



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112300996 B

(45) 授权公告日 2021.06.25

(21) 申请号 202011132036.7

C12N 5/079 (2010.01)

(22) 申请日 2020.10.21

审查员 张晓丹

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112300996 A

(43) 申请公布日 2021.02.02

(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开源大道11号C3栋601室

(72) 发明人 陈泽新 于言 徐丛 黄敏

(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 5/09 (2010.01)

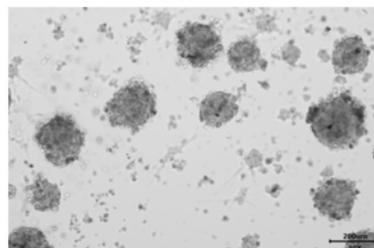
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种脑胶质瘤类器官的3D培养基及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种脑胶质瘤类器官的3D培养基及其应用,该培养基包括基础培养基和特异性添加因子;所述特异性添加因子包括以下终浓度的组分:B27添加剂,1-5%;Thiazovivin,1-10 μ M;L-Glutamine,0.05-0.2%;HGF,10-50ng/ml;Insulin,0.03-0.06%;FGF-2,10-50ng/ml;dorsomorphin,2-3 μ M;SB-431542,20-30 μ M;EGF,100-500ng/ml;HEPES,10-30mM;BSA,1~10%;Heparin,0.01-0.1%;人源NLGN3,50-200nM;双抗,0.5~5%;前述的百分浓度表示质量浓度。采用本发明的培养基培养脑胶质瘤类器官,使得脑胶质瘤组织细胞在培养过程中能够更好的表现出其固有的活性特征,实现高度近似于活体脑组织的综合特性。



1. 一种脑胶质瘤类器官的3D培养基,其特征在于:包括基础培养基和特异性添加因子;所述基础培养基为Neurocult NS-A培养基;所述特异性添加因子包括以下终浓度的组分: B27 添加剂,1-5%;Thiazovivin,1-10 μM ;L-Glutamine,0.05-0.2%;HGF,10-50ng/ml; Insulin,0.03-0.06%;FGF-2,10-50ng/ml;dorsomorphin,2-3 μM ;SB-431542,20-30 μM ; EGF,100-500ng/ml; HEPES,10-30mM;BSA,1~10%;Heparin,0.01-0.1%;人源NLGN3,50-200 nM;双抗,0.5~5%;前述的百分浓度表示质量浓度。

2. 根据权利要求1所述的一种脑胶质瘤类器官的3D培养基,其特征在于:所述培养基的制备方法为:将特异性添加因子加入到基础培养基中混合均匀既得。

3. 一种脑胶质瘤类器官的3D培养方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 将脑胶质瘤组织进行预处理后加入消化酶消化;

2) 消化完成后加入HBSS,并进行细胞过滤得到细胞悬液;

3) 将细胞悬液离心后去除上清,收获细胞沉淀;

4) 用Neurocult NS-A基础培养基重悬细胞沉淀,并用三倍体积的matrigel胶混匀并接种,待混合胶凝固后加入权利要求1或2所述的培养基,并于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 浓度下培养8-21天,既得。

4. 根据权利要求3所述的一种脑胶质瘤类器官的3D培养方法,其特征在于:所述步骤1)中消化过程的条件控制为:采用胶原酶,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、200-300rpm震荡消化20-30min。

5. 根据权利要求3所述的一种脑胶质瘤类器官的3D培养方法,其特征在于:所述步骤4)中接种过程的参数控制为:细胞浓度为 $(5-8) \times 10^4$ cell/每30 μl ,30 μl 每滴接种在培养皿中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%的 CO_2 条件下放置。

一种脑胶质瘤类器官的3D培养基及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种脑胶质瘤类器官的3D培养基及其应用。

背景技术

[0002] 脑胶质瘤是一种常见的中枢神经系统恶性肿瘤,约占颅内肿瘤的40%-50%,多以浸润性生长方式生长,与周围脑组织分界不清,手术完全切除难度的,术后易复发;一般来说肿瘤级别越高,其恶性程度越高,术后复发越快。目前对脑胶质瘤的治疗主要以手术切除、术后联合放化疗为主,但预后不佳。近年来,对胶质瘤的治疗并未取得突破性进展。

