

# 通过 G418 处理离体纯化小鼠胰腺上皮细胞 \*

李 丹<sup>1</sup> 冯锐成<sup>1</sup> 张丽新<sup>1</sup> 郭方琪<sup>2</sup> 梁 洋<sup>1</sup> 滕春波<sup>1△</sup>

(1 东北林业大学生命科学学院发育生物学研究室 黑龙江 哈尔滨 150040 2 天津医科大学医学检验学院 天津 300203)

**摘要** 目的 探索一种能有效去除成纤维细胞 筛选有较强增殖能力上皮细胞的方法。方法 本研究利用成纤维细胞对 G418 敏感的特性 在成体小鼠胰腺细胞分离后 采用悬浮细胞直接接种到含 30 $\mu$ g/mL G418 的培养基中 或细胞贴壁生长汇合至 50-70%后 用 30 至 100 $\mu$ g/mL 之间不同浓度 G418 处理 24h、48h 或 72h 两种方案进行上皮细胞的纯化。结果：在直接接种法培养处理中，存活的大部分细胞为成纤维细胞，上皮细胞的生长受到抑制，无法得到纯化的胰腺上皮集落，而在细胞贴壁生长汇合至 50-70%后经 G418 处理，成纤维细胞随着处理浓度的增加死亡率也在逐渐上升，其中 50 $\mu$ g/mL G418 处理 72 小时对去除成纤维细胞效果最佳。结论：G418 处理能够有效去除成纤维细胞，分离纯化出一群在离体条件下具有强增殖能力、形成大上皮细胞集落的细胞。该分离纯化方法为今后进一步研究成体胰腺干/祖细胞增殖与分化调控机制等问题奠定基础。

**关键词** G418；成纤维细胞；胰腺上皮细胞

**中图分类号** Q95-3 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)12-2242-05

## Purification of Pancreatic Epithelial Cells Treated with G418 in Vitro\*

LI Dan<sup>1</sup>, FENG Rui-cheng<sup>1</sup>, ZHANG Li-xin<sup>1</sup>, Guo Fang-qi<sup>2</sup>, LIANG Yang<sup>1</sup>, TENG Chun-bo<sup>1△</sup>

(1 laboratory of Animal Development Biology, College of Life Science, Northeast Forestry University, 150040, Harbin, China;

2 School of Laboratory Medicine, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

**ABSTRACT Objective:** To eliminate the fibroblasts and purify epithelial cells from adult mouse pancreas in vitro. **Methods:** Based on the sensitivity of fibroblasts to G418, this study designed two schemes: Scheme 1 was that the isolated single cells from pancreas were cultured directly in media with 30 $\mu$ g/mL G418, and Scheme 2 was that the isolated single cells were cultured to 50-70% aggregation, and then they were treated with G418 at concentrations from 30 to 100  $\mu$ g/mL of G418 for 24h, 48h or 72h. **Results:** The results showed that the growth of the epithelial cells was inhibited in scheme 1, but that of the fibroblasts was little affected. However, after the pancreatic cell grew 50-70% aggregation in scheme 2, G418 treatment could eliminate the fibroblasts, and the death ratio of fibroblasts increase with the elevation of G418 concentration. Among them, 50  $\mu$ g/mL G418 treatment for 72h was optimal to kill fibroblasts and preserve epithelial cells. **Conclusions:** G418 treatment could effectively purify a pancreatic epithelial cells with strong proliferative and colony-forming capability, thus provide a pathway for further studies on the proliferation and differentiation of adult pancreas stem/progenitor cells.

