

胰腺干细胞研究的现状与展望

洪天配

洪天配, 北京大学第三医院内分泌科, 北京大学干细胞研究中心, 北京大学糖尿病中心 北京市 100083

洪天配, 男, 1963-07-28 生, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 福建省南安市人, 汉族. 1985 年毕业于福建医科大学医学系, 获医学学士学位, 1991 年毕业于北京医科大学, 获医学博士学位, 1997-09-06 至 1999-10-07 在丹麦 Steno 糖尿病中心从事客座研究. 主要从事胰岛损伤与功能重建的研究, 参与编写专著和教材 4 部, 发表论文及综述 50 篇. 现任中华医学会糖尿病分会青年委员、北京糖尿病防治协会理事、北京医学会糖尿病专业委员会委员、中华糖尿病杂志编委、世界华人消化杂志编委等.

国家自然科学基金项目, No. 30040022, No. 30170443

“211 工程”建设项目人体干细胞工程学科群项目

美国纽约中华医学基金会专项人才基金项目

国家 973 项目子课题, No. 2001CB510105

项目负责人: 洪天配, 100083, 北京市花园北路 49 号, 北京大学第三医院内分泌科. tpho66@bjmu.edu.cn

电话: 010-62017691 传真: 010-62017700

收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-01-19

摘要

干细胞根据其来源的不同, 可分为胚胎干(ES)细胞和成体干细胞. 临床胰岛移植的成功引发了胰岛组织来源不足的巨大压力, 从而促使胰腺干细胞研究成为当前的热门课题. 理论上, 胰腺干细胞可能存在于胰腺组织(如导管上皮)中或由 ES 细胞分化而来, 胰岛细胞还可能来源于其他组织干细胞的横向分化. 有关成年胰腺组织中是否存在胰腺干细胞、巢蛋白是否为胰腺干细胞的特异性标志物、巢蛋白阳性细胞在体外是否能真正诱导分化为胰岛素分泌细胞等焦点问题, 目前存在激烈的争论. 晚近, 已从胰腺组织中成功建立了单克隆的多能胰腺干细胞, 并在单细胞水平上对胰腺干细胞的体外分化规律进行了初步的描述. 同时, 多数学者认为巢蛋白不是胰腺干细胞高度特异性的一种标志物, 单独应用巢蛋白不足以作为胰腺干细胞的鉴定标准. 此外, 在有外源性胰岛素存在的培养条件下, 单独检测胰岛素的含量和释放反应对于干细胞分化而来的胰岛素产生细胞的鉴定不够可靠, 可能出现假阳性结果, 建议联合采用多种不同的检测方法. 尽管胰腺干细胞研究取得的成果仅仅是初步的, 但随着干细胞研究的深入发展和技术突破, 必将为糖尿病治疗学领域开辟一片崭新的天地.

关键词: 胰腺干细胞; 糖尿病; 胰岛素

洪天配. 胰腺干细胞研究的现状与展望. 世界华人消化杂志 2005;13(3):286-289
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/286.asp>

0 引言

糖尿病是严重危害人类健康和生命常见的内分泌代谢性疾病, 近年来其患病率在全球呈现快速增长的趋势, 在大多数国家已成为继心血管疾病和肿瘤之后

的第三大疾病. 目前几乎所有 1 型糖尿病和部分 2 型糖尿病患者都需要长期注射胰岛素治疗, 常规治疗方案发生全身血管并发症的危险性较高, 而强化治疗方案虽可使糖尿病并发症的危险性降低, 但却不能完全避免其发生, 且容易出现低血糖反应甚至昏迷而危及生命^[1-2]. 2000 年, 胰岛移植取得了突破性进展, 来自加拿大 Edmonton 的研究小组改良了抗免疫排斥的用药方案, 取得连续 7 例胰岛移植的成功, 可使 1 型糖尿病患者完全停用胰岛素治疗超过 1 a 以上^[3]. 然而, Edmonton 方案中每次移植的胰岛组织需要来自两个或两个以上的供体胰腺, 且移植后需要长期的抗免疫排斥治疗, 故而限制了胰岛移植的广泛开展.

