# MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染人脐带间充质干细胞向胰岛素分泌细胞的分化

邱晓燕[1]，李碧欣[1]，黎敬弟[1]，范垂钦[1]，马 廉[1, 2, 3]，王鸿武[1, 4]

https://doi.org/10.12307/2024.104
投稿日期：2023-01-07
采用日期：2023-03-06
修回日期：2023-03-23
在线日期：2023-04-26
中图分类号：
R459.9；R318；R394.2
文章编号：
2095-4344(2024)07-01000-07
文献标识码：A

**文章快速阅读：**MAFA-PDX1 过表达慢病毒与人脐带间充质干细胞向胰岛素分泌细胞分化的关系

**研究起点：**
- ◆糖尿病
- ◆ insulin
- ◆人脐带间充质干细胞
- ◆胰岛素分泌细胞
- ◆转录因子
- ◆胰岛细胞
- ◆ β 细胞

**研究来源：**
- ◆胰岛前体细胞
- ◆ β 细胞
- ◆人脐带间充质干细胞
- ◆胰岛细胞
- ◆慢病毒载体
- ◆ MAFA
- ◆ PDX1
- ◆基因转染

**中心问题**：MAFA-PDX1、脐带间充质干细胞、慢病毒、诱导分化、过表达、胰岛素分泌细胞

**文题释义：**

**过表达慢病毒：**慢病毒载体是以HIV为基础发展起来的基因治疗载体，它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力，可以在体内较长期的表达且安全性高。慢病毒为“自杀”性病毒，即病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞，也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒，慢病毒中的毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代，属于假性病毒。过表达慢性病毒产品可通过对慢病毒载体的改造和病毒包装，获得带特定基因序列的慢病毒颗粒，以满足不同的实验需求。

**基因修饰：**主要是指利用生物化学方法修改DNA序列，将目的基因片段导入宿主细胞内，或者将特定基因片段从基因组中删除，从而达到改变宿主细胞基因型或者使得原有基因型得到加强的作用。

**摘要**

**背景：**干细胞来源胰岛β细胞移植被认为是治疗1型糖尿病的有效手段。人脐带间充质干细胞是理想的细胞来源，但其向胰岛β细胞分化的效率不高。

**目的：**研究MAFA、PDX1修饰促进人脐带间充质干细胞向胰岛素分泌细胞分化的潜能。

**方法：**构建MAFA-PDX1过表达慢病毒载体，用细胞形态学、RT-qPCR法、双硫腙染色比较3种方案[方案A：单纯慢病毒组；方案B：先药物(尼克酰胺、β-巯基乙醇)诱导再加慢病毒组；方案C：慢病毒和药物诱导同时进行组]诱导人脐带间充质干细胞分化为胰岛素分泌细胞的效率和潜能。

**结果与结论：**①细胞形态学改变：经3种方案诱导后细胞形态均发生了改变，方案B在诱导第11天细胞聚集生长最为明显，出现聚集生长的胰岛样细胞团；② RT-qPCR检测胰岛相关基因的表达差异：同一诱导时间点3种方案横向比较，在诱导第5天，方案C的MAFA和PDX1基因表达量最高，方案B的GCG基因表达量最高；在诱导第11天，方案B的MAFA、PDX1基因表达量以及INS和GLUT2基因表达量最高；③双硫腙染色鉴定锌离子：3种方案诱导第11天部分细胞被双硫腙染成棕红色，其中方案B中部分小岛状细胞被染成棕红色，颜色较深(阳性表达)；④结果表明，MAFA和PDX1共过表达可促进人脐带间充质干细胞向胰岛素分泌细胞分化；MAFA-PDX1基因修饰联合药物诱导方案优于单纯基因修饰方案。

**关键词：**脐带间充质干细胞；MAFA；PDX1；过表达慢病毒载体；胰岛素分泌细胞；糖尿病；诱导分化

## Differentiation of insulin-producing cells from human umbilical cord mesenchymal stem cells infected by MAFA-PDX1 overexpressed lentivirus

**Qiu Xiaoyan[1], Li Bixin[1], Li Jingdi[1], Fan Chuiqin[1], Ma Lian[1, 2, 3], Wang Hongwu[1, 4]**

[1]Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China; [2]Department of Pediatrics Research Institute, Shenzhen Children’s Hospital, Shenzhen 518038, Guangdong Province, China; [3]The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University (Women’s and Children’s Hospital of Guangzhou Medical University), Guangzhou 512000, Guangdong Province, China; [4]Stem Cell Research Center of Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China

Qiu Xiaoyan, Master, Attending physician, Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China

**Corresponding author:** Wang Hongwu, MD, Chief physician, Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China; Stem Cell Research Center of Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong Province, China

[1]汕头大学医学院第二附属医院儿科，广东省汕头市 515041；[2]深圳市儿童医院儿科研究所，广东省深圳市 518038；[3]广州医科大学第三附属医院(广州医科大学妇女儿童医院)，广东省广州市 512000；[4]汕头大学医学院干细胞研究中心，广东省汕头市 515041

**第一作者：**邱晓燕，女，1984 年生，广东省汕头市人，汉族，2010 年汕头大学医学院毕业，硕士，主治医师，主要从事脐带间充质干细胞向胰岛细胞分化的研究。

**通讯作者：**王鸿武，博士，主任医师，汕头大学医学院第二附属医院儿科，广东省汕头市 515041；汕头大学医学院干细胞研究中心，广东省汕头市 515041

https://orcid.org/0000-0002-2398-1185 (王鸿武)

**基金资助：**2020 年广东省科技计划大专项：基于脐带间充质干细胞来源胰岛素分泌细胞治疗儿童 1 型糖尿病的转化医学研究，汕府科【2020】53-112，项目负责人：王鸿武

**引用本文：**邱晓燕，李碧欣，黎敬弟，范垂钦，马廉，王鸿武. MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染人脐带间充质干细胞向胰岛素分泌细胞的分化 [J]. 中国组织工程研究，2024，28(7):1000-1006.

**Abstract**

**BACKGROUND:** Transplantation of stem cell-derived islet β cells has been considered effective for the treatment of type 1 diabetes. Human umbilical cord mesenchymal stem cell is an ideal cellular source, but with a low differentiation efficiency to islet β cells.

**OBJECTIVE:** To explore the possibility of human umbilical cord mesenchymal stem cells modified by MAFA and PDX1 to differentiate into insulin-producing cells.

**METHODS:** MAFA-PDX1 lentivirus expression vectors were constructed. The efficiency and potentiality of human umbilical cord mesenchymal stem cells differentiated into insulin-producing cells with three methods were compared by cell morphology, RT-qPCR, and dithizone staining [protocol A: Simple lentivirus group; protocol B: Drug (nicotinamide β-mercaptoethanol) induction followed by lentivirus group; protocol C: lentivirus and drug induction group].

