

· 论著 ·

高糖在联合转录因子诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为胰岛样细胞中的作用

闫淑芳 杜少斐 吴敬 刘宏霞 袁慧娟

【摘要】 目的 探讨高糖在胰-十二指肠同源盒因子-1(Pdx-1)、神经元素 3(Ngn 3)诱导大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)分化为胰岛样细胞(IPC)中的作用。**方法** 构建真核表达载体 pcDNA3.1(+)/(zeo)-Ngn 3、pcDNA3.1(+)-Pdx-1,贴壁培养法分离 Sprague-Dawley 雄性大鼠 BMSC,流式细胞术鉴定 BMSC,脂质体介导转染 BMSC,并筛选稳定转染细胞培养于高糖(4.5 g/L)DMEM 培养液,RT-PCR检测Ngn 3、巢蛋白、Pdx-1 mRNA的表达,ELISA法检测胰岛素浓度。**结果** 分离的细胞表面高表达CD44、CD105,而低表达 CD34,符合 BMSC 特征。诱导过程中 BMSC 形态上趋向 IPC 分化,高糖培养组较低糖培养组细胞上清胰岛素浓度明显提高($F=25.77, P<0.05$),高糖质粒培养组Pdx-1、Ngn 3及巢蛋白mRNA表达水平明显高于高糖培养组及质粒转染组($F=35.12、12.76、8.34, P$ 均 <0.05)。**结论** 高糖对Pdx-1联合 Ngn 3 诱导BMSC向 IPC 分化具有促进作用。

【关键词】 神经元素 3;胰-十二指肠同源盒因子-1;高糖;骨髓间充质干细胞;胰岛样细胞

基金项目:国家自然科学基金资助项目(U1204805)

Effects of high glucose on the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into insulin-producing cells induced by transcriptional factors Yan Shufang*, Du Shaofei, Wu Jing, Liu Hongxia, Yuan Huijuan. * Department of Endocrinology, Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, China Corresponding author: Yuan Huijuan, Email: lmls3712@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of high glucose on the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) into insulin-producing cells(IPC) induced by pancreatic duodenal homeobox-1(Pdx-1) and neurogenin 3(Ngn 3). **Methods** Eukaryotic expression vector of pcDNA3.1(+)/(zeo)-Ngn 3 and pcDNA3.1(+)-Pdx-1 were constructed. BMSC was separated and purified by attachment culture method *in vitro*. Pdx-1 and Ngn 3 were transfected to BMSC via Liposome. The stably transfected cells were cultured in medium containing high glucose(4.5 g/L). The mRNA expression of Pdx-1, Ngn 3, Nestin were detected by RT-PCR. The secretion of insulin were measured by ELISA. **Results** The cell surface expressed high level of CD44 and CD105, but low level of CD34, which consistent with the characteristics of BMSC. Morphologically, BMSC had the trend to differentiate into islet cell during the induction process, and the level of insulin was higher in cells cultured in high glucose than in low glucose ($F=25.77, P<0.05$). The mRNA expression level of Pdx-1, Ngn 3, Nestin were increased in high glucose combined with liposome group than in high glucose group and liposome group ($F=35.12, 12.76, 8.34, all P<0.05$). **Conclusion** High glucose improves the differentiation of BMSC into IPC induced by Pdx-1 and Ngn 3.

【Key words】 Neurogenin 3; Pancreatic duodenal homeobox-1; High glucose; Bone marrow mesenchymal stem cell; Insulin-producing cell

Fund program: National Natural Science Foundation of China(U1204805)

骨髓间充质干细胞(BMSC)因具有自我更新能力、多向分化潜能,且生长分化易受环境中营养物质的调节等特性而成为种子细胞的首选^[1]。体外对 BMSC 重新编程,使非 β 细胞诱导分化为胰岛样细胞(IPC)移植到糖尿病患者体内,是目前研究糖尿病治疗方法的热点^[2]。

