

胰腺十二指肠同源框-1 基因促进大鼠骨髓间充质干细胞分化为胰岛样细胞*

孙吉平 杨于嘉 王晓莉 宋建辉 贾延劼**

(中南大学湘雅医院儿科 长沙 410008; 郑州大学第一附属医院神经内科 郑州 450052)

摘要 虽然骨髓间充质干细胞(BMSCs, bone marrow mesenchymal stem cells)具有极强的自我更新能力及多向分化潜能, 但最近发现其体外分化为胰腺内分泌细胞的效率并不高, 不能产生足够用于移植的胰岛样细胞. 胰腺十二指肠同源框-1 基因(*Pdx-1*, pancreatic duodenal homeobox-1)在胰腺胚胎发育和胰岛素基因表达调控方面均具有重要作用, 因此构建含有*Pdx-1* 的真核表达载体, 并使用新型纳米介质Superfect介导重组载体转染BMSCs, 研究*Pdx-1* 表达在BMSCs体外分化为胰岛样细胞中的作用. 结果表明, 转染重组载体后(*Pdx-1*⁺ BMSCs)分化为胰岛素阳性细胞比例为(28.23±2.56)%, 较转染空白载体和未转染组(*Pdx-1*⁻ BMSCs)明显增多(分别为(7.08±2.69)%和(4.59±3.02)%); 细胞免疫化学染色显示诱导后细胞表达胰岛素、胰高血糖素和生长抑素蛋白, 而且*Pdx-1*⁺ BMSCs诱导后表达明显增加, 与Western blotting和RT-PCR结果相似; 葡萄糖诱导的胰岛素分泌量测定显示*Pdx-1*⁺ BMSCs对不同浓度葡萄糖有不同的胰岛素分泌, 25 和 5.5 mmol/L葡萄糖刺激后胰岛素分泌量分别为(115.29±2.56)和(56.61±4.82) μU/mL, 明显高于*Pdx-1*⁻ BMSCs分泌量(分别为(53.26±7.56)和(25.53±6.49) μU/mL). *Pdx-1*⁺ BMSCs分化的细胞同种异体移植后可以恢复糖尿病模型大鼠的血糖水平, 移植物平均存活时间(30.5±15.7)天. 本试验提示大鼠BMSCs体外能分化为胰岛样细胞; *Pdx-1* 能显著增强上述分化能力; BMSCs体外分化的胰岛样细胞移植能改善STZ糖尿病大鼠的生存状态. 这将为糖尿病的治疗提供一条新的途径.

关键词 骨髓 间充质干细胞 胰岛 *Pdx-1* 糖尿病

胰岛移植为糖尿病治疗带来了曙光, 理论上胰岛移植成功后不但能有效的控制血糖, 而且可以恢

复胰岛正常的生理功能, 维持血糖内环境稳定, 从根本上提高I型糖尿病患者的生活质量. 但是经过多年

收稿日期: 2005-05-29; 接受日期: 2005-11-18

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 30200128)

** 联系人, E-mail: jiayanjie2002@yahoo.com.cn

的临床应用, 胰岛移植并没有达到预期的治疗效果, 主要原因在于: (i) 供体数量极其有限; (ii) 胰岛移植物的质量和数量难于控制; (iii) 移植免疫排斥反应^[1]; (iv) 胰岛移植并不能延缓自身免疫反应的进展^[2]. 如何解决这些问题, 尤其是移植物的问题, 成为提高胰岛移植, 甚至细胞移植成功率的关键. 随着干细胞技术的发展, 定向诱导胚胎干细胞分化为胰岛成为研究热点之一^[3-5], 但胚胎干细胞培养和建系是比较困难的, 而且即使建立了胚胎干细胞系, 甚至定向诱导分化了足够的胰岛, 对于移植受体来说, 只能提供同种异体的移植, 免疫排斥的问题没有实质性解决^[6]. 因此, 寻找新的 β 细胞来源势在必行.

骨髓间充质干细胞(BMSCs, bone marrow mesenchymal stem cells)具有极强的自我更新能力及多向分化潜能^[7-10]. 最近研究显示, 骨髓移植后能促进受体糖尿病鼠胰腺组织增生, 改善小鼠生存率^[11,12]. 更有研究发现, BMSCs体外能横向分化为产生胰岛素的细胞, 表达多种胰岛 β 细胞发育和功能相关的基因^[13-15]. 虽然BMSCs向内分泌系统的研究已经取得了上述成就, 但是其体外分化为胰岛效率低, 胰岛素分泌量低, 远远不能满足移植治疗糖尿病的需要^[16], 如何提高其体外分化效率是困扰人们的难题.

胰腺十二指肠同源框-1 基因(*Pdx-1*, pancreatic duodenal homeobox-1)能调节多种 β 细胞功能相关基因表达, 对胰腺器官发生和胰岛个体发育均具有重要作用^[17,18]. 将 *Pdx-1* 基因转染某些非胰岛 β 细胞(如肝细胞、小肠上皮细胞)后, 这些细胞可以产生胰岛素^[19,20]. 在胚胎干细胞中调控*Pdx-1* 表达能调节胰岛相关基因表达^[21], 如果能获得大量有生物活性的*Pdx-1* 基因转染BMSCs, 可能会提高BMSCs体外诱导分化的定向性, 增加诱导效率从而提供足量的供移植胰岛细胞. 一方面, 分离患者自身BMSCs进行诱导分化产生胰岛细胞进行自体移植可避免移植排斥反应; 另一方面, 骨髓移植可诱导微嵌合性, 延缓自身免疫反应的进展, 从根本上解决1型糖尿病的问题^[16], 这将在糖尿病细胞治疗中具有重要意义. 因此, 本研究将在成功构建含有*Pdx-1* 基因的真核表达载体的基础上, 探讨*Pdx-1* 基因表达在BMSCs体外分化为胰岛样细胞中的作用, 并观察BMSCs对STZ糖尿病大鼠

的治疗作用.