**Key words:** G418; Fibroblasts; Pancreatic epithelial cells

**Chinese Library Classification:** Q95-3 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2011)12-2242-05

### 前言

糖尿病是由于胰腺  $\beta$  细胞分泌胰岛素不足或者胰岛素功能发生障碍而引起的一类严重的代谢疾病<sup>[1]</sup>，正在危害着世界上越来越多人口的健康，预计截止到 2025 年，在世界范围内将有 3.34 亿人患有糖尿病<sup>[2]</sup>，最新调查研究数据表明，我国患有糖尿病的人口数量已经接近 10%，而潜在具有患糖尿病倾向的人群数量更是超过了 15%<sup>[3]</sup>。胰岛移植是一种能够有效控制糖尿病的治疗方法，但因供体严重缺乏和移植后的免疫排斥问题制约了其广泛应用<sup>[4-6]</sup>。

近年的研究表明，成体胰腺中的确存在着干细胞，它们对胰腺损伤的修复及  $\beta$  细胞的再生起着极为重要的作用，可为细

胞替代疗法治疗糖尿病提供丰富的供体来源<sup>[7-12]</sup>。胰腺干细胞来源于成体，使用上较胚胎干细胞安全<sup>[13]</sup>，也不存在社会伦理道德问题，可以从根本上解决糖尿病等胰腺相关性疾病的治疗问题，因而成为临床研究的热点之一<sup>[14]</sup>。

胰腺干细胞在发育上被认为来源于内胚层胰腺上皮，在随后的胰腺发育过程中，胰腺干细胞分化为胰岛细胞( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , PP 和  $\epsilon$  细胞)、导管上皮细胞以及腺泡细胞<sup>[15]</sup>。胰腺组织中还存在大量的间充质来源的细胞，包括成纤维细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞以及星形细胞，其中以成纤维细胞占主要部分<sup>[16]</sup>。要离体分离培养获得胰腺上皮细胞就要排除间充质来源的细胞，尤其是成纤维细胞。目前常用的去除成纤维细胞方法有机械刮除法、胰蛋白酶消化以及胶原酶消化法等<sup>[17]</sup>。最近 Hao

\* 基金项目：国家自然科学基金项目资助(30670304)

作者简介：李丹(1986,6-)，女，主要研究方向：胰腺干细胞与发育

$\triangle$  通讯作者：滕春波，电话：0451-82191784 E-mail: xhunboteng@yahoo.com

(收稿日期：2011-03-18 接受日期：2011-04-13)

等研究发现,在对人胰岛分离后剩余的非内分泌胰腺部分离体培养时,用 G418 处理可以去除间充质来源的细胞,得到非内分泌胰腺上皮细胞(NEPECs),并从 NEPECs 中分离得到胰腺内分泌干/祖细胞<sup>[18]</sup>。

本实验摸索尝试不同浓度 G418 处理、不同处理条件,寻找离体条件下能够杀死成体小鼠胰腺来源的成纤维细胞,又对上皮细胞的生长影响较小的实验方案,为今后进一步进行小鼠胰腺干细胞增殖与定向分化研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

4~6 周龄昆明 ICR 品系小白鼠,购自吉林大学医学院实验动物中心。

### 1.2 实验试剂

DMEM/F12 培养基购自 Hyclone 公司;胶原酶、谷氨酰胺、青链霉素、B27、胎牛血清(FBS)购自 GIBCO 公司;表皮生长因子(EGF)购自 R&D 公司;G418、胰岛素(Insulin)、 $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -ME)、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、等购自 Sigma 公司、DNA 酶(DNase)购自 Roche 公司。

### 1.3 胰腺组织的取材

2~4 只 4~8 周健康小鼠用颈椎脱臼法处死,70% (wt/vol) 乙醇中浸泡 2~3min。在超净台将小鼠腹腔打开,暴露内脏,并于左侧可见与紫红色脾脏相连的胰尾,从靠近脾脏的胰腺尾部开始至十二指肠回弯处将胰腺完整取下,移入装有 4℃ PBS 的培养皿中,在冷光源显微镜下用尖头镊子剔除脂肪、血管、系膜以及淋巴结等,用眼科弯剪将其剪成大小约 8mm<sup>3</sup> 的均匀组织块。

