

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00258

NKX6.1 协同 PDX1 诱导人胎肝间充质干细胞分化为胰岛 B 样细胞

唐小龙^{1,2*}, 张荣波², 汪雪峰²

1. 广东省中医院检验科, 广州 510120

2. 安徽理工大学医学院生物工程研究所, 淮南 232001

[摘要] **目的** 探讨 NKX6.1 对 PDX1 诱导人胎肝间充质干细胞(fetal liver-derived mesenchymal stem cells, FL-MSCs) 向胰岛 B 细胞分化的协同作用及可能机制, 以获取足够用于移植的胰岛 B 样细胞。**方法** 构建含 PDX1 与 NKX6.1 双基因的重组腺病毒载体, 用该载体感染 FL-MSCs 并联合相应的细胞因子分步诱导, 检测诱导后的细胞中 PDX1 和 NKX6.1 基因以及 NGN3、NeuroD1/Beta2、MafA 因子和胰岛素等多种胰腺 B 细胞相关分子的表达情况。**结果** 腺病毒载体转染 24 h 后 FL-MSCs 细胞即开始表达 PDX1 与 NKX6.1 基因, 检测显示诱导后的细胞先后开始表达 NGN3、NeuroD1 和 MafA 等因子, 持续稳定表达胰岛素等 B 细胞相关分子; 且这些分子表达存在时序性。**结论** PDX1 与 NKX6.1 联合细胞因子在体外能有效诱导 FL-MSCs 分化为胰岛 B 样细胞; 可能是通过先后活化的 NGN3、NeuroD1 和 MafA 等转录因子, 限定细胞向内分泌前体细胞, 进一步向 B 内分泌前体细胞、B 细胞分化发育。

[关键词] 胰腺十二指肠同源框 1; NKX6.1; 胎肝; 间充质干细胞; 腺病毒载体

[中图分类号] R 329.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0258-06

NKX6.1 combined with PDX1 induces mesenchymal stem cell differentiation into B-like cells

TANG Xiao-long^{1,2*}, ZHANG Rong-bo², WANG Xue-feng²

1. Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of TCM, Guangzhou 510120, Guangdong, China

2. Institute of Biomedical Engineering, Medical College, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, Anhui, China

[Abstract] **Objective** To study the synergistic effect of NKX6.1 and PDX1 in inducing differentiation of fetal liver-derived mesenchymal stem cells(FL-MSCs) into the pancreatic B cells and to explore the underlying mechanisms, so as to obtain enough islet-like body for transplantation. **Methods** Recombinant adenovirus vector harboring both PDX1 and NKX6.1 genes was constructed, and the vector was used to infect FL-MSCs. Then a series of cytokines were used to induce the differentiation of infected FL-MSCs into pancreatic B cells. The expressions of PDX1, NKX6.1 gene, transcription factors NGN3, NeuroD1/Beta2, MafA as well as C-peptide were examined. **Results** PDX1 and NKX6.1 were detected in FL-MSCs cells 24 h after infection; cells began to express NGN3, NeuroD1, and MafA and stably expressed pancreatic B cell related factors including insulin after induction. The expression of these molecules was in a certain order. **Conclusion** PDX1, NKX6.1 combined with a series of cytokines can effectively induce FL-MSCs to differentiate into pancreatic islet B cells *in vitro*, which might be through activation of transcription factors NGN3, NeuroD1, and MafA in turn, inducing FL-MSCs to differentiate towards endocrine precursor cells, B endocrine precursor cells and B cells in turn.

[Key words] pancreatic duodenal homeobox 1; NKX6.1; fetal liver; mesenchymal stem cells; the adenovirus vector

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3): 258-263]

通过基因工程手段, 使干细胞重新编程后转分化为胰腺内分泌 B 细胞, 是治疗糖尿病最有前景的方法, 但当前国内外现有的诱导分化方法尚不能达到临床要求^[1-2]。近年来, 有关内分泌细胞分化分子机制研究取得了较大的进展^[3-4], 胰腺十二指肠同源框蛋白 1(pancreatic and duodenal homeobox factor

1, PDX1) 是胰腺定向分化发育过程中目前已知的最重要转录因子之一, 它启动干细胞向胰腺外分泌和内分泌细胞的分化与发育过程^[3-5], 当进一步向内分泌细胞分化则需要神经元素 3(Neurogenin 3, NGN3)、成对盒基因 4 (paired box gene 4, PAX4)、NK6 转录因子相关 1 (NK6 transcription factor

[收稿日期] 2009-08-01 **[接受日期]** 2009-12-07

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金(2006kj303B). Supported by Natural Science Foundation of Education Department of Anhui Province(2006kj303B).

