

诱导胰腺干细胞再生胰岛治疗糖尿病的研究*

效梅^{1**} 安立龙¹ 窦忠英²

1. 广东海洋大学农学院动物医学系, 湛江 524088; 2. 西北农林科技大学 陕西省干细胞生物工程技术有限公司, 杨凌 712100

摘要 近年来, 随着免疫抑制剂的改进及细胞移植技术的不断成熟, 胰岛细胞移植已成为治愈 I 型和部分 II 型糖尿病的有效治疗方法, 而胰岛供体短缺的矛盾亦更为突出。胰腺干细胞是一类存在于胎儿或成年胰腺组织中的成体干细胞。体外分离、克隆胰腺干细胞, 并定向诱导其分化为功能性胰岛移植治疗糖尿病, 是解决胰岛供体短缺的有效途径。目前, 该研究已成为组织细胞工程研究的又一热点。文中综述了这一领域研究的最新进展。

关键词 胰腺干细胞 诱导分化 胰岛移植 糖尿病

糖尿病是危害人类健康的重大疾病之一, 而传统的药物及胰岛素替代疗法却不能从根本上医治该病。近年来, 随着免疫抑制剂的改进及细胞移植技术的不断成熟, 移植胰岛细胞已成为治愈 I 型和部分 II 型糖尿病的有效途径^[1-4]。但是, 由于 1 个临床胰岛移植受体通常需要 2—4 个新鲜供体胰腺, 胰岛供体短缺的矛盾亦更为突出, 制约了移植胰岛细胞治疗糖尿病技术的应用。

胰腺干细胞是存在于胰腺组织, 能自我更新, 具有多分化潜能的发育早期细胞, 其分化特点是在特定的条件下, 首先分化为胰腺终末细胞。体外分离、克隆人类胰腺干细胞, 并定向诱导其分化为功能性胰岛移植治疗糖尿病, 是解决胰岛供体短缺的有效途径。2000 年, Peck 等成功定向诱导非肥胖性糖尿病(NOD)小鼠胰导管干细胞分化为功能性胰岛, 将诱导胰岛细胞团移植在 NOD 成年小鼠肾囊区, 可降低 NOD 小鼠血糖, 抗糖尿病^[5-7]。同年, Bonner-Weir 等体外诱导培养成人胰导管细胞分化为能分泌胰岛素的功能性胰岛^[8]。2004 年, 我们分离获得一例人胎儿胰腺干细胞, 传 50 代, 体外定向诱导分化为胰岛细胞, 将其诱导胰岛移植给链脲

菌素(STZ)诱发的糖尿病小鼠, 能降低血糖^[9]。目前, 在世界范围内, 分离克隆胰腺干细胞并将其定向诱导分化为功能性胰岛移植治疗糖尿病的研究已成为细胞组织工程研究的一大热点^[10-20]。

1 胰腺和胰岛移植治疗糖尿病的历史与现状

1.1 胰腺器官移植

1967 年, Kelly 等成功地将同源异体胰腺器官移植给糖尿病患者。至 2001 年, 全世界约有 15000 例糖尿病患者进行了胰腺器官移植^[21]。移植后, 糖尿病患者恢复了血糖调控能力, 存活时间延长, 慢性糖尿病并发症得到缓解^[22,23], 移植 3 年存活率达到 70%—80%, 与其他器官移植成活率基本相似^[24]。但是, 由于剖腹手术和长期使用免疫抑制剂对患者造成的损伤较大, 该方法主要用于需要联合移植肾脏或其他脏器的 I 型糖尿病患者。又因为缺乏完全合适的供体, 胰腺器官移植的临床应用受到限制。

1.2 胰岛移植

除胰腺器官移植外, 还可采用胰岛移植疗法,

2006-08-02 收稿, 2006-09-18 收修改稿

* 国家重点基础研究发展计划(批准号: G1999054301), 国家“八六三”计划(批准号: 2002AA216161), 国家自然科学基金(批准号: 39970363), 教育部重点专项, 广东省自然科学基金(批准号: 04011471)和广东省教育厅科学基金资助项目