### 1.4 胰腺组织的分离以及细胞悬液的制备

向胰腺组织块中添加经预热的含有 0.1mg/mL DNase 的 0.8mg/mL 型胶原酶,37℃ 消化,每隔 5min 吹打一次,当观察到组织块颜色由粉红色逐渐变白、一经吹打团块消失时,加入含有 FBS 的培养基终止消化;用移液器加入适量冷 PBS,反复吹打,使组织块及细胞团中的单细胞尽可能多的解离释放出来,经自然沉降约 10~15 秒左右,吸取上清,收集于离心管中;重复清洗操作 5~8 次左右,直至清洗组织块所得的悬液不再浑浊;离心收集到的单细胞悬液,弃去上清液,上层的细胞碎片、死细胞来源的 DNA 絮状缠绕物等,以及中间层的血细胞,保留最下层乳白色的实质细胞层。

### 1.5 直接接种法培养小鼠胰腺上皮细胞

将分离得到的胰腺细胞用含 10% 血清的 D/F12 培养基(添加有 2mmol/L 谷氨酰胺、100IU 青霉素-100 $\mu$ g 链霉素)重悬,直接接种于一个 24 孔板中( $1 \times 10^6$  个细胞/板),置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜,24 小时后更换培养基;培养 3 天后,更换为 2% 血清的扩增培养基(添加有 2mmol/L 谷氨酰胺、100IU 青霉素-100 $\mu$ g 链霉素、2%FBS、2% B27、20ng/mL EGF、10 $\mu$ g/mL insulin、50 $\mu$ mol/L $\beta$ -ME 的 DMEM/F12 培养基)于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养,定期观察,每 3~4 天更换新鲜培养基。

### 1.6 G418 处理去除成纤维细胞、纯化胰腺上皮细胞培养法

将分离得到的胰腺细胞分别采用以下方案去除成纤维细胞,纯化胰腺上皮细胞:

方案 1:悬浮细胞直接接种到含 30 $\mu$ g/mL G418 的培养基中得到的胰腺单细胞悬液直接用含有 30 $\mu$ g/mL G418 的 10% 血清培养基进行接种,将所得单细胞悬液接种至 1 个 24 孔板中( $1 \times 10^6$  个细胞/板),37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3d;弃去培养孔中未贴壁细胞及 10% 血清培养基,PBS 轻柔润洗 2~3 遍,然后换成 2% 血清的扩增培养基于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养,定期观察,每 3~4 天更换新鲜培养基。

方案 2:贴壁细胞用 G418 梯度处理将得到的胰腺单细胞用含 10% 血清的 D/F12 培养基重悬,接种于一个 24 孔板中( $1 \times 10^6$  个细胞/板),37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3 天;弃去培养孔中未贴壁细胞及培养基,PBS 轻柔润洗 2~3 遍,更换为含 2% 血清的培养基于 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养,待细胞生长至 50~70% 汇合,向细胞培养板不同列中分别加入 G418 至终浓度为 30、50、75、100 $\mu$ g/mL,每个浓度 6 个孔,分为三组,分别培养 24、48、72h;每天倒置显微镜观察培养板中各浓度 G418 处理不同时间后细胞变化。选择处理后成纤维细胞大部分脱壁或死亡、上皮细胞生长状态良好时,去除上清培养基,PBS 轻柔润洗 2~3 遍,然后换成 2%FBS 培养基于 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养,定期观察,每 3~4 天更换新鲜培养基。不同处理重复 4~5 次以观察实验结果的稳定性。

## 2 结果

### 2.1 直接接种法培养小鼠胰腺上皮细胞

将分离好的胰腺单细胞直接接种到 24 孔板中进行接种培养,结果发现,接种 24 小时后,孔内贴壁细胞密集,平均每孔贴壁细胞数为 200~300 个,有少量细胞开始增殖,经 3d 培养后发现,贴壁的细胞成混杂生长,成纤维细胞和上皮细胞均有贴壁,各占约 50%;在之后的 3~7 天继续培养过程中,成纤维细胞和上皮细胞均增殖较明显,两种细胞混杂生长,连成一片(图 1A、B)。

