

胚胎干细胞移植治疗糖尿病的研究进展

李 明, 赵 卉

云南大学生命科学学院, 昆明 650091

摘 要: 糖尿病是一种严重的免疫缺陷性疾病, 目前的治疗方法很难从根本上治愈。近年来的研究表明, 通过诱导胚胎干细胞定向分化为胰岛 β 细胞, 并进行移植治疗糖尿病, 是一种有希望的根治方案。本文就利用胚胎干细胞移植治疗糖尿病的最新进展作一综述。

关键词: 糖尿病; 胚胎干细胞; 胰岛素分泌细胞; β 细胞

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2011.03.09

The Advance of Embryonic Stem Cell Transplantation for Diabetes

LI Ming, ZHAO Hui

School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China

Abstract: Autoimmune destruction of β cells is the predominant cause of type I diabetes. Recently, insulin-secreting cells' transplantation from embryonic stem cells has been proved successful in the treatment of diabetes. This review discusses the advance of embryonic stem cell transplantation for diabetes.

Key words: diabetes; embryonic stem cells; insulin-secreting cells; β cells

糖尿病是一种以持续性高血糖为特征的由于自身免疫而导致的内分泌障碍综合症, 严重危害人类的健康, 发病率和死亡率逐年升高。据《科学新闻》报道, 2008 年中国的发病率已达 9.7%, 病人数量已达 1 亿, 从而超越印度成为世界第一糖尿病发病大国。常规的治疗方法是补充外源的胰岛素而达到降低血糖的目的, 但这种方法需要病人终身定时注射胰岛素, 从而给患者带来沉重的医疗负担, 且不能根治。而移植胰岛虽然可以恢复内源性胰岛素的产生并控制血糖, 但供体的极度匮乏以及移植体由于免疫排斥而难以长期维持^[1]。因此, 找到一种能够高效分泌胰岛素的细胞来源并进行体内移植治疗糖尿病, 成为根治糖尿病研究的重点方向之一。

胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES 细胞) 是一种多能性细胞, 具有无限增殖能力和发育全能性的特点, 同时又具有免疫原性低的特性, 这使

干细胞与受体组织免疫耐受性较好, 体内移植免疫排斥的发生几率低^[2~5]。1998 年人胚胎干细胞分离培养获得成功^[6,7], 对成体干细胞的可塑性研究^[8]极大地推动了干细胞技术的发展。如果将干细胞技术和细胞移植治疗技术相结合, 可以治疗人类多种细胞、组织不可逆损伤所致的疾病, 如帕金森综合症、糖尿病、血液病和肝功能衰竭等。本文将就利用胚胎干细胞移植治疗糖尿病, 特别是 I 型糖尿病作一综述。

1 胚胎干细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞的研究

ES 细胞是一种具有无限增殖能力的细胞, 直接移植入糖尿病模型内有形成畸胎瘤的危险, 因此须将 ES 细胞诱导分化为较成熟的细胞进行移植才能避免移植后畸胎瘤的形成。目前已经有胚

