

胎儿胰岛样细胞团源上皮样细胞分离、纯化和鉴定 Isolation, Purification and Identification of Epithelial Cells Derived from Fetal Islet-like Cell Clusters

乔海¹ 赵婷¹ 王赞¹ 杨春荣¹ 效梅² 窦忠英^{1*}

QIAO Hai¹, ZHAO Ting¹, WANG Yun¹, YANG Chun-Rong¹, XIAO Mei² and DOU Zhong-Ying^{1*}

1. 西北农林科技大学陕西省干细胞工程技术研究中心 杨凌 712100

2. 广东海洋大学 湛江 524088

1. Northwest A & F University, Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering & Technology Center, Yangling 712100, China

2. Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

摘 要 旨在优化胰腺干细胞分离、鉴定的方法和体系,为糖尿病研究和治疗提供种子细胞。采用胶原酶消化法,分离培养出胰岛样细胞团(ICC_s)对其进行贴壁培养,从中纯化出上皮样细胞。采用 MTT 法测定其生长情况并绘制生长曲线。采用免疫组织化学染色检测分离得到细胞的 PDX-1、PCNA、CK-7、CK-19、Nestin、Glut2、Vimentin、Insulin 表达情况。应用流式细胞仪检测其表面标志。由分离培养的 ICC_s 成功纯化出上皮样细胞,传 40 代,每代冻存 $10^6 \sim 10^8$ 个细胞,生长曲线显示其传代第 3 天进入对数生长期,第 5 天进入平台期;免疫组织化学染色显示其表达 PDX-1、PCNA、CK-7、CK-19、Nestin、Glut2、Vimentin;不表达 Insulin。流式细胞仪分析表明其表达 CD29、CD44、CD166,不表达 CD11a、CD14、CD34、CD45、CD90、CD105、CD117。由胎儿胰腺能分离出具有自我更新能力的上皮样细胞,为导管来源,具干细胞特性。

关键词 胎儿胰腺,胰腺干细胞,胰岛样细胞团,上皮样细胞

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)02-0246-06

Abstract The aim of this article is to provide methods for the isolation and identification of pancreatic stem cells and cell source for research and therapy of diabetes. ICC_s were isolated by collagenase IV digesting and then cultured; epithelial cells were purified from monolayer cultured ICC_s. The growth curve of the epithelial cells was measured by MTT. The expression of molecular markers in the cells was identified by immunohistochemical staining. The surface markers in the epithelial cells were analyzed by FACS. Epithelial cells were purified from isolated human fetal ICC_s and passaged 40 times, and $10^6 \sim 10^8$ cells were cryopreserved per passage. The growth curve demonstrated that the epithelial cells proliferated rapidly. The epithelial cells expressed PDX-1, PCNA, CK-7, CK-19, Nestin, Glut2, and Vimentin, but Insulin was undetected. The cells expressed CD29, CD44, and CD166, but did not express CD11a, CD14, CD34, CD45, CD90, CD105, and CD117. Taken together, these results indicate that self-renewable epithelial cells can be isolated and purified from human fetal pancreas. These also show that the epithelial cells originate from ducts and have the characteristics of pancreatic stem cells.

Key words fetal pancreas, pancreatic stem cells, islet-like cell cluster(ICC_s), epithelial cells

Received: October 8, 2006; Accepted: November 30, 2006.

This work was supported by grant from the National High-Tech Research and Development Program of China(863 Program X No. 2005AA21905), Key Program of National Ministry of Education(No. 0316), and Sci-Tech Research Development Program of Shaanxi Province(No. 2006KZ05-G1).

