



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111979178 A

(43) 申请公布日 2020.11.24

(21) 申请号 202010843695.5

(22) 申请日 2020.08.20

(71) 申请人 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开源大道11号C3栋601室

(72) 发明人 李刚 陈泽新 于言 王哲君

(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.

G12N 5/071 (2010.01)

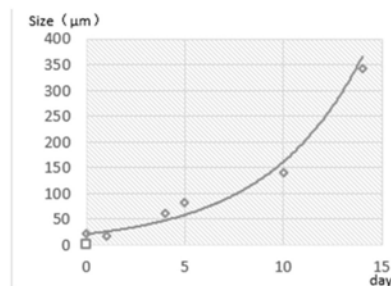
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种动物肺芽类器官培养基及培养方法

(57) 摘要

本发明提供一种动物肺芽类器官培养基及培养方法,该培养基包括基础培养基SAGM、无菌水和功能组分,所述功能组分在该类器官培养基中的终浓度组成包括:B27,0.5-2X;HGF,10-50ng/ml;BMP7,2-20ng/ml;EGF,20-200ng/ml;KGF,2-20ng/ml;FGF4,100-400ng/ml;SB216763,1-20 μ M;tretinoin,10-100nM;Wnt-3A,20-200ng/ml;Prostaglandin E2,0.1-1 μ M;Insulin-Transferrin-Se,0.5-2X;HEPES,5-20mM;青霉素,100U/ml;链霉素,0.1mg/ml。本发明的培养基有利于肺芽类器官生长与功能的维持,能够培养包括来源于小鼠、大鼠的肺组织。



1. 一种动物肺芽类器官培养基,其特征在于:包括基础培养基SAGM、无菌水和功能组分,所述功能组分在该类器官培养基中的终浓度组成包括:B27,0.5-2X;HGF,10-50ng/ml;BMP7,2-20ng/ml;EGF,20-200ng/ml;KGF,2-20ng/ml;FGF4,100-400ng/ml;SB216763,1-20 $\mu$ M;tretinoin,10-100nM;Wnt-3A,20-200ng/ml;Prostaglandin E2,0.1-1 $\mu$ M;Insulin-Transferrin-Se,0.5-2X;HEPES,5-20mM;青霉素,100U/ml;链霉素,0.1mg/ml。

2. 根据权利要求1所述的一种通用型肺芽类器官培养基,其特征在于:所述功能组分在该类器官培养基中的终浓度组成包括:B27,0.8-1.2X;HGF,30-50ng/ml;BMP7,2-10ng/ml;EGF,100-200ng/ml;KGF,2-10ng/ml;FGF4,200-400ng/ml;SB216763,10-20 $\mu$ M;tretinoin,10-50nM;Wnt-3A,100-200ng/ml;Prostaglandin E2,0.1-0.5 $\mu$ M;Insulin-Transferrin-Se,0.8-1.2X;HEPES,5-10mM;青霉素,100U/ml;链霉素,0.1mg/ml。

3. 根据权利要求1所述的一种通用型肺芽类器官培养基,其特征在于:所述培养基的制备方法为:将各组分先用无菌水配制成混合母液,然后加入SAGM培养液。

4. 一种动物肺芽类器官的培养方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 将清洗后的肺组织于低温下剪碎;

2) 加入胶原酶重悬剪碎的肺组织进行消化,之后离心去除上清;

3) 用HBSS重悬沉淀,40 $\mu$ m细胞筛网过滤消化后的组织悬液,离心;

4) 用SAGM培养液重悬细胞沉淀,并用等体积的matrigel胶混合,接种,于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下放置30~50min,待胶凝固后,加入上述培养基,培养7~14天,得到肺芽类器官。

## 一种动物肺芽类器官培养基及培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及培养基及其应用,更具体涉及一种动物肺芽类器官培养基及培养方法。

### 背景技术

[0002] 肺是生物体的呼吸器官,实现机体与外界环境之间的气体交换,以维持生命体的生命活动。肺芽是胚胎期肺的原始结构。在胚胎期喉气管憩室末端膨大发育为左右肺的萌芽组织。肺芽在胚胎发育时期由原肠发育形成,初期是索条状组织,在多种因子多个通路调控下,早期肺芽逐渐演变成管状,不断分支,形成肺支气管树和肺泡。