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Morphological change of cells: Cell morphology was all altered after the induction of three protocols. At day 11, human umbilical cord mesenchymal stem cells induced by protocol B showed the most cell clusters among the three protocols, appearing aggregated islet-like cell clusters. (2) Islet-related gene expression detected by RT-qPCR: Horizontal comparison of the three protocols at the same induction time point showed that the expression levels of MAFA and PDX1 genes were the highest in protocol C on day 5 of induction, and those in protocol B were the highest on day 11 of induction. Human umbilical cord mesenchymal stem cells induced by protocol B had the greatest expression of GCG gene at day 5, INS and GLUT2 genes at day 11. (3) Dithizone staining to identify zinc ions: parts of the post-induced cells were stained brownish red by dithizone on day 11. The partial small island cells were stained brownish red with a darker color (positive expression) in protocol B. (4) It is concluded that the overexpression of MAFA and PDX1 can promote the differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. The combination of MAFA-PDX1 gene modification and drug induction is superior to the single gene modification.

**Key words:** umbilical cord mesenchymal stem cell; MAFA; PDX1; lentivirus overexpression vector; insulin-producing cell; diabetes; induced differentiation

**Funding:** *2020 Guangdong Science and Technology Plan Major Project, No. SFK[2020]53-112 (to WHW)*

***How to cite this article:*** *QIU XY, LI BX, LI JD, FAN CQ, MA L, WANG HW. Differentiation of insulin-producing cells from human umbilical cord mesenchymal stem cells infected by MAFA-PDX1 overexpressed lentivirus. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(7):1000-1006.*

## 0 引言 Introduction

1 型糖尿病是由于自身免疫系统调节紊乱，自身反应性 T 细胞对胰岛 β 细胞特异性免疫损伤导致的糖尿病。目前临床上主要的治疗方法是通过胰岛素替代治疗控制血糖，但不能遏制胰岛 β 细胞功能的进行性衰竭，无法有效阻止远期并发症的发生 [1-2]。更为理想的方案是胰岛细胞移植，但由于供体细胞来源严重短缺、移植后免疫排斥反应等因素，限制了其临床应用。因此，急需寻找一种更好的方案来治疗糖尿病。

干细胞具有多向分化潜能和自我更新能力，干细胞来源胰岛 β 细胞移植被认为是治疗 1 型糖尿病的有效手段 [3-4]。人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells，HuMSCs) 是一种成体干细胞，取自废弃脐带，具有细胞含量丰富、增殖能力强、低免疫原性、无道德伦理争议等优势，是理想的细胞来源 [5-8]。XIAO 等 [9-10] 应用胰 – 十二指肠同源盒 1(pancreatic and duodenal homeobox 1，PDX1)、肌腱膜纤维肉瘤癌基因同源物 A(MAFb ZIP transcription factor A，MAFA)2 个基因注射到小鼠胰岛中，可使胰岛 α 细胞转分化为 β 细胞，提示 MAFA、PDX1 基因在胰岛 β 细胞的发育、分化中起着重要的作用。国内外多个研究团队将 MAFA 和 PDX1 等腺病毒载体导入干细胞，实现了将干细胞分化为胰岛 β 样细胞，但总体来说细胞的分化效率不高。研究表明慢病毒在细胞水平能持续稳定表达 [11-14]，因此，该实验拟用 MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染 HuMSCs，并联合小分子化合物诱导方法，诱导 HuMSCs 向胰岛 β 细胞分化。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学观察实验。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 10 月至 2021 年 3 月在汕头大学医学院干细胞研究中心完成。

1.3 材料

1.3.1 脐带来源 经汕头大学医学院第二附属医院伦理委员会批准，伦理号：汕大医附二伦审科 (2018-04) 号，人脐带来源于汕头大学医学院第二附属医院产科手术室行剖宫产术分娩的足月健康新生儿，并取得产妇及其家属同意，签署知情同意书。

1.3.2 试剂 DMEM/F12 培养基 ( 美国 Gibco 公司 )；L-DMEM 培养基 ( 美国 Gibco 公司 )；H-DMEM 培养基 ( 美国 Gibco 公司 )；胎牛血清 ( 美国 Gibco 公司 )；尼克酰胺 (Solarbio 公司 )；β− 巯基乙醇 (Solarbio 公司 )；Exendin-4(Solarbio 公司 )；双硫腙 (Solarbio 公司 )；GoScript 反转录系统 ( 美国 Promega 公司 )；Trizol(Invitrogen 公司 )；qPCR Master Mix( 美国 Promega 公司 )。

1.4 方法

1.4.1 HuMSCs 的分离和培养 生理盐水冲洗健康足月新生儿脐带，去除血凝块，剔除脐动静脉和羊膜，将剩余的脐带间充质组织剪成 1.0−2.0 $mm^3$ 的组织块，均匀铺板在 12 孔板中，加入含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基，置于 37 ℃，体积分数为 5%$CO_2$ 细胞培养箱中培养，3 d 换液 1 次，细胞融合度达 80% 加入含体积分数为 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养基进行细胞传代。

1.4.2 流式细胞术鉴定 HuMSCs 表型 酶解第 4 代 HuMSCs，500×*g* 离心 5 min 沉淀细胞，弃去上清，加入流式细胞工作液 1 mL，再次离心沉淀细胞，使用 100 μL 流式工作液重悬细胞，按 5 μL 抗体 / 管分别加入对应抗体，置于避光孵育 15 min：anti-human CD73-APC、anti-human CD90-EITC、anti-human CD105-PerCP-Cy5.5、anti-human HLA-DR-PE、anti-human CD11b-PE、anti-human CD19-PE、anti-human CD34-PE、anti-human CD45-PE，随后洗涤，重悬，使用 BD CantoII 流式细胞仪检测。