[作者简介] 唐小龙, 博士, 副教授。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 020-81887233, E-mail: txl9121033@tom.com

related, locus 1, NKX6.1)等多种转录因子协同作用^[3-6]。研究显示 PDX1 与 NGN3 双阳性前体细胞是内分泌细胞共同的前体细胞群,但缺少 NKX6.1 在胚胎发育时期会导致 B 细胞形成异常,而不影响胰腺中其他细胞的分化与发育^[5],提示 B 细胞分化可能也需要 NKX6.1 因子在 PDX1 阳性前体细胞中持续表达。本研究选用人胎肝间充质干细胞(fetal liver-derived mesenchymal stem cells, FL-MSCs),构建 PDX1 及 PDX1 与 NKX6.1 基因共表达腺病毒载体,探索 NKX6.1 是否对 PDX1 在诱导 FL-MSCs 向胰岛 B 样细胞分化具有协同效应,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂 来自广东省妇幼保健院健康成年孕妇自然流产的胚胎(3 个月大小,经患者自愿同意,并经医院医学伦理委员会批准)。Bgl II 等多种限制性内切酶、Klenow 及 T₄ DNA 连接酶均购自 New England Biolabs 公司;CIP(Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal)酶购自 Promega 公司;质粒提取纯化试剂盒和凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司;腺病毒 pAdxsi 载体系统由北京诺赛基因研究中心提供;DH5 α 菌株及 293 细胞由暨南大学孙奋勇博士惠赠,pUC57-NKX6.1 与 pUC57-PDX1 质粒为本所保存。兔抗人 NKX6.1/IgG、NGN3/IgG、MafA/IgG 与 NeuroD1/IgG;鼠抗人 PDX1/IgG 与 Insulin/IgG (购自 American Research Products INCTM公司),HRP 标记的羊抗鼠 IgG、HRP 标记的羊抗兔 IgG、FITC 标记的羊抗兔 IgG、CY5 标记的羊抗鼠 IgG、CY3 标记的羊抗鼠 IgG (购自 eBioscience 公司)。Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司);引物由上海博亚生物工程有限公司合成;RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司;DMEM/F12 培养基、B₂₇ 购自 Gibco 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Hyclone 公司;人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、人碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、人 B 细胞素(human beta cellululin)、胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)、烟酰胺(nicotinamide, NIC)购自 Pepro Tech 公司。

1.2 重组腺病毒的构建

1.2.1 pAdxsi-GFP-CMV-PDX1 腺病毒质粒载体的构建 用 Bgl II/Xho I 分别酶切 pUC57-PDX1 (PDX1 序列上游有 Nhe I 和 Bgl II 酶切位点,下游有 Sal I 和 Xho I 酶切位点)与 pShuttle-GFP-

CMV 穿梭载体,CIP 去磷酸化处理,分别回收 0.9 kb 目的片段与 5.2 kb 载体片段;酶连接得到 pShuttle-GFP-CMV-PDX1。用 I-Ceu I + I-Sce I 双酶切 pAdxsi 骨架质粒与 pShuttle-GFP-CMV-PDX1;酶连接处理好的骨架质粒与目的片段;连接产物转化 DH5 α ,扩增 pAdxsi-GFP-CMV-PDX1 病毒质粒,产物分别进行电泳和测序等鉴定。