[0003] 肺芽类器官具有正在发育的气道支气管和肺泡的细胞类型和分支结构,具有体外多谱系分化潜能,能够在体外重现动物体肺功能。研究肺芽类器官的结构与功能有助于我们了解呼吸道病毒感染的发病机制,从而为疾病的预防、控制和诊疗奠定坚实的基础。肺组织因其特殊的结构,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。体外培养的一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,具有在体外培养环境下构建人体器官疾病模型的潜力,目前已被公认为生物研究的重要工具,并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、再生医学等方面,显示出巨大的应用前景。

[0005] 现有技术中对于肺组织细胞的培养主要是单层细胞二维(2D)环境下的培养,在二维培养过程中肺组织细胞难以或不能充分的模拟体内肺组织的立体环境及多种类型细胞间的相互作用,使得培养的肺组织细胞和活体的肺组织细胞有所差异,不利于研究的进行。而在3D培养中,缺少必要的适宜的培养基的情况下,肺组织细胞的培养分化同样不利,难以充分模拟出体内的肺组织结构的生理特性。虽然多种不同的培养条件可在体外培养多能干细胞或胚胎干细胞来源的肺芽类器官,但目前暂无关于来源于成体干细胞的肺芽类器官培养方法的研究及报道,尤其是具体的试验流程、操作步骤、培养条件及培养基配方尚无太多报道。因此,有必要开发一种动物肺芽类器官通用的培养基,既能满足二维环境下的培养,又能满足三维环境下的培养。

### 发明内容

[0006] 有鉴于此,有必要针对现有技术存在的问题,提供一种动物肺芽类器官培养基及培养方法,该培养基适用于小鼠、大鼠肺组织类器官的二维或三维培养。在肺芽类器官培养过程,采用不同培养条件人为分化诱导,能够模拟体内肺部发育的部分过程,最终形成由I型肺泡细胞和II型肺泡细胞共同组成的囊泡状结构。是发育生物学和呼吸系统疾病研究的

理想模型。

[0007] 本发明的技术方案为：

[0008] 第一个方面，本发明提供一种动物肺芽类器官培养基，包括基础培养基SAGM、无菌水和功能组分，所述功能组分在该类器官培养基中的终浓度组成包括：B27, 0.5-2X; HGF, 10-50ng/ml; BMP7, 2-20ng/ml; EGF, 20-200ng/ml; KGF, 2-20ng/ml; FGF4, 100-400ng/ml; SB216763, 1-20 $\mu$ M; tretinoin, 10-100nM; Wnt-3A, 20-200ng/ml; Prostaglandin E2, 0.1-1 $\mu$ M; Insulin-Transferrin-Se, 0.5-2X; HEPES, 5-20mM; 青霉素, 100U/ml; 链霉素, 0.1mg/ml。

[0009] 优选的，所述功能组分在该类器官培养基中的终浓度组成包括：B27, 0.8-1.2X; HGF, 30-50ng/ml; BMP7, 2-10ng/ml; EGF, 100-200ng/ml; KGF, 2-10ng/ml; FGF4, 200-400ng/ml; SB216763, 10-20 $\mu$ M; tretinoin, 10-50nM; Wnt-3A, 100-200ng/ml; Prostaglandin E2, 0.1-0.5 $\mu$ M; Insulin-Transferrin-Se, 0.8-1.2X; HEPES, 5-10mM; 青霉素, 100U/ml; 链霉素, 0.1mg/ml。

[0010] 进一步的，所述培养基的制备方法为：将各组分先用无菌水配制成混合母液，然后加入SAGM培养液。

[0011] 第二个方面，本发明提供一种动物肺芽类器官的培养方法，包括以下步骤：

[0012] 1) 将清洗后的肺组织于低温下剪碎；

[0013] 2) 加入胶原酶重悬剪碎的肺组织进行消化，之后离心去除上清；

[0014] 3) 用HBSS重悬沉淀，40 $\mu$ m细胞筛网过滤消化后的组织悬液，离心；

[0015] 4) 用SAGM培养液重悬细胞沉淀，并用等体积的matrigel胶混合，接种，于37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>条件下放置30~50min，待胶凝固后，加入上述培养基，培养7~14天，得到肺芽类器官。

[0016] 本发明的有益效果是：

[0017] ①本发明的培养基含有肺芽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小鼠、大鼠的肺组织。

