

干细胞技术治疗糖尿病的研究进展与应用前景

魏蕊, 洪天配

魏蕊, 洪天配, 北京大学第三医院内分泌科 北京市 100191
洪天配, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事糖尿病、干细胞分化方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30771032; 81070701
高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20100001110083

作者贡献分布: 本文设计和指导由洪天配完成; 写作由魏蕊完成。
通讯作者: 洪天配, 教授, 主任医师, 100191, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院内分泌科。tpho66@bjmu.edu.cn
电话: 010-82265515 传真: 010-62017700
收稿日期: 2010-12-17 修回日期: 2011-01-28
接受日期: 2011-02-15 在线出版日期: 2011-02-18

Stem cell therapy for diabetes: progress and prospects

Rui Wei, Tian-Pei Hong

Rui Wei, Tian-Pei Hong, Department of Endocrinology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30771032; 81070701; and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education, No. 20100001110083

Correspondence to: Professor Tian-Pei Hong, Department of Endocrinology, Peking University Third Hospital, 49 North Huayuan Road, Haidian District, Beijing 100191, China. tpho66@bjmu.edu.cn

Received: 2010-12-17 Revised: 2011-01-28

Accepted: 2011-02-15 Published online: 2011-02-18

Abstract

Stem cells can supply sufficient islet cells for cell replacement therapy in patients with diabetes. Many types of stem cells, including embryonic stem (ES) cells, induced pluripotent stem (iPS) cells, and somatic stem cells, have been shown to be able to differentiate into insulin-producing cells either *in vitro* or *in vivo*, which could ameliorate hyperglycemia in diabetic animal models. Furthermore, several small-scale pilot clinical studies have demonstrated the potential efficacy of autologous hematopoietic stem cell transplantation in treating diabetes. Great progress has been made in basic research on the differentiation of insulin-producing cells from human ES cells, in which the ethical debate and immunological rejection are unavoidable. Use of human iPS cells and autologous somatic stem cells can avoid such problems. However, the safety of iPS cells in future clinical application and the amplification, identification and differentiation

of somatic stem cells deserve further investigation. This paper aims to present an overview of different types of stem cells, strategies for differentiation into islet cells, and the problems and prospects of stem cell therapy for diabetes.

Key Words: Diabetes; Stem cells; Differentiation; Transplantation

Wei R, Hong TP. Stem cell therapy for diabetes: progress and prospects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 441-450

摘要

干细胞技术可以为糖尿病的细胞替代治疗提供足量胰岛细胞。胚胎干(embryonic stem, ES)细胞、诱导性多潜能干(induced pluripotent stem, iPS)细胞及成体干细胞可以在体外或体内分化为胰岛素分泌细胞,并可降低糖尿病动物模型的血糖。在小规模的临床试验中,自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病已经初步显示出一定的疗效。ES细胞定向分化为胰岛素分泌细胞的基础研究较为深入,但存在伦理学争议和免疫排斥问题。iPS细胞和自体的成体干细胞可避免上述难题,但iPS细胞临床应用的可行性和安全性有待进一步探讨,成体干细胞的扩增、鉴定及分化等方面的研究工作尚需进一步开展。本文对各种干细胞的研究概况、向胰岛细胞分化策略的研究进展、面临的问题及发展前景作一综述。

关键词: 糖尿病; 干细胞; 分化; 移植

魏蕊, 洪天配. 干细胞技术治疗糖尿病的研究进展与应用前景. *世界华人消化杂志* 2011; 19(5): 441-450

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/441.asp>

0 引言

糖尿病是一种以血糖水平升高为基本特征的慢性代谢性疾病,近年来其患病率在全球呈现快速增长的趋势。随着病情进展,患者的胰岛β细胞功能进行性丧失,导致高血糖的持续恶化。长期的高血糖状态可引发多种大血管和微血管的并发症,引起多脏器功能障碍甚至衰竭,严重影响

■背景资料

胰岛移植是治愈糖尿病的潜在希望。然而,供体胰岛来源不足和免疫排斥反应限制了胰岛移植的广泛开展。干细胞研究的兴起为解决上述难题提供了新思路。将干细胞体外扩增并诱导分化为胰岛细胞可以解决胰岛来源不足的问题,采用患者特异性的干细胞相关技术有望克服免疫排斥的难题。

■同行评议者

高国全, 教授, 中山大学中山医学院生化系

■研发前沿

患者自体的成体干细胞亦不存在伦理和免疫排斥问题,同时成瘤风险低的特性使其成为目前临床应用研究的焦点。

影响人类健康和生活质量。传统的口服降糖药物和注射胰岛素治疗不能从根本上治愈该疾病,也不能完全阻止其并发症的发生和进展。胰岛移植可补充患者体内胰岛 β 细胞数量的不足,重建胰岛 β 细胞总量的稳态平衡,既能有效控制血糖,又可能防止或逆转糖尿病并发症,故被认为是治愈糖尿病的潜在希望。2000年,胰岛移植取得了突破性进展,来自加拿大Edmonton的研究小组改良了抗免疫排斥的用药方案,取得连续7例胰岛移植的成功,可使1型糖尿病患者完全停用胰岛素治疗超过1年以上^[1]。然而,供体胰岛组织来源不足和免疫排斥反应限制了胰岛移植的广泛开展。干细胞研究的兴起为解决上述难题提供了新思路。将干细胞扩增并诱导分化为胰岛细胞将成为解决供体胰岛组织来源不足的希望所在,而采用患者特异性干细胞策略则有望克服免疫排斥的难题。

