

hiPSCs分化为胰岛素分泌细胞过程中microRNA的动态表达研究

蒋锦杏¹ 蒋豆蔻² 张文³ 欧阳志斌¹ 任莉莉¹ 李宁^{1*}

¹深圳市人民医院(暨南大学第二临床医学院, 南方科技大学第一附属医院)生物治疗室, 深圳 518020;

²深圳市人民医院(暨南大学第二临床医学院, 南方科技大学第一附属医院)病理科, 深圳 518020;

³深圳市人民医院(暨南大学第二临床医学院, 南方科技大学第一附属医院)急诊科, 深圳 518020)

摘要 该文探讨了人诱导多能干细胞定向分化为胰岛素分泌细胞过程中microRNA的动态表达变化情况。利用慢病毒技术构建可报告*insulin*基因表达的hiPSCs细胞株(INS-promoter-hiPSCs), 通过“五步法”方案将其诱导为胰岛素分泌细胞; 分别收集hiPSCs、内胚层细胞、原肠管细胞、胰腺祖细胞和胰岛素分泌细胞, 并提取细胞总RNA; 利用S-Poly(T) plus技术检测多种microRNA在胰岛β细胞分化过程中的动态表达水平。结果显示, 成功构建的INS-hiPSCs细胞株可报告胰岛素基因表达, 在体外可将其诱导分化为胰岛素分泌细胞, 流式分选获得约16% EGFP表达阳性的纯胰岛素分泌细胞, 分选好的细胞可用于下游实验; 进一步验证分化过程中各组细胞的miRNAs表达, miR-495-3p、miR-199-5p、miR369-5p的PCR扩增循环阈值(Ct值)大于35, 说明其表达水平极低; miR-152-3p、miR-133a-3p、miR-181c-5p、miR-410-3p、miR-487a-3p、miR-338-3p、miR-30-5p、miR-655-3p、miR-26a-3p、miR-182-5p、miR210-3p、miR-342-3p和miR-589-5p在分化过程中持续上调表达; miR-302a-3p、miR-222-3p和miR-802的表达水平在分化过程中显著下调。因此, 诱导分化稳定表达的INS-promoter-hiPSCs细胞株可以成功实现对胰岛素阳性细胞的分选及富集, 为后续筛选调控干细胞分化的miRNA提供了有力保障; 并进一步验证分析了19种可能参与调控胰岛β细胞胚胎发育的micorRNA的动态表达变化, 为多能干细胞定向分化为胰岛细胞的机制研究提供新线索, 为体外获得功能性的胰岛β细胞奠定相关理论基础。

关键词 糖尿病; 人诱导多能细胞; 胰岛素分泌细胞; microRNA

Dynamic Expression of microRNA in hiPSCs During Differentiation into Insulin-Producing Cells

JIANG Jinxing¹, JIANG Doukou², ZHANG Wen³, OUYANG Zhibin¹, REN Lili¹, LI Ning^{1*}

¹Cytherapy Laboratory, Shenzhen People's Hospital (the Second Clinical Medical College, Jinan University; the First Affiliated Hospital, Southern University of Science and Technology), Shenzhen 518020, China; ²Department of Pathophysiology, Shenzhen People's Hospital (the Second Clinical Medical College, Jinan University; the First Affiliated Hospital, Southern University of Science and Technology), Shenzhen 518020, China; ³Emergency Department, Shenzhen People's Hospital (the Second Clinical Medical College, Jinan University; the First Affiliated Hospital, Southern University of Science and Technology), Shenzhen 518020, China)

收稿日期: 2020-08-12 接受日期: 2020-09-21

国家自然科学基金(批准号: 81700683)、广东省自然科学基金(批准号: 2017A030310646)、深圳市科技计划项目(批准号: JCYJ20180228164515747、JCYJ20190807150615224)和深圳市国际合作研发项目(批准号: GJHZ20190821162003794)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18026949471, E-mail: lining.yatu@hotmail.com

Received: August 12, 2020 Accepted: September 21, 2020

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81700683), Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No.2017A030310646), Science and Technology Project of Shenzhen (Grant No.JCYJ20180228164515747, JCYJ20190807150615224), and Shenzhen Collaborative Innovation Project (Grant No.GJHZ20190821162003794)

*Corresponding author. Tel: +86-18026949471, E-mail: lining.yatu@hotmail.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5383>

Abstract This study aimed to analyze the dynamic expression changes of microRNAs during the differentiation of human induced pluripotent stem cells into insulin-secreting cells. First, the research synthesized the insulin gene promoter sequence and downstream of the enhanced EGFP (green fluorescent protein) gene sequence, infected the hiPSCs by the lentiviral vector carrying the above sequence, to obtain INS-promoter-hiPSCs cell line, and they were induced into insulin-secreting cells by the five-step method. Definitive endoderm cells, pancreatic progenitor cells, and insulin-secreting cells were collected. miRNAs associated with pancreas development were predicted and the S-Poly(T) plus assay was used to detect their expression levels. The results showed that INS-promoter-hiPSCs can report insulin expression, which can be differentiated into insulin-secreting cells by induction scheme, and accumulate about 16% of insulin-secreting cells by flow sorting. Further verification showed that the expression levels of miR-495-3p, miR-199-5p and miR-369-5p were extremely low. miR-152-3p, miR-133A-3P, miR-181C-5p, miR-410-3p, miR-487a-3p, miR-338-3p, miR-30-5p, miR-655-3p, miR-2655-3p, miR-182-5p, miR210-3P, miR-342-3p, and miR-589-5p were continuously up-regulated during the differentiation. The expression levels of miR-302A-3P, miR-222-3p and miR-802 were significantly down-regulated during differentiation. Therefore, the stable INS-promoter-hiPSCs cell line can be successfully induced to differentiate into insulin-secreting cells and enrich by flow sorting. By verifying and analyzing the dynamic expression changes of 19 miRNAs that might be involved in regulating the directional differentiation of islet cells, the research reveals new clues for the mechanism of the directional differentiation of islet cells from pluripotent stem cells.

