



(10) 授权公告号 CN 117549552 B

(45) 授权公告日 2024.05.07

(21) 申请号 202410036823.3

(22) 申请日 2024.01.10

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 117549552 A

(43) 申请公布日 2024.02.13

(73) 专利权人 中国科学院化学研究所

地址 100190 北京市海淀区中关村北一街2号

(72) 发明人 苏萌 陈炳达 谢岱希 宋延林

(74) 专利代理机构 北京知元同创知识产权代理

事务所(普通合伙) 11535

专利代理师 谢蓉

(51) Int. Cl.

B29C 64/10 (2017.01)

C12N 5/09 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

B29C 64/314 (2017.01)

B33Y 10/00 (2015.01)

B33Y 40/00 (2020.01)

(56) 对比文件

CN 113117765 A, 2021.07.16

CN 112661983 A, 2021.04.16

CN 113679888 A, 2021.11.23

CN 113846050 A, 2021.12.28

CN 115068695 A, 2022.09.20

CN 115373217 A, 2022.11.22

KR 20170029779 A, 2017.03.16

审查员 许文彦

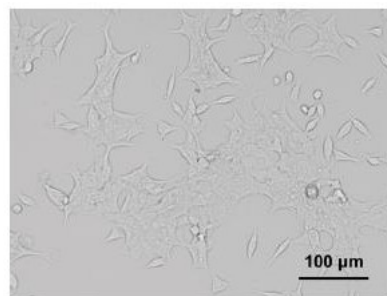
权利要求书1页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

一种细胞或类器官芯片及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种细胞或类器官芯片及其制备方法与应用,该方法包括以下步骤:S1:制备生物活性墨水,所述生物活性墨水包括分散介质和生物单元;S2:通过3D打印方法将生物活性墨水打印到基底上,得到所述细胞或类器官芯片。本发明通过打印技术制备具有类器官微阵列的药物筛选芯片,可以利用少量样本实现高通量药物筛选。



1. 一种细胞或类器官芯片的制备方法,其特征在于:所述制备方法包括以下步骤:

S1:制备生物活性墨水,所述生物活性墨水包括分散介质和生物单元;

所述分散介质中至少包括水凝胶交联前体和水凝胶粘附增强剂,水凝胶交联前体和水凝胶粘附增强剂的质量比为(1~10):0.5;所述水凝胶交联前体包括光敏性水凝胶前体和离子型水凝胶前体,所述光敏性水凝胶前体和离子型水凝胶前体的质量比为1:(0~5);

所述分散介质中还包括交联引发剂;

所述光敏性水凝胶前体为甲基丙烯酰化海藻酸钠;所述离子型水凝胶前体为海藻酸钠和羧甲基纤维素;所述水凝胶粘附增强剂为聚多巴胺;所述交联引发剂为苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基亚磷酸锂;

S2:通过3D打印方法将所述生物活性墨水打印到基底上形成墨点,得到所述细胞或类器官芯片;

在步骤S1和步骤S2之间,还包括将基底进行预处理和表面修饰的步骤;

基底的预处理步骤如下:将基底进行丙酮处理,得到预处理的基底;基底的修饰的步骤如下:(1)将多巴胺盐溶解于缓冲液中,得到多巴胺水溶液;(2)将预处理的基底浸入多巴胺水溶液中,加热,静置得到修饰的基底。

2.如权利要求1所述的一种细胞或类器官芯片的制备方法,其特征在于:所述分散介质中还包括层粘蛋白、RGD多肽、细胞因子、抗生素、小分子化合物、纤维素酶、培养基中的一种或几种。

3.如权利要求1所述的一种细胞或类器官芯片的制备方法,其特征在于:所述生物单元包括细胞、组织或类器官;还包括或不包括药物。

4.如权利要求1-3任一项所述的一种细胞或类器官芯片的制备方法,其特征在于:步骤S2中,3D打印的参数设置包括:打印图案、打印针头距离基底的高度、喷墨气压、单位点喷墨时间、基底接触角和墨滴打印精度中的至少一种。

5.如权利要求1所述的一种细胞或类器官芯片的制备方法,其特征在于:预处理的时间为10-20min。

6.如权利要求1所述的一种细胞或类器官芯片的制备方法,其特征在于:多巴胺的浓度为10-90mg/mL。

7.一种细胞或类器官芯片,由权利要求1-6任一种所述的制备方法制备得到。

8.权利要求7所述的细胞或类器官芯片在非诊断和治疗目的药物筛选、器官模型构建或组织工程中的应用。

9.权利要求7所述的细胞或类器官芯片在非诊断和治疗目的药物毒性和功效测试中的应用。

一种细胞或类器官芯片及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞或组织培养技术领域,尤其涉及一种细胞或类器官芯片及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 类器官是复杂的三维细胞培养系统,能够在体外自我更新和重组,再现了真实器官的行为和功能。类器官可由直接病人癌组织产生,被称为“培养皿中的器官”,在生物医学的许多应用中作为一个宝贵生物模型,涉及药物筛选和设计、疾病建模和发育生物学的研究,特别是针对微量样品的进行超灵敏早期诊断与诊疗指南指定方面。目前,类器官的培养通常成本昂贵且周期较长(至少一个月),且对实验操作人员的基础知识、熟练度要求很高,人为操作的差异明显,导致相关检测芯片的制造技术难度较大,这阻碍了其在高通量筛选、再生医学和诊断中的应用。因此,设计和制备一种快速、便捷的细胞、类器官药筛芯片对临床诊断和生物医学研究具有极其重要意义。

发明内容

[0003] 针对现有技术中所存在的不足,本发明提供了一种细胞或类器官芯片及其制备方法与应用,其解决了现有芯片中存在的成本昂贵且周期较长、操作复杂的问题。

[0004] 具体的,本发明提供如下技术方案:

[0005] 一种细胞或类器官芯片的制备方法,具体的是一种高通量细胞或类器官芯片的制备方法,所述制备方法包括以下步骤:

[0006] S1:制备生物活性墨水,所述生物活性墨水包括分散介质和生物单元;

[0007] S2:通过3D打印方法将所述生物活性墨水打印到基底上,得到所述细胞或类器官芯片。

[0008] 根据本发明,在步骤S1和步骤S2之间,还包括将基底进行预处理和表面修饰的步骤。

[0009] 本发明还提供一种细胞或类器官芯片,具体是一种高通量细胞或类器官芯片,其由上述的制备方法制备得到。

[0010] 本发明还提供所述细胞或类器官芯片在药物筛选、药物毒性和功效测试、器官模型构建、或组织工程中的应用。

[0011] 具体的,所述细胞或类器官芯片可以实现高通量的药物筛选、药物毒性和功效测试。

[0012] 相比于现有技术,本发明具有如下有益效果:

[0013] (1) 本发明的细胞或类器官芯片,相比现有技术,具有高通量的特性,另外还具有打印精度高、细胞存活率高等诸多优势。

[0014] (2) 相比传统手工点样技术,本发明的方法所需细胞量少,通量高,自动化程度高,极大减少细胞培养成本、培养时间及人工成本,降低人工误差。

[0015] (3) 相比现有技术仅能通过手术切除组织提取细胞进行培养,本发明可以利用细胞量更少的活检样本进行细胞提取,极大减少细胞样本扩增所需时间,可缩短从病人身上得到肿瘤组织到得出药物筛选结果的时间,及时为后续治疗提供指导信息。

[0016] (4) 本发明的芯片可以是一种具有类器官微阵列的药物筛选芯片,所述芯片可以利用少量样本实现高通量药物筛选。

附图说明

[0017] 图1为本发明的高通量细胞芯片中培养的肠癌细胞的形态图。

[0018] 图2为本发明的高通量类器官芯片中培养的结肠癌类器官的形态图。

[0019] 图3为打印过程中不同喷墨气压及喷墨时间成型的墨点,其中喷墨气压分别为10psi、50psi;喷墨时间分别为0.1s、0.4s、0.8s。

[0020] 图4为本发明的通过打印法制备的高通量细胞或类器官芯片的示意图与实物图;通过打印法制备的高通量细胞或类器官芯片的示意图如图4a所示,实物图如图4b所示,4c为显微镜下细胞图。

[0021] 图5为打印前后生物墨水中细胞的存活率对比染色图和数量统计图,a为打印前活细胞和死细胞对比染色图,b为打印后活细胞和死细胞对比染色图;c为打印前后细胞存活率统计图。

具体实施方式

[0022] 下文将结合具体实施例对本发明的技术方案做更进一步的详细说明。应当理解,下列实施例仅为示例性地说明和解释本发明,而不应被解释为对本发明保护范围的限制。凡基于本发明上述内容所实现的技术均涵盖在本发明旨在保护的范围内。

[0023] 除非另有说明,以下实施例中使用的原料和试剂均为市售商品,或者可以通过已知方法制备。

[0024] 本发明中,“高通量”是指单个芯片即可同时完成大量药物筛选或检测。以药物筛选为例,单个芯片即可同时完成至少十种以上(例如几十种)药物组合的筛选,这就是本发明所指的“高通量”。例如,图4所示,一个芯片上具有多个包含细胞或类器官的点阵,该点阵中的每个水凝胶微点可独立进行一种药物组合筛选,这样就实现了单个芯片同时完成大量药物筛选。

[0025] 研究发现,基于喷墨打印的纳米绿色印刷技术,具有图案精度容易调控的特点,通过调节含细胞的生物墨水特性、调控打印过程中墨滴与基底的铺展与去浸润行为等,能够有效调控打印墨滴在基底表面的成型过程,提高打印精度,最终实现细胞芯片的快速、简单、大面积制备。

[0026] 基于上述发现,本发明提供了一种细胞或类器官芯片的制备方法,具体的是一种高通量细胞或类器官芯片的制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0027] S1:制备生物活性墨水,所述生物活性墨水包括分散介质和生物单元;

[0028] S2:通过3D打印方法将所述生物活性墨水打印到基底上,得到所述细胞或类器官芯片。

[0029] <步骤S1>

[0030] 在本发明一实施方式中,所述分散介质包括水凝胶交联前体和水凝胶粘附增强剂。

[0031] 在本发明一实施方式中,所述分散介质中,水凝胶交联前体和水凝胶粘附增强剂的质量比为(1~10):0.5;示例性地,为1:0.5、2:0.5、3:0.5、4:0.5、5:0.5、6:0.5、7:0.5、8:0.5、9:0.5、10:0.5或介于其中的某一具体比例值。

[0032] 在本发明一实施方式中,所述分散介质至少包括水凝胶交联前体,任选添加或不添加交联引发剂。当添加交联引发剂时,在形成生物墨水时所述水凝胶交联前体能够与对应的交联引发剂作用形成水凝胶。

[0033] 在本发明一实施方式中,所述交联引发剂选自光引发剂、离子引发剂中的一种或几种。

[0034] 在本发明一实施方式中,所述光引发剂包括但不限于苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基亚磷酸锂(简称LAP)、2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮(I2959)、2,4,6-三甲基苯甲酰基苯基膦酸乙酯(TPO-L)中的至少一种。

[0035] 在本发明一实施方式中,所述离子引发剂包括但不限于氯化钙溶液、氯化钡溶液中的至少一种。

[0036] 在本发明一实施方式中,所述水凝胶交联前体选自光敏性水凝胶前体、离子型水凝胶前体、热固化水凝胶前体中的一种或几种。优选地,所述水凝胶交联前体为光敏性水凝胶前体和/或离子型水凝胶前体。

[0037] 在本发明一实施方式中,所述热固化水凝胶前体包括但不限于基质胶、聚醚F127二丙烯酸酯中的至少一种。

[0038] 在本发明一实施方式中,所述水凝胶交联前体包括光敏性水凝胶前体和离子型水凝胶前体,所述光敏性水凝胶前体和离子型水凝胶前体的质量比为1:(0~5),优选所述光敏性水凝胶前体和离子型水凝胶前体的质量比为1:(0~3),例如为1:1。

[0039] 在本发明一实施方式中,所述光敏性水凝胶前体包括但不限于甲基丙烯酰化海藻酸钠(AlgMA)、甲基丙烯酰化透明质酸(HAMA)、甲基丙烯酰化壳聚糖、甲基丙烯酰化羧甲基壳聚糖、甲基丙烯酰化聚赖氨酸(PLMA)、甲基丙烯酰化明胶(GM)、甲基丙烯酰化丝素蛋白(SilMA)、甲基丙烯酰化葡聚糖(DeXMA)、甲基丙烯酰化硫酸软骨素(ChSMA)、聚醚F127二丙烯酸酯、聚乙二醇二丙烯酸酯、四臂聚乙二醇丙烯酸酯、以及其他丙烯酰化的材料(如丙烯酰化RGD肽、丙烯酰化聚乙二醇NHS酯)。