1.4.3 构建、包装慢病毒载体

(1) 构建慢病毒载体：对目的载体 pHBLV-CMV-MCS-3FLAG-EF1-Zs Green-T2A-PURO 37 ℃酶切，胶回收；片段 PCR 回收；处理好的目的片段与载体连接，构建反应体系 (20 μL)；转化 ( 感受态细胞：DH5α)；抗性：氨苄霉素，37 ℃、230 r/min 培养过夜；转化后的平板挑菌，37 ℃、230 r/min

| 人脐带间充质干细胞的培养及鉴定 | |
|---|---|
| 细胞来源： | 人脐带组织 |
| 原代培养方法： | 组织块贴壁法培养 |
| 基础培养基： | DMEM/F12 培养基 |
| 添加材料： | 体积分数为 10% 胎牛血清 |
| 原代培养时间： | 原代细胞培养 7 d 开始换液，之后 3 d 换液 1 次，培养 7–14 d 根据细胞生长贴壁的密度进行细胞传代 |
| 细胞传代： | 细胞融合至 80%–90% 用含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶消化传至下 1 代，按 1 ∶ 2 或 1 ∶ 3 传代，2–4 d 可长满，当细胞密度再次达到 90%，可再次进行细胞传代。实验采用第 4 代细胞进行后续实验 |
| 细胞鉴定： | 采用流式细胞术鉴定细胞表型 |
| 伦理学批准： | 该实验经汕头大学医学院第二附属医院伦理委员会批准 |

摇菌 14 h，用菌液进行 PCR 鉴定，将阳性克隆菌液送测序公司测序。

(2) 包装慢病毒载体：制备慢病毒穿梭质粒及其辅助包装原件载体质粒，3 种质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提，将 psPAX2，pMD2G 辅助质粒和携带 MAFA，PDX1 基因的穿梭质粒共转染 293T 细胞，转染 6 h 后，更换为含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基，培养 48 h 和 72 h 后，离心收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液，4 ℃，82 700×*g* 离心 120 min，最后得到高滴度的慢病毒超离液。

1.4.4 MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染 HuMSCs 采用感染复数值为 5，10，20，30 的 MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染 HuMSCs，按照 1/2 体积感染法操作，感染 72 h 后在倒置荧光显微镜下观察细胞发出绿色荧光的强弱，并用流式细胞术检测细胞感染率。选择最适感染复数值进行后续实验。

1.4.5 形态学观察 在 MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染诱导 HuMSCs 过程中，倒置显微镜下观察细胞形态变化并拍照。

1.4.6 HuMSCs 诱导分化为胰岛素分泌细胞的方案 应用 3 种方案对 HuMSCs 进行诱导分化，诱导时间均为 11 d。①方案 A 为单纯慢病毒组：第 1 天加入 MAFA-PDX1 过表达慢病毒，培养液为含体积分数为 10% 胎牛血清的 H-DMEM 培养基，隔天换液。②方案 B 为先药物诱导再加慢病毒组，具体步骤：药物诱导第 1 天，培养液为含 10 mmol/L 尼克酰胺、1 mmol/L β- 巯基乙醇，体积分数为 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养基，药物诱导第 2，3 天，培养液为含 10 mmol/L 尼克酰胺、1 mmol/L β- 巯基乙醇、体积分数为 10% 胎牛血清的 H-DMEM 培养基，药物诱导第 4–11 天，培养液为含 10 mmol/L Exendin-4，10 mmol/L 尼克酰胺、1 mmol/L β- 巯基乙醇，体积分数为 10% 胎牛血清的 H-DMEM 培养基，期间于第 7 天加入 MAFA-PDX1 过表达慢病毒。③方案 C 是慢病毒和药物诱导同时进行组，第 1 天加入 MAFA-PDX1 过表达慢病毒，余同方案 B。

1.4.7 qRT-PCR 法检测诱导后细胞胰岛相关基因表达情况 诱导前和方案 A、B、C 分别诱导第 5，11 天，按照 RNA simple Total RNA kit 说明书提取总 RNA，RT-PCR 步骤按照 Quantscript RT Kit 进行获得反转录产物，梯度稀释反转录产物，SYBR® Premix DimerEraser™，ROX Reference Dye 在室温解冻，基因引物序列见**表 1**。设 3 个复孔，对各项指标进行检测及数据分析。

**表 1 | 基因引物序列**
**Table 1 | Gene primer sequences**

| 基因 | 引物序列 (5′-3′) |
|---|---|
| MAFA | F：GGT CAT CCG GCT CAA GCA |
| | R：TTG TAC AGG TCC CGC TCT TTG |
| PDX1 | F：GCC TTT CCC ATG GAT GAA GTC T |
| | R：GGC CGT GAG ATG TAC TTG TTG |
| NKX6.1 | F：TGG CCT ATT CGT TGG GGA TG |
| | R：TGT CTC CGA GTC CTG CTT CT |
| GLUT2 | F：ATG TCA GTG GGA CTT GTG CTG C |
| | R：AAC TCA GCC ACC ATG AAC CAG G |
| INS | F：CGC AGC CTT TGT GAA CCA AC |
| | R：CCA CCT GCC CCA CCT G |
| GCG | F：TTG ATA ATC TTG CCG CCA GGG AC |
| | R：TTG GCA TGC AAA GCA ATG TGG CC |
| NEUROG3 | F：GGA CCC CAT TCT CTC TTC TTT TC |
| | R：TTG AGG CGT CAT CCT TTC TAC C |
| Actin | F：AGG ATG CAG AAG GAG ATC AC |
| | R：TGT AAC GCA ACT AAG TCA TAG |

1.4.8 双硫腙染色 方案 A、B、C 诱导第 11 天，细胞中加入 1 mL 双硫腙工作液，37 ℃孵育 20 min，PBS 洗涤 2 min ×3 次，在倒置相差显微镜下拍照观察。对照组为诱导前的第 4 代 HuMSCs。

1.5 主要观察指标 ①在 MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染 HuMSCs 诱导分化过程中，倒置显微镜下观察细胞形态变化；② qRT-PCR 法检测诱导后细胞胰岛相关基因表达；③双硫腙染色鉴别诱导后细胞内锌离子的螯合情况。

1.6 统计学分析 所有实验重复 3 次，数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。统计方法包括独立样本 *t* 检验、方差分析。$P < 0.05$ 为差异有显著性意义，$P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。文章统计学方法已经由汕头大学医学院第二附属医院生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 HuMSCs 形态 见**图 1**，人脐带组织块在培养基中孵育 5–7 d，可见部分组织块贴壁变圆，周围有新生细胞爬出，呈梭形，稀疏分布；继续孵育至 7–10 d，爬出的原代细胞密度明显增加，趋于融合，细胞形态细长，体积增大，与成纤维细胞相似。原代细胞生长速度慢，10–14 d 细胞融合度达 80%–90% 可传代。传代后细胞生长速度较快，1 ∶ 3 传代约 3 d 可长满培养瓶。该细胞系在体外可培养 10 代以上，但细胞增长速度在 9 代后减慢，细胞开始变得宽大、扁平。实验采用第 4 代细胞，此阶段细胞呈长梭形，生长活力佳。

