

胚胎干细胞诱生的胰岛素分泌细胞移植对糖尿病鼠的治疗作用

刘星霞, 缪兵, 李府, 马秀峰, 时庆, 沈柏均

刘星霞, 李府, 马秀峰, 时庆, 沈柏均, 山东大学齐鲁医院低温医学研究室 山东省济南市 250012

缪兵, 山东大学医学院生理学研究所 山东省济南市 250012
刘星霞, 女, 1970-01-07 生, 山东省临清市人, 汉族. 1996 年上海医科大学医学硕士, 2002 年山东大学博士生. 主要从事干细胞诱导分化及移植治疗研究. 国家自然科学基金资助项目, No. 30271248

项目负责人: 沈柏均, 250012, 山东省济南市, 山东大学齐鲁医院低温医学研究室. shenbaijun@21cn.com

电话: 0531-2169215 传真: 0531-6927544

收稿日期: 2004-02-11 接受日期: 2004-02-13

Therapeutic effect of insulin-producing cells induced from embryonic stem cells on diabetic mice

Xing-Xia Liu, Bing Miao, Fu Li, Xiu-Feng Ma, Qing Shi, Bai-Jun Shen

Xing-Xia Liu, Fu Li, Xiu-Feng Ma, Qing Shi, Bai-Jun Shen, Department of Cryomedicine, Shandong University Qilu Hospital, Jinan 250012, Shandong Province, China

Bing Miao, Department of Physiology, Shandong University School of Medicine, Jinan 250012, Shandong Province, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30271248

Correspondence to: Dr. Bai-Jun Shen, Department of Cryomedicine, Shandong University Qilu Hospital, Jinan 250012, Shandong Province, China. shenbaijun@21cn.com

Received: 2004-02-11 Accepted: 2004-02-13

Abstract

AIM: To study the therapeutic effect on diabetic mice of insulin-producing cells induced from embryonic stem cells.

METHODS: Firstly, ESCs were induced to differentiate in serum-free DMEM supplemented with bFGF for more than 3 weeks, and DTZ staining was used to identify the induced IPCs; Secondly, experimental diabetes was induced in 6- to 8-week-old male Balb/c mice by a single intraperitoneal injection (200 mg/kg) of streptozotocin freshly dissolved in 0.1 mol/L of citrate buffer, pH 4.5; Finally, the induced IPCs were harvested at day 21 after differentiation, and grafted subcutaneously in the shoulder of streptozotocin-diabetic mice to observe their glucose-reducing effect.

RESULTS: ESCs could be induced to differentiate into IPCs in serum-free DMEM supplemented with bFGF. The induced IPCs were stained crimson red by DTZ, and their transplantation could reduce blood glucose of diabetic mouse significantly.

CONCLUSION: ESCs can be induced to differentiate into IPCs in serum-free DMEM supplemented with bFGF, and the induced IPCs transplantation has a certain therapeutic

effect on diabetic mice.

Liu XX, Miao B, Li F, Ma XF, Shi Q, Shen BJ. Therapeutic effect of insulin-producing cells induced from embryonic stem cells on diabetic mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(8):1853-1856

摘要

目的: 探讨小鼠胚胎干细胞ES-D₃诱导生成的胰岛素分泌细胞(IPCs)皮下移植对糖尿病(DM)模型小鼠的血糖及一般状况的影响。

方法: 首先, 将ES-D₃细胞培养于经处理的鼠胚成纤维细胞滋养层上保持未分化状态扩增, 对数生长期时转入无血清含bFGF的DMEM诱导培养液使其进行分化; 其次, 采用STZ(剂量: 200 mg/kg)一次性腹腔注射Balb/c小鼠制备DM模型; 最后, 将诱导21 d的IPCs行肩胛部皮下移植给DM小鼠, 观察小鼠血糖及一般状况的变化。

结果: ES-D₃诱导生成的IPCs在培养基中自我组装形成三维立体细胞簇, 可被DTZ染成洋红色. 诱导生成的IPCs经两次移植给DM小鼠后5 d, 受鼠的血糖水平显著降低, 一般状况有所改善, 但小鼠的血糖未能降至正常水平; 第2次移植后15 d, 血糖水平反弹到与移植前没有差别。