[0018] ②只需一套培养基即可培养出分支气道和肺泡结构的肺芽类器官，模拟肺发育的不同阶段，并可部分重现人体肺功能。

[0019] ③本发明选用的SAGM培养基特别适合肺组织上皮细胞的生长，且不需要添加细胞培养中最常见的组分牛血清白蛋白(FBS)，使得组织细胞的生长、培养效果、肺泡组织的分化与细胞纤毛的生长速度显著提高。

[0020] ④本发明的培养基成分适宜，添加的细胞因子有利于肺芽类器官生长与功能的维持。同时可采用本发明的培养基完成肺芽类器官的传代培养，达到大规模复制培养的需求，控制培养得到的类器官具有高度的一致性。

## 附图说明

[0021] 图1为本发明实施例3培养14天得到的单个小鼠肺芽类器官光学显微图，其中，

[0022] 图1-1和图1-2分别代表2种不同形态的小鼠肺芽类器官的光学显微图。

[0023] 图2为本发明实施例3的小鼠肺芽类器官14天的生长直径变化曲线图。

[0024] 图3为本发明实施例4培养7天得到的大鼠肺芽类器官光学显微图。

[0025] 图4为本发明实施例3中小鼠肺芽类器官的组织形态结构图，其中，图4-2为图4-1中a处放大图，图4-4为图4-3中b处放大图。

[0026] 图5为采用实施例3的培养方法和采用对比例1的培养基及培养方法培养12天获得的小鼠肺芽类器官光学显微对比图,其中,图5-1为采用实施例3的培养方法,图5-2为采用对比例1的培养基及培养方法。

[0027] 图6为采用实施例3的培养方法和采用对比例2的培养基及培养方法培养7天获得的小鼠肺芽类器官光学显微对比图,其中,图6-1为采用实施例3的培养方法,图6-2为采用对比例2的培养基及培养方法。

[0028] 图7为采用实施例3的培养方法和采用对比例3的培养基及培养方法培养7天获得的小鼠肺芽类器官光学显微对比图,其中,图7-1为采用实施例3的培养方法,图7-2为采用对比例3的培养基及培养方法。

[0029] 图8为采用实施例3的培养方法和采用对比例4的培养基及培养方法培养15天获得的小鼠肺芽类器官光学显微对比图,其中,图8-1为采用实施例3的培养方法,图8-2为采用对比例4的培养基及培养方法。

### 具体实施方式

[0030] 本发明实施例采用的B27购自GIBCO公司,即B27补充剂,可维持原代大鼠、小鼠和人PSC来源及胚胎来源的神经元,使人PSC来源和胚胎来源的神经干细胞(NSC)分化成神经元。

[0031] 本发明实施例采用的BMP7购自R&D公司。

[0032] 本发明实施例采用的EGF购自R&D公司,表皮生长因子。

[0033] 本发明实施例采用的KGF购自R&D公司。

[0034] 本发明实施例采用的SB216763购自Selleckchem公司。

[0035] 本发明实施例采用的tretinoin购自R&D公司。

[0036] 本发明实施例采用的Wnt-3A购自PeproTech公司。

[0037] 本发明实施例采用的Prostaglandin E2购自Sigma公司,前列腺素E2。。

[0038] 本发明实施例采用的Insulin-Transferrin-Se购自Gibco。

[0039] 本发明实施例采用的HEPES购自Sigma。

[0040] 本发明实施例采用的青霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0041] 本发明实施例采用的链霉素购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 实施例1

[0045] 本实施例提供一种动物肺芽类器官的培养基,包括基础培养基SAGM、无菌水和功能组分,其中,无菌水适量,用于溶解功能组分,所述功能组分在该类器官培养基中的终浓度组成包括:B27,1.0X;HGF,40ng/ml;BMP7,6ng/ml;EGF,150ng/ml;KGF,6ng/ml;FGF4,300ng/ml;SB216763,15 $\mu$ M;tretinoin,30nM;Wnt-3A,150ng/ml;Prostaglandin E2,0.3 $\mu$ M;Insulin-Transferrin-Se,1.0X;HEPES,7mM;青霉素,100U/ml;链霉素,0.1mg/ml。

