

·综述 General review·

骨髓间质干细胞体外分化为胰岛细胞的研究进展

李爱梅, 邓 钢

Research advancement of the stem cells of the bone marrow interstitial substance differentiating into islet cells LI Ai-mei, DENG Gang. Department of Intervention, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing, Jiangsu Province 210009, China

[Abstract] Type I diabetes mellitus (T_1 DM) is a chronic metabolic disease liable to teenagers all over the world. Its mechanism is due to the attack of auto-immune system on the body's own islet cells leading to hyperglycemia with great damages to the body. The implantation of islet cells is an effective way of curing T_1 DM. The authors reviewed in detail the research advancement of islet cell source from stem cells of the bone marrow interstitial substance. (J Intervent Radiol, 2005, 14:433-435.)

[Key words] Type I diabetes mellitus; Stem cells; Islet cells; Implantation

1 型糖尿病(T_1 DM)是遍及北美和欧洲的易发于青少年的一种慢性代谢性疾病,据估计发病率可达 0.2%。我国 T_1 DM 的发病率亦日趋增高,糖尿病已成为世界共同关注的话题。 T_1 DM 发病机制为自身免疫系统攻击胰腺胰岛细胞,从而使胰岛素分泌功能受损引发高血糖,其危害性极大。传统的外源性胰岛素疗法,无法控制其严重并发症的进展。

目前诸多试验证明,胰岛 β 细胞替代疗法——胰岛细胞移植,是治愈 T_1 DM 的有效方法。因 T_1 DM 患者数量巨大,细胞来源问题亟待解决;而干细胞(stem cells)作为一类具有多向分化潜能的细胞,已逐渐成为胰岛 β 细胞替代物的理想资源^[1-4]。Ammon 等^[2]总结了 3 种获得胰岛细胞替代物的可能途径:①对非内分泌细胞进行基因修饰;②非内分泌干/祖细胞或成熟细胞的横向分化;③胰岛干细胞调控分化为大量成熟的功能性胰岛。虽然以上途径都取得了很大的进展;但是,仍然存在以下问题:①基因修饰方法的关键问题是载体要安全、转染效率要高和基因表达要稳定持久,目前很难完全做到;②胰岛干细胞增殖和分化调控机制未明,再加上取材损伤大,故而临床应用受限。第二种途径目前引起人们的极大兴趣,肝卵圆细胞、肠上皮细胞、神经干细胞及骨髓源性干细胞的研究也取得很大的进展;而骨髓间质干细胞因其独特的优势引起了学者们的研究兴趣,有关成体骨髓间质干细胞方面的研究最近发展很快,通过体外分离培养扩增,研究人员对骨髓

间质干细胞生物学特性有了进一步了解。现对骨髓间质干细胞及其诱导分化为胰岛细胞方面的研究进展做一综述。

一、骨髓间质干细胞概述

研究表明骨髓组织中至少包含 2 种不同却又互相依存的干细胞,即造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)和间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)两大类。骨髓间质干细胞是成体干细胞的一种,在正常情况下大多处于休眠状态,在病理状态或在外因诱导下可以表现出不同程度的再生和更新能力,既可以分化为造血基质细胞,还可以向多种造血以外的组织迁移、定位并分化为组织细胞,并且在体外培养时表现出多向分化潜能。Pitneer 等^[5]对人类间质干细胞定义的“金标准”是:骨髓源性成纤维细胞在体外适宜的刺激下,能沿着 3 个重要方向分化:骨细胞、脂肪细胞以及软骨细胞。这一定义是基于间质干细胞的功能而言的。也有证据表明^[6]:骨髓中预存有组织特异性肌肉、神经、肝干或祖细胞,人类和小鼠骨髓在巨噬细胞集落刺激因子(G-CSF)动员条件下,通过实时逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)在外周血可以检测到单个核细胞;并且,利用 SDF-1 化学诱导剂和实时 RT-PCR 表明骨髓中预存有早期的组织特异性肌肉、神经、肝干或祖细胞,且这些细胞表面表达 CXCR4 受体,在应激和损伤时可以动员到外周血中。

(一)生物学特性 关于其生物学特性,国外学者阐述较多^[7-9]。多向分化潜能(multipotent differentiation)和自我更新(self-renewing)是干细胞的两大基本特点。贾延洁等^[10]总结骨髓间质干细胞具有如下优点:①多向分化潜能;②易于基因修饰,

作者单位:210009 东南大学附属中大医院介入放射科

通讯作者:李爱梅

可以将外源性基因修饰骨髓间质干细胞,建立一种安全的基因治疗的“细胞载体”,因而对胰岛功能重建及其疾病的基因治疗有广泛的应用前景;③体外易增殖,采用合适的纯化和增殖方法在 6 周内增加 2×10^9 倍,照此计算一次骨穿所获骨髓间质干细胞可在较短时间内增值到 10^{13} 个,能满足移植需要;④方法简单,采用骨髓穿刺获取自体骨髓间质干细胞,因其表面表达主要组织相容性抗原(MHCA),可获得免疫豁免,从而可避免自身免疫排斥的难题。

