

文章编号: 1004-0374(2012)02-0145-05

转录因子对干细胞高效定向分化为 β 细胞的作用

陈桃, 齐晖, 李富荣*

(1 暨南大学第二临床医学院(深圳市人民医院)风湿科, 深圳 518020; 2 深圳市老年医学研究所, 深圳 518020)

摘要: 移植干细胞分化的胰岛 β 细胞能逆转糖尿病鼠的高血糖症, 为细胞疗法临床应用于糖尿病治疗提供依据。但如何诱导干细胞高效、定向分化为具有分泌功能的胰岛 β 细胞, 仍是当今世界难题。就影响干细胞分化为胰岛 β 细胞的关键转录因子 PDX-1、Ngn3、NeuroD1、MafA 的作用及机制进行综述, 为干细胞高效定向分化提供新的思路。

关键词: 干细胞; β 细胞; 分化; 转录因子

中图分类号: Q254; Q813

文献标志码: A

Effect of transcription factors on differentiation into insulin-producing cells from stem cells

CHEN Tao, QI Hui, LI Fu-Rong*

(1 Department of Rheumatism, the Second Affiliated Hospital (Shenzhen People's Hospital) of Jinan University, Shenzhen 518020, China; 2 Shenzhen Institute of Gerontology, Shenzhen 518020, China)

Abstract: Transplantation of insulin-producing cells derived from stem cells could reverse hyperglycemia in diabetic mice, which support the evidence of cell replacement therapy of diabetics in clinical use. But the protocol that how to induce differentiation of stem cells into insulin-producing cells effectively and directionally, still is a worldwide problem. This review aims to present mechanism about differentiation into insulin-producing cells from stem cells with key transcription factors PDX-1, Ngn3, NeuroD1, MafA. It is a new way for the efficient and directional differentiation from stem cell into insulin-producing cells.

Key words: stem cell; β cell; differentiation; transcription factors

对于丧失胰岛细胞功能的糖尿病患者来说, 胰岛移植是治愈糖尿病的最具潜力的方案之一, 但胰岛供体短缺, 严重影响其在临床的广泛应用。近年研究表明, 干细胞分化而来的胰岛 β 细胞有望成为糖尿病治疗新的细胞来源。但目前胚胎干细胞、成体干细胞和 iPS 细胞体外分化为胰岛 β 样细胞效率低、成熟度差, 难以满足临床治疗的需要。深入了解干细胞向胰岛 β 细胞诱导分化的分子调控机制, 将有助于提高分化效率及完善胰岛 β 样细胞的功能。本文就影响干细胞分化为胰岛 β 细胞的关键转录因子 PDX-1、Ngn3、NeuroD1、MafA 等在干细胞高效定向分化为胰岛 β 细胞中的作用及机制进行了综述, 为干细胞高效定向分化提供新的思路。

1 胰岛 β 细胞的发育过程及相关转录因子

胚胎发育过程中, 前肠内胚层细胞增生的同时 Shh 信号转导通路受抑制, 即可激活 PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox factor-1, 胰十二指肠同源盒基因-1)^[1-2], 指导前肠内胚层背、腹胰芽生长; 随着胰腺祖细胞分化, 先后形成背胰芽和腹胰芽。当背胰和腹胰不断分支、融合, 胰腺祖细

收稿日期: 2011-08-06; 修回日期: 2011-10-23

基金项目: 国家重点基础研究计划(“973”项目)(2004CCA01500); 广东省自然科学基金项目(6027540); 深圳市科技计划项目(201001002)

