doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.30.051

从人胚胎干细胞获得胰岛素阳性细胞的研究进展 *

贺菁菁 林 戈△

（中南大学生殖与干细胞工程研究所 湖南 长沙 410078）

摘要：人胚胎干细胞（hESCs）因具有无限增殖能力以及多向分化潜能，使其能为糖尿病的细胞治疗提供充足且功能完备的替代细胞。近年来，虽然有许多成功将人胚胎干细胞诱导为胰岛素阳性细胞的报道，但诱导所得的胰岛素阳性细胞仍存在很多缺陷，如效率较低，细胞功能不完备等。本文将关注人们在提高人胚胎干细胞向胰岛素阳性细胞的诱导效率及获得具有成熟 β 细胞功能的胰岛素阳性细胞的各种努力和尝试。

关键词：人胚胎干细胞；胰岛素阳性细胞；诱导分化

中图分类号：R587.1；Q813 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273（2014）30-5986-05

Research Progress on Production of Insulin-Positive Cells From Human Embryonic Stem Cells*

HE Jing-jing, LIN Ge△

（Institute of Reproductive & Stem Cell Engineering, Central South University, Changsha, Hunan, 410078, China）

ABSTRACT: Human embryonic stem cells can be expanded indefinitely in the undifferentiated state and still retain the capacity for multilineage differentiation, which make hESCs are the perfect replacement resources for the cell-based treatments for Diabetes mellitus. In recent years, although there are many successful reports on production of insulin-positive cells from human embryonic stem cells, there are still many defects in the insulin-producing cells derived from hESCs, such as low efficiency of cell induction, and these cells were not able to produce increased insulin in response to a glucose load or induced diabetes, a crucial element of glycaemic control. This article will focus on various efforts and attempts in the aspect of improving the efficiency of inducing human embryonic stem cells into insulin-positive cells and obtaining mature β-cell function in insulin-positive cells.

Key words: Human embryonic stem cell; Insulin-positive cells; Induced differentiation

Chinese Library Classification（CLC）: R587.1; Q813 Document code: A

Article ID: 1673-6273（2014）30-5986-05

引言

糖尿病是一种与胰岛素的产生和作用异常相关的，以血糖值超标为特征的慢性疾病。包括以胰岛素绝对缺乏为主的 1 型糖尿病及以胰岛素相对缺乏或胰岛素抵抗为主的 2 型糖尿病这两种类型。由于生活水平提高、饮食结构改变、快节奏的生活以及少动多坐的生活方式等诸多因素，全球的糖尿病发病率增长非常迅速，糖尿病已然成为继肿瘤、心血管病变之后第三大严重威胁人类健康的慢性疾病[1]。现在全球糖尿病患者人数已超过 1.2 亿人，我国患病人群居于世界第二，目前中国的糖尿病发病率高达 9.6%，从调查数据看目前中国已成为全球糖尿病增长最快的地区且成为世界糖尿病第一大国[2]。而据国际糖尿病基金会的报告预计到 2030 年，这一数字将增加到 1.297 亿，占到总人口的 12.1%。

糖尿病的常规疗法是用外源的胰岛素来降低血糖，但此法需要病人终身定时的注射胰岛素，给患者带来沉重的医疗负担，且仍会导致严重的长期并发症。另外移植胰岛虽可以恢复内源性胰岛素的产生并控制血糖，但是供体的极度匮乏及移植物由于免疫排斥反应而难以长期维持[3]。所以人们一直花费大量精力试图在糖尿病治疗中寻找其他可能替代治疗的新方向。

无论是 1 型还是 2 型糖尿病，胰腺中胰岛功能的减退、β 细胞的死亡或凋亡都是其最根本的发病机理之一，虽然现在可通过控制饮食、口服降糖药物及补充外源胰岛素来部分克服胰岛素不足而带来的高血糖症状，但提供有完悲功能的胰岛 β 细胞是治疗 1 型及 2 型糖尿病患者使其免除依赖外源胰岛素及能长期维持血糖正常的唯一方法。由于仅涉及 β 细胞这一单一的细胞类型，使糖尿病相较于其他复杂病因的疾病更适合细胞移植治疗[4]。找到一种能够高效分泌胰岛素的细胞来源并进行体内移植治疗糖尿病，成为根治糖尿病研究的重点方向之一。

人胚胎干细胞来源于囊胚的内细胞团，是一种具有无限增殖能力以及具有向各种组织细胞分化潜能的细胞。目前已经有人胚胎干细胞成功诱导分化成神经细胞、心肌细胞、造血细胞、

* 基金项目：国家重点基础研究发展计划（973 计划）（309001011）；国家高技术研究发展计划（863 计划）（2011AA020113）；
国家自然科学基金项目（30800659）

