



(21) 申请号 202210034670.X

(22) 申请日 2022.01.13

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115404218 A

(43) 申请公布日 2022.11.29

(73) 专利权人 南华大学附属第一医院

地址 421001 湖南省衡阳市石鼓区船山路
69号

专利权人 中南大学

(72) 发明人 蒙庆团 陈超 刘春宇 唐北沙

张文雕

(74) 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责

任公司 43113

专利代理师 卢宏

(51) Int.Cl.

G12N 5/079 (2010.01)

G12N 5/071 (2010.01)

(56) 对比文件

CN 109136185 A, 2019.01.04

CN 109996870 A, 2019.07.09

审查员 管冰

权利要求书2页 说明书17页 附图3页

(54) 发明名称

一种包含胶质细胞的3D人脑类器官培养方法

(57) 摘要

本发明涉及一种3D人脑类器官培养方法,包括(a)培养多能干细胞以获得类胚体;(b)对来自(a)的所述类胚体进行神经诱导;(c)对来自(b)的神经诱导后的类胚体进行神经分化;(d)对来自(c)的神经分化后的类胚体进行培养,以获得3D人脑类器官;其特征在于,培养多能干细胞分成两个阶段,第一阶段的培养基包含ROCK抑制剂;第二阶段的培养基包含SMAD抑制剂、巨噬细胞集落刺激因子和细胞因子。本发明培养了一种含有胶质细胞的3D人脑类器官,并且培养过程类似生理状态下神经系统中小胶质细胞的形成过程,可为研究神经系统发育过程和神经免疫相关疾病(阿尔茨海默症、帕金森病等)提供可靠、有效的体外研究模型。

1. 一种包含胶质细胞的3D人脑类器官的培养方法,包括以下步骤:

- (a) 培养多能干细胞以获得类胚体;
- (b) 对来自 (a) 的所述类胚体进行神经诱导;
- (c) 对来自 (b) 的神经诱导后的类胚体进行神经分化;
- (d) 对来自 (c) 的神经分化后的类胚体进行培养,以获得3D人脑类器官;

其特征在干,步骤(a)培养多能干细胞获得类胚体分成两个阶段;第一阶段的培养基即第一培养基,由基础培养基和第一特异性添加因子组成;所述第一特异性添加因子由以下终浓度的组分组成:血清替代物,10%-20%;成纤维细胞生长因子,4-8ng/ml;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;ROCK抑制剂Y27632,20-30 μ M;第二阶段的培养基即第二培养基,由基础培养基和第二特异性添加因子组成;所述第二特异性添加因子由以下终浓度的组分组成:血清替代物,10%-20%;成纤维细胞生长因子,4-8 ng/ml;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;巨噬细胞集落刺激因子M-CSF,10 ng/ml;细胞因子IL-34,100 ng/ml;SMAD抑制剂SB431542,10 μ M;SMAD抑制剂LDN19318,200nM;

步骤(b)采用第三培养基培养所述自(a)的所述类胚体;所述第三培养基由基础培养基和第三特异性添加因子组成;所述第三特异性添加因子由以下终浓度的组分组成:成纤维细胞生长因子,4-8 ng/ml;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;用于细胞增殖的补充剂肝素,1 μ g/ml;用于扩增未分化细胞的补充剂N2,1-2x;SMAD抑制剂SB431542,10 μ M,SMAD抑制剂LDN193189,200 μ M;

步骤(c)采用第四培养基培养来自(b)的神经诱导后的类胚体;所述第四培养基由基础胚胎神经元细胞生长培养基和第四特异性添加因子组成;所述第四特异性添加因子由以下终浓度的组分组成:谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;用于扩增未分化细胞的补充剂N2,0.5%-1%;用于维持神经元的补充剂B27,1%-2%;胰岛素,2.5-3.5 μ g/ml;

步骤(d)采用第五培养基培养来自(c)的神经分化后的类胚体;所述第五培养基由基础胚胎神经元细胞生长培养基和第五特异性添加因子组成;所述第五特异性添加因子由以下终浓度的组分组成:谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;用于扩增未分化细胞的补充剂N2,0.5%-1%;用于维持神经元的补充剂B27,1%-2%;胰岛素,2.5-3.5 μ g/ml;脑源性神经营养因子BDNF,10-20ng/ml;胶质细胞源性神经生长因子GDNF,10-20ng/ml;cAMP激活剂,10-20 μ M;抗坏血酸,200-300 μ M。

2. 一种包含胶质细胞的3D人脑类器官的培养方法,包括以下步骤:

- (a) 培养多能干细胞以获得类胚体;
- (b) 对来自 (a) 的所述类胚体进行神经诱导;
- (c) 对来自 (b) 的神经诱导后的类胚体进行神经分化;
- (d) 对来自 (c) 的神经分化后的类胚体进行培养,以获得3D人脑类器官;

其特征在干,步骤(a)培养多能干细胞获得类胚体分成两个阶段;第一阶段的培养基即第一培养基,由基础培养基和第一特异性添加因子组成;所述第一特异性添加因子由以下终浓度的组分组成:血清替代物,10%-20%;成纤维细胞生长因子,4-8ng/ml;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;ROCK抑制剂Y27632,20-30 μ M;第二阶

段的培养基即第二培养基,由基础培养基和第二特异性添加因子组成;所述第二特异性添加因子由以下终浓度的组分组成:血清替代物,10%-20%;成纤维细胞生长因子,4-8 ng/ml;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;巨噬细胞集落刺激因子M-CSF,10 ng/ml;细胞因子IL-34,100 ng/ml;SMAD抑制剂SB431542,10 μ M;SMAD抑制剂LDN19318,200nM;

步骤(b)对来自(a)的所述类胚体进行神经诱导分成两个阶段;第一神经诱导阶段的培养基即第六培养基,由基础培养基和第六特异性添加因子组成;所述第六特异性添加因子由以下终浓度的组分组成:成纤维细胞生长因子,4-8ng/ml;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;SMAD抑制剂SB431542,10 μ M,SMAD抑制剂LDN193189,200 μ M;用于细胞增殖的补充剂肝素,1 μ g/ml;用于扩增未分化细胞的补充剂N2,1-2x;巨噬细胞集落刺激因子M-CSF,10ng/ml;细胞因子IL-34,100ng/ml;第二神经诱导阶段的培养基即第三培养基,由基础培养基和第三特异性添加因子组成;所述第三特异性添加因子由以下终浓度的组分组成:成纤维细胞生长因子,4-8 ng/ml;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;用于细胞增殖的补充剂肝素,1 μ g/ml;用于扩增未分化细胞的补充剂N2,1-2x;SMAD抑制剂SB431542,10 μ M;SMAD抑制剂LDN193189,200 μ M;

步骤(c)采用第四培养基培养来自(b)的神经诱导后的类胚体;所述第四培养基由基础胚胎神经元细胞生长培养基和第四特异性添加因子组成;所述第四特异性添加因子由以下终浓度的组分组成:谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;用于扩增未分化细胞的补充剂N2,0.5%-1%;用于维持神经元的补充剂B27,1%-2%;胰岛素,2.5-3.5 μ g/ml;

步骤(d)采用第五培养基培养来自(c)的神经分化后的类胚体;所述第五培养基由基础胚胎神经元细胞生长培养基和第五特异性添加因子组成;所述第五特异性添加因子由以下终浓度的组分组成:谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;用于扩增未分化细胞的补充剂N2,0.5%-1%;用于维持神经元的补充剂B27,1%-2%;胰岛素,2.5-3.5 μ g/ml;脑源性神经营养因子BDNF,10-20ng/ml;胶质细胞源性神经生长因子GDNF,10-20ng/ml;cAMP激活剂,10-20 μ M;抗坏血酸,200-300 μ M。

3.根据权利要求1或2所述的培养方法,其特征在于,其中在步骤(a)下的培养时长为3至6天。

4.根据权利要求1或2所述的培养方法,其特征在于,其中在步骤(b)下的培养时长为2至6天。

一种包含胶质细胞的3D人脑类器官培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包含胶质细胞的3D人脑类器官培养方法。

背景技术

[0002] 3D人脑类器官是能够在体外培养条件下模拟人脑早期发育的有效模型,由人诱导多能干细胞诱导分化形成。目前已经投入科学研究的3D人脑类器官有人全脑类器官、前脑类器官、中脑类器官和海马体等。

[0003] 培养成熟的3D人脑类器官包含多种细胞类型。例如,培养成熟的全脑类器官中,包含神经祖细胞、成熟神经元、GABA能神经元和谷氨酸能神经元等。但是,多项研究表明,体外培养的3D人脑类器官中缺乏小胶质细胞。

[0004] 胶质细胞是人脑组织中主要的细胞类型之一,包含小胶质细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞。胶质细胞在维持神经系统功能中起到至关重要的作用。小胶质细胞是神经系统中的常驻免疫细胞,在中枢神经系统(CNS)中作为免疫防御的“第一线”细胞发挥着重要作用。活化的小胶质细胞可以充当抗原呈递者并分泌细胞因子来触发后续的免疫反应,能够检测并吞噬受损的细胞、病毒、细胞碎片和细菌等。由于它们具有监测和清除中枢神经系统中有害物质的多方面能力,因此小胶质细胞对于神经系统损伤修复至关重要,并与神经退行性疾病(阿尔茨海默病、帕金森病)有关。小胶质细胞在大脑发育过程中对于树突状修剪至关重要,而在成熟的大脑中,它们有助于维持神经系统稳态平衡环境。星形胶质细胞是中枢神经系统中胶质细胞类型之一,参与调控生理状态和病理状态下神经系统的多个生命进程。在健康神经系统环境中,星形胶质细胞在发育、血流调节(通过支持血脑屏障内皮细胞)、突触传递和功能,以及能量和代谢(通过为神经元提供营养以及合成某些神经递质)中起到重要作用。星形胶质细胞功能丧失或异常与多种神经退行性疾病过程有关。星形胶质细胞的慢性激活会导致与阿尔茨海默病和亨廷顿氏舞蹈病中观察到的病变相似的表型。少突胶质细胞是会产生髓磷脂的高度特化胶质细胞类型,髓磷脂是能够为轴突提供保护鞘,并提高神经元间的信号传导速度的一种富含脂质的物质。少突胶质细胞祖细胞存在于脑中,可促进损伤引起的细胞再生。然而,髓磷脂分解和无法完整再生有髓少突胶质细胞与多种神经退行性疾病相关,包括阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)和多发性硬化症(MS)。因此,胶质细胞在神经免疫、神经系统发育、稳态维持、突触修剪、突触传递和神经系统疾病中扮演重要角色。