干细胞是既具有无限或较长期自我更新、不断增生的能力, 又具有多向分化潜能的一类特殊细胞. 2000 年, Ramiya *et al*^[4]报道了从成年小鼠胰腺导管中分离得到的胰腺干细胞在体外扩增和诱导分化为胰岛后进行移植, 可以逆转小鼠的胰岛素依赖型糖尿病. 2001 年, Zulewski *et al*^[5]首次提出巢蛋白(nestin)是胰腺干细胞的标志物. 随后, 围绕成年胰腺组织中是否存在胰腺干细胞, 巢蛋白是否为胰腺干细胞的特异性标志物, 巢蛋白阳性细胞在体外是否能真正诱导分化为胰岛素分泌细胞等一系列问题, 在学术界展开了激烈的争论. 本文就胰腺干细胞研究领域的若干焦点问题和发展趋势进行评述, 相信随着干细胞研究的深入和干细胞技术的发展, 干细胞体外扩增和诱导分化为胰岛细胞将成为解决供体胰岛来源不足的希望所在, 为糖尿病治疗展示了美好的前景.

1 干细胞研究的概况

干细胞根据分化能力的不同, 可以分为全能干细胞、多能干细胞、单能干细胞. 根据来源的不同, 又可分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)和成体干细胞(somatic stem cells). ES 细胞是从着床前的早期胚胎(囊胚)内细胞团中分离获得的一种二倍体细胞, 理论上具有可发育成各种组织器官的潜能, 成体干细胞理论上在特定条件下可分化为特定的组织器官, 是修复和再生的基础. 1998 年, 人类 ES 细胞首次由美国威斯康星大学 Thomson *et al*^[6]分离培养成功, 并由此推动了干细胞研究热潮的兴起. 2004 年, 韩国和美国的科学家利用克隆人胚胎技术获得了人类 ES 细胞

系^[7], 为开展治疗性克隆研究奠定了坚实的理论基础, 并提供了有益的技术指导. 上述两项成果被认为是干细胞研究领域中具有里程碑意义的重大突破.

2 胰腺干细胞研究的现状

理论上, 胰腺干细胞可能存在于胎胰或成年胰腺组织(胰腺导管上皮细胞)中, 也可来源于ES细胞的进一步分化^[8]. 此外, 胰岛内分泌细胞还可能来源于其他组织特异性干细胞的横向分化, 譬如肝脏干细胞、脾脏干细胞、骨髓间充质干细胞等^[8-10]. 本文重点讨论前两种情况.

2.1 关于成年胰腺组织中是否存在胰腺干细胞的争议
2000年, Ramiya *et al*^[4]从未发病的成年非肥胖糖尿病(NOD)小鼠的胰导管上皮结构中分离出胰腺干细胞, 经体外扩增并诱导分化为胰岛后, 移植到NOD小鼠的肾囊或皮下组织, 可以逆转其胰岛素依赖型糖尿病. 同样, 成人胰导管上皮细胞也可在体外进行扩增并诱导分化为胰岛^[11]. 另有研究发现, 成年大鼠和人胰岛中均存在巢蛋白阳性细胞, 该细胞具有干细胞的特性, 体外培养可分化为胰腺内分泌细胞、外分泌细胞和导管细胞以及肝细胞^[5]. 上述研究结果提示, 成年胰腺组织尤其是胰导管上皮细胞中存在胰腺干细胞.

2004-05, 美国哈佛大学Melton教授的实验室报道, 利用胰岛素启动子控制的他莫昔芬(tamoxifen)依赖性Cre重组酶表达系统(RIP-CreER)和Cre活性报告系统(Z/AP)作为细胞谱系示踪方法, 制备转染双基因(RIP-CreER; Z/AP)小鼠, 发现成年期小鼠和胰腺部分(70%)切除术后小鼠的胰岛 β 细胞主要来自原有 β 细胞自我复制, 而不是来自多能胰腺干细胞的分化^[12]. 上述结果提示, 终末分化的 β 细胞在体内仍保留明显的增生能力, 同时对成体干细胞在 β 细胞补充中发挥显著作用这种观点提出质疑. 该报道在学术界引发了激烈的争论, 不少学者认为其结论过于武断, 理由是: (1)该示踪方法本身存在稳定性不足的缺陷; (2)胰腺切除比例太低, 可能无法激活胰腺干细胞的增生和分化; (3)未对新生期小鼠胰岛 β 细胞的来源进行研究; (4)人类或其他哺乳动物与小鼠之间可能存在种属差异.

