

间充质干细胞改善糖尿病相关机制的研究进展

陈美婷 肖新华

摘 要 间充质干细胞是一种多能干细胞,在 1 型和 2 型糖尿病治疗研究中起了重要作用,其作用机制近年来逐渐研究明确。本文就间充质干细胞改善胰岛功能的相关机制进行文献综述,包括诱导分化成产胰岛素细胞、免疫调节、促进自噬、促组织修复再生;另外,近年的研究发现间充质干细胞的条件培养基及分泌的微粒也可以模拟其免疫调节等功能,间充质干细胞分泌的膜联蛋白 A1 (ANXA1) 是调节胰岛功能的关键因子,有望成为无细胞疗法的发展方向。

关键词 间充质干细胞 糖尿病 机制 免疫调节 微粒 条件培养基

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.09.006

间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 是一种多能、非造血干细胞,可以从人体多种组织和器官中提取,最常用的是从骨髓中提取的骨髓来源的 MSC (BM - MSC),还可以从胎盘、脐带血、胰腺、脂肪组织等提取。目前 MSC 治疗 1 型糖尿病 (T1DM) 的研究较多,治疗方式从 MSC 与胰岛细胞共移植逐渐发展至无细胞移植,而治疗 2 型糖尿病 (T2DM) 的研究也逐年进展,在移植研究中也逐步揭示了 MSC 改善胰岛功能的相关机制。

一、MSC 改善胰岛功能的机制

早在 1970 年代就提出了移植胰岛以改善胰岛素分泌治疗 T1DM,但是当时常用的免疫抑制剂往往含有糖皮质激素,反却加重病情;直至 2000 年才制定了非糖皮质激素类免疫抑制剂方案 (雷帕霉素、他克莫司和达利珠单抗),但中位治疗时长仅 11.9 个月。因而,这样的疗效远远不能满足患者的需求。大量的研究表明单独移植胰岛的长期活性及功能较差,而 MSC 则有免疫调节作用,改善移植抗宿主反应,可改善胰岛周围微环境,改善胰岛移植的疗效,延长移植后的胰岛存活时间,单独移植 MSC 亦可治疗新发的 T1DM^[1-3]。而 MSC 改善胰岛功能的机制目前也在不断研究和探索。将新近研究的主要机制及相关信号通路总结见表 1。

表 1 MSC 改善糖尿病的相关机制

机制	主要内容及信号通路
免疫调节	可溶性细胞因子:IL-6、IL-11、IL-15;生长因子:SCF、IGF-1、VEGF、TGF-β、HGF
	调节细胞功能:T、B 淋巴细胞、DC、Treg、巨噬细胞等
促进自噬	MV:模拟 MSC 功能
	减少 ROS,降低线粒体损伤
MSC - CM	通过 ER 应激促进自噬
	改善血管内皮紊乱:Sirt1/AMPK/PGC-1α 通路
ANXA1	促伤口愈合:TGF-β/SMAD2 及 PI3K/Akt 通路
	促胰岛素分泌

IL. 白介素;SCF. 干细胞因子;IGF-1. 胰岛素生长因子-1;VEGF. 血管内皮生长因子;TGF-β. 肿瘤生长因子-β;HGF. 肝细胞生长因子;DC. 树突状细胞;Treg. 调节 T 细胞;MV. 微粒;ROS. 活性氧;ER. 内质网;CM. 条件培养基

1. 诱导分化为产胰岛素细胞:尽管多项研究表明 MSC 具有分化为产胰岛素细胞 (insulin producing cell, IPC) 的能力,而且与干细胞分化 IPC 相比,MSC 诱导分化 IPC 还有免疫抑制的作用^[4]。但目前 MSC 诱导分化成 IPC 的成功率仍然较低,约 5% ~ 15%^[5]。在诱导 IPC 分化的方法方面仍有不少研究,如胰十二指肠同源盒基因 1 (PDX-1) 可促脂肪来源的 MSC 向 IPC 分化。

2. MSC 的免疫调节功能:除了诱导分化 IPC 之外,研究人员更加关注的是 MSC 的免疫调节功能,这也是被广泛证实的 MSC 改善 T1DM 的机制 MSC 可以调节 T、B 淋巴细胞、巨噬细胞、调节 T 细胞 (Treg)、树突状细胞的功能,抑制 T 淋巴细胞,降低 Th1 及 Th17 细胞比例,上调 T2 细胞,并促进 Treg 产生,起到免疫抑制的作用^[6]。MSC 可分泌免疫调节因子,包括大量细胞因子、生长因子,如白介素-6

