

胰腺干细胞及其治疗糖尿病的研究进展

宋振顺, 安家泽

宋振顺, 安家泽, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科
陕西省西安市 710032

宋振顺, 男, 1961-1-30 生, 上海市人, 汉族, 1984 年第四军医大学本科毕业, 教授, 主要从事肝胆外科疑难疾病的诊治及肝移植、胰腺干细胞的研究。

通讯作者: 宋振顺, 710032, 陕西省西安市长乐西路 15 号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科, zhenshunsong@yahoo.com.cn
电话: 029-83373564

收稿日期: 2005-03-12 接受日期: 2005-03-23

摘要

胰岛素产生细胞的缺陷或缺乏导致的 I 型糖尿病是影响人类健康的重要疾病之一。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, 供体的缺乏和移植排斥反应制约了胰岛移植的广泛应用, 胰腺干细胞将成为胰岛素产生细胞的潜在来源, 随着干细胞领域研究的深入, 胰腺干细胞分离及诱导分化技术的进步将有助于解决这一问题。

关键词: 干细胞; 糖尿病

宋振顺, 安家泽. 胰腺干细胞及其治疗糖尿病的研究进展. 世界华人消化杂志
2005;13(9):1052-1054
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1052.asp>

0 引言

近年来糖尿病患病率不断增加, 我国人口患病率与发达国家的 5% 相近, 已经成为患者和社会的巨大负担, 人们在不断寻找新的治疗方法。胰岛移植治疗糖尿病已取得了突破性进展, 然而这种新方法一般需要至少从 2-3 人的供体胰腺中分离得到的胰岛用于 1 例糖尿病患者的胰岛移植, 供体的缺乏和移植排斥反应制约了胰岛移植的广泛应用^[1]。为了使这种治疗用于广大糖尿病患者, 必须寻找胰岛素产生细胞的新来源。由于干细胞具有无限自我更新以及可进行高度分化的能力, 人们首先考虑到的方法是开发干细胞资源。随着干细胞领域研究的深入, 胰腺干细胞移植成为目前糖尿病治疗研究的热点之一。

1 胰腺干细胞来源

1.1 胚胎干细胞来源的胰腺干细胞 胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 具有全能性或多能性, 在适当条件下可被诱导分化为多种细胞或组织。Lumelsky *et al*^[2] 成功诱导胚胎干细胞分化出了胰岛细胞, 将培养出的胰岛移植到链脲霉素诱导的糖尿病小鼠皮

下, 发现其呈现正常胰岛的形态, 能够血管化, 且能够维持动物体重, 显著延长糖尿病小鼠的生存时间。Assady *et al*^[3] 报道在体外培养和诱导人胚胎干细胞 (hES-H9) 分化为具有 β 细胞特征可合成、分泌胰岛素的细胞, 并且表达葡萄糖转运体 2 (GLUT2) 和葡萄糖激酶 (GK)。

1.2 成体干细胞来源的胰腺干细胞

1.2.1 来源于胰腺导管上皮细胞的胰腺干细胞 Bonner-Weir *et al*^[4] 在体外分离出人胰腺导管细胞, 经培养后出现有组织结构的胰岛样细胞团, 即 CHIBs (culture human islet buds)。在 CHIBs 中有细胞角蛋白 19 (cytokeratin-19, CK-19) 阳性的导管细胞和胰岛素阳性的胰岛细胞。CHIBs 能分泌低浓度胰岛素并对葡萄糖刺激产生反应。我们也使用人胰腺组织在体外培养转分化出较多具有内分泌功能的胰岛, 也证明了成人胰腺的导管上皮具有干细胞潜能。

1.2.2 其他细胞转分化得到胰岛素分泌细胞 转分化 (transdifferentiation) 是指一种已分化的组织细胞分化为另一种组织细胞的不可逆过程, 包括了细胞形态、功能及表面标记物变化。Ferber *et al*^[5] 将含有 pdx-1 基因和巨细胞病毒启动子的重组腺病毒注入鼠尾静脉后, 检测到 pdx-1 基因主要在肝脏表达, 他能诱导内源性鼠胰岛素 I 和 II 的表达。注射了上述重组腺病毒的糖尿病小鼠的血糖从 6 g/L 缓慢降到 2 g/L, 这表明一部分肝细胞在外源基因的作用下可能发生转分化而表达胰岛素。Suzuki *et al*^[6] 也报告成功从肝脏干细胞诱导分化产生出胰腺 β 细胞。

