



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116490603 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 25

(21) 申请号 202180080345.0

(22) 申请日 2021.12.06

(30) 优先权数据

63/121,684 2020.12.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/072762 2021.12.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/120391 EN 2022.06.09

(71) 申请人 宾夕法尼亚大学理事会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 胡东恩 晟希·埃斯特尔·朴

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

专利代理师 辛怡 杨青

(51) Int.Cl.

C12M 3/00 (2006.01)

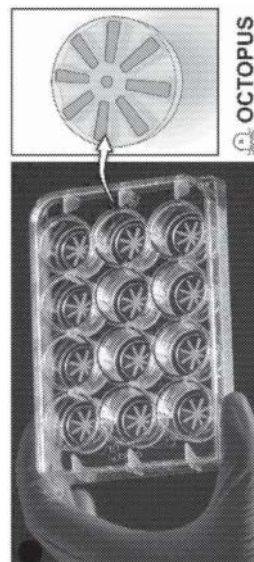
权利要求书2页 说明书32页 附图93页

(54) 发明名称

在培养皿中增强器官发生的类器官培养工程

(57) 摘要

本公开的主题提供了培养类器官或细胞的技术。一种用于培养类器官的装置可以包括：被构造成接收溶液的进入孔；加载室，其中进入孔位于加载室中；以及多个培养室，其中培养室从加载室放射状伸出，使得经由进入孔被注入加载室中的溶液被分配到多个培养室中，其中该多个培养室对外部环境开放并且在该多个培养室的开口处包括突起边缘。



1. 一种用于培养类器官的装置,所述装置包括:
被构造成接收溶液的进入孔;
加载室,其中所述进入孔位于所述加载室中;和
多个培养室,其中所述培养室从所述加载室放射状伸出,使得经由所述进入孔被注入所述加载室中的溶液被分配到所述多个培养室中,其中所述多个培养室对外部环境开放并且在所述多个培养室的开口处包括突起边缘。
2. 根据权利要求1所述的装置,其中所述装置包含聚二甲基硅氧烷。
3. 根据权利要求1所述的装置,其中所述装置是光学透明的。
4. 根据权利要求1所述的装置,其中所述进入孔位于所述加载室的中央。
5. 根据权利要求4所述的装置,其中所述多个培养室相对于绕所述进入孔的周圈而言是对称的。
6. 根据权利要求5所述的装置,其中经由所述进入孔被注入所述加载室中的溶液被均匀地分配到所述多个培养室中。
7. 根据权利要求1所述的装置,其中所述装置被构造成经由所述多个培养室的开口来接触来自外部环境的培养基。
8. 根据权利要求1所述的装置,其中所述溶液是水凝胶溶液。
9. 根据权利要求1所述的装置,其中所述水凝胶溶液包含细胞或类器官。
10. 根据权利要求1所述的装置,其中所述类器官是人类类器官。
11. 根据权利要求1所述的装置,其中所述培养室中每一个的宽度或高度为约100 μm 至约5cm。
12. 根据权利要求11所述的装置,其中所述培养室中每一个的宽度和高度为约1cm。
13. 根据权利要求1所述的装置,其中在培养第21天时,所述培养室中至少约80%的所述类器官是存活的。
14. 根据权利要求1所述的装置,其中所述突起边缘被构造成在所述培养室的开口处牵制所述溶液的弯月面,从而允许填充所述培养室而所述溶液不经由所述开口溢出。
15. 根据权利要求1所述的装置,其中每个培养室包含用于共培养的不同类型的细胞或类器官。
16. 根据权利要求1所述的装置,其中所述类器官的生长持续至少约21天。
17. 根据权利要求1所述的装置,其中所述类器官的尺寸增长至少约21天。
18. 根据权利要求17所述的装置,其中所述装置降低所述类器官尺寸的变异性。
19. 一种用于培养类器官的方法,所述方法包括:
将包含细胞或类器官的溶液经由进入孔注入加载室中;
用所述包含细胞或类器官的溶液填充多个培养室,其中所述培养室从所述加载室放射状伸出,使得被注入所述加载室中的溶液被分配到所述多个培养室中,其中所述多个培养室对外部环境开放并且包括在所述培养室的开口处的突起边缘以防止所述溶液经由所述开口溢出;以及
经由所述多个培养室的开口向所述装置提供培养基。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述进入孔位于所述加载室的中央。
21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述多个培养室相对于绕所述进入孔的周圈而

言是对称的。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中经由所述进入孔被注入所述加载室中的溶液被均匀地分配到所述多个培养室中。

23. 根据权利要求19所述的方法,其中所述溶液是水凝胶溶液。

24. 根据权利要求19所述的方法,其中所述类器官是人类类器官。

25. 根据权利要求23所述的方法,其中所述水凝胶溶液在被注入所述加载室中并被分配到所述多个培养室中后,在所述多个培养室中凝固而形成水凝胶。

26. 根据权利要求19所述的方法,其中在培养第21天时,所述培养室中至少约80%的所述类器官是存活的。

27. 根据权利要求19所述的方法,其中每个培养室包含用于共培养的不同类型的细胞或类器官。

28. 根据权利要求19所述的方法,其中所述类器官的生长持续至少约21天。

29. 根据权利要求19所述的方法,其中所述类器官的尺寸增长至少约21天。

30. 根据权利要求17所述的方法,其中所述装置降低所述类器官尺寸的变异性。

31. 根据权利要求19所述的方法,其中所述培养基包含可溶性因子。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述可溶性因子选自生长因子、活性剂及其组合。

33. 根据权利要求19所述的方法,其还包括使所述类器官成熟。

34. 根据权利要求19所述的方法,其还包括评估所述多个培养室中所述类器官的生存力和成熟度。

在培养皿中增强器官发生的类器官培养工程

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年12月4日提交的美国专利申请No.63/121,684的权益,所述美国专利申请的内容在此通过引用整体并入。

[0003] 关于联邦资助的研究的声明

[0004] 这项发明是在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的HL127720和美国国家科学基金会(National Science Foundation)授予的1548571的政府支持下做出的。美国政府在本发明中有一定的权利。

[0005] 技术领域和背景技术

[0006] 类器官可以用于在体外模拟组织和器官发育的复杂过程。三维(3D)培养中的干细胞可以产生自组织的多细胞结构,称为类器官,其可以类似于它们所源自的器官的解剖和功能单元。由于类器官可以在体外细胞培养的便利下重演体内生理系统的复杂性,因此它们可以用于为生物医学和药学应用模拟各种成体器官的健康和/或疾病状态。

[0007] 为了提供类器官培养的3D环境,某些技术需要将干细胞包埋在由溶解的基底膜提取物制备的细胞外基质(ECM)水凝胶(例如基质胶(Matrigel))的座滴中。当供给的培养基含有容许恰当的细胞生长并定向分化成器官特异性谱系的特定可溶性因子时,所述3D环境可以诱导分化性细胞分隔到不同的域中并经历命运特化(fate specification),导致它们自发组织成器官样结构。尽管它具有实用性和多用性,然而,由于类器官的寿命有限,这些技术可能会受到限制。在典型的设定中,包埋在ECM水凝胶中的正在发育的类器官依靠被动扩散来供应养分和清除废物。这种传输方式在类器官发育的初始阶段通过水凝胶支架来有效支持类器官。然而,随着类器官生长和对新陈代谢的要求变得越来越高,养分和氧向3D支架内部区域中的扩散有限,致使类器官的生存力逐渐显著降低,导致坏死核心形成。这种退化过程发生的速度根据类器官的类型而异,但在大多数情况下,使用ECM水凝胶培养的10天之内,大量细胞死亡变得明显。某些培养技术可以通过每5-7天对类器官进行传代来避免细胞死亡。然而,每个周期如此短的持续时间可能中断类器官的长时间连续培养,而长时间连续培养是它们持续发育和成熟为类似体内的组织构造所必需的。

[0008] 为了解决这个问题,研究人员使用生物反应器来改善类器官的3D培养中氧和养分的扩散传输。最近对脑类器官的工作表明,这种方式已被证明有助于建立长期培养以促进类器官的持续发育和成熟度提高。然而,在常规实验室环境中实施这项技术需要担负机械上复杂的资本设备并且要求专门的操作和维护知识。另一个缺点是类器官是在生物反应器中悬浮培养的,这使得在培养期间监测它们的生长发育具有挑战性。虽然已经提出类器官的血管化作为改善养分供应的替代策略,但具有受控的血管灌注的类器官模型的生成过程复杂得令人生畏,经常需要先进的体外系统和专门的技术,而这些是非工程师不易理解的。

[0009] 因此,需要能够用于长时间不间断和连续培养类器官的改进的技术。

发明内容

[0010] 本公开的主题提供了培养类器官和/或细胞的技术。培养类器官的示例性装置可

以包括被构造成接收溶液的进入孔、加载室和多个培养室。在非限制性实施方式中,所述进入孔可以位于所述加载室的中央。在一些实施方式中,所述培养室可以从所述加载室放射状伸出,使得经由所述进入孔被注入所述加载室中的溶液可以均匀地分配到所述培养室中。在非限制性实施方式中,所述培养室可以对外部环境开放,并且在所述培养室的开口处包括突起边缘。

[0011] 在某些实施方式中,所述装置可以包含聚二甲基硅氧烷。在非限制性实施方式中,所述装置可以是光学透明的。

[0012] 在某些实施方式中,所述溶液可以是水凝胶溶液。在非限制性实施方式中,所述水凝胶溶液可以包含细胞和/或类器官。在一些实施方式中,所述类器官可以是人类类器官。在非限制性实施方式中,每个培养室可以包含不同类型的细胞或类器官用于共培养。在一些实施方式中,在培养的第21天时,所述培养室中至少约80%的类器官可以是存活的。在非限制性实施方式中,类器官的生长可以持续至少21天。在一些实施方式中,类器官的尺寸可以增长至少21天。在某些实施方式中,所述装置可以降低类器官尺寸的变异性。

[0013] 在某些实施方式中,每个培养室的宽度和高度可以为约100 μ m至约5cm。在非限制性实施方式中,所述突起边缘可以被构造成在所述培养室的开口处牵制溶液的弯月面,以填充整个培养室而不会使溶液通过开放顶端溢出。

[0014] 本公开的主题还提供了培养类器官的方法。一种示例性方法可以包括:将包含类器官的水凝胶前体溶液经由进入孔注入加载室中,用所述包含类器官的水凝胶前体溶液填充多个培养室,在所述多个培养室中凝固所述水凝胶前体溶液以形成水凝胶,以及经由开放顶端提供与所述水凝胶接触的培养基。在非限制性实施方式中,所述进入孔可以位于所述加载室的中央。在一些实施方式中,所述培养室可以从所述加载室放射状伸出,使得被注入所述加载室中的所述水凝胶前体溶液可以均匀地分配到所述培养室中。在非限制性实施方式中,所述培养室可以对外部环境开放,并且在所述培养室的开口处包括突起边缘,用于防止所述水凝胶前体溶液经由所述开放顶端溢出。

[0015] 在某些实施方式中,所述培养基包含可溶性因子。在非限制性实施方式中,所述可溶性因子可以包括生长因子、活性剂或其组合。

[0016] 在某些实施方式中,所述方法还可以包括使所述类器官成熟。在非限制性实施方式中,所述方法还可以包括评估所述多个培养室中类器官的生存力和成熟度。所述多个培养室可以是透明的。在一些实施方式中,所述类器官可以是人类类器官。

[0017] 根据一个实施方式,本公开涉及一种用于培养类器官的装置,所述装置包括:被构造成接收溶液的进入孔;加载室,其中所述进入孔位于所述加载室中;以及多个培养室,其中所述培养室从所述加载室放射状伸出,使得经由所述进入孔被注入所述加载室中的溶液被分配到所述多个培养室中,其中所述多个培养室对外部环境开放并且包括在所述多个培养室的开口处的突起边缘。

[0018] 在一个实施方式中,所述装置包含聚二甲基硅氧烷。在一个实施方式中,所述装置是光学透明的。在一个实施方式中,所述进入孔位于所述加载室的中央。在一个实施方式中,所述多个培养室相对于绕所述进入孔的周圈而言是对称的。在一个实施方式中,经由所述进入孔被注入所述加载室中的溶液均匀地分配到所述多个培养室中。在一个实施方式中,所述装置被构造成经由所述多个培养室的开口来接触来自外部环境的培养基。在一个

实施方式中,所述溶液是水凝胶溶液。在一个实施方式中,所述水凝胶溶液包含细胞或类器官。在一个实施方式中,所述类器官是人类类器官。在一个实施方式中,每个培养室的宽度或高度为约100 μm 至约5cm。在一个实施方式中,每个培养室的宽度和高度为约1cm。在一个实施方式中,在培养的第21天时,所述培养室中至少约80%的类器官是存活的。在一个实施方式中,所述突起边缘被构造成在所述培养室的开口处牵制溶液的弯月面,从而允许填充所述培养室而所述溶液不经由所述开口溢出。在一个实施方式中,每个培养室包含用于共培养的不同类型的细胞或类器官。在一个实施方式中,所述类器官的生长持续至少约21天。在一个实施方式中,所述类器官的尺寸增长至少约21天。在一个实施方式中,所述装置降低了类器官尺寸的变异性。

[0019] 根据一个实施方式,本公开涉及一种用于培养类器官的方法,所述方法包括:将包含细胞或类器官的溶液经由进入孔注入加载室中,用所述包含细胞或类器官的溶液填充多个培养室,其中所述培养室从所述加载室放射状伸出,使得被注入所述加载室中的溶液被分配到所述多个培养室中,其中所述多个培养室对外部环境开放并且包括在所述培养室的开口处的突起边缘以防止溶液经由所述开口溢出,以及经由所述多个培养室的开口向所述装置提供培养基。

[0020] 在一个实施方式中,所述培养基包含可溶性因子。在一个实施方式中,所述可溶性因子选自生长因子、活性剂及其组合。在一个实施方式中,所述方法还包括使所述类器官成熟。在一个实施方式中,所述方法还包括评估所述多个培养室中类器官的生存力和成熟度。

[0021] 下面将进一步描述本公开的主题。

附图说明

[0022] 图1A-1G提供了根据本公开的主题的用于培养类器官的示例性系统的照片和图解。图1B-1D的显微照片的比例尺为500 μm 。图1F的上部图像的比例尺为5mm,图1F的下部图像的比例尺为3mm。

[0023] 图2A-2S提供了显示根据本公开的主题使用所公开的系统长期培养肠类器官的图形和共焦图像。图2A-2C、2F、2G和2K的比例尺为100 μm 。

[0024] 图3A-3O提供了显示根据本公开的主题的肠类器官成熟的图形和共焦图像。图3C、3D和3J的比例尺为100 μm 。图3I、3L和3M的比例尺为10 μm 。

[0025] 图4A-4K提供了显示根据本公开的主题在所公开的系统中的肠类器官功能特征化的图形和图像。图4E-4F的比例尺为100 μm 。

[0026] 图5A-5G提供了显示根据本公开的主题在所公开的系统中的共培养的图形和图像。图5A和图5C以及图5D的左侧的比例尺为5mm。

[0027] 图6A-6R提供了显示根据本公开的主题的用于药物测试的示例性肠纤维化模型的图形和图像。

[0028] 图7提供了显示根据本公开的主题的所公开的系统示例性制造的图解。

[0029] 图8提供了显示根据本公开的主题,水凝胶培养系统和所公开的系统之间的芽长度(bud length)比较的图解和共焦图像。

[0030] 图9提供了显示根据本公开的主题在所公开的系统中的肠类器官的细胞组成的图形。

[0031] 图10提供了显示根据本公开的主题在所公开的系统中心类器官连续生长的共焦图像。图10的比例尺为200 μm 。

[0032] 图11A-11C提供了显示根据本公开的主题使用所公开的系统进行人类肠类器官培养的图解和图像。

[0033] 图12A-12Q提供了显示根据本公开的主题使用所公开的系统延长培养人类肠类器官的图解和图像。图12A-在OCTOPUS和基质胶滴中培养5天的源自于成人肠干细胞的人类类肠(enteroids)。比例尺,100 μm 。图12B和图12C-在14天培养期间,OCTOPUS中的类肠变大并发育出隐窝/绒毛样结构(上图),这与基质胶滴培养中的生长停滞和生存力下降(下图)形成对比。比例尺,100 μm 。图12D和图12E-类器官生存力(12D)和尺寸(12E)的量化。图12F和图12G-第7天(12D)和第14天(12E)时在OCTOPUS和基质胶滴中的H&E染色类肠切片的代表性图像。比例尺,20 μm 。图12H和图12I-芽数量(12H)和长度(12I)的量化。图12J-在21天内,人类类肠在OCTOPUS中的生长。比例尺,50 μm 。图12K和图12P-第7天和第14天时隐窝域中的Ki67+增殖细胞(12K,12L)和绒毛表面上的分化肠上皮细胞的免疫荧光和mRNA分析,绒毛表面上的分化肠上皮细胞包括KRT20+吸收型肠细胞(12M,12N)和MUC2+杯状细胞(o,p)。比例尺,10 μm 。数据表示为平均值 \pm SEM。* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ ($n \geq 3$)。sd

[0034] 图13A-13S提供了显示根据本公开的主题使用所公开的系统进行人类类肠的单细胞RNA测序的图解和图像。图13A-代表在OCTOPUS中培养7天产生的人类类肠中不同的干细胞群和肠上皮细胞群的12个簇的UMAP投影。图13B至图13D-UMAP图,显示了吸收型肠细胞(图13B)、杯状细胞(图13C)和干细胞(图13D)特异性的代表性典范基因的表达。图13E,图13F-在基质胶滴中培养7天(e)和在OCTOPUS中不间断培养14天(图13F)后人类类肠中细胞簇的UMAP投影。图13G-人类类肠中细胞组成的量化。在可得到的情况下,用虚线显示在天然人肠中测量的每种细胞类型的百分比。图13F-比较在基质胶滴培养和OCTOPUS之间选定的细胞类型特异性成熟标志物的表达的小提琴图。图13I-在OCTOPUS中培养14天的肠干细胞分化为人肠类肠中的分泌型和吸收型细胞群的拟时间轨迹(Pseudotime trajectories)(上)和分支图(branching plot)(下)。图13J-OCTOPUS和基质胶滴培养中分化的上皮细胞类型的比例比较。* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

[0035] 图14A-14X提供了显示根据本公开的主题在所公开的系统中心人IBD的基于类器官的模型的图解和图像。图14A-使用从IBD患者的肠中分离出的成人干细胞在OCTOPUS中形成类肠。图14B,图14C-通过免疫荧光(14B)和H&E染色(c)可视化的在OCTOPUS中培养14天后IBD患者来源的类肠和正常类肠的形态。比例尺,100 μm (14B)和5 μm (14C)。图14D,图14E-在第7天和第14天时类肠尺寸(14D)和芽数量(14E)的量化。图14F,图14G-IBD类肠和正常类肠中细胞增殖(Ki67)和凋亡(半胱天冬酶-3和膜联蛋白V)的比较。比例尺,10 μm 。图14H-类肠的绒毛域上分化上皮细胞的ZO-1表达的共焦显微照片和量化。比例尺,10 μm 。图14I-4-kDa葡聚糖-FITC扩散到类器官腔(L)的可视化,以显示IBD类肠中的上皮通透性。比例尺,50 μm 。图14J,图14K-在OCTOPUS中培养14天后的IBD类肠和正常类肠中,在转录上不同的细胞群体的UMAP投影(14J)以及它们的比例的量化(14K)。图14L-IBD相关基因的比较。图14M-显示转录因子在IBD类肠中相对于在正常类肠中的平均表达的热图(Heatmap)。图14N-IBD类肠中lncRNA基因的上调大多数发生在潘氏细胞(Paneth cells)中,潘氏细胞在该UMAP图中用虚线显示。图14O-在OCTOPUS中,通过将人类类肠和原代人肠成纤维细胞在同一水凝胶支架中

混合共培养来模拟由底层基质支撑的肠上皮。图14P-所述共培养构建体在第14天时的共聚焦显微照片。比例尺,100 μ m。图14Q-培养14天后,类肠周围局部区域的免疫荧光显微照片。比例尺,25 μ m。图14R-基质中FN产生和成纤维细胞增殖的量化。图14S-第14天类肠释放的细胞因子的量化。数据表示为平均值 \pm SEM。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ ($n\geq 3$)。图14U-当在基质胶滴中培养时,IBD类肠显示出恰当极化的上皮细胞(右上),类似于正常类肠的上皮中的上皮细胞。与OCTOPUS中的IBD类肠相比,它们也保留了上皮结构的完整性,这通过ZO-1表达来可视化(右下)。比例尺,5 μ m。

[0036] 图15A-15O提供了显示根据本公开的主题在所公开的系统对血管化的人类类肠的微工程的图解和图像。图15A-OCTOPUS-EVO装置在标准12孔细胞培养板中的照片。图15B-OCTOPUS-EVO的装置体系结构。图15C,图15D-在同一水凝胶支架中在支持干细胞自组织成类器官的同时生成自组装和可灌注的血管所必需的微流控3D培养顺序步骤。图15E-展示在12天的培养过程中人类类肠和微血管系统同时发育的显微照片。比例尺,200 μ m。f.通过1 μ m荧光微球的流动可视化的微工程血管网络的灌注性。比例尺,100 μ m。图15G-血管化和未血管化的构建物之间类器官尺寸的比较。图15H-OCTOPUS-EVO中血管化的可灌注人类IBD类肠的构建。比例尺,100 μ m。i.血管密度和血管直径的量化。图15J,图15K-通过内皮细胞表达ICAM-1(15J)和增加炎性介质产生(15K)而证明的所述血管化IBD模型的促炎表型。比例尺,50 μ m。图15L-灌注有外周血单核细胞的IBD类肠的显微照片。比例尺,200 μ m。图15M,图15N-单核细胞募集到IBD类肠的顺序步骤的共聚焦显微镜检(15M)和量化(15N)。比例尺,50 μ m。数据表示为平均值 \pm SEM。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ ($n\geq 3$)。

[0037] 应理解,前面的一般描述和以下的详细描述都是示例性的,并且旨在提供对本公开的主题的进一步解释。

具体实施方式

[0038] 本公开的主题提供了培养细胞和/或类器官的技术。本公开的技术可以提供细胞或类器官的增强的器官发生和延长的寿命。本公开的技术还可以增强细胞和类器官的成熟度。本公开的技术还可以允许细胞和类器官的增大。本公开的技术还可以降低细胞和类器官的变异性。

[0039] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语都具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。在有冲突的情况下,应以本文件、包括定义为准。下面描述某些方法和材料,但是在当前公开的主题的实践或检验中可以使用与本文中所述的那些方法和材料相似或等效的方法和材料。本文中提到的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都通过引用整体并入。本文中公开的材料、方法和示例仅仅是说明性的,并不打算限制性的。

[0040] 如本文中所述的术语“类器官”通常描述一种3D多细胞体外组织构建体,它模仿其相应的体内器官,从而可以用于研究该器官的多个方面。如本文中所述的术语“类器官”描述任何几何形状的自组织三维组织培养物。在某些情况下,术语“类器官”可进一步定义为包含干细胞和/或体细胞。

[0041] 如本文中所述的术语“约”或“大致”是指在本领域普通技术人员确定的特定值的容许误差范围内,其将部分取决于如何测量或确定该值,即测量系统的极限。例如,根据本

领域的实践，“约”可以指在3个或多于3个标准偏差内。或者，“约”可以指给定值的至多20%、至多10%、至多5%和至多1%的范围。或者，特别是关于生物系统或过程，该术语可以指在一个值的一个数量级内、5倍内和2倍内。

[0042] 本公开介绍了一种容易的、可伸缩的工程方法，以实现类器官的长期发育和成熟。本文中所述的方法重新设计了常规类器官培养的三维构造以开发一种平台，该平台将单次注入的干细胞悬浮液转变成可以长时间维持的类器官放射状阵列。使用人类和小鼠干细胞，证明了加速的肠类器官产生并且所述类器官在不需传代的情况下持续发育超过4周。与常规技术相比，在本公开的装置中长期培养增强了了隐窝-绒毛结构的形成并且显著增加了肠上皮的成熟度。此外，血管化的、可灌注的人类类肠可以在微工程装置中组装，并用于模拟在IBD中先天免疫细胞向病变肠上皮的募集。本公开的系统、方法和装置可以提供可立即部署的平台，以在培养皿中设计制造更真实的器官样结构。

[0043] 本公开描述了一种简单的、可立即部署的策略，该策略基于对类器官常规3D培养设计的重新思考。本文中所述的方法利用能够重新构造3D培养支架的几何形状的先进平台来产生开放的类器官阵列，从而消除了块状水凝胶中固有的有限且不均匀扩散的问题。本文中所述的系统可以被制造为不同尺寸和形状的简单且即用的培养插件，其可以用于标准细胞培养板中，而无需对已制定的方案和工作流程进行任何修改。

[0044] 通过在延长时间的不间断培养期间小鼠肠类器官的持续生长和发育，证明了本公开的概念验证。由此产生的肠组织构建体表现出在常规培养中无法达到的结构成熟度和功能成熟度。通过产生并长期维持人类肠类器官以及使用单细胞RNA测序(scRNA-seq)深入分析其显著增强的成熟度，可以进一步证明所述方法的实用性。最后，通过建立：i) 使用患者来源的类肠的人类炎症性肠病(IBD)器官型模型和ii) 与可灌注的血管系统集成的微工程类器官用于IBD中免疫-上皮相互作用的体外建模，可以证明所述技术的先进能力。

[0045] 作为背景，应该领会，在传统类器官模型中，长期培养的核心挑战是由于固着水凝胶滴的内部区域中的扩散限制而形成细胞死亡增加的区域。本质上，本文中所述的方法可以概念化为：i) 从水凝胶支架上去除该坏死核心，同时保留类器官仍然存活的外层，以及ii) 将该层放射状分割并使其展开以形成类器官的平面阵列，如图1G所示。通过大幅降低所述培养支架的厚度，该阵列被设计成允许不受限制地扩散和补充养分、氧和其它可溶性因子，从而可以创造更均匀和更可持续的有助于长期培养的生化微环境。

[0046] 为了切实可行地实现这一想法，创造了一种盘状3D培养装置，所述装置能够在标准细胞培养板中产生和维持放射状排列的类器官阵列(图1A)。简单介绍，这种装置，被称为OCTOPUS(不受限制地供应可溶性信号的基于类器官培养的三维器官发生平台(Organoid Culture-based Three-dimensional Organogenesis Platform with Unrestricted Supply of soluble signals))，由一个或多个从中央加载室放射状伸出的类器官培养室组成。在一个实施方式中，所述OCTOPUS可包括在放射状伸出一个或多个类器官培养室的中央处的开放进入孔。在一个实施方式中，每个培养室可具有1mm(高)×1mm(宽)的横截面尺寸。重要的是，所述培养室对外部环境开放，并且包含从开口的边缘突起的微观部分(图1B)。在该系统中，悬浮在ECM水凝胶前体溶液中的干细胞通过所述进入孔手动吸移到所述中央室中(图1C)。得益于所述装置设计的几何对称性，注入的混合物被均等地分配到所述培养室(图1D)。在此过程期间，表面张力作用于在所述室顶的突起边缘处牵制所述液体的

弯月面(图1D),允许注入的溶液推进并填充整个室,而不经由开放顶端溢出。胶凝后,向含有所述装置的孔添加培养基,以通过裸露的水凝胶表面向包埋的细胞提供养分(图1E)。在OCTOPUS中建立3D培养只需要这两个简单的吸移程序,不必对常规类器官培养所使用的标准程序进行任何改变。

[0047] 除了程序简单和方便外,OCTOPUS还实现了新的能力,使所述方法比常规技术更具优势。OCTOPUS作为可拆卸的培养插件的设计使该系统可容易地转移(图1F),便于处理、操作和分析在所述装置中建立的类器官培养模型。所述方法也提供了设计灵活性。在装置制造期间,可轻松地调整限定OCTOPUS体系结构的关键参数,以改变培养室的数量、尺寸、形状和连接性(图1F),这为控制在所述系统中生成的含有类器官的3D组织构建体的体积和空间组织提供了手段。类似地,OCTOPUS的总体尺寸和形状可以容易地改变,以创造出与具有不同孔尺寸和格式的标准培养板相容的装置。这种灵活性特别重要,因为它允许可伸缩性。如图1F所展示,OCTOPUS可以部署为与自动化液体处理系统连接的96孔格式的培养平台,以扩大类器官模型的产生,用于需要显著增加实验通量的应用。

[0048] 以上是简要介绍,下面将参照附图更详细地描述本公开的系统、方法和装置。

[0049] 在某些实施方式中,本公开的主题提供了一种用于培养细胞、类器官或组织外植体的装置。如图1B所示,示例性装置可以包括进入孔101、加载室102和至少一个培养室103(例如,图1B中的8个培养室103)。进入孔101可以位于加载室102的中央,并且所述至少一个培养室103可以从加载室102放射状伸出。

[0050] 在某些实施方式中,加载室102可以被构造通过进入孔101接收溶液。例如,可以通过进入孔101将溶液吸移到加载室102中。在非限制性实施方式中,进入孔101可以位于加载室102的中央。在一些实施方式中,所述装置可以包括多于一个加载室102,用于共培养不同类型的细胞和类器官。在某些实施方式中,加载室102可以包含聚二甲基硅氧烷(PDMS)。在某些实施方式中,加载室102可以包含聚苯乙烯、热塑性塑料、玻璃、金属、纸或其组合。

[0051] 在某些实施方式中,加载室102的直径可以为约2mm至约10mm。在非限制性实施方式中,进入孔101的直径可以为约0.5mm至约3mm。

[0052] 在某些实施方式中,培养室103可以从加载室102放射状伸出,使得经由进入孔101被注入加载室102中的溶液可以均匀地分配到所述至少一个培养室103中。在非限制性实施方式中,从加载室102可以放射状伸出多个培养室103。在一些实施方式中,本公开的装置可以包括多于一个加载室102,并且每个加载室可以连接到所述共培养平台的一个或多个培养室。每个培养室103可以包含不同类型的细胞或类器官,同时它们可以暴露在相同的培养基中。每个培养室103可以包含不同类型的细胞外基质。在某些实施方式中,每个培养室103可以含有可独立进入的流动通道。在某些实施方式中,培养室103可以包含PDMS。在某些实施方式中,培养室103可以包含聚苯乙烯。在某些实施方式中,培养室103可以包含热塑性塑料。在某些实施方式中,培养室103可以包含玻璃。在某些实施方式中,培养室103可以包含金属。在某些实施方式中,培养室103可以包含纸。

[0053] 在一些实施方式中,培养室103的宽度可以从约100 μ m至约50mm。在非限制性实施方式中,培养室103的高度可以从约100 μ m至约5cm。在一些实施方式中,取决于本公开的装置的目的(例如,共培养、靶细胞和靶类器官),可以修改培养室103的形状和尺寸。在一些实施方式中,培养室103的宽度和/或高度可以为约100 μ m至约5,000,000 μ m。在一些实施方式

中,培养室103的宽度和/或高度可以为至少约100 μm 。在一些实施方式中,培养室103的宽度和/或高度可以为至多约5,000,000 μm 。在一些实施方式中,培养室103的宽度和/或高度可以为约100 μm 至约1,000 μm 、约100 μm 至约10,000 μm 、约100 μm 至约50,000 μm 、约100 μm 至约100,000 μm 、约100 μm 至约500,000 μm 、约100 μm 至约1,000,000 μm 、约100 μm 至约5,000,000 μm 、约1,000 μm 至约10,000 μm 、约1,000 μm 至约50,000 μm 、约1,000 μm 至约100,000 μm 、约1,000 μm 至约500,000 μm 、约1,000 μm 至约1,000,000 μm 、约1,000 μm 至约5,000,000 μm 、约10,000 μm 至约50,000 μm 、约10,000 μm 至约100,000 μm 、约10,000 μm 至约500,000 μm 、约10,000 μm 至约1,000,000 μm 、约10,000 μm 至约5,000,000 μm 、约50,000 μm 至约100,000 μm 、约50,000 μm 至约500,000 μm , about 50,000 μm 至约1,000,000 μm 、约50,000 μm 至约5,000,000 μm 、约100,000 μm 至约500,000 μm 、约100,000 μm 至约1,000,000 μm 、约100,000 μm 至约5,000,000 μm 、约500,000 μm 至约1,000,000 μm 、约500,000 μm 至约5,000,000 μm 、或约1,000,000 μm 至约5,000,000 μm 。在一些实施方式中,培养室103的宽度和/或高度可以为约100 μm 、约1,000 μm 、约10,000 μm 、约50,000 μm 、约100,000 μm 、约500,000 μm 、约1,000,000 μm 、或约5,000,000 μm 。

[0054] 在某些实施方式中,所述培养室可以对外部环境开放。如图1B至图1E所示,可以通过培养室103的开口104向培养室中的细胞、类器官、水凝胶或其组合供给养分和/或培养基。例如,所述装置可以浸在有养分的培养基105中,并且养分可以均匀地扩散到培养室中的整个水凝胶中。例如,当供给含有可溶性信号的培养基时,所述水凝胶支架允许培养基在整个3D培养室中快速扩散,在30分钟内向细胞和/或类器官提供养分供应。

[0055] 在某些实施方式中,所述培养基可以包含养分、可溶性因子、生长因子、活性剂或其组合。例如,当供给含有允许恰当的细胞生长和定向分化为器官特异性谱系的可溶性因子/生长因子的培养基时,所述3D培养室中的细胞和/或类器官可以分化为器官样结构。在某些实施方式中,所述培养基可以包含可溶性因子/生长因子,如R-spondin配体、Noggin、骨形态发生蛋白(BMP)、上皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、B-27、N-2、BSA、抗坏血酸、MTG、Glutamax、CHIR99021、rhKGF、8BrcAMP、IBMX、DMH-1、A83-01、氢化可的松和肝素。在非限制性实施方式中,所述培养基可以包含用于筛选药物的目标活性剂。例如,可以将肠干细胞接种到培养室103中,并用抗纤维化药物(例如,吡非尼酮(Pirfenidone)和/或尼达尼布(Nintdanib))以预定浓度进行处理,以测试药物对纤维化表型的效果。在非限制性实施方式中,所述活性剂可以包括化学物质、毒素、纳米材料、细菌、病毒、核酸、肽或其组合。

[0056] 在非限制性实施方式中,培养室103可以包括在培养室103的开口104处的突起边缘106,或阶106。所述突起边缘106可以被构造成在培养室103的开放顶端处牵制注入的溶液的弯月面,以填充整个培养室103而溶液不经由所述开放顶端溢出。

[0057] 在某些实施方式中,可以涂覆培养室103以增强凝胶和/或细胞与培养室103的内表面的粘附力。例如,每个培养室103可以在室温(RT)下填充盐酸多巴胺溶液,以形成增强水凝胶粘附力的表面涂层。

[0058] 在某些实施方式中,本公开的装置可以包含PDMS。在某些实施方式中,所述加载室可以包含聚苯乙烯。在非限制性实施方式中,所述装置可以是光学透明的。例如,位于本公开的装置中的水凝胶内包埋的细胞或类器官可以通过显微镜技术(例如,亮视野、共焦、荧光、电子、原子力和激光扫描显微镜检)观察,无需从本公开的装置移除水凝胶。在某些实施

方式中,所述装置的尺寸可以从约1mm至约50cm。

[0059] 在某些实施方式中,被注入所述加载室中的溶液可以是水凝胶溶液。例如,所述水凝胶溶液可以是细胞外基质(ECM)前体溶液,其可以在所述培养室中之后凝固(即胶凝),提供3D培养环境。在非限制性实施方式中,所述溶液可以包含细胞、类器官或组织外植体。所述细胞可以是能够体外培养的任何细胞。例如但不限于,所述细胞可以是干细胞、杯状细胞、内皮细胞、上皮细胞、间充质细胞、神经细胞、肌细胞、祖细胞、免疫细胞、内分泌细胞或其组合。所述类器官可以是能够体外培养的任何类器官。例如但不限于,所述类器官可以包括人类类器官、小鼠类器官、肠类器官、肝脏类器官、肺脏类器官、初生类器官或其组合。

[0060] 在某些实施方式中,在本公开的装置中培养的一类器官可以具有延长的寿命。例如,在本公开的系统培养的一类器官可以在不传代的情况下存活长达约3周。在非限制性实施方式中,在培养的第5、10、14和21天时,所述培养室中至少约80%的一类器官是存活的。

[0061] 在某些实施方式中,本公开的装置可以提供形态成熟度和功能成熟度改善的一类器官。可以运用本公开的装置的长期培养能力来增加肠类器官的成熟度。例如,在培养期间(例如,大约7天),扁平上皮可以折叠成指状突起(例如,绒毛)并具有延长的出芽,这可以比没有本公开的装置的情况下培养的绒毛更长。除了形态发育之外,本公开的装置还可以改善类器官的功能成熟度。例如,相比在没有本公开的装置的情况下培养的绒毛,在本公开的装置中培养的绒毛可以表达更高的功能标志物(例如,肽转运蛋白1、钠-葡萄糖耦联转运蛋白1(SGLT1)和葡萄糖转运蛋白2(GLUT2))。

[0062] 在某些实施方式中,本公开的主题提供了培养类器官的方法。一种示例性方法可以包括:将包含类器官的水凝胶前体溶液经由进入孔注入加载室中,用所述包含类器官的水凝胶前体溶液填充多个培养室,在所述多个培养室中凝固所述水凝胶前体溶液以形成水凝胶,以及经由开放顶端提供与所述水凝胶接触的培养基。例如,为了在本公开的装置中形成类器官,可以通过在类器官生长完全培养基中将所述水凝胶前体溶液与类器官团混合来产生类器官/水凝胶混合物。使用预润湿的吸管头,可以将约100 μ l的类器官/基质胶混合物经由所述进入孔注入到本公开的装置中。所述混合物可以在整个培养室中均匀分配,而混合物溶液不溢出。例如,在经由所述进入孔被注入后,每个培养室可以具有相同体积的所述混合物。可以温育本公开的装置以使所述水凝胶前体溶液胶凝。可以向每个培养室添加预温热的类器官生长培养基进行长期培养。

[0063] 在某些实施方式中,所述方法还可以包括通过所述透明的装置评估所述多个培养室中类器官的生存力和成熟度。例如,可以通过显微镜技术(例如亮视野、共焦、荧光、电子、原子力和激光扫描显微镜检)和生化分析(例如ELISA)来评估类器官的生存力和成熟度。

[0064] 根据一个实施方式,通过使用标准软光刻技术将PDMS预聚物流延在微图案化的三维印刷模具上,可以制造根据上述的装置。例如,PDMS(Sylgard 184,Dow Corning,USA)单体基质可以与固化剂混合(10:1,w/w)并倾注到3D打印模具(Protolabs,USA)上。被浇铸的模具可以在干燥室中真空脱气30分钟,之后可以将所述PDMS在65 $^{\circ}$ C下烘箱固化过夜,以产生如图1A至图1F中所述的包含类器官培养室的装置。固化的PDMS可以从模具中取出,冲压在薄层的未固化PDMS(以1500rpm旋涂在平坦晶片上5分钟)上,然后密封在形成所述装置的底层的固化PDMS薄板上。每个组装好的OCTOPUS可以在65 $^{\circ}$ C下烘烤,以完全固化所述冲压的PDMS粘合层,然后放入24孔板中直到使用。

[0065] 图7提供了上述装置制造方法的流程图。为了制造所述装置,可以将脱气的PDMS预聚物配送到3D打印模具中,所述3D打印模具具有类器官培养室、加载室、进入孔的突起特征的图案。然后,可以用另一个含有匹配的阳浮雕图案的3D打印模具覆盖所述模具,以生成用于类器官培养室和进入孔的开口。在65°C下固化PDMS 2小时后,可以将所述PDMS薄片从模具上剥离。最后,制成的装置可以放置在如图1A所示的标准多孔板中。

[0066] 实施例

[0067] 结果

[0068] 本公开的装置可以延长类器官的寿命。为了模拟最常见的标准类器官培养环境,选择源自于可商购的小鼠成体干细胞的小肠类器官和方案作为模型系统。图2A显示,在OCTOPUS和滴培养中,基质胶中的小鼠肠成体干细胞都自组装成肠类器官。在培养期间,包埋在OCTOPUS的基质胶阵列中的细胞以制造商的方案和先前研究描述的方式经历了为期5天的自组织过程,以形成由隐窝-绒毛结构鉴别的肠类器官(图2A中的上排)。这些类器官表现出的生存力和形态特征与使用相同的方案在常用尺寸(半径~3mm)的基质胶座滴中形成的那些相似(图2A中的下排;图2D)。然而,当培养期延长超过最长推荐的传代前连续培养期限——5-7天时,发现两组之间的相当大差异。在所述OCTOPUS中的类器官继续生长并形成芽(图2B和图2C中的上排),如图2D中所量化,没有可测量的生存力损失,导致其尺寸在培养14天后增加3.2倍,如图2E所示。相反,在基质胶滴中维持的很大一部分(~65%)类器官到第10天时发生坏死(图2B的下排;图2D中的量化),这随着时间的推移进一步加剧,在14天培养结束时产生超过80%的生存力下降(图2C的下排;图2D中的量化)。这种显著的细胞死亡导致了类器官的崩溃和瓦解,以它们的形态(在图2C中的下排)和尺寸逐渐减小(图2E)为证。如图2P所示,无论初始细胞接种密度如何,在OCTOPUS中都观察到更高的细胞生存力和类器官生长增加。当与从基质胶滴培养方法改良的其它常规技术、如类器官衍生细胞的3D‘顶上(on-top)’培养和单层培养比较时,OCTOPUS还显示出优越的支持类器官长期生存和发育的能力(图2Q和图2R)。图2F显示在OCTOPUS中的肠类器官在21天中持续增大。图2G显示,OCTOPUS降低了类器官尺寸的变异性,这以显著较小的变异系数为证。图片显示了第14天时的类器官。值得注意的是,OCTOPUS的更加支持性的环境允许类器官在不传代的情况下长时间培养和连续生长超过3周,如图2F所示,表示与在基质胶滴中进行常规肠类器官培养的典型期限(5-7天)相比,每个培养周期的类器官寿命增加了超过3倍。此外,在OCTOPUS中的培养寿命提高伴随着发育的类器官的尺寸变异性显著降低(图2G)。

[0069] 在试图提供进一步了解所观察到的差异中,测量了70-kDa FITC-葡聚糖渗入含有类器官的基质胶支架中的时间分布,以模拟可溶性因子在本公开的装置中的被动扩散。为了空间分析,这些测量是在代表所述支架的内部和外部区域的两个位置处进行的。图2H和图2I显示了在基质胶滴(图2H)和OCTOPUS(图2I)中,70kDa的FITC-葡聚糖进入所述水凝胶支架的内部和外部区域的扩散。在所述内部和外部区域中的类器官分别位于距水凝胶表面600 μ m(OCTOPUS)/2400 μ m(基质胶滴)和400 μ m(两组)处。图2J显示了由于葡聚糖扩散而产生的平均荧光强度(MFI)的时间分布。图2K显示了在OCTOPUS和常规滴培养中小鼠肝脏类器官的形成和延长培养。图2L显示了在OCTOPUS 203和滴204中肝脏类器官的尺寸和生存力的量化。