### 2.2 G418 去除成纤维细胞纯化胰腺上皮细胞培养结果

消化好的胰腺单细胞直接用含有 30 $\mu$ g/mL G418 的 10% 血清培养基培养,处理 3 天后,更换成 2% 血清培养基继续培养,培养结果发现:上皮细胞的贴壁和生长均受到显著抑制,而成纤维细胞虽然也受到一些抑制,但其生长状态仍然很好,经过 3~5 天的培养之后,成纤维细胞迅速增殖,培养板中贴壁的细胞 95% 以上都是成纤维细胞,上皮细胞很少(图 1C、D)。

消化得到的胰腺单细胞用 10% 血清培养基接种 3d,然后换成 2% 血清培养基继续培养 5~7d,成纤维细胞和上皮细胞相互参杂生长,当细胞在培养孔底壁达到 50~70% 汇合时,分别用含有 30、50、75、100 $\mu$ g/mL G418 的 2% 血清培养基共培养 24、48、72h,然后再更换成正常 2% 血清培养基继续培养,发现:

100 $\mu$ g/mL G418 处理 24h 的培养孔中,无论贴壁的成纤维细胞还是胰腺上皮细胞均表现出细胞迅速萎缩,形态异常,在之后的培养过程中,逐渐脱壁、最终 95% 以上细胞死亡(图 2A、B)。

75 $\mu$ g/mL G418 处理 24h 的培养孔中,成纤维细胞和上皮细胞生长状态不佳,孔内 50% 以上的细胞均出现死亡,不能有

效的去除成纤维细胞；处理 48h 的培养孔中，80%以上的成纤维细胞和胰腺上皮细胞在继续培养过程中死亡，处理 72h 的培养孔中，所有细胞迅速死亡(图 2C-E)。

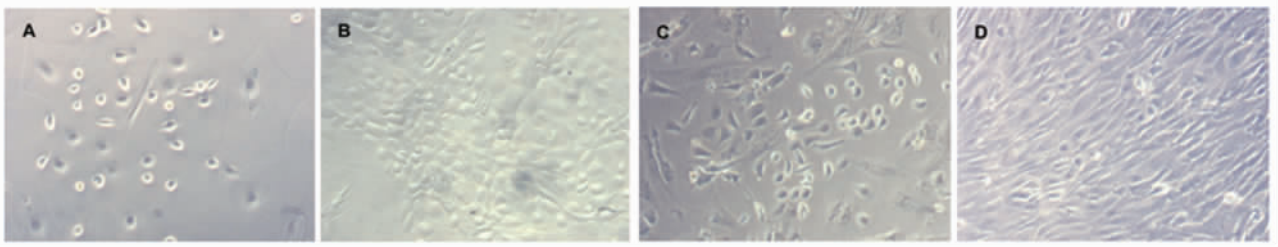


图 1 直接接种法以及采用 30μg/mL G418 直接处理的细胞生长状态

A :10%血清培养基培养 1 天后，上皮细胞与成纤维细胞的贴壁状况 B 接种后培养 7 天时，上皮细胞与成纤维细胞的增殖情况(100× )。

Figure 1 Cell growth of both direct inoculation and deal with 30μg/mL G418 directly

A: Adherent conditions of the epithelial cells and fibroblasts, after 1 day culturing with 10% serum medium; B: The proliferation of the epithelial cells and fibroblast after 7 days culturing(100× ).

