

骨髓间充质干细胞分化为胰岛细胞治疗糖尿病

张翊华 窦忠英*

(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)

摘要 糖尿病已成为严重危害人类健康的疾病之一。目前, 移植胰岛治疗糖尿病已初见疗效, 但由于胰岛来源匮乏和免疫排斥反应而受阻。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)取材方便, 容易进行体外分离、培养和纯化, 且具有跨越分化潜能。若将自体 BMMSCs 诱导分化为胰岛细胞, 可望解决细胞来源和免疫排除问题, 实现糖尿病的自体细胞治疗。现对体外诱导 BMMSCs 分化为胰岛细胞治疗糖尿病的研究进展进行综述, 并指出了存在问题和今后的研究方向。

关键词 骨髓间充质干细胞; 细胞转分化; 胰岛细胞; 糖尿病

糖尿病已成为人类继心血管疾病和肿瘤之后的第三大疾病。据统计, 全世界糖尿病患者 1997 年为 1.35 亿, 2000 年为 1.5 亿, 2001 年为 1.77 亿, 如无有力的防治措施, 预计到 2025 年将达到 3 亿^[1,2]。我国糖尿病发病率一直呈上升趋势, 在成年人群当中, 1979 年为 0.6%, 1994 年为 2.5%, 1996 年剧增至 3.2%, 到 2003 年患病人数已达 2 400 万。估计到 2030 年我国糖尿病患者人数可发展到 4 300 万^[3]。目前糖尿病的治疗方案主要是服用药物和注射胰岛素, 这给患者和社会带来沉重的负担, 而且还会引起严重的并发症。近年来, 移植胰岛治疗糖尿病已初见疗效, 一些病人接受胰岛移植后可脱离胰岛素治疗、血糖控制的最长时间超过 6 年^[4]。遗憾的是, 胰岛移植仍面临着两大难题, 即组织来源不足和免疫排斥反应。干细胞研究给糖尿病患者带来新的希望。胚胎干细胞几乎可以分化为包括胰腺 β 细胞在内的所有成体组织细胞, 但在临床应用中受到伦理学和免疫排斥等因素的限制, 而且目前胚胎干细胞向胰腺 β 细胞分化率还很低, 分化细胞胰岛素分泌量少, 临床应用还有一段很长的路程。胰腺干细胞是最有潜能向 β 细胞分化的成体干细胞, 但同样存在细胞来源和免疫排除问题。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)取材方便, 容易进行体外分离、培养和纯化, 具有跨越分化潜能。若将自体 BMMSCs 诱导分化为胰岛细胞, 可彻底解决细胞来源和免疫排除问题, 实现糖尿病的自体细胞治疗。因此, 该领域的研究具有广阔的临床应用前景。

1 BMMSCs 分化为胰岛细胞

Hess 等^[5]将 BMMSCs 移植到链脲菌素所致的胰腺损伤小鼠体内, 降低了小鼠的高血糖症。他们对受体小鼠的胰腺样品进行定量分析, 结果表明, 尽管供体 BMMSCs 中胰岛素阳性细胞的发生率很低, 但它们大多定居在胰小管和胰岛, 有引发受体胰岛素生成细胞增殖的作用。Ianus 等^[6]将表达增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)和活跃转录胰岛素基因的雄鼠骨髓细胞移植到经过致死量照射的雌鼠体内。移植后 4 到 6 周, 雌鼠的胰岛中出现了 Y 染色体和 EGFP 双阳性细胞, 并且从表达胰岛素和葡萄糖转运蛋白 2 (glucose transporter 2, GLUT2)的胰岛中纯化出 EGFP 阳性细胞, 它们在体外像胰腺 β 细胞一样具有葡萄糖依赖性、在肠降血糖素作用下增强胰岛素分泌。Moriscot 等^[7]研究发现, 人 BMMSCs (hBMMSCs)中有角蛋白 18 和 19 增强胰岛素分泌; hBMMSCs 中有角蛋白 8 和 19 的 mRNA (胰腺导管上皮细胞的标志), 有些 hBMMSCs 中还有转化酶原 mRNA, 并且 hBMMSCs 能够低水平表达 NKX6-1, 只是缺乏向 β 细胞分化的其他转录因子。用编码小鼠 IPF1、HLXB9 和 FOXA2 (调节内分泌细胞早期发育的因子) 基因的腺病毒转染 hBMMSCs, 发现这些因子的表达可导致胰岛素基因