[0070] 这些结果提示,所述装置中的3D培养环境可以允许可溶性因子不受限制的和空间

上均匀的扩散传输。在基质胶座滴中,从30分钟内荧光强度的快速增加中明显看出葡聚糖不受限制地传输到外层中,这与有限的染料渗入所述支架核心中形成对比(图2H,图2J)。重要的是,在OCTOPUS中没有观察到这种显著的空间变异性,其中在整个水凝胶构建体中以几乎相同的速度发生葡聚糖扩散,在不到30分钟内达到饱和水平(图2I,图2J)。在这种情况下,在所述支架的内部和外部区域中的荧光强度的时间分布与在水凝胶滴表层中测量的非常匹配(图2J)。

[0071] 与这些发现一致的是,在OCTOPUS中以快速和均匀的方式发生氧渗入所述基质胶支架中,导致在30分钟内贯穿整个构建体厚度的氧饱和(图2N,图2O)。这种扩散模式不同于在基质胶滴中的扩散模式,后者清楚地显示了出现跨所述支架的氧梯度以及在培养期间始终保留的低氧核心的存在(图2M,图2O)。

[0072] 这些结果验证了OCTOPUS的设计原理,并提示,在本公开的系统显示的类器官的长期生存力和持续生长且尺寸变异性减小可能归因于养分、生长因子和氧的不受限制和空间均匀的扩散传输,这是通过减小类器官与基质胶表面之间的距离来实现的(图2S)。虽然这种论证是基于肠类器官的使用,但结果也表明了将同样的方法扩展到其它类型的类器官的可行性。例如,OCTOPUS对肝脏类器官的培养提供了类似的有益效果,这通过它们在延长的时间内持续生长而没有丧失生存力来说明(图2K)。总之,这些数据表明,OCTOPUS通过延长类器官的寿命,提供了超越常规培养技术的显著增加的价值。

[0073] 在常规培养中类器官的有限寿命阻碍了它们到达后期发育阶段并获得更成熟表型的能力。在所述模型系统中,可以运用OCTOPUS的长周期来增加肠类器官的成熟度。

[0074] 在胚胎发生期间,发育中的肠管的扁平上皮开始折叠成指状突起,称为绒毛,这些突起被称为隐窝的深内褶隔开(图3A)。图3A显示了体内肠发育期间绒毛-隐窝体系结构的形成。随着发育继续,绒毛的数量增加,使隐窝-绒毛结构更加明显,并极大地扩大了可用于养分吸收的上皮表面积。致力于形态发生的这个关键过程,通过测量与类器官的隐窝样域相对应的芽的数量和长度(图3B),研究了肠类器官的形态。图3B显示了在3D培养中用作分析肠类器官形态发育的量的芽形成。在7天的培养期间,在基质胶滴和OCTOPUS中都能清楚地看到在发育中的类器官中形成的皱褶结构,但在OCTOPUS中出芽的程度似乎更大(图3C至3E)。图3C和图3D显示了基质胶滴(图3C)和OCTOPUS(图3D)中类器官的共焦显微照片。在OCTOPUS中,类器官出芽更为明显。重要的是,所述装置允许这些类器官在第7天后继续发育,到第14天形成大约三倍那么多的芽(图3D,图3E)。图3E和图3F显示了在OCTOPUS和滴中培养的芽数量(图3E)和长度(图3F)的量化。相比之下,在水凝胶滴中的类器官在培养7天后停止发芽并迅速失去生存力(数据未显示)。所述分析还显示了在OCTOPUS生成的类器官中的芽显著伸长(图3F和图8)。值得注意的是,第7天和第14天时来自OCTOPUS的芽数量分别与在E15.5和E18.5时的小鼠胚胎中测得的芽数量很接近(图3G)。图3G显示了不同发育阶段绒毛数量的体外-体内比较。类似地,这些类器官中的平均芽长(167.25 μm)与体内测量结果(130.95 μm)相当。

[0075] 结果还显示,当在所述装置中生成类器官时,干细胞标志物(Lgr5,Ki67)的表达更高(图3H)并且EdU的免疫染色更强(图3I)。图3H和图3I显示了在OCTOPUS中的类器官显示出肠干细胞标志物(Ki67和Lgr5)的表达升高,并且通过EdU的免疫荧光增强说明,细胞增殖更活跃。这一发现印证了观察到的类器官出芽的差异(图3C至图3F),因为在类器官发育期间

隐窝-绒毛结构的形成和伸长需要干细胞/祖细胞的扩增和它们的活跃增殖。有趣的是,在装置培养中的EDU+增殖细胞在第7天时分布在整个类器官构建体中(图3J)。图3J提供了共焦显微镜照片,显示了在OCTOPUS生成的类器官中EDU+细胞(白色)的空间分布。特写图像中的线条勾勒出了类器官芽。然而,随着培养的进展,观察到这些细胞定位在芽尖(图3J),重演了在体内肠发育期间绒毛形成后已被充分证明的细胞增殖限于隐窝域。

[0076] 除了形态发育之外,还评估了在OCTOPUS中的3D培养环境如何影响肠类器官中器官特异性组织的出现。胚胎肠中的干细胞和祖细胞在绒毛上产生一种特殊的上皮,其含有对肠的营养吸收和其它重要生理功能至关重要的吸收型和分泌型细胞。事实上,在常规模型和OCTOPUS类器官模型中都发生了这种上皮分化和成熟的过程,以肝细胞核因子4 α (Hnf4 α)的表达为证,这种因子是一种转录因子,在胚胎发生期间对肠成熟起着至关重要的作用。然而,在基质胶滴中的类器官即使在其最大成熟的时候(第7天),发现表达也相当低(图3K,图3L)。图3K显示,在OCTOPUS中发育的类器官,与在基质胶滴中的对照组相比,表现出成熟肠上皮细胞标志物——Hnf4 α 的表达增加。图3L显示了Hnf4 α +细胞分率和Hnf4 α 表达水平的量化。Hnf4 α 的免疫荧光相对于细胞数归一化。在OCTOPUS中,已经较高的Hnf4 α 表达在14天的培养过程中进一步增加,导致Hnf4 α +细胞的分率和以每个细胞为基准的表达水平分别增加了大致1.5和1.4倍(图3K,图3L)。

[0077] 重要的是,通过分析细胞类型特异性标志物,进一步支持了类器官在所述装置中的成熟增强。例如,在第7天,与水凝胶滴相比,在OCTOPUS中绒毛蛋白(一种吸收型肠细胞的终末分化标志物)的表达显著上调(图3M),并且通过延长培养进一步增强了这种表型(图3M)。在诱导产粘液型杯状细胞(MUC2)(图3N)和负责激素分泌的肠内分泌细胞(生长抑素)(图3O)的特异性标志物中也观察到了类似的趋势。图3M-3O显示了肠细胞(绒毛蛋白,图3M)、杯状细胞(MUC2,图3N)和肠内分泌细胞(生长抑素,图3O)特异性的分化标志物的可视化和量化。有趣的是,在发育中的类器官中出现的绒毛上的肠细胞数量显著多于其它类型的细胞(图9),再现了体内肠上皮中这些细胞的最高丰度。这些发现提示,OCTOPUS能够以更快和更持续的方式使类器官发育,让它们达到比某些常规3D培养中更高的形态成熟度和细胞成熟度水平。

[0078] 在下一阶段,评估在所述装置中展现的形态发生和组织成熟度增强是否促进了肠类器官的功能成熟。鉴于肠的主要功能是营养吸收,因此测量了调节肠上皮吸收功能的关键分子转运蛋白,所述转运蛋白包括:i)负责肠摄取肽的肽转运蛋白1(PEPT1)和ii)介导单糖吸收的糖转运蛋白,包括钠-葡萄糖耦联转运蛋白1(SGLT1)和葡萄糖转运蛋白2(GLUT2)。

[0079] 在这项分析中,将最长培养时限(7天)时水凝胶滴中的类器官与OCTOPUS中维持14天的类器官进行比较,以检查延长培养的贡献。无论哪个培养平台,免疫染色都清楚地显示在绒毛上存在转运蛋白,但在OCTOPUS中,这些功能标志物的表达显著升高(图4A,图4B)。在装置生成的类器官中,PEPT1局限于绒毛的顶端表面,在基底侧没有可检波的荧光(图4C),这使人想起它在天然肠上皮的刷缘膜上的极化表达。在顶面和基底面上都发现了糖转运蛋白(图4D),捕捉到了SGLT1(顶面)和GLUT2(基底面和顶面)的空间分布。

[0080] 为了进一步的功能表征,使用活细胞成像技术来可视化细胞内钙信号传导,后者已被证明调节在所述模型中检测到的肠营养转运蛋白的活性。为了评估细胞内钙的水平,用荧光钙指示染料(Fluo-4)标记类器官并实时监测其荧光。鉴于类器官的多细胞复杂性,

测量被选择用于分析的代表性类器官的平均荧光强度。在用100 μ M ATP处理后,所述装置中的类器官在60秒内使它们的荧光增加了约1.6倍,随后逐渐降低到基线水平(图4E)。所述常规模型对相同刺激的反应明显较慢,且发生的程度较小(图4F)。类似地,当使用50mM D-葡萄糖作为更具生理相关性的刺激剂时,在OCTOPUS中的类器官培养物在相同处理条件下以比在水凝胶滴中观察到的更快和更显著的方式表现出钙响应(图4G,图4H)。这两组之间的比较还揭示,在OCTOPUS中对ATP和葡萄糖做出响应的类器官的分率更大(图4I)。注意到在葡萄糖处理期间,在所述装置中测量的细胞内钙的增加比由ATP刺激引起的增加更大(图4E,图4G)。

[0081] 结果表明,细胞内钙信号也在肠的另一项重要生理功能、即响应肠腔内养分增加而分泌消化激素中发挥重要作用。基于这一证据,本公开的类器官模型中的激素分泌被评估为功能成熟的度量。进行条件培养基的酶联免疫吸附测定(ELISA),以测量葡萄糖诱导的胰高血糖素样肽1(GLP-1)的释放,GLP-1是由肠上皮的肠内分泌L细胞分泌的肠降血糖素激素,其增强葡萄糖刺激的从胰腺 β 细胞释放胰岛素。所述ELISA数据显示,所述培养的肠类器官响应培养基中包含的葡萄糖而释放生物活性形式的GLP-1。值得注意的是,对于所有三个时间点的分析(第5、7和10天),在OCTOPUS中分泌的所述激素的量明显大于在所述常规模型中测量的量(图4J)。两组之间的差异随着时间的推移而加剧,因为在所述装置中的类器官继续发育和成熟,在培养10天后,在OCTOPUS中产生高出7倍以上的GLP-1浓度(图4J)。虽然与激素分泌无关,但所述ELISA分析还检测到了MUC2,一种肠特异性糖蛋白,其由杯状细胞分泌,在上皮表面形成保护性粘液层。MUC2的释放遵循与在GLP-1的分泌中所见的相似的趋势(图4K),证明了OCTOPUS能够促进这种在肠屏障功能中发挥核心作用的分泌表型的诱导和成熟。

[0082] 虽然类器官具有再现它们体内对应物的多细胞复杂性的固有能力和在常规类器官培养中模仿天然器官的综合更高水平的结构和功能仍然是一个重大挑战。为了应对这一挑战,正在努力开发新的方法来增加当前类器官模型的细胞异质性并重演超出细胞的组织水平之外的生物串扰以模拟组织-组织和多器官相互作用。受这一新兴工作主体的启发,评估了使用OCTOPUS创建在3D培养中将类器官与其相关组织组合的共培养模型的可能性。

[0083] 首先,对OCTOPUS的设计进行工程改造以并入一对开放的螺旋形培养室,所述培养室带有可分别进入的注射口(图5A)。在这种构造中,所述室可以填充不同的细胞类型,以产生两个可以维持在相同的可溶性环境中的并置组织构建体。为了论证这一方法,建立了小肠类器官与包埋在基质胶中的血管内皮细胞的共培养(图5B)。选择这对组织来近似肠上皮和底层基质中的微血管。所述共培养条件不干扰干细胞的自组织,并允许它们生长为具有典型的隐窝-绒毛微体系结构的肠类器官(图5B)。与这一过程同时,另一个室中的内皮细胞在培养的5天内自组装成互连内皮管的3D网络(图5B),模拟发育期间新生血管的形成过程。由此产生的血管网络和肠类器官在延长的时间内(>10天)保持稳定。

[0084] 所述双室设计在器件制造期间可以容易地修改,以适应数量更多的组织类型。这是通过增加室的数量来创建三培养系统来证明的,所述三培养系统由肠类器官与两个相邻的含有肠成纤维细胞和血管的3D构建体组成(图3C)。OCTOPUS还允许将两种或更多种不同类型的类器官并入单一装置中以表现多个器官,如小肠类器官与肝脏类器官的共培养所示(图5D)。在为这些类器官共同发育而优化的共同可溶性环境中,接种到两个分开的区室中

的干细胞按照与单一培养相同的发育时间线形成它们各自的器官样构建体(图5D)。所述装置支持超过两周的对这种器官对的长期培养,且不会损失生存力和结构完整性。

[0085] 重要的是,所述共培养模型的分析表明了非实质组织对类器官发育的显著效应。例如,当建立小肠类器官与原代肠成纤维细胞的共培养时(图5E),该系统中的类器官平均尺寸大于在单一培养中的平均尺寸(图5F)。所述共培养类器官当与其单一培养对应物比较时,表现出Hnf4 α 表达水平显著升高(1.5 \times)(图5G),证明了重演上皮-基质相互作用对肠类器官生长和成熟的效益。

[0086] 认识到复杂疾病的体外建模正在成为类器官研究的主要重点,因此评估了OCTOPUS在该活跃研究领域的潜在应用。以探索本公开的系统的长期培养能力为目标,建立了一种肠纤维化模型作为由长时间的疾病过程引起的病理生理状况的代表性例子,所述疾病过程在常规的一类器官模型中由于其寿命有限而不容易重演。纤维化是肠疾病如炎症性肠病和胃肠癌的常见并发症。由于诸如慢性炎症的持续损伤导致反复上皮损伤,可能会损害肠修复创伤和恢复稳态的内在能力。创伤愈合过程的失调可能导致以成纤维细胞活化和ECM过度沉积为特征的上皮下组织异常重塑。目标之一是构建一种基于类器官的先进体外模型,能够模仿肠中纤维组织重塑的这些显著特征。

[0087] 为此,使用OCTOPUS在同一水凝胶支架中建立肠类器官和原代肠成纤维细胞的共培养,并生成一种使人想起体内的肠上皮及其底层基质的多细胞构建体(图6A)。在这种混合共培养构造中,包埋在基质胶中的肠祖细胞在5天左右的过程中发育成类器官,在此期间成纤维细胞开始在新生类器官周围扩散和增殖。尽管成纤维细胞增殖活跃,但它们似乎没有阻碍类器官生长,它们也没有引起类器官的形态特征的任何显著变化(图6B)。在该装置中延长培养导致形成致密的微组织,其中充满了增大的类器官和成纤维细胞(图6C)。

[0088] 为了模拟在常规实验室环境下使用该系统评估肠纤维化的场景,使用了一种广泛用于纤维化的体外建模的技术,即用转化生长因子(TGF)- β 处理共培养构建体。TGF- β 通过诱导成纤维细胞活化及其转分化为肌成纤维细胞(肌成纤维细胞是推动纤维发生的关键效应细胞),因此在肠和其它器官的纤维化发病机制中发挥核心作用。为了触发纤维化反应,从第5天到第12天用1ng/ml的TGF- β 处理所述模型。肠微组织暴露在这种条件下确实导致成纤维细胞获得肌成纤维细胞的收缩表型,以 α -平滑肌肌动蛋白(α SMA)的强劲表达为证(图6D)。与未处理的组织相比,表达水平到第8天和第12天分别增加了大于1.9倍和2.9倍(图6E)。TGF- β 处理也促进了成纤维细胞增殖,与未处理的对照组相比,到第12天时产生大约两倍之多的细胞(图6F)。值得注意的是,当从所述模型中移除肠类器官时,这些TGF- β 诱导的成纤维细胞变化明显减少(图6E至图6G),提示上皮细胞在纤维发生反应中有显著贡献。

[0089] 所述模型还允许研究ECM沉积,这对于纤维组织重塑是必要的。本分析致力于作为代表性ECM蛋白的纤连蛋白(FN)。

[0090] 在相同的治疗期期间(从第5天到第12天),免疫染色显示,与未处理的组织相比,用TGF- β 刺激显著增加了成纤维细胞的细胞周围区域中的FN(图6H)。这两组之间的差异在处理发3天内变得明显,并在整个培养期内保持统计显著性(图6I)。由免疫荧光证明的这种FN沉积增加通过条件培养基的ELISA来验证,揭示了用TGF- β 处理的肠组织中释放的FN水平更高(图6J)。与成纤维细胞活化和增殖的分析一致(图6E,图6F),从共培养模型和单一培养模型之间的比较中,确定了肠类器官加强TGF- β 的纤维发生效应并促进成纤维细胞产生FN

(图6I,图6J)。

[0091] 为了进一步证实所述模型的纤维化表型,通过使用原子力显微镜检(AFM)测量了TGF- β 处理的微组织的硬度(stiffness)。OCTOPUS的开放顶端设计极大地便于这种测量,允许AFM探头直接接近培养室中的组织构建体(图6K)。当测试在OCTOPUS中形成的空白基质胶支架时,其硬度为约440Pa,但在相同类型的基质中共培养14天的肠类器官和成纤维细胞将测量值增加到3.5kPa,这与体内健康肠组织的硬度相当(图6K)。正如所料,用TGF- β 1处理该模型导致组织硬化程度明显增加,并生成了比在未处理装置中的共培养构建体硬2.9倍的共培养构建体(图6K)。有趣的是,在这种情况下的平均组织硬度(10.1kPa)在体内测量的纤维化肠组织的生理范围内(图6K)。总之,这些结果证明了在OCTOPUS中工程改造类器官的微环境来模拟肠纤维化发展期间基质重塑和硬化的进行性过程的可行性。

[0092] 对所述肠纤维化模型在药物测试应用中的实用性进行了测试。鉴于目前还没有可用于肠纤维化的特效疗法,使用了两种被批准用于治疗特发性肺纤维化(IPF)的抗纤维化药物,吡非尼酮和尼达尼布。虽然这些药物是为肺部的纤维化而开发的,但它们可以调节其它器官如心脏、肾脏、肝脏和皮肤的纤维化通路的活性。这些发现导致了关于这些化合物是否将会对肠纤维化具有类似疗效的考查。评估了所述药物逆转所述模型的纤维化表型、即成纤维细胞活化和过度的ECM沉积的潜力。

[0093] 首先,在OCTOPUS中通过用5天形成共培养类器官并如上所述再将它们暴露在TGF- β 中7天(第5天-第12天),来产生纤维化肠组织构建体。然后,在通过生存力评估鉴定的治疗窗口内(数据未显示),用临床相关浓度的所述药物将这些构建体处理48小时(第13天-第14天)。在对照组中,纤维化组织在所述48小时时间期间没有接受药物处理。0.1mM时,吡非尼酮有效改变成纤维细胞的收缩表型,这通过与未经处理的对照组相比 α SMA降低50%来说明(图6L至6O)。当剂量增至0.5mM时, α SMA的表达进一步减少(图6L至6O)。吡非尼酮对ECM重塑的效果由于药物处理的纤维化构建体中FN的免疫荧光显著减少而明朗(图6L至6P)。与该结果一致,ELISA分析表明,吡非尼酮也降低了从所述模型释放的FN的量(图6Q)。重要的是要注意,在较高剂量(0.5mM)处理后 α SMA表达和FN产生的水平与代表健康肠组织的正常组中测量的那些在统计上没有区别(图6O至6Q),证明吡非尼酮逆转所述模型中TGF- β 诱导的纤维化并挽救正常表型的能力。

[0094] 在尼达尼布的情况下,较低剂量的该药物(0.1pM)未能对纤维化模型发挥显著效果(图6M至6Q)。然而,当药物浓度提高到0.5pM时,成纤维细胞活化和FN蓄积都明显降至与0.5mM的吡非尼酮处理所达到的相当的水平(图6L至6Q)。在这种情况下,没有观察到伴随着释放的FN浓度的降低,提示组织内的 α SMA和FN沉积是尼达尼布治疗效能的更好指标。

[0095] 与免疫荧光分析结果一致,AFM数据证明了吡非尼酮和尼达尼布以剂量依赖性方式的抗纤维化效果(图6R)。虽然这两种药物当以较高剂量施用时就显著降低了TGF- β 处理的纤维化组织的硬度,但以组织软化的程度更高为证,吡非尼酮似乎具有更明显的效果(图6R)。在用0.5mM吡非尼酮处理的纤维化模型中测得的平均硬度(3.5kPa)与正常组织构建体的(3.3kPa)非常匹配,说明吡非尼酮使所述模型系统中的纤维化肠组织的机械性质正常化的潜力。

[0096] 响应日益增长的对类器官研究的新技术的需求,在此建立了一种微工程平台以重新构造三维度的常规类器官培养。本文介绍的OCTOPUS提供了一种简单而有效的手段来解

决在3D培养中固有的养分供应有限的问题,并工程改造了一个有利于类器官长期培养的更均匀、不受限制的可溶性环境。正如所述模型系统所证明的那样,类器官的寿命延长显著增加了它们的尺寸和成熟度,超过了使用常规技术所能达到的水平,并实现了产生更逼真的多细胞构建体用于器官发生和疾病发展的体外建模。

[0097] 常规水凝胶滴支架中的类器官可以在较长的时间段中每周传代以增加其体外寿命。在传代培养期间被机械破坏的类器官具有快速封闭自身并恢复其原始的体系结构和功能性质的能力。如通过超过一年的肠类器官长期培养所证明的那样,这种方法被证明有助于在较长时间内扩增类器官并维持其分化表型。然而,在这种情况下,类器官寿命的增加并不一定转化为组织成熟度的提高,因为常规培养方案所需的频繁传代(通常每隔5-7天)扰乱了类器官的持续发育和成熟过程。OCTOPUS通过实现显著更长(>3×)时间段的不间断、连续类器官培养,解决了这个问题。

[0098] 虽然支持长期连续培养的能力是OCTOPUS的关键优势,但数据也揭示了这个系统中类器官发育的其它理想特征。例如,在7天培养后,几乎所有被测量的结构和功能成熟的标志物在OCTOPUS生成的类器官中都以显著更高的水平表达(图3)。这些结果提示,OCTOPUS也能够加速处于发育早期的类器官的生长和成熟。据推测,这可以通过在所述装置中可溶性信号的更快、更均匀扩散从而允许OCTOPUS更有效地跟上新生类器官迅速增长的代谢需求来解释。

[0099] 通过运用这些能力,所述工作还证明了在OCTOPUS中发育专门的类器官模型的可行性,该模型可以模拟肠纤维化发展期间纤维发生失调的显著特征。本公开的主题涉及生成共培养类器官构建体并随后将其暴露于致纤维因子的顺序过程,该过程发生的时间段(12-14天)远远超出类器官在常规培养中的典型寿命。事实上,在基质胶滴中类器官生存力在第5天后迅速丧失使得对TGF- β 的纤维发生反应进行建模具有挑战性,即便不是不可能(数据未显示),该反应在OCTOPUS中只有连续培养8天后才开始发生并随着时间的推移变得更加明显(图6E,图6F)。尽管它简单,但所述纤维化模型接近体内测量的组织硬化程度,并揭示了肠上皮在纤维化组织重塑中的重要作用。此外,对使用该疾病模型的原理论证(proof-of-principle)显示为药物测试平台。所使用的吡非尼酮和尼达尼布的抗纤维化效果已经在其它器官中确立,但所述结果提供了支持将其用途扩展到肠纤维化的可能性的体外证据。还有,重要的是要强调所述模型在高内涵药物筛选(high-content drug screening)中的应用潜力,高内涵药物筛选通过使用用于原位测量药物反应的各种分析技术、包括显微荧光测定、ELISA和AFM来说明。考虑到作为纤维化发生基础的病理生理过程是跨器官保守的,所以相同的装置和体外技术可以应用于对其它器官中的纤维化疾病及其药理调节进行建模。

[0100] 虽然OCTOPUS表现出对传统类器官模型的设计的相当大的改变,但该系统的实现不需要对既定的培养方案和工作流程进行任何修改,也不依赖于专门的设备或人员。该优势的关键之处在于OCTOPUS被设计为即用并且易于获取的培养插件,它与标准的孔板和实验室基础设施直接相容。以所述肠模型为例,在传统的实验室环境中,基于常规技术中常用的材料和实验程序,可以很容易地完成在OCTOPUS中生成成熟的类器官。这是所述方法的一个重要方面,使得OCTOPUS成为可立即部署和容易获得的培养平台,这可以促进所述技术迅速传播以供广泛使用。

[0101] 上述演示提出了几个基本问题,为进一步研究开辟了新的途径。其中有哪些设计参数类器官在OCTOPUS中的长期发育起着重要作用等。在延长培养期间,如图2F所示,所述装置中的肠类器官持续尺寸增大并最终接触到培养室的表面(图10),之后它们在横向上的进一步扩大受到壁的物理限制。该观察结果提示,培养室的尺寸是类器官在OCTOPUS中持续生长的重要考虑因素。由于在装置制造期间,所述室的几何形状容易调整,因此可以评估在扩大的培养阵列中类器官发育的模式,并且可以以工程改造在物理和生物化学上都保持不受限制的3D培养环境为目标来优化所述室的尺寸和形状。

[0102] 也许更重要的问题是,在变得必需传代之前,所述系统可以支持多长时间的类器官连续生长和成熟。所述装置中的许多肠类器官在培养4周后停止生长(数据未显示),在目前的OCTOPUS设计中,这可以保守地视为小肠类器官连续培养的最长持续时间。该结果引出了一个问题,即类器官的生长停滞是否是由于上述培养室的物理约束所致。另一种解释是,在上皮细胞周转的自然过程期间死细胞从上皮脱落并积聚在封闭的阈限腔(liminal cavity)中可以对类器官施加有害效应,以前在相同类型的类器官中对此已有描述。可能是,在类器官生长超过某个限度时,所述系统以其当前的构造达到其最大容量,并且变得不再能够满足增大的类器官的代谢需求。如上所讨论,对不同尺寸和几何形状的培养室中的类器官发育进行分析可以帮助解决这些问题中的一部分。可以修改OCTOPUS的外部环境以促进在类器官培养支架中的扩散。例如,作为增加扩散速率的简单策略,可以使用定轨振荡器搅动在含有OCTOPUS的培养孔中的介质并生成对流,这可以促进进一步改善类器官模型的使用寿命。

[0103] 最后,在类器官模型中模仿天然器官的成熟度将需要在此说明的在提高养分供应和细胞生存力以外的先进方法,以考虑体内系统的综合生物学复杂性。所述评估是基于这样的基本原理:类器官的短寿命是它们达到发育后期阶段和获取成熟表型的能力有限的主要原因。然而,从发育生物学角度来看,越来越认识到,在常规模型中类器官的成熟度有限也可能是因为缺乏在体内发育的器官的周围胚胎组织之故,所述组织提供了器官发育和成熟过程的指导性线索。重演体内器官发生的这一关键方面可以极大地提高OCTOPUS促进类器官的结构成熟和功能成熟的能力。所述共培养类器官模型的结果(图5)确实证明了这种方法的可行性和潜在效益-与相关的成纤维细胞一起生长的肠类器官与单一培养的对照相比,显示出生长和成熟显著提高(图5F,图5G)。虽然是初步的,但这些发现值得进一步研究是否可以运用模仿天然器官中特化组织及其生物相互作用的集合作为在OCTOPUS中发育更为成熟和逼真的类器官的补充策略。

[0104] 开发用于实验室生产和维持类器官的新的体外技术正在成为类器官研究的一个主要研究领域。代表这种新的趋势,所述工作提供了关于常规类器官培养的合理设计工程如何推进类器官模仿其体内对应物的结构与功能复杂性的能力的良好例子。通过将工程新颖性无缝地整合到传统的体外技术中,所述技术提供了一种简单、实用的3D培养策略,其可以立即实施以扩大当前类器官模型的能力。OCTOPUS具有重大影响类器官技术的潜力,并且也可以为涉及3D环境中的细胞和组织培养的各种其它应用提供强大的平台。

[0105] 图11A至图11C显示了可以在OCTOPUS中长期培养人类类器官。例如,人类肠类器官可以在OCTOPUS中培养超过14天以上(图11A),以提供与第一天的类器官相比更大且更为分化的组织表型(图11B)。所述人类类器官通过在3D微环境中使其与血管内皮细胞共培养,可

以被血管化(图11C)。

[0106] 下面将更详细地描述对人类类器官模型的研究。

[0107] 使用小鼠类器官论证了OCTOPUS的概念证明后,探索了这项技术对人类肠类器官的适用性。为此,将从健康供体的小肠(回肠末端)分离的单细胞悬液进行培养,并检查它们在本公开的装置和基质胶滴中的自组织和上皮分化(图12A)。在培养的前5天期间,这两种方法都观察到具有高细胞生存力的球形类器官的形成(图12A,图12D),但发现在OCTOPUS中的类器官显著更大(图12A,图12E)。随着培养的进行,本公开的装置中的囊状类器官继续生长,没有可测量的细胞死亡,并经历了形态转变为上皮褶皱延伸到周围基质中的出芽结构(图12B至图12D)。在基质胶滴中没有观察到这种发育过程,在基质胶滴中,超过14天的长时间培养导致生长停滞,细胞生存力下降超过50%,且没有芽形成的迹象(图12B至图12E)。这些显微发现得到了组织学分析的支持,组织学分析显示,在第7天时OCTOPUS类肠中存在芽状结构,在延长培养期间,这种结构的数量和长度都继续增长(图12G至图12I)。相反,在基质胶滴中的肠类器官发育出的芽明显更少且更小(图12F至图12I),并且在整个培养期中大部分保持球形。重要的是,在OCTOPUS中连续、不间断地培养超过1个月而不传代,导致尺寸增加大于32倍,产生了直径大到2.6mm的具有广泛上皮褶皱的人类类肠(图12J)。

[0108] 对培养的构建体的更仔细检查揭示在发育中的类器官中存在不同的细胞群体以及它们的局限性空间分布。例如,通过阳性Ki67免疫染色鉴定的增殖细胞主要在对应于隐窝区域的芽尖端发现(图12K)。通过对编码Ki67(图12I)和细胞周期蛋白D1(图12Q)的基因的RT-PCR分析验证了这个观察结果,细胞周期蛋白D1是一种在细胞周期中介导G1/S转变的蛋白质。所述类器官还含有表达分化的吸收型肠细胞的标志物(KRT20)的细胞(图12M)。重要的是要注意,在OCTOPUS培养中的KRT20表达显著高于在基质胶滴中的表达,这通过免疫荧光和mRNA表达来说明(图12M,图12N)。对本公开的装置的分析还揭示,KRT20的诱导增加从第7天延续到第14天(图12M,图12N),或许是由于在延长培养期间持续的上皮发育和成熟所致。这种增加伴随有Ki67和细胞周期蛋白D1的表达在同一时期的下降(图12L,图12Q),提示由于肠上皮分化增加导致细胞增殖降低。在基质胶滴中没有观察到这种相反关系,在这种情况下,细胞分化和增殖都随着时间的推移而下降(图12L,图12N,图12Q)。

[0109] 通过在诱导杯状细胞特异性标志物(MUC2)中的相似趋势,进一步证明了在OCTOPUS中类肠的上皮成熟增强(图12O,图12P)。总之,这些结果证明了使用OCTOPUS生成人类肠类器官的可行性并支持其持续发育以达到在常规基质胶滴培养中无法达到的尺寸和组织成熟度。

[0110] 认识到在类器官发育期间人类肠干细胞产生各种细胞类型的内在能力,进行scRNA-seq分析来研究OCTOPUS中人类类肠的细胞异质性。为了该研究,在第7天和第14天从本公开的装置中收获类肠,并将它们的单细胞转录图谱与在基质胶滴中培养7天的细胞相比较进行检查——在所述分析中排除来自14天基质胶滴培养的测序数据,以避免由于在该组中观察到显著的细胞死亡而造成的混淆因素(图12D)。

[0111] 对第7天时从OCTOPUS获得的测序数据进行统一流形逼近和投影(UMAP)聚类,得到了3个宽泛定义的细胞组——吸收型细胞、分泌型细胞和干细胞——其各自包含多个亚群,这些亚群通过在先前的人体小肠体内研究中描述的细胞类型特异性基因的表达来明确鉴别(图13A)。具体地说,所述吸收型细胞组由5种转录上不同的细胞类型组成,包括吸收型肠细

胞、肠细胞祖细胞、斑菱蛋白-4 (Bestrophin-4) (BEST4) 阳性的肠细胞、吸收型过渡放大 (transit-amplifying) (TA) 细胞和M细胞 (图13A)。例如,该组中的吸收型肠细胞簇是通过已知调节肠上皮吸收功能的肠细胞特异性转录产物的高表达来定义的,所述肠细胞特异性转录产物如角蛋白20 (KRT20)、脂肪酸结合蛋白1 (FABP1) 和癌胚抗原相关细胞黏附分子6 (CEACAM6) (图13B,图13K)。所述分泌型细胞组包括6个簇 (图13A),其中之一代表杯状细胞,通过胱抑素C (CST3)、三叶因子3 (TFF3) 和S100钙结合蛋白A14 (S100A14) 的表达来鉴定 (图13C,图13L)。干细胞的簇集是基于肠干细胞标志物的表达,所述标志物包括无刚毛鳞甲复合体同源蛋白 (achaete-scute Complex Homolog 2) (ASCL2)、B型肝配蛋白受体2 (EPHB2) 和SPARC相关的模块化钙结合蛋白2 (SMOC2) (图13D,图13M)。

[0112] 重要的是,所述测序结果揭示了在OCTOPUS中独特存在的细胞群体。这样的细胞类型的良好例子是表达BEST4的吸收型细胞群的一个子组 (BEST4+肠细胞) (图13A),其在肠中的宿主-微生物群相互作用和各种稳态功能如离子运输中发挥关键作用。这种特化的细胞类型在通过基质胶滴培养生成的人类类肠中没有发现 (图13E)。通过载脂蛋白 (APOA4、APOC3、APOA1、ALPI和APOB) 的表达来鉴定的脂质吸收型肠细胞是通过本公开的装置培养产生的另一个吸收型肠细胞亚群,在基质胶滴中不存在 (图13E)。对这两个系统中的细胞簇的比较还显示,在OCTOPUS中的吸收型细胞谱系的丰度要高得多 (图13A,图13E)。当在OCTOPUS组中的培养期限从7天延长到14天时,所鉴定的细胞群体的空间分布基本保持不变 (图13F)。然而,发现许多簇的密度有明显改变,表明在延长培养期间细胞丰度改变。

[0113] 为了进一步考查这些变化并了解它们与天然系统的相关性,分析了在OCTOPUS中类肠的细胞组成,并与之前发表的体内人类肠上皮单细胞图谱进行比较。该分析的结果显示,在这里测试的培养条件之间,上皮组成有若干差异。首先,在OCTOPUS中的延长培养导致干细胞的富集远远超过在基质胶滴培养中所能达到的富集,这以干细胞在总群体中的比例从第7天的7.4%增加到第14天的12.3%为证,后者非常接近体内肠干细胞的分率 (14%) (图13G)。其次,OCTOPUS允许吸收型细胞群体中的肠细胞谱系 (吸收型肠细胞、BEST4+肠细胞、肠细胞祖细胞) 从第7天到第14天扩增 (图13G),这与基质胶滴中这些细胞的小分率或可以忽略不计的分率形成对比。结果是,培养14天后,肠细胞祖细胞达到并超过了生理丰度水平。然而,尽管扩增,但吸收型肠细胞和BEST4+肠细胞的比例仍然显著低于在体内图谱中报道的比例。第三,分泌型细胞组的亚群表现出在OCTOPUS中从第7天到第14天丰度降低的一般趋势 (图13G)。对于该组中的大多数细胞类型,第14天时它们的比例明显小于在基质胶滴中的比例,但较低的丰度有助于更好地接近体内分泌型上皮的细胞组成。例如,第14天时OCTOPUS中的杯状细胞分率 (2.56%) 比起在基质胶滴中测量的分率 (19.63%),反而与体内的分率 (5%) 要相当得多。

[0114] 测序数据还揭示了在上皮成熟的转录调控中重要的时间-和平台-依赖性差异。在关键的发现中包括,由于在OCTOPUS中的延长培养,成熟肠细胞特异性的基因表达显著增加。这些基因包括i) 吸收型肠细胞的FABP1、PHGR1、PRAP1和SLC6A8 (图13H,图13O) 以及ii) 由BEST4+肠细胞表达的LGALS3和MT1X (图13H,图13P)。在OCTOPUS中第14天时的分泌型细胞群体的成熟中观察到长期培养类似促进作用,这通过杯状细胞特异性基因 (TFF3、CA9和S100A14) (图13H,图13Q) 和肠内分泌细胞转录本 (REG4,SEZ6L2) 的表达 (图13R) 来说明。

[0115] 有趣的是,与基质胶滴培养相比,OCTOPUS类肠显示出与TA细胞增殖能力相关的基

因如TOP2A、PCNA、MT1E和FABP5的显著下调(图13H,图13S)。该结果与之前的体内报道一致,即在肠发育期间,随着组织成熟度增加,小肠的TA区中的细胞增殖受到抑制,进一步支持了OCTOPUS提高类器官成熟的能力。

[0116] 最后,利用Monocle进行了单细胞轨迹分析,进一步表征了在OCTOPUS中人类类肠发育期间干细胞分化的动态过程。当在UMAP图上以拟时间重建时,发育轨迹显示在培养开始后不久分成两个不同的域,代表吸收和分泌型细胞谱系(图13I)。在这种最初的谱系提交之后,分泌型细胞域中的干细胞进展为分泌型TA细胞,之后分化轨迹分支为周期中TA和肠内分泌细胞域(图13I中的箭头S1)。在相同的拟时间段期间,UMAP图上分开的簇也显示了分泌型TA细胞向未成熟的杯状细胞再到杯状细胞的转变(图13I中的箭头S2)。对吸收型细胞域中的分化轨迹的追踪揭示了从干细胞到吸收型TA细胞到肠细胞祖细胞的发育进程,肠细胞祖细胞然后产生了吸收型肠细胞和BEST4+肠细胞(图13I中的箭头A)。

[0117] 当与每种细胞类型的比例相结合时,所述发育轨迹允许对在OCTOPUS和基质胶滴中的干细胞分化进行更为定量的表征和直接比较(图13I,图13J)。在常规的滴式培养中,数据表明干细胞的发育严重偏向分泌型细胞谱系,占分化细胞的超过54.79%(图13J)。相反,在OCTOPUS中的干细胞分化更多地指向成熟的肠细胞,从而在类肠中产生丰度显著更高的肠细胞祖细胞、吸收型肠细胞和BEST4+肠细胞,这些细胞合起来占上皮群体的大于31.94%(图13J)。鉴于肠细胞是负责小肠的器官特异性功能的为数最多的细胞类型,这种比较支持了OCTOPUS在工程改造人类类肠以使其具有更为生理的细胞组成和增强的功能能力中的优势。

[0118] 认识到对复杂疾病的体外建模正在成为类器官研究中一个活跃的研究领域,所以将努力转移到演示使用OCTOPUS来构建具有增加的保真度和生理相关性的基于类器官的疾病模型的原理论证上。以人类类肠工作为基础,将重点转移到对人类炎性肠病(IBD)进行建模,炎性肠病代表了一组以胃肠慢性炎症为特征的疾病。

[0119] 尽管对IBD的一般性了解有了进步,但对这种复杂疾病进行建模仍然是重大的挑战。研究IBD经常依赖于使用化学模型或同类系鼠模型,这些模型需要遗传或外源操作来近似人类IBD的表型。作为替代方法,研究人员已经证明了对原代或转化细胞(例如Caco-2)进行常规2D和3D培养,以生成可以受到外部施加的炎症信号的人类肠组织的体外类似物。为了克服这些简化系统的局限性,正在做出新的努力,使用肠类器官来更忠实地模拟IBD的病理生理复杂性。受这一新兴工作主体的启发,探索了通过在OCTOPUS中长期培养患者来源的肠类器官,对使人想起IBD中肠上皮功能障碍的人类类肠进行工程改造的可行性(图14A)。

[0120] 当将从IBD患者的小肠分离出的细胞悬液接种到本公开的装置中时,它们在7天中经历自组织成为含有出芽结构的类器官,所述出芽结构看起来与从健康供体获得的正常类肠中观察到的相似(图14B)。然而,组织学分析揭示这两组之间的显著不相似。正常类肠含有恰当极化的上皮细胞,细胞核小且位于底部以及局灶性明显的顶端刷状缘,而IBD类器官的一些区域含有细胞核增大且位于中央并且核质比较高的肠上皮细胞(图14C),与IBD患者肠上皮的组织病理学发现相配。IBD类肠的生长也更慢(图14D)并且形成的芽明显较少(图14E),这与以前关于IBD肠上皮的绒毛形成能力缺陷的报道一致。除了这些形态差异外,患者来源的类肠与正常对照相比还表现出增殖能力降低和细胞凋亡增加(图14F,图14G)。这些类器官的绒毛域还含有大片的紧密连接表达降低或失去紧密连接的细胞(图14H)。由于

上皮结构完整性受损害,IBD类肠显示出屏障功能受损,这通过使用4-kDa异硫氰酸荧光素(FITC)-葡聚糖进行通透性测定来测量(图14I,图14T)。这些结果证明了本公开的模型能够重演IBD中有缺陷的肠上皮的一些关键特征。要注意的是,当在常规的基质胶滴中产生和维持IBD类器官时,它们不能再现这些疾病表型达到在OCTOPUS中演示的程度(图14U)。

[0121] 使用scRNA-seq进一步分析显示了反映IBD类肠的病理生理状态的显著变化。最值得注意的改变之一是,与正常类肠相比,成熟的肠细胞比例减少了近50%(图14J,图14K)。这一发现与炎症肠上皮中肠细胞群体减少的体内报道相似,表明在我们的模型中,干细胞的肠细胞分化失调和/或肠细胞凋亡增加,这二者都已在IBD患者中描述过。在吸收型肠上皮细胞的其它主要亚型、如TA细胞和BEST4+肠细胞中,也注意到类似的变化(图14J,图14K)。这些结果与有些分泌型细胞群体的扩增形成了对比。特别是,潘氏细胞的比例从正常类肠中的0.37%增加到IBD模型中的7.2%(图14J,图14K),这与炎症和上皮损伤导致的在小肠隐窝区域出现潘氏细胞的扩增和再殖是一致的。在转录组学水平上,测序数据揭示了在患者来源的类肠中IBD相关基因的表达明显增加,所述IBD相关基因包括ANKRD1、MUC5B和BST2(图14L,图14V)。在该模型中上调的基因还包括MAPK/ERK信号传导通路的关键调控因子,如转录因子SOX14和长非编码RNA MAP3K20-AS1(图14L,图14V),反映了所述类器官模仿作为炎症性疾病的IBD的能力。重要的是,除了这些已知的IBD相关基因外,还发现了几个在患者来源的类肠中上调的基因间长链非蛋白编码(LINC)RNA基因,包括LINC02253、LINC01210、LINC02303、LINC02577和LINC02159,这些基因以前没有在IBD的情况下描述过(图14)。这些标志物中的许多主要由在所述IBD类器官中扩增的潘氏细胞和其它分泌型细胞类型表达(图14N)。有趣的是,在基质胶滴培养中,不存在LINC基因的差异调节(图14W)。还有,在基质胶滴中培养的患者来源的类肠中发生的IBD相关基因的上调程度显著较低(图14X)。

