

脐血多能干细胞的免疫教育与 1 型糖尿病的治疗

赵勇 周智广

目前,糖尿病的发病率和增长速度令人震惊,正严重威胁着人类的健康^[1]。特别是 1 型糖尿病,因患者机体免疫功能紊乱,T 淋巴细胞特异性杀伤胰岛 β 细胞,而导致胰岛素缺乏和糖尿病的发生。全球数以百万计的 1 型糖尿病患者必须每天注射胰岛素治疗,以维持生命。但胰岛素的治疗只能对症“治标”,长期大剂量应用具有潜在副作用。因此,在临床实践中,如何有效地控制 T 细胞介导的自身免疫反应和再生胰岛 β 细胞,是治疗 1 型糖尿病亟待解决的两个关键问题。大量研究证明:1 型糖尿病的自身免疫反应具有多克隆特性,且有多重的免疫细胞调节紊乱^[2-3]。一直以来,为攻克 1 型糖尿病,世界各国已对众多治疗方案进行了探索和临床尝试,多数以失败告终。故此,针对某个单一环节,采取传统的免疫治疗达不到目的。有学者建议采用联合疗法进行免疫干预,但如何联合、何时联合,非常复杂,且会增加治疗费用^[1,3]。2012 年,国际青少年糖尿病治愈联盟(JDCA)总结了 332 项临床研究,只有 5 项技术(包括人胰岛移植、猪胰岛移植、抗胸腺球蛋白(ATG)+粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、卡介苗和干细胞免疫教育(stem cell educator)有可能治愈 1 型糖尿病。其中,我们创建的脐血多能干细胞(CB-SC)的干细胞免疫教育治疗技术是 1 型糖尿病治疗的全新理念,本文将对此作一介绍。

一、CB-SC 的生物学特性

CB-SC 是脐血中独特的一种干细胞,不同于传统的造血干细胞(HSC)和间充质干细胞(MSC)^[3]。具有大而圆的细胞形态,紧紧地附着在具有疏水特性的培养皿上,并且抵抗常规的细胞消化处理方法[胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA)法]^[4]。其生物学特征为:

1. 分子表型特征:CB-SC 表达人胚胎干细胞相

关的标志(如转录因子 OCT-4、Nanog 和 Sox2 以及细胞表面标志 SSEA-3 和 SSEA-4);CB-SC 表达人白细胞共同抗原 CD45,但不表达如下血细胞标志:CD1a、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD19、CD20、CD34、CD41a、CD41b、CD83、CD105 和 CD133,均为阴性。其中 CD45 可作为 CB-SC 和 MSC 区别的关键分子标志^[2-3]。

2. 分子免疫学特征:CB-SC 表达非常低水平的 I 类主要组织相容性复合体抗原(HLA-I),而 HLA-II 阴性。同种异体淋巴细胞刺激增殖实验表明:CB-SC 具有非常低的免疫原性^[2,4-5]。正因如此,临床采用干细胞免疫教育治疗时,无需进行 HLA 配型,没有排斥反应。另外,CB-SC 细胞表面表达程序化死亡配体 1(PD-L1),通过淋巴细胞表面的程序化死亡因子 1(PD-1)结合,对淋巴细胞产生抑制作用^[5]。重要的是,CB-SC 表达转录因子自身免疫调控因子(Aire),是临床控制自身免疫、诱导免疫平衡的关键因素^[6]。

3. 多向分化潜能:CB-SC 具有胚胎干细胞多向分化潜能。在不同诱导条件下,能够分化为三个胚层来源的细胞^[2],例如经过全反式维甲酸(ATRA)处理后,CB-SC 可向多巴胺神经细胞分化^[7];采用神经生长因子(NGF)处理,CB-SC 可分化为神经细胞^[4]。另外,CB-SC 表达胰岛 β 细胞特异的转录因子 MafA 和 Nkx 6.1,体外经过 10 nmol/L Exendin-4 和 25 mmol/L 高糖刺激,可诱导 CB-SC 向胰岛素产生细胞分化,进而表达胰岛 β 细胞的分子特征^[2]。

二、脐血多能干细胞的免疫教育治疗技术

1. 基本原理与治疗过程:利用 CB-SC 的免疫调节特性,表达 Aire^[6],改变调节性 T 细胞(Treg)和对人胰岛 β 细胞特异性 T 细胞克隆的直接抑制作用^[2,8],我们创建了这种全新的干细胞免疫教育治疗技术(图 1)。

