DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.011
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
26 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)01-0026-03

体外培养神经干细胞分化为类胰岛样组织的研究

姚忠祥,李 巍,李成仁,秦茂林,刘建军,陈兴书,周德山 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察体外培养的神经干细胞是否可以被诱导分化为类胰岛样组织。方法 体外培养神经干细胞,在胰岛素等外源性复合成分(ITS)诱导分化后,分别进行胰腺上皮干细胞特异性标志物CK-19、胰腺β细胞特异性成分胰岛素和胰腺α细胞特异性成分胰高糖素等的免疫细胞化学染色鉴定。结果 体外培养的神经干细胞经诱导分化3 d后,在神经干细胞集落附近可见散在或成群分布的上皮样细胞,并呈CK-19免疫阳性反应。继续培养2~4周后,上皮样细胞增多,细胞圆形或呈鹅卵石样排列,进一步增生形成类胰岛样组织,其中大多数细胞呈胰岛素免疫反应阳性,少数细胞呈胰高糖素免疫反应阳性。结论 体外培养的神经干细胞具有向类胰岛样组织分化的潜能,它能分化为胰岛的α细胞和β细胞。

关键词:神经干细胞;胰腺;细胞角蛋白-19;胰岛素;胰高糖素
中图法分类号:Q813.11;R322.57;R329.21 文献标识码:A

Study of the neural stem cells differentiated into pancreatic islet-like tissue *in vitro*

YAO Zhong-xiang, LI Wei, LI Cheng-ren, QIN Mao-lin, LIU Jian-jun, CHEN Xing-shu, ZHOU De-shan (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing Institute of Neuroscience, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe whether the neural stem cells can be induced to differentiate into pancreatic islet-like tissue *in vitro*. Methods The neural stem cells cultured *in vitro* were induced to differentiate with insulin complex components (Insulin-Transferrin-Selenium, ITS). The characteristics of the differentiated cells were identified by the marker of the pancreatic epithelial stem cell-cytokeratin 19(CK-19), the marker of pancreatic β cell-insulin, and the marker of pancreatic α cell-glucagon by immunocytochemical staining. Results The neural stem cells cultured *in vitro* were differentiated into some epithelioid cells after having been induced by ITS for 3 days. Scattered or gathered distribution of the epithelioid cells with CK-19 immunoreactive positive was found near the colony of neural stem cells. After having been cultured for additional 2 to 4 weeks, the epithelioid cells increased to form pancreatic islet-like tissue. Most of the epithelioid cells were of insulin immunoreactive positive, but only a few were of glucagons positive. Conclusion The neural stem cells cultured *in vitro* are potent to differentiate into pancreatic islet-like tissue and they can differentiate into pancreatic β and α cells.

Key words: neural stem cell; pancrea; CK-19; insulin; glucagon

糖尿病是由于胰岛β细胞数量缺乏(Ⅰ型)或胰岛素的分泌相对不足(Ⅱ型)所致,细胞或组织器官移植是治疗糖尿病最理想的方法之一,目前存在的主要困难是供体来源严重不足。近年,干细胞研究取得的进展为应用干细胞移植治疗糖尿病开辟了新的途径。最近的研究表明成体干细胞具有跨系分化的能力,如Suzuki等[1]报道肝干细胞可以分化为胰腺β细胞。Bjornson等[2]报道神经干细胞能够分化为血细胞。发育过程中的神经元和胰岛细胞的表型有许多相似之处[3],已从胰岛分离培养了Nestin阳性的细胞,具有分化为β细胞的潜能,这些迹象均表明神经干细胞和胰岛细胞之间可能存在密切的关系。因此,作者尝试了将体外培养大鼠脑皮层神经干细胞向胰腺类胰岛样组织分化的可能性,为探索应用干细胞治疗糖尿病提供新的途径和方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12培养液1∶1,B27 50×,胰岛素复合成分(Insulin-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30130110),国家教育部留学归国人员基金资助项目(2001);国家人事部留学人员科技活动择优资助项目(2001)

作者简介:姚忠祥(1965-),男,湖北省汉川县人,博士,副教授,主要从事细胞发育与分化调控方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752231,E-mail:yaozhx2000@yahoo.com

收稿日期:2002-09-05;修回日期:2002-12-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Transferrin-Selenium, ITS), 角质化细胞生长因子(Keratinocyte growth factor, KGF)(Roche); 碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)20 ng/ml (Sigma)。胰岛素抗体, 胰高糖素抗体, 细胞角蛋白-19(Cytokeratin 19, CK-19)抗体(Dako)。胎牛血清等(Gibco)。

