

TGF β 信号通路调节胰岛 β 细胞增殖的功能研究

刘廷生 张方方 金亮*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198)

摘要 该研究主要探讨了转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF β)信号通路对胰岛 β 细胞增殖的影响。以Min6为细胞模型, 使用TGF β 信号通路激活剂TGF β 1、抑制剂SB-431542分别激活和阻断TGF β 信号通路, 采用CCK-8细胞活性检测法检测Min6细胞活性, 并用流式细胞分选术(fluorescence activated cell sorting, FACS)检测Min6细胞中Ki-67阳性(Ki-67⁺)细胞比例。最后用TGF β 1、SB-431542体外处理C57BL/6J小鼠胰岛48 h, 免疫荧光检测小鼠胰岛中胰岛素、Ki-67双阳性(Insulin⁺&Ki-67⁺)细胞数量。结果显示, 使用TGF β 1处理Min6细胞、小鼠胰岛, Min6细胞活性下降, Ki-67⁺ Min6细胞数量减少, 小鼠胰岛中Insulin⁺&Ki-67⁺细胞数量减少; 使用SB-431542处理Min6细胞、小鼠胰岛, Min6细胞活性上升, Ki-67⁺ Min6细胞数量增加, 小鼠胰岛中Insulin⁺&Ki-67⁺细胞数量增多。综上所述, 抑制TGF β 信号通路可促进胰岛 β 细胞的增殖能力, 该研究为胰岛 β 细胞再生疗法的发展提供了理论支持。

关键词 TGF β 信号通路; 胰岛 β 细胞; 细胞增殖

Function Study of TGF β Signaling Pathway on Islet β Cell Proliferation

LIU Tingsheng, ZHANG Fangfang, JIN Liang*

(School of life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the effect of TGF β (transforming growth factor β) signaling pathway on islet β cell proliferation. Firstly, TGF β 1, an activator of TGF β signaling pathway, and SB-431542, an inhibitor of TGF β signaling pathway, were used to activate and prohibit the TGF β signaling pathway in Min6 cells respectively. Then, CCK-8 was used to determine the cell viability of Min6 cells treated by TGF β 1 or SB-431542. FACS (fluorescence activated cell sorting) was applied to detect the proportion of Ki-67⁺ (Ki-67 positive) cells in each group after treatment of TGF β 1 or SB-431542 for 48 h. Finally, islets isolated from C57BL/6J mice were treated by TGF β 1 or SB-431542 for 48 h, and Insulin⁺&Ki-67⁺ cells in mice islets were detected by immunofluorescence. Results showed that cell viability of Min6 cells, the proportion of Ki-67⁺ Min6 cells and the amount of Insulin⁺&Ki-67⁺ cells of mouse islets were reduced by treatment of TGF β 1 compared with control groups. And cell viability of Min6 cells, the proportion of Ki-67⁺ Min6 cells and the amount of Insulin⁺&Ki-67⁺ cells of mice islets were upregulated by treatment of SB-431542 compared with control groups. These data reveal that inhibition of TGF β signaling pathway promotes islet β cell replication, which indicates a new therapy for diabetes.

Keywords TGF β signaling pathway; islet β cell; cell proliferation

收稿日期: 2020-02-29 接受日期: 2020-06-08

国家自然科学基金面上项目(批准号: 81570696)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18761874536, E-mail: ljstemcell@cpu.edu.cn

Received: February 29, 2020 Accepted: June 8, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81570696)

*Corresponding author. Tel: +86-18761874536, E-mail: ljstemcell@cpu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5305>

糖尿病是一种由于持续性高血糖而导致的代谢紊乱疾病,其结果最终将导致机体组织器官的损害,特别是眼、肾、心血管及神经系统。糖尿病主要被分成三类,一型糖尿病(type 1 diabetes, T1D)、二型糖尿病(type 2 diabetes, T2D)和妊娠型糖尿病, T1D和T2D患者几乎占据了所有糖尿病病例,仅仅T2D就占据了总糖尿病病例约90%^[1]。糖尿病发病率高,2000年全球糖尿病患者约有1.51亿,而2019年达到了4.63亿,预估2045年该病患者将达到7亿,所以糖尿病是一种现在、将来都将长期困扰人类的疾病^[2]。T1D、T2D根源在于胰岛 β 细胞减少导致胰岛素供给不足,目前,糖尿病患者主要借助传统药物治疗控制血糖、降低血压,但这些疗法并没有从根本上改善胰岛 β 细胞状况^[3]。

