(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112961821 B
(45)授权公告日 2023.05.30

(21)申请号 202110209211.6
(22)申请日 2021.02.24
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112961821 A
(43)申请公布日 2021.06.15
(73)专利权人 四川大学华西医院
地址 610041 四川省成都市武侯区国学巷37号
(72)发明人 陈丽
(74)专利代理机构 成都虹桥专利事务所(普通合伙) 51124
专利代理师 伍云萍
(51)Int.Cl.
C12N 5/071(2010.01)
(56)对比文件
CN 101951944 A,2011.01.19
CN 102643784 A,2012.08.22
CN 104640974 A,2015.05.20
CN 106755270 A,2017.05.31
CN 108060132 A,2018.05.22
CN 108998441 A,2018.12.14
CN 109893679 A,2019.06.18
CN 110582561 A,2019.12.17
CN 111334469 A,2020.06.26
CN 111977590 A,2020.11.24
JP 2002516617 A,2002.06.04
KR 100840394 B1,2008.06.23
RU 2363430 C1,2009.08.10
Hodder, E等.Investigating the effect of sterilisation methods on the physical properties and cytocompatibility of methyl cellulose used in combination with alginate for 3D-bioplotting of chondrocytes.JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE-MATERIALS IN MEDICINE.2019,第30卷(第1期),摘要.
徐红等.2%甲基纤维素液对兔眼角膜内皮细胞保护作用的实验研究.中国药学杂志.1995,摘要.
陈家楠等.干细胞迁移机理的近场扫描光学显微术研究.分析测试学报.2010,第29卷(第06期),摘要.
审查员 孔维纳

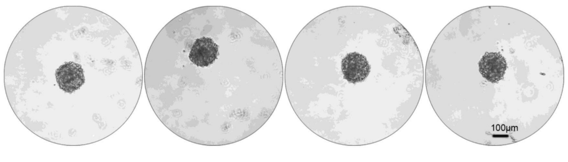
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

三维培养血管内皮细胞的方法

(57)摘要

本发明属于细胞培养技术领域,具体涉及一种高效三维培养血管内皮细胞的方法。针对现有贴壁生长细胞3D微组织培养的耗材贵,形成微组织球体时间较长、效率低等问题,本发明提供了一种高效三维培养血管内皮细胞的方法,包括以下步骤:a,配制甲基纤维素培养基;b,接种内皮细胞到低粘附平面形成悬滴;c,18-24小时后收集内皮细胞微组织球体;d,内皮细胞微组织球体进行出芽实验检测其血管新生能力。本方法所使用的甲基纤维素培养基和低粘附平面均采用实验室常用试剂耗材制备,无需专门购买,可得性强,成本较低,且微组织球体形成时间明显缩短,提高实验效率,适于后续内皮细胞微组织球体功能检测及药物筛选。



CN 112961821 B

1.三维培养血管内皮细胞的方法,其特征在于,包括以下步骤:

a、配制含有浓度为1.2%～2%的甲基纤维素的DMEM培养基;所述的甲基纤维素粘稠度为4000cp;

b、将62500～375000个血管内皮细胞重悬在终体积为4ml含20%FBS的高糖DMEM完全培养基中,加入1ml步骤a的培养基,混合均匀,制备得到单细胞悬液;

c、取40μl步骤b的单细胞悬液,接种至低粘附平面,将平面翻转后,形成悬滴,将悬滴在温度37℃、CO_2浓度5%的条件下进行培养,得到血管内皮细胞的微组织球体。

2.根据权利要求1所述的三维培养血管内皮细胞的方法,其特征在于:步骤a中所述的甲基纤维素浓度为1.2%。

3.根据权利要求1所述的三维培养血管内皮细胞的方法,其特征在于:步骤a中所述的甲基纤维素购自Sigma-Aldrich公司,货号为M0512。

4.根据权利要求1所述的三维培养血管内皮细胞的方法,其特征在于:步骤a所述培养基的具体配制方法为:称取6～10g甲基纤维素,转移至已经加入磁力搅拌子的500ml广口瓶中,高温高压灭菌;加热250ml DMEM基础培养基到60℃,将培养基加入灭菌完毕的甲基纤维素中,室温下磁力搅拌20min;室温下加入250ml DMEM基础培养基,然后在4℃下磁力搅拌过夜;室温下5,000g离心2小时,上清备用。