1 材料和方法

1.1 材料

PCR扩增试剂盒, DNA片段纯化试剂盒, 电泳凝胶回收试剂盒, 限制性内切酶*Bgl* , *Hind* , T₄DNA连接酶, cDNA第一链合成试剂盒, 质粒提取纯化试剂盒和电泳凝胶回收试剂盒购自Promega公司; 引物由上海博亚生物工程有限公司合成; Trizol, Superfect购自Invitrogen公司; DMEM培养基、B₂₇购自 Gibaco公司; 胎牛血清购自Hyclone公司; 人表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、角质化细胞生长因子(KGF)购自Pepro Tech EC公司; 烟酰胺、黄体素购自Sigma公司; 胰岛素ELISA试剂盒购自Diagnostic system lab公司.

主要抗体: 小鼠抗大鼠胰岛素、胰高血糖素和生长抑素抗体购自 Neomarks 公司; 山羊抗鼠 *Pdx-1* 购自 Santa Cruz 公司; 二抗购自 Sigma 公司.

胰岛细胞瘤细胞株购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC); 大肠杆菌DH5 α 和pEGFP-C₂质粒由本校肿瘤研究所惠赠(该质粒含有EGFP序列, 卡那霉素抗性).

实验动物选择成年近交封闭群 SD 大鼠(清洁级), 经中南大学实验动物部提供使用.

1.2 方法

(1) 大鼠BMSCs分离、培养和扩增: 参照Tang等人^[16]报道的方法, 简述如下: 无菌条件下分离大鼠股骨、胫骨(SD大鼠, 3~4周龄), 用5 mL DMEM(L)培养液冲出骨髓, 通过1.073 g/mL Percoll分离液离心 30 min获取单个核细胞. 洗涤后计数, 以 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ cm⁻²密度种植, 培养介质为低糖DMEM+10% FBS+2 mmol/L L-谷氨酰胺+1%青霉素+链霉素; 3天后逐步半量换液, 隔日一次. 待贴壁细胞融合后按 1×10^4 mL⁻¹的密度传5代以上进行诱导实验.

(2) 含有 *Pdx-1* 基因的真核表达载体的构建: 据大鼠 *Pdx-1* mRNA GenBank(NM_022852)已知序列在阅读框架两侧设计引物: 上游 5'-CGGAGATCTATGAATAGTGAGGAGCAGTAC-3'; 下游 5'-TAATAA-

GCTTCCGGGGTTCCTGCGGTCGCAG-3'。其中上游引物含有 *Bgl* 酶切位点AGATCT以及起始密码子AGT, 下游引物含有 *Hind* 酶切位点AAGCTT。Trizol方法提取胰岛细胞瘤细胞株细胞总RNA, 经RT-PCR合成Pdx-1基因, *Bgl* 和 *Hind* 进行双酶切, 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离纯化; pEGFP-C₂质粒扩增后收获细菌, 按照质粒提取试剂盒说明提取质粒, *Bgl* 和 *Hind* 双酶切后 1%琼脂糖凝胶电泳分离纯化。

在无菌 Eppendorf 管内进行双酶切后的目的基因和空白载体的连接体系, 混合离心后 4 过夜。连接完成后种板, 挑取 40 个菌落, 随机选择 7 个克隆接种 5 mL LB(含卡那霉素 40 μg/mL)培养基中进行扩增, 小量提取质粒后进行酶切分析以及序列测定(由 Takara 公司协助进行)。正确重组的克隆大量扩增后进行大规模抽提, 定量后用于细胞的转染。

(3) 细胞转染: 参照 Superfect说明书操作进行。转染前, 第 5 代以上的BMSCs定量后传代接种于 12 孔板(板内覆有盖玻片)中, 常规培养 24 h达到 60%~70%融合时准备转染。2 μg重组质粒(TE溶解)加入 DMEM培养基, 总体积 250 μL, 混匀。加入 8 μL Superfect转染试剂(预实验示最佳配比为 1:4), 振荡 10 s; 常温孵育 10 min后加入 1 mL DMEM培养基(10%标准胎牛血清, 1%青霉素-链霉素), 轻振荡 2次; PBS洗涤细胞后加入混合转染介质 37 °C, 5% CO₂培养 3 h; PBS洗涤后换用正常DMEM培养基(10%标准胎牛血清, 1%青霉素-链霉素), 37 °C, 5% CO₂培养 24 h后荧光显微镜观察转染效率, 同时MTT检测转染后细胞存活率。G418 筛选阳性细胞(500 mg/L的G418 培养 6天后换用 200 mg/L G418 培养, 阳性克隆形成后继续培养或传代); Western blotting检测Pdx-1 基因表达; 阳性细胞进行随后的诱导分化。

