·综 述·

胰腺类器官研究进展

王宇静，李 含，陈秀华，王 娟*
（中国医药工业研究总院药理评价研究中心，上海市生物物质成药性评价专业技术服务平台，上海 200437）

摘要：类器官作为近年来新兴的体外基础研究模型，具有类似真实器官的复杂结构及细胞类型，能模拟原始组织或器官的生理功能。胰腺作为人体内的特殊脏器，包含了内、外分泌腺。虽目前来源于成体组织及多能干细胞的胰腺导管和胰岛样类器官已在体外实现长期扩增，但胰腺类器官技术的发展依然面临许多挑战，建立更贴近人体真实情况的复合型胰腺类器官依然是亟待解决的研究难点。现就胰腺的发育过程、现有胰腺类器官模型的构建方法及其相关应用的研究进展作一综述。

关键词：类器官；胰腺；三维培养；糖尿病
中图分类号：R-33 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188(2022)07-0826-05
DOI：10.13683/j.wph.2022.07.003

Advances in Research of Pancreatic Organoids

WANG Yujing, Li Han, CHEN Xiuhua, WANG Juan*
(*Center for Pharmacological Evaluation and Research, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai Professional and Technical Service Center for Biological Material Druggability Evaluation, Shanghai 200437, China*)

Abstract: As a new *in vitro* basic research model in recent years, organoids have complex structures and cell types similar to real organs, and can simulate the physiological function of primitive tissues or organs. As a special organ in human body, pancreas contains internal and external secretory glands. Although pancreatic ducts and islet like organs derived from adult tissues and pluripotent stem cells have been expanded *in vitro* for a long time, the development of pancreatic organoid technology still faces many challenges, and the establishment of complex pancreatic organoids closer to the real situation of human body is still a research difficulty that needs to be solved urgently. This paper reviewed the development of pancreas, the construction methods of existing pancreatic organoid models and their related applications.

Key words: organoids; pancreas; 3D culture; diabetes mellitus

胰腺是由内、外分泌腺组成的重要消化和内分泌器官[1-2]。当胰腺分泌功能异常时，常会引发胰腺炎（pancreatitis）、糖尿病（diabetes mellitus）及胰腺癌（pancreatic cancer）等胰腺相关疾病的发生。由于部分患者的预后较差，为了让患者获得更好的治疗，相关药物的研发也在不断探索。

虽然细胞系或原代细胞的平面培养简单、可控，但无法对细胞极性、细胞间或细胞与基质间相互作用等进行研究[3-4]，且与体内的生长模式差距较大；在一定程度上，亦限制了在体外对胰腺发育过程及胰腺常见疾病进行研究。为了进一步模拟细胞在体内的真实状态，三维培养技术开辟了新的领域。

类器官是近年来发展最为迅速的一类体外三维培养技术，其由多能干细胞及成体脏器的干细胞培育而来。在体外培养通过自组装形成三维结构，实现与体内相似的自组织和自更新，具有类似真实器官的复杂结构及多种细胞类型，并能模拟来源组织

收稿日期：2022-01-12
作者简介：王宇静，硕士研究生，研究方向：肿瘤药理学。
通信作者：王娟，研究员，硕士生导师，研究方向：肿瘤药理学。

或器官的生理功能[5]。2009 年，Sato 等[6] 以小鼠肠道的富含亮氨酸重复序列 G 蛋白偶联受体 5 阳性干细胞为原料，培养出首个具有隐窝样结构的肠道类器官，至此类器官成为了生物学领域新的研究热门之一。类器官模型可在体外进行稳定地连续扩增培养，并维持基因组的稳定性[7-8]。目前，已培养出如脑[9]、肝[10]、前列腺[11] 及胰腺[12] 等多种类器官。近年来，胰腺类器官技术的发展为研究胰腺发育调控、再生医学、药物筛选和相关疾病的细胞治疗提供巨大可能。本文就胰腺发育机制以及胰腺类器官构建的相关研究作一综述，同时对胰腺类器官潜在的应用领域进行讨论。