结论: ES-D₃诱导生成的IPCs皮下移植给DM小鼠, 能在一段时间内显著降低受鼠的血糖水平, 改善一般状况, 对DM小鼠起到一定的治疗作用。

刘星霞, 缪兵, 李府, 马秀峰, 时庆, 沈柏均. 胚胎干细胞诱生的胰岛素分泌细胞移植对糖尿病鼠的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2004;12(8):1853-1856
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1853.asp>

0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种严重危害人类健康的疾病^[1-2]. 移植胰岛素分泌细胞(insulin-producing cells, IPCs)是治疗I型和部分II型糖尿病患者的有效方法, 但受限于供源缺乏. 所以, 探索移植治疗糖尿病所需的IPCs新供源迫在眉睫^[3-9]. 在体外, 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)不仅具有保持未分化状态的无限增生能力, 而且具有多向分化的潜能^[10-14], 所以, 目前ESCs被视为糖尿病、老年性痴呆等多种疾病移植治疗的潜在供源^[15-19]. 最近, Lumelsky *et al*^[20]在进行鼠ESCs诱导分化研究时发现, ESCs可在体外诱导

分化形成类似在体胰岛组织的胰岛素分泌结构,为胚胎干细胞移植治疗糖尿病提供了实验依据.我们开展了小鼠胚胎干细胞 ES-D₃ 诱导生成 IPCs 的研究并获得成功,在详细研究了该 IPCs 的生物学特点的基础上,我们采用链脲菌素(streptozotocin, STZ)制备的 Balb/c 小鼠 DM 模型,进一步研究了 ES-D₃ 诱导生成的 IPCs 皮下移植对 DM 小鼠的降糖作用及对一般状况的影响,从而探讨该 IPCs 皮下移植治疗 DM 的可能性与可行性.

1 材料和方法

1.1 材料 ES-D₃ 细胞系购自中科院上海细胞生物化学研究所. DMEM, 胎牛血清及非必需氨基酸购自 Gibco 公司; Serum Replacement 3, STZ 和 Dithizone(DTZ)购自 Sigma 公司; 重组鼠碱性纤维母细胞生长因子(rm-bFGF)购自 R&D System 公司. Balb/c 小鼠, SPF 级, 由山东大学实验动物中心提供.

1.2 方法

1.2.1 取孕 13 d Balb/c 小鼠胚胎, 常规方法制备滋养层细胞. 所用培养基为 DMEM(含高糖, 谷氨酰胺, 不含丙酮酸钠)加 100 mL/L 小牛血清. 临用前, 用 10 mg/L 丝裂霉素处理. 将复苏后的 ES-D₃ 细胞种植于原代鼠胚成纤维细胞滋养层上, 种植密度为 5×10^8 /L. 所用培养基为 DMEM(含高糖, 谷氨酰胺, 不含丙酮酸钠), 添加 200 mL/L 胎牛血清, 10 g/L 非必需氨基酸, 0.1 mmol/L 2-巯基乙醇(2-ME), 1 mmol/L 谷氨酰胺. 细胞培养于 37 °C, 50 mL/L CO₂, 95% 饱和湿度的孵箱内, 每 3 d 常规传代 1 次. 将对数生长期的保持未分化状态的 ES-D₃ 细胞用胰酶-EDTA 消化后, 悬浮培养于无滋养层细胞的 12 孔细胞培养板. 所用诱导培养基为 DMEM(含高糖, 谷氨酰胺, 不含丙酮酸钠), 添加 200 mL/L serum replacement 3, 10 g/L 非必需氨基酸, 0.1 mmol/L 2-ME, 1 mmol/L 谷氨酰胺, 5 μg/L rm-bFGF. 细胞培养于 37 °C, 50 mL/L CO₂, 95% 饱和湿度的孵箱内, 隔天半量换液 1 次. 在诱导培养 21 d, 由 ES-D₃ 细胞诱导生成的 IPCs 经 DTZ 染色鉴定后备用^[21].