[0122] 在分子和细胞水平上证明了OCTOPUS生成的IBD类肠的病理生理特征后,接下来考查了它们重演在IBD进展期间在组织尺度上发展的肠异常的能力。本研究致力于肠纤维化,是IBD的一种常见并发症。由于IBD中的慢性炎症导致反复上皮损伤,可能会损害肠修复伤口和恢复稳态的内在能力。研究表明,持续的损伤可以使肠上皮和底层基质之间的组织-组织相互作用失调,导致以成纤维细胞过度增殖和ECM过度沉积为特征的上皮下区室的异常重塑。所述研究的目的是调查是否可以在本公开的IBD类器官模型中再造这种病理生理纤维发生过程的显著特征。

[0123] 为此,患者来源的IBD类肠与原代人类肠成纤维细胞在同一水凝胶支架中共培养,以生成一种使人想到体内的肠上皮和底层基质组织的多细胞结构(图14O)。在这种混合共培养构造中不间断培养超过14天使得成纤维细胞在新生的类器官周围扩散和增殖,最终形成被成纤维细胞包围的增大的类器官所密集填充的微组织(图14P)。对培养14天后的IBD结构的免疫染色揭示了在成纤维细胞的细胞周围区域中过度的纤连蛋白(FN)沉积(图14Q)。在正常类肠的培养中也存在细胞外FN,但其水平明显显著较低(图14Q,图14R)。对条件培养液的ELISA分析进一步支持了这种差异,所述分析显示在IBD模型中释放的FN浓度更高(图14R)。患者来源的类肠也促进了成纤维细胞的增殖,以培养14天后的IBD模型中成纤维细胞几乎多达两倍为证(图14R)。

[0124] 这些发现与以前对IBD患者小肠的体内研究中所描述的纤维组织重塑的一般模式

相配。我们的数据还提示,在本公开的模型中,自发纤维发生是由IBD类肠的病变上皮驱动的。为了表征由这些上皮细胞创造的可溶性促纤维化微环境,测量了转化生长因子(TGF)- β 1的产生,TGF- β 1是在IBD中由肠上皮过度表达的TGF- β 超家族的成员,其选择性地激活通过间充质细胞合成ECM。正如所料,与正常类肠相比,IBD模型中的TGF- β 1产生显著上调(图14S)。在白介素(IL)-6和肿瘤坏死因子- α 的分泌中也观察到类似的差异,这两种都已被证明在IBD相关的纤维化中激活肠成纤维细胞(图14S)。总之,这些结果证明了使用通过OCTOPUS生成的患者来源的肠类器官作为创建更真实和更生理相关的IBD模型的基础的可行性。

[0125] 随着类器官技术的快速发展,对能够模仿天然器官更复杂的结构和生理功能的先进类器官模型的需求显著增长。作为代表性的例子,在正在进行的推进类器官技术的能力和潜力的研究工作中,将血管系统与类器官培养结合在一起正在成为日益感兴趣的领域。类器官的血管化是模拟天然组织的血管分布和血管对实质性功能的贡献所必需的,而且它也被提议作为一种在3D培养中改善养分和氧供应以促进类器官生长和成熟的有前途的策略。然而,生成血管化的类器官并以受控的方式灌注它们的过程极其复杂,往往需要非工程师不易理解的专门的技术和培养系统。

[0126] 受这个问题的驱策,创造了先进的OCTOPUS原型,它提供了工程改造血管化的、可灌注的人类类器官的新能力,同时仍然提供了原始平台的简单和便利(图15)。该系统称为OCTOPUS-EVO(用于工程改造血管化类器官的OCTOPUS),是通过将微型制造室的网络结合到OCTOPUS插件中而构建的,这是使用常规移液器容易达成的(图15A,图15B)。在一个实施方式中,所述装置由开放式细胞培养室以及在所述室的两侧带有的两个流通微通道组成。在一个例子中,所述装置由横截面尺寸为3mm(宽度) \times 1mm(厚度)的开放式细胞培养室以及在所述室的两侧带有的两个流通微通道(1mm \times 1mm)组成(图15B)。所述侧通道可使用独立的进入孔个别寻址,并通过一对微制造的阶与所述细胞培养室分开(图15B)。为了生成血管化的类器官,用悬浮在ECM水凝胶前体溶液中的干细胞、血管内皮细胞和成纤维细胞的混合物注入所述培养室(图15C)。在此过程期间,在所述分隔阶处通过毛细作用牵制所述注入的溶液,使得可以将所述混合物物理限制在中间通道中(图15C,步骤1)。在胶凝形成载有细胞的ECM水凝胶支架后,用内皮细胞接种所述侧通道,以在所述通道表面上形成连续的内皮细胞衬(图15C,步骤2)。在培养期间,所述水凝胶支架中的干细胞发育成类器官,而包埋在相同凝胶中的内皮细胞经历使人想起血管发生的发育过程的自组装,以形成围绕在发育中的类器官周围的3D互连血管网络(图15C,步骤3)。这些血管与所述侧通道中的内皮汇合,使所述血管化的类器官构建体可通过所述侧通道直接可及并灌注(图15D)。

[0127] 为了进行概念验证演示,我们用含有人类肠细胞、内皮细胞和成纤维细胞的纤维蛋白和基质胶前体的混合物接种OCTOPUS-EVO。这种共培养系统支持干细胞在培养的2-3天内快速自组织成类肠(图15E)。血管的形成经过更长的时间段发生,在5-6天后变得明显(图15E)。在12天的培养过程中,肠类器官在血管化的水凝胶中持续生长,在此期间,自组装的微血管系统保持稳定并与发育中的类肠密切关联,没有可测量的结构完整性损失(图15E)。重要的是,整个血管化的类器官结构是可灌注的,这通过1- μ m荧光微球在跨所述支架施加的压力梯度的方向上流过所述血管网络来证明(图15F)。另一个发现是,在相同的培养期限期间,在OCTOPUS-EVO中血管化的、灌注的类肠生长比在OCTOPUS中没有血管化的类肠大两

倍以上(图15G),说明了可灌注的血管系统对类器官生长的有益效果

[0128] 在演示IBD类肠的基础上(图14),探讨是否可以运用所述EVO平台将所述患者来源的类器官血管化并开发出更先进的疾病模型,所述疾病模型可以用于研究IBD中由血管系统介导的血管异常和其它疾病过程。患者来源的肠干细胞与内皮细胞和成纤维细胞在OCTOPUS-EVO的纤维蛋白/基质胶支架中培养12天,导致形成完全被周围微血管系统包被的IBD类肠(图15H)。有趣的是,该模型中的血管与在正常类肠周围形成的其对应物相比,显示出密度和直径显著减小(图15E,图15I),与IBD中慢性炎症肠的血管特征相配。此外,看到很大一部分血管中的内皮细胞有细胞间黏附分子(ICAM)-1的强免疫染色,这在正常组中没有观察到(图15J,图15O)。与该发现一致,对从所述IBD模型收集的血管灌注液的ELISA清楚地显示,已知诱导内皮细胞活化的关键炎症介质的产生明显增加(图15K)。重要的是,发现在所述血管化的IBD类肠中这些细胞因子大多数的水平显著高于在非血管化的IBD模型中的水平(图15K),提示从所述类器官构建体中释放的细胞因子的传输改善和/或血管内皮细胞对IBD类肠的促炎环境的潜在贡献。

[0129] 最后,观察到所述血管化IBD类肠中的内皮细胞活化导致了对于是否可以利用本公开的模型的血管灌注性来模拟IBD中血源性免疫细胞的募集的调查。体内证据已经将循环血单核细胞向肠粘膜的募集明显增加确定为IBD发展期间的关键免疫学事件之一。事实上,用人类外周血单核细胞灌注的本公开的IBD模型显示在类肠关联的血管以及在类肠的管腔中有大量细胞(图15L)。即使在存在管腔内流动的情况下,血管中的单核细胞仍保持牢牢地粘附于所述内皮细胞衬(左图,图15M)。对所述构建体的进一步检查揭示,这些粘附的单核细胞中的一些跨过内皮迁移到血管周隙中(中图,图15M)。在该模型中也捕捉到了单核细胞经历跨过肠上皮进入类肠腔的移行(右图,图15M)。当将单核细胞输注到源自于健康供体的血管化类肠中时,观察到再现体内单核细胞募集的顺序步骤的这些复杂事件中的细胞要少得多(图15A)。

[0130] 该数据合起来提供了OCTOPUS-EVO的概念验证,并证明了它作为可及的体外平台对于工程改造血管化的、可灌注的类器官的潜力,这可以扩大常规类器官培养的能力。

[0131] 响应日益增长的对类器官研究的新技术的需求,本公开描述了一种微工程平台以重新构造三维度的常规类器官培养。OCTOPUS提供了一种简单而有效的手段来解决3D培养中固有的养分供应有限的问题。通过实现厚度显著减小的开放式3D培养支架的受控生产,该系统有助于减小养分和氧扩散到生长中的类器官的距离和空间变异性。与常规的基质胶滴培养相比,这种设计使得可以工程改造有益于类器官长期培养的更均匀、不受限制的可溶微环境。由于显著减少扩散限制而改善的传质特性也降低了本公开的系统的有效培养体积,这是细胞在培养过程中处理和其环境的能力的反向度量。结果,OCTOPUS中的干细胞和类器官在发育期间更好地控制其局部微环境。本文中所述的数据表明,OCTOPUS的这些理想特征可以增加类器官的尺寸和成熟度,超过使用常规技术所能达到的水平,并且可以实现产生更逼真的多细胞构建体,用于器官发生和疾病发展的体外建模。

[0132] OCTOPUS实现了在延长的时间段中不间断的、连续的类器官培养。如人类类肠模型的scRNA-seq所示,与基质胶滴相比,使用OCTOPUS使不间断培养的期限加倍,极大地促进了类器官中的肠细胞分化,以生成更具生理性的肠上皮,其含有明显数量更多的功能成熟的肠细胞。

[0133] 虽然支持长期连续培养的能力是OCTOPUS的关键优势,但本文中的数据还揭示了本公开的系统类器官发育的其它理想特征。例如,在培养7天后,在OCTOPUS中肠类器官的尺寸和几乎所有上皮成熟标志物的表达都显著更高。ScRNA-seq分析提供了进一步的证据,即在OCTOPUS中的人类类肠,当与在常规基质胶滴中培养相同时间量的那些相比,更忠实地重演了天然肠上皮的细胞异质性,以及分化细胞类型的相对丰度及其生理基因表达谱。这些结果提示,OCTOPUS能够加速处于发育早期的类器官的生长和成熟。

[0134] 通过运用这些能力,该工作证明了开发一种可以重演在IBD中患病的人类肠上皮的形态、功能和转录特征的专门类器官模型的可行性。有趣的是,在这个模型中观察到的许多病理生理变化在患者来源的类器官的基质胶滴培养中没有发生。对所述OCTOPUS IBD模型的另一个观察结果是几个长的非编码RNA(lncRNAs)的表达增加。这一发现可能对新兴的IBD中的lncRNA生物学研究具有重要意义。最近的证据提示,lncRNAs积极参与了介导与上皮通透性、细胞凋亡和炎症有关的IBD关键疾病过程。为此,scRNA-seq数据揭示了尚未牵连在IBD中的一组lncRNA。在已被证明通过促进结直肠癌细胞增殖而在肿瘤发生中发挥作用的这些基因中包括LINC02159和LINC02577。LINC01210是另一种以前被描述为结直肠癌和卵巢癌细胞增殖和浸润调节因子的lncRNA。

[0135] 在该模型中包含肠成纤维细胞容许在体外再现肠纤维化。与以前演示的通过用外源性致纤维因子(如TGF- β)处理而生成的基于类器官的纤维化模型不同,本公开的共培养系统在没有外部输入的情况下自发地发展纤维化,以重演在IBD患者小肠中所述的异常基质重塑的关键特征。这一发现支持了病变或持续损伤的上皮作为病理生理器官纤维化的驱动因子的一般概念,所述驱动因子可以激活上皮区室中的效应细胞。因此,本公开的系统可以提供一种简单但有能力的平台,用于对肠中失调的纤维发生进行基于类器官的机制研究。鉴于支撑纤维化发展的生物学过程是跨器官保守的,相同的装置和类器官培养技术可应用于研究其它器官中的纤维化疾病。

[0136] 类器官血管化的演示突显了OCTOPUS的先进的能力和潜力。OCTOPUS-EVO实现了在同一培养支架中器官发生和血管发生同时的自发过程以产生血管化的可灌注的人类类肠,所述人类类肠可以再造天然器官的血管-实质界面和更复杂的生理反应。研究人员最近介绍了类器官血管化的技术,包括将类器官体内移植到血管丰富的器官例如脑、肾、肺和胰腺中,但在体外生成这样具有受控血管灌注的构建体仍然是一个重大挑战。OCTOPUS-EVO提供了一种可达到的手段来应对这一挑战,并且不需要专门的工程系统,在常规3D培养的便利性和简单性下增加了类器官模型的复杂性。本公开的装置中的血管化类肠,与未血管化的类肠相比,具有显著更大的尺寸,支持了类器官血管化是促进类器官生长的有前途的策略这一概念。据推测,所述培养支架的血管化增加了养分和氧的供应,从而允许更有效和更快的类器官发育。基于证明内皮细胞与实质组织相互作用的大量证据,也有可能血管系统和类器官之间的生物串扰可能是造成类器官生长增加的原因。

[0137] 虽然OCTOPUS表现出对传统类器官模型的设计的相当大的改变,但该系统的实现不需要对既定的培养方案和工作流程进行任何修改,也不依赖于专门的设备或人员。该优势的关键之处在于OCTOPUS被设计为即用并且易于获取的培养插件,它与标准的孔板和实验室基础设施直接相容。以所公开的肠模型为例,在传统的实验室环境中,基于常规技术中常用的材料和实验程序,可以很容易地完成在OCTOPUS中生成成熟的类器官。这是本公开的

方法的一个重要方面,使得OCTOPUS成为可立即部署和容易获得的培养平台,这可以促进所述技术迅速传播以供广泛使用。

[0138] 方法

[0139] 以下描述的方法酌情应用于每个上述示例。

[0140] 对于类器官培养,使用冷冻保存的小鼠肠类器官(70931,STEMCELL Technologies,加拿大)和冷冻保存的小鼠肝祖细胞类器官(70932,STEM-CELL Technologies,加拿大)。肠和肝脏的类器官在24孔板中根据制造商的方案分别使用IntesCult™类器官生长培养基(06005,STEMCELL Technologies,加拿大)和HepatiCult™类器官生长培养基(06030,STEMCELL Technologies,加拿大)进行培养。简单地说,将已有的基质胶滴通过在分散酶中温育而溶解。温育30分钟后,将类器官物理解离成单细胞悬液,然后转移到15ml的falcon管,以 $290 \times g$ 的速度离心,获得干细胞沉淀团。然后向所述沉淀团添加100 μ l的完全类器官生长培养基。添加100 μ l的冷基质胶后,将所述悬浮液温和地上下吹打10次以充分混合。使用预润湿的200 μ l移液器头,将50 μ l的类器官/基质胶混合物注入24孔板中形成基质胶滴。然后将所述含有滴的孔板在37°C和5% CO₂中温育10分钟,以使基质胶胶凝。完成这一步骤后,向每孔添加750 μ l预温热的类器官生长培养基。按照制造商的推荐,每5-7天将类器官在新鲜的基质胶中传代,直到使用。

[0141] 关于人类类肠系,从回肠末端生成的类肠系由费城儿童医院胃肠上皮建模程序(Children's Hospital of Philadelphia Gastrointestinal Epithelium Modeling Program)根据机构审查委员会(Institutional Review Board)批准的方案(13042)提供。所有患者的父母都提供了书面知情同意。生成类肠系。简单地说,将两个活检组织片段在1ml冷无菌PBS中漂洗3次,然后在冷室中在转盘上于冷整合缓冲液中温育30分钟,然后机械分离(刮除)上皮层。将所述片段通过100 μ m滤网过滤以消除绒毛,再悬浮在80%基质胶中,然后以50-200个隐窝/30 μ l滴的密度接种。将所述液滴在37°C下凝固30分钟,每孔添加500 μ l人类IntesCult(STEMCELL Technologies;当补充有青霉素-链霉素(Gibco)时是完全的)。Y-27632(SelleckChem;终浓度10 μ M)仅在接种时添加到培养基中。

[0142] 关于人类类肠的维持和传代,每周更换三次类肠培养基。在第14天,将培养物传代和/或冷冻保存在CryoStor CS-10(STEMCELL Technologies)中。为了传代,将基质胶液滴通过P1000头上下吹打取出,转移到1.5ml的微量离心管中,随后离心和用冰冷的HBSS洗涤。通过放置在P1000头上的P200头吹打10次,然后离心,机械地将类肠解离成片段。将沉淀团在80%的基质胶中重构并按1:4分割比的30 μ l滴接种。随后的培养准备在第7天传代和/或冷冻保存。

[0143] 关于在OCTOPUS中形成3D类器官构建体,将含有OCTOPUS插件的标准24孔板首先通过暴露于紫外(UV)光(Electro-lite ELC-500)30分钟进行灭菌。随后,在室温(RT)下用2mg/ml(w/v,在10mM Tris-HCl缓冲液中,pH 8.5)的盐酸多巴胺溶液填充OCTOPUS中的培养室2小时,形成表面涂层以提高基质胶与PDMS的粘附力。将所述聚(多巴胺)(PDA)处理的装置保持无菌直到使用。为了在本公开的装置中形成类器官,首先制成沉淀团。为此,将现有的基质胶通过在分散酶中温育基质胶滴进行溶解。然后将细胞转移到15mL的falcon管中,以 $290 \times g$ 离心,获得干细胞沉淀团。然后,向所述沉淀团添加100 μ l的完全IntestiCult™类器官生长培养基。添加100 μ l的冷基质胶后,将所述悬浮液温和地上下吹吸10次以充分混

合。对于人类肠的类肠,可以将细胞沉淀团重悬浮在80%基质胶中。使用预润湿的200 μ l头,通过进样口将100 μ l的所述类器官/基质胶混合物注入OCTOPUS中。然后,将含有OCTOPUS的孔板在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂中温育10分钟,以使基质胶胶凝。完成后,向每个孔添加750 μ l预温热的IntestiCult™类器官生长培养基。在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂的细胞培养箱中维持所述OCTOPUS板。在长期培养期间,每隔一天进行培养基更换。

[0144] 为了测量和量化所述人类类肠中的半胱天冬酶-3、膜联蛋白V、TNF α 、TGF β -1、IL-6和IL-8,在培养的第14天收集条件培养基,并使用切割的半胱天冬酶-3(Asp175)ELISA试剂盒(ab220655,abcam)、人类膜联蛋白V ELISA试剂盒(ab223863,abcam)、人类TNF α ELISA试剂盒(ab181421,abcam)、人类TGF β 1ELISA试剂盒(ab100647,abcam)、人类IL-6ELISA试剂盒(ab178013,abcam)和人类IL-8ELISA试剂盒(ab214030,abcam)进行分析。每个测定都按照制造商的方案进行。简而言之,向每个孔添加100 μ l的标准溶液或样本培养基。温育2小时后,将孔用300 μ l制造商提供的洗涤缓冲液洗涤5次并与二抗一起温育1小时。洗涤后,向每孔添加100 μ l的TMB底物,避光温育20分钟。最后,每孔添加100 μ l的停止溶液,并在读板器(M200, Tecan, 瑞士)中测量所述板。对于所有的ELISA测定,我们都使用多模式读板器(M200, Tecan, 瑞士)来测量样本的光密度。使用四参数逻辑曲线拟合法绘制各标准的平均光密度和浓度,来生成标准曲线。使用所述标准曲线将样本测量结果换算为目标浓度。

[0145] 为了对作为IBD并发症的肠纤维化进行建模,将人类肠干细胞与 1×10^6 个细胞/ml的原代人类肠成纤维细胞在基质胶(356255, Corning, USA)中共培养。将这种含细胞的水凝胶溶液注入所述装置中,以在所述类器官培养室中形成微组织构建体。在常规细胞培养箱中胶凝15分钟后,每孔中添加750 μ l的IntestiCult™类器官生长培养基(06010, STEMCELL Technologies, 加拿大)并维持14天,以诱导肠类器官发育和成纤维细胞增殖。在此期间,每隔一天补充所述培养基。

[0146] 关于在OCTOPUS-EVO中形成血管化的人类类肠,将所述完全组装的装置在细胞培养之前通过将其暴露在紫外(UV)光(Electro-Lite ELC-500)下至少30分钟进行灭菌。为了在OCTOPUS-EVO中工程改造血管化的类器官,制备20 μ l含有下列物质的细胞悬浮液:纤维蛋白原(5mg/ml; F8630, Sigma)、凝血酶(1U/ml; T7513, Sigma)、抑酶肽(0.15U/ml; A1153, Sigma)、人类肠干细胞、原代人类脐静脉内皮细胞(HUVEC) (5×10^6 个细胞/ml)和原代正常人类肺成纤维细胞(NHLF) (1×10^6 个细胞/ml),并将其经由入口进入孔注入开放式细胞培养室中。然后将所述装置放在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂的细胞培养箱中30分钟。胶凝后,向培养基池和侧微通道添加与EGM-2内皮细胞培养基混合的IntesCult培养基。在形成载有细胞的水凝胶构建体后,将所述侧微通道与纤连蛋白溶液(25 μ g/ml, 在pBS中; 356008, Corning)一起在37 $^{\circ}$ C下温育2小时,以在所述通道表面建立ECM涂层。然后,用IntesCult/EGM-2洗涤所述通道,在两个通道中引入10 μ l的HUVEC悬液(1×10^7 个细胞/ml)。使接种的细胞用1小时时间附着在所述通道表面。温育1小时后,将预温热的培养基添加到每个培养基池中。该培养条件允许内皮细胞在侧通道和水凝胶支架的表面上形成汇合的单层,以诱导内皮细胞衬和自组装的血管系统之间在所述水凝胶中接合。

[0147] 为了检查类器官的生存力,对哺乳动物细胞使用Live/Dead™生存力/细胞毒性试剂盒(L3224, ThermoFisher Scientific, 美国)。对于该测定,将钙黄绿素AM(2 μ M)和溴乙吡锭同二聚体1(4 μ M)在活细胞成像溶液中的混合物引入含有OCTOPUS的孔中,并在室温下温

育30分钟。随后,将样本用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤三次,然后用激光扫描共焦显微镜(LSM 800,Carl Zeiss,德国)检查标记的细胞。为了定量分析,从分别通过钙黄绿素AM和溴乙锭同二聚体-1生成的荧光计算健康和坏死的类器官的分率。在每个装置中,使用30个类器官进行分析。

[0148] 为了考查在OCTOPUS和水凝胶滴中扩散的时空模式,使用FITC-葡聚糖,4kDa FITC-葡聚糖或70kDa FITC-葡聚糖(FD70S-100MG,Sigma,美国),作为荧光示踪剂进行可视化。为了该测定,用FITC-葡聚糖溶液(在PBS中50 μ g/ml)代替类器官培养基。使用激光扫描共焦显微镜(LSM 800,Carl Zeiss,德国)对葡聚糖扩散进行监测和可视化。采集120分钟的延时图像,并使用ZEN软件(Zeiss,德国)进行处理,以测量水凝胶支架内规定位置处荧光强度的时间变化。

[0149] 为了检测肠类器官内的增殖细胞,使用EdU测定/EdU染色增殖试剂盒—iFluor 647(AB222421,Abcam,美国)。简而言之,将类器官与EdU溶液(在培养基中20 μ M)一起在正常培养条件(5% CO₂,37 $^{\circ}$ C)下温育3小时。然后,根据制造商的方案,将类器官用PBS洗涤两次,在4%甲醛中固定,并使用通透缓冲液进行透化。将样本用iFluor 647叠氮染料染色,并用共焦显微镜(LSM 800,Carl Zeiss,德国)可视化。

[0150] 对于钙成像,从培养孔中除去类器官培养基,并将类器官构建体在活细胞成像溶液(LCIS)中洗涤一次。然后,将类器官与根据制造商的方案制备的Fluo-4钙成像溶液(F10489,ThermoFisher Science,美国)一起上样。将样本在37 $^{\circ}$ C下温育30分钟,随后在室温下再温育30分钟。随后,去除Fluo-4溶液,并将类器官用LCIS洗涤一次。所有样本都保存在新鲜的LCIS中直到使用。使用倒置落射荧光显微镜(Axio Observer D1,Zeiss,德国)将用100 μ M ATP(A1852,Sigma,美国)和50mM葡萄糖(G7021,Sigma,USA)刺激后的类器官的钙染色可视化。

[0151] 对于Ca²⁺水平变化的比率分析,在实验期间测量每个类器官的荧光强度,并将数值使用下面的等式根据类器官的静息强度进行归一化。

$$[0152] \quad \Delta Ca^{2+} = (F - F_{\text{静息}}) / F_{\text{静息}} \quad (1)$$

[0153] 为了研究肠类器官的GLP-1和粘蛋白2分泌,在培养的第5、7和10天时收集孔中的培养基。使用多物种总GLP-1 ELISA(Multi-species GLP-1total)试剂盒(EZGLP1T-36K, Millipore Sigma,美国)、胰高血糖素样肽-1(活性)ELISA试剂盒(EGLP-35K,Millipore Sigma,美国)和MUC2 ELISA试剂盒(ABIN6730976,antibodies-online Inc,美国)分别测量总GLP-1、活性GLP-1和粘蛋白2的浓度。每个测定都按照制造商的方案进行。简而言之,向每个孔添加100 μ l的标准溶液或样本培养基。温育2小时后,将孔用300 μ l制造商提供的洗涤缓冲液洗涤5次并与二抗一起温育1小时。洗涤后,向每孔添加100 μ l的TMB底物,避光温育20分钟。最后,每孔添加100 μ l的停止溶液,并在读板器(M200,Tecan,瑞士)中测量所述板。

[0154] 为了分析所述肠纤维化模型中的纤连蛋白产生,使用小鼠纤连蛋白ELISA试剂盒(ab108849,Abcam,美国)。在特定的时间点收集孔中的培养基,并使用制造商提供的方案进行测定。首先,将50 μ l标准样本或装置收集的样本添加到每个孔中,并在室温下温育2小时。随后,将孔用300 μ l洗涤缓冲液洗涤5次,然后与纤连蛋白抗体一起温育1小时。洗涤后,向每个孔添加链霉亲和素-过氧化物酶缀合物,温育30分钟,再次洗涤。将样本与50 μ l的色原底物一起温育10分钟,随后引入50 μ l的停止溶液。

[0155] 对于所有的ELISA测定,都使用多模式读板器(M200,Tecan,瑞士)来测量样本的光密度。使用四参数逻辑曲线拟合法绘制各标准的平均光密度和浓度,来生成标准曲线。使用所述标准曲线将样本测量结果换算为目标浓度。

[0156] 对于某些共培养演示,使用了原代小鼠肠成纤维细胞(mIF)和原代人类脐静脉内皮细胞(HUVEC)。对于从低温保存中的初始扩增,将MIF和HUVEC根据制造商的方案分别使用补充有生长因子的完全成纤维细胞培养基(M2267,Cell Biologics,美国)和内皮细胞生长培养基(EGM)-2(CC-3162,Lonza,瑞士),在75cm²烧瓶中进行培养。使用原代mIF和原代人类肠成纤维细胞建立肠纤维化模型。所有细胞都经过3次和6次之间的传代。

[0157] 为了在OCTOPUS中形成一种适合于例如进行药物测试的肠纤维化模型,将小鼠肠干细胞与1×10⁶个细胞/ml的小鼠肠成纤维细胞在基质胶(356255,Corning,美国)中混合。将这种含细胞的水凝胶溶液注入所述装置中,以在所述类器官培养室中形成微组织构建体。在常规细胞培养箱中胶凝15分钟后,每孔中添加750μl的IntestiCult™类器官生长培养基(06010,STEMCELL Technologies,加拿大)并维持5天,以诱导肠类器官发育和成纤维细胞增殖。在此期间,每隔一天补充所述培养基。为了诱导纤维化,在第5天向培养孔添加1ng/ml的TGF-β(T5050,Sigma,美国),并再维持7天。在第12天使用可商购的吡非尼酮(P1871,TCI America,美国)和尼达尼布(S1010,Selleckchem,美国)以指定浓度进行药物施用。将所述纤维化模型用药物处理48小时,然后使用本文描述的方法分析其纤维化表型的变化。

[0158] 为了考查OCTOPUS和基质胶滴中的氧扩散,将二氯三(1,10-菲咯啉)钌(II)水合物(Ru(Phen)3)(Sigma,目录号343714)用作氧指示剂—溶解氧分子诱导该荧光染料猝灭。简而言之,将15μl的Ru(Phen)3(2mM)和270μl的基质胶与15μl的亚硫酸钠(200mM)(Sigma,目录号S0505)混合,亚硫酸钠用于去除基质胶中剩余的水合氧。然后,使用所述混合物在OCTOPUS和基质胶滴中生成3D组织构建体。通过共焦显微镜监测氧扩散,在此期间,以规定的时间间隔和构建体内的位置采集图像。使用ImageJ对捕获的图像进行分析,以测量荧光强度的时空变化。

[0159] 为了测试微工程的血管网络的灌注性,使用荧光标记的1-μm微球(FluoSpheres;F-8815,ThermoFisher)作为流动示踪剂。为了生成通过血管系统的流动,抽出所述池中的培养基,并将微珠溶液插入一个所述侧微通道。这种构造建立了跨水凝胶支架的流体静压梯度,并为微球通过血管的流动提供了驱动力。使用激光扫描共焦显微镜(LSM 800,Carl Zeiss,德国)来监测和可视化血管的灌注。

[0160] 为了进行单核细胞浸润测定,从宾夕法尼亚大学(University of Pennsylvania)的人类免疫学中心(Human Immunology Core)获得了人类外周血单核细胞。为了在本公开的系统中测试单核细胞的内皮黏附,将细胞用荧光染料(CellTracker Deep Red,ThermoFisher)标记并以3×10⁶个细胞/ml的终浓度悬浮在IntestiCult/EGM-2培养基中。然后,将细胞经由所述侧微通道之一注入血管中,并允许在细胞培养箱中通过血管系统流动24小时。在灌注结束时,将所述装置用DPBS洗涤三次并检查以分析黏附的、迁移的和浸润的单核细胞数量。

[0161] 使用原子力显微镜(AFM,MFP-3D-BIO,Asylum)测量肠纤维化模型中的水化微组织的硬度。使用弹簧常数为14.58pN/nm的镀金悬臂(SCONT尖端,NANOSENSORS)和棱锥压头来获得力-压痕曲线。在所述开放室中的组织样本直接使用,不做任何修改。对于所述AFM测

量,将含有微组织的所述OCTOPUS插件从所述板上取出并安装在仪器上。用一滴PBS润湿微组织后,用扫描探头测量其力学性质。利用Atomic J软件,从所述力压痕数据计算杨氏模量。

[0162] 对于免疫荧光染色,在OCTOPUS中的细胞用PBS洗涤两次,用4%多聚甲醛(Electron Microscopy Sciences,美国)在室温下固定15分钟,并再次用PBS洗涤两次。然后将所述细胞用在PBS中的0.1%Triton X-100(Sigma)透化3分钟,并在4℃下暴露于由PBS和3%牛血清白蛋白(BSA;Sigma)构成的阻断缓冲液中过夜。在用PBS洗涤两次后,将细胞针对下列目标进行免疫染色:肌动蛋白丝(Phalloidin-iFluor 488试剂,ab176753,1:1000,abcam,美国;Phalloidin-iFluor 594试剂,ab176757,1:1000,abcam,美国),成熟上皮细胞(抗EPCAM抗体,ab71916,1:250,abcam,美国;抗HNF-4- α 抗体[K9218]-芯片级,ab41898,1:500,abcam,美国),干细胞(抗Ki67抗体,ab15580,1:1000,abcam,美国;Lgr5单克隆抗体,MA5-25644,1:1000,ThermoFisher Scientific,美国),肠细胞(抗绒毛蛋白抗体[3E5G11]-N-端,ab201989,1:500,abcam,美国),杯状细胞(抗MUC2抗体,ab90007,1:200,abcam,美国),肠内分泌细胞(抗生长抑素抗体[M09204],ab30788,1:100,abcam,美国),肽转运蛋白1(抗SLC15A1/PEPT1抗体,ab203043,1:100,abcam,美国),葡萄糖转运蛋白1(抗葡萄糖转运蛋白GLUT1抗体[SPM498],ab40084,1:250,abcam,美国),内皮细胞(抗CD31抗体[JC/70A](Alexa Fluor®488),ab215911,1:100,abcam,美国), α -平滑肌肌动蛋白(重组抗 α -平滑肌肌动蛋白抗体[E184],ab32575,1:500,abcam,美国),纤连蛋白(抗纤连蛋白抗体[IST-9],ab6328,1:200,abcam,美国), α -平滑肌肌动蛋白(重组抗 α -平滑肌肌动蛋白抗体[E184],ab32575,1:500,abcam,美国),纤连蛋白(抗纤连蛋白抗体[IST-9],ab6328,1:200,abcam,美国),裂解型半胱天冬酶-3(抗剪切型半胱天冬酶-3抗体[E83-77],ab32042,1:200,abcam,美国),膜联蛋白V(抗膜联蛋白V/ANXA5抗体[EPR3980],ab108194,1:500,abcam,美国),或ICAM1(抗ICAM1抗体[EPR24639-3],ab282575,1:500,abcam,美国)。与一抗一起在4℃下温育过夜后,将所述细胞用PBS洗涤两次,并与二抗(山羊抗兔IgG H&L(Alexa Fluor®488),ab150077,1:1000,abcam,美国;山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor®488),ab150113,1:1000,abcam,美国;山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor®594),ab150116,1:1000,abcam,美国;山羊抗兔IgG H&L(Alexa Fluor®594),ab150080,1:1000,abcam,美国)一起在4℃下温育过夜。对于细胞核染色,使用以1:1000稀释的DAPI(D1306,ThermoFisher Scientific,美国)。染色细胞的荧光图像使用激光扫描共焦显微镜(LSM 800,Carl Zeiss,德国)采集并使用ZEN软件(Zeiss,德国)和ImageJ软件进行处理。

[0163] 对于人类类肠的苏木精和伊红(H&E)染色,将类器官用冷PBS洗涤并用4%多聚甲醛(Electron Microscopy Sciences,美国)固定。然后将所述类器官重悬在由2%细菌琼脂和2.5%明胶构成的包埋凝胶中并作为液滴转移到包埋架上。凝胶凝固30分钟后,将包埋类器官的凝胶放入预先标记的组织盒中,并浸入70%乙醇中。将含有石蜡切片的载玻片通过将所述载玻片依次浸入3X二甲苯、2X 100%乙醇、95-95-80-70%乙醇和蒸馏水中来脱蜡和复水。然后,将所述载玻片浸泡在10mM柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中,并在微波炉中温育15分钟。温和漂洗所述载玻片后,用蛋白质封闭剂封闭组织切片。为了进行H&E染色,所述载玻片浸泡在苏木精中,随后用去离子水漂洗。将所述载玻片进一步在伊红中浸泡30秒,并在95%乙醇-100%乙醇-二甲苯溶液中脱水。使用Permount用盖玻片覆盖组织切片,并储存直至分

析。

[0164] 如下进行定量RT-PCR分析。对于RNA分离,通过用冷PBS溶解包含类器官的基质胶来获取类器官。在4℃下以300×g离心5分钟后,去除上清液,并将沉淀的类器官重悬在350μL的RLT缓冲液(QIAGEN)中。使用RNeasy Mini试剂盒(QIAGEN)根据制造商的说明分离总RNA。使用iScrip cDNA合成试剂盒(Bio-Rad)按照制造商的说明合成cDNA。使用TaqMan®基因表达测定进行定量RT-PCR。

[0165] 对于单细胞测序分析,将收集的类器官在胰蛋白酶中在37℃下温育10分钟,并通过20-μm细胞滤网。将分离的单细胞以700个活细胞/μl的密度重悬在有5%胎牛血清(FBS)的DMEM中。然后将所述细胞用台盼蓝染色以检查其生存力,并在显微镜下计数两次以确定平均细胞浓度。

[0166] 将每个类器官样本的单细胞悬液根据制造商的方案加载到10X Genomics Single Cell 3' Reagent Kit v2文库芯片(10X Genomics)的单独通道上。来自单细胞的RNA转录物给予唯一的条形码并逆转录。根据制造商的方案(10X文库制备用户指南)制备cDNA测序文库,并使用S1 100循环流动池v1.5在Illumina NovaSeq 6000上测序。文库质量控制使用Agilent TapeStation进行尺寸控制(bp)和使用KAPA qPCR进行浓度(nM)控制。使用Cell Ranger流程(10X Genomics, v.5.0.0)处理原始序列读取数据以进行多路分解,并与人类基因组GRCh38转录组进行比对。样本数据使用Cell Ranger aggr流程进行聚合,并将文库进行跨样本集的测序深度归一化。共有5个类器官样本计数矩阵合并在一起用于细胞类型鉴定和直接比较。

[0167] 关于统计分析,基于每个试验组最少n=3个独立装置来确定每个实验的样本量。使用OriginLab(OriginLab公司,美国)对数据进行student t检验分析,并表示为均值±S.E.M。通过单因素方差分析将所获得数据的统计学显著性归属为为*P<0.05、**P<0.01和***P<0.001的值。

[0168] 实施方式

[0169] 以下实施方式仅仅是说明性的,并不限制本公开或所附权利要求的范围。

[0170] 实施方式1.一种用于培养类器官的装置,所述装置包括:被构造成接收溶液的进入孔;加载室,其中所述进入孔位于所述加载室中;和多个培养室,其中所述培养室从所述加载室放射状伸出,使得经由所述进入孔被注入所述加载室中的溶液被分配到所述多个培养室中,其中所述多个培养室对外部环境开放并且在所述多个培养室的开口处包括突起边缘。

[0171] 实施方式2.实施方式1的装置,其中所述装置包含聚二甲基硅氧烷。

[0172] 实施方式3.实施方式1或2的装置,其中所述装置是光学透明的。

[0173] 实施方式4.实施方式1-3中任一项的装置,其中所述进入孔位于所述加载室的中央。

[0174] 实施方式5.实施方式4的装置,其中所述多个培养室相对于绕所述进入孔的周围而言是对称的。

[0175] 实施方式6.实施方式5的装置,其中经由所述进入孔被注入所述加载室中的溶液被均匀地分配到所述多个培养室中。

[0176] 实施方式7.实施方式1-6中任一项的装置,其中所述装置被构造成经由所述多个

培养室的开口来接触来自外部环境的培养基。

[0177] 实施方式8.实施方式1的装置,其中所述溶液是水凝胶溶液。

[0178] 实施方式9.实施方式1的装置,其中所述水凝胶溶液包含细胞或类器官。

[0179] 实施方式10.实施方式1的装置,其中所述类器官是人类类器官。

[0180] 实施方式11.实施方式1-10中任一项的装置,其中所述培养室中每一个的宽度或高度为约100 μ m至约5cm。

[0181] 实施方式12.实施方式11的装置,其中所述培养室中每一个的宽度和高度为约1cm。

[0182] 实施方式13.实施方式1-12中任一项的装置,其中在培养第21天时,所述培养室中至少约80%的所述类器官是存活的。

[0183] 实施方式14.实施方式1-13中任一项的装置,其中所述突起边缘被构造在所述培养室的开口处牵制所述溶液的弯月面,从而允许填充所述培养室而所述溶液不经由所述开口溢出。

[0184] 实施方式15.实施方式1-14中任一项的装置,其中每个培养室包含用于共培养的不同类型的细胞或类器官。

[0185] 实施方式16.实施方式1-15中任一项的装置,其中所述类器官的生长持续至少约21天。

[0186] 实施方式17.实施方式1-16中任一项的装置,其中所述类器官的尺寸增长至少约21天。

[0187] 实施方式18.实施方式17的装置,其中所述装置降低所述类器官尺寸的变异性。

[0188] 实施方式19.一种用于培养类器官的方法,所述方法包括:将包含细胞或类器官的溶液经由进入孔注入加载室中;用所述包含细胞或类器官的溶液填充多个培养室,其中所述培养室从所述加载室放射状伸出,使得被注入所述加载室中的溶液被分配到所述多个培养室中,其中所述多个培养室对外部环境开放并且包括在所述培养室的开口处的突起边缘以防止溶液经由所述开口溢出;以及经由所述多个培养室的开口向所述装置提供培养基。

[0189] 实施方式20.实施方式19的方法,其中所述进入孔位于所述加载室的中央。

[0190] 实施方式21.实施方式20的方法,其中所述多个培养室相对于绕所述进入孔的周圈而言是对称的。

[0191] 实施方式22.实施方式21的方法,其中经由所述进入孔被注入所述加载室中的溶液被均匀地分配到所述多个培养室中。

[0192] 实施方式23.实施方式19-22中任一项的方法,其中所述溶液是水凝胶溶液。

[0193] 实施方式24.实施方式19-23中任一项的方法,其中所述类器官是人类类器官。

[0194] 实施方式25.实施方式23或24的方法,其中所述水凝胶溶液在被注入所述加载室中并被分配到所述多个培养室中后,在所述多个培养室中凝固而形成水凝胶。

[0195] 实施方式26.实施方式19-25中任一项的方法,其中在培养第21天时,所述培养室中至少约80%的所述类器官是存活的。

[0196] 实施方式27.实施方式19-26中任一项的方法,其中每个培养室包含用于共培养的不同类型的细胞或类器官。

[0197] 实施方式28.实施方式19-27中任一项的方法,其中所述类器官的生长持续至少约

21天。

[0198] 实施方式29.实施方式19-28中任一项的方法,其中所述类器官的尺寸增长至少约21天。

[0199] 实施方式30.实施方式17的方法,其中所述装置降低所述类器官尺寸的变异性。

[0200] 实施方式31.实施方式19-30中任一项的方法,其中所述培养基包含可溶性因子。

[0201] 实施方式32.实施方式31的方法,其中所述可溶性因子选自生长因子、活性剂及其组合。

[0202] 实施方式33.实施方式19-32中任一项的方法,其还包括使所述类器官成熟。

[0203] 实施方式34.实施方式19-33中任一项的方法,其还包括评估所述多个培养室中类器官的生存力和成熟度。

[0204] 本说明书中引用的所有专利、专利申请、出版物、产品说明、和方案在此通过引用整体并入。在术语冲突的情况下,以本公开内容为准。

[0205] 虽然本文所述的主体非常适于实现上述的益处和优点将是显而易见的,但是本公开的主题不被本文所述的具体实施方式限制范围。应当领会,本公开的主题,在不背离其精神的情况下,可进行修改、变化和改变。本领域技术人员将会只不过使用例行实验就认识到或能够确定本文所述的具体实施方式的许多等效体。这样的等效体旨被权利要求包括在内。