作者简介：贺菁菁（1987-），女，硕士研究生，主要研究方向：人胚胎干细胞向胰岛细胞诱导分化

△通讯作者：林戈，教授，主要研究方向：干细胞与再生医学，E-mail: linggf36@yahoo.com.cn

（收稿日期：2013-12-05 接受日期：2013-12-29）

内皮细胞等多种类型细胞的报道。将人胚胎干细胞定向诱导分化为可分泌胰岛素的细胞，是治疗糖尿病的一条新思路[5]。2006年D'Amour等人首次在体外将人胚胎干细胞诱导分化为表达胰岛素的具备类似β细胞特征的分泌细胞[6]，将分化的细胞移植到链脲菌素诱导的糖尿病小鼠肾被膜下，能使模型小鼠的高血糖恢复正常[7]。

人胚胎干细胞因其独特的生物学特性，有望成为糖尿病细胞移植中最有前途的细胞来源。目前在体外诱导人胚胎干细胞向胰岛素阳性细胞的分化方案很多，本文将概述近年来人们在提高人胚胎干细胞向胰岛素阳性细胞的诱导效率及获得具有成熟β细胞功能的胰岛素阳性细胞的各种努力和尝试。

1 经典诱导方案

胰腺是由背胰原基及腹胰原基相互融合而成。背胰原基直接由十二指肠内胚层发生于肝原基对侧，其发生较早且生长迅速，是形成胰的主要部分；腹胰原基源于肝憩室内胚层，它的发生偏晚，体积较小。在背、腹胰原基体积增长的同时，腹胰原基在胃肠的扭转作用下由十二指肠腹侧转向背侧，两原基相互靠近并最终融合在一起。在背、腹胰原基的内部，细胞索反复分支，其末端不断形成顶芽及侧芽，部分侧芽从细胞索脱落并形成胰岛。人胚胎发育至14-20周时，出现第一代胰岛，20周后开始形成第二代胰岛即具有分泌功能，但在胎儿期的胰岛受葡萄糖调节的胰岛素分泌机制尚未发育完全，直至出生之后，胰岛的功能才最终得以完善。

胰腺的器官发生包括各种信号和转录调控网络的协调和高度复杂的相互作用，一路引导早期特化的芽基逐步发育到最后成熟的器官[8]。经典诱导方案根据模拟的是细胞感受到的外界信号或细胞自身在分化过程中关键转录因子的变化可采用两种策略：多步诱导法和转基因法。

1.1 多步诱导法

在体外诱导胚胎干细胞分化为胰岛素阳性细胞要经历内胚层细胞、胰腺前体细胞、胰腺内分泌前体细胞及成熟β细胞等多个阶段，是体内胚胎发育的一种重演。因此，对该发育过程的相关调控因子进行研究，了解其分化机制，对于尽可能模拟体内β细胞的发育环境，提高分化的效率，使分化的细胞群具有比较完善的功能等都有很重要的指导作用。多步诱导法是模拟体内β细胞的发生过程中不断接受到的外界信号(参见Fig. 1）设计的多步骤多阶段加入不同生长因子及信号蛋白的诱导方案。自从2005年D'Amour等人在高浓度ActivinA，低浓度血清联合Wnt3a作用下在二维平面将人胚胎干细胞诱导为限定性内胚层，其效率高达80%[9]，为后续进一步的诱导分化奠定了坚实的基础。次年该实验室疏通了将人胚胎干细胞诱导至β细胞的整条路径β。诱导过程中常用的因子包括：

1.1.1 ActivinA和Wnt3a Nodal是TGFβ超家族中的一个重要的生长因子，在原肠作用及胚层形成过程中至关重要。在胚胎干细胞向限定性内胚层分化过程中，Nodal表达的增强引导原肠胚向中内胚层，内胚层的分化。使用高浓度的ActivinA是代替Nodal蛋白的常用的手段，两种因子都能通过结合ALK4受体来激活Smad2/3信号[9]。Activin在早期胰腺发育过程中能增强内分泌细胞的分化，抑制外分泌和间质细胞的分化作用。Wnt家族的生长因子参与很多胚胎诱导及形成过程。Wnt信号能够抑制细胞向神经外胚层的分化，提高Wnt和FGF通路配基受体的表达，可以更好地促进ActivinA的效果。

1.1.2 Retinoic acid（RA）、Noggin、KAAD-cyclopamine（CYC）RA 信号通路是前肠内胚层及胰腺内胚层向内分泌谱系分化的重要调节因子。来自侧板中胚层的RA信号对于胰腺在前肠内胚层中前后轴的准确定位起到关键作用，部分RA信号的激活是由FGF信号通路所介导的，这提示在RA诱导的胚胎干细胞向后前肠细胞分化过程中RA和FGF信号通路存在相互作用。心脏中胚层发出FGF信号和横隔间质细胞发出BMP信号在腹侧前肠中共同作用诱导肝脏分化且抑制胰腺分化。Noggin能抑制BMP信号通路，可促使细胞向胰腺方向分化。在背侧前肠，包括activin和FGF等从脊索发出的信号在内胚层抑制Hedgehog信号通路的表达，这些区域将启始胰腺基因PDX1的表达，形成胰腺。CYC是Hedgehog信号通路抑制剂，对胰腺前体细胞的形成具有重要作用。

