维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)01-0012-03

神经元素 3 在不同纯度供体胰岛细胞中的表达

薛 栋,杜成友,杨 闯,尹昌生

(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:研究神经元素 3(Ngn3)在不同纯度胰岛细胞中的表达情况,探讨不同纯度胰岛细胞中所携带的干细胞。方法:30 只成年雄性 SD 大鼠随机分为 3 组,采用胰管内注入胶原酶消化法分离成年大鼠胰腺,Ⅰ组(n=10):采用 2 次消化、不纯化的方法获得胰岛;Ⅱ组(n=10):胰岛沉淀物加入 25%Ficoll-400 纯化,Ⅲ组(n=10):胰岛沉淀物依次加入 25%、11%的 Ficoll-400 纯化。应用免疫组化、逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)方法进行定位、半定量分析,检测 Ngn3 在不同纯度胰岛细胞中的表达。结果:Ⅰ组获得胰岛纯度约为 43.6%±6.29%,Ⅱ组获得胰岛纯度约为 65.3%±4.40%,Ⅲ组获得胰岛纯度约为 77.6%±6.36%,各组比较均具有显著性差异(P<0.05)。Ngn3 在不同纯度胰岛细胞中均有表达,Ⅰ组中 Ngn3 的蛋白和和核酸水平表达明显高于Ⅱ组、Ⅲ组,Ⅲ组中表达最弱,各组比较均具有显著性差异(P<0.05)。结论:Ngn3 在不同纯度胰岛细胞中均有表达,在低纯度胰岛细胞中表达最明显,提示低纯度胰岛细胞中可能携带较多的干细胞。

【关键词】神经元素 3;供体胰岛;逆转录-多聚酶链反应;免疫组化

【中国图书分类法分类号】Q786;R587 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-06-05

Expression of Ngn3 in the donor islets with different purity

XUE Dong, et al

(*Departments of Hepatobiliary Surgery & Liver Transplantation, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of Ngn3 in rats donor islets with different purity, and explore the stem cells in them. *Methods*: Thirty male adult SD rats were randomly divided into 3 groups. Islets were isolated by digestion method of injecting collagenase into pancreatic duct. Group I was harvested by two digestions without purification; For group Ⅱ (n=10), islets sediments were purified by adding 25% ficoll-400 and for, Group Ⅲ (n=10), by adding (25% and 11%) ficoll-400 in order. Finally we applied immunohistochemisiry and RT-PCR to the location and semi-quantitative analysis to test the expression of Ngn3 in the donor islets with different purity. Results: Islets purity of group I was 43.6%±6.29%, Group II 65.3%±4.40%, and group Ⅲ 77.6%±6.36%. The difference of Islet purity was significant in three groups (P<0.05). Compared with group Ⅱ and group Ⅲ, the expressions of protein and mRNA of Ngn3 were both highest in group Ⅰ, lowest in group Ⅲ (P<0.05). *Conclusion*: Ngn3 was expressed in all islets, with the low purity expressing the most prominent, which suggests that islets with low purity may bear more stem cells.

【Key words】Ngn3; Donor islet; RT-PCR; Immunohistochemistry

胰岛细胞移植被认为是治疗Ⅰ型和部分Ⅱ型糖尿病的理想方法,自从 Shapiro 等[1]报告应用 Edmonton 方案控制同种异体移植胰岛排斥的方法,使移植胰岛存活率显著提高,85%(11/13)患者不依赖胰岛素超过 1 年,80%(4/5)不依赖胰岛素超过 2 年;但是患者 5 年不依赖胰岛素率<20%。长期存活同种移植胰岛细胞,由于自身衰老、凋亡或免疫排斥反应导致 β 细胞数量减少,就需要有供体来源的干细胞生成新的胰岛细胞,长期保持足够的移植胰岛细胞数量。成体胰腺中存在着干细胞,近年大量的研究表明其在合适的培养条件下可转分化为具有内分泌功能的细胞。神经原素 3(Ngn3)属于 bHLH 转录因子家族,胚胎发育生物学的研究表明,胰腺内表达 Ngn3 的细胞可分化为所有四种类型胰岛内分泌细胞,Ngn3 阳性细胞认为是胰岛前体细胞[2]。在上述研究的基础上,我们应用免疫组化及 RT-PCR 技术方对不同纯度胰岛细胞中的 Ngn3

