



王琼博士, 上海交通大学医学院组织胚胎学与遗传发育学系研究员, 博导, 上海高校特聘教授(东方学者), 干细胞与再生医学课题组长, 上海市生殖医学重点实验室课题组长。长期利用干细胞和动物模型, 致力于探索干细胞向中内胚层分化的调控机制及其临床应用。例如, 近年来的工作包括了胰腺多潜能细胞的类器官构建、分化和应用。其主要学术论文发表于*Cell Stem Cell*、*Developmental Cell*、*Genes & Development*等杂志上。

胰腺类器官技术的发展及应用

马双羽 赵冰楠 王琼*

(上海交通大学医学院组织胚胎学与遗传发育学系, 上海市生殖医学重点实验室, 上海 200025)

摘要 在人类生物学和疾病的研究过程中, 动物模型扮演了重要的角色。但随着研究的深入, 其局限性也逐渐凸显。新兴的人类类器官(organoid)技术较好地弥补了动物模型的不足。类器官主要是指由干细胞衍生出的3D多细胞微器官。它能在体外模拟组织器官自发的谱系分化与稳态维持, 并具备类似于体内组织器官的生理功能。目前, 类器官培养技术在很多器官(比如胃肠道、食管、肝、胆、脑和膀胱等)中都取得了较好的进展。胰腺是人体内唯一的一个既是外分泌腺又是内分泌腺的特殊脏器。因此, 胰腺类器官技术的发展面临更大的挑战。目前, 胰腺导管类器官和胰岛类器官技术日渐优化, 但如何构建复合型胰腺类器官仍是当前研究的难点。该综述将主要回顾胰腺的发育过程、体外定向分化技术以及胰腺类器官模型构建与应用等最新研究成果, 同时简要探讨胰腺类器官模型具有潜力的发展方向。

关键词 类器官; 胰腺发育; 糖尿病; 胰腺癌; β 细胞疗法; 干细胞疗法

The Development and Application of Pancreatic Organoid Technology

MA Shuangyu, ZHAO Bingnan, WANG Qiong*

(Department of Histo-Embryology, Genetics and Developmental Biology, Shanghai Key Laboratory of Reproductive Medicine, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract In the process of studying human biology and mechanisms underlying disease progression, animal models have played important roles. But in the meantime, their limitations also have gradually become prominent. The emerging human organoid technology has compensated for the insufficiency of animal models. Organoids mainly refer

收稿日期: 2021-04-01 接受日期: 2021-05-08

上海市科学技术委员会自然科学基金(批准号: 20ZR1430400)、上海高校特聘教授(东方学者)岗位计划、上海交通大学新进青年教师启动计划、中国博士后科学基金面上项目(批准号: 2019M651517)和上海交通大学医学院博士后激励计划资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-63846590, E-mail: wangqiong@shsmu.edu.cn

Received: April 1, 2021

Accepted: May 8, 2021

This work was supported by the Natural Science Foundation of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Grant No.20ZR1430400), the Professor of Special Appointment (Eastern Scholar) at Shanghai Institutions of Higher Learning, Shanghai Jiao Tong University Startup Program of Young Teachers, Chinese Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2019M651517), and the Postdoctoral Incentive Program at Shanghai Jiao Tong University School of Medicine

*Corresponding author. Tel: +86-21-63846590, E-mail: wangqiong@shsmu.edu.cn

to 3D (three-dimensional) multicellular tissue cultures derived from stem cells, which mimic the corresponding *in vivo* organs. Organoid constructions have been achieved from several organs including the gastrointestinal tract, esophagus, liver, gallbladder, brain, bladder and so on. The pancreas is unique because it functions as both an exocrine gland and an endocrine gland. Currently, pancreatic duct and islet organoid technologies are under rapid development. However, how to build whole pancreatic organoids with complex structures is still challenging. This review will mainly discuss the latest research about pancreas development and organoid generation. In addition, the perspectives on the application and future studies of pancreatic organoids will also be provided here.

Keywords organoid; pancreas development; diabetes; pancreatic cancer; β cell therapy; stem cell therapy

在过去的数十年间, 动物模型已成为我们解决人体生物医学问题的重要手段。但是无可否认, 人类的基因组结构、信号调控通路、个体发育特点乃至疾病表型与这些模式动物依然存在不小的差异。以基因信息的不一致性为例, 人类只有一个胰岛素基因*INS*, 而小鼠则拥有两个胰岛素基因*Ins1*和*Ins2*。一些常见药物在人类和啮齿类动物的肝脏中有时还存在截然相反的代谢动力学与毒理学特点^[1]。比如临床上广泛使用的消炎止痛药布洛芬和抗凝特效药华法林却可对啮齿类动物产生无法耐受的毒性^[2-3]。人和小鼠的胚胎发育也有着显著的形态学和分子调控机制的差别, 并且人类和小鼠胚胎干细胞所依赖的信号通路也有所不同^[4-16]。此外, 疾病动物模型也存在一些问题。比如, 人囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *CFTR*)突变会导致严重的囊性纤维化疾病, 然而*CFTR*突变小鼠却缺乏类似的症状^[17-20]。因此, 仅利用动物模型去解析人体独特的生物学机制仍然存在许多问题和挑战。

