



invitrogen gibco

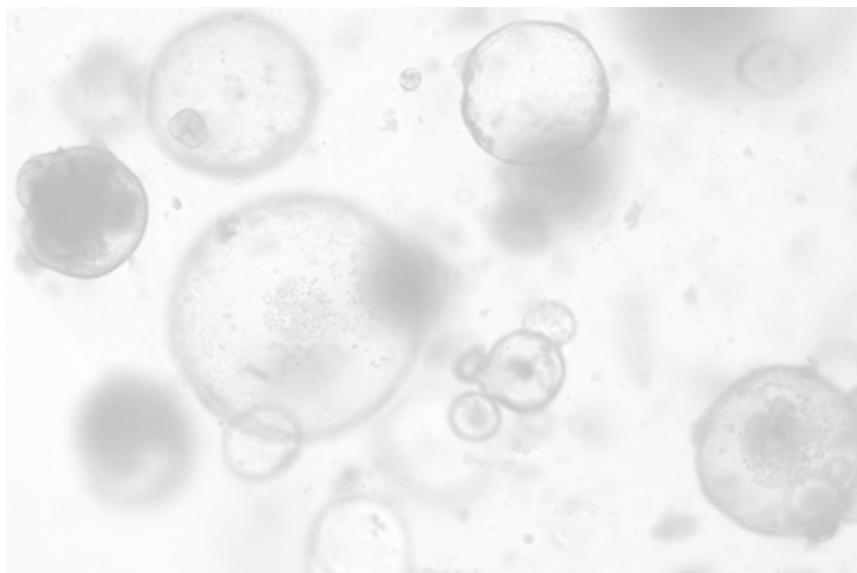
3D细胞培养手册

3D细胞模型的培养和分析

3D细胞模型

在3D环境中培养的细胞和组织显示出极大的潜力,能够促进我们对复杂生物过程的理解。3D细胞模型正越来越多地用于多项研究应用,包括新药研发、毒理学、疾病建模和再生医学。这些模型提供了在生理学相关背景下更好地理解复杂生物学的机会,而2D模型在这一领域的作用尚未得到证明。

本手册概述了从2D模型到3D细胞模型的转变中使用的细胞系、培养条件和分析技术。无论您是刚刚开始这一转变,还是已经在探索对现有3D培养方法的改进,我们整理的各种资源都可以帮助您创建更好的模型系统用于实验。



目录

1	3D细胞模型简介	4	7	疾病和生理学研究中的3D细胞培养模型	43
1.1	3D细胞模型简介	5	7.1	癌症模型	44
1.2	重大进展	7	7.2	神经模型	46
			7.3	肝脏模型	47
			7.4	肠道模型	51
			7.5	肾脏模型	52
			7.6	肺模型	53
2	培养概述	10			
2.1	球状体模型	11			
2.2	类器官模型	12			
2.3	屏障模型	14			
3	3D细胞建模中使用的细胞系来源	15	8	服务	54
3.1	细胞系简介	16	8.1	定制细胞服务	55
3.2	原代细胞	17			
3.3	胚胎和诱导多能干细胞	19			
3.4	成体干细胞	22	9	参考文献	56
3.5	患者来源细胞	23			
4	基质	24	附录: 方案与应用	60	
4.1	简介	25	A.1	多能干细胞分化为神经类器官	61
4.2	细胞外基质	25	A.2	B-27添加剂在建立和表征衍生自单层扩增NSC的功能性3D神经球状体模型中的使用	66
4.3	不依赖于基质的系统	27	A.3	PSC衍生多巴胺能神经元的3D建模	70
5	培养基和添加剂	29	A.4	球状体高通量荧光成像及分析	75
5.1	简介	30	A.5	借助3D球状体培养手段研究药物代谢	83
5.2	培养基	31	A.6	使用人原代肝细胞3D球状体培养系统体外评价肝功能	87
5.3	添加剂	32	A.7	在高通量平板上形成均匀且可重复的3D癌症球状体	93
6	成像和分析	33	A.8	使用3D球状体培养用于新药研发和开发的药物代谢途径基因表达谱分析	97
6.1	可视化在3D细胞培养中的重要性	34	A.9	在载板系统中的NUNC插入式细胞培养器上构建人皮肤组织	102
6.2	监测3D细胞模型特征的工具	35	A.10	癌症球状体的生成—提示和技巧	106
6.3	分析3D培养物的挑战	36	A.11	在研究中利用新维度: 全面了解球状体培养	110
6.4	功能分析	38	A.12	通过高通量筛选检测分析癌症球状体	117
6.5	高通量筛选	41			

第1部分

3D细胞模型简介



1.1

3D细胞模型简介

对正常和疾病状况下生物过程的理解的加深依赖于实验室中的准确建模。几十年来,研究人员使用的都是二维(2D)细胞培养方法,在这一方法下,细胞在培养皿或烧瓶中以单层形式生长。2D细胞培养方法在研究中已被广泛接受,但近年来,其在研究更复杂系统方面的局限性已越来越明显。

三维(3D)细胞培养方法可为细胞重新创建更多生理上相关的微环境。细胞外基质(ECM)对每个微环境都至关重要,它为细胞提供结构支持并调节多种过程,包括细胞迁移、细胞增殖、细胞分化和细胞间通讯。Bissell及其同事在一项关键研究中证明,ECM和组织结构可以塑造正常和恶性细胞接收和响应周围环境信号的方式(Bissell 1981; Hall 1982)。后来,Petersen及其同事证明,使用合适的ECM培养细胞可以使细胞自组装,从而可以在体外观察到形态建成(Petersen 1992)。这些培养物是模拟器官3D结构的第一批系统之一(Rossi 2018)。

3D细胞模型的类型包括球状体、类器官、生物打印的细胞模型和器官芯片。球状体是3D培养中一种或多种细胞类型生长和聚集的结果。一般而言,球状体保留了起始细胞的特征,只是外观呈球形。类器官由通常来自干细胞或其他祖细胞的分化程度更高的结构组成。这些细胞结构保留了其来源器官的许多特征。肿瘤球状体也可以从患者组织中生长,在测试后使个体化治疗的可能性成为现实(Aboukheyr 2018)。器官芯片是微流器械,可以模拟器官的细胞结构,使培养基能够动态流动。所有这些不同的模型均以体外方式提供组织或器官的体内表现。下表显示了2D和3D细胞培养方法之间的主要区别(表1.1)。

表1.1.2D和3D细胞培养系统的主要区别。

特征或条件	2D	3D
形态	细胞以片状或单层形式生长	细胞通常保持自然形状或适当的空间定向,以聚集集体或球状体呈现
增殖	通常快于体内生长	可能比2D培养快,也可能比2D培养慢,具体取决于使用的细胞类型和系统
基因和蛋白质表达	通常与体内表达不同	细胞更贴近于体内表达
药物敏感性	因为接触相当均匀,药物通常显示有效	细胞可能具有不均匀的毒性特征;更贴近于体内的真实效果
氧气压力	培养箱中的高氧气压力并非生理环境下的压力;影响线粒体功能和活性氧类物质(ROS)的形成	氧气压力因培养物而异;更贴近于体内差异
遗传漂变	长期培养中的细胞由于在单个实验室中经历特定生长条件的选择而发生遗传漂变;也可能出现表观遗传和生理变化	细胞不会经历传统的长期培养,因此基因稳定性可能得到改善

改编自: Edmondson 2014; Horvath 2016.

创建3D细胞培养物的方法

有多种方法可用于生成3D细胞培养物,如图1.1所示。这些方法包括静态悬浮法、悬滴培养法,以及使用转瓶或生物打印机生成的更复杂系统。所有这些方法均可以进行优化以适应实验室需求。使用圆底(U型底)孔形的静态悬浮法是生长球状培养物的理想选择,因为细胞在圆形表面上更难以粘附和生长。**Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™ U型底培**

养板上可靠的细胞生长和易于控制的球状体尺寸对于重视一致性和重现性的应用至关重要。凝胶包埋法使用由天然(例如胶原蛋白)或合成材料组成的ECM材料来支持3D细胞培养。这些材料的示例包括明胶、层粘连蛋白、透明质酸、聚乙二醇(PEG)、聚乳酸(PA)和聚乙醇酸(PGA)。一种潜在的应用是创建专门针对目标细胞类型的ECM,以进一步改善肿瘤微环境的体外建模(Lv 2017)。

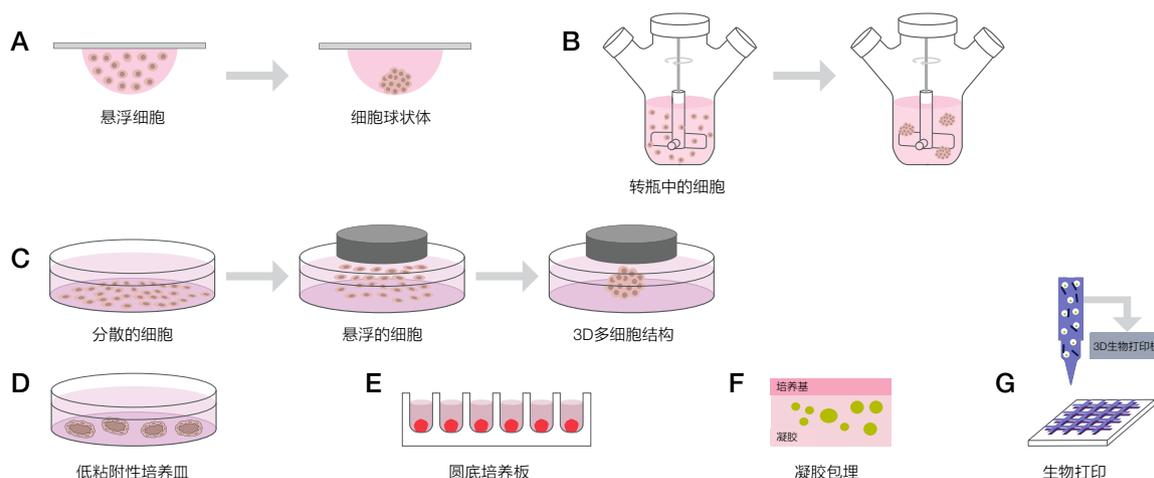


图1.1. 常见的3D细胞培养体系创建方法。(A) 悬滴培养。(B) 转瓶培养。(C) 预载磁性纳米颗粒的细胞磁悬浮培养。(D) 细胞在低附着培养板上静态悬浮培养。(E) 圆底3D培养板中静态悬浮培养。(F) ECM嵌入。(G) 3D生物打印。

Nunclon Sphera微孔板

Nunclon Sphera微孔板具有细胞附着性极低的表面,能够促进球状体和类器官的3D培养,帮助您完成癌症球状体形成和干细胞分化,以进行疾病建模和药物筛选。

3D细胞培养的优化性能:

- 细胞几乎无附着,可实现悬浮生长支持许多不同细胞类型生成球状体
- 促进一致的癌症球状体形成,以模拟肿瘤生长的3D结构
- 显示出支持多能干细胞胚体形成的卓越品质,最大限度地减少自发分化
- 支持长期类器官培养的有效性已得到证明



详情请访问 thermofisher.com/sphera

1.2

重大进展

肿瘤建模

3D细胞培养有助于改变实体瘤建模领域的研究。与2D培养相比,这些系统可在其微环境中更逼真地模拟肿瘤的生化 and 细胞组成。具体而言,3D培养可以重现肿瘤在体内生长时的持续过程。这些过程包括血管生成、缺氧、坏死和细胞粘附 (Benien 2014)。

在最近的一项研究中,研究人员使用3D细胞培养模拟了肿瘤在其微环境中的生长,具体方法是将癌细胞系与成纤维细胞系和内皮细胞共培养。在这些实验中,内皮细胞聚集在非小细胞肺癌细胞(细胞系A549或Colo699)簇的周围。这些微组织的组成通过切片和免疫组织化学染色确认。研究人员能够监测肿瘤中缺氧的发展过程,同时也可以测量分泌到培养基中的血管生成因子的浓度。最后,当添加抗血管生成药物时,肿瘤生长和内皮细胞向肿瘤的迁移均受到抑制 (Amann 2017)。

在其他研究中,研究人员利用多细胞3D技术研究了肿瘤核心的缺氧和坏死。他们确定了肿瘤体外生长过程中的3个氧气压力阶段,分别表现为常氧、缺氧和缺氧加坏死。重要的是,缺氧和缺氧加坏死阶段与对5-氟尿嘧啶(一种常用的抗肿瘤药物)的耐药性有关。在标准化条件下使用多细胞3D培养促进了这些发现,这可能在未来用于筛选抗肿瘤药物的候选化合物 (Däster 2017)。

遗传性疾病建模

类器官是干细胞衍生的3D组织构建体,包含器官特异性细胞类型;如果使用的是癌症干细胞,则衍生的结果有时被称为原发性肿瘤球状体或肿瘤类器官。类器官可用于模拟其来源器官并重现疾病状态 (Chen 2018)。下一部分将详细讨论类器官培养,癌症类器官模型将在第7.1部分讨论。

一些疾病与特异性DNA序列变异有关。对于干细胞衍生的模型,可以采用两种方法来生成同基因系。第一种方法是,使用基因编辑,将与疾病相关的突变引入从健康供体中得到的现有细胞系中。或者,也可以通过携带相关序列的患者生成细胞系,并将突变纠正为野生型。随后可以在2D或3D模型背景下,比较与疾病进展相关的分化细胞的野生型和突变体表型。例如,研究人员发现,纠正囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)突变可恢复成体干细胞衍生的肠类器官的cAMP膨胀功能 (Schwank 2013)。

使用CRISPR-Cas9系统进行基因组编辑的出现,极大地促进了3D模型细胞系工程改造的开发。简而言之,CRISPR-Cas9系统由靶特异性向导RNA(gRNA)和非特异性核酸内切酶(Cas9)两部分组成。当gRNA和Cas9被引入细胞时,会形成核糖核蛋白复合物。如果gRNA和靶DNA序列之间存在足够的同源性,复合物将切割DNA。然后,细胞通过两种机制之一修复DNA,这可以产生基因敲除或允许插入新选择的DNA序列 (Horvath 2016)。利用CRISPR-Cas9系统,研究人员编辑了结肠类器官的基因组以模拟腺瘤,结果导致染色体不稳定和非整倍性,这两种情况在人类结直肠癌中都很常见 (Rios 2018)。

新药研发

新药研发过程十分复杂并且涉及多个方面。3D细胞培养正逐渐成为促进这一过程的重要工具,因为它能够更好地预测药物有效性和毒性(Fang 2017)。

从靶标识别到临床前测试,不同类型的3D培养在证明先导化合物的活性和安全性方面均起着重要作用(图1.2)。

精准医学

3D培养,尤其是类器官培养,提供了为每个患者创建个性化治疗的机会。例如,由于癌细胞会发生突变,其在癌症患者之间存在差异。因此,从单个患者体内培养小型肿瘤外植体并测试这些培养物对治疗敏感性的能力已被多项研究用于确定新药。在呼吸医学领域,研究人员从两例囊性纤维化患者身上培养了类器官,以确定患者是否会对药物依伐卡托产生反应;在这两例病例中,类器官培养物均可以预测出患者后期的阳性反应(Takahashi 2019)。癌症研究人员观察到,患者源性胰腺癌肿瘤类器官与原始肿瘤在药物敏感性方面具有类似的相关性(Tiriac 2018)。由于类器官培养物能够从成体组织中生成(只要组织中存在干细胞),该方法对于许多疾病的个性化治疗范例应是一种有前景的方法。

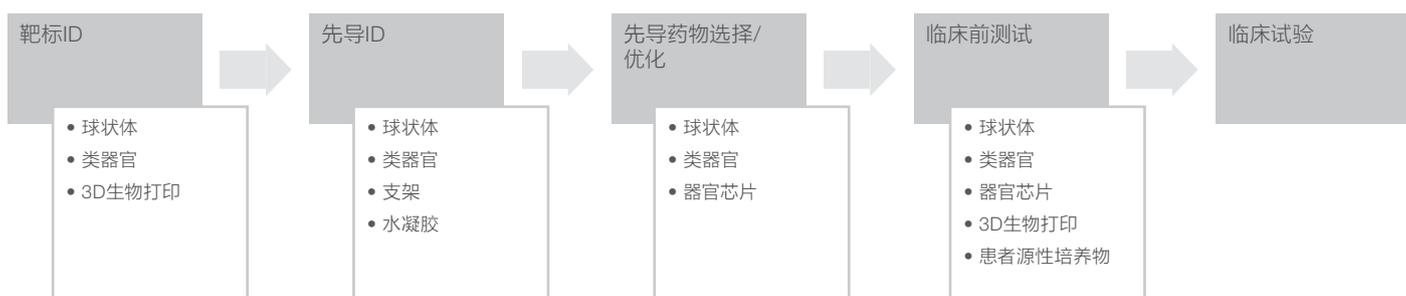


图1.2.新药研发各阶段使用的3D细胞培养类型。

器官芯片和生物打印

器官芯片是一种经过工程改造的微流培养器械，可再现人体器官的微结构和功能，这些器官包括肺、肠、肾、皮肤、骨髓和血脑屏障等。它是微细加工与细胞培养的交叉点。其中一种类型的器官芯片（图1.3）使用涂有光敏材料的聚二甲基硅氧烷（PDMS）晶片创建该器械必需的微流体通道和腔室。用于制造芯片的微细加工技术包括软光刻、光刻和接触印刷。器官芯片用于研究培养基流动和灌注对单细胞或多细胞系统的影响，并为传统的动物实验提供了潜在替代方法。尽管器官芯片已可在微孔板中分析，但它们尚不适用于高通量筛选（Fang 2017）。

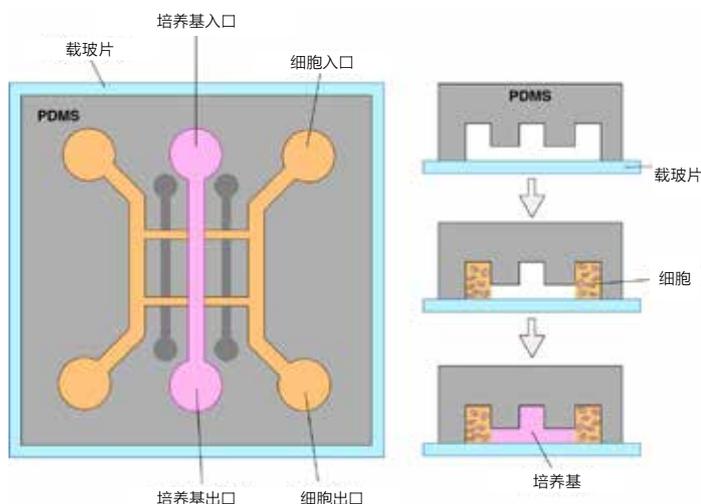


图1.3.器官芯片。用于3D培养的器官芯片的示意图，由试剂可进入的微通道和腔室组成。当有多个器官位于同一芯片上时，器官芯片技术可研究全身性影响。

3D生物打印将打印细胞、支架和支持材料整合到最终的复合体中，其结构、功能和拓扑类似于体内类器官。这种整合通常以分层的方式进行，以将细胞定位在组织或器官形成所必需的特定空间排列中（Fang 2017；图1.4）。生物打印有三种方法：仿生、自主自组装和构造组织构件。诸如骨骼、血管组织、心脏组织和软骨结构等用于移植的功能组织已通过生物打印生成（Zhang 2017）。此外，还能够对生物打印进行改进，使其在未来用于高通量筛选（Fang 2017）。

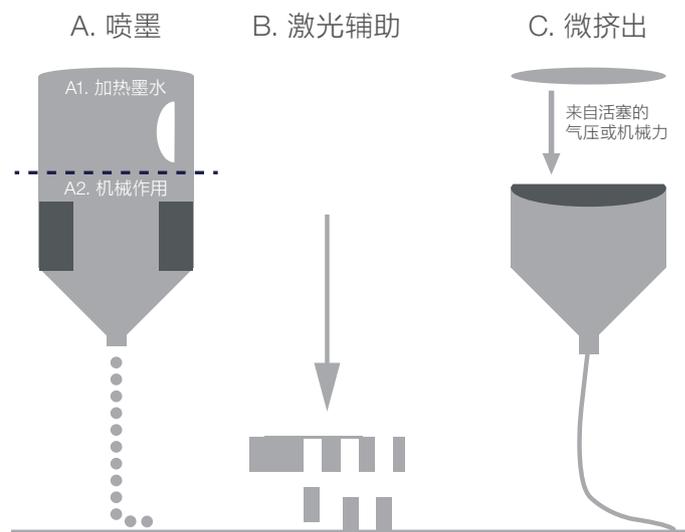
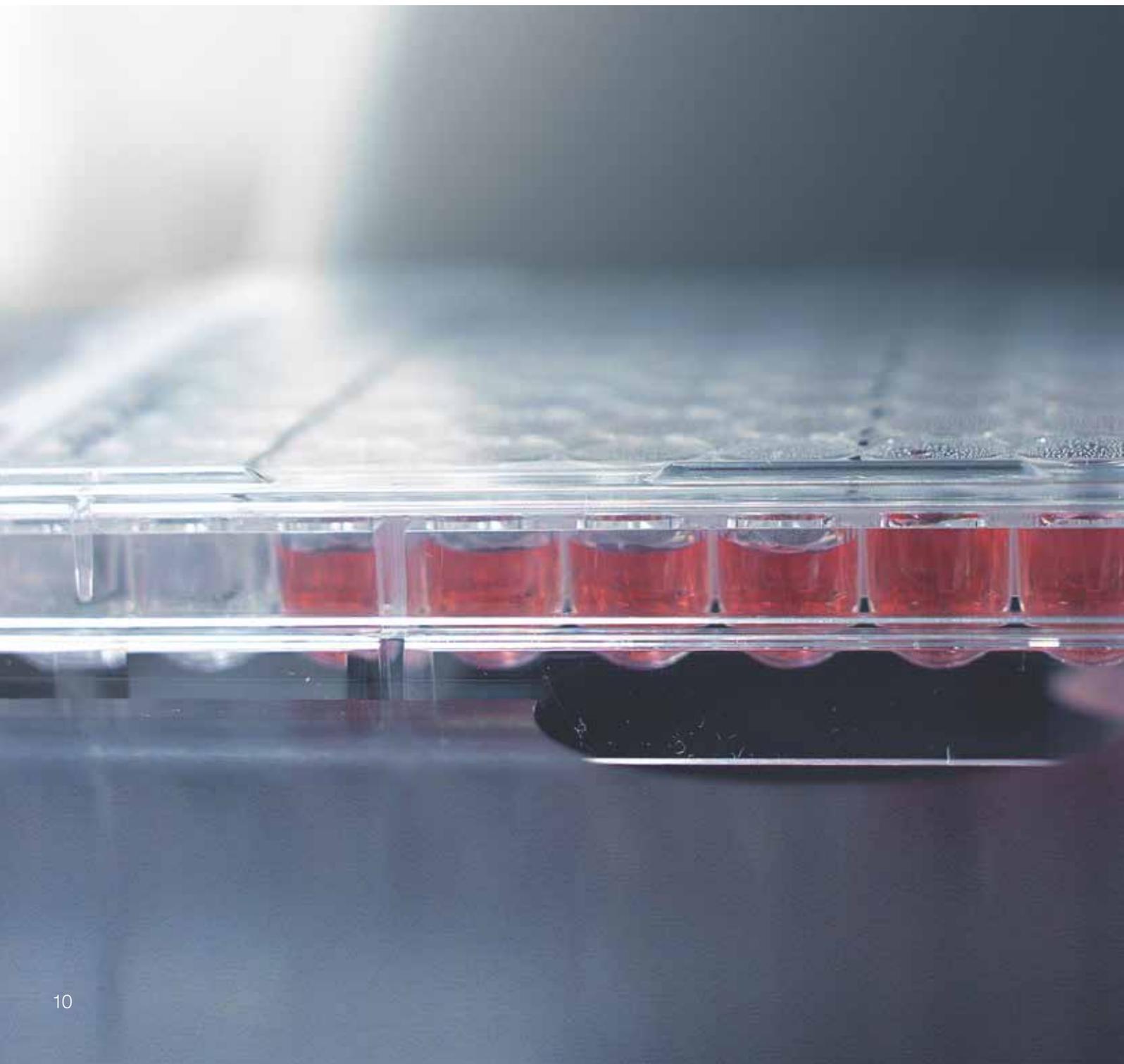


图1.4.创建3D细胞培养物的生物打印。图中显示了用于进行生物打印的一些技术。

第2部分

培养概述



2.1

球状体模型

球状体是由一种或多种细胞类型组成的3D细胞聚集体，其能够生长和增殖，可能表现出增强的生理反应，但不经历分化或自组织。球状体的常见细胞来源是原代组织或永生化细胞系（图2.1）。依赖于细胞在没有粘附底物的情况下会聚集的自然趋势，由于细胞间的接触增加、适当的空间定向以及细胞聚集体内的细胞外基质生产增加，球状体得以更逼真地模拟体内环境。

球状体弥合了单层和复杂器官之间的差距，因此在细胞生物学研究中非常重要。由于球状体培养物中能够掺入一种以上的细胞类型，可以使用这些培养物研究诸如血管生成和血细胞生成等复杂过程。通过改变球状体混合物中造血干细胞的组成，可以重现和研究各种谱系的分化。由此一来，成骨细胞和周细胞在血细胞生成中的重要作用就得到了阐明（Fennema 2013; Ding 2012）。此外，球状体培养物可用于新药研发中的高通量筛选（Fennema 2013）。

球状体培养物的应用范围十分广泛，包括评估药物毒性特征、检查肿瘤核心中的营养和氧梯度以及研究血细胞生成和心脏发育。肝细胞球状体可作为一种筛选候选药物的方法，其通过测量对细胞活性和细胞色素p450 (CYP) 酶活性的影响来筛选可能诱发肝毒性的药物。与传统2D筛选相比，肿瘤球状体能够在更相关且更好地再现肿瘤天然结构的体外系统中测试抗癌药物。在早期的研究中，Sutherland及其同事发现，由于球状体中心中的细胞缺乏营养物，球状体中CHO细胞的生长速率随着球状体直径的增加而降低。一般而言，这些球状体类似于在一些癌症患者中观察到的小瘤（Sutherland 1971）。在最近的一系列研究中，研究人员利用球状体培养物中的心肌细胞和血管细胞研究了体外心脏发育（Yan 2019）。

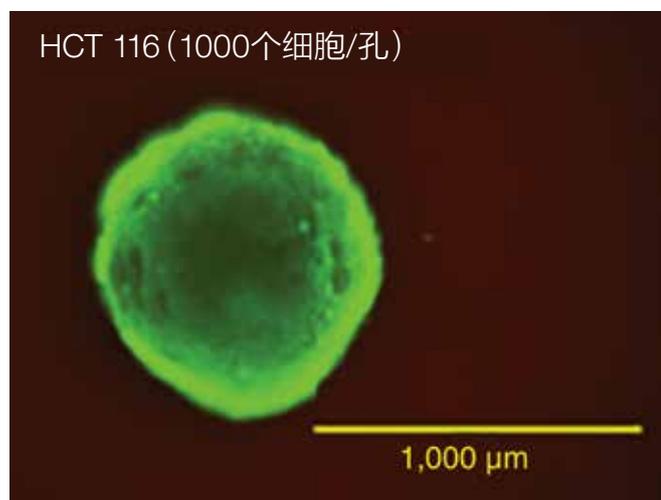


图2.1.培养物中HCT-116结直肠癌细胞组成的球状体的显微照片。

2.2

类器官模型

由肿瘤细胞组成的球状体可代表模型系统，用于研究肿瘤在其微环境中的体外生长。利用球状体培养，可以从球状体的不同区域去除细胞，并研究它们在克隆形成、细胞周期状态和药物反应方面的差异 (Sutherland 1981)。肿瘤球状体在解离时，能够通过流式细胞术进行分析；根据上文的描述，还能够测量氧气和营养梯度的影响 (图2.2)。

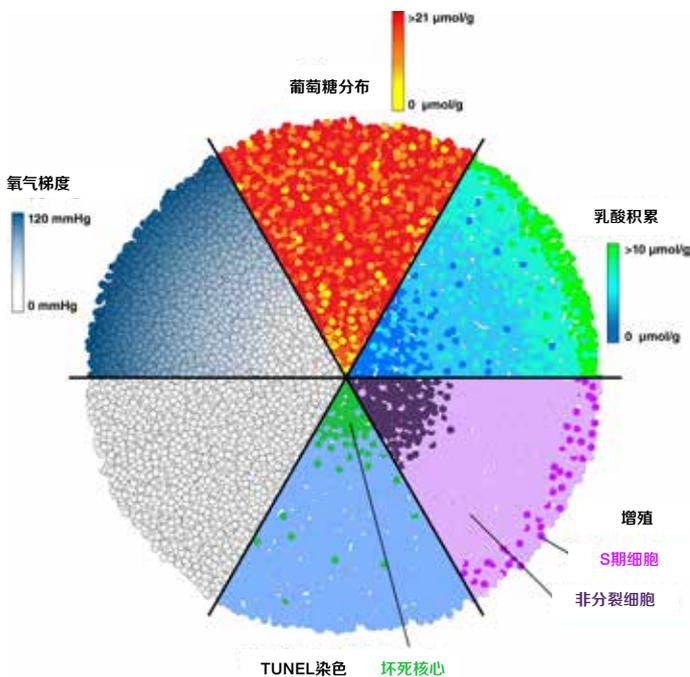


图2.2.球状体肿瘤培养物中的区域。氧气和营养物无法渗透至球状体内坏死的核心，增殖细胞更容易出现在球状体外周而不是内部。

除耐药性之外，还可以研究药物毒性，尤其是与球状体中心渗透的关系 (Sutherland 1981)。例如，研究表明，与2D培养物相比，肿瘤球状体更有可能显示出对抗癌药物的耐药性。在一项研究中，2D和3D HCT-116结直肠癌细胞培养物的敏感性差异为4倍 (Edmondson 2014)。根据上述简要讨论可以得出结论：球状体培养物在促进细胞生理学、癌症和新药研发的研究中具有重要作用。

类器官是由多能干细胞 (PSC)、新生组织干细胞或成体干细胞中的其中一种细胞衍生的3D结构。在形成过程中，细胞自发地自组织成适当分化的功能性细胞类型和祖细胞，它们类似于自身的体内相对物，并至少再现器官的某些功能 (Huch 2015)。类器官比球状体具有更复杂的结构，能够比球状体培养物更逼真地重现目标器官 (Fang 2017)。类器官能够自组装和自组织，复制其来源器官的复杂性，显示代表性的细胞极性，并再现适当的细胞空间结构。类器官可用于研究体外分化、生理表现和复杂的多细胞相互作用。它们促进癌症、神经生物学和其他领域的新药研发的潜力正日益凸显 (Editorial, Nat Cell Biol 2018)。

用于创建类器官培养物的干细胞可以是胚胎干细胞 (ESC) 或诱导多能干细胞 (iPSC)，或衍生自成体组织 (de Souza 2018)。胚胎干细胞衍生自胚泡 (Huch 2015)，而诱导多能干细胞是重编程为胚胎样状态的成体细胞；随后，细胞还可以沿着另一条选择路径重新分化 (Takahashi 2006; 图2.3)。使用诱导多能干细胞可以免去对胚胎的需求，避免了可能引起的伦理问题。研究表明，组织特异性干细胞可能存在于多个器官的上皮区室，包括食道、胃和大肠 (Huch 2015; 图2.3)

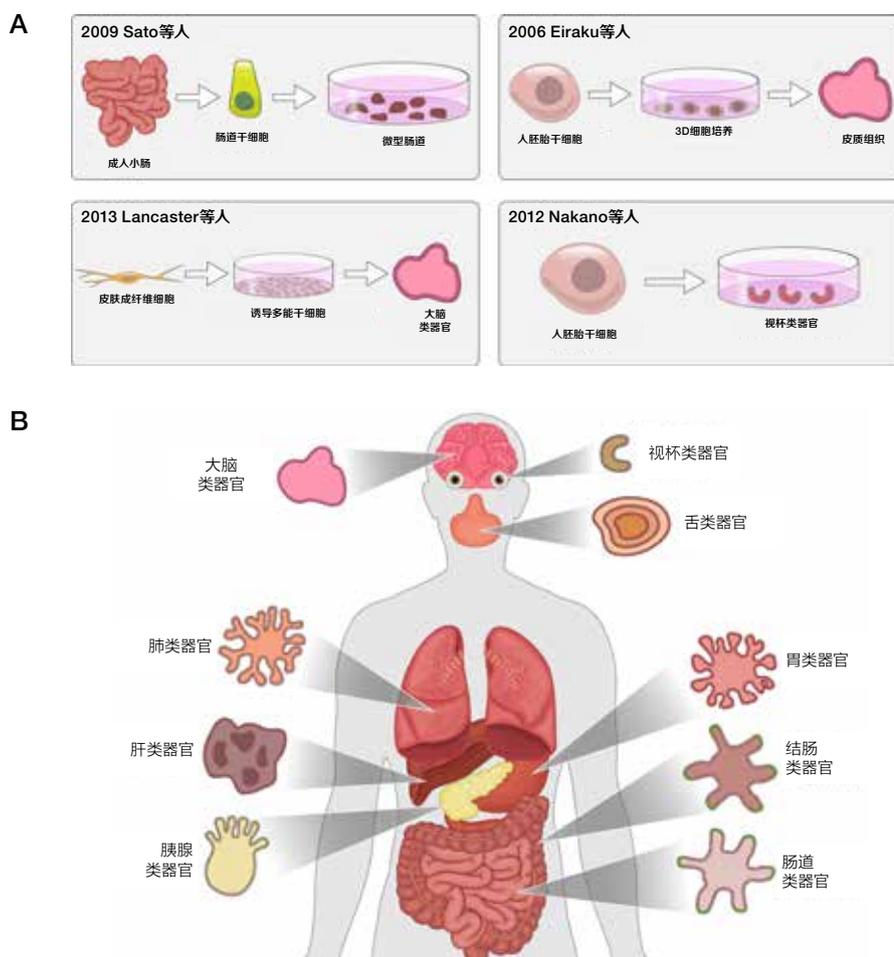


图2.3.胚胎干细胞和诱导多能干细胞与成体干细胞。(A) 衍生自胚胎细胞或体细胞的多能干细胞能够分化为胚层。(B) 成体干细胞由其来源器官预先决定其谱系。

类器官培养在疾病建模和器官发育研究方面具有巨大潜力 (Kaushik 2018)。例如, Dekkers及其同事从小鼠和人体活检标本中创建了肠隐窝类器官。他们通过该方法研究了囊性纤维化(一种由CFTR[囊性纤维化跨膜传导调节因子]基因突变引起的疾病)患者的隐窝结构,并评估了基因产物特异性抑制剂的作用 (Dekkers 2013)。在研究人类心脏发育的过程中, Yan及其同事使用诱导多能干细胞证明,细胞密度和Yes相关蛋白信号对心脏发育至关重要 (Yan 2019)。在另一

个示例中, Song及其同事使用诱导多功能干细胞衍生的类器官研究了体外血管生成、神经发育和图式形成。该小组发现,使用诱导多功能干细胞和成体来源的间充质基质细胞后,血脑屏障基因的表达和皮质神经分化的标志性表达(包括突触活动)增加 (Song, 2019)。研究人员已经注意到诱导多能干细胞后代的早期衰老、与胚胎衍生的多能干细胞相比的表观遗传差异以及诱导多能干细胞的实验室特异性基因特征 (Narsinh 2011)。从这些研究中得出的结论是,应使用最适合所研究问题的多能干细胞或成体干细胞。

2.3

屏障模型

类器官培养已广泛应用于癌症建模和新药研发研究。Sachs及其同事创建了一个生物样本库，其中包含100多个源自患者的原发性和转移性乳腺癌细胞系。在此过程中，他们确定了培养乳腺类器官必需的培养条件，并表明该类器官保留了起源肿瘤的组织学和遗传学特征。这些类器官可代表体外2D细胞系和体内患者源性异种移植(PDX)模型之间的第三种临床前乳腺癌模型(Sachs 2018)。此外，他们还开发了一种利用类器官培养物进行高通量药物筛选和乳腺癌个性化治疗的方法(Sachs 2018)。Vlachogiannis及其同事报告了类似的胃肠道癌治疗方法，他们创建了一个胃肠道类器官生物样本库，目的是对患者源性类器官进行分子谱分析，以评估对抗癌药物的反应。在这些研究中，患者源性类器官对抗癌药物的反应与其来源患者相似；研究人员在预测患者源性类器官在临床中对靶向药物的反应时，观察到其特异性为93%，阳性预测值为88%(Vlachogiannis 2018)。