1.1.3 KGF（FGF7）、FGF10、EGF 胚胎发育过程中细胞间的信号交流对于指导细胞朝正确的方向分化生长是必须的。胰岛细胞的正常发育离不开胰腺中间叶细胞发出的FGF信号。在前肠闭合过程中，腹侧内胚层的细胞迁移到心脏尾部包裹住FGF信号，以诱导并起始腹侧胰腺的发育。FGF7和FGF10参与人胰腺发育中的间叶组织-上皮组织信号作用，但间叶组织FGF信号作用在上皮后也有可能使细胞朝有利于外分泌腺的方向分化。在胚胎胰腺的上皮细胞中EGF是一种重要的生长因子，严格控制EGF诱导的发育和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen- activated protein kinase, MAPK)抑制胰腺各类分泌细胞分化的平衡。

1.1.4 Betacelluin、Exendin-4和IGF-1 Betacellulin（BTC）发现于小鼠胰腺β细胞株中。在胰腺中其主要表达位点是α细胞和导管细胞。研究表明，BTC不仅能刺激胰腺β细胞的增殖，并且促进导管来源的β细胞前体细胞的增殖以及向β细胞的分化，形成胰岛样细胞簇，在胰岛细胞生长和分化过程中起重要的作用。Exendin-4是一种从美国南部大毒蜥唾液腺分泌的一种天然肠促胰岛素拟似物，能模拟胰升血糖素样肽-1的作用、抑制胰高血糖素的分泌、增加细胞对葡萄糖刺激下的胰岛素分泌、刺激胰岛β细胞的分化、增殖和抑制β细胞凋亡等作用。Exendin-4和IGF-1都能PI3K通路激活剂能促进β细胞的增殖。IGF-1即胰岛素样生长因子1，是胰岛素样生长因子的重要成员，并与胰岛素高度同源。其在体内由许多细胞通过自分泌、旁分泌及内分泌机制分泌与IGF-1受体结合发挥多种生理作用，其能促进β细胞有丝分裂。

诱导人胚胎干细胞向胰岛素阳性细胞方向分化是个极其复杂的体外分化发育过程。由于现在对其相关的调控网络还所知仍甚少，现有的诱导方式还需要继续完善，选用更合理的诱导因子组合，以获得更高纯度及成熟度的胰岛素阳性细胞。

1.2 转基因

利用基因工程技术将胰腺β细胞发育过程中的重要转录调控因子(参见Fig.2)导入细胞内，能使细胞成为胰岛素阳性细胞并产生糖变化的应答。常用的转录因子如下：

1.2.1 **PDX1** PDX1即胰腺十二指肠同源盒基因1。PDX1是

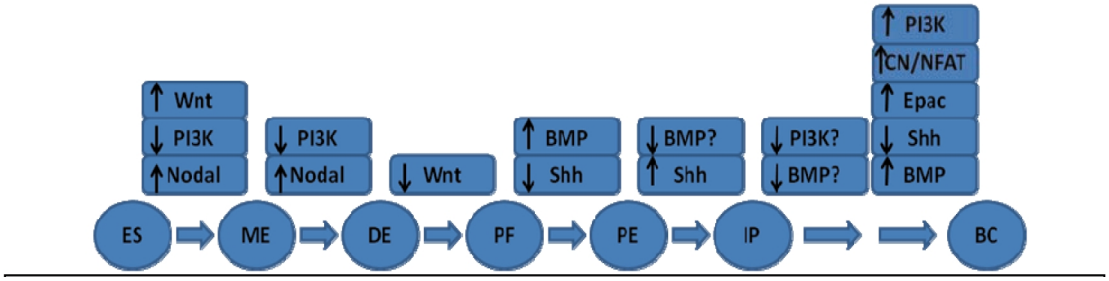

Fig.1 A proposed differentiation protocol for the generation of βcells from embryonic stem cells. Manipulating the signaling cascades as shown is predicted to drive differentiation along the sequence of ES, embryonic stem cells; ME, mesendoderm; DE, definitive endoderm; PF, posterior foregut; PE, pancreatic endoderm; IP, islet precursors; BC, insulin-expressing βcells. CN/NFAT, Calcineurin/NFAT. The role of PI3K and BMP pathway during specific time-points is ambiguous (see question marks). [10,11]

胰腺多基因调控网络中的中枢基因，它结合在胰岛素基因启动子以及增强子区域的转录因子结合位点上，调节胰岛素基因的转录，PDX1 还能调节葡萄糖激酶、葡萄糖转运体以及胰淀粉样多肽等胰岛素分泌相关基因的表达[12]。PDX1 基因的激活被认为是体外胰腺分化的先决条件，这是个领先于其他内分泌谱系更成熟的标志性基因，如 Ngn3、Nkx6. 1、Isl1 和 Pax6 等。PDX1 表达的细胞即胰腺祖细胞，所有类型胰腺细胞的发育均来自于胰腺祖细胞，PDX1 能促进早期胰腺发育以及后期胰岛素分泌和胰岛 β 细胞的分化。