2.2 HuMSCs 表面生物学标志物的表达 实验选取第 4 代细胞样本进行流式细胞检测，结果显示 HuMSCs 稳定高表达 CD73 (99.01%)，CD90 (95.6%)，CD105 (96.2%)，低表达或者不表达 CD11b(0.80%)，CD19(0.6%)，CD34(0.4%)，CD45(0.6%)，HLA-DR(0.6%)，见**图 2**。

2.3 MAFA-PDX1 过表达慢病毒载体成功构建 HBLV-ZsGreen-PURO 滴度为 $3\times10^8$ TU/mL。HBLV-h-MAFA-PDX1-3xflag-ZsGreen-PURO 滴度为 $1\times10^8$ TU/mL，h-MAFA-PDX1 测序结果比对见**图 3**。

2.4 MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染 HuMSCs 的最适感染复数值 用感染复数值为 5，10，20，30 的 MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染 HuMSCs，培养 72 h 后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光强度，流式细胞仪检测慢病毒的感染率。

**图 4** 为 MAFA-PDX1 慢病毒感染 HuMSCs 72 h 后倒置荧光显微镜下照片，感染复数值为 5 时细胞发出的绿色荧光较弱，而感染复数值为 10，20，30 时细胞发出的绿色荧光逐渐增强。

**图 5** 为 MAFA-PDX1 慢病毒感染 HuMSCs 的感染率，感染复数值 5 时慢病毒感染率为 52.6%；感染复数值为 10，20，30 时感染率分别为 99%，100%，100%。随着感染复数值升高，部分 HuMSCs 出现死亡，且感染复数值越高，死亡细胞数量越多。最适感染复数值是选择细胞感染率大于 90% 同时细胞状态良好情况下的最小感染复数值。因此，实验选择感染复数值为 10 的 MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染 HuMSCs。

2.5 MAFA-PDX1 修饰的 HuMSCs 向胰岛素分泌细胞分化

2.5.1 细胞形态学观察 见**图 6**。①方案 A( 单纯慢病毒组 )：诱导第 5 天，细胞形态失去明显成纤维结构，细胞呈圆形或者类圆形，体积略增大，折光性增强，并开始出现细胞聚集；诱导第 11 天，部分细胞聚集成团，并呈半悬浮状态。无论是第 5 天还是第 11 天，方案 A 诱导分化后聚集成团细胞数量均少于方案 B 和方案 C。②方案 B( 先药物诱导再加慢病毒组 )：诱导第 5 天，部分细胞呈圆形或多角形，周边突出逐渐缩短，部分细胞聚集成团，但成团状细胞数量较少，半悬浮生长；第 11 天细胞聚集生长更为明显，出现聚集生长的胰岛样细胞团。方案 B 第 11 天聚集成团的细胞数量明显多于其余 2 种诱导方案。③方案 C( 慢病毒和药物诱导同时进行组 )：诱导第 5 天，部分细胞呈圆形或多角形，周边突出逐渐缩短，部分细胞聚集成团，半悬浮生长，聚集成团的细胞较方案 A 和方案 B 多；诱导第 11 天细胞生长缓慢，细胞聚集成团数量较第 5 天减少。

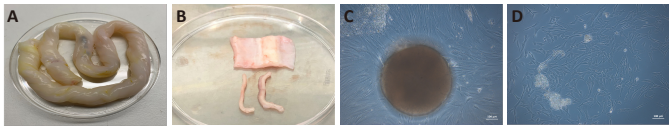
2.5.2 不同方案诱导后细胞中胰岛相关基因表达

(1) 方案 A( 单纯慢病毒组 ) 诱导后细胞中胰岛相关基因表达，见**图 7**。诱导第 5 天时，与对照组相比，MAFA 和 PDX1 基因表达显著升高，二者的相对表达量分别为 37 989.71±7 685.54($P$=0.002)，844.09±22.49($P$ < 0.001)；GCG、GLUT2、NKX6.1 基因表达升高，其相对表达量分别为 33.30±14.50($P$=0.035)，3.35±1.07($P$=0.037)，5.48±1.79 ($P$=0.026)；INS 和 NEUROG3 基因表达在统计学上无明显差异，分别为 0.90±0.39($P$=0.735)，0.35±0.21($P$=0.181)。诱导第 11 天时，与对照组相比，MAFA 和 PDX1 基因表达显著升高，二者的相对表达量分别为 16 307.57±1 890.56($P$ < 0.001)，327.89±23.25($P$ < 0.001)；GCG、NKX6.1 基因表达升高，其相对表达量分别为 8.69±3.47($P$=0.037)，2.65±0.59($P$=0.025)；INS、GLUT2 和 NEUROG3 基因表达在统计学上无明显差异，分别为 1.26±0.14($P$=0.118)，1.91±0.66($P$=0.124)，0.28±0.03 ($P$=0.139)。

(2) 方案 B( 先药物诱导再加慢病毒组 ) 诱导后细胞中胰岛相关基因表达，见**图 8**。诱导第 5 天时，与对照组相比，MAFA、GCG、INS、NKX6.1 基因表达升高，其相对表达量分别为 85.73±14.23($P$=0.001)，40.46±6.54($P$=0.001)，1.77±0.10($P$=0.002)，5.39±1.51($P$=0.016)；PDX1、GLUT2、NEUROG3 基因表达在统计学上无明显差异，分别为 0.18±0.06 ($P$=0.084)，2.06±1.16($P$=0.269)，1.03±0.10($P$=0.772)。诱导第 11 天时，与对照组相比，MAFA 和 PDX1 基因表达显著升高，二者的相对表达量分别为 193 881.49±20 119.50($P$ < 0.001)，2 644.85±146.88($P$ < 0.001)；GCG、INS、GLUT2 基因表达升高，其相对表达量分别为 2.98±0.73($P$=0.033)，19.40±2.44($P$ < 0.001)，5.02±1.38($P$=0.015)；NKX6.1、NEUROG3 基因表达在统计学上无明显差异，分别为 0.90±0.13($P$=0.546)，2.38±0.96($P$=0.226)。MAFA、GCG、INS 基因在诱导第 5，11 天均表达升高，其中 MAFA 和 INS 基因第 11 天表达量显著高于第 5 天，GCG 基因第 5 天表达量高于第 11 天。NKX6.1 基因在诱导第 5 天升高，第 11 天无明显表达。