作者介绍:薛 栋(1980-),男,硕士,
主要研究方向:器官移植、肝胆外科。

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助(编号:04-2-121)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

进行定位、半定量分析，探讨不同纯度胰岛细胞中所携带的干细胞。

1 材料和方法

1.1 动物

成年雄性 SD 大鼠 30 只，体重为 200 ± 20g，由重庆医科大学实验动物中心提供，随机分成Ⅰ组，Ⅱ组，Ⅲ组，每组 10 只，测血糖均在正常值范围，每次实验均同时在每组中各随机取 1 只。

1.2 试剂和仪器

即用型 SABC 试剂盒购自武汉博士德公司，兔抗鼠 Ngn3 多克隆抗体购自 Santacruz 公司(美国)，Trizol、双硫踪(DTZ)均购自上海生工生物工程技术公司，RT-PCR 试剂盒、DNA-martker 均购自 Takara 公司，胶原酶 V 型购自 Sigma 公司(美国)，Ficoll-400 购自 Pharmacia 公司，Ngn3 引物上游序列：5'-TGG CGC CTC ATC CCT TGG ATG-3'，引物下游序列：5'-CAG TCA CCC ACT TCT GCT TCG-3'；大鼠的内参照 B-actin，引物上游序列：5'-ACA CTG TGC CCA TCT AGG AGG-3'，引物下游序列：5'-AGG GGC eGG ACA CGT CAT ACT-3'，由上海生物工程技术公司合成。PCR 仪(ThermoHybaid)，倒置显微镜(Olympus 日本)，GDS-8000 凝胶成像分析系统(美国 UVP)等。

1.2 方法

1.2.1 胰腺的获取及消化分离 SD 大鼠，3.5%水合氯醛(1ml/100g 体重)腹腔内注射麻醉。消毒，剖腹，显露胰腺及胆总管，在近十二指肠的胆总管远端、胆总管近肝门处经后面各穿一缝线，暂不结扎。于胆总管中段向远侧顺行插入 4.5 号针头(已连接装有消化分离液的注射器)，结扎胆总管近肝门处缝线，向胆总管内推注少量消化分离液，使胆总管内的胆汁排入十二指肠腔，之后结扎胆总管远端缝线，打开胸腔，破心放血，将浓度为 0.5g/L 的胶原酶溶液(含 7.5%mmol/L Ca^{2+}pH7.8)6~8ml 缓慢逆行注入胆管内，待胰腺充分膨胀。迅速完整摘取胰腺，并清除血管、脂肪和淋巴结，并将胰腺组织用眼科镊轻轻剪碎，移入 50ml 锥形瓶中(其内装有预温的上述消化分离液 6~10ml)，并置于 38℃水浴中轻轻摇动 20~30min，见有大量细颗粒物时，吸出已消化的细胞悬液，并加入大量冰冷 4℃Hank's 液(含 5%甘油)，中止消化。将未消化物续加入胶原酶溶液，重复消化。将两次消化所得到的细胞悬液洗涤 2 次，离心沉淀，弃上清，获得胰岛沉淀物。

1.2.2 不同纯度胰岛细胞的制备 Ⅰ组通过上述 2 次消化、不纯化的方法直接获得胰岛细胞悬液；Ⅱ组于上法得到的沉淀物中加入 25%的 Ficoll 液(充分与细胞沉淀物混匀)及 Hank's 液纯化；Ⅲ组首先加入 25%的 Ficoll 液(充分与细胞沉淀物混匀)，静置后沿管壁慢慢加入 11%Ficoll 进行纯化，离心 10min，纯化后液面分层，其中Ⅱ组收集 25%界面层的细胞，Ⅲ组收集 11%~25%界面层间的细胞，将收集到的细胞用 Hank's 液洗涤 2 次并制成细胞悬液，经 DTZ 染色估计膜岛纯度，每份样本随机重复取样 3 次，取其均值。