转录因子在调控胰腺内分泌细胞发育、 β 细胞分化及功能完善等方面发挥重要作用。胰-十二指肠同源盒因子-1(Pdx-1)是胰腺发育过程中第一个重要转录因子,其主要作用是维持胰腺前体细胞发育^[3]。前期实验证实,Pdx-1 可诱导 BMSC 分化为 IPC 并分泌胰岛素,但体外诱导分化率较低。神经元素 3(Ngn 3)是胰岛内分泌细胞发育的另一关键转录因子,其编码的蛋白质可调控一系列转录因子,通过复杂的网络系统调节胰腺发育,对内分泌祖细胞的发育至关重要^[4]。有研究显示,Pdx-1 开启包括 Ngn 3 在内的下游转录因子表达,且两者联合可诱导出永久编码的 IPC^[5]。因此本研究拟通过构建 pcDNA3.1(+)/(zeo)-Ngn 3、pcDNA3.1(+)-Pdx-1 真核质粒载体,利用脂质体共同转染 BMSC。研究表明,诱导环境对 BMSC 的分化方向至关重要,高糖可定向促进干细胞转分化为 IPC^[2]。本研究进一步采用稳定转染细胞培养于高糖培养液的诱导方法,初步探讨高糖在 Pdx-1-Ngn 3 联合诱导 BMSC 分化为 IPC 中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物:清洁级 Sprague-Dawley (SD)雄性大鼠 20 只,4 周龄,由河南省实验动物中心提供,动物合格证:SCXK(豫)2010-0002。载体:pcDNA3.1/Zeo(+)购自 Invitrogen 公司,前期实验已构建质粒 pcDNA3.1(+)-Pdx-1、pEGFP-C1-Pdx-1,测序无误,菌液保存于 -80°C 超低温冰箱^[6-7]。胰岛瘤细胞株购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体构建 设计 Ngn 3 引物序列:上游引物 5'AGAAGCGACAAACGACTCAC 3',酶切位点 Hind III;下游引物 5'CGAAGCGGGTGTGATGTAG 3',酶切位点 BamH I。Trizol 法提取胰岛瘤细胞总 RNA,合成 cDNA 第一链,并进行 PCR 扩增,利用胶回收试剂盒回收目的基因片段;对载体 pcDNA3.1(+)/(zeo)进行 Hind III、BamH I 双酶切,用 T4DNA 连接酶将 Ngn 3 基因与 pcDNA3.1(+)/(zeo)载体连接,连接产物转入 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,在含卡那霉素 30 mg/L 的 LB 固体培养基中过夜培养,挑取生长良好的单菌落,部分进行菌落 PCR 验证有质粒 DNA,其余菌落接种于 4 ml 含卡那霉素的液体 LB 培养基中,振荡培养,使用无内毒素质粒小提试剂盒提取质粒 DNA,送基因测序证实无碱基突变,再进行大剂量摇菌,无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒,产物用于后续实验。已构建的真核质粒 pcDNA3.1(+)-Ngn 3 经基因测序,证实无碱基突变,可用于后续实验。

1.2.2 BMSC 的分离培养 随机选取 2 只 SD 大鼠,颈椎脱臼法处死,75% 酒精浸泡 15 min,剥离双后肢,置于 PBS 缓冲液中,转移至超净工作台,分别使用无菌 PBS 和 LG-DMEM 培养基(100 U/ml 青霉素,100 U/ml 链霉素)冲洗 2 次,剪断长骨两端,用注射器(2 ml)吸取 LG-DMEM 培养基 2 ml,冲洗骨髓腔,用吸管将细胞悬液混匀,1 000 r/min ($r=9.6\text{ cm}$),离心 5 min,7 ml LG-DMEM 培养基重悬沉淀置于 10 cm 培养皿,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱中进行培养,倒置显微镜观察细胞生长情况。48 h 后首次半量换液,此后每隔 2~3 d 全量换液 1 次。