最后，正如Takai及其同事的报告，可以在凝胶支架中生长的肝癌细胞中培养类器官。培养类器官保留了上皮-间充质的转化能力，这也是细胞转移进展开始的一部分(Takai 2016)。在前列腺生物学中，可以创建同时捕获管腔和基底上皮谱系的类器官，并在健康和癌性条件下对其进行研究(Drost 2016)。这些类器官的应用包括新药研发、肿瘤形成和前列腺稳态(Drost 2016)。

用于生成3D细胞培养物的另一种方法是使用适合于多孔板的插入式细胞培养器，在插入式容器下方有一个用于细胞培养基的小空间(图2.4)。插入式容器(例如，Thermo Scientific™ Nunc™插入式细胞培养器)内衬有半透膜，有助于使培养基位于孔底中3D构建体的下方和容器托架中构建体的上方。使用该方法的3D模型包括皮肤、肾脏和肠道模型(Carlson 2008; Hoppensack 2014; Ootani 2009; Ude 2019)。如果模型可以在整个培养时间内保持全孔覆盖，则插入式细胞培养法可以研究组织的屏障功能。屏障功能可通过测量跨上皮电阻(TEER)来评估，该值指示在药物或化学转运评价之前，细胞屏障的完整性(Srivinasan 2015)。对于通过生物打印方法构造的3D组织来说，该系统深受欢迎，但某些模型可以在没有打印机的情况下实现。

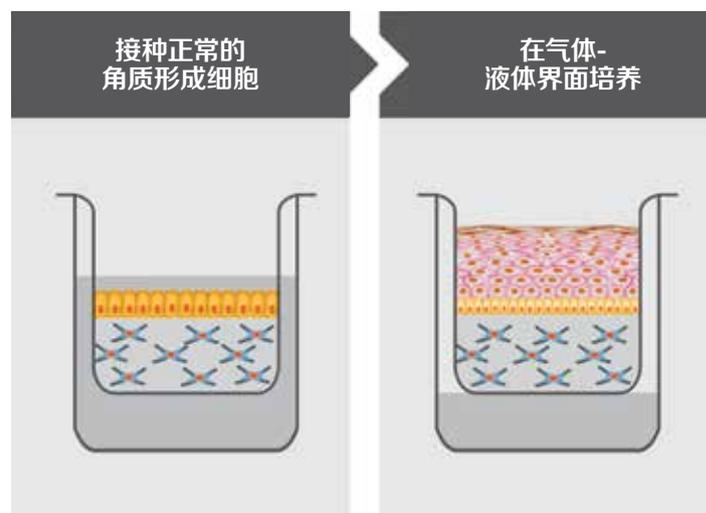


图2.4.使用多孔板中的插入式培养器进行3D皮肤培养。将真皮成纤维细胞嵌入细胞外基质中，然后在其顶部覆盖一层角质形成细胞。将最初的培养物接种并浸没在培养基中，然后在空气-液体界面进行培养以促进角质形成细胞的分化和分层。

第3部分

3D细胞建模中使用的细胞系的来源



3.1

细胞系简介

用于3D培养的细胞可能衍生自多种来源：细胞系、原代细胞和供体来源细胞。一般来说，细胞系获取自细胞储存库。只要满足适当的培养条件（培养基、气体压力），细胞系就能够无限增殖（Ulrich 2001）。常用的肿瘤细胞系很容易从商业或公共渠道获得（Goodspeed 2016；表3.1）。

癌细胞系是相当均质的。然而，由于细胞系可能不再显示原发性肿瘤的异质性，这可能也是一个不利因素。使用足够数量的细胞系可能有助于更准确地重建这种多样性。此外，长期培养可能会影响基因型，进而影响细胞系的表型和功能。建议开始时对培养物进行低次数的传代、扩增并冷冻培养物，并限制实验中的传代次数。最后，期刊可能要求实验室在发表研究之前证明细胞系的器官来源，这是因为HeLa细胞系对许多实验室产生广泛污染（Gillet 2013）。

细胞系已用于生成3D培养物以进行药物筛选。NCI-60细胞库中的细胞系（包括肝、皮肤和内皮细胞系[表3.1]）已被用于创建球状体培养物，以测试各种化合物的抗癌活性（Selby 2017；Goodspeed 2016；Gholami 2013）。在经处理可防止细胞粘附的多孔板中创建培养物。可通过显微镜对细胞进行原位成像，并通过化学发光法对细胞活性进行原位定量（Selby 2017）。最近，美国国立卫生研究院（NIH）与Cancer Research UK、the Wellcome Trust Sanger Institute和the Hubrecht Organoid Technology foundation建立了国际合作关系，致力于协同创建人类癌症模型计划。用于癌症研究的类器官将成为该细胞库的一部分，以帮助评价和开发新的治疗方法（Staudt 2016）。

表3.1. 药物基因组数据库中的代表性癌细胞系。

起源肿瘤	细胞系数量*			
	CCLC	GDSC	CTRP	NCI-60
膀胱	28	18	5	0
乳腺	60	43	1	5
结肠	63	35	37	7
造血和淋巴	181	113	24	6
肝	36	14	4	0
肺	187	141	91	9
卵巢	52	20	26	7
前列腺	8	5	1	2
皮肤	62	45	9	10

* CCLC: 癌细胞系百科全书; GDSC: 抗癌药物敏感性基因组学; CTRP: 癌症治疗反应数据库; NCI-60: 美国国家癌症研究所收集的60个细胞系。

3.2

原代细胞

许多类型的原代细胞已用于3D培养。它们包括肝细胞 (Gomez-Lechon 1998)、前列腺管腔和基底细胞 (Drost 2016)、成纤维细胞 (Sanchez 2019)、内皮细胞 (Sanchez 2019)、成骨细胞和破骨细胞 (Skottke 2019)、乳腺癌细胞 (Wang 2018) 和上皮细胞 (Zhang 2019)。细胞可以从志愿者或患者组织或研究动物中获得。原代细胞的细胞类型的数量和广度受到供体可用性和单个标本中可获得的样本大小的限制。另外, 越罕见的肿瘤类型, 其不同供体能够提供的原代细胞也就越少。尽管可用性和寿命有限, 但原代细胞可能比永生化细胞系具有更大的生物学相关性, 因此已被广泛用于研究 (Hussain 2017; 图3.1)。

虽然已利用癌细胞系得到了对恶性过程的有价值的见解, 但如今也可以通过在培养中使用原代细胞部分克服上述局限性。过去, 原代细胞的培养因存活时间短而受到限制。例如, 在传统的2D培养中, 原代肝细胞仅能存活4-6天。在凝胶基质中培养肝细胞可将培养物的存活期延长至3周 (Hussain 2017; Gomez-Lechon 1998)。然而, 并不是所有研究人员在通过凝胶基质培养人肝细胞时都能获得该结果。

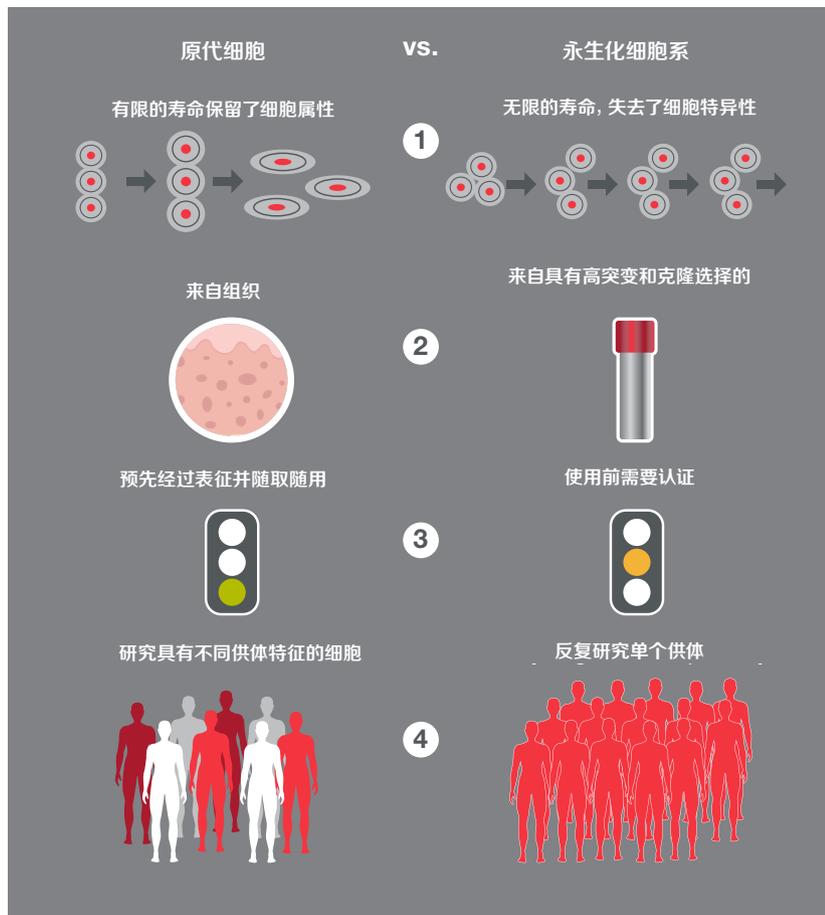


图3.1.原代细胞与永生化细胞系的差异。与永生化细胞系相比, 原代细胞保留了生物学相关性。通过在3D培养条件下培养, 可以克服培养物存活时间短的问题。

以下是我们提供的Thermo Scientific™和Gibco™系列的一些常见产品:

身体部分	细胞类型	培养基	添加剂	塑料制品	基质 (或附着因子)	解离试剂
皮肤 (新生或成体)	<ul style="list-style-type: none"> 表皮角质形成细胞 混合的表皮角质形成细胞 (新生) 	<ul style="list-style-type: none"> EpiLife培养基 M154 角质形成细胞无血清培养基SFM 成分确定的角质形成细胞无血清培养基SFM 	<ul style="list-style-type: none"> HKGS EDGS S7 (成分确定且无动物源性) 	<ul style="list-style-type: none"> Nunclon Delta培养皿和孔板 Nunc胶原蛋白I涂层孔板 Nunc细胞刮刀 	<ul style="list-style-type: none"> 涂层基质 - 在培养人角质形成细胞时与添加剂S7或EDGS结合使用, 以增强附着、促进生长、加快细胞群倍增 	<ul style="list-style-type: none"> TrypLE Select酶 胰蛋白酶 EDTA溶液
	<ul style="list-style-type: none"> 黑色素细胞 	<ul style="list-style-type: none"> M254 	<ul style="list-style-type: none"> HMGS (用于新生HEM) HMGS-2 (用于成体HEM) 		<ul style="list-style-type: none"> 不需要 	
	<ul style="list-style-type: none"> 真皮成纤维细胞 	<ul style="list-style-type: none"> M106 	<ul style="list-style-type: none"> LSGS 			
心脏	<ul style="list-style-type: none"> 主动脉平滑肌细胞 	<ul style="list-style-type: none"> M231 	<ul style="list-style-type: none"> SMGS (用于培养) SMDS (用于增强分化) 	<ul style="list-style-type: none"> Nunclon Delta培养皿和孔板 Nunc胶原蛋白I涂层的孔板 Nunc细胞刮刀 		
	<ul style="list-style-type: none"> 冠状动脉平滑肌细胞 					
骨骼肌	<ul style="list-style-type: none"> 骨骼肌成肌细胞 	<ul style="list-style-type: none"> DMEM 	<ul style="list-style-type: none"> 2%马血清 			
脐带	<ul style="list-style-type: none"> 脐静脉内皮细胞 	<ul style="list-style-type: none"> M200 	<ul style="list-style-type: none"> LVES 	<ul style="list-style-type: none"> Nunc细胞刮刀 	<ul style="list-style-type: none"> 玻连蛋白 rhLaminin 附着因子 	
	<ul style="list-style-type: none"> 混合的脐静脉内皮细胞 	<ul style="list-style-type: none"> M200PRF 				
乳腺	<ul style="list-style-type: none"> 乳腺上皮细胞 	<ul style="list-style-type: none"> M171 HuMEC Ready培养基 	<ul style="list-style-type: none"> MEGS HuMEC添加剂试剂盒 	<ul style="list-style-type: none"> Nunclon Delta培养皿和孔板 Nunc细胞刮刀 	<ul style="list-style-type: none"> 涂层基质试剂盒 	
肝*	<ul style="list-style-type: none"> 混合的冷冻肝细胞 	<ul style="list-style-type: none"> 肝细胞解冻培养基 CHRM CHPM Williams'E培养基 	<ul style="list-style-type: none"> HepExtend添加剂 肝细胞铺板添加剂 肝细胞维持添加剂 	<ul style="list-style-type: none"> Gibco胶原蛋白I涂层孔板 Nunc细胞刮刀 	<ul style="list-style-type: none"> Geltrex基质 胶原蛋白I蛋白 	
	<ul style="list-style-type: none"> 悬浮肝细胞 	<ul style="list-style-type: none"> 肝细胞解冻培养基 CHRM Williams'E培养基 	<ul style="list-style-type: none"> 肝细胞维持添加剂 			
	<ul style="list-style-type: none"> 可铺板肝细胞 	<ul style="list-style-type: none"> 肝细胞解冻培养基 CHRM Williams'E培养基 	<ul style="list-style-type: none"> HepExtend添加剂 肝细胞铺板添加剂 肝细胞维持添加剂 		<ul style="list-style-type: none"> Geltrex基质 胶原蛋白I蛋白 	
	<ul style="list-style-type: none"> Kuffer 细胞 	<ul style="list-style-type: none"> Advanced DMEM RPMI 1640培养基 	<ul style="list-style-type: none"> 肝细胞维持添加剂 (排除地塞米松) 胎牛血清 (FBS) 		<ul style="list-style-type: none"> 胶原蛋白I (无覆盖) 	

* 如果您想询问此处未列出的肝脏产品, 或者想了解定制项目, 请发送邮件至 hepaticproducts@thermofisher.com

详情请访问 thermofisher.com/primarycells

3.3

胚胎和诱导多能干细胞

我们在上一节中已经提到，原代细胞是直接从未分化组织中分离出来的，因此，其可能比永生化细胞系更能代表体内环境 (Hussain 2017)。然而，原代细胞的可用性和寿命有限，并且会终末分化。相比之下，多能干细胞 (PSC) 可分化为体内任何细胞类型，并具有无限的自我更新能力 (Centeno 2018)。因此，干细胞可提供比原代细胞更好的模型来进行长期过程研究，例如涉及进展、退化或发育的过程。

多能干细胞已被广泛用作2D细胞培养的体外模型。2D培养时，细胞为单层生长，因此不会像在复杂的3D组织或器官中那样与其他细胞或环境相互作用。为突破这些局限性，开发了3D培养细胞的方法 (Centeno 2018)。由于多能干细胞衍生的3D结构 (例如类器官) 与体内环境更加相似，它们在研究开发以及疾病建模和其他应用中具有优势 (McCauley 2017; Rossi 2018)。类器官可衍生自悬浮培养的多能干细胞并自聚集成类胚体。这些聚集体中的细胞随后可以分化为不同的细胞类型，并经历自组织和形态发生，以创建与2D系统相比更具生理相关性的模型。迄今为止，已经为多种器官生成了类器官，包括但不限于肾、肝、肺、大脑和肠道 (Dutta 2017; Lancaster 2013; McCracken 2014)。

可以使用两种类型的多能干细胞 (胚胎干细胞[ESC]和诱导多能干细胞[iPSC]) 创建类器官，对胚胎干细胞和诱导多能干细胞的研究有助于理解疾病和基础细胞生物学。胚胎干细胞衍生自胚胎，而诱导多能干细胞衍生自被重编程为

胚胎干细胞样状态的体细胞。诱导多能干细胞的优点之一是不受关于使用胚胎干细胞的当地立法或伦理问题的约束 (Centeno 2018)。而且，生成诱导多能干细胞的能力使研究人员更容易获得胚胎样干细胞。此外，诱导多能干细胞可直接从个体获得，因此保留了个体的基因信息。该基因背景对于单基因疾病的研究至关重要，并可能改善个体化医学的治疗和诊断 (Centeno 2018; Dutta 2017)。

可以通过多种方法重编程体细胞以生成诱导多能干细胞，包括单盒载体 (Cre-Lox)、mRNA或miRNA转染、游离型质粒或非整合病毒载体 (Malik 2013)。例如，成熟的免疫细胞和造血干细胞已被重编程为诱导多能干细胞。这些诱导多能干细胞可以重新分化，随后用于疾病建模和未来可能的临床应用 (Jiang 2014; 图3.2)。使用游离载体和非整合病毒的系统分别为Invitrogen™ Epi5™ Episomal iPSC重编程试剂盒和Invitrogen™ CytoTune™ -iPS 2.0仙台病毒重编程试剂盒。尤其是在病毒微粒无法使用时，Epi5重编程载体对易于重编程的亲本细胞非常有效。CytoTune-iPS 2.0仙台病毒重编程试剂盒在非整合技术中具有最高的成功率，可用于成纤维细胞和血液细胞的重编程。该试剂盒的工作流程也可以通过使用无饲养层培养基进行简化，例如Gibco™ StemFlex™培养基。

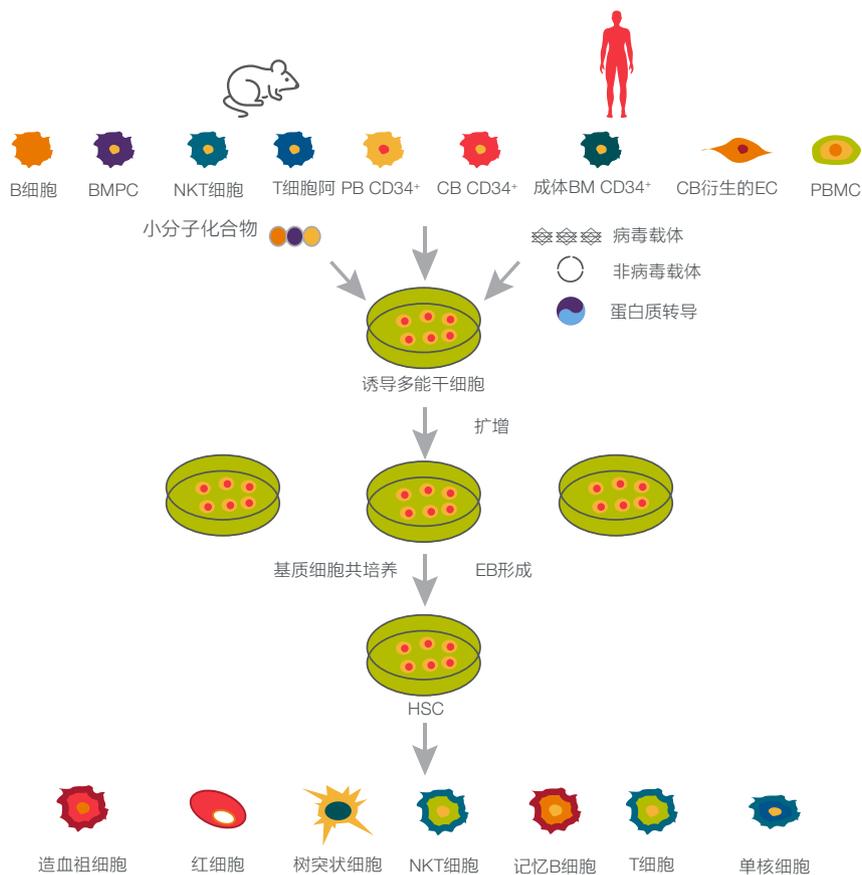


图3.2.重编程造血细胞。可以使用多种技术将造血细胞和成熟免疫细胞重编程为诱导多能干细胞。随后，诱导多能干细胞再根据需要重新分化。BM：骨髓；BMPC：骨髓祖细胞；CB：脐带血；EC：内皮细胞；iPSC：诱导多能干细胞；NKT：自然杀伤T；PB：外周血；PBMC：外周血单核细胞。

使用诱导多能干细胞的2D和3D模型可以应用于不同的研究领域。借助新的基因编辑工具，诱导多能干细胞可以用来生成（1）敲除（用以研究基因对细胞过程的影响）、（2）敲入（用以评估逆转点突变对疾病状态的影响）和（3）报告细胞系。CRISPR-Cas9系统提供简单有效的基因座特异性编辑，使研究人员能够使用诱导多能干细胞创建疾病模型系统（Ben Jehuda 2018）。这项技术被用于创建具有常染色体缺陷的诱导多能干细胞克隆体，而这些常染色体缺陷会导致罕见的常染色体疾病，包括免疫缺陷、着丝粒不稳定和面部异常综合征（ICF）（Horii 2013）。在另一个示例中，使用CRISPR-Cas9 纠正了杜氏肌营养不良症患者的细胞中的移

码突变，恢复了部分抗肌萎缩蛋白的功能，从而将疾病转变为较温和的形式，即贝克氏肌营养不良症（Young 2016）。实现高效的基因组编辑时，诸如Invitrogen™ TrueCut™ Cas9 v2核酸酶与TrueCut™ gRNA等CRISPR-Cas9工具的最佳递送是一个关键因素，这可以使用StemFlex培养基在无饲养层条件下完成。该培养基的设计不仅在重编程方面，而且在基因编辑等其他应用中也具有优异的递送性能。在基因编辑中，与其他培养基相比，StemFlex培养基在单细胞分选后可实现更快的恢复、更持久的多能性和更稳健的克隆扩增（Chen 2018）。

基因编辑不仅在使用多能干细胞的2D系统中使疾病建模取得了重大进展,而且这项技术也已成功地应用于多能干细胞衍生的类器官。利用大脑类器官,CRISPR介导的基因编辑有助于神经发育和神经系统疾病的研究(Kelava 2016)。在另一个示例中,对先天性角化不良(DC)的研究中包含了衍生自诱导多能干细胞同基因对的肠道类器官。如果诱导多能干细胞衍生自健康个体,则引入致病的DKC1突变;如果诱导多能干细胞衍生自感染个体,则将其恢复为野生型。每对中的另一细胞系均未引入基因组变化。观察比较缺陷型和野生型类器官的成熟度,结果与DC的临床数据一致(Driehuis 2016)。同样,存在导致多囊肾病(PKD)的基因突变的类器官表现出与野生型类器官不同的表型,并且在患者中的描述相似(Driehuis 2016)。

在利用多能干细胞的整个过程中,需要对细胞进行特性研究,以确保多能性、登记细胞系或在获得多个细胞系时比较结果。多能干细胞可以使用多种方法来进行特性研究。可以使用试剂(例如Invitrogen™碱性磷酸酶活性染料)测定碱性磷酸酶活性。该酶的表达与多能性相关(Marti 2013)。多能干细胞关键标记物的表达可以使用Invitrogen™多能干细胞4标记物免疫细胞化学试剂盒,通过免疫细胞化学法进行评估。这些关键标记物包括Oct4、SSEA4、Tra-1-60和Sox2(Marti 2013)。具有通用基因表达数据的PluriTest™分析工具也能够验证多能性。用于检测染色体异常的核型分析是一种常用方法,Applied Biosystems™ KaryoStat™检测试剂盒为这种分析提供了一种准确且可重现的简单程序。最后,通过微阵列或全基因组测序进行基因表达分析,可进一步对多能干细胞进行特性研究。

随着2D和3D技术的不断进步并转化到临床研究,药物筛选、疾病建模和潜在治疗应用将需要大量的多能干细胞来源,尤其是诱导多能干细胞(Kropp 2017)。例如,一个成体器官所需的工程改造细胞数量超过10⁹个,因此多能干细胞的大规模生产对于研究再生器官必不可少(Mesquita 2019)。将3D培养方法与生物反应器结合(Kropp 2017)或在层粘连蛋白基质上培养(Mesquita 2019),可以实现多能干细胞的扩增。

StemFlex培养基

Gibco™ StemFlex™培养基支持无饲养层多能干细胞(PSC)的稳健扩增,其配方可为当今更具挑战性的应用如重编程、单细胞传代和基因编辑带来优异的结果。StemFlex培养基具有出色的灵活性,能够选择最佳的饲养时间(可隔日换液),同时还能够搭配多种基质和传代试剂。

详情请访问 thermofisher.com/stemflex



3.4

成体干细胞

成体干细胞并非多能干细胞；相反，它们是多潜能干细胞，由其来源决定其谱系。有研究认为，具有高增殖率的组织（例如肠上皮）可能比静止组织包含更多数量的成体干细胞（Mummery 2011）。成体干细胞可以衍生出许多类型的类器官（Rossi 2018；表3.2和图2.3B）。

表3.2.成体干细胞产生的类器官

组织或器官	物种来源
胃体和幽门窦	小鼠
小肠	小鼠
结肠	人、小鼠
肝	人、小鼠
气管和/或支气管	人、小鼠
肺泡	人、小鼠
前列腺	人、小鼠
输卵管	人
乳腺	人、小鼠
唾液腺	人、小鼠
骨骼	人

改编自：Rossi 2018；Baptista 2018.

值得注意的是，成体干细胞倾向于仅生成器官的上皮区室，而衍生自多能干细胞的类器官能够分化为所有器官特异性细胞类型。然而，多能干细胞倾向于保留胎儿基因型或表型，而成体干细胞衍生模型会形成分化的细胞（Huch 2015）。

间充质基质细胞（MSC）是存在于许多组织中的成体干细胞。众所周知，它们具有分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞的能力。在球状体培养物中培养间充质基质细胞，它们会分化为多种类型的细胞，并且衰老延迟（Cesarz 2016）。同样，球形聚集体增强了血管生成、炎症和其他因素的旁分泌（Malik 2013）。

重建适当的环境以使成体干细胞分化为所需终末类器官是近年来的研究焦点。细胞外基质（ECM）的组成、培养基中的生长因子和添加剂、细胞饲养层的存在等参数均会影响最终结果。例如，在心脏研究中，已证明从脱细胞心脏组织（decellularized cardiac tissue）中衍生的细胞外基质优于单组分细胞外基质。随着该领域向临床应用转移，无血清技术的发展成为了另一项取得进展的技术。无血清培养旨在减少潜在有害物质（如潜伏性病毒）的传播（Bardelli 2017）。

最近，Baptista及其同事描述了3D培养技术在成体干细胞中的使用的有趣案例。他们使用3D打印支架（由类似陶瓷的材料制成），将成体干细胞作为球状体培养物接种，并培养骨骼。这一研究值得关注，由于骨骼的结晶和有机性质，要求骨骼必须有足够的强度来承受重量。在本例中，在培养物中使用生物陶瓷复合物作为附加材料，显示了开发骨移植替代品的的前景（Baptista 2018）。

3.5

患者来源细胞

从原代组织（正常组织和患病组织）获得的患者源性细胞可用于创建类器官，并在癌症研究中有突出应用，例如研究对治疗的抗性（Chonghalle 2018）。类器官衍生自多种肿瘤，包括乳腺癌、肝癌、膀胱癌、成胶质细胞瘤和胰腺癌（Nagle 2018）。通过利用基底膜衍生的基质从患者标本中创建类器官，研究人员建立了一个包含近100个胰腺癌类器官的库。由于该癌症类型非常难以治疗，涵盖癌症亚型和各阶段的类器官库的建立预期有助于新药研发（Tiriach 2018）。在前列腺癌研究中，肿瘤标本3D培养物衍生的类器官可与高通量筛选技术一起使用，还可用于小鼠肿瘤模型的异种移植（Namekawa 2019）。通过切除和活检穿刺从成胶质细胞瘤中创建患者来源细胞用于球状体培养。随后，筛选这些球状体对各种抗癌药物的反应或耐药性。通过这种方式，确定了几种可用于治疗成胶质细胞瘤的非标准药物（Yu 2018）。

第4部分

基质



4.1

简介

选择合适的培养基质是开发成功的类器官和球状体培养系统重要的第一步。类器官和球状体细胞培养模型能够使用天然衍生或合成的、依赖于基质或不依赖于基质的系统 (Rossi 2018)。使用依赖于基质的系统能够更容易地从2D单层环境过渡到3D模型。使用不依赖于基质的系统可扩大和扩充器官发育。对于类器官开发, 基质应增强细胞自组装 (Xie 2017)。

基质材料包括水凝胶和肽水凝胶 (Jongpaiboonkit 2009; Tibbit 2009; Worthington 2015)、多糖 (Diekjürgen 2017)、胶原蛋白、层粘连蛋白、海藻酸盐和更多市售产品。这些材料将在下面的小节中详细讨论。

4.2

细胞外基质

细胞外基质 (ECM) 在研究中的应用越来越多, 原因是它们形成的微环境与体内环境十分相似, 足以实现适当的细胞行为 (例如生长和信号传导) (Godugu 2018)。依赖于基质的系统有两种: 天然/有机 (动物或植物源性) 细胞外基质和合成细胞外基质。

天然源性细胞外基质包括Gibco™ Geltrex™基质, 一种从小鼠Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 肿瘤中纯化的基底膜提取物 (BME); 藻类来源的Gibco™ Alginate™ 3D培养系统; 衍生自动物组织和其他副产物的胶原蛋白; 衍生自小鼠肿瘤细胞或人体细胞的层粘连蛋白。合成细胞外基质包括肽-丙烯酸酯表面、聚[2-(甲基丙烯酰氧基)乙基二甲基-(3-磺丙基)氢氧化铵] (PMEDSAH)、氨基丙基甲基丙烯酰胺的水凝胶界面和聚乙烯醇基水凝胶 (Hayashi 2016)。另一种合成水凝胶为聚乙二醇 (PEG)。聚乙二醇几乎不吸收蛋白质, 因此科学家经常使用它来研究配体向细胞的呈递。此外, 可通过添加各种功能基团修饰聚乙二醇 (Calari 2016)。肽水凝胶可以是天然来源的也可以是合成的 (Worthington 2015)。使用这些试剂的参考文献见表4.1。

Geltrex基底膜基质

Geltrex基质是从小鼠EHS肿瘤中纯化的一种可溶性基底膜。该基质使多种生长因子平均减少了2倍, 同时其蛋白浓度更高, 批次间稳定性更高, 从而为3D模型创建提供了更加可控和可重现的形式。

详情请访问 thermofisher.com/geltrex



表4.1.细胞外基质试剂方案

基质	优势或用途	方案	参考文献
AlgiMatrix (海藻酸盐海绵)	细胞与天然基质中正常的形态和行为非常相近	从AlgiMatrix板中原位获取球状体 从AlgiMatrix试剂中分离出活球状体 抗癌药物筛选	方案可参见 thermofisher.com/algimatrix
层粘连蛋白	更逼真地模仿天然基底膜的特性	角膜上皮的分化	Thermo Fisher Scientific的基质资源手册
胶原蛋白	用于研究细胞迁移	通用方案	Doyle 2016
纤连蛋白	用于研究细胞与基质的相互作用	通用方案	Franco-Barraza 2016
Geltrex	用于研究细胞侵袭和分化	3D培养物降解	Goertzen 2018
		β 细胞分化	Sui 2018
		体外血管生成	内皮细胞血管形成试验 (thermofisher.com/manuals)*
Hydrogel	用于确认促进细胞活性的条件	通用方案	Jongpaiboonkit 2009

* 该方案与Gibco™人脐静脉内皮细胞 (货号C0035C) 一起使用。使用货号检索我们的手册页面, 以查看该方案。

天然衍生的基底膜提取物是目前应用最广泛的3D模型培养和增殖细胞外基质。虽然这些细胞外基质有许多优点, 包括保护生物结构、促进正常生物功能和维持整合蛋白结合位点 (Dhaliwal 2012; Diekjurgen 2017), 但它们也面临自身独特的挑战。由于这些材料是从小鼠EHS肿瘤中提取纯化而来的, 这些细胞外基质中存在固有的批间差异性, 使用前可能需要进行批次测试或预实验。与Geltrex基质产品类似, 在基底膜提取物的生产过程中实施额外的纯化步骤, 有助于减少批间差异性, 但无法完全消除该问题。除了批间差异性外, 基底膜提取物的确切成分仍是未知的, 它们包含多种未确定的细胞外基质蛋白质和生长因子。虽然这些细胞外基质蛋白质和生长因子可能在促进3D模型的生长中起着关键作用, 但未确定的或可变的细胞外基质的使用可能会使得进入临床应用面临挑战。

由于天然衍生的细胞外基质的固有可变性, 一些科学家已经开始探索化学成分更为确定的或合成的细胞外基质版本。合成细胞外基质可确保基质不含外源性生长因子, 可根据所需孔隙度和刚度进行定制, 并且在实验中具有更高的重现性 (Hayashi 2016; Dhaliwal 2012)。然而, 一些合成细胞外基质的生物相容性较差, 在细胞培养过程中有可能释放出有毒副产物。

4.3

不依赖于基质的系统

不依赖于基质的系统不含用户提供的细胞外基质。相反，这些系统为细胞创建自己的细胞外基质提供了条件 (Diekjurgen 2017)。因此，与依赖于基质的系统相比，不依赖于基质的系统具有以下优势：消除了动物源性细胞外基质中不利的生物影响，并且合成和制造过程不会过于繁琐 (Turker 2018; Knight 2015)。此外，不依赖于基质的系统可以从较低成本的试剂中获益。

不依赖于基质的系统其类型包括低细胞附着孔板 (例如, Gibco™ Nunclon™ Sphera™孔板)、悬滴培养、转瓶、旋转培养系统和工程改造组织构建体。使用这些系统的参考文献见表4.2。

表4.2. 不依赖于基质的系统的参考文献

系统	用途	参考文献
Nunclon Sphera孔板	球状体培养	<ul style="list-style-type: none"> • Guzman 2017 • Stadler 2017 • Takagi 2016 • Sin 2017 • Chittajallu 2015
悬滴培养	肿瘤球状体生成	Raghavan 2016
转瓶	诱导多能干细胞在微载体上的扩增	Gupta 2016
经工程改造的组织	多层3D心脏组织	Shimizu 2002; Shimomura 2018

诸如悬滴培养这类较简单的系统，其优点是成本较低且易于使用，而其缺点则包括所产生的球状体大小存在可变性 (如果使用平底低附着孔板) (Breslin 2013)。在基于搅拌的方法 (如旋转器和转瓶培养) 中，很容易创建大规模培养物，但需要可能很昂贵的专用设备 (Breslin 2013)。

将基质与不依赖于基质的系统相结合产生的协同作用可促进细胞的生长和分化 (Ovsiankov 2018)。使用复合系统观察到了增强的细胞自组装，在这一过程中，基质会保护球状体免受机械损伤 (Ovsianikov 2018)。此外，基质增加了细胞培养孔内的细胞密度，同时可能为形态发生，以及极化、分化和组织化的物理提示提供支持。通过使用特异性细胞外基质促进所需分化，可以说明基质和不依赖于基质的复合系统的协同作用。例如，在转移至Nunclon Sphera孔板之前，使用Geltrex基质包被类胚体会增强多能干细胞的神经分化。

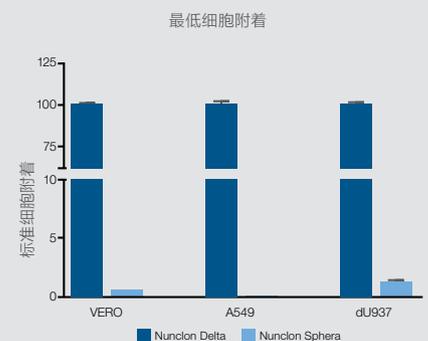
我们提供一系列用于依赖于基质的系统和不依赖于基质的系统的产品。为了帮助您做出适当选择，表4.3列出了与特定细胞类型相容的产品。

Nunclon Sphera 3D培养系统

Nunclon Sphera系统设计用于球状体培养 (例如，3D肿瘤球状体) 和类器官培养 (例如，大脑类器官)，为您提供从孔板到培养皿和烧瓶等多种形式的选择。3D细胞培养表面几乎不允许细胞附着到培养皿上，从而支持通过天然分泌的细胞外基质经细胞间聚集来建立3D球状体和类器官。

Nunclon Sphera培养皿的专利表面涂层可防止任何蛋白质在表面吸附，从而尽可能减少单层细胞与培养皿的粘附。

详情请访问 thermofisher.com/sphera



创建3D细胞模型的另一种选择是使用Thermo Scientific™ Nunc™培养皿（经UpCell™表面处理）来培养您的细胞。UpCell表面涂覆有特殊涂层，其不通过酶促方法解离细胞，而是依赖于温度的降低。借助UpCell表面，您可以创建融合细胞层，利用细胞中天然生成的细胞外基质创建不同细胞类型的层，从而增加模型的复杂性。

UpCell表面使收集的细胞层能够堆叠，形成3D组织模型。细胞层的堆叠，也被称为细胞层工程改造，由Okano及其同事首创（Yamada 1990; Yang 2005和2007）。收集的细胞层所保留的亚细胞基质提供了堆叠所需的粘合剂。在移植模型中，它作为一种天然的粘合剂将细胞层粘合到下层的受体细胞层或受体部位，而不需要使用纤维蛋白胶或缝线。

