



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111471643 B

(45) 授权公告日 2020.12.29

(21) 申请号 202010272903.0

(22) 申请日 2020.04.09

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 111471643 A

(43) 申请公布日 2020.07.31

(73) 专利权人 创芯国际生物科技(广州)有限公司  
地址 510600 广东省广州市黄埔区瑞发路1号自编(1)栋四层016

(72) 发明人 李刚 汪珂 陈泽新

(74) 专利代理机构 广州容大知识产权代理事务所(普通合伙) 44326  
代理人 刘新年

(51) Int. Cl.  
C12N 5/071 (2010.01)

(56) 对比文件  
CN 109679915 A, 2019.04.26  
CN 110129270 A, 2019.08.16  
CN 110066767 A, 2019.07.30  
CN 109609441 A, 2019.04.12  
CN 110621695 A, 2019.12.27  
CN 109136163 A, 2019.01.04  
CN 110249044 A, 2019.09.17  
CN 108367099 A, 2018.08.03  
WO 2014153294 A1, 2014.09.25

KR 20190001297 A, 2019.01.04  
WO 2019178267 A3, 2019.10.10  
WO 2019217429 A1, 2019.11.14  
US 2018291350 A1, 2018.10.11  
WO 2017066507 A1, 2017.04.20  
WO 2019133810 A1, 2019.07.04  
WO 2014152321 A1, 2014.09.25  
WO 2012168930 A3, 2013.04.11  
CN 111117946 A, 2020.05.08  
CN 111565798 A, 2020.08.21

何韶衡. 人呼吸道粘液分泌体外实验方法的建立.《中国呼吸与危重监护杂志》.2003, (第06期),

何东南等. 不同细胞因子在小肠类器官片断体外培养中的作用研究.《肠外与肠内营养》.2005, (第05期),

吕磷. 人小涎腺间充质干细胞和上皮干/祖细胞分离鉴定及其构建生物工程化唾液腺类器官的研究.《中国博士学位论文全文数据库(电子期刊)医药卫生科技辑》.2015, (第11期),

Jie Zhou等. Differentiated human airway organoids to assess infectivity of emerging influenza virus.《PNAS》.2018, 第115卷(第26期), (续)

审查员 吴静

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

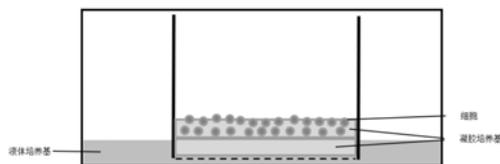
(54) 发明名称

一种通用型上呼吸道粘膜类器官的培养基及培养方法

(57) 摘要

本发明提供一种通用型上呼吸道粘膜类器官的培养基及培养方法,其液体培养基包括基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素、无菌水和BEGM培养液。其凝胶培养基在液体培养基的基础上还加入浓度为3-6mg/ml的Matrigel基质胶。采用该培养基进行上呼吸道粘膜组织类器官的培养,适用范围广,能够培养包

括来源于鼻、口、咽喉等多来样本源的组织,并且培养效果、粘膜组织细胞的分化与细胞纤毛的生长速度显著提高,有利于上呼吸道粘膜组织细胞生长与功能的维持。



CN 111471643 B

[接上页]

(56) 对比文件

Else Driehuis等.Oral mucosal organoids as a potential platform for personalizae cancer therapy.《Cancer Discov》.2019,第9卷(第7期),

Duan, HG等.Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells improves nasal mucosa damage by radiation.《BIOTECHNOLOGY LETTERS》.2018,第40卷(第6期),第999-1007页.

Allison M Greaney等.Platform effects on regeneration by pulmonary basal cells as evaluated by single-cell RNA sequencing.《Cell Rep》.2020,第30卷(第12

期),第4250-4265页.

Qi Tan等.Human airway organoid engineering as a step toward lung regeneration and disease modeling.《Biomaterials》.2016,第11卷第118-132页.