** E-mail: xiaomei0812@yahoo.com.cn

即从新鲜胰腺组织分离获得胰岛移植治疗糖尿病。移植胰岛经门静脉，滞留在肝脏的远侧门脉丛间，经再生血管和神经后，长期甚至可终生发挥调节血糖的功能。与胰腺器官移植相比，胰岛移植无需麻醉和剖腹，减小了对移植受体的损伤，降低了风险性。胰岛移植又分为自体胰岛移植和异体胰岛移植。

有关自体胰岛移植的研究可追溯到100多年前由Williams首次进行的移植山羊胰腺碎块和提取物治疗人类糖尿病。但是，由于免疫排斥，该移植失败。1972年，Ballinger和Lacy成功地将400—600个同源异体正常大鼠胰岛移植给链脲菌素制备的糖尿病大鼠，发挥抗糖尿病作用。1980年，Sutherland和Najarian报道首例人自体胰岛移植获得成功^[25,26]。他们将1例慢性胰腺炎患者胰腺切除后，切碎，胶原酶消化，离心，获得未纯化胰岛，并在胰腺切除2h内，将这些未纯化胰岛经门静脉循环注入患者肝脏。1992年，Pyzdrowski等报道移植 2.65×10^5 个胰岛，移植受体可完全实现胰岛素自给，不再依赖外源性胰岛素^[27]。1995年，Wahoff等报道14例患者胰腺切除后，自体移植 3.0×10^5 个胰岛，2年不依赖外源性胰岛素者达74%。这表明施行自体胰岛移植治疗胰腺疾病是完全可行的^[28]，同时，也提示异体移植失败的主要原因是免疫排斥所致。

有关异体胰岛移植开始于20世纪80年代初，Largiadier报道首例异体胰岛移植获得成功^[29]。从此，移植来源于尸体的纯化胰岛，并结合使用传统

免疫抑制剂治疗I型糖尿病的报道不断出现。但是，至2000年，异体胰岛移植成功率均低于10%^[24]。

2000年，异体胰岛移植获得重大突破。Shapiro等对7例I型糖尿病患者施行异体胰岛移植均获成功，病人不依赖胰岛素可长达1年^[1-3]。与传统移植相比，“Edmonton Protocol”（埃德蒙顿方案）主要进行了3方面改进：(i)对移植受体体重作了更严格的限定；(ii)结合使用非糖皮质激素免疫抑制剂治疗；(iii)从不同供体获得大量新鲜胰岛，移植胰岛数目达到 8×10^5 个。最近，Balamurugan等对过去5年中接受Edmonton法进行异体胰岛移植的患者进行调查，结果显示移植后不依赖胰岛素1年的受体达80%^[4]。Edmonton方案的成功实施提示同种异体胰岛移植将成为治愈I型和部分II型糖尿病的首选治疗方法。但是，由于1个临床胰岛移植受体通常需要2—4个新鲜供体，胰岛供体短缺的矛盾亦更为突出。

2 体外诱导胰腺干细胞再生胰岛移植治疗糖尿病

2.1 研究概况

鉴于胰腺干细胞再生胰岛的巨大应用前景，目前，世界范围内，分离克隆胰腺干细胞并将其定向诱导分化为功能性胰岛移植治疗糖尿病的研究已成为细胞组织工程研究的又一热点(表1)。但是，还没有人胰腺干细胞体外诱导胰岛移植治疗人类糖尿病的报道。