1.2.2 pAdxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 腺病毒质粒载体的构建 首先应用 Bgl II 与 EcoR I 分别酶切 pUC57-NKX6.1(NKX6.1 序列上游有 Nhe I 和 Bgl II 酶切位点,下游有 Sal I 和 EcoR I 酶切位点)与 pShuttle-GFP-CMV 穿梭质粒,回收两目的片段后酶连接,获得 pShuttle-GFP-CMV-NKX6.1。再构建 pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 穿梭质粒载体:先用 Xho I 酶切 pUC57-PDX1 后,Klenow 处理,过柱回收再 Nhe I 酶切,回收 0.87 kb 片段;另用 Nhe I 与 Pme I 酶切 pShuttle-GFP-CMV-NKX6.1,CIP 处理后回收 5.7 kb 片段;两目的片段酶连接获 pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1,转化 DH5 α 扩增并抽提 pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 质粒。用 I-Ceu I + I-Sce I 双酶切 pAdxsi 骨架质粒与 pShuttle-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1;酶连接处理好的骨架质粒与目的片段;连接产物转化 DH5 α ,扩增 pAdxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 病毒质粒,产物分别进行电泳和测序等鉴定。

1.2.3 重组腺病毒包装、扩增和滴度测定 Pac I 酶切线性化两重组腺病毒质粒,分别用 Lipofectamine 2000 脂质体转染细胞融合度约 80% 的 293 细胞,3~5 d 后,开始出现明显噬斑,待大部分细胞病变时,收集细胞及上清液,反复冻融 3 次,离心收集上清,继续感染 293 细胞扩增病毒,病毒液于 -80 $^{\circ}$ C 冻存。TCID₅₀法测定病毒滴度。

1.3 FL-MSCs 的分离和培养 无菌取胎肝,剪碎并离散细胞,低速离心去肝实质细胞后收集上清中的有核细胞,于 DMEM/F12、10% FCS 培养液中 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 环境中培养,48 h 后全量换液,以后每 3~4 d 换液。当细胞融合度达 80%~90% 时,用 0.25% 的胰蛋白酶-EDTA (Sigma) 消化,差速贴壁法传代,3 代后用流式细胞术进行细胞鉴定。

1.4 重组腺病毒感染 FL-MSCs FL-MSCs 以 5 \times 10⁷ cells/瓶接种于 75 cm² 培养瓶中;Adxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 与 Adxsi-GFP-CMV-PDX1 重组腺病毒均以 100 PFU/cell 量加入培养瓶中,分别作为腺病毒载体实验 I、II 组,继续培养;同时设 Adxsi-CMV-GFP 感染的空病毒对照组。

1.5 细胞因子诱导 3组细胞均进行细胞因子诱导,分3个诱导阶段:第I阶段在病毒感染48 h后半量换DMEM/F12、10% FCS培养液,以后隔2 d换液1次并持续培养7 d;第II阶段用含EGF、bFGF、B₂₇、葡萄糖酸锌(0.15 ng/ml)、FBS(5%)的DMEM/F12培养液持续诱导4 d;第III阶段换用GLP-1(10 ng/ml)、人B细胞素(10 ng/ml)、NIC(10 mmol/L)、β-巯基乙醇(0.1 mmol/L)、FCS(5%)的DMEM/F12培养液持续诱导7 d。

1.6 RT-PCR检测目的基因表达 分别于实验的不同阶段收集细胞,行RT-PCR检测目的基因表达。引物分别如下:PDX1(上游5'-ACC TTC ACC ACC ACC TCC CG-3',下游5'-TTC AAC ATG ACA GCC AGC TCC AC-3'; 61℃, 310 bp); NKX6.1(上游5'-CAA TGG AAG GCA CCA GAC A-3',下游5'-GCT ACG GGC ATA GAG GGT C-3'; 57℃, 313 bp); GAPDH(上游5'-GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT-3',下游5'-TGA GGA GGG GAG ATT CAG TG-3'; 54℃, 400 bp); NGN3(上游5'-CGC CGG TAG AAA GGA TGA CGC CTC A-3',下游5'-TTG CTC AGT GCC AAC TCG CTC TTA G-3'; 61℃, 250 bp); NeuroD1(上游5'-CCA CGA CAC GAG GAA TTC GCC CAC G-3',下游5'-CTC TGC GTT CAT GGC TTC GAG GTC G-3'; 61℃, 253 bp); MafA(上游5'-AAT GAG CAA CTC CGA CCT GCC CAC C-3',下游5'-GCT GCG GGT AGC CGG TCA TCC AGT A-3'; 62℃, 298 bp)。Insulin(上游5'-AGC CTT TGT GAA CCA ACA CC-3',下游5'-GCT GGT AGA GGG AGC AGA TG-3'; 65℃, 245 bp)。

