DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.008
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)01-0019-04

论著

昆明小鼠胰腺干细胞分离培养及特性鉴定

秦茂林,刘建军,姚忠祥,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 分离培养昆明小鼠胰腺干细胞并进行鉴定和观察其分化胰岛细胞的能力。方法 用酶消化法分离生后不同时期昆明小鼠胰腺干细胞,用细胞角质蛋白19(Cytokeratin 19,CK19)、胰岛素(Insulin)和胰高血糖素(Glucagon)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 分离初,可见少量上皮样细胞存活,更换含有生长因子的培养基后,可见细胞分裂增殖,呈长梭形,逐渐形成集落。传代后鉴定呈CK19阳性。高糖诱导分化后,细胞形成胰岛样结构,免疫细胞化学染色显示大部分细胞胰岛素阳性,少数细胞呈胰高血糖素阳性。结论 昆明小鼠胰腺干细胞能在体外培养条件下增殖,具有分化形成胰岛β细胞和α细胞的能力。

关键词:胰腺干细胞;小鼠;培养;分化
中图法分类号:Q813.11;R4322.491;R329.24 文献标识码:A

Isolation, culture and identification of pancreatic stem cells of Kunming mouse

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

Abstract: Objective To isolate and identify pancreatic stem cells of Kunming mouse and to observe the differentiation potency of those cells. Methods Pancreas of postnatal Kunming mice were digested by enzymes to isolate pancreatic stem cells. The potency of the cell differentiation was then identified with special marker of cytokeratin-19 (CK-19), insulin and glucagons by immunocytochemical staining. Results Few epithelioid cells could be found to survive at the beginning of isolation, but when medium was replaced by that with growth factor, the cells proliferated quickly in fusiform shape and formed colony gradually. The cells were CK-19 immunoreactive positive after transfer of culture. After differentiation induced by high glucose, the cells formed the pancreatic islet-like structures. Immunocytochemical staining showed that part of the cells of pancreatic islet-like structures were insulin immunoreactive positive and few of the cells were glucagon immunoreactive positive. Conclusion Pancreatic stem cells of Kunming mouse can proliferate when cultured *in vitro* and have the potency of differentiation into β and α cells of pancreatic islet.

Key words: pancreatic stem cells; cultured *in vitro*; differentiation; mouse

糖尿病是一种以糖代谢异常为主要特征的内分泌代谢性疾病,临床常用外源性胰岛素或药物在一定程度上可以控制血糖,延缓慢性并发症的发生。现代医学认为根治糖尿病,只有通过胰腺或胰岛移植才能使病人完全康复[1],但是供体来源缺乏,无法满足众多糖尿病患者的需求。寻找新的胰岛细胞来源已成为生物医学研究者的一项重要任务。最新研究表明,包括胰腺组织在内,许多成年组织中均存在干细胞,称为成体干细胞。美国哈佛大学医学院Bonner-Weir等[2]报道,90%胰腺切除的大鼠,残存的胰外分泌腺组织可见明显的增殖,能够形成新的胰岛和胰腺外分泌组织,提示胰腺存在干细胞或前体细胞,在特定因素的诱导下,能够分化成具有特异功能的细胞。Peck等[3]成功地从人和小鼠的胰导管上皮分离了干细胞,并在离体情况下诱导其分化为类胰岛β细胞。Nadya等[4]利用小鼠的ES细胞诱导分化成类似胰岛样的结构,将其移植糖尿病小鼠的腹腔,能够产生胰岛素,降低小鼠血糖浓度,提示利用干细胞作为移植供体治疗糖尿病已成为可能。国内至今尚未见胰腺干细胞分离、培养及定向分化为胰岛细胞的研究报道,我们在这方面进行了一些探索,尝试了分离生后不同时期昆明小鼠的胰腺干细胞,用细胞角质蛋白19、胰岛素、胰高血糖素等抗体作为标志物,进行初步鉴定,为开展研究胰腺干细胞移植治疗糖尿病提供了理论和实践基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料和试剂

实验材料:生后不同时期的昆明小鼠(2、5、15、30、120 d)各

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:秦茂林(1970-),男,河南省洛阳市人,博士研究生,讲师,主要从干细胞分化和调控方面的研究。电话:(023)68752231
通信作者:周德山,电话:(023)68752230,E-mail:dszhou2000@yahoo.com
收稿日期:2002-09-23;修回日期:2002-12-16