* Corresponding author. Tel: +86-29-87080068; Fax: +86-29-87080068; E-mail: douzhongying@china.com

国家高技术研究与发展计划(No. 2005AA21905)项目,教育部重大项目(No. 0316)和陕西省科技研究发展计划项目(No. 2006KZ05-G1)资助。
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

糖尿病是继癌症和心血管疾病之后的第三大疾病,是全球性医学难题。日趋成熟的胰岛移植技术^[1]给糖尿病患者带来了曙光,但供体器官严重短缺和免疫排斥仍然是胰岛移植的最大障碍^[2]。近年来,随着干细胞研究的发展,将干细胞作为种子细胞应用于临床多种疾病的治疗已成为一个新的领域。将胚胎干细胞或成体干细胞诱导为胰岛后移植治疗糖尿病给患者康复带来了新希望^[3]。胰腺干细胞在理论上更容易向胰岛细胞分化,已有很多研究证明胰腺来源的干/祖细胞在体内外能诱导分化为内分泌细胞^[4-6]。但关于胰腺干细胞来源、形态、分子标志仍存在争议。

研究表明,人胎儿胰腺细胞在体外能自发形成胰岛样细胞团(Islet-like Cell Clusters, ICCs),DTZ染色很弱,以上皮细胞为主;体外经烟酰胺等诱导后能分化为胰岛内分泌细胞,移植到裸鼠体内能发育成功能性 β 细胞^[7-9]。

本研究从获得的胰岛样细胞团中纯化出上皮样细胞(Human Fetal ICCs-Derived Epithelial Cells, HFIECs),并检测与胰腺干细胞相关标志的表达情况,以期优化胰腺干细胞的分离、鉴定方法和体系,为糖尿病临床治疗提供理想的种子细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

3~5月龄人流产胎儿(由西安某医院提供),DMEM(低糖)(GIBCO);RPMI1640(GIBCO);胰蛋白酶(1:250)(GIBCO);EDTA(GIBCO);明胶(Sigma);SABC试剂盒(北京中杉)。

1.2 方法

1.2.1 胎儿胰岛样细胞团的获得:无菌取3~5月龄胎儿胰腺, PBS + 双抗漂洗3次,置于10mL烧杯中剪碎(1mm³), IV型胶原酶37℃消化20min, PBS + 双抗洗3次,离心收集细胞, RPMI1640 + 10% NBS悬浮于6cm玻璃皿中, 37℃, 5% CO₂培养, 接种后第四天开始半量换液, 每两天一次。

1.2.2 胎儿胰岛样细胞团单层培养:用玻璃管将培养皿中聚集形成的胎儿胰岛样细胞团挑出, 接种于明胶包被过的玻璃皿中, 低糖 DMEM + 10% NBS + 10ng/mL EGF 培养, 当细胞长成单层后用 0.25% 胰酶 + 0.08% EDTA 消化(37℃, 5min)传代, RPMI 1640 + 10% NBS 培养。

1.2.3 胎儿胰岛样细胞团源上皮样细胞(HFIECs)的纯化与扩增:胎儿胰岛样细胞团单层培养的细胞

传代4d后可见许多呈克隆样生长的上皮样细胞片,成纤维细胞则散在生长。继续培养3d,上皮样细胞迅速生长,有逐渐与成纤维细胞相交的趋势。此时,用玻璃针将上皮样细胞片挑出,接种于明胶包被过的玻璃皿中, RPMI1640 + 10% NBS 培养。当细胞长至80%融合时,用0.25%胰酶 + 0.08% EDTA 消化(37℃, 5min)传代扩增。

1.2.4 HFIECs 细胞生长曲线绘制测定:取生长状态良好的第13代细胞,将其按每孔 2×10^3 个接种到96孔板中,每孔培养液200 μ L,共6组,每组3个孔,连续培养6d,每2天换液1次。每天各取3孔,分别加入MTT溶液(5g/L)20 μ L, 37℃继续孵育4h后,吸去上清培养液终止培养。每孔加入150 μ L DMSO,轻微振荡10min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪上以490nm和630nm波长测定各孔光吸收值(OD值),求均值,以时间为横轴,光吸收值为纵轴,绘制细胞生长曲线。