1.7 双硫腍染色鉴定胰岛B样细胞 锌是胰岛B细胞形成2-锌-胰岛素六聚体不可或缺的成分之一,双硫腍能特异与锌离子整合成亮红色络合物。50 mg双硫腍(DTZ)加入5 ml DMSO溶解作为储备液,取10 ml PBS+0.1 ml上述液,抽滤,组成染色液;各组细胞均行双硫腍染色,37℃温育15 min,镜检。

1.8 免疫细胞化学与间接荧光法检测相关分子的表达 各组不同实验阶段的细胞爬片,固定后Triton X-100透化,牛血清白蛋白封闭后,分别加入一抗(鼠抗人PDX1与Insulin,兔抗人NKX6.1、NeuroD1/Beta2、NGN3、MafA与C-肽),4℃孵育过夜后,再用HRP标记的二抗孵育,DAB显色;或与FITC-羊抗兔IgG、CY5羊抗鼠IgG和(或)CY3羊抗鼠IgG等二抗孵育后镜检,以检测细胞质内

Insulin和PDX1等相关分子表达情况。

1.9 统计学处理 所有数据均用SPSS 10.0软件进行统计学处理,采用方差分析(F检验)判断组间差异,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒载体质粒的鉴定 *Xho*I酶切pAdxsi-GFP-CMV-PDX1,因重组腺病毒载体骨架序列上自带5个*Xho*I酶切位点,PDX1片段下游自带一个*Xho*I酶切位点,因此*Xho*I酶切阳性克隆后有14、11.8、3.5、2.66、2.47、1.45和0.6 kb等7条带,而阴性克隆只有14、11.8、4.0、2.47、1.45和0.6 kb等6条带;pAdxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1用*Xho*I酶切阳性克隆有14、11.8、3.9、2.66、2.47、1.45和0.6 kb等7条带。所有酶切结果均与理论预期一致,表明PDX1与NKX6.1片段已成功插入pAdxsi载体中(图1)。插入目的基因经测序证实分别与人NKX6.1(1.12 kb)和PDX1(0.87 kb)等目的基因cDNA序列完全一致,且连接正确。

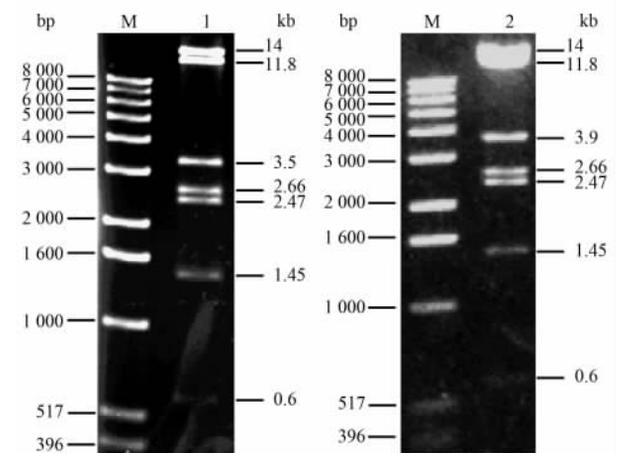


图1 腺病毒载体酶切鉴定结果

Fig 1 Identification of recombinant adenoviruses by digestion

M: Marker; 1: pAdxsi-GFP-CMV-PDX1 digested by *Xho*I; 2: pAdxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 digested by *Xho*I

2.2 流式细胞术鉴定 FL-MSCs FL-MSCs不表达造血细胞标志CD15、CD16、CD19、CD34和CD45;CD29(β12整合素)、基质受体CD44(透明质酸受体)和CD106阳性率分别为97.7%、95.5%和96.8%(图2),表明FL-MSCs是区别于人胎肝中造血细胞的另一类细胞。另外,FL-MSCs不表达与GVHD(移植物抗宿主病)相关的肝组织相容抗原及其共刺激因子,其中HLA-DR阳性率为1.3%,CD80、CD40和CD86的阳性率分别为0.9%、1.0%和0.7%,说明其免疫原性较低。