5.根据权利要求1所述的三维培养血管内皮细胞的方法,其特征在于:步骤b中的细胞浓度取决于所需微组织球体大小,内皮细胞数量可从500/球体到3000/球体。

6.根据权利要求1所述的三维培养血管内皮细胞的方法,其特征在于:步骤c所述的低粘附平面为普通无菌培养皿皿盖。

三维培养血管内皮细胞的方法

技术领域

[0001]　本发明属于细胞培养技术领域，具体涉及一种高效三维培养血管内皮细胞的方法。

背景技术

[0002]　血管内皮细胞在标准二维培养体系中会丢失许多分化完成后的表型特征，这对在体外培养条件下研究分化完成后的内皮细胞功能产生了限制。三维细胞培养体系为内皮细胞提供了更加接近体内生存条件的微环境，能够更好的模拟生理状态，从而能够获得与体内实验更加一致的实验结果。

[0003]　目前三维细胞培养技术中应用最广阔的是无支架培养体系，其可通过悬滴让细胞在重力的作用下通过自组装形成微球体。该体系形成的微组织球体具有高一致性，可为后续研究提供好的微组织材料。

[0004]　专利CN108060132A公开了一种基于肿瘤细胞与肿瘤相关成纤维细胞的3D共培养模型，该方法采用的3D培养基成分为含有0.24%的甲基纤维素的细胞培养基，然后将含有2500个细胞的100μl 3D细胞培养基加入未经过组织处理的96孔圆底板，3天后形成微组织球体。该方法仍需专门购买商业化的未经过组织处理的圆底培养板，且细胞接种到上述培养装置后形成微组织球体时间较长(3天)，影响实验效率。另外，由于该培养装置的培养孔数目固定，通常为96孔，如果实验中仅需使用少量微组织球体，容易造成浪费。

[0005]　专利CN111334469A和CN111334470A公开了一种外周血单个核细胞体外3D甲基纤维素琼脂糖水凝胶培养基及其制备方法，该方法需要配制数种不同浓度甲基纤维素和琼脂糖溶液，且由于琼脂糖溶液在最终形成水凝胶之前均需控制温度以避免凝固，否则将无法进行后续操作，操作过程繁琐。且该方法本身用于非贴壁细胞的培养，未能提供其在贴壁细胞三维培养中的微组织球体形成所需时间及效果。因此，该方法无法为贴壁细胞三维培养形成微组织球体提供启示。

[0006]　目前，仅有商业化的悬滴板可以用来进行细胞的3D微组织培养，该商业化的悬滴板必须要经过特别的处理，才能避免细胞贴壁生长，从而形成微球体。但是，商业化的悬滴板购买不易，仅有少数几家国外的耗材公司提供，价格昂贵，且培养孔数目固定，不易根据所需微组织数量调整耗材用量，灵活性较低。

[0007]　因此，如何采用普通的实验装置实现血管内皮细胞的无支架培养成为了行业内亟待解决的问题。

发明内容

[0008]　本发明要解决的技术问题是：现有贴壁生长细胞3D微组织培养的耗材贵，形成微组织球体时间较长、效率低等问题。

[0009]　本发明解决上述技术问题的技术方案为：提供一种高效三维培养血管内皮细胞的方法。该方法包括以下步骤：

[0010] a、配制含有浓度为0.5%～2%的甲基纤维素的DMEM培养基；

[0011] b、将62500～375000个血管内皮细胞重悬在终体积为4ml含20% FBS的高糖DMEM完全培养基中，加入1ml步骤a的培养基，混合均匀，制备得到单细胞悬液；

[0012] c、取40μl步骤b的单细胞悬液，接种至低粘附平面，将平面翻转后，形成悬滴，将悬滴在温度37℃、CO_2浓度5%的条件下进行培养，得到血管内皮细胞的微组织球体。

[0013] 其中，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤a中所述的甲基纤维素粘稠度为4000cp。

[0014] 进一步的，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤a中所述的甲基纤维素浓度为1.2%。

[0015] 进一步的，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤a中所述的甲基纤维素购自Sigma-Aldrich公司，货号为M0512。

[0016] 进一步的，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤a所述培养基的具体配制方法为：称取2.5～10g甲基纤维素，转移至已经加入磁力搅拌子的500ml广口瓶中，高温高压灭菌；加热250ml DMEM基础培养基到60℃，将培养基加入灭菌完毕的甲基纤维素中，室温下磁力搅拌20min；室温下加入250ml DMEM基础培养基，然后在4℃下磁力搅拌过夜；室温下5,000g离心2小时，上清备用。

