

DOI: 10.13376/j.cbls/2022094

文章编号: 1004-0374(2022)07-0855-08

· 技术与应用 ·

胰岛类器官研究及应用进展

金美玲^{1,2}, 严亚萍^{1,2*}

(1 昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 昆明 650500; 2 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

摘要: 类器官是由多能干细胞、新生组织干细胞或成体干细胞衍生的 3D 结构, 它能在体外模拟组织器官发生过程与稳态维持, 并具备类似于体内组织器官的生理过程。1 型糖尿病 (T1DM) 是一种以高血糖为特征的内分泌代谢性疾病。T1DM 的治疗主要是外源胰岛素注射来降低血糖, 但是这不能完全根治 T1DM。胰岛器官移植被认为是最有可能治愈糖尿病的方法之一, 但是供体的缺乏也限制着 T1DM 的治疗。目前, 将胰岛类器官培养与器官芯片、材料科学等新兴技术结合, 能够突破传统模型的瓶颈, 为胰岛移植治疗糖尿病临床应用研究提供新的方向。本文对近些年来国内外胰岛类器官的研究进展进行综述, 为胰岛类器官移植治疗糖尿病的临床应用研究提供参考。

关键词: 胰岛类器官; 1 型糖尿病; 组织工程; 细胞分化; 类器官移植

中图分类号: Q819 **文献标志码:** A

Advances in research and application of islet organoids

JIN Mei-Ling^{1,2}, YAN Ya-Ping^{1,2*}

(1 Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

2 Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500, China)

Abstract: Organoids are 3D structures derived from pluripotent stem cells, newborn tissue stem cells or adult stem cells, which can simulate organogenesis and homeostasis *in vitro*. Organoids can show similar physiological processes to those of tissues and organs *in vivo*. Type 1 diabetes (T1DM) is an endocrine and metabolic disease characterized by hyperglycemia. The treatment of T1DM is mainly exogenous insulin injection to depress blood sugar level, but cannot completely cure T1DM. Islet transplantation is one of the most effective ways to cure diabetes. However, the lack of donors severely limits the clinical application. At present, the combination of islet culture with organ chip, material science and other emerging technologies can break through the bottleneck and provide a new direction for the clinical application of islet transplantation in the treatment of diabetes. This review summarizes the progress of islet organoids development in recent years and provides reference for the clinical application in the treatment of diabetes.

Key words: islet organoid; type 1 diabetes; tissue engineering; cell differentiation; organoid transplantation

糖尿病目前影响着全世界上亿的患者, 其中 1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 是由 T 淋巴细胞介导的自身免疫性疾病^[1]。由于胰岛 β 细胞受损而导致胰岛素绝对缺乏, T1DM 患者需要完全依赖外源胰岛素治疗^[1], 但注射胰岛素并不能从根本上解决问题, 也不能阻止视网膜病变、神经性病变以及终末期肾衰竭等一系列并发症的发生^[2-3]。近年来, 胰岛移植在 T1DM 治疗中被成功应用, 但是由于供体短缺以及免疫排斥等问题使胰岛移植治

疗 T1DM 受到极大的限制^[4]。类器官作为一种新兴的技术手段逐渐被熟知并且广泛应用于临床前研究^[5]。类器官的价值在于其具有在体外培养环境下构建人类器官疾病模型的潜力, 可在体外真实再现体内组织器官的结构特点、表型和性状, 丰富了器

收稿日期: 2022-01-27; 修回日期: 2022-04-15

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFC2002803)

*通信作者: E-mail: yanyp@lpbr.cn

官供体的来源,有望为治疗 T1MD 带来新希望^[6-8]。但是体外培养的组织器官因缺乏血管网络而导致营养供应不足,使得类器官移植后难以长期存活^[9-10]。生物材料因具有较好的生物相容性、可调的理化性质、可模拟体内组织生理环境等特点为体外构建性能稳定和更高可信度的类器官模型提供了新的思路^[11]。因此,将类器官与生物材料相结合构建具有血管网络的类器官成为新的发展目标^[12-14]。本文就胰岛类器官培养新方法以及胰岛类器官替代治疗 T1DM 的研究进展进行概述,为胰岛类器官治疗 T1DM 的临床转化提供参考和借鉴。