[0003] 然而,目前在全世界范围,用于药物开发和基础研究的体外脑胶质瘤体外模型屈指可数,同临床上数量众多的脑胶质瘤患者急切需求相比,适用的脑胶质瘤体外模型稀缺的问题严重地制约了临床前研究。

[0004] 现有的脑胶质瘤体外研究技术主要是普通的2D细胞培养技术,在二维培养过程中,获得的这种模型缺乏细胞-细胞、细胞-细胞基质间的相互作用来保持在原位的表型,从而无法组织功能及相关的信号途径。脑胶组织细胞难以或不能充分表达出脑胶质瘤组织的特性,使得培养的脑胶质瘤组织细胞和活体的脑胶质瘤组织细胞有所差异,不利于研究的进行。

[0005] 类器官(Organoid)研究是极重要的前沿性热点领域,是一种最新的细胞体外培养技术,即由干细胞定向诱导分化细胞、正常组织细胞或者病人发病组织细胞培养而形成的三维体外组织培养技术。类器官模型能够很好地模拟细胞在体内的微环境,对在体外构建具有生理功能的研究模型具有得天独厚的优势。目前,尽管利用类器官培养已经在体外成功构建了结肠、胃、前列腺和胰腺等组织的类器官,但在脑胶质瘤中应用手术切除的脑胶质瘤组织进行类器官培养的鲜有报道。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明旨在提供一种脑胶质瘤类器官的3D培养基及其应用以解决上述问题。本发明的技术方案为:

[0007] 第一个方面,本发明提供一种脑胶质瘤类器官的3D培养基,包括基础培养基和特异性添加因子;所述特异性添加因子包括以下终浓度的组分:B27添加剂,1-5%;Thiazovivin,1-10 μ M;L-Glutamine,0.05-0.2%;HGF,10-50ng/ml;Insulin,0.03-0.06%;FGF-2,10-50ng/ml;dorsomorphin,2-3 μ M;SB-431542,20-30 μ M;EGF,100-500ng/ml;HEPES,10-30mM;BSA,1~10%;Heparin,0.01-0.1%;人源NLGN3,50-200nM;双抗,0.5~5%;前述的百分浓度表示质量浓度。

[0008] 进一步地,所述基础培养基为Neurocult NS-A。

[0009] 进一步地,所述培养基的制备方法为:将特异性添加因子加入到基础培养基中混合均匀既得。

- [0010] 第二个方面,本发明提供一种脑胶质瘤类器官的3D培养方法,包括以下步骤:
- [0011] 1) 将脑胶质瘤组织进行预处理后加入消化酶消化;
- [0012] 2) 消化完成后加入HBSS,并进行细胞过滤得到细胞悬液;
- [0013] 3) 将细胞悬液离心后去除上清,收获细胞沉淀;
- [0014] 4) 用Neurocult NS-A基础培养基重悬细胞沉淀,并用三倍体积的matrigel胶混匀并接种,待混合胶凝固后加入上述培养基,并于37℃、5%CO₂浓度下培养8-21天,既得。
- [0015] 进一步地,所述步骤1)中消化过程的条件控制为:采用胶原酶,于37、℃200-300rpm震荡消化20-30min。
- [0016] 进一步地,所述步骤4)中接种过程的参数控制为:细胞浓度为(5-8) × 10⁴ cell/每30μl,30μl每滴接种在培养皿中,于37、℃5%的CO₂条件下放置。
- [0017] 第三个方面,本发明提供一种脑胶质瘤类器官,是采用上述培养方法获得。
- [0018] 本发明的有益效果是:
- [0019] 本发明的脑胶质瘤类器官培养基中添加了多种细胞因子和信号通路调控因子,各种细胞因子及调控因子相互直接密切影响,协调配合,使得脑胶质瘤组织细胞在培养过程中能够更好的表现出其固有的活性特征,实现高度近似于活体脑组织的综合特性。此外,本发明的培养基配方,在避免脑胶质瘤类器官缺氧损伤的同时,可促进肿瘤细胞的成团生长,且增殖速度明显加快。