治疗过程如图 1 所示。简要的说,将一枚 16 或 18 号针放置在左或右侧肘正中静脉,患者血液通过血细胞分离机,根据细胞密度和大小差异,分离患者淋巴细胞。整个采血分离过程需 4~7 h。收集的淋

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2014.02.001

作者单位:07601 纽约,美国 Hackensack 大学医学中心(赵勇);中南大学湘雅二医院内分泌科 中南大学糖尿病中心(周智广)

通信作者:赵勇,Email:yzhaowhl@yahoo.com

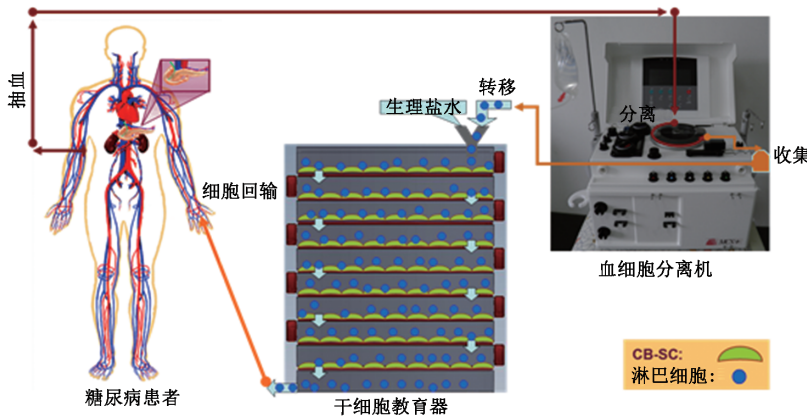


图1 脐血多能干细胞 (CB-SC) 免疫教育治疗技术示意图 (图片来自 ClinicalTrials.gov: NCT0101350219^[6])

淋巴细胞被转移至干细胞教育器后,可与 CB-SC 接触,通过细胞膜分子和释放的可溶性分子发挥相互作用;而其他的血液成分自动返回到患者体内。整个治疗过程是一个封闭而连续的操作系统,患者淋巴细胞在干细胞教育器闭环系统中循环;淋巴细胞与 CB-SC 在体外进行共培养,然后回输至患者体内,整个治疗过程需要 8~9 h/次。

2. 治疗的安全性和优势:在治疗过程中, CB-SC 附着在教育器皿的表面,保留在干细胞教育器内,没有进入患者体内,因此没有排异反应。CB-SC 通过细胞表面信号分子和释放的可溶性分子,作用于淋巴细胞,进而达到纠正和修复患者免疫紊乱的治疗目的;CB-SC 只在体外对患者的免疫细胞进行修复和处理,没有输入患者体内,这与传统的干细胞治疗方案有显著的区别。该治疗技术只需要两个静脉穿刺、感染的风险比典型输血更低。此外, CB-SC 的免疫原性非常低,无需进行组织配型^[2,4,5];根据我们目前国际多中心的临床研究,尚未发现排斥反应。

干细胞免疫教育治疗技术适用于大多数糖尿病患者,创伤小,疼痛小,无不良反应。但是此技术不适合于乙型肝炎、丙型肝炎、艾滋病、结核病等病毒和细菌感染及肿瘤患者。另外,出凝血机制异常、肾功能不全患者亦属禁忌。

3. 治疗的有效性——纠正自身免疫:临床治疗疾病,最好针对病因。然而,1 型糖尿病的病因学研究表明,多种因素如遗传、环境因素、肥胖等均可诱发免疫紊乱,导致糖尿病的发生。近年来,大量研究表明:1 型糖尿病患者存在多种细胞免疫紊乱,包括 T 细胞、B 细胞、Treg、单核/巨噬细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞(NK)、自然杀伤性 T 细胞(NKT)等。有鉴于此,针对单一环节,采用单一的免疫干预,以

纠正 1 型糖尿病的自身免疫行不通^[9],如 CD3 单抗治疗和 GAD65 疫苗治疗,均以失败告终^[11]。理想的治疗方案,应通过诱导外周免疫耐受,调节整体免疫系统平衡,进而达到治疗或逆转 1 型糖尿病的目的。

CB-SC 表达诱导免疫耐受的关键因子 Aire^[6]。当分离的 T 细胞经过教育器时, CB-SC 可通过细胞膜分子和可溶性分子诱导其产生耐受,具有类似人工胸腺的功能。临床研究显示,1 型糖尿病患者接受干细胞教育器治疗后,共刺激分子的

