

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.09.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20230414.1756.005.html\(2023-04-17\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20230414.1756.005.html(2023-04-17))

PKC 通过调控 TRPC/Ca²⁺ 通道影响 iPS-mpMSC-fbs 分化为功能性胰岛 β 细胞的机制研究^{*}

郭 鹏¹, 谭 烨¹, 李文婧², 丁 钧^{1△}

(重庆医科大学附属第三医院:1. 肝胆胰外科;2. 消化内科, 重庆 401120)

[摘要] **目的** 探讨影响诱导性多能干细胞-间充质样-成纤维细胞(iPS-mpMSC-fbs)分化为功能性胰岛 β 细胞的分子机制。**方法** 从健康成年小鼠胰腺中分离纯化间充质样-成纤维细胞(mpMSC-fbs),通过慢病毒将 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 4 种转录因子转染至 mpMSC-fbs,诱导 mpMSC-fbs 转变为诱导性多能干细胞球体细胞(iPS-mpMSC-fbs),并通过免疫荧光染色实验和 Western blot 检测其是否表达瞬时受体离子电位通道蛋白(TRPCs);分别将蛋白激酶 C(PKC)激动剂佛波醇酯(PMA)和拮抗剂(Bis-1)与 iPS-mpMSC-fbs 共孵育,通过荧光影像系统测定细胞内游离钙离子(Ca²⁺)水平,观察 PKC 对 iPS-mpMSC-fbs TRPC/Ca²⁺通道的调节关系。**结果** 从成年小鼠胰腺中成功分离纯化 mpMSC-fbs,该细胞群与骨髓来源的间充质干细胞(MSCs)有相似表面标志物(CD90、CD105 和 CD146),并成功将 mpMSC-fbs 诱导为 iPS-mpMSC-fbs,且诱导后细胞表达 TRPCs (TRPC1、TRPC3 和 TRPC4)。iPS-mpMSC-fbs 与 PKC 激动剂 PMA 共孵育后,使用磷脂酶 C(PLC)/Diac 途径刺激可见细胞内 Ca²⁺未出现第 2 高峰;而与 PKC 抑制剂(Bis-1)共孵育后,使用 PLC/Diac 途径刺激细胞内 Ca²⁺出现第 2 高峰。**结论** PKC 可负性调控 TRPC/Ca²⁺通道,从而影响 iPS-mpMSC-fbs 分化为功能性胰岛 β 细胞。

[关键词] 1 型糖尿病;多能干细胞;转录因子;间充质干细胞;成纤维细胞;蛋白激酶;胰岛 β 细胞

[中图法分类号] R329.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)09-1298-05

Mechanism study of PKC effect on differentiation of iPS-mpMSC-fbs into functional islet β cells by regulating TRPC/Ca²⁺ channels^{*}

GUO Peng¹, TAN Ye¹, LI Wenjing², DING Jun^{1△}

(1. Department of Hepaticobiliary Pancreatic Surgery; 2. Department of Gastroenterology, The Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China)

[Abstract] **Objective** To explore the molecular mechanism affecting the differentiation of induced pluripotent stem cell-mesenchymal-fibroblasts (iPS-mpMSC-fbs) into functional islet β cells. **Methods** Mesenchymal-fibroblast (mpMSC-fbs) were isolated and purified from the pancreas of healthy adult mice. The four transcription factors Oct4, Sox2, c-Myc and Klf4 were transfected into mpMSC-fbs by lentivirus to induce the transformation of mpMSC-fbs into iPS-mpMSC-fbs. Immunofluorescence staining and Western blot were used to detect the expression of transient receptor potential channel proteins (TRPCs). The protein kinase C (PKC) agonist phorbol myristate acetate (PMA) and antagonist (Bis-1) were co-incubated with iPS-mpMSC-fbs, and the intracellular free Ca²⁺ concentration was measured by fluorescence imaging system to observe the relationship between PKC and iPS-mpMSC-fbs TRPC/Ca²⁺ channels. **Results** The mpMSC-fbs were successfully isolated and purified from pancreas of the adult mouse, which had similar surface markers (CD90, CD105 and CD146) to bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs). MpMSC-fbs were successfully induced into iPS-mpMSC-fbs, and the induced cells expressed TRPC proteins including TRPC 1, 3 and 4. After co-incubation of iPS-mpMSC-fbs with PKC agonist phorbol myristate acetate (PMA), intracellular Ca²⁺ did not show a second peak after stimulation with PLC/Diac pathway. After co-incubation with PKC inhibitor (Bis-1), the second peak of intracellular Ca²⁺ appeared after PLC/Diac pathway stimulation. **Conclusion** PKC can negatively regulate TRPC/Ca²⁺ channels, which affects the differentiation of iPS-mpMSC-fbs into functional islet β cells.

