DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.010
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003


文章编号:1000-5404(2003)01-0023-03

论著

# 人胰腺干细胞的体外分离培养、鉴定和分化特性

姚忠祥,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 体外分离培养人胰腺干细胞,进行鉴定并初步观察其分化为胰岛内分泌细胞的能力。方法 用酶消化法从人胎儿胰腺分离胰腺干细胞,培养并传代,应用胰腺干细胞特异性标志物CK-19、胰岛β细胞特异性成分胰岛素和α细胞特异性成分胰高血糖素的抗体进行免疫细胞化学染色鉴定细胞种类和分化特性。结果 分离培养的人胎儿胰腺干细胞呈梭形,最初1周生长较慢,以后增殖较快,约培养3周后即可传代培养。传代细胞约生长2周即可再次传代,免疫细胞化学染色显示细胞呈CK-19免疫阳性反应。经诱导分化后,细胞形成类胰岛样组织,此时免疫细胞化学染色显示部分细胞呈胰岛素免疫阳性反应,少数细胞呈胰高糖素免疫阳性反应。结论 人胰腺干细胞能在体外培养条件下快速增殖,并具有多向分化潜能,能分化形成胰岛β细胞和α细胞。

关键词:人;胰腺干细胞;体外培养;分化
中图法分类号:Q813.11;R322.491;R329.24 文献标识码:A

# Isolation, culture and identification of human pancreatic stem cells and their differentiation characteristics *in vitro*

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

**Abstract**: Objective To isolate, culture and identify the human pancreatic stem cells *in vitro* and to observe the potency of the cells to differentiate into endocrine cells of pancreatic islet. Methods Stem cells were isolated from the human fetal pancreas by enzyme digestion for transfer of culture *in vitro*. The potency and types of the cell differentiation were then identified by using the pancreatic stem cell marker-cytokeratin-19 (CK-19), the pancreatic β cell marker-insulin and the pancreatic α cell marker-glucagons with immunocytochemical staining. Results The shape of human pancreatic stem cells cultured *in vitro* were fusiform. The cells grew slowly in the first week but then proliferated quickly. The cells could be used for subculturing *in vitro* after 3 weeks. The subcultured cells could be used for subculturing again after another 2 weeks and the cells were found to be of CK-19 immunoreactive positive. After induced differentiation, the cells formed the pancreatic islet-like structures. Part of the cells were of insulin immunoreactive positive but few of them were of glucagon immunoreactive positive. Conclusion Human pancreatic stem cells can proliferate quickly, may be of multipotency and can be differentiated into β and α cells of pancreatic islet *in vitro*.

**Key words**: human; pancreatic stem cells; insulin; differentiation

糖尿病常伴有广泛的并发症,其死亡率居第3位。理想的治疗方法是胰腺或胰岛移植,阻止糖尿病的发展及并发症的发生,从根本上治疗糖尿病。无论是Ⅰ型还是Ⅱ型糖尿病,应用细胞移植治疗的主要障碍之一是能产生胰岛素的组织来源极其困难。为此,作者在人胎儿胰腺干细胞的分离培养等方面进行了一些探索,应用细胞角蛋白-19(Cytokeratin 19, CK-19)、胰岛素、胰高血糖素等免疫细胞化学染色方法鉴定,本研究对分离、培养及诱导分化人胰腺干细胞的方法进行了探讨,为深入研究胰腺干细胞的分化调控机制及应用干细胞移植治疗糖尿病奠定了基础。

基金项目: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);军队"十五"杰出人才基金资助项目(01J013)
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
通信作者:周德山,电话:(023)68752230,Email:dszhou2000@yahoo.com
收稿日期:2002-08-02;修回日期:2002-12-12