1.2.3 CCK8 检测细胞生长趋势 第 2 代 BMSC 制成单细胞悬液,调整细胞终密度为 $2 \times 10^3/\text{ml}$,接种于 96 孔板,每孔接种 100 μl 单细胞悬液,另设不加细胞只加培养液的空白对照孔,各设 3 个复孔。每 24 h 后取 3 孔加入 10 μl CCK-8,孵育 7 h,之后在酶标仪上选择 450 nm 波长,以空白孔调零,检测各孔吸光度(OD)值,连续监测 8 d,每隔 3 d,细胞正常换液。以时间为横坐标,OD 均值为纵坐标,记录并绘制 BMSC 生长曲线。

1.2.4 BMSC 表面抗原鉴定 第 3 代 BMSC 制成单细胞悬液 0.5 ml 并计数,细胞数目不少于 6×10^6 个,按比例(1:100)稀释兔抗大鼠抗体 CD44、CD34 和 CD105,加入单细胞悬液孵育 2 h,用流式细胞仪检测 BMSC 表面抗原 CD44、CD34 和 CD105 的表达情况。

1.2.5 质粒 DNA 经脂质体转染 BMSC 取第 3 代对数生长期的 BMSC 接种在 6 孔及 24 孔板内,转染前用无抗生素培养基培养细胞 24 h,细胞在转染前融合度至少 80%,转染开始前将培养板中的培养基换成无抗生素、无血清的 LG-DMEM 培养基,经过预实验摸索,质粒 DNA:HP DNA 转染试剂最佳比例为 1:1。6 孔板细胞转染 pcDNA3.1(+)-Ngn 3,每孔

质粒 DNA 3 μg , 转染试剂 3 μl , 将质粒 DNA 和无抗生素、无血清的 LG-DMEM 培养基混匀, 静置 5 min, 加入相应比例转染试剂混匀, 静置 20 min, 后将混合稀释液加入培养板, 观察转染情况, 2~3 d 后可更换培养基。实验分组: pcDNA3.1(+)/(zeo)-Ngn 3、pcDNA3.1(+)-Pdx-1 按 1:1 比例联合转染 BMSC。以 pEGFP-C1 (空质粒荧光病毒) 转染的细胞作为对照, 观察转染效率。

1.2.6 筛选、培养稳定转染 BMSC 将处于第 3 代的 BMSC 按 $2 \times 10^4/\text{ml}$ 细胞密度接种于 24 孔细胞培养板中, 贴壁后换含有潮霉素的培养基培养, 各孔浓度分别为 0、25、50、100...200 mg/L, 2~3 d 换液, 观察 2 周细胞死亡情况, 同样方法设置博来霉素浓度为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、1.00 g/L, 设置 G418 的浓度为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g/L, 2 周内使细胞全部死亡的最小浓度为最小致死量。pcDNA3.1(+)/(zeo)-Ngn 3、pcDNA3.1(+)-Pdx-1 联合转染 BMSC 3 d 后, 将细胞培养基更换为含最小致死量 G418、博来霉素的低糖 (1.0 g/L) DMEM 培养液, 隔天换液, 1 周后药物浓度减半, 继续筛选 1 周, 随后更换为正常高糖 (4.5 g/L) DMEM 培养液培养。

1.2.7 Western 印迹检测转染株 加裂解液于稳定转染细胞, 提取细胞总蛋白, 于 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转膜, 5% 牛奶-TBST 封闭 1 h, 然后用 1:100 稀释的抗 Pdx-1、Ngn 3 多克隆抗体 4℃ 孵育过夜, 取出 PVDF 膜, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。1:10 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h, 化学荧光法显色。分别检测各组样品中 Pdx-1、Ngn 3 的表达。

