

# 脐血细胞治疗糖尿病的研究进展

秦琳,李红

(昆明医学院第一附属医院内分泌科,云南昆明 650000)

**[摘要]** 干细胞移植是治疗糖尿病的一条新途径,脐血数量丰富、取材容易且不存在伦理问题,成为干细胞的理想来源之一。脐血细胞治疗糖尿病的研究已取得一定进展,部分实验显示可纠正糖尿病动物的高血糖状态。在临床应用脐血细胞治疗糖尿病之前,还有一些技术障碍有待克服。

**[关键词]** 脐血;移植;糖尿病;分化

**[中图分类号]** R587.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1673-7210(2009)04(a)-007-03

## Study progress of umbilical cord blood cells therapy to diabetes

QIN Lin, Li Hong

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650000, China)

**[Abstract]** Stem cells transplantation is a new way to cure diabetes, human umbilical cord blood, with its real abundance, simply collection procedure and no serious ethical dilemmas, represents a ideal source of stem cells. Certain progress has been made in this field and experimental animal hyperglycemia has been rectified. However, many problems still need to be resolved before clinical application.

**[Key words]** Umbilical cord blood; Transplantation; Diabetes; Differentiation

目前的降糖药物和胰岛素注射治疗尚不能根治糖尿病,晚期的严重并发症大大缩短了糖尿病患者的寿命。胰岛移植是治疗1型糖尿病和部分2型糖尿病重症患者的有效方法之一,但供体的来源严重不足,限制了其应用。干细胞移植是治疗糖尿病的一条新途径,脐血数量丰富、取材容易且不存在伦理问题,成为干细胞的理想来源之一。本文对近年来脐血细胞治疗糖尿病的研究进展作一综述。

### 1 脐血细胞移植治疗糖尿病的体内实验

#### 1.1 对1型糖尿病的效果

脐血细胞移植治疗1型糖尿病实验鼠取得良好效果。2001年Ende Norman等<sup>[1]</sup>用密度梯度离心法分离出人脐血单个核细胞(MNCs),经静脉丛输入NOD/LtJ 1型糖尿病鼠体内,从而使其血糖、尿糖及死亡率下降,效果优于骨髓干细胞移植,实验中未使用免疫抑制剂,未发现任何急性或慢性的移植物抗宿主反应的临床或组织学证据,亦未发现其他副作用。2004年Ende Norman等<sup>[2]</sup>用同样方法将不同剂量的人脐带血单个核细胞输入到患早期自身免疫性1型糖尿病的NOD糖尿病鼠体内,发现降糖效果具有剂量相关性,且输注细胞最多者胰岛炎(胰岛内及胰岛周围单核细胞浸润情况)最轻。2005年Yoshida S等<sup>[3]</sup>将去除T细胞的人脐血单个核细胞经静脉移植至出生48h内的NOD/SICD/ $\beta_2m^d$ 糖尿病鼠体内(采用此鼠是因为其不含成熟的T、B、NK等细胞),免疫荧光染色及免疫原位杂交发现移植1~2个月后人脐带血细胞在异种移植宿主体内发展为胰岛素分泌细胞,Rt-PCR显示受体鼠胰腺组织确实分泌了人类的胰岛素,受体鼠胰岛内的人类染色体+鼠染色体-胰岛素+细胞和人类染色体+鼠染色体+胰岛素+细胞的数量基本相等,故该研究组推测,通过

依赖或非依赖融合的机制,人类脐带中的祖细胞可以在一定程度上克服异基因组织相容性排斥,从而在受体胰腺组织中发展为分泌胰岛素的细胞。2007年Zhao Yong等<sup>[4]</sup>从人脐带血中分离出一类干细胞,其表达造血细胞抗原,包括CD9、CD45和CD117,但是不表达CD34,可以表达胚胎干细胞的重要特征,包括胚胎干细胞特异性分子标志物转录因子OCT-4和Nanog,阶段特异性胚胎抗原SSEA-3和SSEA-4,其主要组织相容性复合体(MHC)低,混合淋巴细胞反应(MLR)显示无法刺激异体淋巴细胞增殖,故免疫原性很低,体外扩增的此种脐血干细胞被注射入链脲菌素(STZ)糖尿病模型鼠腹腔后,在体内可(部分)分化为分泌胰岛素的细胞,降低糖尿病鼠的血糖,正常组和未移植组糖尿病鼠在腹腔内糖耐量试验(IPGTT)刺激前后均未检测到人类C肽,只有移植组糖尿病鼠刺激后人类C肽水平是刺激前的2倍。