2 胰腺干细胞分子标志

2.1 胰十二指肠同源异型盒基因 (pdx-1) 胰腺干细胞发育过程中表达的第 1 个分子标记是 1 个同源区蛋白, 即 PDX-1。pdx-1 对于出现在肠内胚层背侧及腹侧的胰腺萌芽的生长分化起重要作用, pdx-1 的纯合子缺失突变会导致胰腺无法形成^[7]。pdx-1 阳性胚胎胰腺干细胞向内分泌细胞分化是多步骤的, pdx-1 阳性导管样细胞也可产生外分泌腺泡细胞。

2.2 细胞角质蛋白 19 (cytokeratin-19, CK-19) Gmyr *et al*^[8] 发现成人 CK-19 阳性细胞能在体外再表达胰岛素促进因子 1 (insulin promoter factor 1) 进一

步表明人胰腺多能前体细胞的存在, 也表明CK-19可能为胰腺前体细胞的分子标志之一。

2.3 细胞角质蛋白 20(cytokeratin-20, CK-20) 胰腺起源于妊娠第10 d的原始前肠, 能定向分化成内外分泌细胞的原分化上皮细胞也于此时出现. 这些原分化上皮细胞表达1种细胞角质蛋白20, 是成熟导管细胞的1个特异标志. 胰腺内分泌细胞最初形成有2种机制: (1) 在胚胎胰腺发育初期, 形成大的CK-20阳性导管细胞集落, 位于该集落中心的细胞逐渐分化成激素分泌细胞, 即所谓的胰岛形成单位. 在这一过程中, CK-20的表达随着原分化细胞的分化而逐渐减少, 最终形成CK-20阴性的胰岛细胞. (2) 内分泌细胞最初形成于导管内衬中CK-20阳性细胞, 然后以出芽的形式从导管内衬脱离出来进一步分化成CK-20阴性胰岛细胞. 无论哪一种机制, CK-20都可作为胰腺干细胞或者始祖细胞的一个分子标志^[9].

2.4 巢蛋白(nestin) 巢蛋白是一高分子质量中间丝蛋白, 在分化细胞中巢蛋白表达于纤维母细胞, 而未见表达于上皮细胞, 但在未分化始祖上皮细胞中却可见其表达. Peters *et al*^[10]通过将表达有巢蛋白的胰腺导管未分化上皮样细胞诱导分化成胰岛细胞的1个亚群, 证明巢蛋白是胰腺干细胞的1个分子标记物, 他可能起着促进胰腺内分泌干细胞分化的作用.

2.5 神经元素3(ngn3) Jensen *et al*^[11]认为属于bHLH转录因子家族的Ngn3在胚胎最早期呈点状分布于背侧胰腺萌芽, 即内分泌细胞起始发育的部位. Ngn3是在胰腺发育过程中短暂表达的bHLH家族蛋白, 他是胰腺内分泌细胞系的定向因子, 且在成熟胰岛中不存在. 用PDX-1启动子促进转基因小鼠中早期胰腺前体细胞中Ngn3表达, 会导致内分泌细胞数增加, 外分泌细胞数减少.

2.6 其他的分子标志 Schmied *et al*^[12]通过将胰岛细胞长期培养并退化为未分化导管样上皮细胞, 发现波形蛋白限制性表达于这些未分化的具有向胰腺内外分泌细胞分化潜能的干细胞中, 从而认为波形蛋白也可作为胰腺干细胞的1个标志. 近来, 有学者研究发现kit基因在部分胰腺导管上皮细胞中呈高表达, 提示其可能是 β 细胞亚群的标志物^[10].