收稿日期: 2011-07-01; 接受日期: 2011-07-29

基金项目: 国家基础科学人才培养基金资助项目 (J1103519); 国家自然科学基金 (地区) 项目 (31060302) 资助。

作者简介: 李 明, 博士, 研究方向为干细胞。Tel: 0871-5031258; E-mail: leeming@ynu.edu.cn

胚胎干细胞成功诱导分化为神经细胞、心肌细胞、上皮细胞、造血细胞等多种细胞的报道^[2,9~12]。将ES细胞定向诱导分化为可分泌胰岛素的细胞,是糖尿病治疗的一条新思路。这方面的研究在2000年取得了突破。Soria等^[13]首次报道了在体外成功诱导小鼠胚胎干细胞分化为胰岛 β 细胞。他们利用转染胰岛素原基因的方法,在分化阶段加入烟酰胺获得了具有分泌胰岛素功能的细胞,将该细胞簇移植到链脲佐菌素(STZ)诱发的糖尿病小鼠体内,高血糖得到了一定程度的纠正,但功效不能持续。次年,Lumelsky等^[14]采用细胞筛选的方法建立了5步法定向诱导小鼠胚胎干细胞,即ES细胞扩增→悬浮培养形成类胚体→选择nestin阳性细胞→胰腺内分泌前体细胞扩增→诱导分化为胰岛素分泌细胞。该法可自发形成胰岛样细胞簇,表达胰高血糖素、胰多肽和生长抑素,将这类细胞移植到STZ糖尿病小鼠中,可形成类似于正常胰岛的形态,移植鼠能够保持体重,并较对照组存活期延长。Assady等^[15]用人ES细胞进行分化诱导,悬浮培养约 10^7 个分散的、未分化的ES细胞,得到胚胎干细胞悬浮培养后形成的类胚体(EBs),将其种植于明胶包被无饲养层的六孔板,在特定培养基条件下培养,并进行免疫组化分析。结果显示,分化诱导细胞从第14 d开始在胞浆中表达胰岛素,表达量持续增加至第19 d,阳性细胞分散于EBs或形成小簇,胰岛素EBs占60%~70%,分化22 d、31 d后胰岛素浓度分别为 $126.2 \pm 17.7 \mu\text{U/mL}$ 和 $315.9 \pm 47 \mu\text{U/mL}$,环境中的葡萄糖浓度不影响胰岛素的分泌。2002年,Hori等^[16]采用前述类似的五阶段培养法,发现分泌胰岛素细胞群表达多种与胰岛 β -细胞相同的组织标记,分泌胰岛素的浓度为约11 300 ng/mg蛋白,相当于分离胰岛的10%,其体外胰岛素释放反应呈葡萄糖依赖性,将其移植到糖尿病小鼠体内可缓解糖尿病症状。在上述研究中,多数都是利用检测胰岛素的分泌水平来评价诱导结果。但Rajagopal等^[17]认为,上述一些方法由于培养基中存在外源性胰岛素,ES细胞摄取培养基中的胰岛素后,导致胰岛素染色阳性的比率过高,而真正分化为胰岛 β 细胞的细胞数目仅为十万分之一。因此,为排除培养基中胰岛素水平导致的假阳性

问题,在之后的研究中,多检测C-肽(C-peptide,胰岛素原经酶切后裂解为一分子的胰岛素和一分子的C-肽)阳性的细胞数。Jiang等^[18]在诱导人胚胎干细胞分化为胰岛素分泌细胞后,检测了C-肽的阳性细胞数,达到4.1%。

2 提高ES源胰岛素分泌细胞分化效率和分化成熟的研究

诱导胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞方向分化是一个极其复杂的体外分化、发育过程。由于目前对其相关的调控网络还所知甚少,所以还需要在现有的诱导方式上加以完善,选用更合理的诱导因子,以获得更多的高纯度和成熟度的胰岛素分泌细胞。

2.1 Activin A

Activin A是从性腺分离出来的一种生长因子,能够促进卵泡刺激素和生长激素的分泌。同时,activin A可在胰岛表达,能促进胰岛激素的释放。有研究显示,activin A可调节胰岛发育,如activinA受体变异的转基因小鼠胰岛不能发育^[19]。Kubo等^[20]报道,activinA可介导ES细胞分化为限定内胚层细胞。而bFGF是一种常用的生长因子,可以促进干细胞的增值和向胰岛素分泌细胞的转化。Jiang等^[21]就利用activin A和bFGF等因子诱导人胚胎干细胞分化为胰岛素分泌细胞,分化末期C肽阳性细胞数达到了15%。

2.2 丁酸钠

胰肠同源域因子(pancreatic and duodenal homeobox factor 1, PDX-1)是调控胰岛素表达的重要转录因子,是 β 细胞成熟的标志^[22]。Goicoa等^[23]研究发现丁酸钠能上调PDX-1的表达,提示丁酸钠可以适用于诱导胚胎干细胞向胰岛 β 细胞的分化。而尼克酰胺可以促进胰岛素分泌细胞的成熟。Ren等^[24]应用activin A、丁酸钠诱导EBs向胰腺前体细胞分化后,序贯以bFGF、尼克酰胺和HGF诱导胰腺前体细胞进一步分化成熟。结果显示分化末期C-肽阳性细胞数达到21%,葡萄糖刺激的胰岛素释放实验证明分化的细胞具有根据血糖水平调节自身胰岛素释放的功能,高糖刺激下的释放水平约为低糖刺激下的6倍。