1.2.8 稳定转染细胞胰岛素分泌检测 稳定转染细胞融合 90% 时, ELISA 法检测细胞上清胰岛素浓度, 设低糖培养组 (培养于含 1.0 g/L 葡萄糖的 DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清)、高糖培养组 (培养于含 4.5 g/L 葡萄糖的 DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清)、质粒转染组 (培养于含 1.0 g/L 葡萄糖的 DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清)、高糖质粒转染组, 按 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.2.9 RT-PCR 分析 设低糖培养组、高糖培养组、质粒转染组和高糖质粒转染组, 稳定转染细胞融合 90% 时, 收集细胞, Trizol 法提取总 RNA, 用反转录试剂盒反转录为 cDNA。用 RT-PCR 试剂盒检测 Ngn 3、Pdx-1、巢蛋白及 GAPDH mRNA 的表达, 引物

序列见表 1。按实时 PCR 试剂盒说明, 配制反应体系, 使用 ABI7300 进行基因扩增, 每次 PCR 反应至少重复 3 次。

表 1 Ngn 3、Pdx-1、巢蛋白及 GAPDH 的引物序列

基因名称	引物序列	产物大小
GAPDH	上游引物 5'-GGAAAGCTGTGGCGTGAT-3'	293 bp
	下游引物 5'-AAGGTGGAAGAATGGGAGTT-3'	
Pdx-1	上游引物 5'-TCACCTCCACCACCACCTT-3'	310 bp
	下游引物 5'-GTTCCGCTGTGTAAGCACCT-3'	
Ngn 3	上游引物 5'-AGAAGCGACAAACGACTCAC-3'	645 bp
	下游引物 5'-CGAAGCGGGTGTGATGTAG-3'	
巢蛋白	上游引物 5'-GAGATGCCTTTGACATTGCT-3'	549 bp
	下游引物 5'-GTCCCTGTAATAGGACTTCTTGAT-3'	

注: Pdx-1: 胰-十二指肠同源盒因子-1; Ngn 3: 神经元素 3

1.2.10 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。正态分布计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用析因方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 载体构建过程中的相关鉴定

2.1.1 胰岛瘤细胞总 RNA 鉴定 Trizol 法提取胰岛瘤细胞总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA, 28 s、18 s 条带清晰, 5 s 条带亮度稍弱, 提取的 RNA 纯度符合要求, 完整性好, 无降解 (图 1-1)。

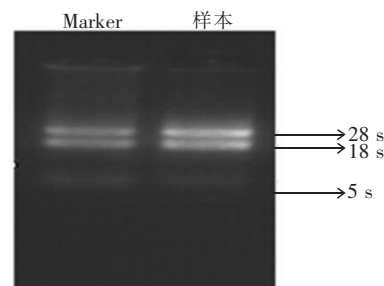


图 1-1 胰岛瘤细胞总 RNA 电泳图

2.1.2 pcDNA3.1(+)/(zeo)-Ngn 3 载体的鉴定

对经鉴定 pcDNA3.1(+)/(zeo)-Ngn 3 阳性克隆的质粒菌液进行双向测序, Chromas 软件显示测序结果含有的目的序列与基因库中的序列相一致, 测序结果见图 1-2 (封 3)。

2.2 BMSC 形态 骨髓冲洗液在培养 24 h 内可见细胞开始贴壁, 3 d 后贴壁细胞增多, 体积小, 呈不规则圆形, 中间透亮。7 d 后可见细胞全部贴壁, 呈不规则梭形, 聚集成团块状。8~10 d 细胞融合达 90%, 细胞呈长条状梭形, 多个核仁, 可以传代。传代后细胞贴壁时间缩短, 形态类似原代细胞, 生长周期缩短, 6~8 d 即可传代, 细胞旋涡状生长, 呈纤维状 (图 2, 封 3)。

2.3 BMSC 的生长曲线 在相同培养条件下, 原代 BMSC 的生长周期为 10 d 左右, 传代后生长周期缩短, 6~8 d 一代, 传代后细胞经过 1~2 d 的潜伏期, 3~5 d 进入对数生长期, 6~8 d 达到平台期。传代后生长增殖、能力稳定(图 3)。