1 干细胞的研究概况

干细胞是机体及其各种组织细胞的初始来源,其最为显著的生物学特征是既有自我更新和不断增殖的能力,又有多向分化的潜能。干细胞根据不同的来源可分为胚胎干(embryonic stem, ES)细胞、诱导性多潜能干(induced pluripotent stem, iPS)细胞及成体干细胞。

1.1 ES细胞 ES细胞是从着床前的早期胚胎(囊胚)内细胞团中分离得到的干细胞,理论上可以分化为机体内几乎所有的组织细胞类型^[2,3]。ES细胞具有以下特征:(1)体外培养条件下具有强大的增殖能力,并且保持稳定的正常二倍体染色体核型和带型;(2)具有较高的端粒酶活性,可长期保持高度未分化状态;(3)具有多向分化潜能,在体内和体外条件下均可向内、中、外三个胚层的细胞分化,也可被定向诱导分化为体内各种类型的组织细胞^[2]。

1981年,ES细胞的分离和培养首先在小鼠中获得成功^[3],是至今研究最广泛、最成熟的干细胞体系。随后,牛、羊等大动物的ES细胞分离和培养也相继获得成功。1998年,人类ES(human ES, hES)细胞系首次被成功建立^[2],推动了新一轮干细胞研究热潮的兴起。目前,hES细胞已被证实可定向分化为神经细胞、骨细胞、心肌细胞等机体几乎所有的细胞类型。因此,理论上可以在体外大量扩增hES细胞并将其诱导分化为胰岛样细胞,从而为糖尿病患者的细胞替代治疗(cell replacement therapy, CRT)提供种子细胞。

hES细胞研究面临着许多难题和争议:hES细胞建系必须摧毁人类早期胚胎,存在剧烈的伦理学争议,故建系所需要的胚胎来源比较有限;hES细胞来源的细胞移植到体内后有发展为肿瘤的潜在风险;宿主对hES细胞来源的细胞存在免疫排斥。针对以上问题,各国建立了相关的法律法规,对ES细胞的胚胎来源和相关获取流程给予明确的规定;同时,采取胚胎单卵裂球法、孤雌生殖等方法获取ES细胞也有一些突破^[4]。肿瘤的形成风险通常是由于诱导分化后细胞的不成熟或混杂有较为原始的细胞所致,这一问题的解决主要依赖于提高诱导分化细胞的成熟度、对目的细胞进行纯化或导入“自杀基因”以去除未分化细胞。解决ES细胞免疫排斥的主要策略有:应用免疫抑制剂或采取免疫隔离措施;诱导免疫耐受;建立hES细胞库,进行主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)配型;进行基因工程改造或修饰以适应宿主的需求;建立体细胞核移植的hES细胞。

1.2 iPS细胞 2006年,来自日本的研究小组将Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4等4个转录因子导入小鼠成纤维细胞,获得了类似于小鼠ES细胞的多潜能干细胞,并将其命名为iPS细胞^[5]。该研究首次证实,既往认为处于终末分化的成熟细胞可以被重编程而恢复多向分化潜能。这一成果引起了整个生命科学领域的广泛关注。2007年,美国和日本两个研究小组几乎同时宣布成功获得了人类iPS细胞^[6,7]。目前,小鼠、大鼠、猪、猴、人等不同物种的iPS细胞都已成功建系。iPS细胞与ES细胞在许多生物学特征方面存在高度的相似性,其中包括细胞形态、生长特性、表面标志物、注射到裸鼠皮下可形成包含3个胚层组织结构的畸胎瘤等^[5]。此外,其在DNA甲基化、基因表达谱、染色质状态、形成嵌合体动物等方面也与ES细胞完全相似^[8]。

在hES细胞研究面临剧烈的伦理学争议的情况下,iPS细胞研究异军突起,不仅避开了伦理和法律上的争论,也使CRT的免疫排斥反应问题得到了合理的解决。但是iPS细胞面临的最大难题是逆转录病毒或慢病毒载体导致肿瘤发生的潜在风险和转染基因可能给机体带来的不利影响;其次,体细胞重编程的具体过程和作用机制尚不十分明确;再次,iPS细胞的制备效率仍然有待提高。

然而,iPS细胞存在无可比拟的优势和潜在的应用价值,故在干细胞研究领域掀起了一次

次研究热潮。现今, iPS细胞的制备技术已显著提高, 为避免最初制备方法中原癌基因*c-myc*和*Klf4*导致肿瘤的潜在风险, 已报道采用组蛋白去乙酰化酶的抑制剂丙戊酸, 从而使仅用*Oct4*和*Sox2*两个转录因子就可将原代人类成纤维细胞重编程为iPS细胞^[9]。最近, 采取mRNA转染技术即可将人类皮肤成纤维细胞等多种细胞类型重编程为iPS细胞, 消除了基于DNA载体与宿主整合技术所引发的相关风险^[10], 并且该方法显著提高了iPS细胞的制备效率。此外, 已成功建立了来源于脐带血的iPS细胞, 降低了成体细胞随着器官寿命的延长和环境暴露而积累突变的可能性^[11,12]。上述结果表明, 通过体外基因转染技术制备个性化的自体多潜能干细胞是可行的。不难预测, 基于hES细胞的研究积淀, iPS细胞在应用基础研究中必将为CRT和再生医学的发展带来更大的希望。