1 胰岛类器官

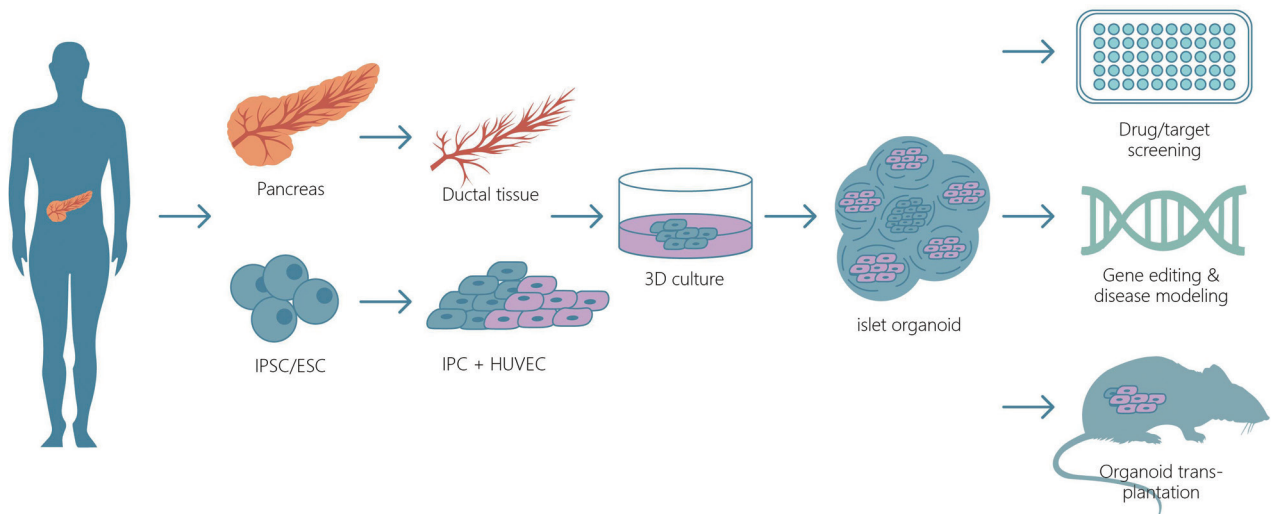
胰腺由外分泌腺和内分泌腺两部分组成。外分泌腺由腺泡、腺管组成,腺泡分泌胰液,腺管可以将胰液排入十二指肠消化蛋白质、脂肪与糖;内分泌腺则由胰岛组成,胰岛是由 α 、 β 、 δ 和 PP 细胞形成的异质结构,其在调节激素分泌方面发挥着重要作用^[15-16]。其中, α 细胞分泌胰高血糖素, β 细胞分泌胰岛素, δ 细胞分泌生长抑素,PP 细胞则是分泌胰多肽^[17]。胰岛类器官是由原代胰腺组织或干细胞体外培养形成的,与体内胰岛组成和功能类似的三维结构。目前体外培养的胰岛或胰腺类器虽然都取得了一定成功,但是如何培养一个既有外分泌腺又有内分泌腺的完整胰腺类器官仍是所要探究的

难题^[18-19]。现阶段,胰岛类器官主要以原代胰腺组织来源的胰岛细胞、人胚胎干细胞 (human embryo stem cells, hESCs)、人诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 等为种子细胞在体外培养而成,并通过器官移植替代受损胰腺组织^[20-22] (图 1)。

2 不同类型的胰岛类器官的构建

2.1 组织来源的胰岛类器官培养

组织来源的胰岛类器官主要是从成熟的胰腺中分离出导管、腺泡和胰岛组织,进而将其培养成胰岛类器官^[23]。但是仅由单纯腺泡、胰岛组织等培养出的胰岛类器官缺乏血管网络,不能长时间存活,也不能传代与冻存^[24]。研究发现,WNT 信号通路可提高分化效率,增加内分泌细胞的比例;TGF- β 信号通路调节细胞生长增殖、细胞分化与衰老等。将消化后的人导管细胞培养在基质胶上并在培养体系中加入 WNT3a 激活 WNT 信号通路,同时加入 A83-01 和 Noggin 抑制 TGF- β 信号通路,使获得的胰腺类器官可以传代培养长达 6 个月并且能够冻存^[25-29]。近期在实验小鼠身上发现了一群新的细胞类别——Procr⁺ 胰岛干细胞,并建立了一种 Procr⁺ 胰岛干细胞与血管细胞共培养的 3D 培养体系,成功获得有功能的小鼠胰岛类器官^[30]。此胰岛类器官与真正的小鼠胰岛在功能、形态等方面都非常相似,



胰岛类器官可以通过胰腺组织离体培养和多能干细胞诱导分化培养两种方法获得。一方面,可以从成熟的胰腺中分离、纯化得到导管与胰岛组织,在适当的培养条件下形成胰岛类器官;另一方面,多能干细胞可在体外定向分化为胰腺前体细胞,再进一步与其他细胞共培养形成胰岛类器官。胰岛类器官技术与药物靶点筛选、基因编辑技术以及器官移植的结合将有益于疾病诊断与治疗。

图1 胰岛类器官制备方法及其应用(根据参考文献[9]绘制)