基金项目:国家重点研发计划项目 (2016YFA0101002)
作者单位:中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院内分泌科、卫生部内分泌重点实验室
通讯作者:肖新华,主任医师、博士生导师,电子信箱: xiaoxh2014@vip.163.com

(IL-6)、IL-11、IL-15、干细胞因子(stem cell factor, SCF)、胰岛素生长因子-1(IGF-1)、血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤生长因子- β (TGF- β)及肝细胞生长因子(HGF)等,这些因子可以改变胰岛的局部微环境,并且促进周围细胞存活^[7]。

3. MSC 分泌的微粒:MSC 在细胞之间的免疫调节作用除了分泌上述的可溶性因子之外,还会通过胞吐的方式向细胞外间质分泌微粒(micro-vesicles, MV)来实现免疫调节功能。这些微粒内含有大量生物活性因子,包括蛋白、脂质、mRNA、非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)、miRNA 等,可以在细胞之间传递信息,并能模拟 MSC 促进细胞生长、组织修复等作用,有望替代 MSC 移植成为新型的无细胞疗法^[8-10]。

大量体外研究发现,将 MSC-MV 与新近起病的 T1DM 患者的 PBMC 共培养后, MSC-MV 可以增加免疫调节因子的水平,包括 PD-L1、TGF- β 、IL-10、IL-6 及前列环素 E₂(PGE₂),降低 IFN- γ 水平,诱导免疫耐受的信号,促进 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 调节 T 细胞形成,抑制自身反应性淋巴细胞增生^[11]。近年来,树突状细胞的免疫调节能力也备受关注。Favaro 的研究发现 MSC 和 MSC-MV 均可诱导 T1DM 患者的 PBMC 中的致耐受性树突状细胞(dendrite cell, DC)形成,分泌 IL-10,这种 DC 可以进一步抑制 Th17 细胞群,降低 IL-17 水平,可抑制炎症 T 细胞对胰岛抗原 GAD-65 的反应,发挥免疫调节的作用^[12]。不过 Conforti 等^[13]的研究则发现虽然 MV 对 B 淋巴细胞的抑制作用和 MSC 相近,但是在对 T 淋巴细胞、浆细胞及抗体产生的免疫抑制作用不如 MSC。

诚然, MV 既携带了 MSC 的分泌组学的信息,体外实验发现可发挥与 MSC 相近的生物学功能,还可以避免自体或异体移植干细胞带来的问题,为无细胞疗法提供了新的思路。不过,如何提高 MV 免疫调节的效率,或提取纯化 MV 内的生物活性物质,还需要更深入地研究。

4. 促进组织修复与再生:另外, MSC 可通过降低氧化应激损伤、分泌大量营养因子促进胰岛细胞的存活,提高胰岛移植的成效^[1,14]。另外近年还发现 MSC 在移植过程中可促胰岛细胞的再血管化、保持胰岛细胞的形态,维持移植的疗效^[2]。高糖环境往往会影响伤口愈合,近年来的研究发现 MSC 可促进糖尿病患者的伤口愈合,尤其是糖尿病足部溃疡,而其中机

制与 MSC 分泌的生长营养因子、改善角细胞功能、自噬体的形成密切相关^[15-17]。

5. 促进自噬体形成:自噬是真核细胞中普遍存在的物质降解途径,可以调节多余或受损的细胞器以保持内环境的稳态,自噬缺陷与多种代谢性疾病密切相关。近年来越来越多的研究关注自噬与 2 型糖尿病的关联。在 T2DM 患者的 β 细胞中发现自噬体的变化,而动物实验则证实自噬紊乱乏会导致 β 细胞质量和功能的破坏^[18];而自噬可以维持 MSC 的多能性,促进组织修复过程,尤其是高糖环境中损伤细胞的修复^[17,19]。

而近年来的研究 MSC 改善糖尿病的机制和自噬也密切相关。Zhao 等^[18]发现骨髓来源的 MSC(BM-MSC)可通过增加 INS-1 细胞中溶酶体相关膜蛋白 2(LAMP2)的表达来促进自噬小体和自溶酶体的形成。而自噬还能减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)诱导的细胞死亡、减少慢性高糖环境导致的线粒体功能损伤,增加胰岛素颗粒的释放。Meng 等^[20]分析了非肥胖的糖尿病大鼠中 MSC 的自噬和凋亡现象,发现内质网(ER)应激可促进自噬并诱导凋亡,并使 mTOR 失活,而抑制 ER 应激则可以减少 BM-MSC 的凋亡。除了 MSC 可以改善自噬之外, BM-MSC 的条件培养基(MSC-conditioned medium, MSC-CM)可以促进高糖环境中的 INS 细胞自噬过程。MSC-CM 是通过 TGF- β 等炎性因子诱导肝癌细胞自噬,但 MSC-CM 改善胰岛细胞的自噬的相关机制尚未明确阐明^[21]。慢性高糖损伤是 T2DM 疾病发展的重要机制, MSC 有望成为治疗 T2DM 的新方法,不论是移植 MSC 中控制自噬和凋亡,还是 MSC 及 MSC-CM 通过自噬改善糖尿病的信号通路网络,都需要大量体外及体内试验不断完善和拓展。