收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-09-30

国家高技术研究发展计划(863计划)(No. 2002AA216161)和教育部重点项目(No. 03160)资助

*通讯作者。Tel: 029-87080068, E-mail: zhongyingdou@126.com

表达。这些研究结果表明, BMMSCs 具有分化为功能性胰腺 β 细胞的潜能; 只要有几种必需的转录因子参与, BMMSCs 完全能够在体外诱导分化成胰岛素生成细胞。

2 体外诱导 BMMSCs 向胰岛细胞分化

2003年6月, 李艳华等^[8]首次在体外将hBMMSCs 诱导分化为胰岛样细胞团, 并经 RT-PCR 检测有 ngn3、IPF-1、胰岛素和胰高血糖素基因表达, 双硫脲染色阳性, 免疫组织化学法检测证明, 细胞团表达胰岛素、胰高血糖素、生长抑素等内分泌激素。90~100个细胞团经 5.6 mmol/L 葡萄糖溶液刺激 1 h 分泌胰岛素(28.19 \pm 2.78) μ IU/ml, 经 16.7 mmol/L 葡萄糖溶液刺激 1 h 分泌胰岛素(37.33 \pm 3.07) μ IU/ml, 细胞内胰岛素含量为(130.14 \pm 12.24) ng/mg 总蛋白。此后, 贾延劫等^[9]、陈立波等^[10]在体外诱导大鼠 BMMSCs (rBMMSCs), 取得了类似的结果。刘雅娟等^[11]用体外诱导 rBMMSCs 形成的胰岛样细胞团修复坏死胰腺组织, 获得一定的效果。武晓泓等^[12]将 rBMMSCs 诱导分化为胰岛素阳性细胞。陆琰等^[13]将 hBMMSCs 诱导分化成胰岛样细胞团。陈黎红等^[14]将小鼠骨髓多能成体祖细胞诱导分化为胰岛素阳性细胞。本实验室将 hBMMSCs 诱导分化为胰岛样细胞团(图1~图4, 未公开发表), DTZ 染色阳性, 经 RT-PCR 鉴定表达胰岛素 mRNA, 在高糖溶液刺激下分泌胰岛素。

国外专家在该研究领域虽然公开发表论文较晚, 但工作做得深入、细致。2004年, Tang 等^[15]将小鼠 BMMSCs (mBMMSCs) 在体外诱导分化为胰岛素生成细胞, 10⁶个细胞经高糖溶液刺激 2 h 分泌胰岛素(1.5 \pm 0.17) ng/ml, 细胞内胰岛素含量为(13.3 \pm 1.69) ng/ml, 而阳性对照组的 INS-1 细胞经高糖溶液刺激 2 h 分泌胰岛素(98.3 \pm 18.31) ng/ml, 细胞内胰岛素含量为(1130.3 \pm 204.23) ng/ml。同年, Oh 等^[16]将 F-344 大鼠骨髓细胞诱导分化为胰岛样细胞团, 用高糖溶液刺激 2 h, 83 个细胞团分泌胰岛素 177.8 ng/ml。Shakhov 等^[17]也进行了类似的研究。Choi 等^[18]报道, 他们将 rBMMSCs 在体外诱导分化成胰岛样细胞团, 在高糖溶液刺激下胰岛素分泌量由 0.25 ng/ml 增加到 0.58 ng/ml。

3 BMMSCs 向胰岛细胞分化的体外诱导方法

3.1 三步法

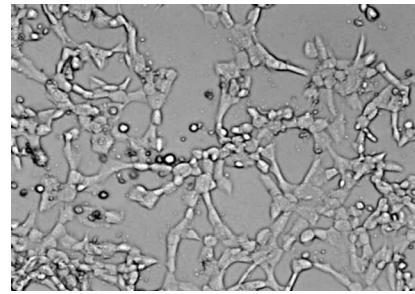


图1 诱导2天(100 \times)

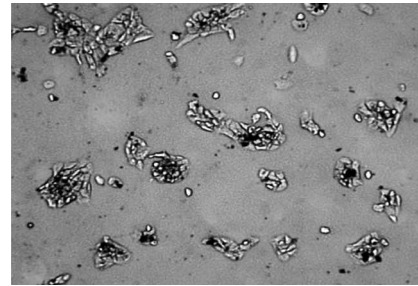


图2 诱导6天(50 \times)

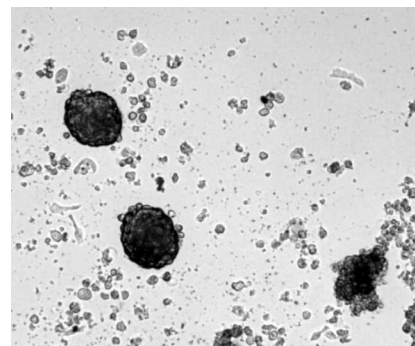


图3 诱导12天(50 \times)

