



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103146572 B

(45) 授权公告日 2016.01.06

(21) 申请号 201110403987.8

CN 101007999 A, 2007.08.01,

(22) 申请日 2011.12.07

审查员 汪一帆

(73) 专利权人 清华大学

地址 100084 北京市海淀区清华园1号

(72) 发明人 杜亚楠 姚睿 王婧宇

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任凤华

(51) Int. Cl.

G12M 3/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101842474 A, 2010.09.22,

CN 101186706 A, 2008.05.28,

CN 101842474 A, 2010.09.22,

权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

一种实现细胞集落均质性生长的装置和方法

(57) 摘要

本发明公开了一种细胞集落生长装置。本发明所提供的装置包括具有若干微图形空腔的微图形化模板和位于所述微图形化模板下的粘性水凝胶,两者交联粘着为整体;每个所述微图形空腔的形状和尺寸决定细胞集落生长的物理空间。用作所述粘性水凝胶的材料由可交联形成水凝胶的天然生物材料和/或人工合成生物材料,以及交联剂组成。本发明所提供的平台制备工艺简单,配合培养皿使用简便易行;利用微图形化技术构建多种细胞共培养环境,为高通量模型构建和筛选提供了方便实用的手段;同时还可实现对细胞集落形状和尺寸、粘附基底机械强度和化学成分、生长因子和化学信号、共培养细胞等多种因素的独立调控;以及原位进行细胞增殖培养和诱导分化培养。

1. 细胞集落体外培养装置,其特征在於:包括具有若干微图形空腔的微图形化模板和位于所述微图形化模板下的粘性水凝胶;所述粘性水凝胶与所述微图形化模板交联粘着为整体;所述微图形化模板的每个所述微图形空腔的形状和体积决定细胞集落生长的物理空间;所述微图形空腔为直径为 300 μm 或 500 μm 的圆形空腔;用作所述微图形化模板的材料为聚甲基丙烯酸甲酯。

2. 根据权利要求 1 所述的细胞集落体外培养装置,其特征在於:所述细胞集落体外培养装置还包括位于所述粘性水凝胶下的基底。

3. 根据权利要求 1 所述的细胞集落体外培养装置,其特征在於:所述细胞集落体外培养装置还包括位于所述粘性水凝胶下并嵌入所述微图形化模板的多孔培养皿。

4. 根据权利要求 1 所述的细胞集落体外培养装置,其特征在於:所述粘性水凝胶用可交联形成水凝胶的天然生物材料和 / 或人工合成生物材料制成,所述天然生物材料选自下述材料中的至少一种:明胶、藻酸盐、琼脂、基质胶、胶原、蛋白多糖、糖蛋白、透明质酸、层连接蛋白;所述人工合成生物材料选自下述材料中的至少一种:聚丙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚乳酸、聚乳酸醇酸共聚物、聚二甲基硅氧烷、聚酸酐、聚碳酸酯、聚氨基酸、聚缩醛、聚氰基丙烯酸酯、聚氨基甲酸酯、聚吡咯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯和聚氧化乙烯。

5. 根据权利要求 4 所述的细胞集落体外培养装置,其特征在於:所述糖蛋白为纤维连接蛋白。

6. 根据权利要求 4 所述的细胞集落体外培养装置,其特征在於:用作所述粘性水凝胶的材料由明胶-甲基丙烯酸甲酯和光引发剂 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮组成;所述明胶-甲基丙烯酸甲酯为明胶与甲基丙烯酸甲酯的使用配比为 1g 所述明胶比 1ml 所述甲基丙烯酸甲酯的聚合物。

7. 根据权利要求 6 所述的细胞集落体外培养装置,其特征在於:所述粘性水凝胶按照包括如下步骤的方法制备:

1) 将所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶于 DMEM 培养液,得到明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液,所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液中所述明胶-甲基丙烯酸甲酯的含量为每 100ml 所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液中含有 5g 所述明胶-甲基丙烯酸甲酯;

2) 将所述光引发剂 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮溶于无水乙醇,得到光引发剂溶液,所述光引发剂溶液中所述 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮的含量为每 100ml 所述光引发剂溶液中含有 10g 所述 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮;

3) 将所述光引发剂溶液与所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液按照体积比 1:20 的比例混合。

8. 根据权利要求 7 所述的细胞集落体外培养装置,其特征在於:所述粘性水凝胶的上表面涂覆有细胞外基质成分;所述细胞外基质成分包括胶原、明胶、基质胶、蛋白多糖、糖蛋白、透明质酸、层连接蛋白;和 / 或,

所述粘性水凝胶中嵌合有生长因子和化学信号分子。

9. 根据权利要求 8 所述的细胞集落体外培养装置,其特征在於:所述粘性水凝胶的厚度为 1-10 μm 。

10. 权利要求 1-9 中任一所述的细胞集落体外培养装置在调控全能干细胞自我更新中的应用。

11. 权利要求 1-9 中任一所述的细胞集落体外培养装置在调控全能干细胞定向分化中的应用。

一种实现细胞集落均质性生长的装置和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种细胞集落生长装置,特别涉及一种实现全能干细胞集落均质性生长的装置,同时也涉及利用该装置调控全能干细胞的自我更新和定向分化的方法。

背景技术

[0002] 全能干细胞(totipotent stem cell, TSC)是指具有无限分化潜能,能分化成所有组织和器官的干细胞,主要包括胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和诱导多能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPS)两类。

[0003] 胚胎干细胞是从哺乳动物早期胚胎中分离培养出来的,其特点是具有发育的全能性,参与整个生物体的发育,并构成人体的各种组织和器官。胚胎干细胞取自原肠胚期的囊胚,进一步分化可形成专能干细胞。如肝脏祖细胞,骨髓造血干细胞等。从技术角度来说,“全能性”的胚胎干细胞对于治疗性克隆来说是最理想的。