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

无糖DMEM培养基,胶原酶P,胰蛋白酶(Sigma);B27

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

50×，胰岛素复合成分(Insulin-Transferrin-Selenium, ITS)，角质化细胞生长因子(Keratinocyte growth factor, KGF)(Roche)；CK19 抗体，胰岛素抗体 (Dako)；胰高血糖素抗体(Santa)；尼克酰胺(Nicotinomide)，胎牛血清等(Gibco)。

### 1.2 胰腺干细胞的分离、体外培养及传代

无菌分离流产人胚胎(5～7 月胎龄)胰腺组织，于解剖显微镜下去除周围的脂肪和结缔组织。机械切碎，胶原酶震荡消化 37 ℃ 40 min，静置 10 min，弃上清，0.25% 胰蛋白酶 37 ℃消化至单细胞悬液，6 孔培养皿(1× $10^6$ 个细胞/孔)无糖 DMEM 培养基(含 2× 非必需氨基酸，1× B27)培养。2 d 后换液(含终浓度为 10 μg/ml KGF，1 mg/ml ITS)。继之，每 3 d 换液 1 次至细胞生长良好后进行传代及鉴定。

### 1.3 诱导分化

改换培养基的成分(葡萄糖浓度为 17.8 mmol/l，10 mmol/L 尼克酰胺，2%胎牛血清)。其它营养成份不变，观察细胞生长状况。

### 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。

## 2 结果

### 2.1 胰腺干细胞的分离、体外培养、传代及鉴定

在无糖无血清培养基中，初分离的胰腺细胞多数贴壁，随后95%以上细胞死亡，仅见少量细胞存活。换液后，可见贴壁细胞分裂增殖，慢慢伸出突起，呈长梭形，最初 1 周生长较慢，细胞数量增加，突起逐渐伸长，见图 1，以后细胞分裂的速度加快，逐渐形成梭形细胞的集落，培养 3 周后，细胞可覆盖培养皿的80%左右，此时进行传代培养。传代细胞每 2 周再次传代。免疫细胞化学染色显示该培养细胞呈 CK-19 免疫阳性反应，见图 2，胰岛素和胰高血糖素免疫染色均为阴性。

### 2.2 胰腺干细胞的诱导分化

经尼克酰胺和高浓度葡萄糖等诱导分化后，细胞突起开始回缩、变短，增长速度加快，培养约 2～3 周后细胞相互聚集形成上皮样团块，类似胰岛样组织，见图 3，免疫细胞化学染色显示部分细胞呈胰岛素免疫阳性反应，见图 4，少数细胞为胰高糖素免疫反应阳性，而 CK19 阴性。随时间延长，胰岛素和胰高血糖素免疫染色阳性细胞数目增多，染色增强。

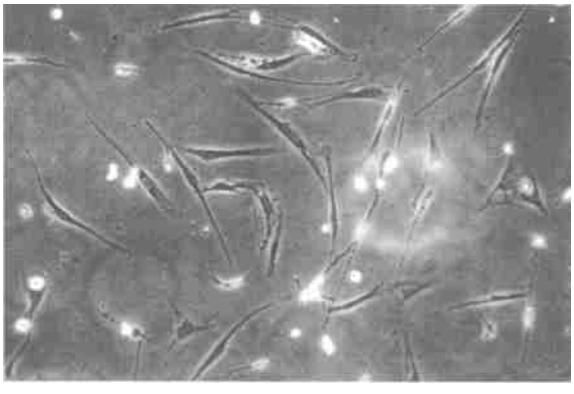


图 1 培养 1 周后贴壁细胞的突起伸长，细胞数目增多 (×100)

**Fig 1 After culturing for 1 week, the protrusions of cells were longer than those at 2 d, and the number of cells increased** (×100)



图 2 培养 2 周后，经免疫细胞化学染色显示细胞呈 CK-19 免疫阳性反应 (S-P× 60)

**Fig 2 After culturing for 2 weeks, the cells were of CK-19 immunoreactive positive by immunocytochemical staining** (S-P × 60)

