

· 综述 ·

功能胰腺 β 细胞获取与应用的研究进展

向桂齐阳^{1,2}, 刘清桂¹, 胡以平¹, 王敏君¹, 陈费¹

1 中国人民解放军海军军医大学 基础医学院 细胞生物学教研室, 上海 200433

2 中国人民解放军海军军医大学 基础医学院 学员六大队, 上海 200433

向桂齐阳, 刘清桂, 胡以平, 王敏君, 陈费. 功能胰腺 β 细胞获取与应用的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(9): 3316-3328.
XIANG GQY, LIU QG, HU YP, WANG MJ, CHEN F. Acquisition and application of functional pancreatic β cells: a review.
Chin J Biotech, 2022, 38(9): 3316-3328.

摘要: 胰腺 β 细胞生成和分泌的胰岛素对维持人体正常血糖起到关键作用, 胰岛素分泌不足或利用缺陷将会导致糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 的发生。经典的 DM 治疗方法包括药物治疗和胰岛移植, 新兴的胰腺 β 细胞替代疗法可以使患者摆脱对药物的依赖并且可以缓解胰岛移植供体缺乏的难题。通过重编程技术或者定向诱导干细胞分化等方法可以获得胰腺 β 样细胞, 相关功能已经在体外细胞和动物体内水平得以验证。有些医院已开展了 β 细胞替代疗法的临床试验。体外获取具有功能的胰腺 β 样细胞有望成为临床 DM 细胞治疗的可靠来源。文中总结了胰腺 β 细胞主要获取方式, 讨论了现有方法存在的问题, 为将来获取和应用功能胰腺 β 细胞提供了思路。

关键词: 糖尿病; 干细胞; 类器官; 胰腺 β 细胞; 分化

Acquisition and application of functional pancreatic β cells: a review

XIANG Guiqiyang^{1,2}, LIU Qinggui¹, HU Yiping¹, WANG Minjun¹, CHEN Fei¹

1 Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

2 The 6th Student Regiment, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Insulin is produced and secreted by pancreatic β cells in the pancreas, which plays a key role

Received: April 16, 2022; **Accepted:** June 6, 2022; **Published online:** June 9, 2022

Supported by: Natural Science Foundation of Shanghai (21ZR1477400); Key Discipline Construction Project of Naval Academy (Biotechnology Major); Talent Development Foundation of Shanghai (2021080)

Corresponding author: CHEN Fei. E-mail: feelchen@smmu.edu.com

基金项目: 上海市自然科学基金 (21ZR1477400); 海军院校学科专业重点建设项目 (生物技术专业); 上海市人才发展资金 (2021080)

in maintaining euglycemia. Insufficient secretion or deficient usage of insulin is the main cause of diabetes mellitus (DM). Drug therapy and islets transplantation are classical treatments for DM. Pancreatic β cell replacement therapy could help patients to get rid of drugs and alleviate the problem of lacking in transplantable donors. Pancreatic β -like cells can be acquired by cell reprogramming techniques or directed induction of stem cell differentiation. These cells are proved to be functional both *in vitro* and *in vivo*. Some hospitals have already performed clinical trials for pancreatic β cell replacement therapy. Functional pancreatic β -like cells, which obtained from *in vitro* pathway, could be a reliable source of cell therapy for treating DM. In this review, the approaches of obtaining pancreatic β cells are summarized and the remaining problems are discussed. Some thoughts are provided for further acquisition and application of pancreatic β cells.

Keywords: diabetes mellitus; stem cell; organoid; pancreas β cell; differentiation

胰岛组织中的 β 细胞是生理状态下唯一产生胰岛素的细胞^[1], 胰岛素对维持机体血糖稳态起到了至关重要的作用, 胰岛素分泌不足或者利用缺陷会导致糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 的发生^[2]。治疗 DM 的经典方法是注射外源胰岛素, 胰岛移植的成功为治疗 DM 提供了新的发展方向^[3]。体外通过不同的细胞获取具有功能的胰腺 β 细胞, 为解决胰岛移植时供体短缺的问题提供了新的思路。目前报道有胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs)、诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)、间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 和肝脏细胞等可以通过不同方式分化成具有胰岛素分泌功能的 β 样细胞 (β -like cells)^[4-9]。然而, 这些方法在实际应用中面临着分化效率不高、分泌功能不全、细胞免疫排斥以及体内致瘤性等问题^[10]。本文总结了现有体外获得胰腺 β 样细胞的方法, 概述了不同来源细胞在应用时的潜在问题, 讨论了针对这些问题的解决方案, 并展望了未来胰腺 β 细胞替代疗法治疗 DM 的前景。

1 胰腺 β 细胞与糖尿病

胰腺主要由外分泌部的腺泡和导管以及内

分泌部的胰岛组成。胰岛包含分泌高血糖素 (glucagon) 的 α 细胞、分泌胰岛素 (insulin) 的 β 细胞、分泌生长抑素 (somatostatin) 的 δ 细胞和少量分泌胰多肽 (pancreatic polypeptide, PP) 的 PP 细胞。 β 细胞是人体内唯一可以分泌胰岛素的细胞, 胰岛素对保持血糖的动态平衡起到至关重要的作用^[1]。DM 是胰岛素分泌不足或利用缺陷所导致的以高血糖为特征的慢性代谢疾病, 最常见的类型为 1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 和 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)^[2]。T 细胞介导的自身免疫反应攻击胰腺 β 细胞导致胰岛素分泌不足是 T1DM 的主要病因^[11], T2DM 则主要由与环境、遗传等因素相关的胰岛素抵抗和胰岛素分泌相对不足导致^[12]。DM 需进行早期诊断和干预, 以防止或减缓其涉及其他器官的潜在并发症, 如糖尿病肾病、视网膜病变、神经病变、心血管疾病和糖尿病足等^[2,11,13-14]。同时, DM 也是多种疾病的并发症^[13], 例如最近的研究发现 SARS-CoV-2 可以感染人胰腺 β 细胞并导致感染者出现高血糖症状, 甚至发生酮症酸中毒; 患有 DM 的感染者的预后较未患 DM 的感染者也更差^[15-18]。根据国际糖尿病联盟 (International Diabetes

Federation, IDF) 2021 年的数据, 全球成年人中有大约 5.37 亿的 DM 患者, 这一数字在未来数十年内还将持续增长^[19], 这对于国家、社会和患者家庭都是巨大的负担。

2 β 细胞替代疗法和功能胰腺 β 细胞的获取

目前, 外源胰岛素注射是针对 T1DM、晚期 T2DM 和一部分单基因糖尿病的标准疗法, 但其无法完全替代内分泌系统对血糖的控制, 也难以避免急慢性并发症的发生^[10]。胰岛移植 (islet transplantation) 成功使 T1DM 患者实现了脱离胰岛素的长期血糖动态平衡, 展现出了 β 细胞替代疗法的巨大潜力^[3]。但胰岛移植存在供体胰岛细胞短缺和免疫排斥等问题, 因此并未广泛开展^[20]。干细胞分化得到的胰腺 β 样细