(二) 间质干细胞分离、纯化及培养 到目前为止,研究人员已经成功地分离出大鼠、猫、狗、狒狒、兔子、猪、山羊及绵羊的间质干细胞。Philippe 等^[11]利用 Kopen 的分离方案成功地分离了小鼠的成体骨髓间质干细胞,并且证明小鼠的骨髓间质干细胞同人类的间质干细胞具备同样的形态学和功能上的特性,这将为疾病模型在临床预试验期的测定提供良好的条件。骨髓间质干细胞纯化方面,由于其缺乏特异表面标志,目前较常用的是培养的细胞差异贴壁法,尤其是对于人类骨髓间质干细胞^[12,13]。另外,随着对骨髓间质干细胞表面标志的深入研究(如表 1 所示),利用表面标志物进行纯化也取得了进展;Ortiz 等^[14]通过免疫清除 CD34/CD45/CD11b 对 MSCs 进行纯化,使其纯度大大的提高。

表 1 骨髓源性干细胞的主要生物学标志

表面标志类型	标志物
特异性抗原	SH2, SH3, SH4, STRO-1, α 肌动蛋白, MAB1740
细胞因子及生长因子	白介素: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, LIF, SCF, FLT-3 配体, GM-CSF, G-CSF, M-CSF
细胞因子及生长因子受体	IL1-R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN γ R, TNF1R, TNF2R, TGF β 1R, TGF β 2R, bFGFR, PDGFR, EGFR
黏附分子	整合素: $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5 整合素链: α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α v, β 1, β 3, β 4 ICAM-1, 2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-选择素, 内皮素, CD44
细胞外基质	I, III, IV, V, VI 型胶原纤维巢蛋白, 层连蛋白

二、骨髓间质干细胞横向诱导分化为胰岛细胞的研究进展

骨髓间质干细胞具有多向分化潜能,其分化最终结果受外界诱导环境的影响很大。Ball 等^[15]通过体外直接培养(co-culture)分化成熟的血管内皮细胞(5 代)和成人骨髓间质干细胞(3 代)后,发现有 α -肌

动蛋白(α -actin)mRNA 及其蛋白生成,并认定直接细胞接触可以影响骨髓间质干细胞的分化方向。这说明骨髓间质干细胞具有很强的可塑性,但针对骨髓间质干细胞能否横向诱导分化为胰岛细胞问题存在有争议:如 Choi 等^[16]利用绿色荧光蛋白转基因小鼠作为供者,将其新鲜分离的骨髓细胞静脉注入由链佐星(STZ)诱导所致糖尿病小鼠模型体内,实验结果显示胰岛细胞增殖及胰管附近少量胰岛素分泌细胞,但是并未发现来源于骨髓细胞的胰岛素分泌细胞;所以他们认为骨髓源性干细胞与胰岛细胞完全不同,骨髓移植后横向分化为胰岛细胞的骨髓细胞很少。但是也有一些研究学者已证实间质干细胞可以分化为胰岛细胞表型,且一旦植入宿主胰腺体内,这些细胞即表达胰岛表面标志和对葡萄糖刺激反应产生胰岛素分泌。如 Janus 等^[17]在受体小鼠体内骨髓利用 CRE-LOXP 细胞示踪系统证实这些细胞来源于供者细胞横向分化(transdifferentiation)而非供-受者细胞融合(cell fusion)。Hess 等^[18]和 Mathew^[19]等均用试验证实骨髓源性干细胞能促进胰腺再生,在胰腺 β 细胞受损时,其相应部位出现绿色荧光蛋白标记的骨髓源性内皮细胞的集聚。最近,贾延诒等^[20]采用体外横向分化技术,将成年大鼠骨髓间质干细胞经三期诱导分化为胰岛素分泌细胞,利用间接免疫荧光法鉴定发现诱导后的胰岛素分泌细胞可以表达胰岛素、胰高糖素、生长抑素和 PDX-1 等蛋白;利用 RT-PCR 法检测到诱导后的胰岛素分泌细胞表达胰岛素-1、葡萄糖转运子 2(GLUT2)、葡萄糖激酶及其多种转录因子 mRNA;胰岛素分泌量增加,且葡萄糖刺激实验反应敏感。这项研究为糖尿病患者治疗点燃了新的希望。