表达显著提高[尤其是 CD28 和可诱导共刺激因子(ICOS)],增加了 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs 的数量,并且恢复了 Th1/Th2/Th3 细胞因子的平衡^[6]。在其他自身免疫病的临床多中心研究中,也进一步证明了 CB-SC 的免疫调节作用。

4. 治疗的有效性——控制糖代谢:通过 I 期和 II 期临床试验观察,15 例典型 1 型糖尿病患者接受了一次干细胞免疫教育治疗。平均年龄 29 岁(15~41 岁),平均糖尿病病史 8 年(1~21 年)^[6]。结果发现,血浆 C 肽水平显著提高(包括空腹和 75 g 口服葡萄糖耐量试验后),糖化血红蛋白(HbA1c)水平降低,并降低了胰岛素用量(有部分胰岛 β 细胞功能残留的患者治疗组降低了 38% 和无胰岛 β 细胞功能残留的患者治疗组降低了 25%)。该治疗在 40 周后,患者基础 C-肽和葡萄糖刺激的 C 肽水平稳步提高。然而,对照组患者(有部分 β 细胞功能残留的 1 型糖尿病)起初在接受对照治疗后(空的教育器,无干细胞)无显著变化;后来,接受干细胞免疫教育治疗后,血浆 C 肽水平显著提高, HbA1c 下降。

5. 治疗的有效性——刺激胰岛再生:胰岛 β 细胞缺乏是 1 型糖尿病治疗的第二个关键问题。经过一次 CB-SC 的免疫教育治疗后,在上述 1 型糖尿病和晚期的 2 型糖尿病患者的临床试验都提示有胰岛 β 细胞再生^[6,10]。因人体研究取材受限,采用 1 型糖尿病 NOD 小鼠模型,进一步探讨了胰岛 β 细胞再生的分子机制。经过免疫调节治疗后,糖尿病 NOD 小鼠胰岛局部浸润的免疫细胞发生凋亡,自身免疫反应得到纠正或控制,残存的胰岛 β 细胞可再生^[8];在转化生长因子 β1(TGF-β1)的作用下,可使损坏的胰岛发生重构,恢复 β 细胞和 α 细胞的正常

的分布结构(β 细胞在内,α 细胞分布在胰岛外周)^[8,11]。

对于晚期严重的 1 型糖尿病患者,胰岛 β 细胞几乎全部破坏,患者血浆 C 肽和胰岛素原检测不到,经 CB-SC 的免疫教育治疗后,也提示有胰岛 β 细胞的再生^[6]。其机制可能是启动了患者自体内源性干细胞的分化和再生,如胰岛 α 细胞或胰管细胞向胰岛 β 细胞的分化。另外,我们在成人外周血中发现了外周血来源的胰岛素产生细胞(PB-IPC)^[12]。采用链脲佐菌素(STZ)诱导的药物性糖尿病 NOD-scid 小鼠,移植到腹腔的 PB-IPC 细胞可通过基质细胞衍生因子 1(SDF-1)(病变的胰岛表达)和其受体 CXCR4(干细胞表达)的作用潜行到胰岛;采用人染色体探针的原位杂交研究证明,PB-IPC 参与了病变胰岛的重构^[12]。上述发现令人鼓舞,但有待更精细的胰岛结构和功能研究。

三、干细胞免疫教育技术治疗 1 型糖尿病的分子免疫学机制

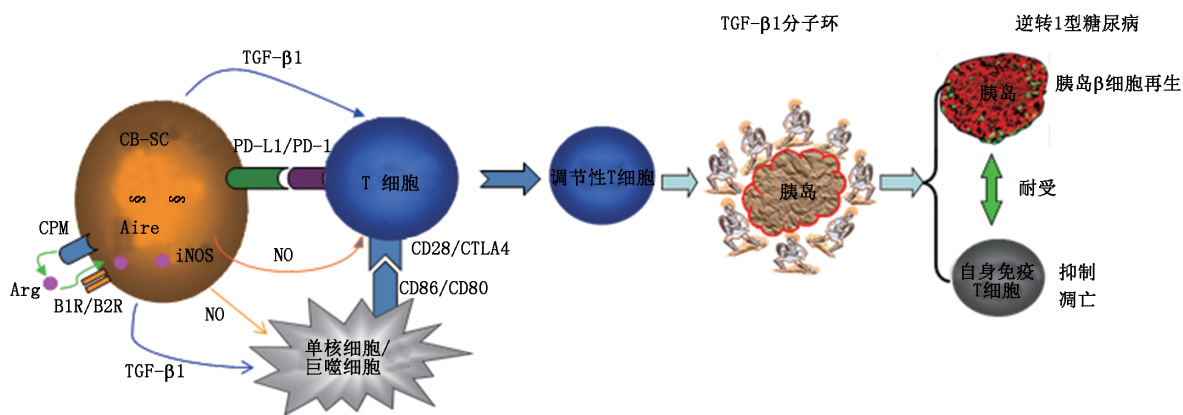
CB-SC 可能通过多种分子和细胞学机制修复患者的免疫紊乱。当分选后患者的免疫细胞经过教育器时,CB-SC 可通过 PD-L1 和释放的可溶性分子[一氧化氮(NO)和 TGF-β1],形成三维调节的微环境,直接作用于 T 细胞^[5]、Treg^[8]、病理性 T 细胞克隆^[2]、单核细胞^[10]等(图 2),产生整体的多方位的综合调节,诱导内环境的稳定,恢复免疫平衡。