6. MSC-CM:胰岛素增敏:除 MSC-MV 之外, MSC-CM 成为无细胞疗法的关键研究对象。近年来大量研究发现 MSC-CM 可以改善 T2DM。Shree 等^[22]在胰岛素抵抗的细胞株 3T3L1 和 C2C12 中发现加入脂肪来源的 MSC 的条件培养基(ADSCs-CM)后,这些细胞可恢复胰岛素刺激的血糖摄入,改善胰岛素的敏感度。进一步研究其机制发现,在这些细胞中葡萄糖转运体-4(GLUT4)和 Akt 基因表达上调、IL-6 和纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI1)基因表达下降,增强了胰岛素通路的信号。

除了胰岛素增敏外, MSC-CM 对糖尿病的血管病变也有改善作用。糖尿病血管病变的原因与高血

糖导致的血管内皮中氧化应激障碍密切相关,血管内皮细胞在高糖的条件下产生过量的 ROS,导致线粒体功能紊乱,诱发血管病变。而 Yuan 等^[23]发现 MSCs - CM 通过 Sirt1/AMPK/PGC - 1 α 通路可改善糖尿病所致的血管内皮功能紊乱。他们给糖尿病小鼠注射 MSCs - CM 后,观察到胰岛细胞中 PI₃K 和 AKT 活化磷酸化、上调 Sirt1 表达,从而改善线粒体功能,减轻氧化应激压力,改善大动脉舒张功能。

MSC - CM 除了改善血管内皮功能外,还能改善伤口愈合。还通过下调 MEK1/2 和 Erk1/2 的磷酸化水平来减少角细胞内的 ROS,降低高糖和脂多糖诱导的氧化损伤,从而促进糖尿病状态的伤口愈合^[24];而 Kyoung 等^[25]研究发现羊水来源的 MSC - CM 则通过 TGF - β /SMAD2 及 PI₃K/Akt 通路促进伤口愈合。MSC - CM 可改善胰岛素敏感度及糖尿病并发症,有望成为一种新型无细胞疗法,具体的通路也需要深入的探索,深度挖掘 MSC - CM 的功能。

7. 膜联蛋白 A1——调节胰岛功能关键因子:膜联蛋白 A1 (annexin A1, ANXA1), 又称脂皮质蛋白,是一种内源性糖皮质激素调节蛋白,在组织中广泛表达,其中在造血细胞系内有减少白细胞浸润、抑制炎症因子产生等抗炎作用已被广泛证实^[26]。尽管 ANXA1 基因也参与了胰岛素分泌、作用的过程,但是基于芬兰及我国的大规模人群调查、基因连锁研究、基因型分型均表明 ANXA1 并不会升高 T2DM 的风险^[27]。2015 年 Chloe 等的动物实验分析了小鼠 MSC 中高表达的 293 种 G 蛋白偶联受体 (GPCR),发现 MSC 分泌的 ANXA1 是调节胰岛功能的关键因子^[28],从 MSC 培养基中发现了高水平的 ANXA1,外源的 ANXA1 和胰岛细胞共培养可以促进葡萄糖刺激性胰岛素分泌 (GSIS),敲除了 ANXA1 的小鼠则无 GSIS 功能。这项研究证实了 ANXA1 调节胰岛功能的作用,不过人体内是否也有类似效应尚待进一步研究。

二、展 望

MSC 在 1 型糖尿病和 2 型糖尿病的治疗中都发挥着重要的作用,目前 MSC 与胰岛共移植通过免疫调节、保持胰岛形态、分泌大量营养因子等机制可改善胰岛微环境及功能,而 MSC 通过促组织修复再生等机制也可治疗糖尿病并发症,如足底溃疡、糖尿病血管病变等。但新近的研究更关注无细胞疗法,其中以 MSC - MV 及 MSC - CM 备受瞩目,在体外中都证实了改善胰岛功能的疗效,但在动物模型上的研究较少,而相关的信号通路还需要进一步完善,而如何提

