

·学科进展与展望·

糖尿病的干细胞疗法

李莉莎^{1,2} 李富荣² 邓宏魁¹

(1 北京大学深圳研究生院, 深圳 518020; 2 深圳市人民医院临床医学研究中心, 深圳 518020)

[摘要] 糖尿病的治疗目前集中于细胞的替代疗法。供体器官的短缺激发了对如何产生 beta 细胞的研究。目前, 胰岛的扩增, 胰岛的异种移植, 人胰岛细胞系的开发, 干细胞的分化都是热点。干细胞的治疗包括胚胎干细胞和成体干细胞。本文讨论干细胞向胰腺 beta 细胞分化的各种可能性。

[关键词] 干细胞, 糖尿病, beta 细胞, 分化

胰腺作为一个生理功能整体, 包括 3 种组织: 分泌激素的胰岛、生成消化酶的腺泡和分泌重碳酸盐的导管细胞。胰岛包括 4 种不同的内分泌细胞: 分泌胰高血糖素的 alpha 细胞、分泌胰岛素的 beta 细胞、分泌生长抑素的 delta 细胞和分泌胰多肽的 PP 细胞, 健康机体的血糖浓度受到胰腺分泌激素, 特别是胰岛素的精密调控。beta 细胞的功能缺失导致了糖尿病。因此, 在胰腺中所占比例只有 1%—2% 的胰岛细胞, 在临床应用上有重要作用。目前, 1 型糖尿病(胰岛素依赖)患者需终生注射胰岛素, 但仍不能避免并发症的发生, 并发症成为糖尿病致死的主要原因。并且, 由于给药过程缺乏理想的血糖感应系统, 常导致病人出现低血糖症状。为了有效控制血糖, 防止糖尿病并发症的发生, 提高糖尿病患者的生存质量, 替代被患者自身免疫系统破坏的胰岛素分泌细胞胰岛的细胞移植蓬勃兴起。遗憾的是胰岛细胞的移植仍面临着两大难题: 一、供体来源不足, 二、免疫抑制药物的长期使用。干细胞独特的生物学特性为解决以上问题开辟了新的途径。干细胞是一类具有自我更新能力和分化潜能的细胞。干细胞极强的自我更新能力和多项分化潜能无疑是获得大量胰岛 beta 细胞的最佳种子细胞。我们可以体外操纵干细胞, 进行大量扩增和定向诱导分化, 最后将得到能分泌胰岛素的胰岛样细胞。目前报道的可用于诱导分化为胰岛素分泌细胞的干细胞主要有胚胎干细胞和成体干细胞。

1 胚胎干细胞

胚胎干细胞来源于哺乳动物早期胚胎内细胞团中的一种二倍体细胞, 一般可从植入子宫内膜前的囊胚等早期胚胎中获得。这种细胞培养在鼠饲养层细胞或分化抑制因子存在的条件下, 具有长期的未分化增殖能力, 在体外长期培养后, 仍具有稳定发育成各胚层的潜能。在合适的条件下, 通过添加特异的诱导因子或去除饲养细胞层及抑制分化的因子, 可将胚胎干细胞诱导分化成各种不同的细胞类型。已经有学者将胚胎干细胞诱导分化成神经细胞、造血细胞、肌肉细胞等。胚胎干细胞的全能性为研究糖尿病的细胞治疗开辟了新途径。在非选择性培养条件下, 一小部分按照早期胰腺发育的模式向胰腺内分泌方向分化。先将小鼠的胚胎干细胞培养成类胚体, 用 ITSFn 培养基培养使其产生 Nestin 阳性的细胞, 并在此基础上诱导出了含有神经细胞及 alpha、beta 等多种胰岛细胞的细胞群。添加磷酸肌醇的激酶抑制剂可以促进更多的胚胎干细胞向功能的 beta 细胞转化; 胚胎干细胞培养条件的改变产生了有 beta 细胞性质的细胞, 与 beta 细胞系相关的转录因子 pax4 或者 pdx-1 的表达也可以促进胚胎干细胞向 beta 细胞的分化^[1]。有些试验怀疑胚胎干细胞的分化是真正分化成了产生胰岛素的 beta 细胞, 还是细胞仅仅吸收了培养液中的胰岛素。成熟的 beta 细胞必须有合成和分泌胰岛素的能力, 而不仅仅是探测到细胞内胰岛素的存在。所以, 单纯地对