能迅速响应糖刺激分泌胰岛素, 并且能够在体外“繁衍”到 20 代以上。当把这些胰岛类器官移植到糖尿病小鼠模型体内, 小鼠的血糖水平恢复, 糖尿病病征减轻, 展示了 Procr⁺ 胰岛干细胞的应用潜力^[30]。研究也发现脱细胞外基质 (ECM) 水凝胶可模拟体内胰岛周围生态环境^[31]。ECM 水凝胶对大鼠胰岛细胞来源的胰岛类器官的三维包裹使得其功能稳定性优于传统 3D 培养, 同时胰岛类器官的组成和形态也发生了改变, 包括胰岛内皮细胞的保留增强并形成索状结构, 胰岛类器官出现血管芽^[31]。此外, 利用从人胰岛器官获得的组织碎片与人脐静脉内皮细胞、人骨髓间充质干细胞在基质凝胶上“自凝集”形成胰岛类器官, 将其移植到糖尿病小鼠肾包膜后发现, 血糖迅速恢复并且正常血糖水平维持时间长达 1 个月之久, 并在移植 7 天后类器官出现血管网络^[32]。这些研究都表明关键信号通路与生物材料的加入将会获得更具有近生理结构与功能特点的胰岛类器官。

2.2 胚胎干细胞(ESCs)来源的胰岛类器官构建

胚胎干细胞是来源于囊胚期内细胞团的全能干细胞, 在体外可被诱导为具有分泌胰岛素的胰岛结构。最早的分化方案是五步诱导分化法, 是从胚胎干细胞依次分化至中胚层、确定性内胚层、原始肠管、后前肠内胚层、表达胰岛素的内分泌细胞^[33]。五步诱导分化出的内分泌细胞团仅含有 7% 胰岛素阳性细胞, 并且缺乏对葡萄糖刺激产生反应的功能^[33]。Kroon 等^[34]使用五步分化法, 将 hESCs 诱导分化为胰腺祖细胞, 将其移植到糖尿病小鼠体内促使胰腺祖细胞进一步表达 C-P、SST、MAFA 等转录因子, 并且能维持小鼠正常血糖长达 3 个月。有研究团队使用五步分化诱导 hESCs 定向分化为类胰岛 β 细胞, 并通过标记连续发育基因实现分化过程的动态检测, 在每个分化阶段鉴定并分离出所需的细胞群^[35]。2014 年, 分化方法取得重大突破。为了提高分化效率, 研究人员将原来的五步分化法改进至七步分化法。七步分化法是胚胎干细胞经历确定性内胚层、原始肠管、后前肠、胰腺内胚层、胰腺内分泌前体、未成熟 β 细胞、成熟 β 细胞七个阶段获得 β 细胞。通过七步诱导法从 hESCs 中分化出胰岛 β 细胞并表达胰岛 β 细胞关键标志物如 MAFA 和 INS 等, 且移植后能成功逆转糖尿病小鼠血糖^[36]。MAFA 是胰岛 β 细胞特异性的胰岛素转录因子, 可促进胰岛 β 细胞发育和维持 β 细胞功能, 是 β 细胞成熟的标志物^[37]。将 hESCs 通过七步法

诱导成胰腺内分泌细胞, 并将这类细胞通过肾囊注射的方式移植到糖尿病裸鼠体内, 术后 50 天内裸鼠血糖水平显著降低, 术后 100 天去除移植物后血糖水平迅速升高, 七步诱导法获得的胰岛类器官发挥功能的时间更长^[38]。除了优化分化方案, 通过生物材料与胚胎干细胞诱导分化的胰岛类器官共培养也可使胰岛类器官的功能更加成熟^[39]。胶原和基质凝胶支架提供的生理环境为人胚胎干细胞衍生的胰腺内分泌 β 细胞的体外分化和成熟提供了更好的物理环境, 这使得类器官含有多种胰腺内分泌细胞, 从而对葡萄糖刺激更加敏感^[40]。将由 hESCs 分化而来的胰岛细胞与内皮细胞通过水凝胶共培养产生了功能更加成熟的胰岛类器官, 这种类器官表达高水平的胰岛 β 标志物, 如 INS、MAFA、PDX1、NKX61 等; 更重要的是, 该类器官表达血管标志性蛋白 CD31^[41]。值得注意的是, 胰腺祖细胞中 PDX1 和 NKX6.1 的共表达对于有效生成功能性胰岛 β 细胞是必不可少的^[42-43]。因此, 生物材料具有的良好相容性与模拟体内细胞基底膜结构的物理特性提高了胰岛类器官移植治疗糖尿病的可行性。