早期在啮齿动物上,学者发现在正常生理条件或一些外在损害情况下,胰岛 β 细胞可通过成熟的胰岛 β 细胞进行细胞分裂而得到补充、更新,于是调节胰岛 β 细胞的增殖就成了糖尿病治疗的新方向^[4]。到今天,在小鼠和大鼠上关于胰岛 β 细胞增殖调控机制的研究取得了很多进展,其中包含G蛋白联受体信号转导、JAK-STAT信号通路(JAK/STAT signaling pathway)、TGF β (transforming growth factor β)超家族信号通路(TGF β superfamily signaling pathway)等对胰岛 β 细胞增殖的调控,并且研究范围正朝多样化发展^[5-8]。在人体实验上,主要使用DNA甲基化、组蛋白修饰、微小RNA和长链非编码RNA等表观遗传学方法调控人胰岛 β 细胞增殖,并取得众多成果,另外,化合物调控人胰岛 β 细胞增殖的相关研究也同时在开展^[9-12]。虽然通过调控胰岛 β 细胞增殖从而根治糖尿病看起来前景光明,但还存在一些问题,目前,关于胰岛 β 细胞增殖的机制仍尚未完全阐明,需要进一步深入研究。

TGF β 信号通路上游由TGF β 超家族配体、一型TGF β 受体(type 1 transforming growth factor β receptor, TBR1)和二型TGF β 受体(type 2 transforming growth factor β receptor, TBR2)构成,下游一般由Smads以及Smads相关转录因子构成,通过转录调控参与细胞代谢^[13]。TGF β 信号通路与细胞增殖密切相关,但其对细胞增殖的促进或抑制作用受细胞外环境、细胞种类等因素影响^[14]。例如,在健康细胞和早期癌细胞中,该通路具有肿瘤抑制功能,包括细胞周期停滞和凋亡。然而,其在晚期癌症中的激活却可促进肿瘤发生^[15]。我们课题组前期研究也发

现,抑制TGF β 信号通路可促进胰腺祖细胞增殖^[16]。TGF β 1作为配体,与TGF β 受体结合可激活TGF β 信号通路。SB-431542是TBR1的特异性抑制剂,常用来阻断TGF β 信号通路^[17]。为探索TGF β 信号通路是否参与调节胰岛 β 细胞增殖,本课题将在体外以Min6和小鼠胰岛为细胞模型,使用TGF β 1、SB-431542分别对该信号通路进行激活、阻断处理,从而研究TGF β 信号通路对胰岛 β 细胞增殖的影响,为胰岛 β 细胞再生疗法的发展提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和小鼠 小鼠胰岛素瘤细胞Min6受赠于南京医科大学韩晓教授实验室。8周龄雄性C57BL/6J小鼠购自扬州大学比较医学中心(许可证号:SCXK(苏)2017-0007),并且通过中国药科大学药理学动物实验中心(许可证号:SYXK(苏)2018-0019)的实验动物福利伦理审查,严格按照国家实验动物管理条例相关原则,确保在遵循实验动物福利伦理的前提下开展动物实验。

1.1.2 主要试剂 五型胶原酶、SB-431542购自Sigma-Aldrich公司;兔源p-Smad2/3抗体、兔源Smad2抗体购自沈阳万类生物科技有限公司;羊抗兔二抗购自Santa公司;CCK-8试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;Ki-67流式抗体、羊抗鼠二抗(Alexa Fluor[®] 647)、羊抗兔二抗(Alexa Fluor[®] 488)购自Abcam公司;鼠源胰岛素抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;兔源Ki-67抗体购自CST公司;TGF β 1购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 多功能酶标仪(VT05504-0998)购自美国伯腾仪器有限公司;流式细胞仪(Accuri C6)购自BD公司;激光共聚焦显微镜(LSM-700)购自蔡司公司。

1.2 方法

1.2.1 Min6细胞培养 Min6细胞复苏后,使用含15% FBS(fatal bovine serum)、1%青霉素-链霉素、50 μ mol/L β -巯基乙醇的DMEM高糖培养基培养于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂细胞培养箱中。每2天更换1次培养基,待细胞融合率为70%~80%时,使用胰酶消化液消化细胞,按照1:2的比例传代。本研究使用TGF β 1、SB-431542分别激活和阻断TGF β 信号通路,对照均为溶剂对照,TGF β 1溶剂为双蒸水,SB-431542溶剂为DMSO。

1.2.2 Western blot Min6细胞按每孔 1×10^7 个细胞接种于6孔板,第二天分别使用5 ng/mL TGF β 1、5 μ mol/L SB-431542处理细胞,48 h后使用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液裂解细胞,提取蛋白,加入适量蛋白上样缓冲液,于100 °C加热10 min。每孔蛋白上样量为20 μ g,使用10%浓度的SDS-PAGE分离蛋白质,使用半干转法将蛋白质转至PVDF膜,于5%脱脂牛奶中(磷酸化蛋白使用5% BSA)室温封闭1 h,一抗4 °C过夜孵育,二抗室温孵育2 h,使用化学发光成像仪分析蛋白含量。