1.3 成体干细胞 成体干细胞是存在于机体某个组织或器官中的干细胞。其中骨髓造血干细胞的应用研究最为成熟, 最初用于治疗血液系统疾病。20世纪60年代, 随着分离、鉴定及功能研究等方面的突破, 造血干细胞移植的适应证明显增加^[13]。90年代末, 有报道显示, 源自成体骨髓的干细胞可分化为其他胚层的组织细胞^[14-16], 开阔了人们对成体干细胞分化潜能的认识。随后, 肝脏、心脏、脑等不同部位成体干细胞的发现和跨胚层分化的研究报道频繁出现^[17-19]。目前在几乎所有的组织或器官中均可发现特异性成体干细胞的存在。在通常情况下, 成体干细胞倾向于分化为自身组织的细胞类型, 维持组织细胞在生长、发育、妊娠、肥胖、创伤等各种应激下的动态平衡。成体干细胞有三大生物学特征: (1)注入体内后有明显的趋化性, 可主要集中在到达受损伤的部位; (2)在损伤部位局部微环境的诱导下, 可向损伤组织修复所急需的细胞类型分化, 促进损伤组织的修复^[20]; (3)注入体内后很少形成肿瘤。对于临床应用而言, 可从浅表组织或容易获取的组织中分离患者的自体干细胞, 如从脂肪组织分离脂肪干细胞、从骨髓或外周血分离造血干细胞等, 进而诱导定向分化为所需的细胞类型。成体干细胞研究目前面临的主要困惑有: 数量较少, 增殖能力有限; 缺乏特异性标记分子, 分离、鉴定及纯化比较困难; 分化能力有限, 并且具有较大变异度; 缺乏行之有效的定向分化方案, 分化细胞成熟度差。寻找理想的干细胞生长因子, 促进干细胞在体外增殖, 可

以弥补体内成体干细胞数量稀少的不足; 明确调控胚胎发育中的关键信号分子, 有助于寻找成体干细胞特异性的标记分子; 对体外诱导分化方案进行优化, 可望提高分化效率和分化细胞的成熟度。然而, 目前在这些方面尚缺少重大的技术突破。

2 干细胞治疗糖尿病的主要策略及其潜在机制

2.1 干细胞治疗糖尿病的主要策略 干细胞治疗糖尿病目前有两种思路: 一是在实验室条件下将干细胞诱导分化为胰岛样细胞后再移植至体内; 二是直接移植干细胞或干细胞巢居的组织。值得关注的是, 干细胞技术在研究胰腺的胚胎发育、糖尿病的发病机制、药物筛选、基因治疗等方面也具有潜在的应用价值, 是糖尿病治疗学研究的有力工具。

2.2 干细胞治疗糖尿病的潜在机制 胰岛β细胞总量丢失和胰岛素分泌功能障碍是糖尿病发生的主要机制。1型糖尿病患者因自身免疫损伤, 胰岛β细胞数量进行性丧失, 因此补充胰岛β细胞数量是一种潜在的治疗方法。2型糖尿病晚期也存在严重的胰岛素分泌功能缺陷, 故补充足量的胰岛β细胞亦能恢复正常的血糖水平。利用干细胞治疗糖尿病的主要理论依据是干细胞具有强大的增殖能力和向胰岛素分泌细胞分化的潜能, 从而为机体补充胰岛β细胞数量, 重建内源性胰岛素分泌功能。

此外, 成体干细胞移植治疗糖尿病还可能存在其他的作用机制。例如, 间充质干细胞移植可纠正胰岛内的免疫损伤, 重建胰岛局部的免疫平衡, 从而达到治疗1型糖尿病的作用^[21]。间充质干细胞还可能释放各种细胞生长因子, 促进胰岛β细胞的增殖和(或)胰腺干细胞的分化^[22]。

3 干细胞定向分化为胰岛样细胞的研究进展

利用干细胞体外诱导分化的策略将有望为糖尿病患者提供具有内分泌功能的胰岛细胞, 为糖尿病治疗学的进步提供了潜在的希望。

3.1 ES细胞定向分化为胰岛样细胞 在体外诱导分化为胰岛素分泌细胞的研究中, ES细胞是目前研究最为深入的干细胞类型。2001年, Assady等^[23]首次报道了hES细胞所形成的拟胚体中有1%-3%细胞呈胰岛素阳性染色, 证实hES细胞可自发分化为胰岛素分泌细胞。为了获得较高比例的胰岛素分泌细胞, 人们采取了多种体外定

■相关报道
Zhang等同样也成功将人类iPS细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞, 胰岛素阳性染色细胞比例高达25%。

■创新盘点

本文较为全面、详尽地阐述了3种干细胞的研究成果,并在研究进展、各自优缺点、分化方案等方面进行总结和对比,对干细胞技术治疗糖尿病的基础研究和临床应用均具有一定的指导作用。

向诱导分化的策略,其中包括:(1)利用基因工程技术将胰岛发育过程中重要的转录调控因子导入ES细胞中,启动其定向分化;(2)在培养体系中添加各种生物因子或小分子,模拟体内胰岛的发育过程,诱导形成胰岛素分泌细胞;(3)采用胰岛 β 细胞系、胎儿胰岛或发育增殖的胰腺组织制备的条件培养基进行干预或直接与上述组织或细胞共培养或共移植,可诱导ES细胞定向分化为胰岛素分泌细胞。

干细胞的定向分化依赖于特定转录因子的存在,因此在胰岛发育过程中起关键作用的转录因子如神经元素-3(neurogenin 3, Ngn3)、配对盒因子-4(paired box4, Pax4)、胰十二指肠同源盒因子-1(pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1)等可以诱导或加速ES细胞向胰腺前体细胞和(或)胰岛样细胞分化。Soria等^[24]利用直接转染胰岛素原基因的方法,诱导小鼠ES细胞定向分化为胰岛素分泌细胞。随后多项研究显示,采取Pax4^[25]、PDX1^[26]、Nkx2.2^[27]等基因的转染技术可促进ES细胞向胰岛素分泌细胞分化。Kwon等^[28]则报道采用体外蛋白质转导技术,将PDX1蛋白导入到hES细胞内,PDX1激活下游靶基因,促使hES细胞分化为胰岛素分泌细胞。将上述诱导分化获得的胰岛素分泌细胞移植到糖尿病小鼠模型体内后具有不同程度的降糖效应,甚至可以使血糖水平恢复正常^[24,25]。