表1 诱导胰腺干细胞再生胰岛移植治疗糖尿病的研究概况

细胞来源	体外研究	体内研究	文献
成年NOD小鼠胰导管	共表达Pdx1, Reg1, Pax4等上皮样细胞克隆性生长,定向诱导形成胰岛细胞团,胰岛素、胰高血糖素抗体染色弱阳性	诱导胰岛细胞移植在糖尿病小鼠体内进一步成熟	Cornelius et al. 1997 ^[5]
成年NOD小鼠胰导管	上述上皮样细胞连续扩增培养3a,诱导培养形成包含 α 、 β 和 γ 细胞的功能性胰岛细胞团;RT-PCR检测,表达胰岛素I,胰岛素II及胰高血糖素等因子;葡萄糖刺激后可释放胰岛素	将诱导胰岛移植在NOD小鼠肾囊区,能降低血糖水平	Ramiya et al. 2000 ^[6]
成年人胰导管	混合培养的上皮样干细胞克隆性生长,诱导培养形成直径为50—150 μ m胰岛细胞团,双硫脲(DTZ)染色阳性,且分泌胰岛素	无	Bonner-Weir et al. 2000 ^[8]
成年人、大鼠胰岛	混合培养的干细胞 nestin 免疫组化染色阳性,诱导形成胰腺内、外分泌细胞和肝细胞;形成的胰岛细胞表达Pdx1、胰岛素和胰高血糖素	无	Zulewski et al. 2001 ^[30]

续表

细胞来源	体外研究	体内研究	文献
成年人胰岛	胰升糖素肽 1(GLP1)刺激 nestin 祖细胞分化为分泌胰岛素的功能性胰岛	无	Abraham et al. 2002 ^[31]
成年人胰导管	混合培养的表达 Pdx1 和 CK19 的上皮样细胞诱导分化为胰岛,DTZ 染色阳性,电子显微镜下见大量内分泌颗粒	无	宋振顺等. 2002 ^[32]
成年猪胰导管	上皮样细胞体外诱导分化为功能性胰岛	移植到糖尿病小鼠体内,移植物发生血管化并抗糖尿病	Peck et al. 2002 ^[7]
成年人胰腺	表达 CK19 的上皮样细胞扩增,且分化为胰岛细胞,葡萄糖刺激释放胰岛素;同时表明 nestin 表达细胞不能分化为胰岛细胞	诱导胰岛移植在裸鼠肾囊内,分化为胰腺内外分泌部	Gao et al. 2003 ^[33]
人胎儿胰腺	表达 CK19 的上皮样细胞诱导培养分化为功能性胰岛细胞,葡萄糖刺激释放胰岛素	无	Yao et al. 2004 ^[34]
人胰导管	无血清培养,人导管上皮细胞分化为功能性胰岛,双硫腺染色阳性,释放胰岛素、胰高血糖素	无	Katdare et al. 2004 ^[35]
人胎儿胰腺	共表达 nestin, vimentin 的胰腺细胞扩增培养 20 代,诱导培养分化为功能性胰岛	移植在 STZ 糖尿病小鼠体内能抗小鼠糖尿病	Wu et al. 2004 ^[10]
成年小鼠胰腺	胰腺祖细胞克隆性生长;诱导培养分化为胰腺内分泌 α , β 细胞,胰腺外分泌细胞及神经元细胞和神经胶质细胞	无	Seaberg et al. 2004 ^[12]
成年小鼠胰腺	胰腺干细胞诱导分化为功能性胰岛和神经细胞	无	Choi et al. 2004 ^[13]
成年小鼠胰腺	流式细胞仪结合克隆试验分离出表达肝细胞生长因子(HGF)的胰腺干细胞,体外诱导培养分化为胰腺多种细胞	移植在裸鼠体内,分化为胰腺细胞和肝、胃、肠细胞	Suzuki et al. 2004 ^[14]
成年人胰岛	采用共聚焦显微和微量 RT-PCR,证实长期培养 nestin 表达细胞分化为共表达 nestin 和胰岛素的祖细胞和胰岛细胞	无	Maria-Engler et al. 2004 ^[15]
人胎儿胰腺	共表达增殖细胞核抗原(PCNA), Pdx1, glucagon, nestin 和 CK19 的胰腺干细胞分化为胰岛素分泌细胞	移植在裸鼠体内,分化为胰腺、上皮和神经组织细胞;移植在 STZ 糖尿病大鼠体内能降低大鼠血糖	效梅等. 2004 ^[9]
人胎儿胰腺	表达 nestin 的胰腺前体细胞定向诱导分化为胰岛内分泌细胞	无	张玲等. 2004 ^[17]
成年小鼠胰岛	共表达 Ngn3 和 A6 的细胞诱导培养分化为胰腺内分泌细胞	无	宋陆军等. 2005 ^[36]
成年人胰岛	nestin 细胞体外培养分化为共表达 Pdx1 的胰岛细胞	无	Wang et al. 2005 ^[19]
成年小鼠胰岛	无血清培养,表达 Pdx1 的胰岛祖细胞扩增达 6 个月,体外定向诱导分化为胰腺内分泌细胞	无	Ta et al. 2006 ^[20]