胞作为候选供体细胞, 有望解决供体短缺问题。ECSs 和 iPSCs 可以分化为表达成熟胰岛标志的 β 样细胞, 并且可以在实验动物体内实现血糖敏感的胰岛素分泌^[4-7]。此外, 将成体干细胞如 MSCs、肝干/前体细胞、胰腺干/前体细胞等作为 β 细胞替代疗法的细胞来源也取得了一定进展^[8-9] (图 1)。

2.1 胰岛移植

临床胰岛移植开始于 20 世纪 80 年代, 对于频繁发生严重低血糖和血糖极度不稳定的患者, 胰岛移植是目前最合适的治疗方式^[21]。捐献者的胰腺经过胶原酶灌注和胰岛分离机 Ricordi Chamber 的处理获得胰岛, 所获得的胰岛经过进一步的纯化和体外培养经过门静脉输注到患者体内以发挥胰岛素分泌的功能^[20]。Shapiro 等^[22]在 2000 年建立了“埃德蒙顿方案 (Edmonton Protocol)”, 运用他克莫司 (tacrolimus)、

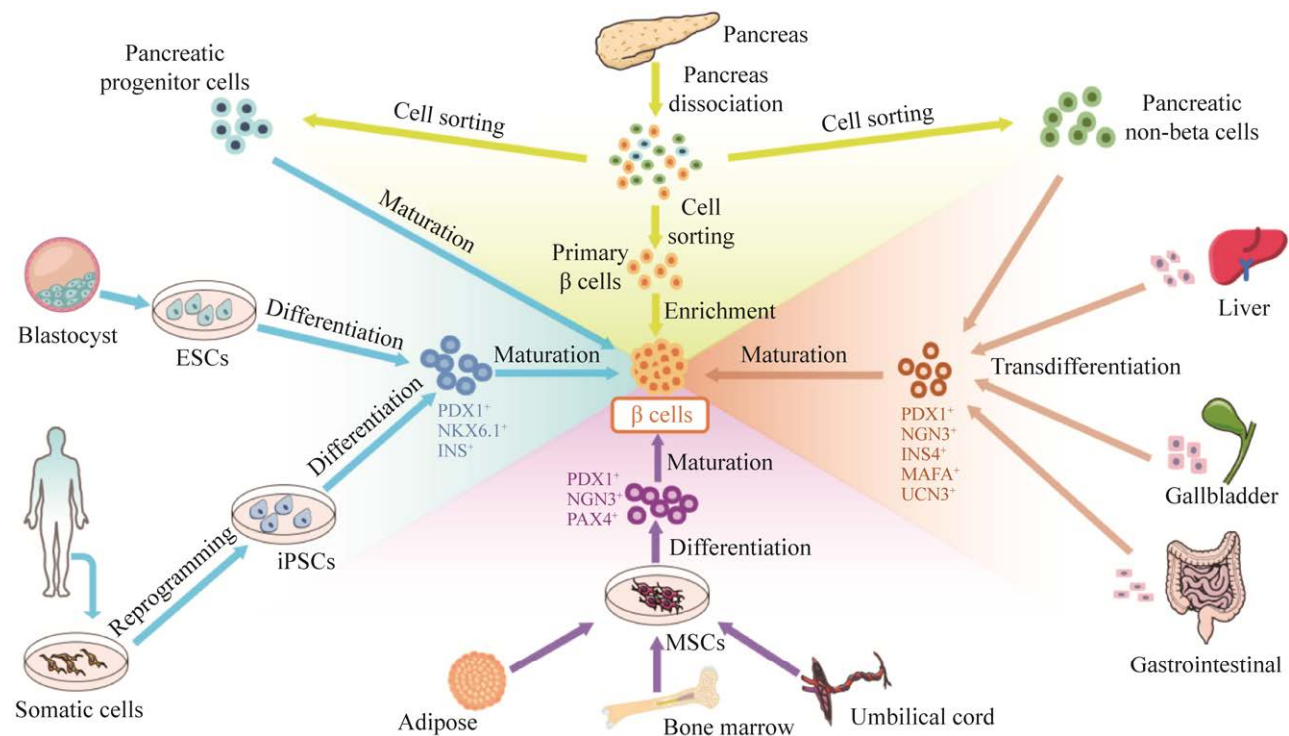


图 1 胰腺 β 细胞的获取

Figure 1 Acquisition of pancreatic β cells.

雷帕霉素 (Rapamycin) 和达克珠单抗 (Daclizumab) 取代了具有 β 细胞毒性的糖皮质激素对患者进行免疫抑制, 使胰岛移植这一 β 细胞替代疗法得以在临床广泛运用。目前胰岛移植患者术后一年生存率达到 95%–98%, 超过 80% 的患者血糖得到控制, 糖化血红蛋白 (glycosylated hemoglobin, HbA1c) 降低, 部分患者可以摆脱对胰岛素的依赖^[23-24]。立即经血液介导的炎症反应 (instant blood mediated inflammatory reaction, IBMIR)、免疫排斥和氧化应激等影响移植效果的问题有待通过改良移植术式、优化药物组合或者细胞治疗等方式加以解决; 干细胞技术和异种移植技术则有望克服供体短缺的问题^[20]。

2.2 胚胎干细胞

ESCs 是来源于内细胞团的高度未分化细胞, 具有多向分化潜能和自我更新能力^[10], 此前的研究证明体外培养的 ESCs 可以自发分化为胰岛素分泌细胞 (insulin-producing cells, IPCs), 但是效率很低^[25]。Kubo 等^[26]和 Kahan 等^[27]在体外诱导分化 ESCs 获得了胰腺内胚层细胞 (pancreas endoderm cells, PECs), D'Amour 等^[28]则第一个将 ESCs 分化为表达 β 细胞标志物胰十二指肠同源盒 1 (pancreas duodenal homeobox 1, PDX1) 和同源盒蛋白 6.1 (NK homeobox factor 6.1, NKX6.1) 的胰腺内分泌细胞 (图 1)。通过 Pagliuca 等^[29]和 Reznika 等^[30]建立的体外分化方案获得的功能胰腺 β 细胞不仅可以响应葡萄糖刺激并分泌胰岛素, 而且这些细胞在移植到 DM 小鼠体内之后可以改善其高血糖状态。ViaCyte 公司和 Vertex 公司分别采用了两种不同的策略于 2014 年和 2021 年开始了临床试验, 但是受限于临床数据的缺乏和免疫抑制方案的不完善, 其安全性和有效性仍有待进一步地确认和优化^[31]。在最近的研究中, Nair 等^[5]运用流式细胞分选术 (fluorescence activated cell

