

诱导多能干细胞在糖尿病慢性并发症防治中基础研究进展

王婉乔, 李彦欣

上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心, 血液肿瘤科,
国家卫生健康委员会儿童血液肿瘤重点实验室 上海

【摘要】近年来,再生医学和干细胞治疗技术发展迅速,利用诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)技术,能够将已经分化成熟的体细胞逆转为早期未分化的多能干细胞,再经各种细胞因子处理诱导其定向分化为终末目的细胞,其过程类似于胚胎细胞的生长发育过程。将此技术运用于糖尿病视网膜病变、糖尿病心肌病变、糖尿病神经病变以及糖尿病肾病等糖尿病常见慢性并发症的防治研究,并逐渐探索适用于临床的方法,开始成为糖尿病干细胞治疗领域的一大研究热点。研究显示,此种干细胞疗法在细胞和实验动物水平获得了积极的结果,并开始探索应用于临床。因此,笔者拟就 iPSCs 在糖尿病慢性并发症应用方面的基础研究进展进行概括并提出展望。

【关键词】诱导多能干细胞;糖尿病;细胞治疗;糖尿病视网膜病变;糖尿病心肌病;糖尿病周围神经病变;糖尿病肾病

【基金项目】国家自然科学基金(81972341);上海市科学技术委员会(201409002700)

Advances in basic research of induced pluripotent stem cells in prevention and treatment of chronic complications in diabetes mellitus

Wanqiao Wang, Yanxin Li

Department of Hematology Oncology, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Key Laboratory of Pediatric Hematology and Oncology of National Health Commission, Shanghai, China

【Abstract】In recent years, the rapid development of regenerative medicine and stem cell therapy techniques has enabled the reversal of mature somatic cells into early undifferentiated pluripotent stem cells by using induced pluripotent stem cells (iPSCs). After treatment with various cytokines, the cells were induced to differentiate into terminal target cells, which was similar to the growth and development process of embryonic cells. Applying this technology to the prevention and treatment of diabetic retinopathy, diabetic cardiomyopathy, diabetic neuropathy, diabetic nephropathy and other chronic complications of diabetes, and gradually exploring the method suitable for clinical use, has become a major research hotspot in the field of diabetic stem cell therapy. The stem cell therapy has shown positive results at the cell and laboratory animal levels, and is beginning to be explored for clinical use. Therefore, I intend to summarize the basic research progress of iPSCs in the application of chronic complications in DM and put forward the prospect.

【Keywords】Induced Pluripotent Stem cells; Diabetes Mellitus; Diabetic Retinopathy; Diabetic Cardiomyopathy; Diabetic Peripheral Neuropathy; Diabetic Nephropathy

近年来,诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)在糖尿病治疗领域逐渐成为一个研究热点,并取得了一定的进展。iPS细胞技术是通过将已经分化成熟的体细胞诱导重编程,逆向分化为类似于胚胎干细胞的、具有多向分化潜能的细胞,

再进一步定向分化为所需的终末细胞。慢性并发症是糖尿病致残、致死的主要原因,主要分为大血管病变(心、脑血管病变和下肢血管)、微血管病变(肾脏病变、视网膜病变)以及神经病变,本文所涉及的 iPS 治疗糖尿病并发症主要集中在微血管并

发病方面。迄今为止, iPSCs 对糖尿病慢性并发症尚无明确的临床试验方面的报告, 治疗观察主要还是在细胞和实验动物等基础性研究中, 故此, 笔者拟就 iPSC 细胞技术用于糖尿病慢性并发症防治方面的基础研究进展及相关挑战进行阐述, 旨在讨论相关研究成果对于临床应用的参考价值。

1 诱导多能干细胞

1.1 诱导多能干细胞形成与优化

在再生医学领域, 用于移植研究的干细胞可分为胚胎干细胞、诱导多能干细胞、成体干细胞以及人类胚胎组织中的各种祖细胞和前体细胞。自 2007 年 Takahashi 团队成功地将分化的人类体细胞重编程为具有多能的状态、并建立患者和疾病特异性的人诱导多能干细胞^[1] (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 以来, iPSCs 成为干细胞技术的一大热点并在相关研究当中取得一定的进展。iPSCs 的最初形成是通过 4 个特定转录因子 (OCT4、KLF4、SOX2 和 c-Myc 的异位表达完成的。利用关键的蛋白质、小分子或者关键多能性基因有可能将几乎所有的成体细胞重编程为多能干细胞, 这样的多能干细胞具有持续的增殖能力, 在使用经优化的方案情况还能定向分化为一系列的特定体细胞^[2-4]。最初利用逆转录病毒、慢病毒系统实现了基因组整合, 但考虑到重编程效率、插入突变以及临床应用的可行性, 开始逐步探索出了利用腺病毒、仙台病毒、游离 DNAs、转座子 PiggyBac、重组蛋白、合成修饰的 mRNAs、microRNAs 和小分子等非整合方法, 并开发出了对于临床应用更适用的细胞资源^[5]。由此激发了人们对于利用 iPSCs 建立人类疾病模型、药物开发平台以及探索细胞治疗的热情。