脐血细胞移植治疗1型糖尿病患者也取得了较好的疗效。2007年Michael J等<sup>[5]</sup>经外周静脉为15位新诊断的1型糖尿病患儿实施脐血自体移植术,移植后患儿内源性胰岛素分泌衰退的速度减慢,没有明显不良反应,脐血含有大量高功能的Treg,移植后6个月患儿外周血仍含有较多的Treg,免疫功能有所改善,脐血输注的治疗效果可能与此有关。

#### 1.2 对2型糖尿病的效果

2004年Ende Norman等<sup>[6]</sup>将人脐带血单个核细胞输入2型糖尿病鼠(B6.Y-Lepob)体内,同样改善了血糖水平和生存率,而且改善了肾小球肥大和肾小管扩张。

#### 1.3 对糖尿病并发症的效果

2004年Ende Norman等<sup>[6]</sup>的研究表明了脐血移植对糖尿病肾脏并发症的疗效。2005年Naruse K等<sup>[7]</sup>将脐带血提取的内皮祖细胞注射入糖尿病周围神经病变模型鼠的一侧下肢,从而使注射侧肢体的神经功能和血流较对侧肢体明显改

**[作者简介]** 秦琳(1980-),女,硕士研究生。

**[通讯作者]** 李红,女,主任医师,教授,硕士生导师。

善,说明此方法对糖尿病周围神经病变也有一定的疗效。

## 2 脐血细胞移植治疗糖尿病的体外实验(脐血细胞在体外分化为胰岛素分泌细胞)

### 2.1 脐血中的多种细胞可以分化为胰岛素分泌细胞

脐血含有造血干(祖)细胞(HSCs/HPCs),同时,脐带血中还存在多种非造血的干细胞和前体细胞,如间充质干细胞(MSCs)、内皮前体细胞(EPCs)和非限制性体干细胞(USSCs)等。

造血干细胞 HSCs 常以 CD34 为标记区分为 CD34<sup>+</sup>细胞群和 CD34<sup>-</sup>细胞群,其中 CD34<sup>+</sup>细胞群占 95% 以上,而 CD34<sup>-</sup>细胞群不到 5%。脐血 CD34<sup>+</sup>细胞和 CD34<sup>-</sup>细胞都可以分化为胰岛素分泌细胞<sup>[6]</sup>。2007 年张芳婷等<sup>[9]</sup>在体外用尼克酰胺、 $\beta$ -细胞调节素(betacellulin)、bFGF、HGF 成功诱导人脐血 CD34<sup>+</sup>细胞向胰岛素分泌细胞分化,胰岛素分泌细胞的分化率平均为(9.8±2.7)%,ELISA 检测发现诱导组和未诱导组培养液中的 insulin 含量有显著性差异( $P<0.01$ )。2007 年 Denner L 等<sup>[10]</sup>通过流式细胞仪分析了 3 个谱系的人脐血干细胞,包括 Lineage negative(CD133<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>),CD133<sup>+</sup>和 CD34<sup>+</sup>,并成功将这三系干细胞都诱导分化为胰岛样细胞,均可分泌 C 肽和胰岛素,因为可以检测到 C 肽、前胰岛素原 mRNA 和前胰岛素原,故排除了胰岛素来自于培养基的可能性。2007 年 Sun Bo 等<sup>[11]</sup>将脐血单个核细胞分化为胰岛素分泌细胞,荧光激活细胞分类器(FACS)分析显示 CD34、CD4、CD20 和 CD51 为阴性,CD29、CD45、CD44、CD31 多数为阳性,免疫组织化学法证明分离出的尚未诱导分化的人脐血干细胞表达胚胎阶段特异性标志 SSEA-4 和多能干细胞标志 OCT4,未表达 C 肽,分化后,不再表达 OCT4,无高糖刺激时未检测到 C 肽和胰岛素,高糖刺激后则表达 C 肽和胰岛素,因为可检测到 C 肽,也排除了胰岛素来自于培养基的可能性。

