

## 糖尿病 的 细胞 治疗 \*

冯仁青 \*\*

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

**摘要** 胰岛素产生细胞的缺陷或缺乏导致的 1 型糖尿病是影响人类健康的重大疾病之一。最近细胞移植和组织工程的研究进展,使得糖尿病的细胞替代治疗成为可能,即通过胰岛素产生细胞的移植治疗 1 型糖尿病和某些 2 型糖尿病。但是由于供体细胞缺乏的限制,使得糖尿病的细胞治疗难以广泛开展。胰腺干细胞将成为胰岛素产生细胞的潜在来源。就 1 型糖尿病的发病机制和治疗中存在的问题、胰腺干细胞的分离和分化、胰岛移植治疗糖尿病的局限性和干细胞治疗的必要性、糖尿病细胞治疗的探讨作如下介绍。

**关键词** 糖尿病 胰腺干细胞 细胞治疗

胰岛素依赖型糖尿病(1 型)是胰岛 细胞功能障碍,胰岛素分泌减少造成糖代谢紊乱,属于多基因遗传病,对糖尿病的基因治疗带来很大困难。干细胞治疗无需了解其发病的确切机制,能克服基因治疗的困难。近年来有胰岛移植的基础研究和临床实践报告,但是存在着移植物抗宿主反应,供体细胞缺乏等问题。胰腺干细胞的研究将有助于解决这些难题。如何定向诱导干细胞向所希望的细胞类型方向分化是药物开发,细胞治疗和组织替代治疗的重要途径,也是目前干细胞研究的热门领域。对造血干细胞和神经干细胞增殖分化的调控因素已有较深入的研究,但对胰腺干细胞的增殖和定向分化的研究尚处于初始阶段。

### 1 1 型糖尿病的发病机制和治疗中存在的问题

全世界有 1.5 亿人患有糖尿病,其中有 490 万人为 1 型糖尿病,在发达国家中 1 型糖尿病的发病率高达人群的 0.5%<sup>[1]</sup>。有些病人最初诊断为 1 型糖尿病,经过缓慢进展转化为 2 型糖尿病。1 型糖尿病是产生胰岛素的胰岛 细胞特异性的被破坏造成的自身免疫性疾病。有两个明显的阶段:胰腺炎阶段,胰岛中有白细胞浸润;糖尿病阶段,大部分

的胰岛 细胞被破坏,不能产生足够的胰岛素用于调节血糖浓度而导致高血糖的发生。有些人的胰腺炎时间很长,可以很多年,最终发展为糖尿病;而有些人可以不发展为糖尿病。

1 型糖尿病是原发性 T 淋巴细胞介导的疾病。免疫组织化学分析证明,在胰腺炎阶段,胰岛中有 T 淋巴细胞浸润;而且没有胸腺或 T 淋巴细胞的非肥胖型糖尿病小鼠(non-obese diabetic mouse, NOD mouse)不发生糖尿病。当将 1 型糖尿病小鼠的 T 淋巴细胞接种给健康的 NOD 小鼠后,糖尿病也被转移给受体小鼠<sup>[2]</sup>。Mathis 等推测可能的机制是:幼稚 T 淋巴细胞经过血液循环遇到抗原呈递细胞(antigen presenting cells, APCs, 可能是树突状细胞, dendritic cell)时,APCs 提供他们表面的 MHC 分子携带抗原,激活幼稚 T 淋巴细胞。当 APCs 定居于胰岛时,胰岛 细胞合成的蛋白质成为抗原。一小部分幼稚 T 淋巴细胞能识别 MHC 分子/ 细胞抗原复合物,接近胰腺组织时,再被激活或者被保留,成为自身免疫反应的根源<sup>[1]</sup>。

糖尿病属于多基因遗传病,发病机制非常复杂,常伴有难以治愈的并发症。然而我们对 1 型糖尿病的病因学和发病机制还知之甚少。如:哪些因素激发其发病?哪些遗传和环境因子调节其发病进程?最后的效应机制是什么?所以我们还缺乏有效的对 1 型糖尿病的预防和无损伤治疗的措施。虽然 1 型糖尿病病人每天注射胰岛素,可以控制糖尿病相对稳定,但是糖尿病可以导致晚期并发症,

