

体外诱导 MSCs 分化 IPCs 治疗 1 型糖尿病的研究进展

杨伦昊

(河北医科大学临床学院, 河北 石家庄 050031)

摘要: 1 型糖尿病是胰腺 β 细胞破坏, 导致胰岛素绝对缺乏, 可见于任何年龄段, 多见于青少年, 症状严重。目前, 尚无有效的治疗方法。间充质干细胞 (MSCs) 具有自我更新和多向分化能力, 低免疫原性, 无致瘤性, 在糖尿病的治疗方面已有广泛尝试。直接注射 MSC 原位分化为胰岛细胞, 但由于分化效率低, 治疗效果不明显。在体外经人为干预诱导分化的胰岛素生成细胞再进行移植治疗, 重建胰岛, 恢复正常的降糖功能, 正成为治疗 1 型糖尿病的研究热点。同时体外诱导胰岛素生成细胞在对胰腺癌手术预后方面也有广泛探索。本文围绕间充质干细胞在体外重建胰岛素生成细胞等问题展开综述。

关键词: 间充质干细胞 (MSCs); 1 型糖尿病 (T1DM); 胰岛素生成细胞 (IPCs); 化学诱导; 基因诱导; 胰腺癌

中图分类号: R329

文献标识码: A

DOI: 10.12230/j.issn.2095-6657.2022.18.044

糖尿病是一种代谢性疾病, 以葡萄糖代谢失调为特征的胰腺分泌不足或胰腺功能不全, 最终导致一系列严重的并发症, 发病率急剧增加。一般糖尿病分为两大类: 1 型糖尿病、2 型糖尿病。1 型糖尿病的发生是自身免疫破坏细胞, 胰腺 β 细胞数量减少到正常水平的 20% 以下, 导致无法分泌胰岛素。相比之下, 2 型糖尿病的特点是胰岛素抵抗和胰腺 β 细胞功能的下降, 随着时间的推移, 最终由于细胞凋亡失去胰腺 β 细胞。因此, 保留或补充有功能的胰腺 β 细胞已成为 1 型和 2 型糖尿病的主要治疗重点。尽管胰腺或胰岛移植在治疗糖尿病方面已显示出巨大潜力, 但一个关键障碍是器官短缺。因此, 干细胞作为一种可再生的多能细胞来源, 可用于胰腺 β 细胞再生。目前, 正在开发的新策略, 其目的是产生干细胞来源的胰岛素生成细胞 (IPCs), 进而从根本上治疗糖尿病。因此, 本文详细阐述了干细胞作为产生 IPCs 候选细胞的潜力, 以及存在的治疗应用障碍。

1 糖尿病现状

糖尿病主要包括 1 型糖尿病和 2 型糖尿病。1 型糖尿病是自身免疫破坏胰腺内分泌部分胰岛素产生的 β 细胞, 从而导致机体无法自主分泌胰岛素, 多发于青少年, 很多与遗传有关系^[1]。2 型糖尿病是胰岛素抵抗和胰岛素产生不良足所导致, 多发于中老年人, 大多由于功能退化或者器官障碍导致^[2]。总之, 在糖尿病的病因中, β 细胞的功能障碍是糖尿病发生发展的关键因素, β 细胞再生研究是糖尿病治疗的热点^[3]。

现有常规的治疗方法, 包括口服降糖药和外源性胰岛素注射, 确实可以改善高血糖相关症状, 或者暂时改善靶组织的胰岛素敏感性, 但既不能逆转疾病进展, 也不能逆转细胞功能障碍, 无法从根源上治疗糖尿病。在生理学上, 胰岛素有自己的

调节系统, 胰岛 β 细胞通过感受血糖的变化, 从而分泌胰岛素应对葡萄糖对血糖的刺激。而长时间的外源性注射, 这种平衡会被打破, 随着时间的延长会发展成为由高血糖驱动的微循环与血管并发症。相比 2 型糖尿病, 1 型糖尿病更多地以青少年为主, 由于胰岛素的绝对缺乏, 发生酮症酸中毒的可能性会更大, 因此更为严重。

