

文章编号: 1004-0374(2009)04-0536-06

干细胞源胰岛素分泌细胞中胰岛素原转化障碍的原因及对策

王跃春^{1*}, 段阿林¹, 李佳穗¹, 张 洵²

(1 暨南大学医学院生理教研室, 广州 510632; 2 暨南大学医学院血液病研究所, 广州 510632)

摘要: 近年来, 诱导干细胞向功能性胰岛素分泌细胞分化已取得了较大进展, 但不论何种干细胞来源, 采取何种诱导方案, 诱导的胰岛素分泌细胞均不同程度地存在着胰岛素原向胰岛素转化的障碍, 严重影响了其治疗糖尿病的效果。该文从胰岛素合成和分泌的生理学角度探讨胰岛素分泌细胞不成熟的原因及机制, 从而指出目前在干细胞向胰岛素分泌细胞诱导过程中存在的不足并提出相应的解决办法。

关键词: 干细胞; 胰岛素分泌细胞; 胰岛素原; 胰岛素

中图分类号: Q813; R587.1 **文献标识码:** A

The obstacles in the conversion of proinsulin to insulin in stem cell-derived insulin-producing cells

WANG Yue-chun^{1*}, DUAN A-lin¹, LI Jia-sui¹, ZHANG Yuan²

(1 Department of Physiology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2 Institute of Hematology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Progress has been made in inducing stem cells to differentiate towards functional insulin-producing cells (IPCs) in recent years. Despite the sources of the stem cells and the protocols used for induction, there are still difficulties in the conversion of proinsulin to insulin in the stem cell-derived IPCs, which hamper the IPCs' effects on diabetes therapy. This review discusses the possible causes and the underlying mechanisms from the physiological viewpoints of insulin synthesis and secretion, and points out the limitations and solutions in the course of inducing stem cells towards IPCs.

Key words: stem cells; insulin-producing cells; proinsulin; insulin

糖尿病已成为继心脑血管性疾病和癌症之后威胁人类健康的第三大杀手, 目前惟一可以治愈糖尿病的方法是进行胰岛或胰岛 β 细胞移植, 但可供移植的细胞来源严重匮乏。因而, 诱导干细胞向功能性胰岛素分泌细胞(insulin-producing cells, IPCs)分化显示了诱人的临床应用前景。近年来, 诱导干细胞向 IPCs 分化已取得了较大进展, 但不论何种干细胞来源, 采取何种诱导方案, 诱导的 IPCs 多不具备完善的生理功能, 其中, 尤为突出的是诱导的 IPCs 均不同程度地存在着胰岛素原向胰岛素转化的障碍, 具体表现为 IPCs 分泌的胰岛素原异常升高, 而胰岛素和 C 肽不成比例^[1, 2]。由于胰岛素原的生理

作用仅为胰岛素的 15%—20%^[3], 因而促进 IPCs 分化成熟以分泌胰岛素是决定干细胞能否有效治疗糖尿病的关键问题。2 型糖尿病的一个重要临床特征是高胰岛素血症, 这可能是胰岛 β 细胞为代偿胰岛素抵抗和高血糖而出现的一种超常分泌状态, 也

收稿日期: 2009-03-31; 修回日期: 2009-04-20

基金项目: 广东省医学自然科学基金资助项目(2008350); 国务院侨办重点学科建设基金资助项目(2005); 暨南大学 2008 年“挑战杯”大学生课外学术科技创新活动研究项目; 2009 年广东省自然科学基金博士科研启动项目(9451063201002957)

*通讯作者: E-mail: monkeymei2@yahoo.com.cn

可能是基因突变所致的原发性胰岛β细胞功能缺陷所致。所以, 了解胰岛素原增高的原因和确切机制对促进 IPCs 的成熟以及2型糖尿病的防治均有重要意义。只有对胰岛β细胞的功能调节有了全面的认识, 才能对这些研究产生新的思路, 所以有必要先对正常胰岛β细胞的功能进行简短的描述, 在此基础上, 本文将从胰岛素合成和分泌的生理学角度探讨 IPCs 不成熟的原因及机制, 从而指出目前在干细胞向 IPCs 诱导过程中存在的缺陷, 并提出相应的解决办法。