2.3 诱导多能干细胞(iPSCs)来源的胰岛类器官构建

由于目前 ESCs 在临床上的应用受到伦理道德限制, 而具有特定基因型的 iPSCs 在组织再生方面比 ESCs 更具吸引力^[44]。近年来发现皮肤成纤维细胞来源的 iPSCs 可以定向分化为胰岛类器官^[45-46]。将以 hiPSCs 为来源的胰岛类器官与器官芯片技术相结合, 实现了 hiPSCs 的内胚层定向诱导分化与 3D 动态培养相结合, 并且培养的胰岛类器官表达 β 细胞相关转录因子如 NKX2.2、NKX6.1、INS 等, 以及 α 细胞特异性标记 GCG^[47]。器官芯片指以微流控技术为核心, 引入细胞、细胞外基质等的人体器官生理微系统, 主要优势在于能够精确控制细胞及其微环境, 模拟器官的发育过程、生理状态和功能^[39, 48]。器官芯片的支持使胰岛类器官发育得更加成熟, 但是类器官移植还存在一定难题, 如免疫排斥。有研究发现, 通过 WNT4a 驱动 WNT 信号通路可促进 hiPSCs 分化产生的胰岛类器官的代谢功能更加成熟, 并且通过雌激素相关受体 γ 体外刺激可诱导内源性 PD-L1 过表达并抑制 T 细胞活化和移植排斥, 移植到 T1DM 裸鼠后, 可迅速降糖并且维持 2 个多月的体内血糖稳态^[49]。PD-L1 蛋白与 PD-1 受体结合诱导 T 细胞进入静息状态, 使 T 细胞增殖减少, 有效解除机体免疫反应。除免疫排斥外, 患者来源的 hiPSCs 分化效率较低也限制了其在临

床上的应用^[50]，所以提高 hiPSCs 的分化效率也迫在眉睫^[51]。有研究开发了一种 hiPSCs 向胰腺 β 细胞的多步分化新方案，使用十种化学物质增强 hiPSCs 向胰腺祖细胞功能性 β 细胞的分化，可使 β 细胞的分化率高达 80%，得到的胰岛类器官都表现出与人体来源的 β 细胞相当的生理功能，表达高水平的胰岛 β 标志物，如 GCG、INS、NKX6.1 以及 PDX1^[52-53]。该研究突破了长期以来 hiPSCs 分化效率低等问题。

组织来源的胰岛类器官已经突破类器官难以长期存活、不能冻存与传代以及缺乏血管网络等问题^[54]，但是由于从组织中提取胰岛细胞难度大且获得可用细胞数量少而限制了其发展。ESCs 来源的胰岛类器官目前在分化效率上有突破性进展并且在生物材料的加入下，能培养出功能更加成熟且有血管芽的类器官，但 ESCs 在临床上的应用受到伦理道德限制^[50]。iPSC 来源的胰岛类器官不但在一定

程度上为避免免疫排斥提供了有效方法，而且相较于 ESCs 来源的胰岛类器官在分化效率上更胜一筹。如表 1 所示，不同来源的细胞构建胰岛类器官分化过程与效率也有所不同。

除此之外，间充质干细胞分化而来的 β 细胞也为治疗糖尿病带来新的生机^[55-56]。本实验室利用脐带间充质干细胞分化而来的类 β 细胞与人脐静脉内皮细胞共培养，获得的胰岛类器官与生物材料共移植到 STZ 诱导的糖尿病小鼠的肾包膜，达到控糖效果，并将类 β 细胞通过肝门静脉移植治疗 STZ 诱导的 1 型糖尿病猴上并取得了较好的效果。但是间充质干细胞分化效率并不理想，需要移植大量细胞才可达治疗效果，细胞的分化效率低也是需要克服的难题。综上所述，提高 β 细胞的分化效率是促进胰岛类器官的发展与进步的第一步，生物材料与器官芯片的支持使胰岛类器官实现血管化，功能更加成熟，在体内存活时间更久，更好地维持血糖，发

表1 不同细胞诱导分化胰岛类器官过程及主要试剂

细胞类型	分化步骤	分化效率	细胞培养主要因子	优劣势	参考文献
组织来源细胞	分离纯化导管细胞	分离纯化效率低	WNT3a、A83-01、Noggin、TGF-β、Nicotinamide、L-glutamine	培养体系简单但获取细胞数量少 细胞难提取	[25] [30-32]
	分离纯化胰岛细胞或胰岛成体干细胞	分离纯化效率高			
胚胎干细胞	ES→DE→PG→PF→PE→NE	分化出含有7%的胰岛素阳性细胞	Activin A、Wnt3a、FGF10、CYC、RA、DAPT、Ex4、IGF1、HGF	细胞自我更新能力强、分化能力强，但细胞的获取存在时间与数量上的问题并且涉及伦理问题	[33-35] [36, 40-41]
	ES→DE→PGT→PF→PE→PEP→Iβc→Mβc	胰岛素阳性细胞率大于15%	GDF8、GSK3β、inh FGF7、VitC、RA、SANT、TPB、LDN ALK5 inh II、T3、GS inh XX、N-Cys、AXL inh		[38-39]
	ES→GT→PFG→PP→Iβc→GFP	分化效率接近16.9%	Activin A、Wnt3a、TGBi、KGF、RA、EGF、Alki、T3、XXi、LDN、Vc		[44, 47]
诱导多能干细胞	hiPS→DE→PE→EP→EC	分化效率达25%	Activin A、bFGF、SANT-1、retinoic acid、ascorbic acid、nicotinamide	可有效避免免疫排斥，不涉及伦理问题但是有致癌风险	[44, 47] [45, 49-51]
	hiPS→DE→FG→PP→EP→Mβc	分化效率达70%	Activin A、retinoic acid、vitamin C、vitamin E、ALK5、FGF7、cAMP、TGFβ、PKC		[46, 52-53]
	hiPS→DE→FG→PP1→PP2→EP→Iβc→Mβc	分化效率达80%	FSK、LDN、TBP、Repsox、KGFSANT1、RA、LDN、T3、ZnS04、GSIXX、HGF、IGF1、ISX-9		