2 干细胞治疗糖尿病的机制和研究现状

随着干细胞再生医学研究的深入, 干细胞对糖尿病的治疗已显示出良好的应用前景。干细胞是一群具有高度增殖、自我更新和多向分化潜能的细胞。一旦机体需要, 干细胞可按照发育途径, 通过分裂分化产生功能细胞。干细胞在生理状态下, 可维持正常的组织结构和功能, 在病理情况下, 修复病变缺损的组织以恢复功能。其中 MSCs 在该病治疗中的效果, 已在多种动物实验和临床观察中得到肯定。由于 MSCs 来源丰富, 具有增殖能力强、免疫源性低等优势, 所以备受青睐。MSCs 的直接移植, 对治疗糖尿病有一定的治疗效果, 但是也有局限性。研究表明 MSCs 直接移植, 产生的胰岛素并不能直接达到患者所需的量。越来越多的研究表明, MSCs 可以被诱导为胰岛产生细胞 (IPCs), 并在 1 型糖尿病的治疗中具有重要意义, 如图 1 所示。

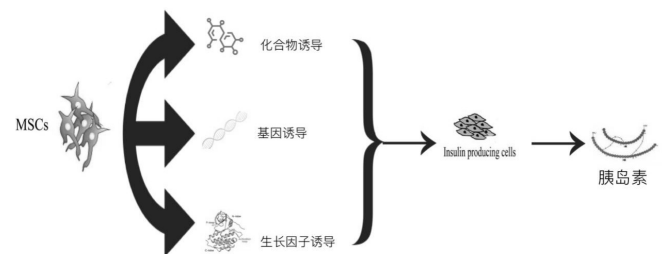


图 1 MSCs 通过不同方法诱导成 IPCs

2.1 诱导 MSCs 分化 IPCs 方面的研究

体外诱导 MSCs 分化 IPCs 机制。就体内的 MSCs 而言，自体分化的成 IPCs 细胞的效率非常低，所以需要人为干预手段来提高转化为 IPCs 的效率，一些研究已经找到化学手段或者基因手段，即通过化合物（例如激活素 A、烟酰胺、曲古菌素 A 和 β -巯基乙醇等）诱导 MSCs 形成 IPCs。

与成骨、成软骨和成脂分化不同，涉及诱导 MSCs 分化 IPCs 的研究差异很大。这种差异通常与所使用的分化技术、培养基的组成、培养时间以及完成分化的步骤数有关。然而，虽然没有“最佳的”分化培养基成分，但最突出的研究提到在培养基中使用烟酰胺、exedin-4、 β -巯基乙醇等化合物来促进分化 MSCs 转化为 IPCs。

由此可知，在诱导 MSCs 形成 IPCs 这一领域，实验大多有着共同特征，那就是培养基加入多种化合物制作模拟胰腺生长发育的微环境，再接着加入多种诱导因子例如 bFGF（碱性成纤维生长因子）、HGF（干细胞生长因子）、EGF（表皮生长因子）等一步步诱导 MSCs 分化为 IPCs。再通过检测其中的糖化血红蛋白（Hb1c）、C 肽等胰岛素相关指标，来判断分化的效率与效果。

2.2 化学手段诱导 MSCs 分化 IPCs

为了提高 IPCs 治疗的效率，已陆续有团队启动相关研究。已有研究表明，PDX-1 基因是一种对 β 细胞发育和功能都至关重要的转录因子，可以用来表示分化效果的基因。它的表达越高，越能证明 MSCs 分化为 IPCs 的效果越好。在分化结束后，可以用 PCR 检测法检测出。已有证据表明，TSA 具有染色质重塑的潜力，并且可以在适当的培养条件下，在高葡萄糖浓度和 GLP-1 的存在下，促使骨髓细胞分化为 IPCs。Mahmoud 团队比较了三种诱导 IPCs 分化方案的效率，用长春新碱（第一步）、曲古抑菌素 A（第二步）和 β -巯基乙醇（第三步），选择 PDX-1 基因为指标来调整相关试剂加入的剂量和时间。因此，在长春新碱方案中使用 Cnp 试剂（一种新型的胰腺 β 细胞分化诱导剂，通过激活 P38 氮活化蛋白激酶，在诱导 neurogenin-3 基因中起关键作用）。