附图说明

- [0020] 图1为本发明实施例4中人脑胶质瘤类器官光学显微镜图。
- [0021] 图2为本发明实施例5中人脑胶质瘤类器官形态鉴定图。
- [0022] 图3为本发明对比例1中人脑胶质瘤类器官光学显微镜图。
- [0023] 图4为本发明对比例2中人脑胶质瘤类器官光学显微镜图。
- [0024] 图5为本发明对比例3中人脑胶质瘤类器官光学显微镜图。
- [0025] 图6为本发明对比例4中人脑胶质瘤类器官光学显微镜图。
- [0026] 图7为本发明实施例6中人脑胶质瘤类器官光学显微镜图。
- [0027] 图8为本发明实施例7中人脑胶质瘤类器官光学显微镜图。
- [0028] 图9为本发明对比例5中人垂体瘤类器官光学显微镜图。

具体实施方式

- [0029] 本发明实施例采用的B27添加剂购自GIBCO公司,即B27补充剂。
- [0030] 本发明实施例采用的Thiazovivin购自MCE。
- [0031] 本发明实施例采用的L-Glutamine购自Gibco公司。
- [0032] 本发明实施例采用的HGF购自R&D公司。
- [0033] 本发明实施例采用的Insulin购自Beyotime。
- [0034] 本发明实施例采用的FGF-2购自R&D公司。
- [0035] 本发明实施例采用的dorsomorphin购自MCE。
- [0036] 本发明实施例采用的SB-431542购自SB-431542。
- [0037] 本发明实施例采用的EGF购自R&D公司。

[0038] 本发明实施例采用的HEPES购自Sigma。

[0039] 本发明实施例采用的BSA购自Sigma。

[0040] 本发明实施例采用的Heparin购自Trevigen。

[0041] 本发明实施例采用的人源NLGN3购自Acro biosystems。

[0042] 本发明实施例采用的双抗购自Gibco公司。

[0043] 本发明实施例采用的Neurocult NS-A培养基购自stem cell公司。

[0044] 此外,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。

[0045] 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。

[0046] 实施例1

[0047] 本实施例提供一种脑胶质瘤类器官培养基,包括Neurocult NS-A基础培养基和特异性添加因子;所述特异性添加因子包括以下终浓度的组分:B27添加剂,2%;Thiazovivin,5 μ M;L-Glutamine,0.1%;HGF,25ng/ml;Insulin,0.05%;FGF-2,30ng/ml;dorsomorphin,2.5 μ M;SB-431542,25 μ M;EGF,250ng/ml;BSA 5%;HEPES,20mM;Heparin,0.05%;人源NLGN3,100nM;双抗,1%;前述的百分浓度表示质量浓度。该培养基的制备方法为:根据前述的培养基组成配料,将特异性添加因子加入到基础培养基中混合均匀即得。

[0048] 实施例2

[0049] 本实施例提供一种脑胶质瘤类器官培养基,包括Neurocult NS-A基础培养基和特异性添加因子;所述特异性添加因子包括以下终浓度的组分:B27添加剂,1%;Thiazovivin,10 μ M;L-Glutamine,0.05%;HGF,50ng/ml;Insulin,0.06%;FGF-2,10ng/ml;dorsomorphin,3 μ M;SB-431542,20 μ M;EGF,500ng/ml;HEPES,30mM;BSA 2%;Heparin,0.01%;人源NLGN3,200nM;双抗,0.5%;前述的百分浓度表示质量浓度。该培养基的制备方法同实施例1。

[0050] 实施例3

[0051] 本实施例提供一种脑胶质瘤类器官培养基,包括Neurocult NS-A基础培养基和特异性添加因子;所述特异性添加因子包括以下终浓度的组分:B27添加剂,5%;Thiazovivin,1 μ M;L-Glutamine,0.2%;HGF,10ng/ml;Insulin,0.03%;FGF-2,50ng/ml;dorsomorphin,2 μ M;SB-431542,30 μ M;EGF,100ng/ml;HEPES,10mM;BSA 9%;Heparin,0.1%;人源NLGN3,50nM;双抗,5%;前述的百分浓度表示质量浓度。该培养基的制备方法同实施例1。

