

纸上说糖

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000720

LY294002 与 Exendin-4 体外诱导人胚胎干细胞分化为胰岛素分泌细胞

陆 平, 田晨光, 王武亮, 王亚楠, 黄筱慧, 赵冬梅, 李茜, 项云改, 陶识博, 毛跟红

(郑州大学第二附属医院生殖医学中心, 郑州 450000)

【摘要】目的:探讨磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抑制剂 LY294002 与胰升血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)拟似物 Exendin-4 体外诱导人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, HESc)分化为成熟胰岛素分泌细胞的影响。**方法:**利用“五步法”包括: HESc 体外培养; 拟胚体(embryoid bodies, EBs)形成; 筛选巢蛋白阳性细胞; 扩增巢蛋白阳性细胞; 第 5 阶段分别加入 PI3K 抑制剂 LY294002 为实验组(LY 组)和 GLP-1 拟似物 Exendin-4 为对照组(Ex 组)诱导 HESc 定向分化。光镜下观察各阶段细胞分化特点, 细胞免疫荧光染色鉴定胰岛样细胞特异蛋白表达。**结果:**C 肽、胰高血糖素、生长抑素单染细胞阳性率及胰岛素/生长抑素、胰岛素/C 肽双染细胞阳性率 Ex 组均高于 LY 组: C 肽($85.7 \pm 2.1\%$ vs. $(74.5 \pm 2.7)\%$, $P=0.005$; 胰高血糖素($38.1 \pm 3.4\%$ vs. $(27.2 \pm 2.4)\%$, $P=0.018$; 生长抑素($75.4 \pm 3.7\%$ vs. $(31.3 \pm 4.7)\%$, $P=0.000$; 胰岛素/生长抑素($21.5 \pm 2.2\%$ vs. $(3.5 \pm 0.9)\%$, $P=0.000$; 胰岛素/C 肽($87.5 \pm 2.4\%$ vs. $(76.7 \pm 3.1)\%$, $P=0.013$ 。**结论:**在无血清培养体系下, LY294002 较 Exendin-4 诱导 HESc 分化的胰岛素分泌细胞更加成熟。

【关键词】人胚胎干细胞; 胰岛素; 胰升血糖素样肽-1; 磷脂酰肌醇 3 激酶抑制剂

【中图分类号】R714.256

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-02-01

Differentiation of insulin-secreting cells derived from human embryonic stem cells induced by LY294002 or Exendin-4 *in vitro*

Lu Ping, Tian Chenguang, Wang Wuliang, Wang Yanan, Huang Xiaohui, Zhao Dongmei,

Li Qian, Xiang Yungai, Tao Shibo, Mao Genhong

(Reproductive Medical Center, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University)

【Abstract】Objective: To investigate whether adding different inducible factors; phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K) inhibitor LY294002 and long-acting glucagon-like peptide-1(GLP-1) mimetic Exendin-4 could efficiently induce human embryonic stem cells(HESc) to differentiate into mature insulin-producing cells. **Methods:** A five-stage culturing strategy was used in this study. Human embryonic stem cells were amplified *in vitro* for 6-7 d at stage 1. Then, the HESc were cultured in the condition of suspension culture for forming embryoid bodies(EBs)(stage 2). The nesting positive cells were selected in condition of ITSF medium(stage 3) and amplified in N2 and B27 medium(stage 4). Finally, LY294002 was taken as experimental(group LY) and Exendin-4 was taken as control group (group Ex), which was utilized to induce the nesting positive cells into mature insulin-producing cells. The morphology and characteristics of each stage were observed under the microscope, and the specific markers were identified by immunofluorescence staining. **Results:** The positive rates of C-peptide staining($85.7 \pm 2.1\%$ vs. $(74.5 \pm 2.7)\%$, $P=0.005$; somatostatin staining($75.4 \pm 3.7\%$ vs. $(31.3 \pm 4.7)\%$, $P=0.000$; glucagon staining($38.1 \pm 3.4\%$ vs. $(27.2 \pm 2.4)\%$, $P=0.018$; insulin/c-peptide($87.5 \pm 2.4\%$ vs. $(76.7 \pm 3.1)\%$, $P=0.013$ and insulin/somatostatin co-staining($21.5 \pm 2.2\%$ vs. $(3.5 \pm 0.9)\%$, $P=0.000$ in group Ex were significantly

higher than those of group LY. **Conclusion:** LY294002 could induce HESc to differentiate into more mature insulin-producing cells in serum-free culture medium.