^{*} 基金项目:重庆市渝中区基础研究与前沿探索项目(20180113)。 作者简介:郭鹏(1979—),副主任医师,硕士,主要从事肝胆胰外科临床及基础研究。 △ 通信作者, E-mail: 2223047767@qq.com。

[Key words] diabetes mellitus type 1; pluripotent stem cell; transcriptional factor; mesenchymal stem cell; fibroblast; protein kinase; islet β cell

1 型糖尿病(T1DM)是一种自身免疫性疾病,主要由免疫介导胰腺 β 细胞的破坏导致,其特征为胰岛素绝对缺乏引起的高血糖。根据国际糖尿病联合会数据,2022 年约有 5.37 亿成年人罹患糖尿病,其中近 2% 为 T1DM^[1]。目前,T1DM 主要治疗方法是注射胰岛素,该方法虽然能取得良好的效果,但胰岛素用量较难控制,伴随许多严重并发症,如酮症酸中毒、低血糖症等^[2];胰腺移植、胰岛移植等治疗方案也可获得较好的疗效,但供体组织短缺使这些治疗方式应用严重受限,而且还需要对免疫抑制剂的副作用进行严格控制^[3-4]。随着干细胞技术飞速发展,再生医学已成为损伤修复的研究热点。TAKAHASHI 等^[5]率先报道了有关诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)的研究。随后大量研究报道 iPSCs 可以定向分化为胰腺系细胞,用于 T1DM 的再生治疗^[6-13],干细胞疗法有望成为糖尿病治疗的有效治疗新方法。但 iPSCs 定向分化为胰腺系细胞的分子机制尚不完全清楚。

钙离子(Ca^{2+})是重要的第二信使信号分子,在细胞分化过程中起着非常重要的作用。瞬时受体离子电位通道蛋白(transient receptor potential channel proteins, TRPCs)是位于细胞膜和内质网重要的非选择性阳离子超家族通道蛋白,与 Ca^{2+} 水平密切相关。有研究报道,调节细胞内 Ca^{2+} 水平可诱导 iPSCs 分化为功能性细胞^[14-16]。HARADA 等^[17]发现,通过 TRPC 调节细胞内 Ca^{2+} 水平可诱导胚胎干细胞(ES 细胞)向神经细胞分化。而 ES 细胞向神经干细胞的分化作用可被蛋白激酶 C(PKC)抑制剂或激活剂调节^[18]。但关于 PKC 在 iPSCs 诱导分化为 β 样细胞过程中是否发挥相同作用未有相关报道。本研究将成年小鼠胰腺分离纯化的间充质样-成纤维细胞(mouse pancreas-derived mesenchymal like fibrotic cells, mpMSC-fbs)通过基因转染技术诱导生成诱导性多能干细胞-mpMSC-fbs(iPS-mpMSC-fbs),并通过抑制或激活 PKC 检测细胞内 Ca^{2+} 水平,从而探究 PKC 在 iPSCs 分化为 β 样细胞过程中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选择遗传背景为 C57/Bl6 的野生型成年小鼠(60 d 龄)20 只,均饲养于无特殊病原体(SPF)级动物室,所有实验操作遵守重庆医科大学伦理委员会规定,动物实验伦理批准号:2019 年伦审第(2)号。

1.1.2 仪器与试剂

胰蛋白酶(批号:T1426)、明胶(批号:G7041)、聚凝胺(批号:107689)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司,

小鼠细胞分层液(批号:17-0891-09)、DMEM 培养基(批号:SH30022.01B)均购自美国 HyClone 公司,胎牛血清(FBS,批号:10270106)购自美国 GIBCO 公司,蛋白裂解液(批号:89900)购自美国 ThermoFisher 公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0012)购自上海碧云天生物技术有限公司,病毒质粒包裹转染系统(批号:A35684)购自美国 Gibco 公司,Hank's 平衡盐溶液[HBSS,含 140 mmol/L NaCl、4.8 mmol/L KCl、1.25 mmol/L CaCl_2 、2 mmol/L MgCl_2 、5 mmol/L 葡萄糖、12.5 mmol/L N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES),pH 7.4]。Milli-Q® IQ 7000 纯水仪(美国 Millipore 公司)、Quantum CX5 蛋白凝胶成像系统(法国 Vilber 公司)、微量移液枪(德国 Eppendorf 公司)、Ti2-U 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司)、HERAcell 240i 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司)及 LSM800 激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)。