1. CB-SC 表达自身免疫调节因子:Aire 通常在胸腺髓质上皮细胞中表达,调节 T 细胞的分化和发育。Aire 通过调控自身抗原的表达而删除自身反应性 T 细胞,诱导免疫耐受^[13-14]。如果 Aire 基因突变或缺失,可导致多器官和系统的自身免疫性疾病。

我们发现 CB-SC 表达 Aire 基因和蛋白。为明确 Aire 在 CB-SC 的免疫调节过程中的作用,我们采用三对人 Aire 特异的小分子干扰 siRNAs,以阻断 CB-SC 中 Aire 的蛋白表达。阻断实验证明:Aire 蛋白表达显著下降 70%,进而导致了有助于 CB-SC 免疫调节的 PD-L1 的表达水平也显著降低^[6,15];另外,细胞共培养中 Treg 亚群比例也显著降低。

2. CB-SC 纠正 Treg 的功能缺陷:Treg 通过抑制和调节效应 T 细胞,维持动态免疫平衡和诱导自身耐受。糖尿病患者和动物模型研究证据显示:Treg 细胞存在数量和功能异常,均与 1 型糖尿病的发生和发展密切相关。纠正 Treg 细胞的异常,已成为预防和治疗 1 型糖尿病新的靶点。我们在 NOD 鼠糖尿病模型中观察到 CB-SC 可纠正 CD4⁺ CD62L⁺ Treg 细胞的功能缺陷,进而预防糖尿病发生,并且可逆转已发生的糖尿病^[8,11]。分子机制研究表明:采用 CB-SC 处理的 CD4⁺ CD62L⁺ Treg 细胞(mCD4CD62L Treg)治疗后的糖尿病小鼠,能够恢复血液中 Th1/Th2/Th3 细胞因子的平衡,拮抗胰岛局部的炎症;特别是在胰岛周围,通过 TGF-β1 的独特分布格局,形成保护性 TGF-β1 分子环,导致浸润的淋巴细胞和其他免疫细胞的凋亡,对抗免疫细胞的再攻击,保护新生的胰岛 β 细胞^[8]。采用 CB-SC 免疫教育技术治疗糖尿病的临床试验中,也观察到类似结果。治疗后,患者外周血中 Treg 显著增多,且血液中 Th1/Th2/Th3 细胞因子恢复平衡,特别是 TGF-β1 水平显著升高^[6]。因此,CB-SC 通过 Treg-TGFβ1 的调节,发挥了重要的治疗作用。

3. CB-SC 直接抑制胰岛 β 细胞特异性 T 细胞克隆增殖:在 1 型糖尿病的发生发展过程中,针对胰岛



注:Aire:自身免疫调节因子;CPM:羧肽酶 M;Arg:精氨酸;B1R:激肽 B1 受体;B2R:激肽 B2 受体;iNOS:诱导型一氧化氮合酶;PD-L1:程序性死亡配体 1;PD-1:程序性死亡因子;TGF-β1:转化生长因子 β1;NO:一氧化氮

图 2 脐血多能干细胞(CB-SC)免疫调节的分子机制示意图

β 细胞的不同抗原形成了不同的 T 细胞克隆,因此 1 型糖尿病具有多克隆的特点,这也是其自身免疫难以攻克的关键原因。这些胰岛 β 细胞特异性 T 细胞克隆可存在于患者外周血中,通过细胞克隆筛选方法,可被分离出来进行体外研究。我们观察到, CB-SC 对 1 型糖尿病患者胰岛 β 细胞谷氨酸脱羧酶 (GAD) 特异性 T 细胞克隆具有直接抑制作用。与对照组比, CB-SC 能够显著抑制由不同比例抗原提呈细胞刺激的 GAD 特异性 T 细胞克隆的增殖^[2]。这为临床应用 CB-SC 治疗 1 型糖尿病提供了重要的理论依据。