1 胰岛素合成、分泌的生理过程

1.1 前胰岛素原基因、前胰岛素原、胰岛素原与真胰岛素

在人类, 编码前胰岛素原的基因位于第11号染色体短臂上, 其编码区域由三个外显子组成: 第一个编码前胰岛素原N终端的信号肽, 第二个编码B链以及部分C肽, 第三个编码C肽的剩余部分以及A链。经过转录以及移去内含子编码的序列后, 产生了一个含有600个核苷酸的信使RNA, 由此翻译成为一个相对分子质量为11.5k的单链多肽, 即前胰岛素原, 从氨基端开始, 依次排列着信号肽、B链、C肽和A链。信号肽将新生的蛋白质迅速转位到粗面内质网的管腔, 在信号肽酶作用下去除信号肽, 生成相对分子质量为9k的胰岛素原(proinsulin, PI)。PI为一直链多肽, 含有A链和B链, 两条肽链之间由C肽相连。C肽的主要功能是排列连接在A链和B链之间的二硫键, 以使分子为进行裂解而准确地折叠。随后, PI被转运到高尔基复合体中并被包裹进入囊泡, 开始了胰岛素原向胰岛素的转换, 此过程在逐渐成熟的分泌颗粒中持续进行。在两个肽链内切酶及羧基肽酶的连续作用下, C肽被移去, 释放出两个裂解的二肽, 最终产生真胰岛素(true insulin, TI)。TI与C肽储存在同一个颗粒囊中, 最终以等分子量的形式释放。在生理情况下, 完整的PI释放量很少, 约占总分泌量的5%—10%; 另外, 少量PI转换的中间产物(裂解PI)也释放到循环中, PI和PI转换的中间产物占循环中胰岛素样免疫反应活性的20%^[3]。

1.2 胰岛素分泌途径中的运输和加工

胰岛素的分泌可通过持续(组成)性或调节性途径而进行, 前者是由蛋白质从反式高尔基器迅速转运到囊泡的浆膜中产生的, 最后通过胞吐而分泌出去; 后者则通过储存颗粒进行分泌, 称为“调节

性途径”, 通过此途径分泌出来的胰岛素, 约占95%。在正常β细胞中, PI进入颗粒的过程发生在高尔基复合体反式为为主的潴泡中, β细胞分泌颗粒中最早被探索到的形态特点是在细胞质界面有笼形蛋白包被。未成熟的分泌颗粒的成熟过程包括三个平行发生的事件: 丢失笼形蛋白、进行性酸化和PI转化^[3](图1)。PI转变为胰岛素和C肽发生在未成熟的、笼形蛋白包被的分泌颗粒中。胰岛素原转换酶1(PC1)、胰岛素原转换酶2(PC2)和羧基肽酶H(CPH)是胰岛素原转换为胰岛素的三个关键酶, 其途径如下: 胰岛素原先经PC1在第32/33(精氨酸/谷氨酸)切开, 形成32/33裂环胰岛素原, 此裂环中间代谢产物不稳定, 紧接着在CPH的作用下, 切掉32/33裂环胰岛素原的31、32(精、精)氨基酸生成比较稳定的脱31, 32胰岛素原, 进一步在PC2和CPH的作用下分离切掉胰岛素原的第64, 65(赖精)氨基酸,

