

文章编号:1009-0002(2004)01-0089-03

综述

I 型糖尿病的细胞治疗

张旭辉,郭希民 综述;王常勇 审校
军事医学科学院 组织工程研究中心,北京 100850

摘要: 糖尿病是一种代谢系统紊乱疾病,全世界大约有 2%~5% 的人口患有此种疾病。I 型糖尿病病因在于中枢及外周免疫系统 β 细胞特异性分子免疫耐受的丧失,破坏 β 细胞,为此需要依赖外源性胰岛素治疗。I 型糖尿病的传统治疗方法存在各种问题,而作为一种糖尿病治疗的有效方法,糖尿病细胞治疗与以往方法相比具有不可替代的优势。本文着重介绍几种通过细胞水平治疗糖尿病的方法,分析了各种方法存在的优势与不足。

关键词: 糖尿病;细胞治疗;干细胞;胰腺; β 细胞

中图分类号: R587.1

文献标识码: A

Cell replacement therapy of type I diabetes mellitus

ZHANG Xu-hui, GUO Xi-min, WANG Chang-yong

Tissue Engineering Research Center, Institute of Basic Medical Sciences,
Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: Diabetes mellitus is a metabolic disorder affecting 2%~5% of the population, the cause of type I diabetes mellitus is the loss of immunologic tolerance. However, the traditional treatment of type I diabetes has various problems. As a new sufficient treatment of diabetes, cell replacement therapy of diabetes has its own priorities. In this review, we discuss several cell treatment methods of type I diabetes were discussed, and their advantages and disadvantages were analysed. In conclusion, cell replacement therapy of I type diabetes mellitus will take on a new prospect for diabetes patients and their families.

Key words: diabetes mellitus; cell therapy; stem cell; pancreas; β cell

随着生活水平的提高、人均寿命的延长和体力活动的减少,以及精神和免疫系统功能障碍等因素,糖尿病的患病率在世界范围内呈明显上升趋势,到 2010 年全世界糖尿病患者预计将超过 3.5 亿例^[1];晚期糖尿病综合症给社会和患者家庭带来巨大的经济和精神负担,并已成为全球关注的卫生保健问题^[2]。细胞治疗是近十年来在分子生物学、分子免疫学及细胞生物学基础上发展起来的一种治疗疾病的新方法,能够在生理水平上实现对血糖的调控,副作用及并发症的发生率都降低,相对简单安全,且随着基因工程技术和干细胞技术的发展,将解决供体短缺的问题,所以糖尿病细胞治疗作为一种新的潜在的糖尿病治疗方法已逐渐引起了人们的广泛关注。本文将从传统的 I 型糖尿病治疗方法存在的问题、糖尿病治疗的细胞来源、免疫防护等几个方面对其进行综述。

1 I 型糖尿病传统治疗方法存在的问题

I 型糖尿病病人的自身免疫反应能够选择性地破坏 β 细胞,而 β 细胞是一种终末分化细胞,其再生能力十分有限,所以 I 型糖尿病病人需要进行长期的胰岛素治疗^[3]。传统的糖尿病治

疗方法主要是应用降糖药物和注射胰岛素,这些方法在改善症状、降低糖尿病相关疾病死亡率的同时,存在药物引发的副作用以及抗药性、安全性、方便性等一系列问题^[4],特别是糖尿病晚期引发的肾病、视网膜病、心血管和末梢神经系统等并发症,仍是糖尿病治疗中重要而艰巨的问题。正因如此,国内外科学家探索用细胞治疗的方法治疗 I 型糖尿病,并已取得了初步效果。

2 I 型糖尿病细胞治疗的细胞来源

2.1 胚胎干细胞(embryonic stem cell,ESC)

胚胎干细胞是一种全能干细胞,具有在体内形成各种成熟组织、在体外诱导分化成各种类型细胞的能力。具有多分化潜能的 ESC 可为糖尿病的细胞治疗提供潜在的细胞来源。在特定的分化条件下,ESC 能够在体外分化增殖^[5-6]。人类及鼠的 ESC 都能够分化增殖形成含有胰岛素分泌细胞的混合细胞。将这些细胞植入 STZ 糖尿病模型鼠中,能使高血糖症状得到控制。将源于鼠 ESC 的 nestin 阳性细胞扩增,结果胰岛素分泌细胞数目也显著增加^[7]。尽管与 β 细胞相比这些细胞分泌胰岛素的量较低,但它们能够按照血糖的生理水平分泌胰岛素。