[0005] 因此,想要使体外环境下培养的3D人脑类器官能够在最大程度上模拟体内人脑的发育特征和过程,建立一种方法,能够培养出包含神经胶质细胞的3D人脑类器官就显得至关重要和紧迫。

[0006] 现有技术形成包含小胶质细胞3D人脑类器官主要有以下几种方式:

[0007] 1. 从人胚胎脑中分离出原代小胶质细胞,并与构建好的3D人脑类器官共培养。随着培养时间的延长,共培养体系中小胶质细胞会逐渐迁入到3D人脑类器官中,形成包含小胶质细胞的神经免疫类器官。但是,迁入到3D人脑类器官中的小胶质细胞数量较少,且培

养时间越长,小胶质细胞的数量越少(如图1,Galina Popova et al.,Cell Stem Cell, 2021.)。

[0008] 2.人诱导多能干细胞(hiPSCs)诱导分化形成小胶质细胞,并与构建好的3D人脑类器官共培养。随着培养时间的延长,共培养体系中小胶质细胞会逐渐迁入到3D人脑类器官中,形成包含小胶质细胞的神经免疫类器官。但是,迁入到3D人脑类器官中的小胶质细胞数量较少,且培养时间越长,小胶质细胞的数量越少(如图2,Galina Popova et al., Cell Stem Cell,2021.)。

[0009] 以上两种方式分别从人胚胎脑中分离出原始小胶质细胞、hiPSCs诱导分化形成小胶质细胞,之后将小胶质细胞与3D人脑类器官共培养,小胶质细胞迁入到3D人脑类器官中,形成神经免疫类脑模型。但是,这两种方法形成的神经免疫类脑器官仍存在不可忽视的缺陷。

[0010] 这两种方法中,形成的神经免疫类脑中包含的小胶质细胞数量较少。在第二周小胶质细胞数量最多的时候,每张类脑切片也只有25个细胞,且随着培养时间的延长,小胶质细胞的数量逐渐下降。共培养到第5周时,每张类脑切片中的小胶质细胞数量仅仅只有5个左右了。这种方法培养出的神经免疫类脑器官中,小胶质细胞的比例远远低于正常人脑中小胶质细胞的比例,正常人脑中小胶质细胞的比例约为总细胞数量的5%-15%。

[0011] 另外,这两种形成神经免疫类脑器官的方法,不符合人脑发育过程中小胶质细胞的形成过程。生理状态下,小胶质细胞由中胚层发育而来。胚胎发育过程中,原肠胚形成三个胚层(内胚层、中胚层和外胚层),中胚层干细胞在集落刺激因子(M-CSF、G-CSF)和细胞因子IL-34等的诱导下,促使胚胎干细胞分化形成小胶质细胞前体细胞,这些小胶质细胞前体细胞迁移到发育中的神经组织中并最终形成成熟小胶质细胞。

[0012] 3.hiPSCs诱导分化形成包含小胶质细胞的3D人脑类器官。2018年,Paul R.Ormel等人从hiPSCs出发,诱导形成了包含小胶质细胞的人3D人脑类器官(如图3,Paul R.Ormel et al.,nature communication,2018)。

[0013] 在该方法中,第1-6天,hiPSCs在类胚体形成培养液的刺激作用下,自组织形成了类胚体,类胚体中包含中胚层、内胚层和外胚层。在第6天时,将培养液更换为神经外胚层诱导培养基,诱导类胚体中神经外胚层祖细胞形成。之后,在第13天时,将培养液更换为神经分化培养基,在神经分化培养基的作用下,神经外胚层祖细胞分化形成神经细胞祖细胞,并进一步分化形成神经细胞。而在此过程中,中胚层祖细胞可能在细胞释放的细胞因子的刺激作用下分化形成小胶质细胞。尽管该方法培养出包含小胶质细胞的3D人脑类器官,其小胶质细胞(IBA1阳性细胞)在类脑切片中的比例仅为 $5.99\% \pm 1.65\%$,低于正常人脑中小胶质细胞的平均比例。且该方法中类胚体在分化到后期时,类胚体中包含多种其他胚层分化而来的复杂的细胞类型。而在生理状态下,脑组织中主要由神经细胞和胶质细胞组成,在血脑屏障的保护下,其他细胞类型是不可能存在于脑组织中的。

[0014] 因此,如果以该模型来模拟人脑发育过程,以及以该模型开展神经相关的研究(例如,AD,PD等),可能导致研究结果出现严重偏差或者出现完全不存在结果。因此,开发一种近似生理状态下脑组织神经系统中小胶质细胞形成的方法至关重要。

发明内容

[0015] 本发明的目的是开发一种能够培养出近似生理状态下脑组织神经系统中小胶质细胞状态的3D人脑类器官方法。

[0016] 为了解决上述技术问题,本发明的技术方案如下:

[0017] 一种3D人脑类器官的培养方法,包括:

[0018] (a) 培养多能干细胞以获得类胚体;

[0019] (b) 对来自(a)的所述类胚体进行神经诱导;

[0020] (c) 对来自(b)的神经诱导后的类胚体进行神经分化;

[0021] (d) 对来自(c)的神经分化后的类胚体进行培养,以获得3D人脑类器官;

[0022] 其特征在于,培养多能干细胞分成两个阶段,第一阶段的培养基包含ROCK抑制剂;第二阶段的培养基包含SMAD抑制剂、巨噬细胞集落刺激因子和细胞因子。

[0023] 进一步优选的,第一阶段的培养基包含20-30 μ M的ROCK抑制剂。

[0024] 进一步优选的,第一阶段的培养基包含基础培养基和第一特异性添加因子;所述第一特异性添加因子包括以下终浓度的组分:血清替代物,10%-20%;成纤维细胞生长因子,4-8ng/ml;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;ROCK抑制剂,20-30 μ M。

[0025] 优选的,所述ROCK抑制剂为Y27632。

[0026] 优选的,第二阶段的培养基包含SMAD抑制剂、巨噬细胞集落刺激因子和细胞因子。

[0027] 进一步优选的,所述SMAD抑制剂包含SB431542和LDN193189。

[0028] 进一步优选的,第二阶段的培养基包括SB431542,10-20 μ M;LDN193189 200-300 μ M。

[0029] 优选的,所述巨噬细胞集落刺激因子为M-CSF。

[0030] 优选的,所述细胞因子为IL-34。

[0031] 进一步优选的,所述第二阶段的培养基包含基础培养基和第二特异性添加因子;所述第二特异性添加因子包括以下终浓度的组分:血清替代物,10%-20%;成纤维细胞生长因子,4-8ng/ml;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;巨噬细胞集落刺激因子,10-20ng/ml;细胞因子,100-200ng/ml;SMAD抑制剂,1-12 μ M。

[0032] 优选的,采用第三培养基培养(b)中所述自(a)的所述类胚体;所述第三培养基包含SMAD抑制剂、用于细胞增殖的补充剂和用于扩增未分化细胞的补充剂。

[0033] 优选的,所述用于细胞增殖的补充剂为肝素。

[0034] 进一步优选的,所述第三培养基包含基础培养基和第三特异性添加因子;所述第三特异性添加因子包括以下终浓度的组分:成纤维细胞生长因子,4-8ng/ml;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;SMAD抑制剂,1-12 μ M;用于细胞增殖的补充剂,1 μ g/ml;用于扩增未分化细胞的补充剂,1-2x。

[0035] 优选的,所述基础培养基为伯克改良伊格尔培养基(DMEM)/Nutrient F-12。

[0036] 优选的,所述血清替代物为KSR。

[0037] 优选的,所述成纤维细胞生长因子为FGF-2/bFGF。

[0038] 优选的,采用第四培养基培养(c)中来自(b)的神经诱导后的类胚体;所述第四培养基包含用于扩增未分化细胞的补充剂、用于维持神经元的补充剂和生长补充剂。

[0039] 优选的,所述第四培养基包含基础胚胎神经元细胞生长培养基和第四特异性添加因子;所述第四特异性添加因子包括以下终浓度的组分:谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;用于扩增未分化细胞的补充剂,0.5%-1%;用于维持神经元的补充剂,1%-2%;生长补充剂,2.5-3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0040] 优选的,采用第五培养基培养(d)中来自(c)的神经分化后的类胚体;所述第五培养基包含用于扩增未分化细胞的补充剂、用于维持神经元的补充剂、生长补充剂、脑源性神经营养因子、胶质细胞源性神经生长因子和cAMP激活剂。

[0041] 优选的,所述用于扩增未分化细胞的补充剂为 N_2 。

[0042] 优选的,所述用于维持神经元的补充剂为B27。

[0043] 优选的,所述生长补充剂为胰岛素。

[0044] 优选的,所述脑源性神经营养因子为BDNF。

[0045] 优选的,所述胶质细胞源性神经生长因子为GDNF。

[0046] 优选的,所述cAMP激活剂为Forskolin。

[0047] 优选的,所述第五培养基包含基础胚胎神经元细胞生长培养基和第五特异性添加因子;所述第五特异性添加因子包括以下终浓度的组分:谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;用于扩增未分化细胞的补充剂,0.5%-1%;用于维持神经元的补充剂,1%-2%;生长补充剂,2.5-3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$;脑源性神经营养因子,10-20 ng/ml ;胶质细胞源性神经生长因子,10-20 ng/ml ;cAMP激活剂,10-20 μM ;维生素,200-300 μM 。