三、目前几种不同细胞来源的体外诱导方案

Leon-Quinto 等^[21]利用以质粒为载体,转染包含有新霉素抗性基因(neomycin-resistance gene)的 Nkx6.1 启动子基因给小鼠胚胎干细胞,然后将这些细胞置于含有一些参与胰腺内分泌部的发育和调控的因子中体外培养,结果发现:由免疫组织化学、RT-PCR 及放射免疫方法检测新霉素筛选的 Nkx6.1 阳性细胞经诱导后可以表达 β 细胞基因,如 Pdx6.1、GLUT-2、Sur-1、胰岛素及葡萄糖激酶等;且置入 STZ 诱导的糖尿病小鼠模型体内,可以纠正其高血糖。日本学者 Nakajima-Nagata 等^[22]利用改良的胶原酶灌注法从肝实质中获取肝小细胞(small hepatocytes, SHCs),通过他们设计的 5 步法即:①分离获取 SHCs 并分为 3 组;②首先在高糖培养基中培养 0~5 d;③

然后每组加 1% 二甲基亚砷 (DMSO) 以促进细胞扩增 2 d (5 ~ 7 d); ④第二组在诱导分化培养基及低血清 (0.2% FBS) 条件下继续培养 2 d (7 ~ 9 d); ⑤利用腺病毒为载体, 将带有示踪系统的绿色荧光蛋白标记的胰十二指肠同源序列-1 (Pdx-1-IRES-GFP) 或绿色荧光蛋白 (GFP) 转染同一培养基中的细胞继续培养至 15 d; 通过 RT-PCR 分析发现其 Pdx-1 阳性的细胞要比 Pdx-1 阴性的细胞释放胰岛素的量高 2 倍, 而对照组无释放胰岛素。实验结果表明: 肝小细胞可以分化为胰岛素分泌细胞, 并且 Pdx-1 于体外可以影响已分化的肝小细胞释放胰岛素。以上 2 种方法均利用外源基因转染体外培养的干细胞而使细胞分泌胰岛素, 从而有可能成为 β 细胞的替代物。理想的 β 细胞替代物必需具备以下特点: 表达葡萄糖激酶 (CK) 和葡萄糖转运子 2 (GLUT2); 低表达高亲和力的己糖激酶 (HK); 表达激素原转换酶 PC2、PC3, 并能将胰岛素原有效地加工成为胰岛素; 能将胰岛素释放入细胞外的分泌系统。要达到以上要求, 还有很多问题尚待解决: ①骨髓间质干细胞的生物学特性多由体外实验获得, 同其在体内的某些特性及功能 (如免疫豁免、定向分化等) 是否一致; ②骨髓间质干细胞缺乏特异性表面标志, 难以分离和鉴定; ③需要进一步探索更适合的诱导微环境, 构建适当的细胞外基质以提高诱导的成功率; ④诱导后的细胞形态及功能上的鉴定缺乏统一标准及糖尿病模型设计等等。

骨髓间质干细胞体外成功诱导分化为胰岛素分泌细胞, 已为胰岛移植开辟新的研究思路; 但其能否用于 T_1DM 的治疗, 临床研究还有待于进一步深入。

[参 考 文 献]

- [1] Colman A. Making new beta cells from stem cell. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, 15: 337-345.
- [2] Ammon B, Ramiri PV. In vitro-generation of surrogate islets from adult stem cells. *Transpl Immunol*, 2004, 12: 259-272.
- [3] Gordon CW. Can we make surrogate β -cells better than the original?. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, 15: 347-357.
- [4] Street CN, Sipione S, Helms L, et al. Stem cell-based approaches to solving the problem of tissue supply for islet-transplantation in type 1 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 667-683.
- [5] Pittengre MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- [6] Kucia M, Ratajczka J, Reca R. Tissue-specific muscle, neural and

liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells, Mol Dis*, 2004, 32: 52-57.

- [7] Short B, Brouard N, Ramakrishnan A, et al. Mesenchymal Stem Cells. *Arch Med Res*, 2003, 34: 565-571.
- [8] Rouffose LA, Direkzi NC, Otto WR, et al. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 585-597.
- [9] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 568-584.
- [10] 贾延颀, 周 燕. 干细胞诱导分化为胰岛细胞的进展. *中华内分泌代谢杂志*. 2004, 20: 87-89.
- [11] Tropel P, Nale D, Platet N. Isolation and characterization of MSCs from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*, 2004, 295: 395-406.
- [12] Muraglia A, Cancedda R, Ceualto R. Chonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*, 2000, 3: 249-258.
- [13] Cotter DC, Sekyia I, Procekp DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow Stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 7841-7845.
- [14] Ortiz IA, Gambelli F, McBride C. Mesenchymal Stem Cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effect. *Proc Natl Sci USA*, 2003, 100: 570-585.
- [15] Ball SG, Shuttleworth AC, Kiely CM. Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int J Biol Cell Biol*, 2004, 36: 714-727.
- [16] Choi JB, Uchino H, Zuma KA, et al. Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 2003, 46: 1366-1374.
- [17] Janus A, Holz GG, Theise ND. In vivo clonogenicity of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*, 2003, 111: 843-850.
- [18] Hess D, Li L, Martin M, et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 763-770.
- [19] Mathew V, Hanson P T, Ford E, et al. Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury. *Diabetologia*, 2004, 53: 91-98.
- [20] 贾延颀, 钟 乐, 宋建辉, 等. 体外诱导大鼠骨髓间质干细胞分化为胰岛素分泌细胞. *中国当代儿科杂志*, 2003, 5: 393-397.
- [21] Leon-Qunito T, Jones J, Skoudy A, et al. In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia*, 2004, 47: 1442-1451.
- [22] Nakajima-Nagata N, Sakuria T, Mitaka T, et al. In vitro induction of adult hepatic progenitors cells into insulin-producing cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318: 625-630.