(3) 方案 C( 慢病毒和药物诱导同时进行组 ) 诱导后细胞中胰岛相关基因表达，见**图 9**。诱导第 5 天时，与对照组相比，MAFA 和 PDX1 基因表达显著升高，二者的相对表达量分别为 314 696.50±52 937.80($P$=0.001)，4 414.68±736.09 ($P$=0.001)；GCG、INS 基因表达升高，其相对表达量分别为 25.53±6.23($P$=0.005)，2.07±0.04($P$ < 0.001)；GLUT2、NKX6.1、NEUROG3 基因表达在统计学上无明显差异，分别 1.64±0.85($P$=0.350)，1.77±1.46($P$=0.523)，0.70±0.25 ($P$=0.406)。诱导第 11 天时，与对照组相比，MAFA 和 PDX1 基因表达显著升高，二者的相对表达量分别为 36 448.73±1 309.93($P$ < 0.001)，617.14±95.67($P$=0.001)；INS 基因表达升高，其相对表达量为 2.93±0.09($P$ < 0.001)；GLUT2 基因表达降低，其相对表达量为 0.26±0.16($P$=0.003)；GCG、NKX6.1、NEUROG3 基因表达在统计学上无明显差异，分别为 1.78±0.35($P$=0.135)，0.74±0.20($P$=0.272)，0.59±0.03($P$=0.297)。MAFA、PDX1、INS 基因在诱导第 5，11 天均表达升高，其中 MAFA、PDX1 基因第 5 天表达量高于第 11 天，INS 基因第 11 天表达量高于第 5 天。GCG 在诱导第 5 天表达升高，第 11 天无明显表达。NKX6.1 基因在第 5，11 天均无明显表达。

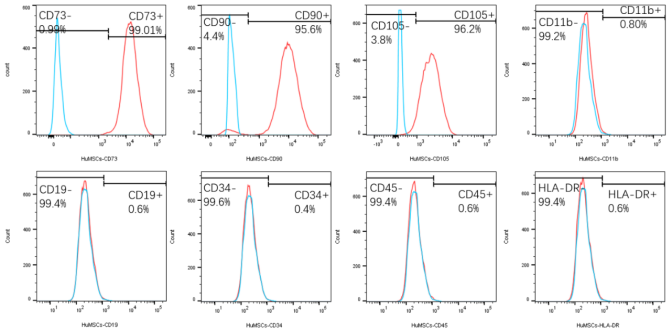
(4) 比较不同方案诱导后细胞中胰岛相关基因表达差异，见**图 10**。同一诱导时间点 3 个方案横向比较，诱导第 5 天，方案 C 的 MAFA 和 PDX1 基因表达量最高；诱导第 11 天，方案 B 的 MAFA 和 PDX1 基因表达量最高。方案 B 在诱导第 5 天 GCG 基因表达，第 11 天 INS 和 GLUT2 基因表达是 3 个方案中最高的。因此，方案 B 具有更好地向胰岛素分泌细胞分化的潜能。




图注：图 A 为从手术室中取出的脐带，浸泡碘伏消毒灭菌、PBS 冲洗、挤出血管和组织残留血液；B 为分离脐带组织，将 2 条脐动脉剥离掉，在保证不损伤到脐静脉和羊膜下，用有齿镊子撕下华尔通胶 ( 脐带基质 )；C 为脐带组织块贴壁，周围可见新生细胞爬出，相互融合 ( 标尺为 100 μm)；D 为原代细胞呈梭形，排列稀疏 ( 标尺为 100 μm)

**图 1 ｜人脐带间充质干细胞原代培养过程**

**Figure 1 ｜ Primary culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells**




图注：人脐带间充质干细胞稳定高表达 CD73，CD90，CD105，低表达或者不表达 CD11b，CD19，CD34，CD45，HLA-DR

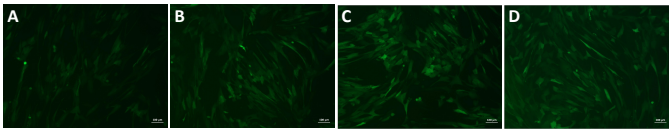
**图 2 ｜人脐带间充质干细胞的流式表型**

**Figure 2 ｜ Flow cytometry phenotype of human umbilical cord mesenchymal stem cells**

图注：绿色区域为与目的序列匹配部分，紫色区域为 flag 比对结果

**图 3 ｜ MAFA-PDX1 测序结果比对**

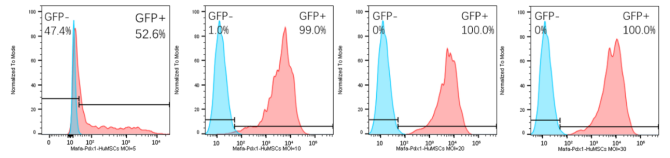
**Figure 3 ｜ Comparison of MAFA-PDX1 sequencing results**




图注：图 A–D 分别为感染复数值为 5，10，20，30。由图可见，感染复数值为 5 时细胞发出绿色荧光较弱，而感染复数值为 10，20，30 时细胞发出绿色荧光逐渐增强

**图 4 ｜ MAFA-PDX1 慢病毒感染人脐带间充质干细胞 72 h 倒置荧光显微镜下照片 ( 标尺为 100 μm)**

**Figure 4 ｜ MAFA-PDX1 lentivirus infected human umbilical cord mesenchymal stem cells under inverted fluorescence microscope for 72 hours (scale bars: 100 μm)**




图注：感染复数值为 5，10，20，30 时，慢病毒感染率分别为 52.6%，99%，100%，100%

**图 5 ｜不同感染复数的 MAFA-PDX1 慢病毒感染人脐带间充质干细胞的效果**

**Figure 5 ｜ Effect of different multiplicity of infection of MAFA-PDX1 lentivirus on human umbilical cord mesenchymal stem cells**

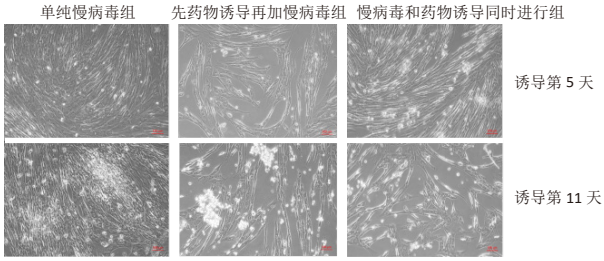
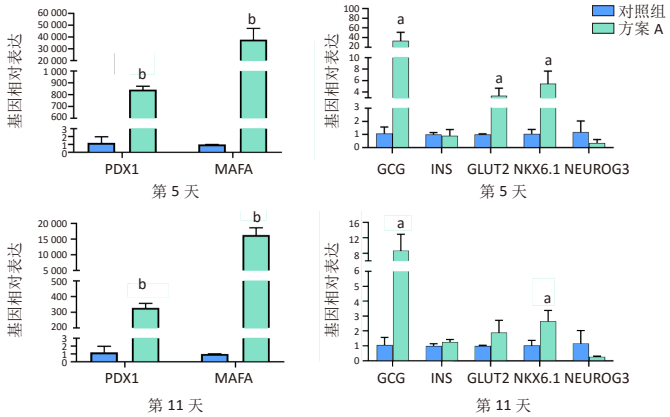