2.3 Exendin 4

2008年,Pratley等^[25]发现Exendin-4(一种从美国南部大毒蛇唾液腺分泌的天然肠促胰岛素拟似物)能模拟胰升血糖素样肽-1(GLP-1)的作用,具有抑制胰升血糖素分泌、增加葡萄糖刺激的胰岛素分泌、刺激胰岛 β 细胞分化、增殖及抑制 β 细胞凋亡等作用。而GLP-1在胰岛素分泌细胞的分化和发育中可能扮演中一个关键性的作用^[26]。Li等^[27]就利用Exendin-4的这一特性,在末期的分化培养液中添加Exendin-4,发现高剂量的Exendin-4可以促进ES源分化的 β 细胞分泌胰岛素。在此基础上,Sui等^[28]建立了一个新的5步法来诱导胚胎干细胞分化形成胰岛素分泌细胞(图1)。由于锌离子在胰岛素的合成、运输、储存和分泌过程中起到重要的作用^[29,30],利用这一特性,在其中第三步添加 $ZnCl_2$ 可以提高诱导效率。

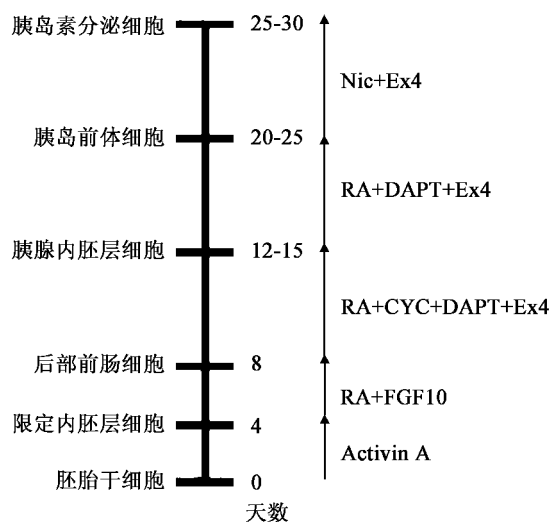


图1 胚胎干细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞示意图^[28]

Fig.1 Sketch of ESCs differentiation protocol^[28].

Nic:尼克酰胺; Ex4:Exendin-4; RA:视黄酸; DAPT: γ -分泌酶抑制剂; CYC:环巴胺; FGF10:成纤维细胞生长因子10

3 移植部位的选择

获得ES源性胰岛素分泌细胞后,如何保证移植治疗糖尿病模型的安全性和有效性就成为一个值得关注的问题。安全性方面,在克服了形成畸胎瘤的风险后,首先应考虑如何避免免疫排斥。

在动物体内,肾包膜下、肝脏和脾脏这三个部位可能属于免疫反应较弱的组织。郝振华等^[31]研究表明,在不应用免疫抑制剂的情况下,异体胰岛移植入上述部位均能发挥作用,可以逆转糖尿病小鼠的高血糖状态,并且可以维持一段时间直到完全排斥,其中肾包膜下移植胰岛存活时间最长。因此,Soria等^[13]选择糖尿病小鼠的脾脏作为移植部位,高血糖症状可以得到纠正,但在移植12周后,部分小鼠的血糖水平又重新升高。Hori等^[16]选择肾脏被膜作为移植部位,3周后发现移植组的血糖和体重得到了控制,血清胰岛素水平有所增加。而Lumelsky等^[14]采用小鼠皮下作为移植部位,移植后糖尿病小鼠能维持体重,但高血糖状态并未得到纠正,这可能跟移植部位不合适、移植细胞分泌的胰岛素量不足有关。而选择糖尿病小鼠其他部位进行移植目前还未见报道,这可能跟其他部位的组织结构和免疫特点不适合作为移植部位有关。而Ren等^[24]根据活体示踪技术的研究表明,移植细胞在植入单个肾包膜下后,ES源分化细胞可迁移到对侧肾脏和脾脏等部位,推测可能是通过血液循环途径到达非移植部位的,但还没检测到迁移到胰腺的分布。

4 ES细胞分化为胰岛素分泌细胞相关机制的探讨

在体外诱导ES细胞分化为成熟的胰岛素分泌细胞要经历内胚层细胞、胰腺前体细胞、内分泌腺前体细胞及成熟 β 细胞等多个阶段,是体内胚胎发育的一种重演。因此,对这一分化发育过程的相关调控因子进行研究,了解其分化机制,对于尽可能的模拟体内发育环境,提高分化效率,使分化细胞群具有比较完善的功能等都有很重要的指导作用。PDX-1于胚胎第9.5 d出现在肠内胚层背侧和腹侧胰芽,早期胰腺表达的PDX-1对胰腺上皮的形成和分化是必需的^[22,32]。敲除小鼠Pdx-1基因将导致胚胎胰腺发育受阻,表现为严重的高血糖和围产期死亡^[33]。因此,ES细胞向胰岛 β 细胞分化过程中,前肠内胚层预定胰区域内Pdx-1基因的表达显得尤为重要。有研究表明,只有在Shh(Sonic Hedgehog,一种强效的细胞间信号蛋白)受抑制的区域Pdx-1才发生作用,使预定胰区域分化。而TGF- β 家族因子活化素 β -B