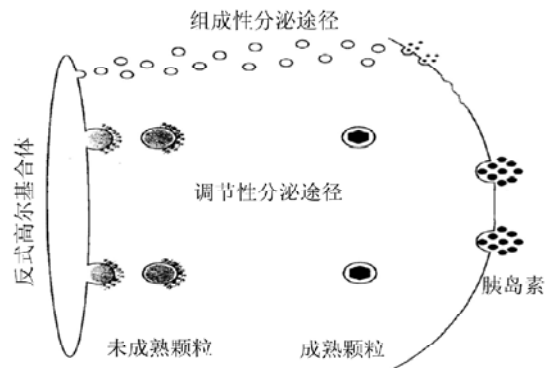


图1 胰岛β细胞产生胰岛素途径中的运输和加工

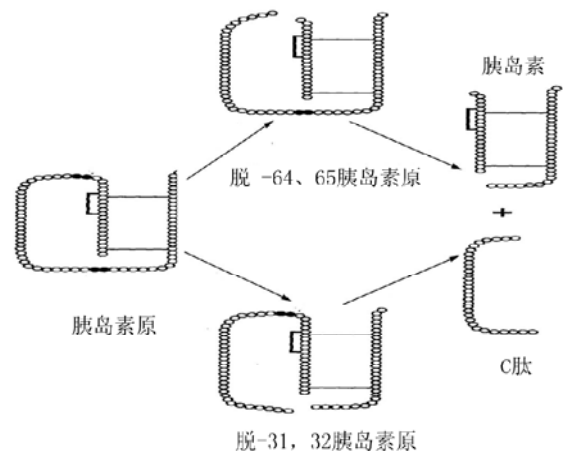


图2 胰岛素原在蛋白水解酶的作用下裂解为胰岛素和C肽

最终形成胰岛素和C肽(图2)。

正常 β 细胞分泌胰岛素的调节性途径包括分泌蛋白质的选择性包装到分泌颗粒,随后对刺激起分泌应答,但仅有少数高度分化的分泌细胞类型可在分泌颗粒中贮存其物质,并在促泌剂应答中将其释放。在正常 β 细胞中,通过储存颗粒的途径分泌出来的胰岛素,约占95%,但这种情况见于原位 β 细胞,在转型的细胞中,分选颗粒的效果并不高^[4]。

1.3 胰岛素原转换的关键酶

PC1和PC2是胰岛素原转变和代谢的限制性内切酶,主要存在于胰腺的 β 细胞中,也存在于垂体细胞和脑细胞,是神经内分泌特异性蛋白酶。CPH是一种糖蛋白,能裂解激素前体的羧基末端,并与PC2和PC3一起参与PI的加工过程。CPH分布于胰岛和多种内分泌细胞中,大约80%存在于 β 细胞中,是胰岛素分泌颗粒的主要成分,占2%—5%,是仅次于PI和INS的最丰富的胰岛蛋白。CPH与INS在胞吐过程中从 β 细胞同一区域释放出来,可认为CPH是衡量 β 细胞分泌功能的一个敏感指标。

1.4 胰岛素生物合成及分泌的调控

1.4.1 葡萄糖刺激的 β 细胞胰岛素生物合成及分泌(GSIS)

胰岛 β 细胞可以根据代谢需求的改变调整胰岛素的产生及释放。细胞外葡萄糖以及其他某些糖类浓度的迅速升高,可以引起胰岛素原合成快速而显著地增加。在葡萄糖浓度与胰岛素的生物合成活性之间,存在着一种“类S型”的相关关系,此阈值为2—4 mmol/L。刺激胰岛素分泌的阈值略低于此阈值,这可能是为了确保在 β 细胞内有一个恰当的胰岛素储存。胰岛素的释放包括3个过程:细胞内ATP浓度升高;含胰岛素小囊泡的转移;囊泡内胰岛素的释放。葡萄糖分子通过胰岛 β 细胞膜上的转运体GLUT2进入细胞,经糖酵解途径转变成丙酮酸,后者可直接通过线粒体膜进入线粒体,经三羧酸循环产生ATP。ATP可以关闭细胞膜上ATP敏感的 K^+ 通道,使细胞内 K^+ 外流减少,细胞膜去极化,由此产生膜两侧的电位差使 Ca^{2+} 通道开放,细胞内 Ca^{2+} 增加。而进入细胞内的 Ca^{2+} 能促使含有胰岛素的囊泡与细胞膜融合,由此向细胞外释放囊泡中的胰岛素。

1.4.2 胰岛素对胰岛素生物合成和分泌(ISIS)的调控

近年来,发现 β 细胞也是胰岛素的靶细胞, β 细胞胰岛素信号转导障碍可导致胰岛素分泌缺陷。Kulkarni等^[5]在 β 细胞胰岛素受体基因敲除(β IRKO)

小鼠的实验中发现,这些小鼠出现了与人2型糖尿病发病初期相似的表现,表明 β 细胞的胰岛素受体对维持GSIS的1相分泌是必不可少的。而Leibiger等^[6]的研究发现,胰岛素能刺激动物及人的离体胰岛或 β 细胞瘤细胞系的胰岛素的生物合成及分泌,包括对 β 细胞胰岛素基因的转录、翻译及其后续加工,分泌颗粒的转运、成熟以及胞吐等全过程均有刺激作用。可见胰岛素对 β 细胞本身具有正反馈调节机制。众所周知的GSIS也离不开胰岛素的作用。这样GSIS和ISIS共存,并相互协同作用。