1 胰腺发育机制

小鼠的胰腺来自前肠内胚层，其发育主要包括两个阶段。第一阶段，由原肠上的胰腺发生区域转变为多种胰腺细胞类型以及背部和腹部出现胰芽，此时大多数未分化的细胞形成多能祖细胞池[13]，可产生各种类型的胰腺细胞。第二阶段，胰腺祖细胞可迅速分化为内分泌和外分泌细胞[14]，该过程时间相对较短，一般为小鼠胚胎期 D13.5 ～ D15.5。最后内分泌细胞迁移聚集形成胰岛[15]，此时胰腺的内、外分泌腺趋于完善，形成功能完备的胰腺器官。

在胰腺的发育过程中，转录因子发挥着精密的调控作用[16]。胰腺十二指肠同源盒 1(pancreatic and duodenal homeobox 1，PDX-1)、性别决定区 Y 框蛋白 9(sex determining region Y box protein 9，SOX9)、胰腺特异性转录因子 1α(pancreas specific transcription factor 1α，PTF1α) 及同源域转录因子自然杀伤细胞 6 同源盒 1(homeodomain transcription factor natural killer cell 6 homeobox 1，Nkx6.1) 等调控胰腺祖细胞增殖。在后续分化阶段时，神经元素 3(neurogenin3，Ngn3) 和神经源性分化蛋白 (neurogenic differentiation protein，NeuroD) 等共同决定着胰岛细胞的分化。除此之外，细胞外信号和细胞黏附分子亦在胰腺不同发育阶段发挥着相应功能，如成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor，FGF)10 活性的降低会影响内分泌细胞的分化[16]。

2 胰腺类器官培养

2.1 胚胎胰腺组织来源的类器官

目前研究大多采用啮齿类动物的胚胎胰腺组织。在胰腺发育早期，SOX9 阳性的细胞可分化为导管细胞、腺泡细胞和内分泌祖细胞，提示其具有胰腺祖细胞的分化潜能，可作为胰腺祖细胞的标志[17-18]。Sugiyama 等[19] 对胚胎期 D11.5 小鼠的胰腺中 SOX9 阳性细胞进行研究，通过流式分选出单细胞，在 Matrigel 基质胶中进行扩增培养，形成中空状类器官。Greggio 等[20] 从胚胎期 D10.5 的 SOX9-eGFP 小鼠中分选出表达 SOX9 的细胞进行三维培养。结果显示，类器官培养基中去除 FGF1 添加剂，或用小分子抑制剂阻断 FGF 的信号传导，可促进胰腺类器官中内分泌细胞的形成。

Bonfanti 等[21] 建立了人胚胎胰腺组织的三维培养系统。研究从 8 ～ 11 周的人胚胎胰腺组织中分离出胰腺祖细胞，在体外进行三维培养，同时对类器官进行表征，发现其具有胰腺祖细胞的一系列标记物如 PDX-1、SOX9、Nkx6.1 和 PTF1α 等，表明该培养体系所得的胰腺类器官较好地维持了胰腺祖细胞的特征，且类器官可在体外培养 5 个月以上。该研究还发现，培养基中去除表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor，EGF) 而其他培养条件均相同时，胰腺祖细胞内分泌分化显著增强，提示 EGF 信号会影响胚胎胰腺的体外扩增及分化。

2.2 成体胰腺组织来源的类器官培养

Driehuis 等[22] 成功构建了鼠和人的胰腺类器官，在组织形态学上均与来源组织保持高度一致。人源性正常胰腺类器官可以在体外连续培养 20 ～ 25 代，约 6 个月，且未有致病基因改变或基因组不稳定性。人胰腺导管来源的类器官大多呈空心球状，无尖端分枝状结构，也无自发的内分泌细胞分化。但可通过调节 β 细胞形成关键转录因子的表达，使该类器官分化为 β 细胞样表型[23]。