干细胞的定向分化还需要来自细胞与细胞之间相互作用的关键性信号以及相互交错的分化阶段。基于这一思想,在ES细胞分化过程中使用不同的培养基、细胞外基质以及生物因子等改变其生长条件,采取分阶段诱导的方式可将ES细胞定向分化为胰岛样细胞。2001年,Lumelsky等^[29]首次建立了稳定的5步法体外定向诱导分化方案(ES细胞扩增→形成拟胚体→选择巢蛋白阳性细胞→胰腺内分泌前体细胞扩增→诱导向胰岛素分泌细胞分化),可将小鼠ES细胞在体外先后诱导分化为巢蛋白阳性前体细胞和胰岛素分泌细胞,后者在体外可自动形成胰岛样结构。这些胰岛素分泌细胞移植后可以在糖尿病小鼠体内存活,但是降低血糖的效应非常有限。2002年,Hori等^[30]在此方案的基础上添加3-磷酸肌醇激酶抑制剂可促使小鼠ES细胞分化为胰岛素分泌细胞,并聚集成胰岛样结构,其体外胰岛素释放反应呈葡萄糖依赖性,将其移植到糖尿病小鼠体内可升高胰岛素水平、缓解体质量下降、改善血糖控制以及完全避免动物死亡。

该方案主要基于胰岛 β 细胞与神经上皮在发育学方面的相似性,在神经上皮发育中瞬时表达的巢蛋白也被认为在胰岛前体细胞中表达,通过“胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠”培养基筛选获得巢蛋白阳性细胞,从而诱导ES细胞定向分化为胰岛素分泌细胞。然而,目前对于将这些细胞作为胰岛 β 细胞的前体细胞存有明显的争议。巢蛋白阳性细胞可能是神经前体细胞,而且检测到的胰岛素有可能来自诱导分化培养过程中凋亡细胞摄取培养基中的胰岛素而非来自内源性胰岛素合成^[31]。因此,为了避免单独采用胰岛素染色可能出现分化鉴定结果的假阳性,必须结合多种其他的检测方法,如C-肽染色和释放试验、电子显微镜观察分泌颗粒、移植实验证实能逆转动物模型的高血糖超过1 mo等。

晚近,模拟体内胰岛 β 细胞发育过程是最常采用的定向诱导分化策略。2006年,D'Amour等^[32]报道了改良的5步法体外诱导定向分化方案(即hES细胞→定型内胚层→肠管内胚层→胰腺内胚层和内分泌前体细胞→表达激素的内分泌细胞)可将hES细胞诱导分化为能够产生胰岛素、胰高糖素、生长抑素、胰多肽及Ghrelin的胰腺内分泌细胞,这些细胞的胰岛素合成接近成人胰岛的水平,但C-肽释放能力仅类似于胎儿胰岛 β 细胞。将该诱导方案中胰腺内胚层阶段的细胞移植到糖尿病小鼠体内后,移植细胞可在体内进一步分化成熟,这些移植物在特异性转录因子表达、胰岛素原加工、成熟分泌颗粒等方面表现出功能性胰岛 β 细胞的特征,不仅能够分泌胰岛素和C-肽,而且可发挥明显的降血糖效应^[33]。随后的研究证实,上述方案中的诱导因子活化素A(activin A)和全反式维甲酸在hES细胞向定型内胚层分化和随后向胰腺内分泌前体细胞分化中分别发挥了至关重要的作用,并且分化后的胰岛素分泌细胞移植到糖尿病小鼠体内具有明显的降血糖效应^[34,35]。另有报道显示,一些小分子化合物也可调控ES细胞的分化,如定型内胚层诱导因子1(inducer of definitive endoderm 1, IDE1)和IDE2可成功诱导小鼠ES和hES细胞向定型内胚层分化,效率要高于活化素A^[36],利用小分子物质Indolactam V可促进定型内胚层细胞高效率地转化为胰腺前体细胞^[37],这为ES细胞向胰岛样细胞的分化提供了新思路。此外,采用小鼠胚胎胰芽制备含有可溶性因子的条件培养基^[38],或者与小鼠 β 细胞株共培养^[39],可在体外诱导小鼠ES细胞定向分化为胰岛素分

泌细胞. 采用大鼠胰腺部分切除后的再生胰腺组织制备的条件培养基, 可诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为胰岛素分泌细胞^[40]. 与成年小鼠离体胰岛、离散胰岛细胞或小鼠 β 细胞株共培养, 可促进胰腺干细胞分化为成熟 β 细胞^[41]. 上述结果提示, 发育和增殖中的胰岛组织存在能够促进干细胞向胰岛 β 细胞分化的重要诱导因子. 另一方面, hES细胞分化而来的胰腺前体细胞与小鼠胚胎背胰共移植到免疫缺陷小鼠体内, 可进一步分化为胰岛 β 细胞样结构^[42]. 同样, 人类胰腺前体细胞与胎儿胰岛细胞共移植到免疫缺陷小鼠肾囊中也可见到相似的现象^[43]. 上述结果提示, 干细胞与其分化微环境之间的相互作用是决定干细胞向胰岛 β 细胞分化和成熟的关键因素. 因此, 条件培养基、与胰岛组织共培养甚或共移植等方法有望成为诱导ES细胞进一步分化成熟的新策略.