脐血间充质干细胞也可以在体外分化为胰岛素分泌细胞。2008 年 Gao Feng 等<sup>[12]</sup>使用细胞外基质胶(Extracellular matrix gel, ECM gel)将人脐血间充质干细胞在体外培养分化为胰岛素分泌细胞,可见细胞团样结构,胰岛素阳性细胞占所诱导细胞的(25.2±3.4)%,诱导后的细胞表达胰岛相关基因和激素,但是对于高糖刺激没有明显反应,未经 ECM gel 培养的人脐血间充质干细胞则没有出现细胞团样结构,没有分泌胰岛素。2008 年迟作华等<sup>[13]</sup>也成功将脐血间充质干细胞在体外诱导为  $\beta$  样细胞,用羟乙基淀粉沉淀法分离脐血中的有核细胞,贴壁筛选法获得脐血间充质干细胞,纯化后的脐血间充质干细胞用表皮生长因子、 $\beta$ -羟乙醇、高糖、激活素 A 和肝细胞生长因子诱导,诱导后,细胞形态发生明显变化,形态变圆而且聚集成团,诱导后的细胞胰岛素免疫荧光染色为阳性,而且细胞能分泌少量胰岛素,并对糖刺激具有反应性。2.2 根据是否需先分化为 Nestin 阳性细胞,可以将分化方案归为两大类

多数方案是先经过 Nestin 阳性阶段,再进一步分化为胰岛素分泌细胞。2007 年张芳婷等<sup>[9]</sup>用磁性细胞分选试剂盒(MACS)分离出 CD34<sup>+</sup>细胞后在含 FBS、1 $\times$ ITS、亚油酸、2-磷酸抗坏血酸的低糖型 DMEM 中培养,扩增后于培养第 5 天加入尼克酰胺、betacellulin、bFGF、HGF 进行诱导,结果 RT-

PCR 可检测到诱导后的 CD34<sup>+</sup>细胞表达人巢蛋白 nestin、ngn3 和人胰岛素启动因子 IPF-1 的 mRNA,免疫细胞化学染色可见诱导的 CD34<sup>+</sup>细胞中出现 nestin 和 insulin 阳性表达细胞。2007 年 Denner L 等<sup>[10]</sup>通过快、慢两种方法将 Lineage negative(CD133<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>),CD133<sup>+</sup>和 CD34<sup>+</sup> 3 个谱系的人脐血干细胞诱导分化为胰岛样细胞,分化过程中均表达 Nestin 和 Vimentin,4 步法共需约 22 d,主要涉及的细胞因子包括碱性成纤维生长因子(bFGF)和尼克酰胺,3 步法大约需要 9 d,主要涉及的细胞因子包括活化素 A(Activin A)、维甲酸(retinoic acid)、碱性成纤维生长因子(bFGF)、层粘连蛋白和尼克酰胺。

少数方案未经过 Nestin 阳性阶段即可分化为胰岛素分泌细胞。2007 年 Sun Bo 等<sup>[11]</sup>用 Ficoll 梯度法从脐血中分离出单个核细胞,在含胎牛血清、碱性成纤维生长因子(bFGF)、青霉素、链霉素、谷酰胺(glutamine)的 DMEM 中扩增,然后在多聚-L-赖氨酸/层粘连蛋白覆盖(poly-L-ornithine/laninin coated)的组织培养皿中培养,培养基为含“N2 培养基+NE”的 DMEM/F12,添加孕酮(progesterone)、腐胺(putrescine),层粘连蛋白(laminin)、胰岛素、sodium selenite、尼克酰胺、转铁球蛋白(transferrin)、纤维结合素(fibronectin)、B27 补充成分和 15% FCS,24 h 后用高糖 DMEM 替代 DMEM/F12,最终分化为胰岛样结构,过程中未检测到 nestin 阳性细胞。