Sandra Ruiz Garcia等.Novel dynamics of human mucociliary differentiation revealed by single-cell RNA sequencing of nasal epithelial cultures.《Development》.2019,第146卷(第20期),

Rachael E. Rayner等.Optimization of Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) Cell 3D Cultures for in vitro Lung Model Studies.《Sci Rep》.2019,

1. 一种通用型上呼吸道粘膜类器官的液体培养基,其特征在于:由基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素、BEGM培养液和无菌水组成;其中,所述基础细胞因子的组成为:10-100ng/ml的EGF,20-500ng/ml的Noggin,20-500ng/ml的R-spondin 1,20-500ng/ml的Wnt3a;所述特异性细胞因子的组成为:1-50ng/ml的Wnt7a,10-200ng/ml的IL-6;所述青霉素浓度为100U/ml;所述链霉素浓度为0.1mg/ml;所述抑制剂的组成为:100-2000nM的EW-7197-HCl (EW-7197Hydrochloride),1-40 $\mu$ M的SB 203580-HCl (SB 203580Hydrochloride),2-50 $\mu$ M的Y-27632dihydrochloride;以上各组分的浓度均以其在BEGM培养液和无菌水的混合液中的浓度为准。

2. 根据权利要求1所述的一种通用型上呼吸道粘膜类器官的液体培养基,其特征在于:所述液体培养基的制备方法为:将基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素的组分用无菌水配制成混合母液,然后加入BEGM培养液得到液体培养基。

3. 一种通用型上呼吸道粘膜类器官的凝胶培养基,其特征在于:由基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素、Matrigel基质胶、BEGM培养液和无菌水组成,其中所述基础细胞因子的组成为:10-100ng/ml的EGF,20-500ng/ml的Noggin,20-500ng/ml的R-spondin 1,20-500ng/ml的Wnt3a;所述特异性细胞因子的组成为:1-50ng/ml的Wnt7a,10-200ng/ml的IL-6;所述青霉素浓度为100U/ml;所述抑制剂的组成为:100-2000nM的EW-7197-HCl (EW-7197Hydrochloride),1-40 $\mu$ M的SB 203580-HCl (SB 203580Hydrochloride),2-50 $\mu$ M的Y-27632dihydrochloride;所述链霉素浓度为0.1mg/ml;所述Matrigel基质胶的浓度为3-6mg/ml;以上各组分的浓度均以其在BEGM培养液和无菌水的混合液中的浓度为准。

4. 根据权利要求3所述的一种通用型上呼吸道粘膜类器官的凝胶培养基,其特征在于:所述凝胶培养基的制备方法为:将基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素的组分按照上述终浓度用无菌水配制成混合母液,然后加入BEGM培养液,再将上述混合液在4 $^{\circ}$ C条件下与Matrigel基质胶混合得到凝胶培养基。

5. 一种上呼吸道粘膜类器官的培养方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 将新鲜来源为上呼吸道位的手术切除标本或活检组织进行预处理,得到细胞数量为3-50个细胞的细胞团后,离心,去除上清,细胞团沉淀备用;

2) 将权利要求3或4所述的凝胶培养基在transwell小室内底面形成一层1-2mm的凝胶层;

3) 将权利要求3或4所述的凝胶培养基重悬步骤1)得到的细胞团沉淀,混匀后将细胞液加至transwell小室内凝胶层上,形成另一层1-5mm的细胞凝胶层;

4) 将步骤3)的transwell小室放在培养皿内,然后在培养皿内加入权利要求1或2所述的液体培养基,所述液体培养基液面高度不高于两层凝胶层总高度,然后于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>浓度下培养;

5) 每隔2-3天更换一次权利要求1或2所述的液体培养基,培养4-14天,得到上呼吸道组织类器官。

## 一种通用型上呼吸道粘膜类器官的培养基及培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种通用型上呼吸道粘膜类器官的培养基及培养方法。

### 背景技术

[0002] 上呼吸道主要包括鼻、咽、喉等器官。上呼吸道内表面都分布有分泌液和纤毛(鼻孔、咽后壁和声带粘膜除外),它能温暖(或冷却)、湿润和净化吸入的空气,对于呼吸器官和人体有着保护作用。上呼吸道对于人体有着非常重要的过滤清洁作用,通过呼吸道的过滤和清洁作用,阻挡和清除了随空气进入呼吸道的颗粒、病原体等异物,使进入肺泡的气体几乎清洁无菌,而这些功能主要是通过上呼吸道粘膜组织来实现的。

[0003] 上呼吸道粘膜组织的细胞通常呈长柱状致密结构,气流经过的表面有大量纤毛生长。这种特殊结构阻挡了来自空气中的细菌、病毒等病原体,为人体的免疫系统构建了第一层防线。呼吸道感染是病原体感染的最常见方式,也是最容易引起大规模公共卫生事件的传染方式。“新冠”疫情的罪魁祸首是2019新型冠状病毒(2019-nCoV),2019-nCoV主要通过呼吸道感染传播。研究的功能与结构有助于帮助我们了解呼吸道感染的发病机制,从而为疾病的预防、控制和诊疗奠定坚实的基础。上呼吸道粘膜组织因为其特殊结构,在以往经典的体外培养模型中培养成功率低,原有结构、功能破坏或者丧失。