1.2 方法

1.2.1 mpMSC-fbs 的分离与纯化

取成年小鼠胰腺,体积比胰酶:乙二胺四乙酸(EDTA)=1:1 消化小块胰腺组织,30 min 后用小鼠细胞分层液(Percoll 连续密度梯度离心法)离心分层。用 15 mL 离心管先后缓慢注入 Percoll 工作原液(Percoll 与 85 g/L NaCl 体积比 9:1 混合)、600 g/L Percoll 工作液(因胰腺间充质干细胞的悬浮密度为 $1.072/\text{cm}^2$,可悬浮在 600 g/L Percoll 工作液层中)和 500 g/L Percoll 工作液各 3 mL,然后缓慢注入制备好的胰腺单细胞悬液 3 mL(比例为 3:7),平稳放入水平离心机后,2 000 r/min 离心 20 min,吸去表层培养液,抽取所需层面细胞进行原代培养,并接种于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中,转入孵箱,37 °C、5% CO_2 饱和湿度下培养。48 h 后全量换液,之后每 3 天换液,去除非贴壁细胞,约 45 d 后即可传代,两次传代后获得实验所需 mpMSC-fbs。

1.2.2 对 mpMSC-fbs 进行 iPS 诱导实验

将 6×10^5 个分离纯化的 mpMSC-fbs 置于 35 mm 明胶覆盖处理,在含 10% FBS 的 DMEM 中培养,第 2 天加入聚凝胺,终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。采用包含 4 种干性转录因子(Oct4、Sox2、Klf4 及 c-Myc)的单病毒质粒包裹转染系统[最佳感染复数(MOI)范围 0.1~1.0]对 mpMSC-fbs 进行转染,转染时间约 16 h。转染 24 h 后,用未加聚凝胺的成纤维细胞培养基换液。48 h 后,用无血清 iPS 细胞培养基换液。

