

诱导脐带间充质干细胞分化为胰岛素分泌细胞的方法探讨

王 敬^{1,2} 吴泳江² 王 琪¹ 齐仁立^{1,3} 黄金秀^{1,3*}

(¹重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; ²西南大学, 重庆 402460; ³农业部养猪科学重点实验室, 重庆 402460)

摘要 β 细胞功能受损会引发1型糖尿病和部分2型糖尿病, 因此, 向患者体内移植正常的 β 细胞是一种理想的治疗方法, 但供体的严重紧缺限制了它的应用, 研究者们试图用胰岛素分泌细胞(insulin producing cells, IPCs)来替代 β 细胞用于细胞移植治疗。脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UCMSCs)是一种多能干细胞, 能够被诱导分化为IPCs, 进而可以用于细胞移植治疗。该文综述了诱导UCMSCs分化为IPCs的主要方法(多步诱导法、基因工程法和共培养法), 探讨了各方法存在的问题及改进方向, 以期为进一步完善提供有益信息。

关键词 脐带间充质干细胞; 胰岛素分泌细胞; 多步诱导法; 基因工程法; 共培养法

Methods for Differentiation of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells into Insulin Producing Cells

Wang Jing^{1,2}, Wu Yongjiang², Wang Qi¹, Qi Renli^{1,3}, Huang Jinxiu^{1,3*}

(¹Chongqing Academy of Animal Science, Chongqing 402460, China; ²Southwest University of Rongchang Campus, Chongqing 402460, China; ³The Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Ministry of Agriculture, Chongqing 402460, China)

Abstract Dysfunction of pancreatic β cell can cause type 1 diabetes and part of type 2 diabetes. Transplantation of functional pancreatic β cell is an ideal therapy for diabetics. However, the serious shortage of donors restricted the clinical application of this therapy. At present, insulin producing cells (IPCs) have been used in the transplantation treatment for years instead pancreatic β cell. Umbilical cord mesenchymal stem cells (UCMSCs) are a pluripotent stem cells which can be induced into IPCs. Here, we reviewed the major induction methods of differentiate UCMSCs into IPCs, including multi-step induction method, genetic engineering method and co-culture method, and then tried to provide more information for further improvement by comparing these methods.

Keywords umbilical cord mesenchymal stem cells; insulin producing cells; multi-step induction; genetic engineering; co-culture

由于人们生活水平提高和饮食结构改变等原因, 全球范围内糖尿病的发病率迅速增长, 已发展成为继肿瘤和心血管疾病后第三大严重威胁人类健康的慢性疾病^[1]。据中商产业研究院大数据数据库数据显示, 2015年全球糖尿病患者人数为4.15亿人, 中国糖

尿病患者人数为1.09亿人, 是世界上糖尿病患者最多的国家。传统的胰岛素注射不能有效治愈糖尿病, 只能缓解糖尿病的症状, 因此, 人们一直致力于寻求新型有效的治疗方法^[2]。

胰岛细胞包括 α 、 β 、 δ 和pp细胞。其中, 胰岛 β

收稿日期: 2016-10-12 接受日期: 2017-04-17

重庆市基本科研业务费(批准号: 14403)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-46792081, E-mail: short00@163.com

Received: October 12, 2016 Accepted: April 17, 2017

This work was supported by the Chongqing Fundamental Research Project (Grant No.14403)

*Corresponding author. Tel: +86-23-46792081, E-mail: short00@163.com

网络出版时间: 2017-05-19 16:01:16

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170519.1601.006.html>

细胞约占胰岛细胞总数的70%, 在糖尿病的发生发展中发挥着重要作用, 其主要功能是分泌胰岛素调节血糖含量。胰岛 β 细胞功能受损会导致胰岛素分泌绝对不足(1型糖尿病)或相对不足(2型糖尿病)^[3], 由此可见, 对于 β 细胞功能受损的糖尿病(1型及部分2型)患者来说, 增加体内正常 β 细胞是一种理想的治疗方法。由于 β 细胞供体缺乏, 研究者们试图利用胰岛素分泌细胞(insulin producing cells, IPCs)来替代 β 细胞进行细胞移植治疗。目前, 通过分化、转分化和基因重编程等方法可以诱导胚胎干细胞^[4]、成体干细胞^[5]和多能干细胞^[6]分化为IPCs。胚胎干细胞成瘤性和伦理争议、胰腺干细胞位置及作用争议、肝干细胞扩增效率低、多能干细胞表观遗传基因修饰等问题阻碍了相关研究进展。

脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UCMSCs)是从新生儿脐带间质组织中分离出的一种多能干细胞, 可向三个胚层细胞分化, 具有来源广泛、取材方便、免疫原性低和无伦理争议等诸多优点^[7-8], 是理想的IPCs来源。本文综述了UCMSCs诱导分化为IPCs的主要方法, 指出各方法的优劣势, 并提出相应的改进方向, 以期这些方法的改进和完善提供有益信息。

1 UCMSCs的分离鉴定及分化潜能

常用的UCMSCs分离方法有组织块贴壁法和酶消化法。组织块贴壁法可保持细胞功能稳定和高活力, 在后续培养中有更高的增殖率, 但培养时间较长。酶消化法培养时间短, 可获得较多细胞, 这些细胞高表达多能干细胞标志基因*c-kit*(KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase)和*Oct-4*(organic cation/carnitine transporter-4), 但消化酶浓度和作用时间不好把握。Smith等^[9]提出了一个改良方法, 即在后续培养中应用人血小板裂解液取代异源血清培养基, 该方法避免过敏反应、降低污染风险、减少操作时间, 可作为UCMSCs分离的标准方案。

UCMSCs表面标志抗原具有非单一性且稳定表达。UCMSCs表达间充质细胞表面标志物, 包括CD10、CD13、CD29、CD44、CD49E、CD51、CD73/SH3、CD90(THY-1)、CD105/SH2、CD106、CD117、CD166、HLA-1/HLA-ABC; 不表达造血干细胞标志物, 如CD14、CD31、CD34、CD38、CD45、HLA-DR。通过流式细胞术检测UCMSCs的

表面标志物, 可判断所分离的UCMSCs的纯度及活力^[10-11]。

UCMSCs具有多能干细胞的“可塑性”, 经诱导培养能向多种成体细胞分化。特定的诱导条件下可以分化为成骨细胞^[12]、雄性生殖样细胞^[13]、肝细胞^[14]、神经干细胞^[15]、心肌细胞^[16]、成牙本质样细胞^[17]、平滑肌细胞^[18]等。UCMSCs的多向分化能力为诱导其分化为IPCs提供了可能。

2 UCMSCs向IPCs诱导分化

干细胞分化为IPCs有两种途径。一种是*nestin*阳性细胞途径(简称*nestin*途径), *nestin*是神经细胞的标志物, 基于 β 细胞发生与神经细胞发生的相似性以及细胞的全能性, 可以诱导干细胞分化为*nestin*阳性细胞, 再诱导其分化为IPCs。另一种是*Pdx1*(pancreatic and duodenal homeobox 1)途径, 诱导UCMSCs分化为成熟内胚层细胞, 表达*Pdx1*, 再诱导其分化为IPCs。*Pdx1*在内胚层细胞分化发育为胰腺的早期发育期间发挥关键作用, 抑制*Pdx1*表达会导致胰腺发育失败^[19]。*Pdx1*通过结合胰岛素基因转录调控区A3激活胰岛素基因转录, 促进胰岛素合成^[20]。

无论*nestin*途径还是*Pdx1*途径, 细胞形态基本呈以下变化: 呈梭型的UCMSCs开始聚集, 有些变成圆形或椭圆形; 呈圆形或椭圆形的细胞越来越多; 细胞聚集成团。陈桃等^[21]发现, 诱导过程中未见细胞聚集成团的现象。也有脐带血间充质干细胞^[22]、骨髓间充质干细胞^[23]向IPCs分化后未成团的报道。由此推测, 细胞成团或许并不是必要条件。相应地, 诱导过程主要有三个阶段: UCMSCs初始分化、IPCs形成和IPCs成熟。目前, 主要的诱导方法有多步诱导法、基因工程法和共培养法。