[0040] 在本发明一实施方式中,所述离子型水凝胶前体包括但不限于羧甲基纤维素、海藻酸钠、羧甲基壳聚糖。

[0041] 在本发明一实施方式中,所述水凝胶交联前体为光敏性水凝胶前体和离子型水凝胶前体的组合物。研究发现,当选择所述组合物作为水凝胶交联前体时,光敏性水凝胶前体和离子型水凝胶前体可以通过调控光固化时间来调控墨水的粘度,进而控制细胞的生长状态;由于离子交联的键合强度要强于光交联的键合强度,加入离子型水凝胶前体可以进一步强化水凝胶的空间骨架强度,提高水凝胶的稳定性,拓宽细胞生长环境的可调控范围。另外,光固化水凝胶前体中的甲基丙烯酰化海藻酸钠、甲基丙烯酰化明胶和甲基丙烯酰化透明质酸,既具有光固化性能,也具有离子固化性能,在使用时,即使不加入离子型水凝胶前体,也可以先进行光固化调控墨水的粘度,再进行离子固化加强凝胶的稳定性,有效调控细

胞的生长环境,也就是说,当选择甲基丙烯酸酰化海藻酸钠、甲基丙烯酸酰化明胶和甲基丙烯酸酰化透明质酸作为光固化水凝胶前体时,即使仅加入光固化水凝胶前体,也可以达到与同时加入离子型水凝胶前体相同的效果。

[0042] 在本发明一实施方式中,当所述水凝胶交联前体包括光敏性水凝胶前体时,所述分散介质包括光引发剂。

[0043] 在本发明一实施方式中,所述光敏性水凝胶前体与光引发剂的质量比为(2~15):1;优选所述光敏性水凝胶前体与光引发剂的质量比为(3~12):1;例如为4:1、7:1、9:1、10:1、12:1。

[0044] 在本发明一实施方式中,所述分散介质还至少包括水凝胶粘附增强剂,所述水凝胶粘附增强剂用于增强水凝胶对基底的粘附性。具体的,所述水凝胶粘附增强剂包括但不限于聚多巴胺、聚甲基丙烯酰胺、聚乙二醇、聚乙烯醇等中的至少一种。

[0045] 作为一个实例,所述分散介质至少包括羧甲基纤维素和聚多巴胺。

[0046] 作为一个实例,所述分散介质至少包括海藻酸盐、羧甲基纤维素和聚多巴胺。

[0047] 作为一个实例,所述分散介质至少包括聚多巴胺、光敏性水凝胶前体和光引发剂。

[0048] 作为一个实例,所述分散介质至少包括海藻酸盐、羧甲基纤维素、聚多巴胺和壳聚糖。

[0049] 在本发明一实施方式中,所述分散介质至少包括海藻酸盐、羧甲基纤维素、聚多巴胺、光敏性水凝胶前体和引发剂。

[0050] 在本发明一具体实施方式中,所述光敏性水凝胶前体包括甲基丙烯酸酰化海藻酸钠。

[0051] 在本发明一具体实施方式中,所述引发剂包括苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基亚磷酸锂(简称LAP)。

[0052] 在本发明一具体实施方式中,所述海藻酸盐、羧甲基纤维素、聚多巴胺、光敏性水凝胶前体和引发剂的质量比为(1~5):1:0.5:(1~5):(0.05~0.25)。

[0053] 示例性地,所述质量比中,海藻酸盐的配比为1~5中的任一点值,具体例如1、2、3、4或5。

[0054] 示例性地,所述质量比中,光敏性水凝胶前体的配比为1~5中的任一点值,具体例如1、2、3、4或5。

[0055] 示例性地,所述质量比中,引发剂的配比为0.05~0.25中的任一点值,具体例如0.05、0.10、0.15、0.20或0.25。

[0056] 在本发明一具体实施方式中,所述分散介质中还包括层粘蛋白、RGD多肽、细胞因子、抗生素、小分子化合物、纤维素酶、添加剂、培养基中的一种或几种。

[0057] 在本发明一具体实施方式中,所述层粘蛋白和/或RGD多肽的浓度为0.1-1mg/ml。

[0058] 在本发明一具体实施方式中,所述细胞因子包括但不限于:R-Spondin细胞生长因子、mNoggin细胞生长因子、EGF细胞生长因子、Wnt3a细胞生长因子中的至少一种。

[0059] 在本发明一具体实施方式中,所述细胞因子的浓度为50-100 ng/mL。

[0060] 在本发明一具体实施方式中,所述抗生素包括但不限于Primocin™ 原代细胞抗生素。

[0061] 在本发明一具体实施方式中,所述抗生素的浓度为50-100 μg/ mL。

[0062] 在本发明进一步的具体实施方式中,所述小分子化合物包括但不限于SB202190(4-(4-氟苯基)-2-(4-羟基苯基)-5-(4-吡啶基)-1H-咪唑)、Gastrin I胃泌素、A83-01(3-(6-甲基-2-吡啶基)-N-苯基-4-(4-喹啉基)-1H-吡唑-1-硫代甲酰胺)、烟酰胺、前列腺素E2(Prostaglandin E2)、及N-乙酰-L-半胱氨酸、GlutaMAX™、Y-27632中的至少一种。

[0063] 在本发明一具体实施方式中,所述小分子化合物的浓度为10 nM-10 mM。

[0064] 在本发明一具体实施方式中,所述纤维素酶包括但不限于内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶,多为市面常售的混合型纤维素酶(Cas No:9012-54-8)(包含以上所有成分)。