[0004] 然而,由于人类胚胎干细胞研究触及伦理和道德,在很多国家被法律禁止,相关研究也处于进退两难的境地。2007年,日本和美国科学家分别宣布发现将普通皮肤细胞转化为干细胞的方法,这样得到的干细胞和具有与胚胎干细胞类似的功能,被称为诱导多功能干细胞,即iPS细胞。这一发现分别被《自然》和《科学》两大权威科学杂志评为当年重大科学进展。

[0005] iPS细胞是“初始化”后的普通体细胞,但具有和胚胎干细胞类似的功能,能分化生成各种组织细胞。更重要的是,它绕开了胚胎干细胞研究一直面临的伦理和法律等诸多障碍,医疗领域的应用前景非常广阔。美国、日本等许多国家更是以极大热情,或加大投入,或制订鼓励政策,推动这一新兴的干细胞研究。中国干细胞基础研究和应用研究起步较早,2001年后,与干细胞相关的重大研究项目不少于二十个。此外,国家还在研发网络建设、人才建设、研究平台搭建等方面给予了大力支持,为中国在该研究领域的优势地位奠定了基础。中科院动物研究所周琪和北京生命科学研究所以高绍荣的研究团队分别利用iPS细胞克隆出小鼠,从而在世界上首次证明了iPS细胞的全能性,说明完全通过体外操作可得到与胚胎干细胞具有同样分化能力的细胞。这项成果是从干细胞研究迈向实际医疗过程中的一大步,对干细胞全能性的机理研究以及器官移植、药物筛选、基因治疗等临床应用研究具有重要价值。

[0006] 全能干细胞的集落性生长对于干细胞全能性的维持具有非常重要的作用。以人胚胎干细胞(hESC)为例,经典培养方法是在以小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)为代表的经过灭活的饲养层细胞上进行的,同时也有研究证实,在合适的化学因素作用下,细胞外基质也能作为培养基底维持hESC的自我更新,如基质胶、胶原、层连接蛋白、纤维连接蛋白中的一种或其混合物。在单细胞状态下,hESC的存活率较低,因此经典的传代方法是将其集落消化或切碎成为含有约100个细胞的团簇。无论采用何种传代技术,操作关键是将hESC保持在细胞团簇的状态。然而,这种方法很大程度上取决于操作人员的素质和手法,并最终形成形状和大小随机的、细胞密度随机的、异质性的hESC集落,但同时过大或者过小的细胞团簇都

有更明显的分化趋势。正是由于全能干细胞自我更新的特殊要求,现阶段的培养和传代方法很难得到均质性的全能干细胞集落。

[0007] 目前,越来越多的研究证明,全能干细胞集落的均质性对其自我更新和后续分化都具有至关重要的意义。以 hESC 为例,集落的尺寸和细胞组成对分化诱导因素和全能性维持因素有调节作用,尤其是与集落尺寸直接相关的 Smad1 信号是由胚胎干细胞和胚胎干细胞衍生的胚胎内胚层细胞的拮抗作用激发的,介导胚胎内胚层细胞的分泌骨形态发生蛋白 -2 (BMP2) 和胚胎干细胞分泌的生长分化因子 -3 (GDF3) 发生作用。通过单独调控 Smad1 激活可以拯救胚胎干细胞的自发分化,提示 hESC 集落的大小可以独立调控干细胞的分化和自我更新,但是在经典培养条件下无法调节集落尺寸大小,在随机的集落尺寸、细胞密度和分子微环境的共同作用下必然存在不可控的自发分化,影响胚胎干细胞的增殖和自我更新。

[0008] 全能干细胞集落的异质性和大小差异对于干细胞的分化命运同样具有重要影响,不可控的初始干细胞集落通常导致不一致或不稳定的分化结果和分化效率,这是全能干细胞分化研究面临的普遍问题。通过微图像化 (micropatterning) 技术研究发现,尺寸较小的集落向心肌细胞分化的趋势更明显,而尺寸较大的集落向神经细胞分化的趋势更明显全能干细胞培养基底的机械性能对于细胞的自我更新和分化命运也有重要影响。研究证明,基底的弹性模量约为 0.6kPa 时,对于小鼠胚胎干细胞的自我更新有很好的维持作用,此机械强度与体内组织相似;类似地,在未添加化学信号刺激的条件下,机械强度较高的培养基底具有诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的作用,而机械强度较低的基底能诱导干细胞向脂肪细胞方向分化;更深入的研究证明合适的机械应力能够抑制 hESC 的自发分化,并促进其自我更新,当双向循环应力与化学信号协同作用时能调控 hESC 的自我更新和分化,对于干细胞分化和细胞治疗等领域的研究具有重要意义。

[0009] 因此全能干细胞最理想的培养平台应在维持干细胞显型和核型正常的前提下包含以下三方面的因素:可控的集落形状和尺寸、物理和化学性质可调的培养基底、合适的传代方法已实现可调、稳定的细胞种植密度。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种细胞集落体外培养装置。

[0011] 本发明所提供的细胞集落体外培养装置包括具有若干微图形空腔的微图形化模板和位于所述微图形化模板下的粘性水凝胶;所述粘性水凝胶与所述微图形化模板交联粘着为整体,所述粘性水凝胶形成所述微图形空腔的底;所述微图形化模板的每个所述微图形空腔的形状和体积决定细胞集落生长的物理空间。

[0012] 根据需要,所述细胞集落体外培养装置还可包括位于所述粘性水凝胶下的基底,或位于所述粘性水凝胶下并嵌入所述微图形化模板的多孔培养皿。

[0013] 所述粘性水凝胶用可交联形成水凝胶的天然生物材料和/或人工合成生物材料制成,所述天然生物材料选自下述材料中的至少一种:明胶、明胶衍生物、藻酸盐、藻酸盐衍生物、琼脂、基质胶、胶原、蛋白多糖、糖蛋白、透明质酸、层连接蛋白和纤维连接蛋白;所述人工合成生物材料选自下述材料中的至少一种:聚丙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚乳酸、聚羟基酸、聚乳酸醇酸共聚物、聚二甲基硅氧烷、聚酸酐、聚酸酯、聚酰胺、聚氨基酸、聚缩醛、