1.2.2 IPCs 皮下移植对 DM 小鼠血糖的影响 纯系 ♂ Balb/c 小鼠 18 只, 6-8 周龄, 体质量 20 ± 2 g. 适应性饲养 3 d 后, 按随机表方法将小鼠随机均分为 3 组. 组 1 为 IPCs 移植治疗组, 组 2 为 DM 模型对照组, 组 3 为未进行 DM 造模的正常对照组. 首先用 pH4.5 的柠檬

酸缓冲液配制 4 g/L STZ 溶液, 然后, 组 1, 组 2 各鼠 1 次性腹腔注射 STZ 200 mg/kg 以制备 DM 模型, 组 3 各鼠腹腔注射等体积的柠檬酸缓冲液, 作为未进行 DM 造模的对照组. 14 d 后, 用 LifeScan 血糖仪检测各组小鼠的血糖水平(检测时间均为上午 10:00), 组 1, 组 2 各鼠血糖 >16.7 mmol/L 者, 诊断为糖尿病^[21]. 移植采用诱导培养 21 d 的 IPCs. 将组 1 各鼠行肩胛部皮下注射移植等量 IPCs ($(2-5) \times 10^7$ 个细胞/鼠), 同时, 给组 2 各 DM 模型对照鼠及组 3 各未造模对照鼠皮下注射等体积不含细胞的诱导上清液作为对照, 即初次移植. 初次移植后 5 d, 同样剂量的 IPCs 同样方法再行第 2 次移植. 2 次移植过程中, 分别在初次移植后 5 d, 第 2 次移植后 5 d 和 15 d, 检测各组小鼠的血糖水平, 同时记录各鼠体质量并观察各鼠一般状况.

统计学处理 采用两样本均数比较的假设检验(方差不齐, 用 t' 检验), 所有数据均用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, $\alpha=0.0500$ (单侧).

2 结果

STZ 溶液 1 次性腹腔注射后 14 d, 检测各组小鼠的血糖水平. 组 1, 组 2 中血糖 >16.7 mmol/L 的小鼠共 10 只, 其余 2 只血糖低于标准, 分别为 11.6 mmol/L 和 12.1 mmol/L. 我们把这 2 只小鼠从糖尿病组中分出另放. 组 3 各鼠血糖正常, 体质量增加(表 1, 2).

2.1 小鼠血糖水平的变化 STZ 制模前, 各组小鼠血糖水平无差异(血糖 1). 血糖 2 为 STZ 溶液腹腔注射后 14 d (即 IPCs 移植前)的各组小鼠血糖水平; 血糖 3 示 IPCs 初次移植后 5 d 的各组小鼠血糖水平. 血糖 4, 5 分别为 IPCs 再次移植后 5 d (即初次移植后 10 d) 和再次移植后 15 d (即初次移植后 20 d) 的各组小鼠血糖水平. 结果显示, 移植前与制模前相比, IPCs 移植组及 DM 模型对照组小鼠血糖水平均明显增高($P < 0.05$); 未造模对照组无明显变化, 说明模型制备成功; 初次移植后 5 d, IPCs 移植组血糖水平较移植前无明显改变, 说明初次 IPCs 移植并未起到降糖作用; 初次移植后 10 d (即再次移植后 5 d) 与移植前相比, IPCs 移植组血糖水平明显降低($P < 0.05$), 说明 IPCs 第 2 次移植, 可有效降低受鼠血糖; 初次移植后 20 d (即再次移植后 15 d), IPCs 移植组血糖水平反弹至与移植前的血糖水平无明显差别. DM 模型对照组和未造模对照组小鼠血糖水平始终均无

表 1 IPCs 移植前后各组小鼠血糖水平(mean \pm SD, mmol/L)