1.2.5 HFIECs 的免疫组织化学染色检测:将第6代、11代、21代细胞分别接种于96孔板中,培养3d后吸出培养液, PBS洗3遍,每孔加200 μ L 4%多聚甲醛(pH7.4)固定15min, 3%双氧水封闭5~10min, PBS洗3min \times 3次;山羊血清封闭10~20min,甩干,不洗;分别滴加兔抗人PDX-1多克隆抗体(1:500, Chemicon), 鼠抗人CK-19单克隆抗体(1:50, Boster Biotechnology), 鼠抗人CK-7单克隆抗体(1:100, Antibody Diagnostica), 人细胞核增殖抗原(PCNA)单克隆抗体(1:2000, sigma), 鼠抗人Nestin多克隆抗体(1:500), 鼠抗Vimentin单克隆抗体(1:100, Santa Cruz Biotechnology), 鼠抗人Insulin单克隆抗体(1:40, Calbiochem)50 μ L/孔, 4℃过夜,加生物素化二抗,室温或37℃孵育20min, PBS洗5min \times 3次,滴加HRP各1滴,孵育20min, PBS洗5min \times 3次;DAB显色10~30min,镜下观察照相,阳性为红棕色。

1.2.6 HFIECs 的流式细胞仪检测:将第5代细胞,用0.25%胰酶 + 0.08% EDTA 消化(37℃, 5min),离心收集细胞,重新悬浮于1mL PBS中,吹打混匀,每只检测管中加100 μ L细胞悬液,然后加入FITC和PE标记的CD抗体(BECKMAN公司)各10 μ L, 10min后上流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 胰岛样细胞团获得与单层培养

胎儿胰腺组织经IV型胶原酶消化后,可得到单细胞和细胞团(块)。接种后单细胞和细胞块很快贴

壁呈单层生长,细胞团则贴壁较慢,有的大细胞团4d内仍保持悬浮。贴壁细胞很快平铺生长,有上皮样细胞和成纤维样,长满时光镜下观察则以成纤维样细胞为主。在生长过程中,平铺细胞能聚集并形成细胞团(胰岛样细胞团,ICC)(图1),DTZ染色阴性表明不含成熟的 β 细胞。将ICCs挑出置于新皿中进行贴壁培养,细胞从细胞团中有细胞游出呈单层生长(图2)。

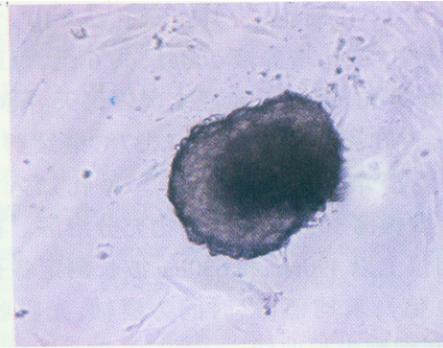


图1 平铺细胞聚集形成细胞团(100 \times)
Fig. 1 ICCs formed from monolayer cells aggregating(100 \times)



图2 细胞团贴壁培养第6天(100 \times)
Fig. 2 The 6th days of monolayer cultured ICC(100 \times)

2.2 HFIECs 纯化和扩增

细胞团单层培养8d后,胰酶消化传代,4d后可见散在的成纤维样细胞空隙间有呈克隆状生长的上皮样细胞片(图3)。用胰酶轻度处理后将上皮样细胞片挑出接种于新皿中继续培养,此时为纯的上皮样细胞(图4)。这些上皮样细胞增殖能力很强,传代后培养4d,细胞量可增加约4倍。传代前3d细胞生长较慢,第3~5天细胞迅速生长,之后进入平台期(图5)。现已传至40代。每代冻存 $10^6 \sim 10^8$ 个细胞。

2.3 HFIECs 检测

2.3.1 免疫组织化学检测:免疫组织化学染色检测表明,该上皮样细胞表达PDX-1、PCNA、CK-7、CK-19、Nestin、Glut2、Vimentin,不表达Insulin(图6)。



图3 上皮样细胞片(50 \times)
Fig. 3 Epithelial cells patch(50 \times)

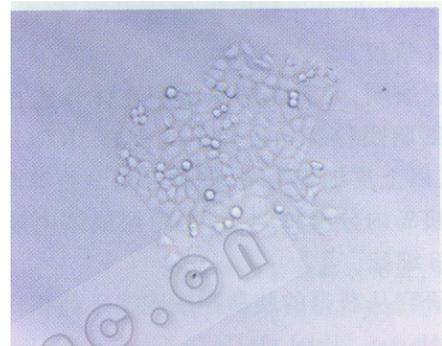


图4 纯化的上皮样细胞(100 \times)
Fig. 4 Purified epithelial cells(100 \times)