本文于 2005 年 8 月 17 日收到。

胰岛素进行免疫染色,对体外检测胰腺分化,并不可靠,应同时检测 C-肽的量,才能真正证明 beta 细胞的存在。而且 beta 细胞内还要有调控胰岛素分泌的功能分子和含有胰岛素的包囊。利用全反式视黄酸,活化素 A 和 Matrigel,通过三步法在 2 周内诱导胚胎干细胞分化为胰岛样细胞。通过转染胰岛素启动子启动的 EGFP 报告系统可以证明是干细胞合成了胰岛素,而不是从培养液中吸取的胰岛素,使转分化的步骤得到简化^[2]。来源于胚胎干细胞产生的胰岛素细胞的移植可逆转啮齿动物的糖尿病^[1],说明这些细胞确实具有合成和分泌胰岛素的能力。在体外分化中,向胚胎干细胞转染转录因子,如果无法调控,不能产生理想的结果;如果导入的转录因子可以进行调控表达,向胰岛细胞分化会更顺利^[1]。胚胎干细胞,经过遗传选择表达胰岛素后,通过尾静脉注射给患糖尿病的小鼠,可改善对血糖的控制。

对啮齿动物胚胎干细胞的研究已经证实了胚胎干细胞的全能性,对相应的信号诱导机制的了解也取得了长足进步,人类胚胎干细胞的应用研究因此受到了很大的推动。由于胚胎干细胞在体外的无限增殖能力和发育的全能性,以胚胎干细胞为“种子细胞”,将其在体外大量扩增,并定向诱导成特定的细胞和组织,可以用于细胞的替代疗法。目前,人胚胎干细胞已经成功建系。虽然胚胎干细胞能分化成各种细胞类型,但是目前这种分化是非“定位性”的,尚不能控制胚胎干细胞在特定部位分化为相应细胞,因此,容易形成畸胎瘤。由于个体的主要组织相容性复合体的不同,同种异体胚胎干细胞及其分化组织用于临床会引起免疫排斥反应,需要对患者进行长期的免疫抑制治疗或将患者的造血系统和外来细胞形成嵌合体。为解决免疫排斥的问题,科研人员对应用治疗性克隆进行探索,形成表达患者自身组织相容性复合体的胚胎干细胞。

2 造血器官来源的干细胞

在很多啮齿动物模型和进行骨髓移植或器官移植器官受体体中都证实:骨髓中存在多能干细胞,在进入肝,肠,皮肤,肺,骨骼肌,心肌和中枢神经系统可以形成相应的实质细胞。在啮齿动物中,造血器官中存在的多能干细胞也可以分化成有功能的胰腺内分泌细胞^[3-7]。

在非糖尿病小鼠中,骨髓移植 1—2 个月后,就可以在受体的胰岛发现这些供体来源的细胞,这些细胞表达胰岛素和胰腺 beta 细胞的遗传标志物^[3]。

在体外培养中这些细胞感应糖的刺激可分泌胰岛素,而且有与正常 beta 细胞相似的胞内 Ca^{2+} 波动。然而,只有 1%—3% 的胰岛细胞是由来自移植骨髓的具有多向分化功能的干细胞分化而来^[3]。在由 STZ 诱导的糖尿病小鼠中,进行了相似的实验。骨髓移植后,血糖和胰岛素浓度都恢复正常,小鼠存活率提高。在胰岛中,骨髓来源的干细胞分化成表达胰岛素的细胞,其机制可能是骨髓来源的干细胞刺激了周围的胰腺前体细胞增殖,使胰岛素分泌细胞的数量增加,使胰腺的功能得到了重建。这有可能成为一条全新的治疗途径^[4]。

尽管这些研究表明了,骨髓移植作为 beta 细胞替代的治疗手段的可能性,但 1 型糖尿病对 beta 细胞的免疫破坏依然存在。骨髓移植可以诱导微融合,在 1 型糖尿病的自体免疫模型非肥胖型小鼠中,进行病发前骨髓移植,结果细胞融合阻止了糖尿病。其机制可能是供体的免疫调节细胞阻止了生病小鼠对 beta 细胞的自身反应。但是对已经是糖尿病的非肥胖型小鼠进行骨髓移植后,亚致死剂量或致死剂量的钴 60γ 辐射所诱导的细胞融合,却不能使糖尿病康复^[5]。然而当这些糖尿病移植鼠通过胰岛素治疗维持正常血糖时,它们最终可以康复。胰腺组织表现为 beta 细胞的增殖和再生能力都增强了。因此,骨髓移植可以诱导免疫控制,阻止对自身 beta 细胞的免疫破坏和维持正常血糖,使 beta 细胞或前体细胞作适度的增殖的反应^[6]。

脾来源的间充质细胞与完全弗氏佐剂的联合注射,逆转了糖尿病,伴有生成胰岛素的胰岛的重生。在一定条件下,移植的脾间充质细胞不仅控制了对胰岛的免疫破坏,而且转分化形成了 beta 细胞^[6]。