[0065] 在本发明一具体实施方式中,所述纤维素酶的浓度为0.01-0.1%。

[0066] 在本发明一具体实施方式中,所述添加剂包括B-27™ 添加剂。

[0067] 在本发明一具体实施方式中,所述添加剂的浓度为1%-2%。

[0068] 在本发明一具体实施方式中,所述培养基包括但不限于DMEM/F12培养基。

[0069] 在本发明一实施方式中,所述生物单元包括细胞、组织或类器官。

[0070] 在本发明一具体实施方式中,所述细胞包含但不限于正常原代细胞、肿瘤原代细胞、细胞系、诱导多能干细胞等中的至少一种。具体的,所述正常原代细胞包括上皮细胞、神经细胞、红细胞、白细胞、血小板、吞噬细胞(噬中性粒细胞、噬碱性粒细胞、噬酸性粒细胞等)、B淋巴细胞、效应B细胞、记忆B细胞、T淋巴细胞、记忆T细胞、效应T细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、成骨细胞、神经胶质细胞、肝细胞、肾细胞、腺细胞、内分泌细胞(甲状腺细胞、胸腺细胞、胰岛B细胞、胰岛细胞等)、造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞、肝干细胞、肌肉卫星细胞、皮肤表皮干细胞、肠上皮干细胞、视网膜干细胞、胰腺干细胞等,所述肿瘤原代细胞包括前列腺癌细胞、上皮癌细胞、乳腺癌细胞、肾癌细胞、肺癌细胞、结肠癌细胞、结直肠癌细胞、胃癌细胞、脑癌细胞、胶质母细胞瘤细胞、胰腺癌细胞、髓样白血病细胞、宫颈癌细胞、甲状腺髓样癌细胞、基质卵巢癌细胞、星形细胞瘤细胞、上皮癌细胞、神经内分泌癌细胞、胃肠胰肿瘤细胞、非霍奇金淋巴瘤细胞、外分泌胰腺癌细胞、尤因肉瘤细胞、皮肤癌细胞、黑色素瘤细胞,所述细胞系包括HeLa人宫颈癌细胞、SW480人结肠腺癌细胞、HCT116人结肠癌细胞、Caco-2人结肠癌细胞、LOVO人结直肠癌细胞、DLD1人结肠腺癌细胞、HepG2人肝癌细胞等中的至少一种。

[0071] 在本发明一具体实施方式中,所述组织包含但不限于细胞团、小块生物组织、细胞质基质等中的一种或多种。具体的,所述生物组织包含但不限于上皮组织、结缔组织、肌肉组织、神经组织中的一种或多种。

[0072] 在本发明一具体实施方式中,所述类器官包括但不限于包括小肠类器官、胃类器官、结肠类器官、肺类器官、膀胱类器官、大脑类器官、肝脏类器官、胰腺类器官、肾脏类器官、卵巢类器官、食道类器官、心脏类器官中的一种或多种。

[0073] 在本发明一具体实施方式中,所述生物单元中细胞的浓度为 10^4 - 10^6 个/mL。

[0074] 在本发明一实施方式中,所述生物单元中还可以包括药物。

[0075] 具体的,所述药物为待筛的药物,包含任何能够均匀分散于水、缓冲溶液(PBS、HEPES、生理盐水等)、血清、培养基等介质中的颗粒或分子,可以是一种药物,也可以是多种混合药物。

[0076] 以结肠癌的治疗药物为例,可以是奥沙利铂、LV、5-FU、贝伐珠单抗、西妥昔单抗、

卡培他滨、伊立替康、瑞戈非尼、呋喹替尼、曲氟尿苷替匹嘧啶、曲妥珠单抗、拉帕替尼、维莫非尼、达拉非尼、曲美替尼、雷替曲塞或帕博利珠单抗等。

[0077] 在本发明一实施方式中,所述混合药物可以预先将多种药物混合于同一墨管进行打印;也可以将多种药物分装于不同的墨管,通过在同一位点进行多轮打印完成药物混合;优选为后者,以此减少人为操作步骤。

[0078] 在本发明一具体实施方式中,所述生物单元的来源包括病人组织切片、组织分离物、原代细胞(组织)、传代细胞(组织)、实验室细胞等中的一种或多种。

[0079] 在本发明一实施方式中,步骤S1具体包括:配制含有海藻酸盐、羧甲基纤维素、聚多巴胺、光敏性水凝胶前体和引发剂的分散介质,将所述生物单元与所述分散介质混合,得到所述生物活性墨水。

[0080] 在本发明一具体实施方式中,配制分散介质的步骤包括:将海藻酸盐、羧甲基纤维素、聚多巴胺、光敏性水凝胶前体和引发剂与其他组分混合,得到所述分散介质;所述其他组分包括层粘蛋白、RGD多肽、细胞因子、抗生素、小分子化合物、纤维素酶、培养基中的至少一种。

[0081] 在本发明一具体实施方式中,所述混合通过本领域常规的方法进行,例如通过搅拌、超声、吹吸、离心、震荡等一种或多种。

[0082] 在本发明一具体实施方式中,所述的分散介质在使用前需要灭菌处理。具体的,灭菌处理方式包含钴60辐照灭菌、高压蒸汽灭菌、紫外灯照射灭菌或细菌过滤器过滤细菌;具体的,灭菌的同时不能改变物质的性能,优选为细菌过滤器过滤细菌。

[0083] <步骤S2>

[0084] 在本发明一实施方式中,所述基底(基材)可以是柔性材料,也可以是硬性材料。

[0085] 在本发明一具体实施方式中,所述柔性材料包含高分子膜、水凝胶等一种或多种材料。所述高分子膜例如为聚二甲基硅氧烷膜(PDMS)、聚对苯二甲酸乙二醇酯膜(PET)、ABS塑料膜、聚四氟乙烯膜。所述水凝胶例如为透明质酸水凝胶、海藻酸水凝胶、纤维素水凝胶、壳聚糖水凝胶、胶原蛋白水凝胶、明胶水凝胶、丝素水凝胶、琼脂水凝胶、DNA水凝胶、去细胞化组织水凝胶、聚乙烯醇水凝胶、聚丙烯酸水凝胶、聚乙二醇水凝胶、聚多巴胺(PDA)水凝胶或聚丙烯酸酯水凝胶等;优选为聚对苯二甲酸乙二醇酯膜或聚多巴胺水凝胶。

[0086] 在本发明一具体实施方式中,所述硬性材料包含塑料类、硅类、金属类等一种或多种材料,所述塑料类例如为常见的培养皿、细胞培养孔板(材质可为聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚氨酯、聚碳酸酯、聚硅氮烯、聚四氟乙烯),所述硅类例如为玻璃片、单晶硅片、二氧化硅片、石英片或聚二甲基硅氧烷薄膜等,所述金属类例如为铝片、铜片、镍片或氧化铝片等;优选为铝片或玻璃片。

[0087] 在本发明一具体实施方式中,所述基材(基底)在使用前需要灭菌处理。具体的,灭菌处理方式包含75%乙醇浸泡灭菌、钴60辐照灭菌、高压蒸汽灭菌或紫外灯照射灭菌;从性价比角度考虑,优选为紫外灯照射一定时间(如30分钟)灭菌。

[0088] 在本发明一具体实施方式中,所述3D打印的参数设置包括:打印图案、打印针头距离基底的高度、喷墨气压、单位点喷墨时间、基底接触角、墨滴打印精度中的至少一种。

[0089] 优选地,所述打印图案设置为点阵、线条或2D/3D图案;

[0090] 优选地,所述打印针头距离基底的高度为20-100微米;