[0046] 实施例2

[0047] 本实施例提供一种动物肺芽类器官的培养基,包括基础培养基SAGM、无菌水和功能组分,其中,无菌水适量,用于溶解功能组分,所述功能组分在该类器官培养基中的终浓度组成包括:B27,0.8X;HGF,50ng/ml;BMP7,2ng/ml;EGF,100ng/ml;KGF,10ng/ml;FGF4,400ng/ml;SB216763,10 $\mu$ M;tretinoin,10nM;Wnt-3A,200ng/ml;Prostaglandin E2,0.1 $\mu$ M;Insulin-Transferrin-Se,1.2X;HEPES,5mM;青霉素,100U/ml;链霉素,0.1mg/ml。

[0048] 实施例3

[0049] 本实施例提供一种小鼠肺芽类器官的培养方法,包括:

[0050] 1) 取小鼠肺组织清洗后,置于冰上用眼科剪刀剪碎。

[0051] 2) 加入5ml胶原酶重悬组织,转移至37 $^{\circ}$ C,220rpm摇床中消化20min,离心,去除上清。

[0052] 3) 用HBSS重悬沉淀,40 $\mu$ m细胞筛网过滤消化后的组织悬液,1200rpm,离心5min。

[0053] 4) 用SAGM培养液重悬细胞沉淀,并用等体积的matrigel胶混合,配制(5-8)  $\times$  10<sup>4</sup>cell/每30 $\mu$ l的细胞浓度,30 $\mu$ l每滴接种在培养皿中。置于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中,待胶凝固后,加入4ml实施例1配制的培养基培养14天,14天内类器官的生长直径变化曲线如图2所示,在接种后的5天内,活性良好的肺干细胞首先变为囊状的圆球体,腔体逐渐增大,且腔体壁逐渐增厚;随着培养时间的延长,腔体壁逐渐变薄;培养至14天时,如图1所示,肺泡类器官可呈现两种形态,一种是大而圆的腔体;一种是形成密集且有多个芽状突起结构;直径可从30 $\mu$ m生长至400 $\mu$ m左右。

[0054] 实施例4

[0055] 本实施例提供一种大鼠肺芽类器官的培养方法,包括:

[0056] 1) 取大鼠肺组织清洗后,置于冰上用眼科剪刀剪碎。

[0057] 2) 加入5ml胶原酶重悬组织,转移至37 $^{\circ}$ C,220rpm摇床中消化20min,离心,去除上清。

[0058] 3) 用HBSS重悬沉淀,40 $\mu$ m细胞筛网过滤消化后的组织悬液,1200rpm,离心5min。

[0059] 4) 用SAGM培养液重悬细胞沉淀,并用等体积的matrigel胶混合,配制(5-8)  $\times$  10<sup>4</sup>cell/每30 $\mu$ l的细胞浓度,30 $\mu$ l每滴接种在培养皿中。置于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中,待胶凝固后,加入4ml实施例1配制的培养基培养7天。

[0060] 实施例5

[0061] 小鼠肺芽类器官形态鉴定

[0062] 将实施例3获得的小鼠肺芽类器官进行石蜡包埋制备切片。将包埋好的类器官进行切片,然后进行HE染色观察,具体过程如下:

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 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 $^{\circ}$ C浸蜡1.5小时。

[0066] 4) 包埋切片:用包埋模具包类器官,然后切片机切成4-6 $\mu$ m的切片贴于防脱载玻

片。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 9) 透明及封固:使用二甲苯透明2min,取出晾干后用中性树胶封固。

[0072] 10) 在普通光学显微镜下观察组织形态结构,如图4所示,表明所获得的类器官具有良好的组织形态。

[0073] 实施例6

[0074] 大鼠肺芽类器官形态鉴定

[0075] 将实施例4获得的大鼠肺芽类器官进行石蜡包埋制备切片。将包埋好的类器官进行切片,然后进行HE染色观察,具体过程如下:

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 9) 透明及封固:使用二甲苯透明2min,取出晾干后用中性树胶封固。

[0085] 10) 在普通光学显微镜下观察组织形态结构,如图3所示,表明所获得的类器官具有良好的组织形态。

[0086] 对比例1

[0087] 本对比例提供的培养基中基础培养基SAGM培养基替换成DMEM培养基,其他同实施例1。

[0088] 使用上述培养基按照实施例3方法进行小鼠肺芽类器官培养,培养时间为12天,并且和采用实施例3的方法培养12天获得的类器官进行比较,如图5所示,结果为:本发明培养基下小鼠肺泡类器官生长状况良好且活细胞比例高,说明SAGM培养基更适合肺芽类器官的