2 干细胞诱导的IPCs存在PI转化障碍的可能机制及对策

目前诱导的IPCs不够成熟,主要表现在不能产生足够的真胰岛素,也就是PI转化障碍,类似于人类的2型糖尿病。根据上述胰岛素合成、分泌的生理过程,PI增高的可能机制如下所述。(1)PC1、PC2和CPH基因突变,以及比例失调等,使其功能减弱或异常^[7]。(2)葡萄糖刺激 β 细胞的各种反应不同步、不协调^[8],如PI裂解为胰岛素按一定顺序由两个酶控制:第一步,PC1使PI降解为脱31,32-PI;第二步,PC2再将脱31,32-PI裂解至胰岛素。然而,葡萄糖水平对PC1、PC2影响并不一致,前者受高血糖影响而合成加速,后者却不受血糖控制。这样,长期高血糖使血中脱31,32-PI浓度显著升高,而造成不成比例的高胰岛素血症。(3) β 细胞分泌颗粒的内环境不合适,如 Ca^{2+} 浓度和pH不正常^[9]。(4)长期高血糖刺激超过了 β 细胞应答能力,分泌颗粒在 β 细胞停留时间缩短^[10]。已有研究显示90%PI裂解为胰岛素需3h,而在急需胰岛素分泌时,PI无充分时间裂解为胰岛素即被分泌,如此会使原来的不成比例高PI血症更严重。(5)在正常 β 细胞中,通过储存颗粒分泌的途径,从细胞中分泌出来的胰岛素,大约占95%,但在某种类型的胰岛瘤细胞中,主要以“基本分泌途径”进行分泌,PI未经转换及包裹步骤,直接从由内质网转化来的囊泡中释放出来。由于分泌过程绕过了加工处理PI所需要的一些细胞器,其主要产物是PI,因此在基本分泌途径占主要优势的胰岛瘤和某些2型糖尿病患者中,有大量的胰岛素原被释放出来,或者胰岛素前质体(胰岛素原及其分裂产物)的分泌不成比例地升高。

上述PI增高的机制在干细胞诱导的IPCs中均有可能存在,但我们认为重点在于:一是诱导的IPCs

中是否表达PI转换为胰岛素的三个关键酶: PC1、PC2和CPH;二是诱导的IPCs是否存在调节性分泌途径。因为,即使我们诱导的IPCs具有了合成前PI和PI的能力,但如果缺乏与PI转换相关的关键酶或不能进入正常的调节性分泌途径,最终也只能产生生物学效能较差的半成品,那么,我们诱导干细胞向IPCs分化的种种努力最终归于无效。

2.1 IPCs是否缺乏PC1、PC2和CPH的表达

已知PC1、PC2主要存在于胰腺的 β 细胞、垂体细胞及脑细胞,是神经内分泌特异性的蛋白酶。非内分泌细胞中缺乏将胰岛素原转换为胰岛素的PC2和PC3酶,则无法表达具有生物活性的成熟胰岛素^[11,12],可以推测干细胞内本身缺乏这三种关键的酶,但向IPCs诱导的过程可能促进其表达。Moriscot等^[13]研究了PC1在成人骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)中的表达情况,结果提示PC1在不同供体来源的MSCs和不同代别MSCs之间存在很大差异;而Marandi等^[14]首次对大鼠骨髓MSCs中的PC家族成员进行了综合研究结果表明:在诱导之前,大鼠骨髓MSCs完全不表达PC1和PC2,但在向神经元诱导之后,细胞不仅开始表达PC1和PC2,而且还表达7B2(一种PC2自我激活和发挥最佳作用所必需的成分);此外,Li等^[15]在研究小鼠ESCs来源的胰岛素原IPCs以及Narushima等^[16]在研究人 β 细胞系时都检测到了PC1、PC2的表达。Kim等^[2]在人源MSCs中转入与腺病毒偶联的前胰岛素基因,分化后的细胞能分泌胰岛素和C肽,但两者不成比例,他们认为可能是酶的不稳定所导致(因为在正常 β 细胞中,胰岛素和C肽储存在同一个颗粒囊中,以等分子量的形式释放,其比例应该为1:1)。前期研究中,我们采用单纯生物学制剂的方法诱导了人胎儿骨髓及肝脏MSCs向IPCs分化,用化学发光法在细胞培养上清中检测出大量的胰岛素免疫反应阳性产物,其特点在于简便、快速、高效且安全,但Western bolt和高效液相色谱分析提示IPCs合成的胰岛素原不能有效地加工为真胰岛素,我们认为单纯的生物学制剂可以诱导胎儿MSCs大量表达前胰岛素原基因,但大量的胰岛素原并不能进入正常的调节性分泌途径,或者IPCs不能正常地表达上述胰岛素原转换的关键酶。在进一步的研究中,我们重点关注两点:一是诱导的IPCs中是否表达胰岛素原转换为胰岛素的三个关键酶:PC1、PC2和CPH;二是IPCs中PC1和PC2表达量与胰