β 细胞替代治疗的关键是对胰岛素分泌的调控。不能按生理需要分泌胰岛素的 β 细胞并不适合细胞替代治疗,所以由 ESC 诱导生成胰岛素分泌细胞必须包括分泌调控旁路的诱导,这样

收稿日期:2003-07-09

作者简介:张旭辉(1977-),女,硕士研究生。

E-mail: zhanghhsnow@hotmail.com

才能使细胞按照不同的生理信号进行胰岛素的储存释放。尽管分化伴随着细胞增殖能力的降低,在移植过程中还应严格控制未调控细胞的增殖^[8,9]。

胚胎干细胞在特定条件下能够诱导分化生成几种类型细胞,如心肌细胞(中胚层细胞)、神经原代细胞(外胚层)、胰岛素分泌细胞(内胚层),其向某一特定细胞方向分化是由细胞密度、生长因子、细胞极化等许多因素共同作用的结果,所以如何建立适宜的体外诱导分化体系,并纯化定向分化的目的细胞是胚胎干细胞诱导分化面临的一大难题。

2.2 胰腺干细胞(pancreas stem cell)

通过对胰腺损伤模型的研究,发现胰腺导管上皮细胞可为胰岛再生提供细胞资源。近年来人们对胰岛细胞的分化生长、胚胎发育等进行了大量研究,发现在胚胎早期的发育过程中,胰岛细胞是从胰腺导管分化而来的^[10],在成熟个体中胰腺导管仍具有增生分化的潜能。胰腺导管可以通过快速增生丧失其导管表型而转变为多潜能干细胞,在某些外界条件的刺激下分化为胰岛细胞。Gmyr等在体外培养的胰腺组织中,利用特定的细胞生长因子及相关条件能够成功诱导干细胞分化为胰岛细胞并形成有胰岛分泌功能的胰岛样小体^[11-13]。

研究表明胰腺干细胞主要存在于胰腺导管和外分泌部。目前,胰腺干细胞体外增殖的方法是,在解剖显微镜下将胰腺导管与其它组织分离,经胰酶消化制成单细胞悬液,然后置于培养液中培养实现胰腺导管上皮细胞的原代培养,而后将增殖培养基改为分化培养基,诱导胰管上皮细胞向类胰岛样小体方向分化。在此分化过程中,细胞CK-7表达逐渐下降,而PDX-1表达则明显增强。

常规培养基中加入EGF、bFGF能促进上皮细胞生长,诱导培养基中加入HGF、烟酰胺、伸展因子-4、活化素-A等生长因子,可诱导类胰岛素小体形成。然后利用双硫腺染色、抗胰岛素抗体免疫组化、葡萄糖刺激实验等鉴定体外培养 β 细胞活性。

与其它几种糖尿病细胞治疗的细胞来源相比较,胰腺干细胞体外诱导培养生成胰岛素分泌细胞不涉及医学伦理问题;此外体外培养胰岛细胞不存在免疫排斥与供体短缺问题。虽然尚未确定胰腺干细胞可否无限分裂增殖,但研究表明,胰腺干细胞至少可以传7代以上,所以适于体外大量扩增。用于移植的胰腺干细胞可预先与宿主HLA配型,进一步降低免疫排斥反应的可能性;动物实验也表明由胰腺干细胞分化所得的类胰岛组织植入动物后,无明显的免疫排斥现象。

2.3 基因工程化胰岛素分泌细胞

通过转入癌基因,可实现啮齿类动物 β 细胞的大量增殖,但在有丝分裂后期由于细胞的复制使其胰岛素的分泌水平降低。更值得重视的是上述细胞在缺乏调控下进行的细胞增殖有致肿瘤的危险,所以并不适合用来移植。近年来随着条件基因表达系统深入研究,推动了基因工程化胰岛素分泌细胞的发展,Efrat^[14]等通过引入条件基因表达系统能够使癌基因表达呈逆向调控,并能够对细胞数目进行精密调控,从而增进细胞功能。在转基因鼠中,在四环素操纵子调控下,SV40大T抗原癌蛋白表达能够促使 β 细胞在维持正常分化表型的条件下增殖^[14,15]。这些细胞易于增殖且能够产生大量胰岛素,具有正常的葡萄糖敏感性。当把上述细胞植入糖尿病模型鼠中后,能够使血糖迅速恢复正常并维持数月。