1.2.3 免疫组织化学染色 分别取 3 种不同纯度胰岛细胞沉淀物用 4%的多聚甲醛固定，石蜡包埋切片(5μm)。免疫组化简要过程：切片常规脱蜡水化；3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶：蒸馏水漂洗：微波抗原修复；PBS 漂洗；Ngn3 一抗(1∶200) 4℃过夜：PBS 漂洗：滴加生物素羊抗兔；PBS 漂洗；滴加试剂 SABC；DAB 显色：蒸馏水漂洗；苏木素复染：二甲苯透明，中性树胶封片。另以 PBS 代替一抗作为阴性对照，阳性判断为胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒。应用北航 CM2000B 图像分析系统对组化结果分析。每张切片随机选取 5 个视野，测其阳性反应部位的平均灰度值。

1.2.4 RT-PCR 按照 Trizol 的说明书提取 RNA。取 1μg 的总 RNA 进行 RT 反应：42℃30min，99℃5min，5℃5min，合成 cDNA。PCR 反应：5×PCR Buffer10 μ1，灭菌蒸馏水 28.75 μ1，Taq 酶 0.25 μ1，上下游引物各 0.5 μ1，cDNA10 μ1，总体积为 50 μ1。94℃ 1min，94℃10s，59℃，10s，72℃ 1min，35 个循环，72℃ 2min，以 β-action 为相应的内参照。PCR 产物经 1.8%的琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察出现 160bp 和 621bp，分别代表 Ngn3 和 β-action。结果经图像分析软件作半定量分析。比较不同纯度胰岛细胞中的 Ngn3 mRNA 表达量/β-actin 密度比值间的差异。

1.3 统计学分析

所有数据用均数 ± 标准差表示，用 SAS8.1 软件分析，组间比较采用方差分析，以 $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结 果

2.1 胰岛的分离及纯化

灌注胶原酶后，大鼠胰腺充盈良好，呈粉红色水泡状，DTZ 染色 10min 后，倒置显微镜下可见大小不一、圆形或卵圆形猩红色的胰岛细胞团，分散在外分泌组织中。经过密度梯度纯化后，可见较多猩红色的细胞团。胰岛纯度的评估：用镜检胰岛数量与内外分泌组织量之比来估计。Ⅰ组获得胰岛纯度为 43.6% ± 6.29%，Ⅱ组获得胰岛纯度为 65.3% ± 4.40%，Ⅲ组获得胰岛纯度为 77.6% ± 6.36%。各分组比较均有显著差异($P<0.05$)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 Ngn3 蛋白的表达

Ngn3 阳性物质定位于细胞核，呈棕黄色或棕褐色颗粒状。Ngn3 在三种纯度胰岛细胞中均有表达，主要表达分布在导管、外分泌相接的部位和胰岛，一些腺泡中央小叶导管细胞也表达阳性，Schwitzgebel[3]等有类似报道。经统计学分析，Ⅰ组为 127.44 ± 4.81，Ⅱ组为 140.92 ± 5.25，Ⅲ为 154.72 ± 4.97。各分组间的灰度值有显著差异（$P < 0.05$）（灰度值越大，颜色越浅），表明蛋白表达下调。

2.3 Ngn3mRNA 的表达

RT-PCR 结果显示，Ngn3 在 3 种纯度胰岛细胞中均有表达，扩增产物以 1.8%的琼脂糖凝胶电泳，可见Ⅰ组中 Ngn3 的 mRNA 表达明显强于Ⅱ、Ⅲ组，Ⅲ组表达最弱（图 1）。各分组间比较有显著差异（$P < 0.05$）。

