(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104911104 A
(43)申请公布日 2015.09.16

(21)申请号 201510346955.7
(22)申请日 2015.06.23
(71)申请人 中国人民解放军第三军医大学第一附属医院
地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号
(72)发明人 白莲花 帅领 赖洁娟 张玉君 赖向东 张宏宇 别平
(74)专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司 11275
代理人 赵荣之
(51)Int.Cl.
C12M 3/00(2006.01)
C12M 1/36(2006.01)
C12M 1/10(2006.01)
C12M 1/04(2006.01)
C12N 5/071(2010.01)

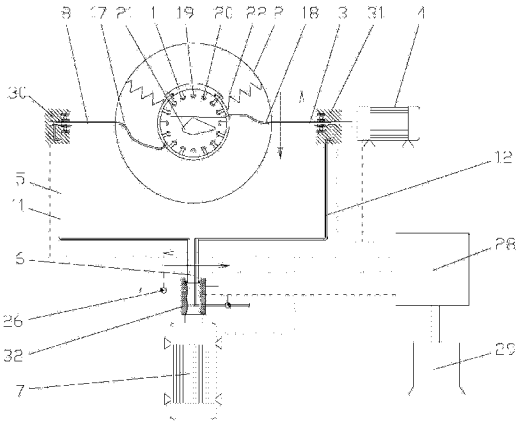
权利要求书2页 说明书7页 附图6页

(54)发明名称

细胞及器官体外3-D培养装置及人工器官培育的方法

(57)摘要

本发明公开了一种细胞及器官体外3-D培养装置及人工器官培育的方法，涉及微生物学技术领域，该装置包括培养室、3-D运动摇箱，以及分别与培养室连通的条件培养液循环系统和气体交换系统，还包括多自由度运动机构。该方法包括利用细胞及器官体外3-D培养装置模拟人体器官生长发育的动态环境培育人工器官。本发明通过设置3-D运动摇箱较真实的模拟了人体细胞或器官在母体内发育胎儿的生长微环境，提高各种子干细胞在体外3-D培养中生长和分化为功能性细胞的效率，为细胞体外3-D培养提供一个简单、经济、温和、立体、营养全面的生长微环境，实验表明采用本装置进行人体器官体外培育的方法是可行的，可以进行临床推广应用。



CN 104911104 A

1. 细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：包括培养室、可做复合运动的 3-D 运动摇箱，以及分别与培养室连通的条件培养液循环系统和气体交换系统，所述培养室通过弹性部件可拆卸的悬挂于 3-D 运动摇箱内，还包括设置在 3-D 运动摇箱一侧或两侧的多自由度运动机构。

2. 根据权利要求 1 所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：所述培养室的培养环境：温度为 37℃；湿度为 95 ～ 98％；含体积分数为 5％ CO_2的空气；酸碱 pH 值为 7.2-7.4。

3. 根据权利要求 1 所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：所述多自由度运动机构包括纵向旋转机构、水平旋转机构和设置在两者之间的多功能连接结构，所述条件培养液循环系统及气体交换系统通过多功能连接结构与外界连接进行培养液及气体交换。

4. 根据权利要求 3 所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：所述纵向旋转机构包括纵向旋转轴和调速电机 I，所述纵向旋转轴的一端与 3-D 运动摇箱固定，另一端与调速电机 I 的主轴固定。

5. 根据权利要求 4 所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：所述水平旋转机构包括水平旋转架、水平旋转轴和调速电机 II，所述水平旋转架的一端与纵向旋转轴的一端转动连接，另一端与水平旋转轴的一端转动连接，所述水平旋转轴的另一端与调速电机 II 的主轴固定。

6. 根据权利要求 5 所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：所述水平旋转架与纵向及水平旋转轴的连接处均设置有多功能连接结构。

7. 根据权利要求 6 所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：所述多自由度运动机构设置在 3-D 运动摇箱的两侧，所述多自由度运动机构还包括固定设置在 3-D 运动摇箱另一侧的纵向从动轴，所述纵向从动轴与水平旋转架之间设置有多功能连接结构。

8. 根据权利要求 7 所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：所述多功能连接结构包括可转动且密封套装于纵向或水平旋转轴外圆面的活动套、设置在活动套与纵向或水平旋转轴之间的密封腔、设置在活动套与纵向或水平旋转轴之间的滚动轴承，以及设置在水平旋转轴、水平旋转架、纵向旋转轴和纵向从动轴内的条件培养液循环通道和气体交换通道，所述密封腔通过条件培养液循环通道及气体交换通道分别与培养室连通。

9. 根据权利要求 1 所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：所述培养室内均匀间隔设置有多个弹性材料制成的挡板，所述挡板的头部设置具有圆弧顶部的弹性缓冲薄膜。

10. 根据权利要求 1 所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：所述弹性部件为弹簧或橡胶或其它弹性件。

11. 根据权利要求 1 所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：所述培养室包括室体和可将室体密封固定的室盖，所述室盖设置有与室体相互嵌合的卡合结构，所述室体设置有与卡合结构相匹配的卡合配合结构。

12. 根据权利要求 1-11 任一所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置，其特征在于：还包括用于对本培养装置进行全自动控制的 PLC 控制系统和信息显示系统。

13. 采用如权利要求 1-12 任一所述的细胞及器官体外 3-D 培养装置培育人工器官的方

法，其特征在于：利用细胞及器官体外 3-D 培养装置模拟人体器官生长发育的动态环境培育人工器官。

14. 根据权利要求 13 所述培育人工器官的方法，其特征在于：所述人体器官生长发育的动态环境包括：将种子细胞的天然去细胞的整体器官支架弹性地悬挂于 3-D 培养装置内，在 37℃、体积分数为 5% CO_2 条件下分阶段培养，第一阶段 1 ～ 7 天，第二阶段 8 ～ 14 天，第三阶段 15 ～ 21 天，采用 24h 动态培养，白天先水平向左 360° 旋转，后水平向右 360° 旋转，晚上采用纵向旋转和水平旋转相结合的复合 3-D 旋转，白天转速为 20 ～ 40rpm/min，晚上转速小于 20rpm/min，每三天换培养基一次，每阶段更换不同的培养基。

细胞及器官体外 3-D 培养装置及人工器官培育的方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物学技术领域，涉及一种细胞及器官体外 3-D 培养装置及人工器官的培育方法。