[0004] 类器官(Organoids)是衍生于干细胞或前体细胞的器官特异性细胞集合。体外培养类器官在细胞成分和组织架构上与对应器官高度相似,并具备相应的功能学特征。与常规细胞培养在二维环境中培养单一细胞类群不同,类器官培养是在三维环境中培养出特定组织器官包含的多种细胞类群,其培养体系与体内微环境更为相似。因此,在各种器官生理病理的基础研究、精准医疗、药物筛选和开发、基因治疗、再生医学等方面,显示出巨大的应用前景。

[0005] 虽然多种人源其他组织(如肝脏、肠等)使用不同的方法、不同的培养条件下可在体外成功培养成功为类器官,但是目前关于上呼吸道粘膜组织类器官的培养方法的研究及报道较少,尤其是具体的试验流程、操作步骤、培养条件、即培养基配方尚无太多报道。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,有必要针对现有技术存在的问题,提供一种通用型上呼吸道粘膜类器官的培养基及培养方法。本发明的技术方案为:

[0007] 第一个方面,本发明提供一种通用型上呼吸道粘膜类器官的液体培养基,包括基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素、BEGM培养液和无菌水;其中,所述基础细胞因子包括:10-100ng/ml的EGF,20-500ng/ml的Noggin,20-500ng/ml的R-spondin 1,20-500ng/ml的Wnt3a;所述特异性细胞因子包括:1-50ng/ml的Wnt7a,10-200ng/ml的IL-6;所述青霉素浓度为100U/ml;所述链霉素浓度为0.1mg/ml;以上各组分的浓度均以其在BEGM培养液和无菌水的混合液中的浓度为准。

[0008] 进一步的,所述液体培养基的制备方法为:将基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素的组分用无菌水配制成混合母液,然后加入BEGM培养液得到液体培养基。

[0009] 第二个方面,本发明提供一种通用型上呼吸道粘膜类器官的凝胶培养基,包括基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素、Matrigel基质胶、BEGM培养液和无菌水,其中所述基础细胞因子包括:10-100ng/ml的EGF,20-500ng/ml的Noggin,20-500ng/ml的R-spondin 1,20-500ng/ml的Wnt3a;所述特异性细胞因子包括:1-50ng/ml的Wnt7a,10-200ng/ml的IL-6;所述青霉素浓度为100U/ml;所述链霉素浓度为0.1mg/ml;所述Matrigel基质胶的浓度为3-6mg/ml;以上各组分的浓度均以其在BEGM培养液和无菌水的混合液中的浓度为准。

[0010] 进一步的,所述凝胶培养基的制备方法为:将基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素的组分按照上述终浓度用无菌水配制成混合母液,然后加入BEGM培养液,再将上述混合液在4℃条件下与Matrigel基质胶混合得到凝胶培养基。

[0011] 进一步的,所述抑制剂包括:100-2000nM的EW-7197-HCl (EW-7197 Hydrochloride),1-40μM的SB 203580-HCl (SB 203580Hydrochloride),2-50 μM的Y-27632dihydrochloride,以上各组分的浓度均以其在BEGM培养液和无菌水的混合液中的浓度为准。

[0012] 第三个方面,本发明提供一种通用型上呼吸道粘膜类器官的培养方法,包括以下步骤:

[0013] 1)将新鲜来源为上呼吸道位的手术切除标本或活检组织进行预处理,得到细胞数量为3-50个细胞的细胞团后,离心,去除上清,细胞团沉淀备用;

[0014] 2)将上述的凝胶培养基在transwell小室内底面形成一层1-2mm的凝胶层;

[0015] 3)将上述的凝胶培养基重悬步骤1)得到的细胞团沉淀,混匀后将细胞液加至transwell小室内凝胶层上,形成另一层1-5mm的细胞凝胶层;

[0016] 4)将步骤3)的transwell小室放在培养皿内,然后在培养皿内加入上述的液体培养基,所述液体培养基液面高度不高于两层凝胶层总高度,然后于37℃、5%CO<sub>2</sub>浓度下培养;

[0017] 5)每隔2-3天更换一次上述的液体培养基,培养4-14天,得到上呼吸道组织类器官。

[0018] 本发明的有益效果是:本发明的培养基含有上呼吸道粘膜组织类器官培养所需的最少组分,适用范围广,能够培养包括来源于鼻、口咽、喉等多来源的组织。本发明培养基具体特点如下:

[0019] ①组分不需要细胞培养中最常见的组分牛血清白蛋白(FBS),并且不需要加入激素等其他大蛋白分子。组分组成更简单,节约成本的同时降低了FBS中带来的细胞毒性和抑制物。

[0020] ②常用于类器官培养的基础培养基为DMEM/F12,而本发明选用的BEGM培养基特别适合上呼吸道粘膜组织细胞的生长,培养效果、粘膜组织细胞的分化与细胞纤毛的生长速度显著提高。

[0021] ③本发明添加的特异性细胞因子有利于上呼吸道粘膜组织细胞生长与功能的维

持。

[0022] ④本发明添加的抑制剂全部为水溶性抑制剂,不需要DMSO溶解,保证效果的同时减少了DMSO对体外细胞培养的毒性。

### 附图说明

[0023] 图1为本发明的培养方法的过程示意图。

[0024] 图2为本发明培养得到的咽粘膜组织类器官光学显微镜图。

[0025] 图3为本发明实施例6中咽粘膜类器官的组织形态结构图。

[0026] 图4为本发明实施例8中鼻粘膜类器官的透射电镜扫描图。

### 具体实施方式

[0027] 本发明实施例采用的青霉素固体购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0028] 本发明实施例采用的链霉素固体购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0029] 本发明实施例采用的EW-7197-HCl购自美国MedChemExpress公司。

[0030] 本发明实施例采用的SB 203580-HCl购自美国MedChemExpress公司。

[0031] 本发明实施例采用的Y-27632dihydrochloride购自美国MedChemExpress 公司。

[0032] 在本发明的描述中,需要说明的是,实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0033] 下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细说明,所述是对本发明的解释而不是限定。

[0034] 实施例1

[0035] 本实施例提供一种通用型上呼吸道粘膜类器官的液体培养基,包括基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素、无菌水和BEGM培养液,其中所述基础细胞因子包括:50ng/ml的EGF,200ng/ml的Noggin,250ng/ml的R-spondin 1,300ng/ml的Wnt3a;所述特异性细胞因子包括:20ng/ml的Wnt7a,100ng/ml的IL-6;所述抑制剂包括:500nM的EW-7197-HCl,10 $\mu$ M的SB 203580-HCl,20 $\mu$ M的Y-27632dihydrochloride;所述青霉素浓度为100U/ml;所述链霉素浓度为0.1mg/ml;以上各组分的浓度均以其在BEGM培养液和无菌水的混合液中的浓度为准。

[0036] 实施例2

[0037] 本实施例提供一种通用型上呼吸道粘膜类器官的液体培养基,包括基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素、无菌水和BEGM培养液,其中所述基础细胞因子包括:20ng/ml的EGF,400ng/ml的Noggin,200ng/ml的R-spondin 1,100ng/ml的Wnt3a;所述特异性细胞因子包括:10ng/ml的Wnt7a,50ng/ml的IL-6;所述抑制剂包括:200nM的EW-7197-HCl,20 $\mu$ M的SB 203580-HCl,40 $\mu$ M的Y-27632dihydrochloride;所述青霉素浓度为100U/ml;所述链霉素浓度为0.1mg/ml;以上各组分的浓度均以其在BEGM培养液和无菌水的混合液中的浓度为准。

[0038] 实施例3

[0039] 本实施例提供一种通用型上呼吸道粘膜类器官的凝胶培养基,包括基础细胞因

子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素、Matrigel基质胶、无菌水 和BEGM培养液,其中所述基础细胞因子包括:50ng/ml的EGF,200ng/ml的 Noggin,250ng/ml的R-spondin 1,300ng/ml的Wnt3a;所述特异性细胞因子包括:20ng/ml的Wnt7a,100ng/ml的IL-6;所述抑制剂包括:500nM的EW-7197-HCl,10 $\mu$ M的SB 203580-HCl,20 $\mu$ M的Y-27632dihydrochloride;所述青霉素浓度为100U/ml;所述链霉素浓度为0.1mg/ml;所述Matrigel基质胶的浓度为5mg/ml;以上各组分的浓度均以其在BEGM培养液和无菌水的混合液中的浓度为准。