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

10只(第三军医大学实验动物中心提供)。主要试剂:1× 非必需氨基酸、ITS 添加剂和 B27 添加剂(Gibco 公司);无糖 DMEM 培养基、角质细胞生长因子(Keratinocyte growth factor, KGF)、胶原酶 P、碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)和尼克酰胺(Sigma 公司);CK19、胰岛素和胰高血糖素等抗体(Santaruz 公司)。

1.2 胰腺干细胞的分离培养

无菌分离生后不同时期小鼠的胰腺组织,解剖显微镜下去除周围的脂肪和结缔组织。切碎(1 mm× 1 mm ~ 2 mm× 2 mm),37 ℃,胶原酶 P 轻微震荡消化 40 min,滤过,Dhanks 液洗脱筛网上剩余物,离心后 0.25% 胰蛋白酶消化至单细胞悬液,6 孔培养皿(1× 10^6 个细胞/孔)于无糖 DMEM 培养基(含 2× 非必需氨基酸,1× B27),37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养。5 d 后换液,加入含终浓度为 20 ng/ml BFGF,10 μg/ml KGF,1 mg/ml ITS 添加剂。每 2 d 换液至细胞生长良好,长满培养瓶 80% 后进行传代,并进行 CK19 免疫细胞化学染色,计数阳性细胞(每组计数 3 个样本,每个样本 100 个细胞)。

1.3 胰腺干细胞诱导分化

传代后细胞经下面培养基(含葡萄糖浓度分别为 5.0 mmol/L 和 17.8 mmol/l, 25.0 mmol/l, 尼克酰胺 10 mmol/L)培养,对照组仍为无糖培养基。相差显微镜观察细胞的生长分化状况。6 d 后进行 CK19、胰岛素、胰高血糖素免疫细胞化学染色,方法同前。

1.4 统计学处理

本实验获得的数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 胰腺干细胞的分离培养

分离的胰腺细胞最初多数贴壁,随后大部分细胞死亡,少量上皮样细胞存活,未见细胞明显分裂增殖。换含生长因子和添加剂的条件培养液后,可见贴壁细胞分裂增殖,伸出突起,呈长梭形。换液后,细胞分裂速度加快,逐渐形成梭形集落,见图 1。生后不同时期分离的干细胞差异较大,生后早期(2、5 d)胰腺组织干细胞的贴壁率、存活的梭形细胞比例和细胞传代次数等明显优于成年动物,CK19 免疫细胞化学染色阳性细胞比例随出生时间而降低,见表 1。传代后细胞 CK19 免疫染色阳性率达 90%。

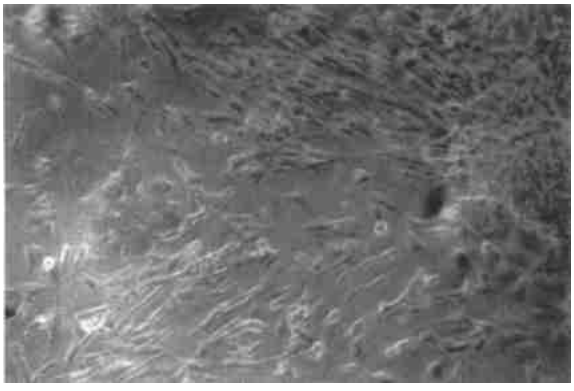


图 1 添加生长因子后 6 d 的胰腺干细胞 (× 100)

Fig 1 Added growth factor 6 d, pancreatic stem cells. phase contrast microscope (× 100)

表 1 昆明小鼠胰腺干细胞体外分离培养的生物学特性(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Biological characteristics of pancreatic islet stem cells of Kunming mouse cultured *in vitro* (%, $\bar{x}\pm s$)

Age of Kunming mouse(d)	2	5	15	30	120
Ratio of cell attachment (%)	80.1±0.4 *	78.2±0.3 *	49.4±0.5	49.0±0.1	48.4±1.1
Ratio of spinal shape cell(%)	69.2±0.3 *	68.1±0.9 *	55.7±0.5 *	44.7±0.3 *	20.8±0.3
$CK19^+$ cell(%)	32.4±0.6 *	30.5±0.3 *	21.7±0.3 *	17.4±0.3 *	6.5±0.3
Cell passages	2	2	0	0	0