聚氰基丙烯酸酯、聚氨酯甲酸酯、聚吡咯、聚酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯、聚碳酸酯和聚氧化乙烯。

[0014] 在本发明的实施例中,用作所述微图形化模板的材料具体为聚甲基丙烯酸甲酯;用作所述粘性水凝胶的材料,具体由明胶-甲基丙烯酸甲酯和光引发剂 Irgacure 2959 (I2959, 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮) 组成;所述明胶-甲基丙烯酸甲酯为明胶与甲基丙烯酸甲酯的使用配比为 1g 所述明胶比 1ml 所述甲基丙烯酸甲酯的聚合物。所述明胶-甲基丙烯酸甲酯具体可按照如下方法制备:1g 明胶粉末加入 10mL DPBS 溶液中,50℃水浴加热,均匀搅拌至完全融化后,以 0.5mL/min 缓慢加入 1mL 甲基丙烯酸甲酯,反应 2h 后取下,待溶液冷却至室温,加入 40mL DPBS 溶液稀释,用截留分子量 8000-12000 的透析袋在去离子水中 60℃透析 1 周,离心取上清液冷冻干燥 1 周,形成白色蓬松泡沫状固体,-80℃保存。

[0015] 所述粘性水凝胶具体可按照包括如下步骤的方法制备:1) 将所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶于 DMEM 培养液,得到明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液,所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液中所述明胶-甲基丙烯酸甲酯的含量为每 100ml 所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液中含有 5g 所述明胶-甲基丙烯酸甲酯;2) 将所述光引发剂 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮溶于无水乙醇,得到光引发剂溶液,所述光引发剂溶液中所述 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮的含量为每 100ml 所述光引发剂溶液中含有 10g 所述 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮;3) 将所述光引发剂溶液与所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液按照体积比 1:20 的比例混合。

[0016] 所述 DMEM 培养液可由商业途径获得,如 Invitrogen 公司的产品编号为 11965092 的产品。

[0017] 在制备所述粘性水凝胶时,根据需要,还可在所述粘性水凝胶的上表面涂覆细胞外基质成分,所述细胞外基质成分包括胶原、明胶、基质胶、蛋白多糖、糖蛋白、透明质酸、层连接蛋白、纤维连接蛋白。同时,还可以将生长因子和化学信号嵌合于所述粘性水凝胶中。所述粘性水凝胶的厚度通常约为 1-10 μm。

[0018] 在本发明的实施例中,所述细胞集落体外培养装置具体是按照如下方法构建的:将所述微图形化模板装置于所述多孔培养皿中,将含有交联剂的粘性水凝胶基溶液沿所述微图形化模板底面均匀注入所述多孔培养皿,利用所述交联剂的交联作用以及所述粘性水凝胶的粘着力作用,将所述微图形化模板和所述多孔培养皿表面连接成整体,形成由上至下依次为微图形化模板-基底水凝胶层-培养皿表面的细胞集落体外培养装置。

[0019] 利用本发明所提供的细胞集落体外培养装置,可以实现细胞集落的均质性生长。

[0020] 本发明所提供的细胞集落体外培养装置在调控全能干细胞自我更新和/或定向分化中的应用也属于本发明的保护范围。

[0021] 所述全能干细胞为人胚胎干细胞;所述定向分化为人胚胎干细胞分化为肝样细胞。

[0022] 本发明与现有研究相比具有如下优点:

[0023] 1、本发明所提供细胞集落体外培养装置整合利用微图形化模板和粘性水凝胶,可实现对细胞集落的形状和尺寸、粘附基底的机械强度和化学成分、生长因子和化学信号、共培养细胞等多种因素的调控,且对各因素的调控手段相互独立,互不干扰。

[0024] 2、本发明所提供细胞集落体外培养装置可实现细胞的增殖培养和诱导分化培养的原位进行,使操作大大简化,同时减小对细胞的处理和损伤。

[0025] 3、本发明所提供的细胞集落体外培养装置制备工艺简便,配合商业化培养皿使用简便易行,无需改变细胞培养的原有操作步骤和细节且能保持很好的无菌环境。

[0026] 4、本发明所提供细胞集落体外培养装置充分利用微图形化技术,同时可方便地构建多种细胞共培养环境,为高通量和高内涵的模型构建和筛选等研究提供了方便实用的手段。

附图说明

[0027] 图1为微图形化模板设计示意图。其中,直径大小不等的四种圆,根据直径由小到大的顺序依次代表直径为 $300\ \mu\text{m}$ 、 $500\ \mu\text{m}$ 、 $1000\ \mu\text{m}$ 或 $1500\ \mu\text{m}$ 的细胞培养空间。

[0028] 图2为细胞集落体外培养装置示意图。其中,1为培养皿,2为微图形化模板,3为基底水凝胶层,4为细胞集落。

具体实施方式

[0029] 本发明所提供的细胞集落体外培养装置包括具有若干微图形空腔的微图形化模板和位于所述微图形化模板下的粘性水凝胶;所述粘性水凝胶与所述微图形化模板交联粘着为整体;所述微图形化模板的每个所述微图形空腔的形状和体积决定细胞集落生长的物理空间。