1.2 诱导多能干细胞的优势

原代细胞培养取材和活检只能以侵入性的方式来获得, 在临床上很难进行, 限制了其应用; 此外, 胚胎干细胞 (ESCs) 在遗传上与患者不匹配, 并且具有伦理道德问题。iPSCs 在形态、增殖率、基因表达谱、表面抗原表达、畸胎瘤形成、多能表观遗传状态和端粒酶活性等许多方面和 ESCs 都很相似^[1]。此外, 与其他多能干细胞相比, iPSC 能够衍生出患者特异性和组织特异性的细胞, 保留了个体的遗传背景、减少了异质性问题、一定程度上避免了免疫排斥以及人类胚胎破坏的相关伦理问题。iPSC 还

可以有多种细胞系的选择, 例如 HLA 匹配的 iPSC 细胞系, 已有研究证实这些细胞系可延长移植物的存活期并降低免疫排斥的风险^[6]。

1.3 诱导多能干细胞在糖尿病治疗中的研究

由 iPSCs 生成胰岛 β 细胞用于糖尿病移植的一系列研究也取得了诸多进展, 并证明了糖尿病患者采用自体细胞替代疗法的可行性^[7]。多项研究表明, hiPSCs 具有分化为 β 样细胞的潜力, 分化的 iPSCs 可以共表达 C 肽和 PDX-1, iPSCs 的这种能力表明这些细胞具有成熟 β 细胞的特征^[8]。但其对于糖尿病的临床治疗还需要更进一步的研究。

总之, 在 iPSC 十余年的发展时间里, iPSC 细胞技术结合 CRISPR-Cas9 基因编辑技术以及随之而来的 3D 类器官技术, 开始被广泛用于各种疾病的临床研究。

2 诱导多能干细胞和糖尿病视网膜病变

2.1 糖尿病视网膜病变受损以及利用 iPSCs 研究的可行性

糖尿病视网膜病变 (Diabetic retinopathy, DR) 是因长期暴露于高血糖症和其他因果危险因素 (例如高血压) 引发的一系列生化和生理变化, 最终导致微血管损伤和视网膜功能障碍的一类病变。Salero 等人从成体人眼成功分离到视网膜色素上皮成体干细胞 (RPESCs)^[9]。这些成体干细胞可以再次分化为 RPE 细胞。相较于 ESCs 和 iPSCs, 成体干细胞虽然相对更加安全, 但是其分化谱系潜能有限, 并且易衰老并保留了疾病的细胞表型, 限制其作为有效治疗底物的潜力^[10]。人原代视网膜细胞在体外培养难度大, 细胞易快速衰老, 不适合长期分析, 最重要的是, 临床获取非常困难。近年来的研究已经证实了 iPSCs 可以分化为视网膜色素上皮细胞 (RPE)^[11]、视网膜神经节细胞^[12]、感光细胞^[13]以及视网膜血管内皮细胞^[14]。iPSCs 为视网膜细胞持续获取和视网膜细胞移植提供了可能, 有望成为视网膜变性疾病的潜在疗法。

2.2 iPSCs 在糖尿病视网膜病变中研究进展

在细胞水平上, 目前已经建立了若干 iPSCs 衍生视网膜色素上皮细胞 (RPE) 不同方案。Brandl C 等人完善了直接从 iPSC 分化为单层 RPE 的方案, 以及 iPSCs 衍生的 RPE 增殖和冷冻保存技术, 并着重于通过跨上皮阻力 (TER) 监测对细胞进行连续

功能测试^[11]。Kiamehr M 等人首次利用 2 型糖尿病患者和健康对照者诱导的多能干细胞源性视网膜色素上皮 (hiPSC-RPE) 细胞系研究葡萄糖浓度对细胞功能的影响, 证实了 2 型糖尿病患者来源的 hiPSC-RPE 细胞屏障功能下降, 并认为 2 型糖尿病患者 RPE 细胞的抗应激能力可能降低^[15]。在各种 iPSCs 衍生视网膜细胞方法建立的前提下, 糖尿病视网膜病变的类器官水平研究也开始发展起来。视网膜类器官可以再现早期视网膜形成, 对于体外药理学、毒理学研究以及相关疾病机制的探究无疑是一个更好的工具。Dean Hallam 等人在 2018 年研究了 5 个不同的 iPSC 细胞系分化成为视网膜类器官的效率的差异, 并用生成的视网膜类器官测试其对莫西沙星反应, 显示出与成年小鼠体内类似的反应性能^[16]。