ES: 胚胎干细胞; DE: 定性内胚层; PG/PGT: 原始肠管; PE: 胰腺内胚层; NE: 激素表达内分泌细胞; PEP: 胰腺内分泌前体; GFP: 阳性胰岛素分泌细胞; hiPS: 诱导多能干细胞; FG: 后肠; EP: 内分泌祖细胞; EC: 内分泌细胞; PP: 胰腺祖细胞; Iβc: 未成熟β细胞; Mβc: 未成熟β细胞

挥功能。

3 胰岛类器官的共移植

体外诱导干细胞分化成胰岛类器官的方案趋于成熟, 但是还需进一步关注移植后如何规避免疫排斥、促血管化等问题^[57]。近年来, 通过将胰岛类器官与其他细胞共移植可有效解决免疫排斥、植入的胰岛类器官不能长时间存活以及功能不成熟等问题。

3.1 间充质干细胞(MSCs)与胰岛类器官共移植

MSCs 是来源于成体组织中的多潜能干细胞, 因其具有强大的增殖能力和多向分化潜能以及免疫调控等功能而被广泛应用^[58]。近年来, 研究发现把不同来源的 MSCs 与胰岛类器官共移植可有效减少移植的免疫排斥。MSCs 通过分泌多种因子, 如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、白细胞介素-10 (IL-10) 等来减少淋巴细胞的增殖、抑制抗原传递细胞分化成熟及功能发挥、提高调节性 T 细胞比例等多种途径发挥免疫调节作用。将大鼠胰岛与大鼠来源的 BM-MSCs 直接共培养可增加胰岛的形态结构完整性, 形成 MSCs 包裹胰岛的胶囊结构, 避免胰岛碎裂, 提高胰岛的存活率^[59]; 而将小鼠胰岛细胞与人脂肪来源 MSCs 的联合移植, MSCs 通过分泌 VEGF-A 有效促进胰岛血管内皮细胞的聚集, 从而促进胰岛细胞移植后新生血管的形态形成^[60]。因此, MSCs 与胰岛类器官的共培养不仅可以减少或避免免疫排斥, 提高类器官存活时间, 还可以促进类器官生成血管网络。

3.2 肝细胞与胰岛类器官共移植

肝细胞具有强再生能力, 并且它们通过 MHC I 类分子促进 CD8 T 细胞的凋亡, 启动对缺血和免疫耐受的防御机制^[61-62]。一项体外研究证明肝基质细胞能够刺激胰腺干细胞分化为分泌胰岛素的胰岛 β 细胞簇, 为胰岛类器官的培养提供新的思路^[63]。将肝细胞与鼠源天然胰岛共同培养后移植到糖尿病大鼠的肝脏中, 结果发现相比于单独移植天然胰岛的大鼠, 共培养移植的大鼠的血糖水平控制较好^[64]。有研究团队利用微孔阵列将大鼠天然胰岛与肝细胞共培养成胰岛类器官, 该类器官移植到糖尿病小鼠肾包膜内后能够维持血糖在正常范围内长达 4 周, 相比之下, 单独移植胰岛细胞组只维持了 2 周^[65]。有研究者开发了一种新的微流体-多器官系统, 这种系统是在循环灌注下将 hiPSC 分化的肝细胞和胰岛类器官进行 3D 共培养, 可在体外培养可长达 30 天。通过转录分析这种共培养体发现共培养的内皮

细胞中代谢相关信号转导途径被激活, 同时共培养的肝细胞和胰岛类器官生长良好, 并改善了胰岛类器官的异质性与组织特异性功能, 调控血糖更加灵敏^[66]。这些研究显示胰岛细胞与肝细胞共培养可能解决胰岛移植后不能长期存活的问题。