为此, 类器官技术应运而生。类器官是一种在体外环境下培育而成的具有3D结构的多细胞微器官。它不仅拥有类似于体内真实器官的显微解剖特征和复杂结构, 而且能重现其来源组织或器官的部分生理功能。因此, 该技术可以在体外高度模拟人组织器官的发生、维持及病变的过程, 有望弥补模式动物的不足, 在研究发育调控、再生医学、药物筛选以及开发疾病诊疗的新方法等方面具有广阔的应用前景。目前, 类器官主要由多能性干细胞和组织特异性干细胞产生。除了来源于健康组织的类器官, 大量类器官疾病模型也在不断地涌现。这种疾病模型可以通过利用基因编辑技术改造正常的人干细胞或者直接分离病变组织这两种方法进行制备。建立高通量筛选的类器官平台是目前的发展趋势。

虽然类器官研究仍处在初级探索阶段, 但已被公认为生物研究的重要工具, 并具有极其重要的临床应用价值。

胰腺包括外分泌部和内分泌部, 是一种重要的消化和内分泌器官。糖尿病(diabetes)、胰腺炎和胰腺癌等是比较常见的胰腺疾病。目前, 干细胞疗法被视为极具潜力的治疗糖尿病的新兴手段, 并有希望替代或补充传统的治疗方案。若给糖尿病患者进行胰岛(islet of langerhans)或全胰腺移植来补充 β 细胞, 可以有效地稳定患者的血糖^[21]。然而, 供体组织和细胞稀缺是限制胰腺移植技术应用的关键。因此, 如何在体外高效地制备有功能的 β 细胞成为亟待解决的技术难题。研究人员希望通过体外定向分化胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)或诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)来制备可供移植的 β 细胞^[22-25]。然而目前, 无论是通过多能性干细胞还是成体组织干细胞制备得到的 β 细胞都存在效率低下、均质性差以及功能不成熟等问题。2013年, 已有研究利用3D培养的方法在体外重现了胚胎胰腺前体细胞向外分泌细胞、导管细胞和内分泌细胞的三谱系分化过程^[26-27]。此后, 多种原代胰腺组织(导管、腺泡和胰岛)来源的类器官培养方法相关的文章也相继发表, 但类器官分化为成熟 β 细胞的效率依然有待提高^[28-37]。另一种常见的胰腺疾病是胰腺癌。胰腺癌是恶性程度最高的消化系统肿瘤之一, 其特点是病程进展迅速, 然而却缺乏早期诊断标志物及治疗特效药。为了更好地诊断和治疗胰腺癌, 研究人员已经构建了不同时期和不同恶性程度的人或鼠胰腺癌类器官^[38-39], 其中以胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)的类器官技术发展最为成熟。这些模型将为研究胰腺癌发病机制与诊疗方法提供有力的工具。

本文将主要回顾小鼠和人的胰腺发育机制以

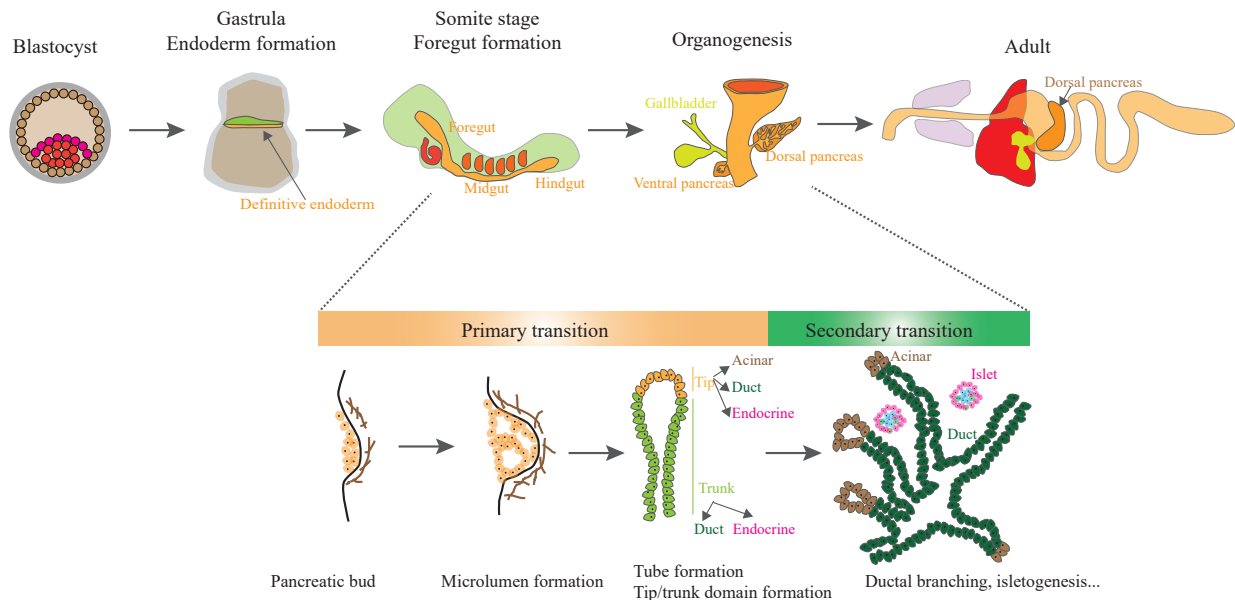
及胰腺类器官模型构建等最新研究成果, 同时还将讨论在胰腺类器官领域具有潜力的研究方向。