Keywords diabetes; human induced pluripotent cells; insulin-producing cells; microRNA

糖尿病已成为全球性的多发病和难治性的代谢性疾病^[1]。传统的药物治疗或重组胰岛素治疗并不能延缓糖尿病的病程进展,仍有很多患者发生急性或慢性并发症。胰岛移植能够有效改善患者的糖代谢紊乱情况和生活质量,但胰岛供体不足和移植后免疫排斥反应极大地限制了这种治疗的应用。干细胞的细胞来源丰富、免疫原性低,将干细胞定向诱导分化为胰岛素分泌细胞(insulin-producing cells, IPCs)已逐渐成为人们寻找胰岛 β 细胞替代细胞的新策略^[2]。国内外科学家利用小分子化合物和细胞因子等物质在体外模拟胰腺发育微环境,将胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导多能干细胞(induced pluripotent cells, iPSCs)诱导分化为胰岛 β 细胞用以治疗糖尿病^[3-4],但这些分化的胰岛素分泌细胞在基因表达、感受葡萄糖刺激和胰岛素分泌功能等方面仍与成熟的胰岛 β 细胞存在差异,严重地制约了其临床转化与应用^[5]。

miRNAs(microRNAs)是一类大小为20~25个碱基的内源性非编码RNA分子,具有调节基因表达活性的功能,其作为转录后调控的关键分子在干细胞分化和胰腺胚胎发育过程中的作用不容忽视^[6]。近年来研究发现,miR-24、miR-26、miR-148、miR-182家族可靶向结合胰岛素抑制子,促进胰岛素合

成;在培养的小鼠 β 细胞中,以上基因的特异性敲除会下调胰岛素启动子活性和胰岛素 mRNA的水平;基因敲除小鼠则会表现出糖尿病症状^[7];miR-7还能够调控胰岛 β 细胞发育和胰岛素分泌,小鼠胚胎胰腺组织特异性敲降 miR-7可使胰岛素阳性细胞增加、胰岛素分泌量提高^[8]。miR-200b通过抑制 *Zeb1* 基因促进 β 细胞凋亡^[9]。miR-802在转基因小鼠中的过表达可导致胰岛素转录和分泌受损^[10]。这些研究表明,miRNA在胰腺发育、胰岛细胞分化、胰岛素分泌以及胰岛 β 细胞增殖与凋亡调控中发挥重要作用^[11]。miRNAs分子成员众多,在 iPSCs 定向分化为胰岛细胞过程中有哪些 miRNAs 起到关键性作用及相关机制仍不完全明确。

因此,本研究将人诱导多能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)定向诱导分化为胰岛素分泌细胞,分析多种 microRNA 在分化过程中的动态表达水平,筛选出可能参与调控胰岛细胞分化的 microRNA,为探讨干细胞分化为胰岛 β 细胞的机制和优化体外分化方案提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及慢病毒 hiPSCs细胞株由中国科学

院广州生物医药与健康研究院提供, 该细胞株是利用携带4个转录因子(Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc)的病毒载体转染人皮肤成纤维细胞重编程获得; 大鼠胰岛β细胞来源的NIT-1细胞株由中国科学院深圳先进技术研究院张键研究员惠赠; Insulin promoter-EGFP-CV130-SV40-puromycin和EGFP-CV130-SV40-puromycin慢病毒由上海吉凯基因化学技术有限公司制备。

1.1.2 主要试剂 DMEM/LOW GLUCOSE、DMEM/F12培养基、胰酶等购自Hyclone公司; mTeSR™1培养基购自STEM CELL Technologies公司; Matrigel购自BD Biosciences公司; 诱导分化过程中使用的DMEM/F12(含 GlutaMax)、F12(含 GlutaMax)、IMDM(含 GlutaMax)、DMEM/H(含 GlutaMax)、ITS-X supplement、B-27 supplement和N-2 supplement均购自Gibco公司; 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、骨形成蛋白4(bone morphogenetic protein 4, BMP4)和Activin A购自Peprotech公司; wortmannin购自Selleck公司; Nicotinamide、exendin-4、Vitamin C和Retinoic Acid购自Sigma公司; TRIzol购自Thermo公司; Prime Script™ RT reagent Kit和SYBR Premix Ex Taq™ II Kit购自TaKaRa公司; Lipofectamine™ 2000 购自Invitrogen公司; S-Poly(T) plus miRNA qPCR-assay primer set、One Step miRNA cDNA Synthesis Core Reagent Kit、Probe Premix HS SM-Taq购自深圳市盎然生物技术有限公司; Pure-Link® Genomic DNA Mini Kit购自Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 人诱导多能干细胞培养 在培养瓶中加入适量的Matrigel工作液, 室温包被1 h后弃掉Matrigel工作液, 加入适量的mTeSR™1培养基, 接种hiPSCs细胞后置于37 °C、5% CO₂培养箱内培养, 每天更换新鲜培养基, 培养5~7天待细胞融合率达到80%~90%时可进行传代。

1.2.2 构建INS-promoter-hiPSCs细胞株 利用网站Promoter2.0 Prediction Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>)预测 *insulin* 启动子核心区段并合成 *insulin* 启动子序列, 并在该序列下游连接绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, EGFP)序列, 将 Insulin promoter-EGFP片段克隆至慢病毒载体(CV130-SV40-puromycin), 随后利用293T细胞制备慢病毒颗粒。利用携带 *insulin* 基因启动子的慢病毒、EGFP

阳性对照慢病毒和阴性对照慢病毒分别感染hiPSCs细胞, 感染48 h后使用1 μg/mL嘌呤霉素(puromycin, puro)进行药物筛选, 用以构建稳定的细胞株。

1.2.3 构建的细胞株基因表达情况 根据Pure-Link® Genomic DNA Mini Kit说明书提取EGFP阳性对照细胞、阴性对照细胞和INS-promoter-hiPSCs细胞的基因组DNA, 检测EGFP基因整合情况, EGFP上游引物序列为5'-TGC TTC AGC CGC TAC CC-3', 下游引物序列为5'-AGT TCA CCT TGA TGC CGT TC-3'; GAPDH上游引物序列为5'-ACA TCA TCC CTG CCT CTA CTG-3', 下游引物序列为5'-ACC ACC TGG TGC TCA GTG TA-3'。PCR反应条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 57 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 40个循环; 72 °C 10 min。

1.2.4 INS-promoter-hiPSCs细胞体外定向分化为胰岛素分泌细胞 本研究模拟体内胰腺发育过程, 改进文献的经典诱导方法^[12], 利用“五步法”诱导方案于不同时期在体外分别添加特定的细胞因子和小分子化合物诱导hiPSCs细胞分化为胰岛素分泌细胞。S1期为限定性内胚层(definitive endoderm, DE): 诱导培养基为含0.2% BSA、1:200 N-2 supplement、1:100 B-27 supplement、100 μg/L Activin A和1 μmol/L wortmannin的DMEM/F12, 每天更换新鲜诱导液, 连续诱导4天。S2期为原肠管内胚层(primitive gut tube, PG): 诱导培养基为含有0.5% BSA、1:200 ITS-X supplement、0.25 mmol/L Vitamin C、50 ng/mL KGF/FGF7的DMEM/F12, 每天更换新鲜诱导液, 连续诱导2天。S3期为胰腺祖细胞1(pancreatic progenitor 1, PP1): 诱导培养基为含2% BSA、1:200 ITS-supplement、0.25 mmol/L Vitamin C、1:100 B27-supplement、2 μmol/L RA、50 ng/mL KGF/FGF7、100 ng/mL Noggin的F12/IMDM培养基(F12:IMDM为1:1), 每天更换新鲜诱导液, 连续诱导4天。S4为胰腺祖细胞2(pancreatic progenitor 2, PP2): 诱导培养基为含2% BSA、1:100 ITS-supplement、0.25 mmol/L Vitamin C、1:100 N2-supplement、100 nmol/L RA、20 ng/mL KGF/FGF7、50 ng/mL EGF的DMEM/H, 每天更换新鲜诱导液, 连续诱导5天。S5期为胰岛素分泌细胞(insulin-producing cells, IPCs): 诱导培养基为含1:200 ITS-supplement、10 ng/mL BMP4、10 ng/mL bFGF、10 mmol/L Nicotinamide、50 ng/mL Exendin-4的DMEM/F12, 每天更换新鲜培养基, 连续诱导7~15