2.1 多步诱导法

多步诱导法即在UCMSCs培养的多个阶段向培养基中加入不同诱导因子和信号蛋白, 诱导其分化为IPCs。

Chao等^[24]用神经细胞条件培养基(neuronal conditioned medium, NCM)培养UCMSCs, 使其分化为*nestin*阳性细胞, 然后用高浓度葡萄糖、尼克酰胺(nicotinamide, NIC)等诱导*nestin*阳性细胞分化为IPCs。这是首次成功将UCMSCs诱导分化为IPCs的报道。近年来, 相关研究越来越多。将它们进行比较后发现, 差异主要体现在诱导因子上(表1), 诱导

因子作用不同,所以重要性和适用性也有差异。

激活蛋白-A(activin-A)、 β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol)、胰高血糖素样肽-1(glucagon like peptide-1, GLP-1)、激动肽-4(exendin-4)和尼克酰胺等是比较重要和常用的诱导因子,由于作用不同,这些诱导因子被用于不同阶段。 β -巯基乙醇是一种抗氧化剂,可以促进间充质干细胞分化^[25-26],激活蛋白-A能促进UCMSCs初始分化^[27],这两者一般用于UCMSCs初始分化阶段。胰高血糖素样肽-1能通过上调胰岛素基因表达,促进IPCs成熟^[28-29],激动肽-4是胰高血糖素样肽-1类似物,半衰期可达13 h,远高于胰高血糖素样肽-1的2~3 min^[30],这两者一般用于IPCs成熟阶段。尼克酰胺能促使胰高血糖素样肽-1受体与高血糖素样肽-1结合,进而促进IPCs分泌更多胰岛素,常用于IPCs的成熟阶段^[31-32]。此外,尼克

酰胺能减少细胞凋亡,有研究将它用于UCMSCs初始分化和IPCs形成阶段^[31]。在UCMSCs初始分化阶段和IPCs成熟阶段选择合适的诱导因子就可以获得IPCs。马桂霞等^[33]证实,在UCMSCs初始分化阶段加入 β -巯基乙醇、在IPCs成熟阶段加入尼克酰胺,可诱导UCMSCs分化为IPCs。Tsai等^[26]在UCMSCs初始分化阶段加入激活蛋白-A、在IPCs成熟阶段加入胰高血糖素样肽-1,诱导UCMSCs分化为IPCs。此外,有研究发现,将作用类似的诱导因子联用可能比单独使用效果更好。尼克酰胺和激动肽-4联合使用比单独使用尼克酰胺更能提高胰岛素分泌量和诱导效率^[25],激活蛋白-A和 β -巯基乙醇联合使用比单独使用 β -巯基乙醇更能促进UCMSCs初始分化^[34]。

氨基酸、维生素、葡萄糖和细胞生长因子等能提供营养成分或促进细胞生长,可选择性添加在诱

表1 UCMSCs诱导分化为IPCs的方案

Table 1 Methods for differentiation of UCMSCs into IPCs

第一阶段 The first stage	第二阶段 The second stage	第三阶段 The third stage	参考文献 Reference
Time: 7 days Medium: NCM Inducing factor: /	Time: 7 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: 25 mmol/L glucose, NIC, B27	Time: 14 days Medium: SCM Inducing factor: 25 mmol/L glucose, insulin, NIC, B27	[24]
Time: 3 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: 25 mmol/L glucose	Time: 3 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: NIC	Time: 4 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: N2, B27, NIC	[36]
Time: 4 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: /			
Time: 2 days Medium: DMEM Inducing factor: high glucose, β -mercaptoethanol	Time: 7 days Medium: DMEM Inducing factor: high glucose, EGF, bFGF, B27	Time: 7 days Medium: DMEM Inducing factor: high glucose, NIC, exendin-4	[25]
Time: 2 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: 17.5 mmol/L glucose, ITS-X, activin-A, sodium butyrate, β -mercaptoethanol	Time: 2 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: 17.5 mmol/L glucose, ITS-X, taurine	Time: 7 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: 17.5 mmol/L glucose, ITS-X, taurine, NEAA, GLP-1, NIC	[23]
Time: 7 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: NIC, activin-A, EGF	Time: 7 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: /	Time: 14 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: ITS, NIC, bFGF	[31]
Time: 1 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: 10% FBS, retinoic acid	Time: 7 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: 10% FBS, EGF, nicotinic acid	Time: 7 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: 10% FBS, exendin-4	[34]
Time: 2 days Medium: DMEM-F12 Inducing factor: 10% FBS			

NCM: 神经细胞条件培养基; SCM: 干细胞条件培养基; NIC: 尼克酰胺; GLP-1: 胰高血糖素样肽-1; EGF: 表皮细胞生长因子; bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子; NEAA: 非必需氨基酸; ITS: 胰岛素-转铁蛋白-硒。

NCM: neuronal conditioned medium; SCM: stem cell conditioned medium; NIC: nicotinamide; GLP-1: glucagon like peptide-1; EGF: epidermal growth factor; bFGF: basic fibroblastic growth factor; NEAA: nonessential amino acids; ITS: insulin transferrin selenium.