*通信作者: E-mail: frli62@yahoo.com

胞向三个方向发育：腺泡、导管、内分泌祖细胞。Notch 信号是决定胰腺祖细胞向内、外分泌细胞形成的临界信号。若 Notch 信号被激活时，bHLH 蛋白 Hes-1 的表达启动，可抑制 Ngn3 (neurogenin 3, 神经元素 3) 的表达，诱导细胞向外分泌祖细胞分化；若 HNF3 β 结合 Ngn3 启动子，开启 Ngn3 的表达，则抑制 Notch 信号，诱导细胞向内分泌祖细胞分化^[3]。随后，位于下游的 NeuroD1 (neurogenic differentiation factor 1, 又称 BETA2, 神经性分化因子 1)，在 IA1 协同作用下指导 Pax4 (paired box gene 4, 成对盒基因 4) 及 ARX (aristaless related homeobox) 双阳性的 β/δ 前体细胞生成。其中，Pax4(+) 的前体细胞被依次激活 MafA (Mus musculus v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family protein A, 肌腱膜的纤维肉瘤肿瘤基因同系物 A)、Nkx2.2 (NK2 transcription factor related, locus 2)、Nkx6.1 (NK6 homeobox 1) 后，Ngn3 表达开始下调^[4]，并在 Hlxb9 (homeobox gene HB9, 同源框 HB9)、Isl-1 (Islet1)、Pax6 (paired box gene 6, 成对盒基因 6)、PDX-1 的共同作用下，细胞呈团簇状聚集生成，最终发育为分泌胰岛素的 β 细胞 (见图 1)。

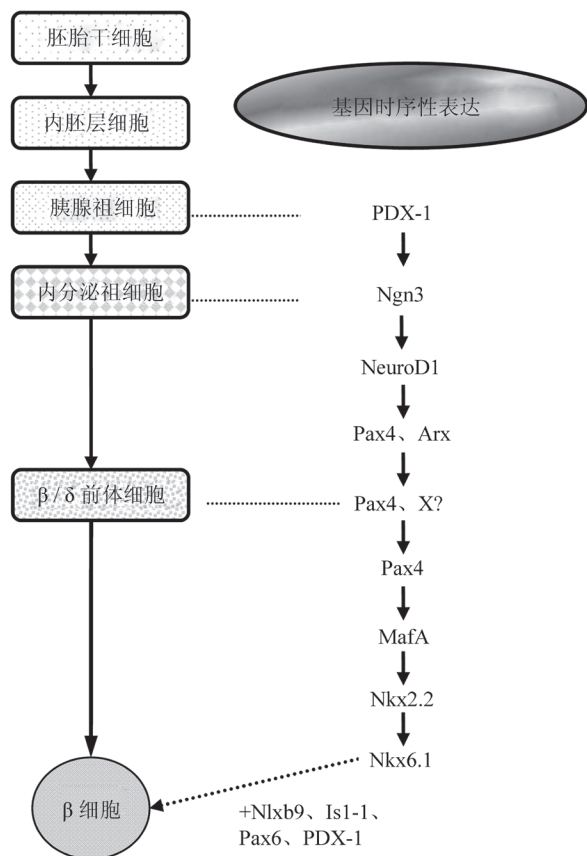


图1 胚胎干细胞向 β 细胞发育示意图

2 干细胞分化为胰岛 β 细胞中转录因子的作用

胰腺发育受复杂的网络调控，其中胰岛 β 细胞的分化及胰岛素基因的表达需要多个转录因子，如 PDX-1、Ngn3、NeuroD1、Pax4、MafA 等时序性表达，进而激活多个信号途径。尽管胰腺发育具体的确切机制尚未完全明确，研究者们利用已知的重要相关因子，模拟 β 细胞发育过程，运用基因转染的方法诱导各种干细胞为胰岛素 β 细胞，为诱导分化的策略提供了宝贵的经验。但鉴于体外或体内环境复杂，基因转染面临能否持续表达以及基因变异的问题，难以短期内广泛应用于临床；再者， β 细胞发育需要多个基因的时序性表达，若多个基因同时开启，可能反而抑制相关发育基因的开启，从而影响干细胞分化为胰岛 β 细胞的效率和成熟度。因此，人为直接添加相关转录因子的产物——蛋白质，并利用蛋白质自身或外源的跨膜结构域穿过细胞膜，于细胞内诱导干细胞为胰岛 β 细胞可能是高效定向分化的新策略。下面就各转录因子通过基因转染或蛋白质转导的方法，在干细胞分化为 β 细胞中的作用作一概括。

2.1 PDX-1

PDX-1 被认为是胰腺内分泌细胞发育的主要调控因子，最早在胚胎发育早期的肠道中表达，除直接指导、维持前肠内胚层向胰腺祖细胞发展外，还通过结合调控蛋白 HNF3 β 而实现调控胰腺内分泌细胞的生成。随着胰腺发育，PDX-1 表达有所下降，但在成体中持续表达，维持着 β 细胞的表型、胰岛素基因的转录以及胰岛素颗粒的成熟与分泌，该功能是 PDX-1 蛋白通过结合胰岛素基因转录调控区 A3 (-201~-196 bp) 而实现的。至于 PDX-1 的激活，可能与 PDX-1 调控序列中占据多个位点的 Foxa1 和 Foxa2 有一定关系^[5]。