背景技术

[0002] 为避免细胞或组织在二维 (2-D) 生长过程中逐渐失去许多原组织生理特征的弊端，人们发明了体外三维 (3-D) 培养。目前采用的体外 3-D 培养装置主要采用生物反应器 (Bioreactor，BR)，是指利用酶或生物体（如微生物）所具有的生物功能在体外提供生物活性环境的装置系统或工程设备。根据培养细胞、培养载体、培养液混合方式的不同 BR 主要分为搅拌式、气体式、中空纤维式、回旋式（空间 BR) 等。根据结构的不同 BR 分为旋转技术结合普通 37℃ 5％ CO2 细胞培养箱的箱体结构；循环培养装置和普通 37℃ 5％ CO2 细胞培养箱的箱体结构、循环培养装置和普通 37℃ 5％ CO2 细胞培养箱各自独立装置和循环培养结合气体交换密闭式装置。此外，与 BR 配套的辅助技术还有灌注培养式、微载体式、多孔微球式等。

[0003] 然而，从经济效益考虑，这些 BR 普遍存在成本高、设备复杂等。例如从功能角度搅拌式 BR 的搅拌桨叶产生的剪切力可对细胞造成损伤；中空纤维式 BR 的培养环境不均一、培养工艺不易放大、消毒重复使用困难等；从结构角度分析，结构一装置造价昂贵，体积庞大，无疑增加了对仪器购买及使用的难度；结构二装置除造价昂贵，体积庞大外，装置中 3-D 培养管是固定存在培养箱中的，不能进行旋转，无法很好实现细胞或组织类似于人体发育过程这样一个自然悬空运动生长的立体培养功能，导致人工器官功能缺失或发育不良；结构三装置中虽然摇摆或旋转系统可使细胞 3-D 培养在动态过程中，但由于 3-D 培养管置于培养箱外，大大增加了污染机率，循环培养结合气体交换密闭式装置则要求造价较高的高级别周围培养氛围。

[0004] 为克服上述问题，急需对现有的培养装置进行结构改进，改进的装置既可模拟胎儿在母体胎盘羊水发育过程中的复合运动，又可进行代谢物质的循环交换，既可充分满足细胞高密度增值需要，又可保证细胞高效分泌，为细胞或器官体外培育提供一个简单、经济、温和、立体、营养全面的 3-D 生长微环境，促进细胞再生和人工器官的生成。

发明内容

[0005] 有鉴于此，本发明的目的之一是提供一种细胞及器官体外 3-D 培养装置，以解决现有技术无法真实模拟人体器官生长微环境导致人工器官存在发育不良、功能缺失、培育效率低的问题。本发明的目的之二提供采用上述细胞及器官体外 3-D 培养装置进行人工培育器官的方法。

[0006] 本发明的目的之一是通过以下技术方案实现的：

[0007] 本发明的细胞及器官体外 3-D 培养装置，包括培养室、可做复合运动的 3-D 运动摇箱，以及分别与培养室连通的条件培养液循环系统和气体交换系统，所述培养室通过弹性

部件可拆卸的悬挂于 3-D 运动摇箱内，还包括设置在 3-D 运动摇箱一侧或两侧的多自由度运动机构。

[0008] 进一步，所述培养室的培养环境：温度为 37℃；湿度为 95 ～ 98％；含体积分数为 5％ CO_2的空气；酸碱 p H 值为 7.2-7.4。

[0009] 进一步，所述多自由度运动机构包括纵向旋转机构、水平旋转机构和设置在两者之间的多功能连接结构，所述条件培养液循环系统及气体交换系统通过多功能连接结构与外界连接进行培养液及气体交换。

[0010] 进一步，所述纵向旋转机构包括纵向旋转轴和调速电机 I，所述纵向旋转轴的一端与 3-D 运动摇箱固定，另一端与调速电机 I 的主轴固定。

[0011] 进一步，所述水平旋转机构包括水平旋转架、水平旋转轴和调速电机 II，所述水平旋转架的一端与纵向旋转轴的一端转动连接，另一端与水平旋转轴的一端转动连接，所述水平旋转轴的另一端与调速电机 II 的主轴固定。

[0012] 进一步，所述水平旋转架与纵向及水平旋转轴的连接处均设置有多功能连接结构。

[0013] 进一步，所述多自由度运动机构设置在 3-D 运动摇箱的两侧，所述多自由度运动机构还包括固定设置在 3-D 运动摇箱另一侧的纵向从动轴，所述纵向从动轴与水平旋转架之间设置有多功能连接结构。

[0014] 进一步，所述多功能连接结构包括可转动且密封套装于纵向或水平旋转轴外圆面的活动套、设置在活动套与纵向或水平旋转轴之间的密封腔、设置在活动套与纵向或水平旋转轴之间的滚动轴承，以及设置在水平旋转轴、水平旋转架、纵向旋转轴和纵向从动轴内的条件培养液循环通道和气体交换通道，所述密封腔通过条件培养液循环通道及气体交换通道分别与培养室连通。

[0015] 进一步，所述培养室内均匀间隔设置有多个弹性材料制成的挡板，所述挡板的头部设置具有圆弧顶部的弹性缓冲薄膜。

[0016] 进一步，所述弹性部件为弹簧或橡胶或其它弹性件。

[0017] 进一步，所述培养室包括室体和可将室体密封固定的室盖，所述室盖设置有与室体相互嵌合的卡合结构，所述室体设置有与卡合结构相匹配的卡合配合结构。

[0018] 进一步，还包括用于对本培养装置进行全自动控制的 PLC 控制系统和信息显示系统。

[0019] 本发明的目的之二是通过以下技术方案实现的：

[0020] 采用如上所述体外细胞及器官 3-D 培养装置培育人工器官的方法，利用细胞及器官体外 3-D 培养装置模拟人体器官生长发育的动态环境培育人工器官。

[0021] 进一步，所述人体器官生长发育的动态环境包括：将种子细胞的天然去细胞的整体器官支架弹性地悬挂于 3-D 培养装置内，在 37℃、体积分数为 5％ CO_2条件下分阶段培养，第一阶段 1 ～ 7 天，第二阶段 8 ～ 14 天，第三阶段 15 ～ 21 天，采用 24h 动态培养，白天先水平向左 360° 旋转，后水平向右 360° 旋转，晚上采用纵向旋转和水平旋转相结合的复合 3-D 旋转，白天转速为 20 ～ 40rpm/min，晚上转速小于 20rpm/min，每三天换培养基一次，每阶段更换不同的培养基。