3 胰腺干细胞的分离、培养

3.1 胰腺干细胞的分离 胰腺导管上皮是具有干细胞潜能的一类细胞, 其在胰腺中所占比例甚少, 约占1%. 目前成人、动物胰腺导管上皮细胞的分离多采用胶原酶消化法^[13]. 消化后胰岛已从外分泌组织中释放出来, 但仍与外分泌组织混悬. 由于内、外分泌组织的密度不同, 可用密度梯度离心法将他们纯化. 如消化

的胰腺组织较多, 可用Euro-Ficoll或Lymphaprep或Ficoll液在COBE 2991细胞分离机中进行连续密度梯度离心, 亦可对少量组织采用非连续密度梯度离心纯化, 而外分泌组织则需进一步处理以便达到获取导管上皮细胞的目的.

另一种获取导管上皮细胞的方法是剪取胰腺的大导管, 然后再将大导管切成小块后以胶原酶消化, 在显微镜下将消化后的导管上皮从多种细胞的混悬液中挑出, 此法仅适用于需少量细胞的研究工作. 此外, 尚有用机械的方法将导管上皮从导管上刮下后收集, 此法收获量小, 已较少应用.

3.2 胰腺干细胞的培养 消化后的胰腺细胞纯化后, 胰岛细胞即被从混悬液中分出, 而外分泌细胞中则绝大多数(>99%)为腺泡细胞, 少量为导管上皮细胞, 根据这两种细胞的不同生物学特性, 即导管上皮细胞在6-12 h即可贴壁生长而腺泡细胞不具备此特性, 在培养的前期置换培养液时, 几乎可将所有的腺泡细胞在换液时丢弃, 仅留有少量的贴壁细胞即导管上皮细胞生长^[4]. 由于干细胞可在无血清培养液中生长和增殖而其他细胞(除成纤维细胞外)不易生长, 故在培养3-7 d后即换为不含血清的DMEM/F12培养液, 其中加入一定量的胰岛素、转铁蛋白和硒、青霉素、链霉素、牛血清白蛋白、尼克酰胺和角朊细胞生长因子(KGF)等. 一般经培养5-7 d后, 细胞集落增大, 互相开始连接成片. 在此基础上可形成一单层细胞, 几乎覆盖培养瓶底, 此时亦开始出现具有三维结构的细胞团, 在相差显微镜下呈山嵴或山峰样隆起, 这种三维细胞团结构随培养时间的延长逐渐增多增大, 当直径达到100 μm 以上时, 轻摇培养瓶则可使胰岛细胞团悬于培养液中, 双硫腺染色阳性. Bonner-Weir报告成人全胰腺的干细胞经过5-7 wk培养后, 可平均收获32 000新生的胰岛细胞团. 而我们改良的方法经27 d培养后平均每克胰腺组织可收获760个胰岛^[13].

在胰腺干细胞培养过程中, 不同的外部条件可以促进干细胞的增殖与分化, 他们包括生长激素, 如胰岛素样生长因子(IGF); 其他激素如胃泌素、胰高血糖素样多肽(GLP-1)等; 生长因子和细胞因子如转化生长因子(TGF- α 、表皮生长因子(EGF)、 β 细胞素(betacellulin)、白介素1 β (IL-1 β)、肝细胞生长因子(HGF)、角朊细胞生长因子(KGF)等; 营养成分如葡萄糖; 细胞外基质如上皮细胞黏附分子(Ep-CAM), 胶原1和胶原4等; 其他物质如尼克酰胺、丁酸钠等也有促进干细胞增殖和分化的作用^[14].

目前仍未找到培养干细胞的最佳条件. 成体胰腺干细胞在体外培养后所获的胰岛因数量及其胰岛素含量尚不足以用于临床试验. 部分动物实验表明, 小鼠

胰腺干细胞在体外培养后获得的胰岛植入同种糖尿病小鼠体内,可纠正糖尿病状态,基本恢复正常的糖代谢.但其实验所用动物数量少,有待进一步研究.