收稿日期:2003-04-10

\*国家自然科学基金资助项目(30240007),教育部留学回国科研启动基金资助项目,北京大学校长基金资助项目

\*\*电子邮箱:rqfeng@pku.edu.cn

如:视网膜病,肾病和神经病变等。胰岛素替代疗法无法逆转糖尿病的并发症。

## 2 胰腺干细胞的分离和鉴定

一般认为,胰腺 Langerhans 岛的所有内分泌细胞,包括产生胰高血糖素的细胞、产生胰岛素的细胞、产生胰多肽的细胞(又称为 PP 细胞)和产生生长激素抑制激素的细胞等都自相同的导管上皮干细胞相继分化而产生。胰岛呈球形,以细胞为核心,细胞或细胞形成外套,细胞插于其间。细胞最为丰富,占胰岛的 60%~80%。胰岛作为一个微型器官,执行胰腺的内分泌生理功能。从导管细胞出芽形成球形岛结构,移入周围的滤泡组织,形成血管,允许小动脉直接流入成熟的胰岛。

近年来,有许多“神秘的胰岛干细胞”的观察,但是对是否存在真正的胰岛干细胞/祖细胞尚缺乏一致意见。由于缺乏特异性标志和可靠的测定系统,阻碍了胰岛干细胞的研究。许多推测的标志,如:cytokeratin20<sup>[3]</sup>,  $\alpha$ -galactosidase<sup>[4]</sup>, PDX-1<sup>[5]</sup>, tyrosine hydroxylase<sup>[6]</sup> and glucose transporter<sup>[7]</sup>, 在内分泌细胞分化过程中的某个阶段表达,而且内分泌细胞的增殖和分化受许多外界因子的影响。这些因素给胰岛干细胞的鉴定带来困难,多数实验室通过干细胞分化为成熟的细胞,鉴定其特异基因的表达,进而推断最初分离的细胞可能是胰岛干细胞。如 Bonner-Weir 等,用人胰腺导管组织在体外适当培养后,胰岛素的含量增加 10~15 倍,并且形成胰岛样结构,证明人胰腺导管中的部分细胞具有分化为胰岛细胞的潜能<sup>[8]</sup>。最近 Gu 等报告 Ngn3 + 细胞可能是胰岛祖细胞<sup>[9]</sup>。但是,Grapin-Botton 等报告,Ngn3 异位表达,足以将肠胚上皮细胞转化为胰高血糖素和生长激素抑制激素产生细胞,而不能导致胰岛素产生细胞的形成<sup>[10]</sup>。Ngn3 + 细胞和胰岛干细胞的关系有待进一步证明。

## 3 影响胰腺干细胞分化的因素

在胚胎发育晚期,细胞群可能通过两种机制扩增,即已经存在的细胞复制或者从胰管上皮细胞分化而来。在成年人体内也可以通过这种机制对胰岛的功能细胞进行调节。Bonner-Weir 等用特殊的培养基对人胰管上皮细胞进行培养,发现角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)和烟碱(Nicotinamide)对胰管上皮细胞向胰岛细胞分

化有促进作用<sup>[8]</sup>。在体外分化过程中,胰管上皮细胞能扩增产生多少胰岛细胞?生物工程学家还没有设计出从胰管上皮细胞向胰岛细胞分化的合适条件。

从小鼠胚胎干细胞得到能够产生胰岛素细胞的令人惊喜的报告。在胰岛素启动子控制下引入抗生素抗性基因,可以从胚胎干细胞选择胰岛素表达细胞,通过细胞捕获措施得到能够产生胰岛素的细胞<sup>[11]</sup>;或者经过多步骤培养条件的改变可以从小鼠胚胎干细胞得到能够产生胰岛素的细胞<sup>[12]</sup>。但是这些细胞是否细胞,还不清楚。

体外研究证明,胚胎胰腺出芽后在没有间充质时,内分泌细胞比外分泌细胞优先扩增;而在有间充质时,外分泌细胞优先扩增。说明间充质对胰腺细胞分化有一定的影响。但是具体机制还不清楚<sup>[13]</sup>。

一些研究组鉴定了一些因子可以诱导胰岛细胞在体内或体外的扩增<sup>[14~16]</sup>,这些因子包括胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、胎盘催乳素(placental lactogen, PL)、甲状旁腺激素相关蛋白(parathyroid hormone-related protein, PTHrP)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)等。HGF 是间充质分泌的一种细胞因子,对许多组织和细胞有促进分裂作用和抗细胞凋亡作用。HGF 对成年胰岛细胞是一种胰岛素亲和因子,可以诱导胰岛素的表达。HGF 在胰岛细胞中高度表达可以导致胰岛细胞的有丝分裂,分化和抗细胞凋亡作用。