[0017] 其中，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤b中的细胞浓度取决于所需微组织球体大小，内皮细胞数量可从500/球体到3000/球体，根据实际所需球体大小决定细胞数量。

[0018] 其中，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤c所述的低粘附平面为普通无菌培养皿皿盖。

[0019] 其中，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，为防止悬滴干涸，可在下面培养皿中加入少量PBS，形成湿盒。悬滴培养内皮细胞形成微组织球体后，可翻转皿盖在显微镜下观察球体，换液，转染，荧光标记等操作。

[0020] 本发明在培养时发现，悬滴中的内皮细胞从培养后4小时开始聚集，18小时到24小时即可形成微组织球体。收集内皮细胞微组织球体进行出芽实验：使用移液枪将微组织球体转移入基质胶包被的普通96孔板中(1个球体/孔)，培养24h后在倒置显微镜下观察内皮细胞出芽式血管新生能力；或者使用5ml血清吸管吸取10ml磷酸盐缓冲液PBS冲洗悬滴，收集PBS冲洗液，转移至15ml离心管。200g转速离心5分钟。丢弃上清后加入6ml甲基纤维素-胶原蛋白培养基重悬微组织球体。甲基纤维素-胶原蛋白培养基配方：20%(v/v)FBS，0.5%(w/v)甲基纤维素，1.5mg/ml鼠尾I型胶原以及补足的DMEM培养基。然后接种到24孔板中进行培养(1ml/孔)。24小时后在倒置显微镜下观察内皮细胞出芽式血管新生能力。

[0021] 与现有技术相比，本发明的有益效果为：

[0022] 本发明提供了一种实验室高效三维培养血管内皮细胞的方法，采用实验室常规耗材试剂对血管内皮细胞进行3D培养，利用悬滴法组装微组织球体。本发明可在不采用昂贵培养器皿的前提下，仅采用现有常规的培养器皿进行血管内皮细胞的3D培养，能显著的降低试验成本。并且，采用本发明的培养方法，18～24小时即可形成微组织球体，相比现有方法的3天，显著的提高了实验效率。另外，可根据实验需要微组织球体数目，灵活控制所需实验耗材，避免试剂耗材浪费，比如本方法可以根据所需球体数目灵活选择35mm，60mm，100mm

和150mm培养皿。本发明的培养方法更高效、低廉且实用，具有很高的价值。

附图说明

[0023]　图1所示为本发明实施例1和实施例2培养体系所需的常规耗材器皿。

[0024]　图2所示为本发明实施例1和实施例2培养体系对内皮细胞进行三维培养时形成的悬滴。

[0025]　图3所示为本发明实施例1和实施例2培养体系形成的内皮细胞悬滴在显微镜下进行直接观察。

[0026]　图4为本发明实施例1和实施例2内皮细胞聚集而成的微组织球体在显微镜下的形态(bar＝100μm)。

[0027]　图5所示为本发明实施例1对内皮细胞微组织球体在基质胶表面进行出芽实验检测(bar＝100μm)。

[0028]　图6所示为本发明实施例2对内皮细胞微组织球体在胶原蛋白-甲基纤维素培养基中进行出芽式血管新生能力的检测(bar＝200μm)。

具体实施方式

[0029]　本发明提供了一种高效三维培养血管内皮细胞的方法，包括以下步骤：

[0030]　a、配制含有浓度为0.5％～2％的甲基纤维素的DMEM培养基；

[0031]　b、将62500～375000个血管内皮细胞重悬在终体积为4ml含20％ FBS的高糖DMEM完全培养基中，加入1ml步骤a的培养基，混合均匀，制备得到单细胞悬液；

[0032]　c、取40μl步骤b的单细胞悬液，接种至低粘附平面，将平面翻转后，形成悬滴，将悬滴在温度37℃、CO_2浓度5％的条件下进行培养，得到血管内皮细胞的微组织球体。

[0033]　其中，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤a中所述的甲基纤维素粘稠度为4000cp。

[0034]　进一步的，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤a中所述的甲基纤维素浓度为1.2％。

[0035]　进一步的，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤a中所述的甲基纤维素购自Sigma-Aldrich公司，货号为M0512。