### 2.3 脐血细胞体外分化为胰岛素分泌细胞的重要因素

碱性成纤维生长因子(bFGF):不仅能促进干细胞的增殖,还有助于其向胰岛素分泌细胞的转化。bFGF 在很多报道中都作为胰岛  $\beta$  样细胞的诱导剂使用,它在体内参与组织修复,刺激 MSC 等多种细胞的生长。与其他生长因子不同,它本身没有信号肽,不能分泌。通常认为细胞死亡、物理化学损伤、辐射或感染引起的细胞膜损伤或溶解而被释放到胞外和高浓度葡萄糖一样,也具有刺激细胞表达胰岛素的作用<sup>[14]</sup>。

尼克酰胺:可以促使幼稚胰岛细胞的成熟,并且在干细胞向胰岛素分泌细胞的分化过程中也起到一定的促进作用。可以抑制多聚 ADP-核糖聚合酶(PAPR)的活性,减少 PAPR 降解产物烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)的消耗,减少细胞的凋亡。尼克酰胺还可以减轻胰岛素依赖性糖尿病患者的危险度。

$\beta$  细胞调节素(betacellulin):具有诱导 nestin 阳性细胞分化为胰岛素分泌细胞的能力。

EGF:作为一种生长因子对多种表皮细胞和上皮细胞的生长有刺激作用,参与损伤的修复,EGF 信号途径通过 c-erbB 受体发挥作用。

$\beta$ -羟乙醇:是常用的还原剂,有抗氧化作用,可以促进谷胱甘肽的合成,清除氧自由基,难以培养的细胞在培养过程中加入小量的  $\beta$ -羟乙醇可以提高培养成功的几率,有人甚至认为它可以部分替代血清的作用,常被用作向神经细胞的诱导分化剂。

活化素 A(activin A):是一种 TGF 超家族的细胞因子,对细胞的增殖、分化、凋亡都起着重要作用,活化素 A 和它的受体在胚胎和成体的多种细胞中表达,如胰岛的  $\alpha$  和  $\beta$  细胞。活化素 A 和 betacellulin 或 HGF 合用可以将胰腺外分泌

(下转第 43 页)

60%乙醇→70%乙醇→80%乙醇→95%乙醇(每级2 min)→固绿溶液[浓度为0.5%(溶媒为95%乙醇),2 min]→5%乙醇→纯乙醇(1~2 min)→50%二甲苯(3 min)→二甲苯(3 min)→二甲苯(3~5 min)。

番红和固绿在纯乙醇中易掉色,因此在纯乙醇中停留时间不宜过长,1~2 min即可。在用固绿染色前必须检查染色是否合适;番红染色应深一些,因脱水时番红的颜色会褪去一部分,如过浅,应退回重染。

### 2.12 封藏、贴标签

将染色片擦净残留液,滴加1~2滴中性树脂后,轻轻盖上清洁的盖玻片,需防止盖入气泡,然后置恒温箱中,40℃左右干燥2 h以上,取出于载玻片左边贴上标签,即为四叶参根的永久制片。

### 3 讨论

虽然石蜡制片法已经是一种较为成熟的经典方法,但在具体制作某一材料时,尚需反复试验以确定最佳条件。本实验中,四叶参的固定、冲洗、脱水、透明、浸蜡等步骤中的试剂浓度、用量、时间等都是影响结果的重要因素,每一步处理不佳都会影响到后续切片、染色。

所制切片能否进行显微鉴定组织结构的关键,取决于切片和染色,本实验中切片的厚度,染色剂的种类、浓度,染色时间等均是在反复试验后确定的最佳方案。切片厚度从5、6、7、8、10、12 μm中确定为8 μm最合适,易切片,切片后不易破碎,染色后观察细胞也不会重叠。染色剂中碱性品红染色时间长且不适合二重染色,在第二次染色后易退色;番红

O的浓度应为0.8%~1%(溶媒为50%乙醇),番红浓度降低,染色时间将会延长,且染的颜色也将变浅;0.1%(溶媒为95%乙醇)的固绿染色剂不易着色,0.5%(溶媒为95%乙醇)的固绿染色剂不仅可着色,且染色时间短,还能防止已染的番红被洗掉。