利用 iPSCs 衍生的视网膜细胞在动物模型上的研究也取得了一些进展。Barnea-Cramer 等人在 2016 年评估了从人类胚胎和诱导多能干细胞 (ESCs 和 iPSCs) 中获得的光感受器祖细胞的治疗潜力, 研究表明, 移植后 3 周, hESC / hiPSC 衍生的视网膜祖细胞能够成熟并整合到宿主视网膜神经回路中, 并在小鼠中产生部分视力恢复。^[17] 2017 年, 日本学者 Michiko Mandai 等人将小鼠 iPSC 衍生的视网膜组织 (miPSC 视网膜) 移植到视网膜终末变性小鼠模型中, 在移植的小鼠中表现出光反应行为, 并通过体外微视网膜电图和神经节细胞记录使用多电极阵列系统记录了移植宿主的视网膜反应^[18]。同年, Kamao H 等人对 12 只兔进行 hiPSC-RPE 细胞片视网膜下移植, 显示所有移植体均可移植且无明显损伤, 为指导临床应用提供了思路^[19]。

临床应用方面, Takahashi 的团队于 2014 年率先开始了由年龄性黄斑变性患者的自体 iPSC 细胞衍生的视网膜细胞的人体移植试验, 并于 2017 年进行了异体 iPSC 细胞衍生的视网膜细胞移植人体试验^[20]。之后, 美国阿拉巴马大学伯明翰分校在 2018 年开始的关于 iPSC 治疗糖尿病视网膜病变的临床队列研究试验中, 用人类 iPSC 细胞来生成中胚层细胞, 注射到糖尿病啮齿动物和灵长类动物眼睛的玻璃体腔中, 以确定它们对增强血管形成的潜在有益作用 (NCT03403699)。克服免疫排斥问题一直是异种移植的关键所在, 尽管视网膜通常被认为具有免疫特权, 但抑制宿主免疫介导的细胞排斥反应很可能

是改善移植细胞长期整合的有效方法, 以期获得成功的临床结果^[21]。2020 年, Takahashi 的团队又报道了利用建立的 HLA 纯合 iPSC-RPE 细胞移植到与 HLA 匹配的渗出性年龄相关性黄斑变性 5 名患者中, 并结合局部类固醇治疗, 结果显示移植的细胞在 1 年观察期内变得稳定且移植体中没有进一步的异常生长^[22]。尽管显示出了良好的移植效能, 但长远来看, 移植策略仍然有待进一步的优化, 并且目前为止, 还没有 III 期临床研究被记录在案^[23]。

iPSC 在糖尿病视网膜病变中的应用, 仍然主要停留在细胞及动物水平, 虽然在临床应用上有相关报道, 但距离真正实现临床治疗还有很长一段路要走。

3 诱导多能干细胞在糖尿病心肌病变中的应用

3.1 糖尿病心肌病变受损以及利用 iPSCs 研究的可行性

糖尿病性心肌病 (Diabetic cardiomyopathy, DCM) 是指在没有其他心血管疾病 (例如冠心病, 高血压, 瓣膜和先天性心脏病) 的情况下在糖尿病患者中观察到的心脏功能障碍, 以左心室肥大和舒张功能受损为特征的早期阶段, 以心脏纤维化和收缩功能障碍为特征的晚期阶段, 最终可导致患者致死性的心力衰竭^[24]。除了有效控制血糖外, 目前临床上尚无有效的特异性治疗方法。心肌细胞自我修复增殖能力较差, 而一般的药物又难以实现修复受损的心肌细胞。在细胞治疗领域, 干细胞由于其较强的增殖分化能力逐渐成为心脏病变治疗的研究热点。间充质干细胞 (MSCs) 是一类来源于成体组织 (如骨髓, 外周血、脐带血、脂肪组织等) 的多能干细胞, 是目前糖尿病干细胞治疗的主要方向。研究表明, MSCs 也可以从 iPSC 细胞诱导获得。Jakob M 等人分离人上呼吸道黏膜间充质干细胞 (mMSCs), 利用非整合染色体技术将 mMSCs 重编程为诱导多能干细胞 (iPSCs), 以自体方式分化出了高度均一的诱导多能干细胞衍生的间充质干细胞 (iP-MSCs), 并证明 mMSCs 和 iP-MSCs 在形态、克隆形成潜能、分化和表面表型方面具有相似的细胞特征。此外, iP-MSCs 具有 mMSCs 的相关免疫抑制能力, 包括细胞因子的分泌和 T 细胞的抑制^[25]。Guo S 等人在 2020 年通过丙戊酸 (VPA) 诱导 hiPSC 可以获得 MSC 样细胞, 并在急性心肌梗死大鼠模型中进行静脉给药, 测试 iPSC-MSC 样细胞治疗 AMI 的安全性和有效性。

他们的研究证明简单的 VPA 处理可以有效地诱导 hiPSC 分化成 MSC 样细胞, 多次静脉输注 hiPSC-MSCs 对 AMI 大鼠是一种有效、安全的恢复心功能的方法^[26]。这为指导 iPS 治疗糖尿病心脏病变受损指明了方向。