[0022] 本发明的有益效果：

[0023] 1、本发明的的细胞及器官体外 3-D 培养装置，通过设置 3-D 运动摇箱模拟胎儿在母体胎盘羊水发育过程中的人体发育复合运动，并通过培养室弹性的设置在摇箱内模拟培养物在人体内悬吊过程中的简谐运动，较真实的模拟了人体细胞或器官在发育过程中的生长微环境，提高各种种子细胞的分化为成熟细胞密度及培养效率，为细胞或器官的体外 3-D 培养提供一个简单、经济、温和、立体、营养全面的生长微环境，加速体外人工器官生成，该装置与现有技术相比，具有明显的成本优势和推广价值。

[0024] 2、通过多功能连接结构实现介质输入系统与转轴之间可相对转动的目的，再由于将各介质通道设置在转轴上，3-D 运动摇箱与培养室实现生长环境所需介质（培养液及 37℃ 5% CO_2 气体）与培养室连通和交换，解决了多自由度转动过程中输入管道缠绕的问题。

[0025] 3、本发明培育人工器官的方法，由于该装置真实模拟人体细胞或器官的生长发育微环境，可以实现对各种人体器官的体外培育和重建。利用本发明的方法培养形成的肝脏样组织仅需 3 周时间，比近期报道采用 BR 方法体外诱导 DLS 间充质干细胞 (Meschymal stem cells, MSC) 形成的肝样组织（需要 4 周时间）节省 1 周时间，实验表明本发明制得的人工肝脏具有肝脏结构和功能，能够作为肝移植供体使用，进一步证实采用本装置进行人体器官体外培育的方法是可行的，可以进行临床推广应用，且具有广阔的应用前景和较高的社会价值。

[0026] 本发明的其他优点、目标和特征在某种程度上将在随后的说明书中进行阐述，并且在某种程度上，基于对下文的考察研究对本领域技术人员而言将是显而易见的，或者可以从本发明的实践中得到教导。本发明的目标和其他优点可以通过下面的说明书来实现和获得。

附图说明

[0027] 为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合附图对本发明作进一步的详细描述，其中：

[0028] 附图 1 为本发明的体外细胞及器官 3-D 培养装置的结构示意图；

[0029] 附图 2 为本发明培养室的放大图；

[0030] 附图 3 为本发明多功能连接结构 I 的放大图；

[0031] 附图 4 为本发明多功能连接结构 II 的放大图；

[0032] 附图 5 为本发明多功能连接结构 III 的放大图。

[0033] 附图 6 为用本装置培育的人工肝脏。A 为体外 3-D 培养第 9 天生成肝叶样结构；B 体外 3-D 培养第 21 天生成类全肝样结构；C(a-b) 组织切片显示有与正常肝脏相似的肝小叶样结构；C(c) 分泌肝功能蛋白。

[0034] 附图 7 为为哺乳类动物肝脏发育成熟示意图。A 为小鼠；B 为人类。

[0035] 附图标记：1- 培养室；2-3-D 运动摇箱；3- 纵向旋转轴；4- 调速电机 I；5- 水平旋转架；6- 水平旋转轴；7- 调速电机 II；8- 纵向从动轴；9- 活动套；10- 滚动轴承；11- 培养液循环通道；12- 气体交换通道；13- 密封腔 I；14- 密封腔 II；15- 密封腔 III；16- 密封腔 IV；17- 培养液管；18- 气管；19- 挡板；20- 弹性缓冲薄膜；21- 培养物；22- 弹簧；23- 室体；24- 室盖；25- 凸起；26- 开口槽；27- 驱动泵；28-PLC 控制系统；29- 信息显示系统；30- 多

功能连接结构 I ;31- 多功能连接结构 II ;32- 多功能连接结构 III。

具体实施方式

[0036] 以下将参照附图，对本发明的优选实施例进行详细的描述。应当理解，优选实施例仅为了说明本发明，而不是为了限制本发明的保护范围。

[0037] 实施例 1、体外细胞及器官 3-D 培养装置

[0038] 如图 1-5 所示，包括培养室 1、3-D 运动摇箱 2，以及分别与培养室 1 连通的培养液交换系统和气体交换系统，所述培养室 1 内可模拟胎儿在母体胎盘羊水中发育生长环境，包括与人体胎盘相适应的温度环境、氧气环境及各种复杂运动的动态环境，用培养室 1 模拟胎盘，用培养液模拟母体胎盘中的羊水，用气体交换系统实现温度环境、氧气环境，用 3-D 运动摇箱 2 模拟胎儿在母体胎盘羊水发育过程中的人体复合运动，最终实现的培育环境：温度为 37℃ ;湿度为 95 ～ 98% ;含体积分数为 5% CO_2的空气 ;酸碱 p H 值为 7.2-7.4 ;包括将培养室 1 通过弹性部件可灵活拆卸的固定于 3-D 运动摇箱 2 内，作各种不规则运动，实现的动态环境。

[0039] 本实施例通过设置 3-D 运动摇箱模拟胎儿在母体胎盘羊水发育过程中的人体复合运动，并通过培养室弹性的设置在摇箱内模拟器官在人体内的悬吊过程中的简谐运动，较真实的模拟了人体细胞或器官在人体内真实的生长环境，提高各种种子干细胞的分化为成熟细胞密度水平和有效促进 3-D 细胞培养效率，为体外器官的生长提供一个简单、经济、温和、立体、营养全面的生长环境，加速细胞再生和器官形成，该装置与现有技术相比，具有明显的成本优势和推广价值。

[0040] 作为本实施例的改进，还包括设置在 3-D 运动摇箱一侧或两侧的多自由度运动机构，本实施例设置在 3-D 运动摇箱 2 的两侧，所述多自由度运动机构包括纵向旋转机构、水平旋转机构和设置在两者之间的多功能连接结构，实现 3-D 运动摇箱 2 的水平和纵向方向的旋转，所述培养液交换系统及气体交换系统通过多功能连接结构与外界连接交换，实现与外界 37℃ 5% CO_2气体交换和培养液的交换，达到细胞和器官生长相适宜的温度环境、氧气环境及羊水环境。

[0041] 作为本实施例的改进，所述纵向旋转机构包括纵向旋转轴 3 和调速电机 I 4，所述纵向旋转轴 3 的一端与 3-D 运动摇箱 2 固定，另一端与调速电机 I 4 的主轴固定，在调速电机 I 4 的驱动下，使 3-D 运动摇箱 2 产生纵向方向的左、右旋转转动。