基于以上机制，学者们视 PDX-1 为重编程细胞的有力武器，构建表达外源性 PDX-1 基因的胚胎干细胞系，诱导其分化为胰岛素分泌细胞，结果发现细胞中胰岛素 2、生长抑素、Kir6.2、葡萄糖激酶、Ngn3、Pax6、PC2 及 HNF6 的表达明显增强了，且分泌胰岛素 54 ng/mg 上清蛋白，但无明显糖依赖的胰岛素分泌^[6]。最近 Kajiyama 等^[7]将转染 PDX-1 基因的小鼠脂肪干细胞移植到糖尿病模型小鼠体内，希望利用体内环境诱导为胰岛素分泌细胞；免疫组化实验显示平均每张胰腺组织切片中，每 12 个脂肪干细胞就约有 3 个细胞表达 C 肽。Yuan 等^[8]

在体外利用重组 PDX-1 转染大鼠骨髓间充质干细胞, 诱导后胰岛素分泌细胞 DTZ 着色约占 32%, 高糖刺激第 5 天胰岛素释放量 (9.1 mIU/L) 是低糖组的 9 倍, 但 9 d 后明显下降, 推测可能在高糖刺激下, PDX-1 先进入细胞核激活 Ngn3 及招募相关蛋白, 进而超激活胰岛素及 β 细胞相关基因的表达。当联合转染 PDX-1 及 Betacellulin 基因, 大鼠骨髓间充质干细胞分化的胰岛素分泌细胞分泌胰岛素的量为单独 PDX-1 组的 5 倍, 但在葡萄糖刺激下释放胰岛素及 C 肽的量仅为正常胰腺的 3%^[9]。

为比较 PDX-1、PDX-1-VP16、TAT-PDX-1、TAT-PDX-1-VP16 四种蛋白的转导及诱导效果, Delisle 等^[10] 分别将其与大鼠肝脏上皮干细胞 WB 细胞共培养 14 d, 发现除含 VP16 的融合蛋白外, 其他蛋白均能激活大鼠 *Insulin 2* 启动子, 但 RT-PCR 未见大鼠 *Insulin 2* 表达; 胰腺发育相关基因 (Ngn3、NeuroD1、Pax-4、Nkx2.2、Nkx6.1、PDX-1) 及 β 细胞成熟相关基因 (*Glut-2*、*Kir6.2*、*Insulin*), 诱导后有不同程度的表达。研究表明, 同为大鼠 WB 系肝干细胞, 在激活 PDX-1 下游 NeuroD 转录水平的效率上, PDX-1 转染效率 (20%) 与重组 PDX-1 蛋白诱导效率 (19%) 相当^[11]。也有人添加外源性 PDX-1-VP16 蛋白成功将人胚胎干细胞体外诱导为胰腺内分泌细胞, 其中约 30% 为 β 样细胞^[12]。

2.2 Ngn3

Ngn3 属于碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 转录因子家族, 对胰腺内分泌细胞的发育是必要的, 且具有剂量效应^[13-14]。研究表明, Ngn3 影响雏鸡内胚层细胞的迁徙和分化^[15]。但胰芽发育后, 内分泌祖细胞中 Ngn3 的表达仅是短暂的, 胎儿出生后则检测不到其表达^[16], 推测 Ngn3 在调控胰腺发育中发挥开关作用。因为当 Ngn3 高表达时, 可能启动了其抑制作用或未知的反馈机制, 下调 Ngn3(+) 的细胞数目, 从而影响内分泌祖细胞与外分泌祖细胞的比例^[14]。在大鼠胚胎胰腺发育及成体胰岛修复中, Ngn3 表达降低时, 位于其下游调控胰岛细胞分化、成熟、功能化的相关基因, 如 NeuroD1、Nkx2.2、Pax4 等表达就会减少, 最终导致胰岛内分泌功能障碍^[17]。