3.2 iPS 在糖尿病心脏病变中的研究进展

在细胞平台上 Ling Tang 等人使用患者特异性的诱导多能干细胞 (iPSCs), 采用基于单层的分化方案将其分化为心肌细胞 (iPSC-CMs), 结果显示 T2DM 的 iPSC-CMs 表现为多种疾病表型, 包括细胞肥大、脂质堆积和线粒体功能受损, 证明 iPSC-CMs 体外模型能够再现 T2DM 的细胞表型^[27]。2018 年, Ronaldson-Bouchard K 等人在体外纤维蛋白水凝胶 3D 环境中培养出在基因表达、心肌结构、钙处理和氧化代谢方面与成人心肌细胞类似的 iPSC-CMs^[28]。Tsukamoto Y 等人在利用 iPSC-CMs 和成纤维细胞等构建 3D 工程化心肌纤维单元后, 将其与人心脏微血管内皮细胞 (HMVEC) 共培养, 进行体外功能特性测试, 结果显示所制造的单元可以同时具有血管化和收缩性^[29]。而 Yeung E 等人用人 iPSC 来源的 CM、成纤维细胞和脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 组成的球状细胞群生成心脏贴片, 证明了三维生物打印心脏贴片有可能促进心肌组织再生, 促进梗死组织血管生成, 减少瘢痕组织的形成^[30]。Kupfer ME 等人首先将 iPSC 打印和增殖, 随后分化为心肌细胞, 用于在体外测试长期存活和功能, 结果显示依序构建的心脏器官可被赋予收缩性和泵性功能^[31]。高通量 3D 生物打印技术仍在不断发展, 它与干细胞技术的结合在组织工程和再生医学领域依然具有极大的优势。心脏组织由心肌细胞、血管内皮细胞、壁细胞、成纤维细胞等多种细胞构成, 加之心肌运动的复杂性, 目前这些心脏贴片的功能和电学性质仍不能与宿主心脏组织的功能和电学性质相提并论, 3D 生物工程体能否在物理和化学上实现或接近 100% 的心脏复制仍有待进一步探索^[32]。未来主要的攻关方向是解决如何优化 iPSC 来源的心肌细胞的成熟和整合, 以期获得临床应用。

一般认为合并糖尿病是心脏移植手术的禁忌证之一自从电子起搏器自 20 世纪 50 年代引入临床, 拯救了许多心脏病患者的生命, 进一步优化策略要求减少其并发症, 随之而来出现了一个全新的领域

——生物起搏器。Schweizer PA 等人在 2017 年的一项大鼠实验中, 将 hiPSC 与内脏内胚层样细胞株 END-2 在无血清培养基中共培养, 结果显示它们对肾上腺素能/胆碱能刺激有反应, 并能调节新生大鼠心肌传导速度^[33]。S.I. Protze 等人描述了一种通过阶段特异性调控发育信号通路从人类多能干细胞中产生窦房结样起搏细胞 (SANLPCs) 的非转基因方法, 当移植到大鼠心尖时, SANLPCs 能够与宿主组织同步, 显示出其作为生物起搏器的功能^[34]。S. Chauveau 等人在狗模型上的试验描述了含有 iPSC-CMs 的类胚体 (EBS) 可以很好地整合到心肌中, 并对完全性心脏阻滞的狗成功地进行心脏起搏^[35]。Schulze ML 等人则建立了一种以 iPSC-CMs 类胚体 (EB) 为触发, 植入大鼠工程心脏组织 (EHT) 中作为心律失常搏动底物的二组分心脏器官模型, 证明了 HiPSC-CM 的 EBs 在二组分心脏器官模型中起生物起搏器的作用, 为研究起搏器活动传播的电生理和结构耦合机制提供了可能^[36]。

在药物探索方面, 相较于肿瘤的药物研发, 有关心肌病的药物研发进展非常缓慢。实验动物和人类心脏兴奋-收缩-偶联机制之间的不同之处突出了建立人类心肌细胞体外模型的必要性。由多能干细胞产生的人心肌细胞最近已被应用于安全药理学、表型筛选、靶点验证和高通量分析, 促进了心脏药物的发现。在一项使用患者特异性 iPSCs 模拟糖尿病性心脏病的研究中证明了 hiPSC-CMs 在药物研发方面减轻心力衰竭的能力^[37]。而确定衰竭心脏的代谢特征将有助于指导未来的药物治疗, 这些药物治疗可以结合各种方法来协调和正常化衰竭心脏的代谢灵活性。

干细胞易于自我更新和分化的潜能使其成为心肌细胞“再生”强有力的工具, 但与此同时也有临床应用的致瘤性、免疫排斥等风险。并且在目前技术水平之下, 研究及治疗成本费用高昂, 在成功应用于临床之前仍然需要不断优化改进。