[0042] 作为本实施例的改进，所述水平旋转机构包括水平旋转架 5、水平旋转轴 6 和调速电机 II 7，所述水平旋转架 5 的一端与纵向旋转轴 3 的一端转动连接，另一端与水平旋转轴 6 的一端转动连接，所述水平旋转轴 6 的另一端与调速电机 II 7 的主轴固定，在调速电机 II 7 的驱动下，驱动水平旋转轴 6 及水平旋转架 5 转动，最终驱使 3-D 运动摇箱 2 产生水平方向的左、右旋转转动。

[0043] 作为本实施例的改进，所述多自由度运动机构还包括固定设置在 3-D 运动摇箱 2 另一侧的纵向从动轴 8，所述纵向从动轴 8 与水平旋转架 5 之间设置有多功能连接结构 I 30，所述水平旋转架 5 与纵向旋转轴 3 的连接处设置有多功能连接结构 II 31，水平旋转架 5 与水平旋转轴 6 的连接处设置有多功能连接结构 III 32，所述多功能连接结构包括可转动且密封套装于纵向旋转轴 3 或水平旋转轴 6 外圆面的活动套 9、设置在活动套 9 与纵向旋

转轴 3 或水平旋转轴 6 之间的密封腔、设置在活动套 9 与纵向旋转轴 3 或水平旋转轴 6 之间的滚动轴承 10，以及设置在水平旋转轴 6、水平旋转架 6、纵向旋转轴 3 和纵向从动轴 8 内的培养液循环通道 11 和气体交换通道 12，所述密封腔通过与培养液循环通道 11 和气体交换通道 12 分别与培养室 1 连通，所述密封腔设置为环形结构，多功能连接结构 III 32 具有两个相互独立的密封腔 I、II(13、14)，多功能连接结构 I 30 具有一个密封腔 III 15，多功能连接结构 II 31 具有一个密封腔 IV 16，所述培养液交换系统包括依次连通的密封腔 I 13、水平旋转轴及水平旋转架部分的培养液循环通道 11、密封腔 III 15、纵向从动轴部分的培养液循环通道 11、与培养液循环通道连通的培养液管 17，所述密封腔 I 13 与外界培养液源连通，所述培养液管 17 穿过 3-D 运动摇箱 2 与培养室 1 连通；所述气体交换系统包括依次连通的密封腔 II 14、水平旋转轴及水平旋转架部分的气体交换通道 12、密封腔 IV 16、纵向旋转轴部分的气体交换通道 12、与气体交换通道 12 连通的气管 18，所述密封腔 II 14 与外界 37℃ 5% CO_2 气源连通，所述气管 18 穿过 3-D 运动摇箱 2 与培养室 1 连通。

[0044] 作为本实施例的改进，上述培养液交换系统和气体交换系统可根据需要调整具体经过的通道，选择合适的密封腔 I、密封腔 II、密封腔 III 与密封腔 IV。

[0045] 作为本实施例的改进，所述培养室 1 内均匀间隔设置有多个弹性材料制成的挡板 19，可为硅胶等，所述挡板 19 的头部设置具有圆弧顶部的弹性缓冲薄膜 20。在挡板 19 的作用下，培养物 21 可作各种不规则运动，模拟更复杂的人体运动，并可以对培养物 21 形成支承，实现悬浮的生长状态；均匀间隔设置成合适的密度，可模拟母体胎盘中的绒毛膜对培养物 21 形成保护，可避免对培养物 20 的伤害，另外，设置具有圆弧顶弹性缓冲薄膜 20，可有效减少与培养物 21 的接触面积，利于与培养基的充分接触，促进其良好的生长。

[0046] 作为本实施例的改进，所述弹性部件为弹簧或橡胶或其它弹性件，本实施例优选弹簧 22，可在 3-D 运动摇箱作用下作简谐振动或摆动，模拟悬吊时的复合运动。

[0047] 作为本实施例的改进，所述培养室 1 包括室体 23 和可将室体 23 密封固定的室盖 24，所述室盖 24 设置有与室体 23 相互嵌合的卡合结构，所述室体设置有与卡合结构相匹配的卡合配合结构，本实施例的卡合结构为设置在室盖上的凸起 25，所述卡合配合结构为与凸起 25 紧密配合的开口槽 26，使用时将培养物装入培养室后，用室盖的凸起装入开口槽 26 内密封，然后再用螺栓或螺钉或快换机构将两者固定。

[0048] 作为本实施例的改进，在所述密封腔 I 与外界培养液源之间、所述密封腔 II 与外界 37℃ 5% CO_2 气源之间均设置有驱动泵 27。

[0049] 作为本实施例的改进，还包括用于对本培养装置进行全自动控制的 PLC 控制系统 28 和信息显示系统 29，有利于对培养过程进行全程监控和管理，提高其培养效率和质量。

[0050] 实施例 2、采用细胞及器官体外 3-D 培养装置培养具有器官结构和功能性的人工肝脏的方法

[0051] 如图 6 所示。本实施例使用的装置及试剂盒材料如下：体外细胞及器官 3-D 培养装置（转速 0 ～ 50rmp/min 的 3-D 运动摇箱；37 ℃、5 % CO_2 培养室），条件培养基 (CM1,CM2,CM3)，100U/mL 青霉素，100 μg/mL 链霉素 (Cellgro，cat. no. 30-001-CI)，5000U/mL 青霉素，5000 μg/mL 链霉素，DMEM/F12(Gibco-BRL，cat. no. 11330)，VEGF(Pepnotech，cat. no. 100-20C)，HGF(R&D，cat. no. 294-HG-005/CF)，bFGF(Pepnotech，cat. no. 100-188)，牛胰岛素 (Sigma，cat. no. I6634)，人转铁蛋白

(Sigma, cat.no.T1147),左旋甲状腺素 (Sigma, cat.no.T6397),亚硒酸钠 (Sigma, cat.no.S9133),腐胺 (Sigma,cat.no.P5780),孕激素 (Sigma,cat.no.7556),Oncostatin M,地塞米松,非必需氨基酸,L- 谷氨酰胺。

[0052] 制备三种条件培养基 (Conditioned mediums,CMs),分别为 CM1 培养基,CM2 培养基,CM3 培养基,具体步骤如下 :

[0053] 1) 去除胚胎期小鼠肝脏中的干细胞和祖先细胞 :

[0054] a. 解剖显微镜下分别取出 7 到 15 天胚胎期小鼠 (E7-E15) 肝样组织,每期五只胚胎小鼠,混匀后用匀浆器实施缓慢研磨,过滤,收集滤液 ;