1.2.3 CCK8检测Min6增殖 Min6细胞按每孔 5×10^3 个细胞接种于96孔板,使用不加TGF β 1和SB-431542的培养基培养,12 h后更换为100 μ L含不同浓度TGF β 1(2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL)和SB-431542(2.5 μ mol/L、5 μ mol/L、10 μ mol/L)的培养基,每个浓度设定6个重复孔,实验重复3遍,培养0、24、48、72 h后,每孔加入10 μ L CCK-8,继续于37 °C培养2 h后,使用酶标仪检测450 nm处的吸光度(D)值。

1.2.4 流式细胞分选技术检测Min6增殖 Min6细胞按每孔 2×10^5 个细胞接种于12孔板,每个浓度设定3个重复孔,经含不同浓度TGF β 1和SB-431542的培养基处理48 h后。用0.25%胰酶消化,收集细胞,500 \times g离心5 min;固定、破膜后每管加入1 μ L Ki-67流式抗体,4 °C避光孵育45 min,洗涤后于350 \times g离心5 min,用100 μ L含有1% FBS的PBS重悬细胞沉淀,使用流式细胞仪检测。

1.2.5 小鼠胰岛分离 通过32 G针头将预冷的2 mL五型胶原酶(1.5 mg/mL)经胆总管注射进小鼠胰腺中,37 °C水浴摇床80 r/min条件下消化28 min。使用梯度离

心法富集胰岛,在显微镜下手动挑选胰岛转至含400 μ L RPMI 1640培养基的24孔板中,培养12 h后挑选形态完整的胰岛至96孔板中,每孔接种10个胰岛。

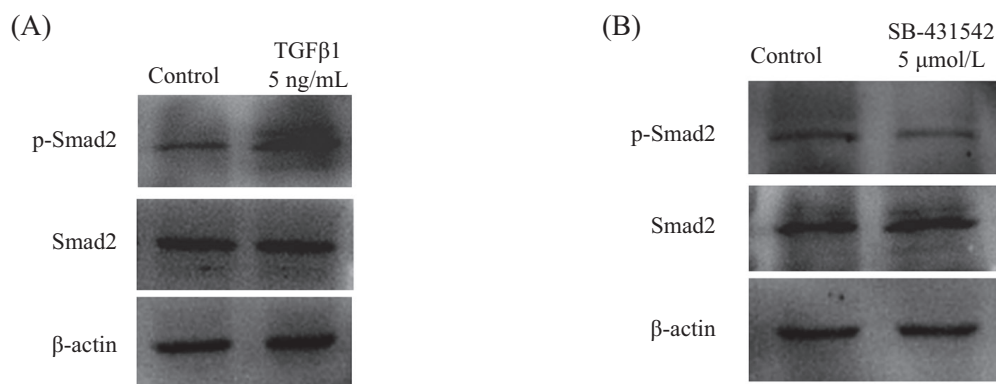
1.2.6 免疫荧光 使用含10 μ mol/L SB-431542和10 ng/mL TGF β 1的RPMI 1640培养基(含10% FBS、1%青霉素-链霉素)培养小鼠胰岛48 h。吸弃培养基,加入200 μ L PBS清洗5 min,重复2遍;每孔加入100 μ L 4%多聚甲醛,室温固定10 min;200 μ L PBS清洗5 min,重复2遍。每孔加入100 μ L 0.3% Triton X-100,室温穿孔5 min。200 μ L PBS清洗5 min,重复2遍;每孔加入100 μ L一抗(1:200稀释比例),4 °C反应过夜。200 μ L PBS清洗5 min,重复3遍;每孔加入100 μ L带荧光标记的二抗,室温避光反应1 h。200 μ L PBS清洗5 min,重复3遍;将胰岛吸至共聚焦小皿,滴加10 μ L抗荧光淬灭封片剂(含DAPI),使用激光共聚焦显微镜拍照。

1.2.7 统计学分析 应用统计学软件SPSS 22.0对数据进行分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两组之间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF β 1激活TGF β 信号通路

为了验证TGF β 1、SB-431542对TGF β 信号通路的激活和抑制调节作用,我们分别使用5 ng/mL TGF β 1、5 μ mol/L SB-431542处理Min6细胞48 h,然后进行Western blot实验,检测用TGF β 1、SB-431542处理Min6细胞后,细胞中p-Smad2的含量变化情况。结果如图1所示,与对照组相比,TGF β 1处理组Min6细胞中Smad2的磷酸化水平明显升高,SB-431542处



A: TGF β 1对Min6细胞中Smad2磷酸化水平的影响; B: SB-431542对Min6细胞中Smad2磷酸化水平的影响。

A: effect of TGF β 1 on p-Smad2 level in Min6 cell; B: effect of SB-431542 on p-Smad2 level in Min6 cell.