[0052] 实施例4

[0053] 本实施例提供一种人脑胶质瘤类器官的培养方法,是采用实施例1的培养基,包括:

[0054] 1) 取脑胶质瘤组织清洗后,置于冰上用眼科剪刀剪碎。

[0055] 2) 加入10ml胶原酶重悬组织,转移至37 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中消化20min,期间应每隔3分钟上下颠倒摇晃几次,离心,去除上清。

[0056] 3) 用HBSS重悬沉淀,70 μ m细胞筛网过滤消化后的组织悬液,1200rpm,离心5min。

[0057] 4) 用Neurocult NS-A基础培养基重悬细胞沉淀,并用三倍体积的matrigel胶混合,配制 $(5-8) \times 10^4$ cell/每30 μ l的细胞浓度,30 μ l每滴接种在培养皿中。置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂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,即得人脑胶质瘤类器官,图1为人脑胶质瘤类器官普通光学显微镜下的图片。

[0058] 实施例5

[0059] 实施例4获得的人脑胶质瘤类器官形态鉴定

[0060] 将实施例4获得的人脑胶质瘤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:

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 4) 包埋切片:用包埋模具包类器官,然后切片机切成4-6 μ m的切片贴于防脱载玻片。

[0065] 5) 烤片:将载玻片放置在玻片架上,放入烘箱中,65 $^{\circ}$ C,30min,将载玻片上的水分烤干、石蜡烤融即可。

[0066] 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。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 9) 透明及封固:使用二甲苯透明2min,取出晾干后用中性树脂封固。

[0070] 10) 在普通光学显微镜下观察组织形态结构,如图2所示,表明所获得的类器官具有良好的组织形态。

[0071] 实施例6

[0072] 本实施例提供一种人脑胶质瘤类器官的培养方法,是采用实施例2的培养基及实施例4中的培养方法,但培养21天,即得人脑胶质瘤类器官,图7为人脑胶质瘤类器官普通光学显微镜下的图片。

[0073] 实施例7

[0074] 本实施例提供一种人脑胶质瘤类器官的培养方法,是采用实施例3的培养基,实施例4中的培养方法,但培养8天,即得人脑胶质瘤类器官,图8为人脑胶质瘤类器官普通光学显微镜下的图片。

[0075] 对比例1

[0076] 本对比例提供一种脑胶质瘤类器官培养基,该培养基与实施例1的区别在于:采用的基础培养基为DMEM培养基,其他同实施例1。

[0077] 使用上述培养基按照实施例4方法进行人脑胶质瘤类器官培养,培养时间为14天,如图3所示,并且和采用实施例4的方法培养14天获得的类器官(如图1)进行比较,结果表

明:本发明采用Neurocult NS-A配制的培养基下人脑胶质瘤类器官生长状况良好,类器官生长速度较快且形成直径较大。

[0078] 对比例2

[0079] 本对比例提供的培养基中减去Thiazovivin因子,其他同实施例1。

[0080] 使用上述培养基按照实施例4方法进行人脑胶质瘤类器官培养,培养时间为14天,并且和采用实施例4的方法培养14天获得的类器官进行比较,如图4所示,结果为:本发明培养基下人脑胶质瘤类器官生长状况良好,生长速度较快,减去Thiazovivin因子后,细胞团连接松散活性较差,内部脱落坏死细胞增多。14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4。使用实施例4培养得到的类器官细胞数量多且活细胞比例高,说明Thiazovivin因子可抑制细胞凋亡,促进细胞存活,更适宜人脑胶质瘤类器官的生长。实施例1和对比例2的培养基获得的类器官的细胞数量比较情况如表1所示。

[0081] 表1

对比项	活细胞数量	细胞总数	活细胞比例
实施例1	2.86×10^7	3.54×10^7	80.79%
对比例2	3.93×10^6	8.32×10^6	47.24%

[0083] 对比例3

[0084] 本对比例提供的培养基中减去dorsomorphin因子,其他同实施例1。

[0085] 分别使用实施例1和本对比例的培养基按照实施例4方法进行人脑胶质瘤类器官培养,培养时间为12天,如图5所示,结果为:本发明培养基下人脑胶质瘤类器官生长状况良好,类器官内部连接紧密且多为规则的圆球状,减去dorsomorphin因子后,形成细胞团较为松散,多为单个细胞的聚集。

