

胰腺干细胞研究进展

吴娟利 赵小立*

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

摘要 胰岛细胞移植是目前治疗 I 型糖尿病的最佳方法, 但是胰岛细胞的匮乏阻碍了这种方法的广泛应用, 寻找胰岛细胞新来源已成为全球糖尿病研究的热点之一。成体组织干细胞所具有的独特优势使胰腺干细胞成为近年来研究的热点。现对胰腺干细胞的研究概况进行综述。

关键词 糖尿病; 胰腺干细胞; β 细胞

糖尿病是一种代谢性疾病, 其进一步发展还可引起一些并发症, 如肾病、视网膜病变以及外周血管神经病变等。如何彻底征服糖尿病是困扰医学界的主要难题之一。20 世纪 70 年代, 胰岛移植首次在大鼠体内取得了成功, 随后又在糖尿病患者治疗中取得了一定成效。2000 年, Shapiro 等^[1]从成人捐献者的胰腺分离出以 β 细胞为主的胰岛细胞, 然后移植到糖尿病患者体内, 使这些患者不需要终身注射胰岛素, 因此取得了惊人的成功。这就是国际上著名的“埃德蒙顿草案”(Edmonton Protocol)。但是, 胰岛 β 细胞的缺乏限制了这种方法的推广, 难以满足全球的糖尿病患者。

根据“埃德蒙顿草案”, 糖尿病患者胰岛 β 细胞的移植治疗至少需要 2 个供体胰腺; 加之移植细胞受到患者体内的免疫攻击, 有些患者往往需要 2~4 次细胞移植, 因此寻找胰岛 β 细胞的新来源已成为关注的焦点。纵观目前所报道的各种途径, 胚胎干细胞(embryonic stem cells)的定向分化、胰腺干细胞(pancreatic stem cells)的体外增殖分化和其他成体组织干细胞的横向分化(trans-differentiation)前景最好。成体组织干细胞的横向分化是指一种组织谱系的细胞转变成另一种完全不同组织谱系的细胞, 从而失去原细胞自身的特异性标记和功能, 获得分化后的细胞的特异性标记和功能^[2]。

与其他两种干细胞相比较, 根据目前报道的所谓胰腺干细胞的研究结果和其他成体组织干细胞的应用情况来看, 胰腺干细胞体外增殖定向分化为 β 细胞的途径具有方法简便、成功率高、致癌性风险小和社会伦理性障碍小等优势, 有望率先用于细胞移植治疗糖尿病。

1 胰腺的发育

胰腺源于原肠内胚层, 包含外分泌细胞、导管细胞和内分泌细胞, 而内分泌细胞包括 α 细胞, β 细胞, δ 细胞和 PP 细胞等 4 种细胞, 形成朗氏(Langerhans)胰岛结构。在怀孕早期(人 28 天, 小鼠 8 天), 胚胎前肠翻转形成胰腺的腹芽和背芽。在原始间充质包围前肠时, 腹芽和背芽向相反的方向生长。腹侧原基与肝脏和胆囊紧密连接, 开始比背芽生长缓慢。当胃和十二指肠翻转后, 腹侧原基向周围生长, 并与背芽融合。腹芽形成胰头, 包括钩状突, 而背芽形成胰腺其他部分。在增生的上皮芽处, 各级导管最后发育为内分泌和外分泌细胞。人在怀孕 12 周时, 由内分泌细胞聚集成团开始形成胰岛。怀孕 13~16 周, 小的内分泌细胞团从胰腺导管向外生长, 形成血管化。这些原始的朗氏胰岛大约占总胰腺组织的 4%。随后, 在怀孕 17~20 周时胰岛与导管分离, 非 β 细胞围绕 β 细胞形成斗篷。在怀孕 21~26 周时, 胰岛中心也出现一些非 β 细胞, 具有出生后胰岛的特征^[3]。胰腺横切面模式图可以参考文献^[4]。

根据分泌激素的含量, 在怀孕第 7 周时首先在人胚胎胰腺中导管细胞周围鉴定到的是 δ 细胞和 PP 细胞; 第 8 周时, 出现 α 细胞; 从第 9 周开始, β 细胞出现; 第 10 周时检测到 C 肽。而小鼠胰岛细胞的发育与人有所不同, β 细胞和 α 细胞是最早出现的内分泌细胞, 时间分别在胚胎发育的 9.5 天和 10.5 天^[3]。

