基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001025

TERT和 p-Akt 对胰岛 β 细胞凋亡的影响

杜小宇[1],甘霞光[2],雷小添[2],陈　刘[2],周丽娜[2],陈　兵[2],吴绮楠[2]
(1. 重庆市涪陵中心医院体检部,重庆　400800;2. 第三军医大学第一附属医院内分泌科,重庆　400038)

【摘　要】**目的**:通过抑制磷酸化丝/苏氨酸激酶(phosphorylation serine/threonine kinase,p-Akt)的表达,观察并探讨 p-Akt 和端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase,TERT)对高糖高脂干预的胰岛 β 细胞凋亡的影响。**方法**:将 NIT-1 细胞随机分成对照组(正常培养)、Akt 抑制组(正常培养+Akt 抑制剂 SH5)、高糖高脂干预组(高糖高脂培养)、高糖高脂+Akt 抑制组(高糖高脂培养+Akt 抑制剂 SH5),TUNEL 法和流式细胞术检测各组细胞凋亡,Western blot 检测各组细胞 TERT、Akt 和 p-Akt 蛋白表达水平,ELISA 检测各组细胞胰岛素分泌。**结果**:与正常对照组比较[凋亡率:(2.88 ± 1.25)%;胰岛素分泌:(0.65 ± 0.10);p-Akt:(0.80 ± 0.07);TERT:(1.63 ± 0.12)];高糖高脂干预组胰岛 β 细胞凋亡率(38.25 ± 8.63) %明显增加,胰岛素分泌(0.40 ± 0.09)下降,p-Akt(0.55 ± 0.05)和 TERT(1.03 ± 0.05)表达明显下降,差异均有统计学意义(P<0.05);与高糖高脂干预组[凋亡率:(38.25± 8.63)%;胰岛素分泌:(0.40 ± 0.09);p-Akt:(0.55 ± 0.05);TERT:(1.03 ± 0.05)]比较,高糖高脂+Akt 抑制组细胞凋亡率(62.00 ± 7.13)%明显增高,胰岛素分泌(0.23 ± 0.10)下降,p-Akt(0.28 ± 0.07)和 TERT(0.61 ± 0.07)表达明显下降,差异均有统计学意义(P<0.05)。**结论**:抑制 p-Akt 表达可增加高糖高脂诱导的胰岛 β 细胞凋亡,其机制可能与降低了 TERT 表达水平有关。

【关键词】胰岛 β 细胞;凋亡;糖尿病;p-Akt;端粒酶逆转录酶
【中图分类号】R587.1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-04-11

Effect of TERT and p-Akt on the apoptosis of islet β cell

Du Xiaoyu[1], *Gan Xiaguang*[2], *Lei Xiaotian*[2], *Chen Liu*[2], *Zhou Lina*[2], *Chen Bing*[2], *Wu Qinan*[2]
(*1. Department of Physical Examination, the Central Hospital of Fuling; 2. Department of Endocrine, the First Affiliated Hospital of the Third Military Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To observe the inhibition of phosphorylation serine/threonine kinase (p-Akt) on expression of TERT and to explore the effect and mechanism of apoptosis on islet β cells in high glucose and lipid intervention. ***Methods***: Islet β cells were randomly divided into normal control group, Akt inhibit group, glucose and fatty acid intervention group, glucose and fatty acid intervention +Akt inhibit group. Cell apoptosis was detected by TUNEL and flow cytometry; the protein expressions of p-Akt and TERT were detected by Western blot; insulin secretion was detected by ELISA. ***Results***: Compared with those of control group (apoptosis rate: (2.88 ± 1.25)%; insulin secretion: (0.65 ± 0.10); p-Akt: (0.80 ± 0.07); TERT: (1.63 ± 0.12), islet β cell apoptosis rate (38.25 ± 8.63)% was significantly increased and insulin secretion (0.40 ± 0.09) was decreased significantly, expression of p-Akt (0.55 ± 0.05) and TERT (1.03 ± 0.05) decreased significantly in glucose and fatty acid intervention group, with statistically significant differences (P<0.05). Compared with those of glucose and fatty acid intervention group (apoptosis rate: (38.25 ± 8.63)%; insulin secretion: (0.40 ± 0.09); p-Akt: (0.55 ± 0.05); TERT: (1.03 ± 0.05), the apoptosis rate (62.00 ± 7.13)% was significantly increased and insulin secretion (0.23 ± 0.10) was decreased significantly, expression of p-Akt (0.28 ± 0.07) and TERT (0.61 ± 0.07) was decreased significantly in glucose and fatty acid intervention+Akt inhibit group, with statistically significant differences (P<0.05). ***Conclusion***: Inhibition of p-Akt expression may increase the apoptosis of islet β cells induced by the glucose and fatty acid intervention, and its mechanism may be reduced expression level of TERT.