1.2.2 NGN3 NGN3 属于碱性螺旋 - 环 - 螺旋转录因子家族，它能与 Nkx2.2、Pax4 和 insulin 基因启动子增强子组件的 E 盒结合[13]，激活其表达，是胰腺发育过程中 PDX1+ 细胞向内分泌细胞分化的关键性转录调控因子以及胰岛 β 细胞再生的重要标志，具有促进细胞向胰岛 β 细胞分化的作用。Ngn3 只表达于胰腺内分泌的干细胞，是胰腺内分泌前体细胞特异的标记，能促使胰腺干细胞向内分泌细胞系定向分化，并在细胞开始分化时下调 [8]，NGN3 表达的这种动态变化对于胰岛细胞的发育是绝对必须的[14]。

1.2.3 Pax4 Pax4 基因是 Pax 家族中的一员，属于编码促进胚胎细胞增殖、分化以及存活的转录因子家族。这一类因子参与细胞内信号传导的高级调控，在胚胎发育的过程中对细胞分化，更新，凋亡等都起着十分重要的调控作用。在胰腺的发育过程中 Pax4 是 Ngn3 下游的靶基因，其作为关键下游信号分子参与 PDX1-NGN3-Pax4 信号轴。Pax4 基因的表达对于维持胰岛 β 细胞增殖、分化及胰岛细胞表型具有十分重要的作用[12]，Pax4 是胰腺 β 细胞发育所必需的调控因子。它是胰岛前体细胞的扩增以及 β 细胞的成熟所必须的。β 细胞发育分化过程中，Pax4 的缺乏将促使成体 β 细胞向 α 细胞和 PP 细胞转化[8]。

1.2.4 MafA MafA 即肌腱膜纤维肉瘤癌基因同源物 A 基因，一个具有亮氨酸拉链结构的转录因子。MafA 蛋白是特异的胰岛 β 细胞核因子，在 β 细胞发育分化的后期结合于胰岛素基因的启动区域保守顺式调控组件 RIPE3b 上，作为一种强烈的反式作用因子调控胰岛素的表达。MafA 还能增加 Nkx2.2、Glut2、胰岛素、胰高血糖素和生长抑素的 mRNA 表达，胰腺 β 细胞的成熟和功能的维持都有赖于 MafA 蛋白的正常表达[8]。

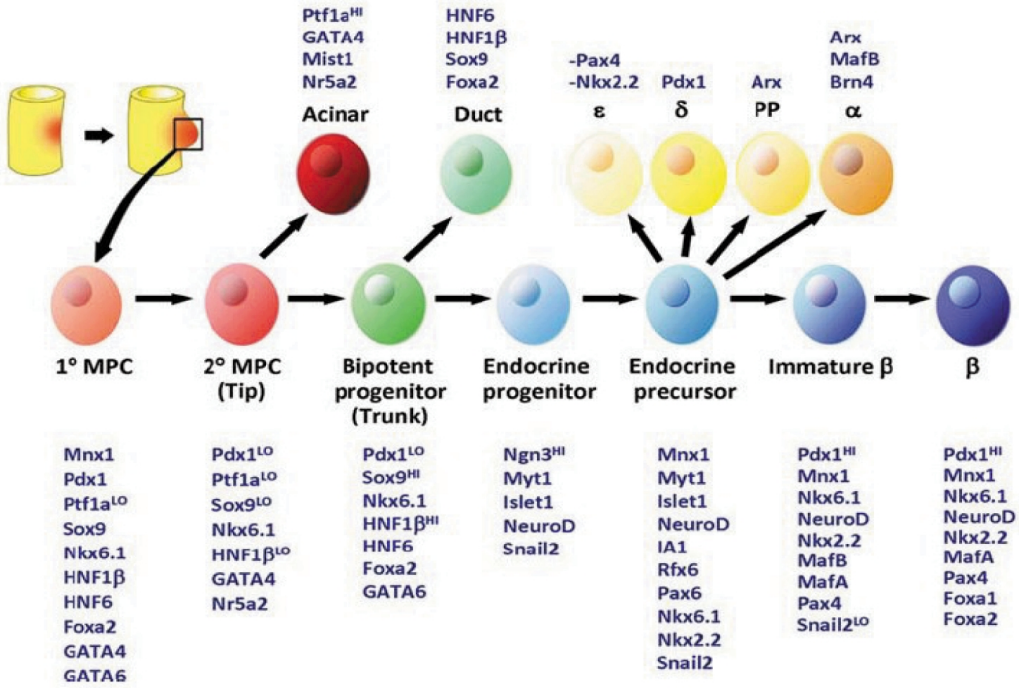

Fig.2 Important transcriptional regulators expressed at each stage of pancreas development. -Pax4 and -Nkx2.2 indicate that ε -cells develop in the absence of Pax4 and Nkx2.2