晚近的许多研究支持成年小鼠胰腺组织中存在胰腺干细胞^[13-16]. 特别值得一提的是, 已从成年小鼠胰腺组织中建立了单克隆的多能胰腺干细胞, 并且在体外可诱导分化为胰岛素分泌细胞^[14-15]. 另据2004-11 Gershengorn *et al*的最新报道, 来源于成人胰岛的成纤维细胞样细胞在体外很容易增生, 这种间充质表型的细胞虽无激素表达, 但可诱导分化为表达激素的胰岛样细胞聚集体, 并重现胰岛细胞典型的

上皮样特征. 不论是在单个细胞或是在群体细胞中, 免疫组织化学、原位杂交及mRNA检测均证实胰岛内上皮细胞在体外培养时先转变为间充质细胞, 然后转变为表达胰岛素的上皮细胞. 此外, 我们已从人胎胰组织中分离获得胰腺干细胞, 并建立了单克隆人胰腺干细胞系, 两类细胞均具有间充质表型特征, 在体外有很强的增生能力, 并可被诱导分化为胰岛素产生细胞^[17-19]. 其他研究者也报道了人胎胰组织来源的胰腺干细胞可诱导分化为胰腺内分泌细胞, 将分化后细胞移植到糖尿病小鼠体内可纠正高血糖^[20-21]. 上述结果进一步支持胰腺组织中存在胰腺干细胞, 并且在适当的环境下可向胰岛内分泌细胞分化.

2.2 关于巢蛋白是否为胰腺干细胞特异性标志物的争议
巢蛋白在神经发育的研究中被确定为神经干细胞的标志物^[22]. 由于神经组织与胰岛在发育过程中有许多相似之处, 故使人们联想到其作为胰腺干细胞标志物的可能性. Hunziker *et al*于2000年首先报道在成年胰岛内存在巢蛋白阳性细胞, 其后发现巢蛋白阳性细胞广泛存在于胚胎期和成年胰岛、胰导管及中心腺泡内^[23-24]. Zulewski *et al*^[5]在2001年发现成年大鼠和人胰岛中均存在巢蛋白阳性细胞, 该细胞具有多向分化的潜能, 体外培养可分化为胰腺内分泌细胞、外分泌细胞和导管细胞以及肝细胞, 从而提出巢蛋白是胰腺干细胞的标志物. 我们和其他研究者均发现, 从人胎胰组织中可分离获得巢蛋白阳性细胞, 其在体外培养时具有很强的增生能力, 并可诱导分化为表达胰岛素、胰升糖素等内分泌标志物的细胞^[18-22]. 诱导分化后的细胞在高浓度葡萄糖的刺激下具有一定的胰岛素释放反应, 细胞移植后可降低糖尿病小鼠的血糖水平^[20-21].

另一方面, Treutelaar *et al*^[25]利用转基因(巢蛋白启动子-Cre; LoxP)细胞标记示踪技术进行的体内发育生物学研究中观察到, 在胚胎发育期, 巢蛋白阳性细胞发育为胰腺间充质的血管; 出生后, 胰腺巢蛋白阳性细胞可发育成胰岛的微血管结构, 但不能发育为胰岛内分泌细胞. 采用相同的示踪技术, 发现巢蛋白在胰腺外分泌细胞系中表达, 而恒定的巢蛋白表达并不是胰腺内分泌前体细胞的主要特征^[26]. 体外实验也发现, 导管上皮细胞可分化形成胰岛样结构并分泌胰岛素, 而巢蛋白阳性细胞并不能向胰岛内分泌细胞分化^[25, 27]. 此外, 通过巢蛋白启动子分离和纯化人胎胰组织中的巢蛋白阳性细胞, 经体外诱导和体内移植后未分化为胰岛内分泌细胞^[28]. Street *et al*^[29]的研究显示, 巢蛋白阳性细胞在胰腺中分布广泛, 巢蛋白在外分泌腺泡部分中的表达水平高于胰岛和导管, 巢蛋白尚可分别与包括腺泡细胞、导管细胞、间充质

细胞、血管平滑肌细胞等多种不同类型细胞的特异性标志物存在不同程度的共表达,因此仅仅巢蛋白本身可能不足以作为识别胰腺干细胞的标志物。

上述似乎矛盾的研究结果仅可提示巢蛋白可能不是胰腺干细胞的一种高度特异性的标志物,尚不足以得出巢蛋白阳性细胞肯定不是胰腺干细胞的结论。理由是:(1)发育生物学的证据显示巢蛋白阳性细胞可发育成为胰岛微血管结构、胰腺外分泌细胞等,表明其具有干细胞的特性,不能排除在其他适当的体内或体外环境下向胰腺内分泌细胞分化的可能性,目前也还没有体外诱导胰腺干细胞向胰岛细胞分化的标准方案;(2)巢蛋白阳性细胞的非均质性和巢蛋白表达的不恒定性提示可能只有部分巢蛋白阳性细胞可分化为胰岛素产生细胞,我们和其他研究者建立的单克隆胰腺干细胞中仍有巢蛋白表达支持这种推论^[14-15,18];(3)在诱导ES细胞向胰岛素产生细胞分化的过程中,先有巢蛋白的表达,后有胰岛素等胰岛细胞标志物的出现^[30-32]。因此,在今后胰腺干细胞的研究中,应积极寻找胰腺干细胞特异性的其他标志物,避免单纯使用巢蛋白作为鉴定胰腺干细胞唯一的标志物。同时,还应进一步探索诱导胰腺干细胞分化为胰岛 β 细胞的条件。