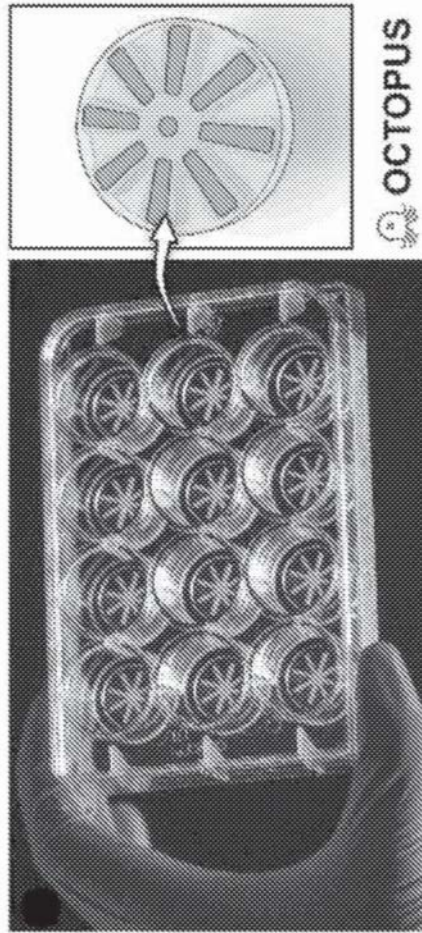


图1A

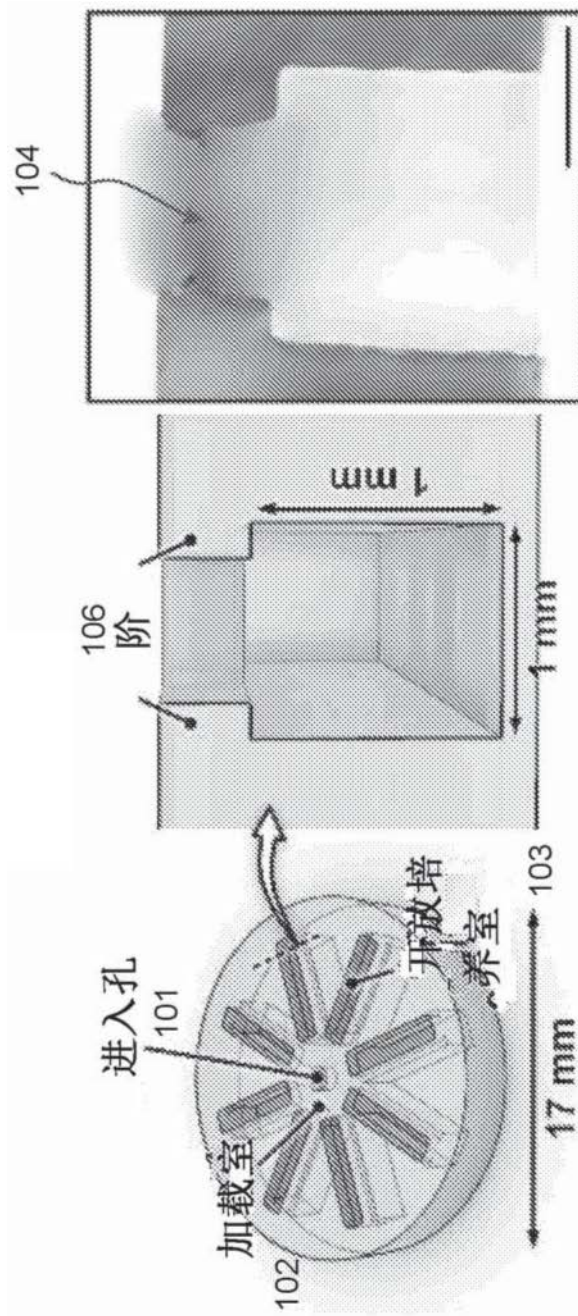


图1B

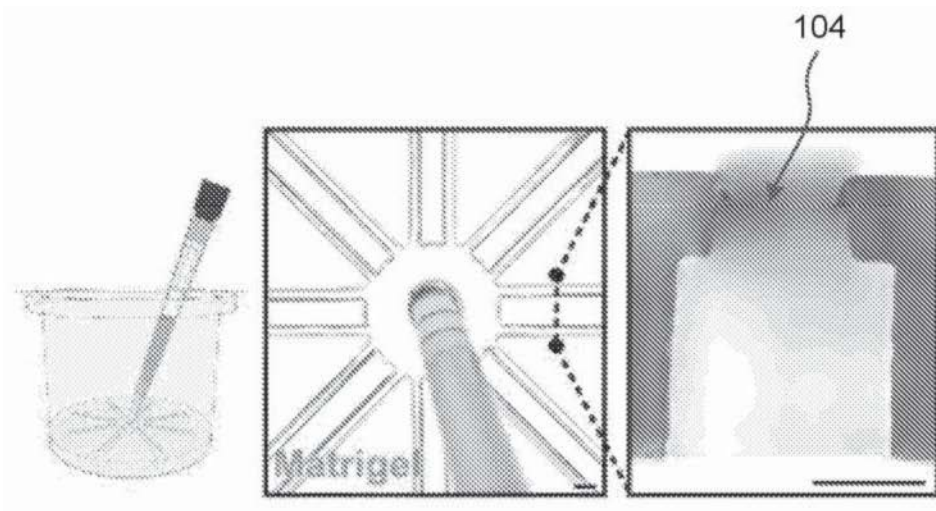


图1C

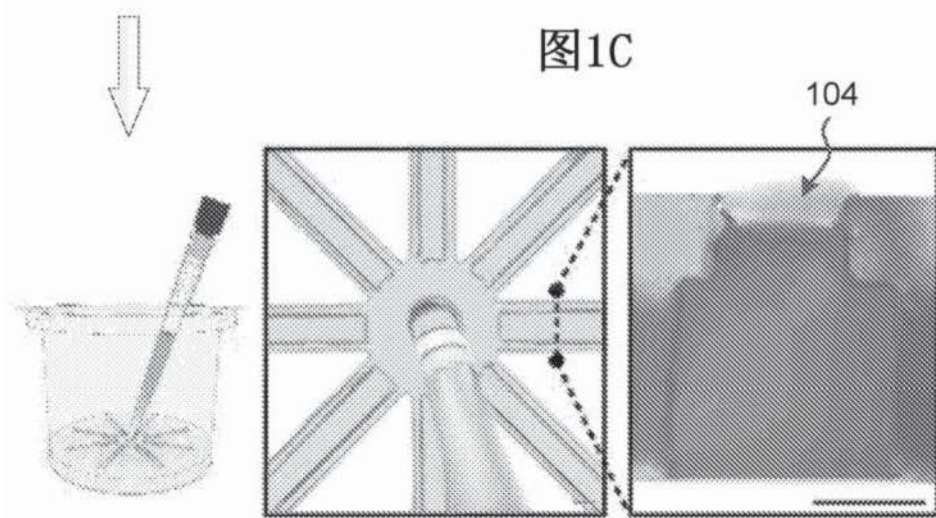


图1D

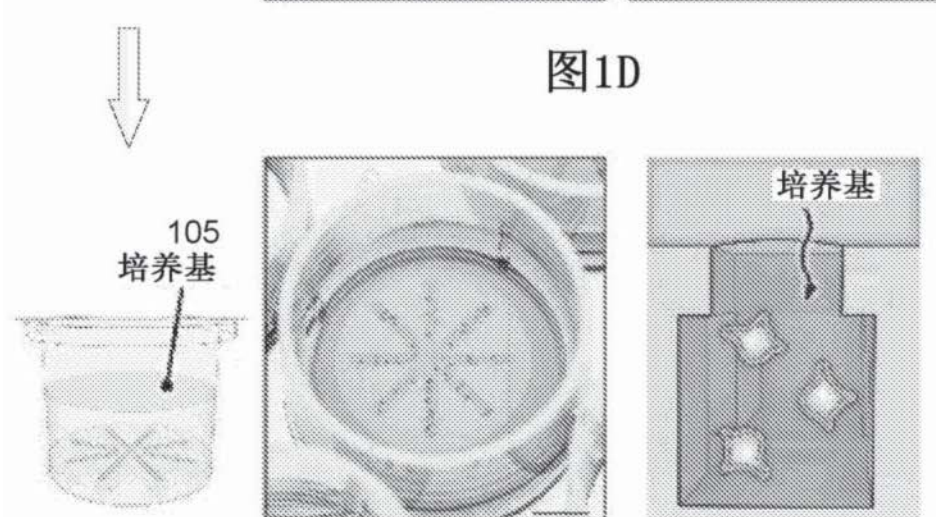


图1E

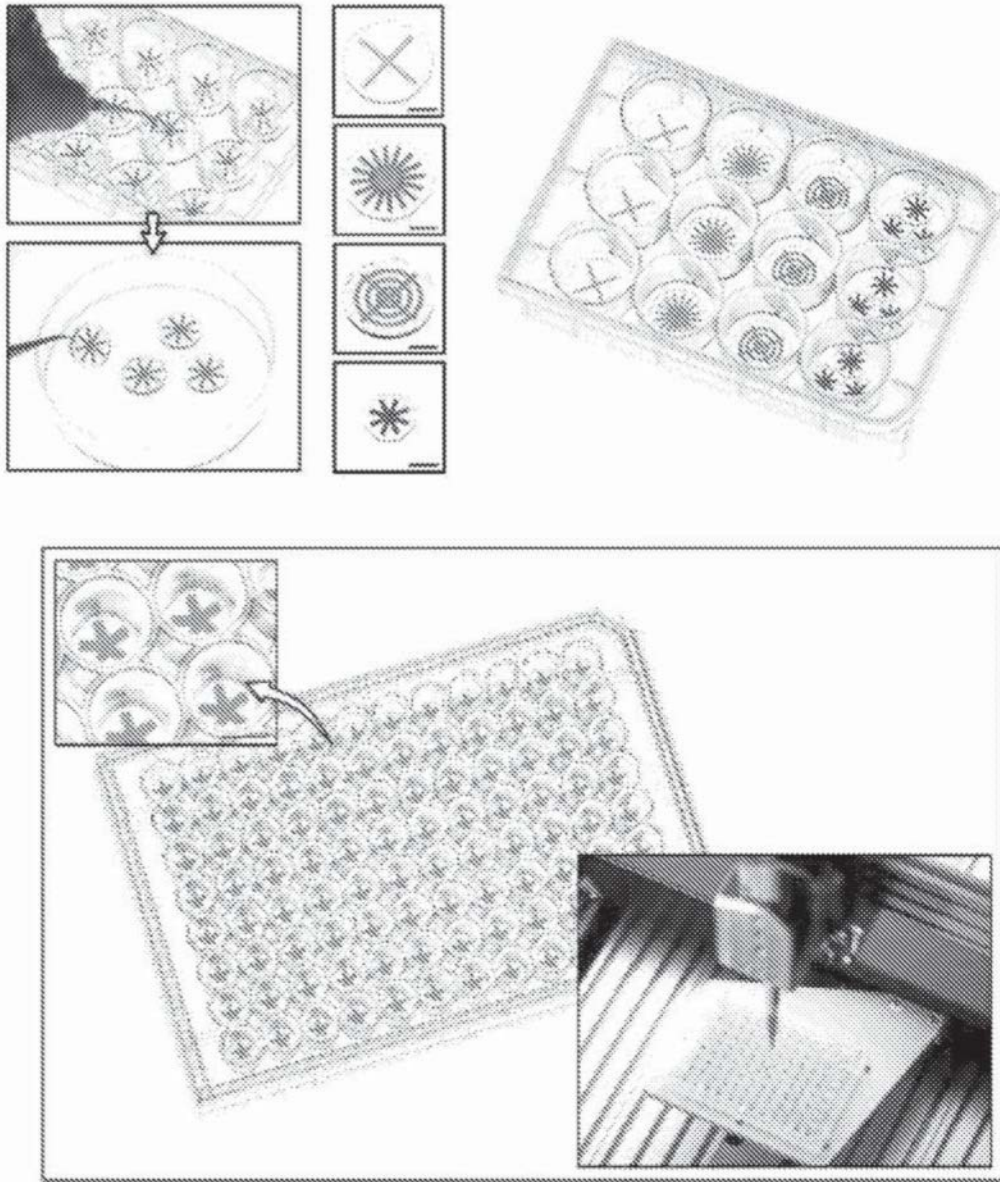


图1F

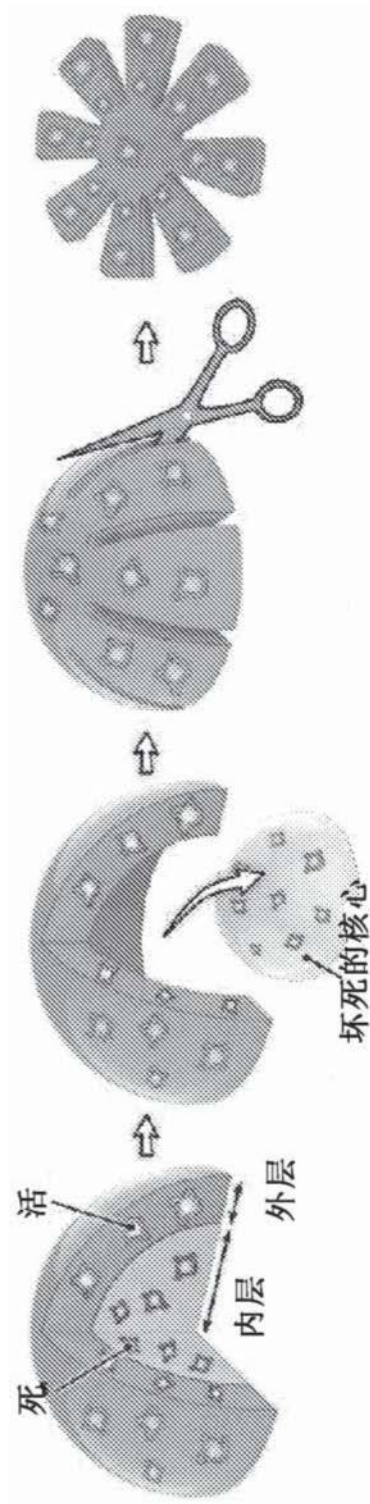


图1G

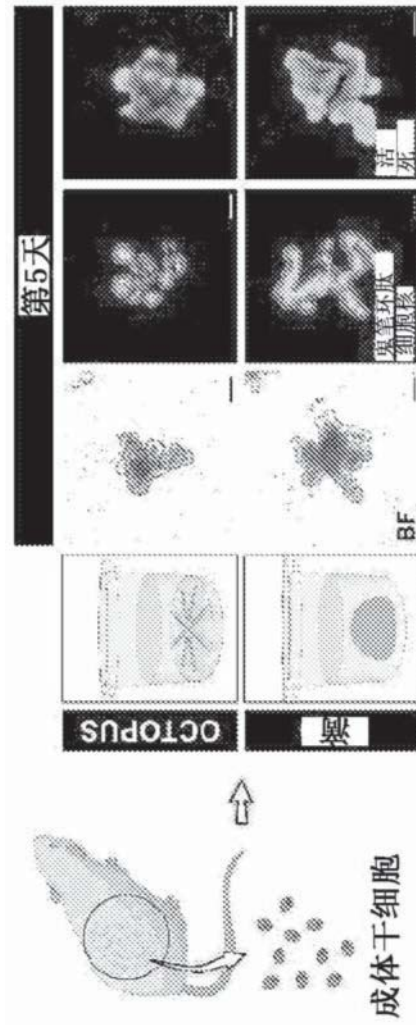


图2A

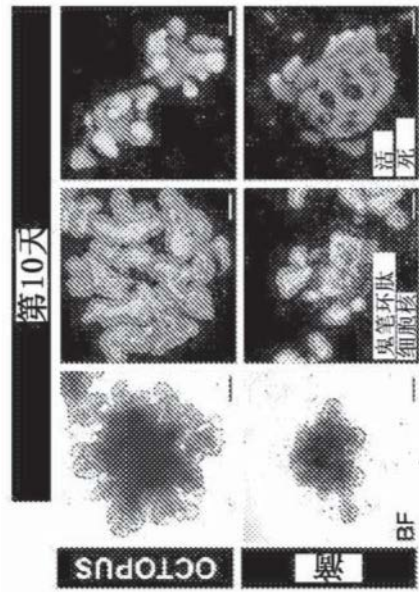


图2B

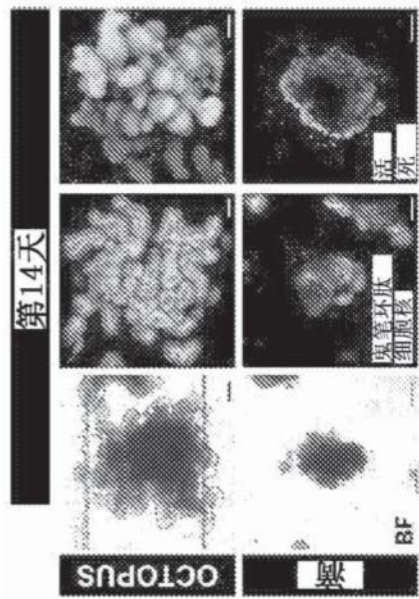


图2C

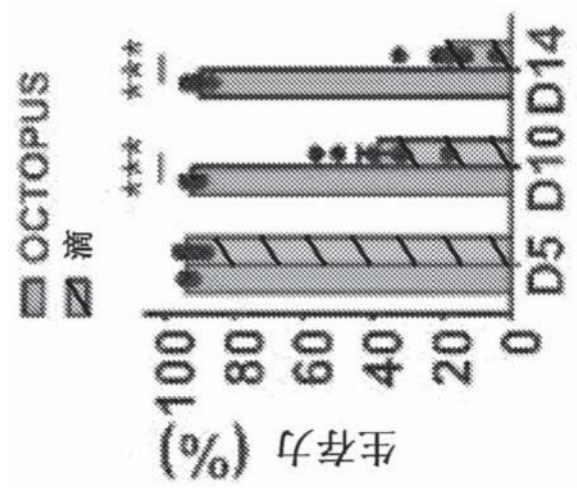


图2D

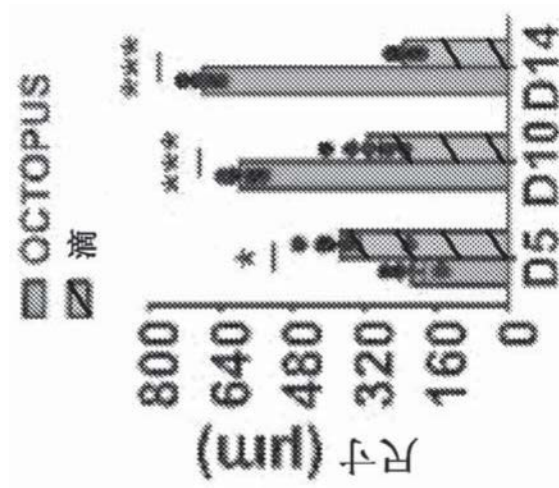


图2E

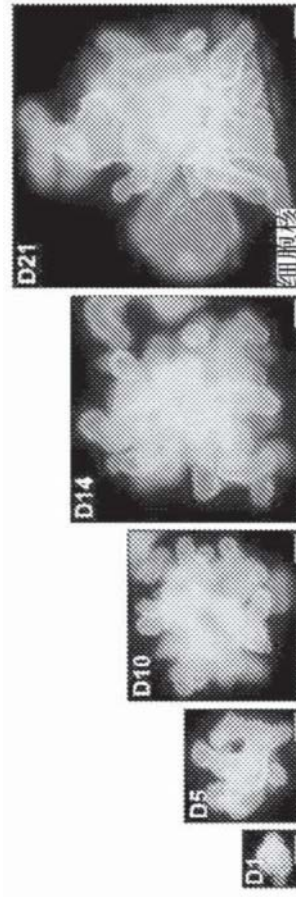


图2F

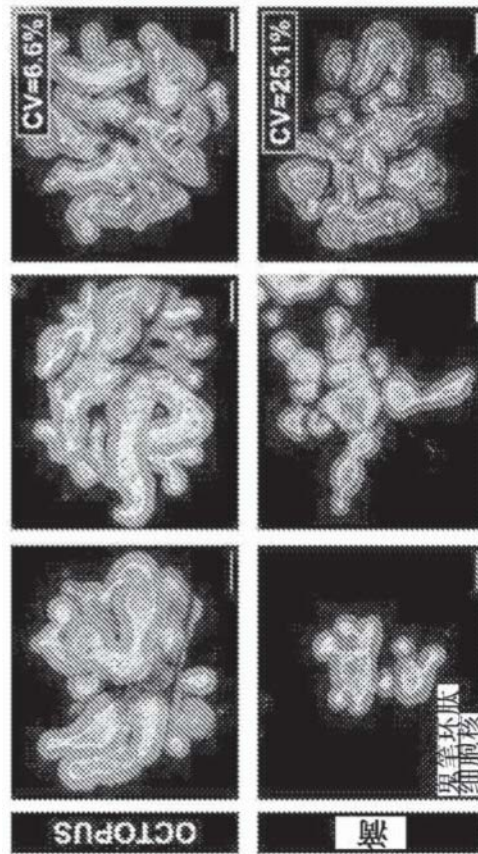


图2G

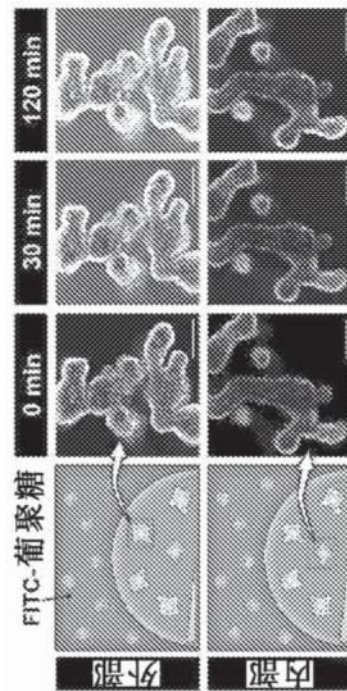


图2H

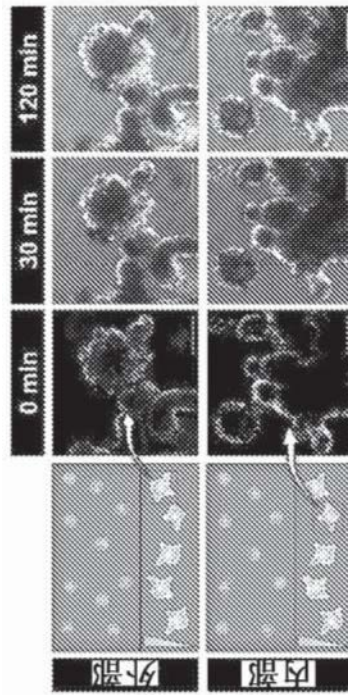


图2I

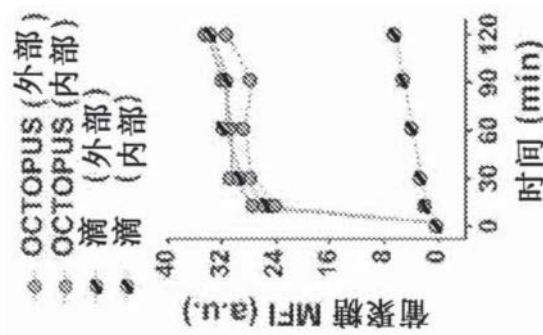


图2J

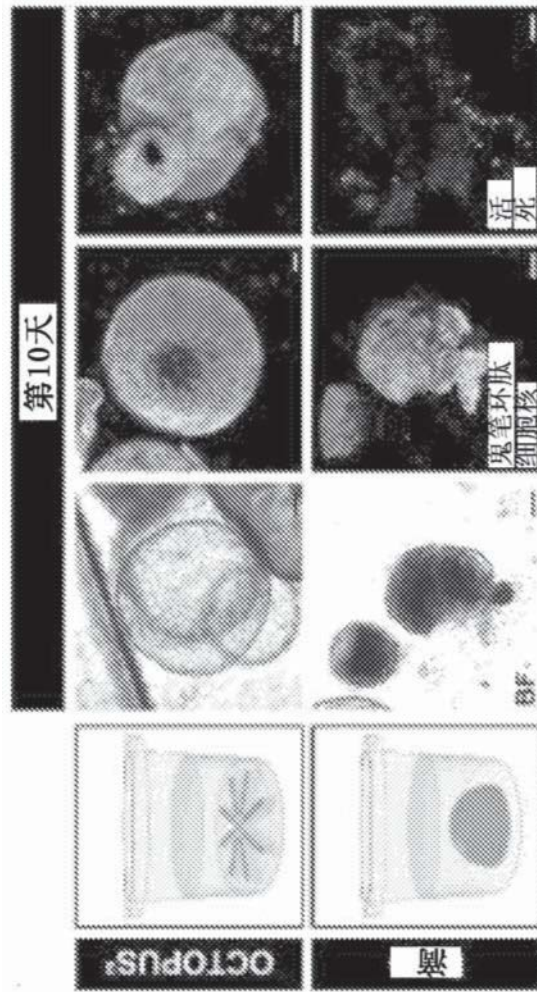


图2K

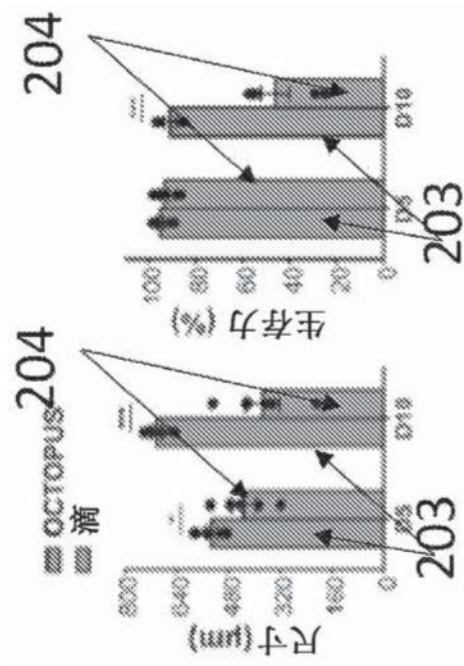


图2L

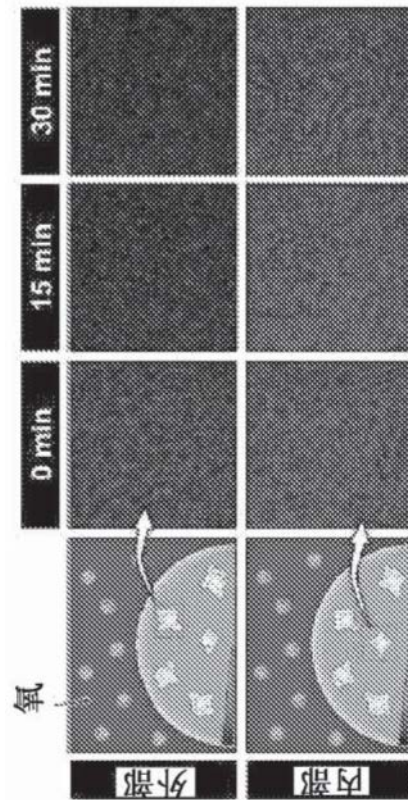


图2M

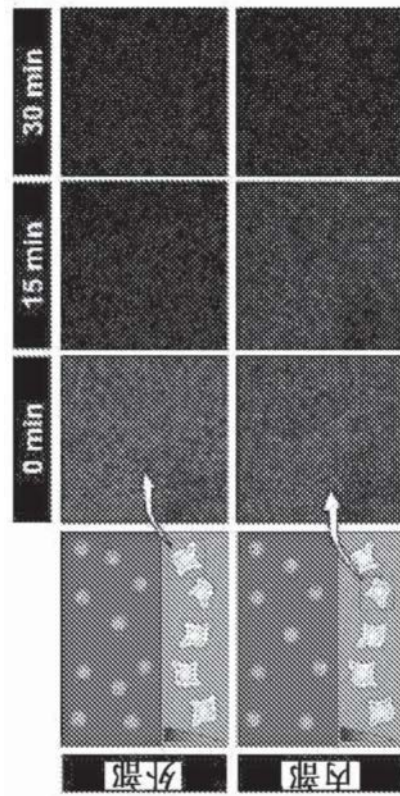


图2N

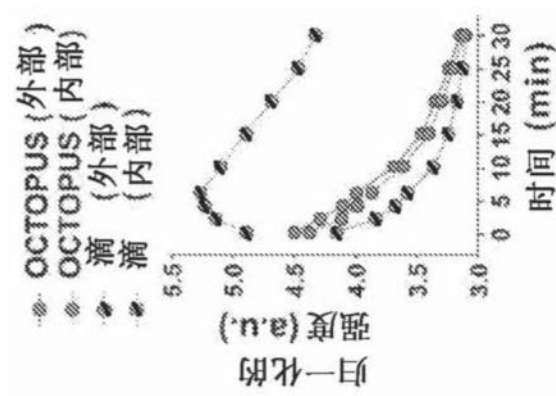


图2O

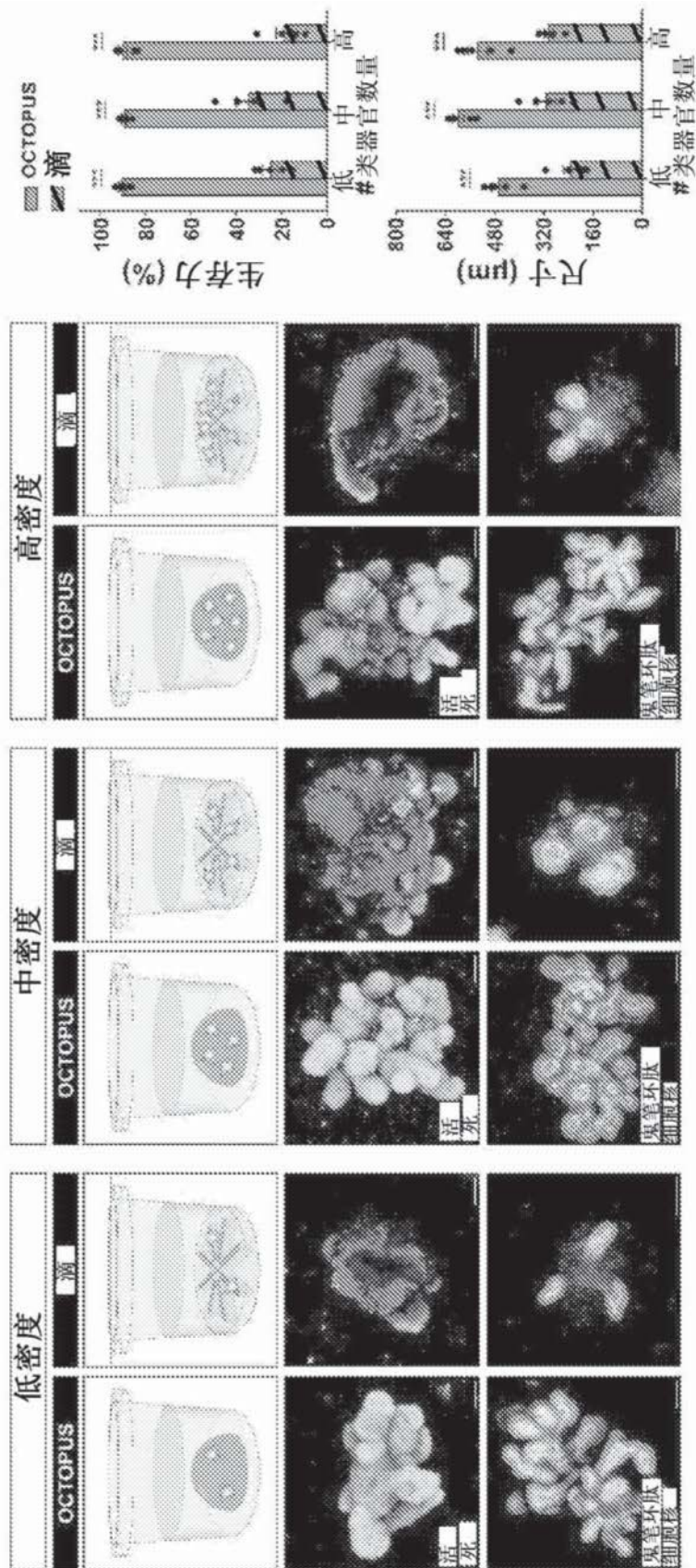


图2P

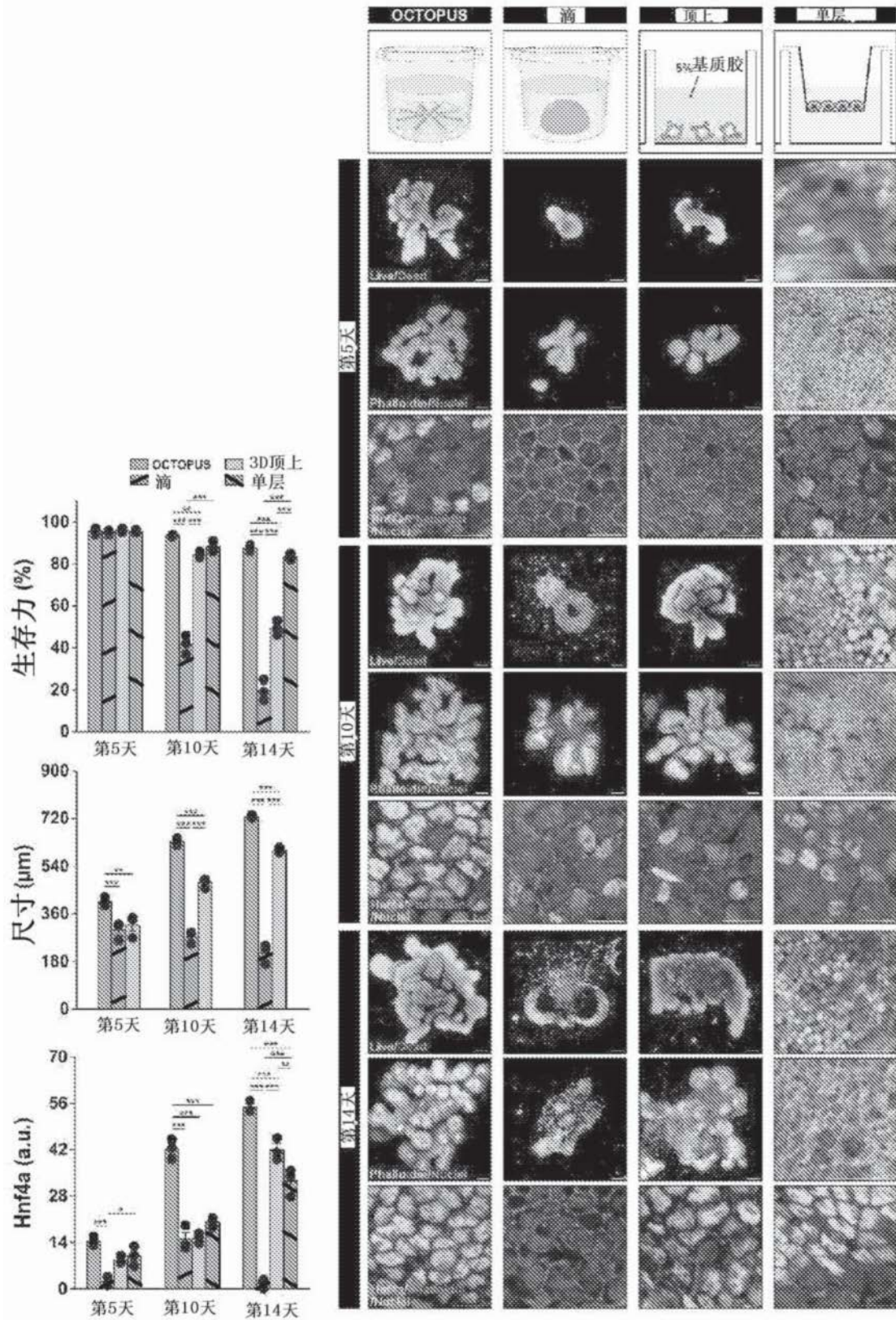


图2Q

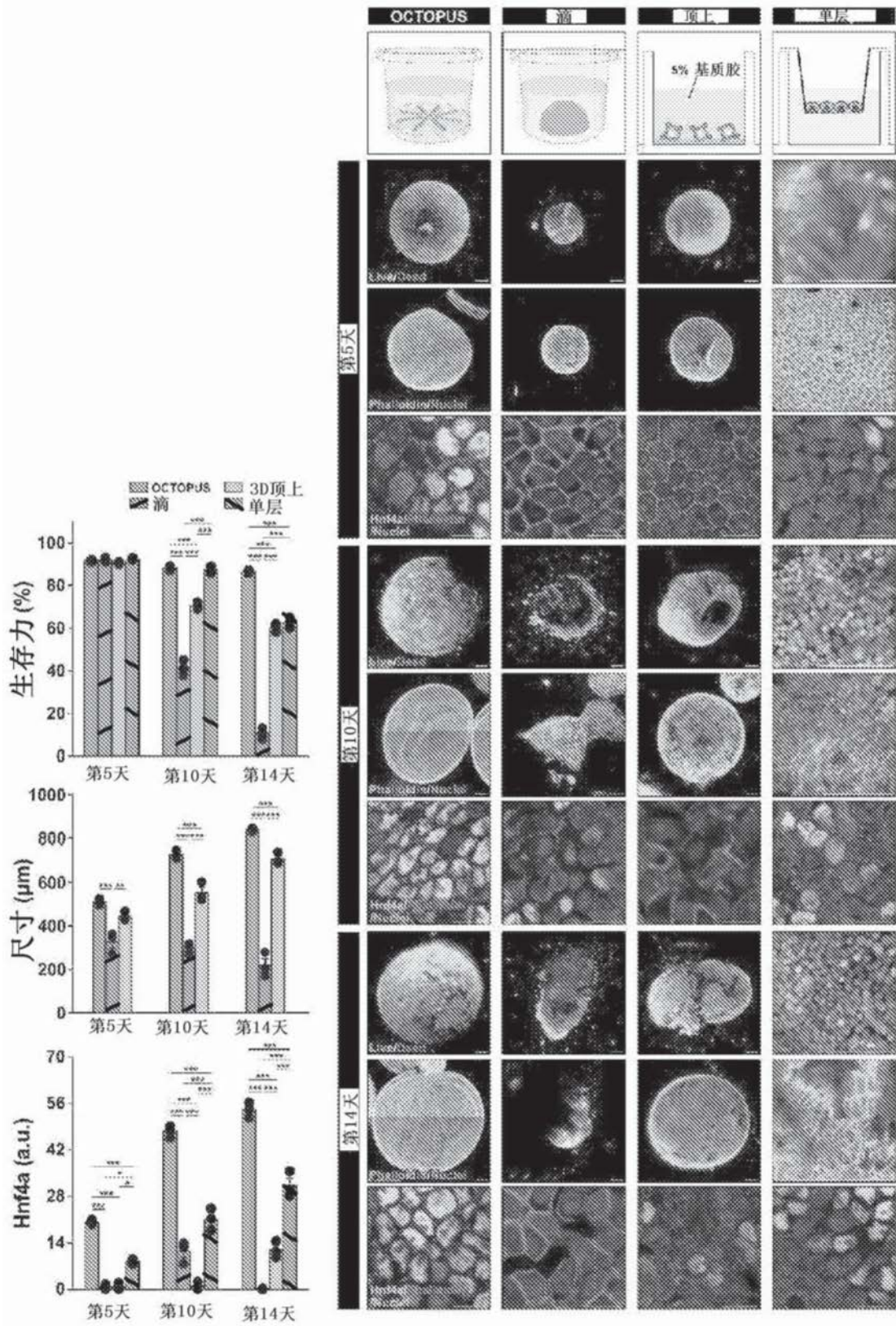


图2R

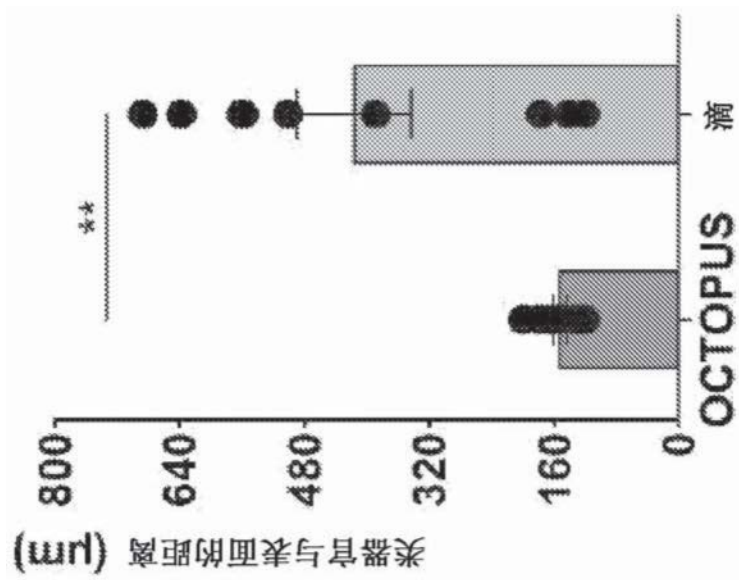


图2S

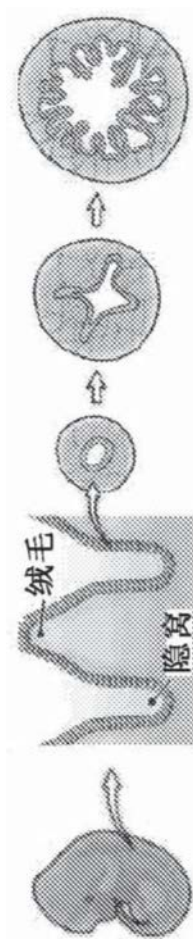


图3A



图3B



图3C

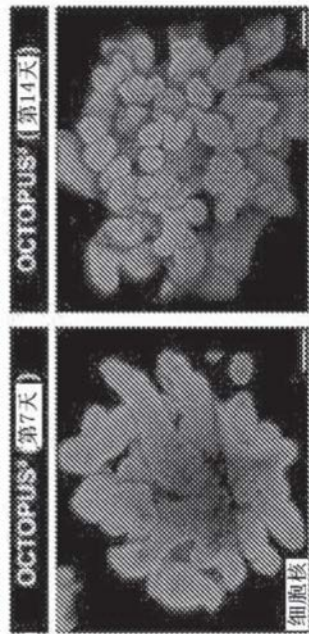


图3D

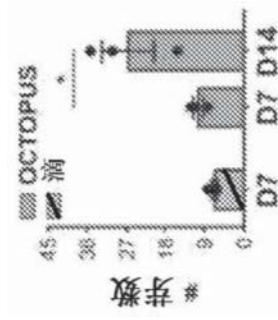


图3E

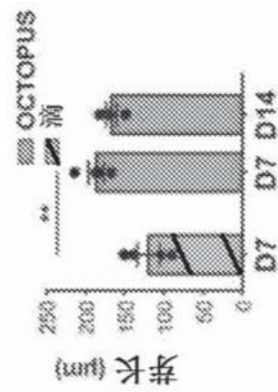


图3F

#绒毛数 (平均值 ± SEM)	
体内	滴
12.6 ± 0.13 (n=15.5)	10.3 ± 1.2 (第7天)
30.5 ± 0.22 (n=18.5)	26.7 ± 0 (第14天)
	6.7 ± 0.7 (第7天)