【Key words】islet β cell; apoptosis; diabetes; p-Akt; telomerase reverse transcriptase

作者介绍:杜小宇,Email:zhaoyhxnyy@126.com,
研究方向:糖尿病及其并发症。
通信作者:吴绮楠,Email:wqn11@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81370885);重庆市教委研究生科研创新资助项目(编号:CYB14097);第三军医大学青年人才基金资助项目(编号:SWH2013QN02)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20161021.0932.002.html (2016-10-21)

中国拥有目前全世界最大的 2 型糖尿病患者群体，胰岛 β 细胞功能障碍是目前中国 2 型糖尿病最主要的病理生理过程，长期的糖脂代谢紊乱，通过氧化应激诱导胰岛 β 细胞凋亡，导致胰岛 β 细胞功能障碍[1]，但对于其具体的过程尚不清楚。

丝/苏氨酸激酶（serine/threonine kinase，Akt）途径广泛参与多种细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种功能的调节，Akt 可在磷脂酰肌醇 3-激酶激活的情况下被磷酸化为磷酸化丝/苏氨酸激酶（phosphorylation serine/threonine kinase，p-Akt），p-Akt 可进一步通过激活多种激酶和转录因子等，调节细胞的增殖分化凋亡。研究表明，p-Akt 的激活可降低糖尿病所致的胰岛 β 细胞凋亡和维持胰岛 β 细胞功能[2-4]，但其具体的机制并不清楚。有研究显示，p-Akt 的活性调节与端粒酶逆转录酶（telomerase reverse transcriptase，TERT）的活性密切相关，阻断 TERT 的表达可同时带来 p-Akt 通路的抑制效应，参与细胞凋亡的调控[5]，降糖药吡格列酮可通过激活p-Akt 途径提高 TERT 表达活性，抑制内皮细胞凋亡，该效果也可被 p-Akt 抑制剂所抑制[6]，但在糖尿病胰岛 β 细胞凋亡中尚无相关研究。

据此，本研究采用高糖高脂干预的方式模拟诱导糖尿病体外环境，并通过 p-Akt 特异性抑制剂 SH5 抑制 p-Akt 的表达，一方面检测糖尿病环境中细胞凋亡和胰岛素分泌功能的变化情况，另一方面检测 TERT 在各组胰岛 β 细胞中的表达变化，希望能发现 TERT 和 Akt 途径参与 2 型糖尿病胰岛 β 细胞凋亡的证据，为糖尿病的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验细胞、试剂、仪器

材料：NIT-1 细胞，由第三军医大学实验中心提供；DMEM 培养基（Hy-clone 公司）；胎牛血清（Hy-clone 公司）；胰酶（Sangon 公司）；5%脱脂奶粉（SIGMA 公司）；TERT、Akt 和 p-Akt 兔抗鼠抗体（SANTACRUZE 公司）；兔抗鼠 GADPH 抗体（SANTA-CRUZE 公司）；羊抗兔 IgG 抗体（北京中山生物技术有限公司）；倒置显微镜（OLYMPUS 公司）；二氧化碳培养箱（美国 Thermo 公司）；SH5[圣克鲁斯生物技术（上海）有限公司]；Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒（江苏凯基生物技术股份有限公司）。