[0048] 优选的,(b)步骤中对来自(a)的所述类胚体进行神经诱导分成两个阶段,第一神经诱导阶段的培养基包含SMAD抑制剂、用于细胞增殖的补充剂、用于扩增未分化细胞的补充剂、巨噬细胞集落刺激因子和细胞因子;第二神经诱导阶段的培养基包含SMAD抑制剂、用于细胞增殖的补充剂和用于扩增未分化细胞的补充剂。

[0049] 优选的,第一神经诱导阶段的培养基包含基础培养基和第六特异性添加因子;所述第六特异性添加因子包括以下终浓度的组分:成纤维细胞生长因子,4-8 ng/ml ;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;SMAD抑制剂,1-12 μM ;用于细胞增殖的补充剂,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$;用于扩增未分化细胞的补充剂,1-2x;巨噬细胞集落刺激因子,10-20 ng/ml ;细胞因子,100-200 ng/ml 。

[0050] 优选的,第二神经诱导阶段的培养基包含基础培养基和第三特异性添加因子;所述第三特异性添加因子包括以下终浓度的组分:成纤维细胞生长因子,4-8 ng/ml ;谷氨酰胺补充剂,1-2x;非必需氨基酸补充剂,1-2x;抗生素,1-2x;SMAD抑制剂,1-12 μM ;用于细胞增殖的补充剂,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$;用于扩增未分化细胞的补充剂,1-2x。

[0051] 优选的,所述基础胚胎神经元细胞生长培养基为DMEM-F12/Neuronal basal。

[0052] 优选的,所述谷氨酰胺补充剂为GlutaMax。

[0053] 优选的,所述非必需氨基酸补充剂为NEAA。

[0054] 优选的,所述抗生素为青霉素和链霉素。

[0055] 优选的,所述维生素为抗坏血酸。

[0056] 优选的,其中在(a)下的培养为3至6天。

[0057] 优选的,其中,步骤(a)中,在第一培养基中培养1至4天;第二培养基中培养1至4天。

[0058] 优选的,其中在 (b) 下的培养为2至6天。

[0059] 优选的,其中在 (c) 下的培养为10至20天。

[0060] 优选的,其中在 (d) 下的培养为60至90天。

[0061] 一种3D人脑类器官的培养基,包括:培养多能干细胞的培养基,其中培养多能干细胞分成两个阶段,第一阶段的培养基包含ROCK抑制剂;第二阶段的培养基包含 SMAD抑制剂、巨噬细胞集落刺激因子和细胞因子。

[0062] 进一步优选的,所述3D人脑类器官的培养基还包括:对来自 (a) 的所述类胚体进行神经诱导的培养基,其中,对来自 (a) 的所述类胚体进行神经诱导分成两个阶段,第一神经诱导阶段的培养基包含SMAD抑制剂、用于细胞增殖的补充剂、用于扩增未分化细胞的补充剂、巨噬细胞集落刺激因子和细胞因子;第二神经诱导阶段的培养基包含 SMAD抑制剂、用于细胞增殖的补充剂和用于扩增未分化细胞的补充剂。

[0063] 本发明还要求保护上述培养方法培养的包含胶质的3D人脑类器官。

[0064] 本发明还要求保护上述包含胶质的3D人脑类器官在制备研究神经系统发育过程和神经免疫相关疾病的体外模型上的应用。

[0065] 下面对本发明做进一步的解释:

[0066] 在类胚体形成阶段,由于hiPSCs能够自组织形成包含三个胚层的类胚体 (EB),在此过程中,第0-3天,将不添加SMAD抑制剂,这样形成的类胚体中包含三个胚层的祖细胞。第3-6天,EB形成培养基 (EBM) 中添加SMAD抑制剂SB431542和LDN193189,抑制类胚体中内胚层和中胚层的进一步发展。以此同时,EBM中添加M-CSF (巨噬细胞集落刺激因子) 和IL-34 (细胞因子) 诱导中胚层祖细胞分化形成髓样造血干细胞,并进一步诱导分化形成小胶质祖细胞和小胶质细胞。神经诱导培养阶段,第6-12天,神经诱导培养基 (NIM) 中不包含M-CSF和IL-34,但是包含SMAD抑制剂SB431542 和LDN193189,以及神经诱导因子N2,诱导外胚层分化形成神经干细胞。神经分化培养阶段,第12-30天,神经分化培养基 (NDM) 中,不包含M-CSF和IL-34,也不包含SMAD抑制剂SB431542和LDN193189,主要添加促进神经干细胞细胞生长和增殖的调控因子,包括N2、B27。神经成熟培养阶段,大于第30天,神经成熟培养基 (NMM) 主要包含N2、B27、BDNF、GDNF、维生素Ascorbic acid等神经营养成分,主要目的是促进神经细胞成熟和维持神经细胞正常生长 (图4)。

[0067] 同样的,本发明中,通过更改培养过程中的部分步骤可以达到相同的目的,即能够培养出包含小胶质细胞的3D人脑类器官。例如,在上述描述的方法基础上,在培养过程中,从EB形成阶段第3天开始,EBM中添加M-CSF和IL-34,同时添加SB431542和LDN193189。一直维持培养到第6天,在第6天时,添加相同体积NIM培养基,NIM培养基中不包含M-CSF和IL-34,因此,添加该培养基后,相当于稀释了M-CSF和IL-34 的浓度。但是NIM培养基中仍然包含SB431542和LDN193189,同时添加N2,以诱导和促进神经干细胞的形成和生长 (图5)。

[0068] 本发明中,通过上述方法的培养,成熟培养阶段的3D人脑类器官包含小胶质细胞 (IBA1、CD11B阳性细胞),同时也包含星形胶质细胞和少突胶质细胞 (图5)。

[0069] 类似的,通过修改本发明中的类脑培养方法的部分内容,可能可以培养出包含小胶质细胞的中脑、前脑和海马体等体外人脑类器官模型。

[0070] 本发明的有益效果为:

[0071] 1. 本发明能够培养出包含小胶质细胞的3D人脑类器官,并且类脑中小胶质细胞的

比例(9.2445%±2.715%)与生理状态下神经系统中小胶质细胞的比例(5%-15%)相似。

[0072] 2.本发明培养的3D人脑类器官,不仅包含小胶质细胞,同时也包含星形胶质细胞和少突胶质细胞,与生理状态下神经系统中胶质细胞类型一致。

[0073] 3.本发明培养了一种含有胶质细胞的3D人脑类器官,且小胶质细胞形成过程类似生理状态下神经系统中小胶质细胞的形成,可为研究神经系统发育过程和神经免疫相关疾病(AD、PD)提供可靠、有效的体外模型。

附图说明

[0074] 图1是现有技术从胎脑组织中分离出小胶质细胞并与类脑共培养,形成神经免疫3D人脑类器官的流程示意图和结果;

[0075] 其中(A)人诱导多能干细胞(hiPSCs)诱导分化形成3D人脑类器官;(B)人胎脑中分离出小胶质细胞,并将小胶质细胞与第35天的人脑类器官共培养,形成3D神经免疫人脑类器官;(C)共培养体系中,第二周检测到类脑中小胶质细胞平均数量最多,随着培养时间的延长,类脑中小胶质细胞的数量逐渐减少;

[0076] 图2是现有技术从hiPSCs诱导分化形成小胶质细胞并与类脑共培养,形成神经免疫3D人脑类器官的流程示意图和结果;

[0077] 其中(A)人诱导多能干细胞(hiPSCs)诱导分化形成3D人脑类器官;(B)hiPSCs诱导分化形成小胶质细胞,并将小胶质细胞与第35天的人脑类器官共培养,形成3D神经免疫人脑类器官;(C)共培养体系中,小胶质细胞进入类脑中,随着培养时间的延长,类脑中小胶质细胞的数量逐渐减少;

[0078] 图3是现有技术从人诱导多能干细胞(hiPSCs)诱导生成包含小胶质细胞的3D人脑类器官的流程示意图和结果;

[0079] 其中(A)人诱导多能干细胞(hiPSCs)诱导生成3D人脑类器官培养示意图;第1-6天是胚状体形成阶段;第6-13天是神经外胚层诱导阶段;第13天,使用matrigel基质凝胶包埋类胚体,基质凝胶包埋提供细胞外基质以进一步生长和发育;四天后,它们被转移到装有神经分化培养液的旋转生物反应器中培养,一直培养到第119天;(B)免疫荧光检测发现,培养类脑在第31天检测到小胶质细胞,第52天和第66天检测到小胶质细胞分布在类脑中;IBA1标记的是小胶质细胞(绿色),nuclei标记的是细胞核(蓝色,比例尺:100 μ m);(C)小胶质细胞免疫荧光图定量,IBA1阳性小胶质细胞平均比例为5.99%±1.65%;

[0080] 图4是本发明中形成小胶质细胞3D人脑类器官流程图一;

[0081] 图5是本发明中修改了M-CSF和IL-34的刺激时间形成小胶质细胞3D人脑类器官流程图二;

[0082] 图6是实施例3中成熟培养阶段的3D人脑类器官包含小胶质细胞(IBA1、CD11B阳性细胞),同时也包含星形胶质细胞和少突胶质细胞的免疫荧光染色结果;

[0083] 图7是对照组免疫荧光染色结果;

[0084] 图8是实施例3中对类脑切片中小胶质细胞的数量定量结果。

具体实施方式

[0085] 术语的定义

[0086] 如本文所用,术语“类器官”是指小型化的并且在一些情况下,是在体外三维产生的器官的简化形式,其显示了逼真的和解剖学上正确的微观解剖学。它们衍生自一种或多种来自组织、胚胎干细胞或诱导的多能干细胞的细胞,其由于例如其自我更新和分化能力而能够在三维培养中自组织。