导过程各阶段。Tsai等^[23]发现, 添加牛磺酸(taurine)能促进IPCs的形成和成熟。Nekoei等^[34]证实, 视黄酸(retinoic acid)和烟酸(nicotinic acid)等能为IPCs的生长提供营养物质。Woltjen等^[35]指出, 表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblastic growth factor, bFGF)能促进IPCs生长。Chen等^[25]发现, B27(一种细胞培养添加剂)与表皮细胞生长因子共同作用可促进IPCs形成。Qu等^[36]发现, B27与尼克酰胺共同作用能促进IPCs成熟。Bouchea等^[37]和Ryang等^[38]的研究表明, 高浓度葡萄糖能为细胞提供能量, 促进UCMSCs向IPCs分化。但Chao等^[24]发现, UCMSCs长期暴露于高浓度葡萄糖中会引起IPCs凋亡。因此, 高浓度葡萄糖的使用还需谨慎。

还有一些诱导因子可能会随着诱导方案的改进和成熟而逐渐被替代。传统诱导方案中一般包含血清或者胰岛素^[31,34], 血清中有很多促进细胞分化的生长因子, 胰岛素能诱导胰腺分化相关基因表达。但是血清成分较为复杂, 含有大量的未知物质, 不利于细胞体外分化的成分控制; 用胰岛素对细胞进行诱导分化, 在后续的鉴定过程中难以判断细胞分泌胰岛素的来源。目前, 有些诱导方案去除了胰岛素-转铁蛋白-硒(insulin transferrin selenium, ITS)^[25]、胰岛素(insulin)^[25]或血清成分^[39], 也获得了具有胰岛素分泌功能的IPCs。

总体来说, 运用多步诱导法可以诱导UCMSCs分化为IPCs, 但以下问题也不容忽视。(1)诱导过程主要有三个阶段, 但是在实验中, 细胞所处阶段不可能严格区分开, 需要根据细胞生长状态和诱导情况等来微调试验方案, 所以也出现了在IPCs成熟阶段加入促进IPCs形成的诱导因子的情况。因此, 单纯比较各方案中每阶段所用的诱导因子并不能很好地把握诱导过程。若能有一个量化的诱导标准, 对诱导过程中细胞所处状态有个大体把握, 如通过细胞特异性表达的基因其检测值在某个范围、或者呈圆形或椭圆形细胞的密度等来判断整体细胞在诱导过程中所处的阶段, 会有益于诱导方案的改进。(2)同一诱导因子在不同方案中的作用时间和剂量相差巨大, 后续研究还需对诱导因子的最佳诱导时间和剂量进行试验。(3)诱导因子的作用机制以及UCMSCs诱导分化为IPCs的机制还有盲点, 应着重梳理诱导过程的整条路径及重要的转录因子和信号蛋白等信

息, 从而对症下药, 提高分化效率以获得更接近于成熟 β 细胞的IPCs。

2.2 基因工程法

基因工程法是指向UCMSCs直接转染在胰腺分化和细胞基因表达中起关键作用的转录因子或直接转入胰岛素基因诱导其分化的方法。胰岛 β 细胞形成的关键基因主要有: *Pdx1*、*Ngn3*(neurogenin 3)和*NeuroD1*(neurogenic differentiation 1)等。*Pdx1*是胰腺细胞分化的关键基因, 在胰腺祖细胞中首先表达, 若缺失, 胚胎发育过程中就无胰腺形成。*Pdx1*的表达首先启动内分泌细胞的分化与发育, 随后*Ngn3*和*NeuroD1*等转录因子促使细胞表型分化, 诱导细胞功能成熟^[34]。