图3G

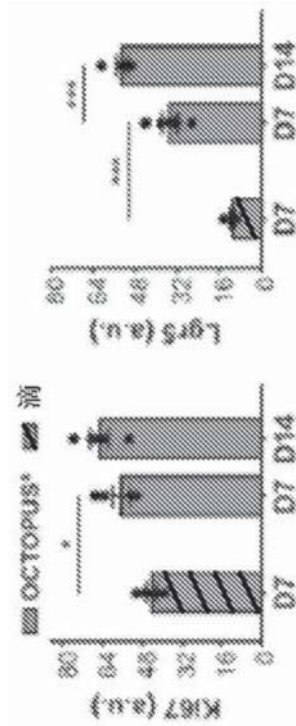


图3H

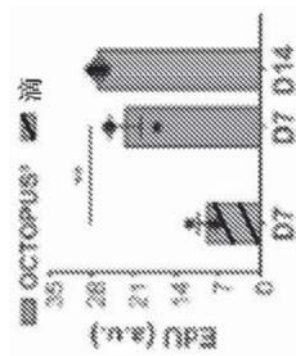


图3I

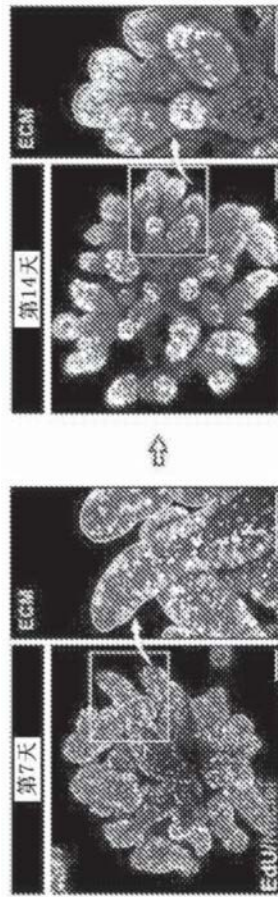


图3J

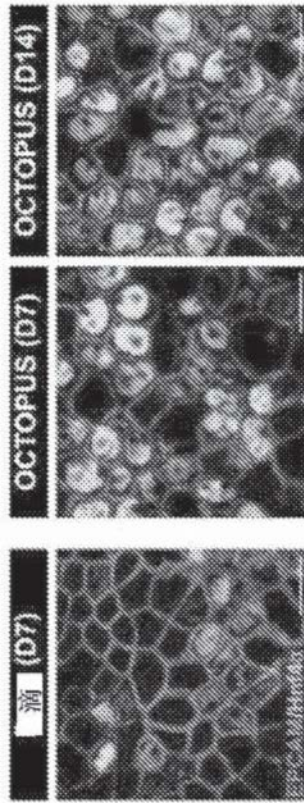


图3K

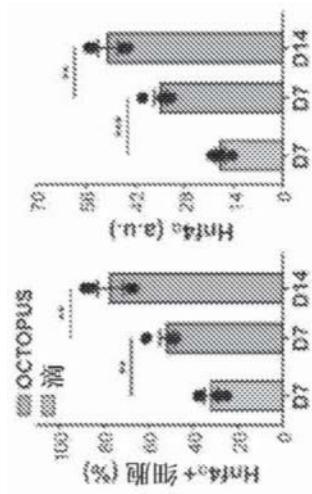


图3L

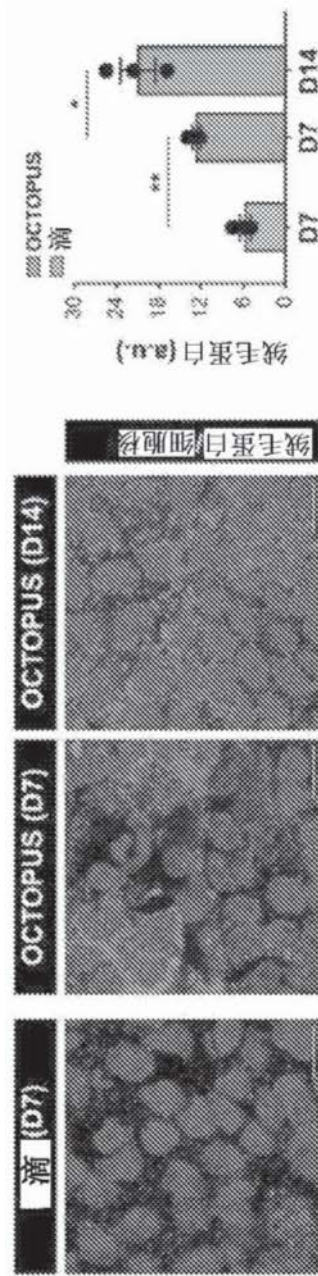


图3M

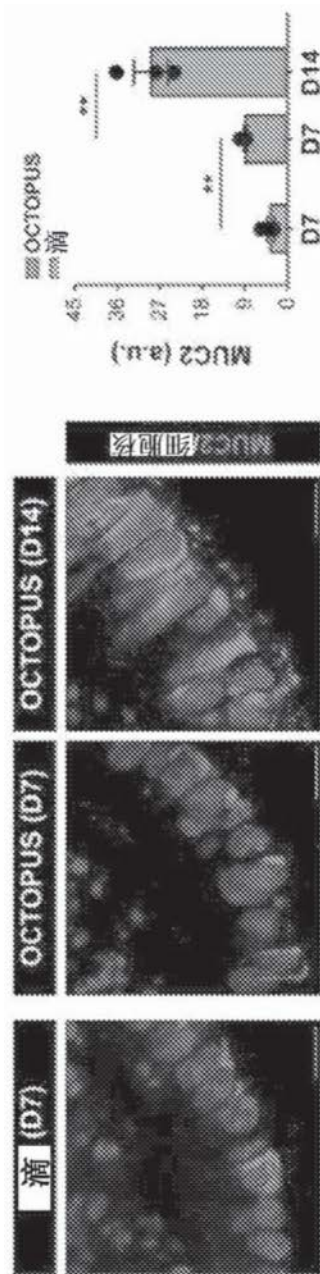


图3N

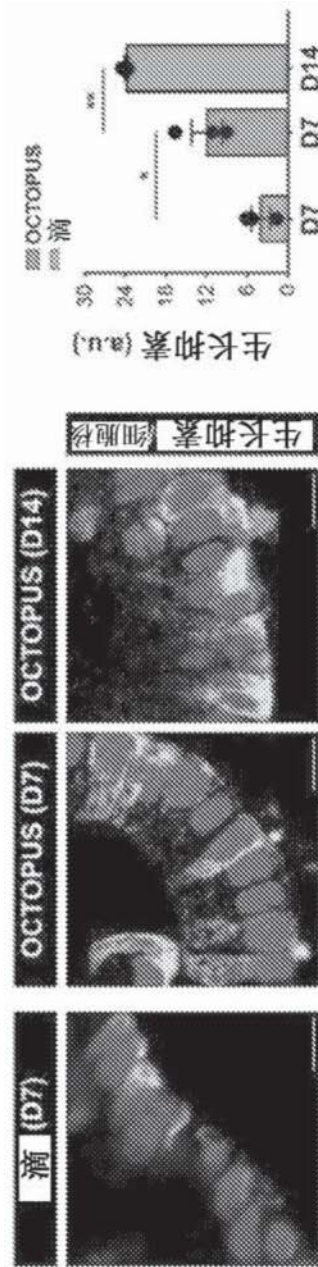


图30

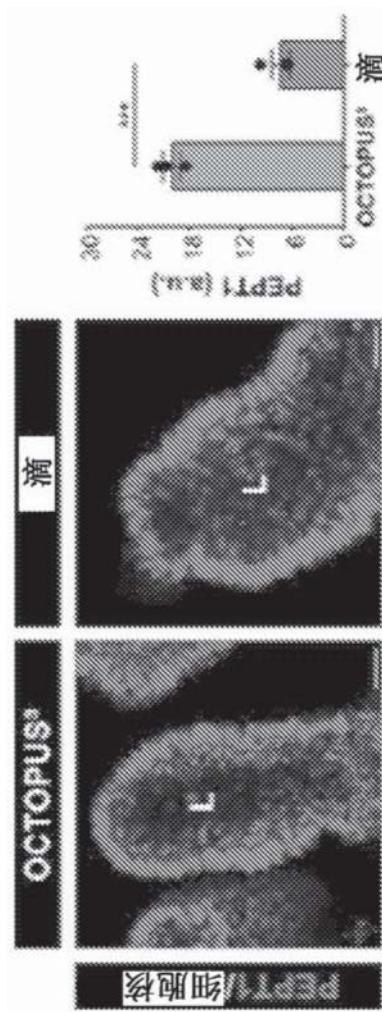


图4A

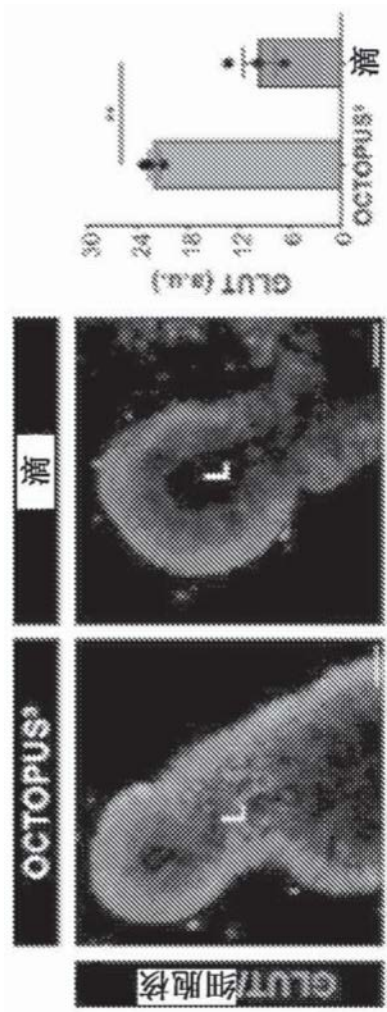


图4B



图4C



图4D

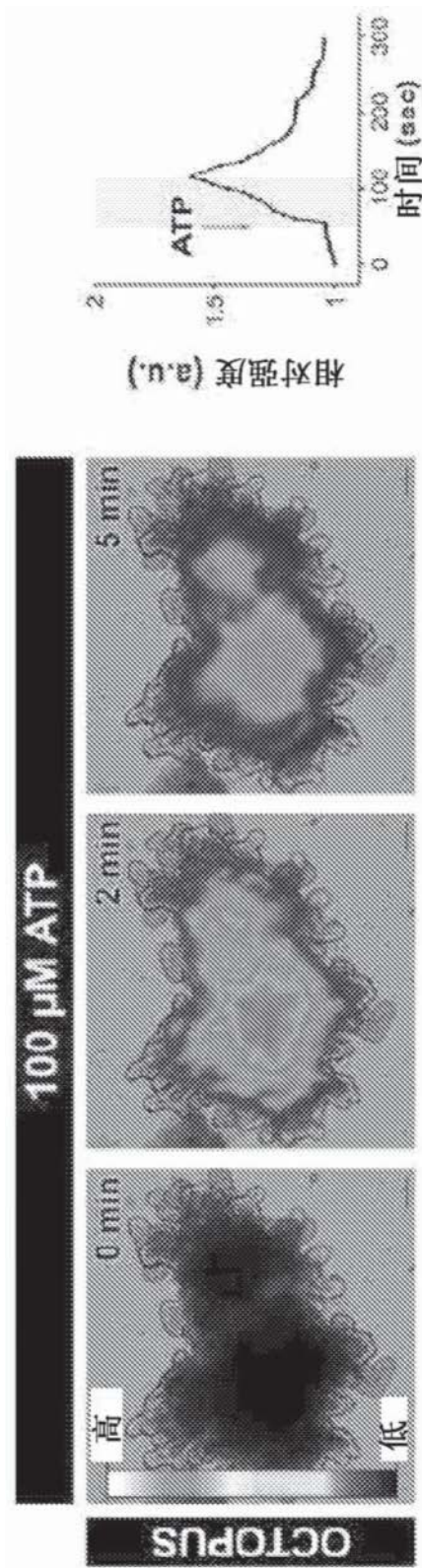


图4E

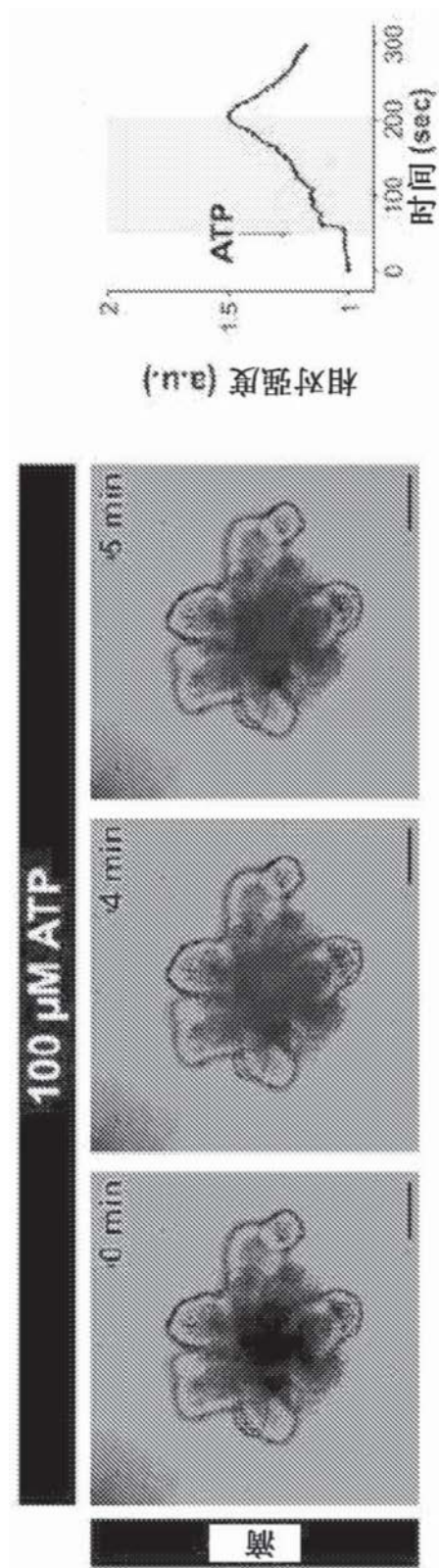


图4F

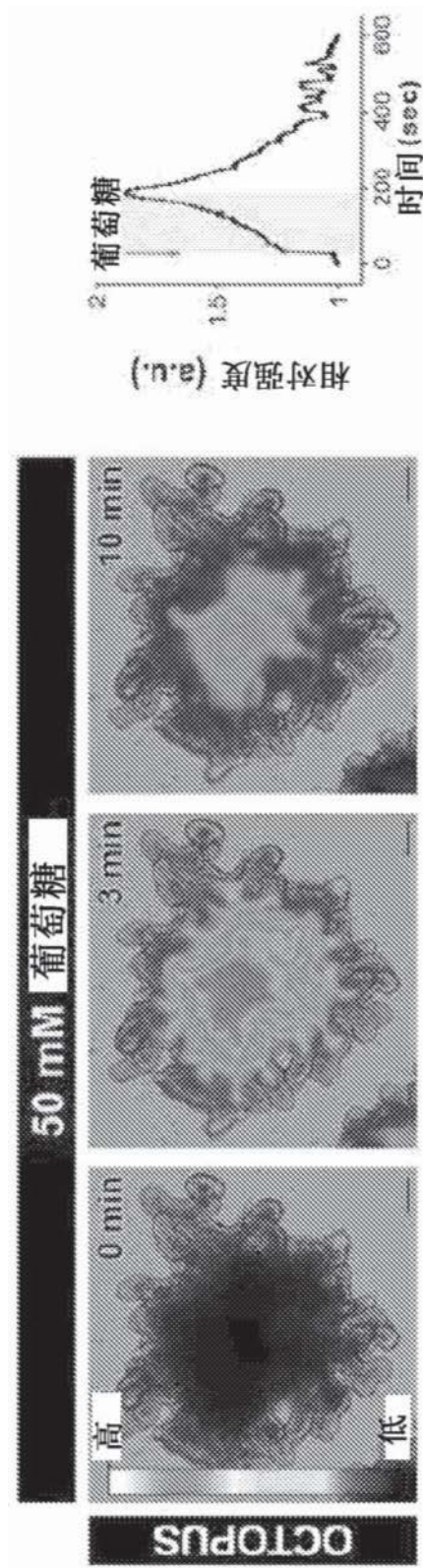


图4G

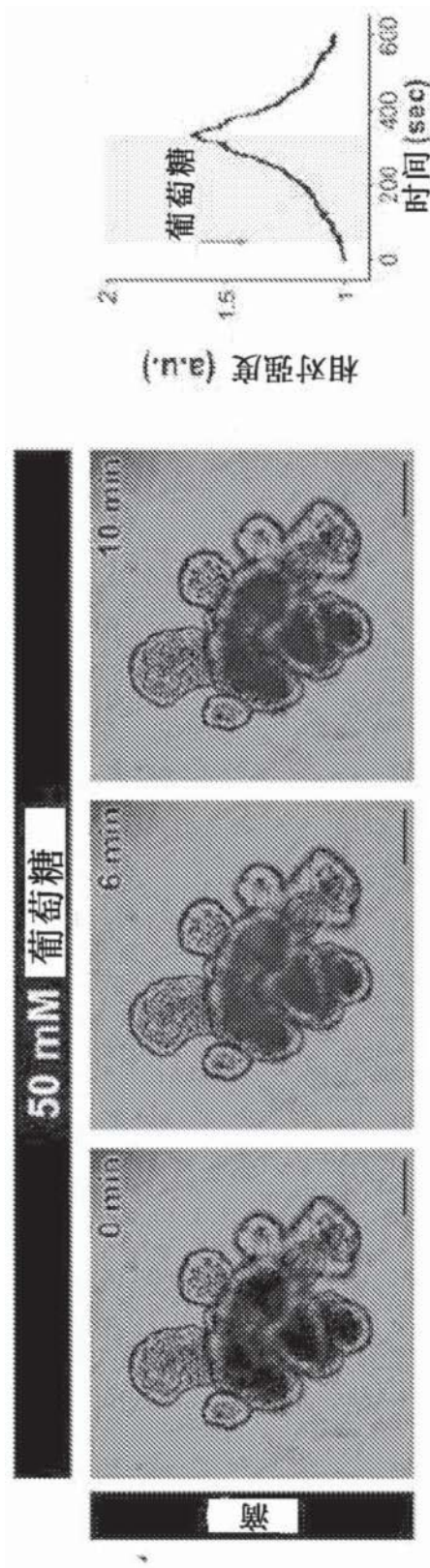


图4H

反应性类器官的分率

OCTOPUS	ATP	葡萄糖
滴	83.3%	100%
	66.7%	60%

图4I

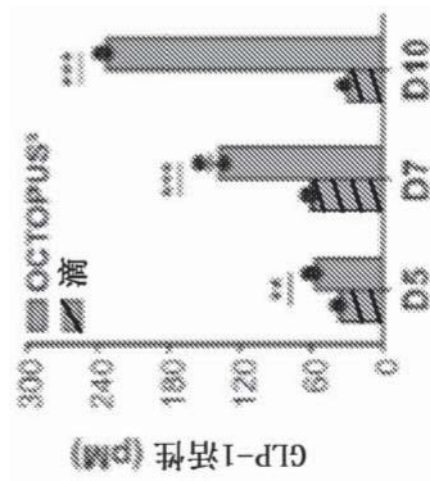


图4J

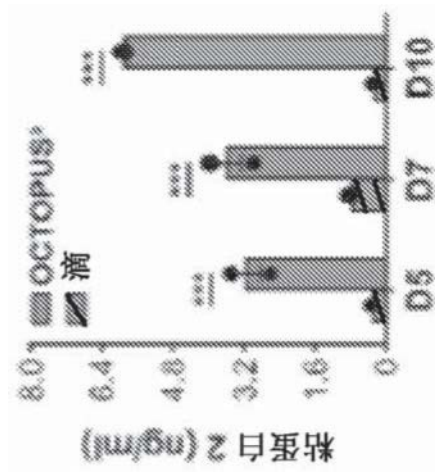


图4K

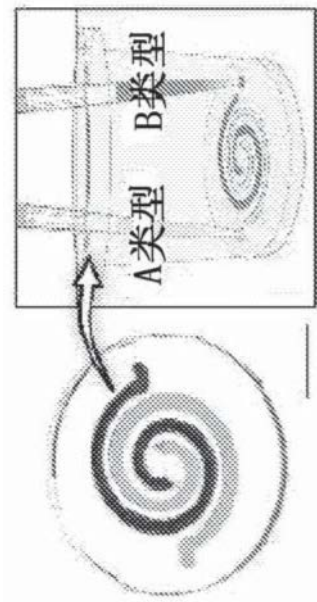


图5A

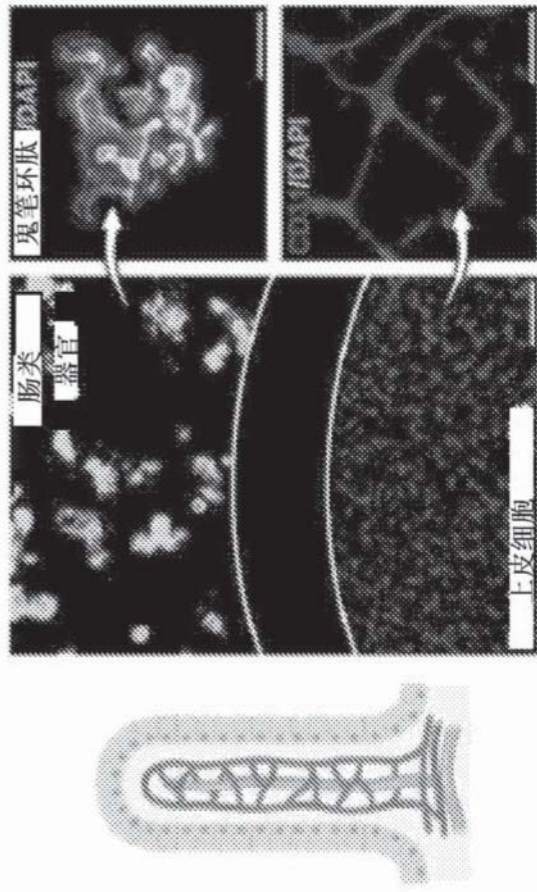


图5B

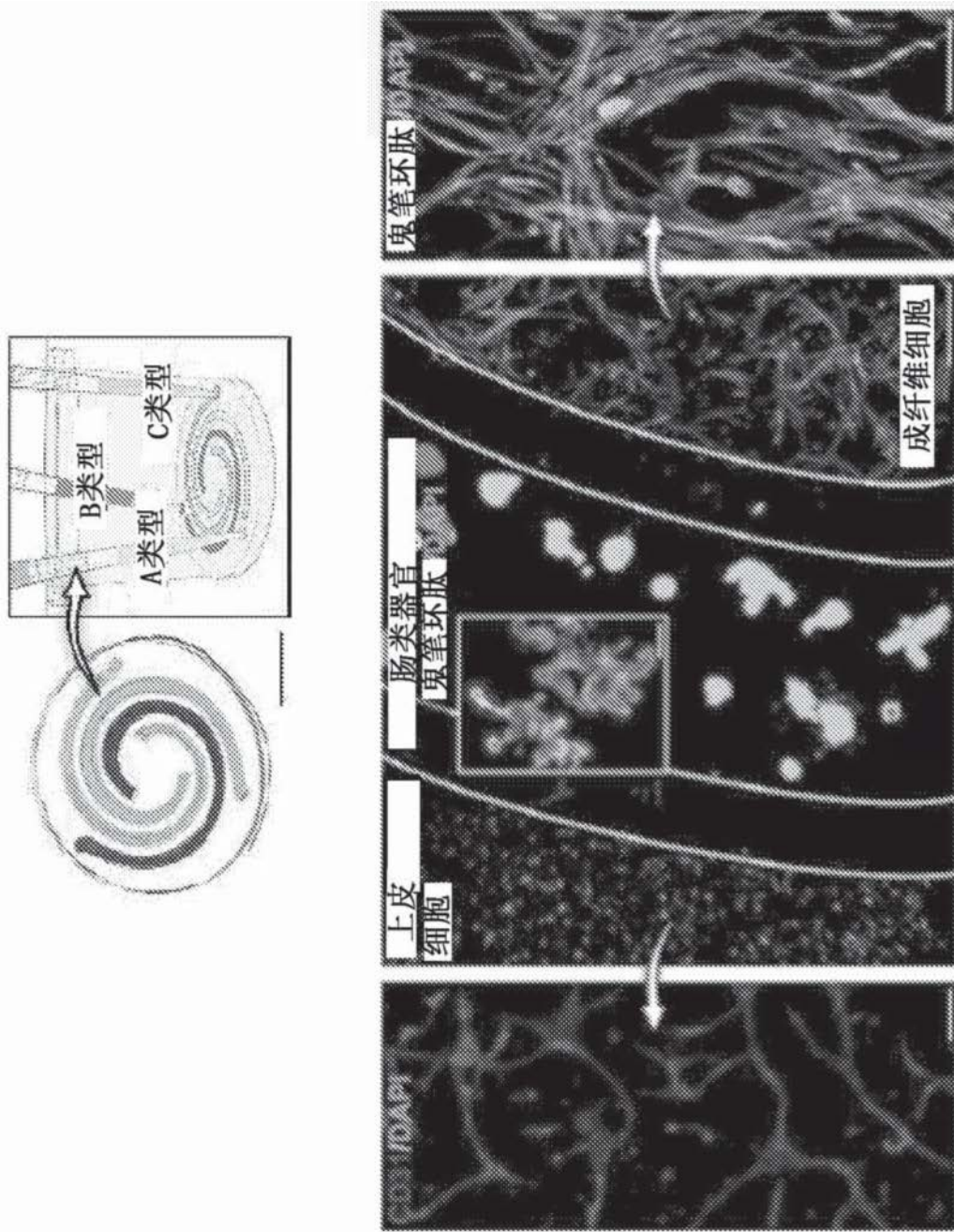


图5C

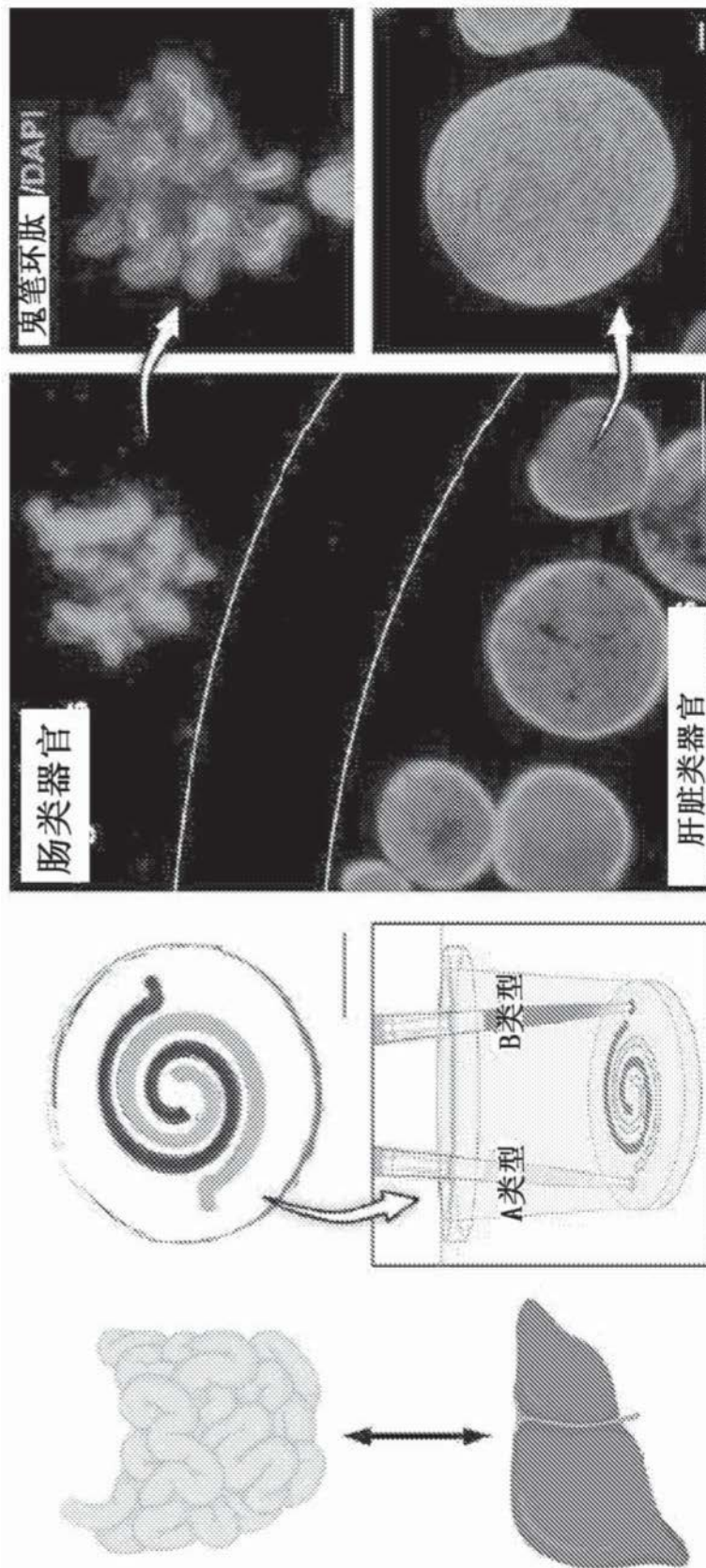
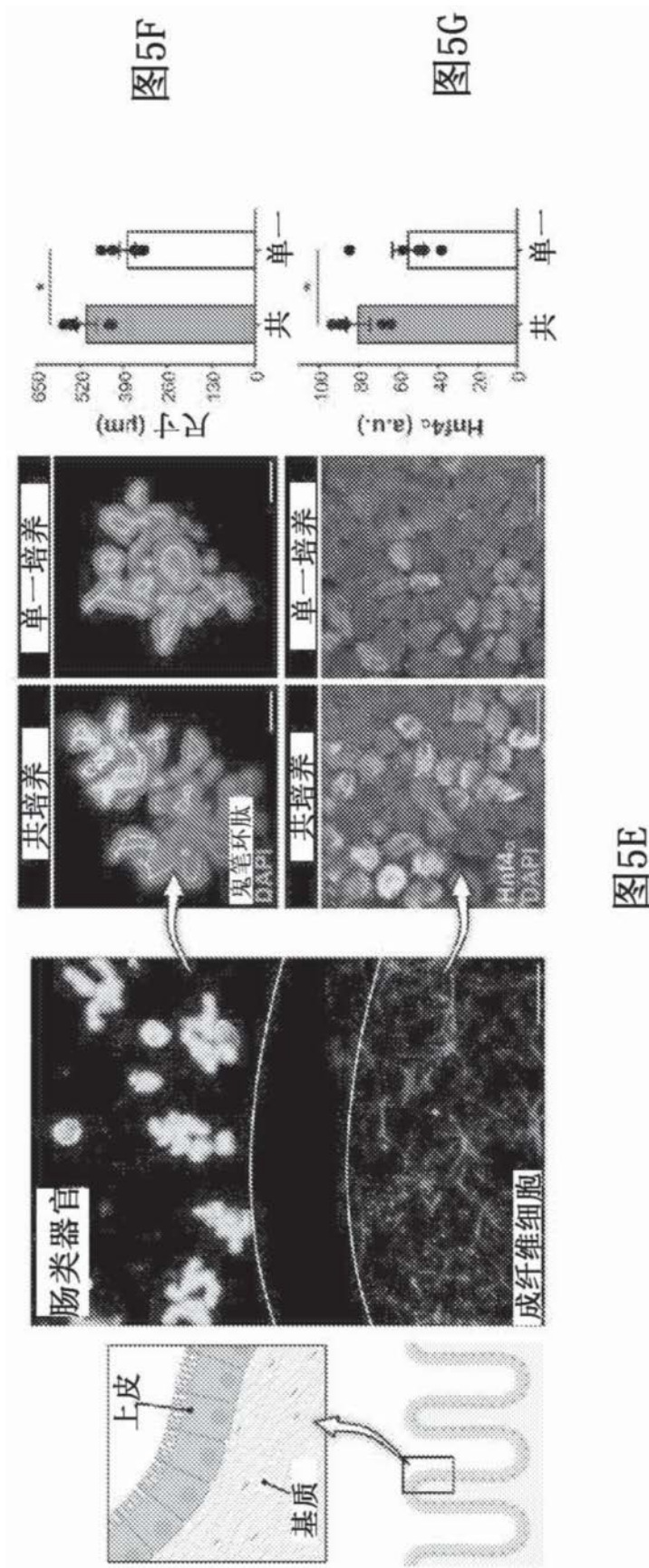


图5D



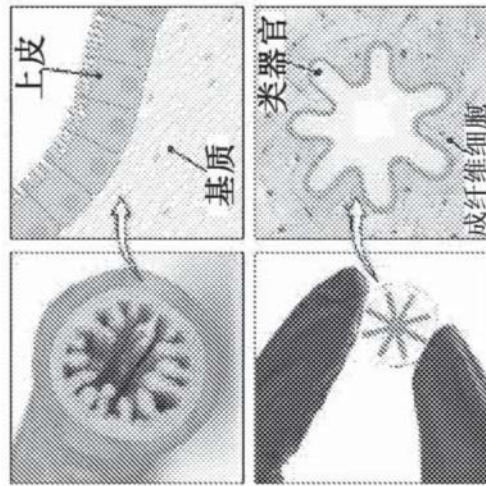


图6A

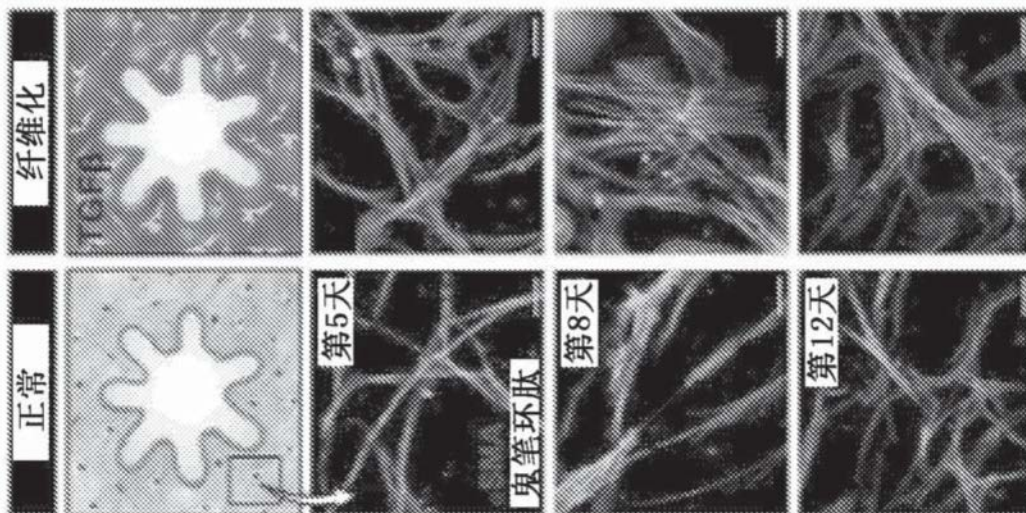
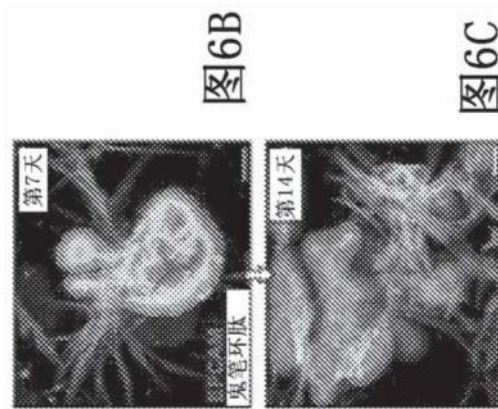


图6D

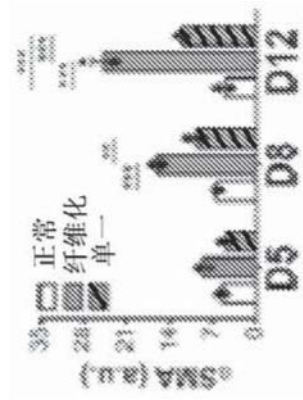


图6E

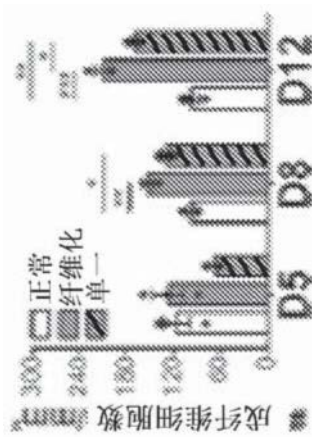


图6F

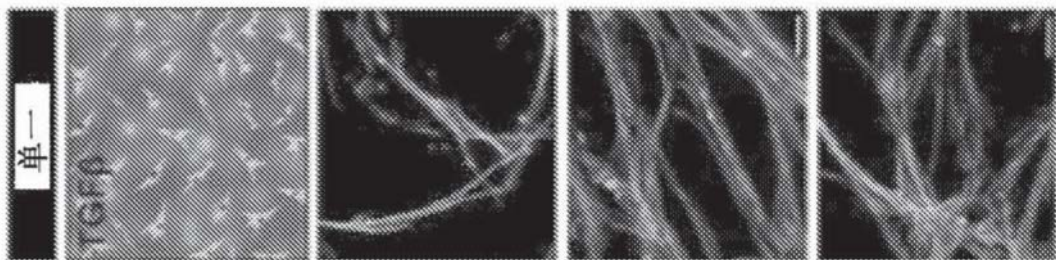


图6G

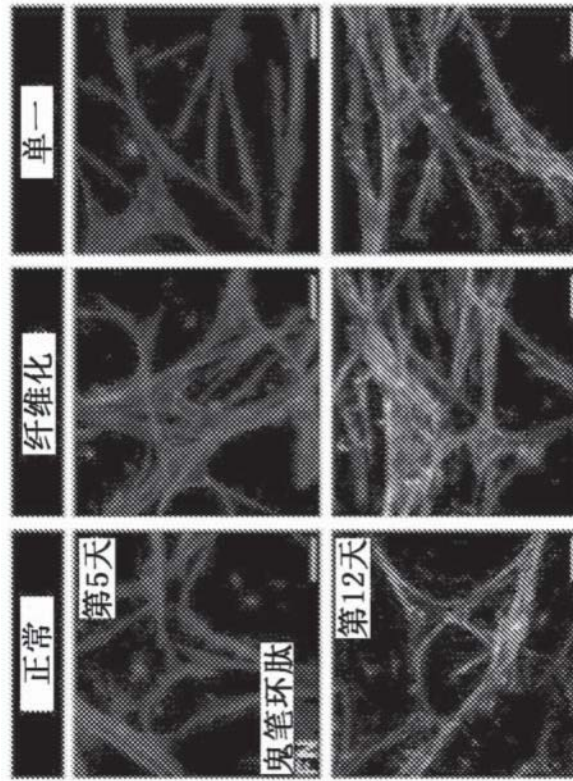


图6H

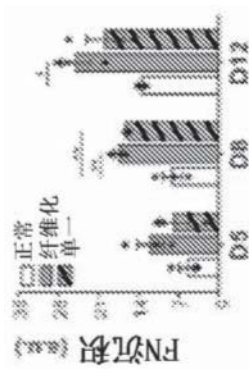


图6I

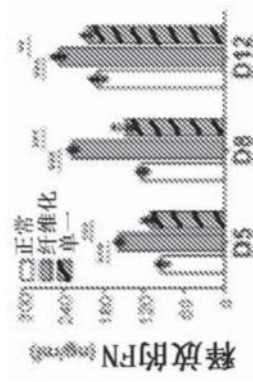


图6J

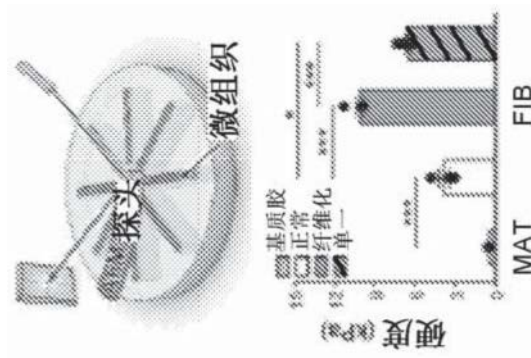


图6K

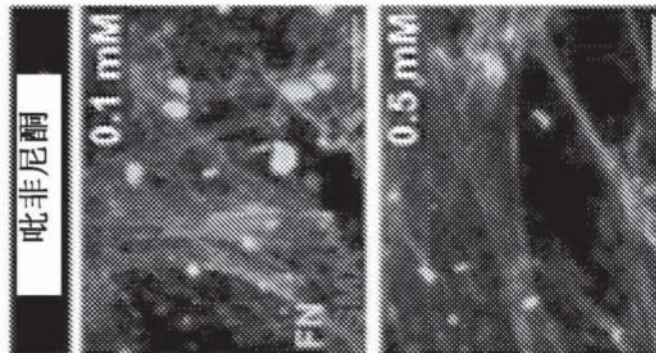


图6L

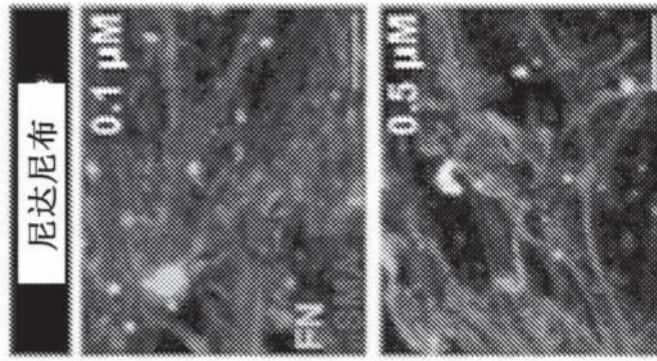


图6M

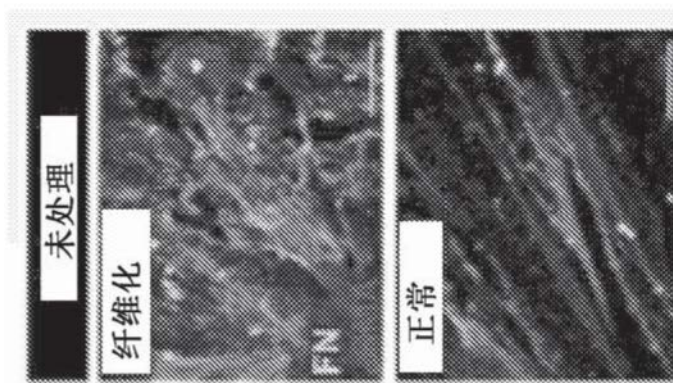
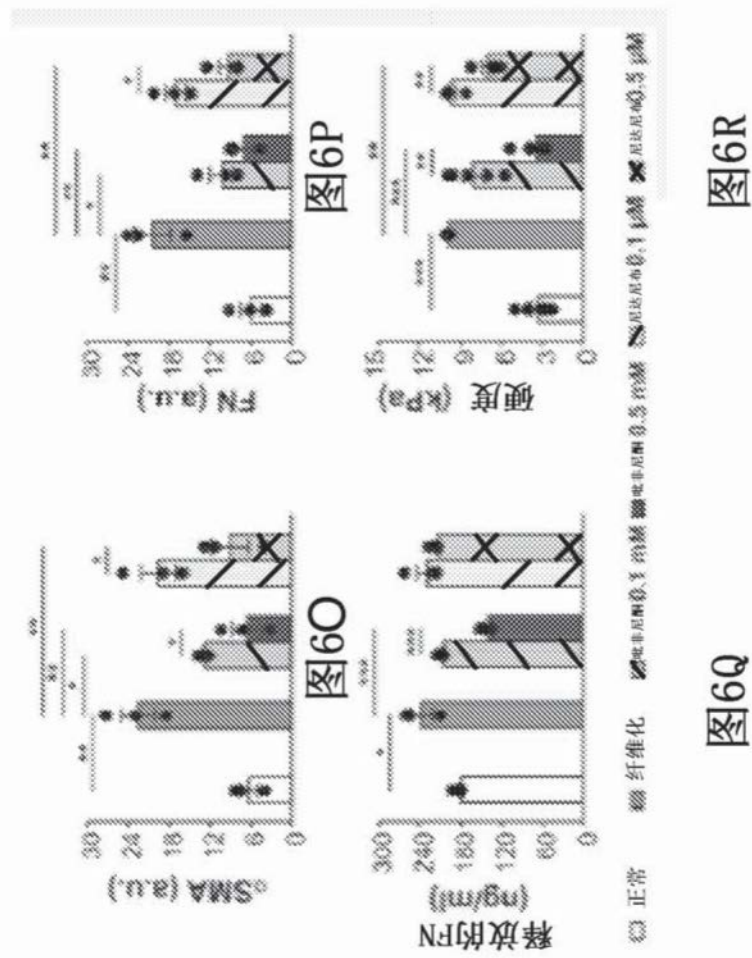