迄今还未实现可转归人 β 细胞无限增殖。原因如下:首先,即使转入癌基因,人 β 细胞也很难象鼠 β 细胞那样无限增殖。利用逆转录病毒作为载体可将SV40大T抗原癌基因转入人胰岛细胞中,从而实现 β 细胞的增殖,但人类 β 细胞增殖需要亚癌基因表达,以及人H-ras基因的激活,同时还需要调控这些细胞表达正常人体细胞不能表达的端粒酶^[16]。如果没有端粒酶表达,细胞每分裂一次端粒会缩短一次,最终会导致染色体破坏而导致细胞死亡^[17],而鼠细胞却由于其端粒较长而没有此类现象发生。其次,与鼠 β 细胞相比,人类永生化的 β 细胞由于不表达胰岛素转录因子而更易缺失分化功能。转入同源结构域转录因子Pdx1,协同伸展因子-4(类高血糖素多肽-1的同系化合物)可恢复细胞分泌胰岛素的功能。在组织培养过程中,细胞呈现出葡萄糖反应性胰岛素分泌;然而将这些细胞植入裸鼠后,由于持续的癌基因表达,可使许多动物产生肿瘤。Cre-loxp系统能够扼制癌基因表达,用含cre基因的腺病毒转染细胞,可使致瘤率降低。但是目前即使利用强有效的癌基因抑制系统,离将这种转化细胞应用于移植这一目标还相距甚远,所以从安全角度考虑,我们还需利用将细胞微囊化、引入自杀基因等手段来减少此项技术的潜在弊端。

利用基因工程技术还可通过将pGIP/Ins和pGIP/neo两种质粒共转染,诱使肠道K细胞分泌胰岛素。肠道K细胞是肠内分泌细胞的一种,是一类分布广泛的激素分泌上皮细胞,在调节胃肠系统及维持生理功能上起重要作用。尽管肠道内皮细胞仅占肠道上皮细胞的1%,但它却是体内最大的内分泌器官。肠道K细胞与 β 细胞具有相类似的葡萄糖反应旁路,利用这一基因结构特点,将胰岛素基因转入K细胞中,可诱使肠道K细胞分泌胰岛素^[18]。Ferber等已成功利用Pdx1腺病毒载体诱导 β 细胞基因表达使肝干细胞向类 β 细胞分化^[19]。

随着基因工程技术的发展,基因工程化胰岛素分泌细胞必将为糖尿病的细胞治疗提供丰富的细胞来源,最终达到治疗糖尿病的目的。

2.4 异体胰岛细胞

异体移植方法治疗糖尿病包括胰岛细胞移植和胰腺整体移植,上述两种方法均存在供体来源有限的问题而限制了进一步临床应用。虽然全胰腺移植的成功率很高,但手术过程繁杂且需要免疫抑制剂治疗,而且通常是在肾衰病人中实行胰肾联合移植术中才采用^[20]。尽管近年来免疫抑制技术不断提高,但是供体短缺仍是异体移植治疗面临的棘手问题,基于上述原因,国内外研究人员正在寻找其他获取胰岛素分泌细胞的途径和方法^[21,22]。

2.5 异种胰岛细胞

异种移植是解决胰岛细胞来源的途径之一。在众多异种胰岛细胞供体中,由于猪胰岛素和人的在结构上只差一个氨基酸,而且来源广泛,所以猪胰岛最适合作为糖尿病细胞治疗的供体。但由于异种移植胰岛细胞的死亡率高,免疫排斥反应强,并存在逆转录病毒跨物种感染等一系列问题,所以异种移植应用于临床仍还遥远。