[0036]　本发明采用的培养基中添加了1.2％的粘稠度为4000cp的甲基纤维素，倒置能够形成球形的小液滴，刚好不会掉落。相比现有的采用甲基纤维素进行细胞培养的方法，本发明通过调整含甲基纤维素培养基的浓度和粘稠度，能够形成具备一定张力和胶凝性的球形液滴，倒置不易滴落，且不添加水凝胶等材料，更易于操作。其中，粘稠度为4000cp时，可增加液滴表面张力，有助于维持液滴球形形状。浓度为1.2％时，有助于悬滴形成后倒置培养时不掉落以及细胞聚集。

[0037]　特别的，本发明在细胞培养接种时，优选将内皮细胞和培养基接种于无菌培养皿皿盖中，翻转培养皿皿盖，盖到培养皿上的，这是发明人创造性的发现，这样培养时细胞由于重量作用，会在培养基液滴中聚集，而不会贴壁生长，从而即使采用普通的未经处理的器皿也能使细胞形成微组织球体，避免了使用高昂的商业化培养器皿。

[0038]　目前商业化的培养器皿，比如康宁球体微孔板(货号CLS4515-5EA，平均每块96孔

球体微孔板价格为427.956元，且需从国外调货，购买极为不便），而本方法采用的甲基纤维素培养基以及普通培养皿盖培养125个球体仅需要一个普通150mm培养皿（比如康宁，货号430599，平均价格25元）。可见，本发明方法显著的降低了细胞3D培养的成本。

[0039] 进一步的，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤a所述培养基的具体配制方法为：称取2.5～10g甲基纤维素，转移至已经加入磁力搅拌子的500ml广口瓶中，高温高压灭菌；加热250ml DMEM基础培养基到60℃，将培养基加入灭菌完毕的甲基纤维素中，室温下磁力搅拌20min；室温下加入250ml DMEM基础培养基，然后在4℃下磁力搅拌过夜；室温下5,000g离心2小时，上清备用。

[0040] 其中，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤b中的细胞浓度取决于所需微组织球体大小，内皮细胞数量可从500/球体到3000/球体，根据实际所需球体大小决定细胞数量。

[0041] 其中，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，步骤c所述的低粘附平面为普通无菌培养皿皿盖。

[0042] 其中，上述高效三维培养血管内皮细胞的方法中，为防止悬滴干涸，可在下面培养皿中加入少量PBS，形成湿盒。悬滴培养内皮细胞形成微组织球体后，可翻转皿盖在显微镜下观察球体，换液，转染，荧光标记等操作。

[0043] 本发明在培养时发现，悬滴中的内皮细胞从培养后4小时开始聚集，18小时到24小时即可形成微组织球体。本领域的技术人员公知，内皮细细胞出芽能力检测是衡量内皮细胞血管新生能力的重要指标，实验室经常进行检测以评估内皮细胞血管新生能力。本发明进一步的验证了采用上述方法培养的内皮细胞的出芽能力。

[0044] 收集内皮细胞微组织球体进行出芽实验：使用移液枪将微组织球体转移入基质胶包被的普通96孔板中（1个球体/孔），培养24h后在倒置显微镜下观察内皮细胞出芽式血管新生能力；或者使用5ml血清吸管吸取10ml磷酸盐缓冲液PBS冲洗悬滴，收集PBS冲洗液，转移至15ml离心管。200g转速离心5分钟。丢弃上清后加入6ml甲基纤维素-胶原蛋白培养基重悬微组织球体。甲基纤维素-胶原蛋白培养基配方：20％(v/v)FBS，0.5％(w/v)甲基纤维素，1.5mg/ml鼠尾I型胶原以及补足的DMEM培养基。然后接种到24孔板中进行培养（1ml/孔）。24小时后在倒置显微镜下观察内皮细胞出芽式血管新生能力。试验显示，本发明方法培养的内皮细胞出芽能力强，血管新生能力强。

[0045] 下面将通过实施例对本发明的具体实施方式做进一步的解释说明，但不表示将本发明的保护范围限制在实施例所述范围内。

[0046] 本发明所用的仪器及试剂，除实施例中明确给出的外，其余试剂均为普通市售产品。实验例中所采用的人心脏微血管内皮细胞和人脐静脉内皮细胞均为市售商业化产品。