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Sequence (5'→3')	产物大小/bp Product length /bp
<i>OCT4</i>	GGG GTT CTA TTT GGG AAG GTA T TAC TGG TTC GCT TTC TCT TTC G	196
<i>FOXA2</i>	CAA GGG CCA GAG TTC CAC AA CCT GCA ACC AGA CAG GGT AT	160
<i>SOX17</i>	CAT CGG GGA CAT GAA GGT GAA TCC TTA GCC CAC ACC ATG AAA	129
<i>PDX-1</i>	CAG TTG AAT GGG GCG GCA A CAA GGT GGA GTG CTG TAG GAG	227
<i>MAFA</i>	GTT GAG CGG AGA ACG GTG ATT T CTG AGA AGA GAA CGA AGG AGG G	189
<i>NKX6.1</i>	CGG GGA CCC TTT GCT ATT TTT G TAC GCA GTG CAT TTG GTG GT	127
<i>HNF6</i>	AGG ATA GAG GCA ACA CAC CC AGA CTC CTC CTT CTT GCG TTC	187
<i>insulin</i>	AAC GAG GCT TCT TCT ACA CAC C TGT TCC ACA ATG CCA CGC TTC	148
<i>GAPDH</i>	ACA TCA TCC CTG CCT CTA CTG ACC ACC TGG TGC TCA GTG TA	232
<i>CXCR4</i>	CTC CTC TTT GTC ATC ACG CTT CC GGA TGA GGA CAC TGC TGT AGA G	127
<i>NANOG</i>	ATA ACC TTG GCT GCC GTC TC AGC CTC CCA ATC CCA AAC AA	149

天。

1.2.5 细胞总RNA提取和Real-time PCR Trizol法提取诱导期间收集的各组细胞的总RNA, 测定纯度和浓度后按照试剂盒说明书建立反应体系合成cDNA并完成Real-time PCR检测, 动态监测hiPSCs分化为胰腺β细胞的过程中相关转录因子的表达变化, 以*GAPDH*为内参, 反应条件为: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性15 s, 60 °C扩增35 s, 40个循环。以hiPSCs作为对照, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各基因的相对表达量, 引物序列见表1。

1.2.6 S-Poly(T) plus RT-qPCR法检测miRNAs的表达 按照Trizol法进行细胞总RNA的提取, 测定纯度和浓度后按照One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit说明书合成cDNA, 按照S-Poly(T) plus miRNA qPCR-assay说明书配制反应体系检测miRNAs的表达水平, 并以cel-miR-54-5p为内参, 反应条件为: 95 °C预变性3 min, 1个循环; 95 °C变性10 s, 60 °C扩增30 s, 40个循环, 引物及探针序列见表2。

1.2.7 流式细胞仪分析 流式分选纯化诱导分化

的胰岛素分泌细胞。将构建的INS-promoter-hiPSCs细胞株进行体外诱导分化, 在分化终末阶段将细胞培养物消化成单细胞悬液, 400 ×g离心10 min, 用含5% BSA的PBS溶液洗涤3次, 并将细胞浓度调整为 1×10^6 个/mL, 流式细胞仪分选EGFP阳性的细胞。

1.2.8 统计分析 所有实验数据来源于3次独立的重复实验。实验结果利用GraphPad Prism 5软件进行统计分析, 并用 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学差异检测采用双尾Student's *t*-test检验。 $P \leq 0.05$ 代表统计学差异显著。

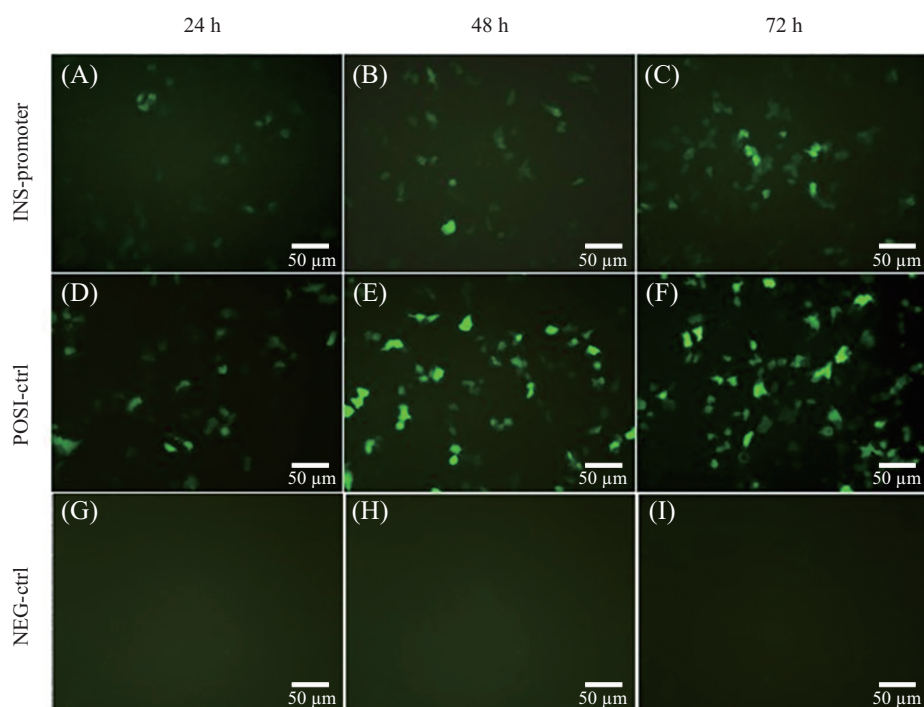
2 结果

2.1 INS-promoter-hiPSCs细胞系的构建

通过序列比对, 我们发现, 大鼠*insulin*基因启动子区序列与设计合成的人*insulin*基因启动子序列有部分同源性。为了初步验证构建的*insulin*基因表达报告载体的功能性, 我们首先利用携带*insulin*基因启动子序列的慢病毒、EGFP阳性对照慢病毒和阴性对照慢病毒分别感染大鼠NIT-1细胞株, 使用荧光显微镜观察感染24 h、48 h、72 h后细胞EGFP的荧