3 糖尿病细胞治疗的免疫防护

免疫抑制剂对于严重的糖尿病综合症免疫防护有效,但却不适用于糖尿病儿童的长期给药,所以研究人员还应利用免疫防

护手段,用细胞微囊化、胸腺内细胞接种等方法来对糖尿病细胞治疗提供足够的免疫防护。

通过啮齿类动物的研究表明,单纯的 β 细胞就可以替代整个胰岛的功能。如 I 型糖尿病患者具有足够的非 β 细胞(γ 、 δ 、 α 细胞),这些细胞能够通过内分泌反馈环与植入 β 细胞形成连接,因此糖尿病的细胞替代治疗旨在体外培养纯化的 β 细胞,而无需构造完整的胰岛结构。

目前并没有理想的替代同基因 β 细胞移植的方法。今后研究人员将探索将闭环胰岛素泵与葡萄糖反应装置连接在一起,这样会使胰岛素的释放与储存更加便利准确^[23]。在大量生理信号整合下仅 β 细胞移植即可提供精确的胰岛素分泌。同时,异基因胰岛移植也是另一可行方法,但它需解决免疫排斥及逆转录病毒跨物种感染等问题。

糖尿病是一种严重危害人类健康的疾病,并且发病率近年来存在逐年上升趋势,糖尿病的细胞治疗与传统的治疗方法相比,能够实现生理意义上对血糖的调控、副作用小、并发症少、安全性高。将干细胞技术、基因工程技术与糖尿病的细胞治疗技术相结合,将为糖尿病的治疗开辟一个全新的领域,给糖尿病患者及家庭带来福音。

参考文献

- [1] Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000,97:7999
- [2] Weir GC, Bonner-weir S. Islet transplantation as a treatment for diabetes[J]. Diabetes,1997,46:1247
- [3] Cornelius JG, Tchernev V, Kao KJ. *In vitro*-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas[J]. Horm Metab Res, 1997,29:271
- [4] Bretzel RG, Brendel M, Eckhard M. Islet transplantation: present clinical situation and future aspects [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001,109:384
- [5] Halvorsen TL, Beattie GM, Lopez AD. Accelerated telomere shortening and senescence in human pancreatic islet cells stimulated to divide *in vitro*[J]. J Endocrinol, 2000,166:103
- [6] Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science,1998,282:1145
- [7] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets [J]. Science, 2001,292:1389
- [8] Edlund H. Pancreas: how to get there from the gut[J]? Curr Opin Cell Biol, 1999,11:663
- [9] Shin DQ, Stoffel M. Dissecting the transcriptional network of pancreatic islets during development and differentiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001,98:14189
- [10] Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells[J]. Diabetes, 1997,46:1733
- [11] Gmyr V, Keer-Conte JV, Ewalle C. Human pancreatic ductal cells: large-scale isolation and expansion[J]. Cell Transplantation, 2001, 10:109
- [12] Gu D, Sarvetnick N. Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN- γ transgenic mice[J]. Development, 1993,118:33
- [13] Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000,97:7999
- [14] Efrat S, Fusco-Demane D, Lemberg H. Conditional transformation of a pancreatic β cell line derived from transgenic mice expressing a tetracycline-regulated oncogene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995,92:3576
- [15] Fleischer N, Chen C, Surana M. Functional analysis of a conditionally-transformed pancreatic β cell line[J]. Diabetes, 1998,47:1419
- [16] Milo-Landesman D, Surana M, Berkovich I. Correction of hyperglycemia in diabetic mice transplanted with reversibly-immortalized pancreatic β cells controlled by the tet-on regulatory system [J]. Cell Transplant, 2001,10:645
- [17] Alvorsen TL, Leibowitz G, Levine F. Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis [J]. Mol Cell Biol, 1999,19:1864
- [18] Cheung AT, Dayanandan B, Lewis JT. Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells[J]. Science, 2000,290: 1959
- [19] Ferber S. Pancreatic and duodenal homeobox genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia[J]. Nat Med, 2000,6: 568
- [20] Soria B, Skoudy A, Martin F. From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus[J]. Diabetologia, 2001, 44:407
- [21] Sutherland DER. In Diabetes Mellitus, A Fundamental and Clinical Text [A]. In: Pancreas transplantation [C]. Lippincott: Williams & Wilkins, 2000,518
- [22] Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA. Islet transplantation in seven patients with type 1 Diabetes mellitus using a glucocorticoid free immunosuppressive regimen[J]. New Eng J Med, 2000,343:230
- [23] Bach FH. Uncertainty in xenotransplantation: individual benefit versus collective risk[J]. Nat Med, 1998,4:141