3.3 内皮细胞与胰岛类器官共移植

目前胰岛移植因其缺乏完整的血管网络而难以长期存活^[67]。体外培养的内皮细胞通过形成新的血管网络获得宿主的营养和物质支持, 而内皮化也是解决胰岛类器官移植后供血问题的一种方法。通过与内皮祖细胞共培养可增强血管网络的形成。研究发现, 大鼠的内皮祖细胞与大鼠胰岛共同培养后, 会高表达与血管网络形成相关的重要因子, 如血管内皮生长因子、血管生成因子、基底膜蛋白 (包括 IV 型胶原和层黏连蛋白) 以及 β 细胞增殖因子, 移植到 DM 小鼠体内 3~5 天后, 血糖水平下降至正常值并且维持 6 个月的正常血糖^[68]。在糖尿病小鼠模型中, 大鼠胰岛与大鼠内皮祖细胞 (EPCs) 联合移植能使血糖维持在正常范围内长达 6 个月, 显著提高了胰岛移植后的作用时间^[69]。胰岛类器官与内皮细胞共培养有助于提高胰岛类器官的生存能力, 增加胰岛素释放, 并促进胰岛血管化, 生成血管网络, 改善因细胞缺血而导致细胞移植后大量死亡的情况。

4 展望

胰岛类器官技术在近年来取得了较大的进展, 但体外培养的胰岛类器官与天然胰岛相比还有很多不足, 探究改善胰岛类器官异质性与功能性的方法还需进一步的研究。另外, 通过移植胰岛类器官治疗糖尿病向临床转化也面临巨大挑战, 包括如何避免自身免疫排斥、保护移植物不受异种排斥、解决移植物在体内供养问题, 以及安全性等。非人灵长类与人类的亲缘关系最近, 在神经系统、代谢系统和免疫系统与人类最为接近, 因此是研究胰岛类器官临床转化最合适的临床前动物。但就目前研究进展来看, 胰岛类器官在非人灵长类动物模型上的应用并不广泛, 除造模成本高外, 免疫排斥也是一大难题。现阶段多是通过注射免疫抑制剂来降低免疫排斥风险, 但是免疫抑制剂的注射会带来机体免疫系统的问题。因此, 需要研究抗免疫排斥生物材料与移植物共移植来避免免疫排斥。本实验室长期关注非人灵长类动物模型的构建和治疗研究, 尤其是在 1 型糖尿病猴模型的建立上有丰富的经验, 目前也开展了基于间充质干细胞的类器官构建研究并

取得了一定的进展, 如将间充质干细胞分化的类胰岛 β 细胞和人脐静脉内皮细胞在生物材料上共培养会促进血管网络的形成, 这些将为糖尿病的治疗带来新的希望。

[参 考 文 献]