- [0091] 优选地,所述单位点喷墨时间为0-10s;
- [0092] 优选地,所述喷墨气压为0-60 psi,精度为0.1 psi;
- [0093] 其中,所述喷墨气压与墨水粘度相关,低粘度液体(如水,温度5℃,粘度1.5 mPa·s)对应喷墨气压为0.5-5.0psi,优选1.0psi;高粘度液体(如2%羧甲基纤维素与2%海藻酸钠混合物,温度4℃,剪切速率0.1/s,剪切应力26.554Pa,粘度250000±50000mPa·s)对应喷墨气压为10-55psi,优选30psi;
- [0094] 优选地,所述基底接触角为0-100度,优选为50±10度;
- [0095] 优选地,所述墨滴打印精度为100-1500微米,优选为300-500微米。所述墨滴打印精度定义为最小喷墨量于基底上形成的墨点尺寸,例如单点的直径、线的宽度等。本发明的生物活性墨水的设计,可以得到打印精度显著提高的墨滴,实现纳升级别的打印。
- [0096] <基底预处理和表面修饰>
- [0097] 在本发明一实施方式中,在步骤S1和步骤S2之间,还包括将基底进行预处理和表面修饰的步骤。
- [0098] 在本发明一实施方式中,所述预处理包括将基底进行丙酮处理,得到预处理的基底。
- [0099] 在本发明一具体实施方式中,预处理的时间为10-20min。
- [0100] 在本发明一实施方式中,所述表面修饰包括将基底表面进行多巴胺修饰。
- [0101] 在本发明一具体实施方式中,多巴胺的浓度为10-90mg/mL。
- [0102] 在本发明一具体实施方式中,所述表面修饰包括以下步骤:(1)将多巴胺盐溶解于缓冲液中,得到多巴胺水溶液;(2)将预处理的基底浸入多巴胺水溶液中,加热,静置得到修饰的基底。
- [0103] 在本发明进一步的具体实施方式中,所述表面修饰包括以下步骤:(1)将多巴胺盐酸盐溶解于Tris-HCl缓冲液(pH=8.8)得到90 mg/mL 的多巴胺水溶液;(2)将基底浸入上述多巴胺水溶液,60℃加热6h后室温静置过夜,移除剩余溶液,PBS清洗,氮气吹干,得到聚多巴胺接枝的高黏附性基底。
- [0104] 本发明中,通过预处理与表面修饰可以显著提高打印物(即所述水凝胶图案)与基底之间的粘附性。
- [0105] [细胞或类器官芯片及其应用]
- [0106] 本发明还提供一种细胞或类器官芯片,具体的,是一种高通量细胞或类器官芯片,其是由上述任一种制备方法制备得到的。
- [0107] 在一些具体实施方式中,所述芯片由基底及水凝胶(含细胞)图案构成。
- [0108] 本发明中,通过打印的方式使生物活性墨水在基底表面图案化,固化后得到高通量细胞或类器官芯片。
- [0109] 本发明还提供上述细胞或类器官芯片在药物筛选、药物毒性和功效测试、器官模型构建或组织工程中的应用。
- [0110] 具体的,所述细胞或类器官芯片可以实现高通量的药物筛选、药物毒性和功效测试。
- [0111] 技术术语
- [0112] 本发明中所述“打印”,即通过气压将预先填充于墨管中的含生物单元的墨水挤

出,喷头按照事先编程的打印路径进行移动,将墨水写于基底上,调控墨滴成型与分布。可分为多喷头打印模式和单喷头打印模式;一方面可利用多喷头打印设备(点胶机),实现含细胞或类器官墨水打印与药物滴加同步进行,即芯片制备与药筛应用同步进行;另一方面可将芯片制备与药筛环节分次完成。

[0113] 本发明中所述“打印”,包含“点”和“线”两种墨滴成型模式;通过间歇性喷墨成“点”、连续性喷墨成“线”(点动成线)、长程喷墨成“面”(线动成面)、不同高度打印组合成“体”(面动成体)。所述的“点”的打印效果,决定因素包含喷墨气压、针头型号、单位点喷墨时间、基底(基材)的接触角、墨水的粘度;喷墨气压压力越大、针头越大、单位点喷墨时间越长、基底(基材)的接触角越小、墨水的粘度越小,则最终“点”的直径越大,反之则越小。所述的“线”的打印效果,决定因素包含喷墨气压、针头型号、基底(基材)的接触角、墨水的粘度;喷墨气压压力越大、针头越大、针头移动速率越慢、基底(基材)的接触角越小、墨水的粘度越小,则最终“线”的宽度越大,反之则越小。

[0114] 本发明中所述“打印设备(简称点胶机)”,主要包含程序主机、微米级精度移动平台、温度控制器、气源、点胶机(喷墨气压控制器)、墨管、微米点胶针头;购置品牌包含诺信、日本武藏、优选为诺信;所述的打印设备及其相关耗材在使用前均需要灭菌处理,方式包含75%乙醇浸泡灭菌、钴60辐照灭菌、高压蒸汽灭菌、紫外灯照射灭菌、细菌过滤器过滤细菌;从性价比角度考虑,优选为高压蒸汽灭菌(120℃,40分钟)或紫外灯照射30分钟灭菌。所述点胶针头,截面尺寸包含100-1500微米,优选为100或200微米;购置品牌包含诺信、日本武藏、优选为诺信。

[0115] 本发明中所述“编程”包含零维、一维、二维、或三维图案的打印路径、喷墨气压,通过软件编程后进行打印。所述零维、一维、二维、或三维图案的打印路径,包含但不限于点、点阵、线段、网格、柱体等。

[0116] 本发明中所述的“打印墨滴成型”,可以是一轮打印成型,也可以是多轮打印复合成型;多轮打印中每轮的打印路径可以相同也可以不同。

[0117] 本发明中所述的“软件”,包含但不限于3D MAX、CAD、打印设备自带编程软件等。

[0118] 本发明中所述“温度控制器”,包含墨管、针头、打印平台(基底或基材)的温度控制,避免墨滴中的水分在打印过程蒸发,维持细胞芯片的生物活性,保证药物的性能质量;所述的控制范围包含(-10)℃-室温,优选为(3±2)℃。

[0119] 本发明中所述“墨管”,体积规格包含3毫升、5毫升,可填充墨量包含50微升-4毫升,针对稀少或昂贵的细胞或药物,优选为100-200微升;墨管填充墨水后,特别是高粘度的物质会产生部分气泡,需要通过离心去除,确保打印过程的稳定性,避免气泡影响细胞活性。

