

引用本文: 王裕康, 王洁, 易昕, 付爽, 王淑芳. 脱细胞ECM支架用于胰岛类器官构建的研究进展 [J]. 离子交换与吸附, 2025, 41(3): 226-239.

Citation: WANG Yu-kang, WANG Jie, YI Xin, FU Shuang, WANG Shu-fang. Research Progress on Acellular ECM Scaffold for Islet Organoid Construction [J]. Ion Exchange and Adsorption, 2025, 41(3): 226-239.

· 综述 ·

文章编号: 1001-5493(2025)03-0226-14

DOI: 10.16026/j.cnki.ica.2024010036

## 脱细胞ECM支架用于胰岛类器官构建的研究进展\*

王裕康, 王洁, 易昕, 付爽, 王淑芳\*\*

(南开大学生命科学学院, 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071)

**摘要:** 糖尿病作为一种常见慢性病, 其治疗方法一直备受关注。用于治疗糖尿病的胰岛移植策略和类器官技术由于供体不足、血管化程度低及微环境丢失等问题而难以发挥预期的作用。脱细胞支架保留了天然细胞外基质 (ECM) 的整体结构和固有生长因子, 模拟了体内细胞微环境, 是胰岛移植的理想载体; 器官的脱细胞支架具有很高的学术研究价值和临床应用潜力。文章对器官脱细胞支架的构建方法进行了总结, 并介绍了近年来脱细胞支架用于胰岛类器官构建的研究进展。总的来说, 目前多通过灌注去污剂和酶溶液辅以物理作用的方式进行脱细胞支架构建, 同时以ECM支架为基础制备的类器官已在动物体内产生短期的正向治疗效果。此外, 文章还介绍了脱细胞支架内皮化的方法, 如多种细胞共培养、多方式富集生长因子等。最后, 总结了现阶段脱细胞支架所面临的挑战和未来的发展机遇。

**关键词:** 糖尿病, 脱细胞支架, 细胞外基质, 类器官, 再生胰腺

**中图分类号:** R318.08 **文献标志码:** A

### 1 前言

糖尿病是一种以糖代谢衰竭导致高血糖为特征的慢性疾病, 是目前最严重而又最常见的慢性疾病, 多年糖尿病常伴随许多致残甚至致死的并发症, 从而导致预期寿命缩短<sup>[1]</sup>。糖尿病也是一个严重的全球公共卫生问题, 截至2021年, 全球约有5.366亿人患有糖尿病, 据预测, 到2045年, 这一人数将上升到7.832亿<sup>[2]</sup>。1型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 常见于儿童患者, 故又称青少年糖尿病, 占糖尿病人群的5%~10%<sup>[3]</sup>。这是一种因患者自身免疫问题导致胰腺β细胞被破坏, 进而造成胰岛素绝对缺乏以及随后血糖升高的疾病<sup>[4]</sup>。

针对1型糖尿病患者的标准治疗手段是外

源性胰岛素治疗<sup>[5]</sup>, 即每日进行胰岛素注射, 并监控其血糖水平。然而这种治疗方法无法对血糖进行生理控制, 患者血糖往往极不稳定, 波动较大, 且无法预防严重的并发症<sup>[6]</sup>, 因此需要替代疗法来恢复患者的胰岛素分泌功能。异体胰岛移植是替代患者自身胰腺β细胞功能的可行方法。2000年, 7名患者通过将胰岛移植到肝门静脉中, 使自身在1年内不再依赖胰岛素注射并同时获得良好的代谢控制, 证明了胰岛移植方案的可行性, 这一过程也被称作“埃德蒙顿方案”<sup>[7]</sup>。最近, 一项由美国国立卫生研究院赞助的肾后胰岛移植的3期试验报告显示<sup>[8]</sup>, 将纯化的人胰岛 (purified human pancreatic islets, PHPI) 移植到肾后, 62.5%的患者在移植1年后无严重低血糖事件发生, 移

\* 收稿日期: 2024-07-03

基金项目: 国家重大专项 (基金号 2020YFA0803701); 天津市科技项目 (基金号 22JCZJXCOO080 和 21JCYBJCO1340).

作者简介: 王裕康 (2001—), 男, 河北省人, 硕士研究生.

\*\*通信作者: 王淑芳, E-mail: wangshufang@nankai.edu.cn.

植的肾功能在3年后仍保持稳定。这些结果都表明异体胰岛移植是一种有效的治疗T1DM和帮助患者控制血糖的方法。虽然异体胰岛移植取得了一定的进展,但该方法仍有很大的局限性<sup>[9]</sup>,如胰岛供体严重不足、需长期依赖免疫抑制以及移植后因微环境改变而导致长期效果不佳等,这些不足,尤其是胰岛供体严重短缺阻碍了该方法的发展。针对供体不足,类器官技术提供了一个很好的思路。

类器官被描述为“体外人工微器官”<sup>[10]</sup>,它可以模拟体内器官的形态和组成细胞类型,并具有器官某些方面的功能。类器官技术可更真实地再现器官内细胞与细胞之间、细胞与细胞外环境之间的相互作用,已成为弥补细胞和组织或器官级生物模型之间差距的一种工具。自2009年Sato<sup>[11]</sup>和他的同事们首次开发肠干细胞衍生类器官以来,类器官技术得到了长足的发展。近年来,胰岛类器官技术已用于糖尿病领域的研究。胰岛类器官是一种具有多种细胞类型且可发挥原生胰岛功能的体外人工器官,其不但可以揭示胰岛相关疾病的发病机制,而且可以作为测试药物效力的良好平台。最重要的是,胰岛类器官有望突破胰岛移植供体来源不足和异体免疫排斥的瓶颈,成为真正能治愈糖尿病的新技术。对于胰岛类器官中最重要的功能性细胞——胰岛 $\beta$ 细胞,研究人员已探索到多种体外诱导方法。总的来说,胰岛类器官中 $\beta$ 细胞主要来源于胚胎干细胞<sup>[12]</sup>、人诱导多能干细胞<sup>[13]</sup>、胰腺祖细胞<sup>[14]</sup>以及肝干细胞<sup>[15]</sup>、胰腺 $\alpha$ 细胞<sup>[16]</sup>等其他类型细胞。尽管这些技术可在一定程度上解决供体不足的问题,但移植后胰岛细胞大量死亡而导致移植后效果不佳的问题仍然显著。移植后效果不佳的主要原因<sup>[17-18]</sup>是在分离和移植过程中,胰岛细胞失去了外周的细胞外基质和微血管系统等重要微环境,从而使移植后的胰岛细胞在缺氧缺血等恶劣条件下急性死亡。因此,应积极探索模拟胰岛微环境的方法以改善胰岛移植的效果。

本文旨在总结利用脱细胞支架构建功能更为成熟的胰岛类器官的相关研究进展,主要包括如何更加真实地模拟胰岛细胞生存和发挥功能的细胞外基质环境,如何加强移植后的血管

系统重建等问题,从而使移植后的胰岛细胞大量存活并长期发挥相应功能。

## 2 胰岛类器官构建策略

### 2.1 构建胰岛类器官的传统策略

在基本解决了胰岛类器官细胞来源问题之后,大量的研究开始倾向于延长胰岛类器官的存活时间,如促进类器官血管化等。下面列举3种最为常见的传统策略。

#### 2.1.1 多种类型细胞共培养

早期研究表明,不同类型的细胞之间可通过旁分泌的形式来互相影响细胞的活性和功能。基于这一结论,Takebe等<sup>[19]</sup>期望借助其他类型的细胞来增强胰岛移植活性。他们报道了一种从不同组织中形成器官芽的通用方法。将分离的小鼠 $\beta$ 细胞(mouse insulinoma 6, MIN6)与人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)共培养,4 d后形成了力学性能稳定、显示出自组织迹象的3D组织;14 d后,移植体发育出具有功能性微血管网络的胰岛样结构,将重组胰岛样组织移植到1型糖尿病小鼠模型的肾包膜中,小鼠的体重和血糖水平迅速恢复正常。