2.2 胰腺干细胞体外定向诱导分化为功能性胰岛

2.2.1 定向诱导的方法 由胰腺干细胞定向诱导分化为功能性胰岛的方法很多,也较不一致.这里介绍两种作者认为比较有代表性的诱导方法.

第一种是 Peck 领导的研究小组报道的长期培养非肥胖性糖尿病小鼠胰导管上皮样干细胞诱导分化出功能性胰岛的方法.其诱导方法是:(i)当成年 NOD 小鼠胰导管上皮样干细胞贴壁生长至单层

时,加入糖尿病供体血清诱导培养,上皮样干细胞分化为胰岛前体细胞,聚集形成球状结构;(ii)加入含葡萄糖的诱导液继续定向诱导,胰岛前体细胞进一步调整排列,形成类胰岛细胞团,胰岛素和/或胰高血糖素抗体染色弱阳性;(iii)植入体内,促进胰岛细胞最终发育成熟.2000年,该研究小组又相继报道添加 5—10 mmol/L 烟酰胺、10 ng/mL 表皮生长因子(EGF)和 10 ng/mL 肝细胞生长因子(HGF)诱导剂,可使胰导管上皮样干细胞分化形成

包含 α 、 β 和 γ 细胞的功能性胰岛细胞团,这些细胞团转录表达胰岛素I,胰岛素II及胰高血糖素等因子,也表达与胰岛发育、分化有关的因子Pdx1, β -半乳糖苷酶和酪氨酸羟化酶等.经葡萄糖刺激,功能性胰岛细胞团释放胰岛素.他们将300个诱导胰岛细胞团移植在NOD成年小鼠肾囊区,降低了NOD小鼠血糖^[5-7].

第二种方法是Bonner-Weir等报道的体外定向诱导成年人胰导管细胞分化为分泌胰岛素的功能性胰岛细胞团.其方法是:当成年人胰导管上皮样干细胞扩增为单层后,用鼠类基质膜成分Matrigel覆盖上皮样细胞,在无血清DMEM/F12+5 mg/L胰岛素+5 mg/L转铁蛋白+5 mg/L硒+2 g/L牛血清白蛋白+10 mmol/L烟酰胺+10 ng/mL角朊细胞生长因子培养基中诱导培养3—4周,胰导管上皮样干细胞形成直径为50—150 μ m的胰岛细胞团,该细胞团双硫脲染色阳性,且能分泌胰岛素^[8].Gao等采用类似的诱导方法,将成人胰导管干细胞诱导分化为功能性胰岛^[32,33].