[0087] 如本文所用,术语“类胚体”是指多能干细胞的三维聚集体。包含类胚体的多能细胞类型包括但不限于衍生自胚胎的胚泡期的胚胎干细胞(ESC),所述胚胎来自例如小鼠(mESC)、灵长类动物和人(hESC)的来源。另外,类胚体可以由通过替代技术衍生的胚胎干细胞形成,包括体细胞核移植或体细胞的重编程以产生诱导的多能干细胞(iPS)。与以单层形式培养的ES胚胎干细胞相似,类胚体内的胚胎干细胞沿着三种胚系-内胚层、外胚层和中胚层-经历分化和细胞特化-其包含所有体细胞类型(其均为体内细胞类型,不包括种系细胞)。

[0088] 如本文所用,术语“干细胞”是指未分化的生物细胞,其能够分化成更特化的细胞并且能够分裂(通过有丝分裂)以产生更多的干细胞。干细胞存在于多细胞生物中。在哺乳动物中,存在两种广泛类型的干细胞:胚胎干细胞,其例如从胚泡的内细胞团中分离;和成体干细胞,其存在于各种组织中。在成体生物中,干细胞和祖细胞通过补充成体组织而作为身体的修复系统起作用。在发育中的胚胎中,干细胞可以分化成所有特化细胞-来自存在于胚胎发育的早期阶段的三个主要胚层(称为外胚层、内胚层和中胚层)中的任何一个-但也保持再生器官如血液、皮肤或肠道组织的正常更新。

[0089] 人体中三种常见的、可获得的自体成体干细胞来源是:骨髓,需要通过收获细胞进行提取,通常来自股骨或髂嵴;脂肪组织(脂质细胞),需要通过吸脂提取;和血液,需要提取,通常通过血液分离机。干细胞也可以在出生后从脐带血中取出。在所有干细胞类型中,自体采集涉及风险最小。根据定义,自体细胞是从自己的身体获得的。成体干细胞经常用于各种医学治疗(例如,骨髓移植)。现在可以使干细胞人工生长和转化(分化)成为具有与各种组织如肌肉或神经的细胞一致的特征的特化细胞类型。

[0090] 任何哺乳动物干细胞均可根据本文公开的本发明方法使用,包括但不限于从脐带血、胎盘和其他来源分离的干细胞。干细胞可以从任何哺乳动物物种中分离,例如但不限于小鼠、大鼠、兔、豚鼠、狗、猫、猪、绵羊、牛、马、猴和人。在一个实例中,干细胞获自人。干细胞可以包括多能细胞,其是具有完全分化多样性的、自我更新并且可以在组织内保持休眠或静止的细胞。干细胞还可包括多能细胞或定向祖细胞。在一个实例中,本文公开的方法在不使用人胚胎干细胞的情况下进行。根据本发明,可以使用其他类型的多能细胞代替人胚胎干细胞。在另一个实例中,本文公开的方法在诱导的多能干细胞上进行。在又一个实例中,使用非人源胚胎干细胞进行本文公开的方法。

[0091] 如本文所用,术语“多能干细胞”是指具有分化成三个胚层中任何一个的潜力的干细胞:内胚层,例如,内部胃粘膜、胃肠道和肺部从内胚层发育;中胚层,例如肌肉、骨骼、血液和泌尿生殖器结构从中胚层发育;或外胚层,例如表皮组织和神经系统从外胚层发育。然而,值得注意的是,细胞多能性被认为是一个连续体,范围从可以形成胚体的每个细胞的完全多能细胞例如胚胎干细胞和诱导的多能干细胞到可以形成所有三个胚层的细胞但可能不具有完全多能细胞的所有特征的不完全或部分多能细胞。

[0092] 细胞培养是细胞在模拟其自然环境然而在其自然环境之外的受控条件下生长的

过程。细胞培养条件因细胞类型而异,但所需的人工环境通常由具有一种或多种底物的合适容器或提供必需营养素(例如氨基酸、碳水化合物、维生素和矿物质)以及细胞生长所需的生长因子、激素和气体(通常是CO₂和/或O₂)的一种或多种介质以及调节生理化学环境(例如,pH缓冲、渗透压、温度、湿度等)的一种或多种介质组成。大多数细胞需要在其上生长的表面或人工基质(也称为粘附或单层培养),而其他细胞可以在培养基(也称为悬浮培养)中自由漂浮,通常在搅拌下(例如,滚瓶培养等)。在实践中,术语“细胞培养”是指,与其他类型的使细胞生长的培养诸如植物组织培养、真菌培养、微生物培养(细菌培养)和细胞用作例如病毒复制的宿主的病毒培养相比,培养来自多细胞真核生物尤其是动物细胞以及患病的人体组织(例如,HeLa细胞、PC3细胞和HEK293T细胞)的细胞。

[0093] 细胞培养可以在二维(2D)或三维(3D)设置中进行。细胞培养的实例是,但不限于,在任何标准细胞培养容器例如培养皿、6孔板、96孔板、培养瓶和滚瓶中的细胞培养。

[0094] 有多种平台可用于促进三维细胞结构的生长,包括但不限于支架系统,如水凝胶基质和固体支架;以及无支架系统,如低粘附板、纳米粒子促进磁悬浮和悬滴板。因此,在一个实例中,本文公开的方法是三维方法。

[0095] 细胞分化是描述细胞从一种细胞类型到另一种细胞类型的变化的过程。最常见的是,细胞变为更特殊的类型。在多细胞生物的发育过程中,分化发生多次,因为它从简单的受精卵变为组织和细胞类型的复杂系统。在成年期,分化仍在继续,因为成体干细胞在组织修复期间和正常细胞更新期间分裂并产生完全分化的子细胞。例如,响应于抗原暴露,发生一些分化。分化显著改变细胞的大小、形状、膜电位、代谢活动和对信号的反应。这些变化主要归因于基因表达中高度可控的修饰,并且是表观遗传学领域的研究。除少数例外,细胞分化几乎从未涉及DNA序列本身的变化。因此,尽管具有相同的基因组,但是不同的细胞可以具有通常在时间上分开的非常不同的物理特征。

[0096] 如本文所用,术语“SMAD”是指细胞内蛋白质,其将细胞外信号从转化生长因子 β (TGF- β)配体转导至细胞核,在那里它们激活下游基因转录。SMAD形成两个经受体调节的SMAD和一个co-SMAD的三聚体,充当调节某些基因表达的转录因子。其他SMAD蛋白是,但不限于,SMAD1、SMAD2(也称为Mothers against decapentaplegic homolog 2、JV18、JV18-1、MADH2、MADR2、hMAD-2或SMAD家族成2)、SMAD3(也称为Mothers against decapentaplegic homolog 3、HSPC193、HsT17436、JV15-2、LDS1C、LDS3、MADH3或SMAD家族成员3)、SMAD4(共同介体SMAD(co-SMAD),也称为SMAD家族成员4、Mothers against decapentaplegic homolog 4、JIP、MADH4、MYHRS或DPC4(在胰腺癌4中缺失)、SMAD5(也称为Mothers against decapentaplegic homolog 5、DWFC、JV5-1、MADH5或SMAD家族成员5)、SMAD6(拮抗或抑制性SMAD,其阻断R-SMAD和co-SMAD的激活;也称为AOVD2、HsT17432、MADH6、MADH7、SMAD家族成员6)、SMAD7(拮抗或抑制性SMAD,其阻断R-SMADs和co-SMAD的激活;也称为CRCS3、Mothers against decapentaplegic homolog 7(MADH7)、MADH8、SMAD家族成员7)和SMAD8/9(也称为Mothers against decapentaplegic homolog 9、SMAD9、SMAD8、MADH9、PPH2、SMAD8、SMAD8A、SMAD8B、SMAD家族成员9或MADH6)。因此,如本文所用,术语“SMAD抑制剂”是指能够抑制(即抑制或下调)SMAD蛋白活性的分子化合物。

[0097] 如本文所用,术语“成纤维细胞生长因子”是指生长因子家族,其成员参与血管生成、伤口愈合、胚胎发育和各种内分泌信号传导通路。成纤维细胞生长因子是肝素结合蛋

白,已经显示与细胞表面相关的硫酸乙酰肝素蛋白多糖的相互作用对于成纤维细胞生长因子信号转导是必需的。成纤维细胞生长因子是多种细胞和组织增殖和分化过程中的关键参与者。成纤维细胞生长因子是具有多种作用的多功能蛋白质;它们是最常见的有丝分裂原,但也具有调节、形态和内分泌作用。由于它们对多种细胞类型的多重作用,它们也被选择性地称为“多能”生长因子和“混杂”生长因子。混杂是指各种分子如何结合并引发单一受体的响应的生物化学和药理学概念。在成纤维细胞生长因子的情况下,四种受体亚型可被超过二十种不同的成纤维细胞生长因子配体激活。因此,FGF在发育过程中的功能包括中胚层诱导、前后轴模式、肢体发育、神经诱导和神经发育以及成熟组织/系统血管生成,角化细胞组织和伤口愈合过程。

[0098] 本文说明性描述的发明可以在缺少本文未具体公开的任何要素,限制的情况下适当地实施。因此,例如,术语“包括”,“包含”,“含有”等应当被广泛地解读而不受限制。另外,这里使用的术语和表达已被用作描述的术语而非限制,并且无意使用这些术语和表达来排除所示和所述特征的任何等同物或其部分,但应认识到在所要求保护的本发明的范围内可以进行各种修改。因此,应该理解,尽管已经通过优选实施例和任选特征具体公开了本发明,但是本领域技术人员可以采用本文公开的发明的修改和变化,并且这些修改和变化被认为在本发明的范围内。

[0099] 在此广泛和一般地描述了本发明。落入一般公开内容中的每个较窄物种和亚属群组也构成本发明的一部分。这包括具有从该属中去除任何主题的附带条件或否定限制的本发明的一般描述,无论是否在本文中具体叙述了被切除的材料。

[0100] 其他实施方案在以下权利要求和非限制性实施例内。另外,在根据马库什群组描述本发明的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,本发明也因此以马库什群组的任何单个成员或成员子群的形式描述。