图1 检测Min6细胞Smad2磷酸化水平

Fig.1 Measurement of p-Smad2 in Min6 cell

理组 Min6 细胞中 Smad2 的磷酸化水平明显下降, 说明 TGFβ1、SB-431542 分别能激活和抑制 Min6 细胞中的 TGFβ 信号通路。

2.2 激活 TGFβ 信号抑制胰岛 β 细胞增殖

为了研究 TGFβ 信号通路是否调控 Min6 细胞增殖, 我们使用不同浓度 TGFβ1 处理 Min6 细胞 0、24、48、72 h。结果如图 2 所示, 当 Min6 细胞孵育 48 h 和 72 h 后, 相对于溶剂对照组, 每个浓度 TGFβ1 均能显著抑制 Min6 细胞增殖, 且 TGFβ1 浓度越高, Min6 增殖被抑制程度越大(图 2)。

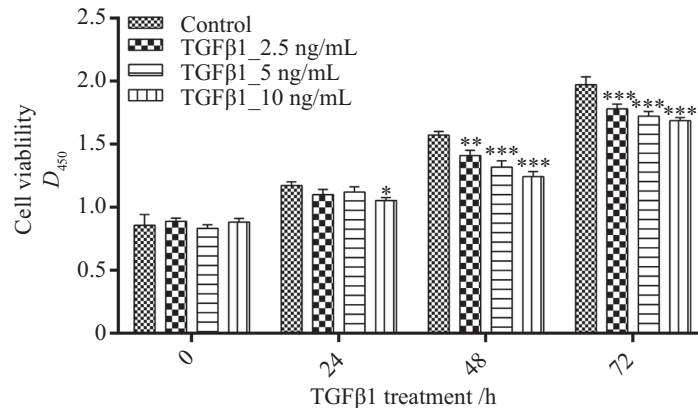
使用不同浓度 TGFβ1 孵育 Min6 细胞, 48 h 后用 0.25% 胰酶消化细胞, 加入 1 μL Ki-67 抗体, 4 °C 避光孵育 45 min, 利用流式细胞术检测, 计算各 TGFβ1 浓度组中 Ki-67⁺ 细胞百分比。相对于溶剂对照组, 各 TGFβ1 浓度组中 Ki-67⁺ Min6 细胞比例降低, 且下降程度与 TGFβ1 浓度呈正相关(图 3)。

为了进一步验证 TGFβ1 是否真的抑制胰岛 β 细胞的增殖, 我们选择胰岛原代细胞为研究对象, 用 10 ng/mL TGFβ1 体外处理小鼠胰岛原代细胞 48 h, 收集胰岛标记胰岛素、Ki-67 和细胞核, 使用激光共聚焦显微镜进行拍照。与对照组相比, 10 ng/mL TGFβ1 处理组原代胰岛 β 细胞中 Ki-67⁺ 细胞数量减少(图 4)。

2.3 抑制 TGFβ 信号通路促进胰岛 β 细胞增殖

SB-431542 是 TGFβ 信号通路的抑制剂之一, 因此, 我们使用不同浓度的 SB-431542 分别处理 Min6 细胞 0、24、48、72 h, 然后检测细胞活性。结果发现, SB-431542 处理 Min6 细胞 48 h 和 72 h 后, 相对于溶剂对照组, 各个浓度的 SB-431542 都能显著促进 Min6 细胞增殖, 且浓度越高细胞增殖速度越快(图 5)。

接着使用不同浓度 SB-431542 处理 Min6 细胞 48 h, 用 0.25% 胰酶消化, 收集细胞, 固定、破膜后每

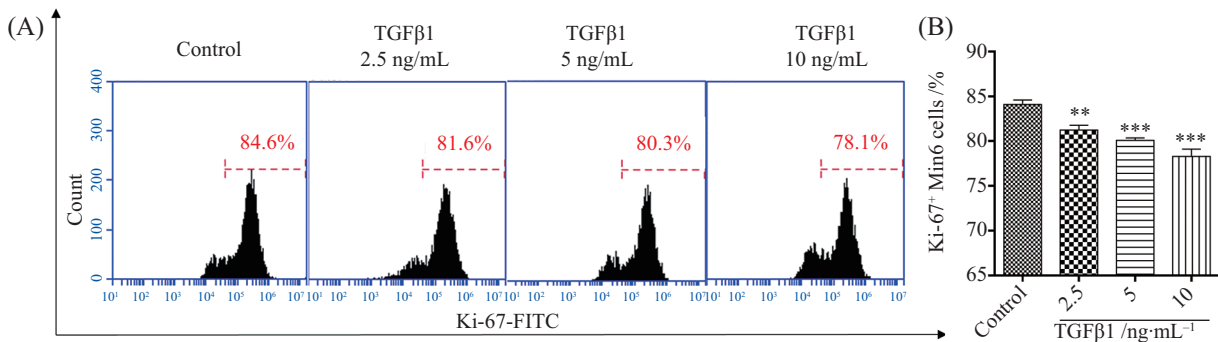


n=3; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, 与对照组相比。

n=3; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with control group.