1 胰腺的发育与谱系分化机制

胰腺是体内重要的消化和内分泌器官。成熟的胰腺主要由具有外分泌功能的腺泡(acinar)与导管(duct)组织, 以及具有内分泌功能的胰岛组织构成。一方面, 腺泡与导管可以分泌并输送胰淀粉酶和脂肪酶等, 以参与食物的消化。严重的腺泡与导管组织病变可导致PDAC的发生。另一方面, 胰岛则通过分泌胰岛素(insulin)和胰高血糖素(glucagon)等参与血糖代谢。胰岛的体积只占成体胰腺的三分之一, 但在全身的血糖平衡中起着至关重要的作用。胰岛中60%~80%的内分泌细胞属于分泌胰岛素的 β 细胞, 15%~20%为分泌胰高血糖素的 α 细胞, 而分泌生长抑素的 δ 细胞与分泌胰多肽的PP细胞的比例总和则低于10%。胰岛分散在腺泡和导管之间的结缔组织中, 并呈现外围 α 细胞包裹内核 β 细胞的簇状结构。

胰岛附近通常有丰富的血管与少量神经的分布, 参与胰岛素、胰高血糖素的分泌、运输和调节。胰岛中 β 细胞的功能障碍将导致糖尿病的发生。

关于人类胰腺发育的研究工作极为有限。因此, 我们对于胰腺发育机制的了解绝大部分来自于其他模式动物, 特别是小鼠。在胚胎发生过程中, 胰腺原基通过形态发生和谱系分化逐渐发育成胰腺(图1)。着床后的囊胚(blastocyst)通过原肠胚形成(gastrulation)阶段产生定型内胚层(definitive endoderm)。定型内胚层最终发育为胰腺、胸腺、肺、食管、胃、肝脏、胆囊和大小肠等内脏器官。沿着胚胎前后轴, 定型内胚层来源的原肠可以发育成为前肠、中肠和后肠。从小鼠胚胎9.5天(embryonic day 9.5, E9.5)开始, 前肠后部的背侧和腹侧的胰腺原基(pancreatic primordium)细胞受到附近中胚层细胞来源的RA(retinoic acid)、FGF(fibroblast growth factor)和Activin等信号刺激后长出胰芽(pancreatic bud)。通过肠旋转, 两个胰芽首先发生融合, 再通



在胚胎发育过程中, 着床后的囊胚通过原肠胚形成产生定型内胚层。然后, 定型内胚层将逐步分化发育为胰腺、胸腺、肺、食管、胃、肝脏、胆囊和大小肠等内脏器官。沿着胚胎前后轴, 定型内胚层来源的原肠可以分为前肠、中肠和后肠。胰腺前体细胞在原肠前端后缘的背侧和腹侧分别长出一个胰芽。胰芽融合后, 逐渐发育为包含管顶和管腔细胞的管腔结构。这是胰腺发育的初始转变。从小鼠胚胎发育E12.5天开始, 胰芽小管继续分支并分化成胰腺中所有的细胞类型, 包括腺泡细胞、导管细胞和内分泌细胞, 这被称为次级转变。

The pancreas develops from DE (definitive endoderm) formed by embryonic gastrulation after blastocyst implantation. In addition to pancreas, DE also gives rise to the thymus, lung, esophagus, stomach, liver, gallbladder, and intestine. At early somite stage, primitive gut tube is divided into the foregut, midgut and hindgut. Two pancreatic buds appear at the posterior region of foregut on both dorsal and ventral sides and eventually fuse together. Then, the pancreas starts early tubulogenesis to generate multipotent “tip” cells and bipotent “trunk” cells. This process is called the primary transition. From E12.5 (embryonic day 12.5) in mice, the secondary transition initiates. Tip and trunk progenitor cells undergo terminal differentiation to generate ductal, acinar and endocrine cells as pancreas bud carries out further branching morphogenesis.

图1 小鼠胰腺发育与形态发生

Fig.1 Mouse pancreas development and morphogenesis

过小管发生过程(tubulogenesis)逐渐发育为独特的管腔结构,这被称为胰腺发育的初始转变(primary transition)^[40]。其中,一部分细胞发育为*Pdx1*⁺/*Ptf1a*⁺/*Sox9*⁺多潜能胰腺前体(祖)细胞(multipotent pancreatic progenitor cells, MPCs)。这部分多潜能胰腺前体细胞可以发育为胰腺的任一谱系细胞,并作为管顶端(tip)细胞引领着小管的生长和迁移,而管腔(trunk)细胞只具有向导管和内分泌细胞分化的双向潜能(bipotency)。大约从小鼠E12.5天开始,胰腺发育出现次级转变(secondary transition):胰芽小管通过分支化形态发生(branching morphogenesis)显著扩张;管顶端细胞逐渐失去多潜能性,转变成仅能分化为腺泡细胞的单潜能细胞,而管腔细胞依然保持双潜能性;腺泡细胞逐渐聚集在导管的末端,而成团的内分泌细胞通过分层的方式从分支中脱离后,散布于器官中。至此,胰腺的基本结构已经形成。目前,内分泌细胞脱离管组织进行发育的机制尚不明确。邻近的间质细胞和血管可能在这一过程中释放了重要的诱导信号^[41-42]。小鼠出生后,胰腺器官进一步发育成熟,而管腔细胞会逐渐变成导管内的单潜能细胞。