(4) 诱导分化: 参考 Moritoh 等人^[22]的方法。Pdx-1⁺ BMSCs以 1×10⁵密度种植到含有 10%胎牛血清 DMEM 的培养瓶或培养板内(涂有Matrigel)培养 2 天(1期); 换用无血清培养基(L-DMEM+2% B₂₇)继续培养 2 天(2期); 存活细胞种植到含有激素混合物的培养基内(含有 25 μg/mL胰岛素+100 μg/mL转铁蛋白+20 nmol/L黄体素+10 ng/mL KGF+20 ng/mL EGF+25

ng/mL bFGF+10 ng/mL烟酰胺+2% B₂₇)培养 6~8 天(3期); 第 4 阶段扩增细胞重新种植到没有bFGF, EGF和 KGF的介质中继续培养 6~8 天(含有 10 ng/mL烟酰胺+2% B₂₇+LY294002)(4期)。未转染的细胞(Pdx-1⁻ BMSCs)、转染空白载体的BMSCs同样进行上述诱导实验作为对照。

(5) 诱导后细胞鉴定:

(i) 流式细胞术检测胰岛素阳性细胞: 胰酶消化细胞制成单细胞悬液 1200 × g 离心 5 min; 加 4%的多聚甲醛溶液固定细胞 15 min; 0.3%的 Triton-X-100 处理 5 min; 0.5%的牛血清白蛋白封闭 5 min; 抗胰岛素的单克隆抗体 4 过夜, 1200 × g 离心 5 min; FITC 标记的二抗室温孵育 30 min, 1200 × g 离心 5 min; 适量 PBS 溶液重悬细胞, 流式细胞仪检测。

(ii) 细胞免疫化学染色检测诱导后细胞胰岛素、胰高血糖素和生长抑素的表达: 诱导后第四期细胞经 4%多聚甲醛固定, 用 0.5% H₂O₂-甲醇处理 30 min, 1%牛血清白蛋白-0.3%Triton-X100 37 °C 处理 30 min, 加入一抗(1:100), 4 °C 孵育过夜再加入相应二抗, DAB显色。阴性对照将一抗换用PBS, 其余步骤相同。

(iii) RT-PCR检测诱导后细胞胰岛素、胰高血糖素和生长抑素mRNA表达: 引物和PCR反应条件参见 Yang等人^[23]报道的方法。胰岛素: 上游 5'-GCTA-CAATCATAGACCATC-3', 下游 5'-GGCGGGGAGT-GGTGGACTC-3', 片段长度 350 bp; 胰高血糖素: 上游 5'-TTAGCAAGTGGGTCTGCAAT-3', 下游 5'-GG-TGTAGTCC TACTCATG-3', 片段长度 343 bp; 生长抑素: 上游 5'-GTGGTGCTTTTGTAGACCCGTT-3', 下游 5'-TTCGATGAAGGTGATTCGCA-3', 片段长度 340 bp; β-actin: 上游 5'-ACACTGTGCCCATCTA-GGAGG-3', 下游 5'-AGGGGCCCGACACGTCATAC-CT-3', 片段长度 621 bp。Trizol试剂提取细胞总RNA, 定量后进行RT-PCR扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测。

(iv) Western blotting 检测诱导后细胞胰岛素、胰高血糖素和生长抑素蛋白的表达: 提取第四期全细胞蛋白, BCA法进行定量, 取 100 μg 蛋白与加样缓冲液混合, 100 °C 变性 5 min, 用 12% SDS-PAGE 胶电泳分离, 电转移至硝纤膜, 膜在胰岛素、胰高血糖素和生长抑素抗体中孵育 12~16 h, 二抗孵育 2 h, DAB 显

色检测棕黄色条带. 用 α -tublin 作为内对照进行二次曝光. 结果转膜后丽春红染色进行校正.

(v) 分化细胞的功能检测(诱导第四期细胞): 吸出 6 孔板中培养细胞的原有培养基, 用无血清的高糖的 DMEM(25 mmol/L)或低糖的 DMEM(5.5 mmol/L)培养基清洗 3 遍, 每孔中加入 1 mL 高糖的 DMEM 或低糖的 DMEM 培养 2 h, 收集条件培养基, 过滤, ELISA 试剂盒测定条件培养基中胰岛素的浓度.

(6) 同种异体移植对糖尿病大鼠的影响:

(i) 糖尿病模型的建立: 选用成年健康近交纯种封闭群 SD 大鼠 60 只, 雌雄各半. 经尾静脉注射链脲佐菌素(STZ)70 mg/kg, 一周内连续 2 次, 间隔至少 2 天测尾静脉血糖, 均超过 22.2 mmol/L 为糖尿病模型, 在专用代谢笼内饲养.

(ii) 实验分组: 随机分为正常对照组 6 只, 假手术组 6 只, STZ 组 44 只, 此外 3 只模型失败, 1 只死于酮症酸中毒. STZ 组又分为 STZ 对照组 6 只(不移植), STZ 假手术组 6 只, 移植组 32 只.

(iii) 同种异体移植: 将诱导第四期末的产生胰岛素的细胞移植到糖尿病大鼠肾包膜下, 约 2×10^6 细胞/只.

(iv) 效果观察: 术后第一周内每天上午 9:00~11:00, 以后每周 2 次在同样时间采尾静脉血, 微量血糖仪监测(Roche)血糖变化.