图2 检测Min6细胞活性

Fig.2 Min6 cell viability measurement

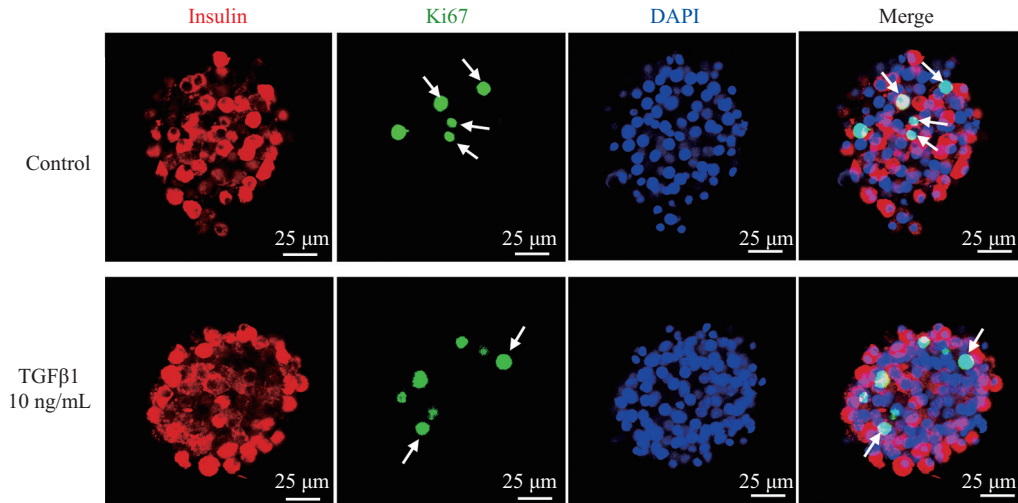


A: 流式细胞术分选Min6细胞中Ki-67⁺细胞; B: TGFβ1处理48 h后各组Ki-67⁺细胞率。n=3; **P<0.01, ***P<0.001, 与对照组相比。

A: Ki-67⁺ Min6 cell sorting using FACS; B: proportion of Ki-67⁺ Min6 cells treated by TGFβ1 for 48 h; n=3; **P<0.01, ***P<0.001 compared with control group.

图3 TGFβ1对Min6细胞中Ki-67⁺细胞数量的影响

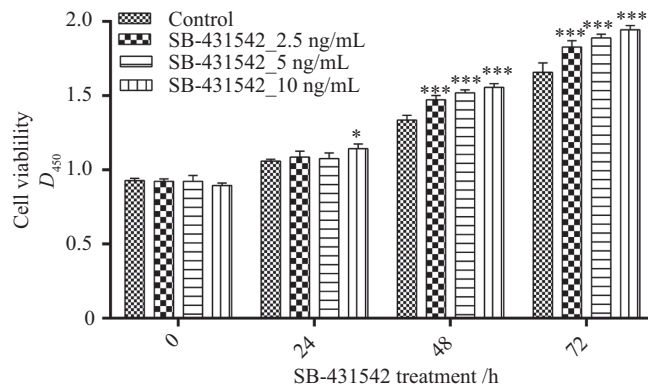
Fig.3 Effect of TGFβ1 on the number of Ki-67⁺ Min6 cells



白色箭头所指为Insulin⁺&Ki-67⁺细胞。
White arrows indicate Insulin⁺&Ki-67⁺ cells.

图4 免疫荧光检测TGFβ1对原代胰岛β细胞增殖的影响

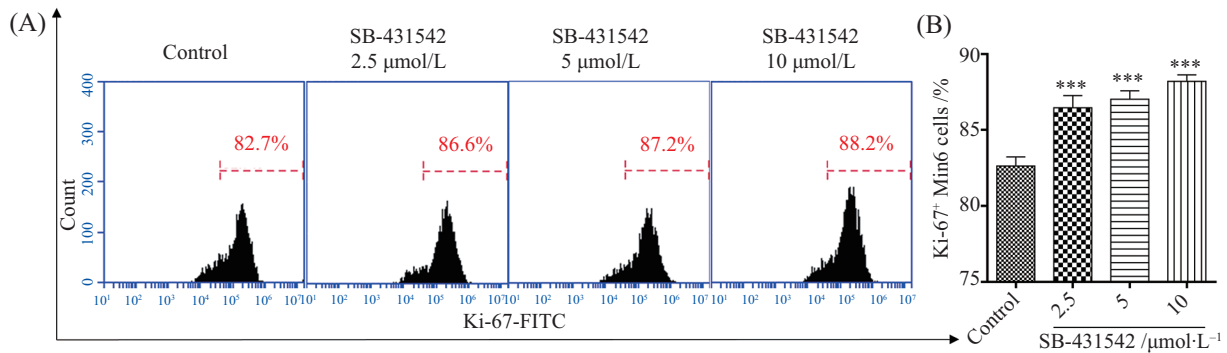
Fig.4 Effect of stimulating TGFβ1 signal path on the proliferation of primary islet β cells



n=3; *P<0.05, ***P<0.001, 与对照组相比。
n=3; *P<0.05, ***P<0.001 compared with control group.