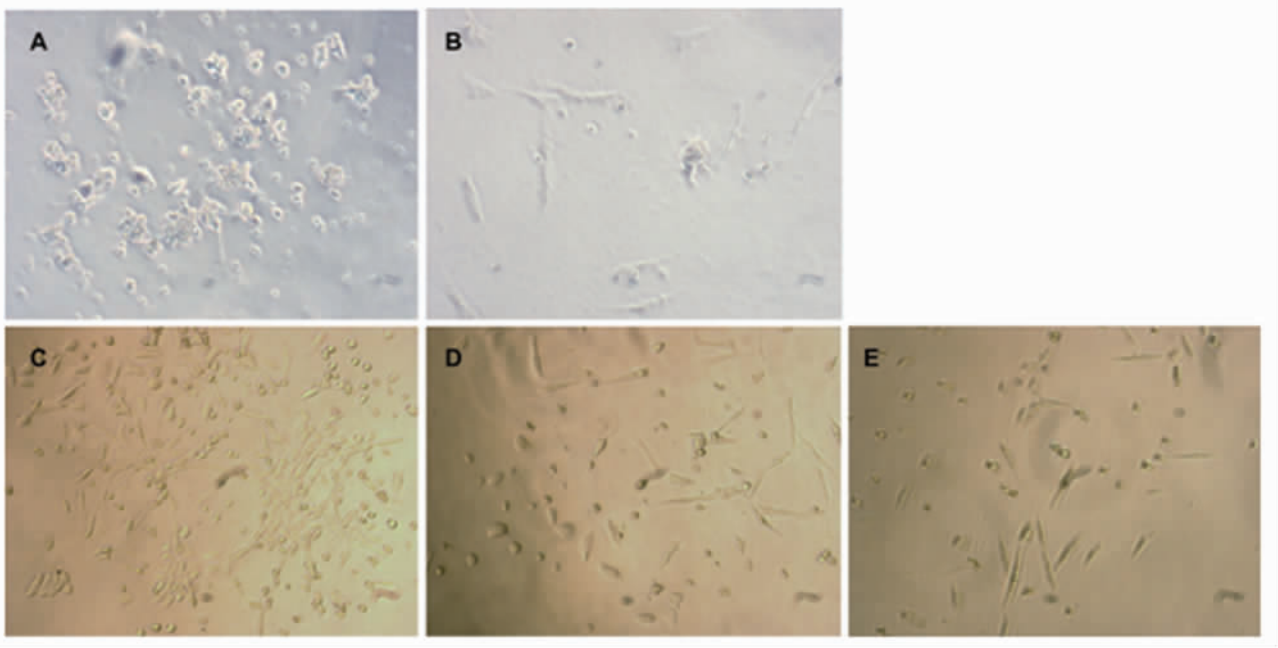


图 2 用 100μg/mL 及 75 μg/mL G418 处理后的细胞形态

A:用 100μg/mL G418 处理 24h 培养 1 天 B:用 100μg/mL G418 处理 24h 后再培养 3 天 C: 75μg/mL G418 处理细胞 24 小时 培养 1 天 D: 75μg/mL G418 处理细胞 48 小时 再培养 1 天 E:75μg/mL G418 处理细胞 72 小时 再培养一天( 100× )。

Figure2 Cell morphology after treatment with 100μg/mL and 75 μg / mL G418

A: The cells were treated for 24 hours with 100μg/mL G418, and then cultured for 1 days; B: the cells were treated for 24 hours with 100μg/mL G418, and then cultured for 3 days; C: the cells were treated for 24 hours with 75μg/mL G418, and then cultured for 1 days; D: the cells were treated for 48 hours with 75μg/mL G418, and then cultured for 1 days; E: the cells were treated for 72 hours with 75μg/mL G418, and then cultured for 1 days; (100× ).

50μg/mL G418 处理 24h 组，可见少量萎缩死亡的成纤维细胞漂浮在孔内，经 3~5 天培养后，70%~80%的成纤维细胞依然生长旺盛，上皮细胞占细胞总数的 5%~10%，且呈散点状生长，培养 7~10 天后，成纤维细胞与上皮细胞生长状态都良好，上皮细胞聚堆形成小集落，与成纤维细胞混杂生长(图 3A)；处理 48h 组，培养孔中成纤维细胞逐渐萎缩，经 3~5 天的培养，80%以上成纤维细胞发生萎缩，脱壁死亡，但仍有小部分成纤维细胞存活，上皮细胞稀疏分散，由圆形变得稍有棱角，培养 7~10d 后，上皮细胞增殖聚堆，形成集落(1/6 的孔内有集落形成)，孔中可见少量成纤维细胞，增殖较缓慢(图 3B)；处理 72h 组，大部分成纤维细胞飘起，换液时被去除，经 3~5 天培养后，