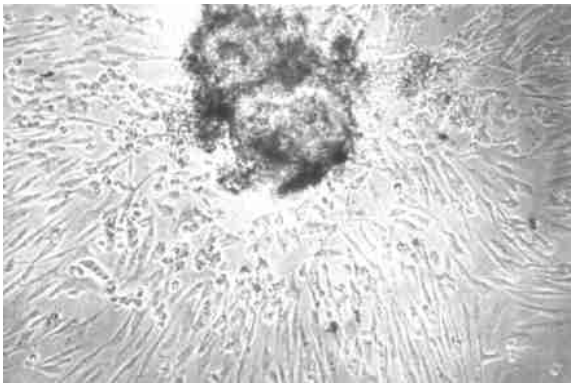


图 3 经尼克酰胺和高浓度葡萄糖诱导分化 2～3 周后，细胞形成类胰岛样组织 (×50)

**Fig 3 The cells formed the pancreatic islet-like structure when they were induced for 2 or 3 weeks with nicotinomide and glucose of high concentration** (× 50)

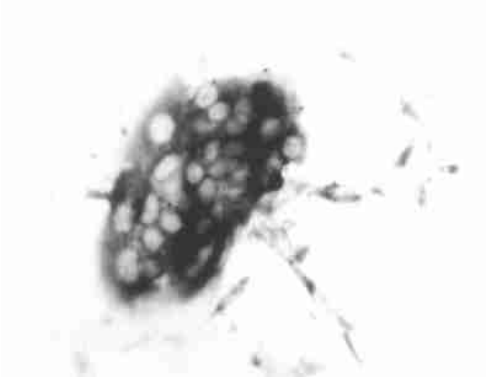


图 4 诱导分化 3 周后，经免疫细胞化学染色显示细胞呈胰岛素免疫阳性反应 (S-P× 200)

**Fig 4 After induced differentiation for 3 weeks, the cells were of insulin immunoreactive positive by the immunocytochemical staining** (S-P× 200)

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

## 3　讨论

传统观念认为出生时胰岛β细胞的数量是恒定的, 即便是β细胞受损或胰岛素抵抗等导致的糖尿病时β细胞亦不会新生[1]。但是, 近年的研究显示生后胰岛β细胞是动态的, 可通过β细胞的增生和肥大, 增加胰岛细胞团的大小以维持血糖浓度局限于一个狭窄的生理范围内[2,3]。当胰岛素的需要量与功能性β细胞的量不相称时将发生糖尿病。新近的研究表明, 成年机体的胰导管组织中部分细胞在体外培养条件下能快速增殖, 失去其导管上皮细胞特异性的表型, 具有多向分化潜能, 称之为胰腺干细胞, 后者在合适的外源性刺激条件下可分化形成胰岛细胞[4], 提示利用干细胞作为移植的供体治疗糖尿病已成为可能, 为探索新的移植方法治疗糖尿病奠定了理论基础。

Bonner-Weir (2000)及 Cornelius (1997)等研究人员分别从成年小鼠[5]和人[4]的胰导管成功分离培养了胰腺干细胞, 具有自我增殖和分化为类胰岛样组织的能力。从 19～20 周龄的患糖尿病前的非肥胖性糖尿病(Nonobese diabetic, NOD)雄性模型小鼠[6]的胰腺组织, 用胶原酶与胰蛋白酶消化分离胰腺干细胞, 培养 4～5 周后可见少量上皮样细胞贴壁生长。经高浓度葡萄糖液培养, 上皮细胞逐渐生长为单层, 进而形成类胰岛样组织, 免疫细胞化学显示部分细胞呈胰岛素或胰高糖素阳性, 但该方法培养周期较长, 细胞生长较慢, 且需要特殊的小鼠模型。人胰腺干细胞是从手术切除的成年胰腺组织经胶原酶消化后, Ficoll 分层液纯化分离, 将各层细胞分别给予适合导管细胞生长增殖的培养条件进行培养, 但该方法的分层离心过程较繁琐, 效率较低。