图5 检测Min6细胞活性

Fig.5 Min6 cell viability measurement

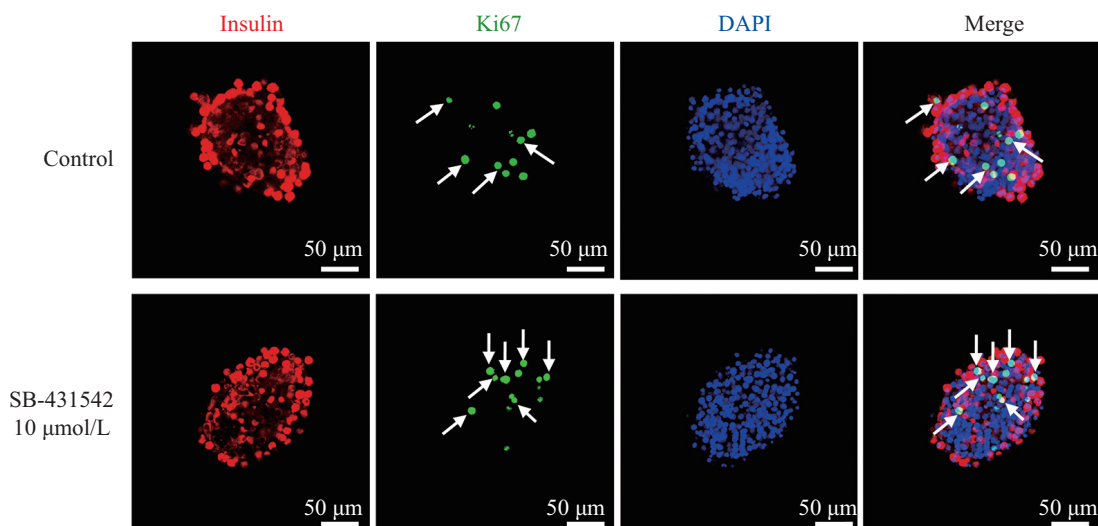


A: 流式细胞术分选Min6细胞中Ki-67⁺细胞, 百分比为Ki-67⁺细胞比例; B: SB-431542处理48 h后各组Ki-67⁺细胞率。n=3; ***P<0.001, 与对照组相比。

A: Ki-67⁺ Min6 cell sorting using FACS, the percentage is the ratio of Ki-67⁺ Min6 cells; B: proportion of Ki-67⁺ Min6 cells treated by TGFβ1 for 48 h; n=3; ***P<0.001 compared with control group.

图6 SB-431542对Min6细胞中Ki-67⁺细胞数量的影响

Fig.6 Effect of SB-431542 on the number of Ki-67⁺ Min6 cells



白色箭头所指为Insulin⁺&Ki-67⁺细胞。

White arrows indicate Insulin⁺&Ki-67⁺ cells.

图7 免疫荧光检测SB-431542对原代胰岛 β 细胞增殖的影响

Fig.7 Effect of SB-431542 on the proliferation of primary islet β cells

个样品加入1 μ L Ki-67抗体, 4 $^{\circ}$ C避光孵育45 min。利用流式细胞术检测, 计算每个SB-431542浓度组中Ki-67⁺细胞率。相对于溶剂对照组, 各SB-431542浓度组中Ki-67⁺ Min6细胞比例上升, 上升程度与SB-431542浓度呈正相关(图6)。

最后, 用含10 μ mol/L SB-431542的RPMI 1640培养基(含10% FBS、1%青霉素-链霉素)培养小鼠胰岛48 h, 收集胰岛标记胰岛素、Ki-67和细胞核。激光共聚焦结果显示, 与对照组相比, 10 μ mol/L SB-431542浓度组原代胰岛 β 细胞中Ki-67⁺细胞数量增加(图7)。

3 讨论

糖尿病常规治疗方法有外源性胰岛素补充和胰岛移植, 但这两种治疗方法的治疗效果都不够理想。不规范补充外源性胰岛素容易导致诸如糖尿病肾病、心脏病等糖尿病并发症^[18]; 而胰岛移植也存在手术风险、慢性免疫排斥和合适的胰岛移植源等问题, 自2000至2017年, 只有约1 500糖尿病患者接受胰岛移植治疗, 相对于几亿基数的糖尿病患者显得杯水车薪^[19]。