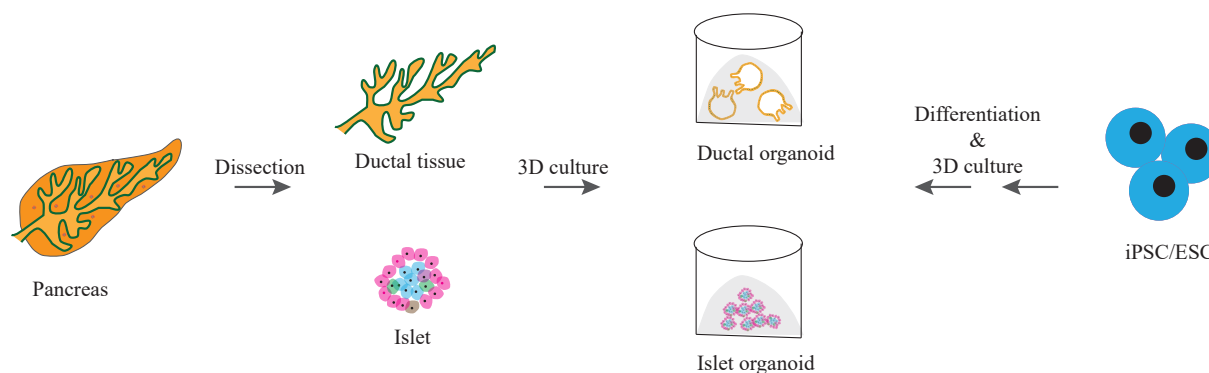
虽然人类和小鼠的胰腺发育过程较为相似,但仍然存在一定的差异^[43]。首先,人类的正常妊娠期约为40周。胚胎期主要是指受精后的前8周,之后被称为胎儿期。小鼠的胰腺发育始于妊娠中期,并在妊娠后期和出生后持续地分化和成熟,而人的胰

腺在胚胎期已经发育成熟。其次,人胰腺前体细胞的数量比小鼠更多。此外,调控两者胰腺发育的信号机制也不尽相同。毋庸置疑,还有更多未知的人特异性的发育调控机制有待发掘。而有望重现体内发育过程的胰腺类器官技术将推进相关的研究的进展。

2 胰腺类器官培养体系

最早的类器官研究可以追溯至1975年, PITOT实验室^[44]利用大鼠尾胶原悬浮培养肝细胞。这些3D培养的肝细胞不仅重现了体内肝细胞的形态发生过程,而且具有分泌细胞色素P450的功能^[44-45]。随后,具有腺泡发生与泌乳能力的乳腺类器官模型也被成功构建^[46-48]。近年来,随着人们对器官发育过程与干细胞认识的不断加深,类器官技术已经在胃、肠、食管、肝、气管、膀胱等组织器官中逐渐发展为一种常用的研究手段^[49-54]。值得注意的是,新兴的类器官技术与传统的肿瘤3D类球体(spheroid)并不等同。类器官主要是指由干细胞分化而成的具有体内组织器官显微结构特征和相似功能的微小组织结构。它包含多种细胞,并且需要受到生长因子的刺激才能在基质中形成3D结构。

胰腺类器官可以通过胰腺组织的离体培养和多能性干细胞分化培养两种方式获得(图2)。一方面,研究人员可以从成熟的胰腺中分离出导管、腺泡和胰岛组织,进而将其培养成导管或胰岛的类器官^[55];



胰腺类器官可以通过胰腺组织(导管、腺泡和胰岛)离体培养和多能性干细胞分化培养两种方法获得。一方面,研究人员可以从成熟的胰腺中分离、纯化得到导管和胰岛组织,在适当的培养条件下将它们在体外培养和传代;另一方面,多能性干细胞(iPSC/ESC)可以在体外定向分化为胰腺前体细胞,再进一步分化为不同类型的胰腺类器官。

Pancreas organoids can be derived either from mature pancreas tissue such as duct, acini and islet of langerhans, or from pluripotent stem cells. On one hand, duct and islet tissues can be isolated from pancreas to establish pancreas organoid *in vitro* under appropriate culture conditions. On the other hand, pluripotent stem cells can be induced into pancreatic progenitors, which further differentiate and aggregate to form organoids in culture.