**图 6 ｜人脐带间充质干细胞经 3 种方案诱导后的细胞形态学改变 ( 光镜，×40)**

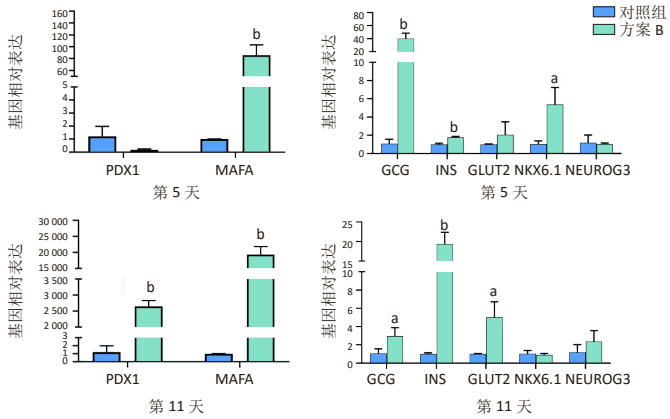
**Figure 6 ｜ Morphological changes of human umbilical cord mesenchymal stem cells induced by three protocols (light microscopy, ×40)**




图注：诱导第 5 天，MAFA、PDX1、GCG、GLUT2、NKX6.1 基因表达升高；诱导第 11 天，MAFA、PDX1、GCG、NKX6.1 基因表达升高。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$

**图 7 ｜ Real-time qPCR 法检测方案 A( 单纯慢病毒组 ) 诱导后人脐带间充质干细胞中胰岛相关基因的表达**

**Figure 7 ｜ Real-time qPCR of detecting the expression of islet related genes in human umbilical cord mesenchymal stem cells induced by protocol A (lentivirus group)**

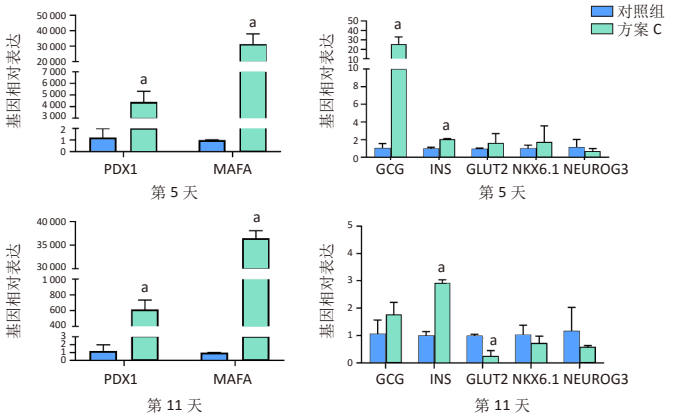



图注：诱导第 5 天，MAFA、GCG、INS、NKX6.1 基因表达升高；诱导第 11 天，MAFA、PDX1、GCG、INS、GLUT2 基因表达升高。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$

**图 8 ｜ Real-time qPCR 法检测方案 B( 先药物诱导再加慢病毒组 ) 诱导后人脐带间充质干细胞中胰岛相关基因的表达**

**Figure 8 ｜ Real-time qPCR of detecting the expression of islet related genes in human umbilical cord mesenchymal stem cells induced by protocol B (drug induction followed by lentivirus group)**

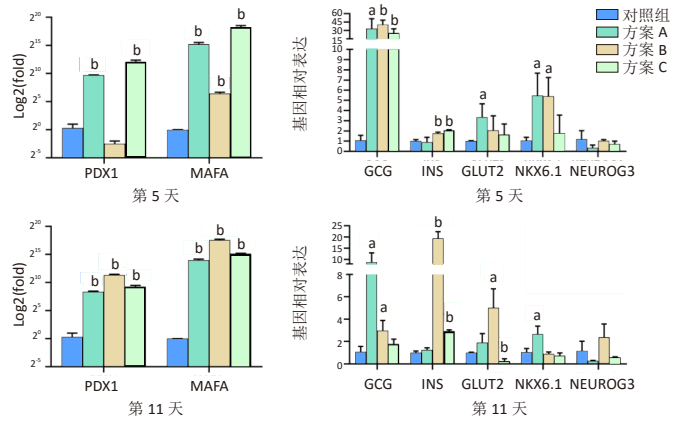
2.5.3　双硫腙染色结果　经药物诱导或 ( 和 )MAFA-PDX1 基因共同修饰后，用双硫腙染色来鉴别诱导后细胞内锌离子的螯合情况，见**图 11**。在倒置相差显微镜下可观察到，经方案 A、方案 B、方案 C 诱导第 11 天部分细胞被双硫腙染成棕红色，




图注：诱导第 5 天，MAFA、PDX1、GCG、INS 基因表达升高；诱导第 11 天，MAFA、PDX1、INS 基因表达升高，而 GLUT2 基因表达却下降。$^{a}P < 0.01$

**图 9 ｜ Real-time qPCR 法检测方案 C( 慢病毒和药物诱导同时进行组 ) 诱导后人脐带间充质干细胞中胰岛相关基因的表达**

**Figure 9 ｜ Real-time qPCR of detecting the expression of islet related genes in human umbilical cord mesenchymal stem cells induced by protocol C (lentivirus and drug induction group)**




图注：$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$。方案 A：单纯慢病毒组；方案 B：先药物诱导再加慢病毒组；方案 C：慢病毒和药物诱导同时进行组

**图 10 ｜ Real-time qPCR 法检测经 3 种方案诱导后人脐带间充质干细胞中胰岛相关基因的表达**

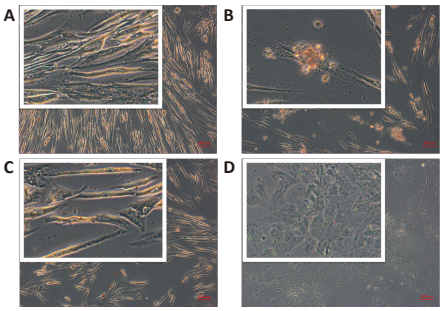
**Figure 10 ｜ Expression of islet related genes in human umbilical cord mesenchymal stem cells induced by three protocols detected by real-time qPCR**

提示诱导后的细胞含有锌离子，而对照组没有染色。方案 A、C 中部分细胞可被染成棕红色，但颜色较浅；方案 B 中部分小岛状细胞被染成棕红色，颜色较深。同时，在双硫腙染色过程中，随着染色时间的延长，多数贴壁无染色细胞变成悬浮细胞，只有部分染色细胞仍然保持贴壁状态。