高 MV 及条件培养基的疗效还待探索。另外 ANXA1 是近年发现的 MSC 高表达的胰岛功能调节的关键因子,有望进入临床研究并成为新型的糖尿病药物。

参考文献

- 1 Park KS, Kim YS, Kim JH, *et al.* Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation [J]. *Transplantation*, 2010, 89(5):509 - 517
- 2 Kerby A, Jones ES, Jones PM, *et al.* Co - transplantation of islets with mesenchymal stem cells in microcapsules demonstrates graft outcome can be improved in an isolated - graft model of islet transplantation in mice [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(2): 192 - 200
- 3 贾晓蕾,沈山梅,李莉蓉,等. 异体间充质干细胞移植治疗酮症起病 1 型糖尿病的临床疗效 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2015, 7:425 - 430
- 4 Ying X, Xin J, Wang Y, *et al.* Insulin - producing cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro ameliorate streptozotocin - induced diabetic hyperglycemia [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0145838
- 5 白国立,谭雪莹,史光军,等. PDX - 1 在人脂肪间充质干细胞分化为胰岛分泌细胞中的作用 [J]. *山东医药*, 2016, 56(25): 17 - 19
- 6 蒲莹峰,方宁,陈代雄,等. 人羊膜间充质干细胞对大鼠 1 型糖尿病模型的疗效及免疫调节作用 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2014, 30(1):55 - 60
- 7 Ueda YJN, Alves DLKW, Carolina CO, *et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells from patients with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus exhibit preserved in vitro and in vivo immunomodulatory properties [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1):14
- 8 Muralidharan - Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, *et al.* Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 10): 1603 - 1611
- 9 Favaro E, Carpanetto A, Lamorte S, *et al.* Human mesenchymal stem cell - derived microvesicles modulate T cell response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in patients with type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(8): 1664 - 1673
- 10 Forostyak S, Jendelova P, Sykova E. The role of mesenchymal stromal cells in spinal cord injury, regenerative medicine and possible clinical applications [J]. *Biochimie*, 2013, 95(12): 2257 - 2270
- 11 Favaro E, Carpanetto A, Caorsi C, *et al.* Human mesenchymal stem cells and derived extracellular vesicles induce regulatory dendritic cells in type 1 diabetic patients [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(2):325 - 333
- 12 Li XY, Zheng ZH, Li XY, *et al.* Treatment of foot disease in patients with type 2 diabetes mellitus using human umbilical cord blood mesenchymal stem cells; response and correction of immunological anomalies [J]. *Curr Pharm Des*, 2013, 19(27): 4893 - 4899
- 13 Conforti A, Scarsella M, Starc N, *et al.* Microvesicles derived from mesenchymal stromal cells are not as effective as their cellular counterpart in the ability to modulate immune responses in vitro [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(21): 2591 - 2599
- 14 Lu Y, Jin X, Chen Y, *et al.* Mesenchymal stem cells protect islets from hypoxia/reoxygenation - induced injury [J]. *Cell Biochem Funct* 2010, 28(8):637 - 643
- 15 Lee MS. Role of islet beta cell autophagy in the pathogenesis of diabe-