#### [0040] 实施例4

[0041] 本实施例提供一种通用型上呼吸道粘膜类器官的凝胶培养基,包括基础细胞因子、特异性细胞因子、抑制剂、青霉素、链霉素、Matrigel基质胶、无菌水 和BEGM培养液,其中所述基础细胞因子包括:20ng/ml的EGF,400ng/ml的 Noggin,200ng/ml的R-spondin 1,100ng/ml的Wnt3a;所述特异性细胞因子包括:10ng/ml的Wnt7a,50ng/ml的IL-6;所述抑制剂包括:200nM的EW-7197-HCl,20 $\mu$ M的SB 203580-HCl,40 $\mu$ M的Y-27632dihydrochloride;所述青霉素浓度为100U/ml;所述链霉素浓度为0.1mg/ml;所述Matrigel基质胶的浓度为4mg/ml;以上各组分的浓度均以其在BEGM培养液和无菌水的混合液中的浓度为准。

#### [0042] 实施例5

[0043] 咽粘膜类器官培养,培养方式如图1所示。

[0044] 具体培养方法如下:

[0045] (1) 将新鲜的咽组织装入准备好的含有5%双抗的BEGM溶液中保存,12小时内送入实验室预处理。

[0046] (2) 样本洗涤:将组织转入15ml离心管中,然后用5ml含有5%双抗的BEGM溶液震荡洗涤30秒,去掉上清,重新加入5ml含有5%双抗的BEGM洗涤。

[0047] 按照上述方法反复洗涤3次去除组织表面的杂质。

[0048] (3) 样本剪切:在生物安全柜中,将样本转移至6cm培养皿,用已消毒的手术剪在冰上操作将组织剪碎至大小1-5mm<sup>3</sup>,剪碎过程不应超过10分钟以避免细胞损伤。

[0049] (4) 组织第一次消化:将剪碎后的组织转移至15ml离心管,加入2ml III型胶原酶和1ml透明质酸酶后在37 $^{\circ}$ C震荡消化60分钟。第一次消化结束后,加入5ml无菌生理盐水终止消化,然后1000rpm离心3min,保留沉淀去除上清。

[0050] (5) 组织第二次消化:将2ml III型胶原酶和1ml透明质酸酶加入至步骤(4)中的沉淀中,重悬混匀后37 $^{\circ}$ C震荡消化60分钟。第二次消化结束后,加入5ml 无菌生理盐水终止消化。

[0051] (6) 细胞过滤:将步骤(5)中的消化液用100 $\mu$ m滤网过滤,去除未消化的大组织块。将过滤后的细胞液1000rpm离心5min,小心去除上清得到细胞团沉淀备用。

[0052] (7) 将实施例3的凝胶培养基在transwell小室内底面形成一层2mm的凝胶层。

[0053] (8) 取150 $\mu$ l实施例3的凝胶培养基重悬步骤6)得到的细胞团沉淀,混匀后将细胞液加至transwell小室内凝胶层上,形成另一层2mm的细胞凝胶层;

[0054] (9) 将步骤8)的transwell小室放在培养皿内,然后在培养皿内加入实施例1的液体培养基,所述液体培养基液面高度不高于两层凝胶层总高度,然后于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>浓度下培养;

[0055] (10) 每隔2-3天更换一次实施例1的液体培养基,培养8天,得到咽粘膜组织类器官,在光学显微镜下的结构如图2所示。

[0056] 实施例6

[0057] 咽粘膜类器官形态鉴定

[0058] 将实施例5获得的咽粘膜组织类器官进行石蜡包埋切片制备。将包埋好的类器官进行切片,然后进行HE染色观察。

[0059] 1) 类器官收集与固定:投入预先配好的固定液中(4%的甲醛固定)固定2小时。完成固定后1200rpm离心5分钟,弃去福尔马林固定液。

[0060] 2) 梯度脱水:将固定后的类器官依次浸入85%酒精、95%酒精和100%酒精各30分钟。

[0061] 3) 透明浸蜡:加入二甲苯没过类器官处理20分钟,重复两次;然后加入石蜡,在60℃浸蜡1.5小时。

[0062] 4) 包埋切片:用包埋模具包类器官,然后切片机切成4-6μm的切片贴于防脱载玻片。

[0063] 5) 烤片:将载玻片放置在玻片架上,放入烘箱中,65℃,30min,将载玻片上的水分烤干、石蜡烤融即可。

[0064] 6) 脱蜡:使用二甲苯脱蜡三次,每次10分钟;然后用100%酒精浸洗三次,每次1分钟;最后用流水浸洗1分钟。

[0065] 7) H&E染色:先用苏木素染色8min,然后水洗1min,接着用1%盐酸酒精分化1-2秒钟,然后再用流水冲洗30min,再接着用1%伊红浸染1-2min,最后用流水冲洗1min。