#### 2.1.2 补充生物活性因子

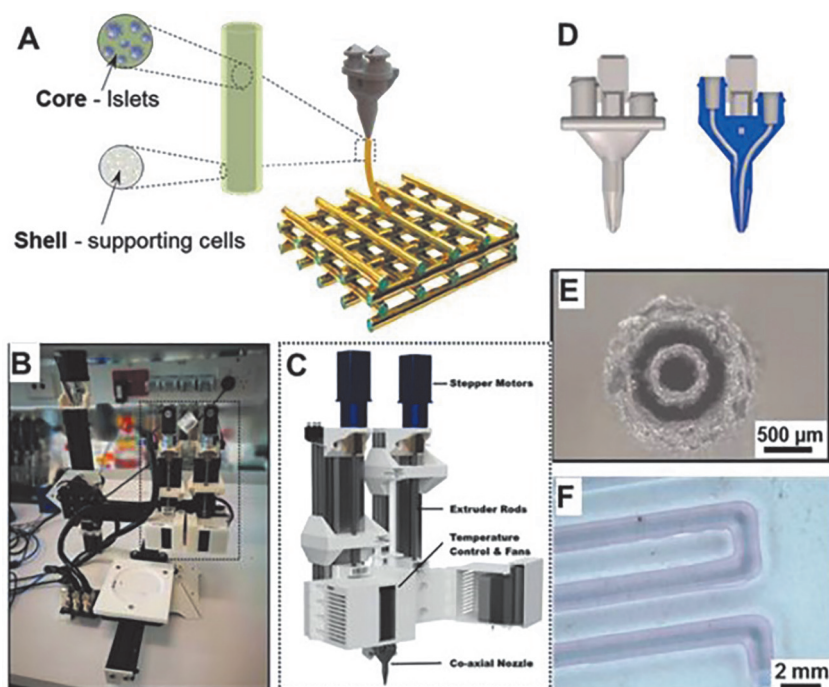
生长因子在细胞发挥特异性功能方面有着非常重要的作用,因此一些研究人员期望在3D支架中添加促进相关功能发挥的生长因子以获得更优的结果。Marchioli等<sup>[20]</sup>开发了一种新的3D支架以促进血管化。通过三维纤维沉积法制备了大孔聚己内酯(polycaprolactone, PCL)环,并使用EDC-NHS(1-ethyl-3-(3-dimethylamino)propyl carbodiimide-N-hydroxysuccinimide)化学法将肝素共价结合到聚合物上,以静电结合血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),从而对支架进行功能化修饰。PCL环的内部核心是经海藻酸盐水凝胶封装的胰岛细胞。在鸡胚绒毛尿囊膜模型中,固定在支架上的VEGF促进了其表面血管的生成。7 d后,被海藻酸盐水凝胶包封的胰岛对葡萄糖刺激的反应仍与未包封胰岛相当。

#### 2.1.3 3D生物打印

3D生物打印技术是一种快速发展的构建复

杂功能器官或结构的技术。利用3D打印技术构建细胞封装结构时,常因结构设计不合理而导致细胞缺氧死亡。Song等<sup>[21]</sup>通过模型计算对结构问题进行了优化,并提出了一种多面移植策略。其利用3D打印技术构建了一个聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)材质的大孔装置,将干细胞衍生的 $\beta$ 细胞簇(stem cell- $\beta$ , SC- $\beta$ )置于可降解的纤维蛋白凝胶中,通过细胞的氧气扩散消耗有限元模型及体外培养系统,确定了避免严重缺氧的细胞簇大小,并开发了一种可调控细胞簇大小的微孔技术。将这种3D打印的结构体皮下移植到免疫缺陷小鼠体内,可维持长达12周的胰岛功能。

结合前述的多种细胞共培养策略及3D打印技术, Liu等<sup>[22]</sup>利用定制的3D同轴打印机,以海藻酸盐/甲基丙烯酰明胶为生物墨水打印了一种核壳机构,实验设计如图1所示。核内是封装的胰岛细胞,壳层里装有调节性T细胞(regulatory cells, Tregs)和内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)等细胞。EPCs和Tregs的共移植有可能改善移植物的血运重建并抑制免疫反应。通过定制的同轴喷嘴,降低了壳结构的厚度,使胰岛与周围环境的距离 $<400\ \mu\text{m}$ 。此外,通过3D打印制造出的大孔结构增加了表面体积比,这些结构特点有利于胰岛细胞从周围环境中摄取营养和氧气。



**图1** 定制3D打印机及实验设计<sup>[22]</sup>: (A) 使用同轴打印方法建立血管化生物人工胰腺结构的示意图,胰岛素分泌细胞置于核层,并被壳层的EPC或Tregs细胞围绕; (B) 双墨同轴生物打印机; (C) 挤压头的3D模型; (D) 喷嘴的3D模型; (E) 喷嘴同轴结构的显微镜图像; (F) 用蓝/红染料打印的明亮场图像,使核壳结构可视化。

**Figure 1** Customized 3D printer and experimental design<sup>[22]</sup>: (A) Schematic representation of the proposed coaxial printing approach to establish vascularized bioartificial pancreatic constructs, pancreatic insulin secreting cells will be housed in the core component, which will be surrounded by EPC or Tregs cells; (B) The dual ink co-axial bioprinter; (C) 3D models of the extruder heads; (D) 3D models of the nozzle; (E) Microscope image of coaxial structure of printing nozzle; (F) Bright field image of coaxial lutrol strand printed with blue/red dye to visualize core and shell structure respectively are displayed.

3种传统构建策略各有利弊。其中,多种细胞共培养法以及补充生物活性因子法操作简便、可重复性强。但细胞疗法存在致癌风险,细胞类型越多,其不可控的风险越大,不利于真正转化;而直接补充生长因子往往会导致所构建

的结构中某种因子的含量剧增,打破原生环境中各生长因子的平衡,可能会引发其他疾病。3D生物打印具有非常强大的构建能力,可按照需求个性化定制所需结构,在类器官构建方面,可打印出细胞生存所需的各种空间。然而,受

打印材料和打印方法的限制, 3D生物打印制备的结构体生物活性不够强, 对细胞的促进作用没有前2种方法显著; 此外, 3D生物打印制备的结构很难真正模仿出原生组织的精细结构, 效果有限。综上所述, 3种方法均在一定程度上有利于胰岛类器官的长期功能发挥, 但其共同的缺点是均不能模拟出胰岛细胞生存的微环境, 与细胞外基质相比, 所构建的细胞环境的组成和结构仍有较大差异, 难以获得最佳效果。

## 2.2 脱细胞支架构建胰岛类器官策略

组织工程中的三维支架为类器官提供了一定的细胞生长环境, 理想情况下, 该支架应提供与原生细胞外基质相同的微环境, 从而维持细胞的长期存活。然而, 目前所开发的各种天然或合成的生物材料在模拟原生ECM时, 常会在体系中添加胶原蛋白<sup>[23]</sup>等细胞外基质蛋白或某种生长因子<sup>[20]</sup>, 虽相较对照组有一定的改善, 但未能真正模拟出复杂的ECM组成和超微结构<sup>[24]</sup>, 难以达到令人满意的效果。

Santini-Gonzalez等<sup>[25]</sup>报道了一种在大鼠和人的离体胰岛表面通过层黏连蛋白、巢蛋白和IV型胶原蛋白溶液共组装构建胰岛周围ECM的

方法。体外离体胰岛涂覆ECM 7 d可显著增强人胰岛素分泌。他们的报道进一步证实: 人工支架对细胞外基质微环境的还原度越高, 效果越显著。来自原生组织或器官的脱细胞ECM天然支架可完美地再现细胞附近复杂的微环境, 这无疑为类器官功能的进一步成熟奠定了基础。

### 2.2.1 脱细胞支架构建胰岛类器官的可行性分析

在胰腺脱细胞支架的思路被提出后, 许多研究人员进行了初步的研究, 旨在探究脱细胞支架是否有利于胰岛- $\beta$ 样细胞或其他细胞的黏附增殖, 是否具有促进细胞分泌等生理功能, 是否具有逆转小鼠高血糖的作用。

Goh等<sup>[24]</sup>验证了通过灌注脱细胞技术制备小鼠脱细胞全胰腺支架的可行性, 并根据胰腺细胞类型再细胞化胰腺支架。结果表明, 灌注脱细胞胰腺可有效去除细胞及细胞内的核酸等物质, 同时保留复杂的三维微结构, 包括可灌注的血管和导管网络以及关键的细胞外基质成分, 其脱细胞过程如图2所示。将胰腺脱细胞支架与腺泡细胞系和 $\beta$ 细胞系重新细胞化, 并培养5 d。结果显示, 细胞在脱细胞胰腺内成功移植, 移植后的胰岛素基因表达显著上调。