孔中成纤维细胞不断萎缩死亡，上皮细胞更加分散，形态也变得更加有棱角，培养 7~10 天后，孔中绝大部分(95%以上)成纤维细胞脱壁死亡，只剩下个别成纤维细胞存活，同时上皮细胞开始增殖，培养两周以上，上皮细胞大量增殖，能够聚堆形成较大的集落(200 个细胞以上)，增殖能力较明显(3/4 的培养孔内有集落形成)，孔内成纤维细胞几乎不增殖(图 C-D)。

30μg/mL G418 分别处理 24、48、72h 后，成纤维细胞和胰腺上皮细胞的生长状态几乎不受 G418 影响，其中成纤维细胞大量增殖，上皮细胞的生长受到成纤维细胞的抑制，增殖不明显(图 3F)。

上述结果表明，与直接接种法相比，采用 G418 处理法能



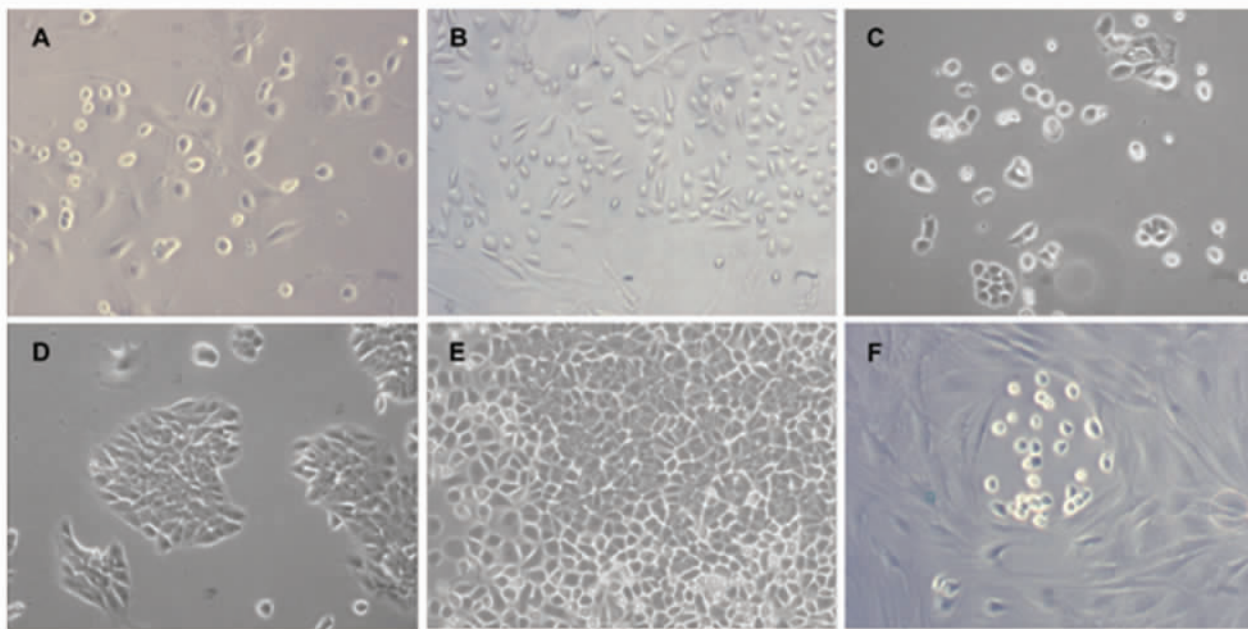


图 3 50 $\mu$ g/mL G418 处理细胞 24、48 及 72h 和 30 $\mu$ g/mL G418 处理细胞 72h 后细胞生长状态

A 经 50 $\mu$ g/mL G418 处理细胞 24h 培养 3 天 B 经 50 $\mu$ g/mL G418 处理细胞 48h 培养 5 天(200 $\times$ ) C D 经 50 $\mu$ g/mL G418 处理细胞 72h 培养 5 天后细胞集落的形成情况 E 经 50 $\mu$ g/mL G418 处理细胞 72h 培养 7 天后细胞集落的增殖情况(200 $\times$ ) F 用 30 $\mu$ g/mL G418 处理细胞 72h 后培养 3 天时的细胞形态(200 $\times$ )。

Figure 3 50 $\mu$ g/mL of G418 treated cells for 24, 48 or 72h, and 30 $\mu$ g/mL of G418 treated cells for 72h.