图2 胰腺导管类器官和胰岛类器官的制备方法

Fig.2 Methods for the preparation of pancreatic ductal and islet organoids

另一方面,还可以将多能性干细胞在体外定向分化为胰腺前体细胞,再通过3D培养的方法将其分化为不同类型的胰腺类器官^[38]。

在体内,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)除了为细胞提供物理支持外,对细胞的黏附、生长、分化、信号传导以及干性维持等都具有重要的作用。类器官技术通常使用商业化的细胞外基质提取物来模拟这种微环境,包括Matrigel、Collagen、Fibronectin和Laminin等。其中,最常用的Matrigel属于基底膜提取物,是一种主要由层黏连蛋白(laminin)和IV型胶原(collagen IV)构成的天然水溶胶。因为Matrigel等天然提取物来源于动物且成分复杂,所以在其中培养的一类器官不能用于临床。近年来,一些研究人员开始尝试制备人工水溶胶以用于类器官的培养^[56]。这种人工水溶胶成分明确,并具有良好的生物相容性、较低的毒性与免疫原性,提高了类器官移植治疗人类疾病的可行性。

除了通过细胞表面整合素蛋白感受细胞外基质等物理刺激外,类器官还需要通过细胞表面受体和胞内信号分子接收形态发生因子等的化学刺激,作出诸如生长、分化等响应。2013年,GRAPIN-BOTTON实验室^[26]利用含有EGF(endothelial growth factor)、FGF10和R-spondin的培养体系对发育中的小鼠胰腺组织进行了3D离体培养,部分重现了体内胰腺的发育过程。这项研究首次成功地建立了胰腺组织来源的类器官。但是,这种胰腺类器官主要由具有导管细胞特性的上皮样细胞组成,并不包含内分泌组织。同年,WNT-Lgr5/R-spondin信号轴被证实对于体外扩增培养小鼠胰腺组织是必需的^[30-31]。随后,人和小鼠胰腺癌组织来源的类器官也相继被建立。与2D培养的癌细胞系相比,这种胰腺癌类器官能在体外长期稳定地保持原有癌组织的癌基因突变类型和病变特征^[39]。此外,利用人多能性干细胞也可以构建出类似的胰腺类器官,其主要以导管细胞为主,包含少量的腺泡细胞。如果在胰腺类器官中过表达癌基因,则可以诱导其转变为类似于PDAC的类器官^[38]。

除了胰腺导管类器官外,胰岛或胰岛样类器官(islet-like organoid)技术也逐渐兴起。多个研究先后报道,利用多能性干细胞分化可获得胰岛样类器官^[23-24,57-58]。当把胰岛样类器官移植到糖尿病小鼠体内后,小鼠的血糖平衡能力得到了较好的恢复。

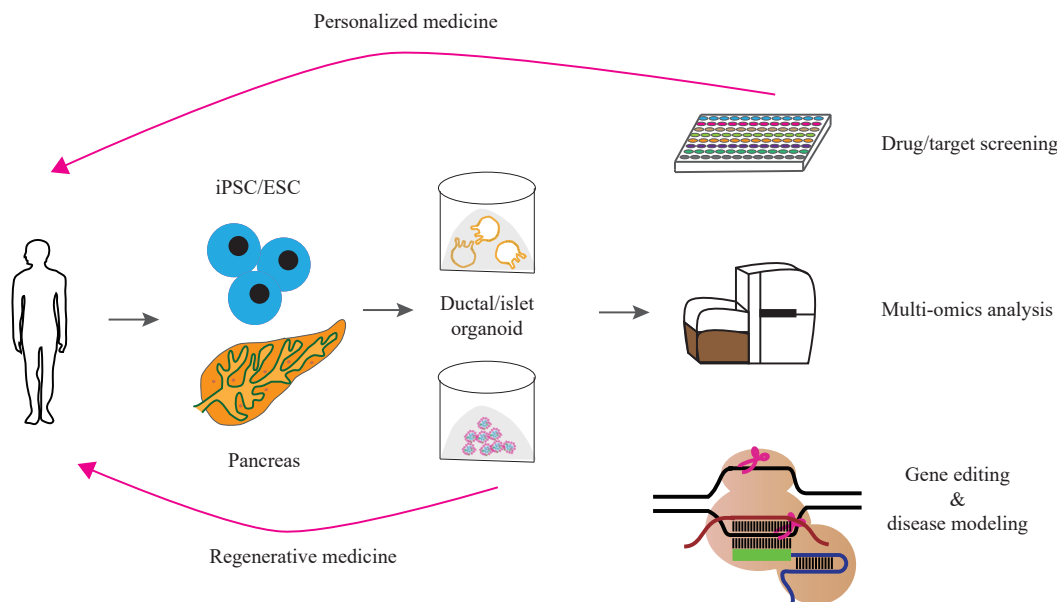
最近,曾艺团队^[59]从小鼠胰岛中分离出一种内分泌前体细胞,在3D培养的条件下,这种前体细胞能连续地传代扩增。这为构建复合功能性的胰岛类器官技术开辟了新的思路。与此同时,各种基于胰岛类器官技术的应用也快速发展起来。KARP等^[60]利用胰岛类器官来筛选促进 β 细胞体外增殖的小分子。EGLI等^[61]通过结合基因编辑与胰岛类器官体外分化技术成功纠正了先天性糖尿病病人的致病突变,并且有效恢复了 β 细胞的正常功能。此外, β 细胞的自身免疫性破坏是造成糖尿病的重要原因之一。因此,如何制造和优化逃避免疫攻击的胰岛样类器官也是目前的研究热点,这将进一步推动胰岛样类器官移植的临床转化^[62-63]。