sorting, FACS) 将体外培养的未成熟的 β 样细胞进行重聚集后继续培养获得了功能更好的 β 样细胞, 证明了未成熟 β 样细胞的聚集对其后续成熟和分化为具有更强动态胰岛素分泌功能的细胞具有重要作用。这一策略不仅增加了干细胞来源 β 细胞 (stem cell-derived beta cells, SC- β C) 和成体胰腺 β 细胞的结构相似性, 也增加了二者在转录组学和功能上的相似性。TGF- β 通路的激活在胰腺发育和干细胞向 β 细胞分化过程中起关键作用, 但其对于 β 细胞胰岛素分泌功能的调节作用则具有多种可能: TGF- β 通路下游 SMAD2/SMAD3 激活时, 将会促进胰岛素的分泌并有利于 β 细胞数量的维持; 但单独激活 SMAD3 时则会使得 β 细胞功能下降^[32-34]。Velazco-Cruz 等^[4]在改进分化方案时提出, 添加活化素受体样激酶 5 抑制剂 (activin receptor-like kinase 5 inhibitor, ALK5i) 抑制 TGF- β 通路是 ESCs 分化为 β 样细胞的必要条件, 但是在获得内分泌细胞后持续抑制 TGF- β 通路将使得细胞的胰岛素分泌功能下降。通过调节分化方案中 ALK5i 的暴露时间, Velazco-Cruz 等获得了表达 β 细胞标志且具有良好胰岛素分泌功能的 SC- β C。Balboa 等^[35]在分化的最后成熟阶段向培养基中添加甲状腺素 T3、N-乙酰半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine) 和具有抗增殖作用的极光激酶 (aurora kinase) ZM447439, 经过 6 周的培养获得了具有双相胰岛素分泌能力的功能和结构更接近原始胰岛的干细胞来源胰岛 (stem cell-derived islets, SC-islet)。然而, 使用 ESCs 进行实验所面临的伦理争议是限制其研究进一步深入和进入临床试验的关键问题。

2.3 人诱导多能干细胞

从成体细胞重编程而来的 iPSCs 可以很好地避免 ESCs 面临的伦理限制; 取自患者自身的细胞也可以一定程度上解决免疫排斥的问题^[8]。

通过基因重组技术^[36]、微 RNA (microRNA, miRNA) 调控^[37-38]等方法, 可以获得表达 PDX1、NKX6.1、胰岛素 (insulin, INS) 等胰腺和胰岛细胞特征标志物的细胞 (图 1), 但是通过这些技术获得的细胞的胰岛素分泌能力显著低于正常人胰腺 β 细胞, 且细胞团中有部分为 α 细胞。此外, 引入外源基因和病毒载体可能使得 iPSCs 的致癌风险升高, 也可能在移植后导致自身免疫的发生^[8], 有研究希望通过使用仙台病毒作为载体以避免外源基因和宿主基因组的整合来克服上述问题^[39-40]。三维培养可以提高 iPSCs 的分化效率^[41-42]。Manzar 等^[42]运用三维生物支架 (3D bio-scaffold) 培养了 T1DM 患者体细胞来源的 iPSCs 并对其进行去甲基化处理后获得了成熟的 β 细胞, iPSCs 在不同阶段的不同化合物作用下经历定型内胚层 (definitive endoderm)、后前肠 (posterior foregut)、胰腺前体细胞的阶段之后, 加入 Noggin 和维甲酸的同时抑制 TGF- β 通路及 Notch 通路使其分化为胰腺内分泌前体细胞; 最后通过添加胰岛素的特异性诱导剂尼克酰胺 (nicotinamide)、甲状腺素 T3、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 等促进 β 细胞成熟; 表观遗传修饰因子 5-氮杂-2'-脱氧胞苷 (5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-DC) 则被用于去甲基化处理以改善胰岛素分泌细胞的分化过程。Du 等^[43]近期将化学诱导的 SC- β C 移植到非人灵长类 DM 模型体内, 恢复了其内源性胰岛素的分泌, 改善了其血糖控制情况。这一实验的成功证明了人多能干细胞用于临床治疗的可能性, 为临床转化做出了初步探索。

2.4 成体组织来源细胞

2.4.1 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)

MSCs 包括骨髓间充质干细胞 (bone marrow

mesenchymal stem cells, BMSCs)、脐带间充质干细胞 (umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)、胎盘间充质干细胞 (placental mesenchymal stem cells, PMSCs) 和脂肪间充质干细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 等, 相较于 ESC 和 iPSC 其致癌风险更低^[8]。通过基因工程的方法在 MSCs 内过表达 *Pdx1*、神经元素 3 (neurogenin-3, *Ngn3*)、配对盒 4 (paired box 4, *Pax4*) 等基因或者运用基因编辑的手段可以获得 IPCs^[44-45] (图 1)。“华通氏”胶间充质干细胞 (Wharton's jelly mesenchymal stem cells)、BMSCs 和 ADSCs 等在体外经尼克酰胺、促胰岛素分泌素 4 (extendin-4)、激活素 A (activin A) 等化合物处理也可以得到分泌胰岛素和表达胰腺相关转录因子的胰岛样细胞 (islet-like cells)^[46-49], 这些细胞的功能也在动物模型体内得到了初步检验^[48,50-51]。然而, MSCs 跨越中胚层的转分化使得其获得 IPCs 的效率明显低于 ESCs 和 iPSCs, 临床获取和运用 MSCs 来源的功能 β 样细胞进行细胞替代治疗仍有待进一步研究^[52-53]。值得一提的是, 除了作为细胞替代治疗的细胞来源, MSCs 还可以通过调节患者自身免疫, 改善受损 β 细胞修复和再生微环境的作用来发挥治疗 DM 的功能, 围绕 MSCs 的这些研究近年来有大量的临床试验正在进行^[52,54-55]。

2.4.2 肝脏细胞

肝脏和胰腺在发育过程中都来自于内胚层, 因此肝脏细胞被视作是获取功能胰腺 β 细胞的良好来源^[56-57]。转录因子 PDX1 在胰腺前体的早期发育和 β 细胞的功能维持过程中发挥关键作用^[58]。在过往研究中, 本课题组通过逆转录病毒载体在永生化的肝脏上皮前体细胞 (liver epithelial progenitor cells, LEPCs) 中表达 *Pdx1* 基因获得了 PDX1⁺ 的细胞, 处理后的细胞还可以表达 *Ngn3*、*Nkx6.1*、*NeuroD* 等 β 细胞特