图6N



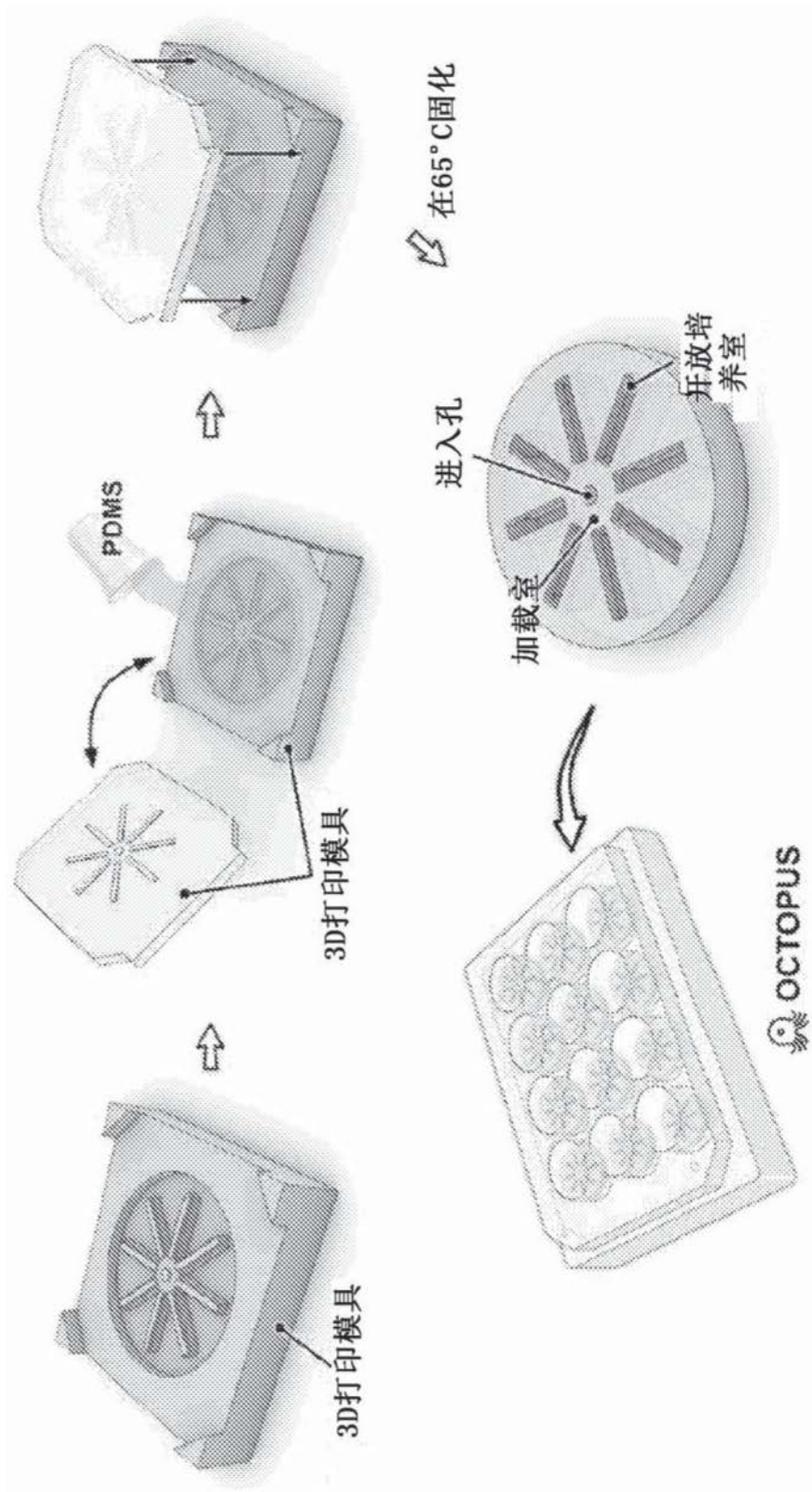


图7

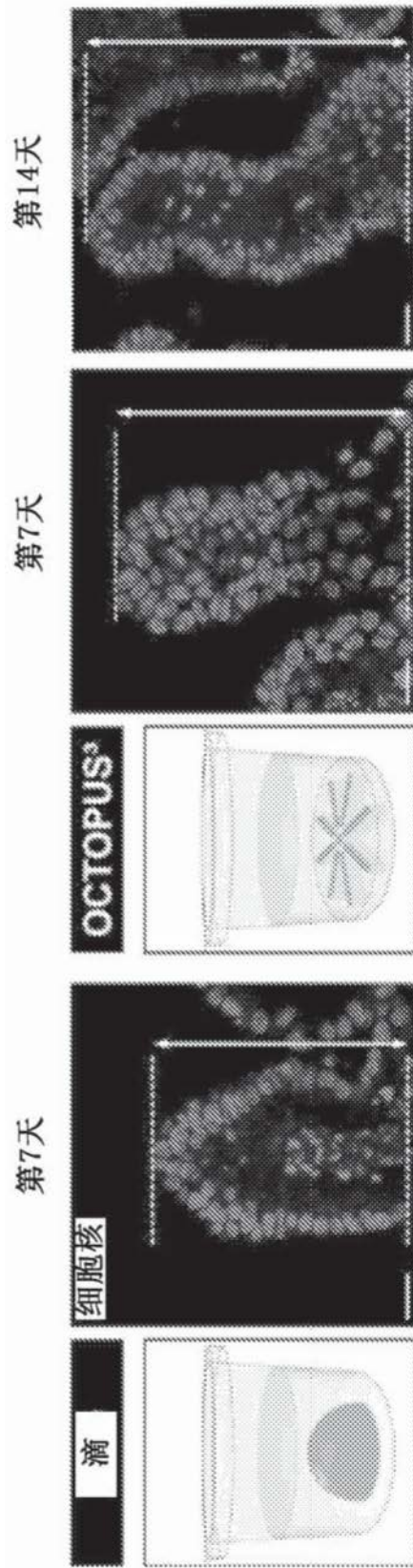


图8

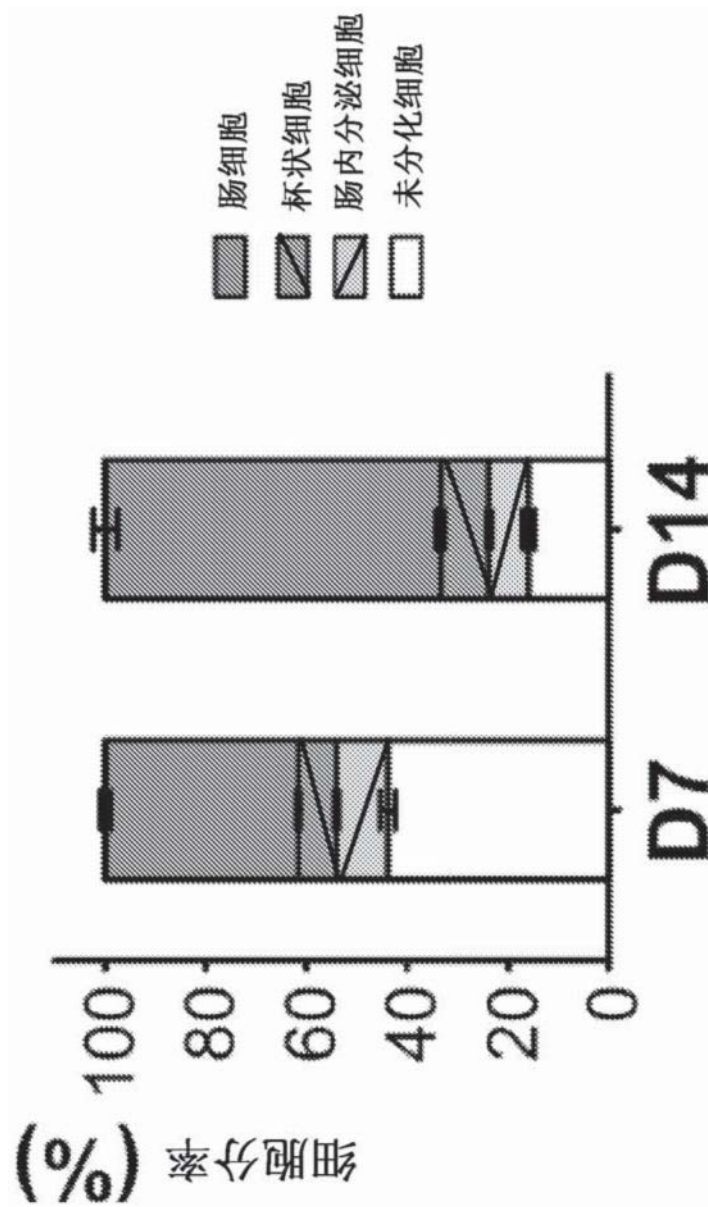


图9

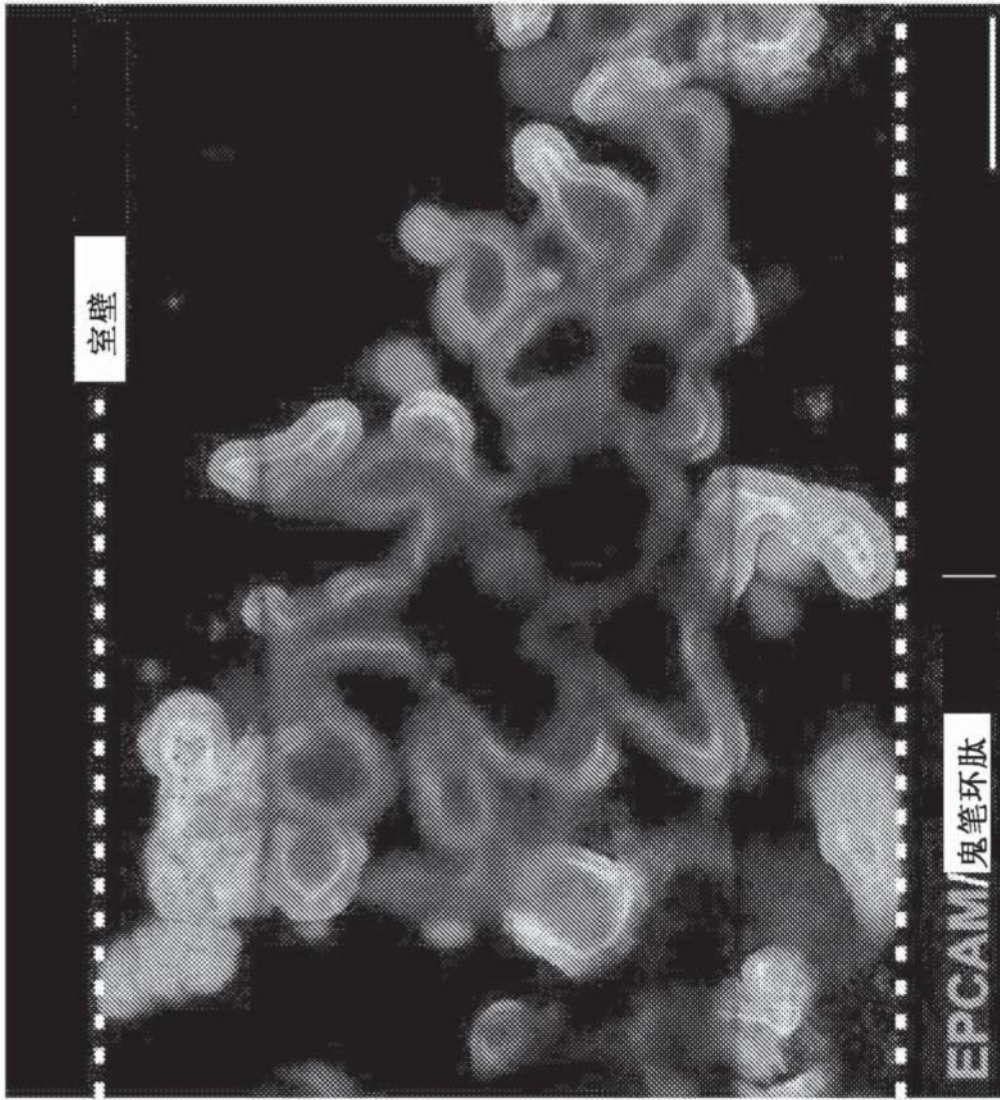


图10

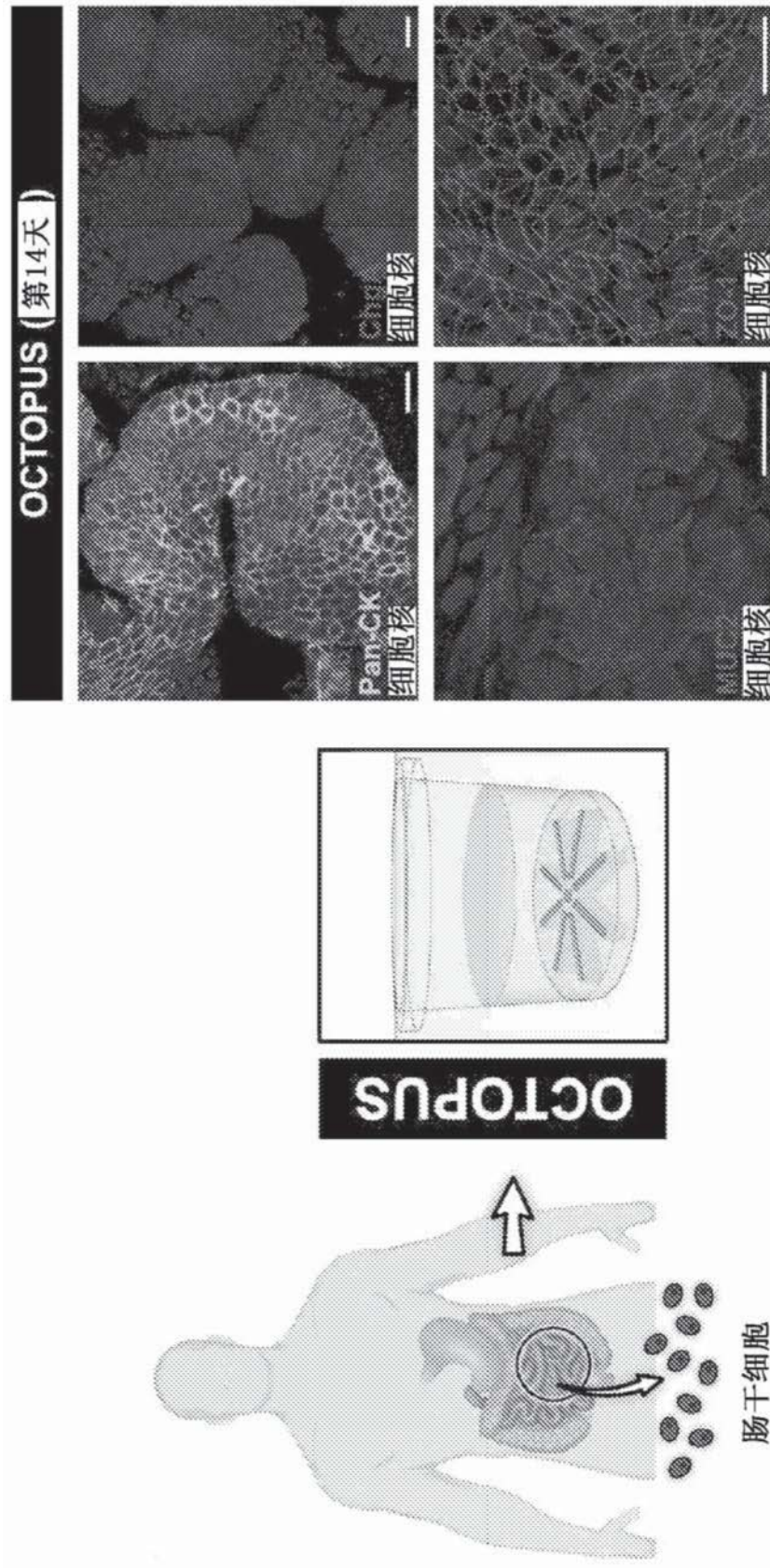


图11A

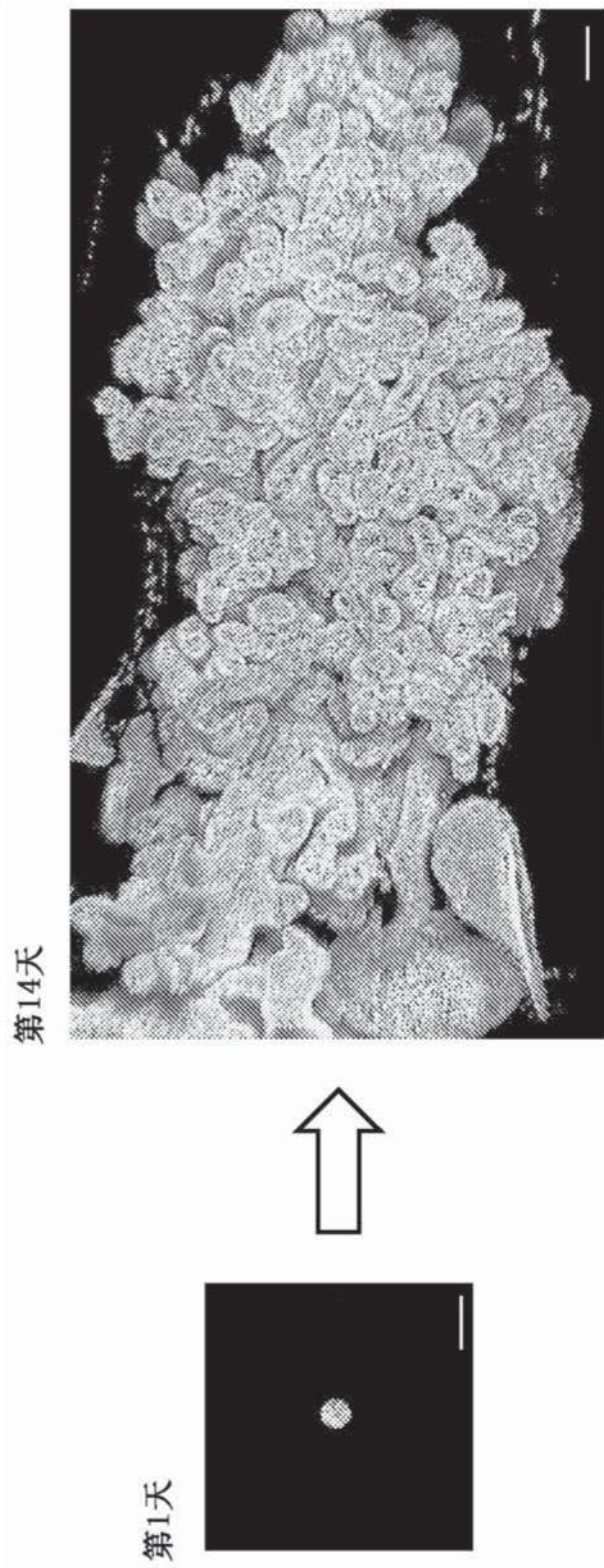


图11B

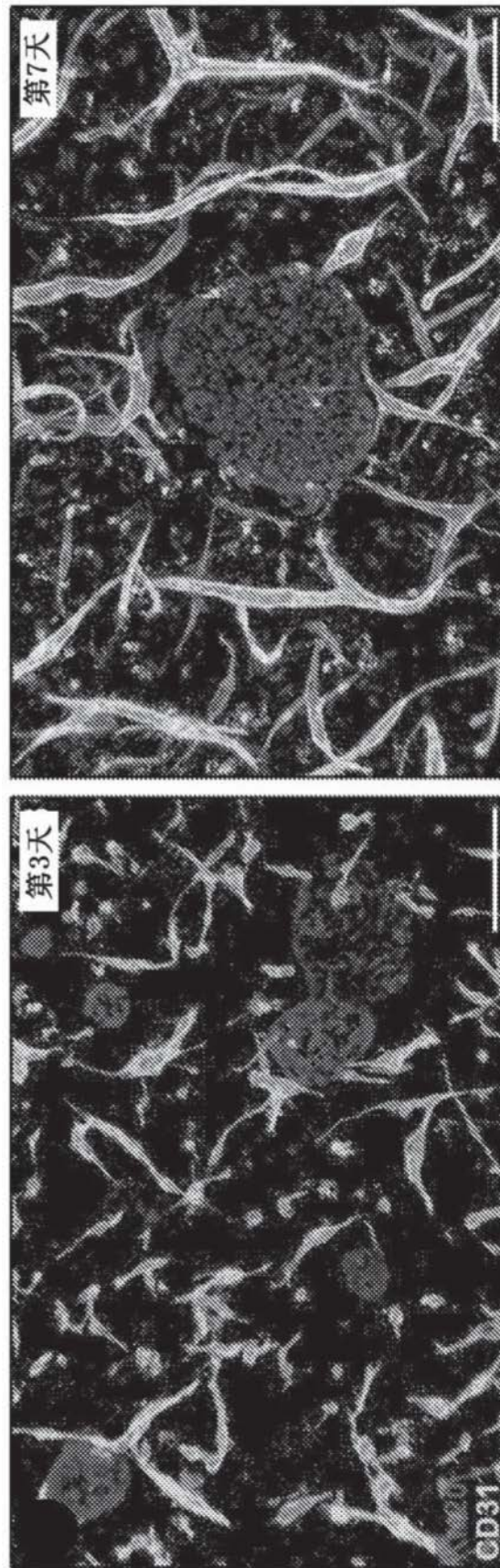


图11C

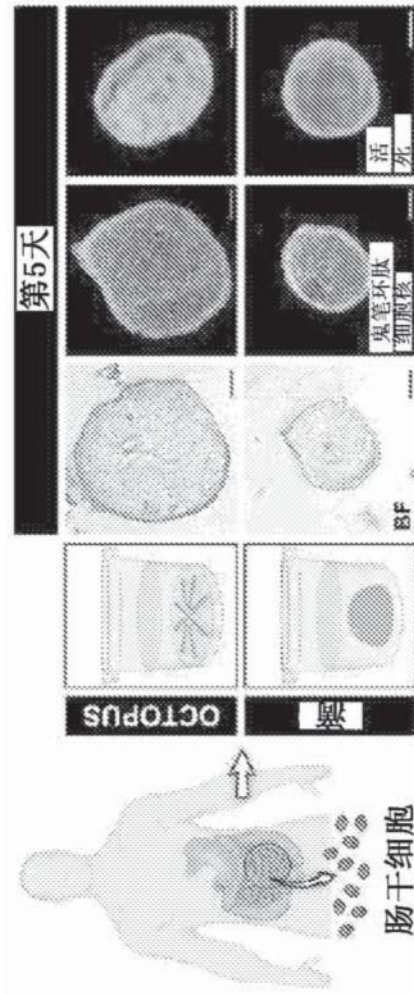


图12A

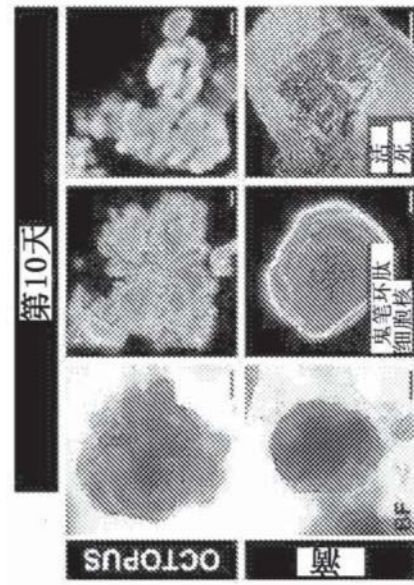


图12B

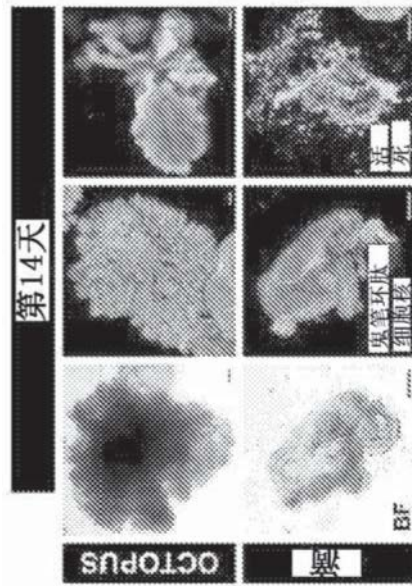


图12C

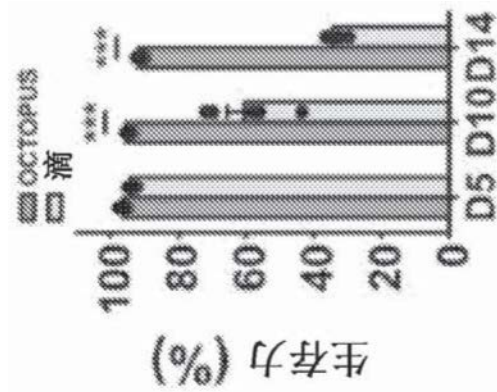


图12D

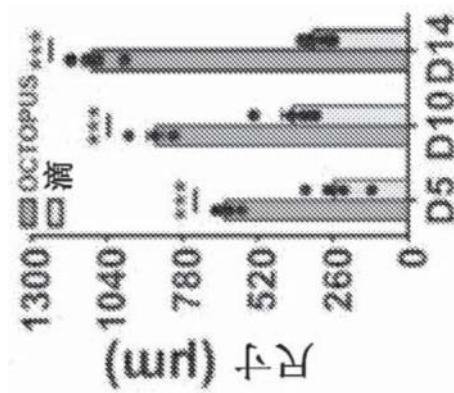


图12E

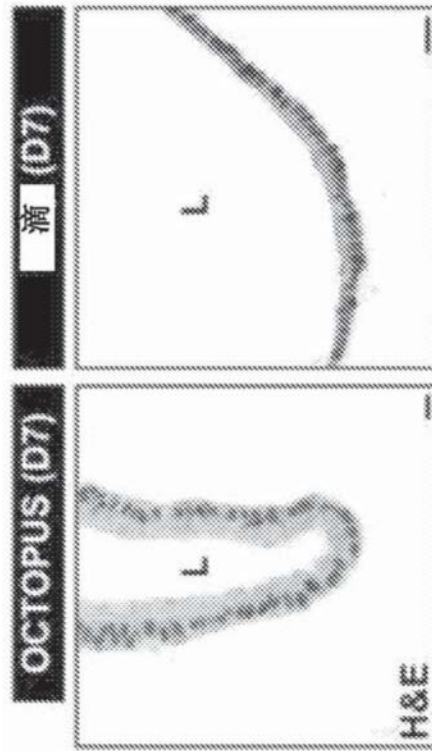


图12F

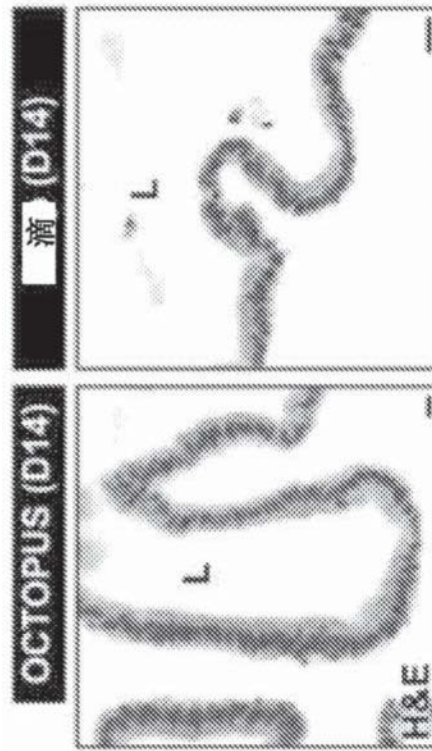


图12G

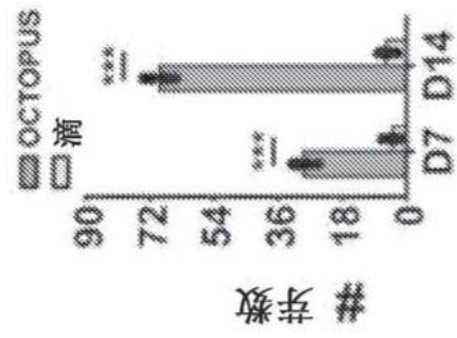


图12H

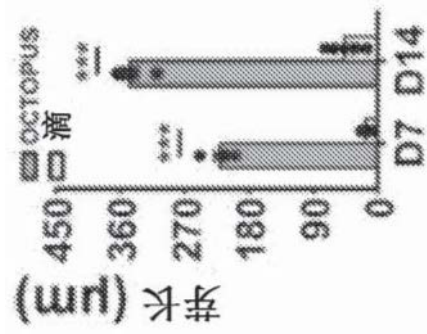


图12I

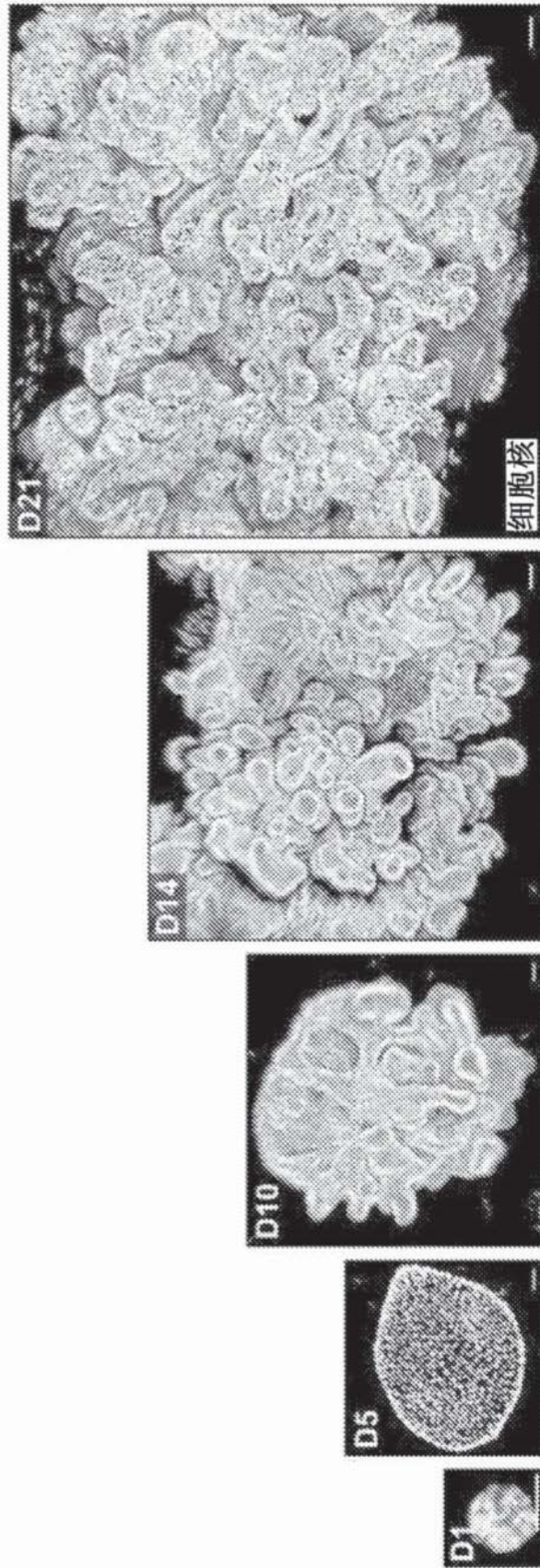


图12J

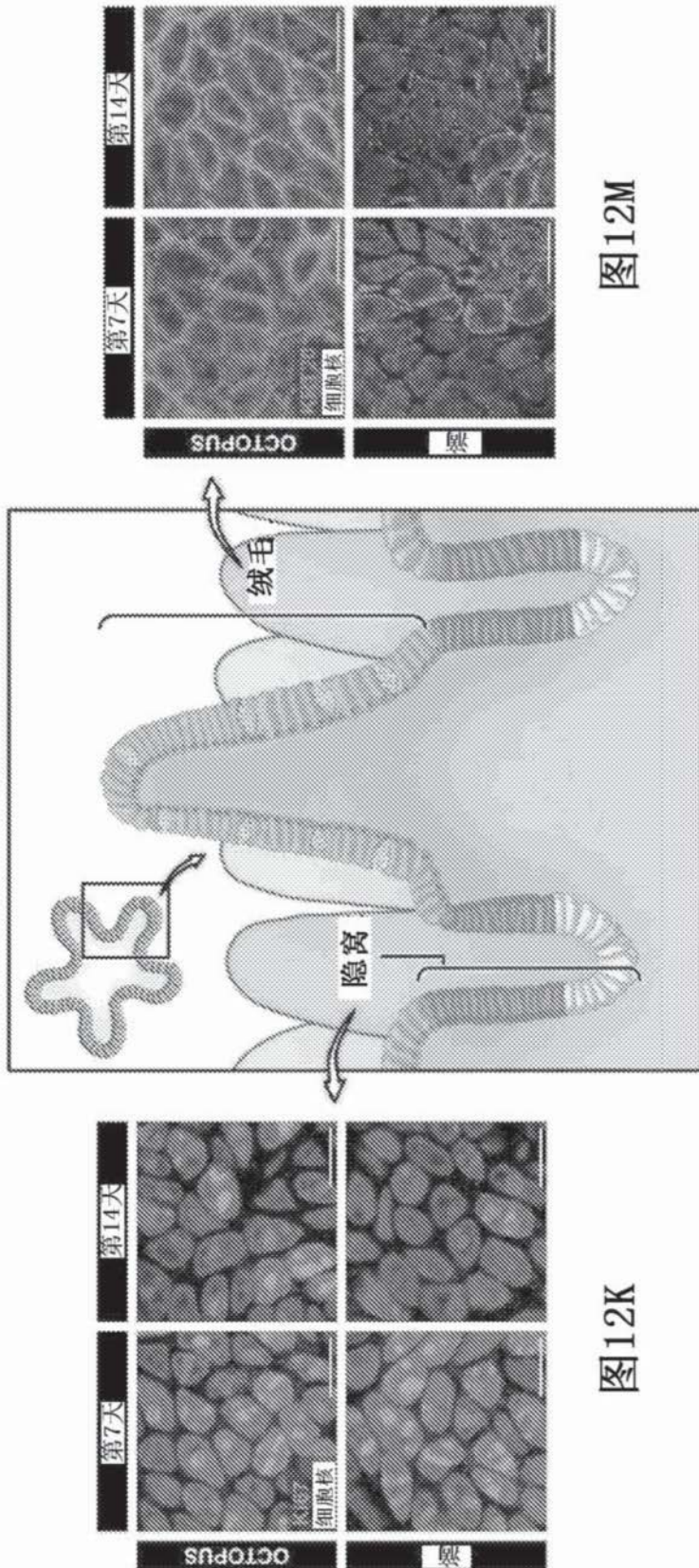


图12K

图12M

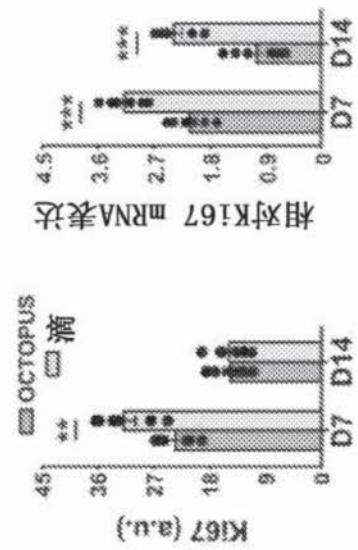


图12L

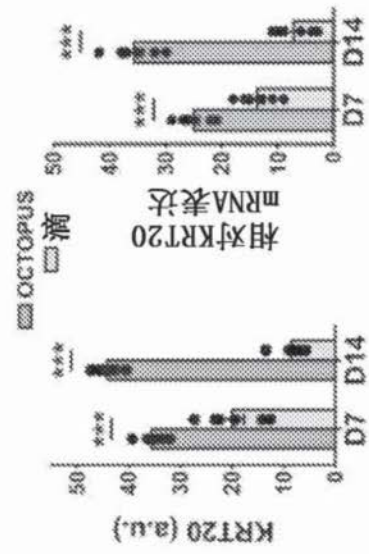


图12N

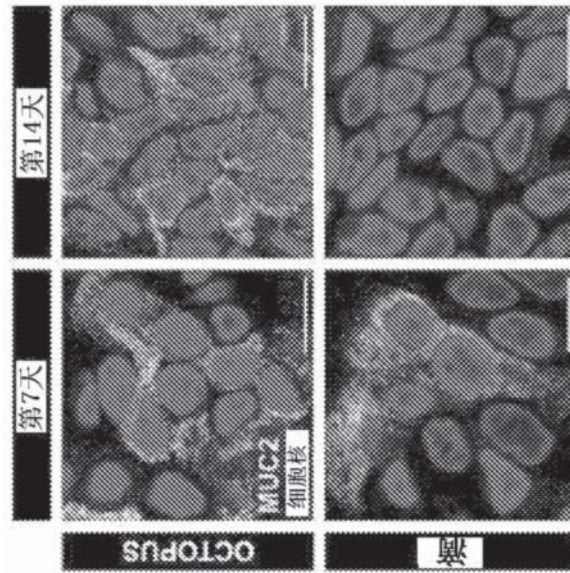


图120

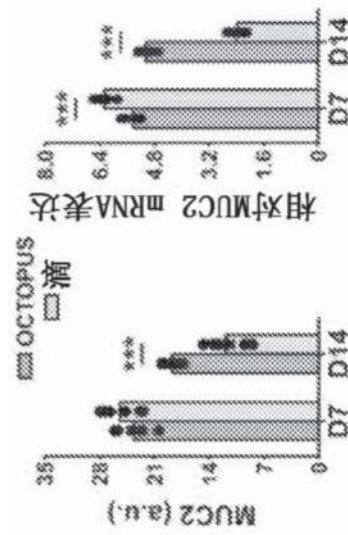


图12P

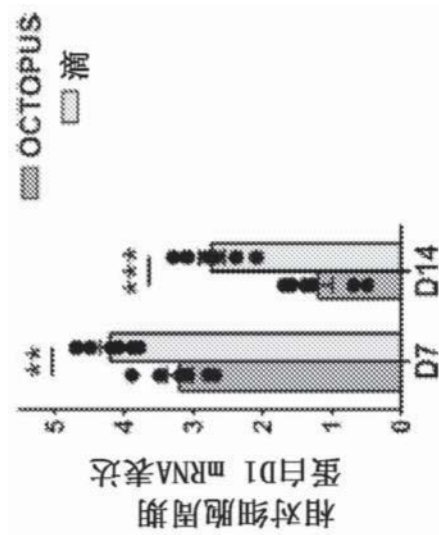


图12Q

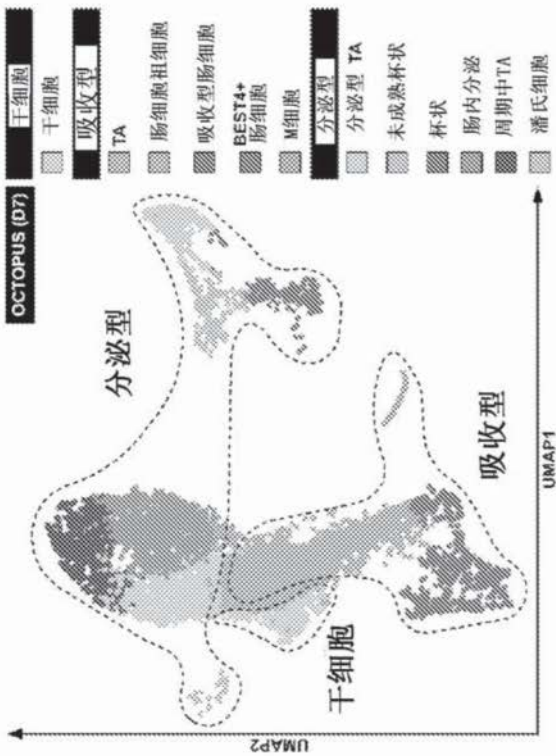


图13A

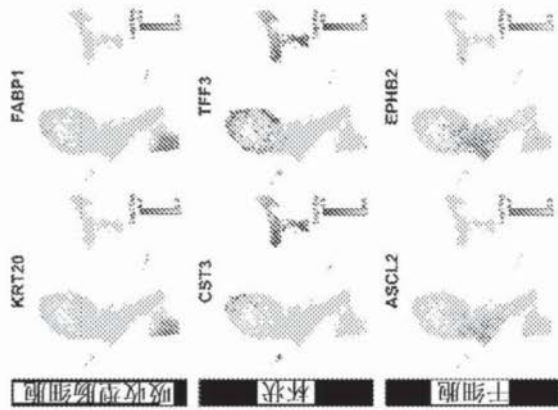


图13B

图13C

图13D