四、结语

胰岛移植和单纯的干细胞移植,若不首先解决自身免疫,其疗效是有限的。CB-SC 不仅具有胚胎干细胞的特征和多向分化的潜能,而且具有免疫调节的功能。我们利用其特性,创建了干细胞免疫教育治疗技术。三年多来,经过国际多中心初步临床试验观察,证明该技术的安全性;而临床治疗 1 型糖尿病可同时纠正自身免疫并可能刺激胰岛 β 细胞再生。CB-SC 能够成功调节免疫,也为治疗其他自身免疫疾病和炎症相关疾病开辟了新的治疗途径。作为一项新的技术,其临床疗效和分子治疗机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Couzin-Frankel J. Trying to reset the clock on type 1 diabetes[J]. Science, 2011, 333: 819-821.
 [2] Zhao Y, Mazzone T. Human cord blood stem cells and the journey to a cure for type 1 diabetes[J]. Autoimmun Rev, 2010, 10: 103-107.

[3] Zhao Y. Stem cell educator therapy and induction of immune balance[J]. Curr Diab Rep, 2012, 12: 517-523.
 [4] Zhao Y, Wang H, Mazzone T. Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics[J]. Exp Cell Res, 2006, 312: 2454-2464.
 [5] Zhao Y, Huang Z, Qi M, et al. Immune regulation of T lymphocyte by a newly characterized human umbilical cord blood stem cell[J]. Immunol Lett, 2007, 108: 78-87.
 [6] Zhao Y, Jiang Z, Zhao T, et al. Reversal of type 1 diabetes via islet beta cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells[J]. BMC Med, 2012, 10: 3.
 [7] Li X, Li H, Bi J, et al. Human cord blood-derived multipotent stem cells (CB-SCs) treated with all-trans-retinoic acid (ATRA) give rise to dopamine neurons [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 419: 110-116.
 [8] Zhao Y, Lin B, Darflinger R, et al. Human cord blood stem cell-modulated regulatory T lymphocytes reverse the autoimmune-caused type 1 diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice[J]. PLoS ONE, 2009, 4: e4226.
 [9] Lehen A, Diana J, Zaccane P, et al. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10: 501-513.
 [10] Zhao Y, Jiang Z, Zhao T, et al. Targeting insulin resistance in type 2 diabetes via immune modulation of cord blood-derived multipotent stem cells (CB-SCs) in stem cell educator therapy: phase I/II clinical trial[J]. BMC Med, 2013, 11: 160.
 [11] Zhao Y, Lin B, Dingeldein M, et al. New type of human blood stem cell; a double-edged sword for the treatment of type 1 diabetes[J]. Transl Res, 2010, 155: 211-216.
 [12] Zhao Y, Huang Z, Lazzarini P, et al. A unique human blood-derived cell population displays high potential for producing insulin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 360: 205-211.
 [13] Mathis D, Benoist C. Aire[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 287-312.
 [14] Metzger TC, Anderson MS. Control of central and peripheral tolerance by Aire[J]. Immunol Rev, 2011, 241: 89-103.
 [15] Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, et al. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal[J]. Nat Immunol, 2009, 10: 1185-1192.

(收稿日期:2013-12-30)

(本文编辑:霍永丰)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊 2013 年特邀审稿人名单

除本刊编委外,2013 年对稿件审核把关工作做出比较突出贡献的专家有(按姓名拼音排序):曹筱佩、曾勇(心内科)、丛丽、邓华聪、董方田(眼科)、高洪伟、高政南、管阳太(神经科)、郭志新、韩学尧、何权瀛(呼吸科)、侯为开、胡云、李连喜、梁华、刘靖(心内科)、刘彦君、刘煜、鲁红云、马晓伟、任伟、舒晓春、孙晓东(眼科)、王从容、王存川(普外科)、王广、王鹏华、王晓明、王颜刚、乌正赉(统计)、吴红花、武晓泓、肖和平(结核科)、许迅(眼科)、严孙杰、杨慧霞(妇产科)、杨兆军、殷峻、于森、袁俊杰(肾内科)、张广宇(结核科)、张丽娟、张森、张茜、张涛(儿科)、张文健、郑成竹(普外科)、周嘉强、周健、周亚茹。

在此特致衷心感谢!

本刊编辑部