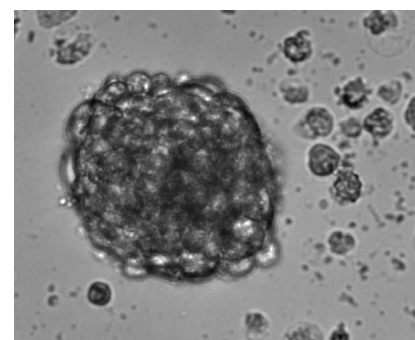


图4 诱导14天(200 \times)

所谓三步法就是将整个诱导过程分为三个阶段进行, 每个阶段所用的诱导液成分不同。贾延劫等^[9]开创了三步法的先河: 第一步, 将大鼠 rBMMSCs 诱导成 nestin 阳性细胞, 用含 5 mmol/L β 巯基乙醇或 0.2~

0.4 mmol/L黄芩苷(baicalin)的DMEM 培养液诱导5 h; 第二步, 扩增nestin阳性细胞并使其转变成祖细胞, 用含10 ng/ml bFGF、0.1 mmol/L β - 巯基乙醇、 B_{27} 等因子的DMEM 培养液诱导7天; 第三步, 使祖细胞分化为胰岛素生成细胞, 用含10 ng/ml HGF、20 mmol/L 烟酰胺、0.1 mmol/L β 巯基乙醇、磷酸肌醇-3- 羟基激酶抑制剂(LY294002)、 B_{27} 等因子的DMEM 培养液诱导7~21天。此后, Tang等^[15]采用三步法将mBMMSCs 诱导分化为胰岛素生成细胞。他们将mBMMSCs 先用含10% FCS的低糖(5.5 mmol/L)或高糖(23 mmol/L) 1640培养液诱导2~4个月, 再用含5% FCS和10 mmol/L烟碱的低糖1640培养液诱导7天, 然后在培养液中添加10 nmol/L exendin-4 (肠促胰岛素类似物, 或GLP-1激动剂)继续诱导5~7天。刘雅娟等^[11]采用三步法将rBMMSCs 诱导分化成胰岛样细胞团。他们先用无血清低糖DMEM 培养液诱导2~3天, 然后添加bFGF和EGF继续培养1周, 再换为含条件培养液、 B_{27} 、活化素、地塞米松、胰岛素及尼克酰胺的无血清高糖DMEM 诱导1周。武晓泓等^[12]采用三步法将rBMMSCs 诱导分化为胰岛素阳性细胞。他们先用含10% FBS的低糖(5.6 mmol/L)或高糖(25 mmol/L)Dulbecco改良的Eagle培养液(DMEM)诱导14天, 然后用含5% FBS和10 mmol/L 尼克酰胺的低糖或高糖DMEM 诱导7天, 再加10 mmol/L exendin-4继续诱导7天。

3.2 二步法

二步法, 即诱导过程分为两个阶段, 每个阶段所用的诱导液成分不同。李艳华等^[8]首次采用二步法将hBMMSCs 诱导分化为胰岛样细胞团, 他们先用含10 ng/ml bFGF、10 ng/ml EGF和2% B_{27} 的IMDM 培养液诱导6天, 然后用含10 ng/ml β 细胞调节素(β cellulins)、10 ng/ml肝细胞生长因子、10 ng/ml活化素(activin A)、10 mmol/L 尼克酰胺和2% B_{27} 的IMDM 培养液诱导6天。此后, 陈立波等^[10]采用二步法将rBMMSCs 诱导分化成胰岛样细胞团。他们先用含10 mmol/L 尼克酰胺、1 mmol/L β 巯基乙醇和20% FCS的低糖DMEM 诱导24 h, 再用含10 mmol/L 尼克酰胺、1 mmol/L β 巯基乙醇的无血清高糖DMEM 诱导10 h; 或者先用含20 mmol/L 尼克酰胺和20% FCS的低糖DMEM 诱导24 h, 再用含20 mmol/L 尼克酰胺的无血清高糖DMEM 诱导10 h。陆琰等^[13]采用二步法将hBMMSCs 诱导分化成胰岛样细胞团。他们先用含10 ng/ml EGF和1 mmol/L