[0101] 实施例1

[0102] 本实施例提供一种3D人脑类器官培养基,包括基础培养基和特异性添加因子。具体成分和型号如表1-5所示。

[0103] 表1第一培养基

[0104] Cerebral organoids EB formation medium(EBM)1:day 0-3

[0105] (根据类脑生长情况,可适当延长EB形成时间。)

[0106]

试剂	浓度	备注	厂家/货号
DMEM-F12		基础培养基	Gibco, 31331093
KSR	20%	血清替代物	Thermo Fisher Scientific, 10828028
FGF-2/bFGF	4 ng/ml	促进细胞增殖和生长	Gibco, 13256-029
GlutaMax	1 x	L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽	Gibco, 35050061
NEAA	1 x	非必需氨基酸(NEAA)补充剂	Gibco, 11140050
青霉素和链霉素	1 x	抗生素	Gibco, 15070063
Y27632	20 μ M	ROCK 抑制剂 前三天使用, 第四天更换没有 Y27632 的 EBM	Selleck, S1049

[0107] 表2第二培养基

[0108] Cerebral organoids EB formation medium(EBM)2:day 3-6

试剂	浓度	备注	厂家/货号
DMEM-F12		基础培养基	Gibco, 31331093
KSR	20%	血清替代物	Thermo Fisher Scientific, 10828028
FGF-2/bFGF	4 ng/ml	促进细胞增殖和生长 重组人碱性成纤维细胞生长因子	Gibco, 13256-029
GlutaMax	1 x	L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽	Gibco, 35050061

[0109]

NEAA	1 x	非必需氨基酸(NEAA)补充剂	Gibco, 11140050
青霉素和链霉素	1 x	抗生素	Gibco, 15070063
M-CSF	10 ng/ml	诱导产生小胶质细胞 (巨噬细胞集落刺激因子)	PeptoTech, 300-25
IL-34	100 ng/ml	诱导产生小胶质细胞和 IL-34 (细胞因子)	PeptoTech, 200-34-50
SB431542	10 μ M	SMAD 抑制剂, 抑制内胚层和中胚层形成	Selleck, S1067
LDN193189	200 nM	SMAD 抑制剂, 抑制内胚层和中胚层形成	Selleck, S2618

[0110]

[0111] 表3第三培养基

[0112] Cerebral organoids EB Neuronal induction medium(NIM):day 6-12

试剂	浓度	备注	厂家/货号
DMEM-F12		基础培养基 达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)/ F-12	Gibco, 31331093
GlutaMax	1 x	L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽	Gibco, 35050061
NEAA	1 x	非必需氨基酸(NEAA)补充剂	Gibco, 11140050
青霉素和链霉素	1 x	抗生素	Gibco, 15070063
SB431542	10 μ M	SMAD 抑制剂, 抑制内胚层和中胚层形成	Selleck, S1067
LDN193189	200 nM	SMAD 抑制剂, 抑制内胚层和中胚层形成	Selleck, S2618
肝素	1 ug/ml	用于细胞增殖的补充剂	MCE, HY-17567
N2	1 x	用于促进神经祖细胞和神经元生长的补充剂	Gibco, 17502048
FGF-2/bFGF	4 ng/ml	促进细胞增殖和生长	Gibco, 13256-029

[0113]

[0114] 表4第四培养基

[0115] Cerebral organoids Neuronal differentiation medium(NDM):day 12-30

试剂	浓度	备注	厂家/货号
DMEM-F12/Neuronal basal	1:1	基础培养基	Gibco,31331093,21103049
GlutaMax	1x	L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽	Gibco,35050061
NEAA	1x	非必需氨基酸(NEAA)补充剂	Gibco,11140050
青霉素和链霉素	1x	抗生素	Gibco,15070063
N2	0.5%	100x	Gibco,17502048
B27	1%	用于维持神经元的补充剂	Gibco,17504044
胰岛素	2.5ug/ml	生长补充剂	MCE, HY-P0035

[0116]

[0117] 表5第五培养基

[0118] Cerebral organoids Neuronal mature medium(NMM):day>30

[0119]

试剂	浓度	备注	厂家/货号
DMEM-F12/Neuronal basal	1:1	基础胚胎神经元细胞生长培养基	Gibco, 31331093, 21103049
GlutaMax	1 x	L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽	Gibco, 35050061
NEAA	1 x	非必需氨基酸(NEAA)补充剂	Gibco, 11140050
青霉素和链霉素	1 x	抗生素	Gibco, 15070063
N2	0.5%	100 x	Gibco, 17502048

[0120]

B27	1%	促进神经元细胞生长	Gibco, 17504044
Insulin	2.5 ug/ml	胰岛素	MCE, HY-P0035
BDNF	10 ng/ml	脑源性神经营养因子	STEMCELL Technologies, 78005
GDNF	10 ng/ml	胶质细胞源性神经生长因子	STEMCELL Technologies, 78058
Forskolin	10 μM	cAMP 激活剂	Selleck, S2449
抗坏血酸	200 μM	维生素	STEMCELL Technologies, 72132

[0121] 实施例2

[0122] 本实施例提供一种3D人脑类器官培养基,包括基础培养基和特异性添加因子。具体成分和型号如表6-11所示。

[0123] 表6第一培养基

[0124] Cerebral organoids EB formation medium(EBM)1:day 0-3

[0125] (根据类脑生长情况,可适当延长EB形成时间。)

[0126]

试剂	浓度	备注	厂家/货号
DMEM-F12		基础培养基	Gibco, 31331093
KSR	20%	血清替代物	Thermo Fisher Scientific, 10828028
FGF-2/bFGF	4 ng/ml	促进细胞增殖和生长	Gibco, 13256-029
GlutaMax	1 x	L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽	Gibco, 35050061
NEAA	1 x	非必需氨基酸(NEAA)补充剂	Gibco, 11140050
青霉素和链霉素	1 x	抗生素	Gibco, 15070063
Y27632	20 μM	ROCK 抑制剂 前三天使用, 第四天更换没有 Y27632 的 EBM	Selleck, S1049

[0127] 表7第二培养基

[0128] Cerebral organoids EB formation medium(EBM)2:day 3-6

[0129]

试剂	浓度	备注	厂家/货号
DMEM-F12		基础培养基	Gibco, 31331093
KSR	20%	血清替代物	Thermo Fisher Scientific, 10828028
FGF-2/bFGF	4 ng/ml	促进细胞增殖和生长 重组人碱性成纤维细胞生长因子	Gibco, 13256-029
GlutaMax	1 x	L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽	Gibco, 35050061
NEAA	1 x	非必需氨基酸(NEAA)补充剂	Gibco, 11140050
青霉素和链霉素	1 x	抗生素	Gibco, 15070063
M-CSF	10 ng/ml	诱导产生小胶质细胞 (巨噬细胞集落刺激因子)	PeproTech, 300-25
IL-34	100 ng/ml	诱导产生小胶质细胞和 IL-34 (细胞因子)	PeproTech, 200-34-50
SB431542	10 μM	SMAD 抑制剂, 抑制内胚层和中胚层形成	Selleck, S1067
LDN193189	200 nM	SMAD 抑制剂, 抑制内胚层和中胚层形成	Selleck, S2618

[0130] 表8第三培养基

[0131] Cerebral organoids EB Neuronal induction medium(NIM):day 8-12

试剂	浓度	备注	厂家/货号
DMEM-F12		基础培养基 达尔伯克改良伊格培培养基(DMEM)/ F-12	Gibco, 31331093
GlutaMax	1 x	L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽	Gibco, 35050061
NEAA	1 x	非必需氨基酸(NEAA)补充剂	Gibco, 11140050
青霉素和链霉素	1 x	抗生素	Gibco, 15070063
SB431542	10 μ M	SMAD 抑制剂, 抑制内胚层和中胚层形成	Selleck, S1067
LDN193189	200 nM	SMAD 抑制剂, 抑制内胚层和中胚层形成	Selleck, S2618
肝素	1 μ g/ml	用于细胞增殖的补充剂	MCE, HY-17567
N2	1 x	用于促进神经祖细胞和神经元生长的补充剂	Gibco, 17502048
FGF-2/bFGF	4 ng/ml	促进细胞增殖和生长	Gibco, 13256-029

[0132] 表9第四培养基

[0134] Cerebral organoids Neuronal differentiation medium(NDM):day 12-30

试剂	浓度	备注	厂家/货号
DMEM-F12/Neuronal basal	1:1	基础培养基	Gibco,31331093,21103049
GlutaMax	1x	L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽	Gibco,35050061
NEAA	1x	非必需氨基酸(NEAA)补充剂	Gibco,11140050
青霉素和链霉素	1x	抗生素	Gibco,15070063
N2	0.5%	100x	Gibco,17502048
B27	1%	用于维持神经元的补充剂	Gibco,17504044
胰岛素	2.5 μ g/ml	生长补充剂	MCE, HY-P0035

[0135] 表10第五培养基

[0137] Cerebral organoids Neuronal mature medium(NMM):day > 30

试剂	浓度	备注	厂家/货号
DMEM-F12/Neuronal basal	1:1	基础胚胎神经元细胞生长培养基	Gibco, 31331093, 21103049
GlutaMax	1 x	L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽	Gibco, 35050061
NEAA	1 x	非必需氨基酸(NEAA)补充剂	Gibco, 11140050
青霉素和链霉素	1 x	抗生素	Gibco, 15070063
N2	0.5%	100 x	Gibco, 17502048
B27	1%	促进神经元细胞生长	Gibco, 17504044
Insulin	2.5 μ g/ml	胰岛素	MCE, HY-P0035
BDNF	10 ng/ml	脑源性神经营养因子	STEMCELL Technologies, 78005
GDNF	10 ng/ml	胶质细胞源性神经生长因子	STEMCELL Technologies, 78058
Forskolin	10 μ M	cAMP 激活剂	Selleck, S2449
抗坏血酸	200 μ M	维生素	STEMCELL Technologies, 72132