Loomans 等[24]从正常和糖尿病胰腺供体中通过酶解分离出无胰岛的胰腺组织团块，将其包埋在 Matrigel 基质胶中。培养 3 d 可观察到 90% 的胰腺类器官出芽结构；培养 7 d 后，在出芽结构中检测出高表达的乙醛脱氢酶（acetaldehyde dehydrogenase，ALDH）。将类器官移植到免疫缺陷小鼠，观察小鼠血糖水平，高血糖组小鼠 D0 血糖为（26.5±3.9）mmol/L，D30 为（24.3±3.8）mmol/L，正常血糖组小鼠 D0 为（8.6±1.3）mmol/L，D30 为（6.7±2.4）mmol/L，两组血糖水平均未显著降低。在高血糖小鼠类器官移植后 1 个月内，虽移植功能可检测到，但不足以恢复正常血糖。此研究还首次证明无需基因编辑，人胰腺外分泌导管细胞在体外经三维培养后具有内分泌分化的潜能，对于获取功能性 β 细胞的新来源具有重要意义。

为了解决使用的 Matrigel 胶成分不明的问题，Jiang 等[25]开发了新型的细胞外基质水凝胶，以猪的胰腺、膀胱和肺组织为原料进行脱细胞处理，在高渗和低渗溶液中交替孵育来制备水凝胶。其支持人和大鼠胰岛的长期体外培养，且类器官可响应葡萄糖的刺激分泌胰岛素。除此之外，由于脱细胞处理的水凝胶提供了独特的三维环境，使其还能与器官芯片技术相结合。

Wang 等[26]通过谱系示踪发现在正常生理状态下，蛋白 C 受体（protein C receptor，Procr）阳性细胞具有多能性，证明其是胰岛中的成体干细胞。分选出的 Procr 阳性细胞通过三维培养在体外进行长期扩增，形成具有功能的胰腺类器官，并在葡萄糖的刺激下分泌胰岛素。将胰腺类器官移植到糖尿病模型小鼠后恢复其血糖水平。未来可进一步研究 Procr 阳性祖细胞在人体中是否存在，以及在糖尿病治疗中的应用潜能。

2.3 多能干细胞来源的胰腺类器官培养

多能干细胞包括胚胎干细胞（embryonic stem cells，ESC）和诱导性多能干细胞（induced pluripotent stem cell，iPSC）[27]，在器官再生与修复及疾病治疗等方面具有较高的应用价值[28]。目前主要采用逐步诱导分化方案诱导多能干细胞进行胰腺类器官培养。Gasa 等[29]从人胚胎干细胞诱导生成具有三维结构的胰岛，有效调节糖尿病小鼠的血糖水平。研究首次表明抑制 Notch 信号可显著提高 Ngn3 和 NeuroD 的表达，两者均与胰腺内分泌祖细胞向 β 细胞分化有关[30]，亦可促进 PDX-1 阳性祖细胞向胰腺内分泌细胞的分化。

Zhang 等[31]利用器官芯片平台通过灌注含有不同生长因子的培养基，将人诱导多能干细胞先分化为胚体，而后向内胚层诱导，最终分化为成熟的人胰岛类组织。培养的类器官含有 β 和 α 细胞两种主要胰岛组织，其在葡萄糖刺激下稳定分泌胰岛素。表明该平台可结合微流控元件及生物传感器等，为构建仿生人胰岛组织、研究胰岛组织发育及进行相关病理生理研究提供新的解决方案。

治疗 1 型糖尿病的最有效方法是胰岛移植，但存在供体不足以及免疫排斥等问题。Helman 等[32]基于 iPSC 成功培养出人胰岛样类器官（human islet like organs，HILOs），其包含了内分泌样细胞类型，移植后可在糖尿病小鼠中快速重建葡萄糖稳态。该团队随后用干扰素 γ（interferon γ）的离体刺激诱导了 HILOs 中内源性程序性死亡受体配体 -1（programmed death ligand-1，PD-L1）的过表达，发现 PD-L1 过表达可使小鼠体内 HILOs 异种移植物具有免疫耐受功能，维持免疫功能正常的糖尿病小鼠血糖稳态，较好地解决了宿主免疫排斥反应问题。