1.3 统计分析

数据处理采用 SPSS 统计软件包. 结果均数以 $\bar{x} \pm SD$ 表示, 两组间均数比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结果

2.1 大鼠 BMSCs 细胞的培养

刚接种的细胞种类较多, 3 天换液后可见散在分布的梭形细胞, 随着培养时间延长, 贴壁细胞明显增多, 并分裂增殖. 培养 7~8 天, 细胞以贴壁生长的 BMSCs 细胞为主, 呈漩涡状排列; 经 3~4 次传代后, 形成较典型的 BMSCs(图 1).

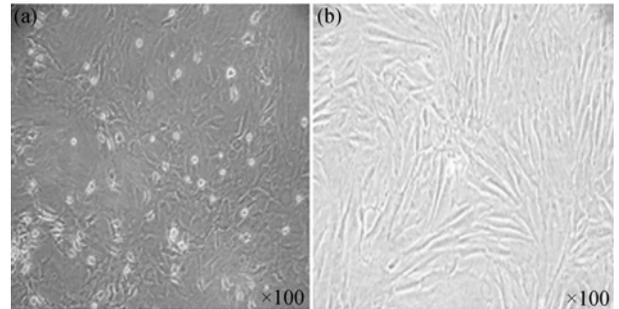


图 1 骨髓 MSCs 体外培养
(a) 原代第 8 天; (b) P4 代第 3 天

2.2 重组载体的构建

重组载体经 *Bgl* 和 *Hind* 双酶切, 可见一条 850 bp 目的基因片段以及一条 4.3 kb 的载体片段, 表明 *Pdx-1* 基因片段已被成功的插入到 pEGFP_{C2} 载体中(图 2); 双向测序结果连接后, 与 GenBank 公布序列的相应部分相符.

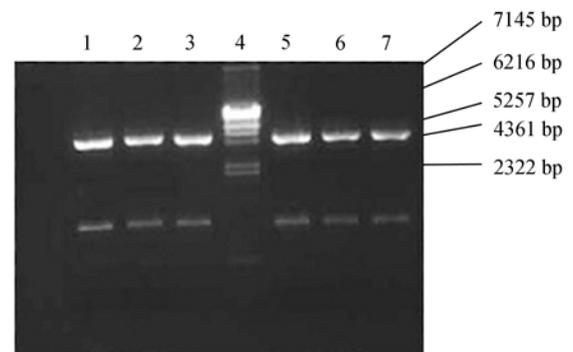


图 2 含有 *Pdx-1* 的重组载体经过 *Bgl* 和 *Hind* 双酶切后琼脂糖凝胶电泳
4 示分子量标记物 Marker; 1~3 和 5~7 示经过双酶切的重组载体

2.3 转染后细胞 *Pdx-1* 表达

pEGFP-C₂ 含有绿色荧光蛋白基因, 转染成功后细胞可以表达绿色荧光蛋白(GFP). 转染 24 h, 荧光显微镜下可见强弱不等的黄绿色细胞; 经 G418 筛选后, 未转染成功的细胞脱落、死亡, 转染成功的细胞 14 天后仍有 GFP 表达(图 3).

Western blotting 结果也提示, 转染前 BMSCs 无

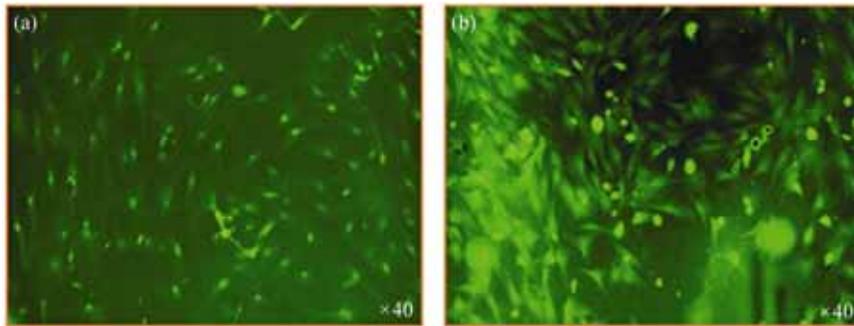


图3 荧光显微镜观察重组载体转染

(a) 转染后 24 h; (b) 转染后 14 天

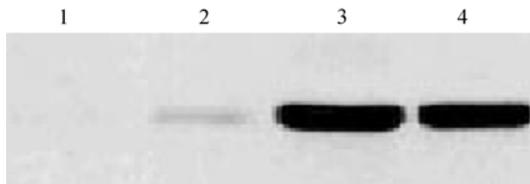


图4 Western blotting 观察重组载体转染 BMSCs 后 Pdx-1 蛋白表达

1 示转染前; 2 示转染后 24 h; 3 示转染后 6 天; 4 示转染后 14 天

Pdx-1 表达, 转染后细胞出现 Pdx-1 蛋白(图 4)。

2.4 诱导分化情况

诱导分化后, 第二阶段部分细胞胞体收缩成锥形, 形成细长突起, 立体感强, 有些细胞周围有光晕, 个别细胞脱落、死亡; 第三阶段, 细胞数目增加; 第四阶段, bFGF 等生长因子撤除后, 细胞聚集成团, 形成胰岛样细胞团状结构。