(activin β -B)与成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2)两者共同作用抑制 *Shh* 基因^[34,35]。在内胚层细胞向胰腺前体细胞分化的过程中,除了 PDX-1 转录因子外,可能还有肝细胞核因子 3 β (hepatic nuclear factor 3 beta, HNF-3 β)、同源盒基因 *hxb9* 编码的转录因子 HB9 和胰岛-1 基因 (*Islet-1* 或 *Isl-1*)。HNF3 β 是 *Pdx-1* 的调控结合蛋白,在胰腺早期发育中大量表达于胰腺的内分泌腺组织,可直接作用 *Pdx-1* 基因调节其转录,控制 *Pdx-1* 在胰岛细胞中选择性表达^[36]。而 HB9 和 *Isl-1* 可能是背侧胰腺内分泌细胞生成所要求的。

在胰腺前体细胞向内分泌腺前体细胞分化的过程中,神经元素 3 (Ngn3, 属于 bHLH 转录因子家族成员) 对启动这一发育过程是必要的^[37]。Ngn3 是胰腺发育过程中短暂表达的蛋白,其表达在胚胎期第 15d 达到高峰,呈点状分布于背侧胰芽,在成熟胰岛细胞中则转为阴性^[38,39]。敲除 *Ngn3* 基因的小鼠胰岛前体细胞和 4 种经典胰岛内分泌细胞均缺失,而 *Pdx-1* 调控 *Ngn3* 的表达,出现内分泌细胞数量增加,外分泌细胞数减少^[40]。另一 bHLH 蛋白成员 *Hes-1* 则通过与 *Ngn3* 沉默子结合来抑制其表达^[41]。因此, *Ngn3* 可能是胰腺内分泌细胞系的定向因子。

在最后的成熟分化阶段, bHLH 转录因子家族成员 NeuroD-2 β 是内分泌细胞完全分化所必须的转录因子,可激活胰岛 β 细胞中胰岛素基因的转录^[42]。而成对同源框 (paired-homeobox) 基因家族的两个成员 Pax-4 和 Pax-6, 特别是 Pax-4 是决定胰岛 β 细胞分化所必需的重要转录因子,胰腺内分泌细胞中可能在 Pax-4 的表达增加时开始进行向胰岛 β 细胞的分化^[43]。Pax-4 在胚胎发育的第 9.5d 胰腺芽中开始表达,然后只在 β 细胞中出现。NK-homeobox 基因家族的 *NKx2.2* 和 *NKx6.1* 在完善胰岛 β 细胞的功能上可能也有重要作用^[44]。

根据以上研究结果,可以将转录因子可能参与胚胎干细胞分化成胰岛 β 细胞各阶段的情况做一概括(见图 2)。当然,参与这一分化过程的调控因子还远不止这些。随着研究的深入,必然会发现更多的因子影响这一分化进程,形成一个更复杂的调控网路。至少从图 2 中我们可以看出,在胚胎胰岛发育的过程中,其每一阶段均有多

种生物因子参与,多种生物因子共同形成了分化调节的微环境,以控制细胞分化的方向。

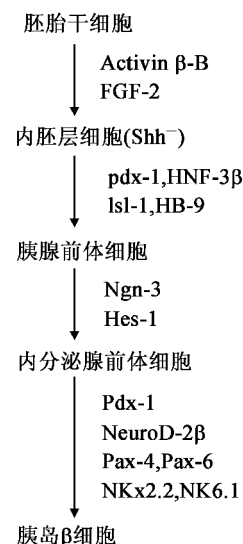


图 2 胚胎干细胞分化为胰岛 β 细胞的分化机制示意图

Fig. 2 Sketch of differentiation mechanism of embryonic stem cells into pancreatic β cells.