A: cells were treated by 50 $\mu$ g/mL G418 for 24h, cultured for 3 days; B: cells were treated by 50 $\mu$ g/mL G418 for 48h, cultured for 5 days(200 $\times$ ); C, D: the state of colony formation after cells were treated by 50 $\mu$ g/mL G418 for 72h and cultured for 5 days; E: the proliferation of cell colonies after the cells were treated by 50 $\mu$ g/mL G418 for 72h, and cultured for 7 days (200 $\times$ ); F: the cells were treated for 72 hours with 30 $\mu$ g/mL G418, and then cultured for 3 days (200 $\times$ ).

够有效的去除成纤维细胞,筛选纯化胰腺上皮细胞;并且在细胞成纤维和上皮混合生长至 50-70% 汇合下,50 $\mu$ g/mL G418 处理 72h 对去除成纤维细胞、纯化上皮细胞的效果是最好的:95%以上的成纤维细胞在培养过程中都逐渐萎缩死亡,75%的培养孔中上皮细胞聚堆增殖,可以得到具有较强增殖能力的上皮细胞集落。

### 3 讨论

随着世界范围内糖尿病患者人数的日益增多,糖尿病已成为当今医学三大难症之一。为了有效和彻底的治疗糖尿病,几十年以来,学者们一直希望能够分离、得到可以经诱导产生新 $\beta$ 细胞的胰腺干细胞,在体外进行大量扩增后诱导分化为胰岛细胞,就可以为细胞替代疗法治疗糖尿病提供丰富的供体来源<sup>[14]</sup>。

要在离体条件下对上皮来源的胰腺干细胞进行分离培养通常通过两条途径抑制成纤维细胞的生长,促进上皮干细胞的增殖:一条途径为无血清培养,在无血清条件下,成纤维细胞的生长受到抑制,而上皮细胞能够缓慢增殖,有报道称通过这种条件的培养胰腺干、祖细胞可以形成球状悬浮于培养基中<sup>[19]</sup>。然而,这种方法由于缺乏血清也抑制了上皮来源的干细胞的生长,很难获得大量干祖细胞后代;第二条途径是在有血清条件下培养,然后通过机械刮除法或挑出法将增殖的胰腺上皮细胞分离出来<sup>[17]</sup>。然而,在胰腺细胞的有血清培养过程中,成纤维细

胞常与胰腺上皮细胞同时混杂生长,使上皮细胞难以纯化出来,而且成纤维细胞通常比上皮细胞生长快,最终能抑制上皮细胞的生长。因此如何排除成纤维细胞成为胰腺上皮细胞离体培养中的关键。我们在胰腺细胞培养过程中,曾尝试过以及胰蛋白酶和胶原酶消化排除法,结果显示,机械刮除法不仅操作上不方便,容易造成细胞污染,而且在刮除的过程中容易将成片的上皮细胞带起,造成细胞萎缩死亡。而在使用胰蛋白酶或胶原酶反复消化去除成纤维细胞的同时,易导致培养的上皮细胞对胰蛋白酶或胶原酶越来越不敏感,最后上皮细胞几乎不能被消化下来,增殖也不明显,还分化成了神经样细胞形态。

Hao 等为了去除人胰腺细胞培养中的成纤维细胞,首先对细胞培养 2-3 天,然后用 400 $\mu$ g/mL G418 处理培养 4 天,去除 G418 后,大约 90%细胞存活下来,这些细胞均为上皮细胞<sup>[18]</sup>。Halaban 等也报道,在培养人的黑色素细胞时,加入 100 $\mu$ g/mL G418 处理两天可以有效去除成纤维细胞<sup>[20]</sup>。因而,在本实验中,我们也尝试使用 G418 去除成体小鼠胰腺离体培养中的成纤维细胞,纯化胰腺上皮细胞。在胰腺细胞培养至 50-70%汇合时加入 G418 处理较在最初培养时直接加入 G418 处理能更有效的保护上皮细胞,而培养后加入 G418 处理的浓度、处理时间不同都会影响成纤维细胞的去除程度。我们以选择对成纤维细胞致死性最强、而对上皮细胞损伤最小的浓度作为 G418 的最佳作用浓度,选择处理后成纤维细胞大部分脱壁死亡、上皮细胞生长状态良好的时间作为 G418 的最佳处理时间。最后发