收稿日期: 2005-09-28 接受日期: 2006-02-22

浙江省“十五”重大科技攻关计划资助项目(No. J20020579-30116)

* 通讯作者。Tel: 0571-88273604, Fax: 0571-88273423, E-mail:

zhaoxiaoli@zju.edu.cn

2 何为胰腺干细胞

胰腺干细胞是否存在? 成体胰腺的再生是否是由胰腺干细胞引起的? 这些问题仍然存在争议。

胰腺干细胞属于成体组织干细胞, 是存在于胰腺中的具有自我更新和分化潜能的一群未分化细胞。关于胰腺干细胞的文献报道很多, 然而关于其存在部位、特异性标记以及如何检测等, 众说纷纭, 各自为是。根据现有的文献报道, 作者对成体胰腺的再生, 胰腺干细胞的存在部位、特异性标记以及其体外诱导分化情况做了简要的归纳和小结。

2.1 成体胰腺再生的实验模型

在生理或损伤的情况下, 体内许多器官能够更新死亡的细胞, 以维持正常的生理功能, 这种再生潜能主要是依赖于成体干细胞。再生组织中存在干细胞的理论已被广泛接受^[2,5,6]。因此, 胰腺再生为研究胰腺干细胞提供了可能性。

胰腺 β 细胞的再生能力是有限的; 在肥胖或怀孕的情况下, β 细胞能够发生生理性增生^[7]。研究人员用严格的实验模型证实了胰腺能够再生^[4,7]。目前使用的胰腺再生模型有以下几类。

2.1.1 部分导管阻塞模型 用玻璃纸包裹(cellophane wrapping)仓鼠部分胰腺导管能诱导营养刺激, 导致导管增殖和产生新的 β 细胞, 并能使链脲菌素诱导的糖尿病小鼠恢复正常血糖, 并认为这些细胞来源于导管干细胞, 而不是来自已有 β 细胞的有丝分裂。类似的模型还有部分胰腺导管结扎模型, 在这个模型中, 导管复合物被认为是正在增殖的干细胞部分, 能引起胰岛再生。

2.1.2 部分胰腺(80%~90%)切除模型 许多胰腺切除的动物模型(包括人)都证实了胰腺再生。大鼠被切除90%胰腺后8~9周就发现有内分泌和外分泌细胞增生, 进一步研究揭示胰腺导管上皮内有胰岛 β 细胞的干细胞, 在这个模型中, 导管系统的细胞标记指数迅速增加。

胰腺部分切除模型的再生能力受到以下因素的影响: 胰腺损伤的程度、残余胰腺对增加功能性通路的应答能力、破坏过程持续的时间、遗传背景和宿主的年龄等^[7]。如切除大鼠40%胰腺组织后, β 细胞的数量以及分泌激素的能力均未表现出可视的变化, 但是60%手术大鼠就有明显的变化^[7]。

2.1.3 链脲菌素(streptozocin, STZ)诱导的糖尿病模型 STZ特异性地破坏 β 细胞, 并诱导胰腺再生, 特别是婴儿。Hartmann等^[8]用低剂量(50 mg/kg

体重)的STZ试验性地诱导小鼠的糖尿病, 研究出一种胰腺再生模型。新生的雄性小鼠注射低剂量的STZ, 成年后就表现出明显的糖尿病。70%的这类小鼠在发病后15周得到恢复。STZ糖尿病小鼠自发恢复的研究表明胰腺胰岛的再生潜能。

2.1.4 Sarvetnick等^[9]研究出IFN- γ 转基因小鼠模型 在这个模型中, IFN- γ 基因与人胰岛素启动子连接。IFN- γ 转基因小鼠出生后6~8周胰腺发生炎症, 胰岛逐渐消失, 类似于I型糖尿病胰岛的损坏; 同时导管细胞通过复制, 接着分化为内分泌细胞, 使小鼠的胰腺胰岛得到快速再生。这个过程类似于胚胎胰岛的形态发生过程。该模型最显著的特征是发现导管细胞保持增殖并分化为胰岛细胞的能力, 而正常条件下, 导管细胞并不继续分化。