Wang等^[28]向UCMSCs转染携带*NeuroD1*的质粒DNA诱导其分化为IPCs, 发现诱导细胞高表达胰岛素、胰高血糖素(一种由胰腺胰岛 α 细胞分泌的激素)和*Pdx1*基因。He等^[40]用携带*Pdx1*基因的重组腺病毒联合 β -巯基乙醇、表皮细胞生长因子、胰高血糖素样肽-1和尼克酰胺诱导UCMSCs分化。所得细胞表达*Pdx1*、*Ngn3*、胰岛素、*Glut-2*(solute carrier family 2 member-2)和*NKX6.1*(NK6 homeobox 1)等胰岛 β 细胞相关基因, 能分泌胰岛素和C肽, 并对葡萄糖刺激较敏感。Wang等^[28]发现, 所得细胞同时表达胰岛素和胰高血糖素, 表明其还未发育为成熟 β 细胞。He等^[40]所得细胞在基因表达和葡萄糖测试等方面都更接近成熟 β 细胞, 原因可能是运用了多种促进IPCs形成和成熟的诱导因子。

除了与诱导因子联合作用外, 基因工程法还可从以下方面着手改进。胰腺细胞分化过程中的基因转录调控是一个级联反应体系, 每阶段都有多个基因的参与。在目前基因调控机理未十分明确的情况下, 通过转染一两个基因去诱导UCMSCs分化的效率并不高, 且IPCs在移植入糖尿病模型鼠后并不能持续降低血糖。因此, 深入了解胰腺细胞分化机制, 转染多个相关基因可能会提高分化效率并获得更成熟的IPCs。

2.3 共培养法

共培养法即将UCMSCs与胰岛细胞共同培养诱导其向IPCs分化。通过利用细胞微环境来诱导细胞分化, 是多步诱导法和基因工程法的补充。

王爱红等^[41]将UCMSCs与大鼠胰岛细胞以半透膜相隔共同培养, 使两种细胞共用培养液但互不接

触, 结果表明, UCMSCs表达*Pdx1*基因, 胰岛素分泌量随着培养基中葡萄糖浓度的提高而增加。朱旅云等^[42]将UCMSCs与雄性SD大鼠胰岛细胞共同培养, 发现UCMSCs的形态逐渐发生变化, 由刚开始的梭形变成圆形, 并有聚集现象, 证明在细胞微环境条件下, UCMSCs可被诱导为IPCs。

Zhou等^[43]在24孔板上用共同培养基分别培养正常和*IGF1*(insulin like growth factor 1)沉默的UCMSCs, 贴壁后换液并将新鲜分离的胰岛放在上层继续培养, 结果表明, 正常组提高了胰岛细胞存活率和胰岛素分泌量, 而实验组并未表现出对胰岛细胞存活率和胰岛素分泌量的促进作用, 揭示了共培养过程中UCMSCs可能通过分泌 β 细胞生长因子(如IGF1)来起作用。在共同培养法的诱导过程中, 究竟是哪些生长因子和基因在起作用及其具体作用机制并不清楚, 但UCMSCs在体内外微环境中向胰岛样细胞分化的潜能不容忽视。因此, 后续研究中, 阐明UCMSCs和IPCs的变化阶段和相关生长因子等信息是研究者的努力方向。

利用多步诱导法、基因工程法和共培养法都可以诱导UCMSCs分化为IPCs, 但由于各方法本身的局限性, 它们在应用和发展等方面存在差异。在多步诱导法中, 通过观察细胞形态等可以了解到细胞所处阶段, 从而调整性地加入相关生长因子来掌控诱导过程, 此方法具有一定灵活性, 因此研究较多。基因工程法直接转染胰腺相关转录因子或胰岛素基因, 省去了诱导干细胞至nestin或*Pdx1*阳性细胞阶段, 但存在目的基因不能稳定转染, 转染基因容易发生突变等问题。目前常用的诱导药物(如 β -巯基乙醇等)有一定毒性, 不能应用于人体内, 共同培养法避免了这个问题, 然而关于共同培养法的研究并不多, 原因可能是培养环境的微妙变化会改变诱导效果。