4 诱导多能干细胞在糖尿病多发性神经病变研究中的应用

4.1 糖尿病多发神经病变以及利用 iPSCs 研究的可行性

糖尿病神经病变是一组继发于糖尿病的外周神经和植物神经损伤引起的病变, 一般分为对称性神

经病变及局灶性和多灶性神经病变两大类, 而慢性远端对称性多发性神经病变 (Distal Symmetric Polyneuropathy, DSPN) 是最常见的糖尿病神经病变, 表现为“长袜和手套”分布, 即手和下肢通常受到影响。若没有及早发现和预防, 最后导致糖尿病足溃疡, 严重者继发感染可能需行下肢截肢手术。尽管对患者生活质量有很大的影响, 相较于其他并发症, 糖尿病神经病变并未得到很好地诊断和治疗。目前针于病因的治疗研究进展依然有限, 药物疗法多限于控制血糖和对症治疗。诸如糖尿病神经病变这类疾病, 无法轻易获得与这些疾病最相关的有缺陷的细胞类型是其中最重要的一点。在现如今不断发展的再生医学领域, 细胞移植疗法的潜力正在不断扩大。而患者来源的诱导多能干细胞可以分化为与疾病相关的神经元, 为体外建模和开发治疗策略提供了更加优化的平台。

4.2 iPSC 在糖尿病多发性神经病变中的研究进展

早在 2012 年, Chambers 团队和 Liu 团队等人就分别报道了有关于 iPSCs 分化为感觉神经元和雪旺细胞的研究成果^[38, 39]。作为糖尿病远端多发神经性病变的一大严重病变, 糖尿病足溃疡的研究也在不断探索中。在糖尿病足中成纤维细胞的研究中发现, 来自糖尿病足患者的 hiPSCs 衍生的成纤维细胞比原代成纤维细胞更能促进伤口愈合^[40]。

2016 年, Shen YI 等人在免疫缺陷的啮齿类动物身上建立了一个伤口模型, 并用来自 EPCs 的工程化血管构建物或来自健康供体或 1 型糖尿病患者的人类诱导多能干细胞 (hiPSCs) 的早期血管细胞进行治疗, 结果显示, 所有血管化的构建物都加速了伤口的闭合和再灌注^[41], 显示出 iPSCs 的治疗潜力。然而, 目前还没有关于这些植入细胞在局部部位是否具有功能和安全性问题的数据, 有待于进一步的研究证实。平滑肌细胞在血管生成这样一个复杂而高度有序的过程中也发挥着重要的作用。最近, Gorecka J 等人为了评估人诱导多能干细胞来源的平滑肌细胞 (hiPSC-SMC) 促进糖尿病创面愈合的潜力, 将 hiPSC-SMC 植入 3D 胶原支架内, 体外培养 72 h, 然后将支架应用于糖尿病裸鼠的夹板背部伤口, 以评估体内愈合情况。结果显示, 与小鼠脂肪来源的干细胞相比, hiPSC-SMC 分泌的促血管生成细胞因子浓度增加。含 hiPSC-SMC 的胶原蛋白支架

加速了糖尿病创面愈合, 以此证明了 hiPSC-SMC 具有促进血管生成、加速糖尿病创面愈合的作用, 是治疗糖尿病创面很有前途的新候选材料^[42]。自此, 通过对血管生成过程中对内皮细胞、成纤维细胞和血管平滑肌细胞的诱导再生, 实现糖尿病皮肤伤口愈合由动物模型正不断向临床转变。虽然使用 iPSC 衍生的神经元/神经胶质来研究疾病并非没有局限, 但这项技术有可能改变我们对糖尿病性神经病发病机制的未来理解。

5 诱导多能干细胞和糖尿病肾病

5.1 糖尿病肾病以及利用 iPSCs 研究的可行性

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 病理特征包括肾小球基底膜增厚、肾小球肥大和系膜扩张, 最终导致蛋白尿、肾纤维化和终末期肾脏疾病。迄今为止, 临床上治疗 DN 的干预措施非常有限, 包括完全肾素-血管紧张素系统阻断以及严格的血糖、血脂和血压控制, 但这些都并非特异性方法。当疾病进展到终末期时, 需要行肾脏替代治疗, 由于副作用及费用较高, 此种疗法加重了患者生活负担并局限了临床应用。因此迫切需要一种再生策略, 干细胞治疗显示出了作为 DN 研究治疗的潜力, 多种类型的干细胞已被用于临床前动物模型来修复或再生糖尿病肾。ESCs 衍生的肾祖细胞产生 3D 培养后的自体组织肾脏, 但如前所述, 畸胎瘤的形成和伦理问题也是其临床应用的一大阻碍。而来自不同实验室或不同供体的 MSCs 具有高度异质性, 体外细胞传代和培养条件等诸多因素也会影响骨髓来源的 MSCs 的表型, 并有报道显示大鼠模型中分离的骨髓来源 MSCs 显示出增殖和分化能力降低, 这限制了 MSCs 的研究和治疗地效果。与其他干细胞一样, iPSCs 有很强大的增殖和分化潜能, 建立从 hiPSCs 定向分化为肾系细胞的方法, 将是发展基于诱导多能干细胞技术的糖尿病肾病治疗的必要条件。迄今已经开发出了几种有前景的将人类 iPSCs 直接分化为输尿管芽肾祖细胞^[43]、肾小球足细胞^[44]、肾小管上皮细胞^[45]等方案, 有力地促进了对 DN 的研究。