[0047] 实施例1采用本发明方法获得内皮细胞微组织球体

[0048] 具体操作步骤如下：

[0049] a、配制1.2％甲基纤维素培养基储存液(w/v)：(1)称取6g甲基纤维素，转移至已经加入磁力搅拌子的500ml广口瓶中。采用高温高压灭菌锅灭菌。(2)加热250ml DMEM基础培养基到60℃，然后超净台中将培养基加入灭菌完毕的甲基纤维素中。室温搅拌20min。(3)室温下加入250ml DMEM基础培养基，然后在4℃下搅拌过夜。(4)将上述储存液分装到50ml离心管后，室温下5,000g离心2小时。使用上清进行内皮细胞3D培养。

[0050] 甲基纤维素培养基配制后需高速离心以去除杂质碎屑。否则，细胞可能会贴附到培养板上，形成多个小的微组织球体而非单个球体。甲基纤维素培养基储存液可以在4℃放置长达6个月。甲基纤维素是一种惰性的粘稠度调节物质，阻止细胞粘附。在球体形成过程中可通过控制甲基纤维素浓度的变化以调节形成球体的大小。

[0051] b、实验前一天将Matrigel基质在4℃过夜融化。注意：需要准备一些4℃预冷的枪头用于吸取Matrigel。开始实验前，将Matrigel始终保持放在冰盒中。Matrigel购于康宁公司，货号356234。

[0052] c、人心脏微血管内皮细胞培养至融合度90％，0.25％胰酶消化后进行细胞计数。调整细胞浓度为25,000/ml。

[0053] d、制备单细胞悬液：将100,000个细胞重悬在终体积为4ml的DMEM完全培养基中，加入1ml上述1.2％甲基纤维素培养基储存液，慢慢混合均匀，不要产生气泡。

[0054] e、接种细胞：将上述计数好的40μl细胞(800个内皮细胞)接种到普通150mm培养皿皿盖中，然后翻转培养皿盖，盖到培养皿上，即形成悬滴。放入37℃ 5％ CO_2培养箱中进行培养。需要掌握好细胞密度，如果接种体积超过50μl，在翻转培养皿盖过程中容易与周围悬滴融合或者悬滴容易掉落。注意在细胞成球过程中不要剧烈摇晃培养皿。

[0055] 试验中可见，悬滴中的内皮细胞从培养开始后4小时开始聚集，18小时到24小时即可形成微组织球体。用相差显微镜观察细胞成球情况。96孔板中每孔加入50μl Matrigel，注意不要产生气泡。然后放入37℃ 5％ CO_2培养箱中静置40min，等待胶凝结。

[0056] 将形成的细胞团吸出，置于凝固的胶平面上。培养24h后使用倒置显微镜采集出芽图像。

[0057] 实施例2用本发明方法获得内皮细胞微组织球体

[0058] 具体操作步骤如下：

[0059] a、配制2％甲基纤维素培养基储存液(w/v)：(1)称取10g甲基纤维素，转移至已经加入磁力搅拌子的500ml广口瓶中。采用高温高压灭菌锅灭菌。(2)加热250ml DMEM基础培养基到60℃，然后超净台中将培养基加入灭菌完毕的甲基纤维素中。室温搅拌20min。(3)室温下加入250ml DMEM基础培养基，然后在4℃下搅拌过夜。(4)将上述储存液分装到50ml离心管后，室温下5,000g离心2小时。使用上清进行内皮细胞3D培养。

[0060] b、人脐静脉内皮细胞培养至融合度80％，0.25％胰酶消化后进行细胞计数。调整细胞浓度为80,000/ml。

[0061] c、制备单细胞悬液：将80,000个细胞重悬在终体积为4ml的DMEM完全培养基中，加入1ml上述1.2％甲基纤维素培养基储存液，慢慢混合均匀，不要产生气泡。

[0062] d、接种细胞：将上述计数好的40μl细胞(640个内皮细胞)接种到普通60mm培养皿皿盖中。每个60mm普通培养皿接种20个，然后翻转培养皿盖，盖到培养皿上，即形成悬滴。放入37℃ 5％ CO_2培养箱中进行培养。注意在细胞成球过程中不要剧烈摇晃培养皿。5ml单细胞悬液可以接种6个60mm培养皿皿盖。

[0063] 试验中可见，18小时后形成微组织球体。可用相差显微镜观察细胞成球情况。

[0064] 使用5ml血清吸管吸取2ml磷酸盐缓冲液PBS冲洗培养皿盖中的悬滴，收集PBS冲洗液，转移至4ml离心管，一共收集6管。200g转速离心5分钟。丢弃上清。