*: $P< 0.01$ *vs* 120 d group

2.2 诱导分化

传代后的细胞,经不同葡萄糖浓度培养基诱导分化,可见梭形细胞分裂增生速度加快,集落外周梭形细胞的突起开始回缩、变短变圆,形成类似上皮样细胞,最终相互聚集成团。但无尼克酰胺的培养基,分化的上皮样细胞聚集速度非常慢。免疫细胞化学染色显示分离培养的胰腺干细胞染色呈 CK19 阳性,见图 2,而胰岛素和胰高血糖素染色均为阴性。在葡萄糖梯度浓度培养基中培养 6 d 后,CK19 阳性细胞数随葡萄糖浓度增加而减弱,与此同时胰岛素免疫阳性细胞增加,见图 3,染色强度增强;并可见少量胰高血糖素免疫染色阳性细胞,见图 4,后者与葡萄糖浓度增加变化不明显,见图 5。

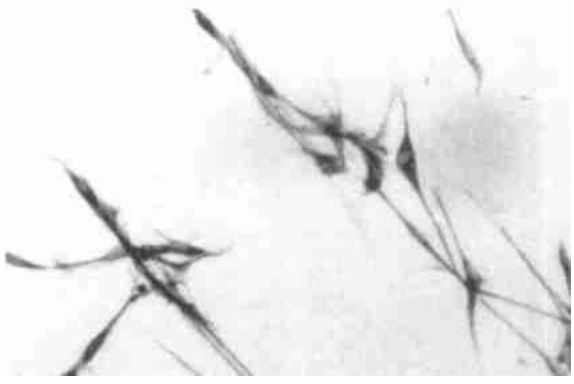


图 2 胰腺干细胞 CD19 免疫细胞化学染色 (× 400)

Fig 2 Pancreatic stem cellss immunocytochemical stained by CK19 antibody (× 400)

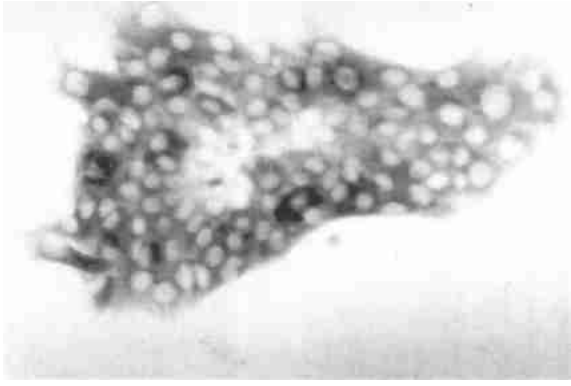


图 3 胰腺干细胞分化 6 d 胰岛素免疫细胞化学染色 (× 200)

Fig 3 After induced and differentiated for 6 d, the cells were insulin immuno-reactive positive (× 200)

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

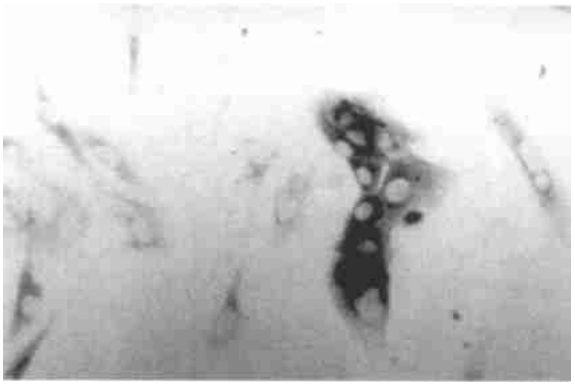
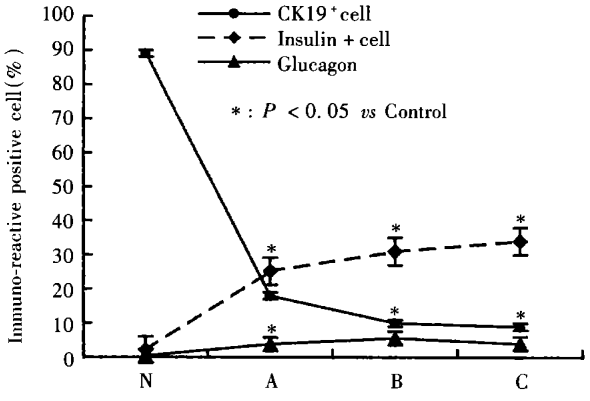