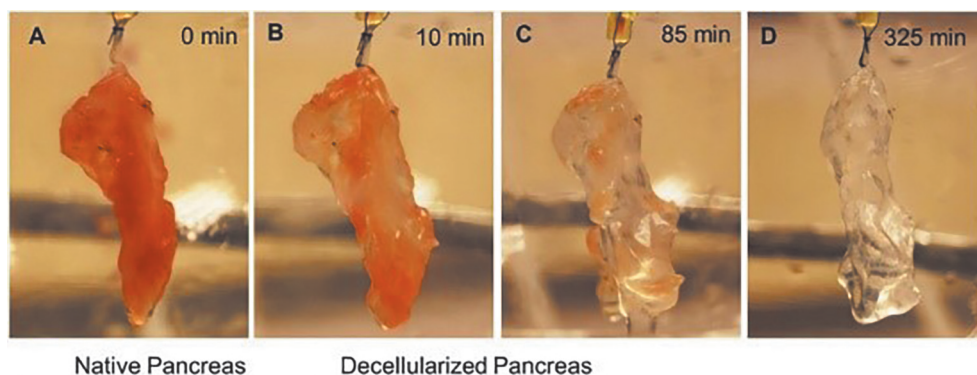
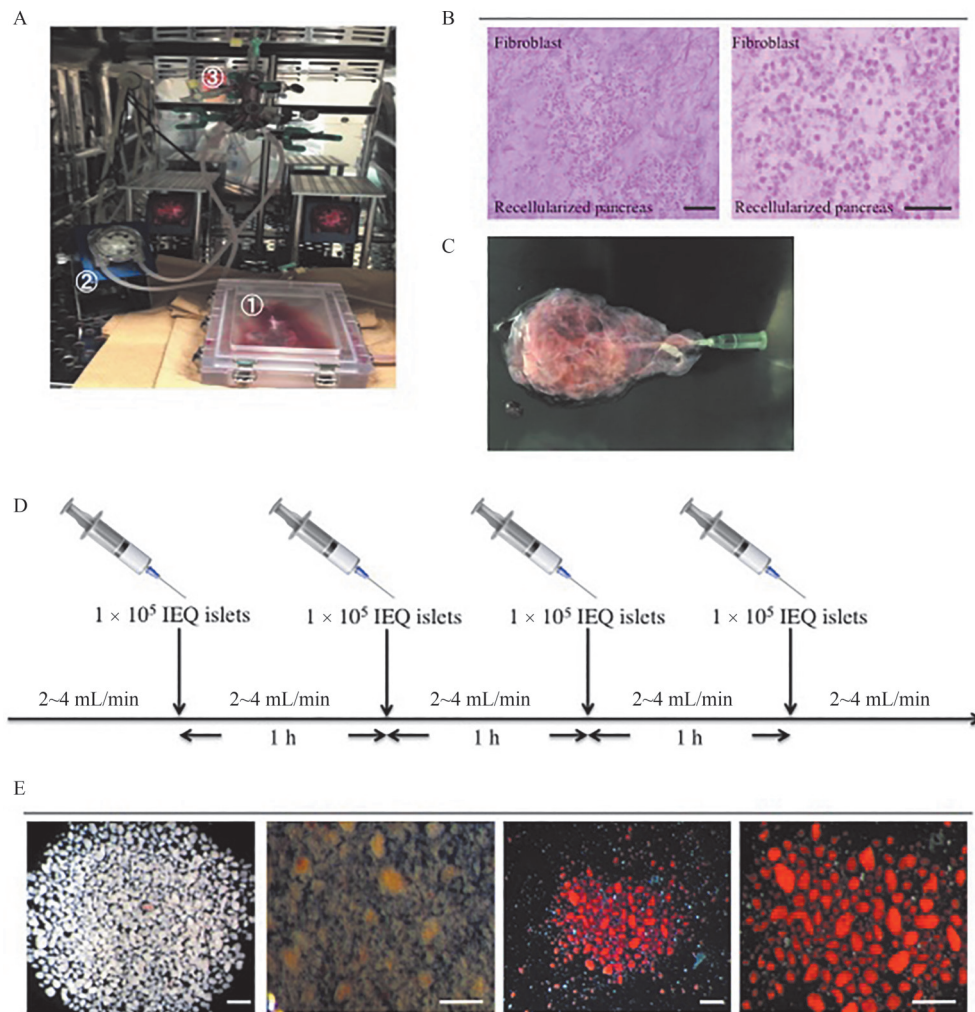


图2 小鼠胰腺灌注脱细胞<sup>[24]</sup>: (A~D) 使用0.5% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 进行小鼠胰腺灌注脱细胞过程中颜色逐渐改变; (D) 325 min后, 脱细胞胰腺呈半透明。

Figure 2 Perfusion-decellularization of murine pancreas<sup>[24]</sup>: (A~D) Panel images depict gradual change of color from perfusion-decellularization of mouse pancreas with 0.5% SDS; (D) Resulting decellularized pancreas after 325 min appeared translucent.

在小鼠的胰腺脱细胞支架成功制备并进行功能验证后, 大动物如猪的胰腺脱细胞支架的制备受到了研究人员的关注。Mirmalek-Sani等<sup>[26]</sup>证明了利用猪胰腺构建人工内分泌胰腺的可行性。他们的脱细胞方案可有效去除细胞遗传物质, 同时保留ECM蛋白和原生血管树。在支架中植入人类干细胞和猪胰岛后, 脱细胞胰腺能支持细胞

黏附增殖并维持胰岛素分泌等细胞的功能。Katsuki等<sup>[27]</sup>开发了一种有效的方法, 实现了完整的猪胰腺的去细胞化和再细胞化, 从而使新鲜分离的猪胰岛在实质空间中得以维持。他们通过胰管灌注胰蛋白酶和Triton X-100使大鼠胰腺均匀脱细胞, 然后通过门静脉多步输注的方法植入细胞, 输注步骤及部分结果如图3所示。相关结



**图3** 猪胰腺胰岛分离及胰管输注方案<sup>[27]</sup>: (A) 胰腺灌注系统代表性图像 (①密闭培养室, ②蠕动泵, ③气泡疏水阀); (B) 低倍镜和高倍镜下脱细胞胰腺中成纤维细胞的H&E染色; (C) 将分离猪胰岛进行再细胞化的猪的部分胰腺支架的大体形态; (D) 经胰管连续输注离体胰岛的方案; (E) 离体胰岛细胞的双硫腙染色 (比例尺:100 μm)。

**Figure 3** Islet isolation from porcine pancreas and infusion protocol via pancreatic duct<sup>[27]</sup>: (A) Representative image of the pancreas perfusion system (①closed chamber, ②peristaltic pump, ③bubble trap); (B) H&E staining of fibroblasts in the decellularized pancreas at low and high magnification; (C) Gross morphology of recellularized porcine partial pancreas scaffold with isolated porcine islets; (D) Sequential infusion protocol of isolated islets via pancreatic duct; (E) Dithizone staining of isolated islet cells (scale bar: 100 μm).