另外还有其他胰腺再生模型, 如有胰岛素瘤的NEDH大鼠去除胰岛素瘤后也能刺激胰腺 β 细胞再生; EMC病毒诱导的糖尿病小鼠也是一个胰腺再生模型^[7]。

在探索成体胰腺再生机制时, 到底是已有 β 细胞复制的结果还是由干/祖细胞增殖分化而来的? Dor等^[10]利用遗传谱系标记技术, 证明小鼠 β 细胞在正常和部分胰腺切除情况下的再生都是由已在的 β 细胞自身复制而来的, 并不是由非 β 细胞(如导管细胞或干细胞)分化的。当然, Dor等^[10]的研究存在一些不足之处, 他们使用的部分胰腺切除模型表现出非常低的再生能力, 不足以诱导胰腺干细胞发生胰腺再生; 切除90%胰腺或者IFN- γ 转基因小鼠模型更适合他们的实验; 另外, 所用的重组酶基因是否有“遗漏”, 也就是说, 这些重组酶基因可能产生一些非 β 细胞的标记基因, 不能被检测到^[11,12]; 加之其他的技术问题等, 这些不足之处使得他们没有观察到由干细胞或祖细胞分化的细胞, 因此Dor等的研究结果并没有否定胰腺干细胞的存在^[10]。

综上所述论据, 并参照其他成体组织的再生规律^[2,5,6], 表明成体胰腺的再生是已有 β 细胞复制和干/祖细胞增殖分化共同作用的结果, 并且已在大鼠模型中得到证实^[13]。

2.2 胰腺干细胞的分子标记

造血干细胞是目前研究最清楚的干细胞之一, 其主要原因是造血干细胞具有数个特异性的标记, 并且位于细胞表面, 这些都便于造血干细胞的分离、鉴别和检测^[14,15]。而胰腺干细胞至今仍未找到公认的特异性细胞表面标记。目前科研中使用的分

表1 胰腺干细胞可能的标记

标记	在胰腺中的表达部位	参考文献
细胞角蛋白	CK20 仅存在成年大鼠的导管细胞中。胎儿和新生大鼠以及胰腺导管结扎的成年大鼠的内分泌中；CK19 存在于细胞和导管细胞人怀孕 12~16 周的所有上皮细胞(包括内分泌细胞)中	[3], [16], [17]
巢蛋白	成人和大鼠胰腺导管和胰岛中；小鼠胰腺发育中的间质细胞而不是上皮细胞	[18], [19]
胰十二指肠同源异	E8.5 时, 在前 - 中肠接合处两侧的腹外侧和背部内胚层。随后, 在形成胰腺的部位和形成胃和型盒基因 1 十二指肠的一些部位。出生后存在胰腺内分泌胰岛 β 细胞中, 胃背侧的一些上皮细胞中以及十二指肠的所有黏膜细胞中	[20]
葡萄糖转运蛋白 2	大鼠胚胎的背侧和腹侧胰芽细胞中	[3]
神经原素	胚胎发育过程中的背胰芽中	[21]
酪氨酸羟化酶	在 E16 时, 存在胰导管细胞中, 在胎儿后期和出生后早期阶段存在胰岛和一些导管细胞中, 仅存在成年大鼠的胰腺 β 细胞中, 怀孕 12~18 周期间存在人胰胰腺上皮细胞中	[3]
β -半乳糖苷酶	胚胎导管上皮细胞中	[21]
胰岛因子	成体胰岛细胞中, 肠内胚层的背侧外翻部周围的间质细胞中	[3]
MSX-2	胚胎导管上皮细胞和内分泌细胞中	[22]
9.5 蛋白基因产物	大鼠的胎儿胰腺中	[23]
Kit	胰腺的内分泌部分, 特别是 β 细胞中	[24]
波形蛋白	存在能分化为内分泌和外分泌细胞的未分化干细胞中	[21]
c-Met	小鼠发育中的胰腺中, 成年小鼠的导管和一些腺泡细胞中	[25]