- [1] Paschou SA, Papadopouloumarketou N, Chrousos G, et al. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Endocrine Connections*, 2018, 7: R38-46
- [2] Latres E, Finan DA, Greenstein JL, et al. Navigating two roads to glucose normalization in diabetes: automated insulin delivery devices and cell therapy. *Cell Metab*, 2019, 29: 545-63
- [3] Yi L, Wang X, Dhumpa R, et al. Integrated perfusion and separation systems for entrainment of insulin secretion from islets of Langerhans. *Lab Chip*, 2015, 15: 823-32
- [4] Yang Z, Peters C W, Lei J, et al. Intrapleural transplantation of allogeneic pancreatic islets achieves glycemic control in a diabetic non-human primate. *Am J Transplant*, 2022, 22: 966-72
- [5] Marchini A, Gelain F. Synthetic scaffolds for 3D cell cultures and organoids: applications in regenerative medicine. *Crit Rev Biotechnol*, 2022, 42: 468-86
- [6] Navarro-Tableros V, Gomez Y, Brizzi MF, et al. Generation of human stem cell-derived pancreatic organoids (POs) for regenerative medicine. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1212: 179-220
- [7] Johansson U, Olsson A, Gabrielsson S, et al. Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308: 474-9
- [8] Lebreton F, Lavallard V, Bellofatto K, et al. Insulin-producing organoids engineered from islet and amniotic epithelial cells to treat diabetes. *Nat Commun*, 2019, 10: 4491
- [9] Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 2014, 345: 1247125
- [10] Tanimizu N, Ichinohe N, Sasaki Y, et al. Generation of functional liver organoids on combining hepatocytes and cholangiocytes with hepatobiliary connections *ex vivo*. *Nat Commun*, 2021, 12: 3390
- [11] Jiang X, Li X, Fei X, et al. Endometrial membrane organoids from human embryonic stem cell combined with the 3D Matrigel for endometrium regeneration in asherman syndrome. *Bioact Mater*, 2021, 6: 3935-46
- [12] Yang S, Wang C, Zhu J, et al. Self-assembling peptide hydrogels functionalized with LN- and BDNF-mimicking epitopes synergistically enhance peripheral nerve regeneration. *Theranostics*, 2020, 10: 8227-49
- [13] Zheng Y, Wu Z, Khan M, et al. Multifunctional regulation of 3D cell-laden microsphere culture on an integrated microfluidic device. *Anal Chem*, 2019, 91: 12283-9
- [14] Alquadeib BT, Eltahir EK, Alagili MF. The oral administration of lidocaine HCl biodegradable microspheres: formulation and optimization. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 857-69
- [15] Dimeglio LA. COVID-19 and type 1 diabetes: addressing concerns and maintaining control. *Diabetes Care*, 2021, 44: 1924-8
- [16] Kahn SE, Chen YC, Esser N, et al. The β cell in diabetes: integrating biomarkers with functional measures. *Endocr Rev*, 2021, 42: 528-83
- [17] Falkmer S, Östberg Y. Comparative morphology of pancreatic islets in animals [M]/Volk BW, Wellmann KF. *The diabetic pancreas*. Boston: Springer, 1997: 17-52
- [18] Dayem AA, Lee SB, Kim K, et al. Recent advances in organoid culture for insulin production and diabetes therapy: methods and challenges. *BMB Rep*, 2019, 52: 295-303
- [19] Huang L, Desai R, Conrad DN, et al. Commitment and oncogene-induced plasticity of human stem cell-derived pancreatic acinar and ductal organoids. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 1090-104.e6
- [20] De Souza BM, Rodrigues M, De Oliveira FS, et al. Improvement of human pancreatic islet quality after coculture with human adipose-derived stem cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2020, 505: 110729
- [21] Sachs N, Papaspyropoulos A, Zomer-Van Ommen DD, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J*, 2019, 38: e100300
- [22] Dossena M, Piras R, Cherubini A, et al. Standardized GMP-compliant scalable production of human pancreas organoids. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11: 94
- [23] Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Pancreatic β cell regeneration as a possible therapy for diabetes. *Cell Metab*, 2018, 27: 57-67
- [24] Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, et al. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 7999-8004
- [25] Boj SF, Hwang CI, Baker LA, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*, 2015, 160: 324-38
- [26] Nostro MC, Sarangi F, Ogawa S, et al. Stage-specific signaling through TGF β family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells. *Development*, 2011, 138: 861-71
- [27] Chung WS, Andersson O, Row R, et al. Suppression of Alk8-mediated Bmp signaling cell-autonomously induces pancreatic β -cells in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107:1142-7
- [28] McIn VA, Rankin SA, Zorn AM. Repression of Wnt/ β -catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. *Development*, 2007, 134: 2207-17
- [29] Wandzioch E, Zaret KS. Dynamic signaling network for the specification of embryonic pancreas and liver progenitors. *Science*, 2009, 324: 1707-10
- [30] Wang D, Wang J, Bai L, et al. Long-term expansion of pancreatic islet organoids from resident Procr⁺ progenitors. *Cell*, 2020, 180: 1198-211.e19
- [31] Jiang K, Chaimov D, Patel SN, et al. 3-D physiometric extracellular matrix hydrogels provide a supportive