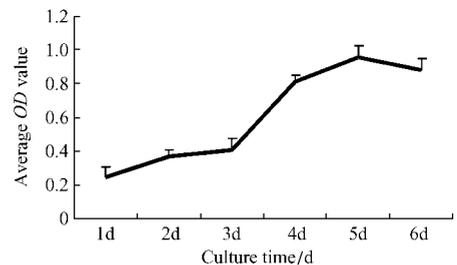


图5 HFIECs 生长曲线
Fig. 5 Growth curve of HFIECs

2.3.2 流式细胞仪检测:表达CD29、CD44、CD166,不表达CD11a、CD14、CD34、CD45、CD90、CD105、CD117(图7)。

3 讨论

Hayek等^[7-9]由人胎儿胰腺得到胰岛样细胞团(ICCs),DTZ染色弱阳性,经烟酰胺(NIC)、肝细胞生长因子(HGF)等诱导能使ICCs向胰腺内分泌细胞分化,将ICCs移植到裸鼠肾背膜下三个月后在其血液中能检测到人C肽,将ICCs移植到STZ诱导的糖尿病无胸腺大鼠肾背膜下,10~12周后大鼠血糖恢复到正常水平。这些结果提示ICCs中含有未分化的胰腺内分泌前体细胞或干细胞。他们的研究还发现ICCs中大部分细胞(>70%)是上皮样细胞,短期内贴壁培养时主要是这些上皮样细胞生长,若继续

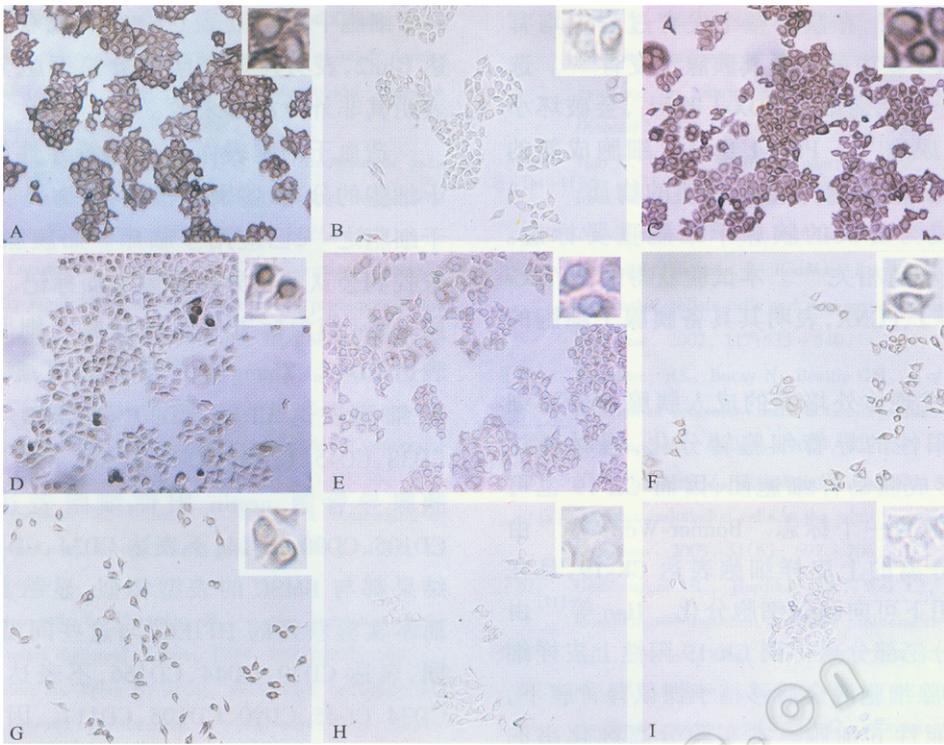


图 6 HFIECs 免疫组织化学染色结果(100×)

Fig. 6 Immunohistochemical staining in HFIECs(100×)

A : PDX-1 positive ; B : CK-19 positive ; C : CK-7 positive ; D : PCNA positive ; E : nestin positive ; F : Glut2 positive ; G : vimentin positive ; H : insulin negative ; I : control .