生长;替换成DMEM培养基,类器官生长速度缓慢,且存活时间有所缩短,易贴壁。

[0089] 对比例2

[0090] 本对比例提供的培养基中减去KGF,其他同实施例1。

[0091] 使用上述培养基按照实施例3方法进行小鼠肺芽类器官培养,培养时间为7天,并且和采用实施例3的方法培养7天获得的类器官进行比较,如图6所示,结果为:本发明培养基下小鼠肺泡类器官生长状况良好,减去KGF因子后,形成类器官数量较少。

[0092] 对比例3

[0093] 本对比例提供的培养基中减去tretinoin,其他同实施例1。

[0094] 使用上述培养基按照实施例3方法进行小鼠肺芽类器官培养,培养时间为7天,并且和采用实施例3的方法培养7天获得的类器官进行比较,如图7所示,结果为:本发明培养基下小鼠肺泡类器官生长状况良好,腔体较大且数量较多,减去tretinoin因子后,其尺寸显著减少。

[0095] 对比例4

[0096] 本对比例提供的培养基中减去Prostaglandin E2,其他同实施例1。

[0097] 使用上述培养基按照实施例3方法进行小鼠肺芽类器官培养,培养时间为15天,并且和采用实施例3的方法培养15天获得的类器官进行比较,如图8所示,结果为:本发明培养基下小鼠肺泡类器官生长状况良好,腔体数量较多,减去Prostaglandin E2因子后,类器官活性较差,腔体内部脱落坏死细胞增多。

[0098] 综上,本发明的培养基使用范围广,能够培养来源于小鼠和大鼠的肺组织;且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),在一定程度上节约了成本。此外,本发明建立的小鼠肺泡类器官原代培养及长期扩增体系简单、可靠和经济:在接种后的5天内,活性良好的肺干细胞首先变为囊状的圆球体,腔体逐渐增大,且腔体壁逐渐增厚;随着培养时间的延长,腔体壁逐渐变薄;培养至14天时,肺泡类器官可呈现两种形态,一种是大而圆的腔体;一种是形成密集且有多个芽状突起结构;直径可从30 $\mu$ m生长至400 $\mu$ m左右。光镜下腔体顶端可观察到微绒毛结构,管腔区排列不规则,由鳞状上皮细胞和立方细胞两种上皮细胞组成,同时最大程度的保留了器官上皮含有的多种细胞种类。可模拟肺发育过程,体内稳定,肺再生与疾病的各个方面,为相关功能学的研究提供便利平台。

[0099] 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,但并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。