3 问题与展望

综上所述, 细胞移植治疗糖尿病虽取得了一些进展, 但应用于临床还存在一些问题, 如诱导效率低, 获得的IPCs分泌胰岛素功能不成熟以及移植入糖尿病模型鼠后不能持久降血糖等。在后续研究中, 可在以下几个方面努力。(1)优化诱导分子组合, 寻找更优良的诱导剂。可用更廉价、高效、稳定的小分子来替代传统重组蛋白。如CWR99021可代替Wnt3a激活Wnt信号通路, 促进人胚胎干细胞分

化为限定性内胚层, 诱导效率可达80%^[44]。(2)优化基因工程技术, 稳定转染目的基因, 使得与胰岛素分泌细胞相关基因适时适量表达。(3)改善细胞生长环境, 构建接近于体内 β 细胞生长的微环境。Seyedi等^[45]在单层和悬浮培养两种情况下诱导UCMSCs分化, 结果表明, 悬浮培养组的细胞有更高的胰岛素基因表达量和胰岛素分泌量。(4)更为系统和深入地探寻IPCs形成的分子机制, 从而更全面地掌控诱导过程。Bai等^[46]发现, miRNA-21及它的下游靶基因*SOX6*(SRY-box 6)、*RBPJ*(recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region)和*HES1*(hes family bHLH transcription factor 1)在IPCs形成过程中发挥了重要的调控作用。这提示, 我们可以从miRNA着手控制UCMSCs向IPCs分化的过程。随着研究的深入和方法学的改进, 我们终将获得数量充足、功能良好和可供移植的IPCs, 为糖尿病患者带来福音。

参考文献 (References)

- 1 康继宏, 宁光, 吴家睿, 管又飞. 中国糖尿病防治研究的现状和挑战. 转化医学研究(电子版)[Kang Jihong, Ning Guang, Wu Jiarui, Guan Youfei. Diabetes research in China: Current status and future challenges. Translational Medicine Research (Electronic Edition)] 2012; 2(3): 1-24.
- 2 Russ HA, Efrat S. Development of human insulin-producing cells for cell therapy of diabetes. *Pediatr Endocrinol Rev* 2011; 9(2): 590-7.
- 3 Calafiore R, Montanucci P, Basta G. Stem cells for pancreatic β -cell replacement in diabetes mellitus: Actual perspectives. *Curr Opin Organ Transplant* 2014; 19(2): 162-8.
- 4 Gioviale MC, Bellavia M, Damiano G, Lo Monte AI. Beyond islet transplantation in diabetes cell therapy: From embryonic stem cells to transdifferentiation of adult cells. *Transplant Proc* 2013; 45(5): 2019-24.
- 5 Gabr MM, Zakaria MM, Refaie AF, Ismail AM, Abou-El-Mahasen MA, Ashamalla SA, et al. Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice. *Cell Transplant* 2013; 22(1): 133-45.
- 6 Rezaei A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2014; 32(11): 1121-33.
- 7 Fu YS, Cheng YC, Lin MYA, Cheng H, Chu PM, Chou SC, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons *in vitro*: Potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells* 2006; 24(1): 115-24.
- 8 Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatl RS, Choi M, Merchav S, et al. Human umbilical cord matrix stem cells:

- Preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2006; 24(3): 781-92.
- 9 Smith JR, Pfeifer K, Petry F, Powell N, Delzeit J, Weiss ML. Standardizing umbilical cord mesenchymal stromal cells for translation to clinical use: Selection of GMP-compliant medium and a simplified isolation method. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 1-14.
 - 10 Wang L, Ott L, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. Musculoskeletal tissue engineering with human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Regen Med* 2011; 6(1): 95-109.
 - 11 Kim DW, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang SD, Borlongan CV. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: Phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int J Mol Sci* 2013; 14(6): 11692-712.
 - 12 Cai H, Wu LL, Sun XC, Zhu W, Qian H, Hu JB, *et al.* Effects of puerarin on proliferation and differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into osteoblasts *in vitro*. *Acta Pharm Sin B* 2011; 46(6): 738-41.
 - 13 Li N, Pan S, Zhu H, Mu H, Liu W, Hua J. BMP4 promotes SSEA-1⁺ hUC-MSC differentiation into male germ-like cells *in vitro*. *Cell Prolif* 2014; 47(4): 299-309.
 - 14 Xue G, Han X, Ma X, Wu H, Qin Y, Liu J, *et al.* Effect of microenvironment on differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biomed Res Int* 2016; 2016(5): 1-13.
 - 15 Chen S, Zhang W, Wang JM, Duan HT, Kong JH, Wang YX, *et al.* Differentiation of isolated human umbilical cord mesenchymal stem cells into neural stem cells. *Int J Ophthalmol* 2016; 9(1): 41-7.
 - 16 Jiang L, Wang Y, Pan F, Zhao X, Zhang H, Lei M, *et al.* Synergistic effect of bioactive lipid and condition medium on cardiac differentiation of human mesenchymal stem cells from different tissues. *Cell Biochem Funct* 2016; 34(3): 163-72.
 - 17 Chen Y, Yu Y, Chen L, Ye L, Cui J, Sun Q, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells: A new therapeutic option for tooth regeneration. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 1-11.
 - 18 Yuan H, Liu L, Zheng S, Liu Z, Yang L, Pu C, *et al.* Experimental study of differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into smooth muscle cells induced by bladder smooth muscle cells conditioned medium. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2013; 27(12): 1506-11.
 - 19 Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development* 1995; 121(6): 1569-80.
 - 20 Kaneto H, Miyatsuka T, Nakatani Y, Matsuoka TA. PDX-1 and MafA: Key transcription factors in pancreas. *Am J Biochem Biotechnol* 2005; 1(2): 54-63.
 - 21 陈 桃, 王云帅, 谷乐辉, 周淑艳, 叶 剑, 简优强, 等. 胰岛新生相关蛋白肽在促进脐带间充质干细胞分化为胰岛素分泌细胞中的作用. *细胞与分子免疫学杂志*(Chen Tao, Wang Yunshuai, Gu Lehui, Zhou Shuyan, Ye Jian, Jian Youqiang. Role of INGAP-p in the differentiation of hUCMSCs into insulin producing cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*) 2013; 29(2): 141-5.
 - 22 Kim SJ, Choi YS, Ko ES, Lim SM, Lee CW, Kim DI. Glucose-stimulated insulin secretion of various mesenchymal stem cells after insulin-producing cell differentiation. *J Biosci Bioeng* 2012; 113(6): 771-7.
 - 23 Limbert C, P  th G, Ebert R, Rothhammer V, Kassem M, Jakob F, *et al.* PDX1 and NGN3 mediated *in vitro* reprogramming of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into pancreatic endocrine lineages. *Cytotherapy* 2011; 13(7): 802-13.
 - 24 Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS One* 2008; 3(1): e1451.
 - 25 陈 燕, 汪珊珊, 刘尚全, 陈明卫, 王佑民. 体外诱导人脐带间充质干细胞向胰岛素分泌细胞分化. *安徽医药*(Chen Yan, Wang Shanshan, Liu Shangquan, Chen Mingwei, Wang Youmin. Inducing the differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into insulin secreting cells *in vitro*. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*) 2014; 18(1): 63-6.
 - 26 Tsai PJ, Wang HS, Shyr YM, Weng ZC, Tai LC, Shyu JF, *et al.* Transplantation of insulin-producing cells from umbilical cord mesenchymal stem cells for the treatment of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biomed Sci* 2012; 19(1): 47.
 - 27 孔德晓. 间充质干细胞及胰岛素分泌细胞治疗糖尿病的临床及应用基础研究(博士论文). 山东大学(Kong Dexiao. Study on mesenchymal stem cell and insulin producing cell therapy for diabetes mellitus. Shandong University) 2015.
 - 28 Sánchez L, Gutiérrez A I, Ligerio G, Martín M, Ayll  n V, Real PJ, *et al.* Maintenance of human embryonic stem cells in media conditioned by human mesenchymal stem cells obviates the requirement of exogenous basic fibroblast growth factor supplementation. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18(5): 387-96.
 - 29 Lin W, Anna O, Zhen H, Leif J, Hongfen C, Xin G, *et al.* GLP-1, exendin-4 and C-peptide regulate pancreatic islet microcirculation, insulin secretion and glucose tolerance in rats. *Clin Sci* 2011; 122(8): 375-84.
 - 30 Malm-Erjef  lt M, Bj  rnsd  tti I, Vanggaar J, Helleberg H, Larsen U, Oosterhuis B, *et al.* Metabolism and excretion of the once-daily human glucagon-like peptide-1 analog liraglutide in healthy male subjects and its *in vitro* degradation by dipeptidyl peptidase IV and neutral endopeptidase. *Drug Metab Dispos* 2010; 38(11): 1944-53.
 - 31 Yu YB, Bian JM, Gu DH. Transplantation of insulin-producing cells to treat diabetic rats after 90% pancreatectomy. *World J Gastroenterol* 2015; 21(21): 6582.
 - 32 Wang HW, Lin LM, He HY, You F, Li WZ, Huang TH, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into insulin-producing cells *in vitro*. *Chin Med J* 2011; 124(10): 1534.
 - 33 马桂霞, 何红燕, 罗敏洁, 黄天华, 肖升平, 崔冰琳, 等. 人脐带间充质干细胞分化为胰岛  细胞的实验研究. *中华实用儿科临床杂志*(Ma Guixia, He Hongyan, Luo Minjie, Huang Tianhua, Xiao Shengping, Cui Binglin, *et al.* Experimental research on human umbilical cord whartons jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin producing cells *in vitro*. *Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics*) 2008; 23(8): 618-20.
 - 34 Nekoei SM, Azarpira N, Sadeghi L, Kamalifar S. *In vitro* differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stromal cells to insulin producing clusters. *World J Clin Cases* 2015; 3(7): 640.