表2 microRNA引物序列
Table 2 The primer sequences of microRNA

miRNAs名称 miRNAs name	编号 Serial number	序列 Sequence
hsa-miR-375	MIMAT0000728	UUU GUU CGU UCG GCU CGC GUG A
hsa-miR-338-3p	MIMAT0000763	UCC AGC AUC AGU GAU UUU GUU G
hsa-miR-210-3p	MIMAT0000267	CUG UGC GUG UGA CAG CGG CUG A
hsa-miR-369-5p	MIMAT0001621	AGA UCG ACC GUG UUA UAU UCG C
hsa-miR-487a-3p	MIMAT0002178	AAU CAU ACA GGG ACA UCC AGU U
hsa-miR-655-3p	MIMAT0003331	AUA AUA CAU GGU UAA CCU CUU U
hsa-miR-181c-5p	MIMAT0000258	AAC AUU CAA CCU GUC GGU GAG U
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	AGC UAC AUC UGG CUA CUG GGU
hsa-miR-26a-2-3p	MIMAT0004681	CCU AUU CUU GAU UAC UUG UUU C
hsa-miR-302a-3p	MIMAT0000684	UAA GUG CUU CCA UGU UUU GGU GA
hsa-miR-495-3p	MIMAT0002817	AAA CAA ACA UGG UGC ACU UCU U
hsa-miR-410-3p	MIMAT0002171	AAU AUA ACA CAG AUG GCC UGU
hsa-miR-182-5p	MIMAT0000259	UUU GGC AAU GGU AGA ACU CAC ACU
hsa-miR-199a-5p	MIMAT0000231	CCC AGU GUU CAG ACU ACC UGU UC
hsa-miR-802	MIMAT0004185	CAG UAA CAA AGA UUC AUC CUU GU
hsa-miR-589-5p	MIMAT0004799	UGA GAA CCA CGU CUG CUC UGA G
hsa-miR-133a-3p	MIMAT0000427	UUU GGU CCC CUU CAA CCA GCU G
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	UGU AAA CAU CCU CGA CUG GAA G
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	UCU CAC ACA GAA AUC GCA CCC GU
hsa-miR-152-3p	MIMAT0000438	UCA GUG CAU GAC AGA ACU UGG
cel-miR-54-5p	MIMAT0020773	AGG AUA UGA GAC GAC GAG AAC A
Probe		CAA TTT/3IABkFQ



A~C: INS-promoter慢病毒载体感染NIT-1细胞; D~F: EGFP阳性对照慢病毒载体感染NIT-1细胞; G~I: 阴性对照慢病毒感染NIT-1细胞。

A-C: the INS-promoter lentivirus vector infected NIT-1 cells; D-F: EGFP-positive control lentivirus vector infected NIT-1 cells; G-I: negative control lentivirus infected NIT-1 cells.

图1 INS-promoter慢病毒载体感染NIT-1细胞

Fig.1 NIT-1 cells are infected by the Ins-promoter vector

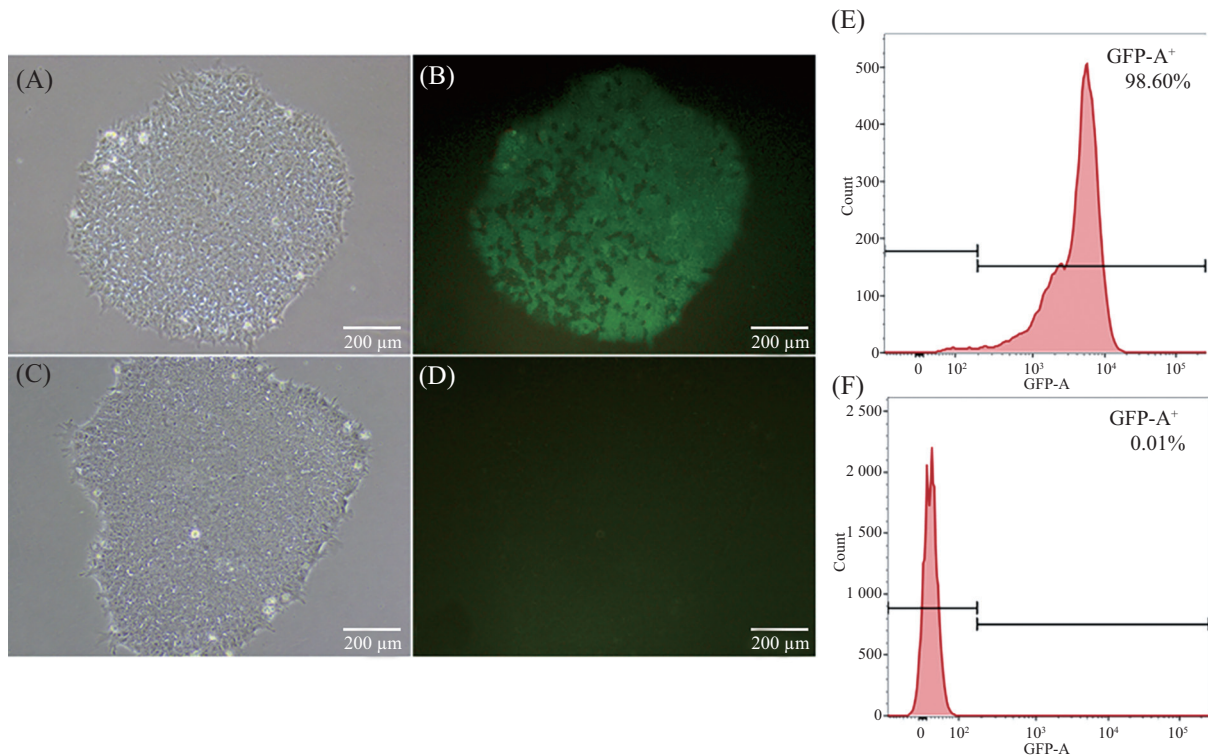
光强度。如图1所示,感染慢病毒24 h后, NIT-1细胞可见EGFP表达, 但荧光强度较弱; 感染72 h后EGFP表达显著增强; EGFP阳性对照病毒感染72 h内, 荧光表达水平逐渐增高(图1D~图1F); 阴性对照病毒感染组, 无EGFP表达(图1G~图1I)。这些结果初步确认了构建的细胞株能够报告*insulin*基因的表达。

利用携带*insulin*基因启动子的慢病毒、EGFP阳性对照慢病毒和阴性对照慢病毒分别感染hiPSCs, 感染48 h后使用1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素筛选5~8天, 对细胞进行传代培养, 连续传代5~8代后, 显微镜下观察到细胞生长状态良好, 可见克隆化生长(图2A和2C)。荧光显微镜下观察和流式细胞分析结果表明, 阳性对照组(EGFP-hiPSCs)中约95%以上细胞能够表达EGFP, 而实验组(INS-promoter-hiPSCs)细胞不表达EGFP(图2B和2D)。提取这些细胞株的基因组DNA进行PCR检测, 结果显示, INS-promoter-hiPSCs细胞和EGFP-hiPSCs细胞的EGFP检测呈阳性, NEG-hiPSCs细胞系检测不到EGFP的PCR产物, 说明慢病