[0120] 本发明中所述“可打印性”,包含墨水稳定的均一性或分散性、墨滴成型的稳定性、持续打印的均匀性、打印图案分辨率高;墨水稳定的均一性或分散性指的是在打印过程中不会聚沉、分相、凝固、挥发、变性;墨滴成型的稳定性指的是打印后于基底上的形状稳定,不会铺展、蒸干、收缩、坍塌,例如打印的点为均匀的圆形且边界平整;持续打印的均匀性指的是多次打印大小、形状差异不大,例如打印的点阵中每个点的直径相差不大,打印的线条各处宽度相差不大,不会出现线条断裂、多个墨滴融合的现象;打印图案的分辨率指的是打印后的墨滴分布与涉及图案的尺寸、边界。

[0121] 本发明中所述“墨滴成型”，包含墨滴的形状、大小，受喷墨气压、基底特性、墨水性质影响；喷墨压力越大，墨滴越大；基底接触角越小，打印墨滴铺展越明显，最终墨滴越大；墨水的粘度越小，成型效果越差（成型：墨滴在打印瞬间的形状与打印后的形状差异，成型度高则差异越小）。

[0122] 本发明中所述“墨滴分布”与打印路径相同，即气压持续或间歇挤出墨水，同时控制针头移动，在移动过程中将挤出的墨水留在基底表面，通过设计打印路径形成不同的墨滴分布，即墨滴的图案化。

[0123] 实施例1 细胞/类器官培养

[0124] 1、细胞分离

[0125] 将离体肠癌组织放入1:2碘伏/PBS混合液中浸泡五分钟，用含链霉素和青霉素的PBS清洗五次。清洗后组织放入15 mL 消化液中，剪碎，37℃水浴消化40分钟。加入15 mL培养基后过滤去除无法消化的组织块，滤液1200转离心5分钟，去除上清液。加入10 mL红细胞裂解液裂解10分钟，1200转离心5分钟，去除上清液。用5 mL分离液清洗细胞后，加入适量Matrigel基质胶，吹吸混合后移入24孔板（50 μ L每孔），37℃固化30分钟，加入培养基（500 μ L每孔）后放入培养箱中。

[0126] 上述消化液为添加10 μ M Y-27632、100 μ g/mL Primocin™ 原代细胞抗生素、2 mg/mL Collagenase Type2酶的分离液。分离液为添加2mM GlutaMAX™、25 mM HEPES、1%链霉素和青霉素的DMEM/F12培养基。培养基为DMEM/F12培养基。

[0127] 2、细胞培养及传代

[0128] 细胞在37℃，5% CO₂条件下培养。每两天更换培养基，每七天传代。传代步骤如下：每孔加入500 μ L分离液，移液枪吹吸破碎基质胶后将液体全部转移至离心管。每孔再取1 mL分离液润洗，液体全部转移至上述离心管，2000转离心五分钟。去除上清液，加入TrypLE™ express酶（250 μ L每孔）及10 μ M Y-27632，37℃水浴消化5分钟。消化后液体用移液枪吹吸数次以进一步破碎大块基质胶后，2000转离心五分钟。去除上清液，加入2 mL分离液重悬后再次2000转离心五分钟。去除上清液，加入适量Matrigel基质胶，吹吸混合后移入24孔板（50 μ L每孔），37℃固化30分钟，加入培养基（500 μ L每孔）后放入培养箱中。

[0129] 该步骤中的分离液为添加2mM GlutaMAX™、25 mM HEPES、1%链霉素和青霉素的DMEM/F12培养基。

[0130] 该步骤中的培养基为添加2mM GlutaMAX™、25mM HEPES、1%链霉素和青霉素、2% B-27™ 添加剂、100ng/mL Wnt3a细胞生长因子、1.25mM N-乙酰基-L-半胱氨酸、500ng/mL R- Spondin、100ng/mL mNoggin细胞生长因子、50ng/mL EGF细胞生长因子、10nM 胃泌素I human、0.5 μ M A83-01、3 μ M SB202190、10nM 前列腺素E2、10mM 烟酰胺、100 μ g/mL Primocin™ 原代细胞抗生素的DMEM/F12培养基。

[0131] 提取稳定传代4次后的细胞用于打印及药物筛选。如图1为培养的肠癌细胞。

[0132] 3、类器官培养

[0133] 类器官培养基为添加2mM GlutaMAX™、25 mM HEPES、1%链霉素和青霉素、2% B-27™ 添加剂、100 ng/mL Wnt3a细胞生长因子、1.25 mM N-乙酰基-L-半胱氨酸、500ng/mL R- Spondin、100 ng/mL mNoggin细胞生长因子、50 ng/mL EGF细胞生长因子、10 nM 胃泌素 I human、0.5 μ M A83-01、3 μ M SB202190、10 nM 前列腺素 E2、10 mM 烟酰胺、100 μ g/

mL Primocin™ 原代细胞抗生素的DMEM/F12培养基。培养的结肠癌类器官的形态图如图2所示。

[0134] 实施例2 配制生物活性墨水中的分散介质

[0135] 将9000mg的多巴胺盐酸盐溶解于300mL的Tris-HCl (pH=8.8) 的缓冲溶液中,用细胞过滤器过滤除菌,然后于60-70℃加热6小时,后静置18小时,过滤后蒸干并研成聚多巴胺粉末。

[0136] 配制包括100ng/mL Wnt3a细胞生长因子、1.25mM N-乙酰基-L-半胱氨酸、500ng/mL R- Spondin、100ng/mL mNoggin细胞生长因子、50ng/mL EGF细胞生长因子、10nM 胃泌素I human、0.5μM A83-01、3μM SB202190、10nM 前列腺素E2、10mM 烟酰胺、100μg/mL Primocin™ 原代细胞抗生素的DMEM/F12培养液。配好培养液然后用细菌过滤器除菌。

[0137] 配制生物活性墨水的分散介质:将海藻酸钠粉末和羧甲基纤维素粉末平铺,紫外灯下照射3小时灭菌。用培养液1000ml溶解分散海藻酸钠 (NaA) 粉末20mg或50mg或75mg或100mg、羧甲基纤维素 (CMC) 粉末20mg (2%NaA-2%CMC、5%NaA-2%CMC、7.5%NaA-2%CMC、10%NaA-2%CMC)、聚多巴胺粉末10mg、甲基丙烯酰化海藻酸钠20mg、LAP 1mg,通过搅拌、超声使其均匀溶解,配制得到四种分散介质。表1中列出了所述四种分散介质中海藻酸钠和羧甲基纤维素的含量和种类。

[0138] 表1 海藻酸钠和羧甲基纤维素的含量

	海藻酸钠	羧甲基纤维素, 20mg
[0139] 水凝胶 A	20mg	2%NaA-2%CMC
水凝胶 B	50mg	5%NaA-2%CMC
水凝胶 C	75mg	7.5%NaA-2%CMC
水凝胶 D	100mg	10%NaA-2%CMC