[0030] 根据需要,所述细胞集落体外培养装置还包括位于所述粘性水凝胶下的基底或位于所述粘性水凝胶下并嵌入所述微图形化模板的多孔培养皿。

[0031] 上层微图形化模板可选择拆卸或固定使用,以适应后期细胞共培养或全能干细胞分化等用途。

[0032] 所述微图形化模板可采用本领域熟知的微图形化方法获得,如激光切割和雕刻,微图形化模具成型等,结合计算机辅助设计与制造技术,可调节细胞集落生长空间和所述微图形化模板整体的形状和尺寸。具体而言,通过计算机辅助设计与制造技术可方便地实现各种微图形空腔的形状和尺寸,形状如圆形、正方形、长方形、菱形、梯形和各种不规则形状等,尺寸为 $10\ \mu\text{m}\sim 2\text{cm}$ 不等,从而决定细胞集落生长的物理空间;所述微图形化模板的整体尺寸和形状通常配合所用培养皿的使用尺寸而定,形状多为规则圆形,直径等于或略小于培养皿的使用直径,可通过计算机辅助设计和制造技术方便地制备所需尺寸和形状的所述微图形模板;模板厚度以节省材料方便使用为宜,一般在 $100\ \mu\text{m}\sim 2\text{cm}$ 不等。

[0033] 所述粘性水凝胶是支持培养细胞(如全能干细胞)或饲养层细胞(如小鼠胚胎成纤维细胞)的生长基底。所述粘性水凝胶用可交联形成水凝胶的天然生物材料和/或人工合成生物材料制成,所述天然生物材料如明胶及其衍生物、藻酸盐及其衍生物、琼脂、基质胶、胶原、蛋白多糖、糖蛋白、透明质酸、层连接蛋白、纤维连接蛋白等,合成生物材料包括聚丙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚乳酸、聚羟基酸、聚乳酸醇酸共聚物、聚二甲基硅氧烷、聚酸酐、聚酸酯、聚酰胺、聚氨基酸、聚缩醛、聚氰基丙烯酸酯、聚氨基甲酸酯、聚吡咯、聚酯、聚甲基丙烯酸酯、聚乙烯、聚碳酸酯、聚氧化乙烯等,形成基底(下层粘性水凝胶)的材料可以是上述材料中的一种或几种的混合物。交联剂的种类和使用量视基底生物材料的种类和用量

而定,以充分交联为前提。

[0034] 用作所述微图形化模板的材料具体可为聚甲基丙烯酸甲酯;用作所述粘性水凝胶的材料,具体可由明胶-甲基丙烯酸甲酯和光引发剂 Irgacure 2959 (I2959, 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮)组成;所述明胶-甲基丙烯酸甲酯为明胶与甲基丙烯酸甲酯的使用配比为 1g 所述明胶比 1ml 所述甲基丙烯酸甲酯的聚合物。所述明胶-甲基丙烯酸甲酯具体可按照如下方法制备:1g 明胶粉末加入 10mL DPBS 溶液中,50℃水浴加热,均匀搅拌至完全融化后,以 0.5mL/min 缓慢加入 1mL 甲基丙烯酸甲酯,反应 2h 后取下,待溶液冷却至室温,加入 40mL DPBS 溶液稀释,用截留分子量 8000-12000 的透析袋在去离子水中 60℃透析 1 周,离心取上清液冷冻干燥 1 周,形成白色蓬松泡沫状固体,-80℃保存。

[0035] 所述粘性水凝胶具体可按照包括如下步骤的方法制备:1) 将所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶于 DMEM 培养液,得到明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液,所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液中所述明胶-甲基丙烯酸甲酯的含量为每 100ml 所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液中含有 5g 所述明胶-甲基丙烯酸甲酯;

[0036] 2) 将所述光引发剂 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮溶于无水乙醇,得到光引发剂溶液,所述光引发剂溶液中所述 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮的含量为每 100ml 所述光引发剂溶液中含有 10g 所述 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮;

[0037] 3) 将所述光引发剂溶液与所述明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液按照体积比 1:20 的比例混合。

[0038] 所述 DMEM 培养液可由商业途径获得,如 Invitrogen 公司的产品编号为 11965092 的产品。

[0039] 根据需要,可以在所述粘性水凝胶的上表面涂覆细胞外基质成分;所述细胞外基质成分包括胶原、明胶、基质胶、蛋白多糖、糖蛋白、透明质酸、层连接蛋白或纤维连接蛋白;也可以在所述粘性水凝胶中嵌合生长因子和化学信号。

[0040] 所述粘性水凝胶材料的使用量视培养皿的使用面积而定,以均匀覆盖培养皿或硬质基底表面为前提,一般为 1 μ l ~ 10ml 不等。

[0041] 本发明所述细胞集落体外培养装置的构建方法包括但不限于以下四种:

[0042] 1) 设计和制备出需要尺寸和形状的微图形化模板后,装置于多孔培养皿中,将基底生物材料沿模板底面均匀注入培养皿后交联,利用交联剂的交联作用和粘性水凝胶的粘性作用,将微图形化模板和多孔培养皿表面连接形成整体,待交联充分后洗去多余交联剂和气泡,即时使用或低温保存待用。

[0043] 2) 先将基底生物材料均匀注入培养皿后交联形成基底水凝胶层,再利用压力将微图形化模板与基底水凝胶层连接成为整体,充分洗去残余交联剂和气泡后即时使用或低温保存待用。

[0044] 3) 将玻璃片、塑料片等硬质基底加工成与微图形化模板一致的整体尺寸,在硬质基底上形成基质水凝胶层,然后利用压力将微图型化模板结合于水凝胶层表面成为整体,形成由下至上依次为硬质基底-水凝胶-模板的三层整体结构,将三层整体结构嵌入培养皿中,充分洗去残余交联剂和气泡后即时使用或低温保存待用。

[0045] 4) 先将片状硬质基底与微图形化模板由下自上对齐或粘连,再将基底生物材料沿

两者间隙均匀注入并交联,形成由下至上依次为硬质基底-水凝胶-模板的三层整体结构,将三层整体结构嵌入培养皿中,充分洗去残余交联剂和气泡后即时使用或低温保存待用。

[0046] 本发明提供的细胞集落体外培养装置可实现细胞集落的均质性生长,可用于调控全能干细胞的自我更新和定向分化。这主要包括对于集落形状、尺寸、基底机械强度等物理因素,基底成分、生长因子、化学信号等化学要素和共培养细胞等生物要素的调控。