毒已被稳定整合进细胞基因组内(图3)。

2.2 构建的细胞株诱导分化后能够表达胰腺发育的标志性基因

通过“五步法”诱导方案将INS-promoter-hiPSCs细胞诱导分化, 胰腺发育过程中标志性基因在各诱导分化阶段细胞中表达有所变化: 干细胞干性相关基因*OCT4*和*NANOG*在hiPSCs细胞中高表达, 在细胞分化过程中表达下降, S1阶段后期下降明显, 且在第4阶段和第5阶段几乎检测不到其mRNA的表达(图4A)。内胚层标志基因*CXCR4*和*SOX17*在分化S1阶段高表达, 当诱导进入S2阶段后表达降低; *FOXA2*的表达在S2至S5阶段的分化细胞中呈现稳定表达(图4B)。 *PDX1*、*NKX6.1*、*HNF6*与胰腺特化发育相关, 在S2阶段出现表达, 胰腺祖分化阶段(S3和S4阶段)表达显著升高, 当细胞分化为胰岛素分泌细胞后表达稍降低(图4C)。 *insulin*基因在胰腺祖分化阶段开始表达, 当诱导至S5阶段后, *insulin*和胰岛素转录调控因子MAFA高表达(图4D)。这些结果表明, 构

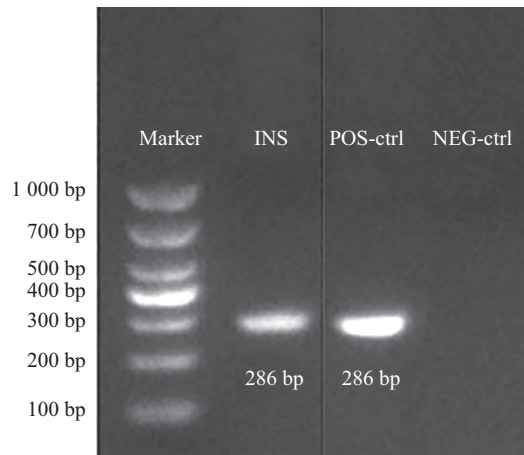


A: EGFP-hiPSCs细胞形态; B: 荧光显微镜下观察EGFP-hiPSCs细胞中EGFP的表达情况; C: INS-promoter-hiPSCs细胞形态; D: 荧光显微镜下观察INS-promoter-hiPSCs细胞中EGFP的表达情况; E、F: 流式分析检测EGFP在细胞中的表达情况。

A: EGFP-hiPSCs cell morphology; B: EGFP-hiPSCs under fluorescence microscope; C: the INS-promoters-hiPSCs cell morphology; D: expression of EGFP under fluorescence microscope in INS-promoter-hiPSCs; E, F: the expression of EGFP in cells was detected by flow analysis.

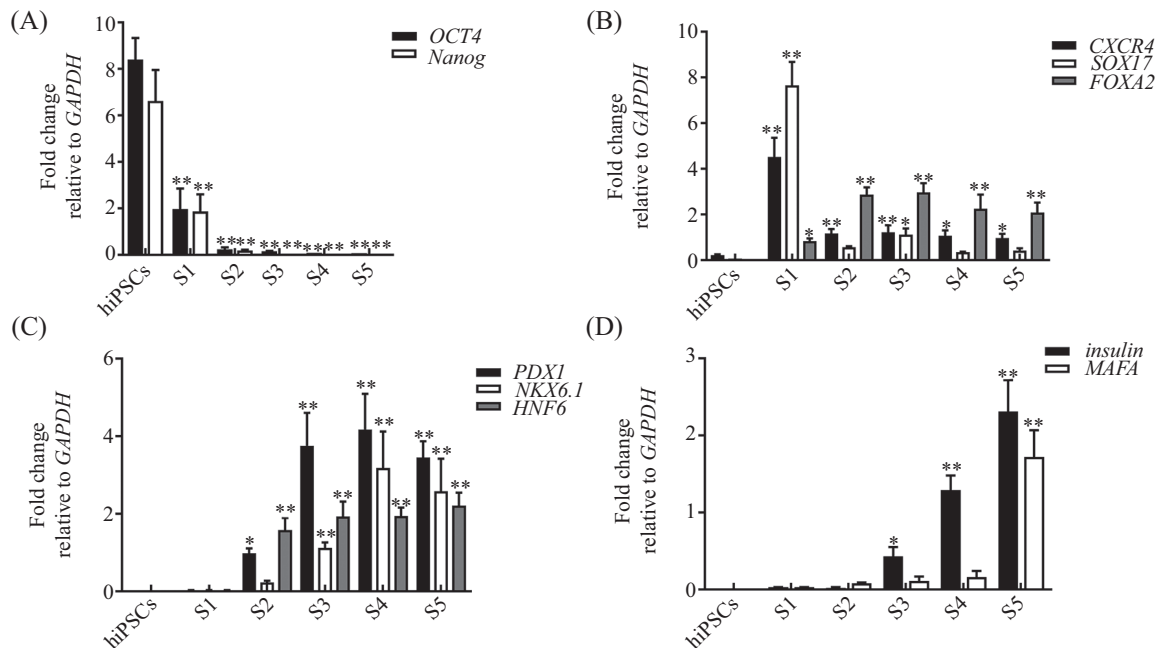
图2 EGFP-hiPSCs和INS-promoter-hiPSCs细胞系的EGFP表达情况

Fig.2 EGFP expression in EGFP-hiPSCs and INS-promoter-hiPSCs cell lines



INS细胞株: INS-promoter-hiPSCs; 阳性对照: EGFP-hiPSCs; 阴性对照: negative-hiPSCs。
INS: INS-promoter-hiPSCs; POS-ctrl: EGFP-hiPSCs; NEG-ctrl: negative-hiPSCs。

图3 PCR鉴定各细胞系EGFP表达
Fig.3 EGFP expression was identified by PCR in each cell line



A~D: Real-time PCR检测胰腺发育过程中标志性基因 *OCT4*、*Nanog*、*CXCR4*、*SOX17*、*FOXA2*、*PDX1*、*NKX6.1*、*HNF6*、*insulin*和 *MAFA*在不同诱导分化阶段的表达水平。S1: 限定性内胚层; S2: 原肠管内胚层; S3: 胰腺祖细胞1; S4: 胰腺祖细胞2; S5: 胰岛素分泌细胞。n=6; *P≤0.05, **P≤0.001, 与hiPSCs组相比。

A~D: Real-time PCR was used to determine the expression of the selected genes *OCT4*, *Nanog*, *CXCR4*, *SOX17*, *FOXA2*, *PDX1*, *NKX6.1*, *HNF6*, *insulin* and *MAFA* at different stages of induction and differentiation. S1: definitive endoderm, DE; S2: primitive gut tube, PG; S3: pancreatic progenitor 1, PP1; S4: pancreatic progenitor 2, PP2; S5: insulin-producing cells, IPCs. n=6; *P≤0.05, **P≤0.001 vs the hiPSCs control.