2.2.2 常用的诱导因子 烟酰胺(nicotinamide)是一种ADP-核糖合成酶抑制剂,不仅能促进体外培养人胎儿胰岛 β 细胞生长和成熟,而且能保护 β 细胞不发生长期暴露在含糖培养液中出现的耐糖性^[37,38].Peck等报道添加10 mmol/L烟酰胺,能提高胰腺干细胞诱导胰岛释放胰岛素的能力.培养液中添加 β 细胞素(β -cellulin)+细胞活性素A(activin A)^[39]或肝细胞生长因子能诱导胰导管细胞系(AR42J)转分化为胰岛素分泌细胞^[40].碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和表皮细胞生长因子能促进体外培养的胰岛细胞扩增.去除bFGF和EGF后,添加 β 细胞素、HGF或GLP1,胰岛细胞聚集为胰岛细胞团^[30].Pdx1是胰腺干细胞向 β 细胞分化的重要调节因子^[41-43],添加GLP1,能诱导胰腺干细胞表达Pdx1,继而分化为功能性 β 细胞.Kraskowski等报道角朊细胞生长因子(KGF)能促进胰腺干细胞转分化为胰岛细胞^[44,45].葡萄糖可促进 β 细胞扩增^[6].此外,多用低血清或无血清基础诱导液定向诱导胰腺干细胞分化胰岛^[8,11,12].最近,Stafford等对斑马鱼(*Brachydanio Rerio*)胰腺发育进行研究,发现来源于中胚层的信号分子视黄酸(RA)

能定向诱导内胚层分化形成胰腺内分泌祖细胞,提出视黄酸可应用于定向诱导干细胞分化为胰岛 β 细胞以治疗糖尿病^[46].

3 其他干细胞体外诱导胰岛移植治疗糖尿病

干细胞具有多向分化潜能,许多研究表明,除胰腺干细胞外,定向诱导胚胎干细胞、造血干细胞、肝干细胞及肠干细胞等,也能分化为胰腺组织细胞,移植后能发挥抗糖尿病作用.但是,作者在这里想提出的是从基因发育的时空性讲,诱导这些干细胞发育为胰腺组织细胞与诱导胰腺干细胞发育为胰腺组织细胞相比,诱导的难度和可靠性均受到影响.“Dolly”羊的早衰或许也明示我们应尽量走自然分化之路,这样,应用的安全系数可能会更高一些.作者建议在开展有关胰腺细胞组织工程研究时,特别是应用研究时,应该首选胰腺干细胞.

3.1 胚胎干细胞

由于人和很多动物胚胎干细胞(ES)已建系,细胞材料丰富,近几年,由胚胎干细胞定向诱导分化为功能性胰岛的研究报道较多.研究表明胚胎干细胞不仅能定向分化为胰岛素分泌细胞,将由胚胎干细胞定向分化的胰岛细胞移植给糖尿病鼠类还能发挥抗糖尿病作用^[47-50].

Soria等报道采用基因工程技术筛选获得由小鼠ES细胞分化形成的胰岛素分泌细胞.其方法是:(i)构建含胰岛素基因、新霉素抗性基因和潮霉素抗性基因的质粒,并转染给小鼠ES细胞,其中,新霉素抗性基因的表达受胰岛素基因启动子调控;(ii)用含潮霉素的培养液培养ES细胞,筛选出已转染细胞;(iii)加不含白血病抑制因子(LIF)的培养液,促使ES自然分化;(iv)用含新霉素的培养液培养,筛选出分泌胰岛素的 β 细胞.将筛选出的诱导细胞移植给链脲菌素制备的糖尿病大鼠能发挥抗糖尿病作用^[51].

Lumelsky等报道采用5步法可将小鼠ES细胞诱导分化为胰岛细胞:(i)将ES细胞接种到明胶包被的无饲养层培养板上,用含LIF的培养液扩增培养2—3d;(ii)加不含LIF的培养液,悬浮培养4d,使ES细胞自然分化为内胚体(EBs);(iii)加无血清培养液筛选培养6—7d,富集nestin表达细

胞；(iv) 加含 bFGF 和 B27 的无血清培养液培养 6 d, 扩增胰岛祖细胞数；(v) 去除 bFGF, 加含烟酰胺和 B27 的无血清培养液诱导培养 6 d, 获得胰岛样细胞团, 经免疫组化染色证实, (31.5 ± 6.6)% 的细胞胰岛素表达强阳性. 葡萄糖刺激可释放胰岛素. 将诱导末期的胰岛移植在链脲菌素制备的糖尿病小鼠皮下, 能显著延长糖尿病小鼠生存时间^[52].