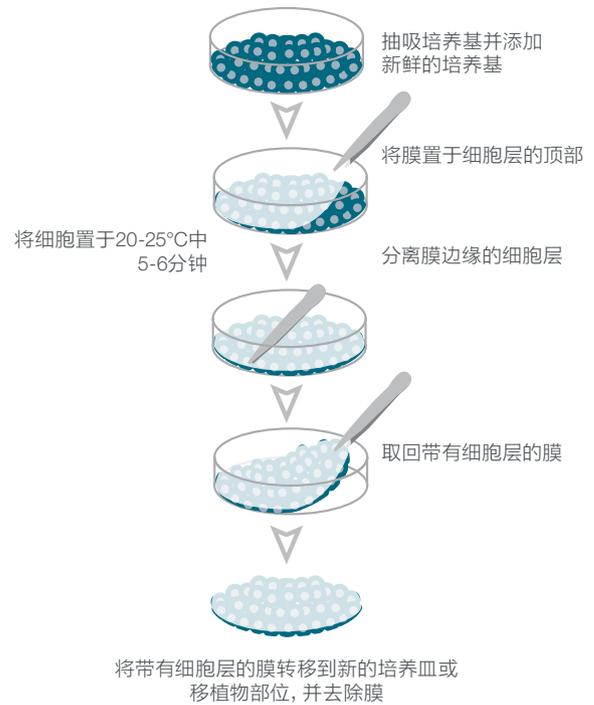


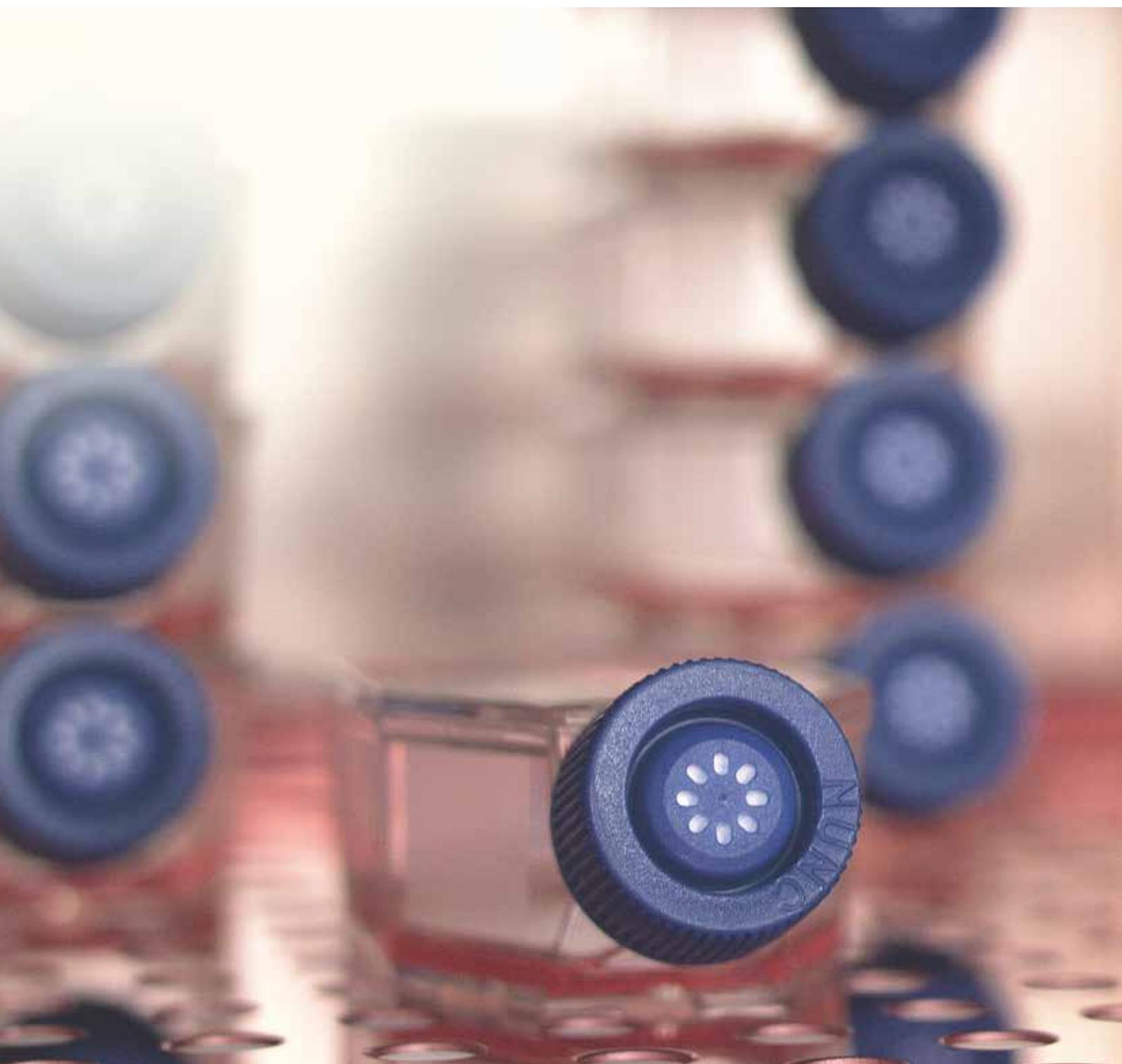
表4.3.Thermo Scientific™细胞培养塑料耗材表面选择指南

选择您的Thermo Scientific表面		Thermo Scientific表面处理						未经处理的表面
细胞类型		Nunclon Delta	Nunclon Vita	胶原蛋白I	多聚-D-赖氨酸	Nunclon Sphera	Nunc UpCell	
肝细胞		•	•	•		•	•	
内皮细胞		•		•		•	•	
神经元细胞	神经元	•			•		•	
	神经球					•		
上皮细胞		•	•	•		•	•	
肿瘤细胞		•	•	•	•	•	•	
血液细胞	巨噬细胞、树突状细胞、中性粒细胞	•				•	•	
	淋巴细胞	•						•
	血小板	•		•			•	
干细胞	MSC	•	•	•		•	•	
	HSC	•			•	•		
	ESC和EB	• [†]	• [§]			•		

[†]需要细胞外基质 (ECM) 涂层。 [§]需要来自饲养层细胞和ROCK抑制剂的条件培养基。

第5部分

培养基和添加剂



5.1

简介

细胞培养始于1882年由Sidney Ringer设计的平衡盐溶液，其用于在解剖后保持青蛙心脏跳动(Yao 2017)。不久，又出现了其他几种平衡盐溶液，包括Earle和Hank的平衡盐溶液(Yao 2017)。1907年，Harrison观察到神经细胞在主要是淋巴液的培养基中表现出生长(Yao 2017; Simian 2017)。Harrison使用了一种后来被称为悬滴培养技术的3D培养方法(Rodriguez Hernandez 2014; Simian 2017)。1909年，Harrison实验室的进一步研究表明，哺乳动物细胞需要血浆来代替淋巴液才能生长(Yao 2017)，该研究同样使用了悬滴法(Rodriguez Hernandez 2014)。到1911年，Margaret和Warren Lewis表明，由平衡盐、氨基酸、肉汤和葡萄糖组成的溶液比单独的平衡盐溶液更适合雏鸡胚胎培养(Yao 2017)。这一观察结果代表了创建用于细胞培养的细胞培养基迈入一个新的阶段。

在20世纪40年代和50年代，Earle及其后的Gey建立了永生化细胞系(Lucey 2009)。Earle在用致癌物处理原发性成纤维细胞后建立了成纤维细胞系。Gey对培养基和培养条件进行了实验，以确定最有助于宫颈癌细胞生长的因素(事实证明，转瓶和几乎任何培养基均可)(Yao 2017; Lucey 2009)。

随着永生化细胞系和一些基础培养基的建立，其他研究人员很快证明，细胞在培养基中需要丙酮酸和20种氨基酸中的13种，并且还需要维生素(Yao 2017)。研究人员还表明，基础培养基可根据细胞类型进行调整，如淋巴细胞、成纤维细胞和肝上皮细胞(Yao 2017)。

无论是2D培养还是3D培养，基础培养基和添加剂都用于为培养中的细胞提供营养、生长因子、维生素、微量元素和pH值缓冲(Rodriguez Hernandez 2014)。最好的做法是选择最适合细胞生长的培养基。例如，许多人在淋巴细胞的短期和长期培养中使用RPMI 1640，而许多肿瘤细胞则通常在DMEM或DMEM/F-12中生长。

5.2

培养基

3D细胞培养所用的基本培养基与2D细胞培养中所用的相同。如前一小节所述, 细胞培养基一部分是使用3D培养技术开发的, 因此两种培养类型使用相同的培养基也在意料之内。表5.1列出了几种类型的3D培养以及每种培养所建议的培养基。

培养基可分为天然培养基和合成培养基, 前者主要是生物液体, 后者是常用的基础培养基 (Yao 2017)。合成培养基可以

添加血清或血浆, 也可以完全无血清。合成培养基可以完全不含非人源性成分 (无异源), 也可以是化学成分完全确定的培养基 (Yao 2017)。专用或定制培养基可从商业渠道获得。来自细胞培养基供应商的客户服务可以帮助用户确定特定应用中最适合使用的培养基。

表5.1.用于3D细胞培养的培养基示例。

细胞类型	培养基	参考文献
大脑, PSC	DMEM/F-12、Neurobasal培养基	Lancaster 2013
	DMEM/F-12、Neurobasal培养基	Pasca 2015
	DMEM/F-12、Neurobasal培养基	Iefremova 2017
	DMEM/F-12、Neurobasal培养基、Essential 6培养基	Zhou 2017
	Neurobasal培养基	Muotri 2018
	Neurobasal培养基	Smits 2019
	Neurobasal培养基	Kim 2019
肠道, PSC	Knockout DMEM	Uchida 2017
	RPMI 1640, Advanced DMEM	Watson 2014
	DMEM/F-12, RPMI 1640, Advanced DMEM/F-12	Spence 2011
肾PSC脏, 胎儿来源细胞	Advanced RPMI 1640 DMEM/F-12	Morizane 2015; Freedman 2015 Li 2016
肝脏, PSC 成体干细胞 原代细胞	RPMI 1640, DMEM/F-12, StemPro-34 SFM	Takebe 2017
	Advanced DMEM/F-12	Huch 2013
	HepaRG培养基	Proctor 2017
肺, PSC	RPMI 1640, Advanced DMEM/F-12	Dye 2015
	Advanced DMEM/F-12	Wilkinson 2016
肠道细胞	Advanced DMEM/F-12	Sato 2009
	F-12	Ootani 2009
肿瘤类器官 食道 结肠 胰腺 乳腺	Advanced DMEM/F-12	Sato 2011; Li 2018
	Advanced DMEM/F-12	Sato 2011
	Advanced DMEM/F-12	Boj 2015
	Advanced DMEM/F-12	Lee 2007; Sachs 2018

PSC: 多能干细胞; SFM: 无血清培养基。



Gibco培养基产品

我们的Gibco细胞培养基系列包括设计用于支持多种哺乳动物细胞和细胞系生长和维持的产品, 它们均经过时间检验且值得信赖。我们开发了即用型细胞培养基产品以及干粉和浓缩液体配方, 以满足您的实验设置和预算。

详情请访问 thermofisher.com/media

5.3

添加剂

一般而言,表5.1中所列的基础培养基通常会补充血清,并额外添加特定生长因子、细胞因子和激素。无论在2D培养还是在3D培养中,添加的添加剂都有助于使培养基更适合目标细胞系的生长。**Gibco™ B-27™添加剂**是因引用最多且最广为人知的神经细胞培养基添加剂。科学家发现,该添加剂不仅是对贴壁培养的神经细胞类型有益。在3D培养领域,它也被应用于各种细胞类型。在3D培养基中添加B-27添加剂的参考文献示例见表5.2。附录A.2中提供了应用指南“B-27添加剂在建立和表征衍生自单层扩增NSC的功能性3D神经球状体模型中的使用”,以证明不同添加剂对神经球状体的影响。

有一种添加剂是条件培养基,它是从在特定条件下培养的细胞中吸移出的无细胞上清液(即,用过的培养基)。在20世纪70年代初期,Iscove及其同事利用人白细胞培养中用过的培养基促进了人骨髓细胞的生长(Iscove 1971)。现在可以确定的是,在正确的培养条件下,用过的培养基可能含有生长因子、细胞因子、血管生成因子和其他促进细胞生长的因子。事实上,已经对条件培养基的成分进行了精密研究,以确定在疾病和健康状态的不同条件下分泌的确切因子(Dowling 2011)。

3D培养物可以成为条件培养基的来源。例如,干细胞条件培养基被证明可能在再生医学中发挥作用。成人干细胞球状体培养物的条件培养基已被发现含有血管内皮生长因子、血小板衍生生长因子、成纤维细胞生长因子2、肝细胞生长因子和CXCL12(Pawitan 2014)。重要的是要了解,由于条件培养基的化学成分不确定,它可能为培养物增加可变性。

表5.2.3D细胞培养中使用B-27添加剂的参考文献。

细胞类型	参考文献
大脑,多能干细胞	Smits 2019
大脑,多能干细胞	Kim 2019
结肠	Devall 2020
肺	Strikoudis 2019
食道	Guha 2019
肠道	Szvicsek 2019
肾	Koning 2019
肾	Grassi 2019
输卵管	Kessler 2019
视网膜	Kaya 2019
前列腺	Pappas 2019
汗腺	Diao 2019
乳腺	Ísberg 2019

第6部分

成像和分析



6.1

可视化在3D细胞培养中的重要性

与2D细胞培养一样，在培养过程中检查细胞是确保生长条件良好或跟踪新型治疗化合物有效性的重要部分。在2D培养中，可以轻松地通过相差显微镜进行原位表面观察，但3D培养物的厚度对显微镜观察提出了更多挑战。除此之外，细胞会随着时间的推移而发挥作用，因此对于图像采集系统提出了更高的要求 (Freimark 2010)。

目前有几种类型的显微镜和成像平台可用于3D细胞图像采集。显微镜和其它成像平台包括共聚焦和多光子显微镜、实时荧光成像显微镜和光学积分干涉断层扫描成像平台 (Graf 2010; Waters 2013; Huang 2017; Lakner 2017; Kim 2016)。可用于3D细胞成像的显微镜类型总结于表6.1。

表6.1.可用于3D细胞成像的的显微镜平台。

显微镜类别	优缺点	可及性
明场 (光源) 显微镜、组织学、相差显微镜	<ul style="list-style-type: none">明场显微镜需要染色的样品组织学需要固定、切片和染色的样品相差显微镜可视化活细胞, 但密度相对较低	<ul style="list-style-type: none">一般可获得成本低易于使用
宽场荧光显微镜	<ul style="list-style-type: none">灵活用于固定细胞成像和活细胞成像	<ul style="list-style-type: none">一般可获得价格可能昂贵需要培训
共聚焦显微镜	<ul style="list-style-type: none">仅限染色的样品固定样品和切片样品可产生更高分辨率的图像使用报告染料可将活细胞可视化可对较厚的样品进行3D结构重建	<ul style="list-style-type: none">可得性受限昂贵需要培训
透射电子显微镜	<ul style="list-style-type: none">样品必须固定并切片	<ul style="list-style-type: none">可得性受限昂贵需进行深度培训
扫描电子显微镜	<ul style="list-style-type: none">样品必须固定并切片	<ul style="list-style-type: none">可得性受限昂贵需进行深度培训
多光子显微镜	<ul style="list-style-type: none">允许组织块内部深层结构成像	<ul style="list-style-type: none">可得性受限昂贵需进行深度培训

6.2

监测3D细胞模型特征的工具

与2D细胞培养一样，应监测3D培养物以确保3D细胞球处于健康状态。当使用荧光染料和紫外线显微镜时，首选在无酚红培养基中培养细胞。一种用于测定细胞活性的简单荧光方法是使用二乙酸荧光素，可以将其与荧光显微镜或流式细胞仪一起使用 (Proffitt 1996)。一种简单的光学显微镜方法是使用台盼蓝 (Piccinini 2017)。对于荧光显微镜和普通光学显微镜技术，传统的方法是使用血细胞计数仪来计算每单位体积的细胞数量。为了提高速度并改善重现性，可以使用带有可重复使用玻片的自动细胞计数仪 (例如Invitrogen™ **Countess™ 3 FL 自动细胞计数仪**)，借助荧光或非荧光染料对细胞活性进行定量。

需要注意的是，在这些技术中，并非在原位评估这些3D培养物，而是将细胞从培养物中分离再进行分析，就像从2D培养物中分离再进行分析一样。可以在Molecular Probes荧光大课堂网页 (thermofisher.com/mpsf) 上找到有关选择荧光团和荧光显微镜其他注意事项的详细讨论，有关共聚焦成像方案的讨论请参阅在线文章 (Sargent 2019)。

从孔中冲洗出球状体即可轻松收获，但对于在某些细胞支架上生长的细胞，可能需要将其从细胞支架上分离，以便进一步进行下游分析。我们提供用于溶解某些细胞支架的特殊试剂，例如用于Gibco™ AlgiMatrix™ 3D培养系统的Gibco™ AlgiMatrix™溶解缓冲液。从细胞支架上分离细胞后，便可以使用多种方法对细胞进行定量和活性评估，

例如使用氧化还原染料测定代谢活性 (例如，Invitrogen™ PrestoBlue™ HS细胞活性试剂、AlamarBlue™ HS细胞活性试剂、CyQUANT™ XTT细胞活性检测试剂盒) 或测定DNA含量 (例如Invitrogen™ CyQUANT™直接细胞增殖检测试剂盒)。

自动成像功能可以帮助用户记录和分析随时间发生的细胞水平生物学事件，如血管生成或伤口愈合实验。在肿瘤研究中，使用自动光学显微镜系统监测细胞活力状态和增殖 (Eka 2015)。对于在2D培养条件下生长的细胞，根据相同的参数对系统进行测量，以确保其具有相对稳定的生长状态 (Eka 2015)。可以借助Invitrogen™ EVOS™活细胞实时培养监测系统 (thermofisher.com/evososi，极易操作和控制)，使用Invitrogen™ EVOS™智能显微成像系统实时采集活细胞荧光图像数据，以评估其活性状态。

自动化成像通常用于单个细胞的分析，而微孔板读数仪则用于均相检测，以将细胞行为量化为群体的平均值。微孔板读数仪可通过测量从常用检测 (例如PrestoBlue HS或CyQUANT XTT检测) 产生的发射光来检测化学、生物学或物理反应。通过此读数可以评估2D和3D模型的细胞活性 (Montoya 2019)。

Countess 3 FL 自动细胞计数仪

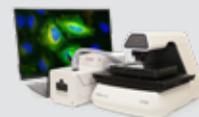
通过选择可重复使用玻片和荧光功能，即明场和两个用户可更改的荧光通道，Countess 3 FL 自动细胞计数仪可以在很短的时间内计数细胞并测量细胞活性。

详情请访问 thermofisher.com/countess



EVOS M5000和M7000成像系统 (可灵活搭载全新专业级图像分析软件Celleste5.0 Software)

EVOS成像系统可用于长期活细胞实时成像、孔板扫描和大图拼接，以及多种自动化成像应用。有多种试剂可用于相关应用的标记和检测，包括Invitrogen™ Alexa Fluor™染料。



详情请访问 thermofisher.com/evos

6.3

分析3D培养物面临的挑战

由于较厚的样品会反射或吸收激发光，3D细胞模型的成像可能具有挑战性。通常使用抗淬灭封片剂和透明化试剂来辅助进行显微镜样品制备 (Waters 2013)。这些试剂的使用对于观察3D培养物至关重要，部分原因是为了减少样品的光散射 (Richardson 2015; Zhu 2017)。

Invitrogen™ ProLong™抗淬灭封片剂和Invitrogen™ CytoVista™透明化试剂设计用于增强3D细胞培养物的成像。表6.2总结了这些产品的具体用途。使用适当的技术和试剂，可以克服与3D培养物成像相关的挑战 (图6.1)。

表6.2.用于3D细胞成像的封片剂和透明化试剂。

	ProLong Glass抗淬灭封片剂	CytoVista 3D细胞成像透明化试剂
形式	胶状，即用型	液体，即用型
培养基类型	水性	溶剂
折射率	-1.52 (固化后)	1.48
样品储存	数月数年	数周至数月
成像深度	<150 μm	<1 mm
信噪比	最佳	良好
光漂白保护	最佳	无
安装显微镜载玻片	是	是
微孔板成像	否	是
样品制备时间	过夜至4天	30分钟至数小时
组织回收	是	是

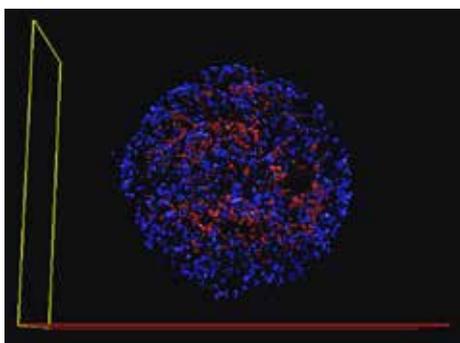


图6.1 细胞球染色和成像分析。 HepG2 3D 细胞球在生物反应器中培养，并在Thermo Scientific™ Nunc™玻底96孔板上铺板。固定和透明化后，用Invitrogen™ Hoechst™ 33342和Alexa Fluor™ 555 Phalloidin染色细胞球。通过Invitrogen™ EVOS™ M7000成像系统进行图像采集 (10x S-Apo物镜，DAPI和RFP光立方，2 μm步进) 采集110张Z轴层扫图像。最后通过Invitrogen™ Celleste™ 5.0 图像分析软件进行3D反卷积、3D图像重构、3D可视化分析和3D动画绘制等多类分析。

对于流式细胞术或任何利用抗体染色的成像技术，必须注意不可使用不温和的蛋白水解酶从支架、载体或培养容器中分离细胞，否则会破坏表面抗原。当使用非酶促方法收集细胞时，也应该谨慎行事。Heng及其同事确定，与胰蛋白酶相比，使用非酶促解离缓冲液会降低间充质基质细胞的活力（Heng 2009）。Tsuji及其同事使用高度纯化的胰蛋白酶试剂，即Gibco™ TrypLE™ Select酶，来收获间充质基质细胞，以便通过流式细胞术进行进一步分析。他们发现，与用胰蛋白酶、二价阳离子螯合剂或胶原酶进行细胞解离相比，用TrypLE Select酶进行细胞解离可产生更高的活性并能够保留表面抗原标记物（Tsuji 2017）。如果某种表面标记物对酶促作用特别不稳定，建议尝试使用Gibco™ Versene溶液并检查活性以及标记物表达。

获取和分析用于高通量研究的大规模成像数据可能具有挑战性。高内涵分析（HCA）平台可将大规模细胞成像与多参数分析功能相结合，从而促进这些研究加速发展。在3D培养模型中，使用Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 LZR 高内涵平台评价肝细胞球中胆小管的3D组织模型构建方法。有关该方案的详细信息，请参阅本手册附录A.6中提供的应用指南“通过人源化3D肝细胞球体外模型构建进行肝功能及毒理学评估”。

CellInsight CX7或CX7 LZR 高内涵平台

CellInsight CX7高内涵平台专为定量显微镜学和高通量筛选相关灵活性而设计，其提供一种开发和自动化高内涵分析的集成方案，可在共聚焦和宽场模式下结合使用5色明场和7色荧光成像。该平台可实现前期检测开发到筛选的过渡，具有卓越的价值表现。CellInsight CX7 高内涵平台可配备基于荧光LED或激光器的光源，为2D和3D筛选项目提供了极大的应用拓展。

详情请访问 thermofisher.com/hca



6.4

功能分析

许多用于分析2D培养细胞的检测技术同样适用于3D细胞培养物的功能性分析。本小节没有列出所有的细胞功能分析方法，而是通过举例说明目前常用的检测方法。

定量PCR (qPCR) 是最常见的RNA分析方法。3D培养与2D培养的检测方法相似，首先需要从细胞裂解物中获得RNA。Gieseck及其同事在3D培养基中培养人iPSCs，分析具有细胞连接的细胞的基因表达情况，并将其与单细胞基因表达进行比较。两种培养条件下的RNA制备操作流程相同 (Gieseck 2014)。最近，Burgess及其同事设计了一种从多肽水凝胶中提取RNA的方法，由于RNA和支架材料之间的相互作用，这种支架并不利于使用常规方法制备RNA (Burgess 2018)。分离出RNA后，可以使用相应试剂和仪器 (如Applied Biosystems™ TaqMan®检测试剂盒和Applied Biosystems™ QuantStudio™实时荧光定量PCR系统) 进行进一步分析。

流式细胞术是一种用于快速分析大量培养细胞、并可以在单细胞水平进行多参数分析的检测方法。从3D培养物中获得的细胞可以用抗体或其他试剂进行染色。抗体的选择取决于研究何种目的抗原；使用抗体进行细胞群鉴定的过程称为免疫表型分析。由于需要从培养容器中取出细胞以进行流式细胞分析，2D或3D培养的细胞可以用相同的方法进行洗涤和染色。缓冲液中不得含有酚红，否则会增加背景荧光。可以使用Invitrogen™ PrimeFlow™ RNA检测试剂盒在流式细胞仪上进行RNA分析。PrimeFlow技术的一个主要优势是能够在单细胞水平同时分析RNA和蛋白。使用Invitrogen™ Attune™ NxT流式细胞仪可以快速地对数万甚至数百万个细胞进行多参数分析。这一高效、灵活的分析系统采用专利的声波辅助流体动力学聚焦技术，从而可以快速处理大量样品，并且为您的多色分析提供多达4种激光器和16个检测通道。



Attune NxT流式细胞仪

Attune NxT是一款全新的台式流式细胞分析仪，采用创新的声波聚焦技术，在保证高精度的同时可以10倍极速上样；仪器配置灵活，可现场升级，最高可达4激光16个参数，满足各种实验方案和实验室预算要求。可配备Invitrogen™ CytKick™自动进样器和Orbitor机械手臂，实现流式全自动化检测。

详情请访问 thermofisher.com/attune

Attune NxT流式细胞仪具有以下技术优势：

- 专利声波聚焦技术，实现10倍极速精准上样
- 专业防堵塞，大细胞、粘细胞轻松上
- 稀有细胞超灵敏高通量分析，全血样本免洗免裂解
- 顶级平顶光斑激光器，无需调光路
- 配置可达4激光16参数，模块化设计，可现场升级
- 可配备流式自动化工作站，实现24小时无人值守自动上样

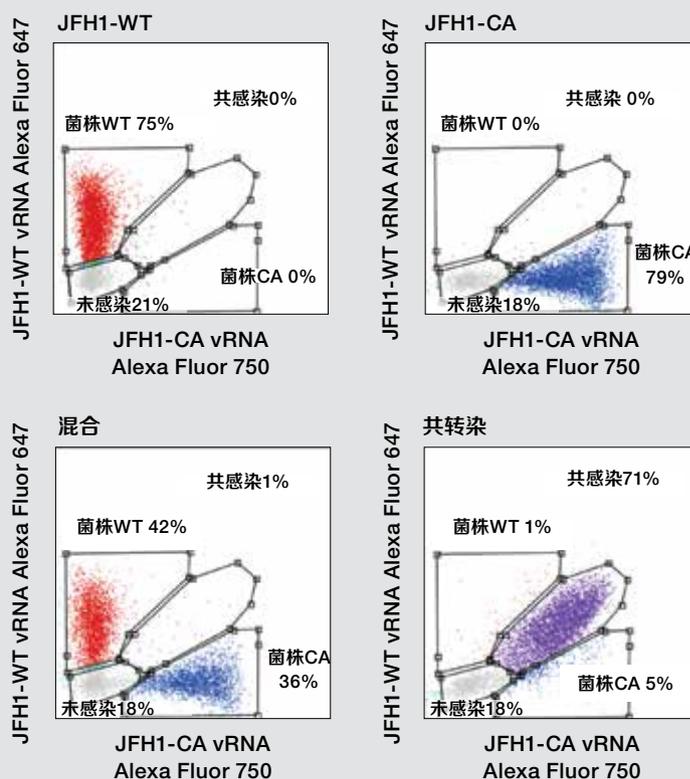
Hanson及其同事最近发表了一篇对在水凝胶中生长的外周血单个核细胞 (PBMCs) 和间充质基质细胞 (MSCs) 进行免疫表型分析的文章。从水凝胶中收集PBMCs和MSCs, 并用CD14、CD16、CD206和HLA-DR抗体进行染色。然后对洗涤后的染色细胞进行流式细胞分析, 以确定共培养物中每个目的抗原的表达情况 (Hanson 2011)。另一个更复杂的流式实验是, 分析比较2D培养和在芯片上生长的3D大鼠肝脏球状体培养物的细胞活性 (Sart 2017)。在另一组实验

中, Takeuchi及其同事对在基质中生长的PSCs分化为胰腺细胞的能力进行分析。该实验中使用的技术主要是细胞内蛋白 (如转录因子) 染色, 以确定PSCs分化的程度 (Takeuchi 2014)。为了解决从支架上分离细胞来制备流式样本的难题, Wu及其同事开发了一种可以让细胞以单一形式生长、分析和进行分选的微载体 (Wu 2018)。

PrimeFlow RNA技术

PrimeFlow RNA是一种利用流式细胞术直接检测单个细胞内多种病毒转录本的技术, 从而有助于对共感染细胞群体进行深入研究。右图以分析两种丙型肝炎病毒株感染的肝细胞为例, 即JFH1野生型丙肝病毒 (JFH1-WT, 左上) 或JFH1密码子变异型丙肝病毒 (JFH1-CA, 右上)。感染后将两种单一病毒感染的肝细胞混合 (左下), 或分析JFH1-WT和JFH1-CA共感染的肝细胞 (右下)。使用PrimeFlow RNA检测试剂盒可以清晰地区分肝细胞中四种不同类型的病毒RNA。数据由斯坦福大学医学院的Nicholas J. van Buuren和Karla Kirkegaard (PI) 提供。

详情请访问 thermofisher.com/primeflow



细胞生理功能的检测包括钙通量、caspase活性(凋亡期间)、氧化应激、代谢、内吞作用和共定位。其中许多检测使用流式细胞仪、荧光或激光扫描显微镜、成像细胞仪或其他仪器以及相关染料或抗体进行。表6.3总结了一些主要用于流式细胞仪的检测、试剂和参考文献。

表6.3.用于细胞生理学的检测和试剂。

过程	试剂	参考文献	URL
细胞增殖	Click-iT和Click-iT Plus EdU试剂盒	BioProbes 65 (2011), 66 (2011) 70 (2014) 和75 (2017)	thermofisher.com/cell-proliferation
细胞活性	LIVE/DEAD细胞活性和成像试剂盒	BioProbes 75 (2017)	thermofisher.com/cell-viability
球状体形态	核染料、CellMask染料、phalloidin 偶联物	BioProbes 70 (2014)	thermofisher.com/organelle-stains
钙通量	Fluo-4、Fura Red染料、Indo-1	Assinger 2018	thermofisher.com/calcium-flux
细胞凋亡	膜联蛋白V (Annexin V)、caspase 3/7	Holville 2016	thermofisher.com/apoptosis
氧化应激	2',7'-二氯荧光素二乙酸盐	Almasi 2019	thermofisher.com/oxidative-stress
代谢(葡萄糖)	GLUT-1、2-NBDG	Palmer 2016	thermofisher.com/2-nbdg
线粒体膜电位	JC-1	Nunez 2004; LeGrand 2001	thermofisher.com/mito-function
内吞作用	荧光纳米粒子	Goldshtein 2019	thermofisher.com/phrodo

6.5

高通量筛选

使用微孔板读数仪进行的活性检测通常是新药研发中用于高通量分析的主要检测。评价细胞功能变化的检测对于鉴定测试化合物及其作为药物的潜在作用至关重要。目前研究3D细胞模型的指南和技术相对较少,但在肿瘤学领域,3D细胞模型被越来越多地用于模拟体内肿瘤的复杂性。2D和3D模型的药物反应通常具有显著差异,特别是耐药性方面(Hou 2018; Hongisto 2013)。

现有的微孔板读数仪提供了一种省时而经济的方法,有助于了解3D细胞模型的治疗效果,允许在新药研发中使用最少的投资进行快速的治疗特性研究。Cell Culture Dish网站上的最新文章讨论了3D细胞培养生长,并提出了针对3D模型的优化细胞活性微孔板检测(Sargent 2019)。有研究报告称,2D培养物在初步药物筛选中显示出比3D培养物更强的细胞毒性反应;这些细胞和药物依赖性结果证明了3D模型在新药研发研究中更具生理相关性(Hou 2018)。

研究3D表型变化的传统方法是使用高内涵成像和荧光成像,但现在人们更关注使用微孔板读数仪来量化细胞功能。已经证明,高内涵成像和微孔板检测的结果与利用球状体的细胞健康检测相关(图6.2)。广泛可用的微孔板读数仪和兼容性检测为研究人员提供了一系列选择,以便在继续使用高内涵和荧光成像方法的同时进行初步或补充研究。

藤黄酸孵育时间	藤黄酸的效价值 (μM)	
	Varioskan LUX多模式 读板仪	Cell Insight CX7 HCA 平台
2 h	100.4	>60
19 h	56.8	~44.4
48 h	17.8	19.8

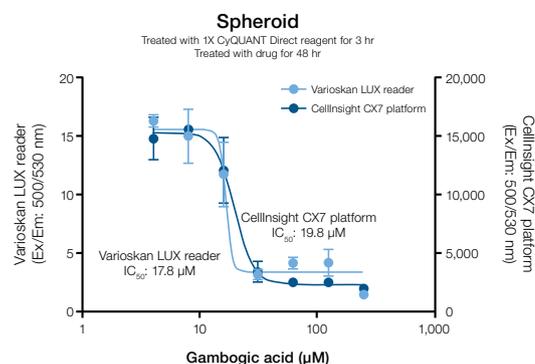


图6.2.使用Varioskan LUX多模式微孔板读数仪和Cell Insight CX7 HCA平台测量细胞健康状况。微孔板读数仪可以分析基于溶液和荧光的现有检测,以解决最初新药研发问题。通过在微孔板读数仪和高内涵系统上使用现有检测确定的IC50值相似。

Varioskan LUX多模式微孔板读板仪

Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX多模式微孔板读板仪专为满足各种需求而设计,可提供多种测量模式。本仪器通过自动动态选择简化测量设置,其智能安全控件可帮助您避免试验误差。Varioskan LUX多模式读板仪提高了可靠性和易用性。



- 五种检测模式: 吸光度、荧光强度、化学发光、时间分辨荧光 (TRF) 和AlphaScreen模块
- 五种测量模式: 终点模式、动力学模式、光谱模式、多点模式和动力学光谱模式
- 用于分析优化的光谱扫描
- 反应快速, 启动运行后在分液的同时即可进行测量
- 集成气体控制模块, 控制 CO_2 和 O_2 浓度

thermofisher.com/varioskanlux

许多细胞活性检测均使用微孔板读数仪进行, 并且可以适用于3D培养。表6.4总结了与微孔板读数仪一起使用的部分检测和试剂。

表6.4.3D细胞健康定量 - 不同检测平台上的分析。

细胞功能	试剂或检测	检测平台	实验指南	
			浓度*	培养时间
细胞凋亡	CellEvent Caspase 3/7 Green检测试剂	微孔板读数仪	0.33X	2小时
		荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	1小时
线粒体健康状况	MitoTracker Orange CMTMRos	微孔板读数仪	2X	1小时
		荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	30分钟-1小时
增殖	Click-iT EdU细胞增殖试剂盒	荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	标准方案
活性	CyQUANT Direct细胞增殖检测	微孔板读数仪	1X染料, 2X背景抑制剂	45分钟-1小时
	CyQUANT XTT细胞活性检测	微孔板读数仪	2X	5-8小时
	PrestoBlue HS细胞活性试剂	微孔板读数仪	1X	3-5小时
	alamarBlue HS细胞活性试剂	微孔板读数仪	1X	3-5小时
	CyQUANT LDH细胞毒性检测	微孔板读数仪	1X	30分钟
	CyQUANT LDH细胞毒性检测, 荧光	微孔板读数仪	1X	10分钟
	LIVE/DEAD细胞活性/细胞毒性试剂盒	荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	标准方案
活性氧	CellROX Deep Red试剂	荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	1小时
缺氧	Image-iT Hypoxia试剂	荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	1小时

*访问thermofisher.com/microplate-viability了解更多产品信息。

另一项在各种应用中用于高通量筛选的技术是Invitrogen™ **QuantiGene™ Plex检测**, 该检测依赖于分支DNA技术实现信号放大, 并利用Luminex®磁珠和仪器获得读数。这种多重基因表达系统无需进行RNA提取, 研究人员使用该系统开发了一种原代人呼吸道基底细胞(称为支气管球状体)3D培养方法(Danahay 2015)。