【Key words】human embryonic stem cells; insulin; glucagon-like peptide-1; phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor

作者介绍: 陆 平, Email: 13673502385@163.com,

研究方向: 妇产科学。

通信作者: 毛跟红, Email: maogenhong2010@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金河南省人才培养联合基金资助项目(编号: U1204803); 河南省教育厅科学技术研究重点资助项目(编号: 12B320025)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150710.1543.002.html>

(2015-07-10)

糖尿病是由于 β 细胞缺乏或功能障碍致以高血糖为主要特征的代谢性疾病。目前 1 型糖尿病和部分 2 型糖尿病患者仍需终身依赖外源性胰岛素治疗,且不能改善远期并发症^[1]。胰岛移植是糖尿病理想的治疗手段,但供体匮乏限制了其临床的广泛应用^[2]。胚胎干细胞具有极强自我更新及多向分化潜能特性,为解决细胞来源不足带来了新希望^[3]。2011 年,Zhu 等^[4]首次将大型动物细胞——猕猴细胞诱导为诱导性多能干细胞,并成功分化成胰岛素分泌细胞;2012 年,有研究者将胚胎干细胞与大鼠微血管内皮细胞共培养获得了功能更加成熟的 β 细胞^[5]。人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, HESc)分化为胰岛细胞的研究已取得了较大进展,而探索如何分化出成熟的胰岛素分泌细胞成为当前的研究热点。本课题前期实验在“五步法”最后阶段加入 Exendin-4 诱导 14 d,得到 C 肽阳性率细胞高达 90%,且可纠正糖尿病鼠高血糖状态,但胰岛样细胞同时表达 4 种胰腺细胞特异性蛋白,仍属于不成熟的胰岛前体细胞^[6]。Hori 等^[7]在“五步法”最后阶段加入磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抑制剂 LY294002 将小鼠胚胎干细胞诱导分化成更加成熟的胰岛素分泌细胞。因此,本实验尝试在无血清条件下于诱导末期加入 LY294002 诱导 HESc 定向分化胰岛素分泌细胞,并与 Exendin-4 进行比较,对其生物学特性进行初步鉴定,以期探索一条更为有效的诱导方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 来自北京大学第三医院生殖中心陈贵安教授赠送的 HESc 单克隆细胞系 pku1.1。pku1.1 具有 HESc 特有的生长形态特征;具有 HESc 特异标记物,包括特异时期胚胎抗原(SSEA-4)、肿瘤抑制抗原(TRA-1-60 和 TRA-1-81)和碱性磷酸酶;具有完整稳定的染色体核型(46,XX);体外可以形成畸胎瘤^[8]。

1.1.2 主要试剂 小鼠胚胎成纤维细胞(上海斯丹赛)、knock-out DMEM、DMEM/F12 1:1、血清替代品(serum replacement, SR)、谷氨酰胺、非必须氨基酸、胰岛素-转铁蛋白-硒-纤维连接蛋白(insulin-transferrin-selenium-fiber connection protein, ITSF)、成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factors, bFGF)、胶原酶 IV 均购自 Invitrogen 公司、纤粘连蛋白(BD 公司)、尼克酰胺(Sigma)、2-巯基乙醇(Sigma)、封闭用山羊血清(北京中杉)、DAPI(武汉博士德)。一抗:多克隆兔抗巢蛋白(1:100)、单克隆鼠抗胰岛素(Sigma)、多克隆兔抗人 C 肽

(Abcam)、单克隆鼠抗胰高血糖素(Sigma)、多克隆兔抗生长抑素(武汉博士德)。二抗:FITC 标记的山羊抗兔和 TRITC 标记的山羊抗鼠均购自北京中杉生物公司。