[0065] 配制6ml甲基纤维素-胶原蛋白培养基：1.2ml FBS，2.5ml 1.2％(w/v)甲基纤维素

培养基，1.8ml I型鼠尾胶原，0.5ml DMEM基础培养基，混合均匀。每管微组织球体中加入1ml甲基纤维素-胶原蛋白培养基重悬，然后接种到24孔板后放入37℃ 5% CO2培养箱中静置(1ml/孔)。30min后在胶面上加入20ng/ml VEGF或不加入VEGF进行培养。24小时后在倒置显微镜下观察内皮细胞出芽式血管新生能力。

[0066] 实施例1和实施例2采用的高效3D培养模型如图1所示，均采用实验室使用的常规培养皿，可根据所需微组织球体数量选择相应大小的培养器皿，灵活简便；如图2所示，将含有内皮细胞的液滴接种到培养皿盖上，翻转培养皿盖形成悬滴；如图3所示，该培养体系也支持在显微镜下观察微组织球体形成过程；如图4所示，悬滴经过18小时培养后即可形成微组织球体。如图5和图6所示，实施例1的心脏微血管内皮细胞微组织球体在基质胶平面上进行出芽实验检测血管新生能力：微组织球体沉降到焦平面上，并逐渐出芽。实施例2的人脐静脉内皮细胞微组织球体包埋在甲基纤维素-胶原蛋白培养基中进行出芽式血管新生能力检测：微组织球体包埋在三维胶质中并逐渐出芽。

[0067] 由上述实施例可知，本发明提供了一种采用常规器皿对血管内皮细胞进行3D培养的方法，能够在18-24h培养得到内皮细胞微组织球体，培养效率高，成本低。培养的细胞容易出芽，血管新生能力与现有方法培养的相当。本发明方法成本低、操作简单，具有显著的经济效益。