- microenvironment for rodent and human islet culture. *Biomaterials*, 2019, 198: 37-48
- [32] Takahashi Y, Sekine K, Kin T, et al. Self-condensation culture enables vascularization of tissue fragments for efficient therapeutic transplantation. *Cell Rep*, 2018, 23: 1620-9
- [33] D'amour KA, Bang AG, Eliazar S, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1392-401
- [34] Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 443-52
- [35] Liu H, Yang H, Zhu D, et al. Systematically labeling developmental stage-specific genes for the study of pancreatic beta-cell differentiation from human embryonic stem cells. *Cell Res*, 2014, 24: 1181-200
- [36] Reznia A, Bruin JE, Arora P, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 1121-33
- [37] Hang Y, Yamamoto T, Benninger RK, et al. The MafA transcription factor becomes essential to islet β -cells soon after birth. *Diabetes*, 2014, 63: 1994-2005
- [38] Nair GG, Liu JS, Russ HA, et al. Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived β cells. *Nat Cell Biol*, 2019, 21: 263-74
- [39] Candiello J, Grandhi TSP, Goh SK, et al. 3D heterogeneous islet organoid generation from human embryonic stem cells using a novel engineered hydrogel platform. *Biomaterials*, 2018, 177: 27-39
- [40] Wang W, Jin S, Ye K. Development of islet organoids from H9 human embryonic stem cells in biomimetic 3D scaffolds. *Stem Cells Dev*, 2017, 26: 394-404
- [41] Augsornworawat P, Velazco-Cruz L, Song J, et al. A hydrogel platform for *in vitro* three dimensional assembly of human stem cell-derived islet cells and endothelial cells. *Acta Biomater*, 2019, 97: 272-80
- [42] Fujitani Y, Fujitani S, Boyer DF, et al. Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for Pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation. *Genes Dev*, 2006, 20: 253-66
- [43] Lu D, Takekawa S, Schisler GJ, et al. The Nkx6.1 homeodomain transcription factor suppresses glucagon expression and regulates glucose-stimulated insulin secretion in islet β cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 7297-302
- [44] Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 106-18
- [45] Pagliuca FW, Millman JR, Gurtler M, et al. Generation of functional human pancreatic β cells *in vitro*. *Cell*, 2014, 159: 428-39
- [46] Veres A, Faust AL, Bushnell HL, et al. Charting cellular identity during human *in vitro* β -cell differentiation. *Nature*, 2019, 569: 368-73
- [47] Tao T, Wang Y, Chen W, et al. Engineering human islet organoids from iPSCs using an organ-on-chip platform. *Lab Chip*, 2019, 19: 948-58
- [48] Puschhof J, Pleguezuelos-Manzano C, Clevers H. Organoids and organs-on-chips: insights into human gut-microbe interactions. *Cell Host Microbe*, 2021, 29: 867-78
- [49] Yoshihara E, O'connor C, Gasser E, et al. Immune-evasive human islet-like organoids ameliorate diabetes. *Nature*, 2020, 586: 606-11
- [50] Dhamecha D, Movsas R, Sano U, et al. Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: past, present and future. *Int J Pharm*, 2019, 569: 118627
- [51] Du Y, Liang Z, Wang S, et al. Human pluripotent stem-cell-derived islets ameliorate diabetes in non-human primates. *Nat Med*, 2022, 28: 272-82
- [52] Liu H, Li R, Liao HK, et al. Chemical combinations potentiate human pluripotent stem cell-derived 3D pancreatic progenitor clusters toward functional beta cells. *Nat Commun*, 2021, 12: 3330
- [53] Hoglebe NJ, Augsornworawat P, Maxwell KG, et al. Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 460-70
- [54] Akolpoglu MB, Inceoglu Y, Bozuyuk U, et al. Recent advances in the design of implantable insulin secreting heterocellular islet organoids. *Biomaterials*, 2021, 269: 120627
- [55] Tsai PJ, Wang HS, Shyr YM, et al. Transplantation of insulin-producing cells from umbilical cord mesenchymal stem cells for the treatment of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biomed Sci*, 2012, 19: 47
- [56] Kao SY, Shyu JF, Wang HS, et al. Comparisons of differentiation potential in human mesenchymal stem cells from Wharton's Jelly, bone marrow, and pancreatic tissues. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 306158
- [57] Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP. Progress and potential in organoid research. *Nat Rev Genet*, 2018, 19: 671-87
- [58] Xu B, Fan D, Zhao Y, et al. Three-dimensional culture promotes the differentiation of human dental pulp mesenchymal stem cells into insulin-producing cells for improving the diabetes therapy. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1576
- [59] Jung EJ, Kim SC, Wee YM, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells support rat pancreatic islet survival and insulin secretory function *in vitro*. *Cytotherapy*, 2011, 13: 19-29
- [60] Gamble A, Pawlick R, Pepper A R, et al. Improved islet recovery and efficacy through co-culture and co-transplantation of islets with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 2018, 13: e0206449
- [61] Bertolino P, Trescol-Biemont M C, Rabourdin-Combe C. Hepatocytes induce functional activation of naive CD8⁺ T lymphocytes but fail to promote survival. *Eur J Immunol*, 2015, 28: 221-36
- [62] Bertolino P, McCaughan GW, Bowen DG, et al. Role of

- primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol Cell Biol*, 2002, 80: 84-92
- [63] Kaufmann PM, Fiegel HC, Kneser U, et al. Influence of pancreatic islets on growth and differentiation of hepatocytes in co-culture. *Tissue Eng*, 1999, 5: 583
- [64] Jara-Albarrán A, Soto-Montenegro L, del Rio R, et al. Influence of hepatic cells on allogeneic islet transplantation in rats without immunosuppressive drugs. *Horm Metab Res*, 2001, 33: 30-3
- [65] Jun Y, Kang AR, Lee JS, et al. 3D co-culturing model of primary pancreatic islets and hepatocytes in hybrid spheroid to overcome pancreatic cell shortage. *Biomaterials*, 2013, 34: 3784-94
- [66] Tao T, Deng P, Wang Y, et al. Microengineered multi-organoid system from hiPSCs to recapitulate human liver-islet axis in normal and type 2 diabetes. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9: e2103495
- [67] Shi Y, Sun L, Wang M, et al. Vascularized human cortical organoids (vOrganoids) model cortical development *in vivo*. *PLoS Biol*, 2020, 18: e3000705
- [68] Kang S, Park HS, Jo A, et al. Endothelial progenitor cell cotransplantation enhances islet engraftment by rapid revascularization. *Diabetes*, 2012, 61: 866-76
- [69] Quaranta P, Antonini S, Spiga S, et al. Co-transplantation of endothelial progenitor cells and pancreatic islets to induce long-lasting normoglycemia in streptozotocin-treated diabetic rats. *PLoS One*, 2014, 9: e94783