为了维持胰岛 β 细胞数量稳定、保证糖代谢正常运行, 胰岛 β 细胞可通过自我更新和分化两种方式得到补给, 即成熟的胰岛 β 细胞分裂产生新的胰岛 β 细胞和胰腺导管细胞分化成胰岛 β 细胞^[4,20-21]。例如, 在肥胖引起的胰岛素耐受早期, 胰岛 β 细胞可通过代偿性增殖以分泌更多的胰岛素来满足糖代谢需要^[22]。

近些年, 人们已经尝试从增加患者自身胰岛 β 细胞数量角度展开研究, 试图促进现有胰岛 β 细胞增殖或调控胰导管细胞等胰腺中其他细胞分化成胰岛 β 细胞^[3]。

TGF β 信号通路参与多种细胞的增殖过程, 抑制TGF β 信号通路可促进精原细胞^[23]、前列腺癌细胞^[24]增殖, 另外FUTAKUCHI等^[25]也报道, 在骨微环境下抑制TGF β 信号通路不利于肿瘤细胞生长。针对TGF β 信号对胰岛 β 细胞增殖的影响已经有了一些研究, EL-GOHARY等^[26]使用转基因小鼠特异性敲除胰岛 β 细胞中的*TBR1*和*TBR2*, 发现*TBR2*特异性敲除可促进小鼠胰岛 β 细胞增殖, 但*TBR1*特异性敲除不影响胰岛 β 细胞增殖。CHEN团队^[27]使用转基因小鼠特异性敲除胰岛 β 细胞中的*TBR2*, 发现在胰腺部分切除手术完成后一周左右, *TBR2*特异性敲除对胰岛 β 细胞增殖有促进作用。DHAWAN^[28]通过向小鼠体内注射TGF β 1和SB-431542从而实现TGF β 信号通路的激活与阻断, 发现抑制TGF β 信号通路可促进胰岛 β 细胞的增殖。以上三人的研究结果都表明: 抑制TGF β 信号通路可促进小鼠体内胰岛 β 细胞增殖。但有趣的是, EL-GOHARY的研究发现, *TBR1*特异性敲除对胰岛 β 细胞增殖无显著影响, 但DHAWAN使用SB-431542促进胰岛 β 细胞增殖, 理论上却是通过特异性抑制TBR1实现对TGF β 信号通路的阻断而实现的。

本文使用TGF β 1作为TGF β 信号通路激动剂, 以

SB-431542为该通路抑制剂。TGF β 1作为配体,与TBR2结合后招募并磷酸化TBR1,磷酸化的TBR1再通过磷酸化激活下游蛋白Smad2/3,磷酸化的Smads聚合物进入细胞核与转录因子结合,然后靶向一些基因实现转录激活或抑制调控^[13]。而SB-431542通过特异性抑制TBR1,阻断TGFB信号通路。首先,我们以Min6细胞Smad2的磷酸化水平高低衡量TGFB信号通路活跃状态,借助Western blot验证了TGF β 1、SB-431542分别能激活和抑制TGFB信号通路。然后使用CCK-8细胞活性检测法和流式细胞分选技术考察了TGFB信号通路对胰岛素瘤细胞系Min6增殖的影响,结果表明,抑制TGFB信号通路将促进Min6细胞增殖。除了以Min6细胞为细胞模型外,本实验还考察了TGFB信号通路对原代胰岛 β 细胞增殖的影响。实验选择用10 μ mol/L SB-431542和10 ng/mL TGF β 1处理小鼠胰岛48 h,然后利用免疫荧光检测小鼠胰岛中的Insulin⁺&Ki-67⁺细胞。结果表明,即使在原代胰岛 β 细胞模型上,SB-431542也可促进胰岛 β 细胞增殖,而TGF β 1也抑制胰岛 β 细胞增殖,实验结果与在Min6细胞模型上得到的一致。本文虽然证明,抑制TGFB信号通路可显著促进胰岛 β 细胞增殖,但TGFB信号通路介导胰岛 β 细胞增殖的机制尚未完全阐明,接下来我们将进一步采用qPCR、Western blot等分子手段进行系统研究。

综上所述,以Min6和小鼠胰岛为实验对象的体外实验结果与DHAWAN^[28]的实验结果一致,抑制TGFB信号通路可促进胰岛 β 细胞增殖。这表明TGFB信号通路可作为一个潜在的糖尿病治疗研究方向。

参考文献 (References)