3 胰腺类器官的应用

类器官在胰腺发育和疾病模型的建立中具有极高的应用潜力。类器官为研究胰腺发育提供了三维模型，弥补了其他生物模型的不足[21]。研究者们还将胰腺类器官用于胰腺外分泌疾病的建模，如胰腺导管癌（pancreatic ductal carcinoma）[28]和胰腺囊性纤维病变（cystic fibropathy，CF）等[33]。Georgakopoulos 等[8]使用来自人胰腺的细胞生成

自组装的胰腺类器官，在体外长期稳定培养，具有遗传稳定性，用于进行疾病建模。Hrvatin 等[33]成功诱导人多能干细胞分化为胰腺腺泡及导管样类器官，并将其作为 CF 的研究模型。

胰岛 β 细胞是人类以及几乎所有脊椎动物产生胰岛素的唯一细胞，但其再生能力有限，是糖尿病发展的一个诱发因素。2021 年初，细胞疗法 VX-880 获得美国 FDA 授予的快速通道，该疗法利用多能干细胞来源的分化完全和分泌胰岛素的胰岛 β 细胞来治疗 1 型糖尿病，且临床研究目前处于患者招募中。胰腺类器官作为更贴近体内胰腺特性的模型，未来在不同类型糖尿病治疗方案的研究上具有高度的应用价值。

4 结语

胰腺类器官技术在近年发展迅速，有显著进展，但该技术向临床转化仍存在很多挑战。首先，由于目前体外培养的胰腺类器官细胞类型相对简单，仅能模拟胰腺的部分生理功能，故对于未来调整优化现有的培养条件，从而得到功能更为成熟的胰腺类器官，且能更好地复现胰腺的复杂生物学功能，是需要克服的难题之一。其次，胰腺的不同细胞类型之间存在着复杂的通信和相互调节机制，但现有胰腺类器官尚未构建出完备和兼容的交互培养体系，而微流控芯片技术的发展有望带来新的解决思路。最后，胰腺类器官技术仍主要停留在实验室基础研究阶段，将获得的胰腺类器官移植到糖尿病小鼠模型中，观察胰岛素的分泌以及血糖变化情况。现有的胰腺类器官培养系统较为复杂，分化周期长，为了提高诱导分化效率，促进分泌胰岛细胞体外成熟，将胰岛类器官移植到糖尿病患者体内，由基础研究向临床应用转化，并且提高胰腺类器官移植应用的可能性，均是未来研究的重点。

参考文献：

[1] Zhou Q, Melton DA. Pancreas regeneration[J]. Nature, 2018, 557(7705): 351-358.

[2] Pan FC, Wright C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland[J]. Dev Dyn, 2011, 240(3): 530-565.

[3] Stock K, Estrada MF, Vidic S, *et al*. Capturing tumor complexity *in vitro*: comparative analysis of 2D and 3D tumor models for drug discovery[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28951.

[4] Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, *et al*. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors[J]. Assay Drug Dev Technol, 2014, 12(4): 207-218.

[5] Clevers H. Modeling development and disease with organoids[J]. Cell, 2016, 165(7): 1586-1597.

[6] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, *et al*. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche[J]. Nature, 2009, 459(7244): 262-265.

[7] Huch M, Gehart H, van Boxtel R, *et al*. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver[J]. Cell, 2015,160(1-2): 299-312.

[8] Georgakopoulos N, Prior N, Angres B, *et al*. Long-term expansion, genomic stability and *in vivo* safety of adult human pancreas organoids[J]. Bio Med Central Dev Biol, 2020, 20(1): 4.

[9] Hattori N. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly[J]. Mov Disord, 2014, 29(2): 185.