由此可见, Ngn3 不仅是诱导内分泌细胞分化的重要因子, 也是促进胰岛成熟和维持胰岛功能的重要因子。在腺病毒感染 AR42J-B13 向 β 细胞分化的体外系统中, 研究人员认为 Ngn3 是小鼠胚胎发育中必不可少的, 若联合 Nkx6.1 及 Ngn3 仅诱导

内源性 *Insulin2* 表达, 而联合 MafA 及 Ngn3 则可同时诱导内源性 *Insulin 1*、*Insulin 2* 表达^[18]。国内有实验室以流产人胎儿胰腺组织克隆出人 Ngn3 基因, 并构建了 pMSCV-ngn3 重组逆转录病毒载体及其包装细胞株, 为下一步将 Ngn3 基因导入人胎儿胰腺祖细胞, 提高诱导分化效率的研究奠定了基础^[19]。

2.3 NeuroD1

NeuroD1 最先被发现于发育的胰腺上皮细胞中, 与 Ngn3 同属 bHLH 蛋白转录调控因子, 且受 Ngn3 的调控^[20]。胚胎出生后 NeuroD1 可在 α、β 及 δ 细胞中表达, 激活 *Glucagons*、*Insulin* 及胰岛素分泌基因, 对胰腺的分化成熟是不可或缺的^[21]。Noguchi 等^[22] 发现用腺病毒感染小鼠或人的胰腺前体细胞, 并诱导其为胰岛素分泌细胞时, 整合 NeuroD1 的腺病毒比整合 PDX-1、Ngn3 或 Pax4 的更能诱导 *Insulin* 基因表达。也有联合 NeuroD1 转染及小分子化合物者, 诱导人脐带间充质细胞为胰岛素分泌细胞团, 并表达内源性 PDX-1、*Insulin* 等胰腺 β 细胞相关基因^[23]。

2.4 MafA

MafA 是 Maf 家族的一员, 具有亮氨酸拉链 (bZip) 结构, 仅在成体胰腺的 β 细胞中表达, 可调控胰岛素合成、分泌和糖代谢等相关基因的表达。其特异结合于胰岛素基因 C1 元件, 与 PDX-1、β 细胞 E 盒反式作用因子共同调节 *Insulin* 的转录, 对胰腺生长, 特别是 β 细胞的功能成熟起着重要作用。

MafA 比 PDX-1 更能增强新生大鼠 β 细胞在葡萄糖刺激下的胰岛素分泌能力^[24]。另一方面, 由于 MafA 是高度磷酸化蛋白, 抑制 p38 MAPK 可促进 MafA 在细胞中的稳定表达; 换言之若诱导过程中避免 p38 MAPK 介导的 MafA 的退化, 可能是改善 β 细胞功能、促进成熟度的一个有效措施^[25]。最近美国有实验室将 TAT-MafA 融合蛋白通过子宫内注射到胚胎心脏, 促进了胚胎后期胰腺前体细胞的成熟, 以及转录水平上 *Insulin 1*、*Insulin 2*、*Glut2* 等胰腺发育或成熟相关基因的上调, 且表达 *Insulin*^[26]。

2.5 多个转录因子联合作用

研究表明影响干细胞高效定向分化的重要转录因子包括 PDX-1、Ngn3、NeuroD1、MafA。PDX-1 与 Ngn3 在激活其他转录因子时具有协同作用^[8]。PDX-1 开启 Ngn3 的同时激活下游转录因子的交叉网络, 胚胎干细胞或胰腺祖细胞即向 β 细胞分化^[2]。此外, PDX-1 也位于 MafA 增强子的 3' 区域, 与