1.2 方法

细胞全程培养在 37 °C、6% CO₂ 和 100%湿度环境下。总时间长度为 35~42 d。

1.2.1 体外培养 HESc(HESc 阶段) 采用传代 59~72 代的细胞,种在小鼠胚胎成纤维细胞饲养层上。HESc 培养系:将 20%SR、1%非必须氨基酸、2 mmol/L 谷氨酰胺、4 ng/mL bFGF、0.1 mmol/L 2-巯基乙醇加入到 80% knockout DMEM 中。每天换液。培养 6~7d 按 1:3 比例传代 1 次。

1.2.2 形成拟胚体(embryoid bodies, EBs)(EBs 阶段) 待细胞形成紧密克隆,加入 1 mg/mL 胶原酶 IV 消化后悬浮于细菌培养皿中形成 EBs。EBs 培养系:与 HESc 培养液相似,但不添加 bFGF。培养 7 d,隔天换液。

1.2.3 筛选巢蛋白阳性细胞(ITS 阶段) 预准备 10 cm 细胞培养皿经 0.1%灭菌明胶包被后,将形成的 EBs 细胞移入。胰岛素-转铁蛋白-硒-纤维连接蛋白(ITSF)能够富集巢蛋白阳性细胞,巢蛋白阳性细胞可以进一步被诱导分化为胰岛素分泌细胞^[9]。巢蛋白培养系:DMEM/F12(1:1)、1 mmol/L ITSF、2 mmol/L 谷氨酰胺和 5 μ g/mL 纤粘连蛋白。隔天换液。培养 7 d 按 1:2 比例传代。

1.2.4 扩增巢蛋白阳性细胞(N2 阶段) 将细胞培养液换为含 10 ng/mL bFGF、2% B27、2 mmol/L 谷氨酰胺、1% N₂ 的 DMEM/F12(1:1)培养基,培养 7 d 后按 1:2 比例传代。隔天换液。

1.2.5 诱导分化胰岛细胞(诱导阶段) 将细胞培养在去除 bFGF 的上述培养液中。细胞分成 2 组,1 组(Ex 组)培养液中添加 Exendin-4(50 ng/mL),另 1 组(LY 组)培养液中添加 LY294002(10 μ mol/L),诱导 7~14 d,隔天换液。

1.3 细胞免疫荧光染色鉴定

ITS 阶段和 N2 阶段诱导 7 d 及第 5 阶段(诱导阶段)诱导 14 d 后,细胞爬片在室温下加入 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次;加入 10%山羊血清封闭液,37 °C 恒温箱封闭 30 min;将一抗按如下比例稀释:兔抗巢蛋白(1:100)、鼠抗胰岛素(1:1 000)、鼠抗胰高血糖素(1:2 000)、兔抗生长抑素(1:100)和兔抗人 C 肽(1:100),吹打均匀后单独加入一个抗体单染或同时加入 2 个 1 抗进行双染,4 °C 湿盒中过夜;次日 PBS 洗 3 次后按如下稀释比例加入二抗:TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:100)和 FITC 标记的山羊抗兔 IgG(1:50),37 °C 温箱孵育 1 h;PBS 洗 3 次后 DAPI 染核 1 min, PBS 洗 3 次;封片,荧光显微镜观察。

1.4 统计学方法

所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示;采用 SPSS 17.0 统计软件进行两独立样本 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 显微镜观察细胞形态

培养中可见:①HESc 聚集如巢状或漩涡状,贴壁细胞扁

平圆形、大小均匀、胞浆少、胞核大,并不断增殖,约 5~7 d 长满皿底,细胞可连续多次传代(图 1A)。②EBs 悬浮生长,紧密聚集成小细胞团,肉眼观呈细小颗粒,大小不一,随培养时间延长,细胞颗粒不断增大(图 1B)。③去除血清替代品,EBs 贴壁生长,部分细胞开始转变成扁平状多角形细胞和长梭形的成纤维样细胞(图 1C)。④第 5 阶段加诱导因子 Exendin-4 组,部分细胞聚集成网状细胞团,且细胞以多角形为主,细胞排列规则,均匀生长(图 1D);加诱导因子 LY294002 组,细胞数目较少,且体积明显变小(图 1E)。