2.5 诱导后细胞鉴定

(1) 流式细胞仪检测胰岛素阳性细胞: 重组载体转染 BMSCs 后进行诱导分化胰岛素阳性细胞比例为 $(28.23 \pm 2.56)\%$, 转染空白载体和未转染的 BMSCs 诱导分化后胰岛素阳性细胞比例分别为 $(7.23 \pm 1.56)\%$ 和 $(4.08 \pm 2.69)\%$, 组间比较 $P < 0.01$; 显示重组载体转染后 BMSCs 分化为胰岛素阳性细胞比例较高。

(2) 免疫细胞化学染色: 诱导前 BMSCs 不表达胰岛各细胞的标记物, 如胰岛素、胰高血糖素和生长抑素等。诱导后, 在细胞团块中央出现胰岛素阳性细胞, 伴随在边缘区域, 出现数量不等的胰高血糖素、生长

抑素阳性细胞; $Pdx-1^+$ BMSCs 组分化为胰岛素阳性细胞比例 $Pdx-1^-$ BMSCs 组明显增多(图 5)。

(3) RT-PCR 检测诱导后胰岛素、胰高血糖素和生长抑素 mRNA 表达: 诱导前细胞不表达胰岛素、胰高血糖素和生长抑素蛋白 mRNA, 诱导后出现表达, 且 $Pdx-1^+$ BMSCs 组表达明显增多(图 6)。

(4) Western blotting: 诱导前细胞不表达胰岛素、胰高血糖素和生长抑素蛋白, 诱导后出现表达, 且 $Pdx-1^+$ BMSCs 表达上述蛋白明显增多(图 7)。

(5) 分化后细胞的功能检测: $Pdx-1^+$ BMSCs 诱导分化后的细胞显示出对不同葡萄糖浓度的胰岛素分泌, 5.5 mmol/L 浓度的葡萄糖刺激后条件培养基中胰岛素浓度为 $(56.61 \pm 4.82) \mu\text{U}/\text{mL}$, 25 mmol/L 浓度的葡萄糖刺激后条件培养基中胰岛素浓度为 $(115.29 \pm 2.56) \mu\text{U}/\text{mL}$; $Pdx-1^-$ BMSCs 对葡萄糖刺激后也有一定程度的胰岛素分泌, 但较 $Pdx-1^+$ BMSCs 明显降低, 分别为 (25.53 ± 6.49) 和 $(53.26 \pm 7.56) \mu\text{U}/\text{mL}$ 。作为空白对照的无血清培养基中胰岛素浓度为 $(3.56 \pm 0.73) \mu\text{U}/\text{mL}$ 。

(6) $Pdx-1^+$ BMSCs 诱导后细胞同种异体移植治疗大鼠糖尿病: 正常对照组血糖在 4.0 mmol/L 左右波动; 假手术组在术后第 1 天血糖有所升高, 但是 4~5 天降至正常; STZ 组在注射 STZ 后血糖显著升高, 维持在 23~27 mmol/L; STZ 假手术组血糖没有降低的趋势; 移植组移植产生胰岛素的细胞后血糖迅速降低, 术后 24 h 平均血糖值 $(11.7 \pm 2.4) \text{mmol}/\text{L}$, 术后第 3 天平均血糖值 $(10.7 \pm 3.6) \text{mmol}/\text{L}$, 同时症状得以改善, 但是随着时间延长, 血糖逐渐上升, 术后第 21 天平均血糖值 $(15.4 \pm 6.3) \text{mmol}/\text{L}$, 显著高于术后第 1 和第 3