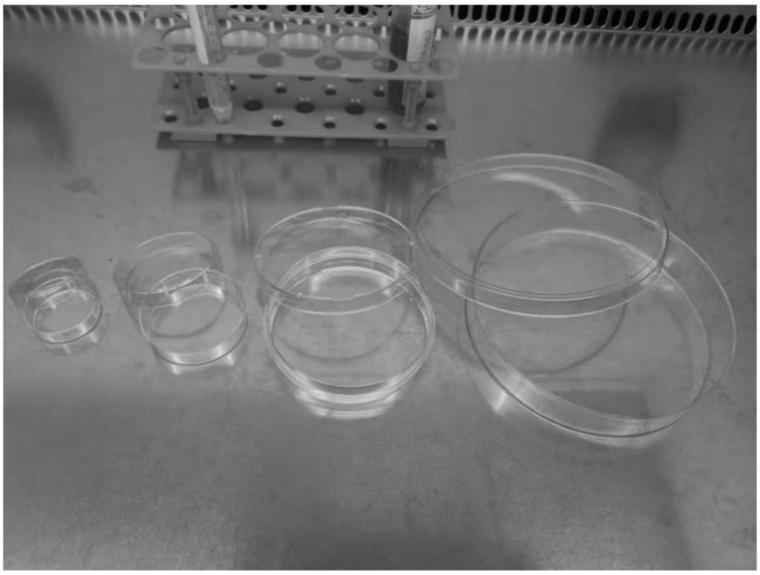


图1

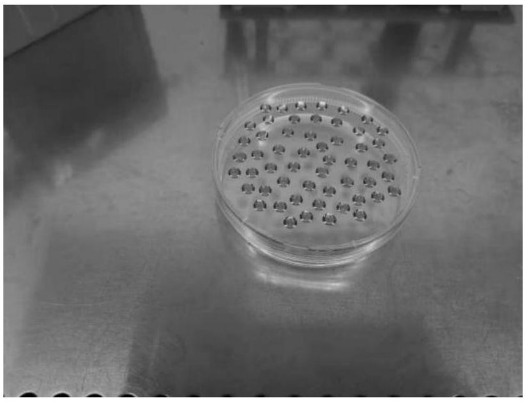


图2

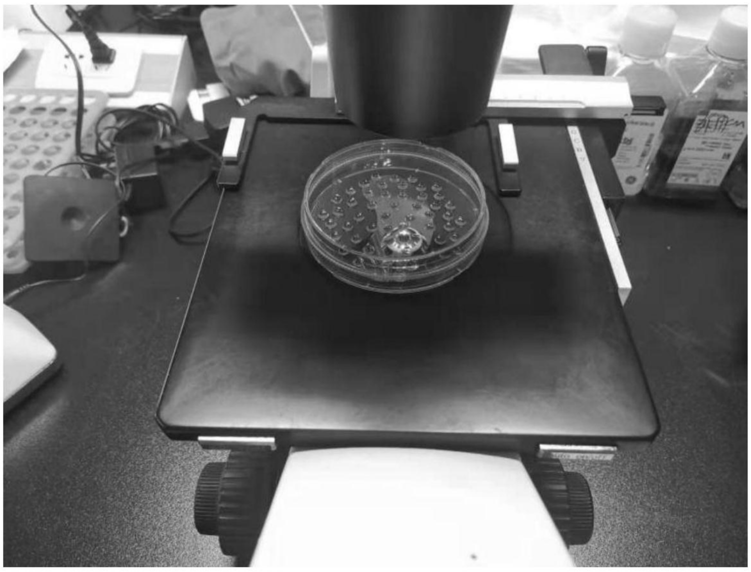


图3

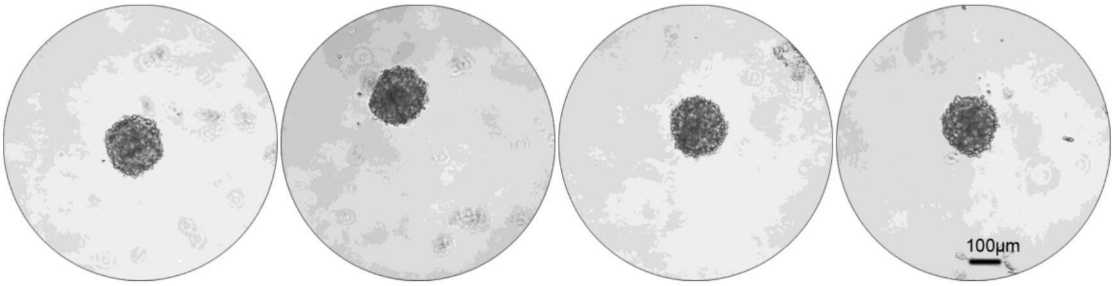


图4

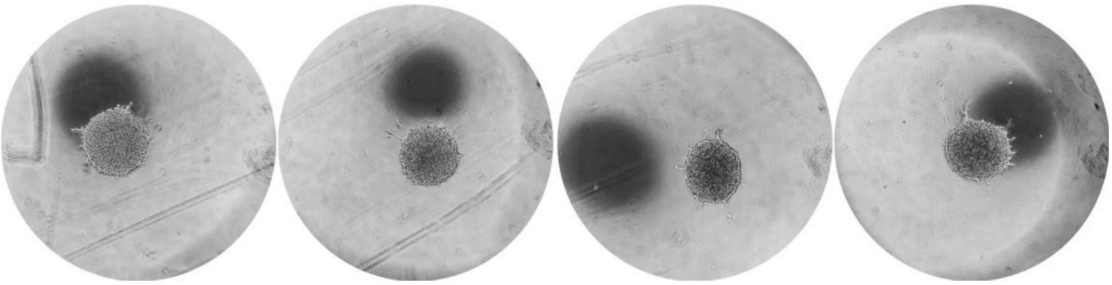


图5

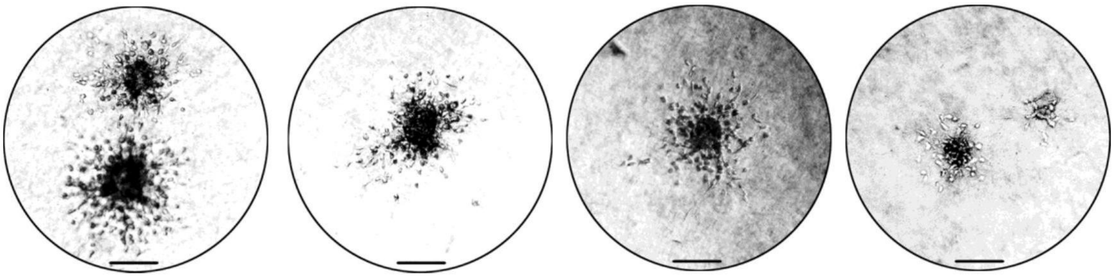


图6