2.4 流式细胞仪检测 BMSC 表面抗原 BMSC 表面抗原 CD44、CD105 呈高表达(>90%), CD34 呈低表达(<5%), 符合 BMSC 的表面抗原表达特性(图 4, 封 3)。

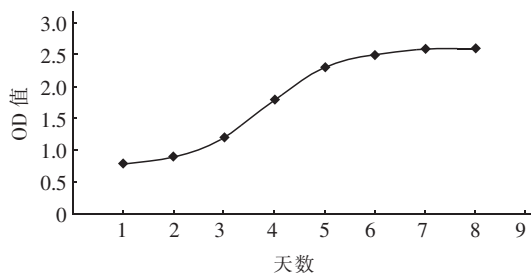
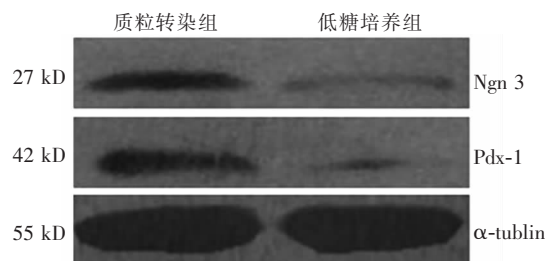


图 3 骨髓间充质干细胞的生长曲线

2.5 抗生素对大鼠 BMSC 最小致死量的测定结果 经筛选发现 G418 最小致死量为 0.4 g/L、博来霉素为 0.06 g/L、潮霉素为 50 mg/L(图 5, 封 4)。

2.6 Western 印迹鉴定转染株 稳定转染细胞裂解后取上清进行 Western 印迹分析, 可见质粒转染组和低糖培养组细胞均有内源性 α -tubulin 表达, 约 55 kD。质粒转染组在 42 kD 处可见一蛋白条带, 与 Pdx-1 分子大小相符, 另外 27 kD 处可见一蛋白条带, 与 Ngn 3 分子大小相符, 低糖培养组此处未见相应蛋白表达(图 6)。



注: Ngn 3: 神经元素 3; Pdx-1: 胰-十二指肠同源盒因子-1; BMSC: 骨髓间充质干细胞

图 6 稳定转染 BMSC Pdx-1、Ngn 3 的蛋白表达

2.7 胰岛素浓度分析 ELISA 法检测不同组别细胞胰岛素分泌情况, 高糖质粒转染组胰岛素分泌量明显多于高糖培养组或者质粒转染组, 为了排除同时期各组细胞数量的差异引起的胰岛素分泌差异, 提取各组细胞总蛋白进行校正。

结果如下: 低糖培养组、高糖培养组、质粒转染组、高糖联合质粒转染组各组胰岛素分泌水平分别为 (0.001 ± 0.00) 、 (1.76 ± 0.01) 、 (3.66 ± 0.33) 、 (5.86 ± 0.60) mIU/L, $F = 8.76$, $P < 0.05$ 。

析因分析结果: 高糖和质粒转染不存在交互效应($F = 6.82$, $P > 0.05$), 高糖及质粒转染诱导条件对 BMSC 分泌胰岛素水平有影响($F = 25.77$ 、 72.21 , P 均 < 0.05)。

2.8 细胞形态 低糖培养组诱导后细胞形态未见明显变化, 质粒转染组和高糖质粒转染组诱导后细胞明显聚集, 双硫腍染色为猩红色(图 7, 封 4)。

2.9 相关基因表达分析 实时荧光定量 PCR 对 Pdx-1、Ngn 3、巢蛋白 mRNA 表达量变化进行分析, Test/A1 代表某个基因在实验组与对照组表达量的比值。Pdx-1、Ngn 3、巢蛋白的表达量在高糖培养组、质粒转染组均增加, 但高糖质粒转染组增加更多(表 2)。