胰岛素的分泌量之间是否具有相关性(一般地,PCH的表达具有广谱性,推测PCH在MSCs诱导前后均有表达,所以我们重点探讨PC1、PC2)。从理论上分析,我们可以得到以下预期结果:诱导之前,胎儿MSCs内缺乏PC1、PC2的表达,诱导之后,IPCs开始表达PC1、PC2,且IPCs中PC1、PC2表达量与其胰岛素的分泌量之间存在正相关(可见在不同诱导方案之间比较,也可在同一诱导方案的不同阶段进行动态比较)。如果上述预期结果得以证实,则可以采取各种措施加强PC1、PC2的表达,从而促进IPCs分化成熟。一方面,通过添加生物或化学诱导剂、受损胰岛 β 细胞提取液或与胰岛 β 细胞共培养、转入胰腺发育相关基因等方法促进这三种基因的表达;另一方面,通过基因转染的方法直接将PC1、PC2基因或通过蛋白质转导的方法将体外合成的这三种酶导入细胞,以促进胰岛素原的转化。此外,在普通细胞的胞内普遍存在着蛋白质前体加工酶Furin^[17]和PACE4^[18],它们能特异识别Arg-X-Lys/Arg-Arg序列,因此对细胞进行胰岛素原基因转染前,采用点突变的方法将胰岛素原基因C肽与A、B链连接处诱变为含有Furin或PACE4识别位点的突变体,可以解决普通细胞不能加工胰岛素原的问题^[19],这种方法当然也可以用于IPCs,从而使IPCs用于糖尿病基因治疗成为可能。

2.2 IPCs中的PI能否进入调节性分泌途径

前已述及仅有少数高度分化的分泌细胞类型可在分泌颗粒中贮存其物质,并在促泌剂应答中将其释放^[4],如基因转染的肝细胞合成的胰岛素就不能在细胞内储存并按需分泌。因此,即使IPCs中有PC1、PC2的表达,如果PI不能进入正常分泌途径,绕过了加工处理PI所需要的一些细胞器,则细胞中PI未经转换及包裹步骤,直接从由内质网转化来的囊泡中释放出来,但胰岛素分泌的生理性调控对成功的糖尿病治疗至关重要,目前可通过控制内质网(ER)中的凝聚过程来调控胰岛素的储存和分泌。Rivera等^[20]和Aridor等^[21]报道了通过控制ER中的凝聚过程来调控胰岛素的分泌。单聚体、可溶性蛋白质FKBP12经改造,其第36位的Phe变成Met后,可与胰岛素嵌合基因转录翻译后以特殊的肽链连接并储存在ER内。而一种人工合成的能通过细胞膜的小分子药物可使之变构,而后被Furin酶在连接处水解,迅速释放成熟胰岛素。当不加外源药物时,培养液中胰岛素的含量非常低,而ER中储

存的胰岛素的量相当于 5—10 h 的合成量,因此可通过改变此药物浓度控制胰岛素分泌率。Rivera 等^[20]将上述表达载体的细胞植入到用 STZ 诱导的糖尿病小鼠体内,15 min 后在血清中可检测出胰岛素,2 h 后达到高峰,循环浓度达 $8 \times 10^{-10} \text{mol/L}$ 。随着胰岛素的释放,血糖浓度迅速下降,在 30 min 内下降 40%,2 h 内下降 90%,2 h 后循环胰岛素量减少,血糖升高。这与生理性胰岛素释放非常相似。这一设计非常巧妙,并且可进行基因转染的宿主细胞可能不受限制。如能证明在人类也具可行性,则一次性或间断性注射含此功能基因的载体将有可能代替重复注射重组胰岛素治疗 1 型糖尿病。兰丽珍等^[22]实验表明,构建带信号肽人胰岛素原突变体(表达载体包含胰岛素 N-端的信号肽序列)有助于基因表达产物进入内质网腔,从而进行正常的调节性分泌途径。