5 展望

近年来,在降低血糖水平、控制体重、延长存活时间等方面利用干细胞移植治疗糖尿病模型小鼠取得了一定的进展,但面临的问题还很多,比如远期疗效、症状反复、免疫排斥、癌变以及建立适合不同的 ES 细胞系诱导分化方案等。因此,若想取得突破性进展,还需对胰岛的发育和分化过程、胚胎干细胞分化为胰岛素分泌细胞的过程和调控网络进行深入研究,有针对性的选用更合理的诱导因子和诱导方案,再结合基因工程技术,从而可能获得数量充足、纯度更高、功能良好、可供移植的胰岛 β 细胞,使干细胞技术成为根治糖尿病的一种新途径。

致谢:本论文是在赵卉老师的关心和帮助下完成的,在此谨向所有给予我指导、关心和帮助的老师、同学、朋友和家人致以最真诚的谢意!

参考文献

- [1] Shapiro A M J, Ricordi C, Hering B J, et al. . International trail of the Edmonton protocol for islet transplantation [J].

- New. Engl. J. Med. , 2006,355:1318 – 1330.
- [2] Imamura T, Cui L, Teng R, *et al.* Embryonic stem cell derived embryoid bodies in three-dimensional culture system form hepatocyte like cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Tissue Eng. , 2004,10(11/12):1716 – 1724.
 - [3] Laurson J, Selden C, Hodgson H J. Hepatocyte progenitors in man and in rodents-multiple pathways, multiple candidates [J]. Int. J. Exp. Pathol. , 2005,86:1 – 18.
 - [4] Alien K J, Buck N E, Williamson R. Stem cells for the treatment of liver disease [J]. Transpl. Immunol. , 2005, 15: 99 – 112.
 - [5] Billingham R E, Brent L, Medawar P B. Actively acquired tolerance of foreign cells[J]. Nature,1953,172:603 – 606.
 - [6] Thomson J A, Joseph I E, Shapiro S S, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998,282:1145 – 1147.
 - [7] Shambloott M J, Axelmann J, Shunping W, *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 13726 – 13731.
 - [8] Bjornson C R R, Rietze R L, Reynolds B A, *et al.* Turning brain into blood; a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*[J]. Science,1999,283:534 – 537.
 - [9] Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, *et al.* *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons[J]. J. Cell Sci. ,1995,108:3181 – 3188.
 - [10] Pedersen R A. Studies of *in vitro* differentiation with embryonic stem cells[J]. Reprod. Fertil. Dev. ,1994,6:563 – 568.
 - [11] Klug M G, Soonpa M H, Koh G Y, *et al.* Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts[J]. J. Clin. Invest. ,1996,98: 216 – 224.
 - [12] Choi D, Kim J H, Lim M, *et al.* Hepatocyte-like cells from human mesenchymal stem cells engrafted in regenerating rat liver tracked with *in vivo* magnetic resonance imaging [J]. Tissue Eng. Part C Methods,2008,1:15 – 23.
 - [13] Soria B, Roche E, Berna G, *et al.* Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Diabetes,2000,49:1 – 5.
 - [14] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, *et al.* Differentiation of embryonic stem cell to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets[J]. Science, 2001,292:1389 – 1394.
 - [15] Assady S, Maor G, Amit M, *et al.* Insulin production by human embryonic stem cells [J]. Diabetes, 2001, 50: 1691 – 1697.
 - [16] Hori Y, Rulifson I C, Tsai B C, *et al.* Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,2002,99(25): 16105 – 16110.
 - [17] Rajagopal J, Anderson W J, Kume S, *et al.* Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake [J]. Science, 2003, 299:363.
 - [18] Jiang J J, Melinda Au, Kuanghui L, *et al.* Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2007,25:1940 – 1953.
 - [19] Yamaoka T, Idehara C, Yano M, *et al.* Hypoplasia of pancreatic islets in transgenic mice expressing activin receptor mutants [J]. J. Clin. Invest. , 1998,102:294 – 301.
 - [20] Kubo A, Shinozake K, Shannon J M, *et al.* Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture[J]. Development,2004,131:1651 – 1662.
 - [21] Jiang W, Shi Y, Zhao D, *et al.* *In vitro* derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells [J]. Cell Res. ,2007,17:333 – 344.
 - [22] Dutta S, Cannon M, Peers B, *et al.* PDX:PBX complexes are required for normal proliferation of pancreatic cells during development[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,2001,3:1065 – 1070.
 - [23] Goicoa S, Alvarez S, Ricordi C, *et al.* Sodium butyrate activates genes of early pancreatic development in embryonic stem cells[J]. Cloning Stem Cells,2006,8:140 – 149.
 - [24] Ren M, Yan L, Shang C Z, *et al.* Effects of sodium butyrate on the differentiation of pancreatic and hepatic cells from mouse embryonic stem cells[J]. J. Cell. Biochem. ,2010,109:236 – 244.
 - [25] Pratley R E, Gilbert M. Targeting incretins in type 2 diabetes: role of GLP-1 receptor agonist and DPP-4 inhibitors[J]. Rev. Diabet Stud. ,2008,5(2):73 – 94.
 - [26] Heath V. GLP-1 directs differentiation of human embryonic stem cells[J]. Nat. Rev. Endocrinol. ,2010,123(6):285.
 - [27] Li H, Lam A, Xu A, *et al.* High dosage of Exendin-4 increased early insulin secretion in differentiated beta cells from mouse embryonic stem cells[J]. Acta Pharmacol. Sin. ,2010, 31:570 – 577.
 - [28] Sui J, Jiang F, Shi B. Differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-secreting cells *in vitro* [J]. J. Med. Coll. PLA,2011,26:1 – 12.
 - [29] Nicolson T J, Bellomo E A, Wijesekara N, *et al.* Insulin storage and glucose homeostasis in mice null for the granule zinc transporter ZnT8 and studies of the type 2 diabetes-associated variants[J]. Diabetes,2009,58(9):2070 – 2083.
 - [30] Chimienti F, Devergnas S, Favier A, *et al.* Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules [J]. Diabetes, 2004, 53 (9):2330 – 2337.
 - [31] 郝振华,张群华,石 伟,等. 糖尿病小鼠胰岛移植部位的实验研究[J]. 中华实验外科杂志,2006,312(5):612 – 613.
 - [32] Shiraki N, Yoshida T, Araki K, *et al.* Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm[J]. Stem Cells,2008,26(4):874 – 885.
 - [33] Yoshida T, Murata K, Shiraki N, *et al.* Analysis of gene expressions of embryonic stem-derived Pdx1-expressing cells; implications of genes involved in pancreas differentiation[J]. Dev Growth Differ. , 2009,51(4):463 – 472.
 - [34] van den Brink G R. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract [J]. Physiol. Rev. ,