本实验研究也提示现在通用的石蜡制片方法只是一个总体框架,在具体应用时还需反复试验才能确定最佳条件,因此,有必要根据不同类型材料对该方法进行进一步的规范。

### [参考文献]

- [1] 中国药科大学主编.中药辞海[M].北京:中国医药科技出版社,1993:516.
- [2] 胡伟建,马水利,高冬梅.大有开发利用价值的轮叶党参[J].中国野生植物资源,2002,21(2):25.
- [3] 王德才,李同德,康颂建.泰山四大名药之一——四叶参[J].食品与药品,2006,9(8):73.
- [4] 邓立东,蒋学华,徐勤,等.四叶参的研究进展[J].中国药房,2006,23(17):1824.
- [5] 吴德康.中药鉴定学实验指导[M].北京:中国中医药出版社,2003:31.
- [6] 张贵君,金哲雄,潘艳丽.常用中药显微鉴定[M].北京:化学工业出版社,2005:11-20.
- [7] 赵奎君.生药实验[M].北京:中国医药科技出版社,1999:114-123.
- [8] 郑俊华.生药实验指导[M].北京:北京大学医学出版社,2001:80-84.
- [9] 王光辉,王琦,时元林.泰山四大名药[J].山东中医杂志,2006,3(25):203.
- [10] 郭月秋,高珊,陈代贤,等.山海螺的显微及紫外光谱鉴别[J].中药材,2003,26(11):786.

(收稿日期:2008-12-08)

(上接第8页)

细胞系 AR42J 转化为胰岛素产生细胞,可以诱导人胎儿胰腺内分泌细胞的分化,可见活化素 A 在 β 细胞的分化发育中起重要作用。

HGF 和层粘连蛋白也能促进胰岛细胞的发育和分化。

### 3 展望

脐血细胞诱导分化产生胰腺 β 样细胞的研究还处于起步阶段,进一步优化诱导分化条件、构建细胞外基质以及提高所分化细胞的胰岛素分泌水平等问题都有待解决。相信随着科技的不断创新,脐血细胞移植一定会造福广大的糖尿病患者。

### [参考文献]

- [1] Ende N,Chen R,Mack R,et al.NOD/LJ type 1 diabetes in mice and the effect of stem cells (Berashis) derived from human umbilical cord blood [J].J Med,2002,33(1-4):181-187.
- [2] Ende N,Chen R,Reddi AS,et al.Effect of human umbilical cord cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice[J].Biochem Biophys Res Commun,2004,325(3):665-669.
- [3] Yoshida S,Ishikawa F,Kawano N,et al.Human cord blood-derived cells generate insulin-producing cells in vivo[J].Stem Cells,2005,23(9):1409-1416.
- [4] Zhao Y,Wang H,Mazzone T,et al.Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristic[J].Exp Cell Res,2006,312(13):2454-2464.
- [5] Haller MJ,Viener HL,Wasserfall C,et al.Autologous umbilical cord blood

infusion for type 1 diabetes[J].Exp Hematol,2008,36(6):710-715.

- [6] Ende N,Chen R,Reddi AS,et al.Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetes mice[J].Biochem Biophys Res Commun,2004,321(1):168-171.
- [7] Naruse K,Hamada Y,Nakashima E,et al.Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy[J].Diabetes,2005,54(6):1823-1828.
- [8] 顾东生,刘斌,韩忠朝,等.脐带血干细胞的基础与应用研究[J].生命科学,2006,18(4):323-327.
- [9] 张芳婷,万汇娟,区文超,等.尼克酰胺、β-细胞调节素、bFGF、HGF 联合诱导人脐血 CD34<sup>+</sup>细胞向胰岛素分泌细胞的分化 [J].解剖学报,2007,38(2):192-195.
- [10] Denner L,Bodenburg Y,Zhao JG,et alDirected engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin[J].Cell Prolif,2007,40(3):367-380.
- [11] Sun B,Roh KH,Lee SR,et al.Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure[J].Biochem Biophys Res Commun,2007,354(4):919-923.
- [12] Gao F,Wu DQ,Hu YH,et al.Extracellular matrix gel is necessary for in vitro cultivation of insulin producing cells from human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells[J].Chin Med J (Engl),2008,121(9):811-818.
- [13] 迟作华,陆瑛,张涓,等.体外诱导脐血间充质干细胞向胰岛 β 样细胞分化的初步研究[J].细胞生物学杂志,2008,30(3):383-386.

(收稿日期:2009-01-20)