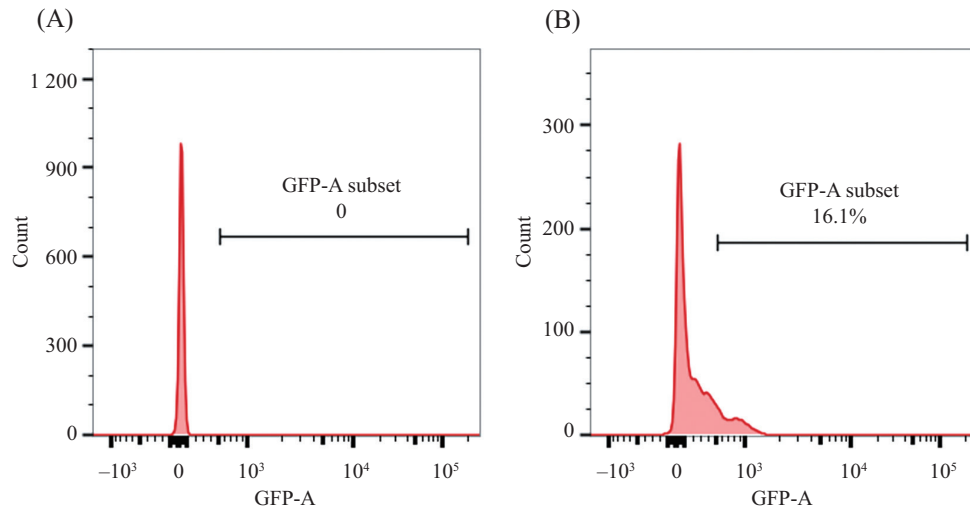
图4 INS-promoter-hiPSCs向iPCs分化过程中标志基因的表达水平
Fig.4 The expression of marker gene during the INS-promoter-hiPSCs differentiation to iPCs

建的可报告 *insulin* 基因表达的 hiPSCs 细胞株仍具备分化为胰岛素分泌细胞的能力。

2.3 流式细胞术分析及分选EGFP阳性的iPCs细胞
INS-promoter-hiPSCs细胞诱导分化至 iPCs 阶段, 通过流式细胞术分选 EGFP 阳性细胞, 获得了约

16% 表达 EGFP 的 iPCs (图 5B), 获得的 iPCs 应用于后续 miRNA 检测。

2.4 miRNA 在胰岛素分泌细胞分化过程中的动态变化
利用 S-Poly(T) plus RT-PCR 法检测预测的 20 个 miRNA 在 hiPSCs、内胚层细胞、原肠管细胞、胰腺



A: NEG-hiPSCs细胞分化后不表达EGFP; B: INS细胞分化后的EGFP⁺ IPCs。

A: EGFP expression in neg-hiPSCs after differentiation; B: EGFP⁺-IPCs in INS cell lines after differentiation.

图5 流式细胞分选EGFP阳性的胰岛素分泌细胞

Fig.5 Classification of EGFP-positive insulin-producing cells by flow cytometer

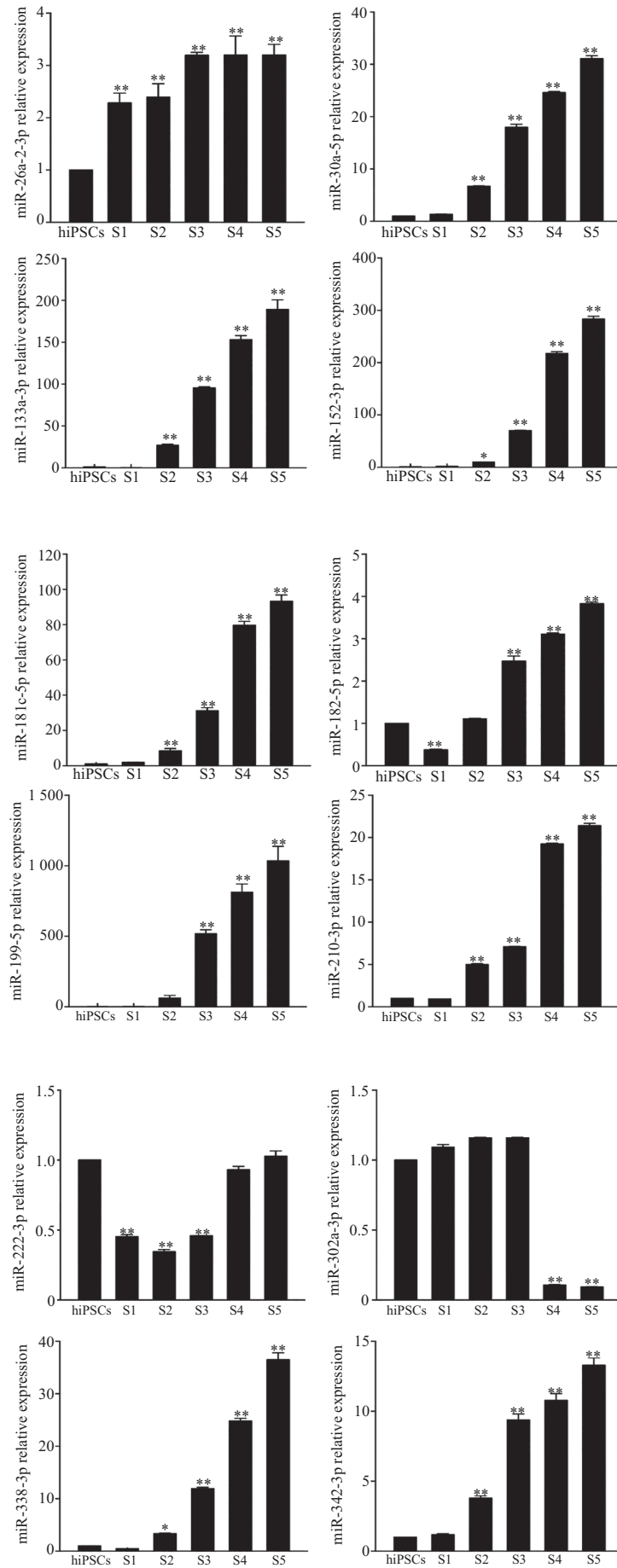
祖细胞、纯化的IPCs中的表达水平。miR-495-3p、miR-199-5p、miR-369-5p的PCR扩增循环阈值(Ct值)大于35,说明这3个miRNA在分化过程中表达水平极低;miR-152-3p、miR-133a-3p、miR-181c-5p、miR-410-3p、miR-487a-3p、miR-338-3p、miR-30-5p、miR-655-3p、miR-26a-3p、miR-182-5p、miR210-3p、miR-342-3p和miR-589-5p在分化过程中上调表达;miR-302a-3p、miR-222-3p和miR-802的表达水平在分化过程中显著下调。其中,miR-26a-2-3p、miR-182-5p、miR-210-3p、miR-222-3p、miR-302a-3p、miR-342-3p、miR-589-5p、miR-655-3p和miR-802的相对表达量很低。在hiPSCs分化为IPCs的过程中,miR-30a-5p、miR-338-3p和miR-487a-3p在IPCs的相对表达量与hiPSCs细胞中的表达量相比低于50倍,miR-133a-3p、miR-152-3p、miR-181c-5p、miR-375、miR-410-3p的相对表达量均在50倍以上。因此,iPSCs细胞定向分化为IPCs的过程中显示miR-133-3p、miR-152-3p、miR-181c-5p和miR-410-3p随着分化过程其表达水平逐渐升高,有可能参与调控干细胞向胰岛细胞的分化过程(图6)。