- 35 Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, *et al.* PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 766-70.
- 36 Qu H, Liu X, Ni Y, Jiang Y, Feng X, Xiao J, *et al.* Laminin 411 acts as a potent inducer of umbilical cord mesenchymal stem cell differentiation into insulin-producing cells. *J Transl Med* 2014; 12(1): 1.
- 37 Bouchea C, Lopeza X, Fleischmana A, Aaron MC, Sheila OS, Darko S, *et al.* Insulin enhances glucose-stimulated insulin secretion in healthy humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(10): 4770-5.
- 38 Ryang HL, Min JS, Roxanne LR, Jeffrey LS, Andrey AP, Scott DO, *et al.* Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(46): 17438-43.
- 39 柴树宏, 鲍艳春. 人脐带间充质干细胞向胰岛素分泌细胞分化的研究. *实用医学杂志*(Cai Shuhong, Bao Yanchun. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into insulin secreting cells. *The Journal of Practical Medicine*) 2014; 30(23): 3752-4.
- 40 He D, Wang J, Gao Y, Zhang Y. Differentiation of PDX1 gene-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells into insulin-producing cells *in vitro*. *Int J Mol Med* 2011; 28(6): 1019.
- 41 王爱红, 何红燕, 罗敏洁, 黄天华, 马 廉, 马桂霞, 等. 人脐带间充质干细胞向胰岛样细胞的分化. *中国组织工程研究与临床康复*(Wang Aihong, He Hongyan, Luo Minjie, Huang Tianhua, Ma Lian, Ma Guixia, *et al.* Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into islet-like cells. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*) 2008; 12(21): 4102-6.
- 42 朱旅云, 赵 芳, 郝永蕾, 李晓玲, 孙蕾蕾. 人脐带间充质干细胞向胰岛样分泌细胞的诱导分化及胰岛样分泌细胞治疗效果评价. *临床误诊误治*(Zhu Lvyun, Zhao Fang, Hao Yonglei, Li Xiaoling, Sun Leilei. Differentiation of islet like cells from the umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro* and its function evaluation. *Clinical Misdiagnosis & Mistherapy*) 2015; 28(8): 91-5.
- 43 Zhou Y, Hu Q, Chen F, Zhang J, Guo J, Wang H, *et al.* Human umbilical cord matrix-derived stem cells exert trophic effects on β -cell survival in diabetic rats and isolated islets. *Dis Model Mech* 2015; 8(12): 1625-33.
- 44 Kunisada Y, Tsubooka YN, Shoji M, Hosoya M. Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 2012; 8(2): 274-84.
- 45 Seyedif, Farsinejad A, Eslaminejad T. Suspension culture alters insulin secretion in induced human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells. *Cell J* 2016; 18(1): 52-61.
- 46 Bai C, Li X, Gao Y, Wang K, Fan Y, Zhang S, *et al.* Role of microRNA-21 in the formation of insulin-producing cells from pancreatic progenitor cells. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1859(2): 280-93.