[0047] 本发明调控集落形状、尺寸、基底机械强度等物理因素的实现方法具体如下:切除模板材料形成微图形空腔,构成全能干细胞集落生长的物理空间,因此集落的形状和尺寸由微图形化模板空腔的特征形状和尺寸决定。通过计算机辅助设计和制造技术可方便地实现各种微图形空腔的形状和尺寸,并可通过在一个模板上切割不同物理属性的空腔实现同一培养条件下不同集落形状、尺寸和分布的比较,对于高通量研究和筛选具有重要意义。以上所述模板空腔的形状如圆形、正方形、长方形、菱形、梯形和各种不规则形状等,尺寸为 $10\ \mu\text{m} \sim 2\text{cm}$ 不等。

[0048] 基底机械强度主要由基底水凝胶的材料(粘性水凝胶的材料)种类、用量及其交联程度决定,一般而言,基底水凝胶的材料用量越大、交联程度越高,则其机械强度越大。特别地,基底机械强度可在细胞集落体外培养装置使用过程中通过人为调控或自发调控等过程来进行干预,人为调控基底机械强度主要通过基底水凝胶材料的二次或多次交联实现,如采用明胶-甲基丙烯酸甲酯作为基底水凝胶材料时,可分别通过紫外光、蓝光等物理交联方式和京尼平、戊二醛等化学交联方式,方便地在需要时间和原位实现二次或多次交联,其结果通常是基底水凝胶材料机械强度的提高;自发调控基底水凝胶材料的机械强度主要是通过细胞培养过程中细胞-材料相互作用和材料降解实现的,其结果通常是基底水凝胶材料机械强度的降低。自发调控和人为调控的结合可实现基底水凝胶材料的机械强度原位、随时、多次地调节和控制,以适应全能干细胞自我更新和定向分化的要求,如在全能干细胞培养初期,较低的基底机械强度有利于干细胞的自我更新和全能性的维持,当全能干细胞增殖形成均质性集落后可进行定向分化诱导培养,如向肝样细胞、心肌细胞、胰腺细胞等方向分化,此时较高的基底机械强度有利于干细胞的定向分化。通过本细胞集落体外培养装置及其调控方法可在原位实现全能干细胞集落的自我更新和定向分化诱导培养。上述基底水凝胶材料的使用量视培养皿的使用面积而定,以均匀覆盖培养皿或硬质基底表面为前提,一般为 $1\ \mu\text{l} \sim 10\text{ml}$ 不等,交联剂的种类和使用量视基底生物材料的种类和用量而定,以充分交联为前提。

[0049] 本发明调控基底成分、生长因子、化学信号分子等化学要素的具体方法如下:由于上层微图形化模板和下层粘性水凝胶的不同的生物和理化属性、不同的垂直高度以及吹打抽吸等后续操作,基底水凝胶材料表面一般是全能干细胞或饲养层细胞生长的直接附着表面,可通过在基底水凝胶表面涂覆各种生物材料实现基底成分的改性和调控,如涂覆胶原、明胶、基质胶、蛋白多糖、糖蛋白、透明质酸、层连接蛋白、纤维连接蛋白等各种细胞外基质成分,以提高细胞粘附、更好地维持干细胞的自我更新、或促进全能干细胞的定向分化。此处所述涂覆材料不限于以上种类材料,具体使用种类和用量视培养细胞的种类和培养目的而定。

[0050] 本发明可以方便地实现各种生长因子和化学信号分子在细胞集落体外培养装置中的复合和缓释。通过因子固定技术(immobilization)可将生长因子和化学信号分子嵌

合于基底水凝胶层中,实现各种因子仿生、高效、可控的缓释,提高因子的作用效率和作用时间,对于体外模拟体内发育提供了一种方便实用的模型,并具有重要的经济效益。同时,生长因子和化学信号分子也可以可溶分子的形式参与细胞培养过程,可方便地进行时序性可控的因子添加,以适应程序性诱导分化培养的要求。此处所述生长因子和化学信号分子的选用视培养细胞的种类和培养目的而定,是本领域的公知方法。

[0051] 本发明可适于全能干细胞的增殖培养和诱导分化培养等多种用途,方便的细胞共培养途径是实现以上功能的重要保证,本发明在调控共培养细胞等生物要素的具体方法包括但不限于如下两类:

[0052] 1) 维持全能干细胞自我更新的饲养层共培养。在细胞集落体外培养装置中可先选择性种植饲养层细胞,使其贴附于微图形空腔的基底水凝胶表面或微图形模板上,其后在细胞集落体外培养装置上种植全能干细胞,形成与饲养层细胞共培养的生理环境,有利于全能干细胞的自我更新和全能性的维持。此处所述饲养层细胞的选择和种植密度是本领域的公知,具体选择视全能干细胞的种类而定。

[0053] 2) 促进全能干细胞定向分化的辅助细胞共培养。在细胞集落体外培养装置形成全能干细胞均质性集落后可原位进行干细胞定向分化诱导培养,此时可选择性进行辅助细胞共培养,共培养方法包括保留微图形化模板和拆卸微图形化模板两种。

[0054] 在保留模板的情况下可直接将辅助细胞种植于细胞集落体外培养装置,此时辅助细胞优先贴附于微图形化模板上非空腔表面,形成辅助细胞与全能干细胞集落非接触式共培养环境;另外,可在形成全能干细胞均质性集落后拆除上层微图形化模板,保留全能干细胞集落、基底水凝胶层和/或硬质基底,此时所种植的辅助细胞优先贴附于基底水凝胶层上未被全能干细胞集落占位的空白表面,形成辅助细胞与全能干细胞集落接触式共培养环境。以上两种方式的选择可根据基底水凝胶材料种类、全能干细胞诱导分化方向和辅助细胞的类型等因素而定。辅助细胞的种类和种植密度是本领域的公知,主要由全能干细胞集落的数量、细胞密度和干细胞诱导分化方向等因素决定。