β 巯基乙醇的DMEM/F12培养液诱导6天, 再用含5% FBS的高糖DMEM 培养液诱导45~60天。此外, Oh等^[16]采用二步法将F-344大鼠骨髓细胞诱导分化为胰岛样细胞团, 他们将大鼠骨髓细胞用含10% FBS的DMEM 溶液培养60 min, 收集未贴壁细胞, 以 1×10^7 个/cm²的密度接种于含1% DMSO的无血清DMEM 培养液中诱导3天, 然后在含10% FBS的高糖DMEM 或低糖DMEM 溶液中培养7~10天。此方法虽然简单, 但针对的是未经扩增的骨髓细胞, 能否用于BMMSCs, 有待进一步研究。

3.3 一步法

用成分相同的培养液将BMMSCs 诱导成胰岛细胞称一步法。Choi等^[17]用含大鼠再生胰腺提取液、10% FBS和1% 抗生素的低糖DMEM 培养液将rBMMSCs 诱导2周后获得了胰岛样细胞团。他们制作大鼠再生胰腺提取液的方法是, 先对大鼠进行60%胰腺切除手术, 48 h后处死大鼠、取出胰腺, 在加蛋白酶抑制剂的PBS缓冲液中均浆, 经3 000 r/min和12 000 r/min低温离心后收集上清液, -70 保存。陈黎红等^[14]用含2g/L BSA、10 mmol/L 烟酰胺、25 μ g/L EGF、100 nmol/L GLP-1的无血清DMEM/F12培养液诱导14天, 将小鼠骨髓多能成体祖细胞诱导分化为胰岛素阳性细胞。

4 BMMSCs分化的胰岛细胞移植治疗糖尿病的动物实验

为了验证BMMSCs 体外分化的胰岛细胞是否能在体内发挥分泌胰岛素的功能、治疗糖尿病, 专家们还对体外分化胰岛细胞进行了糖尿病模型动物移植试验。陈立波等^[10]将经过体外诱导分化的BMMSCs 注射到链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病模型大鼠(n=3)体内(5×10^6 个/只), 1周后大鼠血糖水平与注射前相比有所下降, 而注射未分化MSCs的对照组(n=2)和空白对照组(n=1)的模型大鼠血糖水平与注射前相比没有下降。Tang等^[15]将由mBMMSCs 体外诱导分化的胰岛素生成细胞移植到STZ诱导的糖尿病模型小鼠(n=6)体内(5×10^6 个/只), 另外5只模型小鼠只做手术不移植细胞作为对照, 结果, 移植1周后模型小鼠的血糖水平降低并趋于正常化, 而对照组的模型小鼠血糖持续维持在高水平、体重减轻, 并且大多在成模后15到20天死亡。为了进一步评价移植细胞的功能, 他们用5只非糖尿病小鼠作对照, 对接受移植14天、血糖正常化的3只模型小鼠进行了

腹腔腔内葡萄糖耐受试验(intraperitoneal glucose tolerance test), 结果, 与对照组相比, 试验组小鼠的血糖除整体水平比较高外, 返回正常范围的时间也比较长。说明移植到小鼠体内的细胞确实对葡萄糖刺激有反应, 但恢复血糖到正常水平的效率还没有自然 β 细胞高。此外, Oh等^[16]将由大鼠骨髓细胞诱导分化的胰岛样细胞团(150个/只小鼠)移植到STZ诱导的糖尿病模型小鼠(n=9)肾囊内, 结果, 移植后2~3天血糖水平开始恢复正常。他们在移植后17天时将6只模型小鼠的移植物移去, 导致这些小鼠复发高血糖并且死亡。其余3只接受移植的模型小鼠血糖水平维持相对正常达90天。他们对移植物进行组织学、免疫化学分析证明, 移植细胞具有分泌胰岛素的功能和 β 细胞的典型结构。

5 存在问题与研究方向

体外诱导BMMSCs分化为胰岛细胞治疗糖尿病的研究虽然已经取得突破性的进展, 动物试验也取得显著效果, 但要真正进行临床应用还存在许多问题。

体外诱导BMMSCs分化为胰岛细胞的机制还不是十分清楚, 导致诱导方法多种多样, 时间长者几个月、短则34 h, 步骤多者3步、少则1步, 涉及的诱导因子或化学物质种类多者8种以上、少则仅1种, 有很大的研究空间和筛选余地; 诱导效果不尽人意, 大部分研究还未进行动物实验, 有的仅限于细胞形态观察。