(收稿日期: 2004-11-09)

骨髓间质干细胞体外分化为胰岛细胞的研究进展

作者: 李爱梅, 邓钢, LI Ai-mei, DENG Gang
作者单位: 210009, 东南大学附属中大医院介入放射科
刊名: 介入放射学杂志 **ISTIC PKU**
英文刊名: JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY
年, 卷(期): 2005, 14(4)
被引用次数: 4次

参考文献(22条)

1. Colman A [Making new beta cells from stem cell](#) 2004
2. Ammon B, Ramiri PV [In vitro-generation of surrogate islets from adult stem cells](#) 2004
3. Gordon CW [Can we make surrogate \$\beta\$ -cells better than the original?](#) 2004
4. Street CN, Sipione S, Helms L [Stem cell-based approaches to solving the problem of tissue supply for islet-transplantation in type 1 diabetes](#) 2004
5. Pittengre MF, Mackay AM, Beck SC [Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells](#) 1999
6. Kucia M, Ratajczta J, Reca R [Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury](#) 2004
7. Short B, Brouard N, Ramakrishnan A [Mesenchymal Stem Cells](#) 2003
8. Rouffose LA, Direkzi NC, Otto WR [Circulating mesenchymal stem cells](#) 2004
9. Barry FP, Murphy JM [Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization](#) 2004
10. 贾延颢, 周燕 [干细胞诱导分化为胰岛细胞的进展\[期刊论文\]-中华内分泌代谢杂志](#) 2004
11. Tropel P, Nale D, Platet N [Isolation and characterization of MSCs from adult mouse bone marrow](#) 2004
12. Muraglia A, Cancedda R, Ceuarto R [Chonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model](#) 2000
13. Cotter DC, Sekyia I, Procekp DJ [Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow Stromalcells](#) 2001
14. Ortiz IA, Gambelli F, McBride C [Mesenchymal Stem Cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effect](#) 2003
15. Ball SG, Shuttleworth AC, Kielty CM [Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate](#) 2004
16. Choi JB, Uchino H, Zuma KA [Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-clerived cells into pancreatic beta cells](#) 2003
17. Janus A, Holz GG, Theise ND [In vivo clerivation of glucosecompetent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion](#) 2003
18. Hess D, Li L, Martin M [Bone marrow-clerived stem cells initiate pancreatic regeneration](#) 2003
19. Mathew V, Hanson P T, Ford E [Recruitment of bone marrowclerived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury](#) 2004
20. 贾延颢, 钟乐, 宋建辉 [体外诱导大鼠骨髓间质干细胞分化为胰岛素分泌细胞\[期刊论文\]-中国当代儿科杂志](#) 2003

21. [Leon-Qunito T, Jones J, Skoudy A](#) [In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells](#) 2004
22. [Nakajima-Nagata N, Sakuria T, Mitaka T](#) [In vitro induction of adult hepatic progenitors cells into insulin-producing cells](#) 2004

引证文献(3条)

1. [王刚, 刘丽琼](#) [体外诱导干细胞分化为胰腺β细胞的途径及研究近况](#)[期刊论文]-[甘肃中医学院学报](#) 2007(5)
2. [肖红珍, 李伟娟, 俞芳, 项岫秀, 张慧芹, 刘秀玲, 刘阁玲](#) [肾包膜内注射骨髓间充质干细胞在链脲佐菌素糖尿病模型大鼠体内的定位及功能测评](#)[期刊论文]-[中国组织工程研究与临床康复](#) 2007(20)
3. [肖红珍, 张慧芹, 刘阁玲](#) [外源性骨髓间充质干细胞在糖尿病模型大鼠体内向胰腺迁移并分化为胰岛细胞的趋势](#)[期刊论文]-[中国组织工程研究与临床康复](#) 2007(15)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200504034.aspx

授权使用: qkxb11(qkxb11), 授权号: 1800e51d-87c6-4b82-bebf-9e2f01001a68

下载时间: 2010年11月15日