[0066] 8) 染色后固定:依次浸入95%酒精和100%酒精,每种试剂各两次,每次2分钟。

[0067] 9) 透明及封固:使用二甲苯透明2min,取出晾干后用中性树脂胶封固。

[0068] 10) 在普通光学显微镜下观察组织形态结构如图3所示。

[0069] 实施例7

[0070] 鼻粘膜类器官培养,培养方式如图1所示。

[0071] 具体培养方法如下:

[0072] (1) 将新鲜的鼻组织装入准备好的含有5%双抗的BEGM溶液中保存,12小时内送入实验室预处理。

[0073] (2) 样本洗涤:将组织转入15ml离心管中,然后用5ml含有5%双抗的BEGM溶液震荡洗涤30秒,去掉上清,重新加入5ml含有5%双抗的BEGM洗涤。

[0074] 按照上述方法反复洗涤3次去除组织表面的杂质。

[0075] (3) 样本剪切:在生物安全柜中,将样本转移至6cm培养皿,用已消毒的镊子将软骨剔除,用已消毒的手术剪在冰上操作将组织剪碎至大小1-5mm<sup>3</sup>,剪碎过程不应超过10分钟以避免细胞损伤。

[0076] (4) 组织第一次消化:将剪碎后的组织转移至15ml离心管,加入2ml III型胶原酶和1ml透明质酸酶后在37℃震荡消化60分钟。第一次消化结束后,加入5ml无菌生理盐水终止消化,然后1000rpm离心3min,保留沉淀去除上清。

[0077] (5) 组织第二次消化:将2ml III型胶原酶和1ml透明质酸酶加入至步骤(4)中的沉淀中,重悬混匀后37℃震荡消化60分钟。第二次消化结束后,加入5ml无菌生理盐水终止

消化,然后1000rpm离心5min,保留沉淀去除上清。加入2ml红细胞裂解液重悬沉淀,室温裂解5min后加入55ml无菌生理盐水终止裂解。

[0078] (6) 细胞过滤:将步骤(5)中的消化液用100 $\mu$ m滤网过滤,去除未消化的大组织块。将过滤后的细胞液1000rpm离心5min,小心去除上清得到细胞团沉淀备用。

[0079] (7) 将实施例4的凝胶培养基在transwell小室内底面形成一层1.5mm左右的凝胶层。

[0080] (8) 取150 $\mu$ l实施例4的凝胶培养基重悬步骤(6)得到的细胞团沉淀,混匀后将细胞液加至transwell小室内凝胶层上,形成另一层1mm的细胞凝胶层;

[0081] (9) 将步骤(8)的transwell小室放在培养皿内,然后在培养皿内加入实施例2的液体培养基,所述液体培养基液面高度不高于两层凝胶层总高度,然后于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>浓度下培养;

[0082] (10) 每隔2-3天更换一次实施例2的液体培养基,培养14天,得到含有鼻粘膜组织类器官的胶滴。

[0083] 实施例8

[0084] 鼻粘膜类器官形态鉴定

[0085] 将实施例7获得的含有鼻粘膜组织类器官的胶滴用剪刀剪成1mm<sup>3</sup>左右的碎片,收集至15ml离心管,1000rpm离心5分钟后去掉上清。加入5ml PBS溶液上下颠倒混匀洗涤,1000rpm离心5分钟后去掉上清。按照上述方法用PBS洗涤3遍,最后加入2.5%的戊二醛溶液固定4小时以上。将固定好样本按照透射电镜使用方法进行投射电镜扫描,得到鼻粘膜类器官形态如附图4所示。图中鼻粘膜类器官组织结构,包含了由外圈9组二联微管、内包有一对中央微管的纤毛结构。

[0086] 对比例1

[0087] 本对比例提供的液体培养基中没有特异性细胞因子,其他同实施例1;凝胶培养基中也没有特异性细胞因子,其他同实施例3。

[0088] 使用上述培养基按照实施例5方法进行咽黏膜细胞类器官培养。

[0089] 结果在步骤(10)培养4天后发现咽黏膜细胞生长停滞,逐渐凋亡,10天后细胞基本全部凋亡。这说明这些特异性细胞因子有利于上呼吸道粘膜组织细胞生长与功能的维持。