图 4　胰腺干细胞分化 6 d 胰高血糖素免疫细胞化学染色　(× 200)

Fig 4　After induced and differentiated for 6 d, the cells were glucagon immuno-reactive positive　(× 200)



N: Control; A: 5.0 mmol/L; B: 17.8 mmol/L; C: 25.0 mmol/L

图 5　不同浓度葡萄糖诱导胰腺干细胞 6 d 免疫细胞化学染色阳性细胞百分率

Fig 5　Immunocytochemical staining of different concentrations of glucose at 6th day

3　讨论

传统观念认为出生后胰岛β细胞不能再生，即便在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[5]。近来研究表明，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，并失去导管上皮细胞特异性的表型，该细胞在合适的条件下可分化形成胰岛的各种内分泌细胞，具有多向分化潜能，被称为胰腺干细胞[6]。相继的实验发现除胰腺导管外，胰岛和胚胎干细胞均可以诱导分化为胰腺干细胞，提示利用干细胞作为移植的供体治疗糖尿病已成为可能，为探索新的治疗糖尿病方法奠定了理论基础[7]。

3.1　胰腺干细胞的分离培养

国内外分离小鼠的胰腺干细胞用的多数是非肥胖性糖尿病(Nonobese diabetic, NOD)雄性模型小鼠，据 Cornelius 等[8]报道分离胰腺干细胞，以生后 2 ~3 个月的NOD 小鼠为佳。我们尝试了我国实验常用的昆明小鼠胰腺干细胞分离培养。结果表明，生后早期分离细胞的贴壁率、梭形细胞比例和 CK19 免疫阳性细胞比例均较成年动物高，并且能够传代培养，提示昆明小鼠胰腺干细胞的分离成功率可能与所用组织的成熟度有关，即幼稚的胰腺组织存在干细胞的比例高，增殖能力也强。这一结果与 Cornelius 等[8]报道略有不同，推测可能是动物种属差别造成。最初分离的胰腺干细胞在无糖培养条件下能够维持活性，但不增殖，添加 bFGF, KGF 等细胞生长因子后，胰腺干细胞开始增殖，进入分裂状态。提示胰腺干细胞在合适的营养因子条件下能够体外大量增殖，本实验分离的昆明小鼠胰腺干细胞的表面标志，形态特性与 Peck 等[3]报道结果相似。

3.2　胰腺干细胞的诱导分化

分离培养的胰腺干细胞在适当的条件下能够分化成熟为有功能的胰岛组织，小鼠胰腺干细胞在不同浓度梯度的葡萄糖诱导下，细胞开始分化，CK19 染色阳性细胞比例随葡萄糖浓度升高而降低，与此同时诱导产生的胰岛素染色阳性细胞数目增加，而胰高血糖素染色阳性细胞数变化不明显，提示葡萄糖浓度提高是刺激胰腺干细胞分化的主要因素，尼克酰胺可促使高糖诱导分化的细胞聚集，加快胰岛状细胞团块的形成，也就是说分化的前提是高糖，而尼克酰胺则是分化细胞成熟的条件[9]。

在合适的条件下，分离的昆明小鼠的胰腺干细胞具有体外自我更新和分化的能力，经高浓度葡萄糖等诱导分化后，细胞形成类似胰岛样结构，并可见大部分细胞呈胰岛素(β 细胞)免疫反应阳性，少量细胞为胰高血糖素(α 细胞)免疫反应阳性。寻找提高胰腺干细胞向β细胞分化的比率、控制胰岛素产量的条件以及移植糖尿病动物模型，观察能否控制血糖浓度等将是今后研究工作的重要任务。

参考文献：

[1] Shapiro A M, Lakey J R, Ryan E A, *et al*. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetesmellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen[J]. N Engl J Med, 2000, 343(4): 230－238.

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

[3] Peck A B, Chaudhari M, Cornelius J G, *et al*. Pancreatic stem cells: building blocks for a better surrogate islet to treat type 1 diabetes[J]. Ann Med, 2001, 33(3): 186－192.