析因分析结果: 在胰岛素相关因子的表达中, 高糖和质粒转染两个因素间不存在交互作用; 高糖诱导条件对 Pdx-1、Ngn 3 mRNA 的表达水平有影响, 对巢蛋白 mRNA 的表达没有影响; 质粒转染诱导条件对 Pdx-1、Ngn 3、巢蛋白 mRNA 的表达水平有影响。

3 讨论

诱导非 β 细胞为 IPC 治疗糖尿病是目前的研究热点。其方法主要有胰腺转录因子诱导和促发育因子诱导, 两种方法单独作用均可使 BMSC 分化为 IPC, 但均存在诱导效率低下的瓶颈^[8]。为了提高诱导效率, 获得分化及功能更为完善的 IPC, 本实验采用脂质体介导 Pdx-1、Ngn 3 转染 BMSC, 稳定转染细胞培养于高糖培养液的诱导方案。

表 2 不同处理组 Pdx-1、Ngn 3 和巢蛋白 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	Pdx-1	Ngn 3	巢蛋白
低糖培养组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
高糖培养组	3.51 ± 0.88^a	126.99 ± 35.73^a	126.38 ± 16.20^a
质粒转染组	9.09 ± 1.10^{ab}	425.24 ± 130.30^{ab}	339.05 ± 44.27^{ab}
高糖联合质粒转染组	9.75 ± 3.56^{ab}	472.46 ± 173.45^{ab}	581.63 ± 70.48^{abc}
F 值	7.38	121.76	34.52
P 值	0.00	0.00	0.01

注: 与低糖培养组相比, ^a $P < 0.05$; 与高糖培养组相比, ^b $P < 0.05$; 与质粒转染组相比, ^c $P < 0.05$; Pdx-1: 胰-十二指肠同源盒因子-1; Ngn 3: 神经元素 3

提取的胰岛瘤细胞总 RNA 纯净, pcDNA3.1 (+)/(zeo)-Ngn 3 载体构建符合序列, 证明 Ngn 3 基因载体构建成功。分离培养的细胞表面高表达 CD44、CD105, 低表达 CD34, 符合 BMSC 的表面抗原表达特性。BMSC 生长曲线表明细胞增殖能力强, 可作为种子细胞进行后续的实验。

ELISA 结果显示, 高糖培养组较低糖培养组细胞上清胰岛素浓度明显提高, 证实高糖在 BMSC 分化为 IPC 的过程中具有定向分化作用, 其机制可能是高糖激活了 BMSC 向 IPC 分化的某些通路, 并抑制、干扰其向其他细胞的分化^[6-7,9]。质粒转染组细胞上清胰岛素分泌水平明显高于低糖培养组和高糖培养组, 说明 Pdx-1-Ngn 3 诱导可促进 BMSC 分化为 IPC, 且其作用明显优于高糖诱导。Pdx-1 和 Ngn 3 是胰腺分化发育早期的必需因子, 外源性的导入, 启动 BMSC 向 IPC 分化^[10]。高糖质粒培养组细胞上清胰岛素浓度高于高糖培养组及质粒转染组, 提示高糖培养与 Pdx-1-Ngn 3 在诱导 BMSC 分化为 IPC 的过程中存在协同效应。

RT-PCR 结果显示各组 Pdx-1、Ngn 3 和巢蛋白 mRNA 的表达均上调, 且高糖质粒培养组上述基因的表达水平明显高于高糖培养组及质粒转染组。巢蛋白的表达是胰腺及神经细胞发育起始的标志, 它的出现证实诱导细胞已启动发育^[11]。Pdx-1 是胰腺分化发育过程中第一个最重要的转录因子, 在胚胎发育早期、外分泌细胞表达, Ngn 3 是继 Pdx-1 之后另外一个主要调节胰腺内分泌细胞分化过程的因子, 且有研究显示 Pdx-1 开启包括 Ngn 3 在内的下游转录因子, 共同参与胰岛素合成基因水平的调节^[12]。各组中 Pdx-1 和 Ngn 3 的表达证实, BMSC 已处于向胰腺内分泌细胞分化的阶段。进一步证实, Pdx-1-Ngn 3 质粒转染与高糖培养在诱导 BMSC 分化为 IPC 的过程中存在协同效应。