- tes[J]. Trends Endocrinol Metab, 2014, 25(12): 620 – 627
- 16 Kato J, Kamiya H, Himeno T, *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats[J]. J Diabetes Complications, 2014, 28(5): 588 – 595
 - 17 Han, YF, Sun TJ, Han YQ, *et al.* Clinical perspectives on mesenchymal stem cells promoting wound healing in diabetes mellitus patients by inducing autophagy[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(14): 2666 – 2670
 - 18 Zhao K, Hao H, Liu J, *et al.* Bone marrow – derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic high glucose – induced beta – cell injury through modulation of autophagy[J]. Cell Death Dis, 2015, 6(9): e1885
 - 19 Liu GY, Jiang XX, Zhu X, *et al.* ROS activates JNK – mediated autophagy to counteract apoptosis in mouse mesenchymal stem cells in vitro[J]. Acta Pharmacol Sinica, 2015, 36(12): 1473 – 1479
 - 20 Meng Y, Ji J, Tan W, *et al.* Involvement of autophagy in the procedure of endoplasmic reticulum stress introduced apoptosis in bone marrow mesenchymal stem cells from nonobese diabetic mice[J]. Cell Biochem Funct, 2016, 34(1): 25 – 33
 - 21 Han Z, Jing Y, Xia Y, *et al.* Mesenchymal stem cells contribute to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells in inflammatory environment by inducing autophagy[J]. Cell Biosci, 2014, 4(1): 1
 - 22 Shree N, Bhonde RR, Conditioned media from adipose tissue derived mesenchymal stem cells reverse insulin resistance in cellular models [J]. J Cell Biochem, 2017, 118(8): 2037 – 2043
 - 23 Yuan Y, Shi M, Li L, *et al.* Mesenchymal stem cells – conditioned media ameliorates diabetic endothelial dysfunction by improving mitochondrial bioenergetics via the Sirt1/AMPK/PGC – 1alpha pathway [J]. Clin Sci (Lond), 2016, 130(23): 2181 – 2198
 - 24 Li M, Zhao Y, Hao H, *et al.* Mesenchymal stem cell – conditioned medium improves the proliferation and migration of keratinocytes in a diabetes – like microenvironment [J]. Int J Low Extrem Wounds, 2015, 14(1): 73 – 86
 - 25 Kyoung JE, Zhang Q, Sun YB, *et al.* Hypoxic conditioned medium from human amniotic fluid – derived mesenchymal stem cells accelerates skin wound healing through TGF – beta/SMAD2 and PI₃K/Akt pathways[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(1): 605 – 628
 - 26 Sugimoto MA, Vago JP, Teixeira MM, *et al.* Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance[J]. Immunol Res, 2016, 2016(5): 8239258
 - 27 Dong Y, Li G, Luo TH, *et al.* Absence of evidence for the association of single nucleotide polymorphisms in Annexin A1 gene with type 2 diabetes in Chinese [J]. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2004, 21(5): 508 – 511
 - 28 Rackham CL, Vargas AE, Hawkes RG, *et al.* Annexin A1 is a key modulator of mesenchymal stromal cell – mediated improvements in islet function[J]. Diabetes, 2016, 65(1): 129 – 139

(收稿日期: 2016 – 12 – 16)

(修回日期: 2016 – 12 – 28)

(上接第 16 页)

- 14 Dong B, Zhou H, Han C, *et al.* Ischemia/reperfusion – induced CHOP expression promotes apoptosis and impairs renal function recovery: the role of acidosis and GPR4 [J]. PLoS One, 2014, 9(10): 110944 – 110951
- 15 Chen BL, Sheu ML, Tsai KS, *et al.* CCAAT – enhancer – binding protein homologous protein deficiency attenuates oxidative stress and renal ischemia – reperfusion injury [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 23(15): 1233 – 1245
- 16 Yang JR, Yao FH, Zhang JG, *et al.* Ischemia – reperfusion induces renal tubule pyroptosis via the CHOP – caspase – 11 pathway[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(1): 75 – 84
- 17 Miyazaki Y, Kaikita K, Endo M, *et al.* C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(5): 1124 – 1132
- 18 Chen L, Chen M, Du J, *et al.* Hyperglycemia attenuates remifentanyl postconditioning – induced cardioprotection against hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cardiomyoblasts [J]. J Surg Res, 2016, 203(2): 483 – 490
- 19 Yu H, Zhang H, Zhao W, *et al.* Gypenoside protects against myocardial ischemia – Reperfusion Injury by Inhibiting cardiomyocytes Apoptosis via inhibition of CHOP pathway and activation of PI₃K/Akt pathway In vivo and in vitro [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(1): 123 – 136
- 20 Gao Y, Jia P, Shu W, *et al.* The protective effect of lycopene on hypoxia/reoxygenation – induced endoplasmic reticulum stress in H9C2 cardiomyocytes [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 774(15): 71 – 79
- 21 Ding L, Ba XH. Role of ornithine decarboxylase/polyamine pathway in focal cerebral ischemia – reperfusion injury and its mechanism in rats [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20624 – 20630
- 22 Nashine S, Liu Y, Kim BJ, *et al.* Role of C/EBP homologous protein in retinal ganglion cell death after ischemia/reperfusion injury [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 56(1): 221 – 231
- 23 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, *et al.* Caspase – 12 mediates endoplasmic – reticulum – specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid – beta [J]. Nature, 2000, 403(6765): 98 – 103
- 24 Tong Q, Wu L, Jiang T, *et al.* Inhibition of endoplasmic reticulum stress – activated IRE1alpha – TRAF2 – caspase – 12 apoptotic pathway is involved in the neuroprotective effects of telmisartan in the rotenone rat model of Parkinson's disease [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 776(10): 106 – 115
- 25 Takatori O, Usui S, Okajima M, *et al.* Sodium 4 – phenylbutyrate attenuates myocardial reperfusion injury by reducing the unfolded protein response [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2016, 14(11): 558 – 565

(收稿日期: 2016 – 12 – 17)

(修回日期: 2017 – 01 – 02)