子标记物中, 许多是胰腺发育过程中细胞内表达的蛋白质分子, 这些分子标记物主要有: 细胞角蛋白(cytokeratin, CK19 与 CK20)、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)、巢蛋白(nestin)、葡萄糖转运蛋白 2(glucose transporter 2, GLUT-2)、神经原素(neurogenin3, Ngn3)、胰十二指肠同源异型盒基因 1(pancreatic duodenal homeobox 1, PDX-1)、胰岛因子(islet-1, IS1-1)、 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -gal)、MSX-2(一种细胞核内转录因子)、9.5 蛋白基因产物(protein gene product 9.5, PGP9.5)、Kit(酪氨酸激酶受体)、波形蛋白(vimentin)、Bcl-2(一种细胞凋亡抑制蛋白)、c-Met(肝细胞生长因子受体)等。上述这些标记物的特征见表 1。

2.3 胰腺干细胞存在的部位

如同胰腺干细胞的特异性标记物悬而未决一样, 胰腺干细胞的存在部位也存在多种假说。归纳起来可分为三种: 位于胰腺导管、位于胰岛中以及胰腺导管和胰岛中都存在。

2.3.1 胰腺导管 从发育学角度来说, 胰岛是由胚胎胰腺导管上皮细胞演化而来的。无论是成人和婴儿, 还是大鼠和小鼠, 多个实验室报道离体分离培养的胰腺导管细胞, 经诱导分化后均能获得分泌胰岛素的胰岛样细胞团(cultured human islet buds, CHIBs), 其间也能表达 CK19、CK20、PDX-1、巢蛋白等胰岛干细胞的标记物, 组织化学分析证明胰岛样细胞团中有 α 样细胞、 β 样细胞、 δ 样细胞存在。动物试验表明这些细胞能够逆转小鼠的糖尿病^[16,17, 26, 27]。

2.3.2 胰岛 多个实验室从成体胰岛中分离到胰岛干细胞, 它们也表达巢蛋白、Glu-2、CK19、Bcl-2 等胰腺干细胞的标记物, 体外增殖后, 能诱导分化出胰岛素分泌细胞。动物模型试验也能逆转小鼠的糖尿病^[18,19]。

2.3.3 胰岛-胰腺导管 Suzuki 等^[25]用流式细胞仪分离出一种 c-Met⁺ 胰腺干细胞。体外增殖后, 能诱导分化出胰岛素分泌细胞。组织细胞化学证明 c-Met⁺ 细胞在胰岛和胰腺导管, 胰腺外分泌组织和血管内皮细胞组织中均有存在。研究人员从胰腺导管和胰岛中分离出一种胰腺多能性的干/祖细胞, 这群细胞有的表达巢蛋白, 有的不表达巢蛋白, 体外诱导分化出胰岛细胞外, 还能分化出外分泌组织和神经组织^[28,29]。

2.4 胰腺干细胞的分化

国外对胰腺干细胞的研究比较广泛, 报道也很多。国内也有很多相关的文献报道, 2004 年国内首次报道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, 并可分化为胰岛内分泌细胞^[30]。由于胰腺干细胞的研究起步较晚, 所采用的诱导分化方法各不相同, 差异也比较大; 加之缺少公认的标记物以及确切的存在部位, 使得胰腺干细胞的分离纯化和检测比较困难, 因此至今还没有关于胰腺干细胞建系的相关报道。本文简单列举了几例胰腺干细胞的体外诱导分化情况, 仅供参考(表 2)。