1.2　神经干细胞的培养鉴定

取孕 10~14 d 大鼠胚胎大脑皮层, 按我室建立的方法[4] 分离、培养神经干细胞, 传代并进行 nestin 免疫细胞化学染色鉴定。

1.3　神经干细胞的诱导分化

收集培养的神经干细胞集落, 加入少量培养液后反复吹打, 使细胞尽量分散, 计数细胞, 40~50 个细胞集落/35 mm 培养皿(预先涂多聚赖氨酸)分散培养, 培养条件为: DMEM/F12(1∶1), 2%胎牛血清, ITS 1×, B27 1×, 非必需氨基酸 1×。置 37 ℃ 5%CO_2, 每周换液 2 次。

1.4　免疫细胞化学染色

常规免疫细胞化学染色鉴定培养细胞是否表达 CK-19、胰岛素和胰高糖素等不同种类细胞的特异性标志物。

2　结果

分离培养的胚胎大鼠大脑皮层神经干细胞呈球状悬浮生长, 细胞生长快, 每 3 d 即可传代, 免疫细胞化学染色呈 Nestin 免疫阳性反应, 在自然分化条件下, 神经干细胞主要分化为神经元和神经胶质细胞, 证实为神经干细胞[4]。

给予 ITS 等进行诱导分化, 约 3 d 后即可见在神经干细胞集落周围出现上皮样细胞, 细胞呈圆形或有短突起, 细胞散在或成群分布, 见图 1。免疫细胞化学染色显示上皮样细胞呈 CK-19 免疫阳性反应, 见图 2。

ITS 等诱导约 2 周后, 可见从神经干细胞集落周围分化出的上皮样细胞增多, 细胞逐渐密集呈圆形或鹅卵石样排列, 见图 3。继续培养约 2 周后, 上皮样细胞增多并密集排列形成类胰岛样组织, 免疫细胞化学染色显示大多数细胞呈胰岛素免疫阳性反应, 见图 4, 少数细胞呈胰高糖素免疫阳性反应。

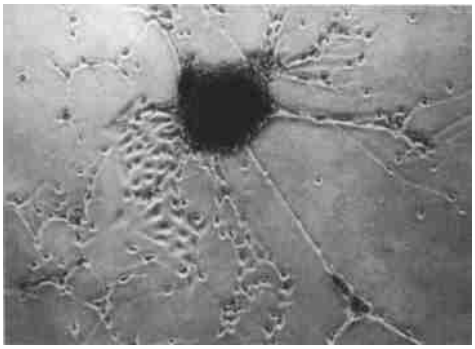


图 1　经 ITS 等诱导分化 3 d 后, 可见上皮样细胞位于神经干细胞集落附近　(× 100)

Fig 1　After induced differentiation for 3 days by ITS, some epithelioid cells were located near the colony of neural stem cells　(× 100)

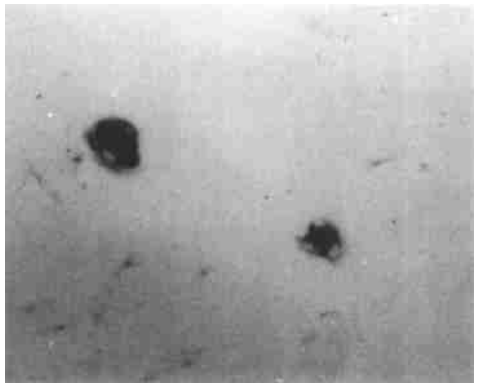


图 2　神经干细胞被 ITS 等诱导分化 3d 后, 经免疫细胞化学染色显示呈 CK-19 免疫阳性反应的上皮样细胞　(S-P× 150)

Fig 2　After induced differentiation for 3 days by ITS, the epithelioid cells were of CK-19 immunoreactive positive with immunocytochemical staining　(S-P× 150)

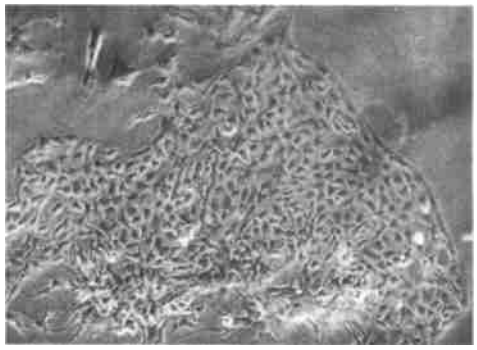


图 3　相差显微镜观察神经干细胞被 ITS 等诱导分化 4 周后, 上皮样细胞增多, 细胞圆形, 细胞逐渐密集形成类胰岛样组织　(× 150)

Fig 3　After induced differentiation for 4 weeks by ITS, epithelioid cells with round shape increased to form pancreatic islet-like tissue under phase contrast microscope　(× 150)



图 4　神经干细胞被 ITS 等诱导分化 4 周后, 上皮样细胞进一步增殖形成类胰岛样组织, 经免疫细胞化学染色显示大多数细胞呈胰岛素免疫阳性反应　(S-P× 150)

Fig 4　After induced differentiation for 4 weeks by ITS, epithelioid cells proliferated more to form pancreatic islet-like tissue. Most of the epithelioid cells were of insulin immunoreactive positive by immunocytochemical staining　(S-P × 150)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