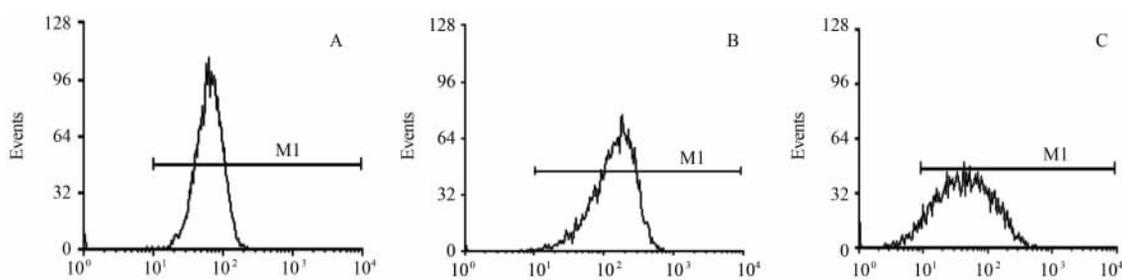


图 2 FL-MSCs 部分细胞表面标志

Fig 2 Expression of some surface markers on FL-MSCs

A: CD29; B: CD44; C: CD106

2.3 转染联合诱导的 FL-MSCs 的细胞形态变化与相关因子表达 从第 2 代后, FL-MSCs 呈典型的长梭形, 呈漩涡状或放射状平行排列(图 3A~3C); Adxsi-GFP-CMV-PDX1 感染后 24 h 即可观察到 GFP 表达(图 3B、3C)。免疫细胞化学染色与间接荧光分别证实 Adxsi-GFP-CMV-PDX1 或 Adxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 腺病毒载体转染 24 h 后实验 I 组 PDX1 与 NKX6.1 基因即开始表达; 从图 3C、3D 可以看出, PDX1 与 NKX6.1 是在相同的细胞核中表达, 但部分细胞核中 PDX1 表达相对较高。

实验 I 组应用第 II 阶段因子(EGF、bFGF、B₂₇ 等)作用 48 h 后, FL-MSCs 形态发生变化, 细胞逐渐变圆并聚集成团, 形成类胰岛小体样结构(图 4A~4K); 双硫脲染色显示胰岛样细胞簇染色阳性, 呈亮红色(图 4C), 说明所诱导的细胞类同胰岛 B 细胞能主动富集锌离子。经第 II 阶段与第 III 阶段因子作用后, 小体中绝大多数细胞为 PDX1⁺ 细胞, 而 NGN3、MafA 等转录因子则主要集中于形成的小体细胞核中(图 4D~4J), 且随诱导阶段的推进, 小体细胞中依次出现 NGN3、NeuroD1 与 MafA 等转录因子的表达; 同时胰岛素则主要集中于 NGN3⁺ 与 MafA⁺ 细胞的细胞质内表达(图 4J、4K)。

而实验 II 组所形成的小体结构不典型且双硫脲染色未见明显亮红色, 细胞因子协同作用后, 免疫细胞化学与间接荧光显示小体中胰岛素表达极弱, 提示单纯 PDX1 不能有效诱导 FL-MSC 转分化为胰岛 B 样细胞。对照组的细胞虽少有形态变化但无胰岛素表达。且在实验 II 组与对照组的细胞中未能检测到 NGN3、NeuroD1/Beta2 与 MafA 等转录因子的表达。

2.4 RT-PCR 检测结果 感染 Adxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 的 FL-MSCs 于 24 h 后至 3 周均可检测到转录因子 PDX1 与 NKX6.1 的稳定

表达; 这两个因子协同作用 4 d 后, 与 B 细胞分化相关因子 NGN3 与 NeuroD1 在实验 I 组的细胞中已有表达; 待用含 EGF、bFGF 等第 II 阶段细胞因子作用后, 细胞中胰岛素开始表达; 在第 III 阶段的细胞因子诱导后, 部分细胞中 MafA 也开始有表达(图 5)。实验 II 组经 3 个阶段诱导作用后仅可测到极低水平的 Insulin 基因表达; 且 NGN3、NeuroD1/Beta2 和 MafA 等基因在实验 II 组与对照组各阶段细胞中均未检测到。