2.3 关于ES细胞向胰岛素产生细胞分化的争议 2001年Lumelsky *et al*^[30]首次报道了应用五步法将小鼠ES细胞体外诱导分化为胰岛素分泌细胞,分化后的细胞在体外自动形成胰岛样结构。随后的研究发现,3-磷酸肌醇激酶抑制剂可促使小鼠ES细胞分化为胰岛素产生细胞,并聚集成胰岛样结构,其体外胰岛素释放反应呈葡萄糖依赖性;移植到糖尿病小鼠体内可升高血中胰岛素水平、缓解体重下降、改善血糖控制以及完全避免动物死亡,切除移植体很快使病情复发,并出现死亡;未发现移植细胞形成肿瘤^[31]。另有报道显示,小鼠ES细胞表达Pax-4可促使其向巢蛋白阳性前体细胞和胰岛素产生细胞分化,并形成含有胰岛素分泌颗粒的胰岛样球形结构^[32]。同样,已有研究证实,人类ES细胞也可自发或诱导分化为胰岛素产生细胞^[33]。

2003年,Melton领导的实验室通过在培养液中加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的胰岛素,发现ES细胞诱导分化后的细胞和小鼠胚胎成纤维细胞均可检测到胰岛素着染,而在不含胰岛素的培养液处理细胞时则未检测到,并且胰岛素着染的细胞出现核固缩、变小和TUNEL染色阳性。据此认为,检测到的胰岛素可能是由于诱导分化过程中凋亡细胞从培养液摄取和浓集而来,而非真正的胰岛素表达。并且提出,为了避免单独胰岛素染色的假阳性结果,确保胰岛素表达鉴定结果真实、可靠,应该联合采用几种不

同的检测方法,其中包括C-肽染色、电子显微镜观察分泌颗粒、Northern分析、原位杂交、代谢标记检测、证实胰岛素双相分泌、移植实验证实降血糖作用超过1 mo等。2004-10, Serup及其同事也发现,在ES细胞分化而来的细胞中可检测到免疫反应性的胰岛素和程度不恒定的葡萄糖刺激胰岛素释放的反应,但细胞内C-肽含量和C-肽释放反应均未能测到;此外,该细胞可摄取培养液中FITC标记的胰岛素,且许多胰岛素免疫反应细胞正在出现凋亡或坏死。因此,他们认为要说明胰岛素产生是来自ES细胞的子代,就应该证实有C-肽的合成和分泌。

由此看来,尽管目前绝大多数学者确信ES细胞可分化为胰岛 β 细胞,但上述研究的某些阳性结果有待于进一步证实,而体外诱导ES细胞分化为胰岛素分泌细胞的技术条件更是亟待完善。迄今为止,ES细胞来源的胰岛素产生细胞移植到体内还不能完全排除肿瘤形成的可能性。除了学术上的争议之外,人ES细胞研究本身目前仍然存在剧烈的伦理学争论。然而,ES细胞研究的终极目标是治疗性克隆,理论上这是同时解决供体胰岛组织来源不足和移植后免疫排斥反应两大难题最有希望的途径。

2.4 关于干细胞研究中如何定义胰岛 β 细胞的意见 前文已述及,在有外源性胰岛素存在的培养条件下,单独检测胰岛素的含量和释放反应可能高估干细胞向真正胰岛 β 细胞分化的实际情况,并可能出现假阳性结果。目前文献中常用于识别胰岛 β 细胞的标志物包括:(1)葡萄糖感受分子,如葡萄糖激酶(GCK)、葡萄糖转运子2(GLUT2)等;(2)调控胰岛 β 细胞发育和胰岛素合成的转录因子,如Pax6、Beta2/NeuroD、PDX-1、Nkx2.2、Nkx6.1、Isl-1等;(3)与葡萄糖刺激胰岛素释放相关的事件,如细胞内钙离子浓度增加、C-肽释放、胰淀素释放等。迄今为止,在几乎所有的研究中,干细胞来源的胰岛素产生细胞的胰岛素含量和分泌能力似乎远远低于原代胰岛 β 细胞,且其特征尚未完全阐明,故有人建议将其命名为“原 β 细胞”^[16]。那么,这类细胞究竟比真正的胰岛 β 细胞缺少什么?真正的胰岛 β 细胞还应该具有以下特征:应表达ATP-敏感性钾通道Kir6.1;应含有专门的线粒体能量运转机制;应有将大量胰岛素储存于特征性颗粒的超凡能力,对小鼠而言,还应同时含有胰岛素I和II;应有葡萄糖刺激胰岛素分泌的剂量-反应曲线,其 K_m 值大约为8 mmol/L;移植后可逆转糖尿病动物模型的高血糖,遗憾的是,目前在多数研究中仍难以出现该效应。