[0090] 对比例2

[0091] 本对比例提供的液体培养基和凝胶培养基中的BEGM培养液更换为DMEM/F12培养液。其他分别同实施例1和实施例3。

[0092] 使用上述培养基按照实施例5方法进行咽粘膜类器官培养。

[0093] 结果在步骤(10)培养4天后发现咽黏膜细胞生长缓慢,8天后将细胞进行收集,然后用台盼蓝染色计数,细胞总数量、活细胞比例显著少于实施例5。使用实施例3培养得到的类器官细胞数量多且活细胞比例高,说明BEGM培养基比DMEM/F12培养液更适宜咽粘膜类器官的生长。此外,实施例5在培养14天后能够在透射电镜图中观察到明显的纤毛结构,而对照例2则无法观察到纤毛结构。延长培养时间后,对照例2在培养21天后观察到少量纤毛结构。以上说明了BEGM培养基比DMEM/F12培养液更利于咽粘膜组织细胞的分化与细胞纤毛的生长。

[0094]	对比项	活细胞数量	细胞总数	活细胞比例
	实施例5	$3.5 \times 10^7$	$3.8 \times 10^7$	92.11%
	对比例2	$4.2 \times 10^6$	$9.7 \times 10^6$	43.30%

[0095] 综上,本发明的培养基适用范围广,能够培养包括来源于鼻、口咽、喉等多来样本源的组织;组分中不需要添加细胞培养中最常见的组分牛血清白蛋白(FBS),并且不需要加入激素等其他大蛋白分子,节约成本的同时降低了FBS中带来的细胞毒性和抑制物。此外,本发明的培养基及培养方法适合上呼吸道粘膜组织细胞的生长,培养效果、粘膜组织细胞的分化与细胞纤毛的生长速度显著提高,有利于上呼吸道粘膜组织细胞生长与功能的维持。