3 讨论

胰腺 B 细胞的分化发育过程中转录因子与信号通路调控机制十分复杂, 多种复杂的信号通路启动干细胞多种转录因子的时序表达, 决定着胰腺的分化与发育进程。早在胰芽开始形成时, 就开始表达的反式作用因子(trans-acting factor)PDX1 通过结合于多种基因启动子上特定的具有转录调节功能的顺式作用元件(cis-acting element), 活化相应的因子转录与表达, 进而启动干细胞向胰腺前体细胞分化^[5-8]。从前体细胞到 B 细胞的发育, 除 PDX1 之外, 尚需一系列转录因子时序表达来调控与限制细胞向 B 细胞分化, 其中 NKX6.1、NGN3 与 PAX4 的有序表达, 对 B 细胞的形成起着决定性作用^[3-6]。研究发现在胚胰组织中, PDX1 与 NKX6.1 是决定胰腺前体细胞向内分泌前体细胞, 进一步向 B 前体细胞与 B 细胞分化发育的重要分子, 联合 PDX1 与 NKX6.1 对诱导获取胰岛素产生细胞可能是有效的方法。因此, 我们构建了 PDX1 及 PDX1 与 NKX6.1 双基因腺病毒载体转染间充质干细胞, 探索 NKX6.1 在 PDX1 对 MSC 重新编程后, 向 B 细胞定向转分化过程中的作用。

结果显示: 单纯 PDX1 不能有效地诱导细胞转分化为具有内分泌前体细胞和(或)B 前体细胞; 而 PDX1 联合 NKX6.1 有效启动了细胞向 B 前体细胞

和 B 细胞分化,内分泌前体细胞相关转录因子 NGN3、NeuroD1/Beta2 等在转染 PDX1 与 NKX6.1 之后 4 d 已有表达,且主要存在于胰岛样小体内 PDX1 阳性的细胞核内(图 4);有报道在早期胰腺的

发育过程中,PDX1、NGN3 与 NeuroD1/Beta2 共表达为内分泌前体细胞的特征,因此 NGN3 与 NeuroD1/Beta2在 PDX1 阳性细胞中表达提示 MSC 细胞已向内分泌前体细胞分化。

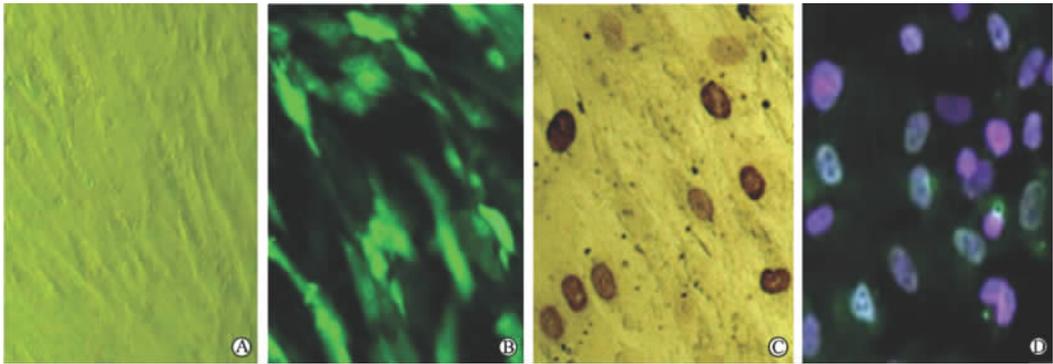


图 3 载体转染后 FL-MSCs 的细胞形态变化与相关因子表达

Fig 3 Morphological change and related protein expression in transfected FL-MSCs

A: The third generation MSCs; B: Fluorescence microscope with GFP expression in cells; C: The expression of PDX1 in transfected MSCs; D: NKX6.1 (FITC) and PDX1 (CY5) expression in transfected FL-MSCs after 7 days induction. Original magnification: $\times 100$ (A, B); $\times 200$ (C, D)