在诱导干细胞向 IPCs 分化方面,目前普遍受到关注并已取得了较大进展的是启动胰腺发育相关基因,以促进前胰岛素原基因的表达或者通过基因转染的方法直接转入相关基因,但从胰岛素合成和分泌的生理学角度看,我们认为调动胰岛素原转换关键酶的表达和促进调节性分泌途径的形成也是非常必要的,因为,即使诱导的 IPCs 具有了合成胰岛素原的能力,但如果缺乏胰岛素原转换为真胰岛素的关键酶或不具有正常的调节性分泌途径,最终也只能产生生物学效能较差的半成品(胰岛素原及其中间产物)。

3 对干细胞诱导的 IPCs 进行功能学检测的思路

通过外源性处理使干细胞表达胰岛相关的转录因子,以促进干细胞向具有胰岛细胞表型的细胞分化是经典的思路。其中,通过葡萄糖和其他生物学制剂来激活内源性胰岛素基因表达是一种较理想的诱导方案,但对前胰岛素的合成、加工以及胰岛素分泌进行生理性调节往往很难奏效;目前,已成功地对干细胞进行外源胰岛素基因或胰岛相关基因的转染与表达,实验表明这些细胞可产生具有生物活性的胰岛素,但目前尚未能达到模拟生理状况下葡萄糖调控的胰岛素合成和分泌的理想模式。而胰岛素基因的表达必须受到严格的调控,因为过少的基因表达不能达到治疗目的;过多的表达又会引起低血糖的不良反应。因而寻找理想的胰岛素表达调控方案,达到胰岛素生理性合成和释放,是临床治疗糖尿病所追求的目标。由于胰岛素的合成、分泌

与血糖水平关系密切,因此理想的胰岛素分泌细胞应具备:(1)胰岛素原转录、翻译后能在分泌囊泡内成熟为胰岛素,即细胞能表达激素原转换酶 PC2、PC3,能有效加工胰岛素原成胰岛素;(2)生理性葡萄糖敏感的胰岛素合成和分泌,即细胞能表达葡萄糖感应器:葡萄糖磷酸化酶(GK)和葡萄糖转运体(Glut2)等;(3)能通过调节性分泌途径将胰岛素释放到细胞外;(4)细胞表面表达胰岛素受体(IR):近年来的研究表明 β 细胞也是胰岛素的靶细胞, β 细胞胰岛素信号转导障碍可导致胰岛素分泌缺陷。

目前,主要从形态和功能上对干细胞诱导 IPCs 进行鉴定,前者包括:细胞聚集成团、双硫脲染色阳性、免疫细胞化学染色阳性、电镜观察到分泌囊泡;后者包括:从基因水平和蛋白质水平测定细胞内或培养上清中胰岛素及 C 肽水平,以及检测葡萄糖刺激前后的胰岛素释放比值(刺激指数),将细胞移植到糖尿病模型体内进行降糖效应的观察等。然而,细胞膜上是否有转运体 GLUT2、GK 和 IR;细胞内是否有激素原转换酶 PC2、PC3;细胞是否通过有效的调节性分泌途径进行分泌(如细胞膜上是否有与胰岛素调节性分泌相关的离子通道)等的研究都鲜有涉及,而这些方面从根本上能够证明诱导的 IPCs 是否真正具有功能。如:已知葡萄糖和胰岛素对胰岛素的合成和分泌具有重要的调节作用,因而细胞膜上是否有转运体 GLUT2 和 IR,是决定细胞有无糖反应性的关键;而研究 IPCs 有无 PC1、PC2 和 CPH 的表达决定了其合成的胰岛素原能否加工为真胰岛素;细胞有无 IR 也决定了 IPCs 能否进行生理性分泌等。这些指标的检测可从根本上判断诱导的 IPCs 是否真正具有功能,从而提供了从分子水平对 IPCs 进行功能学鉴定的资料。

4 结语

如何促进 IPCs 成熟并对其进行功能学鉴定关系到能否将其应用于临床治疗糖尿病;而分析、获得 IPCs 不能成熟的关键因素,将有助于针对这些环节采取相应措施,从而促进 IPCs 发挥生理功能。通过以上分析不难看出,诱导干细胞向功能性 IPCs 分化的目标很明确:一方面启动胰腺发育相关基因以促进胰岛素基因的表达;另一方面要调动胰岛素原转换酶的表达和促进调节性分泌途径的形成。只有两者结合才能获得功能性 IPCs,从而有效地治疗糖尿病。而评价一个诱导方案的优劣,除了经典的方法之外,也可以从以上几方面加以考察,如以诱导