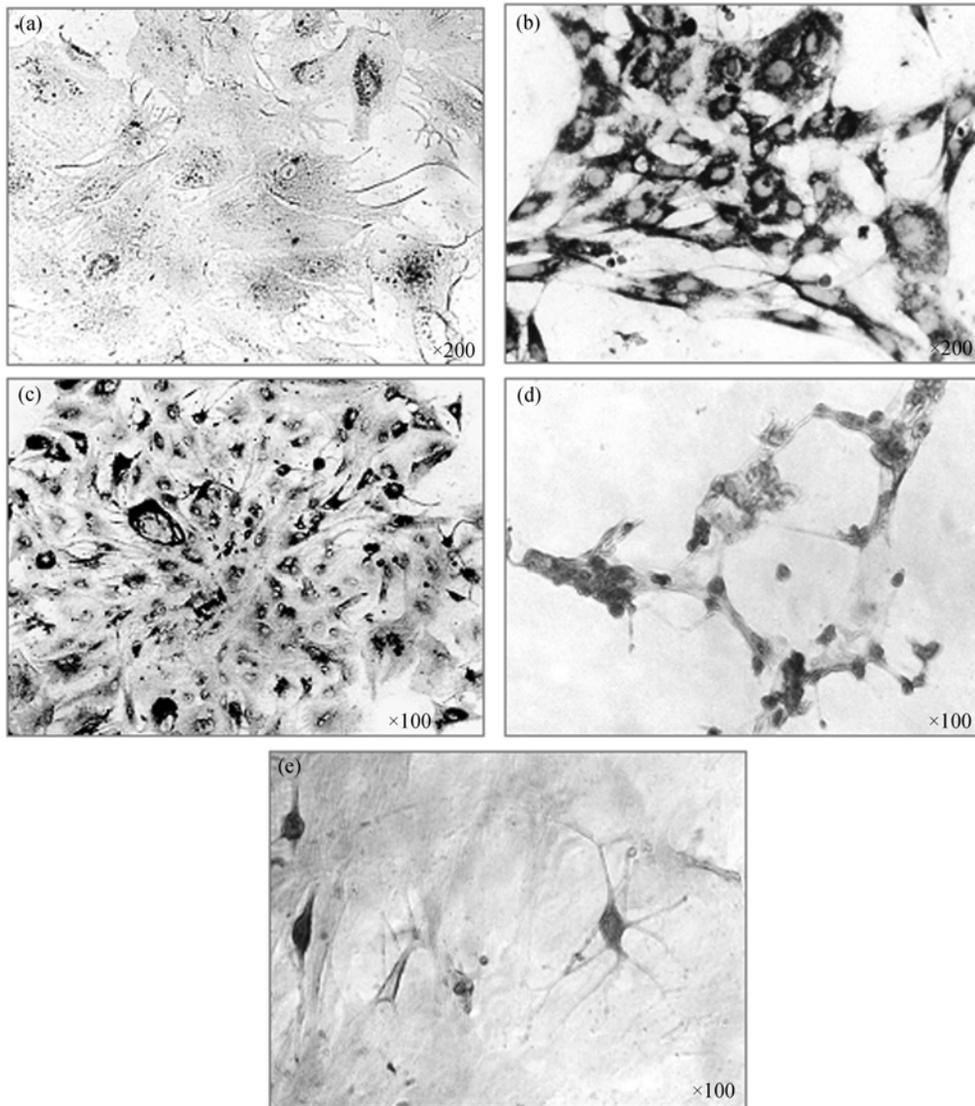


图 5 免疫化学检测诱导后胰岛相关蛋白表达

(a) $Pdx-1^{-}$ BMSCs 组胰岛素表达; (b) 和 (c) $Pdx-1^{+}$ BMSCs 组胰岛素表达; (d) $Pdx-1^{+}$ BMSCs 组胰高血糖素表达; (e) $Pdx-1^{+}$ BMSCs 组生长抑素表达

天的平均血糖值 ($P < 0.05$), 术后第 42 天平均血糖值超过 22.2 mmol/L. 此外, 按照移植物存活的标准, 50% 的动物术后 24 h 血糖值 < 11.1 mmol/L, 存活时间为 9~58 天, 平均 (30.5 ± 15.7) 天 (图 8).

3 讨论

细胞/基因治疗技术是医学领域、甚至是整个生命领域中的研究热点和前沿, 为人类征服多种疾病提供了新的途径和希望, 其中一个关键问题是选择

满足要求和易于操作的靶细胞. BMSCs 的可获得性、可扩增性及多向分化性为人们展示了良好的研究和应用前景, 但是其体外分化为胰岛效率低, 胰岛素分泌量低, 远远不能满足移植治疗糖尿病的需要. *Pdx-1* 基因是胰腺内分泌细胞发育的主要调控基因, 在胰腺生长发育过程中具有重要双重功能: 胚胎发育过程中促进胰腺的早期发育和晚期 β 细胞分化; 成体中维持 β 细胞的正常形态和功能. 此外, *Pdx-1* 是胰腺多基因网络调控的中枢基因, 从上游调控胰腺的激

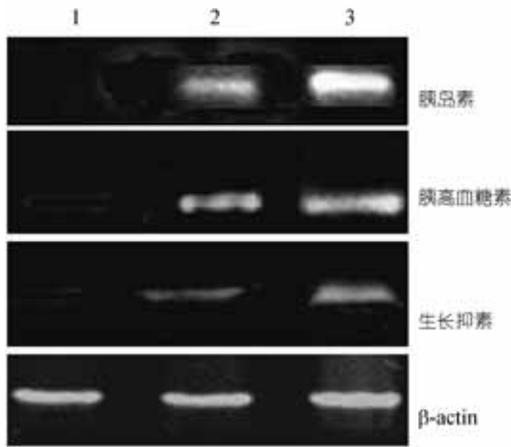


图 6 RT-PCR 检测诱导后胰岛素、胰高血糖素和生长抑素 mRNA 表达
1 示诱导前; 2 示 *Pdx-1*⁻ BMSCs 组; 3 示 *Pdx-1*⁺ BMSCs 组

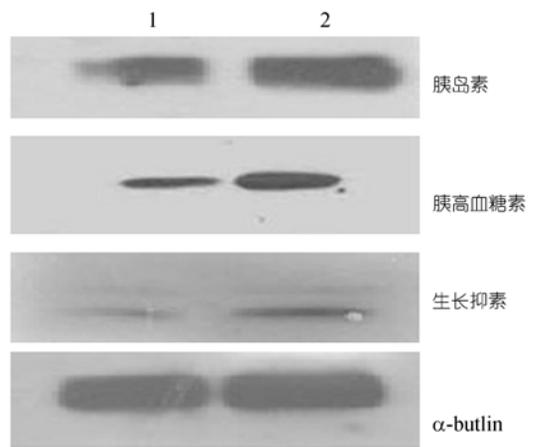


图 7 Western blotting 检测诱导后胰岛相关蛋白表达
1 示 *Pdx-1*⁻ BMSCs 组胰岛相关蛋白表达; 2 示 *Pdx-1*⁺ BMSCs 组胰岛相关蛋白表达

素分泌功能; 同时作为转录调控因子之一, 从下游直接影响胰岛素的分泌和表达水平. 由于干细胞诱导分化为β细胞的基本原理即启动干细胞中 *Pdx-1* 基因的表达, 使细胞原有形态发生改变, 细胞表面表达胰岛特异性的表面标记, 最后成为具有功能的成熟细胞. 因此, 本研究构建了含有 *Pdx-1* 基因的真核表达载体, 并使用新型纳米介质 Superfect 介导重组载体