1.2 细胞培养及分组

将细胞在 37 ℃、5%CO_2 细胞培养箱内培养，48 h 后换液。分组：①对照组（C 组）：15%胎牛血清的低糖 DMEM 培养基培养 2 d 后，无血清培养基同步化 24 h，换含无血清的低糖 DMEM 培养基，并在其中加入二甲亚砜，共培养 12 h 后换无血清的低糖 DMEM 培养基继续培养 36 h；②Akt 抑制组（CS 组）：15%胎牛血清的低糖 DMEM 培养基培养 2 d 后，无血清培养基同步化 24 h，换含无血清的低糖 DMEM 培养基，并在其中加入 SH5（经二甲亚砜溶解并经 PBS 稀释）20 μmol/L，共培养 12 h 后换无血清的低糖 DMEM 培养基继续培养 36 h；③高糖高脂干预组（H 组）：含 15%胎牛血清的低糖 DMEM培养基培养 2 d 后，无血清培养基同步化 24 h，换无血清的高糖（葡萄糖浓度为 25.5 mmol/L）DMEM 并加入脂肪酸（软脂酸终浓度为 0.25 mmol/L），并在其中加入二甲亚砜，共培养 12 h 后换无血清的低糖 DMEM 培养基继续培养 36 h；④高糖高脂+ Akt 抑制组（HS 组）：15%胎牛血清的低糖 DMEM 培养基培养 2 d 后，无血清培养基同步化 24 h，换含无血清的高糖（葡萄糖浓度为 25.5 mmol/L）DMEM 并加入脂肪酸（软脂酸终浓度为 0.25 mmol/L），并在其中加入 SH5（经二甲亚砜溶解并经 PBS 稀释）20 μmol/L，共培养 12 h 后换无血清的高糖（葡萄糖浓度为 25.5 nmol/L）DMEM 并加入脂肪酸（软脂酸终浓度为 0.25 mmol/L）继续培养 36 h。

1.3 检测指标

1.3.1 细胞 TUNEL 凋亡检测 将细胞片用 PBS 洗涤后经 4%多聚甲醛固定 30 min，采用 TUNEL 法（德国罗氏公司）检测细胞凋亡情况。按说明书操作：将用蛋白酶 K 消化后的细胞片用 TUNEL 液覆盖，37 ℃孵育 90 min；生理盐水柠檬酸钠终止反应，抗 HRP 抗体常温孵育 15 min，PBS 洗净，DAB 显色。光镜下凋亡染色阳性的细胞核呈棕黄色。凋亡率计算：在 400 倍光镜下随机选择 8 个视野，每个视野随机计数 100 个细胞，按公式：凋亡率=染色阳性细胞数/100×100%。

1.3.2 流式细胞术凋亡检测 将胰酶消化后的各组细胞密度调整至 1×10^6 个/mL，1 000 g 离心 5 min，弃上清后加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液重悬细胞，并加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀，加入 10 μL 碘化丙啶染色液混匀，室温避光反应 15 min，流式细胞仪检测，利用 Cellquest 软件获取和分析数据，通过计数凋亡区的细胞数，计算凋亡率。

1.3.3 Western blot 检测 TERT、Akt 和 p-Akt 表达 20 μL 上述各组细胞蛋白进行聚丙烯凝胶电泳，上样后以 80 V 电压电泳约 20 min，换 100 V 恒压电泳 2 h，半干电转法将分离胶上的蛋白转移到经甲醇处理的 PVDF 膜上（10 V，45 min）。膜用 5%脱脂奶粉（SIGMA 公司）封闭 12 h，再加入稀释的 TERT 兔抗鼠抗体（SANTACRUZE，1:600 稀释）、Akt 抗体（SANTA-CRUZE，1:500 稀释）、p-Akt 抗体（SANTACRUZE，1:500 稀释）以及以 1:400 稀释的兔抗鼠 GADPH 抗体（SANTACRUZE 公司）于 4 ℃孵育过夜，TBST 清洗，加入 1:800 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体（北京中山生物技术有限公司）37 ℃摇床上孵育 60 min，TBST 清洗。用化学发光试剂盒（北京中山生物技术有限公司）检测结合的辣根过氧化物酶标记的二抗，X 线片显影，Quality one 软件分析，以目的条带灰度/GADPH 灰度。每组检测 3 个样本，取平均值。

1.3.4　ELISA 检测各组细胞葡萄糖刺激后的胰岛素分泌　调整细胞密度至 1×10^7 个/mL，接种 24 孔板，每组设 6 个复孔。二氧化碳培养箱中 37 ℃以低糖 DMEM+15%胎牛血清培养 48 h，PBS 冲洗，然后加入 Krebs-Ringer 缓冲液（葡萄糖 3.3 mmol/L）同步化 2 h，以高糖 DMEM（葡萄糖浓度 25.5 mmol/L）刺激 60 min，使用 ELISA 试剂盒（上海乔羽生物科技有限公司）检测胰岛素浓度，按说明书进行，酶标仪检测 450 nm 处吸光度（absorbance，A）值，即 $A_{450\ nm}$ 值。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件，数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用单因素方差分析，多重比较检验采用 LSD-t 法进行统计分析，检验标准 α=0.05。