上述有关诱导hES细胞定向分化为胰岛素分泌细胞的研究距离临床应用尚有一定距离. 首先, 这些分化方案本身面临着以下技术瓶颈: 诱导分化效率低且不稳定; 分化方案并非适合所有的ES细胞系; 分化细胞的成熟度低, 大多属于胰腺前体细胞或相当于胎儿胰岛细胞, 需要进一步诱导成熟. 其次, 对于应用研究而言, 更为重要的是患者对hES细胞分化而来的各种细胞和组织存在免疫排斥反应. 制备患者特异性自体干细胞是解决免疫排斥问题的根本出路, 其技术策略包括: 体细胞核移植来源的ES细胞; 体细胞重编程产生的iPS细胞; 从容易获取的组织中分离得到的自体成体干细胞.

3.2 体细胞核移植来源的ES细胞定向分化为胰岛样细胞 采用体细胞核移植(somatic cell nuclear transplantation, SCNT)技术将患者体细胞核注入供体去核卵母细胞, 在体外激活形成克隆胚胎, 培养至囊胚阶段, 分离携带有患者基因型的hES细胞, 进而在体外诱导分化为特定类型的自体组织细胞用于疾病治疗, 此即治疗性克隆. 2007年, Byrne等^[44]首次报道在非人灵长类动物猕猴中建立SCNT来源的ES细胞系. 2008年, French等^[45]成功获得了人类SCNT来源的囊胚. 基于既往在hES细胞定向分化研究中的经验积累, SCNT来源的hES细胞一旦成功建系, 其相应的应用研究必将迅速开展.

理论上, 通过治疗性克隆技术制备患者特异性的胰岛素分泌细胞是解决胰岛移植中供体短缺和免疫排斥等难题最有希望的途径, 但治

疗性克隆研究存在着诸多难题, 除了hES细胞研究面临的共性问题和争议以外, 通过SCNT建立hES细胞系的技术不成熟, 需耗费太多的人类卵母细胞, 有导向生殖性克隆的潜在风险等问题制约了该技术的发展. 因此, 治疗性克隆距离临床应用尚需假以时日.

3.3 iPS细胞定向分化为胰岛样细胞 基于iPS细胞与ES细胞极大的相似性以及ES细胞定向分化研究中深厚的技术积淀, iPS细胞的应用基础研究得以迅速开展. Alipio等^[46]将小鼠皮肤成纤维细胞制备的iPS细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞, 将这些细胞经肝脏门静脉注入1型和2型糖尿病小鼠体内, 可提高胰岛素释放水平, 改善小鼠的高血糖状态, 糖化血红蛋白(HbA1c)水平亦趋于正常. 上述结果表明, iPS细胞治疗糖尿病已经在动物模型中取得成功. 2008年, Tateishi等^[47]报道将人类iPS细胞成功诱导分化为胰岛素分泌细胞, 其与hES细胞来源的胰岛素分泌细胞在细胞形态、基因和蛋白表达谱、葡萄糖刺激的胰岛素释放反应等方面是相似的. Zhang等^[48]同样也成功将人类iPS细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞, 胰岛素阳性染色细胞比例高达25%. 2008年, Park等^[49]建立了多种疾病特异性的iPS细胞系, 其中包括1型糖尿病患者来源的iPS细胞系. 2009年, Maehr等^[50]将1型糖尿病患者特异性的iPS细胞成功诱导分化为胰岛素分泌细胞. 然而, 人类iPS细胞来源的胰岛素分泌细胞移植到糖尿病动物模型体内是否具有降糖作用需要进一步验证. iPS细胞不仅可能解决胰岛移植治疗存在的供体组织来源不足和免疫排斥问题, 而且提供了很好的疾病研究模型, 有助于对糖尿病的病因学和发病机制进行探索, 还可在抗糖尿病新药研发中作为药物筛选的工具. 因此, iPS细胞在糖尿病领域的应用基础研究中已初步显示了良好的前景, 但距离最终的临床应用还有很长的路要走. 存在的问题包括: 不同的iPS细胞系之间可能存在定向分化能力的差异, iPS细胞分化而来的胰岛样细胞用于临床治疗的安全性尚不清楚.

3.4 成体干细胞定向分化为胰岛样细胞

3.4.1 胰腺干细胞: 胰腺干细胞在特定条件下优先分化为胰腺组织的细胞类型, 因此诱导胰腺干细胞定向分化是获得胰岛 β 细胞较为直接的途径. 目前, 有关胰腺干细胞的存在部位和分子标志物尚无一致意见. Zulewski等^[51]将大鼠胰岛中巢蛋白阳性的胰腺干细胞诱导形成胰腺内分泌和外分泌细胞. Inada等^[52]采用谱系示踪的方

■应用要点

本文有助于提高对干细胞研究领域的认知, 有助于了解干细胞在糖尿病治疗中的地位.