转染 BMSCs. Superfect 是一种功能基团设计精确、高效低毒的活化的聚酰胺-胺型树枝状高分子纳米载体. 与其他常用转染载体不同的是, Superfect 和 DNA 形成的复合物与细胞孵育的过程中可有血清的参与, 这既提高了其转染效率, 又对细胞具有营养保护的作用, 能增强细胞对其的耐受性. 本试验通过荧光显微镜显示 Superfect 能高效介导 *Pdx-1* 基因转染

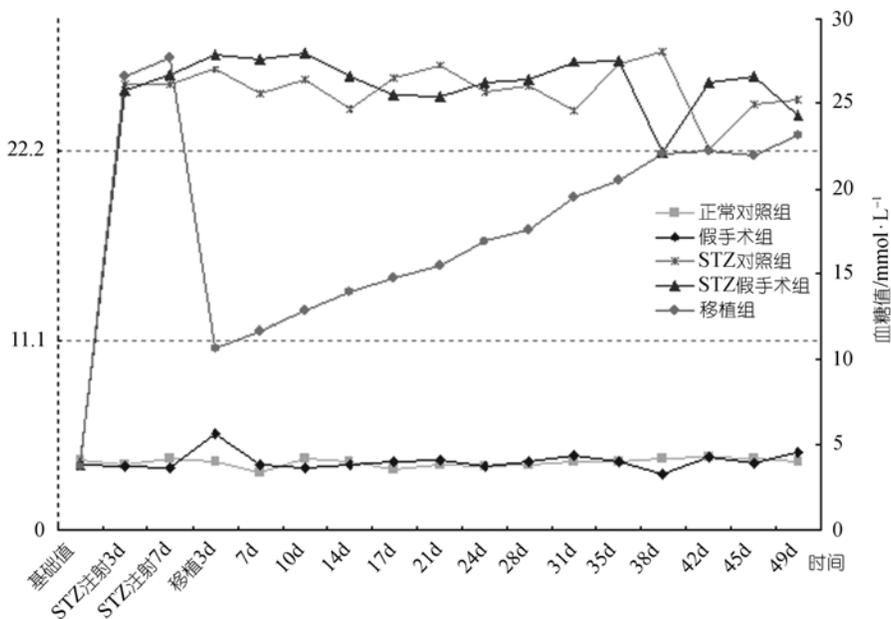


图 8 移植后血糖改变

BMSCs, 转染后 MSCs 在蛋白质水平表达该基因, 这为 BMSCs 作为糖尿病基因/细胞治疗的靶细胞奠定了基础。

胰岛是一个有机的组织结构、生理功能整体, 各种细胞的比例、空间排列方式和内外细胞信息传递都可能影响胰岛或诱导后的细胞发挥正常的生理功能。因此, 选择合理的诱导策略是 MSCs 诱导成败的关键。由单一的成体干细胞分化为含有多种细胞成分的胰岛细胞团, 其微环境尤为重要。我们的实验策略从 *Pdx-1* 转染骨髓间充质干细胞开始, 之后关键步骤是将细胞种植到无血清介质内(2 期)——该介质中许多其他细胞死亡, 从而增加了阳性细胞产生的比例。随后细胞在含有促有丝分裂原、bFGF 和烟酰胺等物质的无血清介质中扩增(3 期), 然后撤除促分裂原以促使细胞分裂和分化的停止(4 期)——这一阶段细胞迅速分化成熟, 与之伴随的是, 许多细胞很快形态改变、脱落, 在悬浮状态下很易凋亡(预实验结果)。因此, 本研究采用 LY294002 和 KGF 促进胰岛素分泌细胞的成熟, 增加胰岛素分泌量, 此阶段添加有 B_{27} (3 和 4 期)能促进胰腺内分泌细胞的产生。

为研究 *Pdx-1* 表达对 MSCs 的分化影响, 对分化的第 4 期细胞通过流式细胞仪、细胞免疫化学染色和 Western blotting 等检测了一系列胰腺系的标记蛋白表达。结果提示, *Pdx-1*⁺ BMSCs 能自我聚集并初步形成类似于胰岛的结构; 诱导后的细胞在中央区域出现大量胰岛素阳性细胞, 而且 *Pdx-1*⁺ BMSCs 分化为胰岛素阳性细胞比率较 *Pdx-1*⁻ BMSCs 分化比率明显增多; Western blotting 能检测到胰岛素蛋白表达, 特别是转染 *Pdx-1* 后显著增强了胰岛素的表达, 同时导入 *Pdx-1* 后也能强烈诱导其他胰腺特异性蛋白如胰高血糖素、生长抑素等的表达。因此, *Pdx-1* 在 BMSCs 体外分化过程中能诱导胰腺细胞特异性基因表达, 驱动分化为内分泌细胞。

诱导后的细胞能否发挥正常的胰岛生理功能是诱导分化的最终目标之一。本研究在体外条件下证明, *Pdx-1*⁺ BMSCs 诱导后细胞可以对葡萄糖刺激而分泌胰岛素, 而且对葡萄糖刺激反应较敏感。然后通过同种异体移植证明, 诱导后细胞具备了胰岛的正常生理分泌功能, 在一定程度上, 对血糖变化产生反