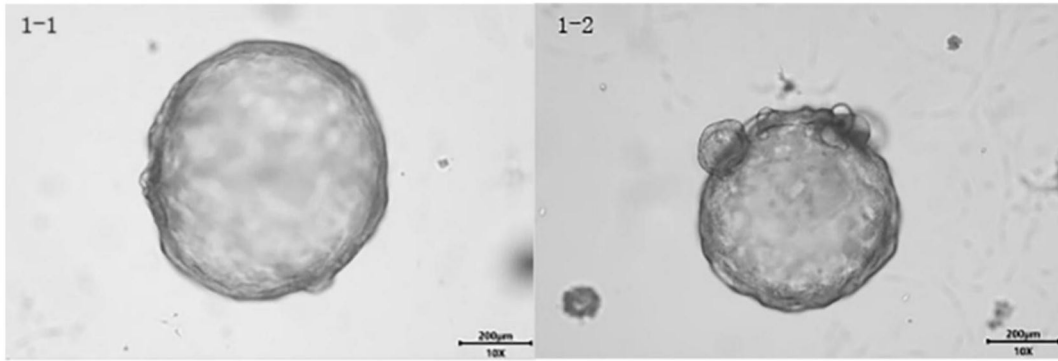


图1

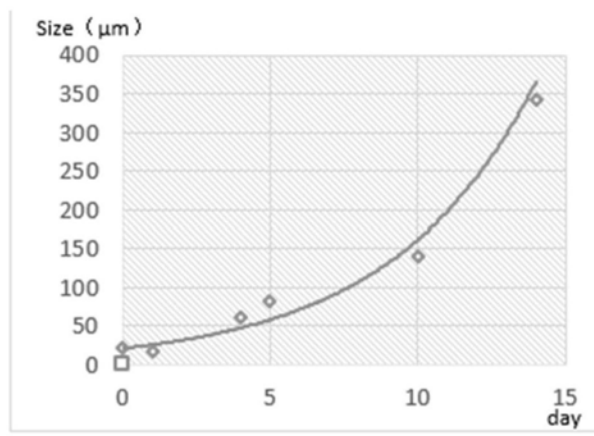


图2

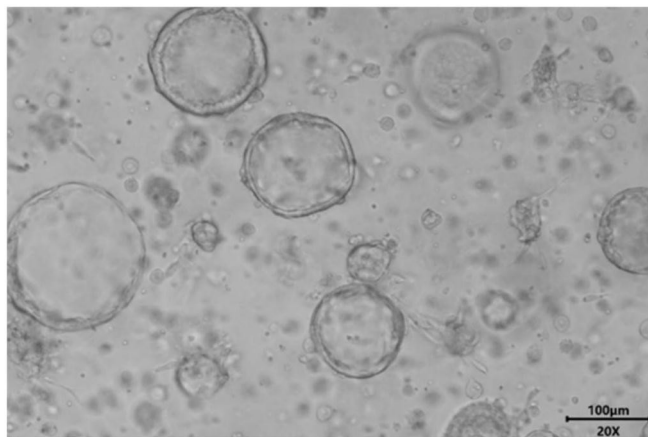


图3

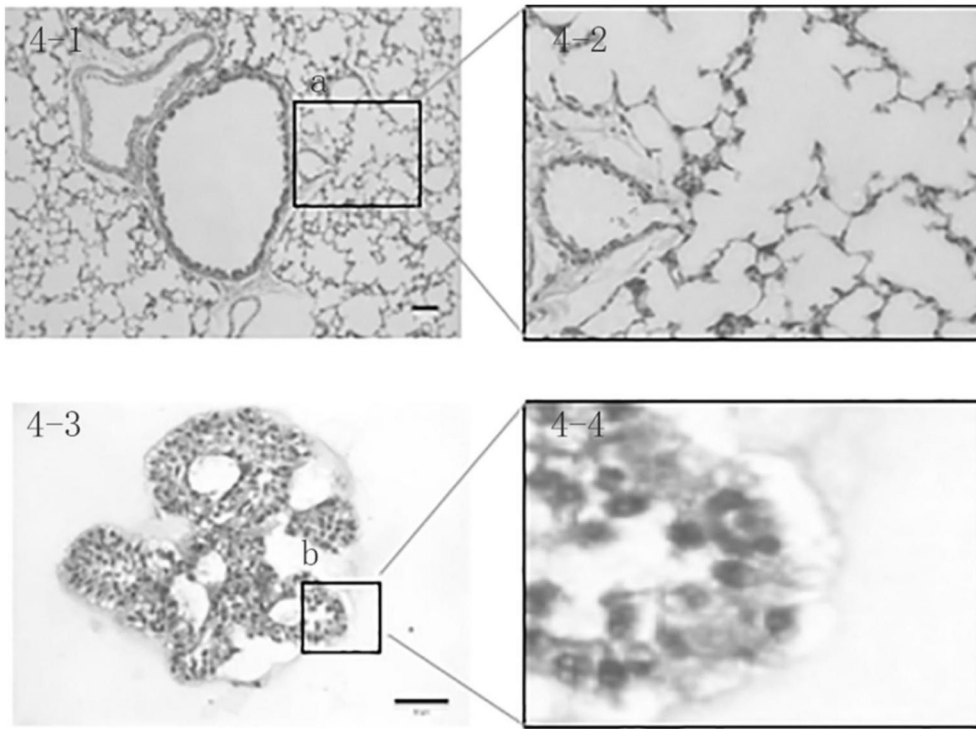


图4