科学家们对影响支气管球状体生长的分泌因子进行了高通量筛选。他们使用QuantiGene Plex检测测量每孔最多80个靶标的基因表达(包括看家基因), 结果发现, 生长中的支气管球状体对IL-13的反应表现为杯状细胞标志物表达增加和纤毛细胞数量减少。

第7部分

疾病和生理学研究中的3D细胞培养模型



癌症模型

虽然动物模型可以在多个方面复制包括癌症在内的疾病，但体外表现通常可以帮助我们理解病理生理学并支持新药研发 (Kumar 2019)。与此同时，与动物模型系统相比，细胞培养模型成本更低，并且更易于扩大规模。此外，癌细胞的个性化培养有助于根据癌细胞的特异性标记物来确定患者特异性治疗 (Kumar 2019)。如成像和分析部分所述，3D培养物在高通量筛选方面存在一些挑战。然而，由于3D细胞培养物能够更准确地代表疾病，尤其是癌症的真正生物学特性，预期3D细胞培养物所带来的机遇将超过挑战 (Booij 2019)。

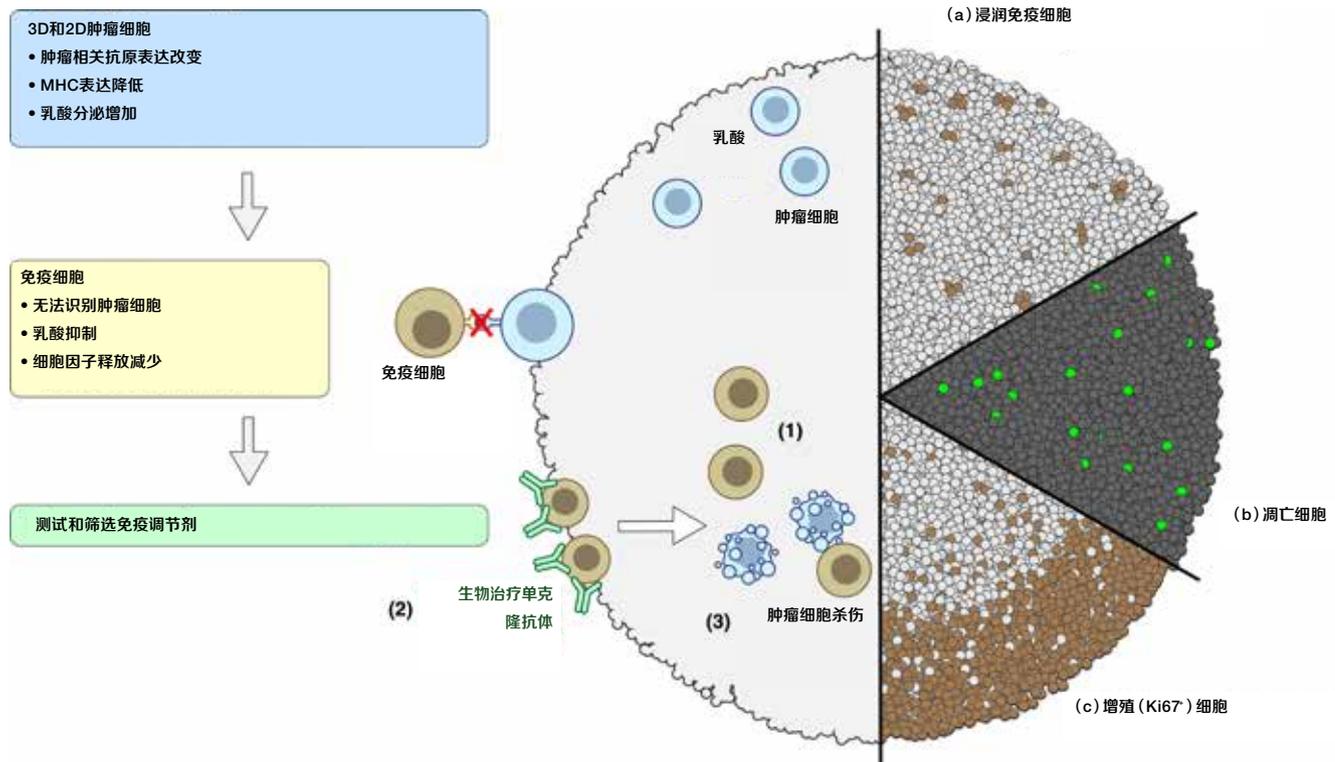


图7.1.肿瘤球状体可再现实体肿瘤微环境的特性。球状体中生长的细胞与其他细胞和细胞外基质 (ECM) 相互作用，并暴露于营养物质、气体、生长因子和其他分泌因子的局部梯度中。所有这些相互作用都会影响细胞功能和对药物的反应。

3D细胞培养有助于研究特定的癌症类型。用于结直肠癌研究的类器官可原位复制肠上皮的生理、形态和细胞组成，使其成为进行结直肠癌基础和转化研究的理想系统。基础研究包括需要对细胞进行基因操纵和干细胞检测的研究，而转化方法包括根据活检样本进行个性化治疗、高通量筛选候选药物以及使用基因编辑技术纠正突变 (Young 2016)。

使用两个乳腺癌3D模型评价肿瘤、球体和微组织中的阿霉素递送情况。这两种模型均通过将癌症相关成纤维细胞与乳腺癌细胞系MCF-7共培养而建立。研究人员观察到，微组织对阿霉素的扩散速率比球状体高；这与高药物诱导毒性有关 (Branconto 2017)。这种探索性研究可以用作体外研究新型抗癌药物作用的手段。

Iwasaki及其同事在1990年时建立了一个显示胶质瘤球状体的淋巴因子激活的杀伤 (LAK) 细胞溶解的模型。在该模型中，来自人外周血的淋巴细胞被细胞因子 (当时称为淋巴因子) 激活，然后与胶质瘤细胞系的球状体共培养。结果表明，LAK细胞渗透到球状体内部并引起肿瘤细胞的细胞溶解，而未受刺激的细胞不具备穿透和杀死靶细胞的能力 (Iwasaki 1990)。

最近，Courau及其同事将人结直肠肿瘤球状体与活化的T细胞或自然杀伤 (NK) 细胞共培养，以检查免疫介导细胞毒性的程度。他们观察到肿瘤球状体通过细胞凋亡快速破坏，并且这一过程由通过T细胞和NK细胞表达的表面蛋白NKG2D以及靶细胞的配体驱动。T细胞和NK细胞未浸润球状体或诱导凋亡 (Courau 2019)。

作为球状体持续生长的细胞将是开发癌症模型的重要工具。为此，Sant和Johnston评价了两种创建球状体以用于高通量筛选的方法；这些方法涉及到极低附着的板，以及微孔板中的水凝胶 (Sant 2017)。两种方法都不具有明显的优势，但都能形成相对均匀的球状体。

已经证明，极低附着的塑料耗材有助于癌细胞系中球状体的生长。**Gibco™ Nunclon™ Sphera™ 培养瓶**和板的设计可促进球状体的形成；它们的塑料表面经过处理，可以阻止介导细胞粘附的ECM蛋白吸附，从而使细胞系生长为球状体。

已证明Nunclon Sphera 96孔板可支持多种癌症类型的球状体形成，包括乳腺癌、结肠癌和前列腺癌。以这种形式生成的球状体允许在处理前后进行特性鉴定 (图7.2)。

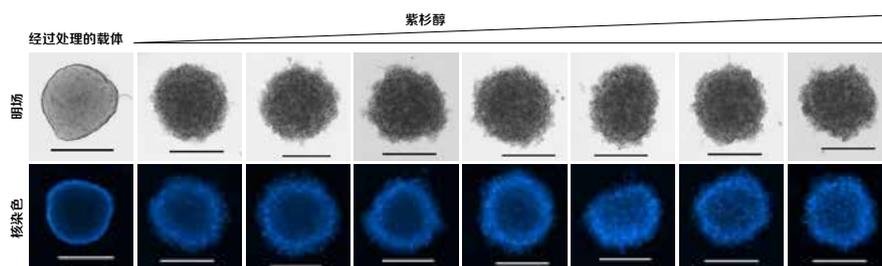


图7.2. 紫杉醇对球状体完整性的影响。将2,000个T-47D细胞接种于Nunclon Sphera板上，以生成球状体。第6天，使用DMSO或通过增加紫杉醇（一种化疗药物）浓度 (0.625-10 μM) 来处理球状体。使用Invitrogen™ EVOS™ M7000成像系统，在4x物镜下采集各时间点的明场和荧光图像。增加紫杉醇浓度会损害球状体的完整性，从而使核染料更好地穿透球状体。比例尺：400 μm 。

7.2

神经模型

已证明神经元研究中的3D模型可用于从阿尔茨海默病到中枢神经系统 (CNS) 病毒感染等的许多研究领域。Kim及其同事介绍了一种用于阿尔茨海默病建模的系统。在该模型中对神经祖细胞进行了基因修饰,使其产生与阿尔茨海默病相关的突变。然后在基质中分化祖细胞,并在6周后进行 β -淀粉样蛋白分析。该模型系统为阿尔茨海默病的体外研究提供了一种方法;这些发现也可以应用于其他神经退行性疾病的研究 (Kim 2015a)。

D'Aiuto及其同事设计了一种利用3D培养物来模拟CNS病毒感染的系统。在该模型中,使用神经元因子处理在无ECM条件下生长的人诱导多能干细胞 (iPSC),从而诱导分化。然后

用单纯疱疹病毒1型感染3D培养物,并评价抗病毒药物阿昔洛韦对受感染细胞的影响。研究的结果值得关注——作者表明,生成贴壁3D神经元培养物无需在基质中嵌入细胞;相反,观察到分化的后代细胞组织层具有心室/室下区某些复杂特征的多层结构。此外,该模型展示了使3D神经元培养适应抗病毒药物活性的高通量评价的方式 (D' Aiuto 2018)。

从多能干细胞培养中生成神经类器官的工作流程通常遵循从标准多能干细胞培养开始的特定步骤序列 (图7.3)。作为神经类器官培养物表型分析的一部分,明场成像显示了神经上皮结构的生长情况 (图7.4)。



图7.3.从多能干细胞到神经元类器官的重要步骤。

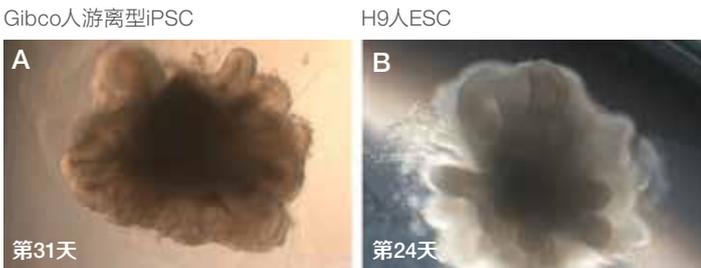


图7.4.类器官培养物中的神经上皮生长。
培养第31天或第24天的神经类器官明场图像显示出复杂的神经上皮结构。

请参阅附录中题为“多能干细胞分化为神经类器官”的完整应用指南。

7.3

肝脏模型

从毒理学到非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 和胰岛素耐受性 (统称为非酒精性脂肪性肝病, NAFLD), 3D肝脏模型在研究的各个方面得到了诸多应用。简而言之, 通过建立人原代肝细胞的球状体培养物, 在体外对NASH和NAFLD进行建模, 然后随着时间的推移使用脂肪酸进行处理。通过这些培养物可以进行脂肪酸累积评估, 并进行基因表达谱分析。特别是监测与胰岛素耐药性相关的基因 (Kozyra 2018) 的表达。研究人员观察到, 球状体最初对胰岛素敏感, 但在暴露于脂肪酸后, 球状体会表达与胰岛素耐药性相关的基因, 并进一步显示出对胰岛素耐药的生理特征 (Kozyra 2018)。

在考虑进行ADME (吸收、分布、代谢、排泄) 和毒理学研究的肝脏体外培养 (无论是2D还是3D) 时, 必须考虑到肝脏的复杂性、肝细胞极化以及肝脏功能并不仅仅存在于3D技术适用的肝细胞中的事实。在可用的3D技术中, 最适用于ADME

和毒理学研究的是在水凝胶中生长的球状体、在合成支架中生长的球状体以及来源于肝癌或原发性肝细胞的肝脏球状体 (Godoy 2013)。使用哪种系统最终取决于所探讨问题的确切性质。Groger将其同事利用器官芯片模型建立了肝窦模型, 以便进行肝功能损害研究。血窦由多种细胞类型组成, 包括层中的肝细胞和血管细胞以及非实质细胞, 这些细胞类型会相互沟通。通过多种刺激诱导炎症反应, 以研究正常肝功能的损害状况。通过这种方式, 3D模型可以模拟患脓毒症期间在体内发生的肝功能损害; 该模型为疾病和修复过程研究提供了有价值的工具 (Groger 2016)。

对于许多肝脏研究, 人原代肝细胞可能是开始3D培养的首选细胞。这些市售的细胞可与低附着塑料U型底孔板结合用于球状体培养 (图7.5)。

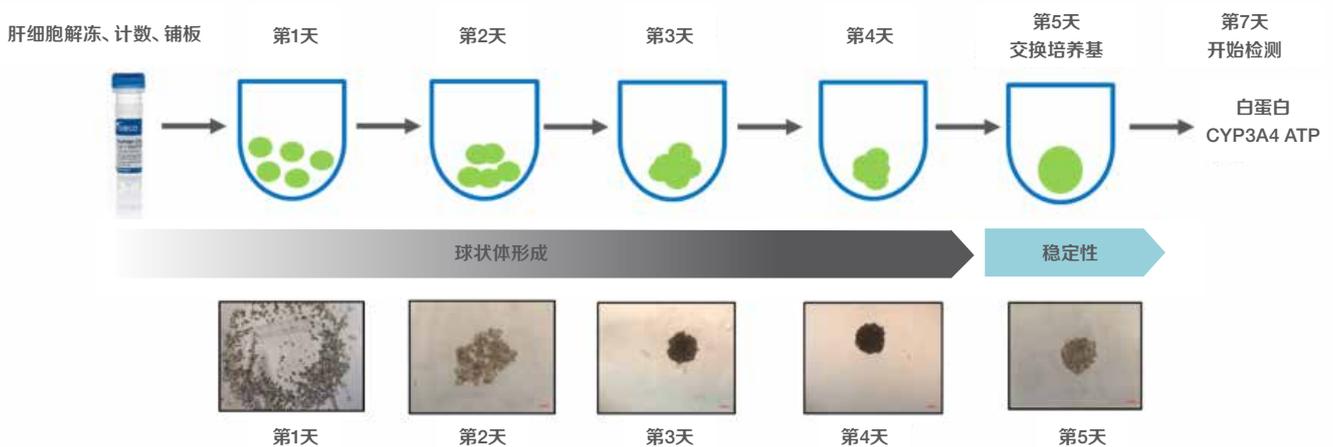


图7.5.由人原代肝细胞形成肝脏球状体。在U型孔中铺板从商业渠道获得的人原代肝细胞。球状体在5天或更短时间内形成, 可在第7天进行肝功能检测。

3D肝脏球状体培养适合于药物代谢研究。对于所研究的CYP450酶,观察到代谢产物形成的充分检测窗口(图7.6)。总体而言,与2D培养相比,3D肝脏培养在药物代谢方面更为有效。

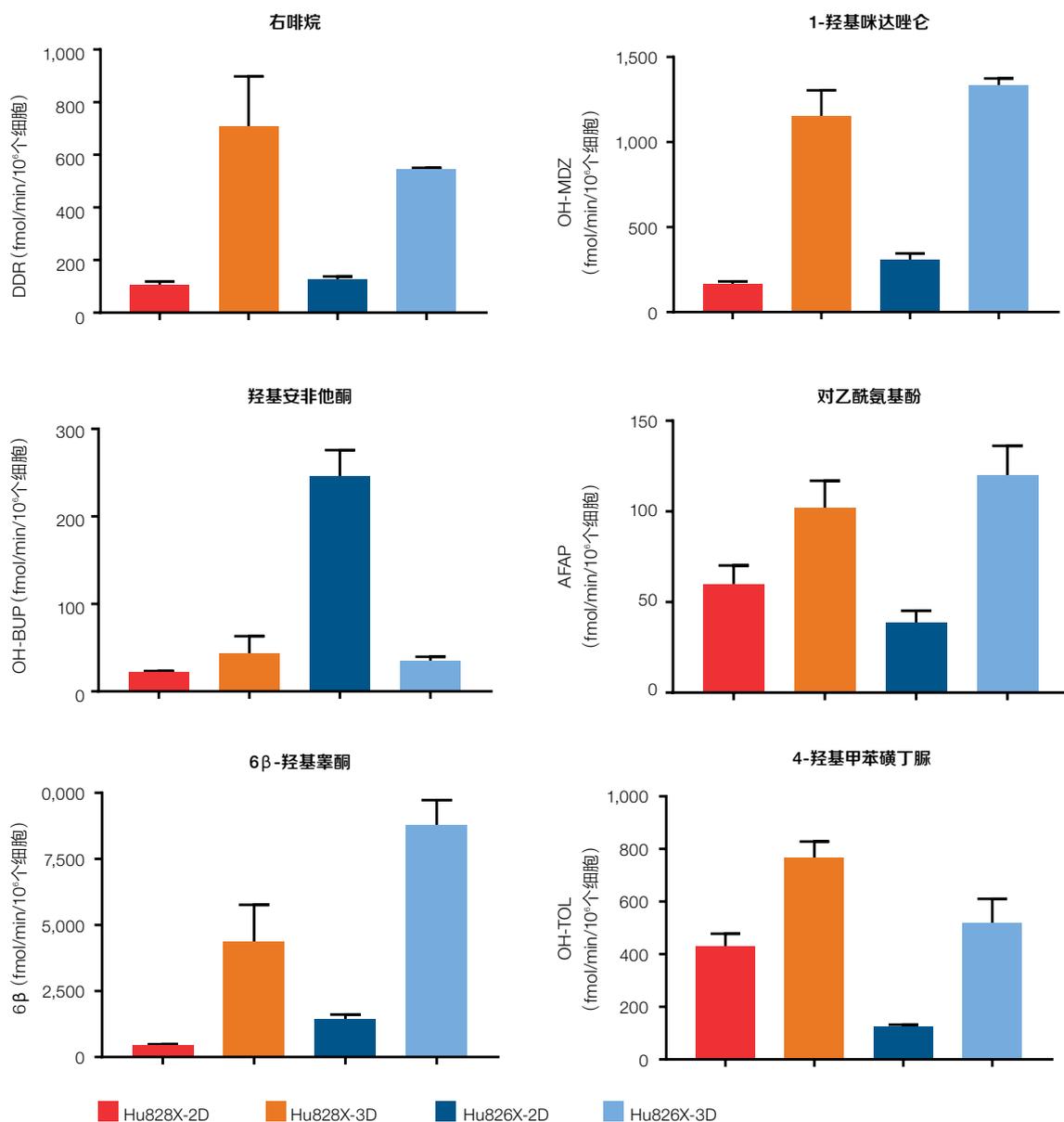


图7.6.2D和3D培养之间的代谢产物比较。使用高分辨率质谱测定法(HRMS)定量的代谢产物,并根据相应代谢产品的标准曲线转换为摩尔量。本检测使用了两种不同批次的人原代肝细胞Hu828X和Hu826X(部分编辑)。结果归一化为2D和3D培养中各底物的孵育时间和每孔细胞数。数据为平均值±SD; n = 3。

随着研究人员转向使用表型更稳定的人原代肝细胞3D培养物，了解基因表达与体内肝脏表型的相似性以及3D培养物中与传统2D培养物相比的基因表达水平变得非常重要(图7.7)。

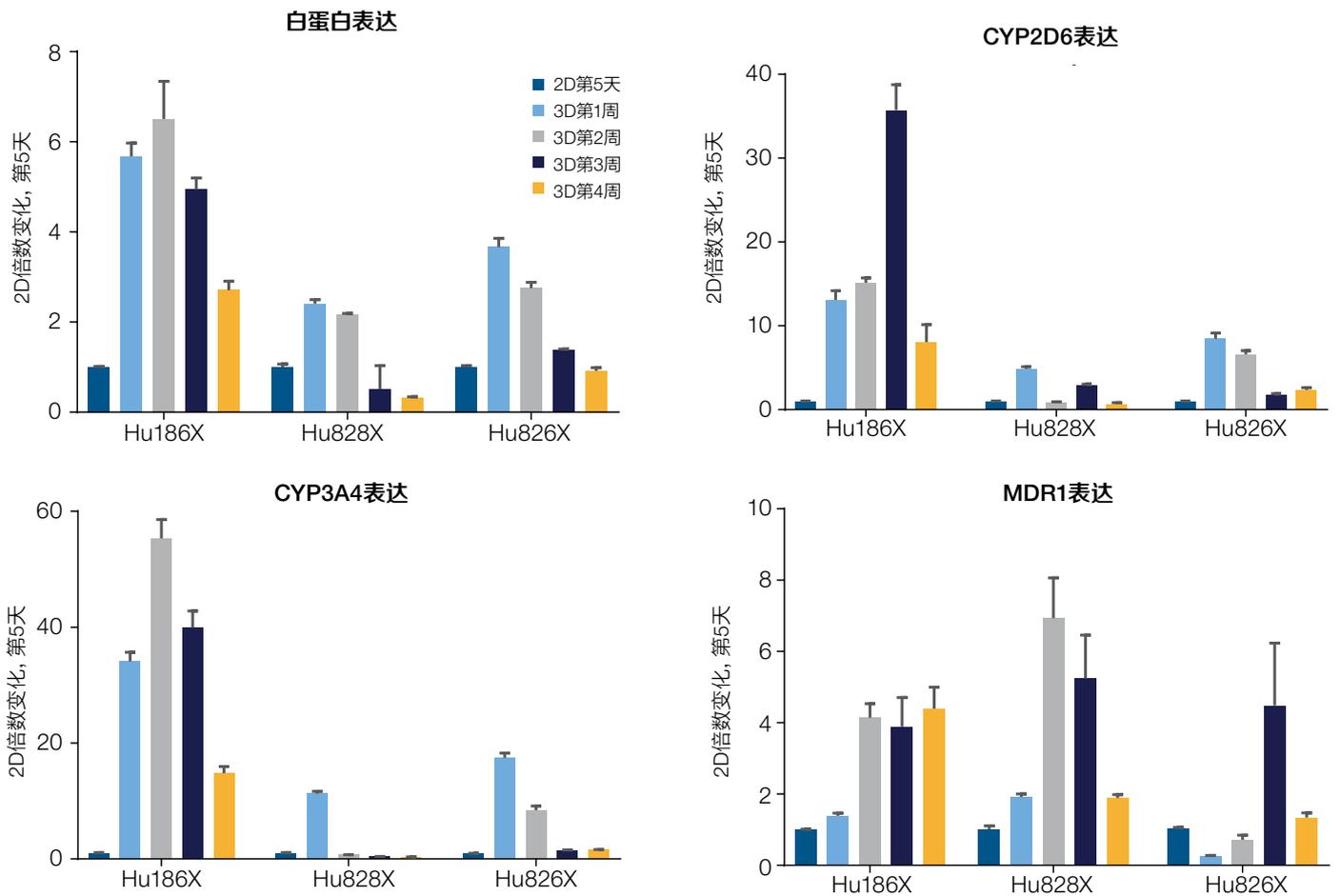


图7.7.肝脏基因表达的时间进程评价显示出球状体培养中的升高趋势。3个单独批次的Gibco™经球状体验证人肝细胞的白蛋白、CYP3A4、CYP2D6和MDR1 mRNA水平。将3D培养物在不同时间点的基因表达水平归一化至2D培养第5天。每个3D球状体样品包含1个球状体池(内含16个球状体)。结果为平均值± SEM; n=3个球状体池样品。

用于3D培养和动物球状体分析

动物（狗和啮齿动物）肝细胞可以用Thermo Scientific[™] Nunclon[™] Sphera[™] U型底孔板来形成球状体（图7.8）。

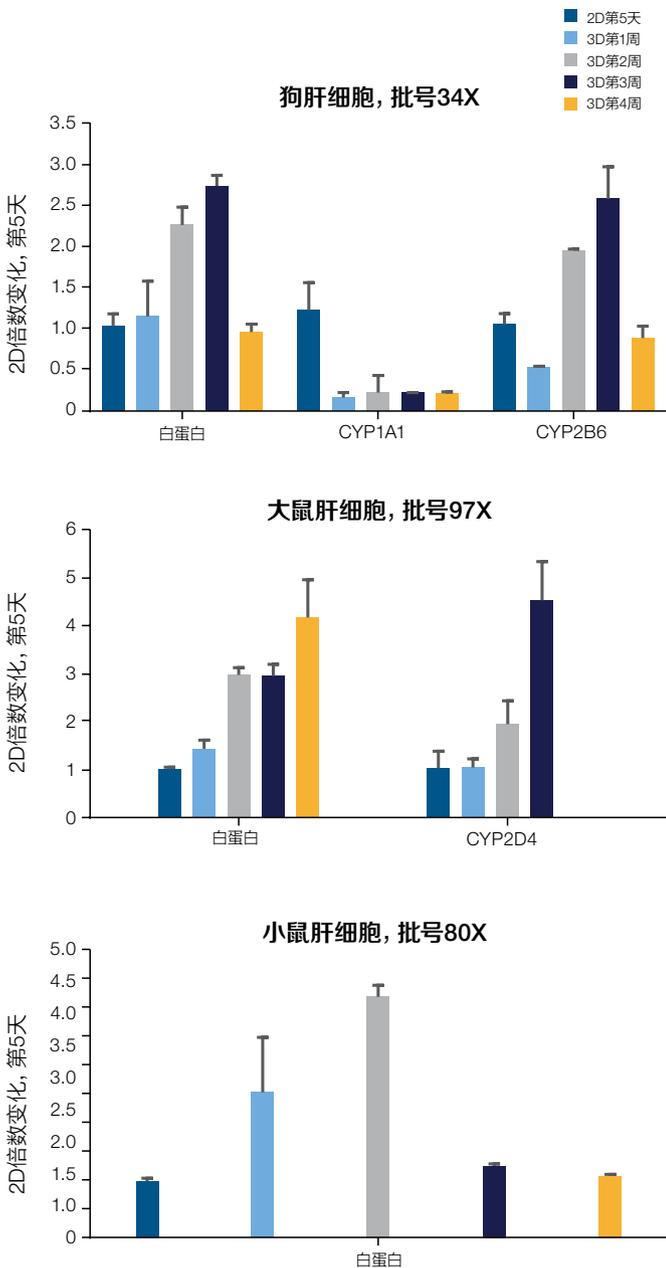


图7.8.用动物细胞形成的球状体分析。通过RT-qPCR测量基因表达水平, 以比较2D培养的第5天和3D培养不同天数的基因表达水平。

用于3D培养和动物球状体分析的HepaRG细胞

Gibco[™] HepaRG[™]细胞可用于3D建模, 以快速形成球状体并获得可重现的结果。HepaRG细胞仅需2-3天即可轻松组装成有活性的3D球状体, 并且产生的CYP活性高于2D培养物的HepaRG细胞（图7.9）。

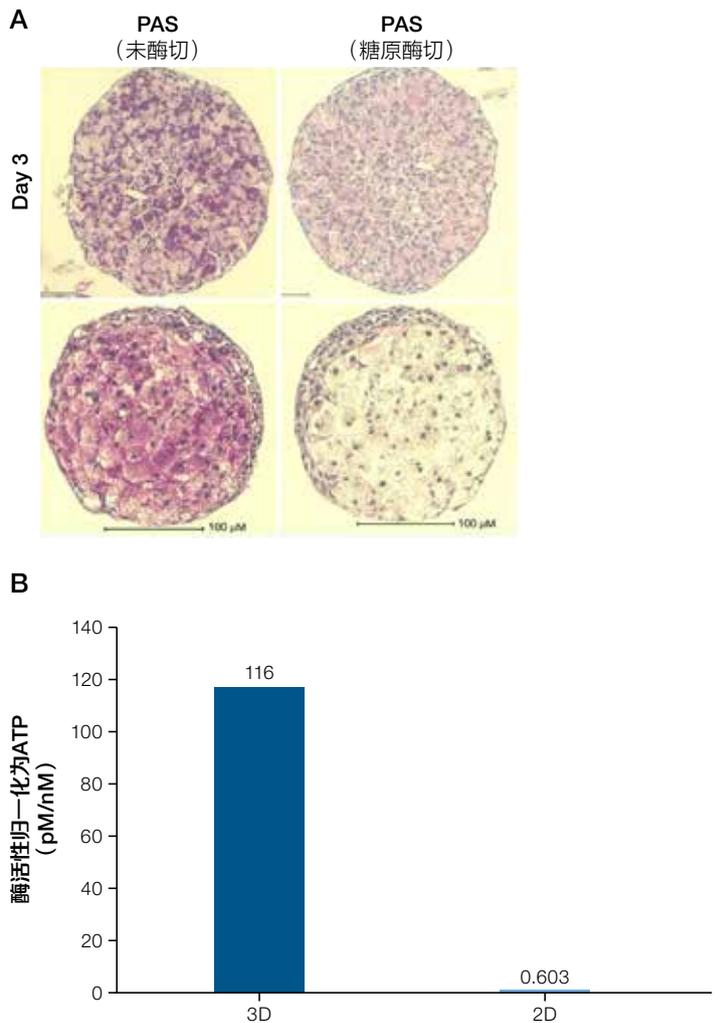


图7.9.HepaRG球状体显示出更高的糖原贮积和基础CYP活性。(A) HepaRG细胞的过碘酸希夫(PAS)染色显示糖原贮积。HepaRG球状体显示糖原贮积随着时间的推移而增加。(B) 球状体中的基础CYP3A4活性比单层培养物约高出200倍。

7.4

肠道模型

肝脏球状体在长达3周的时间内表现出稳定的形态和活性。此外，它们表达正常的肝脏表面标记物和肝酶，并且对氯丙嗪等化合物表现出敏感性，这意味着它们可用于毒理学和ADME研究。最后，这些球状体显示出胆管的形成，这是肝癌衍生球状体培养物所不具有的特征（图7.10）

从了解肠道的胚胎发育和成体稳态，以及结直肠癌等疾病的病因学，到探索肠道微生物组在人类健康中的作用，肠道3D模型的应用范围十分广泛。

20世纪70年代，来源于结肠腺癌的Caco-2细胞成为研究肠上皮功能的常用细胞模型。该细胞系已被用作药物吸收和渗透性的筛选工具，但它缺乏正常肠上皮细胞的多样性、功能和结构。2009年，Clevers和Kuo实验室报告建立了用于生长来源于成体肠道干细胞的类器官的培养条件，这种类器官可再现小肠和结肠上皮的结构和功能（Sato 2009; Ootani 2009; Sato 2011; Jung 2011）。在这些报告之后，将iPSC分化为小肠和结肠类器官的方案和技术相继发表。尽管这些类器官可能无法像成体干细胞一样在体外完全成熟，但这些iPSC衍生模型可能包含其他间充质成分（Spence 2011; Forster 2014; Munera 2017）。此外，已对用于培养成体干细胞衍生类器官的培养条件进行了改进，以支持结直肠癌组织的分离和扩增（Sato 2011; van de Wetering 2015; Fujii 2016）。这些癌症类器官与患者源性异种移植模型具有类似效应，它们可以在无需动物宿主的情况下繁殖癌组织，同时保留原始组织的特征。正因如此，当人们需要大规模培养类器官以进行筛选时，它们成为了极具吸引力的方法。事实上，已经建立了结直肠癌生物库，并且已证明其能够预测对治疗的反应性（van de Wetering 2015; Ooft 2019）。

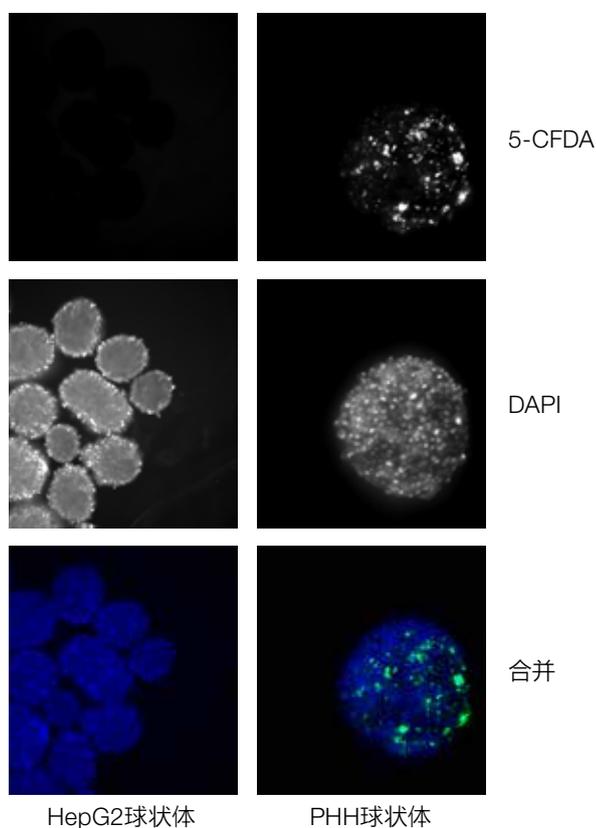


图7.10.肝脏球状体培养中胆管的形成。使用CFDA和DAPI，在第14天对HepG2肝癌球状体（左）进行染色，并在第7天对肝脏球状体（右）进行染色（10x放大）。与HepG2球状体相比，肝脏球状体显示出明显的胆管形成。

7.5

肾脏模型

Kim及其同事利用人肠道芯片来研究肠道环境中的共生生物。除微生物组外，还对肠蠕动和炎症进行了研究。研究人员发现，当肠蠕动停止时，细菌就会过度生长。由此产生的炎症类似于人类炎症性肠病(Kim 2015b)。3D肠道培养有助于研究疾病中的肠道微生物组。这方面在兽医学中尤为重要，因为牲畜容易遭受沙门氏菌和其他引起幼畜腹泻的物种的感染，继而带来经济损失。Derricott及其同事最近使用牛和猪肠道类器官培养物来研究刚地弓形虫和肠道沙门氏菌的感染。他们发现可以将从屠宰场获得的活类器官冷冻保存并复苏，然后成功进行感染(Derricott 2019)。由于刚地弓形虫和肠道沙门氏菌均为人类病原体，这些类器官培养物对人类健康也具有意义。这些研究证明了此类3D肠道培养的多种用途。

肾脏生理学研究的3D模型已被用于从研究肾毒性到疾病过程的各种应用。根据研究的描述，器官型模型可以模拟肾脏复杂性。该模型源自成人肾脏，可分化为具有生理活性的小管(Jun 2018)。作者假设他们的模型应该可用于疾病研究。

使用器官芯片模型来研究庆大霉素毒性；该模型使用已灌注的3D肾脏类器官来研究肾脏清除率。通过观察以连续输注或团注形式给药的庆大霉素的药代动力学特征，来评估肾毒性。研究人员发现，连续输注庆大霉素的测量结果显示膜通透性增加、细胞活性降低并且细胞连接减少，与此相比，团注给药时造成的肾毒性更小(Kim 2016)。综上所述，这些数据证明了已灌注的器官芯片模型在研究正常和异常条件下肾脏生理学的有用性。

最后，了解复杂的细胞相互作用是新药研发的基础，这推动Nugraha及其同事创建了3D共培养系统，从而了解肾脏纤维化的发展并筛选有前景的治疗化合物。该系统允许研究人员在高通量系统中检查上皮-间充质串扰(Nugraha 2017)，从将基础研究与新药研发相结合。

7.6

肺模型

肺是与空气接触并交换气体的复杂器官，它在每次呼吸都会发生机械变形。然而，近年来的研究进展使得通过3D细胞培养技术再现肺功能成为可能。Huh及其同事创建了一个器官芯片模型，该模型能够捕捉人肺部的肺泡-毛细血管界面。研究人员利用这个模型证明了细胞会对二氧化硅微粒、细菌和其他刺激（包括机械应力）做出反应。虽然该模型不能完全捕捉肺功能（例如肺泡巨噬细胞对肺功能的影响），但它捕捉到的信息足以进行新药筛选（Huh 2010）。

3D肺模型也被用于呼吸疾病模型。Gercken及其同事在一个模型中使用获取自供体的组织切片来建立呼吸疾病（如肺纤维化）的3D模型。通过使用充满琼脂的肺组织，研究人员建立了用于研究各种疾病过程的模型。论文中描述了从切除的肺组织生成3D模型的详细方案（Gerckens 2019）。

Deslee及其同事利用从刷取物中获得的原代支气管上皮细胞设计了慢性阻塞性肺疾病（COPD）模型。使细胞生长为球状体，然后在各种刺激下模拟作为COPD过程的一部分的慢性炎症。该3D模型呈现了一种研究慢性阻塞性肺病如何发生和进展的方法（Deslee 2007）。