2　结　果

2.1　各组细胞 TERT、Akt 和 p-Akt 蛋白表达

C 组和 CS 组 TERT 蛋白有一定程度表达，2 组之间无统计学差异（P=0.959），H 组 TERT 蛋白表达较 C 组（P=0.000）和 CS 组（P=0.000）明显减少，HS 组 TERT 蛋白表达较 H 组有所减少（P=0.000）；C 组 Akt 蛋白表达与 CS 组无统计学差异（P=0.924），但明显高于 H 组（P=0.023）和 HS 组（P=0.019），H 组 Akt 蛋白表达无统计学差异（P=0.899），H 组 Akt 蛋白表达与 HS 组相比无统计学差异（P=0.899）；C 组 p-Akt 蛋白表达明显高于 CS 组（P=0.002）和 H 组（P=0.003），CS 组和 H 组相比无统计学差异（P=0.825），H 组 p-Akt 蛋白表达明显高于 HS 组（P=0.002），如图 1~4 及表 1 所示。

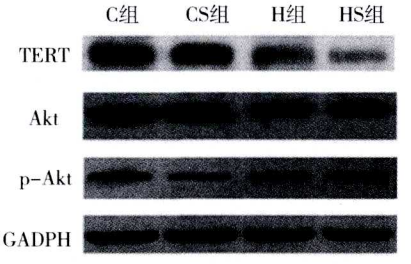


图 1　各组细胞 TERT、Akt 和 p-Akt 蛋白表达

Fig.1　Protein expression of TERT, Akt and p-Akt in each group

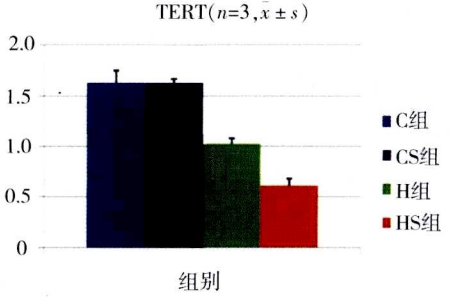


图 2　各组细胞 TERT 蛋白表达

Fig.2　Protein expression of TERT in each group

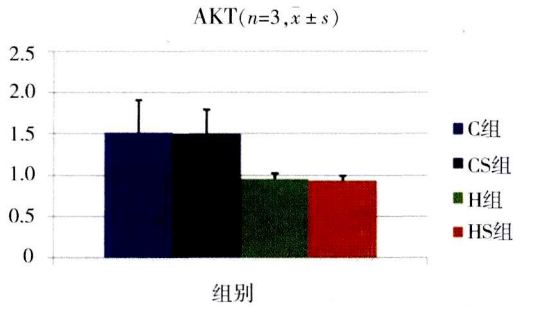


图 3　各组细胞 Akt 蛋白表达

Fig.3　Protein expression of Akt in each group

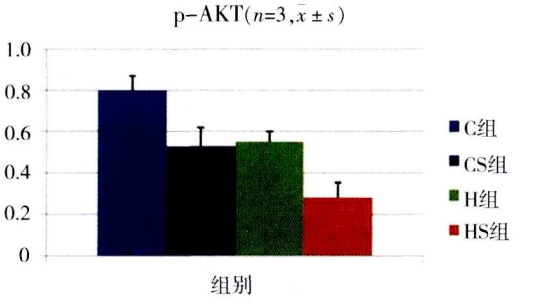


图 4　各组细胞 p-Akt 蛋白表达

Fig.4　Protein expression of p-Akt in each group

2.2　各组细胞 TUNEL 染色凋亡率

H 组凋亡率较 C 组（P=0.000）和 CS 组（P=0.000）增多；HS 组凋亡率较 H 组进一步增多（P=0.000），如图 5~9 及表 1 所示。