1.2.3 mpMSC-fbs 和 iPS-mpMSC-fbs 生物学特性鉴定

使用免疫荧光染色和 Western blot 检测 mpMSC-fbs 是否表达 CD49D90、CD105 和 CD146,检测

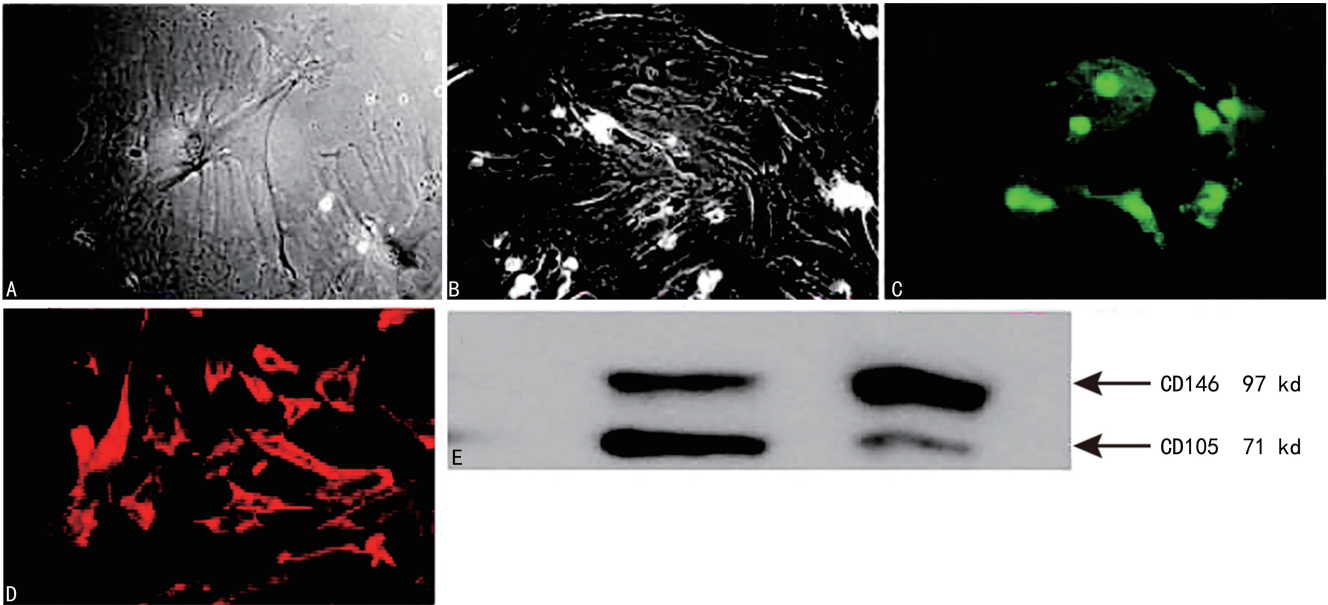
iPS-mpMSC-fbs 中是否表达 TRPCs。

1.2.4 细胞内 Ca²⁺ 水平测定

细胞生长于明胶处理载玻片上,37℃、5 μmol/L 钙离子荧光探针 Fura-2AM 孵育 30~60 min,室温等渗 HBSS 缓冲液清洗。载玻片放入温控小室循环系统(美国 Warner 公司)并连接至倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。HBSS 缓冲液 2 mL/min 流速持续灌注细胞表面。PKC 激动剂佛波醇酯(PMA)和拮抗剂(Bis-1)缓冲液与细胞作用 15 min 后转换正常 HBSS 缓冲液。应用 EasyRatioPro 超快离子荧光影像系统(美国 PTI 公司)测定细胞内游离 Ca²⁺ 水平,影像和光学刺激信号交替于波长 340~380 nm(20 Hz),监测 510 nm 处的发射波长,计算机软件自动测量校正和记录所得结果。

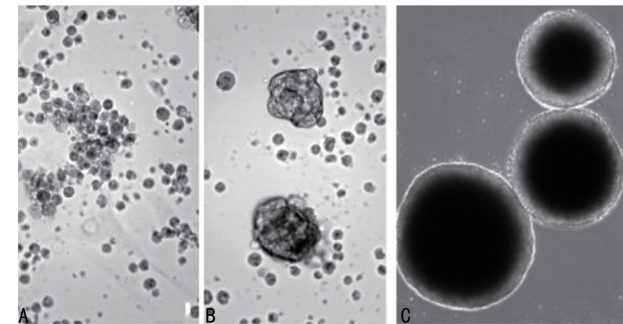
2 结 果

2.1 分离纯化的 mpMSC-fbs 与骨髓来源的 MSC 具有相似的表面标志物



A:第 24 天原代培养中的 mpMSC-fbs(20×);B:传代后稳定生长的 mpMSC-fbs(20×);C:mpMSC-fbs 表达 CD90(免疫荧光染色,20×);D:骨髓来源的 MSC 表达 CD90(免疫荧光染色,20×);E:Western blot 检测 mpMSC-fbs 中 CD105 和 CD146 表达。

图 1 成年小鼠胰腺分离纯化的 mpMSC-fbs 表达 CD90、CD105 和 CD146



A:7 d 培养后的 iPS-mpMSC-fbs(10×);B:10 d 培养后的 iPS-mpMSC-fbs(20×);C:稳定后自我更新的 iPS-mpMSC-fbs(40×)。