MafA 共同参与 *Insulin* 转录水平的正反馈机制。可见, 联合多个转录因子有望将干细胞高效定向分化为胰岛 β 细胞并促进其成熟。

Zhao 等^[27] 将分别整合外源 PDX-1、*NeuroD1*、*Ngn3* 基因的三种病毒同时感染人骨髓间充质干细胞 6 d 后, 培养基上清中检测到含胰岛素约 $220 \mu\text{U}/3 \times 10^6$ 细胞, 体外对葡萄糖刺激无反应说明其成熟度较差, 而移植到糖尿病鼠体内后有 12.5% 的细胞表达 *Insulin* 并有效降低模型鼠的血糖水平, 可见体内高血糖环境促进细胞一定程度分化, 遗憾的是并未检测到 *SUR1* (一种胰岛素分泌调节的 K 离子通道组分) 的表达。有研究为筛选诱导分化的关键转录因子, 将分别导入 *MafA*、PDX-1、*Ngn3*、*NeuroD1*、*Isl-1*、*Pax6*、*Pax4*、*Nkx2.2* 和 *Nkx6.1* 基因的腺病毒混合注射到免疫缺陷小鼠的胰腺内, 免疫组化实验显示有适量胰岛素细胞生成, 进而每次剔除一种腺病毒重复试验, 结果发现 *MafA*、PDX-1、*Ngn3* 腺病毒是必不可少的, 且此组合可诱导大于 20% 的感染细胞分化为胰岛素分泌细胞, 其胰岛素分量与内源性 β 细胞相当, 且 3 个月后细胞仍存活^[28]。猪的器官与人的最为相近, 因此有研究者尝试诱导新生猪的胰腺导管细胞为胰岛素分泌细胞: 当目标细胞联合转染 PDX-1、*NeuroD1* 及 *MafA* 基因后, 表达内源性胰岛素基因, 且诱导结束后移植于裸鼠肾包膜下的细胞仍具有良好的增殖能力并趋于成熟^[29]。

与基因转染类似, 研究者也希望通过联合蛋白诱导出更高效、更安全的诱导方案。Noguchi 等^[30] 联合运用重组 PDX-1 蛋白及 *NeuroD1* 蛋白成功诱导人胰腺前体细胞分化为胰岛素分泌细胞, 并表达胰腺相关基因, 但 30 d 后该细胞开始衰老, 并停止分化。可见, 蛋白质转导的策略尚需不断的完善。

3 干细胞分化为胰岛 β 细胞存在的问题

目前如何诱导产生大量的功能性 β 细胞仍是一个巨大挑战, 这可能与两方面原因有关: (1) 胰腺发育的具体机制与信号转导通路尚未明确, 无法利用转录因子精确调控干细胞分化^[31]; (2) 干细胞的增殖分化行为一方面被细胞本身预先程序化, 另一方面受其所处的微环境 (干细胞壁龛) 的影响, 即包括细胞与细胞、细胞与细胞外基质两种方式, 体外难以模拟复杂的体内微环境。我们需要不断深入研究胰岛发育过程中的分子机制, 寻求高效定向分化干细胞为 β 细胞的方案, 最终实现糖尿病的干细

胞治疗。

[参 考 文 献]

- [1] Van den Brink GR. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev*, 2007, 87(4): 1343-75
- [2] Oliver-Krasinski JM, Kasner MT, Yang JX, et al. The diabetes gene *Pdx1* regulates the transcriptional network of pancreatic endocrine progenitor cells in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119(7): 1888-98
- [3] Cras-Meneur C, Li L, Kopan R, et al. Presenilins, Notch dose control the fate of pancreatic endocrine progenitors during a narrow developmental window. *Genes Dev*, 2009, 23(17): 2088-101
- [4] Rath MF, Bailey MJ, Kim JS, et al. Developmental and daily expression of the *Pax4* and *Pax6* homeobox genes in the rat retina: localization of *Pax4* in photoreceptor cells. *J Neurochem*, 2009, 108(1): 285-94
- [5] Gao N, LeLay J, Vatamaniuk MZ, et al. Dynamic regulation of *Pdx1* enhancers by *Foxa1* and *Foxa2* is essential for pancreas development. *Genes Dev*, 2008, 22(24): 3435-48
- [6] Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. Regulated expression of *pdx-1* promotes *in vitro* differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes*, 2004, 53(4): 1030-7
- [7] Kajiyama H, Hamazaki TS, Tokuhara M, et al. *Pdx1*-transfected adipose tissue-derived stem cells differentiate into insulin-producing cells *in vivo* and reduce hyperglycemia in diabetic mice. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(4): 699-705
- [8] Yuan H, Li J, Xin N, et al. Expression of *Pdx1* mediates differentiation from mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(8): 4023-31
- [9] Li LS, Li FR, Qi H, et al. Coexpression of *Pdx1* and *betacellulin* in mesenchymal stem cells could promote the differentiation of nestin-positive epithelium-like progenitors and pancreatic islet-like spheroids. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(4): 815-23
- [10] Delisle JC, Martignat L, Dubreil L, et al. *Pdx-1* or *Pdx-1*-VP16 protein transduction induces β -cell gene expression in liver-stem WB cells. *BMC Res Notes*, 2009, 2: 3
- [11] Koya V, Lu S, Sun YP, et al. Reversal of streptozotocin-induced diabetes in mice by cellular transduction with recombinant pancreatic transcription factor pancreatic duodenal homeobox-1 - A novel protein transduction domain-based therapy. *Diabetes*, 2008, 57(3): 757-69
- [12] Bernardo AS, Cho CHH, Mason S, et al. Biphasic induction of *Pdx1* in mouse and human embryonic stem cells can mimic development of pancreatic β -Cells. *Stem Cells*, 2009, 27(2): 341-51
- [13] Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, et al. *neurogenin3* is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1607-11
- [14] Wang S, Yan JB, Anderson DA, et al. *Neurog3* gene

- dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas. *Dev Biol*, 2010, 339(1): 26-37
- [15] Rosenberg LC, Lafon ML, Pedersen JK, et al. The transcriptional activity of *Neurog3* affects migration and differentiation of ectopic endocrine cells in chicken endoderm. *Dev Dyn*, 2010, 239(7): 1950-66
- [16] Watada H. Neurogenin 3 is a key transcription factor for differentiation of the endocrine pancreas. *Endocr J*, 2004, 51(3): 255-64
- [17] Wang S, Jensen JN, Seymour PA, et al. Sustained *Neurog3* expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(24): 9715-20
- [18] Ogihara T, Fujitani Y, Uchida T, et al. Combined expression of transcription factors induces AR42J-B13 cells to differentiate into insulin-producing cells. *Endocr J*, 2008, 55(4): 691-8
- [19] 楚元奎, 吕长荣, 陈冬梅, 等. 人神经元素3基因重组逆转录病毒表达载体的构建及其包装细胞株的建立. *生物工程学报*, 2010, 26(4): 448-53
- [20] Huang HP, Liu M, El-Hodiri HM, et al. Regulation of the pancreatic islet-specific gene *BETA2 (neuroD)* by neurogenin 3. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(9): 3292-307
- [21] Lee JC, Smith SB, Watada H, et al. Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene *neurogenin3*. *Diabetes*, 2001, 50(5): 928-36
- [22] Noguchi H, Xu G, Matsumoto S, et al. Induction of pancreatic stem/progenitor cells into insulin-producing cells by adenoviral-mediated gene transfer technology. *Cell Transplan*, 2006, 15(10): 929-38
- [23] Wang HW, Lin LM, He HY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into insulin-producing cells *in vitro*. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(10): 1534-9
- [24] Aguayo-Mazzucato C, Koh A, El Khattabi I, et al. *Mafa* expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. *Diabetologia*, 2011, 54(3): 583-93
- [25] Kondo T, El Khattabi I, Nishimura W, et al. p38 MAPK is a major regulator of MafA protein stability under oxidative stress. *Mol Endocrinol*, 2009, 23(8): 1281-90
- [26] Vargas N, Alvarez-Cubela S, Giraldo JA, et al. TAT-mediated transduction of MafA protein in utero results in enhanced pancreatic insulin expression and changes in islet morphology. *PLoS One*, 2011, 6(8): e22364
- [27] Zhao M, Amiel SA, Ajami S, et al. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes in mice with cells derived from human marrow stromal cells. *PLoS One*, 2008, 3(7): e2666
- [28] Kaneto H, Matsuoka T, Katakami N, et al. Combination of MafA, PDX-1 and NeuroD is a useful tool to efficiently induce insulin-producing surrogate β-cells. *Curr Med Chem*, 2009, 16(24): 3144-51
- [29] You YH, Ham DS, Park HS, et al. Adenoviruses expressing PDX-1, BETA2/NeuroD and MafA induces the transdifferentiation of porcine neonatal pancreas cell clusters and adult pig pancreatic cells into β-cells. *Diabetes Metab J*, 2011, 35(2): 119-29
- [30] Noguchi H, Naziruddin B, Shimoda M, et al. Induction of insulin-producing cells from human pancreatic progenitor cells. *Transplant Proc*, 2010, 42(6): 2081-3
- [31] Liew CG. Generation of insulin-producing cells from pluripotent stem cells: from the selection of cell sources to the optimization of protocols. *Rev Diabet Stud*, 2010, 7(2): 82-92