胞集落边缘有部分细胞伸出突起并逐渐分裂成不规则形单核附壁细胞，逐渐融合呈不规则形或卵圆形，并有呈三维生长的活细胞出现。经双硫腙染色后，部分呈三维生长的活细胞染色呈红色。

2.2 转分化前后胰腺干细胞免疫组化结果

转分化培养前 PDX-1 在胞浆及胞核均有阳性表达（平均面密度值 0.134±0.072）；经转分化培养后，PDX-1 在胞核呈强阳性表达，较胞浆明显（平均面密度值 0.207±0.047）。经 t 检验分析，$t=-3.144$，$P<0.05$。

3 讨 论

国内外的学者均发现，在胰腺干细胞的分化培养过程中，根据干细胞生长与其他细胞生长对血清的不同要求，利用含 2% 低浓度血清的培养液可以较好的纯化胰腺干细胞，去除非干细胞成分，还可以保持胰腺干细胞的未分化状态[4-6]。而无血清培养是诱导胰腺干细胞分化的一个重要条件。在本实验中，我们利用完全无血清的培养液成功地获取了胰腺干细胞，并证明胰腺干细胞在无血清且无任何诱导因子条件下不仅表现出增殖性，还保持了胰腺干细胞的未分化状态。免疫组化的结果提示获得的贴壁细胞中存在 PDX-1 的表达。这与 Lu 等[4]人的研究结果相似。而且我们的免疫组化提示了另外一个结果：与转分化培养前比较，转分化培养后，PDX-1 在胞核表达更加明显。这可能与 PDX-1 最终要进入核内与胰岛素基因启动子结合，促进胰岛素基因转录和导管祖细胞向胰岛素分泌细胞方向分化有关[7]。目前尚无相类似的报道，产生这一现象的原因有待深究。



图 1 转分化培养前(×400)

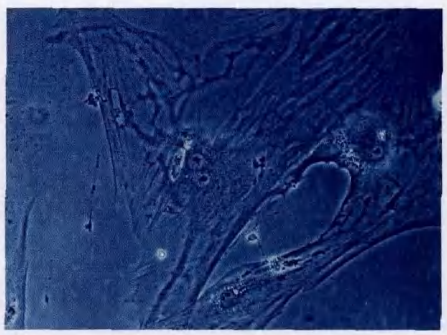


图 2 转分化培养后(×400)

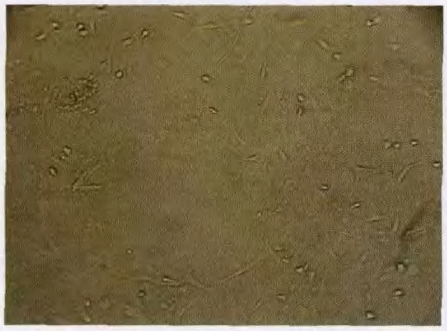


图 3 未加入双硫腙时(×100)

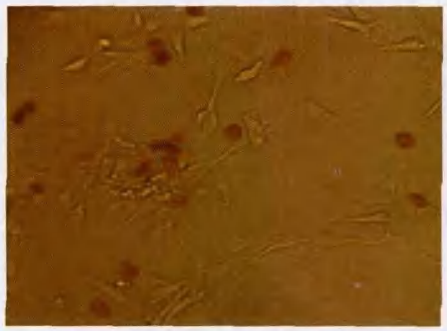


图 4 同一视野加入双硫腙染色后(×400)



图 5 转分化前 PDX-1 免疫组化(SABC×400)



图 6 转分化后 PDX-1 免疫组化(SABC×400)