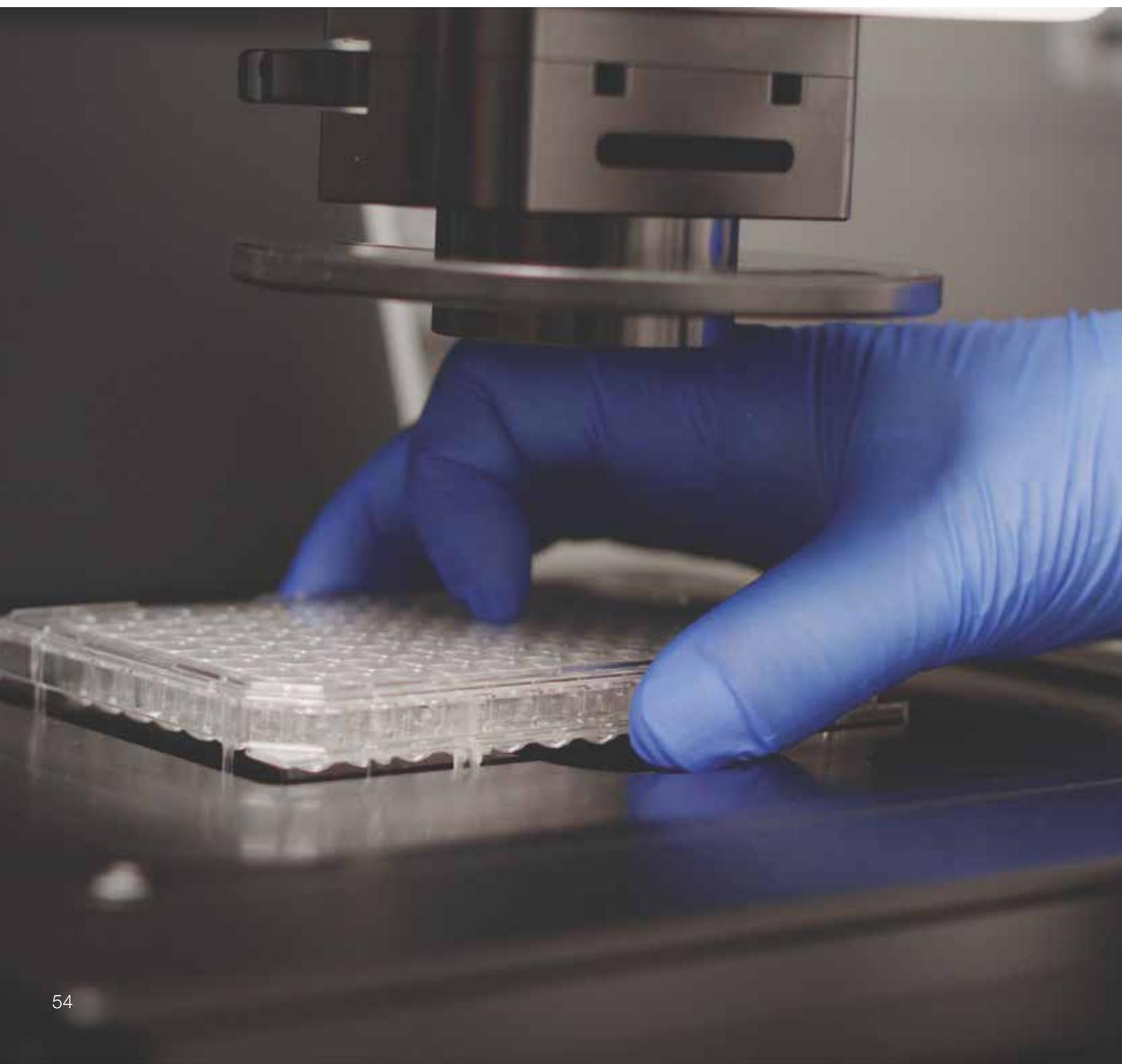
气道平滑肌（ASM）质量增加和肥大细胞浸润是哮喘的病理生理特征，通常称为气道重构。为了研究气道重构、肥大细胞和ECM之间的关系，Ceresa及其同事创建了一个3D模型，其中将胶原中的气道细胞单独培养或与肥大细胞一起培养。他们观察到肥大细胞可促进气道细胞增殖和基质金属蛋白酶的产生，并且3D系统准确地再现了哮喘病理生理学的几个特征（Ceresa 2009）。

流感是一种呼吸疾病，其每年在全球范围内的发病率和死亡率都相当高。Zhou及其同事使用肺类器官培养物研究了流感病毒的传染性。由于流感病毒株会通过基因重组而发生变化，这种模型将有助于确定禽流感病毒株或其他物种中出现的病毒株对人类的感染性。肺类器官提供了一种快速评估病毒感染性的方法，可在实验室间进行标准化（Zhou 2018）。

使用烟草制品对肺造成的伤害仍然是重大公共卫生问题。为了研究香烟烟雾对肺部的影响，Kuehn及其同事使用器官型3D培养物来观察各种参数，例如反复暴露于香烟烟雾或空气（对照）后的纤毛跳动频率和细胞色素P450活性。研究人员在论文中介绍了详细的研究方案。实时测量颗粒沉积可以校准烟雾暴露。除纤毛跳动频率和细胞色素P450活性变化外，在暴露于香烟烟雾后还检测到了转录组的变化（Kuehn 2015）。

第8部分

服务



8.1

定制细胞服务

研究人员不断地被要求将他们的研究过渡到更具有生理相关性的模型中，但实现这一目标的途径并不总是明朗易行的。无论您的团队是需要帮助开发正确的3D细胞模型，还是有兴趣将研究项目的步骤外包，我们的CellModel™服务团队都可以针对您的研究需求提供量身定制的解决方案。

我们会与客户公开分享用于建立3D模型的所有方法和方案，从而确保在服务结束时顺利过渡。我们可以与您合作的领域包括：

定制细胞系和3D模型的创建

永生细胞系

- T47D或MDA-MB-231 (乳腺)
- HepG2 (肝脏)
- HCT116 (结肠)
- PC3或LNCaP (前列腺)
- A549 (肺)

原代细胞系和共培养物

- 原代肝细胞 (人、大鼠、小鼠、狗、猴)
- 非实质细胞系 (如Kupffer细胞、星形细胞)
- 角质形成细胞
- 内皮细胞

干细胞和类器

- 神经元模型
- 肠道模型

定制培养基创建和服务

- 我们在3D模型服务中全程使用Gibco™培养基、添加剂和试剂，以确保提供最高质量的3D模型
- 所有培养基和试剂均可随时提供，您可以在服务结束后继续在实验室中培养您的3D模型

特性研究和表达服务

标准成像

- 使用Invitrogen™ EVOS™ M7000成像系统对您的3D模型进行固定或活细胞成像

高分辨率成像 (共聚焦)

- 使用Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 LZR HCA平台对您的3D模型进行固定或活细胞成像

基因表达谱分析

- 将使用Applied Biosystems™ TaqMan®基因表达检测试剂盒对3D模型的基因表达水平 (mRNA) 进行分析

功能读数和功能活性评估

- 使用我们的Invitrogen™染料和试剂目录产品对您的3D模型进行功能评估

细胞储存

- 我们将大规模繁殖并储存3D模型，以支持筛选活动；包括使用Gibco培养基和添加剂生长3D模型

筛选和谱分析

- 我们拥有超过20年的谱分析经验，可为您的3D模型执行定制筛选项目，以帮助支持您的新药研发计划

我们始终致力于扩展现有细胞系的列表，并开发全新和改进的方法来生长3D模型。即刻联系我们的团队，我们将向您介绍可提供的服务、培训或演示。

详情请访问 thermofisher.com/askdiscovery

第9部分

参考文献

第1部分: 3D细胞模型简介

Aboulkheyr Es et al. *Trends Biotechnol.* 2018;36(4):358–371.
Amann et al. *Sci Rep.* 2017;7(1):2963.
Benien and Swami. *Future Oncol.* 2014;10(7):1311–1327.
Chen et al. *Trends Mol Med.* 2018;24(9):805–820.
Däster et al. *Oncotarget.* 2017;8(1):1725–1736.
Edmondson et al. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(4):207–218.
Fang and Eglen. *SLAS Discov.* 2017;22(5):456–472.
Horvath et al. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(11):751–769.
Lv et al. *Oncol Lett.* 2017;14(6):6999–7010.
Mazzoleni et al. *Genes Nutr.* 2009;4(1):13–22.
Mittal et al. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):8352–8380.
Petersen et al. *Proc Soc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(19):9064–9068.
Rios and Clevers. *Nat Methods.* 2018;15(1):24–26.
Rossi et al. *Nat Rev Genet.* 2019;19(11):671–687.
Schwank et al. *Cell Stem Cell.* 2013;13(6):653–658.
Takahashi. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2019;59:447–462.
Tiriac et al. *Cancer Discov.* 2018;8(9):1112–1129.
Yamada et al. *Makromol Chem Rapid Commun.* 1990;11(11):571–576.
Yang et al. *Biomaterials.* 2005;26(33):6415–6422.
Yang et al. *Biomaterials.* 2007;28(34):5033–5043.
Zhang et al. *Ann Biomed Eng.* 2017;45(1):148–163.

第2部分: 培养概述

Carlson et al. *Curr Protoc Cell Biol.* 2008;Chapter 19:Unit 19.9.
de Souza. *Nat Methods.* 2018;15(1):23.
Dekkers et al. *Nat Med.* 2013;19(7):939–945.
Ding et al. *Nature.* 2012;481(7382):457–462.
Drost et al. *Nat Protoc.* 2016;11(2):347–358.
Editorial. *Nat Cell Biol.* 2018;20(6):633.
Edmondson et al. *Assay Drug Dev Technol.* 2014;12(4):207–218.
Fang and Eglen. *SLAS Discov.* 2017;22(5):456–472.
Fennema et al. *Trends Biotechnol.* 2013;31(2):108–115.
Hoppensack et al. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014;20(7):599–609.
Huch and Koo. *Development.* 2015;142(18):3115–3125.
Kaushik et al. *Stem Cells.* 2018;36(9):1329–1340.
Narsinh et al. *Mol Ther.* 2011;19(4):635–638.
Ootani et al. *Nat Med.* 2009;15(6):701–706.
Sachs et al. *Cell.* 2018;172(1–2):373–386.
Sutherland et al. *Cancer Res.* 1981;41(7):2980–2984.
Sutherland et al. *J Natl Cancer Inst.* 1971;46(1):113–120.
Song et al. *Sci Rep.* 2019;9(1):5977.
Srinivasan et al. *J Lab Autom.* 2015;20(2):107–126.
Takahashi and Yamanaka. *Cell.* 2006;126(4):663–676.
Takai et al. *Sci Rep.* 2016;6:21174.
Ude et al. *J Nanobiotechnology.* 2019;17(1):70.
Vlachogiannis et al. *Science.* 2018;359(6378):920–926.
Yan et al. *Sci Rep.* 2019;9(1):1295.

第3部分: 3D细胞模型中使用的细胞系的来源

- Baghbaderani et al. *Stem Cell Rev Rep*. 2016;12(4):394–420.
- Baptista et al. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1285.
- Bardelli and Moccetti. *Stem Cells Int*. 2017;2017:6406025.
- Chen and Pruetz-Miller. *Stem Cell Res*. 2018;31:186–192.
- Ben Jehuda et al. *Stem Cell Rev Rep*. 2018;14(3):323–336.
- Centeno et al. *Mol Neurodegener*. 2018;13(1):27.
- Cesarz and Tamama. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9176357.
- Chonghalle. *Sci Transl Med*. 2018;10(451):eaau7377.
- Driehuis and Clevers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2017;312(3):G257–G265.
- Dutta et al. *Trends Mol Med*. 2017;23(5):393–410.
- Gholami et al. *Cell Rep*. 2013;4(3):609–620.
- Gillet et al. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(7):452–458.
- Gomez-Lechon et al. *J Cell Physiol*. 1998;177(4):553–562.
- Goodspeed et al. *Mol Cancer Res*. 2016;14(1):3–13.
- Horii et al. *Int J Mol Sci*. 2013;14(10):19774–19781.
- Huch and Koo. *Development*. 2015;142(18):3115–3125.
- Hussain. *Genetic Engineering & Biotechnology News*. 2017;37(13).
- Jiang et al. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(1):17–24.
- Kaushik et al. *Stem Cells*. 2018;36(9):1329–1340.
- Kelava and Lancaster. *Dev Biol*. 2016;420(2):199–209.
- Kropp et al. *Process Biochem*. 2017;59:244–254.
- Lancaster et al. *Nature*. 2013;501(7467):373–379.
- Malik and Rao. *Methods Mol Bio*. 2013;997:23–33.
- Marti et al. *Nat Protoc*. 2013;8(2):223–253.
- McCauley and Well. *Development*. 2017;144(6):958–962.
- McCracken et al. *Nature*. 2014;516(7531):400–404.
- Mesquita et al. *Stem Cells Int*. 2019;2019:9704945.
- Mummery et al. *Stem Cells: Scientific Facts and Fiction, Second Edition*. 2014. Academic Press. pp 101–129.
- Nagle et al. *Semin Cancer Biol*. 2018;53:258–264.
- Namekawa et al. *Cells*. 2019;8(1):74.
- Rossi et al. *Nat Rev Genet*. 2018;19(11):671–687.
- Sanchez et al. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:44.
- Selby et al. *SLAS Discov*. 2017;22(5):473–483.
- Skottke et al. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):1998.
- Staudt. Human Cancer Models Initiative. 2016. Available at <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/blog/2016/human-cancer-models-initiative-launch>; accessed October 10, 2019.
- Tiriac et al. *Cancer Discov*. 2018;8(9):1112–1129.
- Ulrich and Pour. Cell Lines. In: Brenner and Miller (editors), *Encyclopedia of Genetics*. 2001. Available at <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/cell-lines>; accessed October 10, 2019.
- Wang et al. *Oncotarget*. 2018;9(63):32191–32203.
- Wilding and Bodmer. *Cancer Res*. 2014;74(9):2377–2384.
- Young et al. *Cell Stem Cell*. 2016;18(4):533–540.
- Yu et al. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193694.
- Zhang and Manninen. *Methods Mol Biol*. 2019;1926:77–84.

第4部分: 基质

Breslin and O' Driscoll. *Drug Discov Today*. 2013;18(5-6):240-249.
Caliari and Burdick. *Nat Methods*. 2016;13(5):405-414.
Chida et al. *Cytotechnology*. 2013;65(6):955-965.
Chittajallu et al. *Nat Methods*. 2015;12(6):577-585.
Diekjürgen and Grainger. *Biomaterials*. 2017;141:96-115.
Dhaliwal. *Mater Methods*. 2012;2:162.
Doyle. *Curr Protoc Cell Biol*. 2016;72:10.20.1-10.20.16.
Franco-Barraza et al. *Curr Protoc Cell Biol*. 2016;71:10.9.1-10.9.34.
Godugu et al. *PLoS One*. 2013;8(1):e53708.
Gupta et al. *Cytotechnology*. 2016;68(1):45-59.
Guzman et al. *Biomaterials*. 2017;115:19-29.
Goertzen et al. *Biol Proced Online*. 2018;20:20.
Hayashi and Furue. *Stem Cells Int*. 2016;2016:5380560.
Jongpaiboonkit et al. *Biomaterials*. 2009;29(23):3346-3356.
Knight and Przyborski. *J Anat*. 2015;227(6):746-756.
Morizane et al. *J Neurosci Res*. 2011;89(2):117-126.
Neal et al. *Nanomater Environ*. 2014;2(1):1-12.
Oda et al. *J Biol Chem*. 2010;285(38):29270-29278.
Ovsianikov et al. *Trends Biotechnol*. 2018;36(4):348-357.
Raghavan et al. *Oncotarget*. 2016;7(13):16948-16961.
Rossi et al. *Nat Rev Genet*. 2018;19(11):671-687.
Shimizu et al. *Circ Res*. 2002;90:e40-e48.
Shimomura et al. *J Exp Orthop*. 2018;5(1):2.
Sin et al. *Sci Rep*. 2017;7(1):2585.
Stadler et al. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(10):1907-1921.
Sui et al. *Curr Prot Hum Genet*. 2018;99(1):e68.
Takagi et al. *Sci Adv*. 2016;2(4):e1500887.
Tibbitt and Anseth. *Biotechnol Bioeng*. 2009;103(4):655-663.
Türker et al. *Biomater Sci*. 2018;6(7):1745-1753.
Worthington et al. *Front Oncol*. 2015;5:92.
Xie et al. *Nat Sci Rep*. 2017;7:14070.

第5部分: 培养基和添加剂

Boj et al. *Cell* 2015;160(1-2):324-328.
Clinton and McWilliams-Koeppen. *Curr Protoc Cell Bio*. 2019;82(1):e66.
Diao et al. *Cell Death Dis*. 2019;10(3):238.
Devall et al. *PLoS One*. 2020;15(1):e0227116.
Dowling and Clynes. *Proteomics*. 2011;11(4):794-804.
Dye et al. *Elife*. 2015;4:e05098.
Freedman et al. *Nat Commun*. 2015;6:8715.
Grassi et al. *Cell Death Dis*. 2019;10(3):201.
Guha et al. *Oncotarget*. 2019;10(58):6245-6259.
Huch et al. *Nature*. 2013;494(7436):247-250.
Iefremova et al. *Cell Rep*. 2017;19(1):50-59.
Ísberg et al. *Sci Rep*. 2019;9(1):14843.
Iscove et al. *Blood*. 1971;37(1):1-5.
Kaya et al. *Mol Vis*. 2019; 25:663-678.
Kessler et al. *Nat Commun*. 2019;10(1):1194.
Kim et al. *Stem Cell Reports*. 2019;12(3):518-531.
Koning et al. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(12):2257-2273.
Lancaster et al. *Nature*. 2013;501(7467):373-379.
Lee et al. *Nat Methods*. 2007;4(4):359-365.
Li et al. *Nat Commun*. 2018;9(1):2983.
Li et al. *Cell Stem Cell*. 2016;19:516-529.
Lucey et al. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(9):1463-1467.
Morizane et al. *Nat Biotechnol*. 2015;33(11):1193-1200.
Muotri et al. *Stem Cells Dev*. 2018;27(22):1549-1556.
Ootani et al. *Nat Med*. 2009;15(6):701-706.
Pappas et al. *J Vis Exp*. 2019;152:10.3791/60346.
Paşca et al. *Nat Methods*. 2015;12(7):671-678.
Pawitan. *Biomed Res Int*. 2014;2014:965849.
Proctor et al. *Arch Toxicol*. 2017;91(8):2849-2863.
Rodríguez-Hernandez et al. *Int J Curr Res Acad Rev*. 2014;2(12):188-200.
Sachs et al. *Cell* 2018; 172(1-2):373-386.e10.
Sato et al. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1762-1772.
Sato et al. *Nature*. 2009;459(7244):262-265.
Simian and Bissell. *J Cell Biol*. 2017;216(1):31-40.
Smits et al. *NPJ Parkinsons Dis*. 2019;5:5.
Spence et al. *Nature*. 2011;470(7332):105-109.
Strikoudis et al. *Cell Rep*. 2019;27(12):3709-3723.
Szvicsek et al. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(12):2463-2476.
Takebe et al. *Cell Rep*. 2017;21(10):2661-2670.
Uchida et al. *JCI Insight*. 2017;2(1):e86492.
Watson et al. *Nat Med*. 2014;20(11):1310-1314.
Wilkinson et al. *Stem Cell Transl Med*. 2017;6:622-633.
Yao et al. *Reprod Med Biol*. 2017;16(2):99-117.
Zhou et al. *Cell Stem Cell*. 2017;21(2):274-283.e5.

第6部分: 成像和分析

- Almasi et al. *Cell Physiol Biochem*. 2019;52(4):742–757.
- Assinger et al. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122527.
- Burgess et al. *PLoS One*. 2018;13(6):e0197517.
- Danahay et al. *Cell Rep*. 2015;10(2):239–252.
- Eke et al. *Int J Oncol*. 2016;48(1):313–321.
- Freimark et al. *Int J Artif Organs*. 2010;33(4):193–197.
- Gieseck et al. *PLoS One*. 2014;9(1):e86372.
- Goldshstein et al. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;16:378–390.
- Graf and Boppart. *Methods Mol Bio*. 2010;591:211–227.
- Hanson et al. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(19–20):2463–2471.
- Heng et al. *Biol Proceed Online*. 2009;11:161–169.
- Holville and Martin. *Curr Prot Immunol*. 2016;112:14.38.1–14.38.24.
- Hongisto et al. *PLoS One*. 2013;8(10):e77232.
- Hou et al. *SLAS Discov*. 2018;23(6):574–584.
- Huang et al. *Cancer Res*. 2017;77(21):6011–6020.
- Kim et al. *Biomater Res*. 2016;20:2.
- Lakner et al. *Sci Rep*. 2017;7:42730.
- Legrand et al. *Blood*. 2001;97(2):502–508.
- Montoya et al. 2019; poster available at: <http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/posters/new-improved-cellular-health-evaluation-microplate-reader-assays-poster.pdf>
- Nunez et al. *Cytometry A*. 2004;61A(1):56–61.
- Palmer et al. *J Vis Exp*. 2016;114:e54255.
- Piccinini et al. *Biol Proced Online*. 2017;19:8.
- Proffitt et al. *Cytometry*. 1996;24(3):204–215.
- Richardson and Lichtman. *Cell*. 2015;162(2):246–257.
- Rotman and Papermaster. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 1966;55(1):134–141.
- Sargent. Cell Culture Dish. Spheroid cell culture—practical solutions for frequently asked questions. Available at <https://cellculturedish.com/spheroid-cell-culture-practical-solutions-for-frequently-asked-questions/>; accessed October 10, 2019.
- Sart et al. *Nat Commun*. 2017;8(1):469.
- Takeuchi et al. *Sci Rep*. 2014;4:4488.
- Tsuji et al. *Cell Transplant*. 2017;26(6):1089–1102.
- Wu et al. *Microsyst Nanoeng*. 2018;4:21.
- Zhu et al. *Neurosci Bull*. 2017;33(1):95–102.

第7部分: 疾病和生理学研究中的3D细胞培养模型

- Booij et al. *SLAS Discov*. 2019;24(6):615–627.
- Brancato et al. *Acta Biomater*. 2017;75:200–212.
- Ceresa et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;296(6):L1059–L1066.
- Courau et al. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):74.
- D' Aiuto et al. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):134.
- Derricott et al. *Cell Tissue Res*. 2019;375(2):409–424.
- Deslee et al. *Respir Res*. 2007;8(1):86.
- Forster et al. *Stem Cell Reports*. 2014;3(1):215.
- Fujii et al. *Cell Stem Cell*. 2016;18(6):827–838.
- Gerckens et al. *J Vis Exp*. 2019;144:e58437.
- Godoy et al. *Arch Toxicol*. 2013;87(8):1315–1530.
- Groger et al. *Sci Rep*. 2016;6:21868.
- Huh et al. *Science*. 2010;328(5986):1662–1668.
- Iwasaki et al. *Cancer Res*. 1990;50(8):2429–2436.
- Jun et al. *PLoS One*. 2018;13(10):e0206447.
- Jung et al. *Nat Med*. 2011;17(10):1225–1227.
- Kim et al. *Biofabrication*. 2016;8(1):015021.
- Kim et al. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2016;113(1):E7–E15.
- Kim et al. *Nat Protoc*. 2015;10(7):985–1006.
- Kozyra et al. *Sci Rep*. 2018;8(1):14297.
- Kumar et al. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(2):1353–1354.
- Kuehn et al. *J Vis Exp*. 2015;96:e52325.
- Múniera et al. *Cell Stem Cell*. 2017;21(1):51–64.e6.
- Nugraha et al. *Sci Rep*. 2017;7(1):14490.
- Ootani et al. *Nat Med*. 2009;15(6):701–706.
- Ooft et al. *Sci Transl Med*. 2019;11(513):eaay2574.
- Phan et al. *Commun Biol*. 2019;2:78.
- Sant and Johnston. *Drug Discov Today Technol*. 2017;23:27–36.
- Sato et al. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1762–1772.
- Sato et al. *Nature*. 2009;459(7244):262–265.
- Spence et al. *Nature*. 2011;470(7332):105–109.
- van de Wetering et al. *Cell*. 2015;161(4):933–945.
- Young and Reed. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2016;12(5):281–287.
- Zhou et al. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2018;115(26):6822–6827.

附录

方案与应用

A.1	多能干细胞分化为神经类器官	61
A.2	B-27添加剂在建立和表征衍生自单层扩增NSC的功能性3D神经球状体模型中的使用	66
A.3	PSC衍生多巴胺能神经元的3D建模	70
A.4	球状体高通量荧光成像及分析	75
A.5	借助3D球状体培养手段研究药物代谢	83
A.6	使用人原代肝细胞3D球状体培养系统体外评价肝功能	87
A.7	在高通量平板上形成均匀且可重复的3D癌症球状体	93
A.8	使用3D球状体培养进行用于新药研发和开发的药物代谢途径基因表达谱分析	97
A.9	在载板系统中的Nunc插入式细胞培养器上构建人皮肤组织	102
A.10	癌症球状体的生成—提示和技巧	106
A.11	在研究中利用新维度: 全面了解球状体培养	110
A.12	通过高通量筛选检测分析癌症球状体	117

A.1

多能干细胞分化为神经类器官

简介

细胞培养技术的最新进展集中体现在创建三维(3D)系统上,目的是尝试在体外表观体内条件下的细胞间关系和微环境。已有生物打印、微流体、器官芯片等多种组织工程技术成功用于生成3D培养^[1, 2]。利用成体和多能干细胞(ASC和PSC)生成3D器官样(即类器官)细胞模型的研究也取得了显著进展^[3-5]。基于PSC的方法通常首先在悬浮培养中聚集细胞,以形成称为胚状体(EB)的簇。这些簇中的细胞能够分化为多种类型,并且能够进行自组织和自形态发生,以这种方式创建一个复杂的细胞模型,更好地模拟给定组织类型的体内细胞间相互作用和微解剖结构。一些基于PSC的方法也需要将细胞包被在天然或合成的细胞外基质(ECM)样底物中^[6-8]。在所有方法中,都会应用生长因子、小分子和其他培养基添加剂来引导类器官系统的形成,这些应用都基于胚胎发生和成体干细胞生物学研究推断出的原理。现在有许多已发表的方法可用于生成各种类器官类型,举例来说,这些类器官涵盖大脑的不同部分,以及肝脏、肠道和肾脏等。

在类器官工作流程的各个阶段中会用到不同供应商的多种试剂,而这些试剂的相容性不确定是许多研究人员都会遇到的问题。这一问题可能对所需类器官系统的成功生成及其在实验室之间的重现性产生重大影响。从PSC生成神经类器官的既定工作流程通常遵循特定的步骤顺序,一般先从标准PSC培养开始,然后是EB形成、神经诱导、神经图式形成和类器官生长^[7, 9-12](图1)。每个步骤中,细胞培养基的组成对PSC的成功分化都至关重要。重要的是,必须根据经验确定给定PSC系的分化能力,对于所选的PSC细胞系,可能需要对分化方法进行一些优化。在本应用指南中,我们介绍了使用Gibco™ StemFlex™无饲养层的培养基、Gibco™ Geltrex™基质和Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™微孔板创建神经类器官和球状体的工作流程。



图1.从PSC培养形成神经类器官的重要步骤。

实验详细信息和结果

PSC培养

分化前, 使用StemFlex培养基维持H9人胚胎干细胞 (ESC) 和Gibco™人游离型诱导多能干细胞 (iPSC, 货号A18945), 并在Thermo Scientific™ Nunclon™ Delta组织培养皿上生长, 培养皿上涂有以1:100稀释的Geltrex经hESC验证且不含LDEV的低生长因子基底膜基质 (货号A1413301)。使用Gibco™ Versene™溶液 (货号15040066) 对PSC团块进行常规传代。

EB形成

使用StemFlex培养基 (货号A3349401) 在无饲养层的条件下培养PSC。当PSC培养物达到70-80%的融合度时, 使用Gibco™ StemPro™ Accutase™细胞解离试剂 (货号A1110501)、胰蛋白酶/EDTA溶液 (货号R001100) 或TrypLE™ Select

酶 (货号12563011) 将它们解离至单细胞悬液。使用Gibco™ 台盼蓝溶液 (货号15250061) 和Invitrogen™ Countess™ 3 FL自动细胞计数仪 (货号A49893) 测定细胞计数和活性。在Nunclon Sphera 96孔U型底微孔板 (货号174925) 中, 以每孔约 $6-9 \times 10^3$ 个细胞的密度将活细胞接种在含有Gibco™ RevitaCell™添加剂 (货号A2644501) 的StemFlex培养基中。Nunclon Sphera微孔板几乎无细胞附着, 促进了球状体形成的一致性。所有解离方法过夜形成EB的效果相同, 但添加RevitaCell添加剂后效果最佳 (图2)。

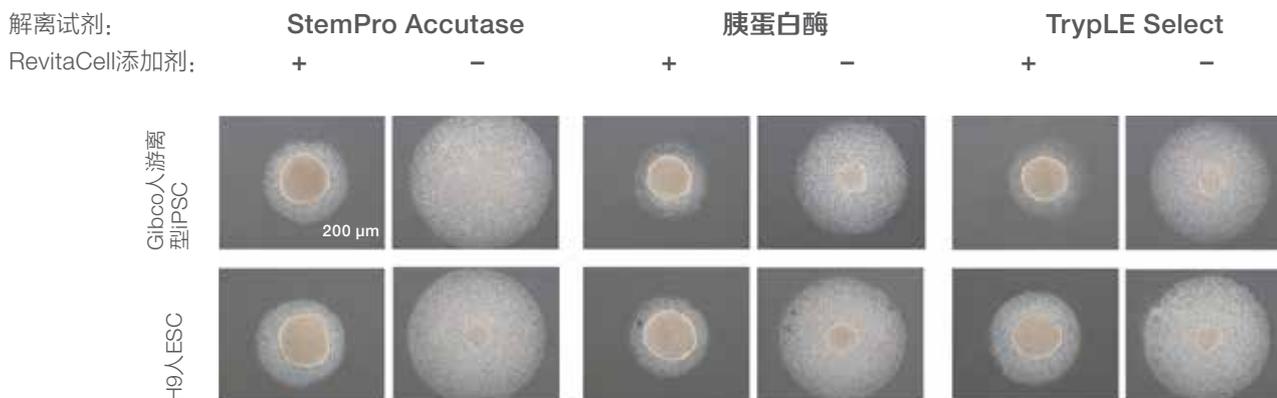


图2. RevitaCell添加剂可显著促进EB形成。通过不同方法分离PSC后的EB形成比较表明, 使用各种解离试剂的EB形成效果均相同, 但仅当培养基中含有RevitaCell添加剂时, EB形成的效果更佳。对EB形成无促进作用的细胞最终会在培养基更换过程中被冲走, 通常不会影响后续的步骤; 在本示例中, 这些细胞没有被冲走, 显示了EB形成的效率。

在没有RevitaCell添加剂的情况下,确实形成了小的EB,但效率极低,因为大多数细胞要么无法存活,要么无法自聚集(图2)。将EB培养3-4天,每隔一天用含有RevitaCell添加剂的StemFlex培养基更换75%的培养基。由此产生的EB大小一致,与接种的细胞数量成正比(图3)。

神经诱导和图式形成

EB形成后,通过连续进行3-4次75%体积的培养基更换,连续稀释并去除先前的培养基,以此诱导细胞聚集体分化为神经谱系。

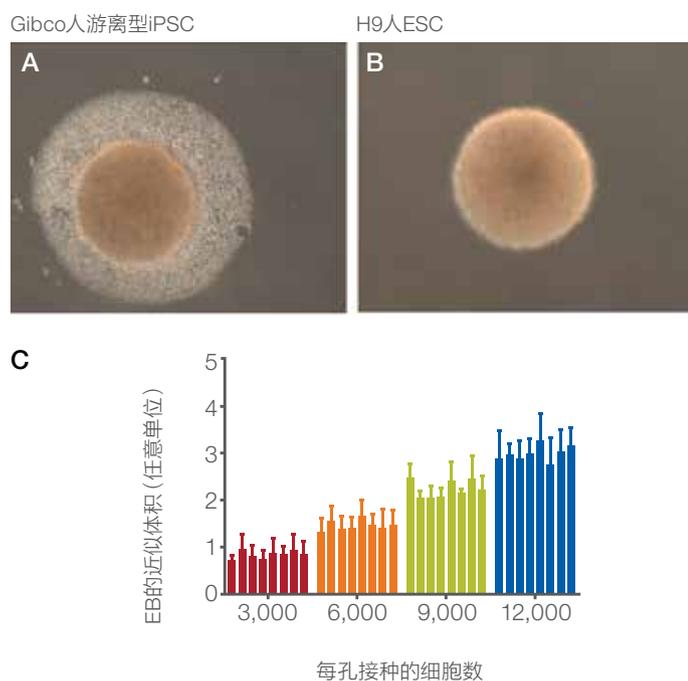


图3.含有RevitaCell添加剂的StemFlex培养基中所形成EB的评价。
(A, B)显示了衍生自两个不同PSC细胞系的代表EB培养4天后的图片。
(C)EB的大小与接种的细胞数量成正比。该图显示,所评价的每种细胞密度的8个平行样品之间的大小一致。数据通过使用ImageJ软件测量每个EB的面积而获得。然后使用该面积计算近似EB体积,并绘制在y轴上。

为神经谱系。神经诱导培养基由含有GlutaMAX™添加剂(货号10565018)和N-2添加剂(货号17502001)的Gibco™ DMEM/F-12组成。EB培养8-9天,每隔一天更换75%体积的培养基,直到EB的外层与较暗的中心相对比形成一个明亮的“圆环”(图4)。到第10天,将显示这种表型的每个EB包被在未稀释的Geltrex不含LDEV低生长因子基底膜基质(货号A1413201)中,并在37°C下孵育,直至形成凝胶状。Geltrex基质在这一应用中的使用已经在其他研究中得到了独立证明^[3]。将含有EB的Geltrex基质液滴转移到由含GlutaMAX添加剂的DMEM/F-12(货号10565018)、含GlutaMAX添加剂(货号35050061)的Gibco™ Neurobasal™培养基(货号21103049)以及含NEAA(货号11140050)、2-巯基乙醇(货号21985023)、胰岛素(货号12585014)、N-2添加剂(货号17502001)和B-27™添加剂减维生素A(货号12587010)的MEM组成的DMEM/F-12中。然后将包被的样本转移到Nunclon Sphera 6孔或24孔板(货号174932、174930)上,密度分别为每孔3-5或1-2滴。

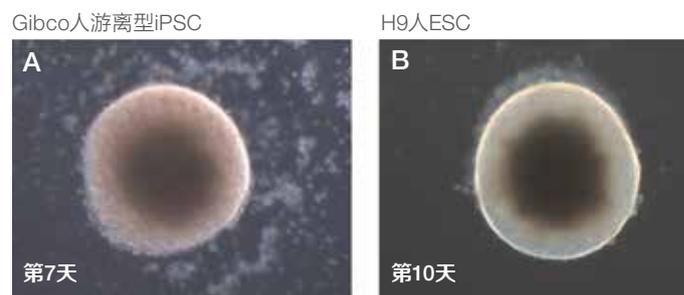


图4.神经诱导和图式形成。(A)明场图像显示第7天的EB。(B)第10天时, Geltrex基质包被前的神经化EB。

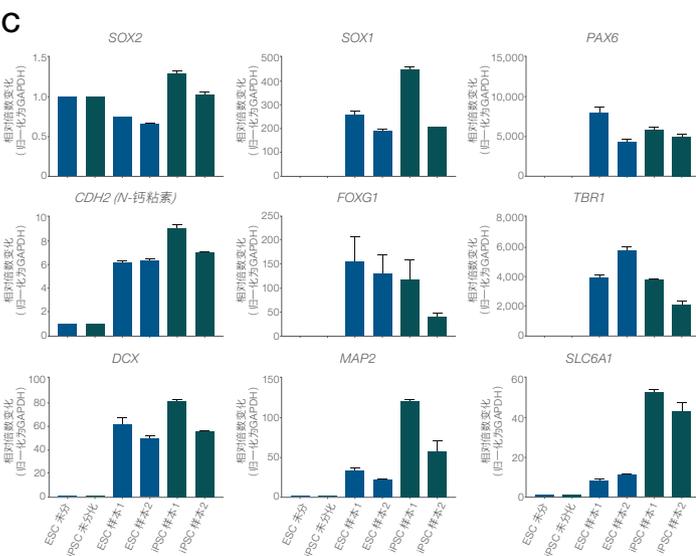
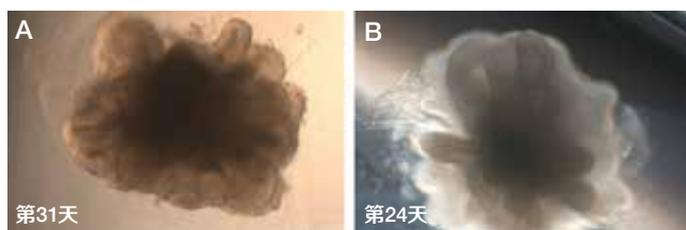
生长和成熟

将样本在与先前培养基配方相同的生长和成熟培养基中进行培养，不同的是在该培养基中添加B-27添加剂（货号17504044）。然后，在80-85 rpm的轨道摇床上培养神经类器官，每2-3天更换一次培养基。神经上皮在约一周内变得显而易见。这些样本可连续培养数周（图5A、B）或直至进行分析（如细胞组织、标记物表达）。例如，图5C指示，在培养的第39天已表现出多种神经细胞类型。基因表达分析表明，根据SOX1、SOX2和PAX6的表达，以及未成熟的神经元标记物

（如DCX和MAP2），这些类器官仍含有神经干细胞和祖细胞。但是，也检测到了特定神经区域的标记物，如TBR1（深层神经元）、FOXG1（前脑组织）和SLC6A1（编码脑皮质组织、海马体等组织中表达的GABA1转运体），表明存在更多分化的细胞类型。

Gibco人游离型iPSC

H9人ESC



D

基因	TaqMan检测试剂盒	细胞或组织
SOX2	Hs01053049_s1	神经干细胞、放射状胶质细胞
SOX1	Hs01057642_s1	神经干细胞
PAX6	Hs01088114_m1	神经干细胞、放射状胶质细胞
CDH2 (N-钙粘素)	Hs00983056_m1	神经外胚层
FOXG1	Hs01850784_s1	前脑
TBR1	Hs00232429_m1	深层神经元
DCX	Hs00167057_m1	神经元
MAP2	Hs00258900_m1	神经元
SLC6A1	Hs01104475_m1	大脑皮层、海马体

图5. 神经类器官的表型特征和基因表达分析。 (A, B) 神经类器官培养31天或24天时的明场图像显示复杂的神经上皮结构。(C) 神经类器官培养39天时的基因表达分析表明存在多种神经细胞类型，包括神经干细胞和神经元。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对于未分化的H9人ESC或Gibco人游离型iPSC的表达水平。展示了两个实验的样本数据。(D) 用于基因表达分析的Applied Biosystems™ TaqMan®检测试剂盒的总结。

结论

这些数据共同证明了StemFlex无饲养层的培养基和Nunclon Sphera 96孔U型底微孔板与EB形成和神经类器官分化的相容性。此外,我们还证明了Geltrex基质对神经类器官的包被和形态发生的有效性。总之,结果表明这三种产品可以成功地与通常用于神经类器官研究的现有Gibco基础培养基和添加剂结合使用。

参考文献

1. Bhatia SN, Ingber DE (2014) Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* 32:760–72.
2. Murphy SV, Atala A (2014) 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* 32:773–785.
3. Bartfeld S, Clevers H (2017) Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J Mol Med (Berl)* 95:729–738.
4. Clevers H (2016) Modeling development and disease with organoids. *Cell* 165: 1586–1597.
5. Drost J, Clevers H (2018) Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer* 18:407–418.
6. Sato T, Vries RG, Snippert HJ et al. (2009) Single Lgr5 stem cells build cryptvillus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 459:262–265.
7. Lancaster MA, Renner M, Martin CA et al. (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501:373–379.
8. Gjorevski N, Sachs N, Manfrin A et al. (2016) Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature* 539:560–564.
9. Mariani J, Simonini MV, Palejev D et al. (2012) Modeling human cortical development *in vitro* using induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:12770–12775.
10. Phillips AW, Nestor JE, Nestor MW (2017) Developing hiPSC derived serum free embryoid bodies for the interrogation of 3-D stem cell cultures using physiologically relevant assays. *J Vis Exp* 125:e55799.
11. Sloan SA, Darmanis S, Huber N et al. (2017) Human astrocyte maturation captured in 3D cerebral cortical spheroids derived from pluripotent stem cells. *Neuron* 95:779–790.e6.
12. Thomas CA, Tejwani L, Trujillo CA et al. (2017) Modeling of TREX1-dependent autoimmune disease using human stem cells highlights L1 accumulation as a source of neuroinflammation. *Cell Stem Cell* 21:319–331.e8.
13. Iefremova V, Manikakis G, Krefft O et al. (2017) An organoid-based model of cortical development identifies non-cell-autonomous defects in Wnt signaling contributing to Miller-Dieker syndrome. *Cell Rep* 19:50–59.