胰腺细胞发育过程中的基因转录调控是一个具有等级或级联反应的过程，每一个阶段都不是单一的基因在起作用，而是很多基因共同作用的结果。早在 03 年就有人尝试将 PDX1 和 Pax4 转入胚胎干细胞中，但由于过表达 PDX1 可能存在一定的细胞毒性，获得稳定表达 PDX1 的胚胎干细胞成为一项挑战。直至出现 Dox 诱导的 Tet-on 调控系统一批转入了 Hnf4a，Hnf6，Nkx2.2，Nkx6.1，Pax4，Pdx1 及 Ptf1a 的胚胎干细胞得以建立。同时过表达 PDX1 和 NGN3 能促进胰岛素阳性细胞的形成。

表达外源性 Pdx1，Ngn3 和 Pax4，可以向胰腺方向分化，因为这些转录因子的表达时相、表达水平以及表达的持续时间是非常重要的，持续过度表达 Pdx1，不能诱导胚胎干细胞的进一步分化；如果 Ngn3 在胰腺形成的早期表达，α 细胞的形成过度，相应地 β 细胞的形成就减少，所以人们试图通过各种基因表达调控技术控制上述基因的适时和适量表达，以期诱导生成大量具有活性的 β 细胞.

这些基因之间相互作用构成一个相互联系的网络结构。在不同时间点这个网络结构还会发生改变，实际上这是个由不同基因与时间组成的三维立体网络联系。深入了解胰腺细胞的发育机制可以更好地控制体外细胞诱导分化的方向，更加准确地确定诱导胰腺细胞的发育阶段，从而有助于这种来源广泛的细胞诱导，应用于胰腺组织的再生研究以及糖尿病的临床治疗。在目前基因调控机理不是十分明确的情况下，试图通过转染一两个基因就构建这么一个复杂的基因调控系统，是不可能有重大突破的。目的基因不能稳定转染，转染基因容易发生突变等原因制约了转基因法。

2 新型诱导方案

各种传统诱导方案分化形成的带有胰岛细胞部分特征的胰岛素阳性细胞，大部分细胞释放胰岛素和 C- 肽，表达特定的胰岛转录因子，并含有分泌颗粒。然而这些诱导方案除了诱导效率低之外，所获得的胰岛素阳性细胞大部分具有未成熟胰岛的特征，如胰岛素、C- 肽和胰高血糖素等激素的共表达，细胞内胰岛素和 C- 肽含量明显低于成人 β 细胞，诱导获得的胰岛素阳性细胞对于葡萄糖刺激下的胰岛素释放反应较弱。针对这一系列的问题，近年来出现了各种各样的新型诱导方案。

2.1 重组蛋白 Vs. 小分子

许多诱导方案中都用到了多肽、细胞因子和蛋白诱使人胚胎干细胞一步一步的走向胰岛素阳性细胞的命运。研究表明，小分子可以替代重组蛋白同样能完成这一促进过程，并且小分子相较于重组的生物大分子具有更有效，更廉价，更稳定，更容易地控制等优势[15]。

小分子凭借着具有与生物大分子结构域相同或相似的空间构象，能特异的抑制或激活相应的信号通路。如 IDE1、IDE2 能代替 ActivinA [16]，Wortmannin 一种 PI3K 抑制剂[17]，ChIR99021 一种 GSK3 抑制剂[18]，均可代替 Wnt3a 激活 Wnt 信号通路，促进人胚胎干细胞分化为限定性内胚层，诱导效率可达到 80%。SB431542 选择性抑制 TGF-β RI 激活素受体样激酶 ALK5，ALK4，ALK7，而对 ALK1, ALK2, ALK3,和 ALK6 抑制作用不大，这四种含磷酸化 Smad1。SB431542 选择性抑制内生的 Activin，而对 BMP 信号没有作用效果。SB431542 可以诱导 Smad2/Smad4 和 Smad3/Smad4 依赖的转录[18,19]。(-)-Indolactam V 是蛋白激酶 C（PKC）同工酶的抑制剂，PKC 同工酶在第二信使介导的细胞信号转导中具有重要作用。在内胚层细胞形成的决定性阶段，Indolactam 是人胚胎干细胞分化成功能胰岛素 β 细胞的小分子诱导剂，因而能增加表达 PDX1 基因的胰腺原基细胞数目[20]。ALK5 Inhibitor 是 TGF-β 家族 I 型受体 ALK5 的 ATP 竞争性抑制剂。Dexamethasone 是肾上腺皮质激素受体兴奋剂，影响炎症反应及细胞增殖和分化成特定的组织。Forskolin 是一种天然化合物，用于许多细胞分化过程。Forskolin 能刺激腺苷酸环化酶的活性并增加 cAMP，cAMP 是一个信号分子，是细胞发生过程中关键酶的调节因子。cAMP 能与蛋白激酶 A(PKA)的调节亚基结合，激活 PKA 的活性，作为 Hedgehog 信号路径的阴性调节因子[18]。

2.2 体外 Vs. 体内

在体外诱导不能获得具有成熟功能的胰岛素阳性细胞，可能的原因是体外的环境与体内 β 细胞的分化生长的环境差异太大。有些诱导的细胞无法逆转糖尿病模型鼠的高血糖水平。有人尝试将 ES 细胞直接移入体内，在体内的微环境下自行分化，但 ES 导致畸胎瘤的形成这一问题却无法克服[4]。而将胰腺内分泌前体细胞与胰岛素阳性细胞分别对糖尿病模型小鼠进行移植，胰腺内分泌前体细胞在宿主体内显示出更好的生存能力，且移植的大部分细胞分化为 β 细胞，血糖水平也得到改善[19,21,22]。提示体外诱导分化得到的胰腺内分泌前体细胞能在体内能进一步分化为有功能的 β 细胞。