在曲古抑菌素 A 方案中使用 TSA 试剂（TSA 是一种从吸水链霉菌菌株代谢物中分离出来的天然物，具有抗真菌和抗生素活性），来促进 PDX-1 基因的表达，从而达到更高的分化效率。在 β -巯基乙醇方案中使用 β -巯基乙醇来促进 PDX-1 的表达，以利于增强 HBM-MSCs 分化为 IPCs 的能力。通过流式细胞仪分析，研究结果表明，三种分化方案产生的胰岛素阳性细胞比例基本相似，介于 0.7% 和 5% 之间。经过 PCR 检测 PDX-1、胰高血糖素和生长抑素的基因表达，虽然相较于未分化的 MSCs 组有着明显提高，但是只有正常对照组的一半。结果进一步显示在以后的实验鉴于其简单性和分化

所需的持续时间短，计划优先使用基于 TSA 的分化方案。因此，在发现改进高效率的方案前，后续的很多诱导方案都是采用他们的方案。

研究人员发现改变 MSCs 的贴壁状态，也可以做到提高化学手段诱导 MSCs 的效率。他们将 BMSCs（骨髓间充质干细胞）的贴壁状态与非贴壁状态分别进行诱导形成对照实验。实验总共分为三个阶段。在实验的第一阶段，用 DMEM-高糖加上 10 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子、10 ng/ml 表皮生长因子（EGF），2%B27 补充剂，0.5% 牛血清白蛋白（BSA）和 0.1 mmol/l β -巯基乙醇将 BMSCs 培养 6 天，每 2 天更换一次培养基。在第二阶段，通过 DMEM-高糖加 10 ng/ml EGF、20 ng/ml 激活素 a、10 mmol/l 烟酰胺、2%B27、0.5%BSA 和 0.1 mmol/l β -巯基乙醇诱导 6 天，将两个分化的 nestin 阳性细胞分化为 IPC，每 2 天更换一次培养基。第三阶段是预期的 IPCs 通过含 DMEM-低葡萄糖（含 5.6 mmol/l 葡萄糖）经过 4 天的培养成熟；加上 10 ng/ml EGF、10 nmol/l exendin-4、10 ng/ml betacellulin、2%B27、0.5%BSA 和 0.1 mmol/l β -巯基乙醇，每 2 天更换一次培养基。结果根据细胞簇内细胞聚集率和 IPCs 百分比计算，非贴壁诱导后分化为 IPCs 的 BMSCs 为 $29.80 \pm 3.95\%$ ，贴壁诱导后分化为 IPCs 的 BMSCs 为 $18.40 \pm 2.08\%$ （ $P < 0.01$ ， $n=10$ ），前者明显高于后者。遗憾的是，分化率虽然高了超 10%，但是分化的细胞仍然达到了 30%，这个分化率还是处于比较低的水平。由此可以明确的是，在化学试剂诱导方面，我们还需要进一步提高分化效率。

2.3 基因手段诱导 MSCs 分化 IPCs

与化学手段不同，基因手段则是通过诱导信号来使 MSCs 表达目的基因，从而达到目的效果。例如，肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体（TRAIL）基因的表达是治疗胶质母细胞瘤（GBM）的有效方法。利用 GBM 的内在表达谱及其相对正常脑组织的 TGF- β 表达升高，研究人员设计人类脂肪来源的 ADSC（脂肪来源的间充质干细胞），其在 TGF 的触发下增加 TRAIL 的表达信号。

基因手段诱导生成 IPCs 一般情况下需要很高的成本、复杂的过程，花费的时间也很多，并且很多都以病毒为载体，可能会导致癌症与病变，但是基因工程手段的优点就在于效率高。在基因诱导方面也有了成果，在高糖条件下用 DMSO（二甲基亚砜），胰岛细胞发育相关基因的表达水平在 ADSC 衍生的 IPCs 中上调。Wnt-3a 在 mRNA 和蛋白质水平上促进了 Wnt 信号标志物和胰岛细胞发育相关基因的表达。Wnt/ β -catenin 信号通路可能对 ADSC 衍生的 IPCs 的诱导、增殖和 GSIS 发挥积极作用。