■同行评价

本文阐述了各种干细胞的优势和目前亟待解决的问题,对基础研究有一定的指导作用,对未来干细胞用于临床也有一定的启发。

法证实碳酸酐酶 II(carbonic anhydrase, CA II)阳性的胰导管细胞在出生后和胰腺受损的情况下可形成胰岛和腺泡细胞。Xu等^[53]则发现导管结扎诱导的胰腺新生源于导管内Ngn3阳性的细胞,并且发现这些细胞在体外可分化为功能性胰岛细胞。Zou等^[54]在国际上首次从灵长类糖尿病动物模型的胰腺中分离和培养了胰腺前体细胞,并成功在体外将这些前体细胞进行扩增和诱导分化为功能性胰岛细胞。Bonner-Weir等^[55]将混合培养的成人胰导管上皮样干细胞诱导形成胰岛样细胞团。Gao等^[56]将表达细胞角蛋白19(cytokeratin, CK19)的成人胰导管来源的干细胞诱导分化为胰岛样细胞,这些细胞具有葡萄糖刺激的胰岛素分泌反应,移植到裸鼠肾囊区可分化为胰腺的内分泌和外分泌细胞。本课题组在既往的研究中从胎儿胰腺组织中分离并建立了单克隆胰腺前体细胞,该细胞在体外具有很强的增殖能力,并可分化为胰岛样细胞^[57]。

理论上可尝试从糖尿病患者的胰腺中获取胰腺干细胞,并在体外进行扩增培养、诱导分化形成新的胰岛样细胞,最后再将这些细胞移植入患者体内。目前人类胰腺干细胞研究的主要困惑有:缺乏特异性标志分子,分离、纯化及鉴定比较困难;体外诱导分化方案各不相同,研究结果差异较大;分化所得到的胰岛内分泌细胞数量有限,细胞的成熟度较差,胰岛素含量和葡萄糖刺激后的胰岛素分泌量均明显低于正常,不能完全实现胰岛素分泌的生理性调节,故其临床应用前景尚需验证。

3.4.2 生殖干细胞: 精原干细胞(spermatogonial stem cells)是一种具有高度自我更新能力和分化潜能的成体干细胞,存在于成体睾丸内,具有终身的有丝分裂能力,进行自我复制的同时也可分化成单倍体精子。研究证明,从成人睾丸中得到的精原干细胞与hES细胞在细胞生物学和分子生物学特征上极为相似^[58]。相对于其他类型的成体干细胞,精原干细胞的分化潜能较大,为成体干细胞的应用开创了更广阔的空间。在今年的美国细胞生物学会50周年年会上有报道可直接从人类睾丸组织中分离出精原干细胞,并诱导分化为胰岛素分泌细胞,这些细胞表达胰岛细胞特异性标志物,并且可降低糖尿病小鼠的血糖水平。由于这类干细胞来自男性患者自身,诱导分化所获得的胰岛样细胞能够解决1型糖尿病男性患者进行胰岛移植的胰岛细胞来源和免疫排斥问题。同样,女性的卵母细胞可能也具有与精原干细胞相似的特征和潜能。

3.4.3 骨髓干细胞治疗糖尿病-定向分化或其他作用: 骨髓干细胞包含造血干细胞、间充质干细胞、内皮祖细胞等多种干细胞亚群,具有多向分化的潜能^[59]。骨髓干细胞是一种被广泛研究和应用的成体干细胞,采用患者自体的骨髓干细胞进行移植可克服免疫排斥问题。

体外研究和动物实验显示,骨髓来源的干细胞在体外和体内均可分化为胰岛素分泌细胞,这些细胞具有类似胰岛的形态结构,可表达胰岛素、胰高糖素等胰岛特异性基因产物,具有成熟 β 细胞的超微结构,存在葡萄糖刺激的胰岛素分泌反应,移植后具有降血糖效应^[60,61]。骨髓干细胞移植可促进小鼠受者胰岛细胞的增殖,使得胰岛素分泌细胞的数量增多,胰岛结构改善,胰岛素分泌量增多^[62,63]。在自身免疫性糖尿病发病之前进行骨髓移植可阻止非肥胖糖尿病(nonobese diabetic, NOD)小鼠发生糖尿病^[64,65]。此外,国内学者从1型糖尿病和2型糖尿病患者中获得骨髓间充质干细胞,并在体外诱导分化为功能性胰岛样细胞^[66]。上述研究提示,应用患者自体骨髓干细胞治疗糖尿病具有一定的科学依据。

2007年, Voltarelli等^[67]的研究显示,在15例没有糖尿病酮症酸中毒病史的新诊断1型糖尿病患者中,给予大剂量免疫抑制剂后进行自体非清髓造血干细胞移植(autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation, AHST), 14例停用胰岛素注射,最长达35 mo,其中13例HbA1c水平维持在7%以下;移植后6 mo C-肽释放反应比移植前明显增加, 12和24 mo时几乎保持不变。2009年,该研究小组增加病例数至23例,并延长了随访时间,观察到在胰岛素停用或减量的同时, C-肽水平显著升高,并可长期保持^[68]。上述结果提示, AHST可改善1型糖尿病患者的胰岛 β 细胞功能和血糖控制。Estrada等^[69]在25例2型糖尿病患者中进行胰腺动脉内输注自体骨髓干细胞与高压氧联合治疗,每3 mo随访1次, 1年后患者的代谢控制较基线显著改善,表现为空腹血糖和HbA1c显著降低,空腹C-肽和C-肽/血糖比值明显升高,胰岛素需要量减少,而体质量指数保持不变。Bhansali等^[70]采用选择性胃十二指肠动脉内输注自体骨髓干细胞治疗10例需要胰岛素治疗的2型糖尿病患者, 7例患者达到首要终点,即胰岛素剂量减少 $\geq 50\%$ 判断为有疗效, 3例患者可以完全脱

离胰岛素, 平均HbA1c下降1.0%, 其中在7例有疗效患者中有3例HbA1c<7%。在整组和有疗效组中, 空腹和胰高糖素刺激的C-肽水平均显著改善, 稳态模型评估(homeostatic model assessment, HOMA)方法计算的 β 细胞功能指数显著升高, 胰岛素抵抗指数则无明显改变。上述结果提示, 自体骨髓干细胞移植在2型糖尿病患者中可能改善胰岛 β 细胞功能。