关于影响推测的胰腺干细胞分化的因素还包括:葡萄糖、烟碱、精氨酸、Prla 等<sup>[17, 18]</sup>。

## 4 胰岛移植治疗糖尿病的局限性和干细胞治疗的必要性

由于 Shapiro 等在给 1 型糖尿病患者进行胰岛移植后,用非糖皮质激素类免疫抑制剂取得成功<sup>[19]</sup>,通过胰岛移植的细胞替代疗法引起了人们的极大兴趣。然而这种新方法(Edmonton protocol),需要至少从 2~3 人的供体胰腺中分离得到的胰岛才能用于一位糖尿病病人的胰岛移植。所以胰岛移植治疗糖尿病受到了供体细胞缺乏的限制。为

了使这种治疗用于成千上万的糖尿病患者成为可能, 必须寻找胰岛素产生细胞的新来源。科学家们首先考虑到的方法是开发干细胞资源。

干细胞有两个特征: 自我更新和向其他细胞类型分化的能力。干细胞的自我更新和分化受所暴露的局部特殊微环境的控制, 即所谓干细胞增殖和分化受微巢 (niche) 的影响。由于对每一种干细胞和它们的周围环境的鉴定和操作困难, 微巢还是一种理论结构。随着技术的进步, 对某些器官的微环境在保持和控制干细胞活性方面有所了解, 如: 睾丸, 皮肤和肠<sup>[20]</sup>。干细胞包括胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞来源于胚泡的内细胞群, 被认为是全能干细胞, 能分化为各种组织细胞, 当给严重免疫缺陷的小鼠 (severe combined immunodeficiency mice, SCID mice) 注射后, 可以形成畸胎瘤<sup>[21]</sup>。已经分离的哺乳动物多能干细胞包括 3 种: (1) 来源于睾丸肿瘤的胚胎癌细胞 (embryonal carcinoma cells, EC cells); (2) 来自于植入前的胚的胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES cells); (3) 来自于植入后的胚的生殖干细胞 (primordial germ cells, PGCs) 的胚胎干细胞 (embryonic germ cells, EG cells)<sup>[22]</sup>。如果来自于人胚的多能干细胞能像来源于小鼠的类似物一样, 将可以被用于许多人类疾病的治疗。但是存在着多能干细胞分化控制的问题, 如: 形成肿瘤, 和伦理学问题等。

成体组织可能是干细胞的来源, 成体干细胞存在于各种组织器官, 能分化为特定的组织细胞。在表皮组织, 造血组织, 间充质等组织中存在的有自我更新和多种分化潜能的干细胞已被鉴定。干细胞是器官发育和重建必需的细胞。这一特征使得干细胞成为基因治疗的理想靶。干细胞也提供了用“器官重建”来治疗器官功能衰竭的可能性, 而不是用器官移植或人工器官。所以干细胞的鉴定和研究对细胞移植, 基因治疗和组织工程非常重要。

皮肤和小肠上皮细胞不断更新, 所以皮肤和小肠上皮含有能分化为相应细胞类型的干细胞。成体干细胞的分化能力被认为是有限的。最近有一些横向分化的报告, 如从骨髓分离的造血干细胞可以分化为肌细胞, 肝细胞, 神经细胞等<sup>[23]</sup>。但是 Terada 等通过核型检查报告, 骨髓细胞移植后, 通过细胞融合而采取其他细胞的表型, 这提示干细胞

的横向分化还有待进一步研究<sup>[24]</sup>。

在人和大鼠的胰岛中分离出表达神经干细胞标志巢蛋白 (nestin) 的细胞, 推测是胰岛内的干细胞<sup>[25]</sup>。就像肝脏中的卵圆细胞一样, 在胰岛组织中可能包埋着没有分化的多能干细胞。发现胰岛干/祖细胞的新抗原标志对胰岛干/祖细胞的鉴定非常重要, 将会为 1 型糖尿病的治疗开辟新途径。体外培养得到胰岛素产生细胞的成功实验<sup>[17, 26, 27]</sup>, 为糖尿病的细胞治疗带来曙光。