[0138] 表11第六培养基

[0139] Cerebral organoids EB Neuronal induction medium(NIM):day 6-8

试剂	浓度	备注	厂家/货号
DMEM-F12		基础培养基 达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)/ F-12	Gibco, 31331093
GlutaMax	1 x	L-丙氨酸-L-谷氨酰胺二肽	Gibco, 35050061
NEAA	1 x	非必需氨基酸(NEAA)补充剂	Gibco, 11140050
青霉素和链霉素	1 x	抗生素	Gibco, 15070063
[0141] SB431542	10 μ M	SMAD 抑制剂, 抑制内胚层和中胚层形成	Selleck, S1067
LDN193189	200 nM	SMAD 抑制剂, 抑制内胚层和中胚层形成	Selleck, S2618
M-CSF	10 ng/ml	诱导产生小胶质细胞 (巨噬细胞集落刺激因子)	PeproTech, 300-25
IL-34	100 ng/ml	诱导产生小胶质细胞和 IL-34 (细胞因子)	PeproTech, 200-34-50
肝素	1 μ g/ml	用于细胞增殖的补充剂	MCE, HY-17567
N2	1 x	用于扩增未分化细胞的补充剂	Gibco, 17502048
FGF-2/bFGF	4 ng/ml	促进细胞增殖和生长	Gibco, 13256-029

[0142] 实施例3培养出包含胶质细胞的3D人脑类器官实验步骤

[0143] 采用实施例1的培养基进行胶质细胞3D人脑类器官的培养过程包含多个阶段(按照图4的流程):1.类胚体形成;2.类胚体神经诱导;3.类胚体神经分化;4.类胚体神经成熟。以下将详细描述各个培养阶段。

[0144] 1.hiPS细胞形成类胚体(Embryoid body,EB),培养时间:第0天至第6天(图4)

[0145] 6孔板或12孔板中hiPS细胞生长至培养皿底部面积80-90%,且hips细胞呈现致密的克隆团生长,无分化细胞或分化细胞较少(分化的细胞呈现出较多的触角或者细胞胞体较大且与周围干细胞形态差异较大)时,hips细胞可用于形成3D人脑类器官类胚体。

[0146] 3D人脑类器官EB形成实验步骤

[0147] Accutase消化hiPS成单细胞:人脑类器官EB形成需使用单细胞悬液。

[0148] 1)从CO₂细胞培养箱中取出培养hiPS细胞的六孔板或12孔板,用1mL枪头吸走培养皿中旧的mTeSR完全培养基;

[0149] 2)加入0.05mM EDTA消化液清洗细胞一次;

[0150] 3)吸出EDTA清洗液,加入37℃水浴预热的Accutase(12孔板每孔用500uL,6孔板每孔用1mL)温和消化酶消化hips细胞1-2min(消化时间长短与细胞密度和细胞状态有关),直至细胞缩成一个光亮的小球;

[0151] 4)吸出Accutase消化液,加入已预热的1mL DMEM-F12培养基;

[0152] 5)用1mL枪头轻轻吹打细胞,使细胞分散为单个细胞悬液;

[0153] 6)将细胞悬液转移到15mL离心管中,再往离心管中加入2mL DMEM-F12培养基(根据细胞密度适当调整加入培养基的体积,12孔板中每孔加入培养基的总体积为3 mL,6孔板加入培养基的总体积为5-6mL),充分混匀细胞悬液。

[0154] 7)hiPS细胞计数:本文中,每个人脑类器官EB形成使用 1×10^4 个单细胞。

[0155] 接种单细胞悬液:

[0156] 8)以 1×10^4 个细胞每孔将单细胞悬液接种到低吸附96孔板中(100uL EB形成培养液每孔)。例如,形成24个类脑EB球,需要总细胞数量为 24×10^4 个细胞(一般多计算一个孔,防止误差);

[0157] 9)如果计算出细胞悬液为 80×10^4 /mL,则需要的细胞悬液体积为:24除以80等于0.3mL。因此,取0.3mL细胞悬液,800rpm室温离心3分钟;

[0158] 10) 离心结束后,小心吸走上清,加入24x100u1 (100u1每孔) 配制好的EB形成 培养液 (Embryoid body formation medium,EBM;本文中的EBM配方参照“Cerebral organoids EB formation medium 1和2”),重悬细胞,使细胞分散为单细胞悬液;

[0159] 11) 取一块低吸附96孔板,做好实验组与对照组的标记,将细胞悬液以100u1每孔接种到96孔板中,并将接种好细胞的培养板以700rpm室温离心1分钟,使细胞集聚 到低吸附U型96孔板底部。

[0160] 12) 将细胞培养板置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养24小时,24小时之内不能移动培养板。

[0161] EB形成阶段一般为培养过程的前6天。本发明中,接种到低吸附96孔板中的细胞在24小时后会聚集形成EB球,并记为第一天。EB培养的前三天,使用“Cerebral organoids EB formation medium 1”(第一培养基);EB培养第3-6天,更换培养基为“Cerebral organoids EB formation medium 2”(第二培养基)。之后,EB球可培养至第6 天(图4)再进行神经诱导阶段的培养。

[0162] 2.3D人脑类器官类胚体神经诱导,培养时间:第6天至第12天(图4)

[0163] EB球形成以后,培养至第6天需要将培养基更换为神经诱导培养基 (Neural induction medium,NIM;NIM配方参照“Cerebral organoids EB Neuronal induction medium”) (第三培养基),诱导外胚层形成神经干细胞并往神经细胞生长。

[0164] EB神经诱导培养实验步骤

[0165] 1) 在EB形成后第6天,将培养基更换为神经诱导培养基 (NIM)。

[0166] 2) 保持神经诱导培养。在第6天添加NIM后,将培养板置于37℃、5%CO₂培养 箱中培养至第12天(图4),期间需要观察EB生长状态。在后续培养过程中,每三天 完全更换一次神经诱导培养基。

[0167] 类似的,从神经诱导培养阶段开始,也可以用matrigel包埋类脑进行培养。具体步骤如下:

[0168] 第7天(图4),使用Matrigel包埋EB球,然后将EB球转移到低吸附6孔板中培 养。

[0169] 1) 从培养箱中取出96孔EB培养板并置于超净工作台中;

[0170] 2) 用减去尖头的200u1黄色枪头(减去枪头的尖头时,用移液枪插上待剪的枪头并在酒精灯火焰上旋转过火3秒钟左右,使枪头软化防止剪枪头时枪头发生破裂,剪去 枪头后,将断面在酒精灯火焰上旋转过火3秒钟左右,使枪头断面平滑。)吸出EB球,并将EB球置于特制封口膜上的圆形压痕中(特制的封口膜预先需要处理:剪取长5-8cm x宽5-8cm的封口膜,将封口膜置于200u1枪头盒的插孔上,用手指按压封口膜,使 封口膜上出现圆孔的按压痕迹为止。按压好的封口膜置于超净工作台中,开启紫外灯照射封口膜灭菌备用。使用时,将封口膜置于10mL培养皿中。),一个类脑放置在一个圆 形压痕中;

[0171] 3) 用10u1枪头小心吸走类脑周围的培养液;

[0172] 4) 用100u1枪头(置于冰上预冷)吸取15u1 Matrigel (4℃解冻,使用时置于冰上,常温下呈果冻状) 包埋EB球,注意不能产生气泡;

[0173] 5) 将包埋好的EB球连同封口膜(封口膜置于10cm培养皿中)放入37℃、5%CO₂培养箱培养30分钟;

[0174] 6) 30分钟后,Matrigel凝固为果冻状,将EB球包埋在中间;

[0175] 7) 用1mL枪头吸取新鲜神经诱导培养基将包埋好的EB球轻轻吹打到低吸附6孔板中,每个孔放置12-20个EB球进行培养,神经诱导培养液维持在3ml每孔。

[0176] 8) 在后续培养中,每3天更换一次新鲜的培养基,直至第12天添加神经分化培养基。

[0177] 3.3D人脑类器官类胚体神经分化,培养时间:第12天至第30天(图4)。

[0178] EB球经过神经诱导培养阶段,培养至第12天需要将培养基更换为神经分化培养基(Neural differentiation medium,NDM;NDM配方参照“Cerebral organoids Neuronal differentiation medium”) (第四培养基),促进神经干细胞往神经细胞分化生长。

[0179] EB神经分化培养实验步骤

[0180] EB在96孔板中培养

[0181] 1) EB培养至第12天,将培养基更换为神经分化培养基NDM。

[0182] 2) 保持神经分化培养。在第12天更换NDM后,将培养板置于37℃、5%CO₂培养箱中培养至第30天,期间需要观察EB生长状态。在培养过程中,每三天完全更换一次神经分化培养基。

[0183] 3) 在培养过程中,会产生细胞碎片附着在类脑周围,因此,每次换液的时候,用200u1枪头轻轻吹打几次,使碎细胞和类脑都悬浮起来,然后再小心吸出旧的培养基。

[0184] EB转移到6孔板中培养

[0185] EB培养至第12天,将类脑转移到低吸附6孔板中培养,并将培养基更换为神经分化培养基NDM。具体实验步骤如下:

[0186] 1) EB培养至第12天,使用剪去尖头的200u1枪头小心吸取EB球并转移至6孔板中,待所需EB球数量都转移到6孔板中,吸出旧的神经诱导培养基,再加入已预热1-3ml NDM培养液。

[0187] 2) 保持神经分化培养。在第12天更换为NDM后,将培养板置于37℃、5%CO₂培养箱中培养至第30天,期间需要观察EB生长状态。在培养过程中,每三天完全更换一次神经分化培养基。

[0188] 3) 培养过程中,培养液中可能会产生细胞碎片,因此,每次更换新鲜培养基的时候,将6孔板朝一侧倾斜,并静止1-2分钟,由于类脑较大,会聚集到较低的一侧。等类脑聚集到较低一侧时,用1mL枪头小心吸出旧的培养基和碎细胞。注意,不能吸到类脑。