3 讨 论

由于胰岛、外分泌细胞、导管细胞等组织结构的不同而存在密度差异，故通过不同密度梯度的介质可以将其分离、纯化。本实验Ⅰ组，采用 2 次消化、不纯化的方法获得的胰岛纯度低，说明制备物中含有大量的外分泌细胞、导管细胞等其它细胞。Ⅱ组采用一种密度纯化方法可以获得的胰岛纯度 65%，由于只存在一种密度介质，梯度离心达不到完全纯化的目的，纯化物中仍混有相当一部分外分泌细胞、导管细胞等。而Ⅲ组采用两种不同密度梯度纯化方法可得到较高纯度的胰岛。用胶原酶胰管灌注可起到机械扩张和初步消化的作用，有利于胰岛同外分泌细胞的分离，用多种不同密度梯度纯化方法通常可获得胰岛纯度为 80% 以上。本实验中获得纯度为 77% 左右，这可能与分离消化、纯化技术、实验条件等多种因素有关。在胰岛分离、纯化过程中，胰岛的产量和质量会受到胶原酶浓度、温度、时间等因素的影响[4]。最近 Street 等[5]研究发现，临床胰岛移植中对胰岛纯度估计过高，通过 DTZ 染色纯度（66.9% ± 15.8%）较通过免疫细胞化学得到的胰岛纯度（46.7% ± 20.1%）偏高胰岛移植物中导管上皮细胞和外分泌细胞所占比例分别为 23.8% ± 11.9%，34.7% ± 16.1%，移植物中的这些导管上皮细胞（胰腺干细胞）可能在移植后 β 细胞更新中起到很大作用。本实验通过长期摸索获得不同纯度胰岛细胞，低纯度胰岛细胞中携带更多的干细胞和（或）提供一种适合干细胞转分化的细胞外环境，可能有利于新胰岛细胞的生成，从而长期保持足够的移植胰岛细胞数量。

移植胰岛发挥良好功能的先决条件是大量有活力胰岛细胞。生理情况下，胰岛细胞每 40~50 天通过自我复制，干细胞（Stem cells）转分化生成新胰岛细胞，衰老细胞通过凋亡等方式来实现自我更新。Ngn3 属于 bHLH 转录因子家族，胚胎发育生物学的研究表明，胰腺内表达 Ngn3 的细胞可分化为所有四种类型胰岛内分泌细胞，被认为是胰岛前体细胞的标志之一[2]。Ngn3 是在胰岛干细胞转分化过程中短期表达的转录因子，是 NeuroDl（NeuroDl 是 β 细胞分化所必需的转录因子）的激活因子，在小鼠胚胎 15.5 天，在部分导管上皮细胞及其周围细胞中，通过免疫组织化学检测到有 Ngn3 的表达[3]。宋陆军等[7]在体外胰岛培养研究中发现共同表达的 Ngn3 和 A6 的细胞，胰岛内表达 A6 的细胞可能源于成体胰管，并迁移至胰岛内，参与成体胰岛内分泌细胞的维护和更新。转基因小鼠证实 Ngn3 本身足以使前体细胞向内分泌细胞分化，所以在胰腺发育过程中，Ngn3 是胰岛细胞形成所必需的和充分的条件。可见 Ngn3 在胰腺的胰岛细胞及导管细胞中都有表达，在胰岛干细胞转分化过程中短期表达的转录因子，Ngn3 阳性的细胞在胰岛干细胞转分化过程中，属于过渡细胞即胰岛前体细胞。

实验以大鼠的胰腺为胰岛来源，通过不同的纯化方法，获得 3 种不同纯度的胰岛，在同等条件下，通过免疫组化及 RT-PCR 技术在蛋白、核酸水平对不同纯度胰岛细胞进行定位、半定量分析，Ngn3 在 3 种不同纯度胰岛中都有表达，结果分析显示Ⅰ组中表达最强，Ⅱ组、Ⅲ组中表达弱。这表明低纯度组胰岛中 Ngn3 阳性细胞最多，即在低纯度胰岛细胞中含有更多的导管细胞等其它非胰岛细胞成分，这些供体胰岛中携带的 Ngn3 阳性细胞，在移植后能否转分化为新的胰岛细胞还有待于深入研究。成体胰腺干细胞主要存在于胰腺导管组织及胰腺组织内部，这些胰腺干细胞在胰岛分离、纯化和培养过程中可能或多或少被保留，与供体胰岛一起被移植，由于干细胞的自我复制和转分化能力，长期存活移植胰岛细胞的一部分极有可能由这些干细胞转分化而来，在有效的抗排斥免疫反应治疗的前提下，本实验为临床选用携带最佳数量干细胞移植胰岛的纯度提供实验依据，对达到临床移植长期疗效有重要意义。