[0055] 本发明所述细胞集落体外培养装置尤其适用于全能干细胞的培养,同时也可用于其它各种细胞的培养。

[0056] 下面结合具体实施例对本发明加以阐述,应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0057] 实施例 1、细胞集落体外培养装置的制造

[0058] 一、微图形化模板的制备

[0059] 利用激光切割法制备上层微图形化模板。具体操作如下:采用 Rayjet 激光雕刻机切割厚度为 0.5cm 的聚甲基丙烯酸甲酯平板(尊宝科技)形成上层微图形化模板。按照图 1 所示,由软件 AutoCAD 设计完成微图形化模板:模板为圆形,直径尺寸为 22.1mm,中央呈正方形均匀分布 8×8 个直径为 300 μm、500 μm、1000 μm 或 1500 μm 的空腔作为微图形化的细胞(如全能干细胞)培养空间,相邻两个空腔圆心的距离为 1500 μm。激光雕刻机的主要加工参数为:切割能量 100%,切割次数 2,切割线速度 10%。

[0060] 将加工成型的聚甲基丙烯酸甲酯模板用去离子水漂洗两次,超声清洗 30min,然后进行热处理以改善平整度:取平整清洁的加热板,温度设置 90℃,在受压状态下热处理聚

甲基丙烯酸甲酯模板 45min。

[0061] 将热处理后的微图形化模板用无菌三蒸水浸泡漂洗 30min,并用无菌清洁纸擦拭干净,于安全柜中双面照射紫外 45min 灭菌备用。

[0062] 二、细胞集落体外培养装置的制造

[0063] 用无水乙醇将光引发剂 (I2959, 2-羟基-4-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮, 106797-53-9, 英力, 中国) 配制成浓度为 0.1g/ml 的光引发剂溶液, 0.2 μm 滤膜过滤除菌后分装成 1ml/管并避光 4℃ 低温保存。

[0064] 按照如下方法制备明胶-甲基丙烯酸甲酯: 1g 明胶 (G6144, Sigma, 美国) 粉末加入 10mL DPBS 溶液中, 50℃ 水浴加热, 均匀搅拌至完全融化后, 以 0.5mL/min 缓慢加入 1mL 甲基丙烯酸甲酯 (276685, Sigma, 美国), 反应 2h 后取下, 待溶液冷却至室温, 加入 40mL DPBS 溶液稀释, 用截留分子量 8000-12000 的透析袋在去离子水中 60℃ 透析 1 周, 离心取上清液冷冻干燥 1 周, 形成白色蓬松泡沫状固体, 为明胶-甲基丙烯酸甲酯聚合物, -80℃ 保存。

[0065] 将上述制备好的明胶-甲基丙烯酸甲酯溶于 DMEM 培养液 (11965092, Invitrogen, 美国) 中, 60℃ 助溶 3 小时, 形成浓度为 0.05g/ml 明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液, 用 0.2 μm 滤膜过滤后分装成 1ml/管备用。

[0066] 使用时将上述配制好的浓度为 0.1g/ml 的光引发剂溶液与浓度为 0.05g/ml 的明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液以 1:20 均匀混合后避光保存, 并且之后的相关操作均在避光的条件下进行。

[0067] 在安全柜中按照无菌操作规范将步骤一中所述微图形化模板 1:1 嵌入 12 孔板培养皿 (Corning 公司) 的培养孔中, 在避光条件下沿微图形模板底面缓慢注入 70 μl 无菌的明胶-甲基丙烯酸甲酯/光引发剂溶液, 此时在模板底面与培养皿表面之间形成一层均匀的基底生物材料层。利用紫外光交联明胶-甲基丙烯酸甲酯溶液, 紫外光能量约为 5.4mW/cm², 作用时间 40s, 形成厚度为 1-10 μm 的基底水凝胶层 (下层粘性水凝胶)。此时在交联剂的交联作用和明胶-甲基丙烯酸甲酯水凝胶粘着力的共同作用下形成由上至下依次为微图形化模板-基底水凝胶层-培养皿表面的细胞集落体外培养装置 (如图 2 所示)。然后用 1ml/孔 DMEM 溶液润洗细胞集落体外培养装置两次, 立即使用或低温无菌保存。

[0068] 实施例 2、利用实施例 1 的细胞集落体外培养装置培养人胚胎干细胞

[0069] 1、人胚胎干细胞增殖培养

[0070] MEF 培养液: 每 250ml MEF 培养液含 DMEM (11965092, Invitrogen) 225ml, 胎牛血清 (10099141, Invitrogen) 25ml, 谷丙氨酸二肽 (Glutamax I) (35050061, Invitrogen) 2.5ml, MEM 非必需氨基酸 (MEM NEAA) (11140050, Invitrogen) 2.5ml, 青霉素/链霉素 (Pen/strep) (100X (15140122, Invitrogen) 2.5ml。

[0071] 人胚胎干细胞培养液: 每 250ml 培养液含 knock out DMEM (10829018, Invitrogen) 200ml, Knockout serum replacer (10828028, Invitrogen) 50ml, 谷丙氨酸二肽 (Glutamax I) (35050061, Invitrogen) 2.5ml, MEM 非必需氨基酸 (MEM NEAA) (11140050, Invitrogen) 2.5ml, 青霉素/链霉素 (Pen/strep) (15140122, Invitrogen) 2.5ml, 人碱性成纤维细胞生长因子 (hbFGF) (25 μg/ml) (233-FB-025, R&D) 0.08ml。