[0055] b. 将滤液在 -80℃和 39℃条件下反复冻融 3 次,每次各 30mim,然后用 0.45μm 滤膜过滤,收集滤液 ;

[0056] c. 用免疫荧光方法检测过滤液中 OX43 和 OX44 阳性造血干细胞、Thy-1 阳性肝脏胚胎肝细胞,若检测结果呈阴性,表明胚胎期小鼠肝脏中的干细胞和祖先细胞已去除 ;

[0057] 2) 采用蛋白试剂盒检测蛋白含量 (50-100mg/mL)

[0058] 3) 配制 CM1,CM2 和 CM3 培养基

[0059] CM1 培养基 :向去除干细胞和祖先细胞的胚胎期小鼠肝脏滤液和 DMEM 完全培养液的混合溶液 (1:4) 中加入 VEGF 至 VEGF 终浓度为 20ng/ml ;

[0060] CM2 培养基 :向去除干细胞和祖先细胞的胚胎期小鼠肝脏滤液和 DMEM 完全培养液的混合溶液 (1:4) 中加入 HGF、bFGF,牛胰岛素、人转铁蛋白、左旋甲状腺素、亚硒酸钠、腐胺、孕激素至 HGF 终浓度为 10ng/mL, bFGF 终浓度为 5ng/mL,牛胰岛素终浓度为 0.5mg/mL, 人转铁蛋白终浓度为 0.5mg/mL, 左旋甲状腺素终浓度为 40ug/mL, 亚硒酸钠终浓度为 34ug/mL, 腐胺终浓度为 0.5ug/mL,孕激素终浓度为 6ug/mL(各组分浓度为多少,请补充) ;

[0061] CM3 培养基 :向去除干细胞和祖先细胞的胚胎期小鼠肝脏滤液和 DMEM 完全培养液的混合溶液 (1:4) 中加入 HGF、bFGF, Oncostatin M、地塞米松、非必需氨基酸和 L- 谷氨酰胺至 HGF 终浓度为 100ng/mL,bFGF 终浓度为 50ng/mL,Oncostatin M 终浓度为 20ng/ml,地塞米松终浓度为 0.1μM,非必需氨基酸质量分数为 1%和 L- 谷氨酰胺终浓度为 5mM。

[0062] 然后利用配制的 CM1,CM2 和 CM3 培养基体外 3-D 培养具有器官结构和功能性的人工肝脏,具体方法如下 :

[0063] 首先在计算机系统监控下,利用三步法分别从门静脉和下腔静脉将细胞包括种子干细胞缓慢注入支架中,每次至少 3 ～ 5×10^5,间隔 15-30min,注射 2-3 次 ;然后将注入种子干细胞的 WDLS(以下称为 WDLS-NG2$^+$HSC) 放入培养室中,并将培养室弹性地悬挂于 3-D 运动摇箱内,启动培养液交换系统和气体交换系统,加入 500μl CM1 培养基进行体外 3-D 培养一周 (第 1 ～ 7 天),白天启动水平旋转机构,先水平向左 360° 旋转 8h, 后水平向右 360° 旋转 8h,晚上启动纵向旋转机构和水平旋转机构,进行纵向和水平旋转相结合的复合 3-D 旋转 8h,每两天补加 200μL CM1 培养基 ;培养进入第二周后 (第 8 天),改换 500μLCM2 培养基,培养方式及条件与第一周相同 (第 8-14 天) ;培养进入第三周后 (第 15 天),改换 500μL CM3 培养基,培养方式及条件与第一周相同,剂量与方式与第一周相同,持续 7 天 (8-14 天) ;培养进入第三周后 (第 15 天),改换 500μL CM3 培养基,剂量与方式与第一周相同 (第 15 ～ 21 天),培养 21 天后终止培养,获得具有器官结构和功能性的人工肝脏,然后于白光和荧光显微镜下观察组织学结构,并分析上清肝脏功能蛋白。结果显示,培养至第

9 天形成了肝叶样轮廓（图 6A），培养至第 21 天形成了全肝样轮廓（图 6B），对 21 天的培养物进行 H&E 染色和培养物上清功能蛋白分析，显示培养物具有与正常肝组织（图 6Ca）类似结构（图 6Cb）如有肝小叶中央静脉（the central vein，CV）形成（箭头所示），随着培养时间的延长，培养物上清功能蛋白（Alb 表示肝脏白蛋白）分泌增加（图 6Cc），表明种子干细胞在特定培养微环境中可形成具有器官结构和功能的人工肝脏，表现了很有临床应用潜力的种子细胞。

[0064] 最后说明两点：(1) 我们研制的三种条件培养基（CM1、CM2、CM3—）的制备是根据哺乳类动物肝脏发育成熟的理论基础（见图 7），花费了大量时间进行科学研究证明而获得的，相关文章即将发表；(2) 以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述，但本领域技术人员应当理解，可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变，而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