A.2

B-27添加剂在建立和表征衍生自单层扩增NSC的功能性3D神经球状体模型中的使用

简介

3D培养方法在生成干细胞衍生的神经元发育、成熟和疾病模型方面的广泛应用,使得能够创建比传统2D培养更复杂的细胞模型,从而更真实地再现体内神经架构和生理机能。

在本文中,我们评价了在单层培养中生成和扩增的神经干细胞(NSC)的分化和功能性成熟度,然后将其转移至促进3D球状体形成的条件中。本研究使用一系列分析工具,证明了我们的Sox2/巢蛋白阳性NSC能够形成3D球状体,并且这些球状体可以成熟地产生具有电活性神经元,并稳健表达与功能性突触和神经递质传递相关的基因。

目前,许多创建3D模型的方法依赖于为2D单层系统设计的试剂和工具。在本研究中,我们评估了为实现NSC向神经元的最佳分化而使用的多个专用培养皿、培养基组合、培养条件和试剂,以及这些变量对增殖、基因表达和成熟的影响。

我们的结果明确地证明了从2D NSC培养系统向3D系统过渡的可行性,以及优化多个关键培养系统参数的重要性,只有优化参数才能可重现地生成神经球状体并影响成熟率。确定在2D与3D系统中进行神经生物学建模和分析的相对优势,是一个热门的研究领域,我们在研究中也重点考虑了几个因素。

材料和方法

使用Gibco™ PSC神经诱导培养基(货号A1647801),将Gibco™人游离型iPSC细胞系(货号A18945)或H9 hESC分化为NSC(图1)。将传代6次后的细胞冷冻保存,解冻后接种到装有神经扩增培养基的Gibco™ Nunclon™ Sphera™ 96孔U型底微孔板(货号174925)中。培养7天后,将球状体转移到由含B-27™添加剂(货号1750404)的Gibco™ Neurobasal™培养基(货号21103049)或添加或不添加Gibco™ CultureOne™添加剂(货号A3320201)的Gibco™ B-27™ Plus神经元培养系统(货号A3653401)组成的成熟培养基中。

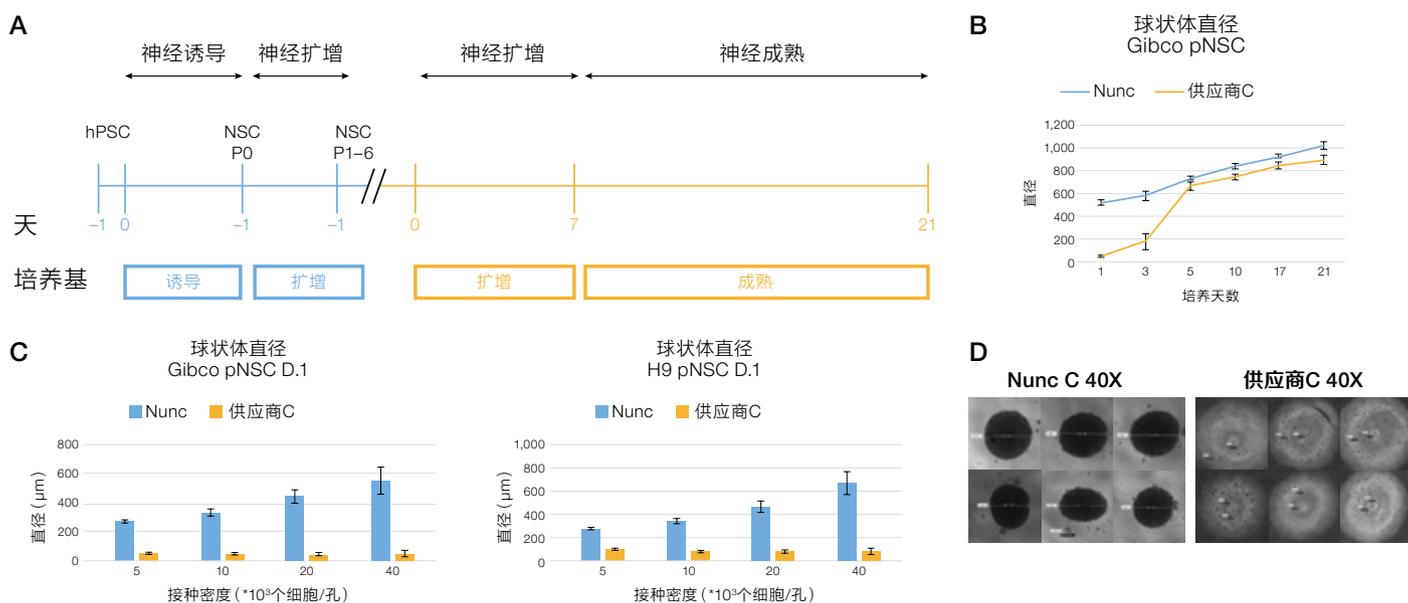


图1.建立神经球状体模型。(A) 生成神经球状体模型并等待其成熟的工作流程。(B, D) 与其他供应商的产品相比, 接种在Nunclon Sphera板中的NSC可快速形成大小均匀的球状体。(C) 从两个PSC细胞系 (iPSC左图, ESC右图) 生成的NSC以一定密度接种后, 在24小时内形成单一的球状体。(D) 在Invitrogen™ EVOS™ FL自动成像系统上采集的培养1天时的神经球状体相差图像。两个孔板均使用了相当的曝光设置。孔板尺寸的差异会影响图像亮度。

结果

含有B-27或B-27 Plus添加剂的成熟培养基产生了大小和形状相似的球状体(图2)。添加CultureOne添加剂导致球状体变小,形态更紧密,原因可能是祖细胞增殖减少。添加CultureOne添加剂可提高与功能性突触和神经递质传递相关的基因的表达水平(图3)。B-27Plus添加剂和CultureOne

添加剂中的培养物产生高水平的PVALB表达,表明这种GABA能神经元亚型的数量增加。在含有CultureOne添加剂的B-27 Plus神经元培养系统中成熟的球状体似乎包含更加密集和更具结构化的神经突网络。神经球状体具有电活性,包含兴奋性和抑制性神经元的混合群体(图4)。

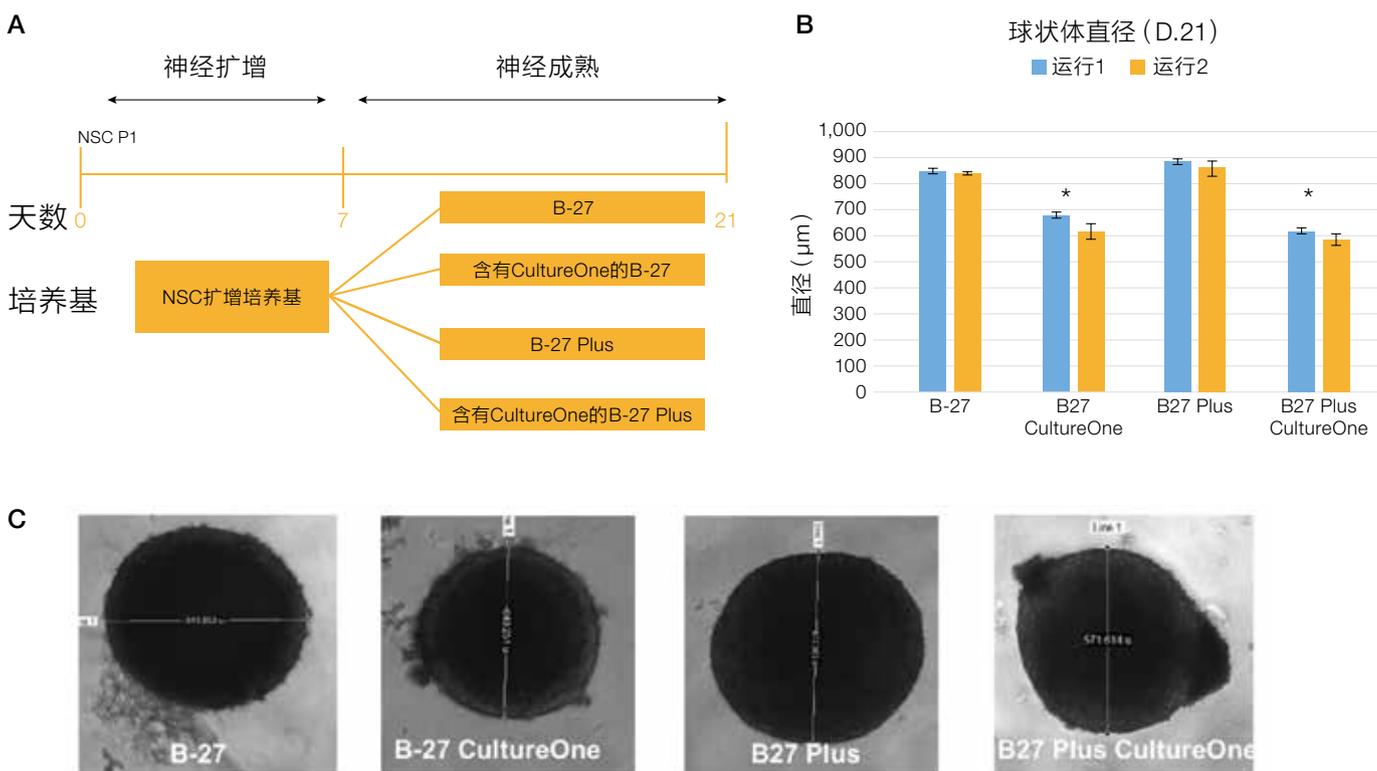


图2.神经球状体的成熟。(A) 球状体培养7天后转移到4种不同的成熟培养基中(如图所示)。(B) 在EVOS FL自动成像系统上采集的神经球状体培养21天时的相差图像显示,在含有CultureOne添加剂的培养基中培养的球状体发生形态变化。(C) 使用EVOS FL自动成像系统上的测量工具获得的两个独立实验中的球状体直径。添加CultureOne添加剂后观察到的差异具有统计学意义(学生t检验, $P < 0.001$)。

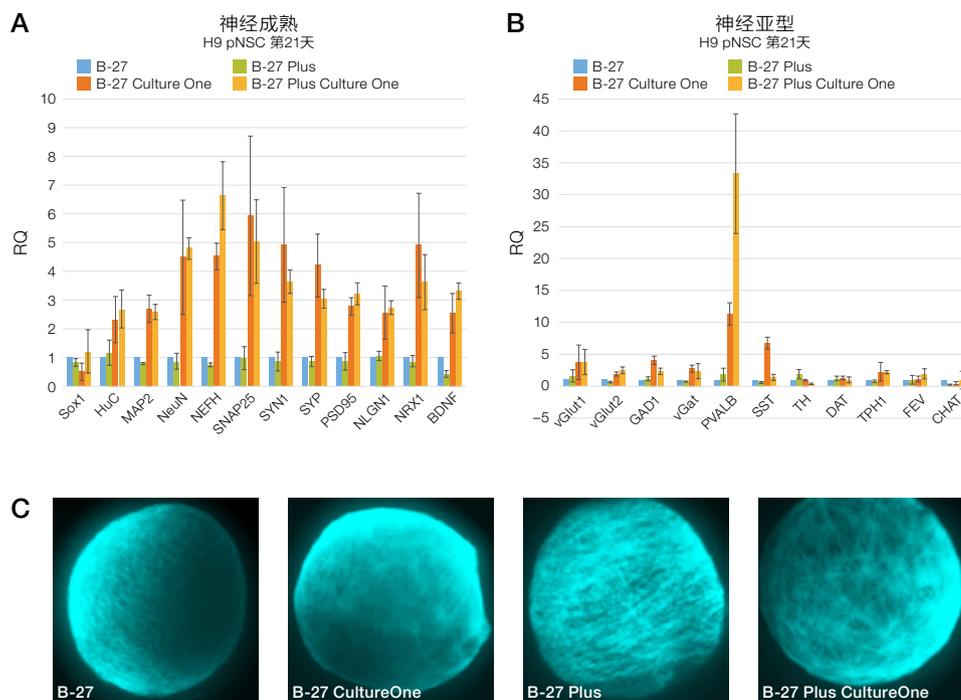


图3.神经球状体的表征。使用Applied Biosystems™ TaqMan® 检测试剂盒评估培养第21天时球状体 (A) 神经成熟和 (B) 亚型标记物的基因表达分析。(C) 使用Invitrogen™ Tubulin Tracker™ Deep Red (货号T34077) 染色的球状体, 标记了神经元过程。图像使用Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 LZR HCA平台采集。

总结

- 所述试剂与3D神经球状体培养的生成过程相容
- 添加CultureOne添加剂可调节神经球状体的增殖和成熟率
- 在B-27 Plus神经元培养系统中成熟的球状体会形成复杂的神经网络并具有电活性

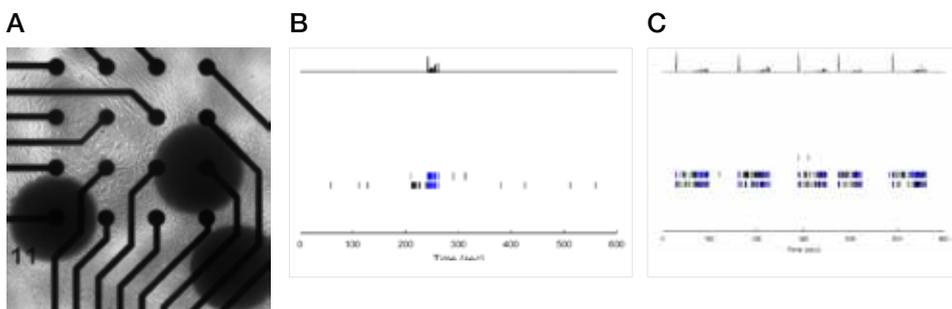


图4.神经球状体的功能评估。使用Axion Biosystems Maestro平台的多电极阵列 (MEA) 分析。(A) 附着于MEA表面的神经球状体的相差图像。使用1 μm印防己毒素 (GABA拮抗剂) (B) 处理之前和 (C) 之后的放电活动光栅图。

PSC衍生多巴胺能神经元的3D建模

简介

准确的神经系统疾病体外建模需要大脑的多种细胞类型相互作用，并向成熟功能发展。当人多能干细胞 (PSC) 在3D模型中进行神经分化时，子代细胞的自组织会产生具有脑样结构和功能的类器官，这在2D培养中未观察到。然而，神经类器官的复杂性增加往往以低通量和低重现性为代价。因此，用于新药研发的疾病模型可能必须通过对所需细胞类型的特异性诱导来调节自组织的复杂性。

为了建立帕金森病 (PD) 模型，我们探索了在3D中人PSC分化为中脑多巴胺能 (DA) 神经元的方法。为了比较对类器官结构的物理影响，我们使用了一套单独的培养基，该培养基之前在2D培养中针对中脑底板的特异性诱导、扩增和成熟进行了优化。尽管在3D中进行特异性诱导和分化所需的时间显著更少，但该培养基试剂盒用于在悬浮培养中特异性诱导底板和分化多巴胺能神经元。

我们测试了多项物理参数，包括旋转vs.静态悬浮，细胞外基质 (ECM) 内包被vs.培养基中稀释添加ECM分子。令人惊讶的是，添加稀释ECM的静态悬浮培养可以重现ECM包被的一些已知优势，例如形态复杂性和更快的神经元成熟，同时又不存在包被方法中存在的困难和低通量。

为了将这些前景广阔的步骤应用于帕金森病的可重现3D模型中，我们已经从经过CRISPR-Cas9技术工程改造以使 α -突触核蛋白 (SNCA) 中携带PD-连接A30P突变的iPSC细胞系和经过相同编辑过程的未改变野生型 (WT) 细胞系中生成了中脑类器官。在下文中，我们将描述我们对这些突变体和野生型类器官进行的氧化应激源反应测试。

为用于药物筛选，体外疾病模型必须能够以可重现的方式大规模生成。作为实现这一目标的第一步，我们测试了是否可以使用简单且可扩展的Gibco™ PSC多巴胺能神经元分化试剂盒制作中脑腹侧的3D类器官模型。有研究报告，类器官模型复杂性的增加取决于细胞与基底膜的相互作用。我们探索了添加或不添加细胞外基质 (ECM) 的类器官形成方法对复杂性和神经元成熟的影响。

方法

在附着培养中使用试剂盒进行2D特异性诱导，随后在扩增培养基中多次传代，直至第21天（图1）。然后将底板细胞在多聚-D-赖氨酸/层粘连蛋白表面上传代，分化多巴胺能神经元直至第35天。3D中脑类器官形成的方法始于旋转悬浮培养中的PSC。将这些细胞解离并接种到适用于底板特异性诱导的悬浮培养中，然后在悬浮状态下更换为扩增培养基和成熟培养基，无需进一步传代。对于底板标记物表达相当的3D培养，特异性诱导和扩增的时间可相应缩短。

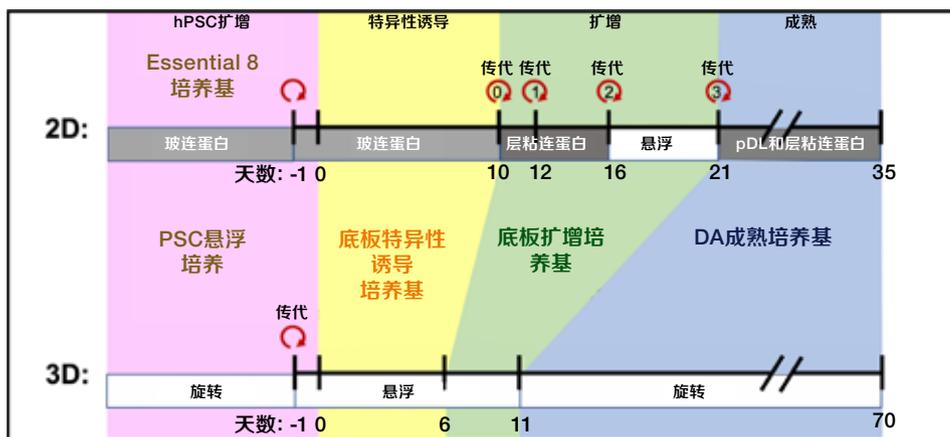


图1.使用PSC多巴胺能神经元分化试剂盒中的三种培养基进行底板衍生过程的工作流程。

结果

我们比较了未使用ECM培养的中脑类器官与使用ECM培养以及在U型底微孔板中生长的类器官的形态。ECM包被或U型底微孔板扩增促进了中脑底板类器官的形成(图2)。此外,在底板特异性诱导过程中,在微孔板中添加ECM改变了微孔类器官的结构(图3)。

进一步分析证实了中脑类器官的成熟和功能性活性。当使用ECM或在微孔中形成时,中脑类器官具有更复杂的上皮形态和更早期的多巴胺能神经元生长(图4)。在使用稀释Geltrex基质培养的微孔类器官中较早地检测到神经黑色素,这也表明多巴胺能神经元成熟得更快(图5)。微电极阵列(MEA)分析证实,在装有稀释Geltrex基质的微孔板中形成的中脑类器官可在短短5周内产生协调的多巴胺能活性(图6)。

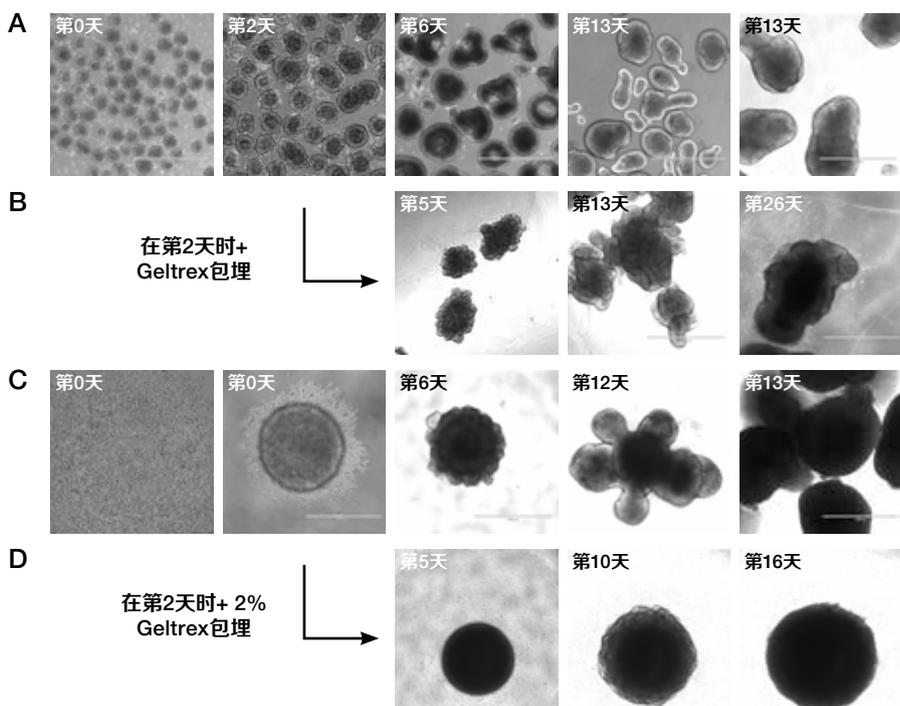


图2. ECM促进了类器官的形成。(A) 无ECM的旋转悬浮培养中hPSC的底板特异性诱导和扩增。天数和传代数的编号与图1中的示意图相对应。(B) 在旋转悬浮培养的底板特异性诱导期间,第2天时50% Gibco™ Geltrex™不含LDEV的低生长因子基底膜基质中的ECM包被。(C) 在不含ECM的Scientific™ Nunclon™ Sphera™ U型底微孔板中进行底板特异性诱导和扩增的静态悬浮培养。将球状体转移至旋转培养中以使其成熟。(D) 在第2天时使用添加2% Geltrex基质的底板特异性诱导培养基在微孔中进行静态悬浮培养。所有其他培养基的变化同上。比例尺: 1,000 μm。

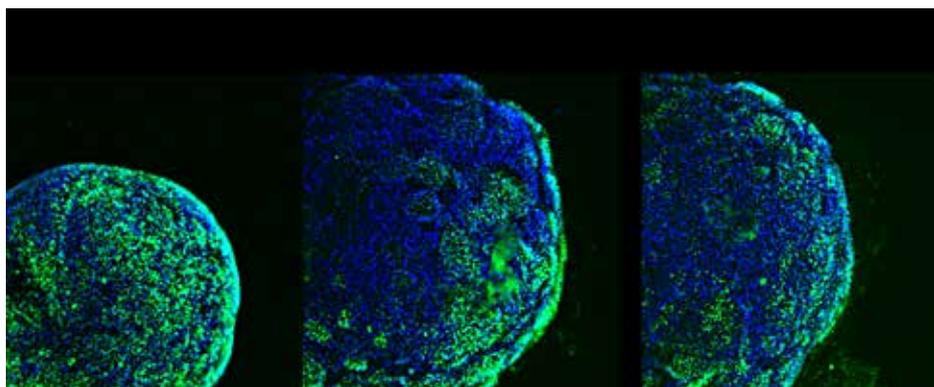


图3. 所添加的ECM使早期类器官呈现突出的玫瑰花样结构。通过方法C(无ECM)进行特异性诱导后的静态微孔类器官,在第2天添加200 g/mL层粘连蛋白(LAM),或添加2% Geltrex(GTX)基质。类器官在第7天时进行固定,并用N-钙粘素抗体和DAPI染色。在Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 LZR高内涵分析平台上进行8 μm光学切片的最大信号强度投影。

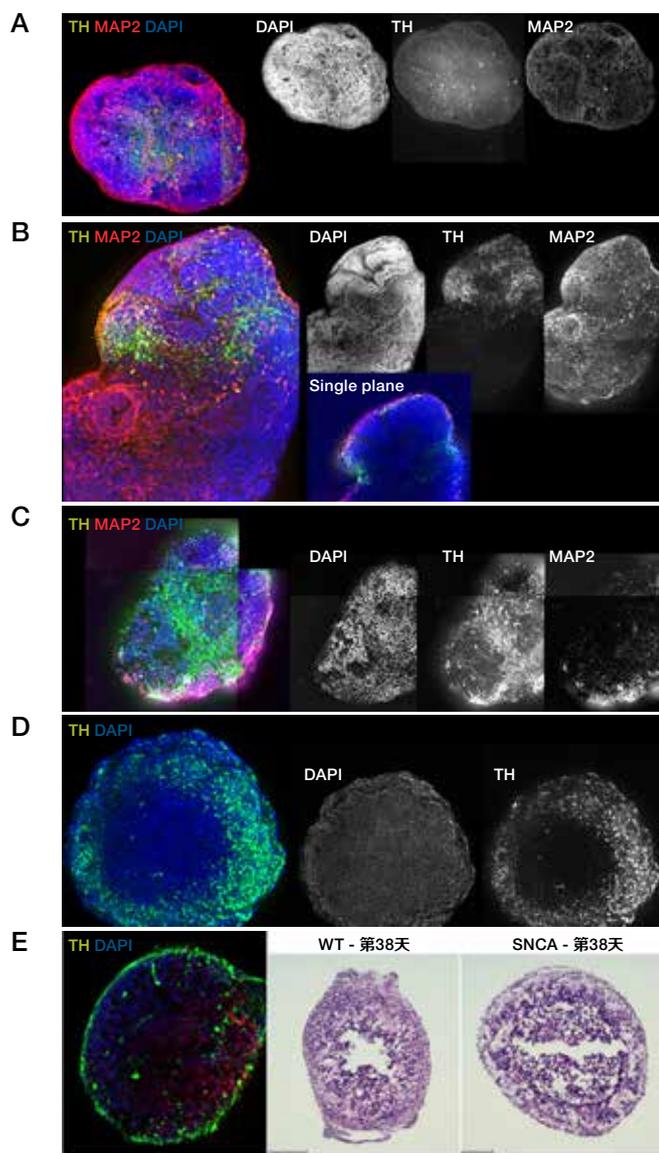


图4. ECM包被和U型底板微孔板增加了类器官复杂性和多巴胺能神经元的产量。在CellInsight CX7 LZR高内涵分析平台上采集了抗体染色后光学切片的最大信号强度投影。(A) 第19天时 (早期成熟) 的旋转悬浮类器官 (方法A), 用MAP2和酪氨酸羟化酶 (TH) 抗体染色。(B) 第19天时的包被类器官 (方法B), 用MAP2和TH抗体染色。(C) 第19天时的微孔类器官 (方法C), 用MAP2和TH抗体染色。(D) 第23天时的微孔类器官, 在第2天时在2% Geltrex基质中进行特异性诱导 (方法D), 用TH抗体染色。(E) 5周时的微孔类器官, 在2% Geltrex基质中进行特异性诱导, 切片用苏木精-伊红染色。染色显示, 在类器官外部, 有一圈围绕降解细胞致密核心的较宽细胞条带。

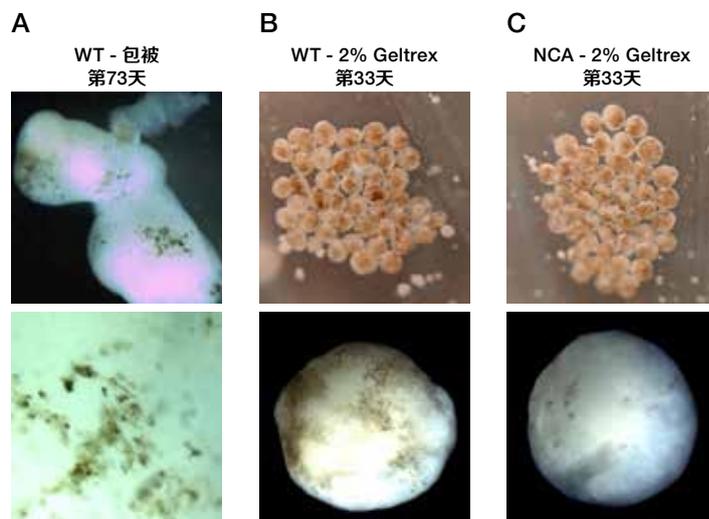


图5. ECM促进底板类器官的成熟。(A) 在第73天时采集的包被类器官 (方法B) 的图像, 无染料或染色。红棕色表明存在神经黑色素, 这是一种色素, 是多巴胺合成的副产品^[1]。(B) 第33天时的微孔类器官, 在2% Geltrex基质 (方法D) 中从SNCA野生型CRISPR iPSC细胞系中特异性诱导。(C) 第33天时的微孔类器官, 在2% Geltrex基质 (方法D) 中从SNCA A30P突变CRISPR iPSC细胞系中特异性诱导。

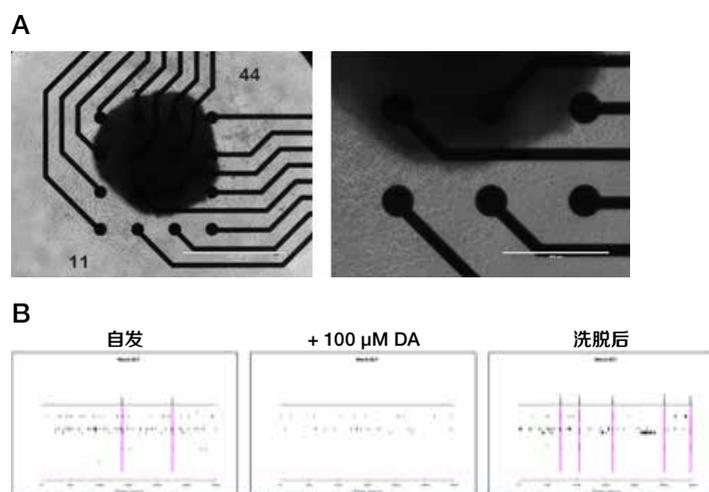


图6. 底板类器官在功能上成熟。(A) 在2% Geltrex基质中特异性诱导, 并在悬液中培养至第21天的微孔类器官, 随后在多聚-D-赖氨酸/层粘连蛋白包被的MEA上附着培养14天。(B) 微孔板类器官的MEA记录光栅图。每张图均显示了300秒的活性, 第一张在成熟培养基中, 第二张在添加100 μM多巴胺后, 第三张在多巴胺洗脱后。垂直的粉红色条柱表示检测到的网络簇放电。

这种3D培养技术适用于建立衍生自iPSC的中脑类器官中的氧化应激模型。结果证实，中脑类器官可由疾病相关的iPSC细胞系生成，并用于建立环境应激反应模型(图7)。

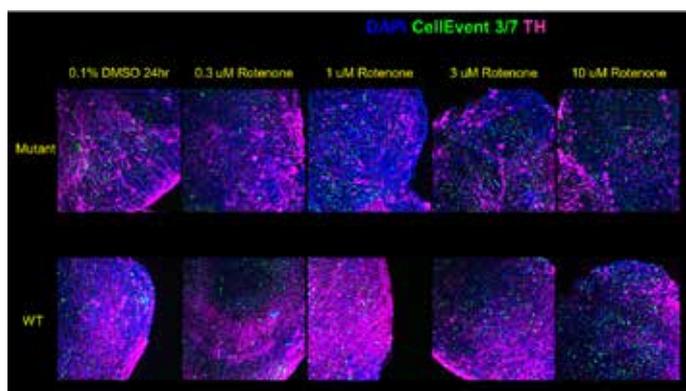


图7.建立底板类器官中的氧化应激模型。对在包含稀释Geltrex基质的多孔板中衍生自两个经CRISPR工程改造的iPSC细胞系的5周中脑类器官进行氧化应激测试。类器官在旋转悬浮条件下使用鱼藤酮处理20个小时。将处理过的类器官固定，使用甲醇和Triton™ X-100溶液进行连续透化，然后进行活性caspase-3和TH染色。随后，使用Invitrogen™ CytoVista™ 3D细胞培养透明化试剂对整装类器官进行透明化，并在CellInsight CX7高内涵分析平台上成像。可以对TH阳性神经元中的活性caspase-3染色进行定量，以测量应激敏感性。

总结

- 在ECM或微孔中形成的中脑类器官比游离悬浮中的类器官更复杂。
- ECM或微孔促进了类器官内多巴胺能神经元的分化
- 在底板特异性诱导过程中，微孔和稀释ECM的结合有助于多巴胺能神经元的早期成熟和功能活性
- 对于疾病模型脑类器官的生成，这种ECM和微孔结合的方法提供了比包被方法更高的通量

参考文献

1. Jo J, Xiao Y, Sun AX et al. (2016) Midbrain-like organoids from human pluripotent stem cells contain functional dopaminergic and neuromelanin-producing neurons. *Cell Stem Cell* 19(2):248–257.