（下转第 21 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

nase,COX）抑制剂，因此其抗炎效应是通过抑制COX发挥作用,但是近年来发现,特异的COX-2抑制剂对AD没有疗效,而且可能存在COX非依赖途径[7]。最近研究发现，NSAIDs可以通过结合PPAR-γ而调节下游分子的产生,从而发挥广泛的生理效应[8]。因此,探索NSAIDs治疗EAE中的疗效,探讨其作用途径有非常重要的意义。研究表明,布洛芬能够明显减轻EAE的临床症状，下调TNF-α的表达,而且与罗格列酮的疗效没有差异。因此我们认为,NSAIDs对EAE的保护作用可能与激动PPAR-γ,下调炎症因子的产生而发挥作用有关。由于存在细胞因子之间的相互调节,其机制尚不十分清楚,需要进一步的实验研究。

研究结果显示，罗格列酮和布洛芬均能改善EAE的临床表现,降低TNF-α mRNA的表达。两种药物均为临床常用药物,为临床进一步研究提供了良好的实验基础。

（通讯作者：秦新月，教授，主任医师，博士生导师，E-mail:qinxinyue@yahoo.com）

参 考 文 献

[1] Lazennec G,Canaple L,Saugy D,et al.Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)by their ligands and protein kinase A activators[J].Mol Endocrinol,2000;14:1962-1975.

[2] Antella L,Kyozuka K,De Riso L,et al.Calcium,protease action, and the regulation of the cell cycle[J].Cell Calcium,1998;23(2-3): 123-130.

[3] Koh CS,Paterson PY.Suppression of clinical signs of cell-transferred experimental allergic encephalomyelitis and altered cerebrovascular permeability in Lewis rats treated with a plasminogen activator inhibitor[J].Cell-Immunol,1987;107(1):52-63.

[4] Delerive P,Fruchart JC,Staels B.Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control[J].J Endocrinol,2001;169:453-459.

[5] 关洪平,李树新,库宝善.肿瘤坏死因子α与中枢神经系统[J].生理科学进展,1998;1(29):55-58.

[6] Villarroya H,Violleau K,Ben-Younes-Chennoufi A,et al. Myelin-induced experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats: tumor necrosis factor alpha levels in serum and cerebrospinal fluid immunohistochemical expression in glial cells and macrophages of optic nerve and spinal cord[J].J Neuroimmunol,1996;64(1):55-61.

[7] Adamson DJ,Frew D,Tatoud R,et al.Diclofenac antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor γ signalling[J].Mol Pharmacol, 2002;61(1):7-12.

[8] Sastre M,Dewachter I,Landreth GE,et al.Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Agonists Modulate Immunostimulated Processing of Amyloid Precursor Protein through Regulation of β-Secretase[J].The Journal of Neuroscience,2003;23(30):9796-9804.

（上接第 14 页）

（通讯作者：杜成友,Tel:(023)89011181;E-mail: duchengyou@126.com）

参 考 文 献

[1] Shapiro AM,Ryan EA,Rajotte R,et al.Improved function of islet grafts under steroid-free immunosuppression:will grafts work forever [J].Transplantation,2002;73(9):1528.

[2] Gu G,Dubauskaite J,Melton DA.Direct evidence for the pancreatic lineage:NGN3+cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors[J].Development,2002;129(10):2447-2457.

[3] Schwitzgebel VM,Scheel DW,Conners JR,et al.Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas[J].Development,2000;127(16):3533-3542.

[4] 张 雷,吴德全,孙 岩,等.大鼠胰岛分离的影响因素[J].中华内分泌代谢杂志,2002;18(6):491-492.

[5] Street CN,Jonathan RT,Lakey AM,et al.Islet graft assessment in the Edmonton Protocol implications for predicting long-term clinical outcome[J].Diabetes,2004;53(12):3107-3114.

[6] 宋陆军，秦新裕，牛伟新，等. 源于体外培养膜岛细胞中表达Ngn3的细胞是胰腺内分泌前体细胞的新证据[J].中华外科杂志，2005;43(1):42-45.