图 2 iPS-mpMSC-fbs 的诱导形成

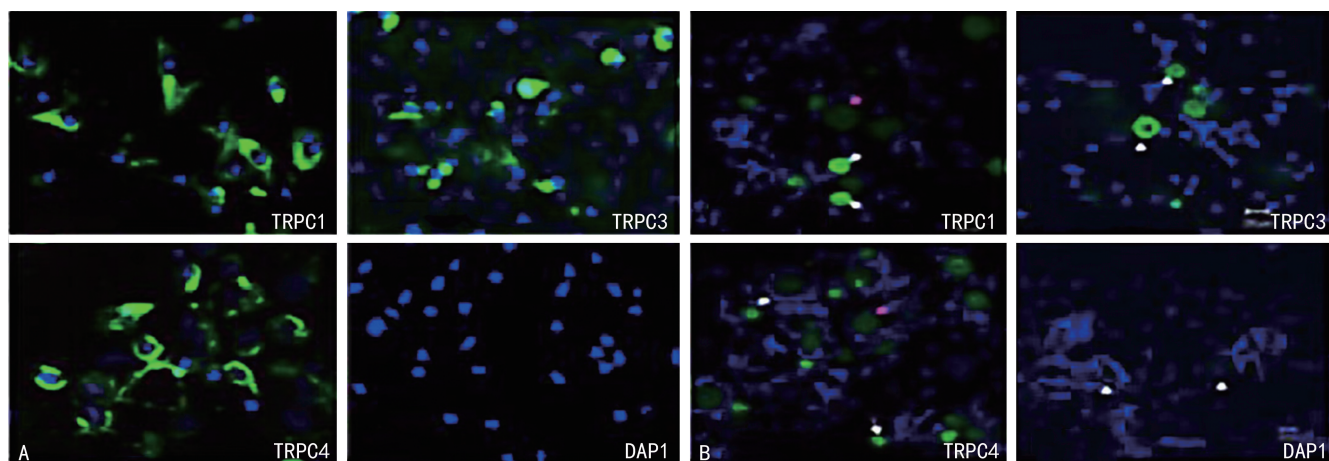
首先从成年健康小鼠胰腺中成功分离纯化 mpMSC-fbs,并进行细胞培养,原代培养时细胞生长缓慢,传代后增殖保持稳定生长(图 1A、B)。为确定前期分离纯化的 mpMSC-fbs 与骨髓来源的间充质干细胞(MSCs)形态和表面标志物是否相似,采用免疫荧光染色实验检测发现,mpMSC-fbs 与 MSCs 均表达 CD90(图 1C、D);采用 Western blot 检测发现,mpMSC-fbs 也表达 MSC 标志物 CD105 和 间周细胞标记物 CD146(图 1E),表明分离纯化的 mpMSC-fbs 具有与骨髓来源的 MSCs 相似的形态和表面标志物。

2.2 iPS-mpMSC-fbs 的诱导形成

为了获得具有干性功能的 mpMSC-fbs,将 4 种关键性的 ES 细胞干性转录因子(Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4)转染到 mpMSC-fbs,使 mpMSC-fbs 转变为球体细胞 iPS-mpMSC-fbs。转染后的球体细胞 iPS-mpMSC-fbs 生长稳定,而且再生能力强(图 2),表明成功诱导出了 iPS-mpMSC-fbs。

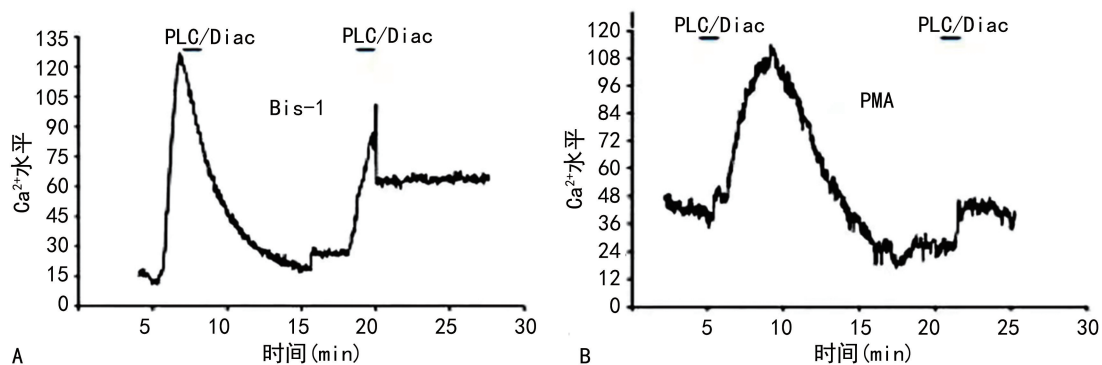
2.3 PKC 对 TRPC/Ca²⁺ 通道的影响

为探究 PKC 对 TRPC/Ca²⁺ 的影响,首先通过免疫荧光染色实验证实 iPS-mpMSC-fbs 表达 TRPC1、TRPC3 和 TRPC4(图 3A、B)。然后分别将 PKC 激动剂(PMA)和拮抗剂(Bis-1)与 iPS-mpMSC-fbs 共同孵育,通过荧光影像系统测定细胞内游离 Ca²⁺ 水平,观察 PKC 对 iPS-mpMSC-fbs TRPC/Ca²⁺ 通道的相互调节关系,结果显示:iPS-mpMSC-fbs 与 PKC 抑制剂(Bis-1)共孵育后,经磷脂酶 C(PLC)/Diac 途径刺激后细胞内 Ca²⁺ 出现第 2 个高峰(图 4A);而与 PKC 激动剂(PMA)共孵育后,使用 PLC/Diac 途径刺激未见细胞内 Ca²⁺ 出现第 2 个高峰(图 4B)。