虽然胰腺导管类器官和胰岛类器官技术都取得了一定的成功,但是如何构建一个同时拥有内分泌和外分泌功能的完整胰腺类器官体系仍然有待探索。不少胰腺疾病往往会同时累及内分泌部和外分泌部,因此,构建具有多谱系分化潜能的胰腺类器官势在必行。在胚胎发育早期,多能性胰腺前体细胞具有向导管、腺泡和胰岛分化的潜能。但在成体胰腺中,是否存在类似的多能性干细胞群体仍然存有争议^[64-65]。目前,研究报道的胰腺类器官主要依赖EGF、FGF和WNT信号通路来维持体外增殖的能力。同时,通过抑制TGF(transforming growth factor)和BMP(bone morphogenetic protein)信号通路还能进一步提高胰腺类器官的培养效率。只有进一步挖掘胰腺发育与稳态维持的分子机制,才能更好地构建优质的胰腺类器官。

3 胰腺类器官的应用

近年来,类器官作为一种新兴的技术手段逐渐被熟知并广泛应用于生物研究。相比于传统的动物实验,类器官不仅可在体外真实再现体内组织器官的结构特点、表型和性状,还具有可在体外扩增、传代和进行高通量筛选的优势。在临床上,人胰腺的供体不足和取材困难不仅限制了胰腺相关疾病的研究,而且延误了等待接受胰腺或胰岛移植病人的治疗时机。因此,胰腺类器官技术在精准医学和再生医学等领域中具有重要的应用前景(图3)。

胰腺癌是目前生存期最短的癌症之一,不仅缺乏有效的治疗手段,而且癌症患者的个体异质性使得常规药物治疗结果难以预测。如果能借助一个可



病人特异性的胰腺类器官模型可以通过病人来源的胰腺组织或多能性干细胞来构建, 它们在个体化医疗和再生医学领域具有巨大的前景。胰腺类器官技术与多组学诊断、药物靶点筛选以及基因编辑技术的结合将会有益于疾病诊断和治疗。

Patient-derived pancreas organoids are generated from human tissues or pluripotent stem cells, which have great prospects for personalized and regenerative medicine. For examples, pancreas organoids combined with multi-omics diagnosis, drug target-based screening and gene editing techniques will benefit the diagnosis and treatment of disease.

图3 胰腺类器官在精准医学和再生医学中的应用

Fig.3 Application of pancreas organoids in personalized and regenerative medicine

靠的体系进行药物的筛选和测试, 将有助于指导医生的诊疗和预后判断。如今, 在个性化药物筛选中, 胰腺癌类器官技术的重要性逐渐凸显^[38]。此外, 随着类器官技术与多组学分析手段的结合, 研究人员更加深入地阐明了胰腺癌病程进展的新机制, 拓宽了胰腺癌治疗和诊断的思路^[39]。

糖尿病目前影响着全世界上亿的病人, 然而在疾病研究与治疗中却始终缺乏病人特异性的疾病模型。胰腺类器官技术有望在体外模拟胰腺的发育过程, 并有利于构建糖尿病模型, 从而进一步促进对糖尿病机制的研究。例如, 研究者们通过病人来源的诱导性多能干细胞建立了胰腺样类器官模型^[1,66]。借助该模型, 他们不仅发现了WNT4可以促进 β 细胞的体外分化和成熟, 而且发现了过表达程序性细胞死亡配体1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)的人胰岛样类器官可以在免疫功能正常的小鼠体内存活并维持血糖水平^[62]。

4 总结与展望

胰腺类器官技术在近年来取得了较大的进展。研究人员利用小鼠和人的胰腺组织成功构建了胰腺

类器官培养体系。此外, 研究人员还通过多能性干细胞体外定向分化技术获得了各种类型的胰腺类器官。这极大丰富了胰腺类器官的供体来源。与此同时, 胰腺类器官模型也促进了研究人员对胰腺癌、胰腺发育以及糖尿病诊治等的深入认识。

然而, 胰腺类器官技术向临床转化仍然存在较大的挑战。首先, 体外培养的胰腺类器官如何最大化重现胰腺的生物学功能? 目前, 虽然导管和胰岛类器官可以模拟简单的胰腺形态发生和生理功能, 但是其细胞功能仍然不太成熟。不断优化现有的培养条件是实现类器官功能成熟的必经之路。其次, 如何构建具有多种细胞类型的复合型胰腺类器官是另一个挑战。胰腺的多种细胞类型之间存在着直接与间接的相互交流与调节机制, 而现有的导管和胰岛类器官还没有建立完善的相互兼容的培养体系。简单的类器官共培养难以构建具有生物学功能的复合型胰腺类器官。最近发展起来的微流控芯片为构建复合型类器官带来了新的思路。该技术在胰腺多谱系类器官系统中的应用值得期待。最后, 如何降低制备成本, 并确保规模化生产的胰腺类器官的质量是从基础研究进入临床应用所必须克服的瓶颈。

胰腺类器官技术虽然取得了初步的成功,但是其分化的异质性和构建效率的差异性依然存在。开发新的基质材料和分化培养基配方等将有利于提高胰腺类器官体系的稳定性,还可以降低实验成本,提高基于胰腺类器官技术的药物筛选和移植应用的可能性。这些问题的解决势必将推动胰腺类器官技术在精准医学与再生医学中的成功转化。

参考文献 (References)