3.2 骨髓干细胞

体外定向诱导骨髓细胞分化为功能性胰岛进行自体移植, 能避免异体移植引起的免疫排斥反应. 近几年, 有关这方面的研究也受到重视.

Ianus 等将胰岛素基因导入雄性小鼠骨髓细胞, 用促绿色荧光蛋白(EGFP)标记后, 将其经尾静脉移植给受辐射的雌性小鼠体内. 移植 4—6 月后, 雌性小鼠胰岛、胰腺外分泌部和肝脏均检测到 Y 染色体细胞, 且仅胰岛内检测到含 Y 染色体和 EGFP 标记的细胞. 进一步检测, 雌性小鼠胰岛中来源于雄性小鼠标记骨髓细胞表达胰岛素、葡萄糖转录因子 2(Glut-2)和几种 β 细胞标记物如 IPF-1, HNF3β 等. 葡萄糖和内分泌激素刺激分泌胰岛素, 表明骨髓细胞导入胰岛素基因后, 在体内胰岛微环境的作用下转分化为功能性 β 细胞^[53].

Choi 等用大鼠胰腺再生抽提物体外诱导培养骨髓间充质细胞, 分化为表达胰岛素、胰高血糖素、胰多肽及生长抑素的类胰岛, 这些类胰岛经葡萄糖刺激可释放胰岛素^[54].

3.3 肝脏卵圆细胞

在胚胎发育过程中, 肝脏和胰腺起源于前肠末端内胚层同一种细胞, 因此, 一些研究者认为胰腺和肝脏中存在共同的干细胞, 存在于肝脏的干细胞可转分化为功能性胰岛细胞.

Zalzman 等将大鼠胰岛细胞表达因子 Pdx1 导入人胎儿肝脏祖细胞, 体外定向诱导, 人胎儿肝脏祖细胞转分化为功能性胰岛 β 细胞, 并可在葡萄糖刺激下分泌胰岛素. 移植在 STZ 制备的糖尿病小鼠肾囊内, 2 周后, 糖尿病小鼠血糖水平降低, 证明其抗糖尿病作用^[55].

Yamada 等报道采用丁酸钠和 β 细胞素体外定向诱导来源于成年大鼠的肝脏干细胞分化为胰腺内分泌细胞, 分化后的细胞可表达胰多肽、生长抑

素和胰岛素^[56]. Yang 等报道在体外高糖诱导培养下, 成年大鼠肝脏卵圆细胞转分化为功能性胰岛细胞, 并表达 Pdx1, Pax4, Pax6, 胰岛素 I, 胰岛素 II 和胰高血糖素. 将 200 个诱导细胞团移植在 STZ 制备的糖尿病小鼠肾囊内, 10 d 后, 糖尿病小鼠血糖水平降低^[57].

综上, 研究者在诱导胰腺干细胞及其他干细胞再生胰岛治疗实验动物糖尿病方面已作了一些探讨, 尽管目前还没有人胰腺干细胞体外诱导胰岛移植治疗人类糖尿病的报道, 但是, 作者认为其巨大的应用价值必将吸引更多的研究力量为之不懈努力, 危害人类健康的 I 型和部分 II 型糖尿病有望治愈.

参 考 文 献

- 1 Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 2000, 27: 230-238
- 2 Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes*, 2001, 50: 710-719
- 3 Ryan EA, Lakey JR, Paty BW. Successful islet transplantation: Continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes*, 2002, 51: 2148-2157
- 4 Balamurugan AN, Bottino R, Giannoukakis N, et al. Prospective and challenges of islet transplantation for the therapy of autoimmune diabetes. *Pancreas*, 2006, 32(3):231-243
- 5 Cornelius JG, Tchernev V, Kao KJ, et al. *In vitro*-generation of islets in long-term cultures of multipotent stem cells from adult mouse pancreas. *Horm Metab Res*, 1997, 29: 271-277
- 6 Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, et al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells. *Nat Med*, 2000, 6: 278-282
- 7 Peck AB, Cornelius JG, Schatz D, et al. Generation of islets of langerhans from adult pancreatic stem cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2002, 9: 704-709
- 8 Bonner-weir S, Taneja M, Weir GC, et al. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 7999-8004
- 9 效梅, 扬学义, 屈雷等. 哺乳动物胰腺干细胞研究进展. *解剖学杂志*, 2004, 27(4): 445-448
- 10 Wu F, Jagir M, Powell JS. Long-term correction of hyperglycemia in diabetic mice after implantation of cultured human cells derived from fetal pancreas. *Pancreas*, 2004, 29: E23-29

- 11 Wang J, Song LJ, Gerber DA, et al. A model utilizing adult murine stem cells for creating personalized islets for transplantation. *Transplant Proc*, 2004, 36: 1188—1190
- 12 Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, et al. Clonal identification of multipotent precursors from mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 1115—1124
- 13 Choi Y, Ta M, Atouf F, et al. Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny. *Stem Cells*, 2004, 22: 1070—1084
- 14 Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes*, 2004, 53: 2143—2152
- 15 Maria-Engler SS, Correa-Giannella ML, Labriola L, et al. Colocalization of nestin and insulin and expression islet cell markers in long-term human pancreatic nestin-positive cell cultures. *J Endocrinol*, 2004, 183: 455—467
- 16 Abraham EJ, Kodama S, Lin JC, et al. Human pancreatic islet-derived progenitor cell engraftment in immunocompetent mice. *Am J Pathol*, 2004, 164: 817—830
- 17 张玲, 洪天配, 胡江, 等. 从胎儿胰腺组织建立单克隆胰腺前体细胞的研究. *中华糖尿病杂志*, 2004, 12(6): 442—445
- 18 Dominguez-Bendala J, Klein D, Ribeiro M, et al. TAT-mediated neurogenin 3 protein transduction stimulates pancreatic endocrine differentiation *in vitro*. *Diabetes*, 2005, 54(3): 720—726
- 19 Wang R, Li J, Yashpal N, et al. Nestin expression and clonal analysis of islet-derived epithelial monolayers: Insight into nestin-expressing cell heterogeneity and differentiation potential. *J Endocrinol*, 2005, 184(2): 329—339
- 20 Ta M, Choi Y, Atouf F, et al. The defined combination of growth factors controls generation of long-term replicating islet progenitor-like cells from cultures of adult mouse pancreas. *Stem Cells*, 2006, 24(7): 1738—1749
- 21 Logdberg L, Sgan SL, Larsen CP, et al. Islet transplantation, stem cells, and transfusion medicine. *Transfusion Medicine Reviews*, 2003, 17(2): 95—109
- 22 Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, et al. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med*, 1998, 339: 69—75
- 23 Tyden G, Bolinder J, Solders G, et al. Improved survival in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and endstage diabetic nephropathy 10 years after combined pancreas and kidney transplantation. *Transplantation*, 1999, 67: 645—648
- 24 Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*, 2001, 358: 221—229
- 25 Sutherland DE, Matas AJ, Goetz FC, et al. Transplantation of dispersed pancreatic islet tissue in humans: autografts and allografts. *Diabetes*, 1980, 29(Suppl)1: 31—44
- 26 Najarian JS, Sutherland DE, Baumgartner D, et al. Total or near total pancreatectomy and islet autotransplantation for treatment of chronic pancreatitis. *Ann Surg*, 1980, 192: 526—542
- 27 Pyzdrowski KL, Kendall DM, Halter JB, et al. Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts. *N Engl J Med*, 1992, 327: 220—226
- 28 Wahoff DC, Papalouis BE, Najarian JS, et al. Autologous islet transplantation to prevent diabetes after pancreatic resection. *Ann Surg*, 1995, 222: 562—579
- 29 Largiader F, Kolb E, Binswanger UA. Long-term function human pancreatic islet allotransplant. *Transplantation*, 1980, 29: 76—77
- 30 Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*, 2001, 50: 521—533
- 31 Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, et al. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology*, 2002, 143(8): 3152—3161
- 32 宋振顺, 顾克菊. 成人胰腺干细胞转分化为胰岛细胞过程中的形态学观察. *外科理论与实践*, 2002, 7: 196—200
- 33 Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes*, 2003, 52: 2007—2015
- 34 Yao ZX, Qin ML, Liu JJ, et al. *In vitro* cultivation of human fetal pancreatic ductal cells and their differentiation into insulin-producing cells. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 1452—1456
- 35 Katdare MR, Bhonde RR, Parab PB. Analysis of morphological and functional maturation of neo-islets generated *in vitro* from pancreatic ductal cells and their suitability for islet banking and transplantation. *J Endocrinol*, 2004, 182(1): 105—112
- 36 宋陆军, 秦新裕, 牛伟新, 等. 源于体外培养胰岛中表达 Ngn3 的细胞是胰腺内分泌前体细胞的新证据. *中华外科杂志*, 2005, 43(1): 42—45
- 37 Otonkoski T, Beattie G, Mally M, et al. Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. *J Clin Invest*, 1993, 92: 1459—1466
- 38 Ohgawara H. Reversal of glucose insensitivity of pancreatic B-cells due to prolonged exposure to high glucose in culture: Effect of nicotinamide on pancreatic B-cells. *Tohoku J Exp Med*, 1993, 169: 159—166
- 39 Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, et al. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J Clin Invest*, 1996, 97: 1647—1654