征基因 (图 1)。PDX1⁺的 LEPCs 在高糖培养基中失去肝脏细胞标志并分化为具有胰岛素分泌功能的功能 β 细胞, 在移植到 DM 小鼠体内后可以有效缓解其高血糖状态^[59]。该研究为肝脏细胞向 β 细胞的转化提供了依据, 但分化效率也有待进一步提高, 病毒载体和永生化细胞带来的安全性问题也有待解决。最近, Chang 等^[58]通过腺病毒载体向原代肝细胞内同时导入 *Pdx1* 和 *Ngn3* 基因, 并将这些细胞培养于含有 GLP-1、exendin-4 和血小板衍生生长因子二聚体 (homodimers of platelet-derived growth factor-A, PDGF-AA) 的高糖培养基中, 显著提高了细胞转分化的效率, 这些肝细胞来源的 β 样细胞在移植到 DM 小鼠体内亦可发挥降血糖的功能。Yang 等^[60]则采用非病毒的方法在体内对肝脏细胞进行重编程获得了 IPCs, 所获得的 IPCs 可以表达胰岛成熟标志基因尾促皮质肽 3 (urocortin 3, *Ucn3*) 并改善小鼠的血糖调节能力。Yang 等的这一方法不仅避免了病毒载体引入外源基因导致的安全性问题, 并且通过体内重编程的方式避免了细胞移植带来的免疫排斥问题。现有的研究提示, 并非所有肝脏细胞都具有胰向分化的倾向, 因此合适的细胞分选标志和方法将是值得研究的方向。此外, Wnt 信号通路的激活和分化过程中针对肝脏细胞的表现遗传修饰将有助于实现更高效地获取 β 样细胞, 促进分化后细胞的血管化和改良细胞微环境则将有利于提高 β 样细胞体内和体外的存活率和移植后功能的发挥^[57]。

肝外胆道系统包括胆囊、胆总管、肝管等组织, 相关研究表明位于这些组织的细胞中存在有 PDX1⁺的细胞, 且在一定条件下可以分化为胰腺 β 样细胞^[61-62]。有研究运用 Kubota's 培养基从胆周腺和胆囊上皮细胞中筛选出了具有干性的细胞, 并通过维甲酸、维生素 C 等化

物诱导分化得到了可以产生胰岛素的胰岛样细胞^[62-63]。Hickey 等^[64]和 Wang 等^[65]运用腺病毒载体在胆囊上皮细胞中表达 *Pdx1*、*MafA*、*Ngn3* 等基因, 成功获得了 INS⁺的 β 样细胞 (图 1)。他们的方法效率更高, 获得的细胞同时呈现出胰腺其他细胞的特征, 但没有葡萄糖刺激后分泌胰岛素的功能, 与成熟 β 细胞相比功能较弱。本课题组前期通过建立胰岛素启动子 (insulin-promoter) 驱动的 Cherry-expression 胆囊上皮细胞系, 筛选出了添加 Noggin、抑制 ERK 和 Hedgehog 信号通路的条件, 可以得到 PDX1⁺/NKX6.1⁺的 IPCs, 将其移植到 DM 模型小鼠体内后可以显著改善小鼠的 DM 症状^[9]。该方法优势在于使用了过程可控和操作便捷的化学诱导方法, 同时缩短了分化时间, 并且不表达 α 细胞特异的标志物, 为体外获取功能 β 细胞提供了更为有效和便捷的方法。在后续研究中, 通过三维培养的方式有望构建类似于胰岛结构的细胞团, 进一步促进目的细胞的分化和功能成熟。

2.4.3 胰腺细胞

成体胰腺干/前体细胞具有良好的分化潜能和增殖能力, 也有望成为获取功能胰腺 β 细胞的起始细胞^[66]。通过基因重组技术实现 β 细胞关键基因的过表达或者关键转录因子 NGN3 的激活可以实现胰腺导管细胞向 β 细胞的转分化; 人胰腺腺泡细胞则可以通过 STAT3 和 MAPK 信号通路的激活从而诱导获得 NGN3⁺/INS⁺的 β 样细胞^[67] (图 1)。胰岛内的 α 细胞和 δ 细胞也被证实可以转分化为 β 细胞^[68-69], 除了常用的基因工程手段之外, GLP-1 类似物、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 和青蒿素也参与促进 α 细胞向 β 细胞分化^[70-71]。近期科学家在胰岛内鉴定出了一群“原始 β 细胞亚群”细胞, 为获取功能胰腺 β 细胞提供了更多来源^[72]。

2.4.4 胃肠道细胞

胃肠道细胞具有很强的再生能力,不仅具有很多和 β 细胞类似的内分泌细胞,而且具有免疫豁免的特性,这些优点使得研究胃肠道细胞向 β 细胞的分化成为可能^[73-74]。通过 *Pdx1*、*Ngn3* 和 *MafA* 的异位表达可以在小肠隐窝内获得上皮细胞来源的 β 样细胞^[75] (图 1)。虽然也有其他研究实现了类似的转分化,但受限于肠道细胞表面标志尾型同源盒转录因子 2 (caudal-type homeobox protein 2, CDX2) 的存在使得分化并不完全,效率也较低^[56]。通过 β 细胞关键基因的过表达同样可以高效地诱导胃细胞分化为 INS^+ 细胞,并且可以获得良好的胰岛素反应能力^[76]。虽然技术尚未成熟,但胃肠道细胞凭借其易获取和易转化的特点获得了越来越多的关注。

2.5 胰腺类器官

类器官是在体外培养的包含有来自多能干细胞或成体干/前体细胞来源的特定器官细胞的三维结构^[77]。胰岛类器官可以很好地模拟胰

岛在体内的空间组织、细胞间相互作用以及与微环境的相互影响,不仅可以作为胰岛发育和相关疾病的研究模型以及为药物筛选提供平台,也有望解决胰岛移植的供体不足的困难^[78-80]。目前一般有 3 类细胞可以作为胰岛类器官的种子细胞,来源于多能干细胞的胰岛细胞、去分化和再分化的成体胰岛细胞来源的胰岛内分泌细胞、可以被转分化为胰岛细胞的其他非胰岛系细胞^[77]。此外,内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 和 MSCs 也被证实可以促进胰岛类器官的结构和功能形成^[81-84] (图 2)。WANG 等^[1,85]以细胞标志 C 蛋白受体 (protein C receptor, Procr) 在小鼠成体胰腺中鉴定出了一类全新的胰岛前体细胞,将其与 ECs 在体外共同培养获得可以稳定扩增的对葡萄糖敏感且能够分泌胰岛素的胰岛类器官,将该胰岛类器官移植到 DM 小鼠体内之后可以有效缓解其 DM 症状。另外的研究指出,非经典的 WNT4 信号 (non-canonical WNT4 signaling) 在 iPSC 来源的胰岛类器官胰岛素分泌功能的体外成熟过程中发挥了关键作用,所获

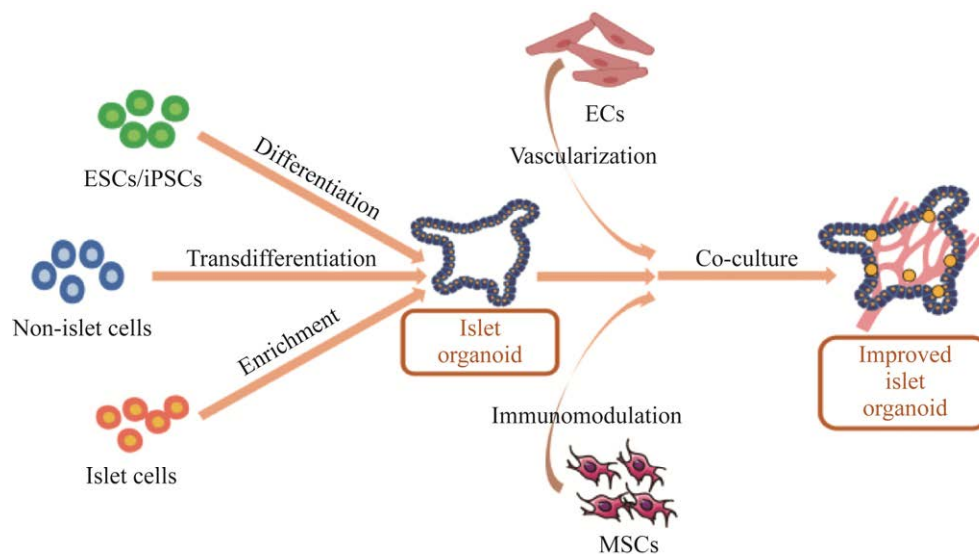


图 2 胰岛类器官的形成

Figure 2 Generation of islet organoid.