[0140] 实施例3 制备基底

[0141] 1、基底的预处理

[0142] 将聚苯乙烯基底浸泡在丙酮中,10-20min后,取出干燥。

[0143] 2、基底的修饰

[0144] 将多巴胺盐酸盐溶解于Tris-HCl缓冲液 (pH=8.8) 得到90 mg/mL的多巴胺水溶液。将预处理的基底浸入上述多巴胺水溶液,60℃加热6h后室温静置过夜,移除剩余溶液,PBS清洗,氮气吹干,得到聚多巴胺接枝的高粘附性基底。

[0145] 实施例4 制备高通量细胞芯片

[0146] 1、制备生物活性墨水

[0147] 将实施例1中酶消化后的肠癌细胞悬浮液离心,去除上清液,分别加入实施例2制备的四种分散介质,混合均匀后得到四种生物活性墨水,细胞浓度为 10^5 - 10^6 个/mL。

[0148] 2、打印生物活性墨水

[0149] 1) 将墨管、针头、墨管压力塞等耗材置于高压蒸汽灭菌锅中进行灭菌 (130℃, 40分钟),打印基底 (PET薄膜、孔板) 用紫外灯照射30分钟。

[0150] 2) 利用打印设备内置的程序,对打印过程进行编程,包括打印图案坐标设置为点阵、打印针头距离基底的高度20-100微米、喷墨气压 0-60 psi、单位点喷墨时间0-10s、基

底接触角0-100度、墨滴打印精度100-1500微米。

[0151] 一个示例中,打印针头距离基底的高度50微米、喷墨气压10psi、30psi、50psi、单位点喷墨时间0.1s、0.4s、0.8s,基底接触角50度、墨滴打印精度350微米。

[0152] 3) 将紫外灯照射后的打印基底平整固定在打印平台上;取300微升生物活性墨水填充于墨管,通过离心除去分散介质中的气泡,使用蓝光灯(405 nm)照射30-60秒,使甲基丙烯酰化海藻酸钠完成交联。将墨管连通点胶机(喷墨气压控制器)与截面尺寸包含100-1500微米的型号不同针头,置于移动平台,利用温度控制器控制温度在4℃环境下,运行程序进行打印。打印完成后用1.5%Ca²⁺(PBS为分散液,pH=7.0)浸泡墨滴10分钟完成固化,制备得到高通量细胞芯片。将打印得到的芯片置于显微镜下观察。水凝胶B配制的墨水打印结果如图3所示。由结果可知,墨滴成型效果好;喷墨气压压力越大,墨点直径越大;单位点喷墨时间越长,墨点直径越大。

[0153] 4) 测定打印墨点体积

[0154] 测试方法:选择5%NaA-2%CMC水凝胶,单位点喷墨时间0.4s,喷墨气压10psi、30psi、50psi,在基底上打印100个墨点,称量质量后根据密度(水凝胶主要成分为水,密度为1g/mL)计算每个墨点的体积,结果如表2所示。如图4、表2所示。由表2可看出打印得到的芯片可能实现纳升级别的墨点打印。

[0155] 表2 打印的墨滴体积

	打印气压 (psi)	墨点直径 (μm)	墨点体积 (nL)
[0156]	50	1347.53	457
	30	703.91	63
	10	390.12	12

[0157] 实施例5 检测芯片中的细胞活性

[0158] 1) 对实施例4中打印得到的芯片进行活死细胞免疫染色测试,检验芯片上的墨点中细胞的存活率。

[0159] 具体方法为:取出样本(即实施例4中打印得到的芯片),用PBS洗涤1-2次,洗去残留的培养基溶液。使用细胞活死染色试剂盒进行染色,先加入足量配制好的碘化丙啶工作液,保证没过细胞,室温孵育10min。去除碘化丙啶工作液,再用足量PBS温和洗涤一遍去除上清。加入足量配制好的钙黄素工作液,保证没过细胞,室温孵育20-45分钟。去除钙黄素工作液,再用足量PBS温和洗涤一遍去除上清。滴加PBS或抗荧光淬灭剂,最后在荧光显微镜下观察细胞活死标记情况。结果如图5所示,结果显示,打印前后生物墨水中的细胞存活率几乎不变,可知打印过程不会对细胞造成伤害。

[0160] 2) 将实施例4中打印得到的芯片置于类器官培养基中培养,14天后进行活死细胞免疫染色测试,检验墨点中细胞的存活率。培养14天后,墨点中活细胞的比例为80-99%。

[0161] 对比例1

[0162] 打印方法同实施例4,不同之处在于:未加入光敏剂。

[0163] 按照实施例5的方法,检测打印后的墨点形态出现微小缺陷,墨点中细胞的数量变少,活细胞的比例为50%。由此可见,光敏剂是促进水凝胶骨架成型的必要成分,提供细胞生

长、增殖、分化等过程的物理支撑。

[0164] 对比例2

[0165] 打印方法同实施例4,不同之处在于:未加入羧甲基纤维素。

[0166] 按照实施例5的方法,检测打印后的墨点中活细胞的比例为40%。

[0167] 由对比例1和对比例2的结果可以看出,未加入光敏剂或羧甲基纤维素的墨水中,打印的细胞存活率均有明显的下降,由此可推测出羧甲基纤维素和光敏剂共同促进了细胞存活,对于提高打印后墨点中活细胞的比例具有协同增效作用。