干细胞研究取得的巨大进展，为应用干细胞移植治疗包括糖尿病在内的各种慢性疾病开辟了新的途径。糖尿病最理想的治疗的方法是细胞或组织器官移植，但供体来源极其困难。最近的研究表明，胰腺β细胞的体外来源可能有多种途径：①从成年或胎儿胰岛组织体外分离培养β细胞。Beattie 等[5] 体外培养成年胰岛β细胞，但细胞增殖的数量有限，同时分泌胰岛素的能力明显下降。② 诱导胰腺干细胞分化为β细胞。Cornelius 等[6] 和 Bonner-Weir 等[7] 分别从成年小鼠和人的胰导管分离培养了胰腺干细胞，该细胞具有自我增殖和分化为类似胰岛样结构的能力，但目前仅有极少数报道。③将胚胎干细胞诱导分化为β细胞。Soria 等[8] 和 Assady 等[9] 分别报道了从小鼠和人胚胎干细胞可以诱导分化为β细胞。④从其它组织干细胞跨系分化β细胞。Suzuki 等[1] 成功地从肝脏干细胞诱导分化为胰腺β细胞。

哺乳类动物在早期胚胎发育时期，神经元和胰岛细胞的表型有许多相似之处，而且，发育中的胰岛细胞表达多种神经元特有的标志物，如神经元特异性烯醇化酶、儿茶酚氨合成酶、酪氨酸转氨酶羟化、多巴氨脱羧酶及一些转录因子等。Zulewski 等[3] 报道从成年大鼠胰岛中分离得到了一种 Nestin 阳性的多潜能干细胞，它能分化为胰腺的内、外分泌细胞和肝细胞。Nestin 是神经干细胞的一种中间丝蛋白。胰岛内这种 Nestin 阳性细胞既不表达内分泌激素如胰岛素，也不表达血管内皮或神经元的标志物如胶原Ⅳ和甘丙素，而且，这种 Nestin 阳性细胞不表达胰腺上皮干细胞的特异性标志物 CK-19。将 Nestin 阳性细胞分离培养后，可见其具有明显的增生能力，分化的细胞表达肝和胰腺细胞的标志物：α-胎蛋白，胰酶和 CK-19，亦可测到胰岛素、胰高血糖素和胰高血糖素样多肽Ⅰ等，提示 Nestin 阳性细胞可能具有干细胞的性质，且参与胰岛内分泌细胞的形成。

为了探讨是否可以从 Nestin 阳性的神经干细胞分化为胰岛β细胞，我们利用体外稳定传代培养的神经干细胞，通过添加不同的外源性复合因子（如 ITS 等）诱导分化后，发现神经干细胞经诱导分化后，分化形成上皮样细胞，进一步增生密集形成类胰岛样组织。早期的上皮样细胞表达胰腺上皮干细胞的特异性标志物 CK-19，类胰岛样组织的大多数上皮样细胞表达β细胞的特异性标志物胰岛素，少数细胞则表达α细胞的特异性标志物胰高糖素。这一实验结果表明神经干细胞具有分化为类胰岛样组织的能力，且能进一步分化形成胰岛α细胞和β细胞。但是，目前所得到的β细胞数量仍很有限，合成胰岛素的量也不具备临床意义。因此，探寻体外大量扩增胰腺干细胞和提高β细胞产生胰岛素的能力将是今后研究的重点，成体干细胞间的相互转化调控机制需进一步研究。

参考文献：

[1] Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, *et al*. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver [J]. JCB, 2002, 156(1): 173-184.

[2] Bjornson C R, Rietze R L, Reynolds B A, *et al*. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo* [J]. Science, 1999, 283(5 401): 534-537.

[3] Zulewski H, Abraham E J, Gerlach M J, *et al*. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, excrine, and hepatic phenotypes [J]. Diabetes, 2001, 50(3): 521-533.

[4] 李 巍，蔡文琴，姚忠祥. 大鼠神经干细胞分离培养及基因转染研究[J]. 第三军医大学学报，2001, 23(12): 1425-1427.

[5] Beattie G M, Itkin-Ansari P, Cirulli V, *et al*. Sustained proliferation of PDX-1+ cells derived from human islets [J]. Diabetes, 1999, 48(5): 1013-1019.

[6] Cornelius J G, Tchernev V, Kao K J, *et al*. *In vitro*-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas [J]. Horm Metab Res, 1997, 29(6): 271-277.

[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 USA, 2000, 97(14): 7999-8004.

[8] Soria B, Roche E, Berna G, *et al*. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Diabetes, 2000, 49(2): 157-162.

[9] Assady S, Maor G, Amit M, *et al*. Insulin production by human embryonic stem cells [J]. Diabetes, 2001, 50(8): 1691-1697.

（编辑 薛国文）

欢迎订阅《第三军医大学学报》

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net