5.2 iPSC 在糖尿病肾病中的研究进展

在 DN 的发病机制中, 足细胞和肾小管上皮细胞起着重要的作用, 因此一定程度上可以视为研究和治疗的靶点。组织特异性的 iPSC 保留能够原始

亲本细胞的表观遗传模式, 因此有报道从正常人肾系膜细胞和健康供体尿液中脱落的肾小管细胞生成 iPSC, 这为开发针对肾脏疾病的组织特异性 iPSC 疗法开辟了道路。Song B 等人于 2012 年首次报道 iPSCs 定向分化为具有足细胞特征的肾细胞^[46]。2018 年, TAJIRI S 等人从糖尿病肾病和肾小球肾炎患者的外周血或者成纤维细胞生成了 iPSC (统称为 HD-iPSC), HD-iPSCs 与健康人来源的 iPSCs 具有相似的分化为肾单位祖细胞 (NPC) 效率, 并在移植到小鼠体内后能够分化为血管化肾小球, 表明 HD-iPSCs 作为肾脏再生的可行细胞来源的潜力。尽管存在因为没有评估产生 iPSC 的亲本 PBMC 是否确实受到糖尿病肾病或者肾小球肾炎的影响, 以及无法在较长时期内分析 iPSC 衍生的肾单位的功能的这些缺陷, 但这为 DN 患者干细胞衍生的肾脏再生铺平道路的研究, 强调了 DN-iPSCs 的潜力^[47]。在此基础上, LIU D 等人的研究证明了组织特异性的肾来源的 iPSCs, 可能比其他组织来源的 iPSCs 甚至 ESCs 更有效地分化为成熟的肾脏细胞^[48]。

此外, iPSC 还可以通过 3D 培养分化为包含多个谱系的肾脏类器官。一项研究表明, 通过用小分子将人类 iPSC 分形成复杂的多细胞肾脏类器官, 其中包含内皮细胞和肾间质。每个类器官由 500 多个肾单位组成, 肾单位的转录与人类胎儿肾脏相似^[49]。另一项研究报道了一种从体外从人类 iPSC 中获得功能性足细胞的简单有效的方法。细胞接受三步疗法, 诱导分化为中胚层, 然后分化为肾祖细胞, 最后分化为成熟的足细胞。这些足细胞能够通过与分离的小鼠胚胎肾细胞结合, 将白蛋白内化并自组装成嵌合三维结构^[50]。

而在糖尿病肾病临床研究中, 目前有两项临床试验 (NCT03620773、NCT04074668) 均利用诱导多能干细胞 (iPSCs) 以评估肾组织的形态计量学和基因表达, 也期待理想的结果。

与其他再生医学策略一样, 使用 iPS 细胞技术建立糖尿病肾病的细胞治疗方法也面临许多挑战, 如 hiPSCs 分化而来的细胞可能发生的过早老化、定向分化效率低下以及基因组不稳定等问题, 需要进一步地探索研究。

6 总结与展望

近年来, 基于干细胞的糖尿病治疗成为一个热

点问题, 通过在临床前模型中应用各种类型的干细胞, 对糖尿病及其并发症的研究和治疗取得了一些成果, 但是距离真正的临床应用仍然有一定的距离。在诱导多能干细胞不断发展的十多年间, 依旧有许多亟待解决的问题。其中主要包括: ①致瘤性。iPSCs 的无限增殖潜能, 一方面能够使其移植后继续增殖, 另一方面, 也有由于重编程因子的存在、不正确的分化模式或者体外培养发生基因突变而形成畸胎瘤的可能性。因此, 未来研究的重点在于如何建立正确有效的体外定向分化方案、如何执行更加严格的标准产生纯化试验细胞、如何严格筛选适用于临床的 iPS 细胞系、如何替代具有致瘤性重编程因子的整合等, 以此降低甚至免除畸胎瘤或者其他肿瘤形成的可能性; ②免疫原性。免疫排斥也是细胞治疗中一个不可规避的问题, 然而, 自体 iPSCs 的免疫原性却一直存在争议。用于减少排斥的另一种方法是 HLA 单倍型的匹配, 如前所述, 可以从已确定 HLA 单倍型的供体中产生 iPSC。在一些灵长类动物模型上的研究证明, 即使与 HLA 匹配, 仍需要免疫抑制。但是未来可以期望通过匹配 HLA 来减少免疫抑制的剂量和持续时间, 这对患者来说将是一个显著的优势; ③异质性。iPS 细胞系的异质性也是 iPSC 的一个重要问题。每个 iPSCs 细胞系在细胞形态、生长曲线、基因表达和分化成各种细胞谱系的倾向方面都不同。遗传背景是决定基因表达异质性的最大因素, 为了克服异质性, 可以通过将 hiPSCs 转化为幼稚和基态来增强它们的分化能力。迄今为止, 尽管已经开展了部分针对 iPSCs 治疗的临床试验, 但对 iPSCs 主要研究主要还是集中实验室水平, 要实现从实验室走向临床, 如何完善一整套的 iPS 分化策略、进行目的细胞质量检测、微生物安全评估、基因组稳定性和致瘤性的监测以及细胞安全性的评估体系等等, 这些都是未来进行相关研究的重点。