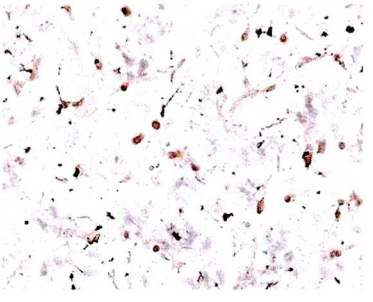


图 5　C 组 TUNEL 染色（200×）

Fig.5　TUNEL staining of C group（200×）

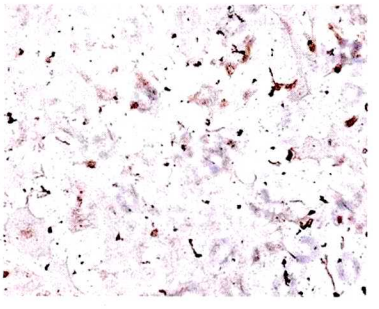


图 6　CS 组 TUNEL 染色（200×）

Fig.6　TUNEL staining of CS group（200×）

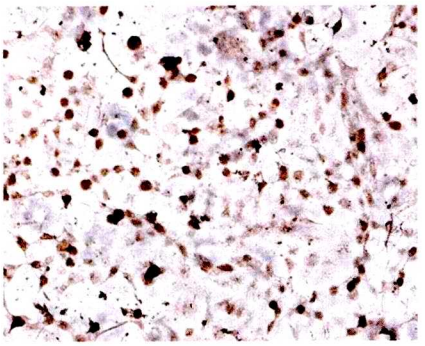


图 7 H 组 TUNEL 染色(200×)

Fig.7 TUENL staining of H group(200×)

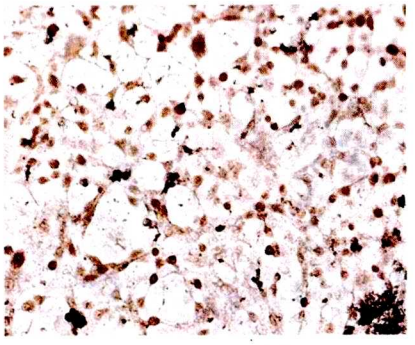


图 8 HS 组 TUNEL 染色(200×)

Fig.8 TUENL staining of HS group(200×)

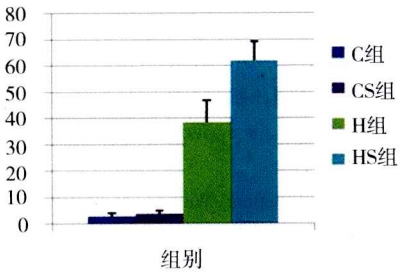


图 9 各组细胞 TUNEL 凋亡率

Fig.9 Apoptosis rate of each group

2.3 各组细胞流式细胞术检测凋亡率

H 组凋亡率较 C 组(P=0.007)和 CS 组(P=0.000)增多；HS 组凋亡率较 H 组进一步增多，P=0.000，见表 1。

2.4 各组细胞葡萄糖刺激后的胰岛素分泌

与 C 组相比，CS 组 $A_{450\ nm}$ 值无统计学差异(P=0.28)；与 C 组相比，H 组 $A_{450\ nm}$ 值明显下降(P=0.000)，与 H 组比较，CS 组 $A_{450\ nm}$ 值明显升高(P=0.006)，与 H 组比较，HS 组 $A_{450\ nm}$ 值明显下降(P=0.012)，如图 10 和表 1 所示。

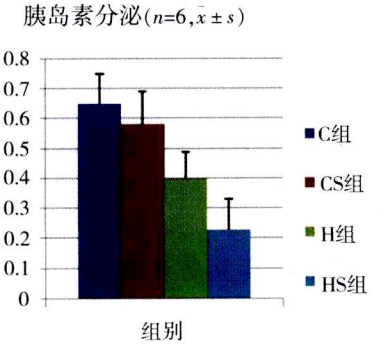


图 10 各组细胞胰岛素分泌

Fig.10 Insulin secretion of each group

3 讨 论

据报道，长期高血糖和高血脂形成的糖脂联合毒性可导致体内氧化应激水平增高，启动胰岛 β 细胞凋亡，这是糖尿病代谢紊乱引起 β 细胞功能障碍乏的主要机制[7-10]。但其中具体的过程尚不清楚。