A.4

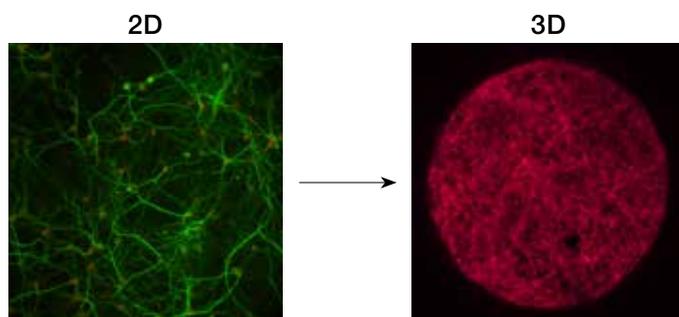
球状体高通量荧光成像及分析

高效培养、染色、成像和分析3D细胞培养物的提示、技巧和工具

简介

细胞不是孤立生长的, 传统的二维(2D)细胞培养单层模型缺乏生理方面相关的环境条件, 并且与完整的生物系统相比, 其物理和生物化学特征完全不同。由于更多生理方面相关的动物研究既耗时又昂贵, 需要能够弥补体外细胞检测与体内动物研究之间差距的实验模型。为了满足这一需求, 研究人员已开始转向研究三维(3D)类器官和肿瘤球状体系统, 这两种系统可模拟体内环境, 同时还保留了细胞检测方法的易操作性。这些3D模型系统具有多

种特征, 使其更类似于完整生物体中的细胞环境, 包括细胞间相互作用, 细胞与基质间相互作用, 相关基因表达谱以及氧、营养物质和代谢物的梯度^[1](图1)。由于3D球状体与肿瘤具有共同特征, 例如功能不同的区域其核心有凋亡或坏死区域, 外围有增殖细胞, 因此它们是癌症生物学和新药研发测试的出色模型。3D球状体的特征使研究人员可以更好地研究肿瘤核心区的化疗耐药性, 以改善药物输送, 和更多相关的药物筛选和药理学检测方法^[2-4]。



	2D单层	3D球状体
细胞相互作用	细胞间	细胞间、细胞与细胞外基质间
细胞活性	细胞粘附、增殖和修饰基因	增殖环; 凋亡或坏死核心
微环境	相对均匀	氧气、代谢物和营养物质的梯度

图1.2D和3D细胞模型比较。3D系统中的操作包括球状体形成。球状体是细胞的聚集体, 可以在悬浮中生长、包被或在3D基质顶层生长。与2D细胞模型相比, 3D球状体具有更类似于体内系统的细胞相互作用、细胞活性区域和微环境, 从而可以进行更多相关的药理学研究和构建更好的肿瘤模型。

3D细胞培养和分析工作流程

使用最佳的技术和细胞培养试剂，3D球状体可以在实验室中轻松生长，并可以使用各种荧光试剂进行染色，以检查分子定位和各种细胞功能。可以使用微孔板读数仪、荧光显微镜或高内涵成像系统对荧光标记的球状体进行成像和分析。在从细胞生长和染色再到成像和结果量化的完整3D细

胞培养工作流程中，我们提供一系列Invitrogen™和Thermo Scientific™细胞培养系统、试剂、仪器和分析软件供您使用（图2）。这些产品可以实现强大的3D细胞培养，并进行准确的成像和分析，用于更多生理方面相关的新药研发和癌症生物学应用。

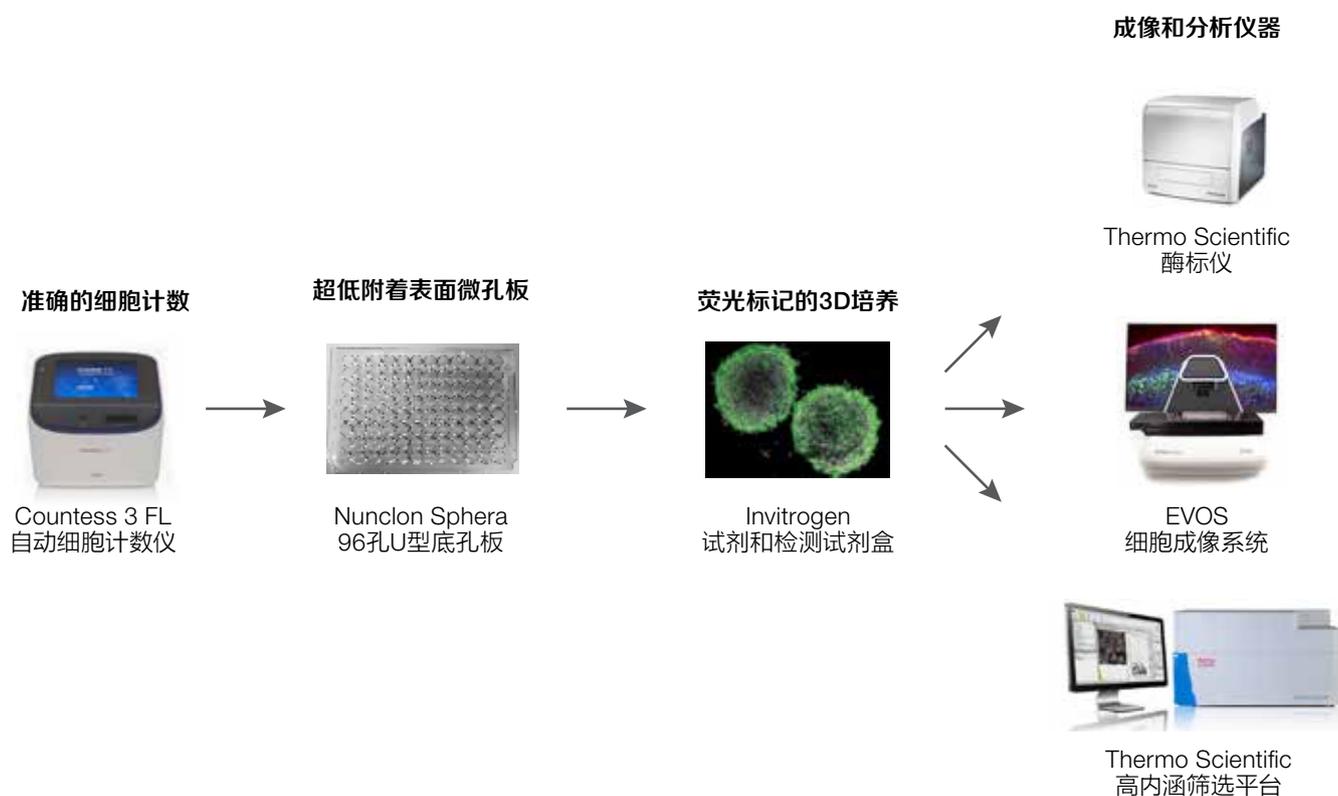


图2.球状体生长、染色、成像和量化工作流程。使用Invitrogen™ Countess™ 3 FL 自动细胞计数仪进行准确的细胞计数，可将细胞以适当的密度接种到Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™ 96孔U型底孔板上，该板的超低附着表面十分适合球状体生长。然后，可以使用Invitrogen™荧光试剂和检测试剂盒对球状体进行染色，然后在多个荧光平台上进行成像和分析，包括Thermo Scientific™微孔板读数仪、Invitrogen™ EVOS™细胞成像系统和Thermo Scientific™高内涵筛选（HCS）平台。

如何培养球状体

虽然在3D组装中生长细胞比单层培养技术更具挑战性,但许多细胞类型的球状体生长可以使用优化的工具和方法轻易完成。为了球状体能有效地在培养系统中生长,重要的是以适当的细胞密度接种细胞,并使用针对3D生长而优化的细胞培养板。与传统的经组织培养处理的孔板相比,这些孔板具有超低附着表面,有助于细胞在3D组装中聚集生长而不是在单个表面上生长。与其他类型的孔板相比,Nunclon Sphera 96孔U型底孔板具有超低附着的圆底表面,可最大限度地减少单层细胞粘附,促进单个球状体的生长,而非多个球状体或卫星样3D培养物生长(图3)。可以使用Countess 3 FL 自动细胞计数仪进行准确的细胞计数,以便将细胞以合适的密度接种到3D培养板上,然后生长为3D球状体。在孔板中接种适当数量的细胞后,也可以通过短暂离心来帮助细胞生长为3D细胞培养物。

因为在3D培养系统中生长的细胞是在一个自由浮动的3D结构中聚集生长,而不是附着在一个表面上,所以需要轻轻移液来改变培养基,但又不干扰到或吸走球状体。这可以通过在相对较大体积的培养基(例如,在96孔板中每孔200 μ L)中生长球状体,并每隔一天更换一半的培养基,而不是吸移整个体积的培养基来更轻松地实现。使用针对3D细胞培养而优化和验证的培养基和添加剂也能使球状体更快形成,这可以最大限度地减少培养基的更换次数,并使细胞更快成熟,成长为成熟表型。有些细胞可能还需要钙粘素等外部因子才能生长成3D复合物。

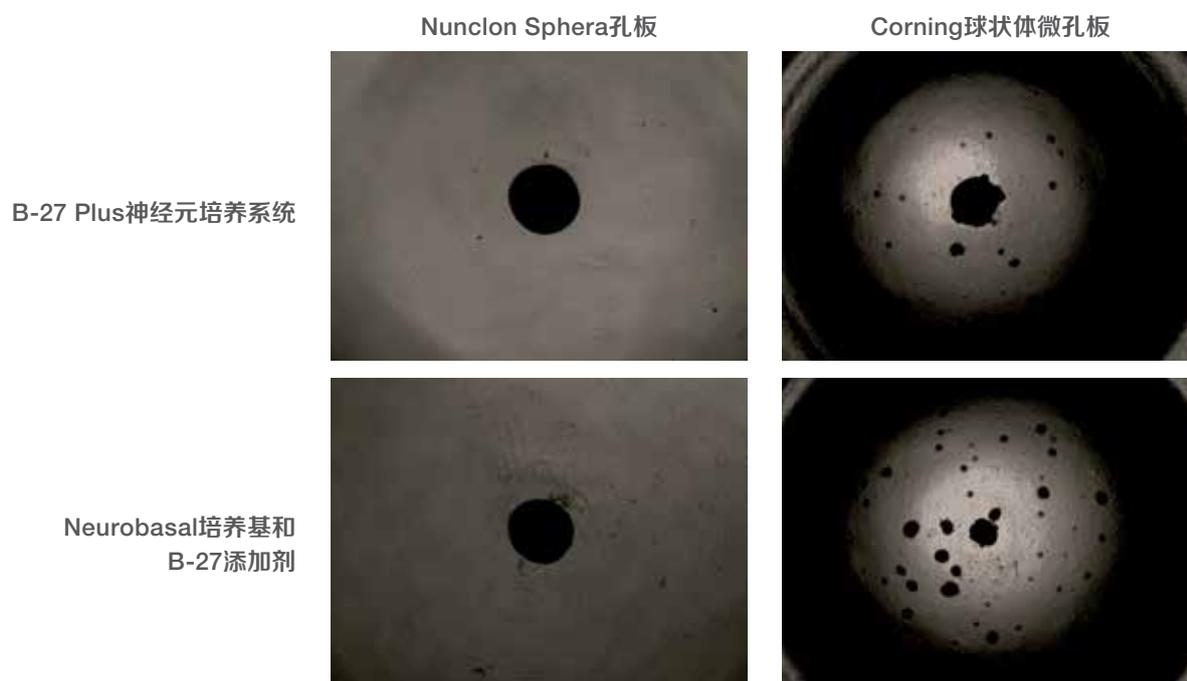


图3.球状体在Nunclon Sphera 96孔U型底孔板上生长最佳。神经干细胞(NSC)在Nunclon Sphera 96孔U型底孔板或Corning™ 96孔超低附着(ULA)球状体微孔板上以每孔5,000个细胞的密度接种,并在Gibco™ B-27™ Plus神经元培养系统或Gibco™ Neurobasal™培养基和B-27™添加剂中生长10天。Invitrogen™ EVOS™ XL Core成像系统上的成像显示,在Nunclon Sphera孔板上生长的NSC形成了单个、紧密的神经球状体,而其他孔板上生长的NSC则形成了带有卫星样培养物的多个球状体。

如何对球状体进行染色

球状体可以用各种荧光试剂进行染色,以检查3D细胞培养内分子的定位和丰度,以及活性、凋亡、线粒体健康状况和其他细胞功能(表1)。许多为2D细胞培养染色而开发的荧光染料和探针也可用于球状体的染色。然而,由于3D细胞培养物的密度比单层细胞更大,可能需要对浓度和孵育时间进行

优化,以使染料完全渗透到3D培养物的中心,可能需要增加洗涤步骤的持续时间以减少背景。固定和透化的球状体进行免疫染色时,在抗体染色溶液中加入5% DMSO可以帮助减少背景。

表1.在不同的检测平台上进行球状体染色和分析的荧光试剂和检测试剂盒。

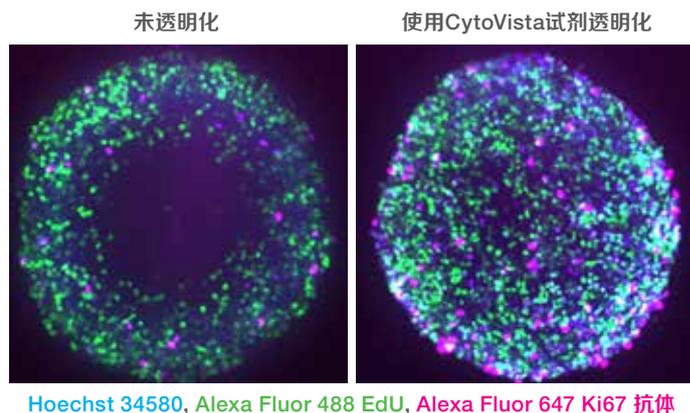
细胞功能	试剂或检测试剂盒	检测平台	实验指南	
			浓度*	培养时间
细胞凋亡	CellEvent Green Caspase-3/7	微孔板读数仪	0.33X	2 hr
		荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	1 hr
线粒体健康状况	MitoTracker Orange	微孔板读数仪	2X	1 hr
		荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	30 min - 1 hr
增殖	Click-iT EdU	荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	标准方案
活性	CyQUANT Direct Green	微孔板读数仪	1X染料, 2X背景抑制剂	45 min - 1 hr
	CyQUANT XTT	微孔板读数仪	2X	5-8 hr
	PrestoBlue HS	微孔板读数仪	1X	3-5 hr
	alamarBlue HS	微孔板读数仪	1X	3-5 hr
	CyQUANT LDH细胞毒性检测试剂盒	微孔板读数仪	1X	30 min
	CyQUANT LDH, 荧光	微孔板读数仪	1X	10 min
	LIVE/DEAD细胞活性/细胞毒性试剂盒	荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	标准方案
活性氧	CellROX Deep Red	荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	1 hr
缺氧	Image-iT缺氧试剂	荧光显微镜, 高内涵筛选	1X	1 hr

*所推荐的3D染色浓度为制造商推荐的2D染色工作条件下浓度的倍数。

球状体的成像和分析

一旦用所选的荧光试剂对球状体进行染色, 就有多种方法对其进行成像和分析, 以从3D细胞模型中获得数据。微孔板检测可用于快速评估整个球状体的一般细胞健康状况, 而更复杂的成像和分析允许通过光学切片分析来可视化球状体核心内的细胞, 并评估3D培养物中的单个细胞。根据所需的读取类型和详细程度, 可以用微孔板读数仪、荧光显微镜和高内涵筛选系统对荧光标记的球状体进行检测和分析。通常认为3D细胞培养物的核心无法良好地可视化是由于试剂渗透问题; 此外, 光散射也会严重限制球状体的成像。选择最佳的成像和分析系统可以对整个球状体进行荧光检测, 从而提高3D培养图像和数据的质量。

组织透明化试剂, 如Invitrogen™ CytoVista™ 3D细胞培养透明化试剂, 可以改善3D培养物的成像。用该试剂处理球状体改善了3D球状体核心中细胞的可视化, 从而能够更好地对球状体内的细胞进行荧光检测和分析(图4)。



Hoechst 34580, Alexa Fluor 488 EdU, Alexa Fluor 647 Ki67 抗体

图4.使用CytoVista 3D细胞培养透明化试剂透明化的球状体, 其核心的成像和分辨率得到提高。A549球状体在Nunclon Sphera 96孔U型底板板上以每孔5,000个细胞的密度生长。用10 μ M 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 孵育球状体1小时。将球状体固定并进行透化处理, 然后按照试剂盒方案使用Invitrogen™ Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 488 HCS检测试剂盒进行标记。还用Invitrogen™ Hoechst 34580和Ki67小鼠单克隆抗体对球状体进行染色, 该抗体已使用Invitrogen™ Zip Alexa Fluor™ 647快速抗体标记试剂盒进行标记。然后使用CytoVista 3D细胞培养透明化试剂处理球状体1小时或不进行处理。在Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7 LZR高内涵分析平台上使用共聚焦模式对球状体进行成像。该图像是100个2 μ m光学切片的最大信号强度投影。

微孔板读数仪

微孔板检测可用于快速评估细胞活性和健康状况，检测结果可作为药物表征等下游应用前的初步测量值。球状体需要更高的药物浓度才能发挥效力，因此与相同药物在2D培养中获得的IC50值相比，会产生不同的IC50值。使用微孔板读数仪和高内涵分析系统分析经药物处理的球状体，所得到的IC50值是相似的，这说明微孔板读数仪可用来快速筛选球状体的药物反应，并提供类似于逐个细胞量化的数据（图5）。

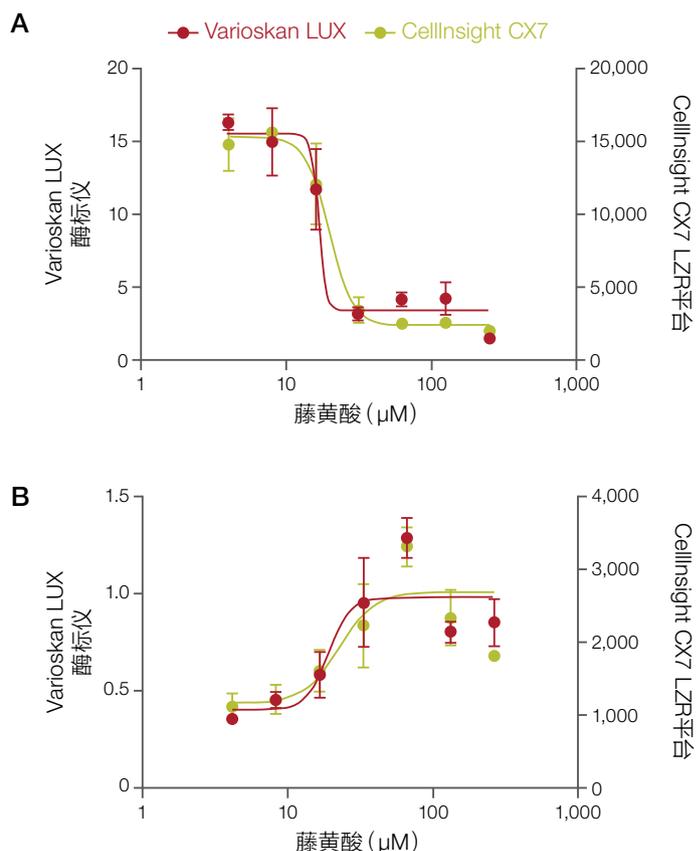


图5.3D球状体的药物剂量反应。将A549球状体使用不同浓度的藤黄酸处理48小时，然后使用(A) Invitrogen™ CyQUANT™ Direct细胞增殖检测试剂盒或(B) Invitrogen™ CellEvent™ Caspase-3/7 Green检测试剂进行染色，以分析细胞凋亡。在Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX多模式微孔板读数仪或CellInsight CX7 LZR高内涵分析平台上读取荧光(500 nm激发, 530 nm发射)。对于每种试剂，在微孔板读数仪和高内涵分析平台上获得的IC50值相似，这表明可以用微孔板读数仪分析基于荧光的检测结果，以此分析最初的新药研发问题。

荧光显微镜

当使用荧光显微镜对3D培养进行成像时，优化显微镜设置和使用高级功能可以提高图像质量和更好地可视化球状体的核心。选择合适的物镜可以改善轴向分辨率和焦距，而具有z层叠功能的显微镜可实现对整个球状体进行成像。EVOS细胞成像系统是具有高性能、易于使用的成像系统，拥有的

z层叠功能可用于生成3D培养物的高分辨率图像。然后，可以在诸如Invitrogen™ Celleste™图像分析软件等图像分析平台上对这些图像进行分析，以此定量球状体大小并对整个球状体进行通用强度测量（图6）。

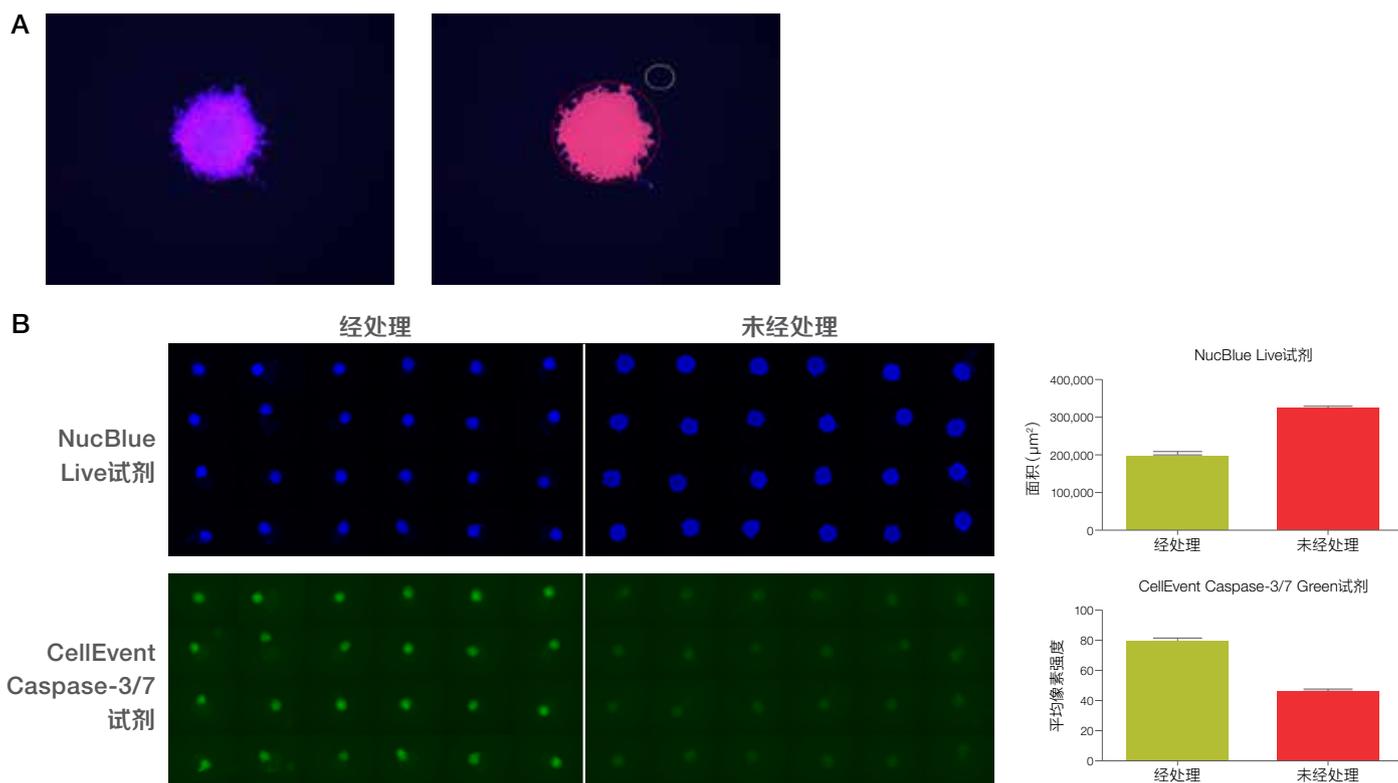


图6.在Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 2成像系统上成像的球状体，用Celleste图像分析软件进行分割。 (A) A549细胞球状体在Nunclon Sphera 96孔U型底孔板中培养，随后使用 Invitrogen™ NucBlue™ Live、MitoTracker™ Orange和CellEvent Caspase-3/7 Green试剂标记，然后在EVOS FL Auto 2成像系统上用Olympus™ 4x超级消色差物镜与DAPI、RFP和GFP滤光片光立方成像。将图像导入到Celleste 4.1软件中，使用智能分割功能自动分析球状体形态和染色强度，显示为红色（感兴趣对象）和黄色（背景）感兴趣区域。定义这两个区域后，Celleste 4.1软件能够自动检测对象，并成功分割球状体与背景。(B) 使用40µM氯硝柳胺或DMSO对照处理的A549球状体的代表性合成图像。一半的孔板经过处理，另一半的孔板则未经过处理。图中显示，经处理的球状体大小较小（通过测量使用NucBlue Live试剂染色确定的面积测定），且球状体的凋亡活性增加（通过使用CellEvent Caspase-3/7 Green试剂染色测定）。使用(A)中定义的智能分割输入分割球状体，并将分析应用于代表性图像中所示的48个孔，从而生成分析数据。每个条柱代表24个球状体的平均值±SEM。

高内涵筛选

高内涵筛选具有强大的定量和统计功能，能够为大细胞群体提供快速和高通量细胞成像和分析的优势。CellInsight CX7 LZR高内涵分析平台具有诸多特点，使其成为3D细胞培养的高内涵成像和分析的理想平台。该系统结合了高分辨率成像和获得z层叠的能力，并且扫描时间短，还提供共聚焦模式。与基于LED的激发源相比，其基于激光的激发源减少了光散射，具有更深的穿透力，提高了信噪比。

Thermo Scientific™ HCS Studio™ 3.1细胞分析软件可以对这些高分辨率的3D培养图像进行逐个细胞分析。该软件可以分割3D球状体内的单个细胞，并逐个测量细胞强度和其他特征，以提供3D结构内每个细胞的详细分析结果（图7）。

结论

借助最佳的细胞培养试剂、强大的荧光试剂和检测试剂盒，以及高性能的荧光成像和检测系统，即使在标准的实验室环境中，也可以轻松实现从2D到3D细胞培养的转换。由于3D球状体具有更类似于肿瘤和体内模型的细胞环境和其他特征，因此对这些培养的研究可以提供更多适用于完整生物系统的相关数据和发现，从而深化新药研发、癌症生物学和其他关键领域的研究。

参考文献

1. Baker BM, Chen CS (2012) Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* 125(Pt 13):3015–3024.
2. Huang BW, Gao JQ (2018) Application of 3D cultured multicellular spheroid tumor models in tumor-targeted drug delivery system research. *J Control Release* 270:246–259.
3. Patel NR, Aryasomayajula B, Abouzeid AH et al. (2015) Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems. *Ther Deliv* 6(4):509–520.
4. Fang Y, Eglen RM (2017) Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. *SLAS Discov* 22(5):456–472.

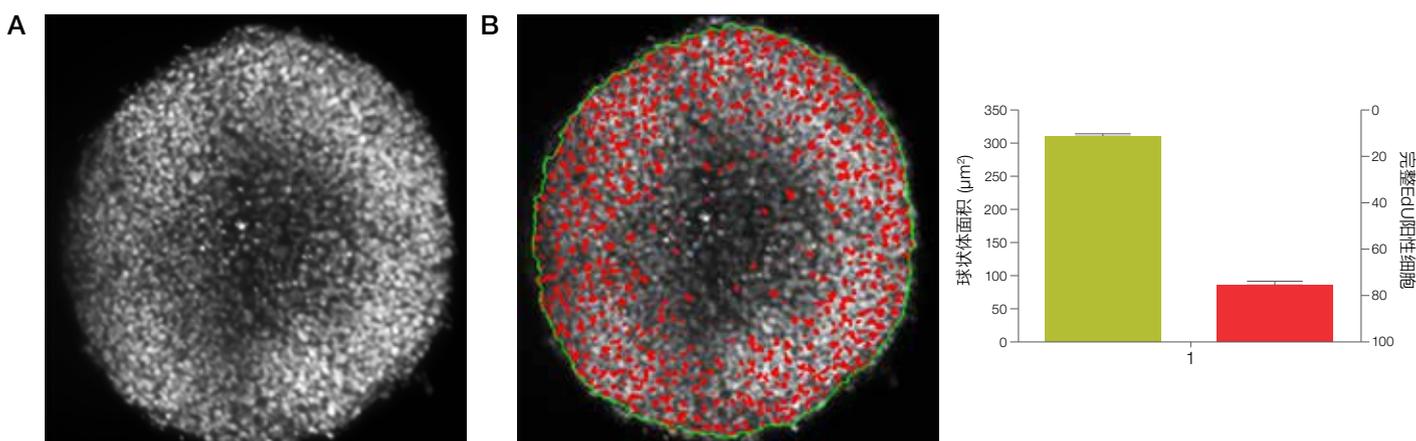


图7.使用高内涵筛选定量球状体中的细胞增殖。在Nunclon Sphera 96孔U型底微孔板上以每孔5,000个细胞的密度接种A549细胞，在CO₂培养箱中孵育24小时。加入EdU，直至最终浓度为10μM，孵育1小时。然后使用4%甲醛固定球状体，用0.25% Triton™ X-100表面活性剂进行透化处理，并按照试剂盒方案使用Click-iT EdU Alexa Fluor 488 HCS检测试剂盒进行EdU染色。(A)在配有4x物镜的CellInsight CX7 LZR高内涵分析平台上使用共聚焦模式对孔板进行成像。该图像是200个1 μm光学Z切片的最大信号强度投影。(B)使用HCS Studio软件Morphology Explorer生物应用程序完成定量。球状体被分割为一个对象，EdU阳性细胞通过球状体内的斑点计数。

A.5

借助3D球状体培养手段研究药物代谢 (COL23475)

简介

Thermo Fisher Scientific开发的人原代肝细胞 (PHH) 三维 (3D) 培养模型有望用于疾病建模和功能研究。由于肝脏是大多数药物代谢的主要部位, 原代肝细胞也因而成为评估肝脏药物代谢的最常用体外工具。但3D肝细胞球状体在评估药物代谢方面的效率相对不明。3D肝培养与常规二维 (2D) 培养的一个主要区别是每孔的细胞数。单个肝细胞球状体通常由1,000至3,000个细胞组成, 而常规2D培养通常为每孔50,000 (96孔板) 至400,000个 (24孔板) 细胞。因此, 相对于在2D培养, 3D培养合成的代谢物浓度相对更低。但我们观察到, 某些细胞色素P450 (CYP) 酶在3D肝细胞球状体中的相对基因表达水平高于对应量的2D培养物。由于CYP蛋白是药物代谢的关键相酶, 我们利用高分辨率质谱测定了6种酶的CYP活性, 进而直接比较2D和3D培养物的酶活性。我们的数据结果表明, Gibco™ 3D肝细胞球状体模型在研究药物代谢方面更具应用价值。

材料和方法

球状体培养

根据用户指南, 使用Gibco™ 经球状体验证人冻存肝细胞 (货号HMCPSQ) 培养肝细胞球状体^[1]。每孔包含3,000个PHH。接种细胞后5天内形成球状体。从第5天开始, 每48-72小时置换一半铺板培养基。在球状体培养第9天, 根据公开指南, 将2D肝细胞以每孔50,000个PHH的密度接种到胶原蛋白包被的96孔板^[2]。

代谢检测

在第10天, 将2D和3D培养培养基置换到含Gibco™ Williams' E培养基和Gibco™ 原代肝细胞维持添加剂的孵育培养基。分别将六种目标化合物添加到无血清Williams' E培养基内的2D和3D PHH培养物中。选择这类化合物时, 原则是可用于检测对肝脏药物代谢较为重要的几种CYP酶。表1列出了六种化合物各自的信息、负责该化合物代谢的CYP酶、分析的代谢物以及试样药物浓度。在所用的六种化合物中, 除甲苯磺丁脲以外均为高代谢率化合物, 具有高固有清除率。无论2D还是3D研究, 每种化合物的孵育时间 (表2) 均先行决定选在在实验的线性范围内。在不破坏细胞的情况下, 收集培养基并-80°C储存, 以供后续分析使用。

代谢物的分析

从2D和3D肝培养物中收集的细胞培养物样品, 使用Thermo Scientific™ Q Exactive™ Plus组合型四极杆Orbitrap™ 质谱仪分析形成的代谢物 (表3)。此方法既可得到准确、高分辨率的质谱分析结果, 又可快速扫描复杂基质中的代谢物 (定量和/或定性)。

液相色谱-质谱联用 (LC-MS)

使用Thermo Scientific™ Vanquish™ Flex二元/UHPLC系统进行液相色谱 (LC) 分析。使用Thermo Scientific™ Hypersil™ BDS C18柱进行液相分离, 流动相A (H₂O/0.1%甲酸) 和B (ACN/0.1%甲酸) 的流速为400 μL/min, 梯度为15分钟5%至90%。从含有相应代谢物的2D和3D样本中收集培养基,

直接进样至Vanquish系统, 进而在Q Exactive Plus质谱仪上进行LC-MS分析。通过极性切换以数据依赖性方式收集高分辨率全扫描和HCD MS₂数据。使用35,000分辨率全扫描质谱可以轻松鉴定和定量代谢物。表3提供了质谱仪的规格。

表1.通过代谢实验测定的细胞色素P450酶和分析的化合物。

测定的CYP酶	所用化合物	分析的代谢物	代谢物分子量 (m/z)
CYP2D6	右美沙芬	右啡烷	258.1852
CYP3A4	咪达唑仑	1-羟基咪达唑仑	342.0804
CYP1A2	非那西丁	对乙酰氨基酚	152.0706
CYP2B6	安非他酮	羟基安非他酮	256.1099
CYP3A4	睾酮	6β-羟基睾酮	305.2111
CYP2C9	甲苯磺丁脲	4-羟基甲苯磺丁脲	287.1060

表2.所用化合物浓度以及2D和3D培养孵育时间。

所用化合物	浓度 (μM)	孵育时间 (hr)	
		2D	3D
右美沙芬	150	2	8
咪达唑仑	100	2	8
非那西丁	200	2	8
安非他酮	500	2	8
睾酮	400	2	8
甲苯磺丁脲	500	4	16

表3.Q Exactive Plus组合型四极杆Orbitrap™质谱仪规格。

项目	规格参数
离子源	Thermo Scientific™加热电喷雾电离 (HESI-II) 探针
电离模式	ESI正/负切换
鞘气流速	50单位N ₂
辅助气体流速	10单位N ₂
喷雾电压	+3.2/-3.0 kV
离子传输管温度	300°C
s-lens射频水平	50.0
加热器温度	425°C

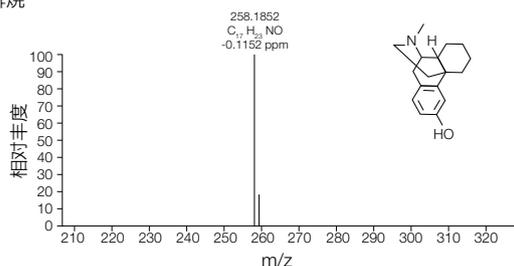
结论

相对于2D培养, PHH 3D球状体具有许多优势, 包括组织型和表型持续更久。但是, 每个球状体中只有少量细胞可以产生3D肝细胞培养物, 因此, 可能无法为药物代谢研究产生足够的检测窗, 这是一个值得担忧的问题。本研究评估了2D和3D PHH培养物中CYP450酶活性的差异。

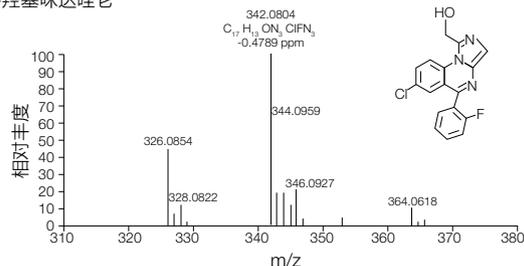
根据我们展示的数据, 可以得出以下结论:

1. 使用高分辨率质谱仪 (如Q Exactive Plus质谱仪), 可以轻松鉴定和定量3D肝细胞球状体产生的代谢物 (图1)。
2. 3D肝细胞球状体培养适于研究药物代谢。针对所研究的CYP450酶, 已观察到足够的代谢物形成检测窗 (图1和2)。
3. 相对于2D培养物, 3D肝细胞培养在药物代谢方面通常效率更高。这一发现与我们先前的观察结果一致, 即3D肝细胞球状体表达的各种CYP450基因和白蛋白水平均高于2D培养^[3]。之前, 我们还使用发光检测法在3D培养物中发现更高的CYP3A4活性。
4. 根据获取的数据, 我们得出的结论是3D肝细胞球状体培养体系适用于高通量药物筛选和代谢物测定。