2.3 2D Vs. 3D

研究复杂的细胞和组织，及其信号传导与调控可不是件容易事。而模拟细胞或组织环境，建立最接近体内天然条件的实验系统同样困难。这就是 3D 细胞培养所面临的挑战，3D 培养系统旨在更好的模拟细胞的体内生长环境，为其创造更天然的家。近来越来越多的证据表明，3D 细胞培养系统比传统 2D 培养系统更贴近体内的生理条件。3D 细胞培养的主要优势在于，能够在研究早期的体外实验中模拟细胞在体内的行为。传统 2D 细胞培养往往无法了解细胞在组织内的功能和应答反应，结果可能导致以 2D 细胞培养为基础的药物或生物学研究出现偏颇。近来 3D 细胞培养技术和产品如雨后春笋一般涌现出来。

胰岛素阳性细胞在聚集成胰岛样结构是其功能达到最佳效果，然而在过大的聚集群体中其核心细胞因为无法获得充足的营养和氧气导致生存能力受到限制。因此，在将人胚胎干细胞诱导分化为功能性 β 细胞的生产过程中控制这些细胞的生长和分化的尺寸，获得均匀的小聚集体，这对于以后糖尿病的细胞移植治疗是非常有益的。在这项研究中，研究者将人胚胎干细胞种植在一种特殊的盖玻片上，这种盖玻片上排列着大量直径在 120μm 的以共价微接触交联的圆形斑块状的层粘连蛋白簇。用这种方式能有效的控制细胞团块的大小，生产出大小均匀的胰腺内分泌前体细胞团块用于移植或进一步在体外成熟[23]。

静置的悬浮、或动态旋转悬浮培养均能一定程度减轻重力对细胞分裂分化聚集的影响：重力使我们在试管内培养细胞达

不到如同在体内一样的效果。由于气体扩散,营养物的有效性和代谢废物的排除都是有限的,故在平的培养板上的细胞通常仅局限于进行 2 维生长。在这种受限的环境中,细胞即使能聚集成团,这个团状物通常过小,以至于不适合用来进行较理想的研究。D'Amour 实验室已尝试大规模培养,利用动态悬浮培养的方法将 hES 诱导为胰腺内分泌前体,并做大批量移植实验,结果显示在移植后 4-5 个月糖尿病模型小鼠的血糖仍能维持平衡。而且如此大规模的培养已经能够达到临床应用检验的要求[22]。

2.4 单纯培养 Vs. 共培养

胰岛 β 细胞在体内并不是单独存在的,内皮细胞是胰岛细胞群的重要组成部分,不仅参与了向胰岛内分泌细胞供应必需的氧气及营养物质,而且与胰岛发育过程中胰岛素基因的表达、β 细胞增生、血糖感知及调节等密切相关。胰岛内皮细胞与内分泌细胞间的相互作用对于胰岛 β 细胞功能具有重要意义,胰岛内皮细胞通过分泌肝细胞生长因子(HGF)刺激 β 细胞增殖。胰岛内皮细胞基底膜可以促进 β 细胞分泌胰岛素及细胞增殖。于是有人开始尝试胚胎干细胞与内皮细胞的共培养。

2011 年有文献报道,将鼠胚胎干细胞与人微血管内皮细胞进行共培养,发现在两类细胞交界的边缘的 ESCs 来源的诱导细胞中胰腺标记基因 PDX1、NGN3、Nkx6.1、proinsulin、GLUT-2 及 Ptf1a 的表达量大增。且 Nkx6.1、proinsulin 阳性细胞中都共表达磷酸化的 Smad 蛋白 1/5/8,即表明这些细胞中的 BMP 信号通路处于活化状态。从内皮细胞的条件培养基中检测到 BMP 信号通路的活化因子,进一步证明,内皮细胞通过分泌活性因子使胚胎干细胞来源的诱导细胞中的 BMP 信号通路活化,从而促进 β 细胞功能的成熟[24]。

2012 年有研究者尝试了将人胚胎干细胞诱导至胰腺前体细胞,然后与大鼠心脏微血管内皮细胞进行共培养,通过用内皮细胞条件培养基,transwell- 共培养,两种细胞直接接触的共培养三种方式比较诱导细胞中 β 细胞的功能成熟情况。结论表明两种细胞直接相接触的共培养方式能获得的功能更 β 细胞。导致这样结果可能的机制是细胞分泌的活性因子的影响作用,内皮细胞能调节 Notch 信号通路使其受到抑制,以及内皮细胞分泌的细胞外基质对 β 细胞功能成熟的影响[25]。