果证明, 胰腺脱细胞基质是一种有价值的支架, 能维持短期胰岛分泌功能并保持其球形形状。

尽管许多研究小组对胰腺的脱细胞支架进行了验证, 但这些小组并没有将再细胞化的脱细胞支架重新植入动物体内, 缺少动物实验的进一步验证。体外实验结果有可能在体内复杂环境的影响下出现偏差, 因此很多学者开始验证体内胰腺脱细胞治疗效果。Uday等<sup>[28]</sup>使用去污剂和酶使胰腺去细胞, 然后将人胎盘的MSC经肝门静脉灌注, 分3步再细胞化该天然支架。将再细胞化的支架移植到链脲佐菌素诱导的糖

尿病小鼠的腹腔靠近其胰腺的位置。移植后, 约80%的小鼠存活。移植胰腺在移植部位形成与周围相吻合的血管, 接受再细胞化胰腺的小鼠第20天时出现血糖降低, 而未经再细胞化的对照组在实验期间未实现血糖水平的有效控制。此外, 实验组未发现免疫排斥现象。免疫组化结果显示, 移植胰腺的胰岛、腺泡和血管网均恢复正常。

为探索更佳的体内移植部位, Wang等<sup>[29]</sup>报道了一个利用脱细胞支架 (decellularized scaffold, DCS) 进行糖尿病小鼠附睾脂肪垫 (epididymal

fat pad, EFP) 胰岛移植的详细方案。他们利用自创方法从 C57BL/6J 小鼠中高效分离和纯化出胰岛, 将胰岛植入脱细胞支架后, 将其移植到由链脲佐菌素诱导的患有糖尿病的同基因 C57BL/6J 小鼠的 EFP 位点。含 500 个胰岛的 DCS 移植体在 10 d 内逆转了高血糖状况, 而不含 DCS 的游离胰岛至少需要 30 d。移植 60 d 后, 胰岛均匀分布在 EFP 组织和 DCS 中, 并形成了新血管。血糖维持正常达 3 个月, 直至移植体移除。总之, DCS 改善了胰岛在肝外位置植入的可行性。

此外, 由于大部分体外实验小组的细胞培养时间相对较短, 为进一步验证脱细胞支架的生物相容性, Damodaran 等<sup>[30]</sup>进行了更长时间的体外实验。他们采用质量分数为 0.5% 的 SDS 灌注脱细胞小鼠胰腺。多种不同的表征方法都表明, 所得到的基质不含细胞, 且保留了胰腺细胞外基质的血管系统及其内部导管、基膜等结构以及糖胺聚糖和胶原等组分。胰岛被注入脱细胞胰腺的导管系统, 48 h 后葡萄糖刺激的胰岛素分泌结果证实了胰岛功能的保留。此外, 用绿色荧光蛋白标记的大鼠胰岛细胞瘤细胞 (INS-1) 对脱细胞胰腺进行再细胞化, 并将该系统培养 120 d 以上, 证实了该支架的生物相容性和无毒性质。

一系列相关报道不仅介绍了利用 SDS 和 Triton X-100 进行灌注脱细胞的方法, 还通过体内外实验验证了脱细胞支架的生物相容性和用于植入培养胰岛细胞的可行性。

## 2.2.2 获得脱细胞支架的方法优化与评估

上述可行性分析已报道了许多胰腺脱细胞的策略。本节在介绍脱细胞、再细胞化方法的同时, 更主要的是总结相关方法的优化及评估手段。

已有文献报道了各种各样的脱细胞方法, 然而少有对脱细胞方法进行比较和评估的研究。Hashemi 等<sup>[31]</sup>首先报道了一种有效且省时的获得胰腺细胞外基质生物支架的方法。将大鼠胰腺与邻近的器官和组织分离后, 他们探究了在不同浓度的 SDS、不同的 2 条灌注通路、不同的灌注时间下的脱细胞支架的特性。研究发现, 当胰腺被质量分数为 0.05% 的 SDS 灌注 6 h 时, 可产生具有完整细胞外基质和适当生物力学特性的生物支架。染料输注实验证明该支架具有完整的血管网络。

Snellings 等<sup>[32]</sup>提出一种通过使用磁共振弹性成像 (magnetic resonance elastography, MRE) 一致、无创地量化脱细胞组织的黏弹性及固相分数以评估脱细胞方案效率和质量的方法, 成像原理及部分结果如图 4 所示。他们是第一个使用 MRE 来调查脱细胞胰腺组织的固相分数和黏弹性之间关系的研究团队, 结果显示, 黏弹性参数与剩余组织基质中固相结构元素的密度相关, 并与固相分数呈幂次关系。此外, 他们所用的脱细胞方案是第一个通过腹腔动脉和肠系膜上动脉途径进行灌注的可控压的脱细胞方案。该方案在很短的时间内提供了一个完全脱细胞器官, 非常有效地创建了结构良好的 ECM 支

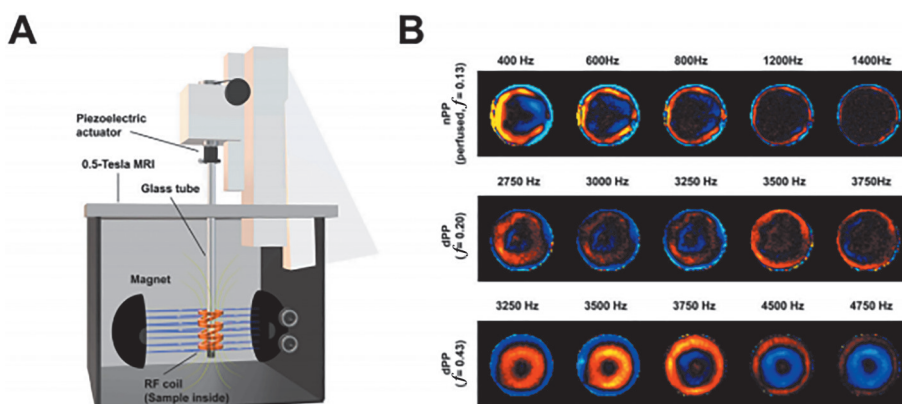


图 4 紧凑多频 MRE 装置的结构及代表性的剪切波图像<sup>[32]</sup>: (A) 紧凑型 MRE 台式系统示意图; (B) 在不同的振动频率和不同的组织类型下获得的剪切波图像。

Figure 4 Overview of the compact multifrequency MRE setup and representative shear wave fields<sup>[32]</sup>: (A) Illustration of the compact MRE benchtop system; (B) Wave images acquired at different vibration frequencies and in different tissue types.

架。此外,针对绝大多数脱细胞方案中用到的具有毒性的 Triton X-100, Klak 等<sup>[33]</sup>开发了一种测定 ECM 中洗涤剂残留量的新方法,即采用四溴酞乙酯钾盐分光光度法对 Triton X-100 进行定量,从而确定脱细胞组织的生物学质量。

在脱细胞过程中,细胞被溶解,细胞内消化酶的酶原暴露在环境中,可能会与恶劣的灌注环境发生相互作用而被激活,激活的酶原又反过来激活其他的酶原。激活的蛋白酶会对 ECM 支架造成损伤,因此需抑制这些酶的活性以尽可能保留 ECM 结构的完整性。Elebring 等<sup>[34]</sup>开发了一种抑制外分泌酶的猪胰腺高效灌注脱细胞的新方法,可最大限度地保存 ECM 的超微结构。与传统的室温灌注相比,新型的冷灌注方法中猪胰腺的 ECM 结构更完整。使用人胎儿胰腺干细胞进行再细胞化,内分泌标记物 C 肽和胰十二指肠同源异型盒 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1) 以及外分泌标记物(胰高血糖素和  $\alpha$ -淀粉酶)均在再细胞化组织中得到了高度表达。此外, Wu 等<sup>[35]</sup>在胰腺脱细胞前引入了冻融循环过程,该过程可有效溶解组织中的细胞,并降低生物支架的免疫原性,使脱细胞支架更利于胰岛素基因的表达。

已有研究人员对脱细胞过程中洗涤液的多条灌注途径进行了比较,但很少有比较再细胞化途径的研究。Demko 等<sup>[36]</sup>比较了胆管和门静脉这 2 种灌注途径对去细胞肝脏再细胞化的效果。灌注质量分数均为 1% 的 Triton X-100 和 SDS 使大鼠肝脏脱细胞,然后用泵或注射器分别通过 2 种途径向脱细胞器官中灌注 1~2 万个胰岛。门静脉途径组中细胞与基质间的边界清楚;胆管途径组中胰岛分布在脱细胞组织中,临近血管分支,但没有清晰的边界。Azan 染色证明门静脉途径组中的细胞大部分位于静脉系统中。总之,他们证明在再细胞化过程中,胆管途径优于门静脉途径。这一报道为再细胞化研究提供了直接的思路。

通常情况下,研究人员将取自正常大鼠的胰腺去细胞,待重新灌注细胞后,植入糖尿病小鼠模型中观察效果,很少有人直接取糖尿病小鼠的胰腺进行去细胞化处理。Huang 等<sup>[37]</sup>证明糖尿病胰腺也可进行去细胞化和再细胞化。他们使用灌注脱细胞技术制备出正常、T1DM 和