前后PC1、PC2表达量的变化来衡量IPCs的功能并动态观察诱导效果等。

[参 考 文 献]

- [1] Alidibiat A, Marriott CE, Scougal KT, et al. Inability to process and store proinsulin in transdifferentiated pancreatic acinar cells lacking the regulated secretory pathway. *J Endocrinol*, 2008, 196(1): 33-43
- [2] Kim JH, Park SN, Suh H. Generation of insulin-producing human mesenchymal stem cells using recombinant adeno-associated virus. *Yonsei Med J*, 2007, 48(1): 109-19
- [3] Joslin EP. 糖尿病学[M]. 潘长玉, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2007
- [4] Nagamatsu S, Steiner DF. Altered glucose regulation biosynthesis in insulinoma cells: mouse TC3 cells secrete insulin-related peptides predominately via a constitutive pathway. *Endocrinology*, 1992, 130(2): 748-54
- [5] Kulkarni RN, Winnay JN, Kahn CR, et al. Tissue-specific knockout of insulin receptor in pancreatic β cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*, 1999, 96(3): 329-39
- [6] Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO. Insulin feedback action on pancreatic β -cell function. *FEBS Lett*, 2002, 532(1-2): 1-6
- [7] Steiner DF, Rouille Y, Gong Q, et al. The role of prohormone convertase in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes Metab*, 1996, 22(2): 94-104
- [8] Hostens K, Ling Z, Van Schravendijk C, et al. Prolonged exposure of human β -cell to high glucose increases their release of proinsulin during acute stimulation with glucose or arginine. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(4): 1386-90
- [9] Urukawa H, Carroll RJ, Swift HH, et al. Long-term elevation of free fatty acids leads to delayed processing of proinsulin and prohormone convertases 2 and 3 in the pancreatic β -cell line MIN6. *Diabetes*, 1999, 48(7): 1395-401
- [10] Kahn SE, Halban PA. Release of incompletely processed proinsulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia of NIDDM. *Diabetes*, 1997, 46(11): 1725-32
- [11] Quinn D, Orci L, Ravazzola M, et al. Intracellular transport and sorting of mutant human proinsulin that fail to form hexamers. *J Cell Biol*, 1991, 113(5): 987-96
- [12] Galloway JA, Hooper SA, Spardlin CT, et al. Biosynthetic human proinsulin. Review of chemistry, *in vivo* receptor binding, animal and human pharmacology studies, and clinical experience. *Diabetes Care*, 1992, 15(5): 666-92
- [13] Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation *in vitro*. *Stem Cells*, 2005, 23(4): 594-603
- [14] Marandi M, Mowla SJ, Tavallaei M, et al. Proprotein convertases 1 and 2 (PC1 and PC2) are expressed in neurally differentiated rat bone marrow stromal stem cells. *Neurosci Lett*, 2007, 420(3): 198-203
- [15] Li GD, Luo RH, Zhang JP, et al. Generating mESC-derived insulin-producing cell lines through an intermediate lineage-restricted progenitor line. *Stem Cell Res*, 2007, 2(1): 41-55
- [16] Narushima M, Kobayashi N, Okitsu T, et al. A human β -cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(10): 1274-82
- [17] Kiefer MC, Tucker JE, Joh R, et al. Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol*, 1991, 10(10): 757-69
- [18] Bart PJ, Mason OB, Landsberg K, et al. cDNA and gene structure for a human subtilisin-like protease with cleavage specificity for paired basic amino acid residues. *DNA Cell Biol*, 1991, 10(5): 319-28
- [19] Mitanehez D, Chen R, Massias JF, et al. Regulated expression of mature human insulin in the liver of transgenic mice. *FEBS Lett*, 1998, 421(3): 285-9
- [20] Rivera VM, Wang X, Wardwell S, et al. Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum. *Science*, 2000, 287(5454): 826-30
- [21] Aridor M, Balch WE. Perspectives: drug delivery. regulating export of ER cargo. *Science*, 2000, 287(5454): 816-7
- [22] 兰丽珍, 邓华聪, 孙辽, 等. 带信号肽人胰岛素原突变体的构建及在COS-7细胞中的表达. *重庆医科大学学报*, 2004, 29(5): 563-75