得的胰岛类器官包含有导管细胞和各类内分泌细胞在内的多种细胞,很好地模拟了成体胰岛的细胞组成和分泌功能;如果运用基因工程手段在 iPSCs 内增加免疫检查点蛋白 PD-L1 的表达,可以使移植到 DM 小鼠体内的胰岛类器官存活更长时间并持续改善小鼠的 DM 症状^[81]。三维培养的方法是胰岛类器官的制备的关键技术^[77];除了传统的细胞自聚集 (self-aggregation)^[86-87]和水凝胶包埋^[88]的方法之外,脱细胞支架^[89]、3D 生物打印^[90]和器官芯片技术 (organs-on-chips)^[91]也推动了胰岛类器官研究的发展。目前,胰岛类器官的发展聚焦于如何优化类器官细胞的组成和结构使得其结构和功能进一步向真实器官靠拢,与此同时如何提高类器官的存活时间和安全性也是亟待解决的问题^[77]。

3 临床细胞治疗应用的难点与解决方案

体外获取功能 β 细胞的尝试取得了阶段性进展,但是如何将这些细胞安全有效地应用于临床,还存在很多难点和问题。近期有很多研究为解决这些问题提供了新的方法和思路。

3.1 干细胞来源 β 细胞功能未成熟

虽然目前体外获取的 SC- β C 可以表达绝大多数已知的成熟 β 细胞标志分子,但这并不意味着其本身功能的完全成熟,功能成熟的验证需要通过对其对葡萄糖刺激的动态响应和胰岛素分泌机制的研究^[10]。细胞微环境对 β 细胞的成熟至关重要,这也是目前往往需要通过将 SC- β C 移植到体内完成最终功能成熟的原因^[29,43]。单细胞测序的结果证实,移植到体内 6 个月后的 SC- β C 不仅具有胰岛素分泌能力,而且与未移植的分化后细胞相比表达更多 β 细胞成熟标志物^[92-93]。但是这样的方法无疑推迟了 SC- β C 发

挥功能的时间,而且在体内的分化和成熟方向也难以实时确认。除了微环境的影响之外,移植物的血管形成也影响着 SC- β C 移植后的存活和功能发挥^[94]。ECs 的信号对 β 细胞的发育、增殖、分化等发挥关键作用^[95]。通过脂质体转导修饰后的 *Vegfa* mRNA 可以有效提升移植物血管化程度并增加 β 细胞数量^[96]。

3.2 存在肿瘤发生的风险

多能干细胞具有强大的自我更新和多向分化潜能,这使得其可以作为体外获取功能 β 细胞的种子细胞,但同时也带来了肿瘤发生的风险。不论是 ESCs 还是 iPSCs,在向 β 细胞分化的过程中都难以达到 100%的分化效率,所取得的细胞团中仍存在部分具有致瘤性的未分化细胞^[10]。此外,制备 iPSCs 过程中常引入的原癌基因 *c-Myc* 和病毒载体也增加了 iPSCs 成瘤的风险^[8,79]。使用其他谱系的细胞转分化获取 β 细胞时则还没有致瘤的报道。现在胰岛移植主要的方法是门静脉输注,这是一种不可逆的移植方法^[97],已经有研究尝试进行皮下或者肌内移植以便于观察移植物的存活状态并在肿瘤发生时及时将其移除^[13,20,98]。除了优化移植部位之外,研究希望通过改良分化方案和细胞培养技术从而尽可能地提高成熟且具有既定功能的细胞比例^[4-5]。与之对应的,也可以运用化学或者免疫学的手段剔除未分化的细胞^[99-100]。运用基因工程的手段向 ESCs 或 iPSCs 细胞中导入自杀基因的方式也为降低移植后形成肿瘤风险提供了新思路^[101-102]。

3.3 免疫排斥

由于人类白细胞抗原 (human leucocyte antigen, HLA) 不匹配导致的免疫排斥反应也是 β 细胞替代疗法面临的一大难题,目前主要依靠运用免疫抑制剂来避免这一问题。但这一方法存在诸多副作用,严重时甚至会导致致命

的感染和肿瘤发生^[103]。iPSCs 一般来自于患者自身细胞, 具有最低的免疫原性, 但是这样个体化的方式价格昂贵且耗时很长, 难以满足临床需求^[10]。调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 治疗被证实可以增强同种异体移植物的免疫耐受能力并有效避免自身免疫反应^[104], 针对 T1DM 患者进行的临床试验验证了这一方法的有效性和安全性^[105], 如何获取足够治疗用的 Treg 细胞并保证其纯度是目前有待进一步优化的方向^[106]。通过 CRISPR/Cas9 技术向 β 细胞内导入 *IL-10* 基因可以使其自身部分模拟 Treg 细胞的作用以调节免疫反应^[107]。基因编辑技术也可以通过干扰 HLA 和免疫调节因子相关基因的表达从而降低移植细胞的免疫原性^[108-109]。另外, MSCs 和 β 细胞的共移植可以有效减少效应 T 细胞和炎症细胞因子的数量并增加 Treg 细胞数量, 促进移植物的血管形成并且发挥免疫调节作用, 有效地提升了移植物的存活率^[110]。由于目前常用的门静脉输注移植方式会使得体积很小的 MSCs 在肺部被清除, 所以有研究尝试通过富集 MSCs 的细胞产物用于免疫调节的治疗^[111]。通过生物材料包裹 SC- β C 的方式近年来得到了很多研究, 这一方式不仅可以在保证 SC- β C 获得足够营养并保持激素分泌功能的前提下躲避免疫攻击, 而且可以使得移植状态更加可控并且可以在必要时被取出, 提高了移植的有效性和安全性, 为 β 细胞替代治疗提供了新的方案^[112]。

4 总结

随着 DM 患者人数不断增加, 对公共健康的影响日益加深, 人们对新的治疗方法有了更高的期望。随着科学研究的深入, SC- β C 展现出了其巨大的临床应用潜能和研究价值, 已经有大量的实验证明了在体外获取和培养可以用