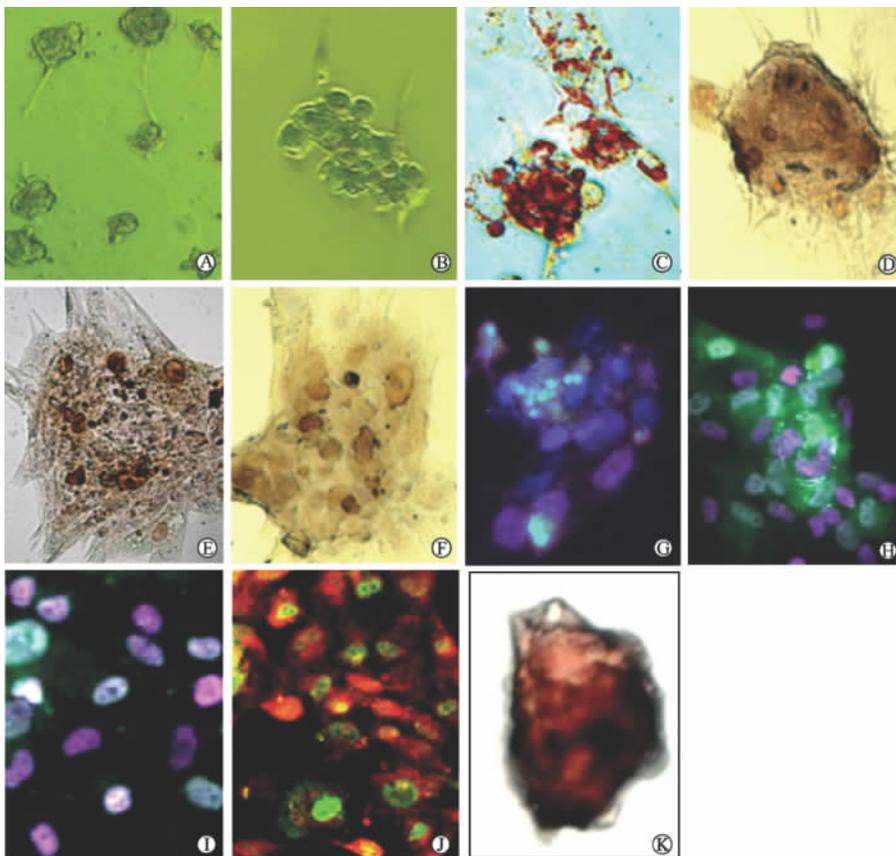


图 4 转染联合细胞因子诱导后 FL-MSCs 的细胞形态变化与相关分子表达

Fig 4 Morphological change and expression of related molecules in islet-like cluster after induction

A, B: Morphology of islet-like body (IB); C: Morphology, positive of dithizone staining; D-F: The expression of PDX1, NKX6.1, NGN3, NeuroD1 and MafA expression in IB, respectively; G: NeuroD1/Beta2 (FITC) and PDX1 (CY5) expression in IB; H: NGN3 (FITC) and PDX1 (CY5) expression in IB; I: MafA (FITC) and PDX1 (CY5) expression in IB; J: MafA (FITC) and insulin (CY3) expression in IB; K: Insulin expression in IB. Original magnification: $\times 50$ (A); $\times 200$ (B-K)

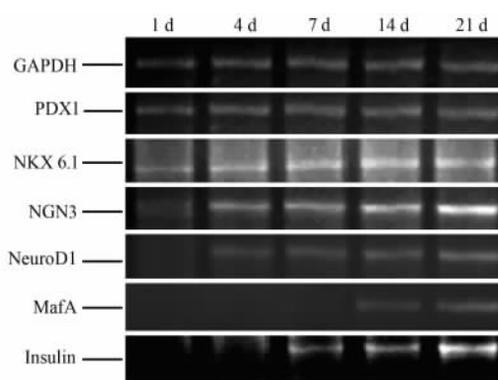


图 5 RT-PCR 检测 FL-MSCs 诱导后不同时间 PDX1、NKX6.1、NGN3、NeuroD1/Beta2、MafA 和 Insulin mRNA 表达

Fig 5 Expression of PDX1, NKX6.1, NGN3, NeuroD1/Beta2, MafA, and Insulin mRNA in FL-MSCs at different time points after induction

为诱导细胞进一步向 B 细胞定向分化与发育,我们用细胞因子进行了联合分步诱导。首先用 EGF、bFGF 与 B₂₇ 联合作用,7 d 后实验组 MSCs 变圆、聚集,形成胰岛样小体(图 4A~4C)。双硫脲染色显示 Adxsi-CMV-PDX1/CMV-NKX6.1 组胰岛样小体染色阳性(图 4C),说明所诱导的细胞与胰岛 B 细胞相似,能主动摄取丰富的锌离子以利于合成与分泌胰岛素;同时 RT-PCR 检测胰岛素 mRNA 阳性(图 5),显示这一阶段的细胞开始具有合成胰岛素(原)等 B 细胞的部分生理功能。