自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病虽然在小规模临床试验中已取得了初步的成果, 但长期有效性和安全性尚需在大规模随机对照临床试验中加以验证, 其治疗作用机制同样也需要进一步探讨。

3.4.4 其他成体干细胞: 肝脏干细胞、神经干细胞、小肠干细胞等多种成体干细胞亦可诱导分化为胰岛样细胞。然而, 体外培养条件下制备的胰岛样细胞通常缺乏胰岛细胞正常发育所必需的某些信号, 导致这类细胞存在部分功能缺失, 例如, 无法合成成熟的胰岛素、缺乏对葡萄糖的反应性等。

4 结论

重建糖尿病患者体内的功能性胰岛 β 细胞总量的稳态是治疗糖尿病的理想目标, 干细胞研究的飞速发展是糖尿病患者的CRT提供了诱人的应用前景。hES细胞是目前研究最广泛、最成熟的干细胞体系, hES细胞向胰岛细胞分化的研究为CRT提供了重要的技术积淀, 但其面临剧烈的伦理学争议及移植后存在的免疫排斥反应等难题, 故距离临床应用尚有一定距离。SCNT来源的hES细胞理论上可同时解决供体组织短缺和免疫排斥反应两大难题, 但目前尚未成功建系, 且同样也存在伦理学争议。人类iPS细胞具有与SCNT来源的hES细胞相似的特点, 且避开了伦理学争议。此外, 可建立疾病特异性的iPS细胞系, 有助于对病因学和发病机制的探讨, 还可作为药物筛选的工具。患者自体的成体干细胞亦不存在伦理和免疫排斥问题, 同时成瘤风险低的特性使其成为目前临床应用研究的焦点。胰腺干细胞、生殖干细胞、骨髓干细胞等在体外均可分化为胰岛细胞。自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病在小规模的临床试验中初步显示了一定的疗效, 但长期有效性和安全性尚需进一步验证。

目前干细胞治疗糖尿病正处于基础理论和关键技术亟待突破的阶段, 要达到最终的

临床应用仍需假以时日。首先, 如何有效诱导干细胞向胰岛样细胞分化的关键技术问题还没有彻底解决。其次, CRT的研究成果目前大多数是在啮齿类动物模型中得到的, 有待在高等动物中进行验证。再次, 干细胞来源的胰岛样细胞用于治疗糖尿病的安全性尚不清楚。当前迫切需要开展的工作包括: 明确调控胰腺和胰岛 β 细胞正常胚胎发育的关键信号分子; 发现促进胰岛 β 细胞分化的特异性分子, 对体外诱导分化方案进行优化; 对CRT治疗糖尿病进行严格的有效性和安全性评价; 针对干细胞治疗糖尿病的临床应用问题制定合理的操作规程和管理规范。

5 参考文献

- 1 Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt 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
- 2 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147
- 3 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156
- 4 Sung LY, Chang CC, Amano T, Lin CJ, Amano M, Treaster SB, Xu J, Chang WF, Nagy ZP, Yang X, Tian XC. Efficient derivation of embryonic stem cells from nuclear transfer and parthenogenetic embryos derived from cryopreserved oocytes. *Cell Reprogram* 2010; 12: 203-211
- 5 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676
- 6 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872
- 7 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318: 1917-1920
- 8 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313-317
- 9 Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1269-1275
- 10 Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*

- 2010; 7: 618-630
- 11 Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodríguez-Pizà I, Vassena R, Raya A, Boué S, Barreiro MJ, Corbella BA, Torrabadella M, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 353-357
- 12 Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S, Maier LS, Han DW, Glage S, Miller K, Fischer P, Schöler HR, Martin U. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 434-441
- 13 Hołowiecki J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation. *Pol Arch Med Wewn* 2008; 118: 658-663
- 14 Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530
- 15 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- 16 Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-1779
- 17 Strick-Marchand H, Morosan S, Charneau P, Kreamsdorf D, Weiss MC. Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 8360-8365
- 18 Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 2002; 415: 240-243
- 19 Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G, Vescovi AL. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 2000; 3: 986-991
- 20 唐佩弦. 干细胞基础研究的新进展. *基础医学与临床* 2006; 26: 28-37
- 21 Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 1759-1767
- 22 Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1076-1084
- 23 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
- 24 Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49: 157-162
- 25 Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus AM. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 998-1003
- 26 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
- 27 Shiroy A, Ueda S, Ougi Y, Saito K, Moriya K, Sugie Y, Fukui H, Ishizaka S, Yoshikawa M. Differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells promoted by Nkx2.2 gene transfer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4161-4166
- 28 Kwon YD, Oh SK, Kim HS, Ku SY, Kim SH, Choi YM, Moon SY. Cellular manipulation of human embryonic stem cells by TAT-PDX1 protein transduction. *Mol Ther* 2005; 12: 28-32
- 29 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
- 30 Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16105-16110
- 31 Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* 2003; 299: 363
- 32 D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1392-1401
- 33 Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 443-452
- 34 Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, Qing T, Sun X, Zhang P, Ding M, Li D, Deng H. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res* 2007; 17: 333-344
- 35 Shim JH, Kim SE, Woo DH, Kim SK, Oh CH, McKay R, Kim JH. Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia* 2007; 50: 1228-1238
- 36 Borowiak M, Maehr R, Chen S, Chen AE, Tang W, Fox JL, Schreiber SL, Melton DA. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 348-358
- 37 Chen S, Borowiak M, Fox JL, Maehr R, Osafune K, Davidow L, Lam K, Peng LF, Schreiber SL, Rubin LL, Melton D. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat Chem Biol* 2009; 5: 258-265
- 38 Vaca P, Martín F, Vegara-Meseguer JM, Rovira JM, Berná G, Soria B. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells* 2006; 24: 258-265
- 39 Uroic DS, Baudouin G, Ferguson LA, Docherty HM, Vallier L, Docherty K. A factor(s) secreted from MIN-6 beta-cells stimulates differentiation of definitive endoderm enriched embryonic stem cells towards a pancreatic lineage. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 328: 80-86
- 40 Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim YS, Kim SB, Kim CW. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1299-1305
- 41 Chen W, Begum S, Opere-Addo L, Garyu J, Gibson TF, Bothwell AL, Papaioannou VE, Herold KC. Promotion of beta-cell differentiation in pancreatic precursor cells by adult islet cells. *Endocrinology* 2009;