分组	<i>n</i>	血糖 1 (制模前)	血糖 2 (制模后 移植前)	血糖 3 (初次移植后 5 d)	血糖 4 (再次移植后 5 d)	血糖 5 (再次移植后 15 d)
IPCs 移植组	5	6.2 \pm 0.5	20.9 \pm 2.1 ^a	21.9 \pm 2.3	16.9 \pm 0.6 ^c	21.5 \pm 2.8
DM 模型对照组	5	6.3 \pm 0.4	19.5 \pm 2.5 ^a	22.1 \pm 2.9	21.2 \pm 2.3	21.5 \pm 2.1
未造模对照组	6	6.3 \pm 0.5	6.4 \pm 0.9	7.3 \pm 0.6	7.1 \pm 0.8	6.8 \pm 1.0

^a $P < 0.05$ vs 制模前, ^c $P < 0.05$ vs 移植组移植前.

明显改变, 且前组一直维持在高水平, 而后组一直维持在正常水平, 该结果说明, 第1次 IPCs 移植未起降糖作用, 第2次 IPCs 移植在一段时间内明显降低 DM 小鼠的血糖(表 1)。

表2 IPCs 移植前后各组小鼠体质量情况(mean±SD, g)

分组	n	体质量 1 (制模前)	体质量 2 (制模后移植前)	体质量 3 (再次移植后 15 d)
IPCs 移植组	5	20.3 ± 2.5	18.3 ± 2.5	19.8 ± 3.2
DM 模型对照组	5	19.2 ± 2.9	16.9 ± 2.6	17.1 ± 2.6
未造模对照组	6	19.4 ± 1.8	21.7 ± 2.1	23.5 ± 2.5

2.2 小鼠体质量的变化 STZ 制模前, 称量各组小鼠体质量(体质量 1); STZ 溶液腹腔注射后 14 d(即制模后、IPCs 移植前), 称量各组小鼠体质量(体质量 2); IPCs 第2次移植后 15 d, 称量各组小鼠体质量(体质量 3)。结果显示, 与制模前相比, IPCs 移植组和 DM 模型对照组各鼠在制模后, 体质量均降低, 但无显著差异, 同时, 小鼠活动减少, 毛发疏松无光泽。移植组小鼠在 IPCs 再次移植后 15 d, 体质量虽无明显回升, 但动物的一般状况有所改善; 而 DM 模型对照组各鼠体质量继续维持较轻水平, 一般状况也较差; 未造模对照组各鼠体质量则持续增加, 且一般状况良好。这与 Lumelsky *et al*^[21] 报道相一致(表 2)。

3 讨论

ESCs 诱导分化为 IPCs 的研究起步较晚, 相关报道不多^[20-26], 尤其是关于诱导生成的 IPCs 移植治疗糖尿病的文献则更少^[20, 22, 24-25]。所以, 我们在 ES-D₃ 诱导生成的 IPCs 获得成功并详细研究了该 IPCs 的生物学特点的基础上, 进一步研究了 ES-D₃ 诱生的 IPCs 皮下移植对 DM 小鼠的降糖作用及对一般状况的影响。Soria *et al*^[22] 报告进行脾脏内 IPCs 移植, 能够将 DM 小鼠血糖水平降至正常, 并维持 10 wk 左右, 然后, 约一半受鼠血糖反弹至移植前水平, 原因不明。Hori *et al*^[24] 进行肾脏被膜下移植, 能够将 DM 小鼠血糖水平降至 <17 mmol/L 左右, 并维持约 14 d, 之后, 受鼠的血糖水平反弹至移植前水平, 原因亦不明, 血糖虽未能降至正常水平, 但是, 移植受鼠的一般状况得到改善; Blyszczuk *et al*^[25] 进行脾脏内及肾脏被膜下移植, 能够将 DM 小鼠血糖水平降至 <10 mmol/L, 并维持约 14 d, 所以, 脾脏、肾脏内移植效果较为肯定。Lumelsky *et al*^[20] 进行了 IPCs 皮下移植, 结果与 Hori *et al*^[24] 的相仿, 未能纠正受鼠的高血糖, 但是, 他们观察到受鼠的一般状况得到改善, 体质量不减, 原因也不清楚。我们考虑到临床应用及患者的接受程度, 认为皮下移植治疗有较大的实用价值。我们分析皮下移植疗效不肯定的原因, 可能与移植 IPCs 的年轻程度、功能状态、细胞数量、移植局部微环境、受者病情的严重程度及个体差异等