本研究证实高糖环境对 Pdx-1-Ngn 3 联合诱导 BMSC 分化为 IPC 的过程具有促进作用, 但诱导的 IPC 在胰岛素相关基因表达并不完善, 如随着细胞的分化及成熟, 巢蛋白的表达会明显减少, 甚至消失, 但该研究中各组未见巢蛋白减少或消失。有研究显示, Pdx-1、Ngn 3、肌腱膜纤维肉瘤癌基因同系物 A (MafA) 和利拉鲁肽均可单独诱导 BMSC 分化为 IPC, 因此, 后续研究可以尝试 Pdx-1、Ngn 3 和 MafA 联合诱导后, 加入利拉鲁肽进一步诱导分化, 以期获得

分化及功能更为完善的 IPC; 也可进一步补充动物实验, 证实体外诱导分化的细胞在体内的生物活性。总之, 此研究提供了诱导 BMSC 分化为 IPC 的新方案。

参 考 文 献

- [1] Kaneto H, Matsuoka TA, Katakami N, et al. Combination of MafA, PDX-1 and NeuroD is a useful tool to efficiently induce insulin-producing surrogate beta-cells [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(24):3144-3151.
- [2] Kim SY, Lee S, Hong SW, et al. Nestin action during insulin-secreting cell differentiation [J]. *J Histochem Cytochem*, 2010, 58(6):567-576. DOI: 10.1369/jhc.2010.955682.
- [3] Melloul D. Transcription factors in islet development and physiology: role of PDX-1 in beta-cell function [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1014:28-37.
- [4] Rukstalis JM, Habener JF. Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration [J]. *Islets*, 2009, 1(3):177-184. DOI: 10.4161/isl.1.3.9877.
- [5] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells [J]. *Nature*, 2008, 455(7213):627-632. DOI: 10.1038/nature07314.
- [6] Yuan H, Li J, Xin N, et al. Expression of Pdx1 mediates differentiation from mesenchymal stem cells into insulin-producing cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(8):4023-4031. DOI: 10.1007/s11033-010-0061-y.
- [7] Yuan H, Liu H, Tian R, et al. Regulation of mesenchymal stem cell differentiation and insulin secretion by differential expression of Pdx-1 [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(7):7777-7783. DOI: 10.1007/s11033-012-1619-7.
- [8] 陈频, 张芳芳, 王惠玲, 等. 利拉鲁肽在人骨髓间充质干细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞中的作用 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28(5):414-418. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2012.05.014.
- [9] Komatsu M, Takei M, Ishii H, et al. Glucose-stimulated insulin secretion: a newer perspective [J]. *J Diabetes Investig*, 2013, 4(6):511-516. DOI: 10.1111/jdi.12094.
- [10] Limbert C, P  th G, Ebert R, et al. Pdx-1 and NGN3-mediated *in vitro* reprogramming of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into pancreatic endocrine lineages [J]. *Cytotherapy*, 2011, 13(7):802-813. DOI: 10.3109/14653249.2011.571248.
- [11] Burlison JS, Long Q, Fujitani Y, et al. Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells [J]. *Dev Biol*, 2008, 316(1):74-86. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.01.011.
- [12] Guo QS, Zhu MY, Wang L, et al. Combined transfection of the three transcriptional factors, PDX-1, NeuroD1, and MafA, causes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into insulin-producing cells [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012:672013. DOI: 10.1155/2012/672013.

(收稿日期: 2016-05-05)