随着研究的深入，很多研究人员也能摸索出来提高效率的优化方案。Dayer 团队发现 MafA 是一种具有 b-zip 设计的转录

因子,属于 MafA 家族。MafA 蛋白与胰岛素基因启动子的胰岛素增强子元件 RIPE3b 结合并激活胰岛素基因表达。该实验将分化组分为两组,一组为不加 MafA 的对照组,一组则为加 MafA 组。在对照组中,执行基本分化方案。

基本分化方案包括三个主要阶段。在第一阶段,细胞(1×10^6 ng/ml)在含有 DMEM-LG、10%FBS 和 1%Pen/Strep 的培养基中培养,直到细胞达到 80% 汇合。在第二阶段,分化培养基含有 DMEM-低葡萄糖、 $20 \mu\text{M}$ 烟酰胺、5%FBS 和 1%Pen/Strep 培养 7 天。在第三阶段,添加 $10 \mu\text{M}$ MExidix-4 在 MafA 组中,细胞通过基本分化方案进行分化,然后在第三阶段的第 3 天用重组 MafA/pCDNA3.1 (+) 载体转染。

实验结果表明,分化的 IPCs 表达了各种与胰腺 β 细胞成熟、维持和胰岛素分泌相关的基因,包括 Nkx2.2、Nkx6.1、Isl-1、Pdx1 和 Ngn3。相比基本分化对照组,都有着显著的提高,其中 Isl-1、Pdx 表达更是提高了 2.5 倍。通过新方案获得的 IPCs 表现出模拟胰腺发育的基因表达模式,效率之高表明这种体外模型可能是一种诱导或增加胰腺内分泌细胞分化的有用方法,并有可能成为产生 β - 的新方法的潜力。但可惜的是,经此得到的 IPCs 移植后无法降低对大鼠的高血糖,作者认为这可能源于移植的 IPCs 数量不足或体内分化细胞的短期存活时间。因此,基因手段在兼顾效果与分化效率时还有着很多不足,未来还有许多路需要走。

3 MSCs 治疗 1 型糖尿病机制研究和现状

3.1 动物的研究

Ayat M 团队研究发现,PDX1、GLUT2 这两种基因在糖尿病患者胰腺中表达很低,而通过 IPCs 移植后,这两项基因可以有比较高的表达。在研究中,将实验分为了四组,分别用 STZ 注射制造鼠的 1 型糖尿病模型,分为对照组,不加任何处理的糖尿病组,MSCs 治疗组和 IPCs 治疗组,由此比较 IPCs 和 MSCs 的治疗效果。

结果显示,对照组的血清浓度最高胰岛素水平(95 ± 7.2 ng/dl),IPCs 组(82.9 ± 10.7 ng/dl),MSCs 组(49.6 ± 11.8),糖尿病组(9.4 ± 5.8 ng/dl),实验结果中也充分说明 IPCs 组对小鼠的疗效是明显优于 MSCs 组。Mahmoud 团队在实验中使用狗开展实验。化学诱发糖尿病 7 只,正常对照 3 只。对于每只糖尿病狗,使用以毛曲他汀为基础的方法,每公斤 500 万人 BMSCs 被分化成 IPCs。然后,将细胞装入 2 个 TheraCyte 胶囊,这些胶囊被移植到直肌鞘下(相当于一个人造胰岛)8 周左右,大部分实验狗的空腹血糖恢复到正常血糖水平,少部分有恢复但不到正常水平,记录糖化血红蛋白(HbA1c),正常犬的 HbA1c 水平在 3.1% 到 3.5% 之间。

治愈的实验动物的值在 3.6% ~ 3.8% 内。对于部分糖尿

病控制不完全的犬,记录达到了更高的值(4.7% ~ 6.7%)。取出胶囊后,空腹血糖水平迅速恢复到移植前水平。移植 IPCs 组胰岛素也在第八周达到最高水平(与血糖恢复正常时一致),达到了 $25 \sim 33 \mu\text{IU/mL}$ 内,同时 C 肽也遵循相同的变化。在从分离装置中回收的细胞中,所有相关胰腺内分泌基因(胰腺激素、胰腺酶和内分泌前体以及转录因子的基因)的相对表达显著增加。与体外分化结束时的值相比,胰岛素基因表达水平在 6 个月时增加了约 30 倍,在 12 和 18 个月时增加了约 100 倍。