多种因素有关。

ESCs 在体外不仅能诱导生成包括 β 细胞在内的胰腺内分泌细胞, 同时亦能分化出多种胰腺外分泌细胞, 而且 ESCs 诱导生成的 IPCs 未经纯化移植给糖尿病小鼠后, 植入的移植物在受鼠体内可形成包括 β , α , δ 及 pp 细胞在内的类胰岛组织^[20, 26]; 且 β 细胞必须移植入体内才能获得完全的功能性成熟^[27-30]。所以, 我们认为, 我们的诱导体系中, 可能存在有利于维持已诱导生成的胰腺 β 细胞活性和生存的其他类型的细胞或物质。移植中其他类型的细胞(包括胰岛的其他内分泌细胞及胰腺外分泌部的细胞等)的存在, 可能改善了移植局部的微环境, 更有利于 β 细胞的功能性成熟及植入的 β 细胞发挥作用, 因此, 我们选择胰岛素分泌处于高峰期的未纯化 IPCs 进行皮下移植。

就糖尿病模型而言, 目前有两种, 一是 Soria *et al*^[22] 的报道, 采用 STZ(200 mg/kg)腹腔注射 14 d, 受鼠的血糖水平 >28 mmol/L 为诊断指标的 DM 模型, 二是 Blyszczuk *et al*^[25] 的报道, 采用 STZ(200 mg/kg)腹腔注射 24 h, 受鼠的血糖水平约为 12 mmol/L 为诊断指标的 DM 模型。根据临床实际, 患者多数病程较长, 血糖水平较高, 所以我们选择采用 STZ(200 mg/kg)腹腔注射 14 d 的受鼠作为糖尿病模型; 针对糖尿病的诊断指标, 我们根据 Lumelsky *et al*^[20] 的报道, 采用血糖 >16.7 mmol/L 作为糖尿病的诊断标准。移植细胞的数量一般为 $(1-2) \times 10^7$ 个细胞/鼠^[20, 25], 鉴于皮下注射降糖作用较弱, 我们选择 5×10^7 个细胞/鼠进行移植。结果, 在移植后 5 d, 血糖水平未降, 我们怀疑移植细胞的数量不够, 接着进行了等量诱生的 IPCs 再次移植。于第2次移植后的 5 d, 发现小鼠血糖虽然未降至正常水平, 但较移植前显著降低($P < 0.05$, 表 1)。说明在我们的实验条件下, IPCs 皮下移植虽然不能将模型鼠的高血糖水平降至正常, 但在一段时间内, 能够明显降低患鼠的血糖水平。

值得注意的是, 在诱导 DM 模型的 12 只小鼠中, 有 2 只小鼠血糖水平分别为 11.6 mmol/L 和 12.1 mmol/L, 虽然明显高于未造模对照组(6.3 ± 0.5 mmol/L), 但低于 16.7 mmol/L 的诊断标准, 我们把这两只小鼠从糖尿病组中分出, 同时也对他们进行了 IPCs 移植, 移植方案同前。结果发现, 初次移植后 5 d, 这两只小鼠血糖分别恢复到 6.6 mmol/L 和 7.8 mmol/L, 再次移植后 5 d, 血糖仍维持在正常水平。提示处于胰腺 β 细胞病损较轻的早期糖尿病的状态, 进行 IPCs 移植治疗, 疗效可能更好。另外, 对于重症糖尿病患者, 先利用其他降糖药, 将血糖水平降低到一定程度, 再行 IPCs 移植, 或 IPCs 移植治疗的同时辅以其他降糖药, 疗效是否会更好, 也值得探讨。

4 参考文献

- Engelgau MM, Narayan KM, Saaddine JB, Vinicor F. Addressing the burden of diabetes in the 21st century: better care and