3 小结与展望

表2 胰腺干细胞体外定向分化为 β 细胞的情况

来源	分离方法	标记	诱导及分化	结果	参考文献
人胰岛	释放酶 消化法		DMEM/F12, 10 mmol/L 尼克酰胺, ITS, 10 ng/ml 细胞角蛋白生长因子	CHIBs 由细胞角蛋白 19 阳性导管细胞和激素阳性胰岛细胞组成, 葡萄糖刺激后能分泌胰岛素	[16]
成人胰岛	半自动 消化过 滤法	细胞角蛋白 19	无血清 DMEM/F12, ITS, 2 g/L 牛血清白蛋白, 8 mmol/L 葡萄糖, 10 mmol/L NI 或者 10 ng/ml 成纤维生长因子 7	能分化为内分泌细胞, 葡萄糖刺激后能分泌胰岛素; 移植到裸小鼠体内, 只有 1/5 的动物体内有内分泌和外分泌分化的集落形成	[17]
人和大鼠 胰腺 胰岛	胶原酶 消化法	巢蛋白 巢蛋白	RPMI, 2.5 mmol/L 葡萄糖, 2 nmol/L 活素 A, 100 pmol/L 肝细胞生长因子或者 500 pmol/L betacellulin	巢蛋白阳性细胞不能产生内分泌细胞 表达甲胎蛋白, 胰淀粉酶, 细胞角蛋白 19, 胰岛素, 胰高血糖素, IDX-1, 能分化为内分泌、外分泌和肝细胞	[18]
成年小鼠 胰岛	胶原酶 消化法		Earle's high-amino-acid medium, 2.5 mmol/L 葡萄糖, 0.5% 正常小鼠血清	表达 PDX-1, β -gal, TH, c-Met, beta2/neuroD, 能分化为胰岛细胞, 葡萄糖刺激后能分泌胰岛素; 移植到非肥胖糖尿病小鼠体内, 能够使糖尿病得到恢复	[26]
小鼠胰腺	胶原酶 消化法		Defined serum-free medium (SFM)	表达内分泌、腺泡和导管细胞的标记物等, 葡萄糖刺激后能分泌胰岛素	[28]
人胎儿 胰岛	胶原酶 消化法	巢蛋白	无血清 RPMI 1640, 100 pmol/L 肝细胞生长因子, 2 nmol/L 活素 A, 500 pmol/L betacellulin, 10 nmol/L exendin-4, 10 mmol/L 尼克酰胺和 5 mmol/L 葡萄糖	能够表达胰岛素、胰高血糖素和 PDX-1, 不表达 Ngn3 和 ABCG2	[30]
人和犬 胰岛	释放酶 消化法	小细胞	CMRL-1066	表达 PDX-1, synaptophysin, Bcl-2, 胰岛素, 胰高血糖素, 黑素抑素, 甲胎蛋白, 胰腺多肽, 葡萄糖刺激后能分泌胰岛素	[31]
成人胰腺	胶原酶 消化法	细胞角蛋白 19	DMEM (3 g/L 葡萄糖), 1% ITS	分化为内分泌细胞, 并表达 IPX-1	[32]

2004年, 中国教育和科研计算机网站(www.edu.cn)和国内很多媒体相继报道和转载了我国首次建成人胎儿胰腺干细胞系; 同年, 国内文献首次报道从胎儿胰腺组织中分离并建立了单克隆胰腺前体细胞^[30]。迄今为止, 国内外有很多关于胰腺干细胞的文献报道, 但是很难建立胰腺干细胞系, 其原因主要有几点: ①内分泌胰腺损伤后的自身修复和再生试验都无法在人体内进行, 而且目前所用的大鼠和小鼠都不是研究人胰腺干细胞的最佳模型; ②胰腺干细胞的存在部位不确定, 其特异性标记不确定, 而且缺少公认的检测方法等, 这就使得胰腺干细胞很难从组织中分离纯化出来; ③没有适宜的体外培养条件, 这是胰腺干细胞体外长期培养的必须条件; ④胰腺干细胞的研究起步比较晚, 还需要时间进一步探索和研究, 等等。以上这些原因使得胰腺干细胞的研究进展比较缓慢, 也很难建立胰腺干细胞系。

干细胞应具备两种特性: 继续发育分化成终末细胞的潜能和长期自我更新的能力。经过几十年的深入研究, 造血干细胞已获得广泛的公认^[14,15]。借鉴造血干细胞的研究历程, 作者认为想要获得广泛

认同的胰腺干细胞需要解决以下几个问题: ①胰腺干细胞的特异性标记, 最好位于细胞表面, 以便于分离纯化, 目前所涉及的所谓胰腺干细胞的标记均不符合要求, 如: c-Met 的组织特异性不强; ②适宜的体外培养条件, 这是进行诱导分化及细胞治疗的前提条件, 其目的是为了长期保持干细胞的特征, 并获得大量的干细胞; ③进一步完善体外诱导分化的条件。目前体外诱导获取的胰岛素分泌细胞还存在着胰岛素分泌量少等缺陷。