骨髓干细胞在遗传操作或微环境调控条件下,可以在体外分化成表达胰岛素的细胞。这些细胞移植到糖尿病小鼠的肾包囊下可以将血糖调节为正常,当切除有移植物的肾后,小鼠恢复糖尿病状态。遗传操作的方法是向骨髓干细胞转染胰腺发育过程中的关键转录因子,如 IPF-1, HLXB9, FOXA2, NGN3 等。微环境的调节包括同胰岛细胞,受损胰腺提取物等共培养。在一些特殊的生长因子或化学物质诱导下产生了胰岛样的细胞^[7]。目前认为骨髓来源的细胞变成骨髓外细胞的机制是细胞融合;造血器官衍生物向胰腺内分泌细胞分化的机制排除了细胞融合的可能性^[10]。近来,由 Andreas Lechner 和他的同事证明在糖尿病小鼠的肝、脂肪组织、脾和骨髓中发现存在生成胰岛素的细胞,并证实它们的

来源为骨髓^[8]。

3 肝脏、胰腺、神经干细胞

啮齿类的肝细胞和人胎肝细胞通过培养或引入 beta 细胞特异的基因, 在体外可分化成分泌胰岛素的细胞。移植时, 在啮齿动物中这些细胞逆转了糖尿病。在经腺病毒基因传递治愈的糖尿病啮齿动物体内, 肝内的细胞可以分化成分泌胰岛素的细胞^[9]。肝卵圆干细胞, 可以在高糖培养基中横向分化, 聚集成胰岛样细胞团, 并能表达与胰岛细胞分化相关的转录因子及胰岛特有的激素, 当受到葡萄糖刺激时, 这些细胞团在烟酰胺的作用下能合成分泌胰岛素, 逆转 NOD 大鼠的高血糖状态。

胰腺中的前体细胞可以产生内分泌细胞, 人和啮齿类的胰腺导管细胞、胰岛细胞和外分泌细胞可以向内分泌细胞分化。这些组织在体外培养、分化, 移植后可逆转糖尿病。

一直以来, 受损 beta 细胞的重生被认为来自干细胞的分化, 而这种干细胞存在于胰腺导管上皮。这种观点的基础是大量的免疫组织化学证据: 在组织发生和再生模型中, 从导管部位再生、分化迁移形成新的胰岛。Zulewski 等从成人胰岛和胰腺导管分离得到干细胞样细胞, 并发现它们在体外具有良好的增殖能力。Bonner-Weir 等通过体外培养人胰腺导管细胞, 成功分化为胰岛样细胞。Dor 等人引入了一种遗传品系追踪方法质疑了胰腺内分泌干细胞的存在^[10], 但这种方法的缺陷, 使得在没有 tamoxifen 的情况下, 强启动子调控的重组酶仍保持活性。所以新生的 beta 细胞同样可以被标记^[11]。在人 1 型糖尿病发展中, 早期免疫干涉阻止了 beta 细胞损坏, 使胰腺内分泌细胞恢复功能^[12]。beta 细胞数量的恢复可能是由于因为胰腺前体细胞的分化, 也可能是残余 beta 细胞的增殖。对来源于胰岛和导管的细胞进行克隆分析, 证明存在多功能前体细胞。这些前体细胞可以分化成各种类型的胰岛内分泌细胞^[13]。尽管, 小鼠和大鼠可能不是人类胰岛生长和重建的合适模型。但是, 组织切片表明无论是胎儿, 新生儿, 还是成人在小导管周围都存在孤立的胰岛素阳性细胞, 而且在成人体内没有 beta 细胞复制的证据。

应用胰腺干细胞目前面临的困难为: (1) 胰腺干细胞不易获得。胰腺干细胞存在的部位尚不能确定, 所得量稀少, 培养条件复杂。(2) 胰腺干细胞缺乏明显的细胞标志物, 难以鉴定。神经细胞的发育

与胰腺细胞发育具有相似性, 神经球细胞系在体外受到胰岛发育信号的调控, 可以形成响应葡萄糖浓度变化的胰岛素分泌细胞团, 移植入体内后, 细胞团可以产生胰岛素^[14]。

4 展望

干细胞可定向诱导分化为胰岛素分泌细胞的研究, 为糖尿病的细胞治疗提供了新的思路。干细胞无疑是治疗糖尿病的最佳种子细胞, 探索成体干细胞的可塑性可回避胚胎干细胞的伦理学争论。在发育的过程中, 成体干细胞存在于身体的各种组织, 保存多向分化潜能。在合适的条件下, 可以进行定向分化。最近, 中国的科学工作者已经证明, 从骨髓的间充质干细胞和皮肤干细胞可以诱导出分泌胰岛素的细胞^[15], 对这类容易获得的干细胞的研究, 有利于加速细胞移植在临床上的应用。