3 胰腺干细胞研究的展望

尽管胰腺干细胞研究近年来已经取得了一定的进展和

成果, 但应该看到这些成果仅仅是初步的, 距离最终用于治疗糖尿病患者仍有许多问题需要进一步探索. 未来需要着重解决的问题有: (1) 利用高通量的现代分子生物学技术如基因芯片、蛋白质组学方法等, 寻找胰腺干细胞特异性的标志物, 为其鉴定和纯化提供技术保障; (2) 探索干细胞向真正的胰岛细胞分化的最佳体外诱导条件; (3) 深入开展 ES 细胞定向分化为胰岛细胞和治疗性克隆的研究; (4) 评估干细胞来源的胰岛素分泌细胞移植到体内的长期安全性, 如肿瘤形成的可能性该加以排除. 总之, 随着干细胞研究的深入发展和技术的不断完善, 相信干细胞技术必将为糖尿病治疗学领域开辟一片崭新的天地.

4 参考文献

- Diabetes Control and Complication Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-986
- UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes(UKPD 33). *Lancet* 1998;352:837-853
- 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
- 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
- Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001;50:521-533
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147
- Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004;303:1669-1674
- Soria B, Skoudy A, Martin F. From stem cell to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44:407-415
- 洪天配. 干细胞在糖尿病治疗中的应用前景. 国外医学内分泌学分册 2004;24:278-279
- Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:3016-3020
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7999-8004
- Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 2004;429:41-46
- Choi Y, Ta M, Atouf F, Lumelsky N. Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny. *Stem Cells* 2004;22:1070-1084
- Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbitt G, van der Kooy D. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* 2004;22:1115-1124
- Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 2004;53:2143-2152
- Weir GC, Bonner-Weir S. β -cell precursors-a work in progress. *Nat Biotechnol* 2004;22:1095-1096
- 张玲, 洪天配, 胡江, 吴永华, 李凌松. 胎儿胰腺组织中巢蛋白阳性细胞的分离和体外增生以及诱导分化. 中国糖尿病杂志 2003;11:416-420
- 张玲, 洪天配, 胡江, 刘羿男, 吴永华, 李凌松. 从胎儿胰腺组织建立单克隆胰腺前体细胞的研究. 中华糖尿病杂志 2004;12:442-445
- Zhang L, Hong TP, Hu J, Liu YN, Wu YH, Li LS. Nestin-positive progenitor cells isolated from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol*(in press)
- Huang H, Tang X. Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. *Lab Invest* 2003;83:539-547
- Wu F, Jagir M, Powell JS. Long-term correction of hyperglycemia in diabetic mice after implantation of cultured human cells derived from fetal pancreas. *Pancreas* 2004;29:e23-e29
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60:585-595
- Hunziker E, Stein M. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:116-119
- 夏修金, 鲍卫汉, 陈东明, 洪天配, 张玲, 郑宗梅, 郭文媛. 巢蛋白在人胚胎胰腺中的表达. 中国糖尿病杂志 2003;11:204-207
- Treutelaar MK, Skidmore JM, Dias-Leme CL, Hara M, Zhang L, Simeone D, Martin DM, Burant CF. Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes* 2003;52:2503-2512
- Delacour A, Nepote V, Trumpp A, Herrera PL. Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages. *Mech Dev* 2004;121:3-14
- Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O, Otonkoski T. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* 2003;52:2007-2015
- Humphrey RK, Bucay N, Beattie GM, Lopez A, Messam CA, Cirulli V, Hayek A. Characterization and isolation of promoter-defined nestin-positive cells from the human fetal pancreas. *Diabetes* 2003;52:2519-2525
- Street CN, Lakey JR, Seeberger K, Helms L, Rajotte RV, Shapiro AM, Korbitt GS. Heterogenous expression of nestin in human pancreatic tissue precludes its use as an islet precursor marker. *J Endocrinol* 2004;180:213-225
- 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;292:1389-1394
- 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
- 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
- Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001;50:1691-1697