[0072] 一、小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 的获取

[0073] 获取小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 的具体操作步骤如下：

[0074] (1) 用孕马血清促性腺激素 (HOR-272, 上海高创) 处理小鼠, 使其同期发情和超数排卵。

[0075] (2) 将雌雄小鼠按照 2 : 1 的比例合笼过夜。

[0076] (3) 第二天, 取出有阴道栓 (即乳白色或淡黄色冻胶状物, 确定其已经怀孕) 的雌性小鼠。此时, 小鼠怀孕时间记录为 0.5 天。

[0077] (4) 取出妊娠 12.5-14.5 天的雌性小鼠为下述进一步实验的材料。

[0078] (5) 颈椎脱臼法处死步骤 (4) 的怀孕小鼠, 放于盛有 75% 酒精的烧杯中消毒, 拿到超净工作台上解剖, 先剖开腹部皮肤, 暴露子宫, 然后换另外一套手术器械, 用眼科镊提起近子宫颈端, 分离子宫系膜, 剪断子宫角, 取出子宫, 置于装有 PBS 的培养皿中。

[0079] (6) 取出胎鼠, 在 PBS 中洗涤数次。去除头、尾、内脏和四肢, 仅留躯干部。在 PBS 中充分漂洗, 弃除红细胞。

[0080] (7) 在新的培养皿中加入少量 PBS, 放入躯干部分, 用眼科剪刀剪成 1mm^3 以下的组织块碎片。

[0081] (8) 加入 2 ~ 4ml 0.25% 胰蛋白酶, 培养箱中消化 10-15min, 消化结束后加入等体积 MEF 培养液终止消化反应, 轻轻吹打, 使细胞分散。

[0082] (9) 将收集的细胞悬液离心, 1500rpm, 4min, 弃上清, 加入红细胞裂解液 (3 ~ 5 倍体积的细胞体积), 轻轻吹打 1min, 离心除上清, 若仍有红细胞残留, 则须继续进行前述的红细胞裂解步骤。

[0083] (10) 离心, 弃上清, 重悬细胞, 过滤 (200 目筛网) 并收集滤液, 离心除去上清。

[0084] (11) 用 MEF 培养液洗涤沉淀, 离心除上清, 重悬细胞并铺板后置于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度恒温培养箱中培养。

[0085] (12) 第二天换液, 随后每 2 天换液一次。培养 2 ~ 4d 后, MEF 接近汇合, 即可按 1 : 3 比例传代培养。

[0086] (13) 收集细胞进行 X 射线灭活, 剂量为 70 戈瑞 (Gy)。

[0087] 将灭活的 MEF (以下简称 In-MEF) 以 2.5×10^4 个 / cm^2 的细胞密度均匀种植于实施例 1 构建的细胞集落体外培养装置中, 如为低温无菌保存的细胞集落体外培养装置, 则 PBS 润洗两次后 37°C 孵育 10min 使用。细胞集落体外培养装置种植 In-MEF 后, 置于培养箱中静置 10min, 稍倾斜吸出上清, 沿培养皿的孔壁加入 1ml/ 孔 MEF 培养液润洗两次, 以去除模板表面的细胞, 留下微图形化空腔中的 In-MEF 细胞。沿培养皿的孔壁加入 1.5ml/ 孔 MEF 培养液, 在培养箱中进行 In-MEF 细胞培养。

[0088] 24h 后, 吸去细胞集落体外培养装置中的 MEF 培养液。将在六孔板培养皿中常规培养的汇合度约为 60-70% 的人胚胎干细胞 H9 (Wice11) 均匀传代至细胞集落体外培养装置中, 将六孔板一个培养孔中的人胚胎干细胞 H9, 传到上述含有 In-MEF 细胞集落体外培养装置 12 孔板的一个培养孔中, 即人胚胎干细胞 H9 约为 3 : 1 种植。将细胞集落体外培养装置置于培养箱中静置 10min, 稍倾斜吸出上清, 以去除模板表面的人胚胎干细胞 H9, 留下微图形化空腔中的人胚胎干细胞 H9。沿培养皿的孔壁加入 1.5ml/ 孔人胚胎干细胞 H9 培养液, 在培养箱中进行 MEF 和人胚胎干细胞 H9 共培养, 每天换液、观察, 采用碱性磷酸酶活性测定、特异性表面抗原表达检测 (如 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60)、核转录因子检测 (如 OCT4)

等方法鉴定人胚胎干细胞 H9 的生物学特性。

[0089] In-MEF 和人胚胎干细胞 H9 在实施例 1 的细胞集落体外培养装置中共培养约 3 ~ 4 天后,人胚胎干细胞 H9 形成与微图形化模板的空腔形状一致的,8×8 个直径为 300 μm、500 μm、1000 μm 或 1500 μm 均一集落。

[0090] 上述 MEF 细胞培养和传代、人胚胎干细胞 H9 的常规培养、传代和检测方法是本领域的公知,优先采用目前经典操作规范进行。

[0091] 2、原位人胚胎干细胞定向诱导分化

[0092] 1) 原位人胚胎干细胞程序性定向诱导分化

[0093] 约 3 ~ 4 天后,可观察到上述步骤 1 培养的人胚胎干细胞 H9,在微图形化空腔中形成 8×8 个直径为 300 μm、500 μm、1000 μm 或 1500 μm 的均质性人胚胎干细胞 H9 集落(经所述生物学特性鉴定较好),之后在细胞集落体外培养装置中进行原位人胚胎干细胞 H9 诱导分化培养,此处所述以肝样细胞程序性诱导分化为例。