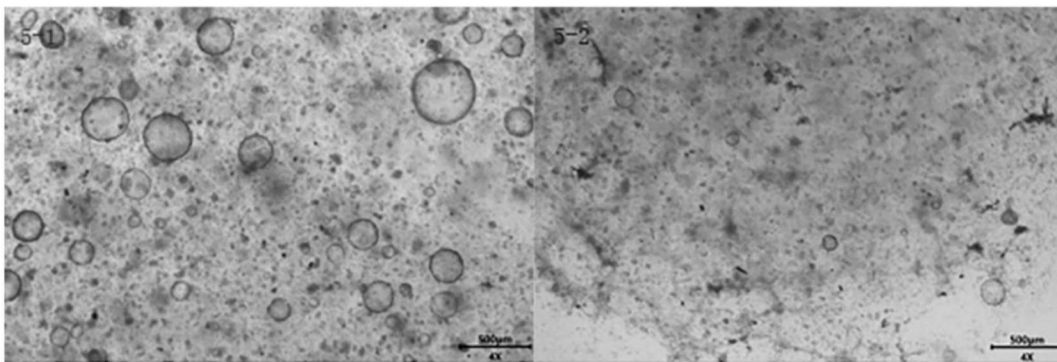


图5

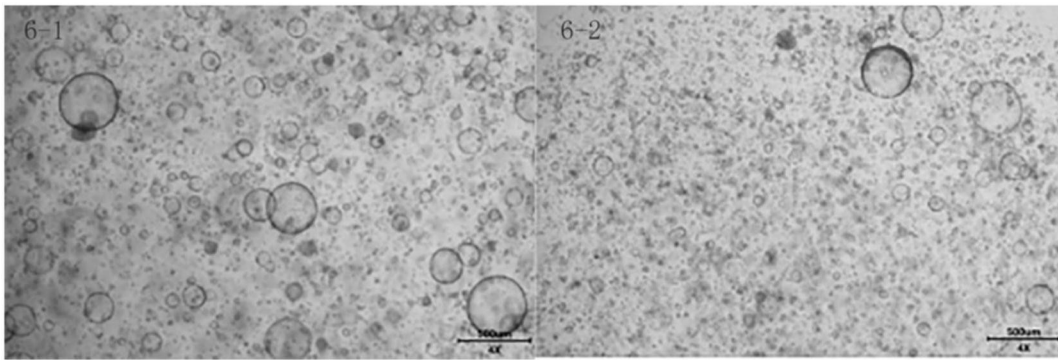


图6

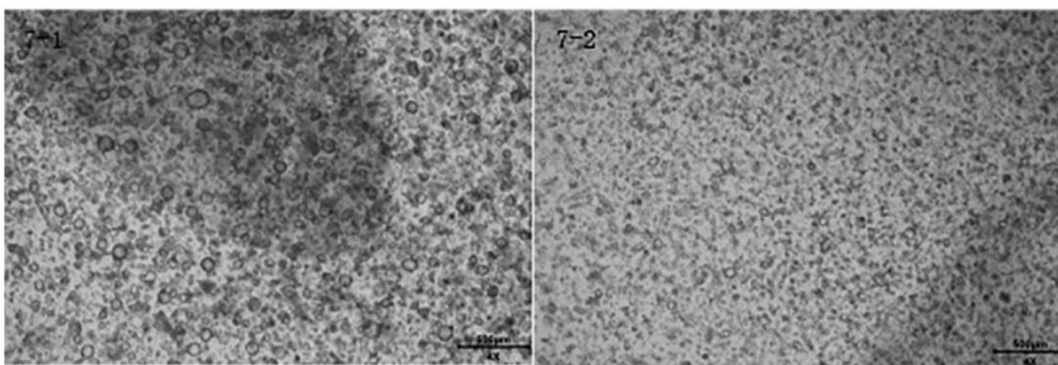


图7

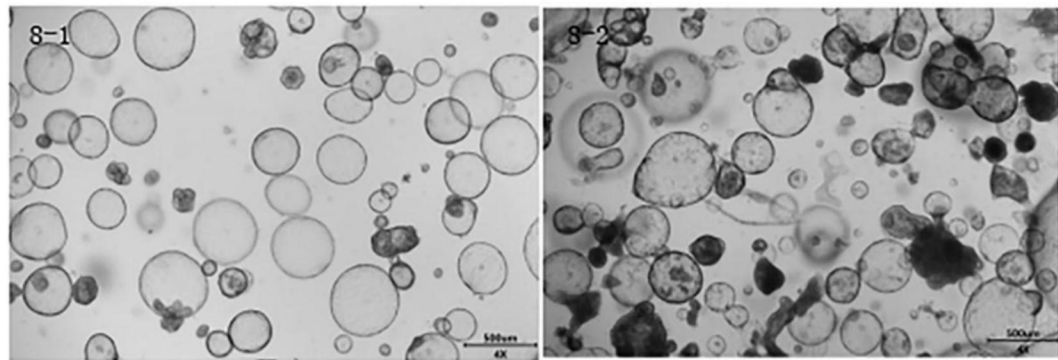


图8