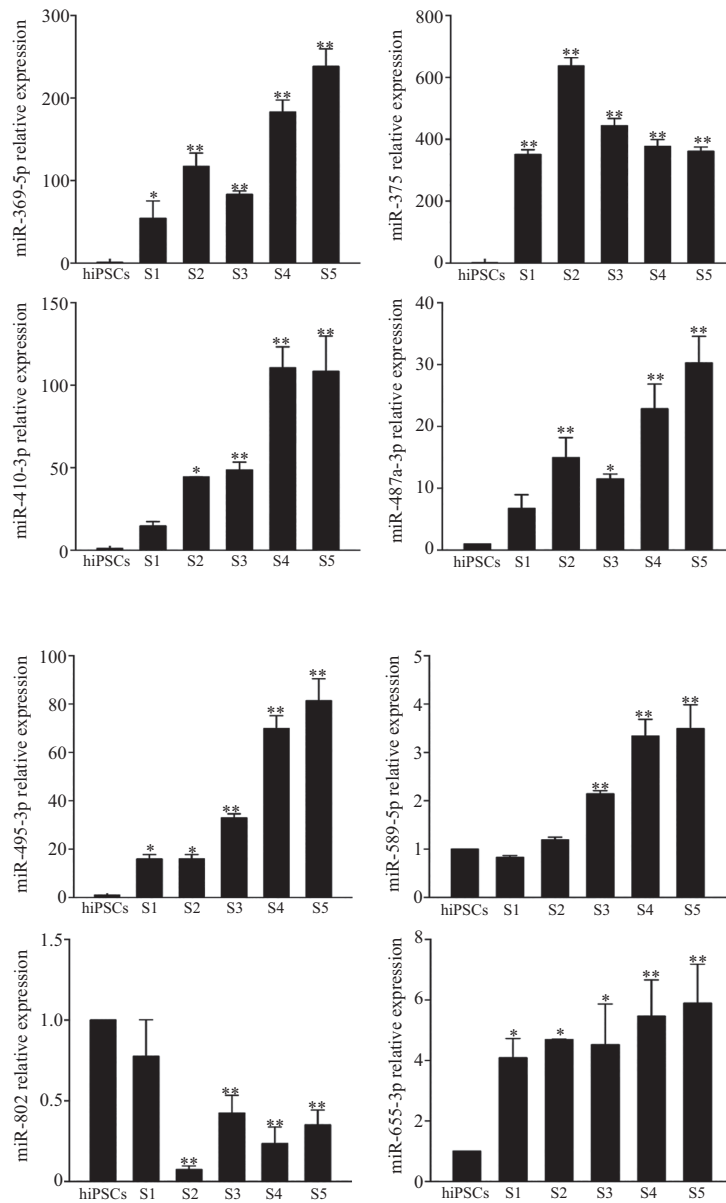
3 讨论

I型糖尿病是由于胰岛β细胞死亡或功能异常,导致分泌的胰岛素不足以满足机体能量代谢的需要,继而发生糖代谢和脂代谢紊乱造成的,可诱发多器官并发症,严重威胁患者生命健康^[13]。胰腺胚胎

发育过程精密且复杂^[14],科学家们通过在体外模拟胰腺胚胎发育过程,利用小分子化合物和细胞因子等物质调控胰腺发育关键信号,成功地将多能干细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞,为胰岛损伤性疾病的治疗带来了新的曙光^[15]。但是,目前已建立的多种诱导分化体系所获得的胰岛素分泌细胞的效率很低,而且大多诱导方案诱导为分化的胰岛素细胞阳性率较低,无法获得较纯的胰岛素分泌细胞,阻碍了胰岛细胞分化相关机制的研究^[16]。RUSS等^[17]转染携带大鼠胰岛素基因启动子的质粒至小鼠胰岛β细胞,实现了对细胞的分选,分选后的细胞活性良好,适用于后续实验的进行。因此,本研究通过生物合成技术合成人*insulin*启动子序列,并在该序列下游连接EGFP序列,利用慢病毒载体携带此段外源性基因感染hiPSCs;当干细胞分化为胰岛素分泌细胞时相应的转录因子结合到*insulin*启动子区,启动下游EGFP的表达,实现对目的细胞的荧光标记,通过流式细胞分选共获得约16%的EGFP阳性的IPCs细胞,成功实现对胰岛素阳性细胞的纯化和富集,为后续筛选调控干细胞分化的miRNA提供了有力保障。

胰腺的发育和功能除了受到关键信号、关键转录因子以及基因转录调控以外,非编码基因miRNA也参与其中^[18-19]。近年来,miRNA被证实在糖代谢调节的所有生理和病理过程中发挥重要作用,包括胰腺细胞的分化发育、胰岛素分泌与利用等,考虑到miRNAs和葡萄糖代谢之间的关系,通过调节特定





S1: 限定性内胚层; S2: 原肠管内胚层; S3: 胰腺祖细胞1; S4: 胰腺祖细胞2; S5: 胰岛素分泌细胞。* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.001$, 与hiPSCs组相比。

S1: definitive endoderm; S2: primitive gut tube; S3: pancreatic progenitor 1; S4: pancreatic progenitor 2; S5: insulin-producing cells. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.001$ vs hiPSCs control.

图6 INS-promoter-hiPSCs诱导分化为IPC过程中相关miRNA表达的动态变化

Fig.6 Dynamic changes of miRNA expression during the INS-promoter-hiPSCs differentiation to IPCs

组织或器官中的特定miRNAs,可以在转录水平和转录后水平上改善糖代谢紊乱,作为维持血糖稳态的靶点^[20]。单一miRNA可能有多个基因靶标,但相同的信号通路和基因靶标也可能受到多个miRNA的调控^[21]。本研究利用已报道的文献数据并通过生物信息学预测与干细胞分化、胰腺发育、胰岛素分泌等功能相关的miRNA,以研究最为广泛的miR-375作为阳性对照,筛选到19个未见功能研究的miRNA,作为潜在的研究对象^[22]。miR-338-3p参与葡萄糖转

运和胰岛β细胞发育的过程^[23]; miR-181c-5p与β细胞的发育和增殖相关,还可参与应激反应; miR-222-3p、miR-26a-2-3p可能影响干细胞向内胚层分化,这是干细胞向胰岛分化的“必经之路”; miR-802参与应激应答,调节葡萄糖应答和胰岛素的分泌; miR-342-3p调节胰岛素样生长因子活性受体活性。我们进一步利用S-Poly(T) plus RT-PCR法验证,这些miRNA在胰岛细胞发育分化过程中的动态表达水平。实验结果表明,这些miRNA在胰岛细胞分化过程中呈现