[0094] 程序性诱导分化以体内肝脏发育为指导,依次分为限定性内胚层诱导、肝祖细胞特化诱导和肝细胞成熟诱导等阶段。各个阶段的诱导培养液是基于成分培养液配制的,成分培养液配方为:50% IMDM 培养基(Iscove's modified Dulbecco's medium)与 50% F12NUT-MIX,添加 7 μg/ml 胰岛素、15 μg/ml 转铁蛋白、450 μmol/L 硫代甘油和 5mg/ml 牛血清白蛋白。以诱导起始时间记为第 1 天,诱导分化方法为:第 1 ~ 2 天,采用添加 10ng/mL 活化素(activin)和 12ng/ml 人成纤维细胞生长因子 2(FGF2)的成分培养液培养干细胞,每天换液;第 3 ~ 5 天,采用添加 100ng/mL activin,20ng/mL FGF2,10ng/mL 骨形态发生蛋白(BMP4)和 10 μmol/L LY294003(PI3K 抑制剂)的成分培养液诱导人胚胎干细胞 H9 向内胚层细胞分化,每天换液;第 6 ~ 8 天,采用添加 50ng/mL 人成纤维细胞生长因子 10(FGF10)的成分培养液诱导向前部限定性内胚层的定向分化,每天换液;第 9 ~ 10 天,采用添加 50ng/mL FGF10,10⁻⁷mol/L 视黄酸和 10 μmol/L SB431542(TGF-Smads 信号通路抑制剂)的成分培养液诱导向肝祖细胞的定向分化,每天换液;第 11 ~ 20 天,采用添加 30ng/mL 人成纤维细胞生长因子 4(FGF4),50ng/mL 肝细胞生长因子(HGF)和 50ng/mL 上皮生长因子(EGF)的成分培养液诱导向肝样细胞的定向分化,每 2 ~ 3 天换液。以上培养过程都将细胞集落体外培养装置置于 37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中进行,每次每孔加液 1.5ml。

[0095] 经上述诱导后人胚胎干细胞 H9 分化的细胞能够表达肝脏特定基因 AFP,分泌白蛋白,由此判定人胚胎干细胞 H9 定向分化为了肝样细胞。

[0096] 2) 原位人胚胎干细胞共培养定向诱导分化

[0097] 观察到上述步骤 1 培养的人胚胎干细胞 H9,在微图形化空腔中形成 8×8 个直径为 1000 μm 的均质性人胚胎干细胞 H9 集落后,在细胞集落体外培养装置中进行原位共培养诱导分化培养,此处所述以肝样细胞共培养诱导分化为例。

[0098] 将人来源的肝星状细胞系(Human Hepatic Stellate Cells, cat#5300, Sciencell)培养于 37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱中,培养条件为添加 10% FBS 和 200U/mL 青链霉素的 DMEM 培养液。

[0099] 开始肝星状细胞共培养前用镊子揭下上层微图形化模板,用人胚胎干细胞 H9 全培养液润洗培养皿两次,此时培养皿中留下基底水凝胶层和微图形化的人胚胎干细胞 H9 集落。将肝星状细胞重悬于人胚胎干细胞 H9 全培养液中,以 2.5×10⁴个/cm²的细胞密度

均匀种植于培养皿中,一天后换液,此时星状细胞优先贴附于基底水凝胶层,围绕人胚胎干细胞 H9 集落形成两种细胞共培养环境。

[0100] 其后 6 天,采用诱导培养液诱导人胚胎干细胞 H9 向肝样细胞定向分化,诱导培养液的成分为:50% IMDM 培养基与 50% F12NUT-MIX,添加 7 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素、15 $\mu\text{g/ml}$ 转铁蛋白、450 $\mu\text{mol/L}$ 硫代甘油、5mg/ml 牛血清白蛋白、50ng/mL FGF4,50ng/mL HGF 和 50ng/mL EGF,每 2 ~ 3 天换液。以上培养过程都将细胞集落体外培养装置置于 37°C、5% CO_2 饱和湿度培养箱中进行,每次每孔加液 1.5ml。

[0101] 经上述诱导后人胚胎干细胞 H9 分化的细胞能够表达肝脏特定基因 AFP,分泌白蛋白,由此判定人胚胎干细胞 H9 定向分化为了肝样细胞。

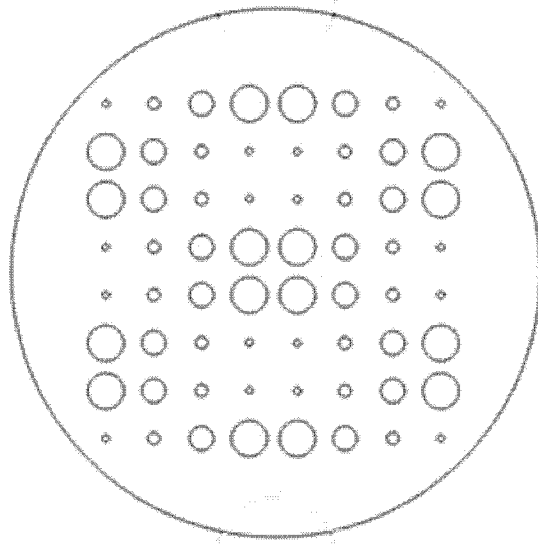


图 1

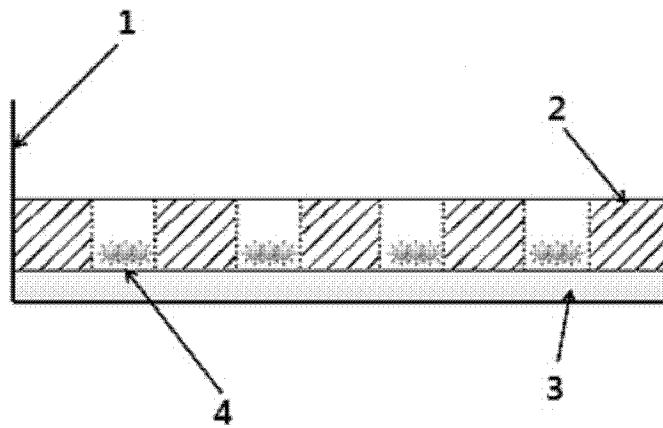


图 2