[0086] 对比例4

[0087] 本对比例提供的培养基中减去人源NLGN3因子,其他同实施例1。

[0088] 分别使用实施例1和本对比例的培养基按照实施例4方法进行人脑胶质瘤类器官培养,培养时间为21天,如图6所示,结果为:本发明培养基下人脑胶质瘤类器官生长状况良好,细胞间相互作用较好,类器官生长情况维持较好,减去Thiazovivin因子后,类器官活性较差,腔体尺寸显著减小。

[0089] 对比例5

[0090] 将实施例1的培养基用于垂体瘤类器官的培养,按照实施例4的方法进行人垂体瘤类器官的培养,培养时间为14天,如图9所示,结果为:本发明培养基用于培养人垂体瘤类器官时生长状况较差,多为较小细胞团,无法形成直径大于50um的类器官结构。

[0091] 综上,本发明的人脑胶质瘤类器官培养基可显著提高人脑胶质瘤类器官的培养成功率,形成与患者来源胶质瘤接近的肿瘤;培养基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),节约成本的同时降低了FBS中带来的细胞毒性。本发明培养基中含有的小分子化合物可以有效抑制体外脑胶质瘤细胞的凋亡,促进细胞存活的同时增强了胶质瘤类器官的体外连接,形成类器官间的脉络丛类似体内脑细胞的连接,最大程度上模拟了胶质瘤的组织学与形态学,此外,本发明的培养基及培养方法形成的脑胶质瘤类器官有望成为用于体外原代人脑胶质瘤的建模和高通量药物筛选的有力工具。

[0092] 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,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