现 50 $\mu$ g/mL G418 处理 72h 对去除成纤维细胞、纯化上皮细胞的效果最佳。这种方法能够特异杀死成纤维细胞,而且通过对 G418 处理浓度的控制,将其对上皮细胞的损伤降至最低,保持了细胞正常的生长性状。利用此方法,达到了去除成纤维细胞,富集、纯化胰腺上皮细胞目的,也筛选出了具有强增殖能力、能形成大的单细胞集落的胰腺上皮细胞,筛选出的这群上皮细胞很可能来源于成体胰腺干/祖细胞。在以后的深入研究的过程中,我们拟应用此方法进一步筛选出具有很强增殖能力和多向分化潜能的细胞,为利用干细胞治疗糖尿病研究打下基础。

#### 参考文献(Reference)

- [1] Zulewski H. Stem cells with potential to generate insulin producing cells in man[J]. Swiss Med Wkly, 2006, 136:647-654
- [2] Bodnar C A, Sen A, Kallos M S, et al. Characterization of Human Islet-Like Structures Generated from Pancreatic Precursor Cells in Culture[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 93: 980-988
- [3] Yang WY, Lu JM, Weng JP, et al. Prevalence of Diabetes among Men and Women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362: 1090-101
- [4] Roche E et al. Therapeutic potential of stem cells in diabetes[J]. Handb Exp Pharmacol, 2006, 174:147-167
- [5] Inada A, Nienaber C, Katsuta H, Fujitani Y, Levine J, Morita R, Sharma A, Bonner-Weir S. Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008, 105:19915-19919
- [6] Rovira M, Scott SG, Liss AS, Jensen J, Thayer SP, Leach SD. Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jan 5; 107(1):75-80
- [7] Ramiya V K, Maraist M, Arfors K E, et al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells[J]. Nat Medicine, 2000, 6:278-282
- [8] Gershengorn MC, Hardikar AA, Wei C, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Generates Proliferative Human Islet Precursor Cells[J]. Science, 2004, 306:2261-2264
- [9] Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22: 1115-1124
- [10] Zulewski H, Abraham E J, Gerlach M J, et al. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes[J]. Diabetes, 2001, 50: 521-533
- [11] Xu X, D'Hoker J, Stange G, et al. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas [J]. Cell, 2008, 132: 197-207
- [12] Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. Nat Genet, 2011, 43:34-41
- [13] 张丽新, 滕春波, 安铁洙. 利用成体干细胞治疗糖尿病 [J]. 生物工程学报. 2008, 24 :177-182  
Zhang L, Teng C, An T. Progress in treating diabetes mellitus with adult stem cells. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao [J]. 2008, 24: 177-82
- [14] Hu Huo-zhen et al. Stem Cell Biology [M]. Sichuan: Sichuan University Press, 2005
- [15] Gu G, Brown JR, Melton DA. Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis [J]. Mech Dev. 2003, 120:35-43
- [15] Slack JM. Developmental biology of the pancreas [J]. Development. 1995, 121:1569-1580
- [17] 章静波主编, 动物细胞培养(第四版)[M]. 科学出版社, 2004.  
Zhang jing-bo et al, Animal cell culture (Fourth Edition)[M]. Science Press, 2004
- [18] Hao E, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, et al. Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas [J]. Nature Medicine, 2006, 12: 310-316
- [19] Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22: 1115-1124
- [20] Halaban R, Alfano FD. Selective elimination of fibroblasts from cultures of normal human melanocytes [J]. In Vitro, 1984, 20: 447-450