作者尝试了从流产的人胎儿(5～7 月胎龄)胰腺组织分离胰腺干细胞, 最初 1 周生长较慢, 但从第 2 周细胞增殖加快, 约 3 周可获得单层贴壁细胞, 经诱导分化形成小的细胞团, 类似胰岛样组织。为增加导管上皮细胞(非胰岛细胞)的贴壁, 我们应用了非粘附性的培养瓶(瓶底不涂粘附性物质), 胰岛细胞漂浮在培养液中, 而胰导管上皮细胞在培养 24 h 时开始贴壁, 通过换液方法除去非贴壁细胞, 可明显提高培养细胞的纯度。结果表明, 分离培养的人胎儿胰腺干细胞具有体外自我更新和多向分化的潜能, 免疫细胞化学染色显示呈胰腺干细胞特异性标志物 CK-19 阳性, 形态特性与文献报道相似。经高浓度葡萄糖等诱导分化后, 细胞形成类似胰岛样组织, 大部分细胞呈胰岛素(β细胞)免疫反应阳性, 部分细胞为胰高血糖素(α细胞)免疫反应阳性。

人胰腺干细胞的成功分离培养, 为β细胞替换移植治疗糖尿病开辟了新方法。但是, 有必要进一步优化培养条件, 需要大量的扩增人胰腺干细胞, 增加胰岛内分泌细胞的数量, 以满足大量的胰岛细胞移植的需要。啮齿动物的资料显示胰腺外分泌组织(包括腺泡和导管)的体外培养可形成与直接分离导管上皮单独培养相似的结果, 提示腺泡细胞可能通过逆分化形成导管上皮细胞[7,8]。通常认为胚胎期胰腺的自然分化途径是形成胰岛[9], 体内存在抑制性作用可防止过度形成胰岛导致产生过多胰岛素。但体外增殖导管组织形成胰岛的速度较快, 可能是排除了体内原位时存在的抑制效应。总之, 体外培养胰腺导管细胞形成新的胰岛的能力仍然有限, 目前还不具备临床意义。

尽管胰腺干细胞的临床应用仍有许多难题有待进一步解决, 但它的体外成功培养和定向分化, 使人们对利用胰腺干细胞制作新的胰岛充满了希望, 预计在未来的医学实践中, 移植胰岛β细胞治疗糖尿病患者具有巨大的应用前景。

参考文献:


[1] Bonner-Weir S. Perspective: postnatal pancreatic beta cell growth[J]. Endocrinology, 2000, 141(6): 1926－1929.

[2] Finegood D T, Scaglia L, Bonner-Weir S. Dynamics of β-cell mass in the growing rat pancreas: estimation with a simple mathematical model[J]. Diabetes, 1995, 44(3): 249－256.

[3] Xu G, Stoffers D A, Habener J F, *et al*. Exendin-4 stimulates both β-cell replication and neogenesis, resulting in increased β-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats[J]. Diabetes, 1999, 48(12): 2270－2276.

[4] 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.

[5] 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.

[6] Leiter E H, Prochazka M, Coleman D L. Animal model of human disease, the non-obese diabetic (NOD) mouse[J]. Am J Path, 1987, 128(2): 380－383.

[7] Githens S, Schexnayder J A, Moses R L, *et al*. Mouse pancreatic acinar/ductular tissue gives rise to epithelial cultures that are morphologically, biochemically, and functionally indistinguishable from interlobular duct cell cultures[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 1994, 30A(9): 622－635.

[8] Githens S, Schexnayder J A, Desai K, *et al*. Rat pancreatic interlobular duct epithelium: isolation and culture in collagen gel[8]. *In Vitro* Cell Dev Biol, 1989, 25(8): 679－688.

[9] Gittes G K, Galante P E, Hanahan D, *et al*. Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors[J]. Development, 1996, 122(2): 439－447.


(编辑　王　红)

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