- 150: 570-579
- 42 Brolén GK, Heins N, Edsbacke J, Semb H. Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells. *Diabetes* 2005; 54: 2867-2874
- 43 Hao E, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Lakey JR, Geron I, Monosov EZ, Barcova M, Mercola M, Levine F. Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. *Nat Med* 2006; 12: 310-316
- 44 Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, Nelson M, Sanger WG, Gokhale S, Wolf DP, Mitalipov SM. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; 450: 497-502
- 45 French AJ, Adams CA, Anderson LS, Kitchen JR, Hughes MR, Wood SH. Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26: 485-493
- 46 Alipio Z, Liao W, Roemer EJ, Waner M, Fink LM, Ward DC, Ma Y. Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 13426-13431
- 47 Tateishi K, He J, Taranova O, Liang G, D'Alessio AC, Zhang Y. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2008; 283: 31601-31607
- 48 Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, Shi Y, Deng H. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res* 2009; 19: 429-438
- 49 Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochdinger K, Daley GQ. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; 134: 877-886
- 50 Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, Leibel RL, Melton DA. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 15768-15773
- 51 Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001; 50: 521-533
- 52 Inada A, Nienaber C, Katsuta H, Fujitani Y, Levine J, Morita R, Sharma A, Bonner-Weir S. Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 19915-19919
- 53 Xu X, D'Hoker J, Stangé G, Bonnè S, De Leu N, Xiao X, Van de Castele M, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, Bouwens L, Scharfmann R, Gradwohl G, Heimberg H. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 2008; 132: 197-207
- 54 Zou C, Suen PM, Zhang Y, Wang Z, Chan P, Leung PS, Zhang YA. Isolation and in vitro characterization of pancreatic progenitor cells from the islets of diabetic monkey models. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 973-984
- 55 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 U S A* 2000; 97: 7999-8004
- 56 Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O, Otonkoski T. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* 2003; 52: 2007-2015
- 57 Zhang L, Hu J, Hong TP, Liu YN, Wu YH, Li LS. Monoclonal side population progenitors isolated from human fetal pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 603-608
- 58 Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Bühring HJ, Mattheus U, Mack A, Wagner HJ, Minger S, Matzkies M, Roppel M, Hescheler J, Sievert KD, Stenzl A, Skutella T. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; 456: 344-349
- 59 Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-3493
- 60 Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; 111: 843-850
- 61 Zhao M, Amiel SA, Ajami S, Jiang J, Rela M, Heaton N, Huang GC. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes in mice with cells derived from human marrow stromal cells. *PLoS One* 2008; 3: e2666
- 62 Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, Thyssen S, Gray DA, Bhatia M. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 763-770
- 63 Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop DJ. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 17438-17443
- 64 Zorina TD, Subbotin VM, Bertera S, Alexander AM, Haluszczak C, Gambrell B, Bottino R, Styche AJ, Trucco M. Recovery of the endogenous beta cell function in the NOD model of autoimmune diabetes. *Stem Cells* 2003; 21: 377-388
- 65 Kang EM, Zickler PP, Burns S, Langemeijer SM, Brenner S, Phang OA, Patterson N, Harlan D, Tisdale JF. Hematopoietic stem cell transplantation prevents diabetes in NOD mice but does not contribute to significant islet cell regeneration once disease is established. *Exp Hematol* 2005; 33: 699-705
- 66 Sun Y, Chen L, Hou XG, Hou WK, Dong JJ, Sun L, Tang KX, Wang B, Song J, Li H, Wang KX. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 771-776
- 67 Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, Coutinho M, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simões BP, Foss MC, Squiers E, Burt RK. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2007; 297: 1568-1576
- 68 Couri CE, Oliveira MC, Stracieri AB, Moraes DA, Pieroni F, Barros GM, Madeira MI, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simões BP, Martinez EZ, Foss MC, Burt RK, Voltarelli JC. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2009; 301: 1573-1579
- 69 Estrada EJ, Valacchi F, Nicora E, Brieva S, Esteve C, Echevarria L, Froud T, Bernetti K, Cayetano SM, Velazquez O, Alejandro R, Ricordi C. Combined treatment of intrapancreatic autologous bone mar-

- row stem cells and hyperbaric oxygen in type 2 diabetes mellitus. *Cell Transplant* 2008; 17: 1295-1304
- 70 Bhansali A, Upreti V, Khandelwal N, Marwaha N, Gupta V, Sachdeva N, Sharma RR, Saluja K, Dutta P,

Walia R, Minz R, Bhadada S, Das S, Ramakrishnan S. Efficacy of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 1407-1416

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复.

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行核对, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校. 责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色. 责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对. 责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑.

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷. 责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件. 编务配合档案管理员邮寄杂志.

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原始文章、原始清样、制作文件等.

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章16 wk内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)