A:mpMSC-fbs 表达 TRPCs(TRPC1、TRPC3 和 TRPC4);B:iPS-mpMSC-fbs 表达 TRPCs(TRPC1、TRPC3 和 TRPC4)。

图 3 免疫荧光染色实验检测 mpMSC-fbs 和 iPS-mpMSC-fbs 表达 TRPCs(10×)



A:iPS-mpMSC-fbs 与 Bis-1 共孵育;B:iPS-mpMSC-fbs 与 PMA 共孵育。

图 4 PKC 反馈性调节 iPS-mpMSC-fbs 的 TRPC/Ca²⁺ 通道

3 讨 论

iPSCs 分化为胰腺 β 细胞技术有望治愈 T1DM^[19]。目前关于使用 iPS 疗法治疗 T1DM 的研究还处于实验室研究阶段,大多方法是首先通过 4 种转录因子(Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc)将体细胞转化为具有多种分化能力的多能细胞^[5,20],然后通过调节各种多能干细胞的生存通路和分化通路,将这些多能细胞从原始状态逐步分化成为内胚层细胞、原始肠管细胞、后前肠细胞、胰腺内胚层细胞、内分泌前体细胞,最后分化成为胰岛 β 细胞^[21]。但 iPS 诱导产生胰岛 β 细胞的效率很低,这一缺点限制了通过 iPS 诱导产生胰岛 β 细胞的应用。

为了提高 iPS 向胰岛 β 细胞转化的效率,最近 HOGREBE 等^[22]报道了一种新方法,该研究建立了肌动蛋白细胞骨架的状态与驱动胰腺谱系的胰腺转录因子表达之间的联系,通过靶向细胞骨架促进 iPSs 向胰岛 β 细胞分化。研究人员将分化出的细胞移植到 T1DM 小鼠体内,发现 T1DM 小鼠可以维持正常血糖至少 9 个月^[22],但该方法的有效性必须在体型更大的动物实验中进行验证,同时需要找到一种新的自动化方法,产生更多的细胞。因此,探索提高 iPS 向胰岛 β 细胞转化效率的新方法是实现其应用的必要

前提。

TRPC 是位于细胞膜和内质网的重要非选择性阳离子超家族通道蛋白,其开放状态与细胞内 Ca^{2+} 水平密切相关,而作为第二信使信号的 Ca^{2+} 在细胞分化中具有非常重要的作用。有研究发现,可以通过调控 Ca^{2+} 水平诱导 iPSCs 分化为功能性细胞,如分化为神经细胞、心肌细胞和骨细胞等^[14-16]。HARADA 等^[17]发现,诱导 ES 细胞向神经细胞分化可以通过 TRPC 调节细胞内 Ca^{2+} 水平实现。而这种分化作用既可被 PKC 抑制剂(Bis-1)激活,又可被 PKC 激活剂(PMA)抑制^[18]。据此,可以假设将成年小鼠胰腺本身分离纯化的 mpMSC-fbs 通过 iPS 基因转染技术诱导为多能干细胞(iPS-mpMSC-fbs),继而借助 TRPC 调控 iPS-mpMSC-fbs 细胞内 Ca^{2+} 水平,抑制 PKC 信号传导通路,促使 iPS-mpMSC-fbs 向胰岛 β 细胞分化,这可能是提高 iPS 向胰岛 β 细胞转化效率的新方法。

为了验证上述假设,本研究首先从小鼠胰腺中分离纯化 mpMSC-fbs,然后采用慢病毒将 Oct-4、c-Myc、Sox-2 和 Klf-4 基因转染到 mpMSC-fbs,完成基因再编码过程,得到 iPS-mpMSC-fbs。通过采用 PKC 激活剂(PMA)与 iPS-mpMSC-fbs 共孵育后,检测到细胞内 Ca^{2+} 水平未出现第 2 个峰,表明 PKC 的激活