2 型 DM (T2DM) 胰腺的小鼠胰腺支架,通过组织学等一系列表征评估各组间差异,结果显示所有的胰腺支架均具有足够的细胞相容性,能支持 HUVECs 和 MIN-6  $\beta$  细胞的增殖和黏附。这项研究为患病胰腺的可用性提供了依据,拓宽了研究的思路。

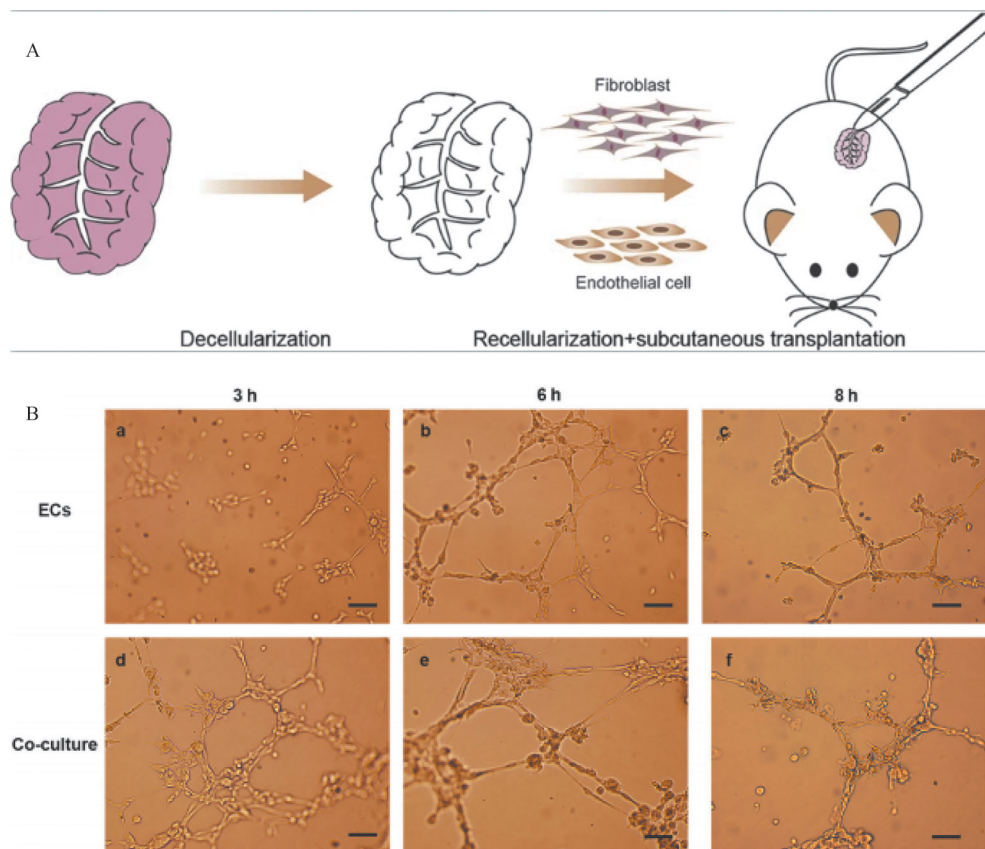
### 2.2.3 脱细胞支架的内皮化与血管化

脱细胞支架为胰腺器官再生提供了新的机会,然而,不充分的血管化会阻碍移植器官中的氧气运输和营养供应,并导致血栓事件。一些研究已进一步提高了脱细胞支架的血管化程度,为将来的胰岛植入提供了更好的移植微环境。

传统构建策略中,依靠共培养细胞的旁分泌作用而增强胰岛活性的思路同样可用于提高脱细胞支架的血管化程度。Xu 等<sup>[38]</sup>证明内皮细胞和成纤维细胞共培养可促进胰腺脱细胞支架的再血管化。他们将人皮肤成纤维细胞 (fibroblasts, FBs) 和 HUVECs 以 1:1 的比例共培养,然后通过脾动脉将 HUVECs 和 FBs 细胞注射到脱细胞支架中。通过循环灌注对脱细胞支架进行再内皮化,研究思路示意图及部分结果如图 5 所示。相关结果显示,当这些细胞被联合培养时,细胞黏附率高于对照组。ELISA 结果显示,灌注介质中生长因子如 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 的释放增加。将这些再细胞化的器官体内植入大鼠背部,28 d 后,免疫组化和免疫荧光染色结果表明共培养样品中新生血管的形成明显优于对照样品。

共培养不同类型细胞的策略是类器官构建中一种十分有前景的方法。胰岛细胞在分离过程中失去了细胞与细胞间的相互作用以及细胞与基质间的相互作用,通过脱细胞支架可弥补部分细胞与基质间的相互作用,但仍缺少细胞与细胞间的相互作用。体内的原生细胞在发挥作用时就受到各种细胞与细胞间的相互作用,因此与适当的几类细胞共培养可更加真实地还原胰岛细胞的微环境。

胰岛移植后因血管化不足而导致移植效果不佳。通常的优化策略是设计提高血管化程度



**图5** 成纤维细胞和内皮细胞共移植以改善胰腺脱细胞支架的内皮化程度的方案示意图及部分结果<sup>[38]</sup>: (A) 方案示意简图; (B) HUVEC组 a、b、c 和共培养 (HUVEC 和 FBs) 组 d、e、f 在基质生长 3、6、8 h 后管腔形成结果 (比例尺: 50 μm)。

**Figure 5** Schematic diagram and partial results of co transplantation of fibroblasts and endothelial cells to improve the endothelialization of pancreatic acellular scaffold<sup>[38]</sup>: (A) Schematic diagram of experiment plan; (B) Tubule-formation in the HUVEC group a, b, c and the co-culture group (HUVECs and FBs; d, e, f) grown on Matrigel after 3, 6 and 8 h (scale bar: 50 μm).

的方法, 也可先将生物支架预血管化, 再植入细胞, 以避免植入初期的快速死亡。Guo 等<sup>[39]</sup>在生物反应器中通过 EPCs 制备了预血管化的胰腺脱细胞支架。他们从 SD 大鼠中采集胰腺后, 灌注质量分数为 1% 的 Triton X-100 和质量分数为 0.1% 的氢氧化铵以去除细胞成分, 同时保留多层级的血管网络。EPCs 取自安乐死的大鼠的后腿股骨和胫骨, 将胰酶处理过的 EPCs 分 3 次注入脱细胞支架, 然后灌注培养 3 d, 从而在血管结构中创建了一个覆盖内皮祖细胞的支架。将支架植入小鼠的背侧皮下组织, 分别于 10、20 d 后处死小鼠进行分析。结果显示, 该支架中 ECM 主要成分保存完整, 具有良好的生物相容性, EPCs 分布均匀, 移植后的支架形成了明显的血管且新血管密度的定量结果差异有统计学意义。总之, 该研究证明了预植入 EPCs 的胰腺脱细胞支架可加快移植植物中的血管形成。

肝素 (heparin, HEP) 是一种黏多糖硫酸酯,

具有富集生长因子的作用, 利用促血管生长因子可增强支架的内皮化。Xu 等<sup>[40]</sup>通过肝素将生长因子修饰在支架上, 从而在温和条件下获得了内皮化的胰腺脱细胞支架, 提高了脱细胞支架的血管生成性能。原生胰腺取自 SD 大鼠, 灌注质量分数为 1% 的 Triton X-100 和质量分数为 0.1% 的氢氧化铵进行去细胞化处理, 采用 EDC/NHS 将肝素共价结合到脱细胞支架上 (PDS)。体外的人脐静脉内皮细胞吸附实验结果表明 HEP-PDSs 对 HUVEC 的生长和增殖具有更好的生物相容性。大鼠背部皮下组织的体内植入结果表明, 植入 14 d 后, HEP-PDSs 中的血管数量显著增加, 明显优于 PDSs 组。

Everwien 等<sup>[41]</sup>首先提出了脱细胞、再内皮化和内分泌再填充大鼠肝脏以作为内分泌新胰腺的方案。大鼠肝脏经灌注脱细胞后, 在第 1~2 天向基质中重新填充内皮细胞和间充质干细胞, 并在灌注室中培养至第 8 天使新器官成熟。