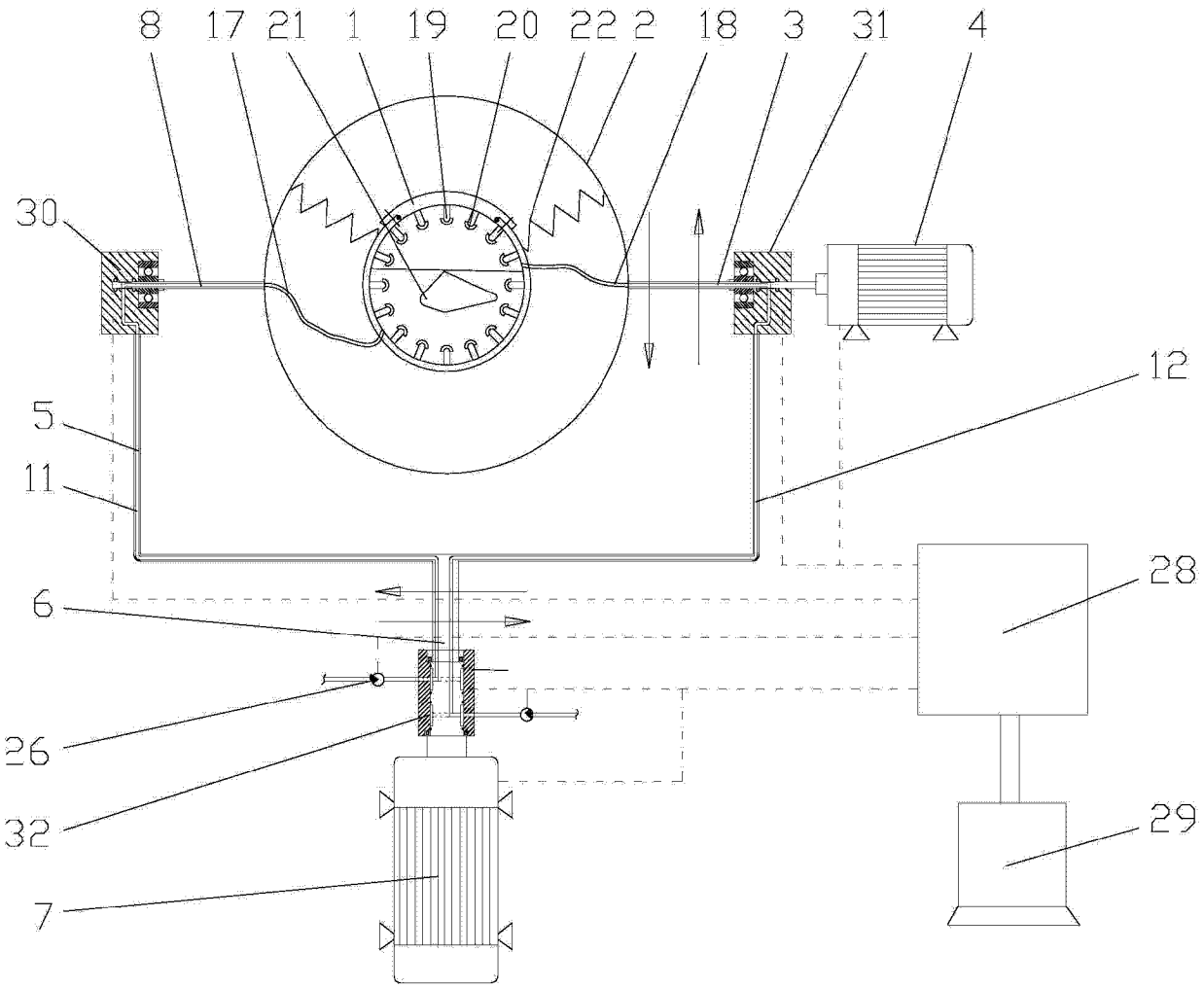


图 1

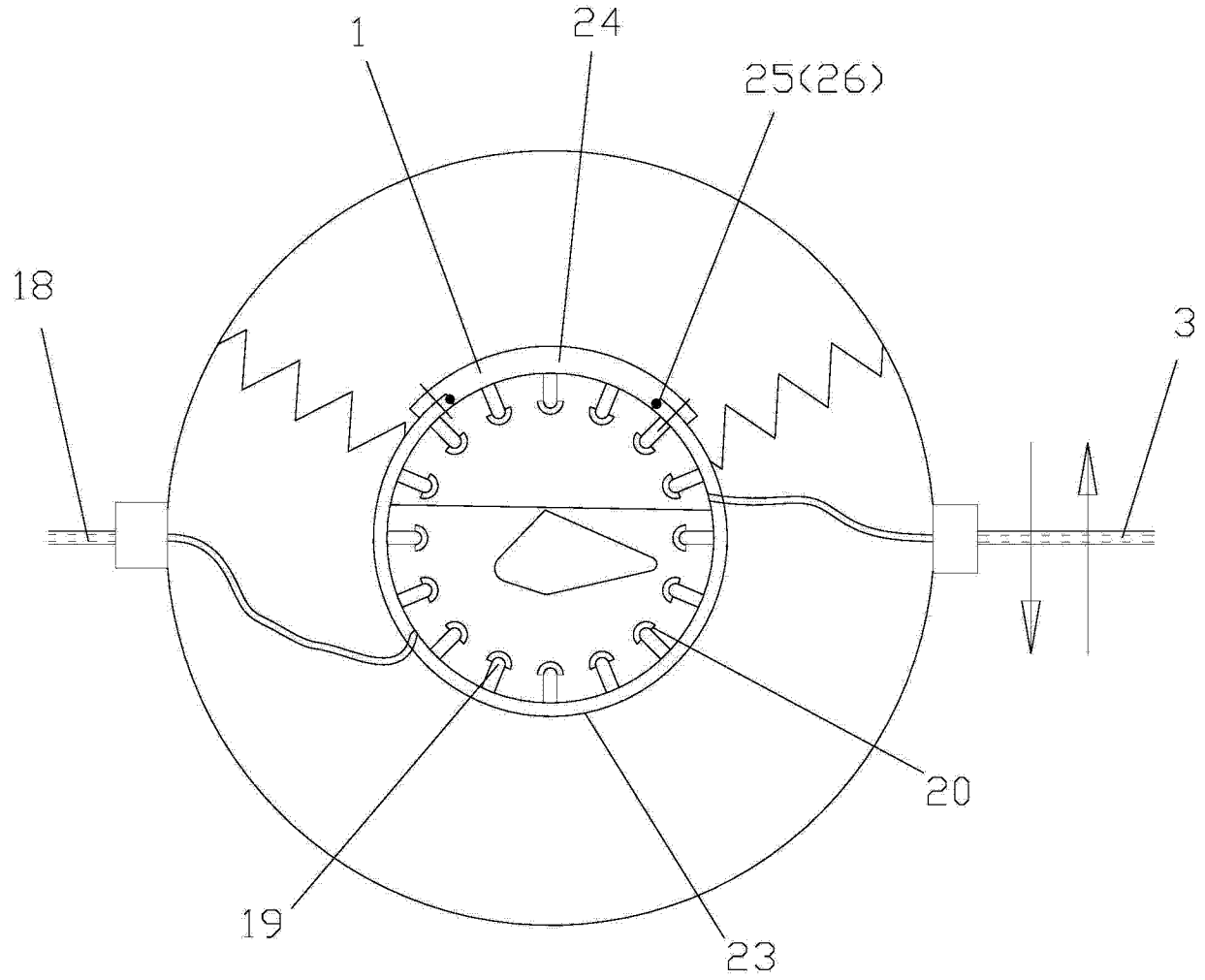


图 2

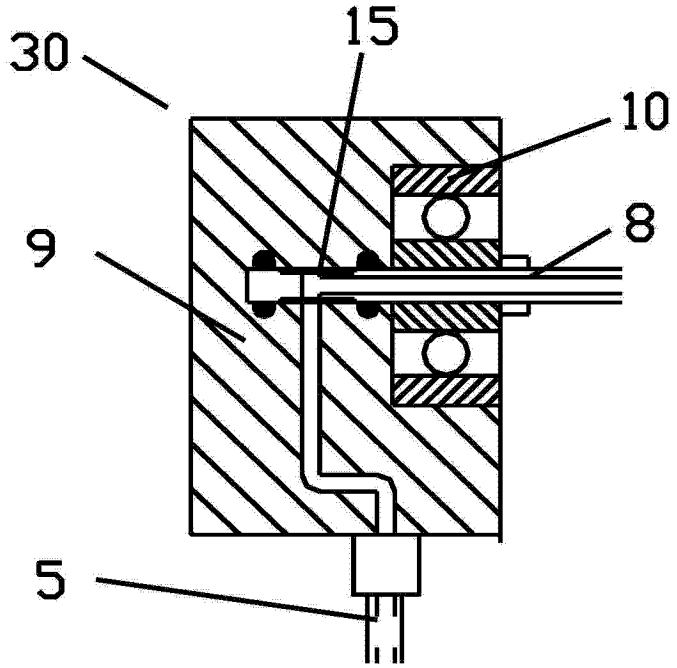


图 3

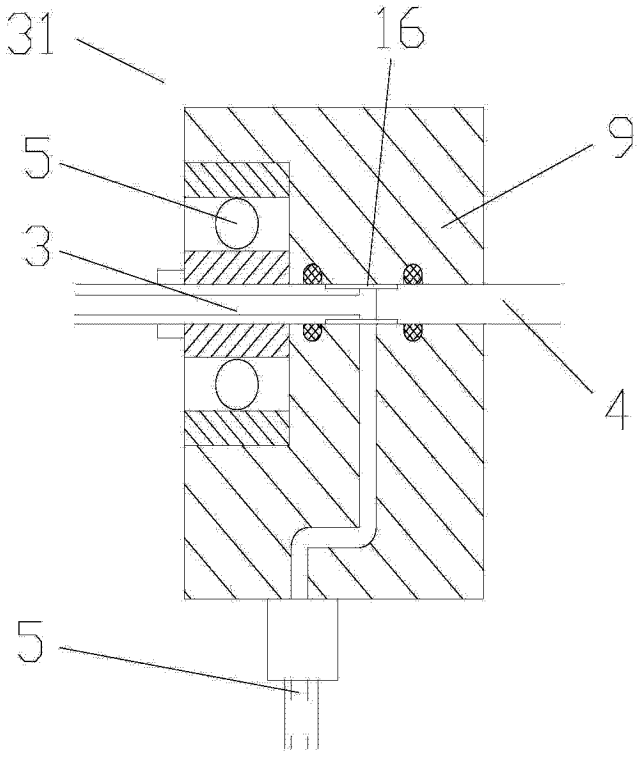


图 4

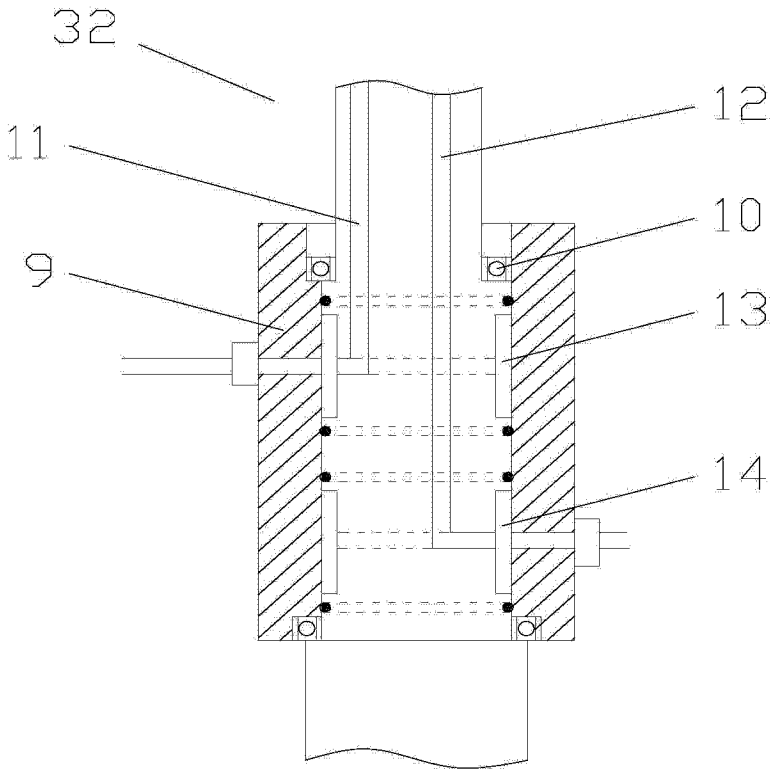


图 5