Akt 信号途径是调控细胞凋亡的一条重要途径，p-Akt 为其活性形式，多项研究均发现，糖尿病环境中 Akt 和 p-Akt 表达下降，β 细胞凋亡明显增多[2-4]，两者之间存在一定的相关性，但对于 Akt 途

表 1 各组凋亡率、胰岛素分泌、TERT、Akt、p-Akt 和 p-Akt/Akt 比较($\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Apoptosis rate, insulin secretion, expression of TERT、Akt and p-Akt($\bar{x}\pm s$)

组别	TUNEL(%)（n=8）	流失细胞术(%)（n=3）	$A_{450\ nm}$（n=6）	TERT（n=3）	Akt（n=3）	p-Akt（n=3）	p-Akt / Akt（n=3）
C 组	2.88 ± 1.25[a]	5.00 ± 2.35[a]	0.65 ± 0.10[a]	1.63 ± 0.12[a]	1.52 ± 0.39[a]	0.80 ± 0.07[a]	0.54 ± 0.09
CS 组	3.63 ± 1.41[ab]	3.57 ± 1.55[ab]	0.58 ± 0.12[ab]	1.63 ± 0.04[ab]	1.50 ± 0.29[a]	0.53 ± 0.09[b]	0.37 ± 0.12[b]
H 组	38.25 ± 8.63[b]	22.57 ± 7.60[b]	0.40 ± 0.09[b]	1.03 ± 0.05[b]	0.95 ± 0.07[b]	0.55 ± 0.05[b]	0.58 ± 0.09[b]
HS 组	62.00 ± 7.13[ab]	58.63 ± 8.90[ab]	0.23 ± 0.10[ab]	0.61 ± 0.07[ab]	0.93 ± 0.06[b]	0.28 ± 0.07[ab]	0.30 ± 0.06[ab]
F 值	205.200	54.350	19.590	128.202	5.304	26.189	6.627
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.015

注：C 组与 CS 组比较，$P_{TUNEL\ 凋亡率}$=0.794；$P_{流式细胞术凋亡率}$=0.778；P_{A450}=0.28；P_{TERT}=0.959；P_{Akt}=0.924；P_{p-Akt}=0.002；$P_{p-Akt/Akt}$=0.05；C 组与 H 组比较，$P_{TUNEL\ 凋亡率}$=0.000；$P_{流式细胞术凋亡率}$=0.007；P_{A450}=0.000；P_{TERT}=0.000；P_{Akt}=0.023；P_{p-Akt}=0.003；$P_{p-Akt/Akt}$=0.572；H 组与 HS 组比较，$P_{TUNEL\ 凋亡率}$=0.000；$P_{流式细胞术凋亡率}$=0.000；P_{A450}=0.012；P_{TERT}=0.000；P_{Akt}=0.899；P_{p-Akt}=0.002；$P_{p-Akt/Akt}$=0.005；a：与 H 组比较，P<0.05；b：与 C 组比较 P<0.05

径如何参与 β 细胞凋亡的具体过程尚不清楚。

端粒被称为细胞的“分子时钟”，其长度和端粒酶活性与细胞的衰老和死亡关系密切。TERT 是端粒酶蛋白组分的主要催化亚单位，广泛表达于多种细胞，其与端粒酶 RNA 模板组分一起可修复端粒酶活性，延长各种原因如氧化应激等所致的端粒长度磨损，是维持端粒和染色体稳定的重要结构。研究表明，TERT 的表达活性与细胞的增殖和凋亡关系密切，但既往对 TERT 的研究多局限于肿瘤细胞[11]。有研究发现，过表达 TERT 可以在胰岛 β 细胞中实现抗凋亡作用，这为糖尿病的治疗提供了一条新的思路[12-14]。TERT 本身在胰岛 β 细胞中有一定的表达，其如何参与糖尿病胰岛 β 细胞的凋亡的具体过程尚不明确。