## 5 糖尿病细胞治疗的探讨

近年来, 许多研究组进行了糖尿病细胞治疗的相关研究。如: Ramiya 等将胰岛祖细胞移植到糖尿病小鼠的肾被膜下, 糖尿病小鼠在停用胰岛素的情况下, 血糖恢复正常水平<sup>[17]</sup>。Garcia-Ocana 等报道将转基因高度表达 HGF 的细胞移植给糖尿病小鼠, 可以明显改善胰岛功能和胰岛移植物的产量<sup>[16]</sup>。Cornelius 等从成年小鼠胰腺分离出多能干细胞, 移植给 NOD 糖尿病小鼠后, 在停用胰岛素的情况下血糖正常可达到 50 天之久<sup>[26]</sup>。Oberholzer 等对接受自体胰岛移植和异体胰岛移植的病人进行追踪观察, 发现早期胰岛功能得到改善, 但是接受自体胰岛移植的病人, 由于发生胰腺炎, 而出现胰岛功能衰竭; 接受异体胰岛移植的病人, 由于移植体导致的反应性抗体最后出现胰岛功能衰竭<sup>[28]</sup>。

胰岛移植的实用性将使糖尿病患者得到治愈, 不仅能从胰岛素注射的负担, 葡萄糖试验和饮食限制中解放患者, 而且更重要的是可以避免糖尿病的严重并发症。随着对胰岛干细胞和胰岛细胞体外分化研究的深入, 我们有希望能得到足够的胰岛干细胞/祖细胞, 然后进行筛选, 得到所希望的细胞类型。对胰岛干细胞和胰岛细胞体外分化研究能够提供体外遗传操作的机会, 以达到保护胰岛移植体避免受细胞免疫和体液免疫的攻击, 能克服糖尿病细胞治疗中存在的问题。

致谢: 北京大学生命科学学院丁明孝教授在百忙中审校此稿, 对此稿提出了宝贵意见, 作者深表感谢。

## 参考文献

- [1] Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 2001, 13, 414(6865): 792 ~ 798
- [2] Bach J F, Mathis D. The NOD mouse. *Res Immunol*, 1997, 148

- (5) :285 ~ 286
- [ 3 ] Bouwens L , De Blay E. Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas. *J Histochem Cytochem* , 1996 ,44(9) :947 ~ 951
- [ 4 ] Beattie G M , Levine F , Mally M I , et al. Acid betagalactosidase : a developmentally regulated marker of endocrine cell precursors in the human fetal pancreas. *J Clin Endocrinol Metab* , 1994 ,78(5) :1232 ~ 1240
- [ 5 ] Jonsson J , Carlsson L , Edlund T , et al. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* , 1994 ,371(6498) :606 ~ 609
- [ 6 ] Teitelman G , Joh T H , Reis D J. Transformation of catecholaminergic precursors into glucagon (A) cells in mouse embryonic pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1981 ,78(8) :5225 ~ 5229
- [ 7 ] Pang K , Mukonoweshuro C , Wong G G. Beta cells arise from glucose transporter type 2 (Gut2)-expressing epithelial cells of the developing rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1994 ,91(20) :9559 ~ 9563
- [ 8 ] Bonner-Weir S , Taneja M , Weir G C , et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2000 ,97(14) :7999 ~ 8004
- [ 9 ] Gu G , Dubauskaite J , Melton D A. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3 + cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* , 2002 ,129(10) :2447 ~ 2457
- [10] Grapin-Botton A , Majithia A R , Melton D A. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev* , 2001 ,15(4) :444 ~ 454
- [11] Thomas J M , Contreras J L , Smyth C A , et al. Successful reversal of streptozotocin-induced diabetes with stable allogeneic islet function in a preclinical model of type 1 diabetes. *Diabetes* , 2001 ,50(6) :1227 ~ 1236
- [12] Lumelsky N , Blondel O , Laeng P , et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* , 2001 ,292(5520) :1389 ~ 1394
- [13] Miralles F , Czernichow P , Scharfmann R. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* , 1998 ,125(6) :1017 ~ 1024
- [14] Schuldiner M , Yanuka O , Itskovitz-Eldor J , et al. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2000 ,97(21) :11307 ~ 11312
- [15] Otonkoski T , Cirulli V , Beattie M , et al. A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in fetal mesenchyme-induced pancreatic beta-cell growth. *Endocrinology* , 1996 ,137(7) :3131 ~ 3139
- [16] Garcia-Ocana A , Vasavada R C , Cebrian A , et al. Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the beta-cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice. *Diabetes* , 2001 ,50(12) :2752 ~ 2762
- [17] Ramiya V K , Maraist M , Afors K E , et al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* , 2000 ,6(3) :278 ~ 282
- [18] Kawaguchi Y , Cooper B , Gannon M , et al. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* , 2002 ,32(1) :128 ~ 134
- [19] Shapiro A M , Lakey J R , Ryan E A , 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
- [20] Spradling A , Drummond-Barbosa D , Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* , 2001 ,414(6859) :98 ~ 104
- [21] Thomson J A , Itskovitz-Eldor J , Shapiro S S , et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* , 1998 ,282(5391) :1145 ~ 1147
- [22] Donovan P J , Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* , 2001 ,414(6859) :92 ~ 97
- [23] Weissman I L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* , 2000 ,287(5457) :1442 ~ 1446
- [24] Terada N , Hamazaki T , Oka M , et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* , 2002 ,416(6880) :542 ~ 545
- [25] Zulewski H , Abraham E J , Gerlach M J , et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine , exocrine , and hepatic phenotypes. *Diabetes* , 2001 ,50(3) :521 ~ 533
- [26] Cornelius J G , Tchernev V , Kao K J , et al. In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Horm Metab Res* , 1997 ,29(6) :271 ~ 277
- [27] Yang L , Li S , Hatch H , et al. In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2002 ,99(12) :8078 ~ 8083
- [28] Oberholzer J , Triponez F , Mage R , et al. Human islet transplantation: lessons from 13 autologous and 13 allogeneic transplantations. *Transplantation* , 2000 ,69(6) :1115 ~ 1123