## 3 讨论 Discussion

间充质干细胞是具有自我更新潜能并能够分化为各种组织细胞类型的成体多能干细胞，来源方便且不存在伦理问题，易于分离、培养、扩增和纯化，因此是治疗糖尿病的理想种子细胞。

既往研究发现干细胞通过小分子化合物诱导为胰岛 β 细胞的效率不高，不足以应对临床需求。MAFA 是具有胰岛 β 细胞特异性的转录因子，是促进胰岛 β 细胞发育和维持 β 细胞功能的主要因子；PDX1 是决定内胚层时期胰腺发育的关




图注：图 A–C 分别为方案 A( 单纯慢病毒组 )、方案 B( 先药物诱导再加慢病毒组 )、方案 C( 慢病毒和药物诱导同时进行组 ) 诱导第 11 天部分细胞被染成棕红色；D 为对照组：诱导前细胞，没有染色，提示经诱导后的细胞含有一定量的锌

**图 11 ｜ 三种方案诱导后双硫腙染色结果 ( 光镜，×100)**

**Figure 11 ｜ Dithizone staining results after induction of three protocols (light microscopy, ×100)**

键性转录因子，在成熟的胰岛 β 细胞中则维持其生存及增殖 [15]。将胰岛分化的关键基因通过病毒载体导入干细胞中，有望获得高分化效率的胰岛 β 细胞，为糖尿病治疗开辟了一条新途径。腺病毒和慢病毒均为哺乳动物常见的表达系统，腺病毒表达系统携带基因不能整合到宿主基因组中，因此不能长期高表达，无法获得转基因动物，且具有高免疫原性。而慢病毒表达系统携带基因可整合至宿主细胞基因组中，长时间高水平表达，可建立基因稳定过表达的细胞株，且具有低免疫原性可减少移植后自身免疫反应发生 [11]。因此，该实验应用 MAFA-PDX1 过表达慢病毒感染 HuMSCs，获得 MAFA 和 PDX1 基因的稳定高表达，再结合小分子化合物诱导分化，期望可得到胰岛素高分泌细胞。

2015 年 JENNINGS 等 [16-17] 在《Development》上详细描述了人类胰腺发育的过程，构建了人类胰腺发育全面、动态的基因组图谱。人类胰腺发育会依次经历以下几个阶段：多能干细胞、定向内胚层、原肠管、后前肠、胰腺内胚层、内分泌前体、不成熟 β 细胞和成熟 β 细胞 [16-19]。人类胰腺来源于背侧和腹侧内胚层，背芽在受孕后 26 d 检测到，腹芽在受孕后 30 d 检测到，二者在怀孕后 6–8 周肠道旋转时融合 [17]。表达 PDX1 的多能干细胞 (MP 细胞 ) 分化为尖端和双能干细胞，尖端进一步分化为腺泡细胞，而双能干细胞通过短暂的表达 NEUROG3(NGN3) 分化为内分泌细胞。内分泌细胞的分化受 NGN3 调节，NGN3 是形成内分泌祖细胞的关键转录因子 [20-25]。该实验 3 种诱导分化方案，无论是诱导第 5 天还是第 11 天，均未见 NEUROG3 表达，见图 10，可能是 MAFA 和 PDX1 基因修饰使 HuMSCs 跨越了 NGN3 短暂表达阶段直接到达内分泌祖细胞。有学者采用单细胞测序研究人类胰腺内分泌细胞诱导过程中的基因动态表达，多能干细胞诱导的胰岛样组织中主要包括 4 种细胞类型，共分为 6 个阶段：诱导 8 d 到达第 3 阶段，此阶段细胞主要表达 PDX1；诱导第 13 天到达第 4 阶段，细胞除了表达 PDX1 外，开始表达 NKX6.1 和 CHGA；诱导第 5，6 阶段开始产生成熟的胰岛细胞，SC-β 细胞 ( 表达 INS、NKX6.1、ISL1 和其他 β 细胞标志物 )、SC-α 细胞 ( 表达 GCG、ARX、IRX2 和 INS)、SC-EC 细胞 ( 表达 CHGA、TPH1、LMX1A 和 SLC18A1)、非内分泌细胞 [26]。内分泌细胞的形成需要一些关键的转录因子，如胰岛 α 细胞的形

成需要表达 ARX、GCG[27-28]，胰岛 β 细胞在成熟胰岛中会特异性表达 NKX6.1[29]。该实验 3 种诱导分化方案在诱导第 5 天和第 11 天均可部分表达胰岛素相关基因，见图 10。方案 A 除了高表达 MAFA 和 PDX1 外，诱导第 5 天，GCG、NKX6.1、GLUT2 基因表达升高；在诱导第 11 天，GCG 和 NKX6.1 表达升高，但上调幅度较第 5 天要低。无论是第 5 天还是第 11 天，在统计学意义上均未见 INSULIN 基因表达，见图 7。这表明，单纯 MAFA 和 PDX1 慢病毒修饰 HuMSCs 可部分诱导为胰岛 α 细胞，但未能成功诱导为胰岛 β 细胞。方案 B 和方案 C 均为基因修饰联合药物诱导，但二者基因修饰的时间点不一样。方案 B 是先药物诱导，最后 4 d 加入 MAFA-PDX1 过表达慢病毒，这符合人类胰腺发育的过程。方案 B 前 3 d 在含尼克酰胺和 β- 巯基乙醇的培养基中培养，第 4 天开始加入 Exendin-4。诱导第 5 天，方案 B 的 PDX1 基因无明显表达，而 MAFA 基因明显上调，与 MAFA 同步上调的还有基因 GCG、INSULIN、NKX6.1。诱导第 11 天，方案 B 的 MAFA 和 PDX1 基因表达是 3 者中最高的，在相对应的时间节点上，INSULIN 基因表达也是最高的，同时，GCG 和 NKX6.1 基因也有上调，见图 8，10。从方案 B 的诱导结果看到，在诱导第 5 天，GCG 基因表达明显升高，说明部分诱导出胰岛 α 细胞；在诱导第 11 天，INSULIN 和 GLUT2 基因表达均有升高，但 NKX6.1 无表达，说明该方案可部分诱导出胰岛 β 细胞，且分化效率为 3 个方案中最高的。而方案 C 在诱导起始即开始基因修饰，且同时加入药物诱导，除高表达 MAFA 和 PDX1 外，在诱导第 5 天，GCG 和 INSULIN 基因表达升高，在诱导第 11 天，仅有 INSULIN 基因表达升高，GCG 无表达，见图 9。这说明，方案 C 在诱导第 5 天已出现部分胰岛 α 细胞和少量胰岛 β 细胞，但随着诱导的继续，INSULIN 基因继续表达，胰岛 β 细胞分化仍在继续，而胰岛 α 细胞的分化已停止。因此，方案 B 具有更好地向胰岛素分泌细胞分化的潜能。