[0189] 4.3D人脑类器官神经成熟,培养时间:大于第30天。

[0190] EB球经过神经分化培养阶段,培养至第30天需要将培养基更换为神经成熟培养基(Neural maturation medium,NMM,NMM配方参照“Cerebral organoids Neuronal mature medium”) (第五培养基),促进神经细胞成熟生长和维持神经细胞生长。

[0191] EB神经成熟培养实验步骤

[0192] EB类脑在96孔板中培养

[0193] 1) EB培养至第30天,将培养基更换为神经成熟培养基NMM。

[0194] 2) 保持神经成熟培养。在第30天更换NMM后,将培养板置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,期间需要观察EB生长状态。在培养过程中,每三天完全更换一次神经成熟培养基。

[0195] 3) 在培养过程中,会产生细胞碎片附着在类脑周围,因此,每次换液的时候,用200u1枪头轻轻吹打几次,使碎细胞和类脑都悬浮起来,然后再小心吸出旧的培养基。

[0196] EB类脑在6孔板中培养

[0197] 1) EB培养至第30天,将类脑转移到低吸附6孔板中培养,并将培养基更换为神经成熟培养基NMM。保持神经成熟培养。在第30天添加NMM后,将培养板置于37℃、5%CO₂培养箱中培养至用于各种实验检测,期间需要观察类脑生长状态。在培养过程中,每三天完全更换一次神经成熟培养基。

[0198] 2) 在培养过程中,会产生细胞碎片附着在类脑周围,因此,每次换液的时候,用200ul枪头轻轻吹打几次,使碎细胞和类脑都悬浮起来,然后在小心吸出旧的培养基。

[0199] 本发明中,通过上述方法的培养,成熟培养阶段的3D人脑类器官包含小胶质细胞(IBA1、CD11B阳性细胞),同时也包含星形胶质细胞和少突胶质细胞(图6)。

[0200] 免疫荧光染色发现,培养成熟的类脑中包含小胶质细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞。(A) CD11B和IBA1是小胶质细胞的标志蛋白;(B) GFAP是星形胶质细胞的标志蛋白;(C) O4是少突胶质细胞的标志蛋白。NEUN和MAP2标记了成熟的神经元细胞。类脑培养时间为第92天,在培养至第70天时,已经发现类脑中包含胶质细胞。DAPI 标记细胞核,标尺为100μm。

[0201] 而作为对照组,即在EB形成阶段第三天至第六天,培养液中只添加SMAD双抑制剂,而不添加M-CSF和IL-34,培养至成熟阶段,培养类脑中分化出成熟神经元(MAP2),但是未观察到CD11B阳性和IBA1阳性小胶质细胞。DAPI标记细胞核,MAP2标记成熟神经元,标尺为100μm(图7)。

[0202] 作为对比例1,即在EB形成阶段第三天至第六天,EB形成培养液中添加SMAD双抑制剂,同时单独添加IL-34(100ng/ml,EB形成培养液中的其他成分如表2,神经诱导培养基NIM组分如表3,神经分化培养基NDM组分如表4,神经成熟培养基NMM组分如表5。),而不添加M-CSF。其他操作同实施例1。类脑培养至成熟阶段(第60天),类脑中分化出成熟神经元,同时存在少量的CD11B阳性和IBA1阳性小胶质细胞(5.23%±1.56%)。

[0203] 作为对比例2,即在EB形成阶段第三天至第六天,EB形成培养液中添加SMAD双抑制剂,同时单独添加M-CSF(10ng/ml,EB形成培养液中的其他成分如表2,神经诱导培养基NIM组分如表3,神经分化培养基NDM组分如表4,神经成熟培养基NMM组分如表5。),而不添加IL-34。其他操作同实施例1。类脑培养至成熟阶段(第60天),类脑中分化出成熟神经元,同时存在少量的CD11B阳性和IBA1阳性小胶质细胞(4.68%±1.86%)。

[0204] 另外,通过对类脑切片中小胶质细胞的数量进行定量发现,本发明培养出的类脑中,小胶质细胞的比例为10.11%±2.04%(CD11B)和8.379%±3.39%(IBA1),CD11B和IBA1阳性细胞比例平均值为9.2445%±2.715%。这个数值正好在生理状态下神经系统中小胶质细胞的比例(5%-15%)之内(图8),且比值也较Paul R.Ormel等人培养出的类脑中小胶质细胞的比例高出3.25%(Paul R.Ormel:IBA1=5.99%±1.65%),是他们的1.54倍。

[0205] 说明在培养阶段,更换培养基的成分,即使是只添加一种SMAD抑制剂,生成的类脑中的小胶质细胞的数量也不能符合生理状态下的数量。

[0206] 同时,经过多次试验,改变培养基中SMAD抑制剂或者小胶质细胞刺激试剂的试剂种类或剂量,也不能得到生理状态下的小胶质细胞的数量。说明,只有本申请这两种特定的SMAD抑制剂的特定添加量,搭配特定数量的固定的小胶质细胞刺激试剂,才能培养出符

合生理状态下的小胶质细胞的数量。

[0207] 实施例4培养出包含胶质细胞的3D人脑类器官实验步骤

[0208] 采用实施例2的培养基进行胶质细胞3D人脑类器官的培养过程包含多个阶段(按照图4的流程):1.类胚体形成;2.类胚体神经诱导;3.类胚体神经分化;4.类胚体神经成熟。以下将详细描述各个培养阶段。

[0209] 其余步骤同实施例3,不同的是在3D人脑类器官类胚体神经诱导,培养时间:第6天至第12天(图5)

[0210] EB球形形成以后,培养至第6天需要将培养基更换为第六培养基,然后在培养至第8天,将培养基更换为第三培养基,诱导外胚层形成神经干细胞并往神经细胞生长。

[0211] EB神经诱导培养实验步骤

[0212] 3) 在EB形成后第6天,将培养基更换为第六培养基。

[0213] 4) 保持神经诱导培养。在第6天添加第六培养基后,将培养板置于37℃、5%CO₂培养箱中培养至第8天(图5),期间需要观察EB生长状态。然后在培养至第8天,将培养基更换为第三培养基。在后续培养过程中,每三天完全更换一次神经诱导培养基。

[0214] 本实施例中,通过上述方法的培养,成熟培养阶段的3D人脑类器官包含小胶质细胞(IBA1、CD11B阳性细胞),同时也包含星形胶质细胞和少突胶质细胞(结果类似图6)。

[0215] 另外,通过对类脑切片中小胶质细胞的数量进行定量发现,本实施例培养出的类脑中,小胶质细胞的比例为9.52%±2.13%(CD11B)和9.23%±2.53%(IBA1),CD11B和IBA1阳性细胞比例平均值为9.375%±2.33%。这个数值正好在生理状态下神经系统中小胶质细胞的比例(5%-15%)之内。

[0216] 以上公开的本发明优选实施例只是用于帮助阐述本发明。优选实施例并没有详尽叙述所有的细节,也不限制该发明仅为所述的具体实施方式。显然,根据本说明书的内容,可作很多的修改和变化。本说明书选取并具体描述这些实施例,是为了更好地解释本发明的原理和实际应用,从而使所属技术领域技术人员能很好地理解和利用本发明。本发明仅受权利要求书及其全部范围和等效物的限制。