Dayer 团队的研究结果也具有参考价值,MafA+IPCs 中 β 细胞特异性基因的表达高于对照组细胞。并且与对照组相比,MafA+ 组中 IPCs 暴露于葡萄糖溶液中后,葡萄糖诱导的胰岛素分泌更高。遗憾的是,实际控制血糖水平的能力结果,却与胰岛素生成量相反。经操作的 IPCs 移植的糖尿病大鼠的平均胰岛素浓度显著高于 ADMSCs 移植的大鼠。

在第 6 周监测期间,接受未分化 ADMSCs 的 STZ 糖尿病大鼠的血糖浓度没有明显降低。将对照 IPCs 移植到 STZ 糖尿病大鼠时,在 3 周内观察到平均血糖浓度显著降低。然后,血糖浓度的平均值逐渐升高。此后,直到移植后第 6 周结束时,葡萄糖浓度的平均值达到正常血糖条件。经 MafA+ 组注射的 IPCs 作用于 STZ 糖尿病大鼠的平均血糖浓度没有明显降低。虽然 MafA+ 组实验结果证明了经 MafA 处理过的 IPCs 治疗较于 ADMSCs 治疗效果没有太大区别,但是对照组的 IPCs 移植对血糖的控制效果是明显的。这也能说明 IPCs 的移植治疗相对 ADMSCs 来说,更有效果。

3.2 人体的研究

有人已经直接通过移植胰腺或胰岛细胞到患者体内,来替代功能丧失的胰岛细胞,从而增加胰岛素的产生,满足糖尿病患者对胰岛素的需求。这项治疗方法已经获得一些成功,但是存在其他方面的缺点,例如在胰岛细胞的供体缺乏、免疫排斥、术后并发症严重等诸多方面有着限制。已经有学者尝试从人类胚胎干细胞(hESC)和人类诱导多能干细胞(hiPSC)产生 β 细胞,这代表了一种研究糖尿病发展和治疗的新型体外技术。

现有临床试验注册中心关于 MSCs 治疗 T1DM 的临床研究中,大部分为脐带 MSCs(UC-MSCs),即沃顿商学院的脐带华通间充质干细胞(WJ-MSCs)和骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)用于治疗糖尿病。另一种是经血来源的间充质干细胞和脱落牙来源的间充质干细胞。这些临床试验研究只能证明使用 MSCs 治疗的短期安全性与有效性,样本量小,缺乏多中心研究,不能作为临床实践的标准。

3.3 可能的副作用

在诱导生成 IPCs 后,由于化学毒性的存在,以至于细胞

的存活时间很短,除此之外还有很多方面并不完善,已经有实验结果证实了人脐带来源的 MSCs (hUC-MSCs) 在定向分化为 IPCs 之前和之后的免疫原性。研究表明, hUC-MSCs 衍生的 IPCs 在体外是低免疫原性的,但在将它们移植到有免疫能力的小鼠体内,会引起同种异体反应,因此还有许多问题需要解决。诱导细胞不但会引起免疫排斥反应,一些化合物诱导剂通常用于诱导分化还有可能可损伤细胞 (TSA 可增加细胞的凋亡率),引起病毒介导的分化提升致肿瘤的风险。不过,总体趋势是好的,期待未来能攻克这些难题,那对人类治疗糖尿病将是一个史诗级的进步。

3.4 体外诱导 IPCs 对于胰腺癌的治疗应用

已经有研究表明,胰岛素生成细胞 (IPCs) 移植对糖尿病大鼠 90% 胰腺切除术后的治疗效果。这项研究主要是基于胰腺癌治疗的基础上,胰腺切除术在胰腺癌的治疗中起着至关重要的作用,并且是唯一有可能实现长期生存的治疗方法。从理论上讲,通过全胰腺切除术 (TP) 来消除高风险的胰腺吻合术可以降低围手术期的发病率。