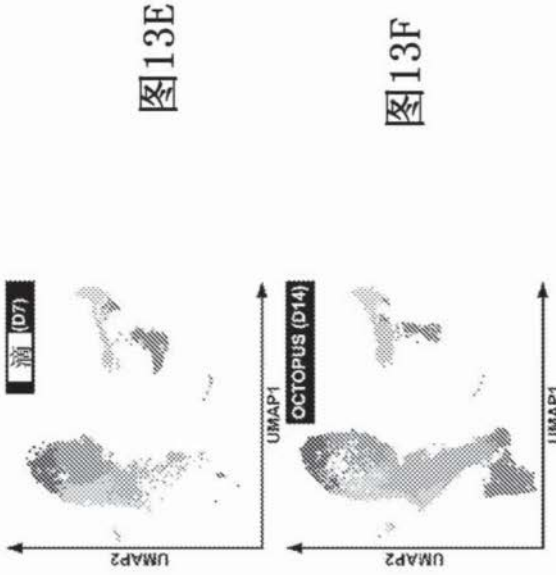


图13E

图13F

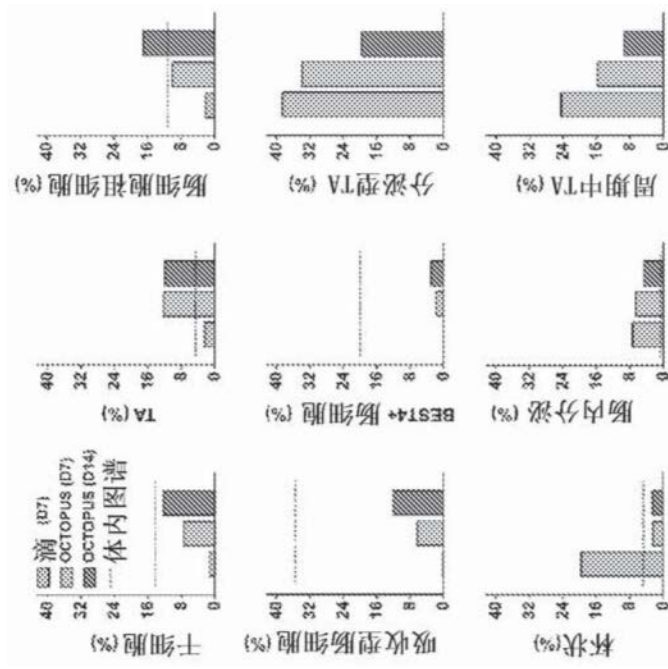


图13G

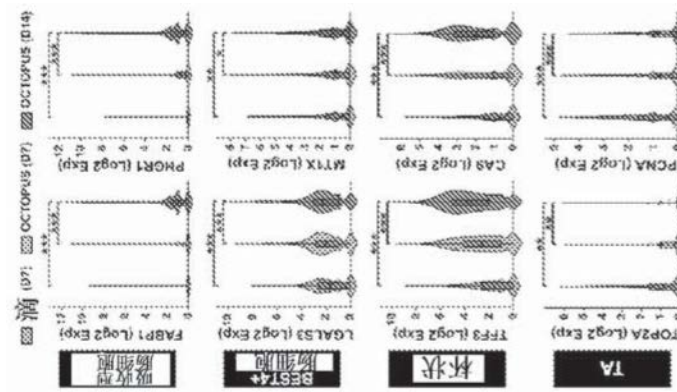


图13H

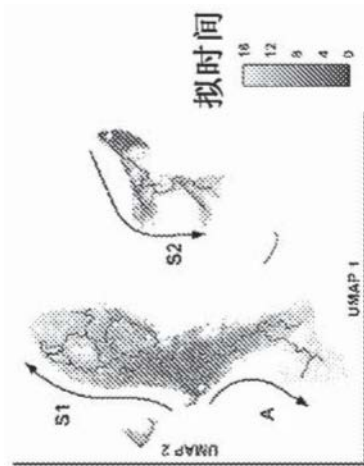


图13I

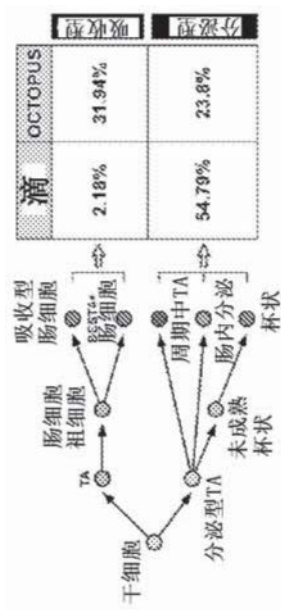


图13J

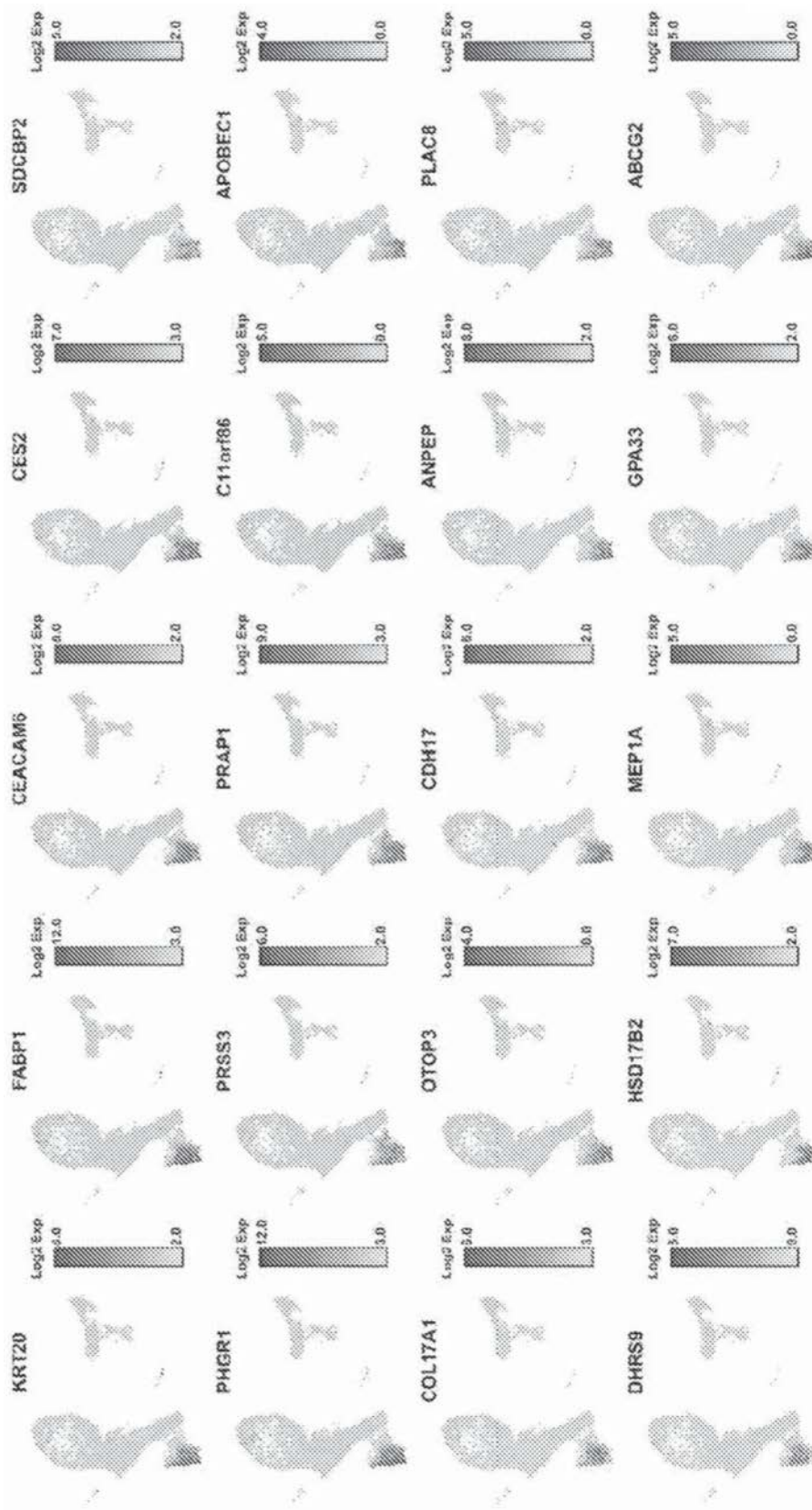


图13K

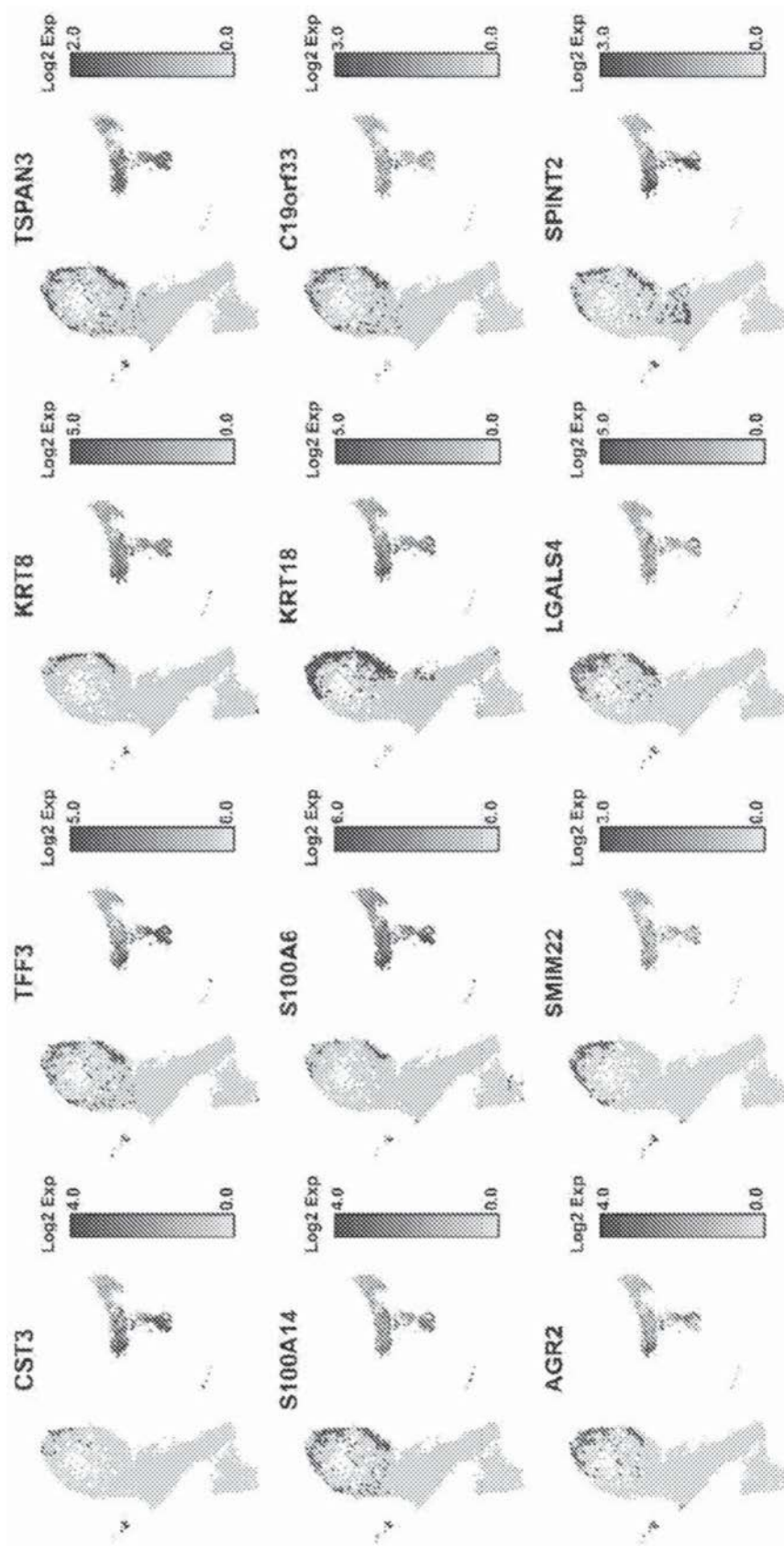


图13L

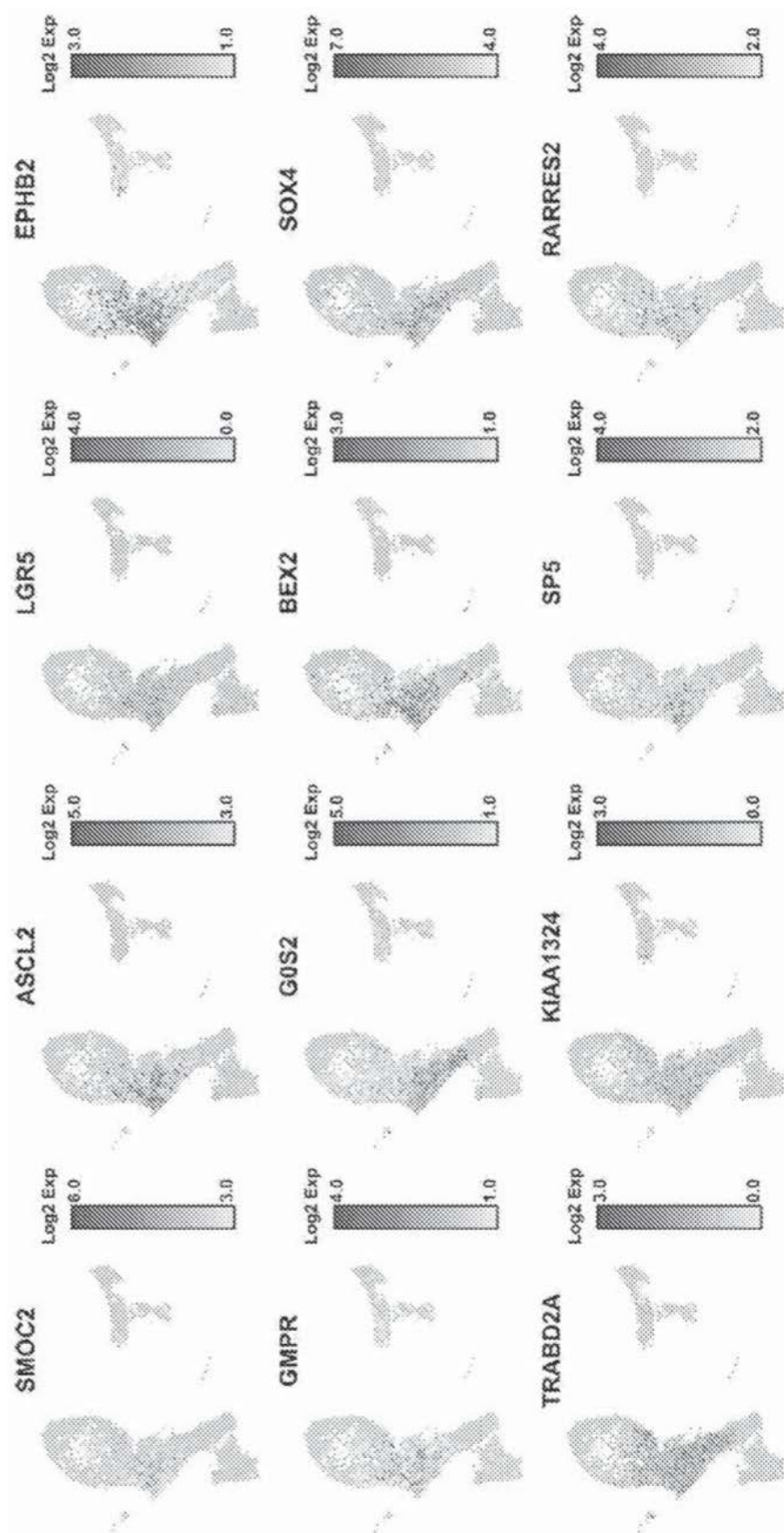


图13M

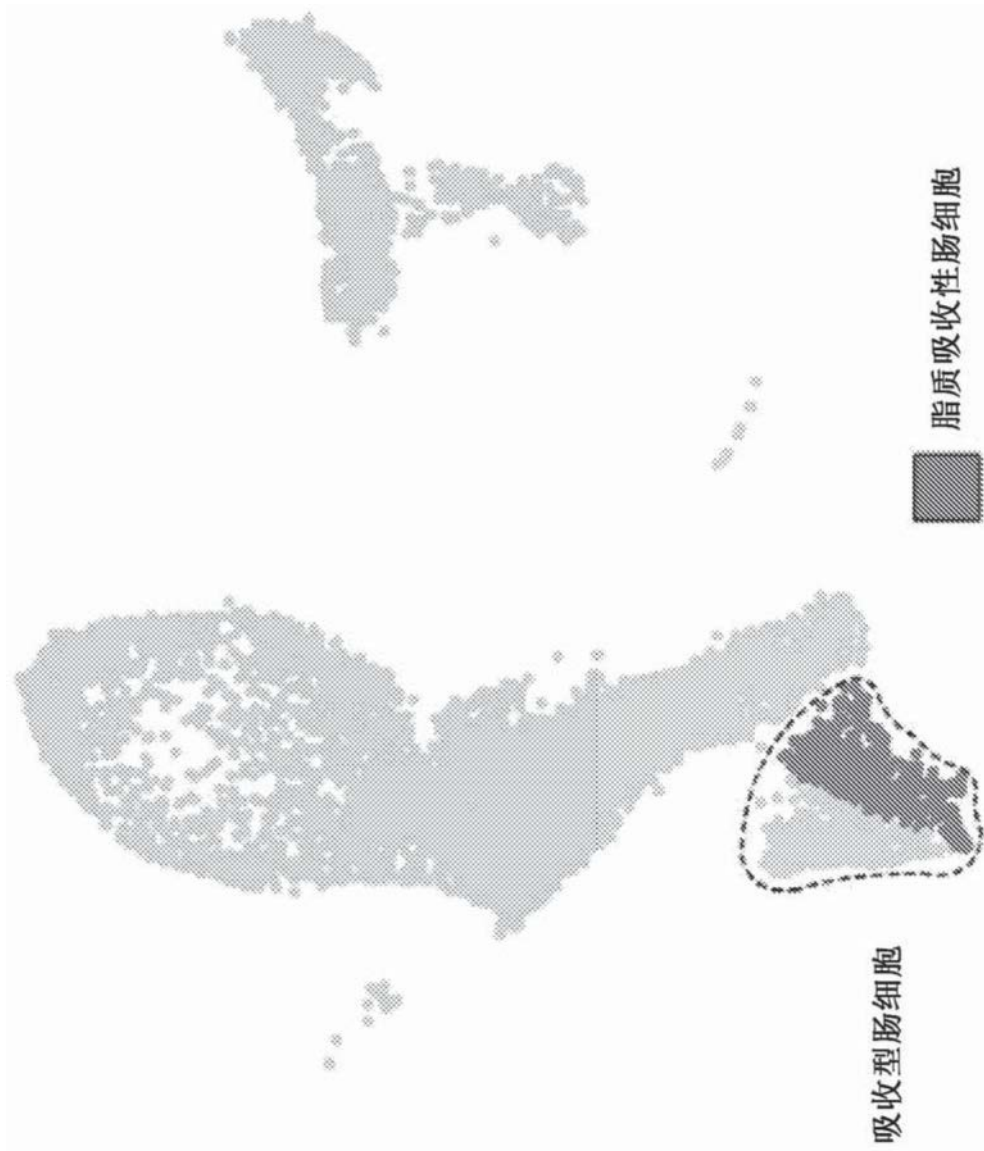


图13N

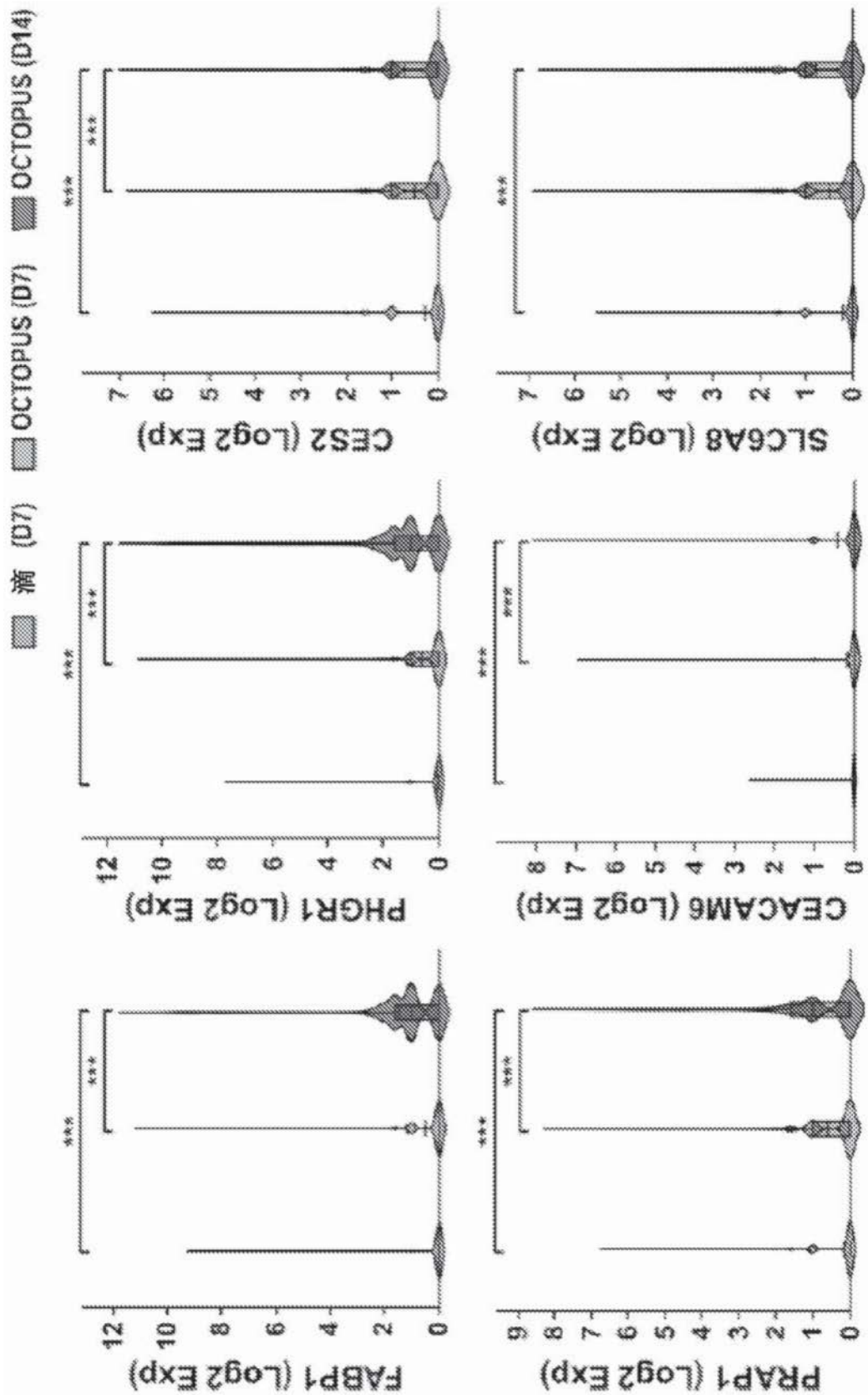


图130

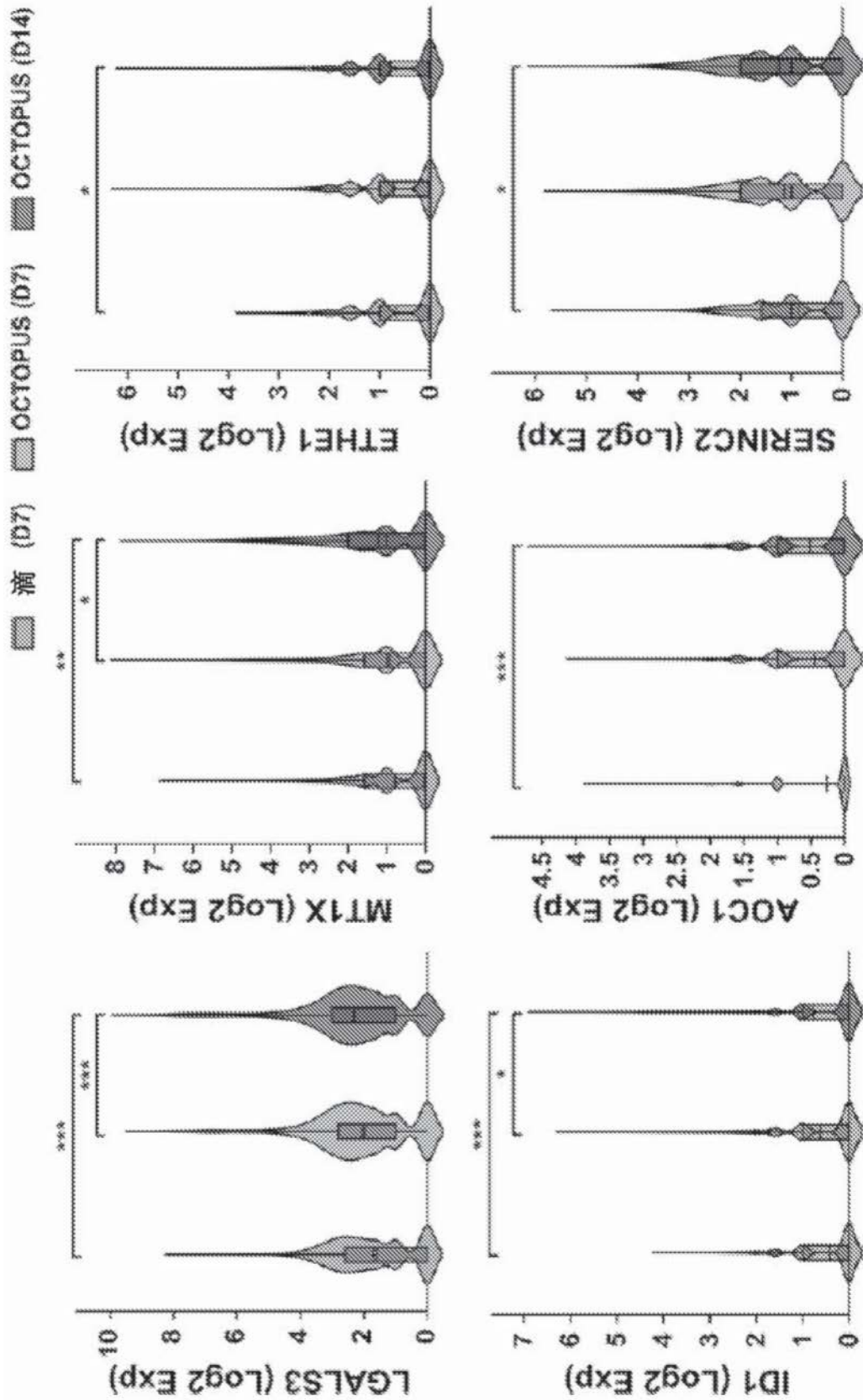


图13P

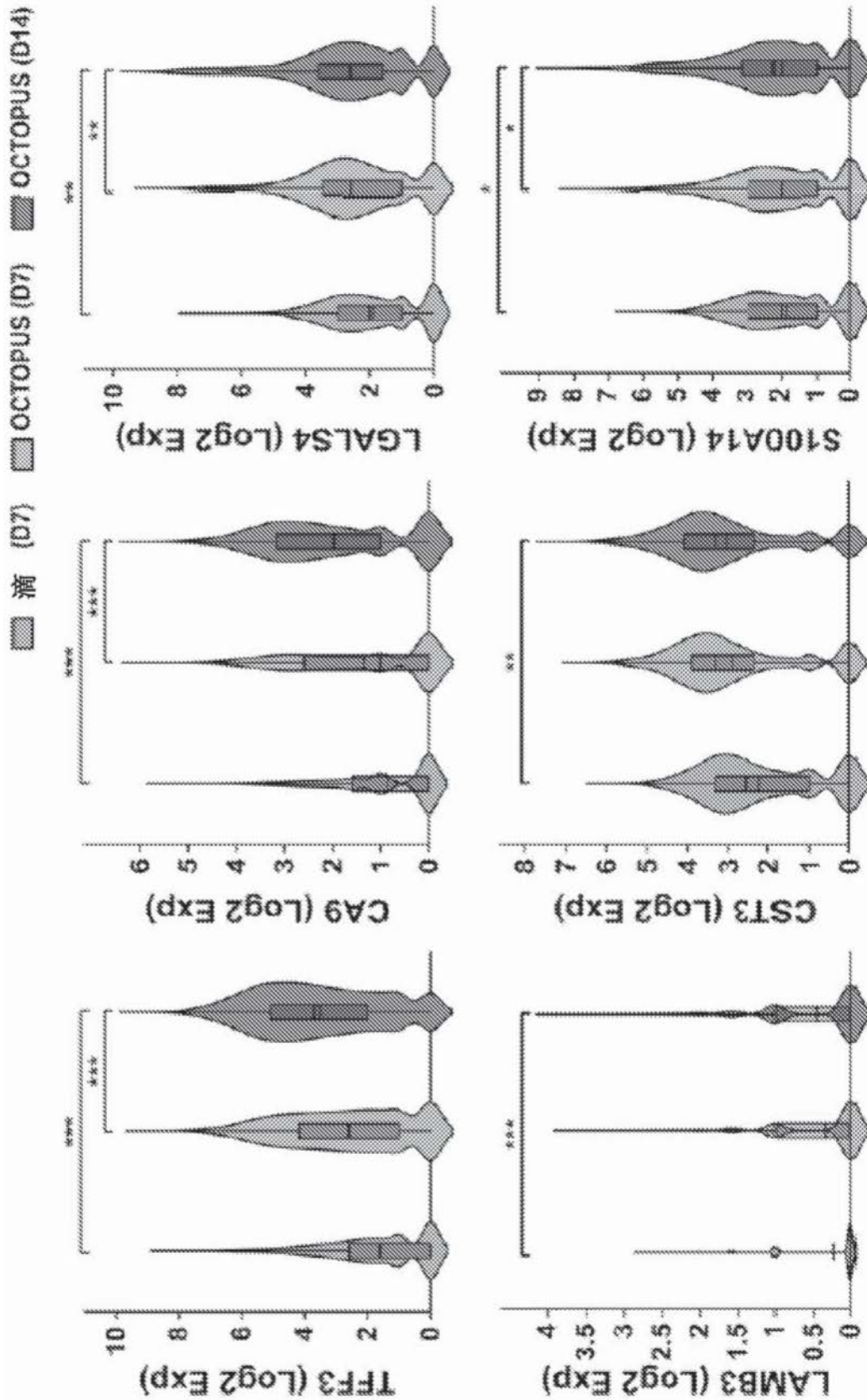


图13Q

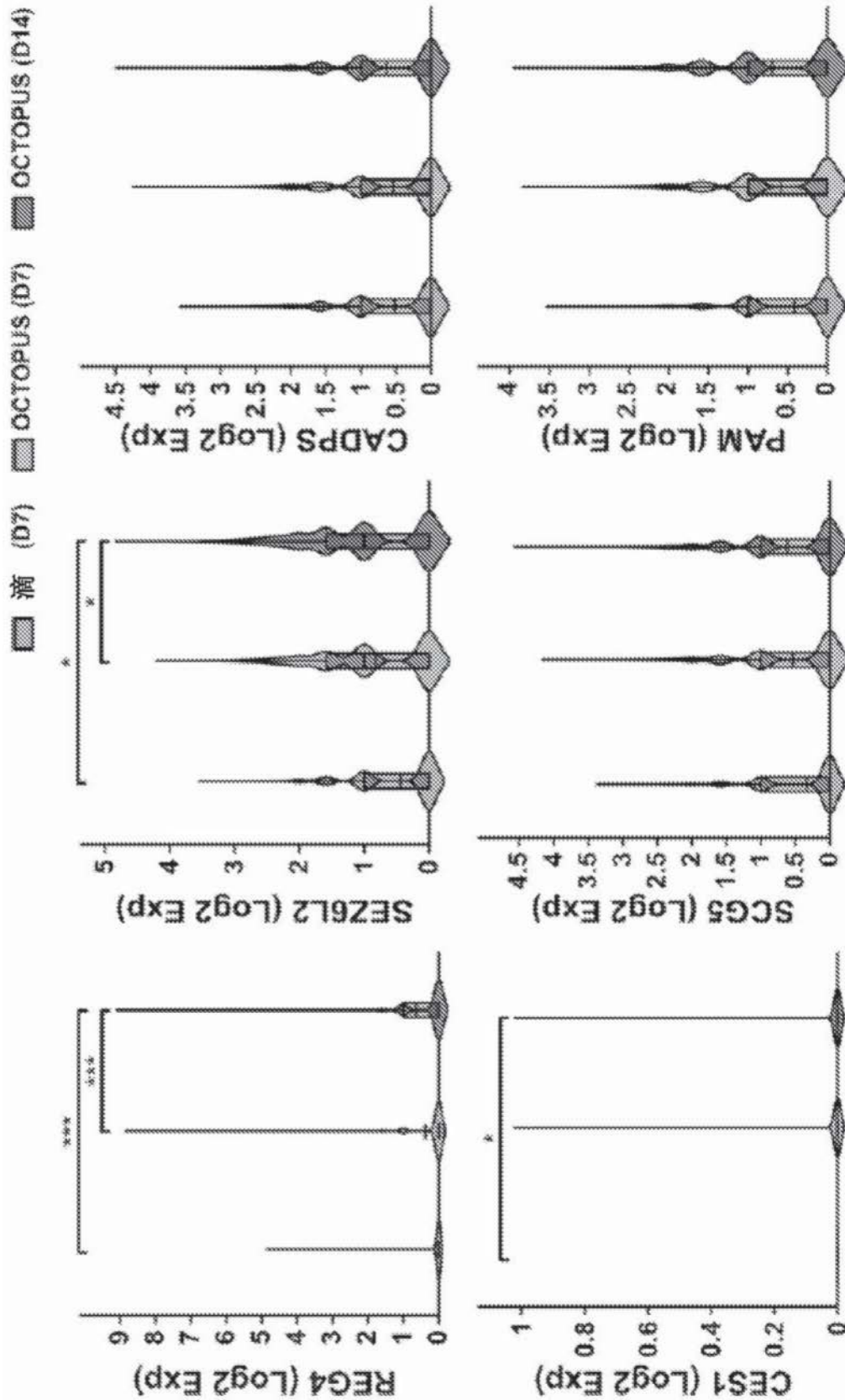


图13R

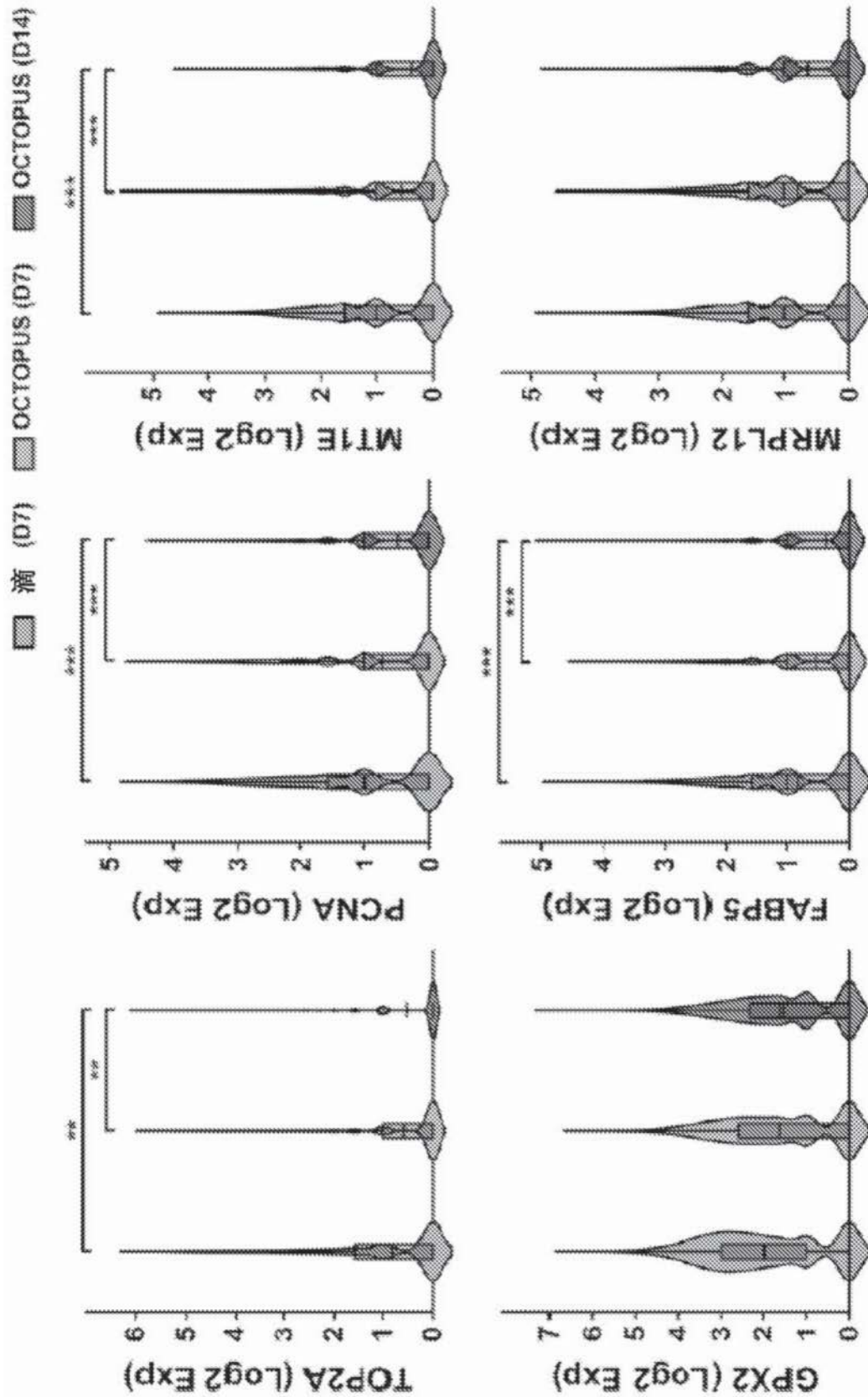


图13S

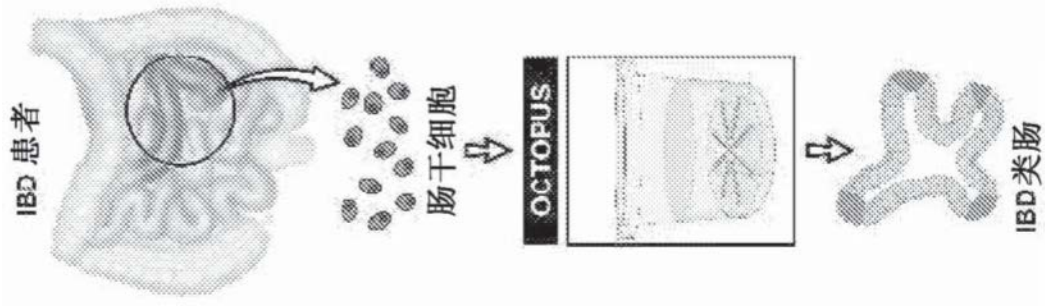


图14A

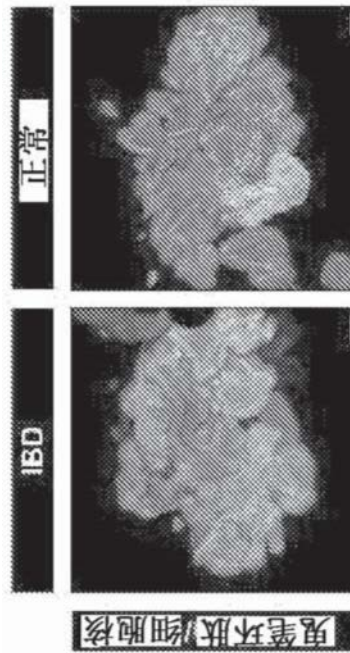


图14B

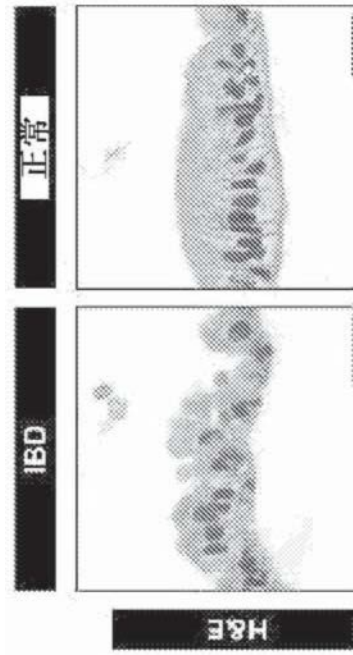


图14C

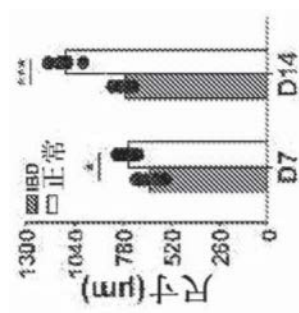


图14D

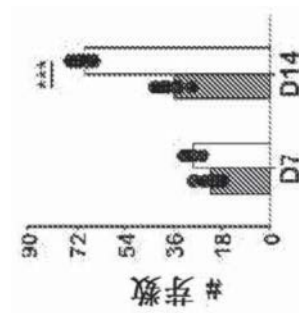


图14E

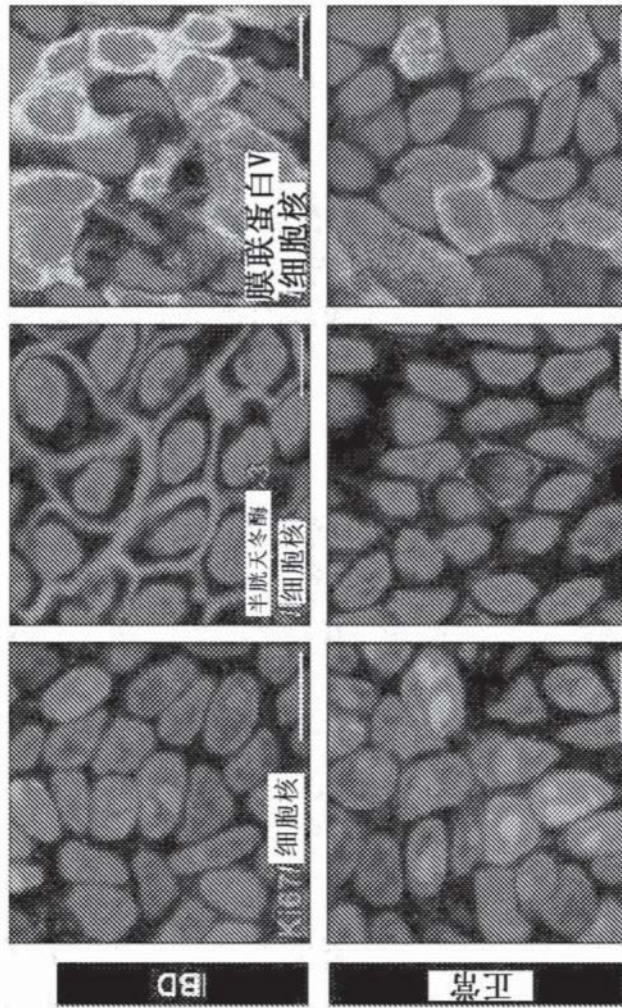


图14F

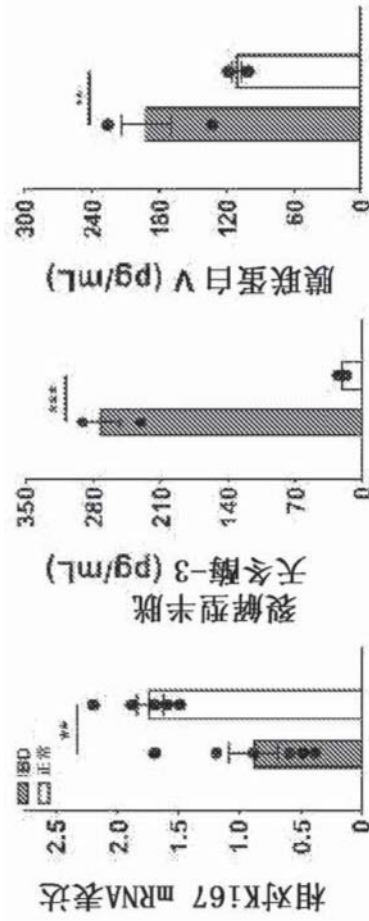


图14G

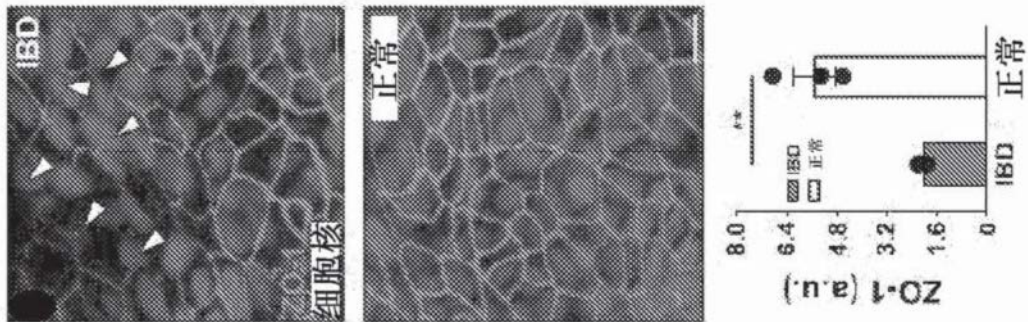


图14H

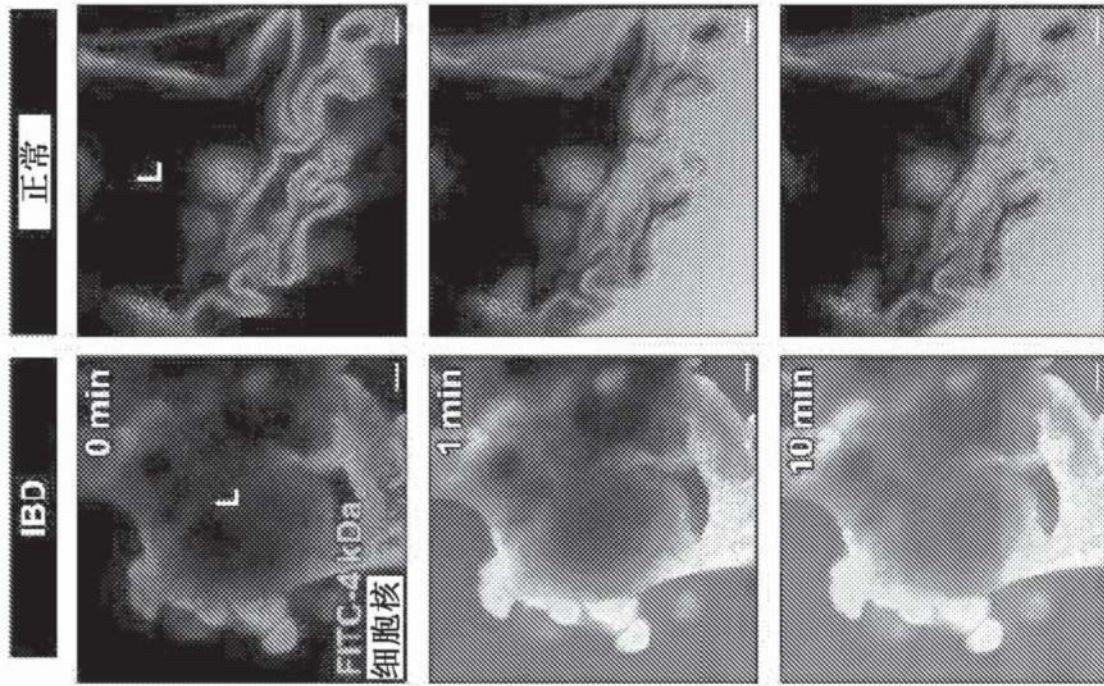


图14I

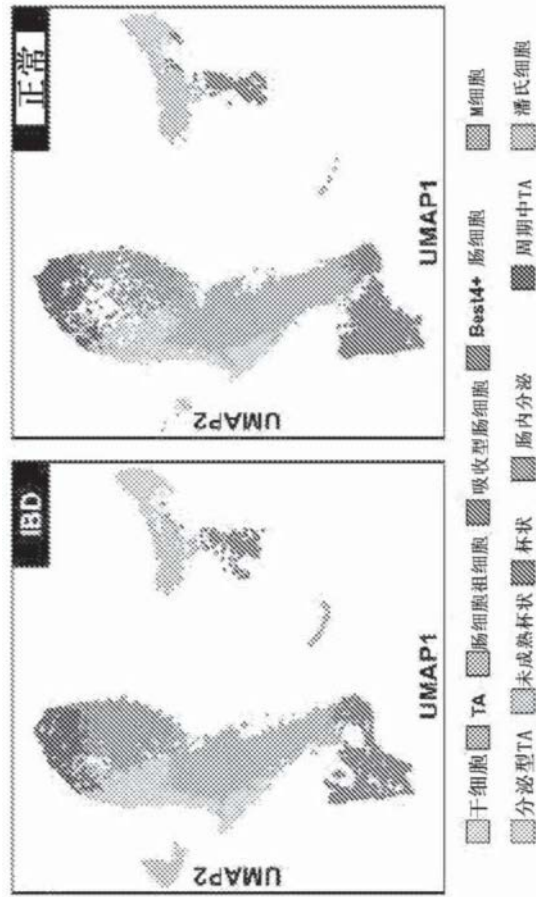


图14J

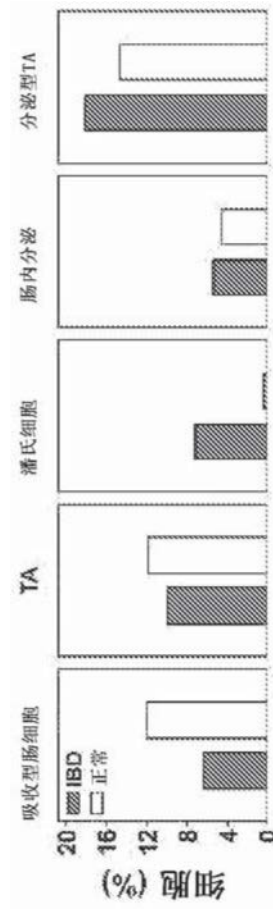


图14K

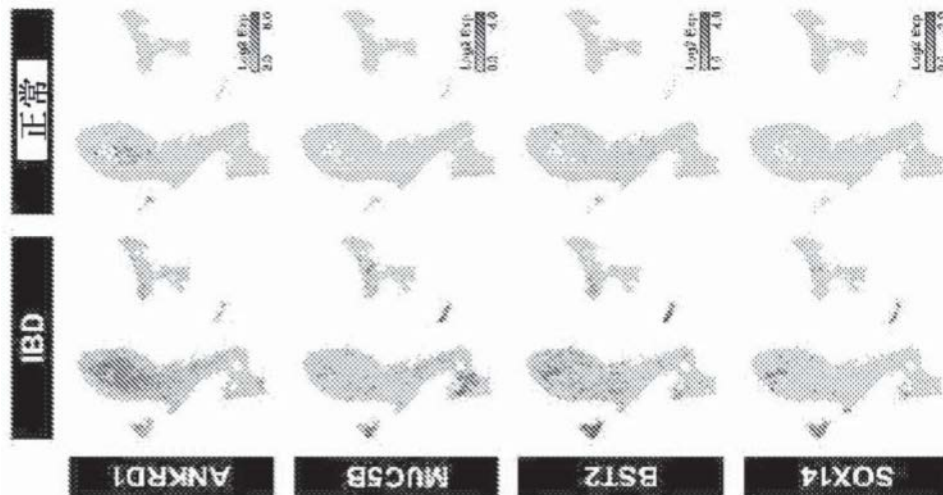


图14L