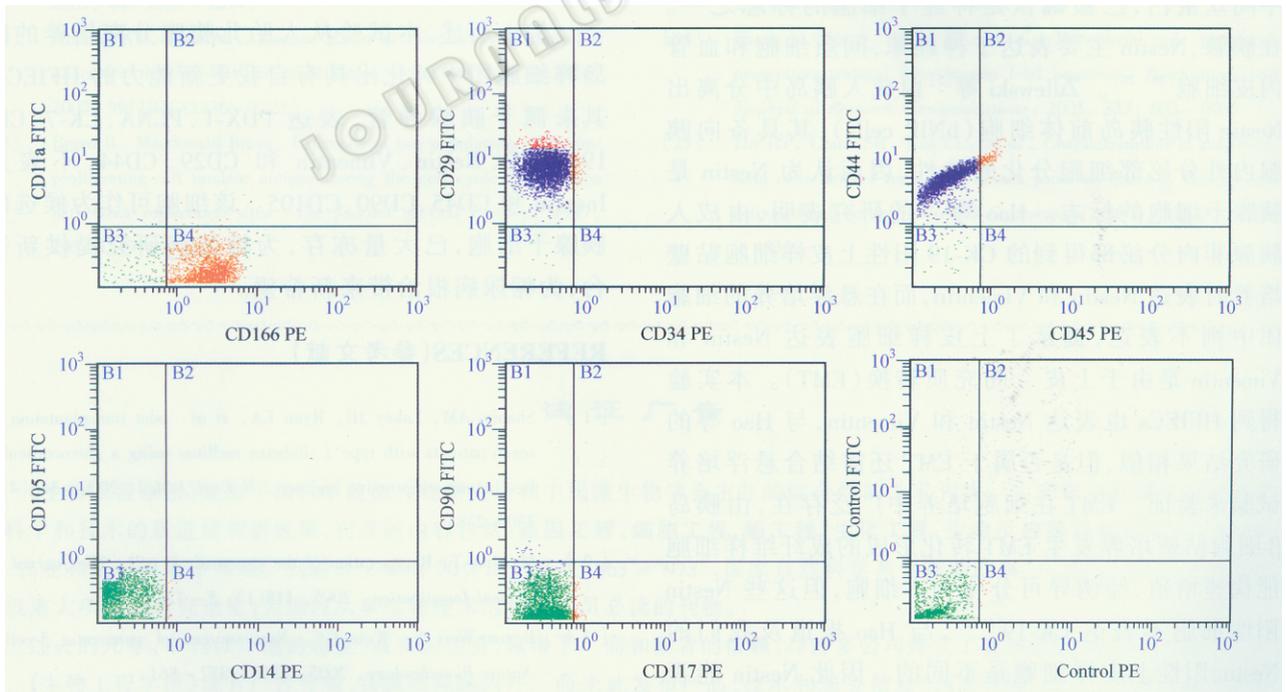


图 7 HFIECs 表面标记的流式细胞仪分析

Fig. 7 FACS analysis of the surface markers in HFIECs

CD29 ,CD44 , and CD 166 were positive ; CD11a , CD14 ,CD34 , CD45 , CD90 ,CD105 and CD117 were negative .

培养,成纤维细胞就会过度生长。本试验在这些研究的基础上加以改进,将 ICCs 贴壁培养,待上皮样细胞扩增后代传,上皮样细胞呈克隆样生长,挑出纯

化后继续传代扩增,可得到大量具备自我更新能力的上皮样细胞(HFIECs)。

PDX-1 是胰腺发育的关键基因,是调控胰岛素

表达的重要转录因子,在胰腺整个发育过程中均有重要作用。PDX-1 缺失的小鼠其胰腺不发育^[10]。选择性别除成年小鼠胰岛细胞 PDX-1 基因,会破坏小鼠胰岛,引发糖尿病^[11]。PDX-1 也是 β 细胞成熟的标志,是胰岛和腺泡细胞分化所必须的物质^[12-14]。PDX-1 目前已成为公认的胰腺干细胞重要标志。PCNA 则与细胞增殖相关^[15]。本试验获得的 HFIECs 稳定表达 PDX-1、PCNA,表明其具备胰腺干细胞的特性。