显著上调或下调趋势;但部分miRNA的相对表达量很低,在后续的研究中应该增加检测的时间点进一步确认其表达水平;miR-375、miR-181c-5p、miR-133a-3p、miR-152-3p和miR-410-3p的相对表达量较高,且在整个分化过程中表达持续上调,提示其在胰腺发育过程中可能发挥重要的调控作用。miR-375在胰岛 β 细胞中高度表达,通过*Rasdl*、*Rgs16*等靶基因调节胰岛细胞增殖与分化^[24],胰岛素分泌相关基因*Mtpn*、*Pdk1*决定了功能性 β 细胞发育成熟^[25];机体维持正常的血糖稳态也需要miR-375在胰岛细胞中持续的高度表达^[26],敲除miR-375的小鼠其胰腺内分泌细胞的增殖能力降低,并表现出明显的高血糖特征^[27];SCHEIBNER等^[28]指出,Wnt信号通路在胰腺胚胎发育过程中发挥重要作用,miR-152-3p、miR-181c-5p能够参与调控Wnt信号活化影响胚胎干细胞向胰腺细胞的分化^[29-30];TGF- β 家族在胰腺发育和iPSCs细胞分化中发挥重要作用^[31],是决定干细胞向内胚层分化的关键信号,miR-410-3p通过TGF- β 信号通路影响胰岛素分泌细胞的生成与胰岛素的分泌^[32]。因此我们推测,上述miRNAs通过以上相关信号通路在干细胞向胰岛细胞的分化过程发挥重要调控作用。

综上所述,本研究成功建立了可报告*insulin*基因表达的hiPSCs细胞株,能够纯化和富集得到分化的胰岛素分泌细胞用于后续实验研究。该文分析了多种miRNAs在胰岛素分泌细胞分化过程中的动态表达水平,为深入探讨胰腺胚胎发育的调控机制和体外胰岛 β 细胞的制备提供了新的靶点和研究手段。

参考文献 (References)

- [1] MENDIS S, DAVIS S, NORRVING B. Organizational update: the World Health Organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease [J]. *Stroke*, 2015, 46(5): e121-2.
- [2] D'AMOUR K A, BANG A G, ELIAZER S, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11): 1392-401.
- [3] KROON E, MARTINSON L A, KADOYA K, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(4): 443-52.
- [4] ZHU S, RUSS H A, WANG X, et al. Human pancreatic beta-like cells converted from fibroblasts [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(1): 1-13.
- [5] LIU H, YANG H, ZHU D, et al. Systematically labeling developmental stage-specific genes for the study of pancreatic β -cell differentiation from human embryonic stem cells [J]. *Cell Res*, 2014, 24(10): 1181-200.
- [6] KIM V N, HAN J, SIOMI M C. Biogenesis of small RNAs in animals [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(2): 126-39.
- [7] MELKMAN-ZEHAVID T, OREN R, KRED-ORUSSO S, et al. miRNAs control insulin content in pancreatic β -cells via down-regulation of transcriptional repressors [J]. *EMBO J*, 2011, 30(5): 835-45.
- [8] KREDO-RUSSO S, MANDELBAUM A D, NESS A, et al. Pancreas-enriched miRNA refines endocrine cell differentiation [J]. *Development*, 2012, 139(16): 3021-31.
- [9] FILIOS S R, XU G, CHEN J, et al. MicroRNA-200 is induced by thioredoxin-interacting protein and regulates Zeb1 protein signaling and beta cell apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(52): 36275-83.
- [10] ZHANG F, MA D, ZHAO W, et al. Obesity-induced overexpression of miR-802 impairs insulin transcription and secretion [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1-16.
- [11] STOLL L, SOBEL J, RODRIGUEZ-TREJO A, et al. Circular RNAs as novel regulators of β -cell functions in normal and disease conditions [J]. *Mol Metab*, 2018, 9: 69-83.
- [12] ZHANG D, JIANG W, LIU M, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells [J]. *Cell Res*, 2009, 19(4): 429-38.
- [13] DAS S, MOHAMED I N, TEOH S L, et al. Micro-RNA and the features of metabolic syndrome: a narrative review [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20(7): 626-35.
- [14] BASTIDAS-PONCE A, SCHEIBNER K, LICKERT H, et al. Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development [J]. *Development*, 2017, 144(16): 2873-88.
- [15] PÄTH G, PERAKAKIS N, MANTZOROS C S, et al. Stem cells in the treatment of diabetes mellitus-Focus on mesenchymal stem cells [J]. *Metabolism*, 2019, 90: 1-15.
- [16] SHAHJALAL H M, DAYEM A A, LIM K M, et al. Generation of pancreatic β cells for treatment of diabetes: advances and challenges [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 355.
- [17] RUSS H A, RAVASSARD P, KERR-CONTE J, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cells expanded *in vitro* from lineage-traced adult human pancreatic beta cells [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6417.
- [18] LANDRIER J F, DERGHAL A, MOUNIEN L. MicroRNAs in obesity and related metabolic disorders [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 859.
- [19] MIAO C G, CHANG J, ZHANG G X, et al. MicroRNAs in type 1 diabetes: new research progress and potential directions [J]. *Biochem Cell Biol*, 2018, 96(5): 498-506.
- [20] YU Z, XINGHUI S, BASAK I, et al. Emerging roles for microRNAs in diabetic microvascular disease: novel targets for therapy [J]. *Endocr Rev*, 2017(2): 1-22.
- [21] ZHANG B H, SHEN C A, ZHU B W, et al. Insight into miRNAs related with glucometabolic disorder [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 111: 657-65.
- [22] REGAZZI R. MicroRNAs as therapeutic targets for the treatment of diabetes mellitus and its complications [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22(2): 153-60.
- [23] HUANG Y, XU Y, LU Y, et al. lncRNA Gm10451 regulates PTIP to facilitate iPSCs-derived β -like cell differentiation by targeting

- miR-338-3p as a ceRNA [J]. *Biomaterials*, 2019, 216: 119266.
- [24] WEI R, YANG J, LIU G Q, et al. Dynamic expression of microRNAs during the differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing cells [J]. *Gene*, 2013, 518(2): 246-55.
- [25] ELIASSON L. The small RNA miR-375-a pancreatic islet abundant miRNA with multiple roles in endocrine beta cell function [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 456: 95-101.
- [26] DUMORTIER O, FABRIS G, PISANI D F, et al. microRNA-375 regulates glucose metabolism-related signaling for insulin secretion [J]. *J Endocrinol*, 2020, 244(1): 189-200.
- [27] POY M N, HAUSSER J, TRAJKOVSKI M, et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha-and beta-cell mass [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(14): 5813-8.
- [28] SCHEIBNER K, BAKHTI M, BASTIDASPONCE A, et al. Wnt signaling: implications in endoderm development and pancreas organogenesis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 12(61): 48-55.
- [29] GADUE P, HUBER T L, PADDISON P J, et al. Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an *in vitro* model of primitive streak formation using embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(45): 16806-11.
- [30] LI N, JIANG D K, HE Q, et al. microRNA-181c-5p promotes the formation of insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells by targeting smad7 and TGIF2 [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 1-12.
- [31] NOSTRO M C, SARANGI F, OGAWA S, et al. Stage-specific signaling through TGF β family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells [J]. *Development*, 2011, 138(5): 861-71.
- [32] WATABE T, MIYAZONO K. Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation [J]. *Cell Res*, 2009, 19(1): 103-15.