实验的创新点在于应用 MAFA-PDX1 修饰 HuMSCs，结合基因修饰和药物诱导，共同向胰岛素高分泌细胞方向分化，在短时间内 (11 d 诱导时间 ) 获得高分化效率的胰岛 β 细胞。通过细胞形态学、胰岛相关基因表达水平和双硫腙染色等结果，可以得出基因修饰联合小分子化合物诱导在获得胰岛 β 细胞方面优于单纯基因修饰的结论。这给下一步工作指明了方向，基于基因修饰的干细胞疗法有望治愈糖尿病。

**作者贡献：**邱晓燕、李碧欣负责实验实施、论文撰写，范垂钦负责实验数据分析处理，黎敬弟负责细胞培养、指标检测，王鸿武负责数据和文章的校对，马廉负责实验设计。

**利益冲突：**文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明：**这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让：**文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范：**该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

[1] PUNTHAKEE Z, GOLDENBERG R, KATZ P. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes,Prediabetes and Metabolic Syndrome. Can J Diabetes. 2018;42 Suppl 1:S10-S15.
[2] HARREITER J, RODEN M. Diabetes mellitus-Definition,classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2019). Wien Klin Wochenschr. 2019;131 (Suppl 1):6-15.
[3] HELMAN A, MELTON DA. A Stem Cell Approach to Cure Type 1 Diabetes. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2021;13(1):a035741.
[4] QUISKAMP N, BRUIN JE, KIEFFER TJ. Differentiation of human pluripotent stem cells into β-cells: Potential and challenges. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2015;29(6):833-847.
[5] DING DC, CHANG YH, SHYU WC, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. Cell Transplant. 2015;24(3):339-347.
[6] XIE Q, LIU R, JIANG J, et al. What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? Stem Cell Res Ther. 2020;11(1):519.
[7] LI T, XIA M, GAO Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. Expert Opin BiolTher. 2015; 15(9):1293-306.
[8] BI S, NIE Q, WANG WQ, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy for Insulin Resistance: A Novel Strategy in Clinical Implication. Curr Stem Cell Res Ther. 2018;13(8):658-664.
[9] XIAO X, GUO P, SHIOTA C, et al. Endogenous Reprogramming of Alpha Cells into Beta Cells, Induced by Viral Gene Therapy,Reverses Autoimmune Diabetes. Cell Stem Cell. 2018;22(1):78-90.e4.
[10] ZHU Y, LIU Q, ZHOU Z, et al. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. Stem Cell Res Ther. 2017;8(1):240.
[11] ANGUELA XM, HIGH KA. Entering the Modern Era of Gene Therapy. Annu Rev Med. 2019;70:273-288.
[12] MILONE MC, O'DOHERTY U. Clinical use of lentiviral vectors. Leukemia. 2018; 32(7):1529-1541.
[13] WANG X, MA C, RODRÍGUEZ LABRADA R, et al. Recent advances in lentiviral vectors for gene therapy. Sci China Life Sci. 2021;64(11):1842-1857.
[14] MUNIS AM. Gene Therapy Applications of Non-Human Lentiviral Vectors. Viruses. 2020;12(10):1106.
[15] AKINCI E, BANGA A, GREDER LV, et al. Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (β) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA. Biochem J. 2012;442(3):539-550.
[16] JENNINGS RE, BERRY AA, STRUTT JP, et al. Human pancreas development. Development. 2015;142(18):3126-3137.
[17] JENNINGS RE, BERRY AA, KIRKWOOD-WILSON R, et al. Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. Diabetes. 2013;62(10):3514-3522.
[18] HENRY BM, SKINNINGSRUD B, SAGANIAK K, et al. Tomaszewski KA. Development of the human pancreas and its vasculature- An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. Ann Anat. 2019; 221:115-124.
[19] PETERSEN MBK, GONÇALVES CAC, KIM YH, et al. Recapitulating and Deciphering Human Pancreas Development From Human Pluripotent Stem Cells in a Dish. Curr Top Dev Biol. 2018;129:143-190.
[20] RUBIO-CABEZAS O, JENSEN JN, HODGSON MI, et al. Permanent Neonatal Diabetes and Enteric Anendocrinosis Associated With Biallelic Mutations in NEUROG3. Diabetes. 2011;60(4):1349-1353.
[21] SCHREIBER V, MERCIER R, JIMÉNEZ S, et al. Extensive NEUROG3 occupancy in the human pancreatic endocrine gene regulatory network. Mol Metab. 2021; 53:101313.
[22] SOLORZANO-VARGAS RS, BJERKNES M, WANG J, et al. Null mutations of NEUROG3 are associated with delayed-onset diabetes mellitus. JCI Insight. 2020; 5(1):e127657.
[23] MCGRATH PS, WATSON CL, INGRAM C, et al. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor NEUROG3 Is Required for Development of the Human Endocrine Pancreas. Diabetes. 2015;64(7):2497-2505.
[24] YONG HJ, XIE G, LIU C, et al. Gene Signatures of NEUROGENIN3+ Endocrine Progenitor Cells in the Human Pancreas. Front Endocrinol(Lausanne). 2021;12: 736286.
[25] LIU J, BANERJEE A, HERRING CA, et al. Neurog3-Independent Methylation Is the Earliest Detectable Mark Distinguishing Pancreatic Progenitor Identity. Dev Cell. 2019;48(1):49-63.e7.
[26] VERES A, FAUST AL, BUSHNELL HL, et al. Charting cellular identity during human in vitro β-cell differentiation. Nature. 2019;569(7756):368-373.
[27] ITOH M, TAKIZAWA Y, HANAI S, et al. Partial loss of pancreas endocrine and exocrine cells of human ARX-null mutation: consideration of pancreas differentiation. Differentiation. 2010;80(2-3):118-122.
[28] GAGE BK, ASADI A, BAKER RK, et al. The Role of ARX in Human Pancreatic Endocrine Specification. PLoS One. 2015;10(12):e0144100.
[29] RIEDEL MJ, ASADI A, WANG R, et al. Immunohistochemical characterisation of cells co-producing insulin and glucagon in the developing human pancreas. Diabetologia. 2012;55(2):372-381.

( 责任编辑：MZH，ZN，QY，ZM)