3 展望

从胰岛素的发现直至今日,糖尿病的治疗一直没有革命性的突破。1998 年,Thomson 等从不育症夫妇捐赠的早期胚胎中分离并建立了第一株人胚胎干细胞系。hESC 细胞系的分离与培养的成功,对于人类生命科学研究的理论和临床应用具有重要意义,也被认为是为糖尿病的治疗带来了新的希望。近年来,利用人胚胎干细胞移植治疗糖尿病模型小鼠,在降低血糖、控制体重、延长存活时间等方面取得了一定的进展。但面临的问题还很多,比如 hESCs 来源与人的囊胚本身存在伦理问题;由 hESCs 诱导分化为胰岛素阳性细胞并制备成产品这个过程存在:分化效率低,细胞分化程度不一致,细胞不具备成熟的功能,不同的 hESCs 细胞系存在个体差异需要建立适合不同的 ES 细胞系诱导分化方案等问题;而从目前诱导细胞在糖尿病模型小鼠身上的实验结果来看存在:免疫排斥反应,治疗症状出现反复,远期疗效不佳,另外在体内环境下干细胞的扩增和分化不易控制,以及诱导细胞存在潜在的致瘤风险等等,而这些问题的解决绝非短时间能够完成的。

随着研究的深入,对胰岛的发育和分化过程、胚胎干细胞分化为胰岛素阳性细胞的过程以及调控网络进行深入研究,特别是对胰岛 β 细胞中胰岛素的分泌调控以及胰岛素的作用机制有了深刻的认识。随着新的细胞内胰岛素底物和信号分子作用和调节机制的不断发现,有关胰岛素的生物作用及其介导的信号通路的分子基础将逐渐被阐明。有针对性的选用更合理的诱导因子组合和 hESCs 个体化的诱导方案,再结合基因工程技术,有望获得数量充足、纯度更高、功能良好、可供移植的胰岛素阳性细胞,并最终能建立起干细胞移植治疗糖尿病的技术服务体系并形成产品。我们相信,人胚胎干细胞终将成为糖尿病 β 细胞的源泉,成为根治糖尿病的一种新途径。

参 考 文 献(References)

[1] 康继宏, Tiao Guan, 宁光, et al., 中国糖尿病防治研究的现状和挑战[J]. 转化医学研究, 2012, 2(3): 1-24
Kang Ji-hong, Tiao Guan, Ning Guang, et al. Diabetes research in China: current status and future challenges [J]. Translational Medicine Research, 2012, 2(3): 1-24

[2] 代庆红, 王忠东.中国糖尿病的现状调查[J]. 中国医药指南, 2011, 9(13): 3
Dai Qing-hong, Wang Zhong-dong. The status quo of the Chinese diabetes research[J]. Guide of China Medicine, 2011, 9(13): 3

[3] Russ, H.A. S. Efrat, Development of human insulin-producing cells for cell therapy of diabetes [J]. Pediatric endocrinology reviews, 2011, 9(2): 8

[4] Godfrey, K.J. B. Mathew, J. C. Bulman, et al., Stem cell-based treatments for Type 1 diabetes mellitus: bone marrow, embryonic, hepatic, pancreatic and induced pluripotent stem cells [J]. DIABETIC Medicine, 2012, (29): 10

[5] Melton, D.A. Using stem cells to study and possibly treat type 1 diabetes[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 2011, 366(1575): 2307-2311

[6] D'Amour, K. A. Bang, A. G. Eliazer, S. et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2006, 24(11): 1392-401

[7] Kroon, E. Martinson, L. A. Kadoya, K, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(4): 443-452

[8] Pan, F. C. C. Wright, Pancreas Organogenesis: From Bud to Plexus to Gland[J]. Developmental Dynamics, 2011, 240(3): p.530-565

[9] D'Amour, K.A, Agulnick, A. D., Eliazer, S, et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm [J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(12): 1534-1541

[10] Champeris Tsaniras, S. P. M. Jones, Generating pancreatic beta-cells from embryonic stem cells by manipulating signaling pathways[J]. J Endocrinol, 2010, 206(1): 13-26

[11] Tsaniras, S.C., Generating Mature β-Cells From Embryonic Stem Cells: Strategies for Late-Stage Differentiation[M]. 2011, 87: 14

(下转第 5962 页)

志, 2007, 6(8): 496
Sun Qing-juan. Clinical observation on treatment of 90 cases of ovarian cyst interventional ultrasound B [J]. Chinese Journal of Difficult and Complicated Cases, 2007, 6(8): 496

[11] 邝国超.腹腔镜手术治疗卵巢囊肿蒂扭转临床疗效分析[J].齐齐哈尔医学院学报, 2012, 33(17): 2311-2312
Kuang Guo-chao. Curative effect analysis of laparoscopic operation in treating ovarian cyst Torsion [J]. Journal of Qiqihar University of medicne, 2012, 33(17): 2311-2312

[12] 李凤英.腹腔镜下保守性手术治疗卵巢囊肿蒂扭转的疗效观察[J].中国医疗前沿, 2013, (20): 38, 50
Li Feng-ying. The efficacy of conservative laparoscopic surgery in treating torsion of ovarian cyst [J]. National Medical Frontiers of China, 2013, (20): 38, 50