[0168] 对比例3

[0169] 打印方法同实施例4,不同之处在于:未进行丙酮预处理。

[0170] 按照实施例4步骤3的方法,结果显示,墨滴成型效果较差,容易脱落。

[0171] 对比例4

[0172] 打印方法同实施例4,不同之处在于:未进行聚多巴胺修饰。

[0173] 按照实施例4步骤3的方法,结果显示,墨滴成型效果较差。

[0174] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

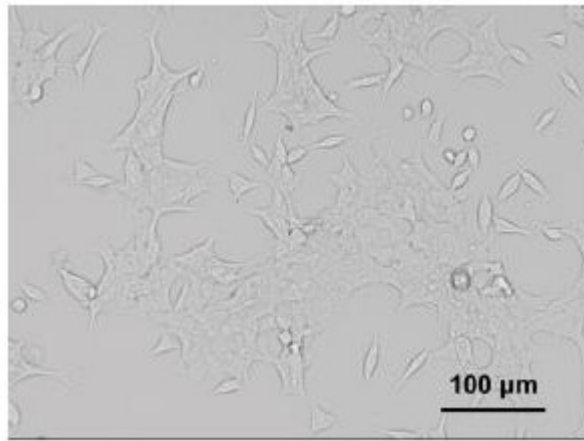


图 1

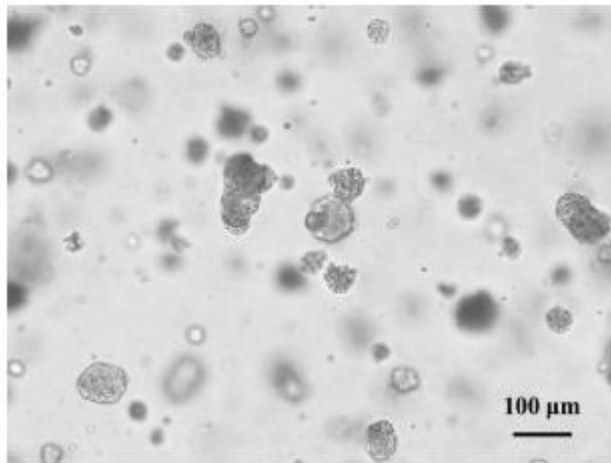


图 2

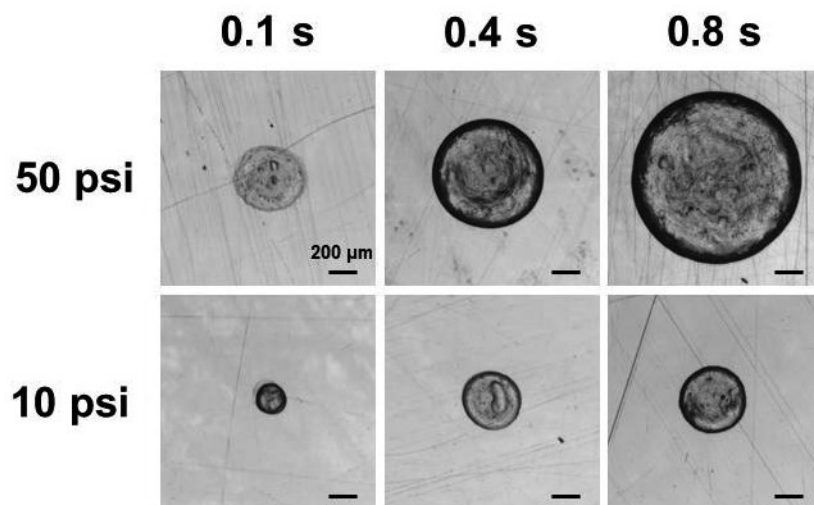


图 3

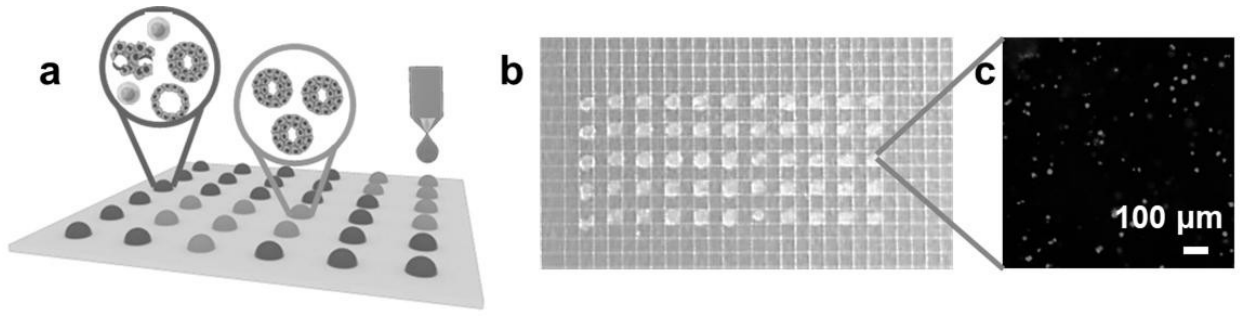


图 4

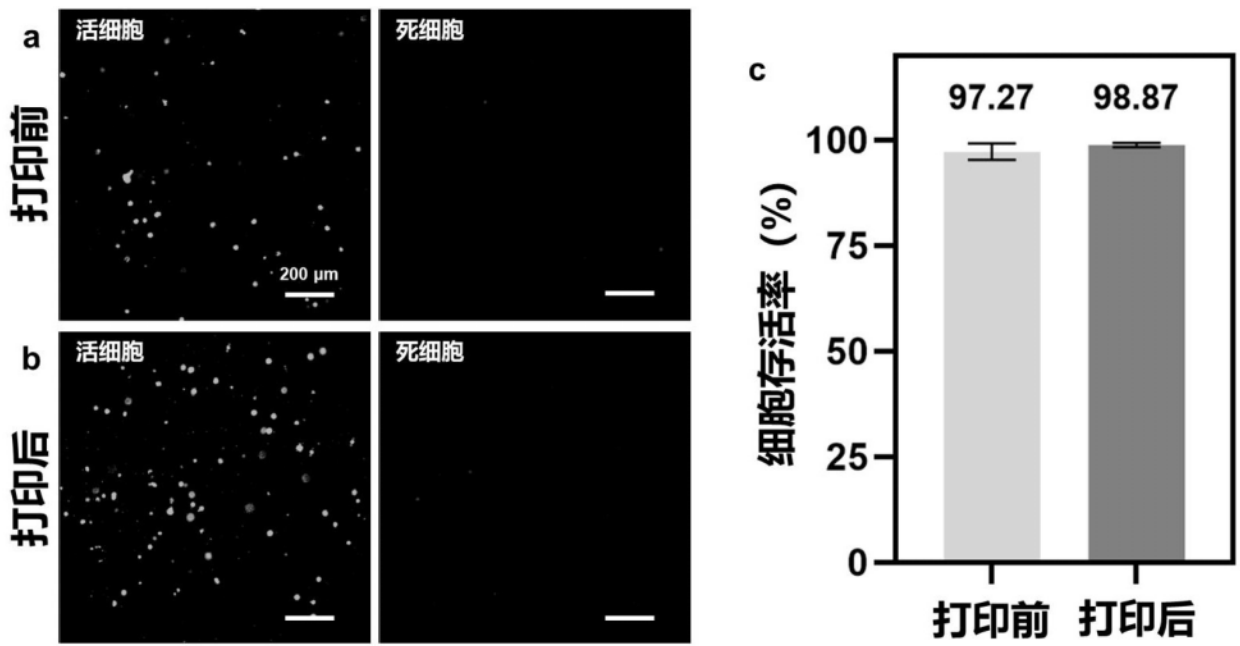


图 5