4 胰腺干细胞临床应用前景

近年来,许多研究组进行了胰腺干细胞移植治疗糖尿病的相关研究.体外培养的、源于干细胞的胰岛可能在不远的将来替代同种供体的胰岛,用于治疗糖尿病. Ramiya *et al*^[15]用胶原酶消化成年非肥胖糖尿病模型小鼠(NOD鼠)的胰腺导管组织,经一系列培养后可分化形成“生胰岛细胞”(islet producing cells, IPCs),IPCs可进一步分化成有组织结构的胰岛细胞团,包括 α 、 β 、 δ 细胞,可表达一系列胰岛细胞标志,分泌胰岛素并与葡萄糖剂量相关.他们将这些细胞移植入糖尿病小鼠的肾被膜下,经过55 d的观察发现,接受细胞移植的糖尿病小鼠血糖控制良好,而对照小鼠死于糖尿病. Garcia *et al*报道将转基因高度表达HGF的 β 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^[16]. Cornelius *et al*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 d之久^[17],表明用干细胞治疗糖尿病有较好的前景.

何时能将同种供者的干细胞起源的胰岛用于治疗糖尿病?应当说,目前已具备了一定的条件.利用自体胰岛不论在伦理上及免疫反应上都明显优于同种供者或异种供者.因而,如果能将糖尿病患者的胰腺干细胞以细针穿刺法从胰腺中取出,再在体外培养成胰岛后移植给该患者,将可造福大量糖尿病患者.真正地将此技术用于临床治疗糖尿病,仍要克服不少障碍,例如对于来源于干细胞的胰岛素分泌细胞分泌胰岛素的调控机制需要进一步研究^[18],此外,为了扩大胰岛素分泌细胞的来源,如何将骨髓基质干细胞、肝干细胞转分化为胰岛细胞也是将来重要的研究课题^[19].总之,随着干细胞研究的深入,以干细胞为基础的糖尿病治疗将会给人们带来新的希望.

5 参考文献

- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343:230-238
- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R.

- Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001;292:1389-1394
- Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001;50:1691-1697
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7999-8004
- Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seijffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 2000;6:568-572
- Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, Onodera M, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 2002;156:173-184
- McKinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 2001;44:1203-1214
- Gmyr V, Kerr-Conte J, Belaich S, Vandewalle B, Leteurtre E, Vantyghem MC, Lecomte-Houcke M, Proye C, Lefebvre J, Pattou F. Adult human cytotokeratin 19-positive cells reexpress insulin promoter factor 1 in vitro: further evidence for pluripotent pancreatic stem cells in humans. *Diabetes* 2000;49:1671-1680
- Wang R, Li J, Yashpal N. Phenotypic analysis of c-Kit expression in epithelial monolayers derived from postnatal rat pancreatic islets. *J Endocrinol* 2004;182:113-122
- Peters K, Panienka R, Li J, Kloppel G, Wang R. Expression of stem cell markers and transcription factors during the remodeling of the rat pancreas after duct ligation. *Virchows Arch* 2005;446:56-63
- Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P. Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 2000;49:163-176
- Schmied BM, Ulrich A, Matsuzaki H, Ding X, Ricordi C, Weide L, Moyer MP, Batra SK, Adrian TE, Pour PM. Transdifferentiation of human islet cells in a long-term culture. *Pancreas* 2001;23:157-171
- 宋振顺, 顾克菊. 成人胰腺干细胞转分化为胰岛的研究. *中华外科杂志* 2002;40:807-810
- Soria B. In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* 2001;68:205-219
- Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000;6:278-282
- Garcia-Ocana A, Vasavada RC, Cebrian A, Reddy V, Takane KK, Lopez-Talavera JC, Stewart AF. Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the beta-cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice. *Diabetes* 2001;50:2752-2762
- Cornelius JG, Tchernev V, Kao KJ, Peck AB. In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Horm Metab Res* 1997;29:271-277
- Lechner A. Stem cells and regenerative medicine for the treatment of type 1 diabetes: the challenges lying ahead. *Pediatr Diabetes* 2004;5:88-93
- Blyszczuk P, Wobus AM. Stem cells and pancreatic differentiation in vitro. *J Biotechnol* 2004;113:3-13