本实验发现，H 组胰岛 β 细胞凋亡较 C 组明显增加，胰岛素分泌明显减少，虽然 H 组 p-Akt/Akt 与 C 组相比无统计学差异，但 H 组 p-Akt 蛋白表达较 C 组明显减少，同时 TERT 蛋白也明显下降，说明高糖高脂可降低胰岛 β 细胞 p-Akt 以及 TERT 表达，增加胰岛 β 细胞凋亡，降低胰岛素分泌功能；通过在高糖高脂的培养环境中抑制 p-Akt 表达（HS 组），随着 p-Akt 表达和 p-Akt/Akt 的下降，HS 组胰岛 β 细胞凋亡较 H 组有所增加，胰岛素分泌进一步减少，一方面表明 p-Akt 的抑制可能与高糖高脂诱导的胰岛 β 细胞凋亡增加和胰岛素分泌下降有关，另一方面也说明其可能与 TERT 的表达下降有关。据此，我们推测正常生理情况下抑制 p-Akt 信号途径对 TERT 和胰岛 β 细胞凋亡影响不大，而高糖高脂培养环境则可能降低 TERT、p-Akt 水平上调诱导细胞凋亡，降低胰岛素分泌功能；抑制 p-Akt 信号途径可降低胰岛 β 细胞 TERT 水平从而增加凋亡，进一步加重胰岛素分泌功能障碍。同时，我们的研究也发现使用 p-Akt 信号抑制剂 SH5 主要是抑制 p-Akt 而非 Akt 的表达，结果说明主要是 p-Akt 而非 Akt 表达参与糖尿病环境中胰岛 β 细胞凋亡的调节。

综上所述，本研究认为高糖高脂可通过降低 p-Akt 信号途径增加小鼠胰岛 β 细胞凋亡，参与胰岛β 细胞功能障碍，其机制可能与胰岛 β 细胞 TERT 表达下降有关。通过抑制 p-Akt 信号途径，可进一步降低 TERT 表达水平，增加高糖高脂诱导的胰岛 β细胞凋亡，进一步加重胰岛素分泌功能障碍，两者是否存在直接或间接的相互作用，其详细的机制如何尚有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Yang W, Weng J. Early therapy for type 2 diabetes in China[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014, 2(12): 992-1002.

[2] Fukaya M, Brorsson CA, Meyerovich K, et al. A20 inhibits β-cell apoptosis by multiple mechanisms and predicts residual β-cell function in type 1 diabetes[J]. Mol Endocrinol, 2016, 30(1): 48-61.

[3] Chowdhury S, Wang X, Srikant CB, et al. IGF-I stimulates CCN5/WISP2 gene expression in pancreatic β-cells, which promotes cell proliferation and survival against streptozotocin[J]. Endocrinology, 2014, 155(5): 1629-1642.

[4] Fan R, Li X, Gu X, et al. Exendin-4 protects pancreatic beta cells from human islet amyloid polypeptide-induced cell damage: potential involvement of AKT and mitochondria biogenesis[J]. Diabetes Obes Metab, 2010, 12(9): 815-824.

[5] Zhao T, Hu F, Liu X, et al. Blockade of telomerase reverse transcriptase enhances chemosensitivity in head and neck cancers through inhibition of AKT/ERK signaling pathways [J]. Oncotarget, 2015, 6(34): 35908-35921.

[6] Werner C, Gensch C, Pöss J, et al. Pioglitazone activates aortic telomerase and prevents stress-induced endothelial apoptosis[J]. Atherosclerosis, 2011, 216(1): 23-34.

[7] Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, et al. β-cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment [J]. Diabetes Care, 2014, 37(6): 1751-1758.

[8] Leibowitz G, Kaiser N, Cerasi E. Balancing needs and means: the dilemma of the beta-cell in the modern world[J]. Diabetes Obes Metab, 2009, 11(s4): 1-9.

[9] Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes[J]. Diabetes, 2003, 52(1): 102-110.

[10] Gorman AM, Healy SJ, Jäger R, et al. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis[J]. Pharmacol Ther, 2012, 134(3): 306-316.

[11] Qinan W, Ling Z, Bing C. The influence of the telomere-telomerase system on diabetes mellitus and its vascular complications[J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 19(6): 849-864.

[12] Wu HL, Wang Y, Zhang P, et al. Reversible immortalization of rat pancreatic β cells with a novel immortalizing and tamoxifen-mediated self-recombination tricistronic vector[J]. J Biotechnol, 2011, 151(3): 231-241.

[13] Itkin-Ansari P, Levine F. Sources of beta-cells for human cell-based therapies for diabetes[J]. Cell Biochem Biophys, 2004, 40(3s): 103-112.

[14] Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, et al. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion[J]. J Clin Invest, 2011, 121(9): 3589-3597.

（责任编辑：唐秋姗）