## Cell Therapy for Diabetes Mellitus

Feng Renqing

(College of Life Sciences, Peking University Beijing 100871)

**Abstract** Lack or defect of insulin-producing cells produces type 1 diabetes mellitus. It is a common disease, affecting human's health. Recently, it is possible to apply cell replacement therapy to diabetes mellitus, with the progress on cell transplantation and tissue engineering. However, cell replacement therapy for diabetes is limited by the scarcity of donor cells. Pancreatic stem cells may be a potential source of insulin-producing cells. The recent research in this aspect was reviewed.

**Key words** Diabetes mellitus Pancreatic stem cells Cell therapy

---

### 2003 年全国生化与生物技术药物学术研讨会

随着高级生化分离技术和生物技术的发展,研究开发生化和生物技术药物已成为 21 世纪医药科研的热点。为促进我国医药工作者在生化和生物技术药物研究领域的交流与合作,提高我国在该领域药物研究的整体水平,中国药学会定于 2003 年 8 月 10~15 日在辽宁省丹东市召开“2003 年全国生化与生物技术药物学术研讨会”,国内著名生化与生物技术药物研究专家将作专题报告,同时就以下 11 个主要方面进行研讨与交流。

1. 生化药物的最新研究进展与展望;2. 生物技术(基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程)药物的研究进展与展望;3. 动植物、微生物、海洋生物活性成份(蛋白质、多肽、核酸、多糖等)及相关生物工程药物的开发的临床应用研究;4. 特种动植物活性成份的开发应用和稀有药用植物的人工培育及替代产品的研究开发;5. 生化与生物药物分离纯化、结构修饰、质量分析监控的新工艺、新方法和新技术;6. 生化与生物技术药物新剂型、临床新应用的研究开发;7. 生化与生物技术诊断试剂研究进展与临床应用;8. 基因(蛋白)芯片的研究进展与临床应用;9. 人类基因组计划(HGP)与基因医药研究开发;10. 基因治疗与体细胞治疗;11. SARS 病原生物学、SARS 病毒致病机理、SARS 疾病控制原理和检测试剂、疫苗、防治药物研究。

会议联系地址:北京市复兴门内大街 45 号 118 信箱(100801),联系人:王秀红、安丽萍,电话(传真):(010)66095677, E-mail: ann79@sohu.com。会议通知全文请登陆中国生物技术信息网 [www.biotech.org.cn](http://www.biotech.org.cn) 查询。