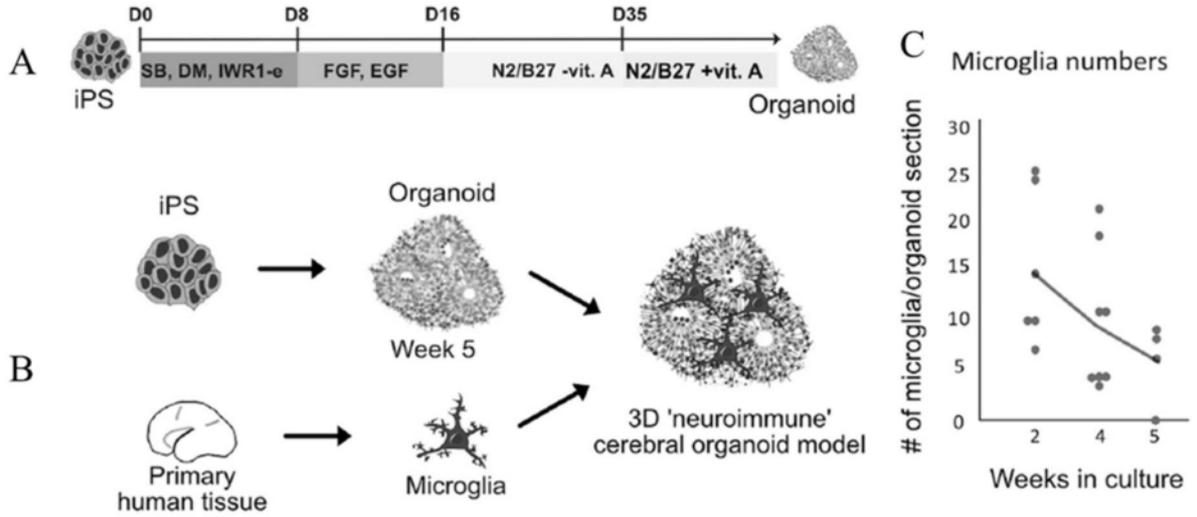


图1

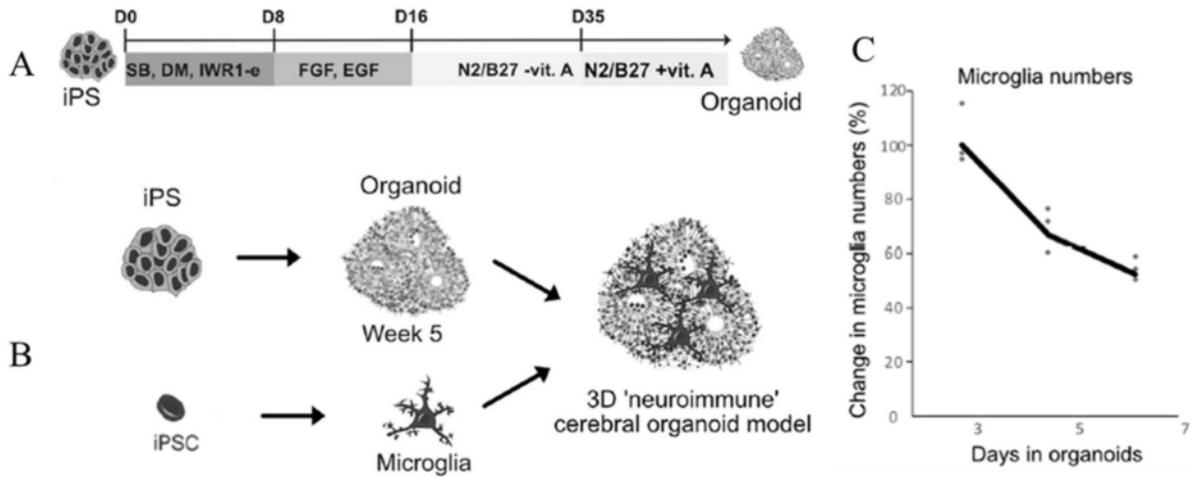


图2

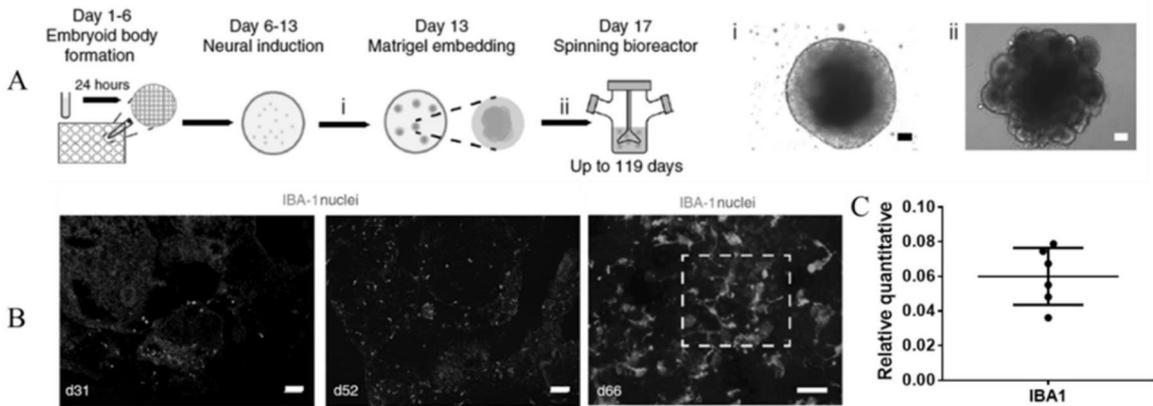


图3

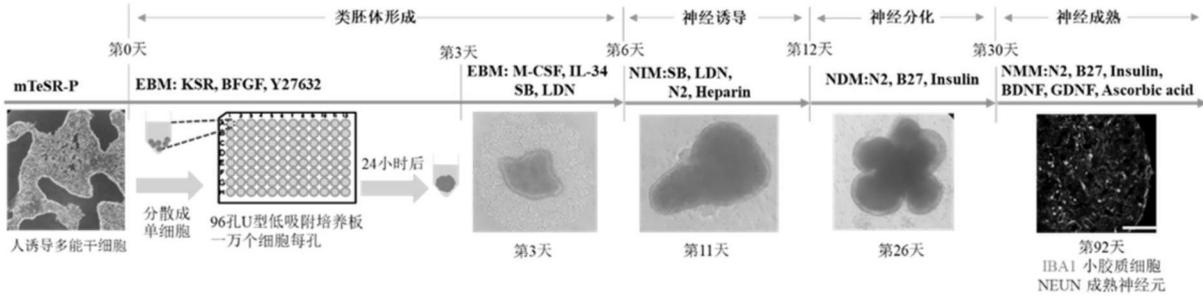


图4

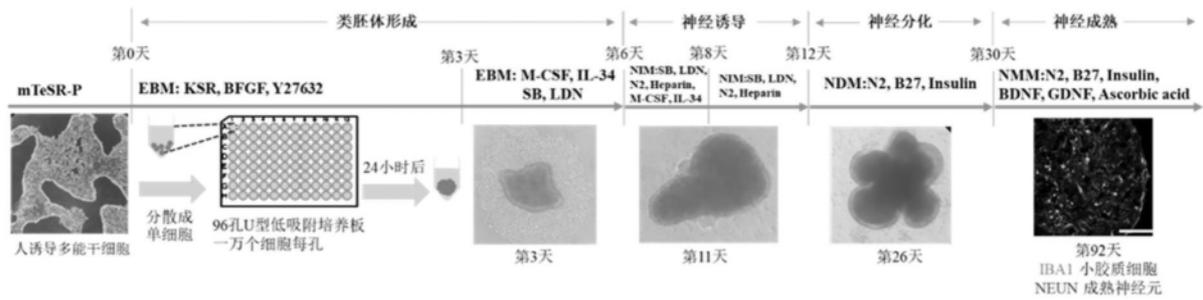


图5

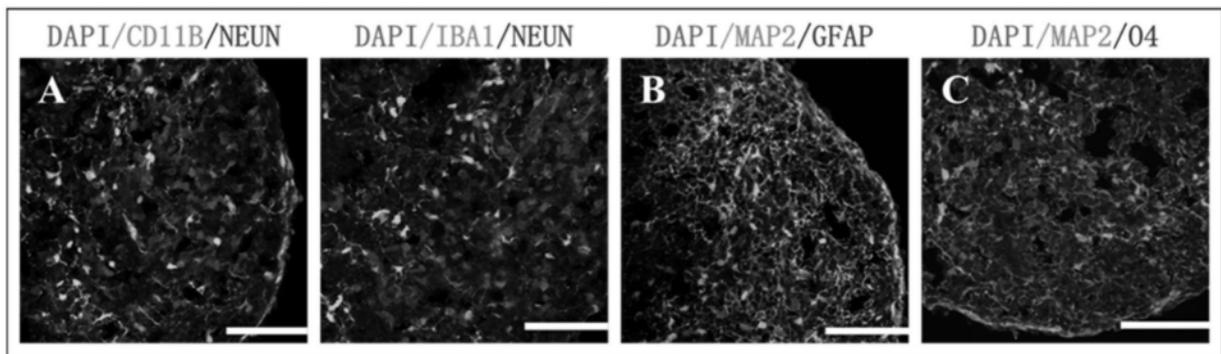


图6

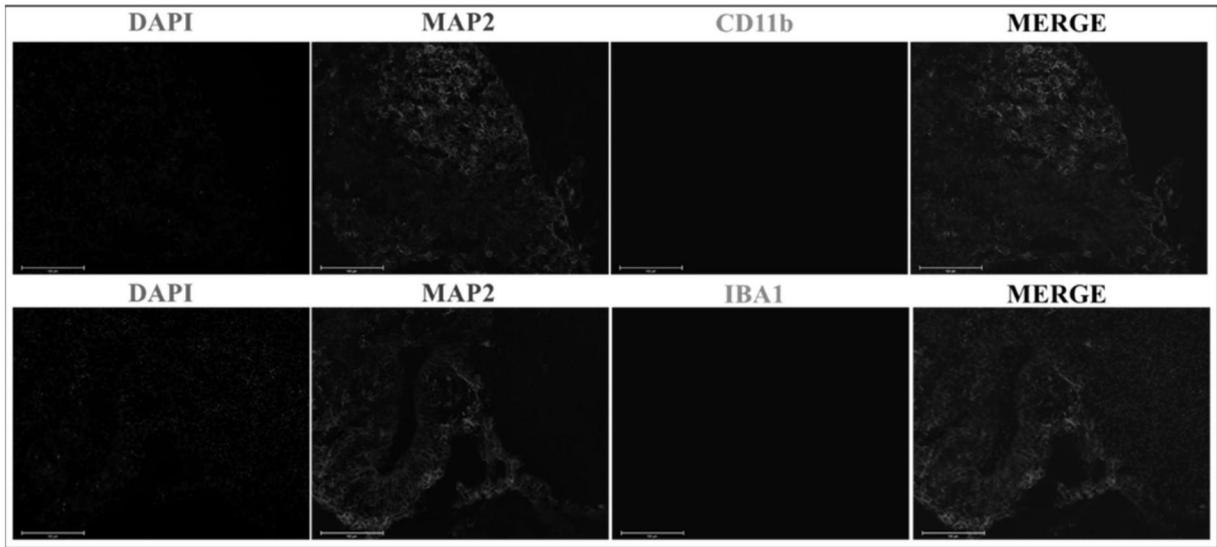
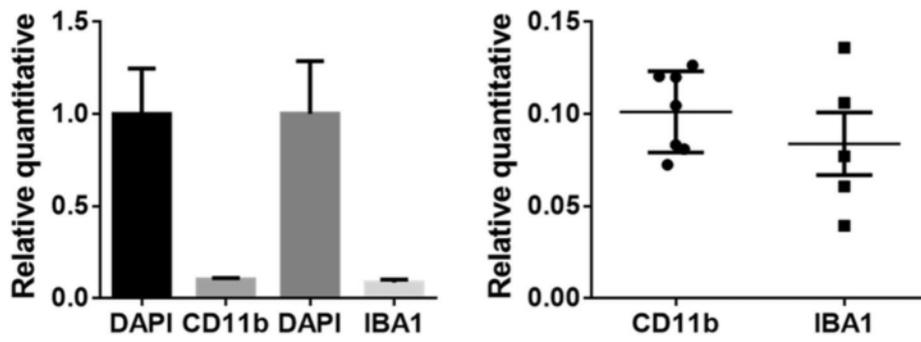


图7



	CD11b	IBA1
Mean+SD	0.1011 ± 0.0204	0.08379 ± 0.0339

图8