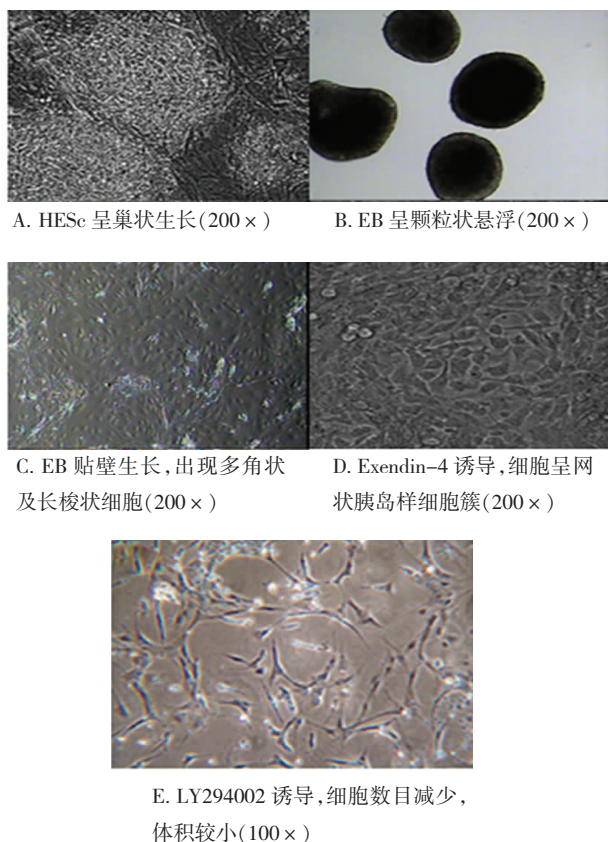
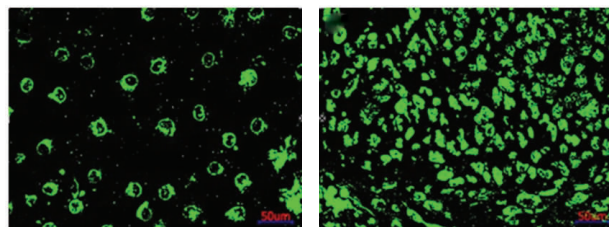


图 1 HESc 体外培养各阶段形态特点

Fig.1 The morphological characteristics of HESc cultured *in vitro* at each stage

2.2 胰岛样细胞鉴定

2.2.1 巢蛋白阳性细胞免疫荧光染色鉴定 巢蛋白是神经上皮干细胞的表面标记物,是一种重要的中间丝蛋白,在胚胎发育期神经元细胞的位置与胰腺内分泌细胞临近,胰腺内分泌细胞同样稳定表达 Nestin 基因,而已分化的细胞不表达该基因。巢蛋白在诱导第 3 阶段(ITS 阶段)开始出现阳性表达,通过 ITSF 条件培养液对巢蛋白阳性细胞进行筛选,培养 7 d 后巢蛋白阳性染色以核膜染色为主,阳性细胞率为 $(72.7 \pm 8.2)\%$ (图 2A);第 4 阶段添加 bFGF 因子后巢蛋白阳性细胞大量表达,呈现出核膜或整个胞核的染色状态,阳性细胞率为 $(89.4 \pm 5.8)\%$ (图 2B)。