应, 保证血糖稳定, 可以作为胰岛移植物的替代细胞。虽然目前对分化细胞中检测的胰岛素有争议, 有研究认为其是从无血清培养基中摄取的, 而胰岛素阳性细胞是凋亡细胞^[24], 但最近 Miyazaki 等人^[21]对胚胎干细胞诱导分化后的细胞进行了胰岛素和 TUNEL 双染色, 发现多数克隆中心的细胞是胰岛素阳性而 TUNEL 阴性, 为本实验提供了支持依据。实验中骨髓分化的胰岛样细胞移植后糖尿病鼠血糖迅速下降, 但在移植后 21 天即反弹至 15 mmol/L, 考虑可能与以下因素有关: (i) 分化后的细胞功能尚未完全成熟, 细胞比例与正常情况下尚有差异; (ii) 移植细胞数量; (iii) 移植局部微环境; (iv) 本次实验进行的同种异体移植, 并未使用免疫抑制剂, 是否也存在免疫排斥影响移植存活。上述问题均值得进一步深入研究。一旦得到解决, 骨髓 MSCs 移植治疗糖尿病将取得极大进展。

本实验证实, BMSCs 能体外分化为解剖学和功能上均与胰岛相似的结构, *Pdx-1* 能显著促进上述分化过程。从临床观点来看, 以 BMSCs 为基础的系统可能为优化胰岛素产生和分析葡萄糖动态平衡的控制提供方法, 并能回避胚胎干细胞的伦理学争论及克服选用自体的胰腺干细胞需要做较大的手术等困难, 从而为糖尿病的细胞/基因治疗提供一条新的途径。

参 考 文 献

- 1 Soria B, Skoudy A, Martin F. From stem cells to β -cells: New strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2001, 44: 407~415 [DOI]
- 2 Shapiro A M, Lakey J R, Ryan E A, Korbutt G S, Toth E, Warnock G L, Kneteman N M, Rajotte R V. 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 [DOI]
- 3 Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*, 2001, 292(5520): 1389~1394 [DOI]
- 4 Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig J A, Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycaemia in streptozocin-induced diabetic mice. *Diabetes*, 2000, 49(2): 157~162
- 5 Christiansen M P, Linfoot P A, Neese R A, Hellerstein M K. Insu-

- lin production by human embryonic stem cells, *Diabetes*, 2001, 50(8): 1691~1699
- 6 Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells*, 2004, 22(3): 265~274[DOI]
- 7 Kopen G C, Prockop D J, Phinney D G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(19): 10711~10716[DOI]
- 8 Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner J M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, 85(3): 221~228
- 9 Gussoni E, Soneoka Y, Strickland C D, Buzney E A, Khan M K, Flint A F, Kunkel L M, Mulligan R C. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 1999, 401(6751): 390~394[DOI]
- 10 Schwartz R E, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu W S, Verfaillie C M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, 2002, 109(10): 1291~1302 [DOI]
- 11 Zorina T D, Subbotin V M, Bertera S, Alexander A M, Haluszczak C, Gambrell B, Bottino R, Styche A J, Trucco M. Recovery of the endogenous beta cell function in the NOD model of autoimmune diabetes. *Stem Cells*, 2003, 21(4): 377~388 [DOI]
- 12 Janus A, Holz G G, Theise N D, Hussain M A. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*, 2003, 111(6): 843~850[DOI]
- 13 Oh S H, Muzzonigro T M, Bae S H, LaPlante J M, Hatch H M, Petersen B E. Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes. *Lab Invest*, 2004, 84(5): 607~617[DOI]
- 14 Jahr H, Bretzel R G. Insulin-positive cells *in vitro* generated from rat bone marrow stromal cells. *Transplant Proc*, 2003, 35(6): 2140~2141[DOI]
- 15 Jia Y J, Zhong L, Song J H, Luo F, Sun J P, Yang Y J. Rat bone marrow mesenchymal stem cells transdifferentiate into islet-secreting cells *in vitro*. *Chin J Contemp Pediatr*, 2003, 5(5): 393~397
- 16 Tang D Q, Cao L Z, Burkhardt B R, Xia C Q, Litherland S A, Atkinson M A, Yang L J. *In vivo* and *in vitro* characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow. *Diabetes*, 2004, 53(7): 1721~1732
- 17 Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, 1994, 371(6498): 606~609[DOI]
- 18 Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev*, 1998, 12(12): 1763~1768
- 19 Yoshida S, Kajimoto Y, Yasuda T, Watada H, Fujitani Y, Kosaka H, Gotow T, Miyatsuka T, Umayahara Y, Yamasaki Y, Hori M. *Pdx-1* induces differentiation of intestinal epithelioid IEC-6 into insulin-producing cells. *Diabetes*, 2002, 51(8): 2505~2513
- 20 Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seiffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med*, 2000, 6(5): 568~572[DOI]
- 21 Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. Regulated expression of *pdx-1* promoted *in vitro* differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes*, 2004, 53(4): 1030~1037
- 22 Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y, Miyazaki S, Miyazaki J. Analysis of insulin-producing cells during *in vitro* differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes*, 2003, 52(5): 1163~1168
- 23 Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius J G, Petersen B E, Peck A B. *In vitro* trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 8078~8083[DOI]
- 24 Rajagopal J, Anderson W J, Kume S, Martinez O I, Melton D A. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science*, 2003, 299(5605): 363