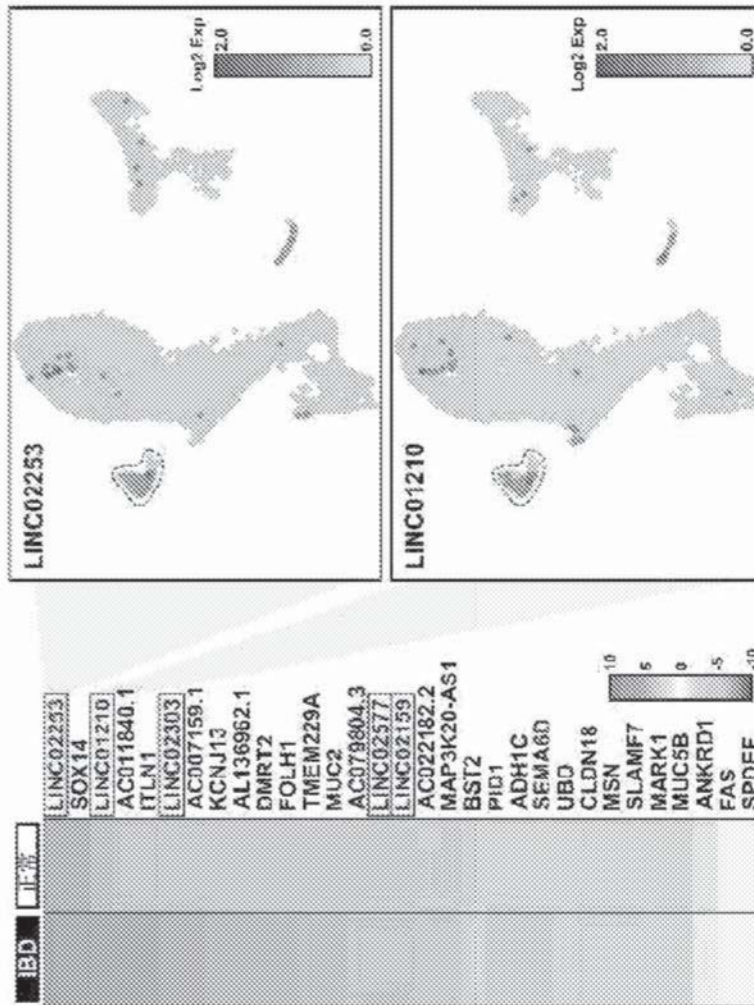


图 14M

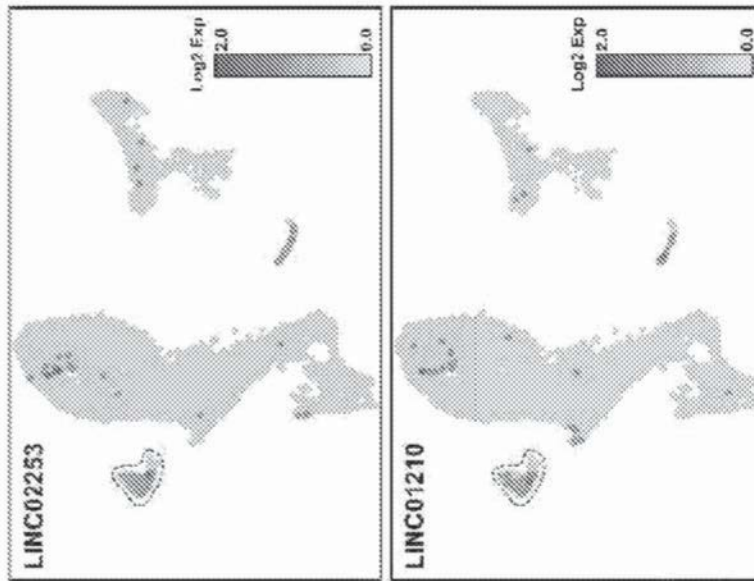


图 14N

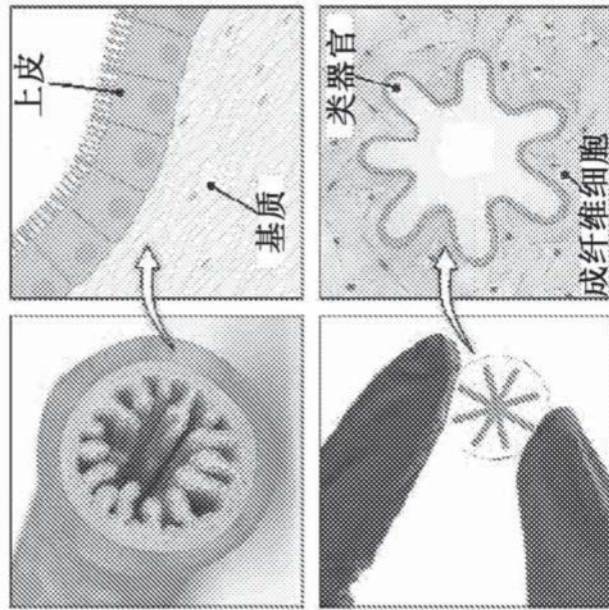


图140

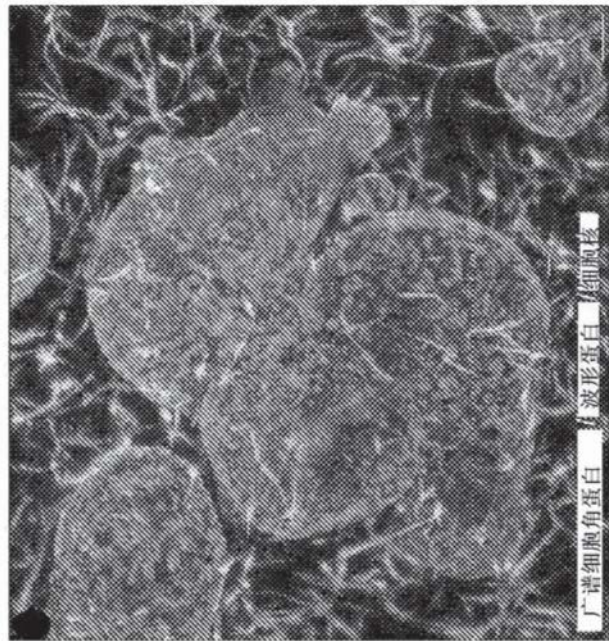


图14P

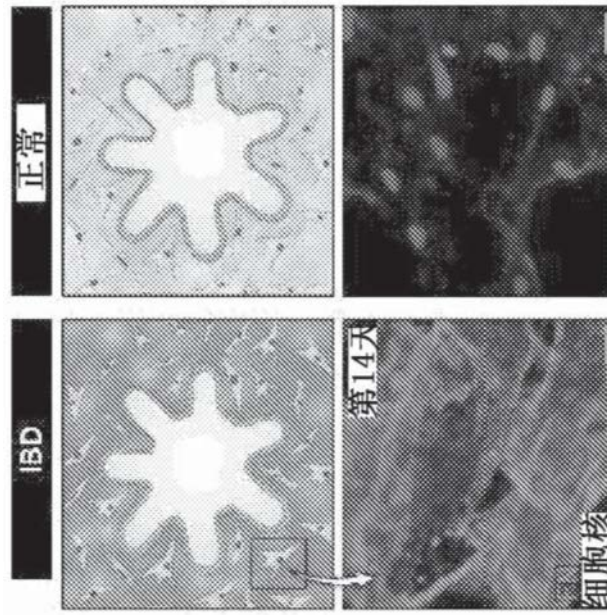


图14Q

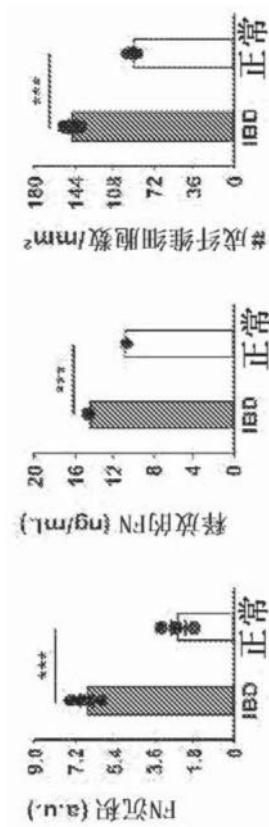


图14R

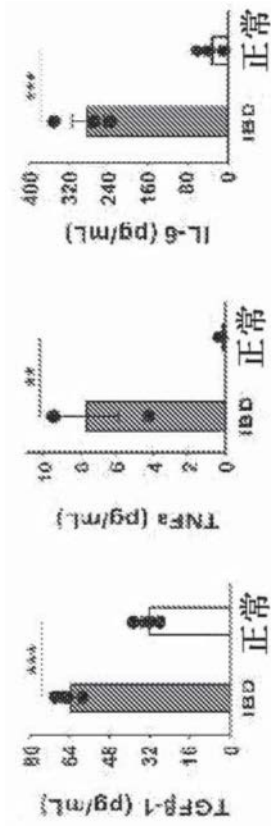


图14S

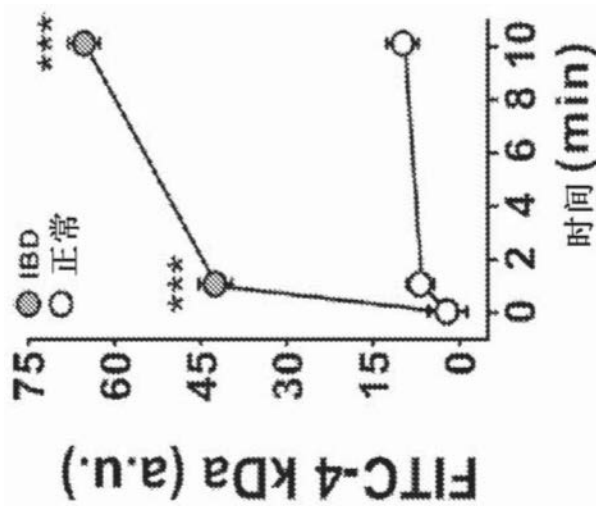


图14T

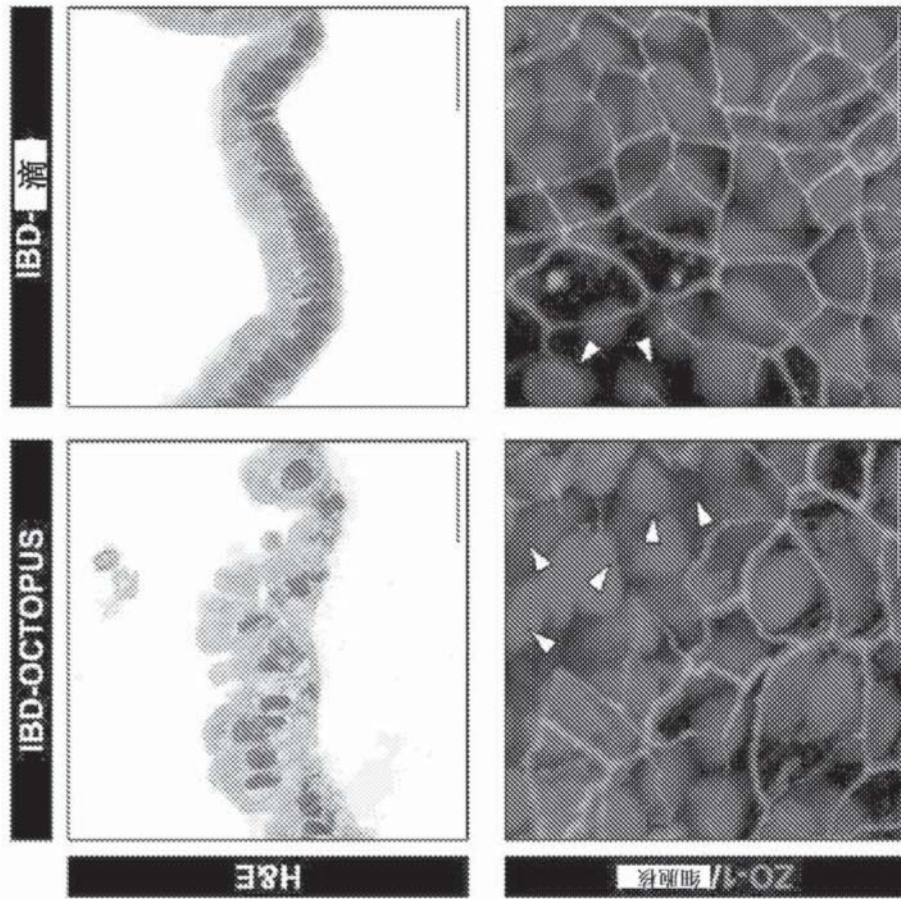


图14U

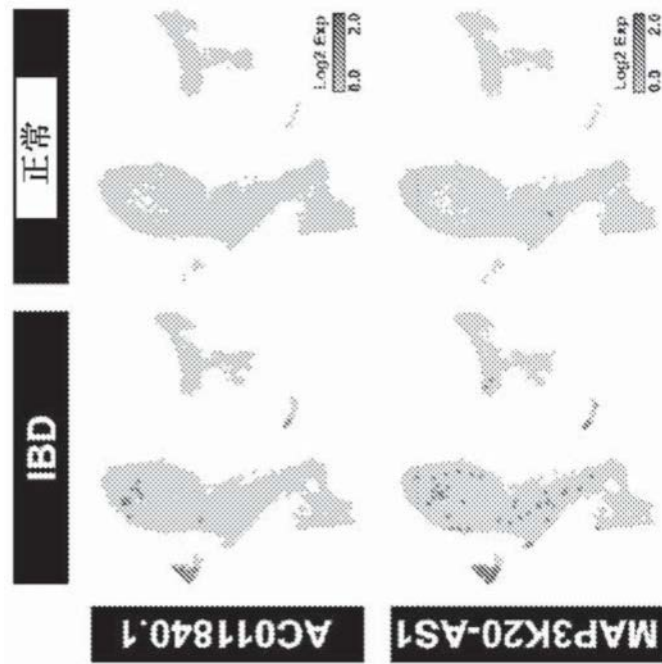


图14V

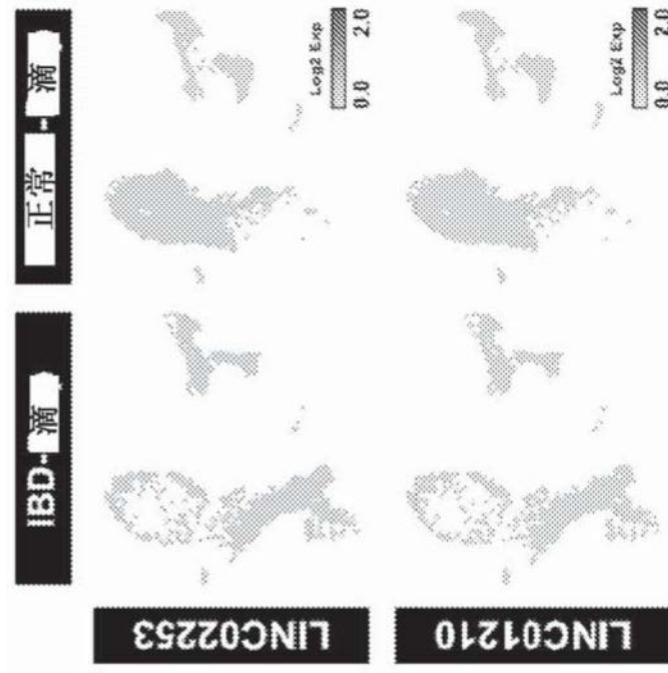


图14W

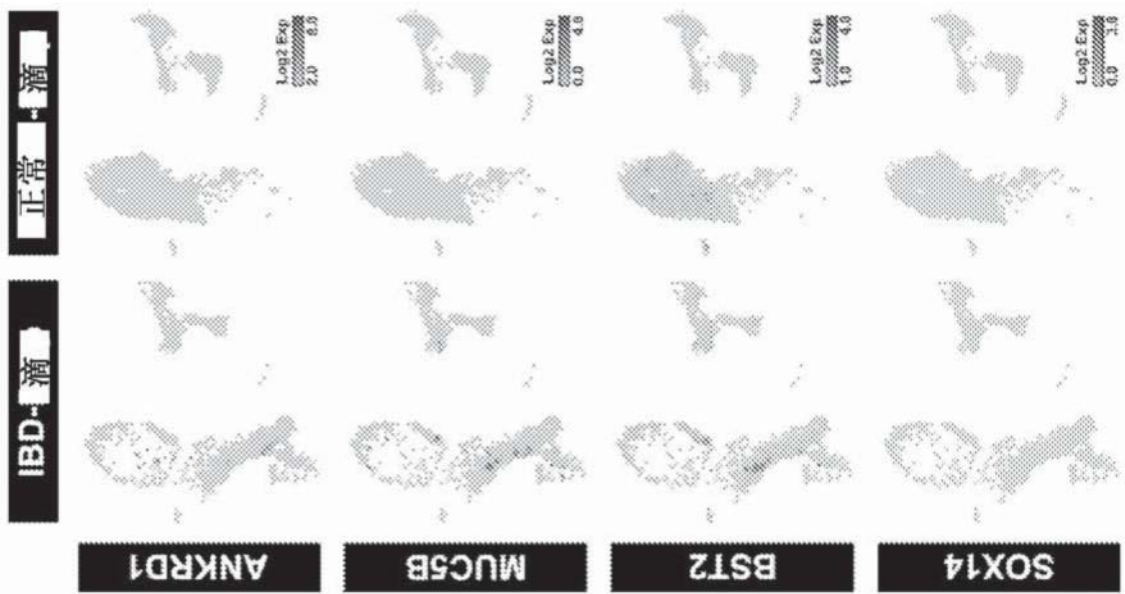


图14X

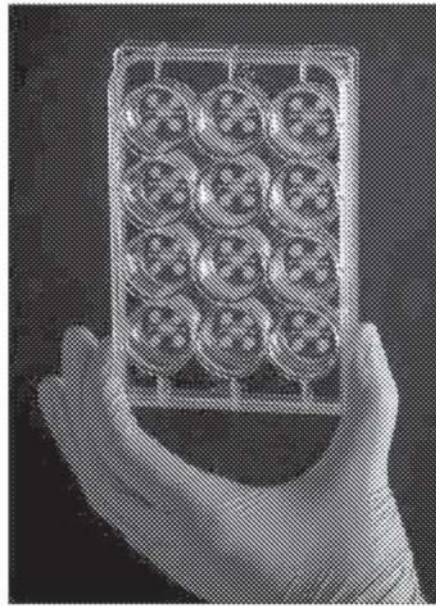


图15A

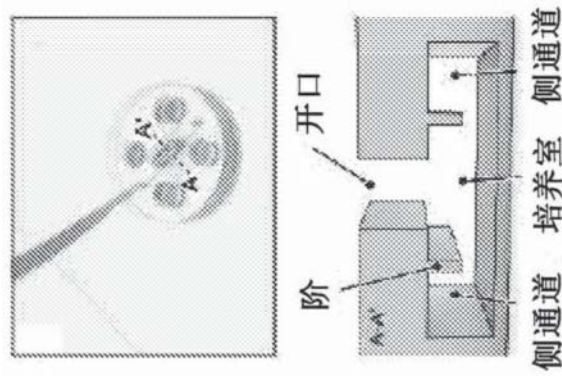
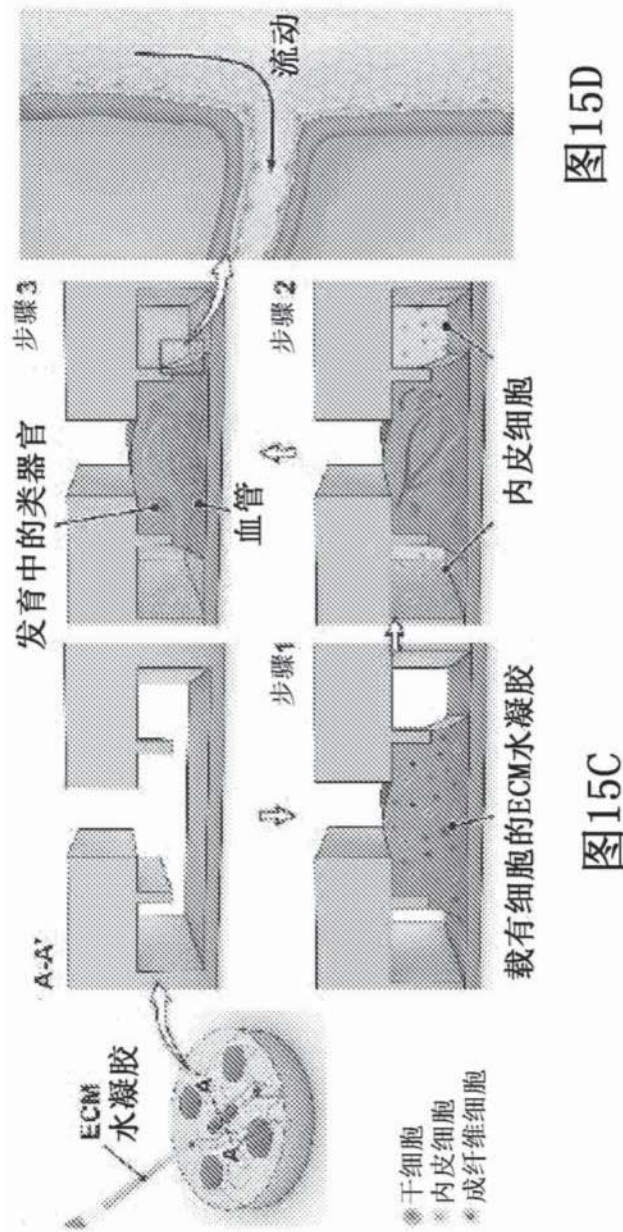


图15B



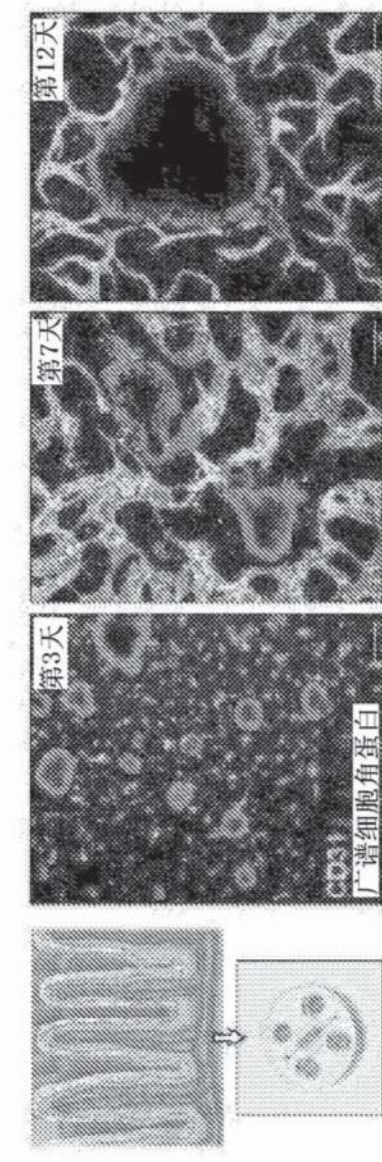


图15E

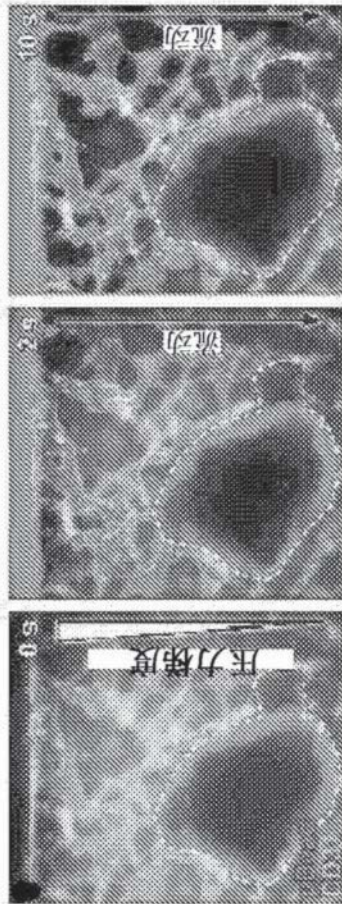


图15F

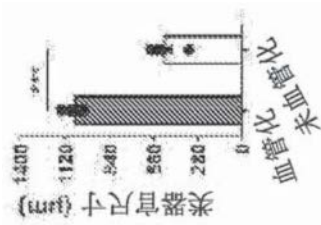


图15G

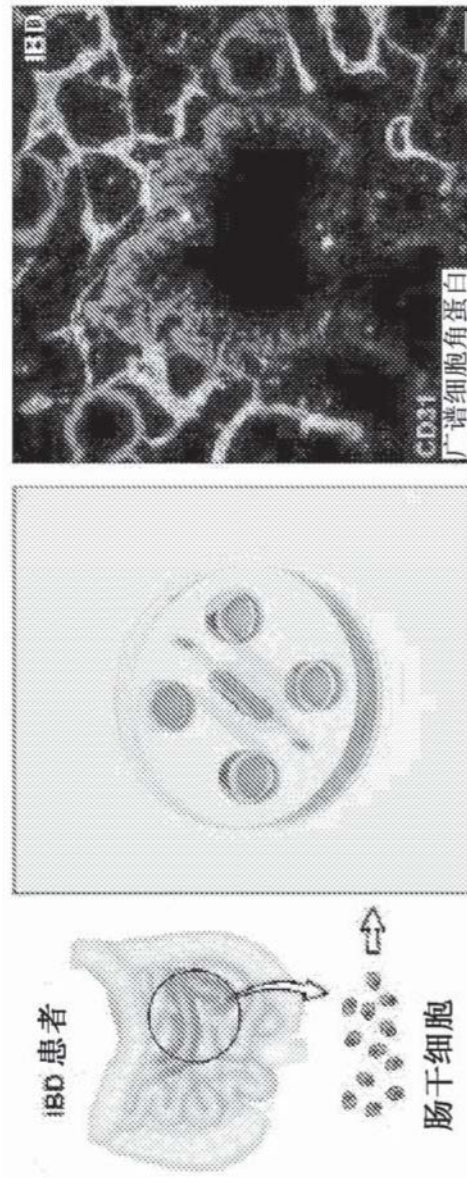


图15H

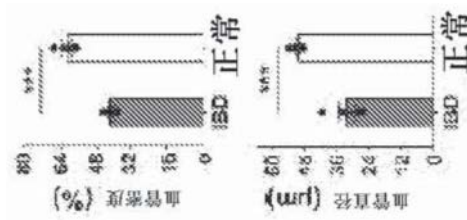


图15I

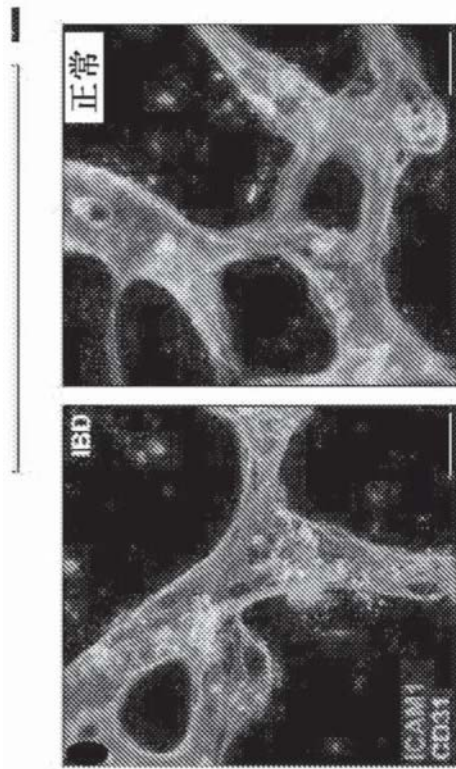


图15J

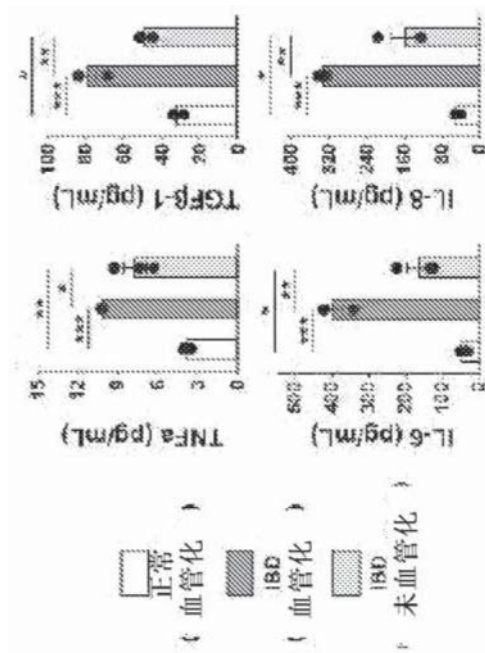


图15K

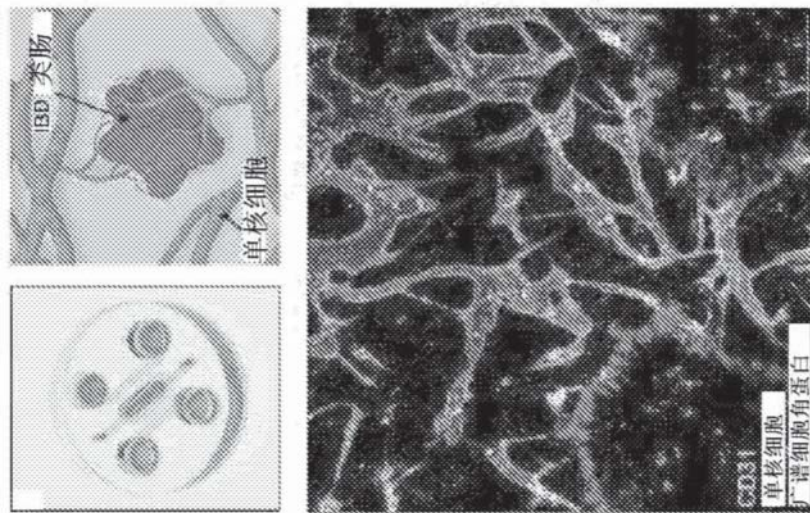


图15L

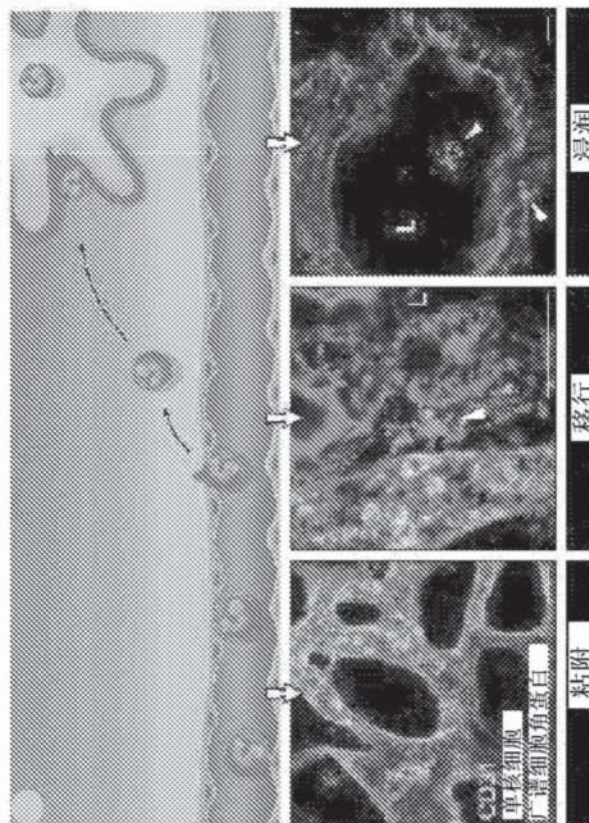


图15M

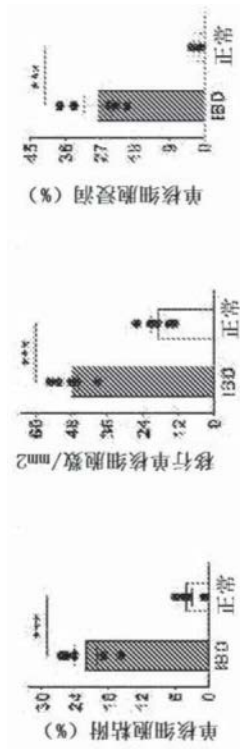


图15N

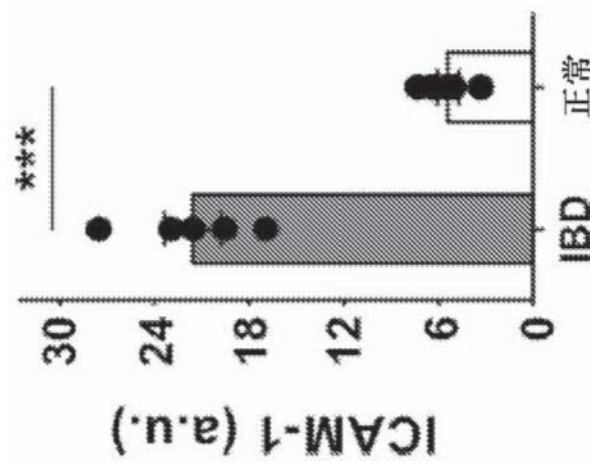


图150