第9天将分离到的完整的胰岛植入器官。在胰岛培养1或3 d后进行葡萄糖刺激胰岛素分泌(glucose stimulates insulin secretion, GSIS) 试验, 结果表明新器官具有完全的胰岛功能。

胰岛分离过程中失去了很多有助于细胞功能发挥的生长因子, 而全血中的富血小板血浆可缓慢释放生长因子, 补充胰岛分离过程中的损失。Zhang 等<sup>[42]</sup>提出一种负载富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP) 的大鼠胰腺脱细胞支架(PDS) 以增强血管化和生物相容性。他们从SD大鼠心脏采集全血, 采用梯度离心法制备PRP。通过灌注获得具有完整血管分支的PDS和负载PRP的PDS。研究结果表明, 与PDS相比, 负载PRP的PDS的力学性能增强, 且能缓慢而持续地释放生长因子以补充各个过程中细胞因子的损失。在体外, 将HUVECs植入负载PRP的PDS中, 并在循环灌注系统中培养。与对照组相比, 负载PRP的PDS显著促进了内皮细胞的存活、增殖和促血管生成基因的表达。在体内, 将植入了HUVECs且负载PRP的PDS与植入大鼠皮下组织

相比, 结果显示其血管化充分, 宿主炎症反应减弱, 巨噬细胞以M2为主。此外, M2巨噬细胞还通过其促再生作用促进支架内组织血管生成。负载PRP是一种很有希望的以提高生长因子浓度为原理来促进血管化的方法。

此外, 共价偶联某些可发挥特殊功能的多肽也是一种促血管化的方法。Wan 等<sup>[43]</sup>提出了一种全新的促进大鼠脱细胞胰腺支架(PDS) 再内皮化的有效方法。他们通过灌注质量分数为1%的Triton X-100和质量分数为0.1%的氢氧化铵对大鼠胰腺进行脱细胞化处理, 然后通过灌注培养将GRGDSPC肽共价偶联在脱细胞支架上, 在生物反应器中经脾动脉将HUVECs注入支架内使GRGDSPC-PDS和未处理的胰腺支架再内皮化。体外实验表明, GRGDSPC-PDS能支持HUVECs的存活并促进其增殖。将GRGDSPC-PDS与未处理的PDS植入小鼠背面, 2周后GRGDSPC偶联支架中观察到更多的血管。脱细胞支架血管化的常用方法和策略汇总如表1所示。

表1 脱细胞支架血管化的常用方法和策略汇总。

Table 1 Summary of common methods and strategies for vascularization of decellularized scaffolds.

策略	主要方法	参考文献
多种细胞共培养	FBs和HUVECs以1:1的比例共培养,通过脾动脉注射到支架中,循环灌注培养	[38]
支架预血管化	从同种大鼠的后腿股骨和胫骨中取EPCs,分3次注入脱细胞支架,并灌注培养3 d	[39]
单种生长因子修饰	采用EDC/NHS将肝素共价结合到脱细胞支架上,肝素对VEGF具有结合作用,从而将VEGF修饰到支架上	[40]
PRP负载	大鼠心脏采集全血,梯度离心法制备PRP,向脱细胞支架中循环灌注PRP	[42]
多肽偶联	通过循环灌注培养将GRGDSPC肽共价偶联在脱细胞支架上	[43]

总结上述促血管化方法, 可得出2个常规但有效的策略。一是共培养某些细胞, 借助旁分泌作用增加胰岛细胞活性和血管化程度; 二是通过富集或直接补充等方法增加相关生长因子的浓度, 其中负载PRP是一种很有希望的提高生长因子浓度的方法。

#### 2.2.4 来自其他器官的脱细胞支架

大多数研究集中在以猪或大鼠的胰腺作为脱细胞的器官。然而, 也有采用其他脱细胞器官进行再生胰腺构建的报道。虽然利用了其他器官的脱细胞支架, 但由于这些器官本身的构造, 也取得了一定的成功。这里仅列举几种具有代表性的研究, 以供拓宽思路。

Zhou 等<sup>[44]</sup>证明大鼠肝的脱细胞支架可促进间充质干细胞来源的胰岛素分泌细胞的生长发育。他们首先通过灌注质量分数为1%的Triton X-100和质量分数为0.1%的氢氧化铵制备了脱细胞肝支架, 然后通过门静脉输注的方法将胰岛样簇重新植入脱细胞支架中, 并采用动态循环灌注装置进行培养, 最后通过免疫荧光、RT-PCR等技术评估了培养结果。结果表明, 该脱细胞支架不仅可以维持胰岛样簇的存活、分化、增殖, 还可以促进胰岛素的分泌。

Wang 等<sup>[45]</sup>利用猪心包和肌腱制备了一种新型双胺化脱细胞支架用于胰岛移植。该支架以猪心包脱细胞基质为底层, 将脱细胞的猪肌腱

组织磨成粉末后置于心包的顶表面。将胰岛细胞接种到圆形的新型支架后,植入糖尿病小鼠的附睾脂肪垫中。结果表明,复合脱细胞支架(composite decellularized scaffold, CDS)可增强胰岛的黏附性和活力。将胰岛-CDS结构移植到糖尿病小鼠后,83%的糖尿病小鼠血糖恢复正常。在整个研究过程中,小鼠血糖水平稳定且保持正常,移植300 d后研究结束。

Zhu等<sup>[46]</sup>利用大鼠脱细胞睾丸组织作为一种新型支架构建了生物人工胰腺。将大鼠睾丸组织浸泡在质量分数为1%的Triton X-100和质量分数为1%的SDS溶液中进行脱细胞化,将MIN-6  $\beta$ 细胞系植入脱细胞支架中。放射免疫分析证明支架对 $\beta$ 细胞具有良好的生物相容性,可维持其胰岛素分泌能力。将再细胞化的支架植入糖尿病大鼠的肠系膜中,从第8天开始实验组小鼠的血糖水平开始下降并逐渐恢复正常,小鼠体重维持稳定,未出现明显下降。28 d后将移植体取出,未发现黏连痕迹,且植入部位有新血管形成。

Citro等<sup>[47]</sup>构建了第一个以脱细胞大鼠肺叶、内皮细胞和胰岛为基础的血管化胰岛器官(vascularized islet organ, VIO)。脱细胞肺支架包含2个独立的腔室,可分别用于内分泌细胞的植入以及血液灌注。通过灌注内皮细胞将脱细胞肺基质内皮化,为胰岛移植提供了完整的分级预血管树。当VIOs暴露于体内或体外的高血糖时,成熟的VIOs会从静脉释放生理性胰岛素,与部分体内移植的新鲜胰岛相比,VIOs能更有效地降低血糖。在糖尿病小鼠的长期移植中,与以无器械方式移植的胰岛相比,皮下植入的VIOs可更快、更有效地使血糖恢复正常。

### 3 总结与展望

干细胞衍生的类器官是发育生物学和疾病检测中极具前景的模型。类器官构建的三要素分别为:种子细胞、培养基和基质。其中,基质为类器官的培养提供支撑性结构和一些营养成分。目前,最常见的基质是动物源性的商业水凝胶,如Matrigel和基底膜提取物(basement membrane extract, BME),它们在最近几年极大地促进了类器官的发展。然而,这些成分是从小鼠肉瘤细胞分泌的基底膜中获得的,其成分

不固定且各批次均有所不同,与理想基质存在较大差异。

理想的类器官基质应满足以下条件:(1)具有高度的生物相容性、无毒和无免疫原性;(2)具有优异的力学性能;(3)可生物降解;(4)支持并改善细胞的生命活动,包括细胞的分化、增殖、黏附和迁移;(5)模拟各种细胞的特定微环境;(6)与细胞间存在良好的相互作用。到目前为止,各种天然和人工合成材料已被用作3D细胞培养或类器官构建的基质,如胶原蛋白、明胶、壳聚糖和Matrigel等,但这些物质都只符合上述标准中的一部分。而基质研究和开发的最终目标是模拟ECM,因为由它构成细胞的微环境,对细胞生存至关重要。对此,提出了天然的脱细胞细胞外基质可直接用作类器官基质的设想。

在脱细胞细胞外基质用于心脏、肝脏、肺类器官构建之后,针对其他器官如胰腺的研究也日益增多,因此本文对典型的ECM支架构建胰岛类器官的案例进行了总结。具体而言,可从器官来源、脱细胞方法、实验构思及结果三方面进行分析。