参考文献

- [1] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. Cell, 2007, 131(5): 861-872.
- [2] EBRAHIMI M, FOROUZESH M, RAOUFI S, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells

- into erythroid cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 483.
- [3] VELMURUGAN B K, BHARATHI PRIYA L, POORNIMA P, et al. Biomaterial aided differentiation and maturation of induced pluripotent stem cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8443-8454.
- [4] STEICHEN C, HANNOUN Z, LUCE E, et al. Genomic integrity of human induced pluripotent stem cells: Reprogramming, differentiation and applications[J]. *World J Stem Cells*, 2019, 11(10): 729-747.
- [5] SHI Y, INOUE H, WU J C, et al. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(2): 115-130.
- [6] MATTAPALLY S, PAWLIK K M, FAST V G, et al. Human Leukocyte Antigen Class I and II Knockout Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cells: Universal Donor for Cell Therapy[J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(23): e010239.
- [7] MILLMAN J R, PAGLIUCA F W. Autologous Pluripotent Stem Cell-Derived β -Like Cells for Diabetes Cellular Therapy[J]. *Diabetes*, 2017, 66(5): 1111-1120.
- [8] 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.
- [9] SALERO E, BLENKINSOP T A, CORNEO B, et al. Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(1): 88-95.
- [10] GOLESTANEH N, CHU Y, XIAO Y Y, et al. Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1): e2537.
- [11] BRANDL C. Generation of Functional Retinal Pigment Epithelium from Human Induced Pluripotent Stem Cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1834: 87-94.
- [12] JI S L, TANG S B. Differentiation of retinal ganglion cells from induced pluripotent stem cells: a review[J]. *Int J Ophthalmol*, 2019, 12(1): 152-160.
- [13] ZHU J, REYNOLDS J, GARCIA T, et al. Generation of Transplantable Retinal Photoreceptors from a Current Good Manufacturing Practice-Manufactured Human Induced Pluripotent Stem Cell Line[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(2): 210-219.
- [14] SIMARA P, TESAROVA L, REHAKOVA D, et al. Reprogramming of Adult Peripheral Blood Cells into Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Safe and Accessible Source of Endothelial Cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(1): 10-22.
- [15] KIAMEHR M, KLETTNER A, RICHERT E, et al. Compromised Barrier Function in Human Induced Pluripotent Stem-Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells from Type 2 Diabetic Patients[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15).
- [16] HALLAM D, HILGEN G, DORGAU B, et al. Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generate Light Responsive Retinal Organoids with Variable and Nutrient-Dependent Efficiency[J]. *Stem Cells*, 2018, 36(10): 1535-1551.
- [17] BARNEA-CRAMER A O, WANG W, LU S J, et al. Function of human pluripotent stem cell-derived photoreceptor progenitors in blind mice[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29784.
- [18] MANDAI M, FUJII M, HASHIGUCHI T, et al. iPSC-Derived Retina Transplants Improve Vision in rd1 End-Stage Retinal-Degeneration Mice[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(1): 69-83.
- [19] KAMAO H, MANDAI M, OHASHI W, et al. Evaluation of the Surgical Device and Procedure for Extracellular Matrix-Scaffold-Supported Human iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheet Transplantation[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(1): 211-220.
- [20] MANDAI M, WATANABE A, KURIMOTO Y, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(11): 1038-1046.
- [21] ZHU J, CIFUENTES H, REYNOLDS J, et al. Immunosuppression via Loss of IL2 γ Enhances Long-Term Functional Integration of hESC-Derived Photoreceptors in the Mouse Retina[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(3): 374-384.e375.
- [22] SUGITA S, MANDAI M, HIRAMI Y, et al. HLA-Matched Allogeneic iPSC Cells-Derived RPE Transplantation for Macular Degeneration[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(7).