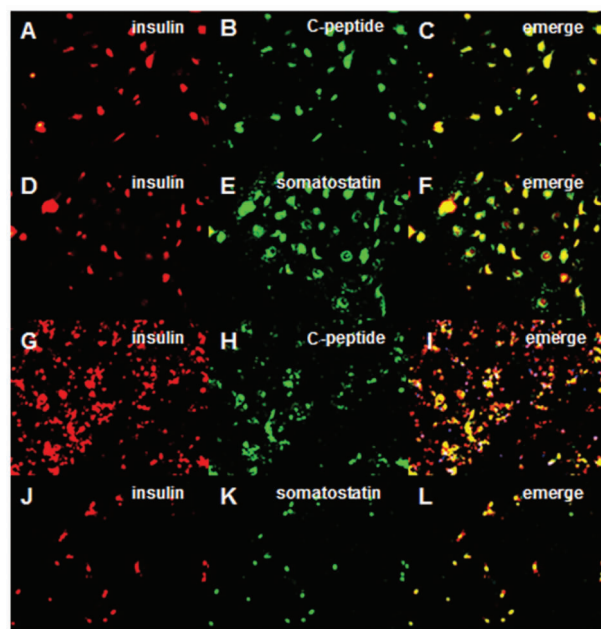
A. ITS 阶段巢蛋白以核膜染色为主

B. N2 阶段核膜或细胞核巢蛋白染色

图 2 ITS 阶段及 N2 阶段诱导 7 d 后巢蛋白荧光染色 (200 ×)

Fig.2 The nestin expressions at ITS stage and N2 stage for 7 d (200 ×)

2.2.2 胰岛样细胞特异蛋白免疫荧光鉴定 第 5 阶段(诱导阶段)Exendin-4 和 LY294002 分别诱导 14 d 后胰岛样细胞表达特异蛋白免疫荧光结果显示:C 肽、生长抑素、胰高血糖素单染及胰岛素/C-肽、胰岛素/生长抑素的免疫荧光双染在 Ex 组和 LY 组中均有表达(图 3A~L)。



(A~F)为 Exendin-4 诱导 14 d 特异蛋白荧光表达:A. 胰岛素;B. C 肽;C. 胰岛素/C 肽共染;D. 胰岛素;E. 生长抑素;F. 胰岛素/生长抑素共染。(G~L)为 LY294002 诱导 14 d 特异蛋白荧光表达;G. 胰岛素;H. C 肽;I. 胰岛素/C 肽共染;J. 胰岛素;K. 生长抑素;L. 胰岛素/生长抑素共染

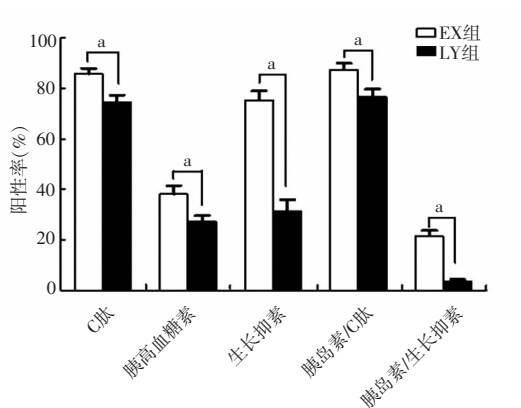
图 3 Exendin-4 和 LY294002 分别诱导 14 d 后各特异蛋白荧光染色表达 (200 ×)

Fig.3 Specific protein expressions induced by Exendin-4 or LY294002 for 14 d (200 ×)

2.3 统计学检验结果

将 59~72 传代细胞爬片各特异蛋白进行荧光染色,2 组细胞爬片均随机取 10 个区域计数各特异蛋白单染或双染阳性率,两独立样本 *t* 检验结果显示:C 肽、胰高血糖素、生长抑

素单染阳性率 Ex 组均高于 LY 组; C 肽(85.7 ± 2.1)% vs. (74.5 ± 2.7)%, $t=3.199$, $P=0.005$; 胰高血糖素(38.1 ± 3.4)% vs. (27.2 ± 2.4)%, $t=2.603$, $P=0.018$; 生长抑素(75.4 ± 3.7)% vs. (31.3 ± 4.7)%, $t=7.433$, $P=0.000$; 胰岛素/生长抑素、胰岛素/C 肽双染阳性率 Ex 组均高于 LY 组; 胰岛素/生长抑素(21.5 ± 2.2)% vs. (3.5 ± 0.9)%, $t=7.506$, $P=0.000$; 胰岛素/C 肽(87.5 ± 2.4)% vs. (76.7 ± 3.1)%, $t=2.768$, $P=0.013$ (图 4)。