首先,用于脱细胞的器官来源可大体分为两大类,一是容纳胰岛细胞的胰腺,二是较胰腺有结构或功能优势的器官。最初的研究集中于胰腺是因为胰岛细胞所处的位置正是胰腺,借此方法希望在体外完全还原胰岛所处的复杂微环境,从而为胰岛的生存提供保障。之后出现睾丸、肺等其他器官则是因为这些器官在结构或功能上存在优势。例如,睾丸具有丰富的血管,脱细胞后可保留许多有利于细胞存活的生长因子;肺脱细胞后的支架含有2个独立的腔室,可分别用于内分泌细胞的植入和血液灌注。目前仍无可靠研究比较何种器官为最佳来源,但值得关注的方向有:(1)血管结构丰富的器官;(2)结构上可避免胰岛直接接触血液的器官或支架。

其次,用于脱细胞的方法可分为三大类:物理法、化学法和酶法。物理法中声波降解法及浸泡搅拌法等只适用于表皮组织和较小较薄的器官,不适用于大型器官。化学法中的离子/非离子洗涤剂、酸或碱等脱细胞效果显著,但对全器官的整体力学性能及ECM微观结构有较大破坏,需谨慎使用。酶法中如核酸酶和胰蛋白酶

常用于脱细胞处理,可精确去除细胞成分并防止出现不利的免疫反应,常与其他方法联用。回顾本文中提到的案例,大多使用化学法与酶法联用,并采用灌注的方式进行脱细胞处理,这将是后续对大器官进行脱细胞处理的研究方向。

最后,根据类器官构建的思路与结果可分为以下几种,其中存在方法上的联用。需先得到类器官构建的基本框架,即获得一种生物支架以供后续细胞的黏附生长,即各种器官脱细胞后的ECM支架。此后,为使胰岛在植入后有较好的生存状况,需使支架尽可能还原胰岛生存的微环境。其中的一大重点是提高支架的血管化程度,因为胰岛在原生组织中接受了大量的血液供应,因此所构建的类器官需满足胰岛较大的氧气与营养需求。还原微环境的方法包括但不限于:(1)共培养内皮细胞和干细胞;(2)通过肝素或其他途径补充相关生长因子,如VEGF等;(3)偶联功能多肽;(4)改善支架外部培养条件。目前不仅在体外构建出了可供胰岛存活的类器官,而且在体内也有可长期存活并发挥胰岛降糖功能的类器官研究<sup>[48-50]</sup>。由此可充分证明类器官是一项很有前景的再生医学技术,未来胰岛类器官将朝着产生更长期的生理性血糖控制,并预防各种并发症的目标进行。

总之,器官的脱细胞支架为再生医学提供了新的思路。脱细胞支架可完美保留ECM的主

要成分、多层级的血管网络等作用的微环境,在类器官构建方面具有很大的潜力。到目前为止,脱细胞支架已在再生胰腺构建中取得了一定的进展和应用。然而,脱细胞支架的发展仍面临一些挑战,主要体现在以下几个方面:

(1)各个批次间的脱细胞支架的性质存在差异。受供体器官来源不确定性影响,制备的脱细胞支架的性质难以保持一致,这为商业化产品的制备留下了隐患。

(2)脱细胞支架增强类器官功能的相关机制不够清楚。虽通过一些实验可验证脱细胞支架具有促进细胞增殖黏附、增强细胞功能的效果,但内在机制仍不清楚。具体机制的研究可帮助研究人员更好地理解微环境的重要意义,构建更接近天然的细胞微环境。

(3)脱细胞支架在保留原有血管系统的情况下,难以根据实验需要任意调整支架尺寸。由于血管网络结构具有固定组成,其难以满足所有实验要求。

(4)临床转化存在很大困难。由于脱细胞支架具有天然来源的性质,其风险评估极其困难,此外应进一步探究免疫排斥反应等问题。

虽然脱细胞支架还面临不少挑战,但其独特的微环境优势、真正仿生的生物学理念、已有的长期正向结果,无不预示着脱细胞ECM支架将是再生医学领域中最有前景的重要技术。

## 参考文献

- 1 Heald A H, Stedman M, Davies M, et al. Estimating life years lost to diabetes: Outcomes from analysis of national diabetes audit and office of national statistics data[J]. *Cardiovasc Endocrinol Metab*, **2020**, 9(4): 183-185.
- 2 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[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, **2022**, 183: 109119.
- 3 Rayburn W. Diagnosis and classification of diabetes mellitus: Highlights from the American diabetes association. [J]. *The Journal of Reproductive Medicine*, **1997**, 429:585-586.
- 4 Colli M L, Szymczak F, Eizirik D L. Molecular footprints of the immune assault on pancreatic beta cells in type 1 diabetes[J]. *Frontiers in Endocrinology*, **2020**, 11: 568446.
- 5 Aslamy A, Oh E, Olson E M, et al. Doc2b protects beta-cells against inflammatory damage and enhances function [J]. *Diabetes*, **2018**, 67(7): 1332-1344.
- 6 Skrzypek K, Groot N M, Van L J, et al. Pancreatic islet macroencapsulation using microwell porous membranes [J]. *Sci Rep*, **2017**, 7(1): 9186.
- 7 Shapiro A M, Lakey J R, Ryan E A, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen[J]. *N Engl J Med*, **2000**, 343(4): 230-238.
- 8 Markmann J F, Rickels M R, Eggerman T L, et al. Phase 3 trial of human islet-after-kidney transplantation in type 1 diabetes[J]. *Am J Transplant*, **2021**, 21(4): 1477-1492.

- 9 Espona-Noguera A, Ciriza J, Canibano-Hernandez A, et al. Review of advanced hydrogel-based cell encapsulation systems for insulin delivery in type 1 diabetes mellitus[J]. *Pharmaceutics*, **2019**, 11(11): 597.
- 10 Jiang L, Shen Y R, Liu Y J, et al. Making human pancreatic islet organoids: Progresses on the cell origins, biomaterials and three-dimensional technologies[J]. *Theranostics*, **2022**, 12(4): 1537-1556.
- 11 Sato T, Vries R G, Snippert H J, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche[J]. *Nature*, **2009**, 459(7244): 262-265.
- 12 Zhang D H, Jiang W, Liu M, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells[J]. *Cell Res*, **2009**, 19(4): 429-438.
- 13 Liu H T, Wang Y Q, Wang H, et al. A droplet microfluidic system to fabricate hybrid capsules enabling stem cell organoid engineering[J]. *Adv Sci (Weinh)*, **2020**, 7(11): 1903739.
- 14 Youngblood R L, Sampson J P, Lebioda K R, et al. Microporous scaffolds support assembly and differentiation of pancreatic progenitors into beta-cell clusters[J]. *Acta Biomater*, **2019**, 96: 111-122.
- 15 Navarro-Tableros V, Gai C, Gomez Y, et al. Islet-like structures generated in vitro from adult human liver stem cells revert hyperglycemia in diabetic scid mice[J]. *Stem Cell Rev Rep*, **2019**, 15(1): 93-111.
- 16 Thorel F, Nepote V, Avril I, et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss[J]. *Nature*, **2010**, 464(7292): 1149-1154.
- 17 Stephens C H, Orr K S, Acton A J, et al. In situ type 1 oligomeric collagen macroencapsulation promotes islet longevity and function in vitro and in vivo[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **2018**, 315(4): E650-E661.
- 18 Miao G, Ostrowski R P, Mace J, et al. Dynamic production of hypoxia-inducible factor-1alpha in early transplanted islets[J]. *Am J Transplant*, **2006**, 6(11): 2636-2643.
- 19 Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, et al. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation[J]. *Cell Stem Cell*, **2015**, 16(5): 556-565.
- 20 Marchioli G, Luca A D, De Koning E, et al. Hybrid polycaprolactone/alginate scaffolds functionalized with VEGF to promote de novo vessel formation for the transplantation of islets of langerhans[J]. *Adv Healthc Mater*, **2016**, 5(13): 1606-1616.
- 21 Song J, Millman J R. Economic 3D-printing approach for transplantation of human stem cell-derived beta-like cells[J]. *Biofabrication*, **2016**, 9(1): 015002.
- 22 Liu X, Carter S D, Renes M J, et al. Development of a coaxial 3D printing platform for biofabrication of implantable islet-containing constructs[J]. *Adv Healthc Mater*, **2019**, 8(7): e1801181.
- 23 Zbinden A, Urbanczyk M, Layland S L, et al. Collagen and endothelial cell coculture improves beta-cell functionality and rescues pancreatic extracellular matrix[J]. *Tissue Eng Part A*, **2021**, 27(13-14): 977-991.
- 24 Goh S K, Bertera S, Olsen P, et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering[J]. *Biomaterials*, **2013**, 34(28): 6760-6772.
- 25 Santini-Gonzalez J, Simonovich J A, Castro-Gutierrez R, et al. In vitro generation of peri-islet basement membrane-like structures[J]. *Biomaterials*, **2021**, 273: 120808.
- 26 Mirmalek-Sani S H, Orlando G, Mcquilling J P, et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering[J]. *Biomaterials*, **2013**, 34(22): 5488-5495.
- 27 Katsuki Y, Yagi H, Okitsu T, et al. Endocrine pancreas engineered using porcine islets and partial pancreatic scaffolds[J]. *Pancreatology*, **2016**, 16(5): 922-930.
- 28 Uday K, Tripathi R, Kameshwari Y, et al. Refunctionalization of decellularized organ scaffold of pancreas by recellularization: Whole organ regeneration into functional pancreas[J]. *Tissue Eng Regen Med*, **2021**, 18(1): 99-112.
- 29 Wang K, Wang X, Han C S, et al. Scaffold-supported transplantation of islets in the epididymal fat pad of diabetic mice[J]. *J Vis Exp*, **2017**(125): e54995.
- 30 Damodaran R G, Vermette P. Decellularized pancreas as a native extracellular matrix scaffold for pancreatic islet seeding and culture[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, **2018**, 12(5): 1230-1237.
- 31 Hashemi J, Pasalar P, Soleimani M, et al. Decellularized pancreas matrix scaffolds for tissue engineering using ductal or arterial catheterization[J]. *Cells Tissues Organs*, **2018**, 205(2): 72-84.
- 32 Snellings J, Keshi E, Tang P, et al. Solid fraction determines stiffness and viscosity in decellularized pancreatic