- [23] LI X J, LI C Y, BAI D, et al. Insights into stem cell therapy for diabetic retinopathy: a bibliometric and visual analysis[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(1): 172-178.
- [24] PAOLILLO S, MARSICO F, PRASTARO M, et al. Diabetic Cardiomyopathy: Definition, Diagnosis, and Therapeutic Implications[J]. *Heart Fail Clin*, 2019, 15(3): 341-347.
- [25] JAKOB M, HAMBRECHT M, SPIEGEL J L, et al. Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Show Comparable Functionality to Their Autologous Origin[J]. *Cells*, 2020, 10(1).
- [26] GUO S, ZHANG Y, ZHANG Y, et al. Multiple Intravenous Injections of Valproic Acid-Induced Mesenchymal Stem Cell from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Improved Cardiac Function in an Acute Myocardial Infarction Rat Model[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 2863501.
- [27] TANG L, WANG H, DAI B, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveal abnormal TGF β signaling in type 2 diabetes mellitus[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 142: 53-64.
- [28] RONALDSON-BOUCHARD K, MA S P, YEAGER K, et al. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2018, 556(7700): 239-243.
- [29] TSUKAMOTO Y, AKAGI T, AKASHI M. Vascularized cardiac tissue construction with orientation by layer-by-layer method and 3D printer[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5484.
- [30] YEUNG E, FUKUNISHI T, BAI Y, et al. Cardiac regeneration using human-induced pluripotent stem cell-derived biomaterial-free 3D-bioprinted cardiac patch in vivo[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13(11): 2031-2039.
- [31] KUPFER M E, LIN W H, RAVIKUMAR V, et al. In Situ Expansion, Differentiation, and Electromechanical Coupling of Human Cardiac Muscle in a 3D Bioprinted, Chambered Organoid[J]. *Circ Res*, 2020, 127(2): 207-224.
- [32] TANG S W, TONG W Y, PANG S W, et al. Deconstructing, Replicating, and Engineering Tissue Microenvironment for Stem Cell Differentiation[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2020.
- [33] SCHWEIZER P A, DARCHE F F, ULLRICH N D, et al. Subtype-specific differentiation of cardiac pacemaker cell clusters from human induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 229.
- [34] PROTZE S I, LIU J, NUSSINOVITCH U, et al. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker[J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(1): 56-68.
- [35] CHAUVEAU S, ANYUKHOVSKY E P, BEN-ARI M, et al. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Provide In Vivo Biological Pacemaker Function[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2017, 10(5): e004508.
- [36] SCHULZE M L, LEMOINE M D, FISCHER A W, et al. Dissecting hiPSC-CM pacemaker function in a cardiac organoid model[J]. *Biomaterials*, 2019, 206: 133-145.
- [37] DRAWNEL F M, BOCCARDO S, PRUMMER M, et al. Disease modeling and phenotypic drug screening for diabetic cardiomyopathy using human induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Rep*, 2014, 9(3): 810-821.
- [38] CHAMBERS S M, QI Y, MICA Y, et al. Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors[J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(7): 715-720.
- [39] LIU Q, SPUSTA S C, MI R, et al. Human neural crest stem cells derived from human ESCs and induced pluripotent stem cells: induction, maintenance, and differentiation into functional schwann cells[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(4): 266-278.
- [40] KASHPUR O, SMITH A, GERAMI-NAINI B, et al. Differentiation of diabetic foot ulcer-derived induced pluripotent stem cells reveals distinct cellular and tissue phenotypes[J]. *Faseb j*, 2019, 33(1): 1262-1277.
- [41] SHEN Y I, CHO H, PAPA A E, et al. Engineered human vascularized constructs accelerate diabetic wound healing[J]. *Biomaterials*, 2016, 102: 107-119.
- [42] GORECKA J, GAO X, FEREYDOONI A, et al. Induced pluripotent stem cell-derived smooth muscle cells increase angiogenesis and accelerate diabetic wound healing[J]. *Regen Med*, 2020, 15(2): 1277-1293.
- [43] XIA Y, NIVET E, SANCHO-MARTINEZ I, et al. Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(12): 1507-1515.

- [44] SONG B, SMINK A M, JONES C V, et al. The directed differentiation of human iPS cells into kidney podocytes[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46453.
- [45] LAM A Q, FREEDMAN B S, MORIZANE R, et al. Rapid and efficient differentiation of human pluripotent stem cells into intermediate mesoderm that forms tubules expressing kidney proximal tubular markers[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(6): 1211-1225.
- [46] SONG B, NICLIS J C, ALIKHAN M A, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human kidney mesangial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(7): 1213-1220.
- [47] TAJIRI S, YAMANAKA S, FUJIMOTO T, et al. Regenerative potential of induced pluripotent stem cells derived from patients undergoing haemodialysis in kidney regeneration[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 14919.
- [48] LIU D, ZHENG W, PAN S, et al. Concise review: current trends on applications of stem cells in diabetic nephropathy[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(11): 1000.
- [49] TAKASATO M, ER P X, CHIU H S, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis[J]. Nature, 2016, 536(7615): 238.
- [50] CIAMPI O, IACONE R, LONGARETTI L, et al. Generation of functional podocytes from human induced pluripotent stem cells[J]. Stem Cell Res, 2016, 17(1): 130-139.

收稿日期: 2021年9月16日

出刊日期: 2021年10月20日

引用本文: 王婉乔, 李彦欣, 诱导多能干细胞在糖尿病慢性并发症防治中基础研究进展[J]. 细胞与分子生物学研究, 2021, 1(1): 33-41.

DOI: 10.12208/j.ijcmbr.20210007

检索信息: 中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA) 等数据库收录期刊

版权声明: ©2021 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS