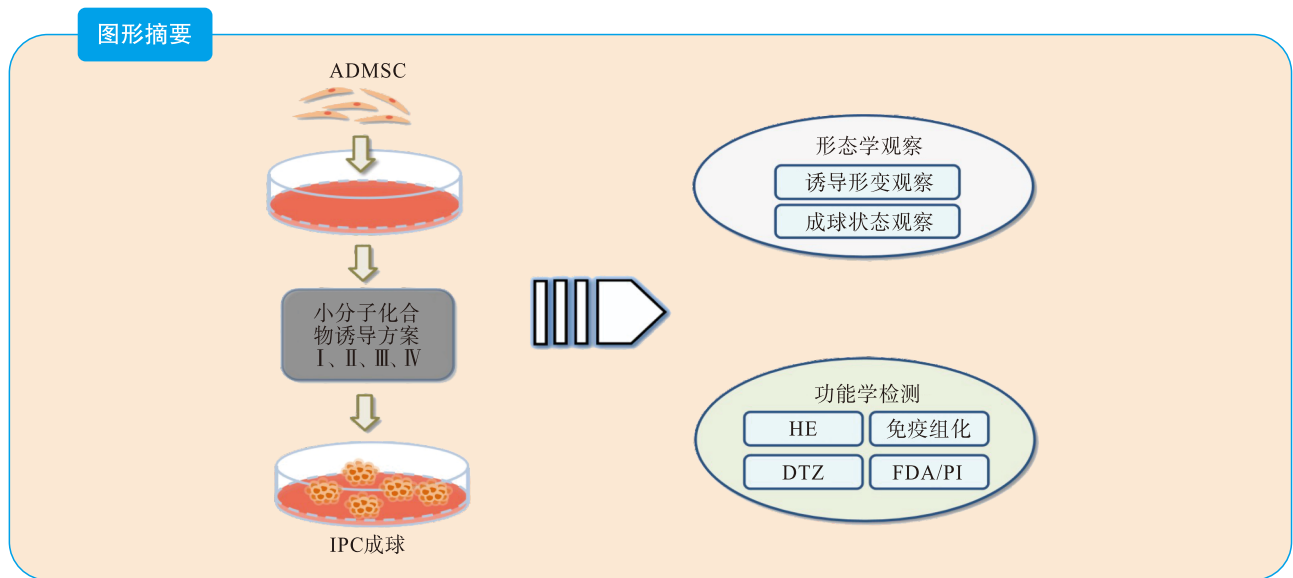


# 功能性胰岛素分泌细胞化学诱导方案的研究

李易文 陈继冰 梁维萍 高宏君 徐之然



**【摘要】** 目的 探讨脂肪间充质干细胞（ADMSC）向胰岛素分泌细胞（IPC）分化的有效诱导方案。方法 使用不同方案的小分子化合物诱导分化 ADMSC，通过流式细胞术分析细胞纯度，镜下观察细胞形态学变化，苏木素-伊红和免疫组织化学染色检测细胞质量、性能及胰岛素相关指标，双硫脲（DTZ）与二乙酰荧光素/碘化丙啶染色检测细胞成熟度及活性，分析 ADMSC 向 IPC 分化诱导效果。结果 ADMSC 纯度可达 99% 以上，方案 I、II、III 的成球性良好；细胞诱导质量及胰腺十二脂肠同源盒 1（PDX1）、肌腱膜纤维肉瘤癌基因同源物 A（MAFA）、胰岛素和 C 肽表达效果均为方案 I 优于其它方案；DTZ 染色深浅可能与 IPC 成熟度有关，其中方案 I 的凋亡细胞数量明显较方案 II、III 少。结论 诱导方案 I 能提高 ADMSC 向 IPC 的分化效率，为未来临床 IPC 移植应用奠定一定基础。

**【关键词】** 胰岛素分泌细胞；脂肪间充质干细胞；胰岛移植；小分子化合物；糖尿病；化学诱导；基质胶；胰岛素

**【中图分类号】** R617, R971 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2025) 03-0012-08

**Research on the chemical induction scheme for functional insulin producing cell** Li Yiwen\*, Chen Jibing, Liang Weiping, Gao Hongjun, Xu Zhiran. \*Ruikang Clinical Medical College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China  
Corresponding author: Xu Zhiran, Email: zhiran\_xu@163.com

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2024269

基金项目：广西壮族自治区临床医学研究中心项目（桂科 AD22035122）；中医药服务体系与能力建设经费—中医特色优势重点项目（瑞康医院 2024）

作者单位：530001 南宁，广西中医药大学瑞康临床医学院（李易文、陈继冰）；广西中医药大学附属瑞康医院中西医结合转化医学中心（陈继冰、梁维萍、高宏君、徐之然）；广西中西医结合肾脏疾病临床医学研究中心（陈继冰、高宏君）

作者简介：李易文（ORCID 0009-0000-7397-0487），硕士研究生，研究方向为器官移植，Email: 1926724758@qq.com

通信作者：徐之然（ORCID 0000-0003-1747-1952），硕士，主管药师，研究方向为器官移植与胰岛移植，Email: zhiran\_xu@163.com

**【 Abstract 】 Objective** To explore the effective induction scheme for differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cell (ADMSC) to insulin producing cell (IPC). **Methods** Different schemes of small molecule compound were used to induce the differentiation of ADMSC. The purity of cells was analyzed by flow cytometry and the morphological changes of cells were observed under the microscope. The quality, performance and insulin related indicators of cells were detected by hematoxylin-eosin and immunohistochemical staining. The maturity and activity of cells were detected by dithizone (DTZ) and diacetylfluorescein/propidium iodide staining. The induction effect of ADMSC differentiated into IPC was analyzed. **Results** The purity of ADMSC reached more than 99%, and the sphere forming properties of schemes I, II and III were good. Cell induction mass, the expression effects of pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1), musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (MAFA) and insulin and C peptide of schemes I were both better than those of other schemes. The DTZ staining depth may be related to IPC maturity, among which the number of apoptotic cells in scheme I was significantly less than that of scheme II and III. **Conclusions** Induction scheme I may improve the differentiation efficiency of ADMSC to IPC and lay a certain foundation for future clinical IPC transplantation applications.

**【 Key words 】** Insulin producing cell; Adipose-derived mesenchymal stem cell; Islet transplantation; Small molecule compound; Diabetes mellitus; Chemical induction; Matrigel; Insulin

胰岛移植已成为临床上治疗糖尿病的一种新型且有效的手段,而供者的稀缺及移植后胰岛有效数量的不确定性严重影响其临床应用<sup>[1]</sup>。脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cell, ADMSC)具有分化为特定细胞类型的潜力,为研究人员提供了一种易获得且对血糖变化有效效应的胰岛素分泌细胞(insulin producing cell, IPC),并且 ADMSC 诱导的 IPC 可实现个体化移植,减少排斥反应的发生<sup>[2]</sup>。现有报道的体外诱导 IPC 方案面临着诱导效率不高和细胞功能稳定性不强等挑战。因此,寻找一种高效的 IPC 诱导方案迫在眉睫。

化学诱导法是利用小分子化合物,通过模拟体内胰腺发育过程进行体外胰腺诱导分化。胰腺发育始于胚胎期,原肠管前肠后端细胞形成背侧和腹侧原基后融合,胰腺原基的上皮细胞随后产生分支形成小叶结构,进而分化为不同细胞。经过定性内胚层(definitive endoderm, DE)、胰向内胚层、胰腺前体细胞、内分泌前体细胞和胰岛内分泌细胞等阶段的分步诱导,最终形成功能相对成熟的 IPC<sup>[3-4]</sup>。小分子化合物对细胞的渗透性强、免疫原性低及可控性强。因此,高效、便捷的诱导方案是体外获取 IPC 的一个有效途径。

本实验将在既往研究的基础上,通过对比文献报道不同方案诱导的 IPC<sup>[5-6]</sup>,探索一种新的小分子化合物诱导 IPC 的方案,旨在为未来临床 IPC 移植应用提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(Dulbecco's modified

Eagle medium, DMEM)、N2 添加剂、 $\beta$ -巯基乙醇均购自美国 Gibco 公司;表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)均购自苏州 Novoprotein 公司;胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸(insulin-transferrin-selenious acid, ITS)细胞培养添加物购自上海源叶公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)购自武汉 Servicebio 公司;二乙酰荧光素(flourescein diacetate, FDA)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、尼克酰胺购自北京 Solarbio 公司;激活素 A、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)-7 蛋白购自美国 MedChemExpress 公司。

免疫组织化学(免疫组化)一抗:胰腺十二指肠同源盒 1(pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1)抗体、C 肽抗体均购自英国 Abcam 公司;肌腱膜纤维肉瘤癌基因同源物 A(musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A, MAFA)抗体购自美国 Invitrogen 公司;胰岛素抗体购自武汉 Bioswamp 公司。免疫组化二抗:即用型快捷免疫组化 MaxVision<sup>TM</sup> HRP 试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。

实验细胞取自广西中医药大学附属瑞康医院中西医结合转化医学中心细胞库冻存第 3 代人 ADMSC,脂肪的获取来源为广西中医药大学附属瑞康医院整形美容科室医疗废弃物。本研究已获得广西中医药大学附属瑞康医院医学伦理委员会批准(批号:KY2023-057)且签署知情同意书。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与扩增 将冻存细胞从-80℃ 冰箱取

出,复苏,使用间充质干细胞专用培养基培养,待细胞长满后按 1.2.3 诱导方案进行化学诱导。

**1.2.2 ADMSC 流式鉴定** 取传代扩增后的 ADMSC,用 PBS 洗涤,加入流式管中,每管  $1 \times 10^6$  个细胞,分别加入 CD19、CD31、CD34、CD45、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166 流式抗体,常温避光静置 15 min, PBS 洗涤后用流式细胞仪检测。

**1.2.3 细胞诱导方案** (1) 诱导方案 I: 根据人体胚胎发育中多能干细胞经特定信号通路及转录因子调控来诱导 ADMSC 分化为 IPC, 在细胞分化路径及调控逻辑上与人体自然发育高度契合。基础培养基为 DMEM/F12、1% B-27, 按照各阶段诱导需求, 加入的小分子化合物分别包括①维甲酸、Sant1 以及 Wnt-C59; ②激活素 A、渥曼青霉素、N2; ③GlutaMAX、EGF、尼克酰胺、维生素 C、Noggin、FGF-7、smoothed 拮抗剂 cyclopamine-KAAD; ④ALK5 inhibitor II、isoxazole-9、肝素、 $\gamma$ -secretase inhibitor XXi、Y27632、胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸; ⑤毛喉素、七水硫酸锌、碱性 FGF、毒晰外泌肽-4。诱导结束时间为诱导后 26 d。(2) 诱导方案 II 诱导途径为 ADMSC $\rightarrow$ 定性内胚层细胞 $\rightarrow$ 胰腺祖细胞 $\rightarrow$ IPC<sup>[7]</sup>, 诱导结束时间为诱导后 19 d。(3) 诱导方案 III 的诱导原理为加入还原剂  $\beta$ -巯基乙醇和调节钙离子信号及线粒体功能的尼克酰胺来促进细胞诱导分化及增强细胞的能量代谢效率<sup>[8]</sup>, 诱导结束时间为诱导后 28 d。(4) 诱导方案 IV: 采用含有胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸持续诱导细胞 7 d, 直接让细胞具备胰岛素分泌功能<sup>[9]</sup>。

**1.2.4 IPC 成球** 方案 I、II、III 诱导完成后, 用 AggreWell 微孔六孔板进行收集。方案 IV 为完全培养基静置 3~4 d 自主成球。

**1.2.5 细胞制片** 每个方案诱导结束后取 10% 甲醛溶液进行固定, 离心后取细胞沉淀制成蜡块, 脱水、包埋、切片、烤片、脱蜡, 再进行染色。

**1.2.6 苏木素-伊红染色** 紫色部分为细胞核, 粉色部分为细胞质, 根据苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色情况判断细胞的状态是否有正常的细胞形态。

**1.2.7 免疫组化染色** PDX1、C 肽的一抗稀释比例均为 1:500, MAFA、胰岛素的一抗稀释比例均为 1:200, 过夜后加入即用型二抗, 根据棕色显色程度及显示范围判断阳性表达量。使用 Image J 软件分析

免疫组化染色阳性率。

**1.2.8 双硫脲染色** 取 IPC 细胞球, 用 PBS 清洗, 按 1:1 加入双硫脲 (dithizone, DTZ) 染料, 15~20 min 后, 镜下观察, 已转化完成的  $\beta$  样细胞会被染成棕红色。

**1.2.9 FDA/PI 检测** 取 IPC 细胞重悬液, 加入 0.46  $\mu\text{mol/L}$  FDA 和 14.34  $\mu\text{mol/L}$  PI, 孵育 5 min, 用 PBS 洗涤, 于荧光显微镜下观察其活性。

## 1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ADMSC 的纯度鉴定

来自于我院中西医结合转化医学中心细胞库的 ADMSC 的纯度达 99% 以上。CD44、CD73、CD90、CD105、CD166 抗体表达率达 99% 以上, CD19、CD31、CD34、CD45 抗体表达率均低于 0.6%, 证明该细胞株纯度较高, 可进行下一步诱导实验 (图 1)。

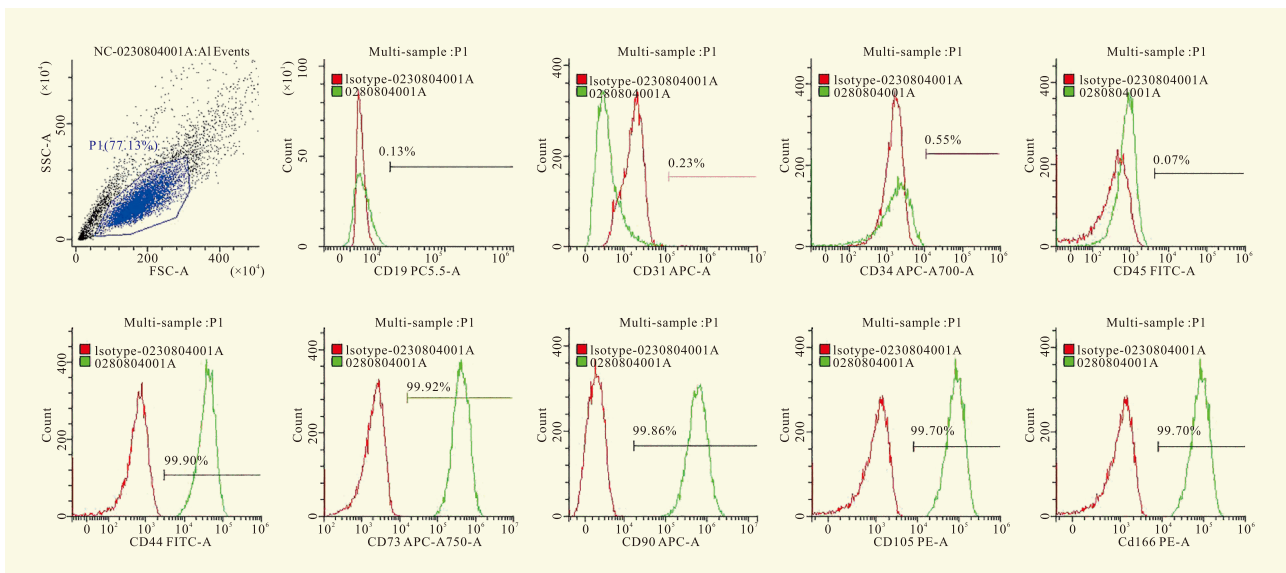
### 2.2 ADMSC 向 IPC 诱导分化的细胞形态学变化

IPC 成球是其体外成熟的重要一步, 这决定移植后的存活率。方案 I~IV 的 ADMSC 向 IPC 的转化中, 细胞形态都出现明显的变化, 细胞逐渐皱缩、聚集, 最终转变成悬浮细胞 (图 2), 此过程为细胞诱导阶段, 通过细胞形态学变化观察细胞诱导进展情况。方案 I~III 细胞孵育时采用基质胶包被, 之后用多孔收集板成球, 成球效果良好, 而方案 IV 的细胞为自主成球, 成球效果一般, 且发生粘连 (图 3)。

### 2.3 IPC 质量、细胞性能及胰岛素相关指标检测

HE 染色结果显示, 紫色部分为细胞核,  $\beta$  样细胞的细胞核较小, 形态规则, 分布均匀, 红色或粉红色部分为细胞质, 不同方案的细胞质量良好 (图 4)。

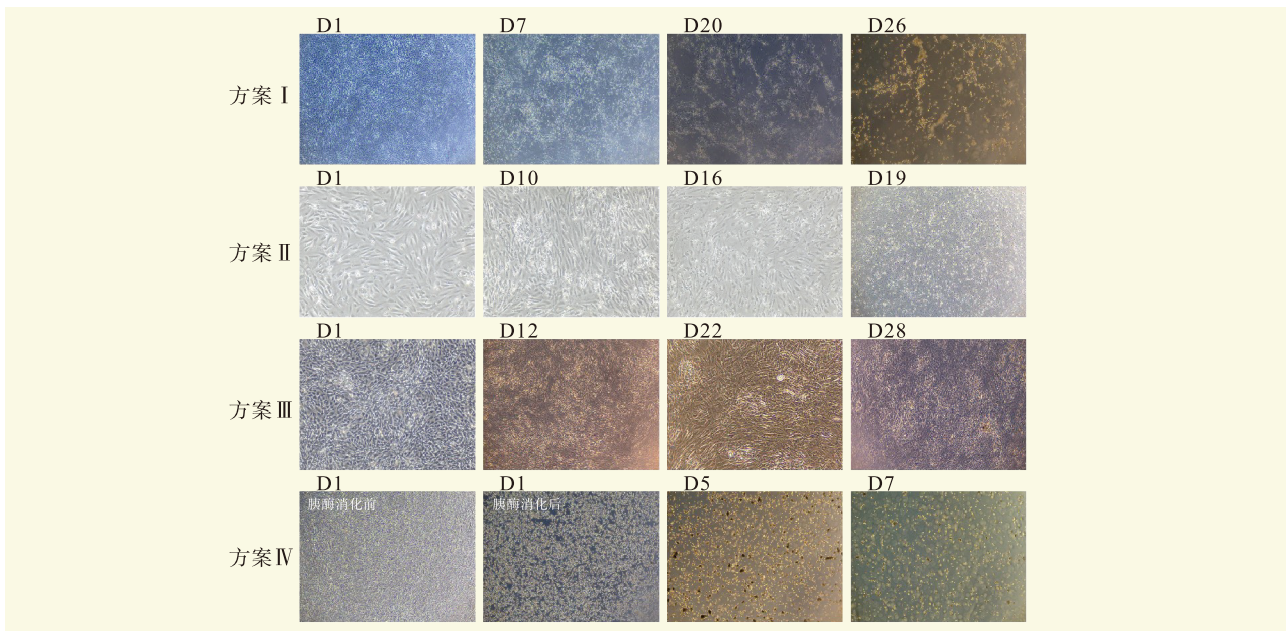
免疫组化结果可以看出方案 I 中 4 个特异性蛋白表达水平均高于其他 3 个方案, 这表明方案 I 相比于其他 3 个方案, 在 IPC 质量、细胞性能及胰岛素相关指标等方面更具优势 (图 4)。各方案的免疫组化阳性率均低于方案 I, 差异均有统计学意义 (均为  $P < 0.05$ , 图 5)。



注：Isotype-0230804001A 为同型对照细胞编号，0280804001A 为样本细胞编号。

图 1 ADMSC 的流式鉴定结果

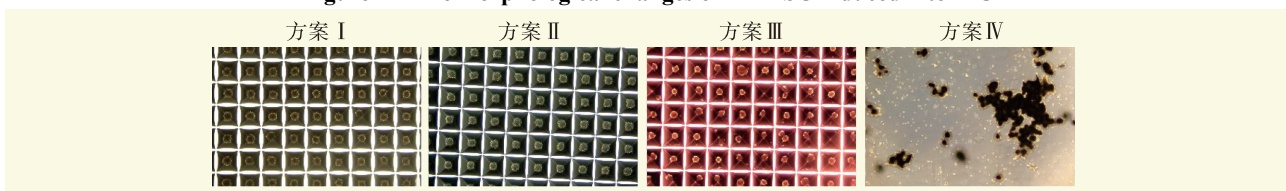
Figure 1 The flow identification result of ADMSC



注：方案 I、II、III、IV 诱导结束时间分别为诱导后 26 d、19 d、28 d 和 7 d。

图 2 ADMSC 诱导为 IPC 的细胞形态学变化 (×100)

Figure 2 The morphological changes of ADMSC induced into IPC



注：方案 I、II、III 使用多孔收集板成球，方案 IV 为自主成球。

图 3 IPC 成球情况 (×40)

Figure 3 The pelletizing condition of IPC

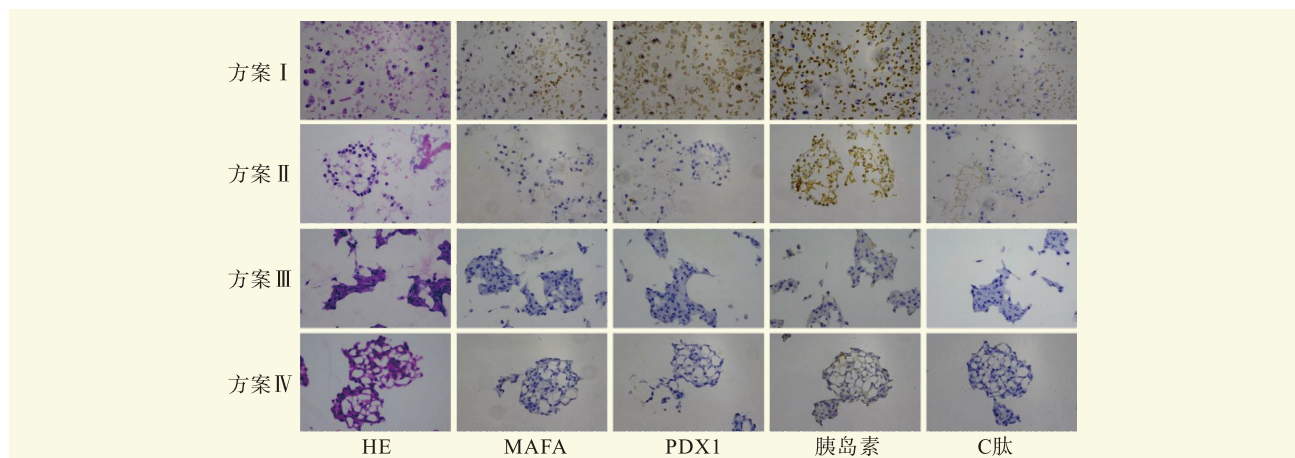
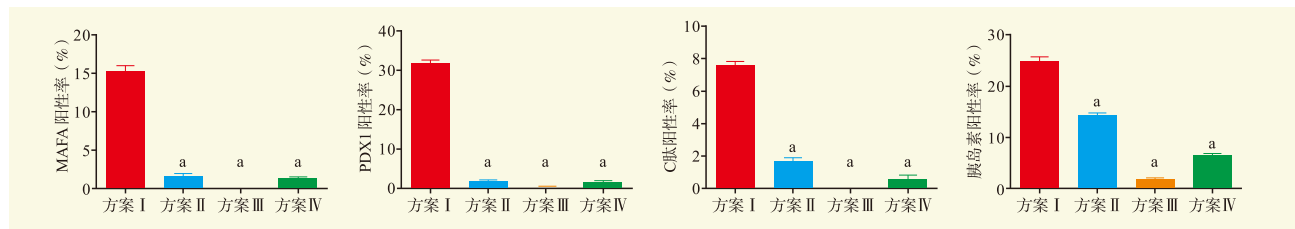


图 4 IPC 的 HE 染色和免疫组化染色结果 (×400)

Figure 4 Results of HE and immunohistochemistry staining of IPC



注: 与方案 I 比较, <sup>a</sup>P<0.05。

图 5 不同方案中 IPC 免疫组化染色阳性率的比较

Figure 5 Comparison of the positive rate of IPC immunohistochemistry staining in different schemes

### 2.4 IPC 成熟度和活性检测

DTZ 可以与 IPC 里的锌离子特异性结合, 从而显示棕红色, 因此通过观察细胞染色情况, 可以预测其成熟程度。DTZ 染色结果显示方案 I 和方案 III 有棕红色染色, 方案 II 也有少量棕红色染色, 这可能与 IPC 的成熟度有关。但 IPC 的成熟也离不开体内微环境, 故体外染色可作为参考。活性染色中 FDA 显绿色荧光, PI 为凋亡细胞染色, 显红色荧光。方案 I、II、III 绿色信号均较明显, 说明细胞活力较好, 其中方案 I 的红色荧光信号较其它 3 个方案弱, 表明其凋亡细胞数量最少。方案 IV 的 PI 信号较强, 但 FDA 信号较其它 3 个方案弱, 可能与自主成球有关, 细胞内部结构过于致密导致发生凋亡 (图 6)。

## 3 讨论

胰岛移植自 1974 年首次应用于临床后, 因其手术安全方便, 逐渐成为治疗糖尿病患者的新方案。但胰岛提取对操作场地和设备有一定要求, 对供者胰腺的筛选也较为严格, 同时提取技术及移植后发生的排斥反应使得最终有效的胰岛数量减少。自体脂肪组织

提取的 ADMSC 诱导为 IPC, 不但可以解决移植来源受限问题, 并且可实现个体化治疗, 大大减少了移植后发生的排斥反应, 移植数量也可就需求进行控

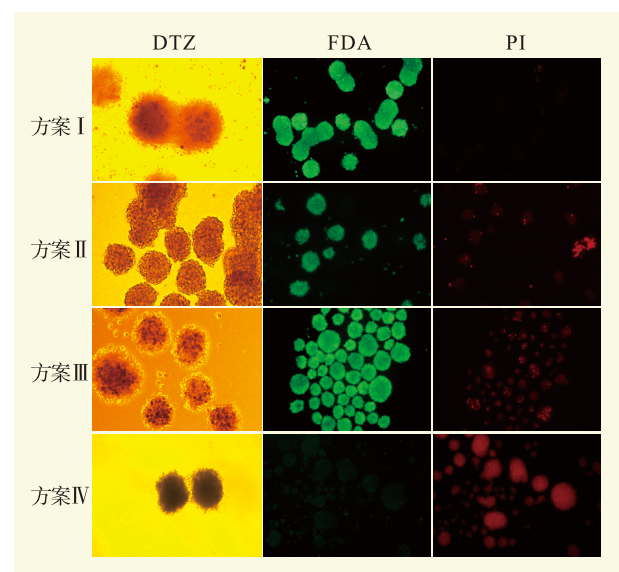


图 6 IPC 的 DTZ 染色 (×100) 和 FDA/PI 染色 (×63) 结果

Figure 6 Results of DTZ and FDA/PI staining of IPC

制。因此,探讨一种高效的 IPC 诱导方案在临床应用中具有十分重要的意义。

IPC 首次报道是由小鼠胚胎干细胞诱导生成,此后,人神经祖细胞、胚胎干细胞、肝细胞等向 IPC 转化的研究方案陆续诞生<sup>[10-13]</sup>。关于 IPC 分化和成熟的效率一直是研究的难点,转化的 IPC 只有约 20% 可以分泌胰岛素,IPC 的胰岛素释放量在体外仍然不足<sup>[10,14]</sup>。IPC 诱导方案一般分为基因转染和化学诱导两个方向。化学诱导不受基因操作的影响,保证了未来临床应用的安全性。在本研究中,以前期研究为基础,根据诱导各阶段的特异性<sup>[15-17]</sup>,得出新的诱导方案(诱导方案 I),可以有效提高 IPC 的转化效率和胰岛素分泌量。

在胰岛样细胞移植中,特异性蛋白的表达对 IPC 的质量及移植后效果起决定性作用。高表达的 MAFA 可直接作用于胰岛素基因的转录调控,增强细胞的敏感性,同时还可调节抗凋亡基因的表达,增强 IPC 的存活能力<sup>[18]</sup>。PDX1 高表达说明有充足的胰岛素和特定表型 IPC 的产生,并且可以影响细胞对葡萄糖的感知和代谢。胰岛素高表达表示 IPC 具有大量的胰岛素储备。C 肽高表达意味着内源性胰岛素的分泌能力强,移植后可以保证移植植物更好地调节血糖水平。

小分子化合物诱导方案能在信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 和蛋白质水平诱导 PDX1 和神经源素 3 (neurogenin 3, NGN3) 表达<sup>[19]</sup>,为促进 IPC 成熟提供线索。PDX1 是胰腺发育主要调节因子,对胰腺  $\beta$  样细胞的发育和功能至关重要<sup>[20-21]</sup>,胚胎发育中缺乏 PDX1 的小鼠和人类无胰腺<sup>[22]</sup>。将 PDX1 转染到人类骨髓间充质干细胞可诱导 IPC 产生,注射到糖尿病小鼠可使血糖持续下降超 80 d<sup>[23]</sup>。在胰腺  $\beta$  样细胞个体发育中,表达 NGN3 的胰腺祖细胞发育成内分泌细胞,只有 PDX1<sup>+</sup> NGN3<sup>+</sup> 祖细胞能发育成分泌胰岛素的  $\beta$  样细胞<sup>[24]</sup>。

DE 被定义为一群表达 Foxa2、Sox17 和 CXCR4 的鳞状细胞,它是在原始内胚层形成之后形成的<sup>[25-26]</sup>。只有 DE 能够进一步分化为特定的内胚层谱系<sup>[27]</sup>,这确定了我们的方案也通过 DE 的表达进行下一步诱导。

在分化早期引入维生素 C 可产生低表达 NGN3 及其下游靶标的 PDX1<sup>+</sup> NKX6.1<sup>+</sup> 胰腺祖细胞,增加第 3 步总细胞数量和汇合,这与维生素 C 在细胞外基质的作用相符<sup>[28-29]</sup>。第 3 阶段添加维生素 C 降低

NGN3 及其下游靶标(如 NEUROD1 和 NKX2.2)的 mRNA 水平,但不影响 PDX1 表达<sup>[30]</sup>。分化早期抑制 NGN3 很重要,因先前研究表明,胰腺内胚层细胞中 NGN3 的过早诱导会使细胞对富含胰高血糖素等激素的多激素细胞群体致敏<sup>[31]</sup>。

激活素 A 与碱性 FGF 等因子组合可促进 ADMSC 增殖及中胚层和 DE 相关基因的表达<sup>[32]</sup>。Sant1 在胰腺祖细胞分化和内分泌细胞形成过程中起关键调节作用<sup>[33]</sup>,与维生素 A 酸等因子共同作用驱动细胞向胰腺谱系发展,促使转录因子 PDX1 表达并启动  $\beta$  样细胞转录因子 NKX6.1<sup>+</sup> 表达;在内分泌诱导阶段,Sant1 与  $\gamma$ -secretase inhibitor XXI、ALK5 inhibitor II 和维生素 A 酸等协同下调 Notch 信号,促进胰腺祖细胞向内分泌细胞转化<sup>[34]</sup>。渥曼青霉素能抑制 PI3K/Akt 信号通路,减弱 Ang1 诱导的 Akt 磷酸化,从而促进胰岛素的合成和分泌<sup>[35]</sup>。EGF 对诱导的细胞有多重作用,通过激活 EGF 受体,进而激活 Ras/Raf/MEK/ERK 和 PI3K/Akt 信号通路,促进胰岛素的合成和分泌,同时还可以促进细胞增殖及细胞活力的提升<sup>[36]</sup>。Noggin 通过抑制 BMP 信号通路,帮助调节胰腺细胞的分化和增殖,同时也可间接调节胰岛素的分泌<sup>[37-39]</sup>。ALK5 inhibitor II 能促进胰腺祖细胞向内分泌细胞分化,诱导  $\beta$  样细胞形成,且对细胞周期蛋白依赖激酶(cyclin dependent kinase, CDK) 8 和 CDK19 具有独特的抑制作用,因此该因子对高效诱导  $\beta$  样细胞至关重要<sup>[40]</sup>。毛喉素是环磷酸腺苷升高剂,在不同葡萄糖浓度下对  $\beta$  样细胞有不同作用,且不介导葡萄糖代谢引起的胰岛素分泌增加的代谢扩增。这些小分子化合物在 IPC 的诱导过程中的不同阶段发挥独特作用<sup>[41-42]</sup>。

综上所述,本文探讨的 IPC 诱导方案 I 能显著提高 ADMSC 向 IPC 的分化效率。相较于以往已报道方案,PDX1、MAFA、胰岛素、C 肽这 4 个特异性抗体均在方案 I 诱导的 IPC 中有显著性表达,并且 IPC 成球后活性更高。这为今后胰岛体内研究奠定了一定基础,对未来胰岛移植成为临床的治疗手段有一定的参考价值。

#### 参考文献:

- [1] 李静静,赵渊宇,傅宏,等.全胰切除联合自体胰岛细胞移植的研究进展[J].临床肝胆病杂志,2023,39(10):2506-2512. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.10.033. LI J J, ZHAO Y Y, FU H, et al. Research advances in total pancreatectomy with autologous islet cell transplantation[J]. J Clin Hepatol, 2023, 39(10): 2506-

2512. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.10.033.
- [2] 宋益康, 叶泽岚, 章余旋, 等. 医疗机构开展临床胰岛移植的法规要求与准备工作[J/OL]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2023, 13(5): 257-262. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2023.05.001.  
SONG Y K, YE Z L, ZHANG Y X, et al. Regulatory requirements and preparation for clinical islet transplantation in medical institutions[J/OL]. Chin J Cell Stem Cell (Electr Edit), 2023, 13(5): 257-262. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2023.05.001.
- [3] 李怡, 周文静, 陈丽华, 等. 间充质干细胞在骨免疫中的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2024, 40(10): 924-929. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009841.  
LI Y, ZHOU W J, CHEN L H, et al. Research progress of mesenchymal stem cells in osteoimmunity[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2024, 40(10): 924-929. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009841.
- [4] MA Z, ZHANG X, ZHONG W, et al. Deciphering early human pancreas development at the single-cell level[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 5354. DOI: 10.1038/s41467-023-40893-8.
- [5] YEHYA H, WELLS A, MAJCHER M, et al. Identifying and optimizing critical process parameters for large-scale manufacturing of iPSC derived insulin-producing  $\beta$ -cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2024, 15(1): 408. DOI: 10.1186/s13287-024-03973-0.
- [6] MIKŁOSZ A, CHABOWSKI A. Adipose-derived mesenchymal stem cells therapy as a new treatment option for diabetes mellitus[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2023, 108(8): 1889-1897. DOI: 10.1210/clinem/dgad142.
- [7] GHONEIM M A, GABR M M, EL-HALAWANI S M, et al. Current status of stem cell therapy for type 1 diabetes: a critique and a prospective consideration[J]. Stem Cell Res Ther, 2024, 15(1): 23. DOI: 10.1186/s13287-024-03636-0.
- [8] LI J, ZHU L, QU X, et al. Stepwise differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells toward definitive endoderm and pancreatic progenitor cells by mimicking pancreatic development in vivo[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(10): 1576-1587. DOI: 10.1089/scd.2012.0148.
- [9] HOGREBE N J, ISHAHAK M, MILLMAN J R. Developments in stem cell-derived islet replacement therapy for treating type 1 diabetes[J]. Cell Stem Cell, 2023, 30(5): 530-548. DOI: 10.1016/j.stem.2023.04.002.
- [10] ZHANG S, HUANG F, TIAN W, et al. Andrographolide promotes pancreatic duct cells differentiation into insulin-producing cells by targeting PDX-1[J]. Biochem Pharmacol, 2020, 174: 113785. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.113785.
- [11] JUN H R, KIM Y H, MOON J E, et al. Effect of isoproterenol, a  $\beta$ -adrenergic agonist, on the differentiation of insulin-producing pancreatic  $\beta$  cells derived from human pluripotent stem cells[J]. Exp Cell Res, 2024, 443(1): 114307. DOI: 10.1016/j.yexcr.2024.114307.
- [12] BROLÉN G K C, HEINS N, EDSBAGGE J, et al. Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells[J]. Diabetes, 2005, 54(10): 2867-2874. DOI: 10.2337/diabetes.54.10.2867.
- [13] HUANG X, GU W, ZHANG J, et al. Stomach-derived human insulin-secreting organoids restore glucose homeostasis[J]. Nat Cell Biol, 2023, 25(5): 778-786. DOI: 10.1038/s41556-023-01130-y.
- [14] ZALZMAN M, ANKER-KITAI L, EFRAT S. Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the beta-cell phenotype[J]. Diabetes, 2005, 54(9): 2568-2575. DOI: 10.2337/diabetes.54.9.2568.
- [15] DANG LE Q, RODPRASERT W, KUNCOROJAKTI S, et al. In vitro generation of transplantable insulin-producing cells from canine adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. Sci Rep, 2022, 12: 9127. DOI: 10.1038/s41598-022-13114-3.
- [16] DU Y, LIANG Z, WANG S, et al. Human pluripotent stem-cell-derived islets ameliorate diabetes in non-human primates[J]. Nat Med, 2022, 28(2): 272-282. DOI: 10.1038/s41591-021-01645-7.
- [17] SILVA I B B, KIMURA C H, COLANTONI V P, et al. Stem cells differentiation into insulin-producing cells (IPCs): recent advances and current challenges[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 309. DOI: 10.1186/s13287-022-02977-y.
- [18] ZHU H, WANG G, NGUYEN-NGOC K V, et al. Understanding cell fate acquisition in stem-cell-derived pancreatic islets using single-cell multiome-inferred regulomes[J]. Dev Cell, 2023, 58(9): 727-743. DOI: 10.1016/j.devcel.2023.03.011.
- [19] 邱晓燕, 李碧欣, 黎敬弟, 等. MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染人脐带间充质干细胞向胰岛素分泌细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(7): 1000-1006. DOI: 10.12307/2024.104.  
QIU X Y, LI B X, LI J D, et al. Differentiation of insulin-producing cells from human umbilical cord mesenchymal stem cells infected by MAFA-PDX1 overexpressed lentivirus[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(7): 1000-1006. DOI: 10.12307/2024.104.
- [20] JEYAGARAN A, URBANCZYK M, LAYLAND S L, et al. Forward programming of hiPSCs towards beta-like cells using Ngn3, Pdx1, and MafA[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 13608. DOI: 10.1038/s41598-024-64346-4.
- [21] DOBOSZ A M, JANIKIEWICZ J, KROGULEC E, et al. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 in the mouse impairs pancreatic islet morphogenesis and promotes loss of  $\beta$ -cell identity and  $\alpha$ -cell expansion in the mature pancreas[J]. Mol Metab, 2023, 67: 101659. DOI: 10.1016/j.molmet.2022.101659.
- [22] PROSHCHINA A E, KRIVOVA Y S, GODOVALOVA O S, et al. PDX1 as a marker of early differentiation of human pancreatic duct cells[J]. Bull Exp Biol Med, 2024, 178(1): 110-114. DOI: 10.1007/s10517-024-06292-9.
- [23] JONSSON J, CARLSSON L, EDLUND T, et al. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice[J]. Nature, 1994, 371(6498): 606-609. DOI: 10.1038/371606a0.
- [24] LEE S A, KIM S, KIM S Y, et al. Direct differentiation of bone marrow mononucleated cells into insulin-producing cells using 4 specific soluble factors[J]. Stem Cells Transl Med, 2023, 12(7): 485-495. DOI: 10.1093/

- stcltm/szad035.
- [25] MERINO P L H. Developmental biology of the pancreas[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2004, 40(3 Suppl): 127-142. DOI:10.1385/cbb:40:3:127.
- [26] 胡博文, 陈家斌, 刘晓东. 人类早期胚胎发育体外模型研究进展[J]. *合成生物学*, 2024, 5(4): 719-733. DOI: 10.12211/2096-8280.2024-010.
- HU B W, CHEN J B, LIU X D. Advances in the development of human embryo models[J]. *Synth Biol J*, 2024, 5(4): 719-733. DOI: 10.12211/2096-8280.2024-010.
- [27] ZEINHOM A, FADALLAH S A, MAHMOUD M. Human mesenchymal stem/stromal cell based-therapy in diabetes mellitus: experimental and clinical perspectives [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 384. DOI: 10.1186/s13287-024-03974-z.
- [28] 杨沛霖, 吕灏, 赵冬冬, 等. 胰腺胚胎发育调控机制及胰腺干细胞诱导分化方法研究进展[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(2): 98-101. DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2017.02.023.
- YANG P L, LÜ H, ZHAO D D, et al. Progress on regulation mechanism of pancreatic embryonic development and differentiation of stem cells[J]. *Prog Vet Med*, 2017, 38(2): 98-101. DOI: 10.16437/j.cnki.1007-5038.2017.02.023.
- [29] CHOI K M, SEO Y K, YOON H H, et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation[J]. *J Biosci Bioeng*, 2008, 105(6): 586-594. DOI: 10.1263/jbb.105.586.
- [30] LI Y, ZHENG R, JIANG L, et al. A noncoding variant confers pancreatic differentiation defect and contributes to diabetes susceptibility by recruiting RXRA[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 9771. DOI: 10.1038/s41467-024-54151-y.
- [31] 李泽平, 翟佳佳, 焦慧凤, 等. Neurogenin 3 在胰岛  $\beta$  细胞再生中的研究进展[J]. *陕西医学杂志*, 2018, 47(12): 1667-1669,1673. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7377.2018.12.044.
- LI Z P, ZHAI J J, JIAO H F, et al. Research progress of Neurogenin 3 in islet  $\beta$  cell regeneration[J]. *Shanxi Med J*, 2018, 47(12): 1667-1669,1673. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7377.2018.12.044.
- [32] JOHANSSON K A, DURSUN U, JORDAN N, et al. Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types[J]. *Dev Cell*, 2007, 12(3): 457-465. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.02.010.
- [33] FEKETE N, ROJEWSKI M T, LOTFI R, et al. Essential components for ex vivo proliferation of mesenchymal stromal cells[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2014, 20(2): 129-139. DOI: 10.1089/ten.TEC.2013.0061.
- [34] ARROYAVE F, USCÁTEGUI Y, LIZCANO F. From iPSCs to pancreatic  $\beta$  cells: unveiling molecular pathways and enhancements with vitamin C and retinoic acid in diabetes research[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(17): 9654. DOI: 10.3390/ijms25179654.
- [35] HOGREBE N J, MAXWELL K G, AUGSORNWORAWAT P, et al. Generation of insulin-producing pancreatic  $\beta$  cells from multiple human stem cell lines[J]. *Nat Protoc*, 2021, 16(9): 4109-4143. DOI: 10.1038/s41596-021-00560-y.
- [36] LIU X B, JIANG J, GUI C, et al. Angiopoietin-1 protects mesenchymal stem cells against serum deprivation and hypoxia-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(7): 815-822. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2008.00811.x.
- [37] TAMAMA K, KAWASAKI H, WELLS A. Epidermal growth factor (EGF) treatment on multipotential stromal cells (MSCs). possible enhancement of therapeutic potential of MSC[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 795385. DOI: 10.1155/2010/795385.
- [38] PFEIFER C G, KARL A, BERNER A, et al. Expression of BMP and actin membrane bound inhibitor is increased during terminal differentiation of MSCs[J]. *Stem Cells Int*, 2016: 2685147. DOI: 10.1155/2016/2685147.
- [39] KRAUSE C, GUZMAN A, KNAUS P. Noggin[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(4): 478-481. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.01.007.
- [40] CHEN C, ULUDAĞ H, WANG Z, et al. Noggin suppression decreases BMP-2-induced osteogenesis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(12): 3672-3680. DOI: 10.1002/jcb.24240.
- [41] SAKUMA K, TSUBOOKA-YAMAZOE N, HASHIMOTO K, et al. CDK8/19 inhibition plays an important role in pancreatic  $\beta$ -cell induction from human iPSCs[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 1. DOI: 10.1186/s13287-022-03220-4.
- [42] SKELIN KLEMEN M, DOLENŠEK J, KRIŽANČIĆ BOMBOK L, et al. The effect of forskolin and the role of Epac2A during activation, activity, and deactivation of beta cell networks[J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1225486. DOI: 10.3389/fendo.2023.1225486.

(收稿日期: 2024-12-22)

(本文编辑: 谢诗韵 吴秋玲)