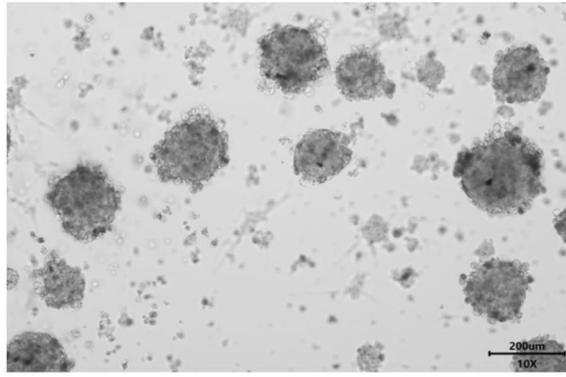


图1

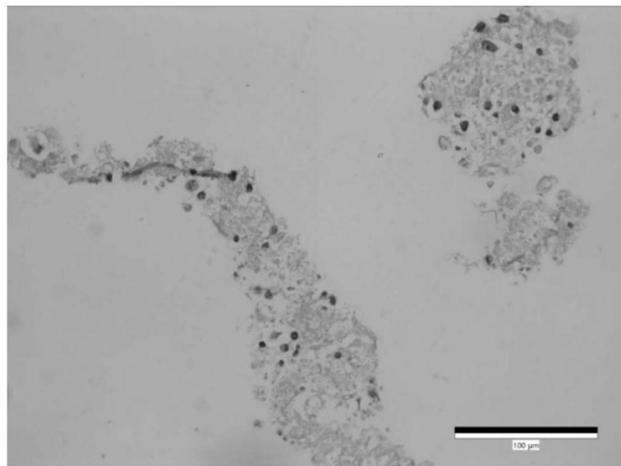


图2

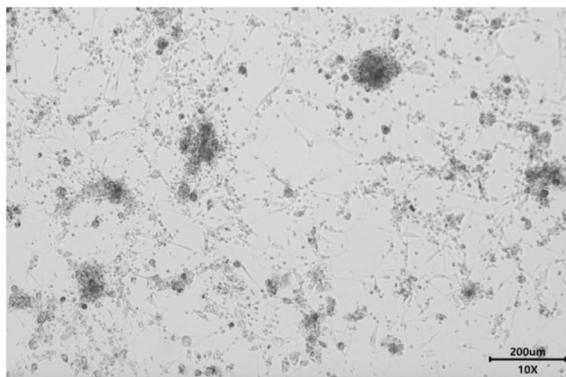


图3

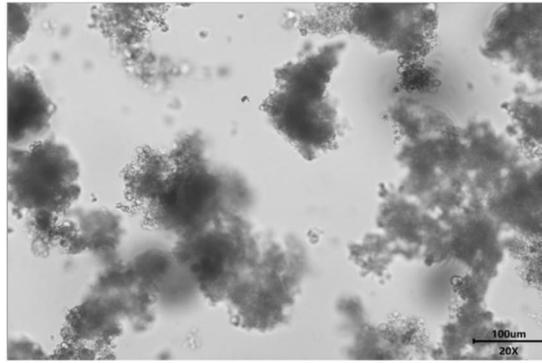


图4

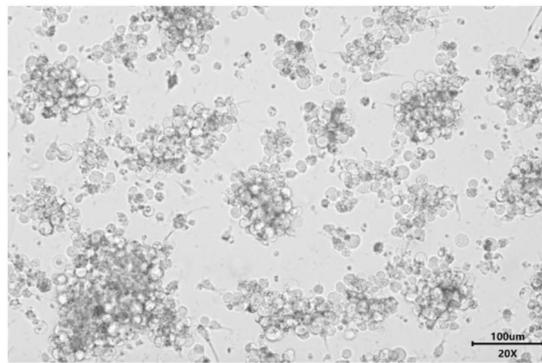


图5

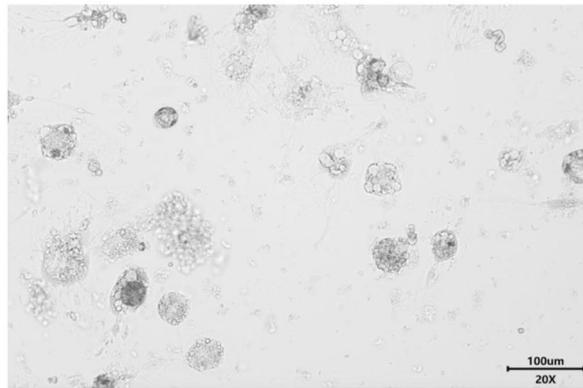


图6

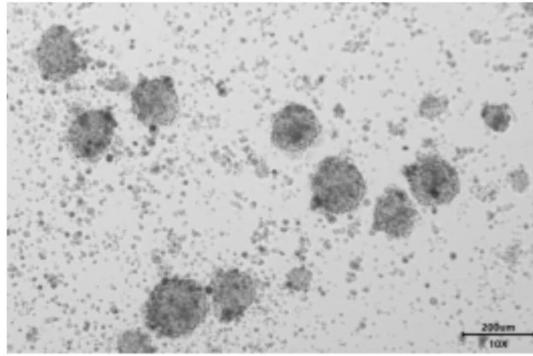


图7

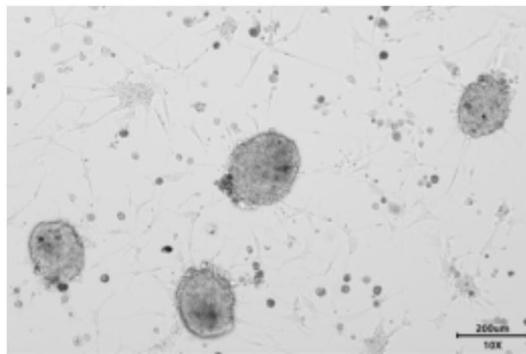


图8

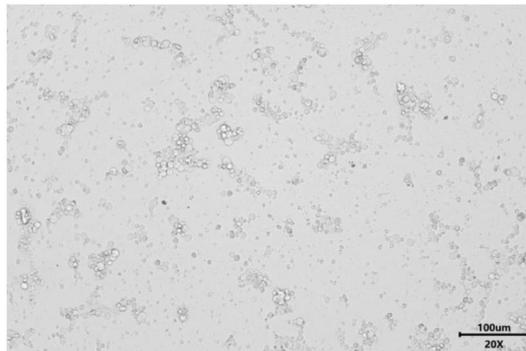


图9