诱导过程中BMMSCs死亡率很高, 有人研究证明, 将BMMSCs长期培养在高糖环境下有34~37%会发生死亡^[14]。

分化细胞的成团率和胰岛素阳性细胞的比率低(20%左右)。

胰岛素分泌量低。由于各人测试的细胞基数不同、用高糖刺激的时间长短不同和所采用的单位不同, 从数字上看差别较大, 数值也不小。但通过折算($1\mu\text{g/L}\times 172.2=1\text{pmol/L}$, $1\text{pmol/L}=1\text{mIU/ml}\times 6.965$), 与适合移植的尸体分离胰岛[胰岛素分泌量为

(2.12 ± 0.47) $\mu\text{IU}/(\text{胰岛}\cdot\text{min})$ ^[19], 细胞内胰岛素含量为(130.14 ± 12.24) $\mu\text{IU}/\text{胰岛}$ ^[20]]相比, 分化细胞胰岛素分泌量很低, 而且对高糖刺激的反应性也比较弱。

由此可见, 要想用BMMSCs诱导分化的胰岛细胞或胰岛样细胞团代替从尸体胰腺分离的胰岛、实现糖尿病自体细胞治疗, 还有许多难题需要研究。一方面应积极开展 β 细胞乃至胰岛的发育生物学和分子生物学调控机制研究, 以便减少体外诱导过程的盲目性, 提高针对性; 另一方面应在监测 β 细胞乃至胰岛特殊分子表达的基础上对目前所用的诱导因子和化学物质进行严格筛选, 逐步确定它们的诱导作用、作用时段和最佳用量, 进而优化体外诱导程序和方法, 提高诱导效率。尤其在促进BMMSCs增殖和分化、减少在分化过程中细胞死亡方面狠下功夫, 既要使细胞获得良好的分泌功能, 又要有足够的细胞数量。此外, 还应研究由BMMSCs诱导分化的 β 细胞移植到体内后是否具有自我复制能力, 是否会遭到自体免疫系统的破坏等问题。

参考文献(References)

- [1] Zimmet P et al. Diabet Med, 2003, 20: 693
- [2] 陆 琰等. 生命科学, 2006, 18: 75
- [3] 杨华章等. 实用医学杂志, 2004, 20: 1209
- [4] 董 丽等. 医学综述, 2006, 12: 43
- [5] Hess D et al. Nat Biotechnol, 2003, 21: 763
- [6] Ianus A et al. J Clin Invest, 2003, 111: 843
- [7] Moriscot C et al. Stem Cells, 2005, 23: 594
- [8] 李艳华等. 自然科学通报, 2003, 13: 593
- [9] 贾延劫等. 中国当代儿科杂志, 2003, 5: 395
- [10] Chen LB et al. World J Gastroenterol, 2004, 10: 3016
- [11] 刘雅娟等. 吉林大学学报(医学版), 2005, 31: 836
- [12] 武晓泓等. 中国临床康复, 2005, 9: 1
- [13] 陆 琰等. 暨南大学学报(医学版), 2005, 26: 729
- [14] 陈黎红等. 中国病理生理杂志, 2005, 21: 1797
- [15] Tang DQ et al. Diabetes, 2004, 53: 1721
- [16] Oh SH et al. Lab Invest, 2004, 84: 607
- [17] Shakhov VP et al. Bull Exp Biol Med, 2004, 137: 625
- [18] Choi KS et al. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 330: 1299
- [19] 周 毅等. 中华器官移植杂志, 2005, 26: 467
- [20] Marchetti P et al. Diabetes, 2002, 51: 1419

Transdifferentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Islet Cells to Treat Diabetes Mellitus

Yi-Hua Zhang, Zhong-Ying Dou*

*(The Research Centre of Stem Cell Engineering Technique in Shaanxi Province, Northwest
Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)*

Abstract Diabetes mellitus is a serious disease damaging human being's health. At present, the curative effect of transplantation of pancreatic islets used to treat diabetes mellitus appears. However, it is limited with the lack of pancreatic islets and immunological rejection. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs), easily separated, cultured and purified, have multi-differentiation potential. If BMMSCs are induced to transdifferentiate into islet cells, the problems of lacking pancreatic islets and immunological rejection can be entirely solved, and diabetes mellitus can be cured with patient's marrow cells. In this paper, the progress of transdifferentiation from BMMSCs into islet cells to treat diabetes mellitus was fully reviewed, and the problems and research directions were discussed.

Key words bone marrow mesenchymal stem cells; islet cells; cell transdifferentiation; diabetes mellitus

Received: May 8, 2006 Accepted: September 30, 2006

This work was supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No.2002AA216161) and the Key Program of Ministry of Education (No.03160)

*Corresponding author: Tel: 86-29-87080068, E-mail: zhongyingdou@126.com