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

[4] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, *et al*. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Insulin-Secreting Structures Similar to Pancreatic Islets [J]. Science, 2000, 292(5520): 1389—1394.

[5] David Q. Shih Markus Stoffel Dissecting the transcriptional network of pancreatic islets during development and differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(25): 14189—14191.

[6] 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.

[7] Berna G, Leon-Quinto T, Ensenat-Waser R, *et al*. Stem cells and diabetes [J]. Biomed Pharmacother, 2001, 55(4): 206—212.

[8] 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.

[9] Soria B, Skoudy A, Martin F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus[J]. Diabetologia, 2001, 44(4): 407—415.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)01-0022-01

蛇黄洗剂治疗婴儿湿疹105例疗效分析

Therapeutic efficacy of *She Chuang Zi* and yellow-corktree bark lotion in 105 cases with eczema

韩景芳[1]，杨 林[1]，叶俊儒[1]，张晋康[1]，刘海燕[2]（[1]第三军医大学成都军医学院第47医院小儿科，成都 610500；[2]四川省乐山市武警总医院，乐山 674000）

婴儿湿疹（简称湿疹）是一种常见的急性或亚急性皮肤瘙痒性、炎症性疾病，中医称之为胎毒、湿毒，俗称奶癣。虽然治疗该病的中西医方法较多，且短期内效果也较好，但易复发。近2年来，我们使用自制蛇黄洗剂治疗105例湿疹，获得了较满意的效果，现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

105例中，男70例，女35例，3～5个月72例，5～8个月23例，8个月至1岁10例；人工喂养78例，母乳喂养27例；家族中有哮喘史35例（33.33%），家族中有荨麻疹史27例（25.7%）。

1.2 临床表现

105例患儿面颊、头部、眉毛中均有红斑、丘疹、糜烂、渗出及黄痂附着，其中25例除上述部位有湿疹外，均累及颈、胸背、臀部等处，17例伴有哭闹、夜眠差，食奶量减少。有75例过去曾多次接受治疗，后又复发。

1.3 治疗方法

蛇床子、黄柏各20 g加水500 ml煎熬30 min，取药液外擦患处皮肤，早晚各1次，连续用3～5 d。特别重者，外擦的同时，以蛇黄汤（即蛇床子、黄柏各3～5 g加水150 ml煎至40～60 ml），分次口服，一般口服2剂，最多4剂。

2 治疗效果

78例单用蛇黄洗剂3剂，外擦4～6 d痊愈，占74.29%；27例湿疹较重者擦蛇黄洗剂加服蛇黄汤2～4剂后有15例10 d痊愈，随访半年无1例复发。治疗过程中有18例出现食欲下降，大便稀且次数增多（3～4次/d），14例出现恶心、呕吐现象（1～3次/d）。经对症治疗，恶心、呕吐自然消失，痊愈停药2 d后，食欲和大便恢复正常。

3 讨论

婴儿湿疹多急性起病，初以红斑为主，继之产生针头大小的丘疹和水疱，部分融合形成大疱。疱破后形成糜烂面，若继发感染则产生脓疱或脓液。如治疗不彻底少数可转为慢性，经常瘙痒，易并发真菌感染[1]。

中医辨证认为，婴儿湿疹多系湿热毒邪所致。我们自拟的蛇黄洗剂主要根据蛇床子和黄柏均具有清热解毒和显著的燥湿功效，可抑制真菌繁殖，并有收敛、抑制渗出等作用。该方毒副作用小，极少数婴儿服药后有恶心、呕吐、食欲下降、大便稀且次数增多现象，经停药及对症治疗，症状立即消失，不影响继续治疗。该治疗方法简单、价廉和患儿易接受等优点，是治疗湿疹的有效方法。

关键词：蛇黄洗剂；婴儿湿疹

中图法分类号：R758.23 文献标识码：B

参考文献：

[1] 杨国亮. 皮肤病学[M]. 上海：上海医科大学出版社，1992 357.

（编辑 陈聪连）

作者简介：韩景芳（1956—），男，河南省镇平县人，副主任医师，主要从事儿科专业方面的研究。电话：(028)30116603

收稿日期：2002-03-26；修回日期：2002-06-08

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