在随后的诱导培养过程中,我们的研究结果提示在以无血清 Ham'sF-10 培养液培养 14 d 后出现 PDX-1 的表达,而在以无血清的含生长因子的DMEM/F12 培养液培养以后也有 PDX-1 表达。然而 Todorov 研究小组的结果提示在胰腺干细胞的扩增阶段(4~7 d)存在 CK-19 的表达而无 PDX-1 表达,在随后添加生长因子进行诱导分化后 90%的细胞两者均有表达[5]。所以,我们推测短期培养(4~7 d)无法使 PDX-1 表达,可能在培养十余天左右开始表达,而后出现表达量下降;在添加了 KGF 以后,贴壁细胞会再次表达 PDX-1。正如 Sharma 等[8]描述的那样:在导管上皮细胞快速复制时期,PDX-1 会暂时性的表达。而且有研究表明具有导管表型的细胞在体外的培养中具有再次表达 PDX-1 的能力,即 CK-19 阳性的细胞可再次表达 PDX-1。这可能与 KGF 有关,因为 KGF 对于维持上皮细胞的特性是至关重要的[9-11]。所以我们推测 KGF 可能通过某种间接途径促进 PDX-1 的表达。同时我们的结果证实了部分胰腺干细胞经诱导培养以后可以分化为具有胰岛细胞特征的活细胞。为了更直观的表现呈三维生长的活细胞,我们选用了低倍镜观察。

我们的实验结果均基于体外培养条件,然而当进行体内胰岛移植时,由于机体内环境与体外有太多不同如各种生长因子,机体免疫状态以及移植胰岛新生血管的形成均可能对干细胞的生长和分化产生积极或消极的影响。因此,胰腺干细胞的体内分化状态有待于更进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Graphin-Botton A, Majizhia A R, Melton D A.Key enents of pancreas formation are trigg- ered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regenera tion[J]. Diabetes, 1999, 48(8):507-513.

[2] Hesse U J, Meyer G P, Weyer J, et al. In situe intraductal collagenase

injection for preparation of langerhans in the pig[J]. Transplant proc, 2000,24(3):1007.

[3] Bonner-Weir S,Taneja M,Gordon C,et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(14):7999-8004.

[4] Lu J,Gu Y P,Xu X,et al. Adult islets cultred in collagen gel transdifferentiate into duct-like cells[J]. World J Gastroenterol,2005,11(22):3426-3430.

[5] Todorov I,Omori K,Pascual M,et al. Generation of human islets through expansion and differentiation of non-islet pancreatic cells discard (pancreatin discard) after islet isolation[J]. Pancreas,2006,32(2):130-138.

[6] 史 恺,徐 立,邓仪昊,等.昆明小鼠胰腺导管上皮样细胞的培养方法研究[J]. Sichuan Journal of Anatomyvol,2006,14(4):72-73.

[7] Noguchi H,Kaneto H,Weir G C,et al. PDX-1 protein containing its own antennapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells[J]. Diabetes,2003,52(7):1732-1737.

[8] Sharma A,Zangen D H,Reitz P,et al. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration[J]. Diabetes,1999,8(7):507-513.

[9] Gemyr V,Kerr-Conte J,Belaich S,et al. Adult human cytokeration19-postive cells reexpress insulin promoter factor in vitro further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in human[J]. Diabetes,2000,49(6):1071-1080.

[10] Hosotani R,Ida J,Kogire M,et al. Expression of pancreatic duodenal hoemobox-1 in pancreatic islet neogenesis after surgical wrapping in rats[J]. Surgery,2004,135(3):297-306.

[11] Therese B D,Mira M S,Melanie P W,et al. The PDX1 Homeodomain transcription factor negatively regulates the pancreatic ductal cell-specific keratin 19 Promoter[J]. J. Biol. Chem,2006,281(50):38385-38390.