[10] Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, *et al*. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation[J]. Nat Protoc, 2016, 11(9): 1724-1743.

[11] Drost J, Karthaus WR, Gao D, *et al*. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue[J]. Nat Protoc, 2016, 11(2): 347-358.

[12] Dossena M, Piras R, Cherubini A, *et al*. Standardized GMP-compliant scalable production of human pancreas organoids[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 94.

[13] Qiu WL, Zhang YW, Feng Y, *et al*. Deciphering pancreatic islet β cell and α cell maturation pathways and characteristic features at the single-cell level[J]. Cell Metab, 2018, 27(3): 702.

[14] Bastidas-Ponce A, Scheibner K, Lickert H, *et al*. Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development[J]. Development, 2017, 144(16): 2873-2888.

[15] Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, *et al*. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000,

97(4): 1607-1611.

[16] Caetano LA, Santana LS, Costa-Riquetto AD, *et al*. PDX1-MODY and dorsal pancreatic agenesis: new phenotype of a rare disease[J]. Clin Genet, 2018, 93(2): 382-386.

[17] Al-Khawaga S, Memon B, Butler AE, *et al*. Pathways governing development of stem cell-derived pancreatic β cells: lessons from embryogenesis[J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2018, 93(1): 364-389.

[18] Kopp JL, Dubois CL, Schaffer AE, *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): 653-665.

[19] Sugiyama T, Benitez CM, 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): 12691-12696.

[20] Greggio C, De Franceschi F, Figueiredo-Larsen M, *et al*. Artificial three-dimensional niches deconstruct pancreas development *in vitro*[J]. Development, 2013, 140(21): 4452-4462.

[21] Bonfanti P, Nobecourt E, Oshima M, *et al*. Ex vivo expansion and differentiation of human and mouse fetal pancreatic progenitors are modulated by epidermal growth factor[J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(15): 1766-1778.

[22] Driehuis E, van Hoeck A, Moore K, *et al.* Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow personalized drug screening[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(52): 26580-26590.

[23] Lee J, Sugiyama T, Liu Y, *et al.* Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells[J]. Elife, 2013, 2: e00940.

[24] Loomans CJM, Williams Giuliani N, Balak J, *et al*. Expansion of adult human pancreatic tissue yields organoids harboring progenitor cells with endocrine differentiation potential[J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(3): 712-724.

[25] Jiang K, Chaimov D, Patel SN, *et al*. 3-D physiomimetic extracellular matrix hydrogels provide a supportive microenvironment for rodent and human islet culture[J]. Biomaterials, 2019, 198: 37-48.

[26] Wang D, Wang J, Bai L, *et al*. Long-term expansion of pancreatic islet organoids from resident procr^{+}progenitors[J]. Cell, 2020, 180(6): 1198-1211.

[27] 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): 1364-1371.

[28] Shim JH, Kim J, Han J, *et al*. Pancreatic islet-like three-dimensional aggregates derived from human embryonic stem cells ameliorate hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Cell Transplant, 2015, 24(10): 2155-2168.

[29] Gasa R, Mrejen C, Lynn FC, *et al*. Induction of pancreatic islet cell differentiation by the neurogenin-neuroD cascade[J]. Differentiation, 2008, 76(4): 381-391.

[30] Kim Y, Kim H, Ko UH, *et al*. Islet-like organoids derived from human pluripotent stem cells efficiently function in the glucose responsiveness *in vitro* and *in vivo*[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35145.

[31] Zhang X, McGrath PS, Salomone J, *et al*. A comprehensive structure-function study of neurogenin3 disease-causing alleles during human pancreas and intestinal organoid development[J]. Dev Cell, 2019, 50(3): 367-380.

[32] Helman A, Melton DA. A stem cell approach to cure type 1 diabetes[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2021, 13(1): a035741.

[33] Hrvatin S, O'Donnell CW, Deng F, *et al*. Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, β cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(8): 3038-3043.

（编辑：沈佳婕）