经历了 30 多年的研究, 造血干细胞才被用于临床骨髓的移植治疗。而胰腺干细胞的研究还不到 10 年, 但随着基因组表达谱系和蛋白质以及胰腺发育的分子生物学的深入研究, 可以期望获得胰腺干细胞的特异性标记物。伴随着抗体技术和流式细胞术的进一步完善, 人们完全可以实现胰腺干细胞体外分离培养及定向诱导分化, 最终用于糖尿病的细胞移植治疗。

参考文献 (References)

- [1] Shapiro AM *et al.* *N Engl J Med*, 2000, **343**: 230
- [2] Wagers AJ *et al.* *Cell*, 2004, **116**: 639

- [3] Peters J *et al. Virchows Arch*, 2000, **436**: 527
[4] Trucco M. *J Clin Invest*, 2005, **115**: 5
[5] Fuchs E *et al. Cell*, 2004, **116**: 769
[6] Barthel R *et al. J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2005, **19**: 405
[7] Risbud MV *et al. Diabetes Res Clin Pract*, 2002, **58**: 155
[8] Hartmann K *et al. Exp Clin Endocrinol*, 1989, **93**: 225
[9] Sarvetnick NE *et al. Adv Exp Med Biol*, 1992, **321**: 85
[10] Dor Y *et al. Nature*, 2004, **429**: 31
[11] Zaret K. *Nature*, 2004, **429**: 30
[12] Levine F *et al. N Engl J Med*, 2004, **351**: 1024
[13] Halban PA. *Nat Cell Biol*, 2004, **6**: 1021
[14] Antonchuk J *et al. Cell*, 2002, **109**: 39
[15] Benveniste P *et al. Nat Immunol*, 2003, **4**: 708
[16] Bonner-Weir S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 7999
[17] Gao R *et al. Diabetes*, 2003, **52**: 2007
[18] Zulewski H *et al. Diabetes*, 2001, **50**: 521
[19] Abraham EJ *et al. Endocrinology*, 2002, **143**: 3152
[20] Gu G *et al. Development*, 2002, **129**: 2447
[21] Schmied BM *et al. Pancreas*, 2000, **20**: 337
[22] Kritzik MR *et al. J Endocrinol*, 1999, **163**: 523
[23] Yokoyama-Hayashi K *et al. Endocr J*, 2002, **49**: 61
[24] Rachdi L *et al. Diabetes*, 2001, **50**: 2021
[25] Suzuki A *et al. Diabetes*, 2004, **53**: 2143
[26] Ramiya VK *et al. Nat Med*, 2000, **6**: 278
[27] Ogata T *et al. Endocr J*, 2004, **51**: 381
[28] Seaberg RM *et al. Nat Biotechnol*, 2004, **22**: 1115
[29] Nat Biotechnol Editorial. *Nat Biotechnol*, 2004, **22**: 1
[30] 张玲等. *中华糖尿病杂志*, 2004, **12**: 442
[31] Petropavlovskaja M *et al. Cell Tissue Res*, 2002, **310**: 51
[32] Gmyr V *et al. Diabetes*, 2000, **49**: 1671

Progress in Pancreatic Stem Cells

Juan-Li Wu, Xiao-Li Zhao*

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract Islet transplantation is the best cure for type I diabetes mellitus. However, this protocol is limited by the scarcity of the transplantation material. Therefore it is urgent to search for new sources of islet cells all over the world. Recently great progress has been made on research of pancreatic stem cells, which are significant to supply for abundant islet cells. This review summarized the recent progress in pancreatic stem cells.

Key words diabetes mellitus; pancreatic stem cells; β cells

Received: September 28, 2005 Accepted: February 22, 2006

This work was supported by the Major Technologies R & D Program of Zhejiang Province during the 10th Five-Year Plan Period (No. J20020579-30116)

* Corresponding author. Tel: 86-571-88273604, Fax: 86-571-88273423, E-mail: zhaoxiaoli@zju.edu.cn