参 考 文 献

- [1] Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. Regulated expression of pdx-1 promotes *in vitro* differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes*, 2004, 53: 1030—1037.
- [2] Shi Y, Hou L L, Tang F C et al. Enducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta cells by a novel three-step approach with activin A and all-trans retinoic acid. *Stem Cells*, 2005, 23: 656—662.
- [3] Ianus A, Holz G G, Theise N D et al. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*, 2003, 111: 843—850.
- [4] Hess D, Li L, Martin M et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 763—770.
- [5] Zorina T D, Subbotin V M, Bertera S et al. Recovery of endogenous cells function in the NOD model of autoimmune diabetes. *Stem Cells*, 2003, 21: 377—388.
- [6] Kodama S, Kühtreiber W, Fujimura S et al. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. *Science*, 2003, 302: 1223—1226.
- [7] Moriscot C, Fraipont F, Richard M J et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrin pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation *in vitro*. *Stem Cells*, 2005, 23: 594—604.
- [8] Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K et al. Extrapancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 2458—2463.
- [9] Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K et al. NeuroD-beta-catenin therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med*, 2003, 9: 596—603.

- [10] Dor Y, Brown J, Martinez O I et al. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 2004, 429: 41—46.
- [11] Guo C, Yang W, Lobe C G. A Cre recombinase transgene with mosaic, widespread tamoxifen-inducible action. *Genesis*, 2002, 32: 8—18.
- [12] Glandt M, Hagopian W, Herold K C. Treatment of type 1 diabetes with anti-CD3 monoclonal antibody. *Rev Endocr Metab Disord*, 2003, 4: 361—368.
- [13] Seaberg R M et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nature Biotechnol*, 2004, 22: 1115—1124.
- [14] Hori Y, Gu X, Xie X et al. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. *PLoS Medicine*, 2005, April, e103.
- [15] Chen L B, Jiang X B, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(20): 3016—3020.

STEM-CELL THERAPY FOR DIABETES MELLITUS

Li Lisha^{1,2} Li Furong² Deng Hongkui¹

(1 *Shenzhen Graduate School of Peking University, Shenzhen 518020;*

2 *Clinical Medical Research Center of Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020*)

Abstract Curative therapy for diabetes mellitus mainly implies replacement of functional insulin-producing pancreatic cells. However, shortage of donor organs spurs research into alternative means of generating cells from islet expansion, encapsulated islet xenografts, human islet cell-lines, and stem cells. Both embryonic stem cells and adult stem cells have been used to generate surrogate cells. This paper discussed the possibilities of the differentiation from stem cells to pancreatic beta cells.

Key words stem cell, diabetes, beta cell, differentiation

·资料·信息·

“高等植物杂交与进化”研究取得新进展

远缘杂交是高等植物基因组进化和新物种形成的主要动力之一,高等植物杂交与进化的关系一直是进化生物学上有争议的热点问题之一。一种观点认为,由于种间杂种在适合度(fitness)上的普遍劣势,杂交阻碍了进化;另一种观点则认为,杂交可以综合亲本种的适应性或创造出新的适应性,丰富基因库、拓宽生境,进而促进基因组进化和新种形成。可成活远缘杂种有3种主要命运:形成多倍体,二倍体重组或与亲本种之一回交(又称渐渗杂交)。近年来基因组学的巨大进展,解释了高等植物多倍体普遍性的原因,在二倍体重组途径导致新种形成的研究领域,也取得突破性进展,但关于第3种途径,即渐渗杂交(introgressive hybridization)在进化上的意义,实验性研究不多。

近年来,东北师范大学植物分子表观遗传学实验室在“国家杰出青年科学基金”和国家自然科学基金重点项目支持下,在高等植物“杂交与进化”研究

领域开展了系统研究工作,特别在远缘渐渗杂交对受体基因组稳定性影响方面取得重要研究进展。他们以一系列“水稻+菘”渐渗杂交系为材料,通过在不同层面上的深入研究得到以下主要结果:(1)菘染色质的微小渐渗诱导受体水稻发生了广泛的不能用孟德尔规律解释的表型变异;(2)水稻和菘之间的远缘杂交和渐渗诱导了MITE类转座子mPing及其转座酶供体Pong的大量转座激活;(3)菘染色质的微小渐渗诱导水稻受体基因组广泛的遗传变异,包括碱基替换和小片段缺失/插入;(4)微小异缘渐渗可以诱导受体基因组发生可遗传DNA甲基化模式改变和基因表达谱(transcriptome)变化。这些研究结果为“远缘渐渗杂交促进基因组进化”的观点提供了分子水平上的实验性证据,并对利用远缘杂交进行作物遗传改良提出了新启示。

(生命科学部 温明章 供稿)