Ex 组 C 肽、生长抑素、胰高血糖素单染阳性率及胰岛素/C 肽、胰岛素/生长抑素双染阳性率均高于 LY 组; a, $P<0.05$

图 4 第 5 阶段(诱导阶段)Exendin-4 和 LY294002 分别诱导 14 d 后各特异蛋白阳性率比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Fig.4 Comparison of positive rates of the specific proteins induced by Exendin-4 or LY294002 for 14 d at stage 5 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

3 讨论

D'Amour 等^[10]通过模拟胰腺发育过程进行体外诱导 HESc 分化,是 HESc 诱导分化为胰岛素分泌细胞的重要里程碑,但最终形成的胰岛细胞功能低于原生胰岛细胞,C-肽释放呈非葡萄糖浓度依赖性,胰岛细胞分化效率也仅有 7.3%。目前研究者们尝试了多种诱导方法,但分化效率普遍不高。而本实验通过在第 5 阶段(诱导阶段)添加胰岛细胞诱导因子 LY294002,获得了较高 C-肽阳性表达的胰岛样细胞。

PI3K 是催化磷脂酰肌醇羟基磷酸化,生成第二信使的特异性激酶,胰岛素与胰岛素受体结合后使胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)中酪氨酸磷酸化,PI3K 与 IRS 结合并最终激活 PKB 激酶,调节下游 Bad 促凋亡蛋白、Foxo1 转录因子等信号蛋白,减少 β 细胞凋亡,促进 β 细胞增殖来发挥

作用。PI3K/PKB 信号途径是胰岛素代谢过程的主要途径,而 LY294002 能与 PI3K 竞争性结合 ATP 位点,抑制下游信号蛋白激活,是 PI3K/PKB 通道的特异性抑制剂。研究发现,LY294002 可以促进细胞分化、抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡^[11]。本实验在诱导末期加入 PI3K 抑制剂 LY294002 诱导 HESc 分化的胰岛素分泌细胞,相较于 Exendin-4,表达更低水平的非胰岛素多肽,可能是通过 PI3K 信号通路特异性增加了 β 细胞胰岛素基因的表达,促进了 β 细胞的成熟;另外,LY294002 诱导 14 d 后数量明显减少,可能与其负反馈调节诱导了细胞凋亡有关,其分子机制还有待于进一步研究。

Exendin-4 属于长效胰升血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 拟似物,具有与 GLP-1 受体结合能力强且不易被分解的特点^[12]。它可以模拟生理 GLP-1 的作用,促进 β 细胞增殖、抑制 β 细胞凋亡^[13]。已有实验证实,Exendin-4 可以增强糖尿病小鼠 IRS-2 表达的 cAMP,促使负调控转录因子 Foxo1 磷酸化,调节 PDX1 表达,促进 β 细胞增殖和新生^[14]。本实验添加 Exendin-4 诱导 HESc 14 d 后形成的胰岛样细胞表达 C 肽阳性率达 85.7%,也印证了我们前期的工作成果^[6]。

在体内,C-肽由胰岛素原裂解产生,一分子胰岛素原合成一分子 C-肽与一分子的 A、B 链,后者合成胰岛素。C-肽与胰岛素共同存在于同一分泌颗粒内最终以等克分子分泌入门静脉。C-肽和胰岛素的荧光双染结果提示 HESc 经 LY294002 及 Exendin-4 诱导形成的胰岛样细胞具有合成胰岛素的功能。同时,免疫荧光发现胰岛素与生长抑素双染现象,说明了目前所诱导分化的细胞不是单一的 β 细胞,而是胰岛细胞的前体细胞。LY 组生长抑素、胰高血糖素单染及胰岛素/生长抑素双染阳性细胞率均明显低于 Ex 组,表明 LY294002 诱导的胰岛样细胞更为成熟。

本实验通过改良 Hori^[7]等的“五步法”在诱导阶段运用无血清培养基,避免了动物源性因子干扰,添加外源性诱导因子 LY294002 成功诱导 HESc 分化为胰岛素分泌细胞,获得了更高的分化效率,细胞免疫荧光染色 C-肽阳性细胞率达 74.5%,且较 Exendin-4 获得的胰岛素分泌细胞更为成熟;过程简单易于操作,材料价廉易得,为推动胰岛细胞的临床应用提供了实验依据。