- [1] KIM J, KOO B K, KNOBLICH J A. Human organoids: model systems for human biology and medicine [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(10): 571-84.
- [2] SANO H, HORIGUCHI A, SUGIHARA K, et al. Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using chimeric mice with human hepatocytes [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40(12): 2267-72.
- [3] INOUE T, NITTA K, SUGIHARA K, et al. CYP2C9-catalyzed metabolism of S-warfarin to 7-hydroxywarfarin *in vivo* and *in vitro* in chimeric mice with humanized liver [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(12): 2429-33.
- [4] SMITH A G, HEATH J K, DONALDSON D D, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides [J]. *Nature*, 1988, 336(6200): 688-90.
- [5] WILLIAMS R L, HILTON D J, PEASE S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells [J]. *Nature*, 1988, 336(6200): 684-7.
- [6] YING Q L, WRAY J, NICHOLS J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal [J]. *Nature*, 2008, 453(7194): 519-23.
- [7] NICHOLS J, JONES K, PHILLIPS J M, et al. Validated germ-line-competent embryonic stem cell lines from nonobese diabetic mice [J]. *Nat Med*, 2009, 15(7): 814-8.
- [8] TESAR P J, CHENOWETH J G, BROOK F A, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2007, 448(7150): 196-9.
- [9] BRONS I G, SMITHERS L E, TROTTER M W, et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos [J]. *Nature*, 2007, 448(7150): 191-5.
- [10] GAFNI O, WEINBERGER L, MANSOUR A A, et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2013, 504(7479): 282-6.
- [11] CHAN Y S, GÖKE J, NG J H, et al. Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 663-75.
- [12] WARE C B, NELSON A M, MECHAM B, et al. Derivation of naive human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(12): 4484-9.
- [13] THEUNISSEN T W, POWELL B E, WANG H, et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(4): 524-6.
- [14] GUO G, VON MEYENN F, ROSTOVSKAYA M, et al. Epigenetic resetting of human pluripotency [J]. *Development*, 2017, 144(15): 2748-63.
- [15] GUO G, VON MEYENN F, SANTOS F, et al. Naive pluripotent stem cells derived directly from isolated cells of the human inner cell mass [J]. *Stem Cell Rep*, 2016, 6(4): 437-46.
- [16] TAKASHIMA Y, GUO G, LOOS R, et al. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human [J]. *Cell*, 2015, 162(2): 452-3.
- [17] ROGERS C S, HAO Y, ROKHLINA T, et al. Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(4): 1571-7.
- [18] ROGERS C S, ABRAHAM W M, BROGDEN K A, et al. The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(2): L240-63.
- [19] ROGERS C S, STOLTZ D A, MEYERHOLZ D K, et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs [J]. *Science*, 2008, 321(5897): 1837-41.
- [20] SUN X, YAN Z, YI Y, et al. Adeno-associated virus-targeted disruption of the CFTR gene in cloned ferrets [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(4): 1578-83.
- [21] LYSY P A, WEIR G C, BONNER-WEIR S. Making β cells from adult cells within the pancreas [J]. *Curr Diab Rep*, 2013, 13(5): 695-703.
- [22] CHENG X, YING L, LU L, et al. Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(4): 371-84.
- [23] PAGLIUCA F W, MILLMAN J R, GURTLER M, et al. Generation of functional human pancreatic beta cells *in vitro* [J]. *Cell*, 2014, 159(2): 428-39.
- [24] 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): 1121-33.
- [25] SNEDDON J B, BOROWIAK M, MELTON D A. Self-renewal of embryonic-stem-cell-derived progenitors by organ-matched mesenchyme [J]. *Nature*, 2012, 491(7426): 765-8.
- [26] GREGGIO C, DE FRANCESCHI F, FIGUEIREDO-LARSEN M, et al. Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development *in vitro* [J]. *Development*, 2013, 140(21): 4452-62.
- [27] SUGIYAMA T, BENITEZ C M, GHODASARA A, et al. Reconstituting pancreas development from purified progenitor cells reveals genes essential for islet differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(31): 12691-6.
- [28] BONNER-WEIR S, TANEJA M, WEIR G C, et al. *In vitro* cultivation of human islets from expanded ductal tissue [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(14): 7999-8004.
- [29] GAO R, USTINOV J, KORSGREN O, et al. *In vitro* neogenesis of human islets reflects the plasticity of differentiated human pancreatic cells [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(11): 2296-304.
- [30] HUCH M, BONFANTI P, BOJ S F, et al. Unlimited *in vitro* expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis [J]. *EMBO J*, 2013, 32(20): 2708-21.
- [31] JIN L, FENG T, SHIH H P, et al. Colony-forming cells in the adult mouse pancreas are expandable in Matrigel and form endocrine/acinar colonies in laminin hydrogel [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(10): 3907-12.
- [32] RAMIYA V K, MARAIST M, ARFORS K E, et al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated *in vitro* from pancreatic stem cells [J]. *Nat Med*, 2000, 6(3): 278-82.