- [1] SHI Y, HU F B. The global implications of diabetes and cancer [J]. *Lancet*, 2014, 383(9933): 1947-8.
- [2] FEDERATION I D. IDF Diabetes atlas, 9th [M/OL]. 2019, <https://diabetesatlas.org/en/resources/>.
- [3] JUNG K Y, KIM K M, LIM S. Therapeutic approaches for preserving or restoring pancreatic β -cell function and mass [J]. *Diabetes Metab J*, 2014, 38(6): 426-36.
- [4] DOR Y, BROWN J, MARTINEZ O I, et al. Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation [J]. *Nature*, 2004, 429(6987): 41-6.
- [5] STEWART A F, HUSSAIN M A, GARCÍA-OCAÑA A, et al. Human β -cell proliferation and intracellular signaling: part 3 [J]. *Diabetes*, 2015, 64(6): 1872-85.
- [6] LI Y, DENG S, PENG J, et al. MicroRNA-223 is essential for maintaining functional β -cell mass during diabetes through inhibiting both FOXO1 and SOX6 pathways [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(27): 10438-48.
- [7] KUMAR A, KATZ L S, SCHULZ A M, et al. Activation of Nrf2 is required for normal and ChREBP α -augmented glucose-stimulated β -cell proliferation [J]. *Diabetes*, 2018, 67(8): 1561-75.
- [8] LI J, WANG Z, REN L, et al. Antagonistic interaction between Nodal and insulin modulates pancreatic β -cell proliferation and survival [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 79.
- [9] SHEN W, TAYLOR B, JIN Q, et al. Inhibition of DYRK1A and GSK3B induces human β -cell proliferation [J]. *Nat Commun*, 2015, doi: 10.1038/ncomms9372.
- [10] WANG P, FIASCHI-TAESCH N M, VASAVADA R C, et al. Diabetes mellitus—advances and challenges in human β -cell proliferation [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(4): 201-12.
- [11] DAI C, HANG Y, SHOSTAK A, et al. Age-dependent human β cell proliferation induced by glucagon-like peptide 1 and calcineurin signaling [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(10): 3835-44.
- [12] WANG P, ALVAREZ-PEREZ J C, FELSENFELD D P, et al. A high-throughput chemical screen reveals that harmine-mediated inhibition of DYRK1A increases human pancreatic beta cell replication [J]. *Nat Med*, 2015, 21(4): 383-8.
- [13] BUDI E H, DUAN D, DERYNCK R. Transforming growth factor- β receptors and smads: regulatory complexity and functional versatility [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(9): 658-72.
- [14] SEOANE J, GOMIS R R. TGF- β family signaling in tumor suppression and cancer progression [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017, 9(12): a022277.
- [15] COLAK S, TEN DIJKE P. Targeting TGF- β signaling in cancer [J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(1): 56-71.
- [16] ZHANG F, MA D, LIU T, et al. Expansion and maintenance of CD133-expressing pancreatic ductal epithelial cells by inhibition of TGF- β signaling [J]. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(18): 1236-52.
- [17] LAPING N J, GRYGIELKO E, MATHUR A, et al. Inhibition of transforming growth factor (TGF)- β 1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF- β type I receptor kinase activity: SB-431542 [J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 62(1): 58.
- [18] AMERICAN DIABETES A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus [J]. *Diabetes Care*, 2012, doi: 10.2337/dc12-s064.
- [19] SHAPIRO A M J, POKRYWCZYNSKA M, RICORDI C. Clinical pancreatic islet transplantation [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(5): 268-77.
- [20] XU X, D'HOKER J, STANGÉ G, et al. Cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas [J]. *Cell*, 2008, 132(2): 197-207.
- [21] NIR T, MELTON D A, DOR Y. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(9): 2553-61.
- [22] CERF M E. Beta cell dynamics: beta cell replenishment, beta cell compensation and diabetes [J]. *Endocrine*, 2013, 44(2): 303-11.
- [23] MORAVEJI S F, ESFANDIARI F, TALEAHMAD S, et al. Suppression of transforming growth factor-beta signaling enhances spermatogonial proliferation and spermatogenesis recovery following chemotherapy [J]. *Hum Reprod*, 2019, 34(12): 2430-42.
- [24] MILLENA A C, VO B T, KHAN S A. JunD is required for proliferation of prostate cancer cells and plays a role in transforming growth factor- β (TGF- β)-induced inhibition of cell proliferation

- [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(34): 17964-76.
- [25] FUTAKUCHI M, LAMI K, TACHIBANA Y, et al. The effects of TGF- β signaling on cancer cells and cancer stem cells in the bone microenvironment [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 5117.
- [26] EI-GOHARY Y, TULACHAN S, WIERSCH J, et al. A smad signaling network regulates islet cell proliferation [J]. *Diabetes*, 2014, 63(1): 224-36.
- [27] CHEN L, ZHOU X, PANG Y, et al. TGF- β signalling prevents pancreatic beta cell death after proliferation [J]. *Cell Prolif*, 2015, 48(3): 356-62.
- [28] DHAWAN S, DIRICE E, KULKARNI R N, et al. Inhibition of TGF- β signaling promotes human pancreatic β -cell replication [J]. *diabetes*, 2016, 65(5): 1208.