于移植的 β 细胞的可能, 未来需要解决的问题主要在于如何提高分化效率和细胞存活率、如何增强其免疫耐受能力以及如何避免其致畸致癌的风险。除此之外, SC- β C 和胰岛类器官还可以被用于毒物和药物筛选、 β 细胞发育生物学研究和 DM 体外模型的构建, 为进一步了解 DM 机理并开发新的治疗手段提供了平台^[113]。随着分化方案的不断优化和相关技术的不断进步, 部分 SC- β C 的研究已经进入到了临床试验阶段并取得了良好的疗效, β 细胞替代疗法在 DM 的临床治疗中得到广泛运用或将成为可能。

REFERENCES

- [1] Wang DS, Wang JQ, Bai LY, et al. Long-term expansion of pancreatic islet organoids from resident procr⁺ progenitors. *Cell*, 2020, 180(6): 1198-1211.e19.
- [2] Tan SY, Mei Wong JL, Sim YJ, et al. Type 1 and 2 diabetes mellitus: a review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(1): 364-372.
- [3] Shapiro AMJ, Pokrywczynska M, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(5): 268-277.
- [4] Velazco-Cruz L, Song J, Maxwell KG, et al. Acquisition of dynamic function in human stem cell-derived β cells. *Stem Cell Reports*, 2019, 12(2): 351-365.
- [5] 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(2): 263-274.
- [6] Balboa D, Iworima DG, Kieffer TJ. Human pluripotent stem cells to model islet defects in diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 642152.
- [7] Maxwell KG, Millman JR. Applications of iPSC-derived beta cells from patients with diabetes. *Cell Rep Med*, 2021, 2(4): 100238.
- [8] Pan G, Mu YM, Hou LF, et al. Examining the therapeutic potential of various stem cell sources for differentiation into insulin-producing cells to treat diabetes. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2019, 80(1): 47-53.
- [9] Chen F, Li T, Sun Y, et al. Generation of insulin-secreting cells from mouse gallbladder stem cells by small molecules *in vitro*. *Stem Cell Res Ther*,

- 2019, 10(1): 289.
- [10] Bourgeois S, Sawatani T, Van Mulders A, et al. Towards a functional cure for diabetes using stem cell-derived beta cells: are we there yet? *Cells*, 2021, 10(1): 191.
- [11] DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*, 2018, 391(10138): 2449-2462.
- [12] American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes-2022. *Diabetes Care*, 2022, 45(Suppl 1): S17-S38.
- [13] Cayabyab F, Nih LR, Yoshihara E. Advances in pancreatic islet transplantation sites for the treatment of diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 732431.
- [14] Khalil H. Diabetes microvascular complications-a clinical update. *Diabetes Metab Syndr*, 2017, 11(Suppl 1): S133-S139.
- [15] Zhu LH, She ZG, Cheng X, et al. Association of blood glucose control and outcomes in patients with COVID-19 and pre-existing type 2 diabetes. *Cell Metab*, 2020, 31(6): 1068-1077.e3.
- [16] Li GR, Chen Z, Lv Z, et al. Diabetes mellitus and COVID-19: associations and possible mechanisms. *Int J Endocrinol*, 2021, 2021: 7394378.
- [17] Wu CT, Lidsky PV, Xiao YH, et al. SARS-CoV-2 infects human pancreatic β cells and elicits β cell impairment. *Cell Metab*, 2021, 33(8): 1565-1576.e5.
- [18] Müller JA, Groß R, Conzelmann C, et al. SARS-CoV-2 infects and replicates in cells of the human endocrine and exocrine pancreas. *Nat Metab*, 2021, 3(2): 149-165.
- [19] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*, 2022, 183: 109119.
- [20] Gamble A, Pepper AR, Bruni A, et al. The journey of islet cell transplantation and future development. *Islets*, 2018, 10(2): 80-94.
- [21] Rickels MR, Stock PG, De Koning EJP, et al. Defining outcomes for β -cell replacement therapy in the treatment of diabetes: a consensus report on the igls criteria from the IPITA/EPITA opinion leaders workshop. *Transplantation*, 2018, 102(9): 1479-1486.
- [22] Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 2000, 343(4): 230-238.
- [23] Ludwig B, Ludwig S, Steffen A, et al. Islet versus pancreas transplantation in type 1 diabetes: competitive or complementary? *Curr Diab Rep*, 2010, 10(6): 506-511.
- [24] Rickels MR, Robertson RP. Pancreatic islet transplantation in humans: recent progress and future directions. *Endocr Rev*, 2019, 40(2): 631-668.
- [25] Limbert C, Pärth G, Jakob F, et al. Beta-cell replacement and regeneration: strategies of cell-based therapy for type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 79(3): 389-399.
- [26] Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, et al. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development*, 2004, 131(7): 1651-1662.
- [27] Kahan BW, Jacobson LM, Hullett DA, et al. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an *in vitro* model to study islet differentiation. *Diabetes*, 2003, 52(8): 2016-2024.
- [28] D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11): 1392-1401.
- [29] Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, et al. Generation of functional human pancreatic β cells *in vitro*. *Cell*, 2014, 159(2): 428-439.
- [30] Rezania 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(11): 1121-1133.
- [31] Butler PC, Gale EA. Reversing type 1 diabetes with stem cell-derived islets: a step closer to the dream? *J Clin Invest*, 2022, 132(3): e158305.
- [32] Gao YH, Zhang RX, Dai SS, et al. Role of TGF- β /smad pathway in the transcription of pancreas-specific genes during beta cell differentiation. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 351.
- [33] Lin HM, Lee JH, Yadav H, et al. Transforming growth factor-beta/Smad3 signaling regulates insulin gene transcription and pancreatic islet beta-cell function. *J Biol Chem*, 2009, 284(18): 12246-12257.
- [34] Nomura M, Zhu HL, Wang LX, et al. SMAD2 disruption in mouse pancreatic beta cells leads to islet hyperplasia and impaired insulin secretion due to the attenuation of ATP-sensitive K^+ channel activity. *Diabetologia*, 2014, 57(1): 157-166.
- [35] Balboa D, Barsby T, Lithovius V, et al. Functional, metabolic and transcriptional maturation of human pancreatic islets derived from stem cells. *Nat Biotechnol*, 2022: 1-14.
- [36] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K.

- Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 2008, 18(12): 890-894.
- [37] Shaer A, Azarpira N, Karimi MH. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into insulin-like cell clusters with miR-186 and miR-375 by using chemical transfection. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 174(1): 242-258.
- [38] Lahmy R, Soleimani M, Sanati MH, et al. MiRNA-375 promotes beta pancreatic differentiation in human induced pluripotent stem (hiPS) cells. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(4): 2055-2066.
- [39] Schlaeger TM, Daheron L, Brickler TR, et al. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(1): 58-63.
- [40] Pellegrini S, Ungaro F, Mercurio A, et al. Human induced pluripotent stem cells differentiate into insulin-producing cells able to engraft *in vivo*. *Acta Diabetol*, 2015, 52(6): 1025-1035.
- [41] Konagaya S, Iwata H. Reproducible preparation of spheroids of pancreatic hormone positive cells from human iPS cells: an *in vitro* study. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1860(9): 2008-2016.
- [42] Manzar GS, Kim EM, Zavazava N. Demethylation of induced pluripotent stem cells from type 1 diabetic patients enhances differentiation into functional pancreatic β cells. *J Biol Chem*, 2017, 292(34): 14066-14079.
- [43] Du YY, Liang Z, Wang SS, et al. Human pluripotent stem-cell-derived islets ameliorate diabetes in non-human primates. *Nat Med*, 2022, 28(2): 272-282.
- [44] Xu LF, Xu CJ, Zhou SP, et al. PAX4 promotes PDX1-induced differentiation of mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3): 874-886.
- [45] Gerace D, Martiniello-Wilks R, Nassif NT, et al. CRISPR-targeted genome editing of mesenchymal stem cell-derived therapies for type 1 diabetes: a path to clinical success? *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 62.
- [46] Gabr MM, Zakaria MM, Refaie AF, et al. Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stromal cells could control chemically induced diabetes in dogs: a preliminary study. *Cell Transplant*, 2018, 27(6): 937-947.
- [47] Domouky AM, Hegab AS, Al-Shahat A, et al. Mesenchymal stem cells and differentiated insulin producing cells are new horizons for pancreatic regeneration in type I diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 87: 77-85.
- [48] El-Demerdash RF, Hammad LN, Kamal MM, et al. A comparison of Wharton's jelly and cord blood as a source of mesenchymal stem cells for diabetes cell therapy. *Regen Med*, 2015, 10(7): 841-855.
- [49] Karimi S, Ai J, Khorsandi L, et al. Vildagliptin enhances differentiation of insulin producing cells from adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell J*, 2019, 20(4): 477-482.
- [50] Tsai PJ, Wang HS, Lin GJ, et al. Undifferentiated wharton's jelly mesenchymal stem cell transplantation induces insulin-producing cell differentiation and suppression of T-cell-mediated autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Cell Transplant*, 2015, 24(8): 1555-1570.
- [51] Ghoneim MA, Refaie AF, Elbassiouny BL, et al. From mesenchymal stromal/stem cells to insulin-producing cells: progress and challenges. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(6): 1156-1172.
- [52] P ath G, Perakakis N, Mantzoros CS, et al. Stem cells in the treatment of diabetes mellitus-focus on mesenchymal stem cells. *Metabolism*, 2019, 90: 1-15.
- [53] Li HS, Zhu H, Ge T, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy for diabetes mellitus: enhancement strategies and future perspectives. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(5): 1552-1569.
- [54] Huang QL, Huang YT, Liu JP. Mesenchymal stem cells: an excellent candidate for the treatment of diabetes mellitus. *Int J Endocrinol*, 2021, 2021: 9938658.
- [55] De Klerk E, Hebrok M. Stem cell-based clinical trials for diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 631463.
- [56] Wang WR, Zhang C. Targeting β -cell dedifferentiation and transdifferentiation: opportunities and challenges. *Endocr Connect*, 2021, 10(8): R213-R228.
- [57] Meivar-Levy I, Ferber S. Liver to pancreas transdifferentiation. *Curr Diab Rep*, 2019, 19(9): 76.
- [58] Chang FP, Cho CHH, Shen CR, et al. PDGF facilitates direct lineage reprogramming of hepatocytes to functional β -like cells induced by Pdx1 and Ngn3. *Cell Transplant*, 2016, 25(10): 1893-1909.
- [59] Jin CX, Li WL, Xu F, et al. Conversion of immortal liver progenitor cells into pancreatic endocrine progenitor cells by persistent expression of Pdx-1. *J Cell Biochem*, 2008, 104(1): 224-236.
- [60] Yang XF, Ren LW, Yang L, et al. *In vivo* direct reprogramming of liver cells to insulin producing cells by virus-free overexpression of defined factors. *Endocr J*, 2017, 64(3): 291-302.
- [61] Wang YF, Lanzoni G, Carpino G, et al. Biliary tree

- stem cells, precursors to pancreatic committed progenitors: evidence for possible life-long pancreatic organogenesis. *Stem Cells*, 2013, 31(9): 1966-1979.
- [62] Carpino G, Cardinale V, Gentile R, et al. Evidence for multipotent endodermal stem/progenitor cell populations in human gallbladder. *J Hepatol*, 2014, 60(6): 1194-1202.
- [63] Cardinale V, Wang YF, Carpino G, et al. Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology*, 2011, 54(6): 2159-2172.
- [64] Hickey RD, Galivo F, Schug J, et al. Generation of islet-like cells from mouse gall bladder by direct *ex vivo* reprogramming. *Stem Cell Res*, 2013, 11(1): 503-515.
- [65] Wang YH, Galivo F, Pelz C, et al. Efficient generation of pancreatic β -like cells from the mouse gallbladder. *Stem Cell Res*, 2016, 17(3): 587-596.
- [66] Kim HS, Lee MK. B-cell regeneration through the transdifferentiation of pancreatic cells: pancreatic progenitor cells in the pancreas. *J Diabetes Investig*, 2016, 7(3): 286-296.
- [67] Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Pancreatic β cell regeneration as a possible therapy for diabetes. *Cell Metab*, 2018, 27(1): 57-67.
- [68] Chakravarthy H, Gu XY, Enge M, et al. Converting adult pancreatic islet α cells into β cells by targeting both *Dnmt1* and *arx*. *Cell Metab*, 2017, 25(3): 622-634.
- [69] Chera S, Baronnier D, Ghila L, et al. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic δ -cells into insulin producers. *Nature*, 2014, 514(7523): 503-507.
- [70] Ben-Othman N, Vieira A, Courtney M, et al. Long-term GABA administration induces alpha cell-mediated beta-like cell *Neogenesis*. *Cell*, 2017, 168(1/2): 73-85.e11.
- [71] Li J, Casteels T, Frogne T, et al. Artemisinins target GABA a receptor signaling and impair α cell identity. *Cell*, 2017, 168(1/2): 86-100.e15.
- [72] Van Der Meulen T, Mawla AM, DiGruccio MR, et al. Virgin beta cells persist throughout life at a neogenic niche within pancreatic islets. *Cell Metab*, 2017, 25(4): 911-926.e6.
- [73] Talchai C, Xuan SH, Kitamura T, et al. Generation of functional insulin-producing cells in the gut by *Foxo1* ablation. *Nat Genet*, 2012, 44(4): 406-412, S1.
- [74] Spadoni I, Fornasa G, Rescigno M. Organ-specific protection mediated by cooperation between vascular and epithelial barriers. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(12): 761-773.
- [75] Chen YJ, Finkbeiner SR, Weinblatt D, et al. *De novo* formation of insulin-producing “neo- β cell islets” from intestinal crypts. *Cell Rep*, 2014, 6(6): 1046-1058.
- [76] Ariyachet C, Tovaglieri A, Xiang GJ, et al. Reprogrammed stomach tissue as a renewable source of functional β cells for blood glucose regulation. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(3): 410-421.
- [77] Jiang L, Shen YR, Liu YJ, et al. Making human pancreatic islet organoids: progresses on the cell origins, biomaterials and three-dimensional technologies. *Theranostics*, 2022, 12(4): 1537-1556.
- [78] Schutgens F, Clevers H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 211-234.
- [79] Zhang XF, Ma Z, Song EL, et al. Islet organoid as a promising model for diabetes. *Protein Cell*, 2022, 13(4): 239-257.
- [80] Wassmer CH, Lebreton F, Bellofatto K, et al. Generation of insulin-secreting organoids: a step toward engineering and transplanting the bioartificial pancreas. *Transpl Int*, 2020, 33(12): 1577-1588.
- [81] Yoshihara E, O'Connor C, Gasser E, et al. Immune-evasive human islet-like organoids ameliorate diabetes. *Nature*, 2020, 586(7830): 606-611.
- [82] Karanth SS, Sun SF, Bi HJ, et al. Angiopoietins stimulate pancreatic islet development from stem cells. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 13558.
- [83] Soltanian A, Ghezelayagh Z, Mazidi Z, et al. Generation of functional human pancreatic organoids by transplants of embryonic stem cell derivatives in a 3D-printed tissue trapper. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 9564-9576.
- [84] Akolpoglu MB, Inceoglu Y, Bozuyuk U, et al. Recent advances in the design of implantable insulin secreting heterocellular islet organoids. *Biomaterials*, 2021, 269: 120627.
- [85] Wang JQ, Wang DS, Chen XY, et al. Isolation of mouse pancreatic islet *Procr*⁺ progenitors and long-term expansion of islet organoids *in vitro*. *Nat Protoc*, 2022, 17(5): 1359-1384.
- [86] Sharon N, Chawla R, Mueller J, et al. A peninsular structure coordinates asynchronous differentiation with morphogenesis to generate pancreatic islets. *Cell*, 2019, 176(4): 790-804.e13.
- [87] Brassard JA, Lutolf MP. Engineering stem cell self-organization to build better organoids. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(6): 860-876.
- [88] Legøy TA, Vethe H, Abadpour S, et al. Encapsulation boosts islet-cell signature in differentiating human