- [33] ROVIRA M, SCOTT S G, LISS A S, et al. Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(1): 75-80.
- [34] YATOH S, DODGE R, AKASHI T, et al. Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to beta-cells [J]. *Diabetes*, 2007, 56(7): 1802-9.
- [35] MINAMI K, OKUNO M, MIYAWAKI K, et al. Lineage tracing and characterization of insulin-secreting cells generated from adult pancreatic acinar cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(42): 15116-21.
- [36] SEABERG R M, SMUKLER S R, KIEFFER T J, et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(9): 1115-24.
- [37] SMUKLER S R, ARNTFIELD M E, RAZAVI R, et al. The adult mouse and human pancreas contain rare multipotent stem cells that express insulin [J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(3): 281-93.
- [38] HUANG L, HOLTZINGER A, JAGAN I, et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids [J]. *Nat Med*, 2015, 21(11): 1364-71.
- [39] BOJ S F, HWANG C I, BAKER L A, et al. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer [J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 324-38.
- [40] BENITEZ C M, GOODYER W R, KIM S K. Deconstructing pancreas developmental biology [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(6): 353-61.
- [41] PURI S, HEBROK M. Cellular plasticity within the pancreas—lessons learned from development [J]. *Dev Cell*, 2010, 18(3): 342-56.
- [42] MAGENHEIM J, ILOVICH O, LAZARUS A, et al. Blood vessels restrain pancreas branching, differentiation and growth [J]. *Development*, 2011, 138(21): 4743-52.
- [43] JENNINGS R E, BERRY A A, STRUTT J P, et al. Human pancreas development [J]. *Development*, 2015, 142(18): 3126-37.
- [44] MICHALOPOULOS G, PITOT H C. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations [J]. *Exp Cell Res*, 1975, 94(1): 70-8.
- [45] MICHALOPOULOS G, SATTLER C A, SATTLER G L, et al. Cytochrome P-450 induction by phenobarbital and 3-methylcholanthrene in primary cultures of hepatocytes [J]. *Science*, 1976, 193(4256): 907-9.
- [46] EMERMAN J T, PITELKA D R. Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes [J]. *In Vitro*, 1977, 13(5): 316-28.
- [47] EMERMAN J T, ENAMI J, PITELKA D R, et al. Hormonal effects on intracellular and secreted casein in cultures of mouse mammary epithelial cells on floating collagen membranes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(10): 4466-70.
- [48] BISSELL M J, HALL H G, PARRY G. How does the extracellular matrix direct gene expression [J]? *J Theor Biol*, 1982, 99(1): 31-68.
- [49] MCCracken K W, AIHARA E, MARTIN B, et al. Wnt/ β -catenin promotes gastric fundus specification in mice and humans [J]. *Nature*, 2017, 541(7636): 182-7.
- [50] FUJII M, MATANO M, TOSHIMITSU K, et al. Human intestinal organoids maintain self-renewal capacity and cellular diversity in niche-inspired culture condition [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(6): 787-93, e6.
- [51] ZHANG Y, YANG Y, JIANG M, et al. 3D modeling of esophageal development using human PSC-derived basal progenitors reveals a critical role for Notch signaling [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4): 516-29, e5.
- [52] MUN S J, RYU J S, LEE M O, et al. Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(5): 970-85.
- [53] CHEN Y W, HUANG S X, DE CARVALHO A, et al. A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(5): 542-9.
- [54] KIM E, CHOI S, KANG B, et al. Creation of bladder assembloids mimicking tissue regeneration and cancer [J]. *Nature*, 2020, 588(7839): 664-9.
- [55] HUCH M, KOO B K. Modeling mouse and human development using organoid cultures [J]. *Development*, 2015, 142(18): 3113-25.
- [56] CRUZ-ACUÑA R, QUIRÓS M, FARKAS A E, et al. Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(11): 1326-35.
- [57] RUSS H A, PARENT A V, RINGLER J J, et al. Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells *in vitro* [J]. *EMBO J*, 2015, 34(13): 1759-72.
- [58] NOSTRO M C, SARANGI F, YANG C, et al. Efficient generation of NKX6-1⁺ pancreatic progenitors from multiple human pluripotent stem cell lines [J]. *Stem Cell Rep*, 2015, 4(4): 591-604.
- [59] WANG D, WANG J, BAI L, et al. Long-term expansion of pancreatic islet organoids from resident procr⁺ progenitors [J]. *Cell*, 2020, 180(6): 1198-211, e19.
- [60] YANG K, LEE M, JONES P A, et al. A 3D culture platform enables development of zinc-binding prodrugs for targeted proliferation of β cells [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(47): eabc3207.
- [61] MA S, VIOLA R, SUI L, et al. β cell replacement after gene editing of a neonatal diabetes-causing mutation at the insulin locus [J]. *Stem Cell Rep*, 2018, 11(6): 1407-15.
- [62] YOSHIHARA E, O'CONNOR C, GASSER E, et al. Immune-evasive human islet-like organoids ameliorate diabetes [J]. *Nature*, 2020, 586(7830): 606-11.
- [63] ALAGPULINSA D A, CAO J J L, DRISCOLL R K, et al. Alginate-microencapsulation of human stem cell-derived β cells with CXCL12 prolongs their survival and function in immunocompetent mice without systemic immunosuppression [J]. *Am J Transplant*, 2019, 19(7): 1930-40.
- [64] XU X, D'HOKER J, STANGÉ G, et al. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas [J]. *Cell*, 2008, 132(2): 197-207.
- [65] KOPP J L, DUBOIS C L, SCHAFFER A E, et al. Sox9⁺ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas [J]. *Development*, 2011, 138(4): 653-65.
- [66] DROST J, CLEVERS H. Translational applications of adult stem cell-derived organoids [J]. *Development*, 2017, 144(6): 968-75.