在过去的几十年里,由于在胰腺患者内分泌功能不全的手术和术后管理方面都取得了显著进步,TP 已经出现明显疗效。胰岛移植是一个很好方法,用于降低 TP 后与糖尿病 (DM) 相关的发病率。但是现如今胰岛的捐献者极度稀缺,此外,还有着免疫排斥和潜在的自身免疫对胰岛的反复攻击。为了解决免疫问题以及胰岛短缺问题帮助治疗胰腺癌,研究人员在本研究中尝试诱导 hUC-MSCs 分化为 IPCs,从而满足所需胰岛的效果。

对于胰腺分化,从第四代达到 80% ~ 90% 汇合的 hUC-MSCs 被诱导分化为 IPCs。hUC-MSCs 的胰腺诱导程序是根据他们先前的研究进行的。在他们的实验中, hUC-MSCs 最终诱导成为 IPCs,通过门静脉移植到糖尿病大鼠体内后,血糖水平下降,表明移植的细胞分泌功能性胰岛素。移植后, IPCs 移植可以降低 SD 大鼠的高血糖。移植后两周,与对照 SD 大鼠的 25.8 mmol/L 相比,血糖水平降至约 18.7 mmol/L。因此,通过体外诱导的 IPCs 可以为 TP 的手术补充胰岛缺乏的可行性。但是动物实验的成功只是提供了思路,到应用于临床,还需要很长的时间。

4 展望

细胞替代方法来治疗糖尿病仍处于起步阶段。最需要克服细胞治疗的两个主要挑战:移植细胞的有效性和安全性。人们一直在不断寻找具有最佳特性的干细胞来源,如分化效率、移植后的安全性、广泛的可及性和所涉及的程序的低复杂性。到目前为止,每一种 IPCs 策略都有其优点和缺点。因此,不可

能确定它们中的哪一个会在各种诱导方法中成功。然而,即使在最好的情况下,从人胰腺中提取的候选干细胞/体细胞也不能进行广泛测试,以表明这些诱导细胞完全复制内源性细胞的所有功能。虽然我们已经取得了巨大的进展,但由于细胞功能不完全和诱导效率相对较低,在干细胞来源的细胞移植成为现实之前,还有更多重要的工作要做。

5 结语

1 型糖尿病患者多为青少年,如果不能及时控制与治疗,对其身心健康发展都是极大障碍。而 1 型糖尿病大多数和遗传有关,社会需要提高对 1 型糖尿病的关注度,多宣传这方面的遗传知识,以利于避免 1 型糖尿病患者的出现。如今,最适合也是最有希望攻克治疗 1 型糖尿病的新型生物疗法就是干细胞治疗,而其中 MSCs 也是最具分化潜能的干细胞。在以往的实验研究中,直接作用 MSCs 分化胰岛使其自发分化是一个可行的治疗手段,但是效果往往不是那么明显。在体外经人为干预诱导分化的 IPCs 移植治疗,已经有研究表明,效果是非常接近于正常对照组的,在对胰腺癌手术改善预后方面也有很大作用。同时,随着研究的深入,提高体外诱导 IPCs 效率的方法也层出不穷,但是这项技术还有许多需要我们完善的地方,例如,免疫原性在植入体内之后会产生免疫反应,以及化学手段中的一些诱导化合物会使细胞凋亡、基因手段可致癌等。距离完全攻克这项难题,我们还有很长的路要走。

参考文献:

- [1]Cañibano-Hernández Alberto, Sáenz Del Burgo Laura, Espona-Noguera Albert et al.Current advanced therapy cell-based medicinal products for type-1-diabetes treatment[J].Int J Pharm, 2018, 543: 107-120.
- [2]Raz I, Riddle M. C, Rosenstock J, et al.Personalized management of hyperglycemia in type 2 diabetes: reflections from a Diabetes Care[J].Diabetes Care.2013, 36 (6): 1779-1788.
- [3]Chen Chunguang, Cohrs Christian M, Stertmann Julia, et al.Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis[J].Mol Metab, 2017, 6: 943-957.

作者简介:杨伦昊(2000-),男,广东清远人,河北医科大学临床学院临床医学专业 2018 级在读本科生,主要从事干细胞、再生医学、糖尿病研究。