[0096] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

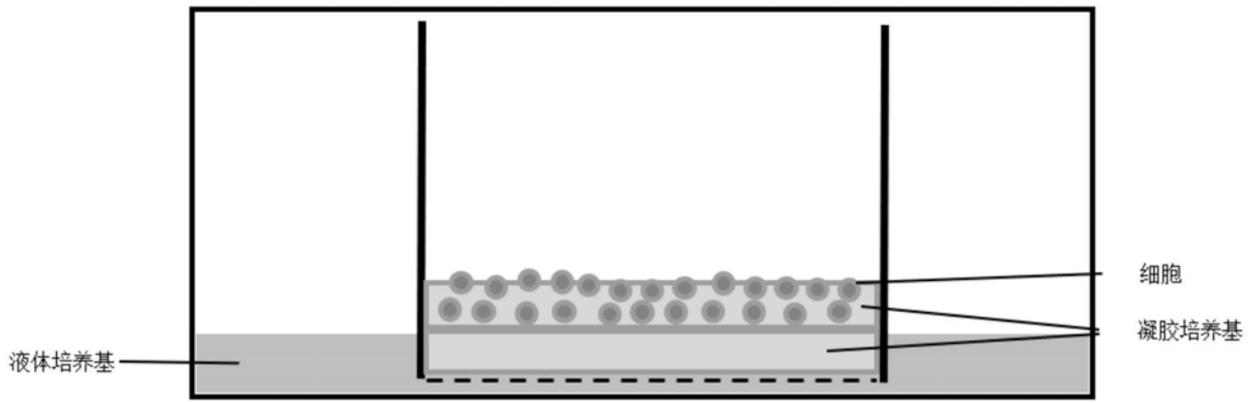


图1

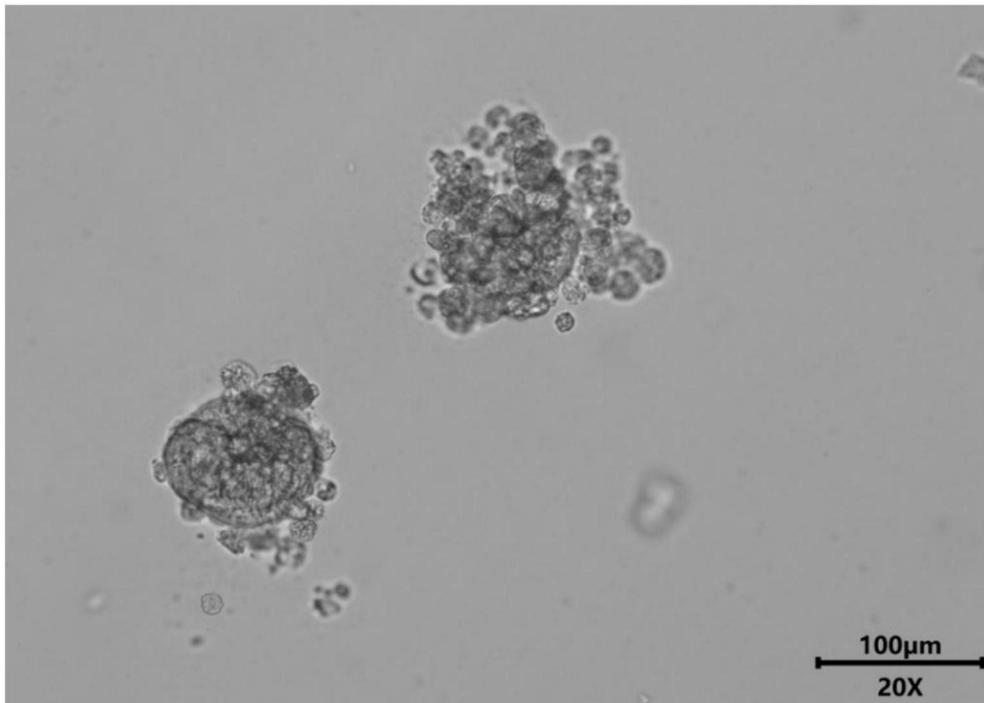


图2

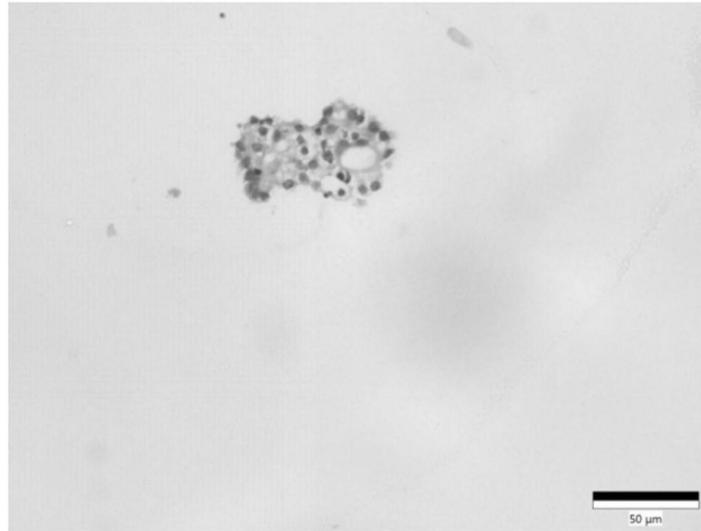


图3

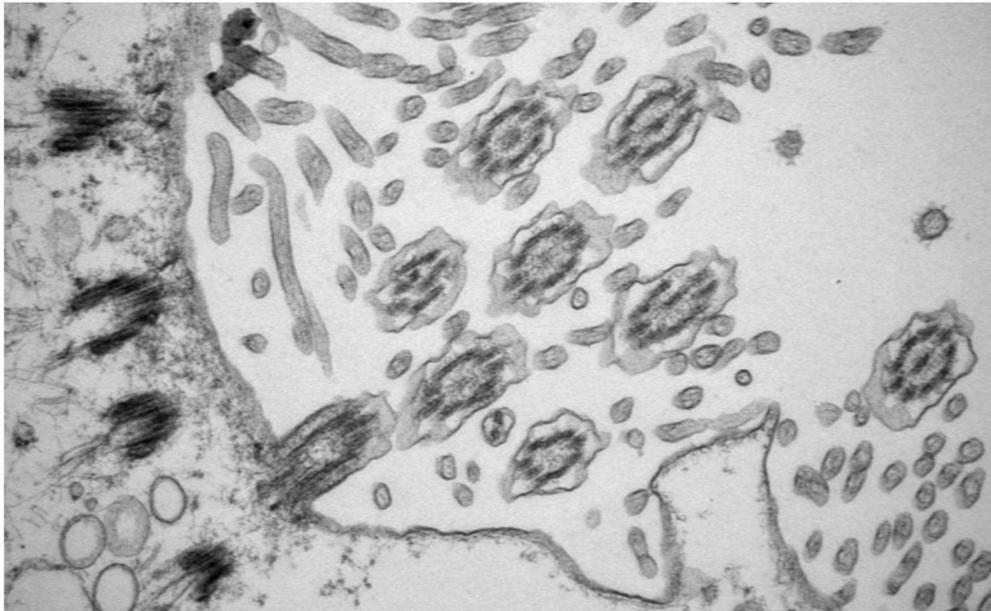


图4