- induced pluripotent stem cells via integrin signalling. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 414.
- [89] Everwien H, Keshi E, Hillebrandt KH, et al. Engineering an endothelialized, endocrine Neo-Pancreas: evaluation of islet functionality in an *ex vivo* model. *Acta Biomater*, 2020, 117: 213-225.
- [90] Duin S, Schütz K, Ahlfeld T, et al. 3D bioprinting of functional islets of Langerhans in an alginate/methylcellulose hydrogel blend. *Adv Health Mater*, 2019, 8(7): e1801631.
- [91] Patel SN, Ishahak M, Chaimov D, et al. Organoid microphysiological system preserves pancreatic islet function within 3D matrix. *Sci Adv*, 2021, 7(7): eaba5515.
- [92] Hoglebe NJ, Augsornworawat P, Maxwell KG, et al. Targeting the cytoskeleton to direct pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(4): 460-470.
- [93] Augsornworawat P, Maxwell KG, Velazco-Cruz L, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals β cell maturation in stem cell-derived islets after transplantation. *Cell Rep*, 2020, 32(8): 108067.
- [94] Nalbach L, Roma LP, Schmitt BM, et al. Improvement of islet transplantation by the fusion of islet cells with functional blood vessels. *EMBO Mol Med*, 2021, 13(1): e12616.
- [95] Staels W, Verdonck Y, Heremans Y, et al. Vegf-A mRNA transfection as a novel approach to improve mouse and human islet graft revascularisation. *Diabetologia*, 2018, 61(8): 1804-1810.
- [96] Staels W, Heremans Y, Heimberg H, et al. VEGF-A and blood vessels: a beta cell perspective. *Diabetologia*, 2019, 62(11): 1961-1968.
- [97] Sneddon JB, Tang QZ, Stock P, et al. Stem cell therapies for treating diabetes: progress and remaining challenges. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(6): 810-823.
- [98] Bertuzzi F, Colussi G, Lauterio A, et al. Intramuscular islet allotransplantation in type 1 diabetes mellitus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(6): 1731-1736.
- [99] Veres A, Faust AL, Bushnell HL, et al. Charting cellular identity during human *in vitro* β -cell differentiation. *Nature*, 2019, 569(7756): 368-373.
- [100] Ben-David U, Gan QF, Golan-Lev T, et al. Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(2): 167-179.
- [101] Qadir MMF, Álvarez-Cubela S, Belle K, et al. A double fail-safe approach to prevent tumorigenesis and select pancreatic β cells from human embryonic stem cells. *Stem Cell Reports*, 2019, 12(3): 611-623.
- [102] Yagyu S, Hoyos V, del Bufalo F, et al. An inducible caspase-9 suicide gene to improve the safety of therapy using human induced pluripotent stem cells. *Mol Ther*, 2015, 23(9): 1475-1485.
- [103] Mishra V, Nayak P, Sharma M, et al. Emerging treatment strategies for diabetes mellitus and associated complications: an update. *Pharmaceutics*, 2021, 13(10): 1568.
- [104] Zhang D, Zhang W, Ng TW, et al. Adoptive cell therapy using antigen-specific CD4⁺CD8⁻ T regulatory cells to prevent autoimmune diabetes and promote islet allograft survival in NOD mice. *Diabetologia*, 2011, 54(8): 2082-2092.
- [105] Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Dobyszek A, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4⁺CD25⁺ high CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets—results of one year follow-up. *Clin Immunol*, 2014, 153(1): 23-30.
- [106] Ferreira LMR, Muller YD, Bluestone JA, et al. Next-generation regulatory T cell therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(10): 749-769.
- [107] Lim D, Sreekanth V, Cox KJ, et al. Engineering designer beta cells with a CRISPR-Cas9 conjugation platform. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4043.
- [108] Mattapally S, Pawlik KM, Fast VG, et al. Human leukocyte antigen class I and II knockout human induced pluripotent stem cell-derived cells: universal donor for cell therapy. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(23): e010239.
- [109] Han X, Wang MN, Duan SW, et al. Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells. *PNAS*, 2019, 116(21): 10441-10446.
- [110] English K. Mesenchymal stem cells to promote islet transplant survival. *Curr Opin Organ Transplant*, 2016, 21(6): 568-573.
- [111] Arzouni AA, Vargas-Seymour A, Nardi N, et al. Using mesenchymal stromal cells in islet transplantation. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(8): 559-563.
- [112] Desai T, Shea LD. Advances in islet encapsulation technologies. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(5): 338-350.
- [113] Bittenglova K, Habart D, Saudek F, et al. The potential of pancreatic organoids for diabetes research and therapy. *Islets*, 2021, 13(5/6): 85-105.

(本文责编 郝丽芳)