Gmyr 等^[16]发现体外培养的成人胰腺外分泌细胞能向 CK-19 阳性的导管细胞转分化,同时表达 PDX-1 并能够形成胰岛样细胞团,因而 CK-19 也可作为胰腺干细胞的一个标志。Bonner-Weirs 等^[4]由成人胰腺导管分离的上皮样细胞表达 CK-19,且在细胞外基质作用下可向胰岛细胞分化。Hao 等^[17]由成人胰腺非内分泌部分离得到 CK-19 阳性上皮样细胞,其与胎儿胰腺细胞混合后移植于裸鼠肾背膜下,能分化成为功能性 β 细胞。本实验分离纯化出的 HFIECs 除表达 CK-19 外,还表达其他上皮细胞标志如 CK-7,这充分表明了其上皮来源。

Nestin 是在神经干细胞中发现的一种高分子量中间丝蛋白,已被确认是神经干细胞的标志之一。在胰腺,Nestin 主要表达于神经原,间质细胞和血管内皮细胞^[18-20]。Zulewski 等^[5]由成人胰岛中分离出 Nestin 阳性胰岛前体细胞(hNIP cells),其具备向胰腺内外分泌部细胞分化的特性,因而认为 Nestin 是胰腺干细胞的标志。Hao 等^[17]的研究表明,由成人胰腺非内分泌部得到的 CK-19 阳性上皮样细胞贴壁培养时表达 Nestin 和 Vimentin,而在悬浮培养的细胞团中则不表达,提示了上皮样细胞表达 Nestin 和 Vimentin 是由于上皮-间充质转换(EMT)。本实验得到 HFIECs 也表达 Nestin 和 Vimentin,与 Hao 等的研究结果相似,但是否属于 EMT 还需结合悬浮培养试验来验证。EMT 在细胞培养中广泛存在,由胰岛 β 细胞贴壁培养发生 EMT 转化形成的成纤维样细胞能快速增殖,经诱导可分化为 β 细胞,但这些 Nestin 阳性细胞不表达 CK-19^[5,21],与 Hao 报道及我们的 Nestin 阳性上皮样细胞是不同的。因此 Nestin 能否作为胰腺干细胞标志仍需更进一步的研究。

Pang 等^[22]发现大鼠 11d 胎龄时其胰腺原基就表达 Glut2,在随后形成的背侧和腹侧胰芽及其分支形成的导管细胞中持续表达,其中分化成外分泌部的细胞(表达胰淀粉酶)停止表达 Glut2;而共表达 Glut2 和胰岛素的细胞可聚集形成胰岛,最后在成熟

的 β 细胞中仍持续表达。本研究获得的 HFIECs 表达 Glut2,表明其具有向内分泌细胞分化的潜能,也表明其非外分泌部来源。

造血干细胞表面具有的特异性标记,便于造血干细胞的分离、鉴别和检测,成为目前研究最清楚的干细胞之一,已应用于临床。而胰腺干细胞至今仍未找到公认的特异性细胞表面标记。Shzuki 等^[23]应用 c-Met 作为标志分离出胰腺干细胞,这些细胞不表达 CD45。Zhang 等^[24]研究表明,胰岛样细胞团源 SP 细胞表达 CD44、CD90 和 CD14,不表达 CD34、CD38、CD45、CD117、CD133;Lin 等^[25]研究发现成人胰腺导管源 nestin 阳性细胞表达 CD29、CD44、CD105、CD90、CD14,不表达 CD34、CD45、CD133,这些结果都与 BMSC 的表型相似,显示其为间质来源。而本实验获得的 HFIECs 与这些间质来源的细胞不同,表达 CD29、CD44、CD166,不表达 CD11a、CD14、CD34、CD45、CD90、CD105、CD117。因此,表达 CD29、CD44,不表达 CD45 可能是人胰腺细胞的共同特征;而不表达 CD90 和 CD105 则可能是本实验获得的 HFIECs 区别于间质源细胞的特征。这将为胰腺干细胞的流式细胞仪分选和鉴定提供新依据。