- primary prevention. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(7 Suppl 2): S88-91
- 2 Halvorsen T, Levine F. Diabetes mellitus-cell transplantation and gene therapy approaches. *Curr Mol Med* 2001;1:273-286
 - 3 Bertuzzi F, Secchi A, Di Carlo V. Islet transplantation in type 1 diabetic patients. *Transplant Proc* 2004;36:603-604
 - 4 姜佳丽, 万小平, 张琳, 展玉涛. 胰腺干细胞. 世界华人消化杂志 2003;11:1740-1742
 - 5 Scharfmann R. Alternative sources of beta cells for cell therapy of diabetes. *Eur J Clin Invest* 2003;33:595-600
 - 6 Street CN, Rajotte RV, Korbitt GS. Stem cells: a promising source of pancreatic islets for transplantation in type 1 diabetes. *Curr Top Dev Biol* 2003;58:111-136
 - 7 Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343:230-238
 - 8 Yamaoka T. Regeneration therapy of pancreatic beta cells: towards a cure for diabetes? *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:1039-1043
 - 9 Ball SG, Barber TM. Molecular development of the pancreatic beta cell: implications for cell replacement therapy. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:349-355
 - 10 Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000;18:675-679
 - 11 Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10716-10721
 - 12 Gerecht-Nir S, Itskovitz-Eldor J. Human embryonic stem cells: a potential source for cellular therapy. *Am J Transplant* 2004; 4(Suppl 6):51-57
 - 13 Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 2002;91:189-201
 - 14 Henon PR. Human embryonic or adult stem cells: an overview on ethics and perspectives for tissue engineering. *Adv Exp Med Biol* 2003;534:27-45
 - 15 Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000;408:92-96
 - 16 Hornstein E, Benvenisty N. The "brainy side" of human embryonic stem cells. *J Neurosci Res* 2004;76:169-173
 - 17 Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000;18:399-404
 - 18 Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 193:193-204
 - 19 He Q, Li J, Bettiol E, Jaconi ME. Embryonic stem cells: new possible therapy for degenerative diseases that affect elderly people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003;58:279-287
 - 20 Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001;292:1389-1393
 - 21 Shiroy A, Yoshikawa M, Yokota H, Fukui H, Ishizaka S, Tatsumi K, Takahashi Y. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithione. *Stem Cells* 2002;20:284-292
 - 22 Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000;49:157-162
 - 23 Assady S, Maorl G, Amitl M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001;50:1691-1697
 - 24 Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16105-16110
 - 25 Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus AM. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:998-1003
 - 26 Moritoh Y, Yamato E, Yasui Y, Miyazaki S, Miyazaki J. Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes* 2003;52:1163-1168
 - 27 Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000;6:278-282
 - 28 Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 2001;15:111-127
 - 29 Soria B. In-vitro differentiation of pancreatic β -cells. *Differentiation* 2001;68:205-219
 - 30 Murtaugh LC, Melton DA. Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:71-89

World Journal of Gastroenterology 被国际检索系统收录

ISI 编制出版的《科学引文索引》(Science Citation Index®-Expanded, SCI-E)是一种大型的综合性检索工具, 收录世界上 5876 多种权威科技期刊。它具有严格的选刊标准, 是国际公认的进行科学统计与科学评价的主要工具, 是衡量期刊质量和论文学术水平的重要依据。由于 SCI-E 特有的著者与著者、文献与文献之间的引用与被引用关系, 使之成为目前国际上最具权威性的科研成果评价体系。一个国家或地区的科技期刊和论文被 SCI-E 收录和引用的多少, 被认为是评价该国或该地区科学研究水平高低的标志之一。1998 年以来《World Journal of Gastroenterology, WJG》先后被美国《科学引文索引》(SCI-E, Research Alert®, Current Contents/Clinical Medicine®, Journal Citation Reports®, Clinical Medicine Citation Index®), 美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE), 美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA), 荷兰《医学文摘库 / 医学文摘》(EMBASE/Excerpta Medica, EM), 俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journals, AJ) 收录。