- 40 Mashima H, Shibata H, Mine T, et al. Formation of insulin-producing cells from pancreatic acinar AR42J cells by hepatocyte growth factor. *Endocrinology*, 1996, 137: 3969—3976
- 41 Edlund H. Pancreatic organogenesis—developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 524—532
- 42 Habener JF. Glucagonlike peptide-1 agonist stimulation of β -cell growth and differentiation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*, 2001, 8: 74—81
- 43 Habener JF, Stoffers DA. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998, 110: 12—21
- 44 Krakowski ML, Kritzik MR, Jones EM, et al. Pancreatic expression of keratinocyte growth factor leads to differentiation of islet hepatocytes and proliferation of duct cells. *Am J Pathol*, 1999, 154(3): 683—691
- 45 Swenne I. Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1992, 35: 193—201
- 46 Stafford D, White RJ, Kinkel MD, et al. Retinoids signal directly to zebrafish endoderm to specify insulin-expressing beta-cells. *Development*, 2006, 133(5): 949—956
- 47 Assady S, Maor G, Amit M, et al. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*, 2001, 50: 1691—1697
- 48 Lester LB, Kuo HC, Andrews L, et al. Directed differentiation of rhesus monkey ES cells into pancreatic cell phenotypes. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, 2: 42
- 49 Shi Y, Hou L, Tang F, et al. Inducing embryonic stem cells to differentiate into pancreatic beta-cells by a novel three-step approach with activin A and all-*trans* retinoic acid. *Stem Cells*, 2005, 23(5): 656—662
- 50 Vaca P, Martin F, Vegara-Meseguer JM, et al. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 258—265
- 51 Soria B, Roche E, Berna G, et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*, 2000, 49: 157—162
- 52 Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islet. *Science*, 2001, 292: 1389—1394
- 53 Iaus A, Holz GG, Theise ND, et al. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*, 2003, 111: 843—850
- 54 Choi KS, Shin JS, Lee JJ, et al. *In vitro trans*-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(4): 1299—1305
- 55 Zalzman M, Gupta S, Giri RK, et al. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(12): 7253—7258
- 56 Yamada S, Terada K, Ueno Y, et al. Differentiation of adult hepatic stem-like cells into pancreatic endocrine cells. *Cell Transplant*, 2005, 14(9): 647—653
- 57 Yang L, Li S, Hatch H, et al. *In vitro trans*-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 8078—8083