抑制了 TRPC/ Ca²⁺ 通道;而采用 PKC 抑制剂 (Bis-1) 与 iPS-mpMSC-fbs 共孵育后,检测到细胞内 Ca²⁺ 水平出现第 2 个峰,表明 PKC 的抑制激活了 TRPC/Ca²⁺ 通道。基于此,可以得出结论,PKC 通过负性调控 TRPC/Ca²⁺ 通道调节 iPS-mpMSC-fbs 分化为功能性胰岛 β 细胞的能力。

综上所述,本研究的发现为提高 iPSCs 向胰岛 β 细胞转化的效率提供了新思路和新方向。不过后续研究还需要比较加 PKC 抑制剂和加 PKC 激活剂的 iPS-mpMSC-fbs 的分化状态,进一步确证 PKC 在 iPSCs 分化为功能性胰岛 β 细胞中的具体作用。

参考文献

[1] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas 2021[R/OL]. 10th ed. Brussels,Belgium: International Diabetes Federation, 2021 [2022-05-21]. <https://www.diabetesatlas.org>.

[2] XING L L,KHEE Y P,YING T Y,et al. Current status on immunological therapies for type 1 diabetes mellitus[J]. Curr Diab Rep,2019,19 (5):22.

[3] BLUESTONE J A,TANG Q. Treg cells-the next frontier of cell therapy[J]. Science,2018,362 (6411):154-155.

[4] VANTYGHM M C,DE KONING E J P,PA TTOU F,et al. Advances in β-cell replacement therapy for the treatment of type 1 diabetes [J]. Lancet,2019,394(10205):1274-1285.

[5] TAKAHASHI K,YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell,2006,126(4):663-676.

[6] DONADEL G,PASTORE D,DELLA-MORTE D,et al. FGF-2b and h-PL transform duct and non-endocrine human pancreatic cells into endocrine insulin secreting cells by modulating differentiating genes[J]. Int J Mol Sci,2017,18 (11):2234.

[7] RAMZY A,THOMPSON D M,WARD-HARTSTONGE K, et al. Implanted pluripotent stem-cell-derived pancreatic endoderm cells secrete glucose-responsive C-peptide in patients with type 1 diabetes[J]. Cell stem cell,2021,28 (12):2047-2061.

[8] THATAVA T,NELSON T J,EDUKULLA R, et al. Indolactam V/GLP-1 mediated differenti-

ation of human iPS cells into glucose responsive insulin-secreting progeny[J]. Gene Ther,2011, 18(3):283-229.

[9] SCHULZ T C,YOUNG H Y,AGULNICK A D, et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells [J/OL]. PLoS One, 2012, 7 (5): e37004[2022-05-21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037004>.

[10] REZANIA A,BRUIN J E,ARORA P,et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells [J]. Nat Biotechnol,2014,32(11):1121-1133.

[11] PELLEGRINI S,UNGARO F,MERCALLI A, et al. Human induced pluripotent stem cells differentiate into insulin-producing cells able to engraft in vivo[J]. Acta Diabetol,2015,52(6): 1025-1035.

[12] KONDO Y,TOYODA T,INAGAKI N,et al. iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes[J]. J Diabetes Investig, 2018, 9 (2): 234-243.

[13] MO Y,WANG Z,GAO J,et al. Comparative study of three types of mesenchymal stem cell to differentiate into pancreatic β-like cells in vitro [J]. Exp Ther Med,2021,22(3):936.

[14] ZANOU N,SCHAKMAN O,LOUIS P,et al. Trpc1 ion channel modulates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway during myoblast differentiation and muscle regeneration [J]. J Biol Chem,2012,287(18):14524-14534.

[15] COMBS C E,FULLER K,KUMAR H,et al. Urocortin is a novel regulator of osteoclast differentiation and function through inhibition of a canonical transient receptor potential 1-like cation channel[J]. J Endocrinol, 2012, 212 (2): 187-197.

[16] SANTOS T G,BERALDO F H,HAJJ G N,et al. Laminin-γ1 chain and stress inducible protein 1 synergistically mediate PrPC-dependent axonal growth via Ca²⁺ mobilization in dorsal root ganglia neurons [J]. J Neurochem, 2013, 124 (2):210-223.