为提供细胞进一步发育成熟为 B 细胞的微环境,采用第 II 阶段与第 III 阶段因子联合作用,约 7 d 后,实验 I 组细胞开始表达影响胰岛素基因转录的一个重要因子 MafA^[7-8](图 4、图 5),且在 PDX1 阳性细胞中表达水平显著高于 PDX1 阴性细胞;同时胰岛素表达水平显著上升(图 5、图 6),且甚至在这一阶段可检测到胰岛素等分子产物 C-肽(后续报道)。该阶段的细胞已能合成并分泌具有生理功能的胰岛素,已具有 B 细胞的主要功能,结果有力地说明 NKX6.1 与 PDX1 对干细胞重新编程,启动细胞向内分泌细胞方向发育相关转录因子 NGN3、NeuroD1/Beta2 与 MafA 等表达,从而有利于细胞进一步向内分泌前体细胞、B 前体细胞甚至 B 细胞方向分化与发育。

总之,本研究结果表明:通过 NKX6.1 与 PDX1 协同作用,可以有效地启动 MSCs 重新编程,诱导其转分化发育为能合成与分泌胰岛素的胰腺 B 功能样

细胞,其可能的机制是通过 NKX6.1 协同 PDX1 转录因子和(或)与其他目前尚不清楚的转录因子及其他因素共同作用,启动细胞重新编程,诱导细胞中 NGN3、NeuroD1/Beta2、MafA 等转录因子时序表达。一方面通过 PDX1、NKX6.1、NGN3、NeuroD1/Beta2 等表达,诱导 MSCs 转分化并限定向内分泌 B 细胞分化发育;另一方面,PDX1、NGN3 与 MafA 还可通过结合于胰岛素启动子上的 A、C、E 等顺式作用元件,有效活化胰岛素基因转录与表达,同时也启动相关蛋白酶的表达,从而诱导细胞具备 B 细胞关键性生理功能。因此通过这一基因编程并联合细胞因子诱导方案,在体外可以有效诱导间充质干细胞转分化为胰腺 B 样功能细胞,这为临床治疗糖尿病获取所需的 B 样功能细胞提供了一种新的诱导方案。

[参考文献]

- [1] Jiang J, Au M, Lu K, Eshpeter A, Korbitt G, Fisk G, et al. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2007, 25:1940-1953.
- [2] Bai L, Meredith G, Tuch B E. Glucagon-like peptide-1 enhances production of insulin in insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells[J]. *J Endocrinol*, 2005, 186:343-352.
- [3] Ye D Z, Tai M H, Linning K D, Szabo C, Olson L K. MafA expression and insulin promoter activity are induced by nicotinamide and related compounds in INS-1 pancreatic beta-cells [J]. *Diabetes*, 2006, 55:742-750.
- [4] Serafimidis I, Rakatzi I, Episkopou V, Gouti M, Gavalas A. Novel effectors of directed and Ngn3-mediated differentiation of mouse embryonic stem cells into endocrine pancreas progenitors[J]. *Stem Cells*, 2008, 26:3-16.
- [5] Hald J, Sprinkel A E, Ray M, Serup P, Wright C, Madsen O D. Generation and characterization of Ptf1a antiserum and localization of Ptf1a in relation to Nkx6.1 and Pdx1 during the earliest stages of mouse pancreas development. [J]. *J Histochem Cytochem*, 2008, 56:587-595.
- [6] Vedtofte L, Bødóvarsdóttir T B, Karlsen A E, Heller R S. Developmental biology of the psammomys obese pancreas: cloning and expression of the neurogenin-3 gene[J]. *J Histochem Cytochem*, 2007, 55:97-104.
- [7] Babu D A, Chakrabarti S K, Garmey J C, Mirmira R G. Pdx1 and BETA2/NeuroD1 participate in a transcriptional complex that mediates short-range DNA looping at the insulin gene[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283:8164-8172.
- [8] Heller R S, Jenny M, Collombat P, Mansouri A, Tomasetto C, Madsen O D, et al. Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development[J]. *Dev Biol*, 2005, 286:217-224.