综上所述,本试验从人胎儿胰腺分离培养的胰岛样细胞团中纯化出具有自我更新能力的 HFIECs,其来源于胰腺导管,表达 PDX-1、PCNA、CK-7、CK-19、Glut2、Nestin、Vimentin 和 CD29、CD44,不表达 Insulin 和 CD45、CD90、CD105。该细胞可作为候选的胰腺干细胞,已大量冻存,为糖尿病研究提供新平台,为糖尿病根治带来新希望。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 2000, **343**(4): 230-238.
- [2] Massimo T. Regeneration of the pancreatic β cell. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, **115**(1): 5-12.
- [3] Bonner-Weir S, Weir GC. New sources of pancreatic β -cells. *Nature Biotechnology*, 2005, **23**(7): 857-861.
- [4] Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, et al. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(14): 7999-8004.
- [5] Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, et al. Multipotential nestin-positive stemcells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and

- [6] Lechner A, Nolan AL, Blacken RA, *et al.* Redifferentiation of insulin-secreting cells after *in vitro* expansion of adult human pancreatic islet tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, **327**: 581 – 588.
- [7] Otonkoski T, Besttie GM, Mally MI, *et al.* Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. *J Clin Invest*, 1993, **92**(9): 1459 – 1466.
- [8] Besttie GM, Levine F, Mally MI, *et al.* Acid-galactosidase: a developmentally regulated marker of endocrine cell precursors in the human fetal pancreas. *J Clin Endocrinology Metabolism*, 1994, **78**(5): 1232 – 1240.
- [9] Otonkoski T, Cirulli V, Beattie GM, *et al.* A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in fetal mesenchyme-induced pancreatic β -cell growth. *Endocrinology*, 1996, **137**(7): 3131 – 3139.
- [10] Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. IPF-1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J*, 1993, **12**(11): 4251 – 4259.
- [11] Dutta S, Bonner-weir S, Moutminy M, *et al.* Regulatory factor linked to late-onset diabetes? *Nature*, 1998, **392**(6676): 560.
- [12] Dutta S, Cannon M, Peers B, *et al.* PDX :PBX complexes are required for normal proliferation of pancreatic cells during development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(3): 1065 – 1070.
- [13] McKinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox 1, PDX 1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia*, 2001, **44**: 1203 – 1214.
- [14] Holland AM, Hale MA, Kagami H, *et al.* Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(19): 12236 – 12241.
- [15] Bravo R, Macdonald-Bravo. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *The Journal of Cell Biology*, 1987, **105**: 1549 – 1554.
- [16] Gmyr V, Kerr-Conte J, Belaich S. Adult human cytoke-
ratin 19-positive cells reexpress insulin promoter factor 1 *in vitro*: further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in humans. *J Diabetes*, 2000, **49**(10): 1671.
- [17] Hao E, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, *et al.* Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelia cells of the adult human pancreas. *Nature medicine*, 2006, **12**(3): 310 – 316.
- [18] Lardon J, Rooman I, Bouwens L, *et al.* Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Biol*, 2002, **117**: 535 – 540.
- [19] Humphrey RK, Bucay N, Beattie GM, *et al.* Characterization and isolation of promoter-defined nestin-positive cells from the human fetal pancreas. *Diabetes*, 2003, **52**: 2519 – 2525.
- [20] Klein T, Ling Z, Heimberg H, *et al.* Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas. *J Histochem Cytochem*, 2003, **51**(6): 697 – 706.
- [20] Gershengom MC, Hardikar AA, Wei CJ, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science*, 2004, **306**: 2261 – 2264.
- [22] Pang K, Mukonoweshuro C, Wong GC. Beta cells arise from glucose transporter type 2 (Glut2)-expressing epithelial cells of the developing rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 9559 – 9563.
- [23] Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes*, 2004, **53**: 2143 – 2152.
- [24] Zhang L, Hu J, Hong TP, *et al.* Monoclonal side population progenitors isolated from human fetal pancreas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, **333**: 603 – 608.
- [25] Lin HT, Chiou SH, Kao CL, *et al.* Characterization of pancreatic stem cells derived from adult human pancreas ducts by fluorescence activated cell sorting. *World J Gastroenterol*, 2006, **12**(28): 4529