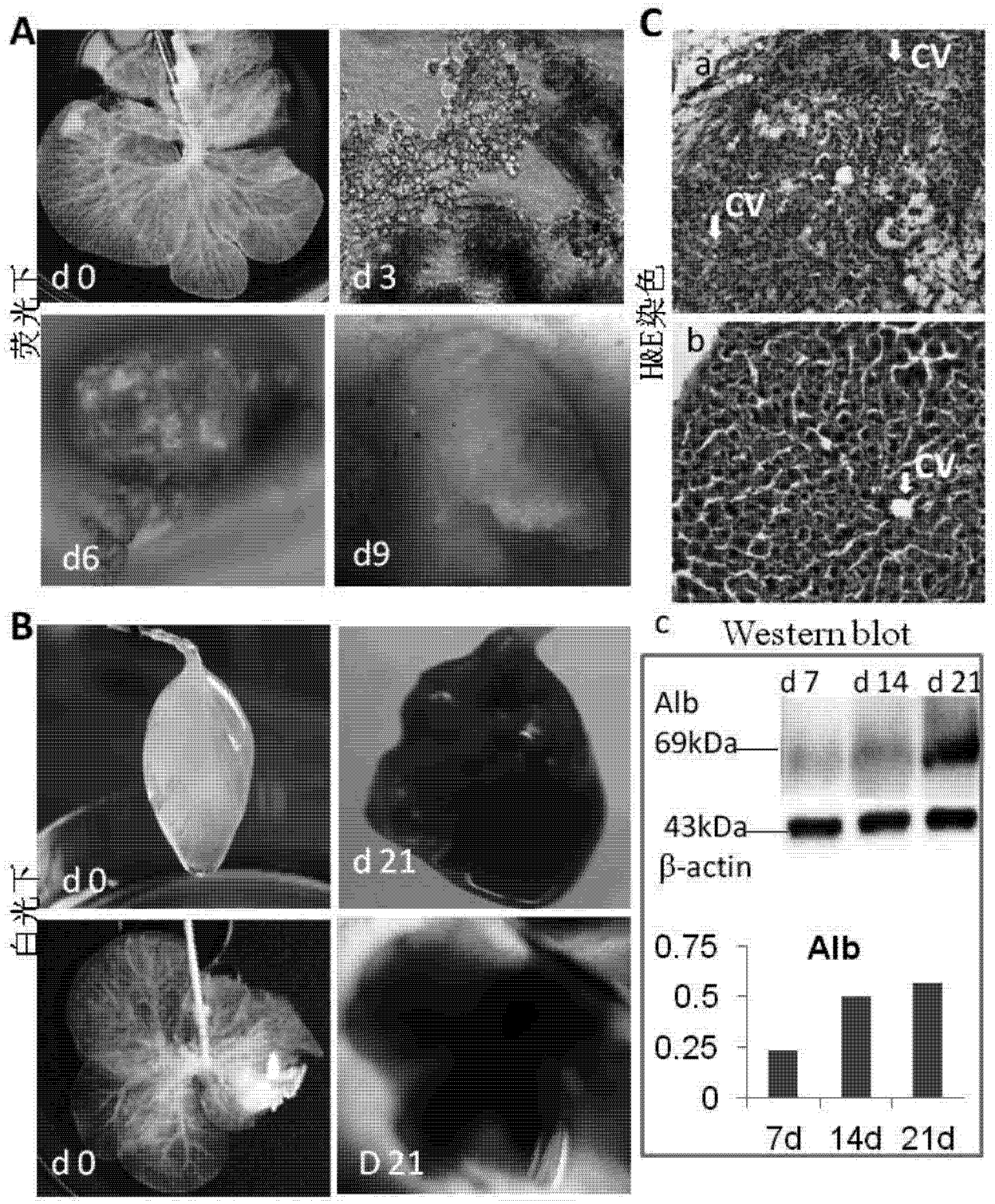

A
荧光下
d 0
d 3
d6
d9
B
白光下
d 0
d 21
d 0
D 21
C
H&E染色
a
CV
CV
b
CV
c
Western blot
d 7
d 14
d 21
Alb
69kDa
43kDa
β-actin
Alb
0.75
0.5
0.25
0
7d
14d
21d

图 6

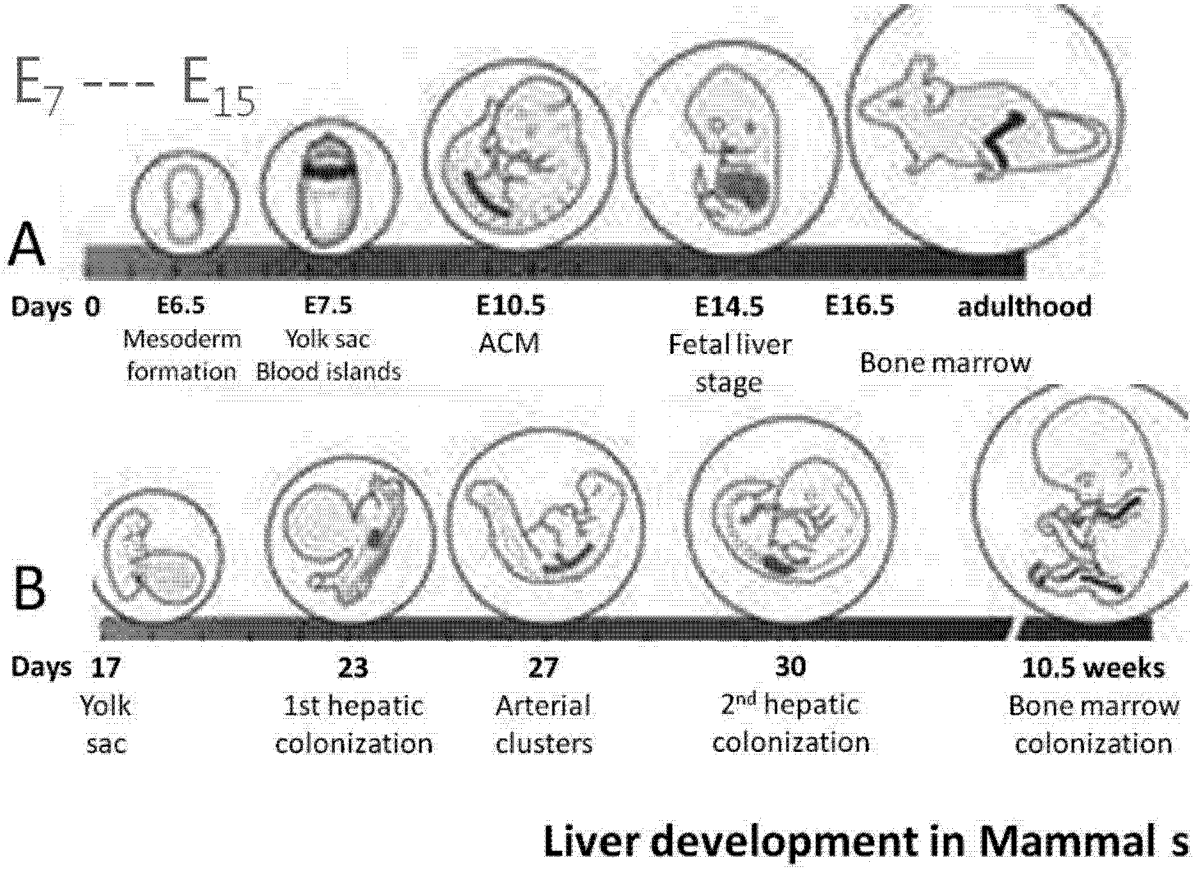

E7 --- E15
A
Days 0
E6.5
Mesoderm formation
E7.5
Yolk sac Blood islands
E10.5
ACM
E14.5
Fetal liver stage
E16.5
Bone marrow
adulthood
B
Days 17
Yolk sac
23
1st hepatic colonization
27
Arterial clusters
30
2nd hepatic colonization
10.5 weeks
Bone marrow colonization
Liver development in Mammal s

图 7