- 2007,87(4):1343–1375.
- [35] Oliver-Krasinski J M, Kasner M T, Yang J, *et al.*. The diabetes gene *Pdx1* regulates the transcriptional network of pancreatic endocrine progenitor cells in mice[J]. *J. Clin. Invest.*, 2009, 119(7):1888–1898.
- [36] Wilson M E, Scheel D, German M S. Gene expression cascades in pancreatic development[J]. *Mech. Dev.*, 2003, 120(1):65–80.
- [37] Dominguez-Bendala J, Klejn D, Rjbeiro M, *et al.*. TAT-mediated neurogenin 3 protein transduction stimulates pancreatic endocrine differentiation *in vitro*[J]. *Diabetes*, 2005, 54(3):720–726.
- [38] Serafimidis I, Rakatzi I, Episkopou V, *et al.*. Novel effectors of directed and Ngn3-mediated differentiation of mouse embryonic stem cells into endocrine pancreas progenitors[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1):3–16.
- [39] Gu G, Dubauskaite J, Melton D A. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3⁺ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors[J]. *Development*, 2002, 129(10):2447–2457.
- [40] Jensen J, Heller R S, Funder-Nielsen T, *et al.*. Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors; a role for the notch pathway in repression of premature differentiation[J]. *Diabetes*, 2000, 49(2):163–176.
- [41] Gras-Meneur C, Li L, Kopan R, *et al.*. Presenilins, notch dose control the fate of pancreatic endocrine progenitors during a narrow developmental window[J]. *Genes Dev.*, 2009, 23(17):2088–2101.
- [42] Song Y D, Lee E J, Yashar P, *et al.*. Islet cell differentiation in liver by combinatorial expression of transcription factors neurogenin-3 beta2, and RIPE3b1[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 354(2):334–339.
- [43] Sosa-Pineda B. The gene *Pax4* is an essential regulator of pancreatic beta-cell development[J]. *Mol. Cells*, 2005, 18(3):289–294.
- [44] Schisler J C, Fueger P T, Babu D A, *et al.*. Stimulation of human and rat islet beta-cell proliferation with retention of function by the homeodomain transcription factor NKx6.1[J]. *Mol. Cell Biol.*, 2008, 28(10):3465–3476.