[17] HARADA M,LUO X,QI X Y,et al. Transient receptor potential canonical-3 channel-dependent fibroblast regulation in atrial fibrillation[J]. Circulation,2012,126(17):2051-2064. (下转第 1308 页)

[6] MARIATH L M, SANTIN J T, SCHULER-F ACCINI L, et al. Inherited epidermolysis bullosa: update on the clinical and genetic aspects [J]. *An Bras Dermatol*, 2020, 95(5): 551-569.

[7] 陆效笑, 陆春梅, 王来栓, 等. COL7A1 基因致病变异所致新生儿期大疱表皮松解症 28 例病例系列报告 [J]. *中国循证儿科杂志*, 2020, 15(3): 210-214.

[8] BARDHAN A, BRUCKNER-TUDERMAN L, CHAPPLE I L C, et al. Epidermolysis bullosa [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6(1): 78.

[9] HAM K A, AUNG-HTUT M T, FLETCHER S, et al. Nonsequential splicing events alter antisense-mediated exon skipping outcome in COL7A1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7705.

[10] DANG N, MURRELL D F. Mutation analysis and characterization of COL7A1 mutations in dystrophic epidermolysis bullosa [J]. *Exp Dermatol*, 2008, 17(7): 553-568.

[11] EICHSTADT S, TANG J Y, SOLIS D C, et al. From clinical phenotype to genotypic modeling: incidence and prevalence of recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) [J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2019, 12: 933-942.

[12] 吕雪, 李昊, 刘红彦, 等. COL7A1 基因复合杂合变异所致的隐性营养不良型大疱性表皮松解症家系的遗传学分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2020, 37(4): 445-448.

[13] UITTO J, BRUCKNER-TUDERMAN L, MCGRA TH J A, et al. EB2017-progress in epidermolysis bullosa research towards treatment and cure [J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(5): 1010-1016.

[14] CHEN F, HUANG L, LI C, et al. Next-genera-

tion sequencing through multigene panel testing for the diagnosis of hereditary epidermolysis bullosa in Chinese population [J]. *Clin Genet*, 2020, 98(2): 179-184.

[15] 刘宁, 郭宏湘, 孔祥东, 等. 营养不良性大疱性表皮松解症 COL7A1 基因诊断及产前诊断 [J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(4): 277-282.

[16] YONEI N, OHTANI T, FURUKAWA F. Recessive dystrophic epidermolysis bullosa: Case of non-Hallopeau-Siemens variant with premature termination codons in both alleles [J]. *J Dermatol*, 2006, 33(11): 802-805.

[17] CHO J W, NAKANO H, LEE K S. Type VII collagen gene mutations (c. 8569G>T and c. 4879G>A) result in the moderately severe phenotype of recessive dystrophic epidermolysis bullosa in a Korean patient [J]. *J Korean Med Sci*, 2009, 24(2): 256-261.

[18] HAS C, LIU L, BOLLING M C, et al. Clinical practice guidelines for epidermolysis bullosa laboratory diagnosis [J]. *Br J Dermatol*, 2020, 182(3): 574-592.

[19] HAS C, J KÜSEL, REIMER A, et al. The position of targeted next-generation sequencing in epidermolysis bullosa diagnosis [J]. *Acta Derm Venereol*, 2018, 98(4): 437-440.

[20] HOU P C, WANG H T, ABHEE S, et al. Investigational treatments for epidermolysis bullosa [J]. *Am J Clin Dermatol*, 2021, 22(6): 801-817.

(收稿日期: 2022-08-18 修回日期: 2022-12-08)

(上接第 1302 页)

[18] WANG J, GALLAGHER D, DEVITO L M, et al. Metformin activates an atypical PKC-CBP pathway to promote neurogenesis and enhance spatial memory formation [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(1): 23-35.

[19] TOMEI A A, VILLA C, RICORDI C. Development of an encapsulated stem cell-based therapy for diabetes [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(9): 1321-1336.

[20] LIU B, CHEN S, XU Y, et al. Chemically defined and xeno-free culture condition for human extended pluripotent stem cells [J]. *Nat Com-*

mun, 2021, 12(1): 3017.

[21] KONDO Y, TOYODA T, INAGAKI N, et al. iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes [J]. *J Diabetes Investig*, 2018, 9(2): 234-243.

[22] HOGREBE N J, AUGSORNWORAWAT P, MA XWELL K G, et al. Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(4): 460-470.

(收稿日期: 2022-06-10 修回日期: 2023-02-05)