(责任编辑:冉明会)

个案与短篇 文章编号:0253-3626(2009)01-0036-01

肝硬化合并自发性脾梗塞报告 1 例

范玲燕,胡 鹏,王 娜,周 智,张大志,任 红

(重庆医科大学附属第二医院感染科 病毒性肝炎研究所,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R575.2+1 【文献标识码】B 【收稿日期】2008-01-24

1 病 例

患者,男,38 岁,因"反复腹胀、尿黄 3 年,再发 1 月"于 2007 年 4 月 8 日入院。患者 3 年前无明显诱因出现腹胀,尿黄如茶色,双下肢水肿,无发热,无腹痛,在我院诊断为"慢性乙型肝炎,脾大",予保肝、降酶、退黄等对症治疗后好转出院。1 年前开始反复出现尿黄,不伴眼黄、身黄及大便颜色改变,未予重视,未予正规治疗,未做肝功能检查。1 月前因感冒后出现畏寒,无发热、咳嗽,在当地诊所予以静滴抗生素(药名不详)后,症状缓解,但渐出现腹胀,双下肢水肿,纳差(食量减少 1/3),腹部渐膨隆,尿量减少,尿黄如茶色,无腹痛、发热,无颜面部浮肿,无恶心、呕吐,在当地县医院查 B 超示"腹水,脾大",肝功能示:ALB,22 g/l;TB,190 μmol/L(具体数值不详)。为进一步治疗来我院。患者患病来,精神差、食欲差、睡眠好、大便无特殊、小便色如浓茶色、量减少。

入院查体:肝病面容,可见肝掌,未见蜘蛛痣,全身皮肤、巩膜中度黄染;双下肺呼吸音减低,未闻及干湿性罗音,心脏无特殊;腹部明显膨隆,腹围:97 cm,可见脐疝,无压痛、反跳痛,肝脾未满意扪及,移动性浊音阳性,双下肢浮肿。

入院后辅助检查血常规:WBC,9.09×10⁹ 个/L, 中性粒细胞百分比:71.2%,HGB:82g/L, PLT:39×10⁹ 个/L。肝功能:ALT/AST:51/107 μmol/L,ALB:21.2 g/L,TB/DB:139.7/96.6 μmol/L。PT:23S,PTA:37%。AFP:14.0 μg/L。乙肝两对半示:HBsAg(+)、HBeAg(+)、HBeAb(+)、HBcAb(+)。腹水常规:浑浊,比重 1.012;李凡它蛋白定性:微量,阳性;白细胞:1 260×10⁶ 个/L;红细胞:1 080×10⁶ 个/L;嗜中性粒细胞:0.74;淋巴细胞:0.24。腹部 B 超示:肝脏形态失常,缩小,右叶斜径 12.2 cm。肝包膜不规则。门静脉主干内径 1.4 cm。肝实质回声增多、增强、细密,分布欠均匀。肝静脉欠清晰、变细。脾脏长:16.7 cm,厚 6.8 cm,脾静脉内径:脾侧主干 0.9 cm。腹腔内见大量液性暗区。

患者入院后予以腹水浓缩回输术 1 次,超滤腹水 4 600 ml,同时给予保肝、降酶、退黄、抗感染对症治疗及人血白蛋白支持治疗。患者病情明显好转。于 4 月 25 日患者出现左上腹疼痛,渐加重,随体位改变疼痛加剧,腹围:85.5 cm,予上腹部 CT 检查示:肝脏体积减少,肝轮廓不光整,表面成波浪状。肝实质密度尚均匀,门静脉主干增粗,其最宽径约 2.0 cm。脾脏体积增大,增强扫描脾外缘实质内可见大片成楔形的低密度无强化影。腹腔内见少量积液征。腹腔内系膜筋膜明显增厚。肠系膜及腹膜后见多个肿大淋巴结。CT 诊断为:(1)肝硬化,脾大,腹水,门脉高压;(2)脾梗死;(3)肠系膜及各筋膜增厚,腹腔及腹膜后淋巴结肿大,考虑原发性腹膜炎改变可能。粗略估计梗塞面积约在 30%左右,予以头孢哌酮钠舒巴坦钠预防感染、心电监护观察、吸氧、补液等对症处理,患者左上腹痛逐渐减轻,于 5 月 9 日出院。

(下转第 108 页)

作者简介:范玲燕(1980-),女,硕士,
研究方向:慢性乙肝的诊治进展。

通讯作者:胡 鹏,男,副主任医师,E-mail:rocfly2000@sina.com。