[13] 刘黎青,刘丹.卵巢囊肿蒂扭转保留卵巢手术 16 例临床分析[J].中国医药指南, 2012, 10(23): 414-415
Liu Li-qing, Li Dan. Clinical Application of 26 Surgical Operations to Preserve Ovarian Function for Pedicle Torsion of Ovarian [J]. Guide of China Medicine, 2012, 10(23): 414-415

[14] 刘海娟.腹腔镜手术治疗卵巢囊肿蒂扭转[J].中国医药指南,2013, (9): 46-47
Liu Hai-juan. Laparoscopic Surgery Treatment of Ovarian Cyst Pedicle Torsion[J]. Guide of China Medicine, 2013, (9): 46-47

[15] Chang HC, Bhatt S, Dogra VS. Pearls and pitfalls in diagnosis of ovarian torsion[J]. Radiographics, 2008, 28(5): 1355-1368

[16] Tanaka M, Sagawa T, Hashimoto M, et al. Ultrasound-guided culdotomy for vaginal ovarian cystectomy using a renal balloon dilator catheter[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2008, 31(3): 342-345

[17] 刘国珍,杨维民,罗柳萍,等.经阴道与经腹部超声诊断卵巢囊肿蒂扭转的对比性分析[J].中国现代医生, 2011, 49(30): 95-96
Liu Guo-zhen, Yang Wei-min, Luo Liu-ping, et al. Comparative Analysis of Transvaginal and Abdominal Ultrasound in Diagnosis of Ovarian Cyst Torsion[J]. China Modern Doctor, 2011, 49(30): 95-96

[18] 曹丽,周毓青,赵蔚,等.妇科急腹症 1036 例超声诊断与病理结果对照研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2008, 24(3): 198-200
Cao Li, Zhou Yu-qing, Zhao Wei, et al. The comparison study of ultrasonography and pathologic results in 1036 gynecologic emergency[J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2008, 24(3): 198-200

[19] 张志斌. 经阴道超声诊断卵巢囊肿蒂扭转的价值 [J]. 吉林医学, 2012, 33(32): 7026-7027
Zhang Zhi-bin. Value of transvaginal ultrasound in diagnosing the ovarian cyst torsion[J]. Jilin Medical Journal, 2012, 33(32):7026-7027

[20] 杨忠诚,周小媛.不同程度卵巢囊肿蒂扭转彩色多普勒超声表现[J].右江医学, 2012, 40(5): 627-630
Yang Zhong-cheng, Zhou Xiao-yuan. Color Doppler ultrasonography of varying degrees of ovarian cyst torsion [J]. Youjiang Medical Journal, 2012, 40(5): 627-630

（上接第 5990 页）

[12] Wilson, M. E. D. Scheel, M. S. German. Gene expression cascades in pancreatic development[J]. Mech Dev, 2003, 120(1): 65-80

[13] Rukstalis J M, J. F. Habener. Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration[J]. Islets, 2009, 1(3): 177-184

[14] Dor Y DA. Melton. Facultative endocrine progenitor cells in the adult pancreas[J]. Cell, 2008, 132(2): 183-184

[15] Borowiak, M. The New Generation of Beta-Cells: Replication, Stem Cell Differentiation, and the Role of Small Molecules[J]. The Review of Diabetic Studies, 2010, 7(2): 12

[16] Borowiak M, Maehr R, Chen S B, et al. Small Molecules Efficiently Direct Endodermal Differentiation of Mouse and Human Embryonic Stem Cells[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(4): 348-358

[17] Zhang D, Jiang W, Liu M, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells[J]. Cell Res, 2009, 19(4): 429-438

[18] Kunisada Y, Tsubooka-Yamazoe N, Shoji M, et al. Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells [J]. Stem Cell Res, 2012, 8(2): 274-284

[19] Zhu F F, Zhang P B, Zhang D H, et al. Generation of pancreatic insulin-producing cells from rhesus monkey induced pluripotent stem cells[J]. Diabetologia, 2011, 54(9): 2325-2336

[20] Chen S, Borowiak M, Fox J L, et al. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage [J]. Nat Chem Biol, 2009, 5(4): 258-265

[21] Kelly O G, Chan M Y, Martinson L, A, et al. Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 750-756

[22] Schulz T C, Young H Y, Agulnick A D, et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37004

[23] Van Hoof D, Mendelsohn A D, Seerke R, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic endoderm in patterned size-controlled clusters[J]. Stem Cell Res, 2011, 6(3): 276-285

[24] Talavera-Adame D, Wu G, He Y, et al. Endothelial cells in co-culture enhance embryonic stem cell differentiation to pancreatic progenitors and insulin-producing cells through BMP signaling[J]. Stem Cell Rev, 2011, 7(3): 532-543

[25] Jaramillo M I. Banerjee, Endothelial cell co-culture mediates maturation of human embryonic stem cell to pancreatic in sulin producing cells in a directed differentiation approach[J]. J Vis Exp, 2012, (61)