- tissues[J]. *Biomater Adv*, **2022**, 139: 212999.
- 33 Klak M, Lojszczyk I, Berman A, et al. Impact of porcine pancreas decellularization conditions on the quality of obtained dECM[J]. *Int J Mol Sci*, **2021**, 22(13): 7005.
- 34 Elebring E, Kuna K, Kvarnstrom N, et al. Cold-perfusion decellularization of whole-organ porcine pancreas supports human fetal pancreatic cell attachment and expression of endocrine and exocrine markers[J]. *J Tissue Eng*, **2017**, 8: 2041731417738145.
- 35 Wu D, Wan J, Huang Y, et al. 3D culture of MIN-6 cells on decellularized pancreatic scaffold: In vitro and in vivo study[J]. *Biomed Res Int*, **2015**, 2015: 432645.
- 36 Demko P, Hillebrandt K H, Napierala H, et al. Perfusion-based recellularization of rat livers with islets of langerhans[J]. *Journal of Medical and Biological Engineering*, **2022**, 42(2): 271-280.
- 37 Huang Y B, Mei J, Yu Y L, et al. Comparative decellularization and recellularization of normal versus streptozotocin-induced diabetes mellitus rat pancreas[J]. *Artif Organs*, **2019**, 43(4): 399-412.
- 38 Xu L C, Huang Y, Wang D Z, et al. Reseeding endothelial cells with fibroblasts to improve the re-endothelialization of pancreatic acellular scaffolds[J]. *J Mater Sci Mater Med*, **2019**, 30(7): 85.
- 39 Guo Y B, Wu C, Xu L C, et al. Vascularization of pancreatic decellularized scaffold with endothelial progenitor cells[J]. *J Artif Organs*, **2018**, 21(2): 230-237.
- 40 Xu L C, Guo Y B, Huang Y, et al. Constructing heparin-modified pancreatic decellularized scaffold to improve its re-endothelialization[J]. *J Biomater Appl*, **2018**, 32(8): 1063-1070.
- 41 Everwien H, Keshi E, Hillebrandt K H, et al. Engineering an endothelialized, endocrine neo-pancreas: Evaluation of islet functionality in an ex vivo model[J]. *Acta Biomater*, **2020**, 117: 213-225.
- 42 Zhang L, Qiu H Q, Wang D Z, et al. Enhanced vascularization and biocompatibility of rat pancreatic decellularized scaffolds loaded with platelet-rich plasma[J]. *J Biomater Appl*, **2020**, 35(3): 313-330.
- 43 Wan J, Wang L, Huang Y, et al. Using GRGDSPC peptides to improve re-endothelialization of decellularized pancreatic scaffolds[J]. *Artif Organs*, **2020**, 44(4): E172-E180.
- 44 Zhou P C, Guo Y B, Huang Y, et al. The dynamic three-dimensional culture of islet-like clusters in decellularized liver scaffolds[J]. *Cell Tissue Res*, **2016**, 365(1): 157-171.
- 45 Wang X, Wang K, Zhang W, et al. A bilaminated decellularized scaffold for islet transplantation: Structure, properties and functions in diabetic mice[J]. *Biomaterials*, **2017**, 138: 80-90.
- 46 Zhu Q Y, Lu C T, Jiang X, et al. Using recombinant human collagen with basic fibroblast growth factor to provide a simulated extracellular matrix microenvironment for the revascularization and attachment of islets to the transplantation region[J]. *Front Pharmacol*, **2019**, 10: 1536.
- 47 Citro A, Moser P T, Dugnani E, et al. Biofabrication of a vascularized islet organ for type 1 diabetes[J]. *Biomaterials*, **2019**, 199: 40-51.
- 48 Li H F, Shang Y L, Feng Q, et al. A novel bioartificial pancreas fabricated via islets microencapsulation in anti-adhesive core-shell microgels and macroencapsulation in a hydrogel scaffold prevascularized in vivo[J]. *Bioactive Materials*, **2023**, 27: 362-376.
- 49 Li J B, Fang Y L, Wu Z H, et al. Biomimetic artificial islet model with vascularized microcapsule structures for durable glycemic control[J]. *Materials Futures*, **2024**, 3(3): 035401.
- 50 Sun J, Li J B, Huan Z K, et al. Mesenchymal stem cell-laden composite  $\beta$  cell porous microgel for diabetes treatment[J]. *Advanced Functional Materials*, **2023**, 33(21): 2211897.

## Research Progress on Acellular ECM Scaffold for Islet Organoid Construction

WANG Yu-kang, WANG Jie, YI Xin, FU Shuang, WANG Shu-fang\*  
(Key Laboratory of Bioactive Materials of Ministry of Education, College of Life Sciences,  
Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract** As a common chronic disease, the treatment of diabetes has always been concerned. The strategy of islet transplantation and organoid technology for treatment are difficult to play the expected role due to insufficient donors, low vascularization and loss of microenvironment. The acellular scaffold retains the overall structure of the natural ECM and the inherent growth factors, simulates the microenvironment of cells replanted *in vivo*, making the acellular scaffold an ideal carrier for islet transplantation. The current research has confirmed that the acellular scaffold of organs has high academic research value and clinical application potential. In this paper, we summarized the construction methods of acellular scaffolds for organs and introduced the research progress of acellular scaffolds for the construction of regenerated pancreas in recent years. In general, acellular scaffolds are usually constructed by injecting detergent and enzyme solution and supplemented by physical effects. Meanwhile, organoids prepared on the basis of ECM scaffolds have produced short-term positive therapeutic effects in animals. In addition, the methods of endothelialization of the acellular scaffold were introduced, such as co-culture of multiple cell types and enrichment of growth factors in various ways. Finally, the challenges and future development opportunities faced by acellular scaffolds at this stage were summarized.

**Keywords** Diabetes, Acellular scaffold, Extracellular matrix, Organoid, Regenerated pancreas

---

\* Corresponding author: WANG Shu-fang, E-mail: wangshufang@nankai.edu.cn.