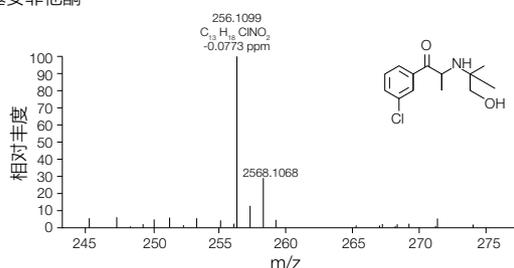
右啡烷



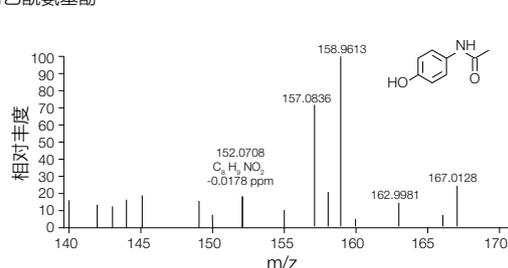
1-羟基咪达唑仑



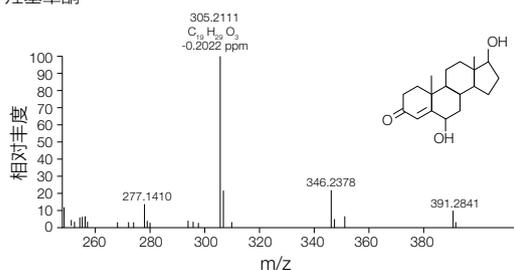
羟基安非他酮



对乙酰氨基酚



6β-羟基睾酮



4-羟基甲苯磺丁脲

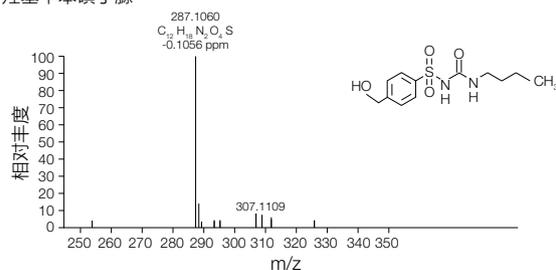


图1. 代谢标记物的鉴定。使用高分辨率质谱 (HRMS) 鉴定并定量由各个化合物合成的标记代谢物。HRMS可轻松鉴定出仅3,000个细胞组成的单个球状体分泌的代谢物。

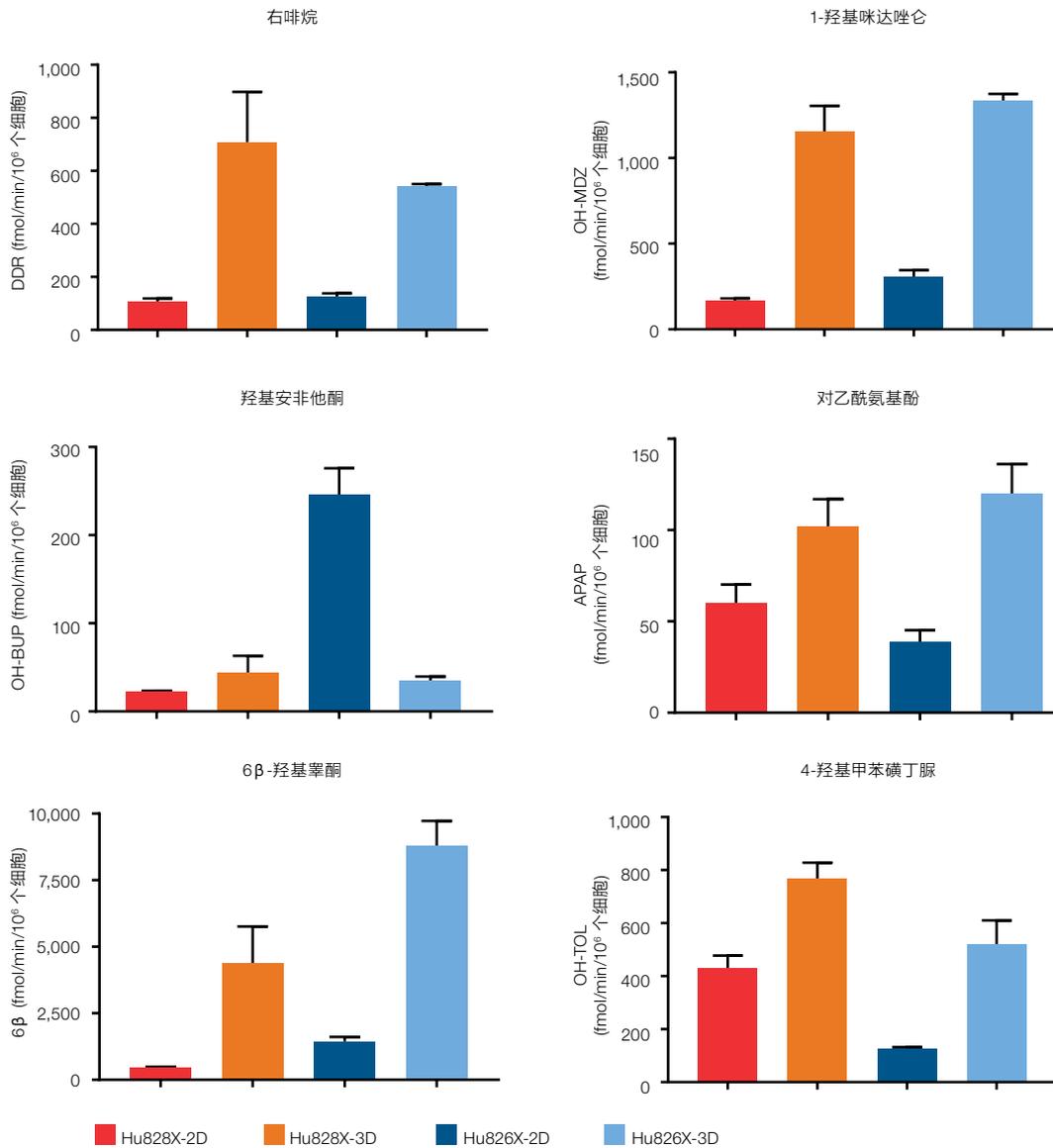


图2.2D和3D培养代谢对比。利用HRMS定量代谢物，根据相应代谢物的标准曲线，换算为摩尔量。本实验采用了两个不同批次的PHH，即Hu828X和Hu826X。利用每个底物下的孵育时间以及2D和3D培养每孔细胞数，标准化结果。数据为平均值± SD；n = 3。

参考文献

1. Thermo Fisher Scientific. User Guide: Cryopreserved 3D-Spheroid Qualified Human Hepatocytes. Pub. No. MAN0018280.
2. Thermo Fisher Scientific. Thawing and Plating Cryopreserved Hepatocytes. Protocol available at thermofisher.com/us/en/home/references/protocols/drug-discovery/adme-tox-protocols/thawing-and-plating-hepatocytes-protocol.html.
3. Thermo Fisher Scientific. Primary Human Hepatocyte 3D Spheroids for Studying Hepatic Function and Drug Toxicity. Poster available at assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/posters/human-hepatocyte-3d-spheroids-hepatic-function-drug-toxicity-poster.pdf.

A.6

使用人原代肝细胞3D球状体培养系统体外评价肝功能

简介

在二维 (2D) 单层中培养人原代肝细胞 (PHH) 的常规方法在研究肝生物学、肝功能和药物诱导的肝毒性方面存在局限性。传统的2D肝细胞培养会去分化, 使得特定的肝功能在约5天内丧失。我们开发并表征了一种PHH三维 (3D) 球状体培养体系, 可保留肝功能并延长培养物寿命。



使用Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™低附着96孔U型底微孔板和Gibco™铺板培养基和铺板添加剂, Gibco™经3D球状体验证的人肝细胞可以在5天内轻松组装成3D球状体培养物。3D球状体肝细胞培养所需的细胞数明显低于对应量的2D培养, 使得3D系统能够更好地支持高通量检测。此外, 3D球状体培养中的PHH能够保持至少3周的功能活性, 从而可实现对肝细胞功能的长期研究。

应用1: PHH 3D球状体形成

1. 向Gibco™ Williams' E培养基 (货号A1217601) 中添加Gibco™原代肝细胞解冻和铺板添加剂 (货号CM3000), 以此制备铺板培养基。将铺板培养基和Gibco™肝细胞解冻培养基 (HTM) (货号CM7500) 在37°C水浴中加热。
2. 在37°C水浴中快速解冻经球状体验证的Gibco™人肝细胞 (货号HMCPSQ), 并将试管中的内容物转移到HTM试管中。
3. 细胞以100 x g离心10分钟, 然后将细胞团块轻轻再悬浮于3 mL铺板培养基中。
4. 计数肝细胞, 然后以1,500个细胞/孔的浓度将肝细胞接种于Nunclon Sphera 96孔微孔板 (货号174925) 中。

注: 对于每个孔, 可添加每200 μL培养基1,500个细胞 (7,500个细胞/mL) 的细胞培养物; 或者, 在使用100 μL铺板培养基预润湿孔板后, 可添加每100 μL培养基1,500个细胞 (15,000个细胞/mL) 的细胞培养物。

5. 在细胞铺板后, 以200 x g离心孔板2分钟, 使细胞沉淀到孔板底部。

6. 将接种的细胞置于含5% CO₂的37°C培养箱中, 静置孵育3-5天, 然后更换培养基。

注: 很重要的一点是, 将孔板放在不经常打开用于其他培养的培养箱中, 并轻轻地关闭培养箱门, 以免干扰球状体的形成。

7. 球状体在5天内形成。在第7天后进行生化检测和表征。每48-72小时, 使用肝细胞维持培养基 (通过将Gibco™肝细胞维持添加剂[货号CM4000]添加到Williams' E培养基[货号A1217601]中进行制备) 更换50%的培养基 (图1)。可以使用Thermo Scientific™ Wellwash™ Versa洗板机 (货号5165010) 完成培养基更换。

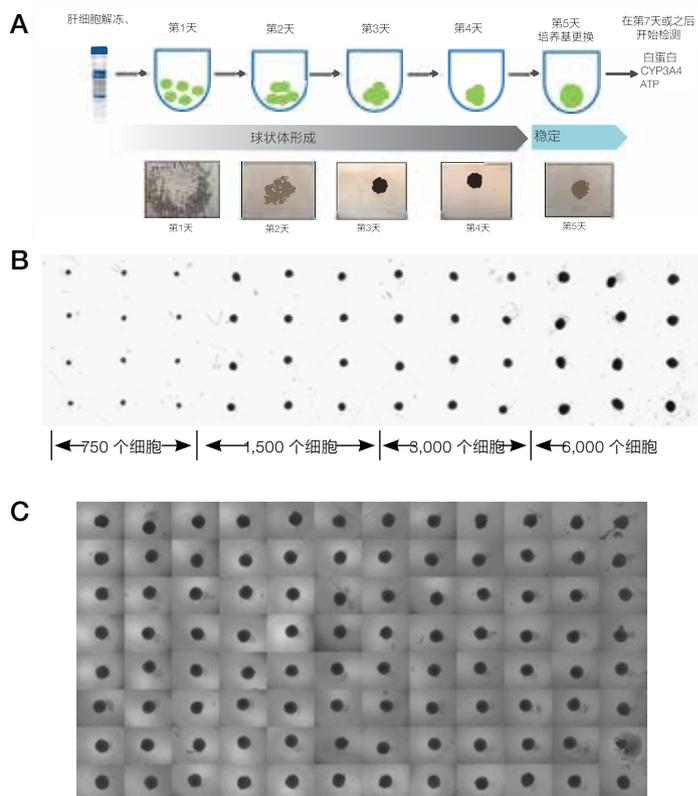


图1.3D球状体培养中原代肝细胞的组装和表征工作流程。(A) 以10倍放大倍数同相位成像的球状体。这些图像显示, 培养5天内形成球状体。(B) 球状体的大小与接种的细胞数量成正比。使用Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 2成像系统 (货号AMAFD2000) 以4倍放大倍数对球状体进行成像。(C) 肝细胞球状体铺板于Nunclon Sphera 96孔U型底微孔板中, 显示了整个孔板中球状体形成的一致性。

应用2: 分析3D肝细胞球状体中胆小管的形成

1. 使用应用1建立肝细胞的3D球状体培养体系。
2. 制备5 μM Invitrogen™ 5-羧基二乙酸荧光素, 乙酰氧基甲酯 (5-CFDA, AM; 货号C1354) 的工作溶液。5-CFDA 用于可视化3D球状体中胆小管的形成。5-CFDA能渗透完整的功能性肝细胞, 并水解为5-羧基荧光素 (5-CF), 然后从肝细胞中分泌而出, 积聚在胆小管中, 并表现出强荧光。
3. 在第1周, 移除3D肝细胞球状体的培养基, 用100 μL 的5 μM 5-CFDA原液处理, 然后在37°C下孵育1小时。
4. 使用肝细胞维持培养基将孔洗涤3次, 并使用具有GFP/FITC设置的透射电子显微镜对细胞进行成像(图2)。

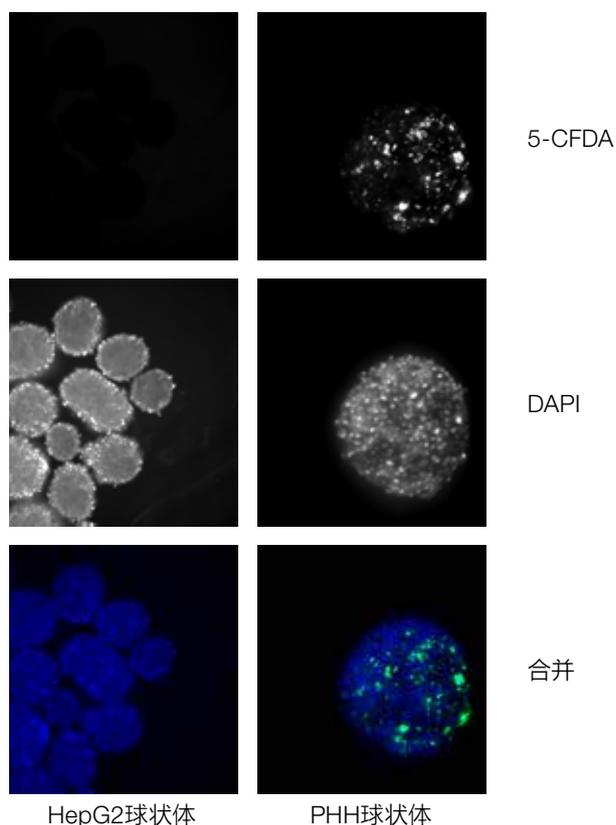


图2.肝细胞球状体中胆小管形成的评价。使用5-CFDA和DAPI对第2周的HepG2球状体(左)和第1周的肝细胞球状体(右)进行染色, 并使用 Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7平台以10倍放大倍数进行成像。与 HepG2球状体(用作阴性对照)相比, 肝细胞球状体清晰显示出胆小管的形成。

应用3: 测量2D或3D肝细胞球状体培养产生的白蛋白

1. 使用应用1建立肝细胞的3D球状体培养体系。另外, 还启动一项对肝细胞的2D培养。
2. 在2D肝细胞培养的第5天和3D肝细胞球状体培养的不同日期, 从2D和3D培养物的每个孔中收集120 μ L的细胞培养基, 用于白蛋白分泌分析。
3. 将细胞培养基以3,000 x g离心10分钟, 并使用Abcam人白蛋白ELISA试剂盒收集上清液用于ELISA检测 (图3)。

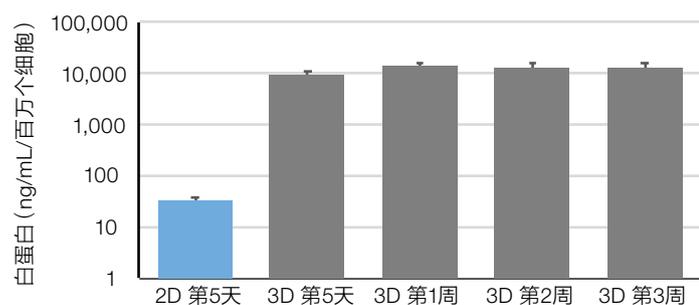


图3.肝细胞2D和3D球状体培养中的白蛋白分泌。将分泌的白蛋白浓度归一化为每孔的细胞总数。

应用4: 肝细胞2D或3D球状体培养中的活性

1. 使用应用1建立肝细胞的3D球状体培养体系。
2. 在2D肝细胞培养的第5天和3D球状体培养的不同日期, 将总共8个肝细胞球状体分别转移到Thermo Scientific™ Nunclon™ Delta™ 24孔板 (货号142475) 的孔中。
3. 转移球状体后, 使用移液器将留在24孔板中的肝细胞维持培养基小心地移出, 并补充500 μ L新鲜肝细胞维持培养基。
4. 在图4所示的培养日, 使用含有荧光素IPA的Promega P450-Glo™ CYP3A4检测试剂盒方案测定了肝酶CYP3A4的活性。

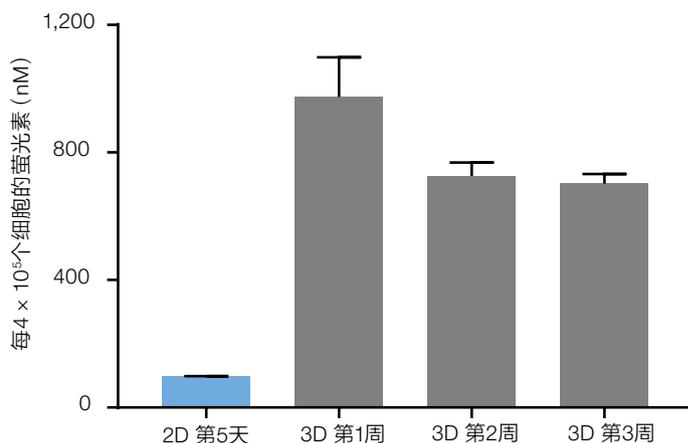


图4.肝细胞2D和3D球状体培养中的CYP3A4活性。使用含有荧光素IPA的Promega P450-Glo™ CYP3A4检测试剂盒测定CYP3A4的活性。发现3D球状体中的CYP3A4活性明显高于2D培养中的CYP3A4活性。提供的数据为平均值 \pm SEM (对于2D培养, n=3, 对于3D球状体, n=8)。

应用5: 3D球状体肝培养合成的ATP

1. 使用应用1建立肝细胞的3D球状体培养体系。
2. 在第1周中, 使用Promega CellTiter-Glo™ 3D细胞活性检测试剂盒, 进行一式三份(图5)的ATP合成测定。

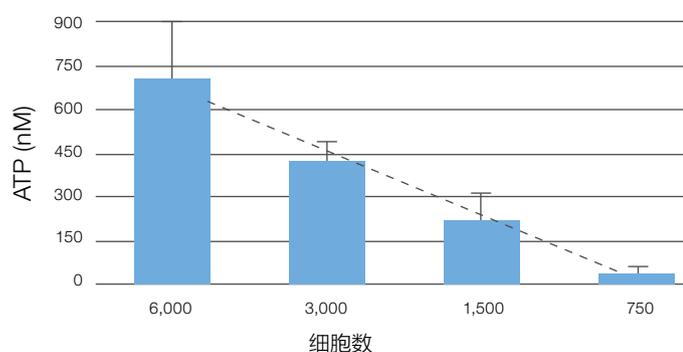


图5. 3D肝细胞球状体培养合成的ATP与细胞数成正比。使用CellTiter-Glo 3D细胞活性检测试剂盒进行一式三份的测量, 在第1周测定了单个球状体的ATP合成。

应用6: 使用3D肝细胞球状体培养检测药物诱导的细胞毒性

1. 使用应用1建立肝细胞的3D球状体培养体系。
2. 在培养的第2周期间, 使用不同水平的精神抑制药(氯丙嗪)和抗炎药(双氯芬酸)对3D球状体进行一式四份的处理。
3. 处理后24小时, 使用CellTiter-Glo 3D细胞活性检测试剂盒方案检测细胞活性。使用GraphPad Prism™ 7软件, 对对数(抑制剂) vs. 反应的可变斜率进行非线性回归分析(图6)。表1显示, 肝细胞2D和3D球状体培养的IC₅₀值相当。

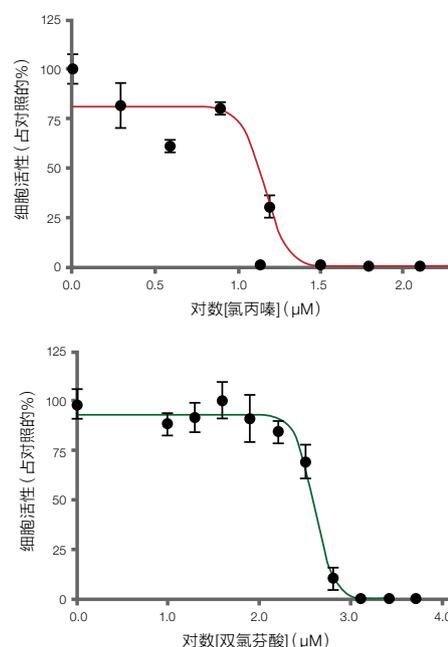


图6. 使用3D肝细胞球状体培养检测的药物诱导细胞毒性。

表1. 2D肝细胞和3D肝细胞球状体培养的药物诱导细胞毒性的IC₅₀。

药物	IC ₅₀ (2D培养)	IC ₅₀ (3D培养)
氯丙嗪	34 μM	14 μM
双氯芬酸	331 μM	396 μM

结论

总体而言, 这些数据证实, 对经3D球状体验证的人肝细胞培养物的特性研究显示其能够保持至少3周的稳定形态、活性和肝细胞特异性功能。研究已证明我们经3D球状体验证肝培养具有功能性, 这已通过胆小管形成和持续的白蛋白分泌得到证实。在比较肝细胞2D培养第5天和3D球状体培养第1周的CYP3A4活性时, 我们发现3D球状体培养的活性明显更高(图4)。研究还表明, 这种3D肝细胞球状体培养体系可用于分析肝细胞中药物诱导的细胞毒性。最后, 这些数据表明, 3D球状体形成所需细胞数量的减少以及这些培养物存活时间的延长可能能够更好地支持肝细胞功能的高通量检测和长期研究。

订购信息

产品	货号
经验证的3D球状体原代人肝细胞	HMCP5Q
Hepatocyte Thaw Medium培养基	CM7500
William's E培养基, 无酚红	A1217601
原代肝细胞解冻和铺板添加剂	CM3000
原代肝细胞维持添加剂	CM4000
Nunclon Sphera微孔板, 低细胞粘附性U型底96孔	174925
I型包被孔板, 24孔	A1142802
5-CFCA, AM (5-二醋酸羧基荧光素, 乙酰氧基甲基酯)	C1354

A.7

在高通量平板上形成均匀且可重复的3D癌症球状体

简介

在平面二维 (2D) 组织培养基质上生长的细胞可能与生理三维 (3D) 环境中生长的细胞有很大不同。越来越多的证据表明3D癌症球状体更能代表体内肿瘤, 并表现出多种生理特征, 包括相似的形态、形成细胞相互接触、增殖减少、存活率提高以及核心缺氧。然而, 癌症球状体形成的变异性一直是长期困扰研究人员的一个问题。这种变异性与培养基成分和体积、细胞密度、培养时间有关, 最重要的是和细胞与培养皿本身的相互作用有关。使用具有低细胞结合特征的高质量培养皿可以获得更一致的结果。

在本应用指南中, 我们讨论了Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™ 聚合物涂层表面, 该表面可最大程度减少细胞附着并支持癌症球状体的体外形成。Nunclon Sphera细胞培养表面抑制细胞外基质 (ECM) 的结合, 而细胞外基质通常会介导细胞粘附。癌症球状体在Nunclon Sphera 96孔U型底孔板上快速形成, 未出现卫星集落, 证明其质量优于在未处理的板中含甲基纤维素的培养基中形成的球状体。通过直接在Nunclon Sphera板上进行荧光和比色分析, 可以方便地在原位评价癌细胞活性和球状体细胞的健康状况。为了进一步显示癌症球状体的生理相关性, 我们通过免疫细胞染色法对球状体的缺氧核心进行了评估。Nunclon Sphera孔板可形成均匀且可重复的癌症球状体, 因此成为许多基于细胞的新药研发程序、共培养研究和高通量筛选的理想平台。

材料和方法

癌症球状体培养

在进行球状体培养之前, 将癌细胞系保存在Thermo Scientific™ Nunc™细胞培养瓶中。为了形成癌症球状体, 将细胞以每孔100-5,000个细胞的密度接种到Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™ 96孔U型底孔板上, 每孔含200 μ L DMEM, 添加有GlutaMAX™ 添加剂、10% FBS、1 \times MEM非必需氨基酸、100 U/mL青霉素-链霉素和25 mM HEPES (所有Gibco™培养基、血清和试剂)。将未处理的平板以同样的方式接种在含有3%甲基纤维素的完全DMEM中。将板以250 \times g短暂离心5分钟。然后在37°C和5% CO₂条件下培养细胞, 每72小时重新补充一次培养基, 即从每个孔中小心地移出100 μ L培养基, 并使用多通道移液器补充100 μ L新鲜生长培养基。在显微镜下对球状体的形成和生长进行成像。

球状体细胞的健康状况评估

使用Invitrogen™ PrestoBlue™细胞活性检测试剂, 在原位对A549和HCT 116球状体的健康状况进行了评价。简单来说, 在球状体培养后12-13天, 向Nunclon Sphera孔板的每个孔中添加20 μ L 10 \times Pretoblue细胞活性检测试剂。然后将板在37°C和5% CO₂下额外孵育2-5小时, 然后在基于荧光检测的微孔板读数仪 (激发/发射: 560/590 nm) 上读取数据。荧光读数根据球状体大小进行归一化, 以便进行一致的定量比较: 比率更高表示球状体更健康。

球状体细胞活性评估

在Nunclon Sphera孔板中培养A549和HCT 116球状体12-13天后,向每个孔中添加Invitrogen™ LIVE/DEAD™细胞活性检测试剂。将孔板在室温下孵育30-45分钟。使用每次更换一半体积的DPBS冲洗球状体至少3次,然后在荧光显微镜下进行成像。使用ImageJ软件分析数据。

球状体缺氧核心的检测

HeLa细胞(250个细胞/孔)在Nunclon Sphera 96孔U型底孔板中的完全培养基中培养2天。使用5 μM Invitrogen™ Image-iT™ Green Hypoxia试剂对球状体进行原位染色,然后额外孵育3小时。使用Invitrogen™ NucBlue™ Live ReadyProbes™试剂进行核复染。然后,使用宽口移液器吸头移液,将染色后的球状体转移到Thermo Scientific™ Nunc™ 玻底培养皿中,并在共聚焦显微镜上拍摄图像。

ECM蛋白非特异性结合测定

将Nunclon Sphera 96孔板和Nunc 96孔板用每孔100 μL的FITC-牛胶原蛋白偶联物(在DPBS中为24 μg/mL)包被,并在2-8°C下孵育24小时。另一组板用纤连蛋白的TAMRA™染料偶联物(在DPBS中为20 μg/mL)包被,并在室温下孵育16小时。所有板均用每孔200 μL PBS(含0.05% Tween™ 20表面活性剂)冲洗3次。读取FITC染料(激发/发射:495/525 nm)或TAMRA染料(激发/发射:543/570 nm)的荧光强度。

结果

ECM在Nunclon Sphera表面的吸附极低

为了使贴壁依赖性细胞或粘附细胞在悬浮液中形成球状体,培养容器必须防止细胞外基质与培养表面结合,以此通过细胞与细胞的结合促进细胞聚集。在这项研究中,我们证明与Nunclon Delta表面相比,I型胶原蛋白和纤连蛋白在Nunclon Sphera表面的吸附更少(图1)。这表明,与标准细胞培养物处理过的表面不同,Nunclon Sphera表面与ECM的结合相互作用极小,因此阻止了细胞吸附到培养皿上。

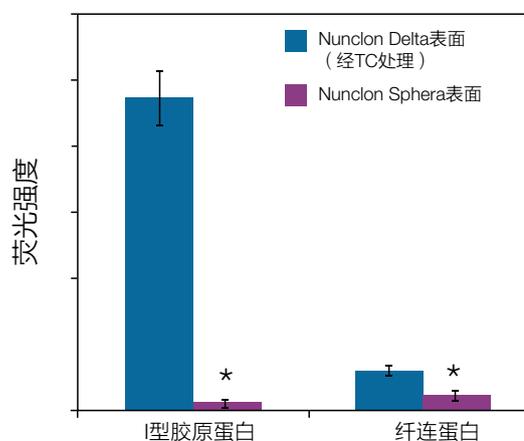
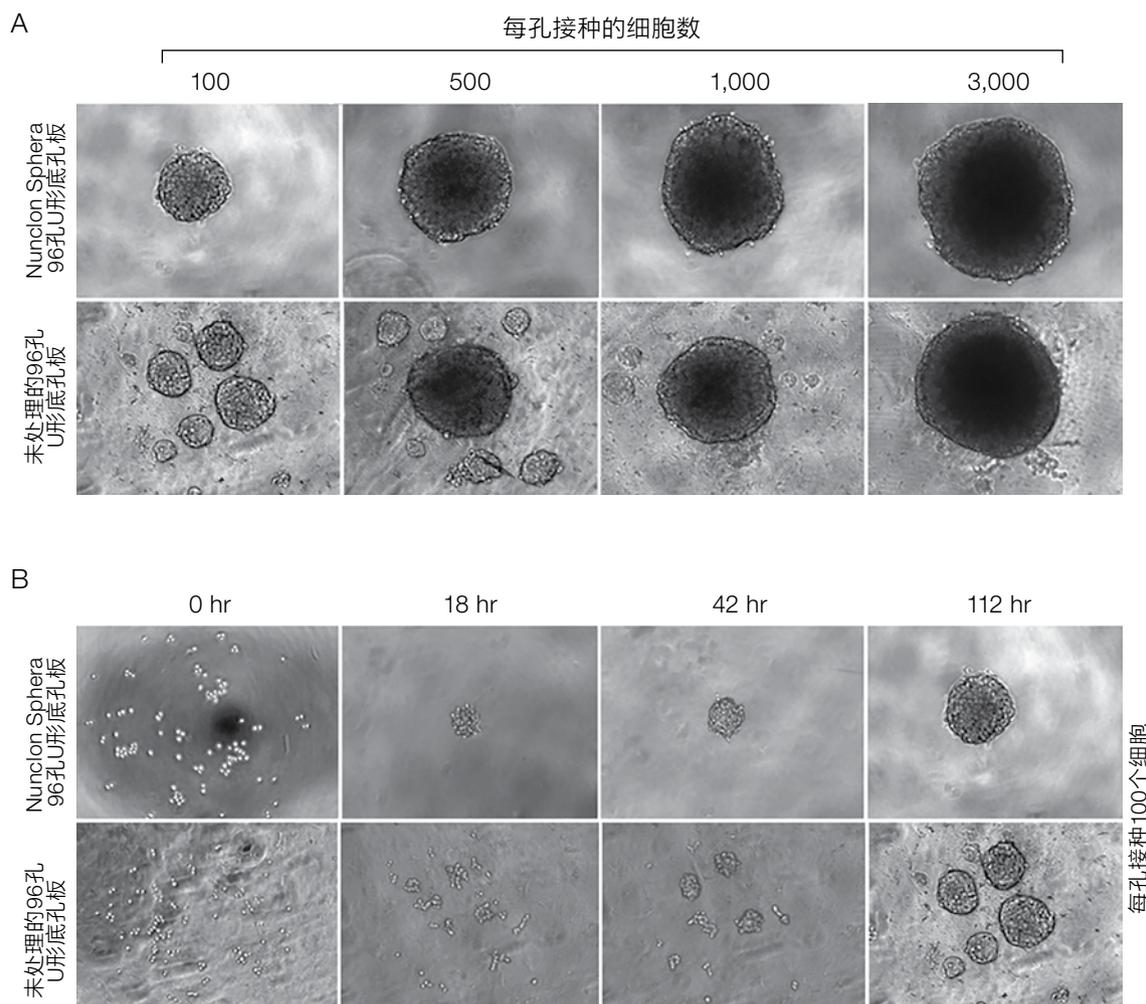


图1.非特异性蛋白的结合。与标准细胞培养物处理表面相比,Nunclon Sphera表面对I型胶原蛋白和纤连蛋白的吸附极低(*= Student's t test, P <0.01)。

Nunclon Sphera表面是优异的癌症球状体培养表面

将HCT 116人结肠癌细胞接种到Nunclon Sphera 96孔U型底孔板中的完全DMEM中。以同样的方法将细胞接种到未经处理的96孔U型底孔板中含3%甲基纤维素的完全DMEM中。与未处理的板相比，在Nunclon Sphera孔板上形成的HCT 116癌症球状体在各种接种密度下的卫星菌落更少，且背景更干净，从而获得了更高质量的球状体培养图像（图

2A）。在Nunclon Sphera孔板上，在最低接种密度为100个细胞/孔的条件下，孵育仅18小时后，就形成了HCT 116癌症球状体（图2B）。在整个培养过程中，可以在Nunclon Sphera孔板上观察到边缘和形状更清晰的单个球状体。



由维也纳医科大学医学遗传学研究所的Dolznic教授提供

图2. Nunclon Sphera孔板相较于未处理的孔板和含甲基纤维素培养基的优点。(A) 在Nunclon Sphera孔板上生长的癌症球状体质量高且稳定。**(B)** 在Nunclon Sphera 96孔U型底孔板上较早形成单个癌症球状体。(由维也纳医科大学医学遗传学研究所的Dolznic教授提供。)

在Nunclon Sphera孔板上生长的癌症球状体状况极佳

为了展示球状体的生长,在Nunclon Sphera板上以不同密度培养A549和HCT 116癌细胞系2周。根据尺寸测量的结果,两种细胞类型都显示出球状体的充分生长(图3A)。此外,使用Pretoblue细胞活性试剂评估A549和HCT 116球状体的细胞健康状况(图3B)。数据根据球状体大小进行归一化,以便进行一致的定量比较:比率更高表示球状体更健康。用LIVE/DEAD试剂染色进一步证实了癌症球状体的细胞活性(图3C)。所有参数表明,在Nunclon Sphera板上生长的癌症球状体健康且稳健,并且Nunclon Sphera 96孔U型底孔板是常规和高通量癌症球状体应用的可靠且方便的工具。

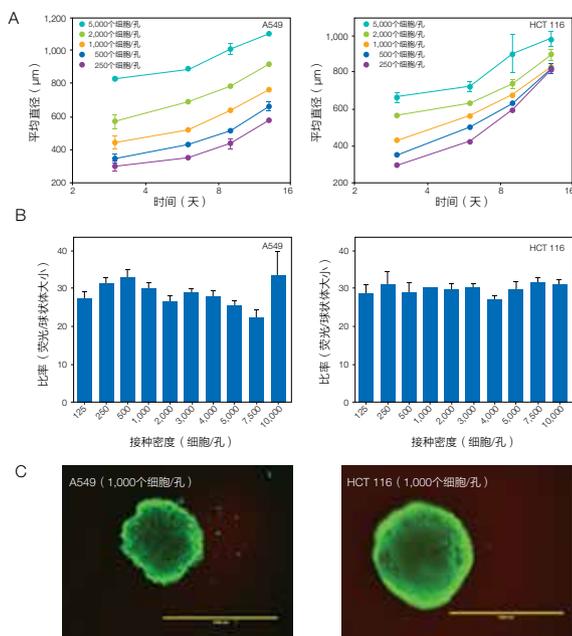


图3. Nunclon Sphera板上球状体生长、细胞健康状况和活性的评估。
(A) Nunclon Sphera板上A549和HCT 116癌症球状体历时13天的生长动力学评价。数据代表每个细胞数3份平行样本的平均值±SD。**(B)** 在Nunclon Sphera板上使用Pretoblue细胞活性试剂评估球状体细胞的健康状况,数据按球状体大小进行了归一化。**(C)** 通过染色活细胞(绿色)和死细胞(红色)评估球状体细胞的活性。比例尺:1,000 μm。

缺氧染色为癌症球状体内的缺氧核心提供支持性证据

低氧核心,也被称为缺氧核心,是3D癌症球状体生长与平面单层培养相比最明显的特征之一。它真实地模拟了实体瘤在体内的情境,即细胞迅速生长导致血液供应不足,使得肿瘤中心处的氧浓度极低。为了观察这种球状体特征,将HeLa细胞在Nunclon Sphera 96孔U型底孔板上培养2天。通过范围涵盖球状体表面以外的缺氧染色,模拟肿瘤的生理状况,显示了癌症球状体内的缺氧核心(图4)。

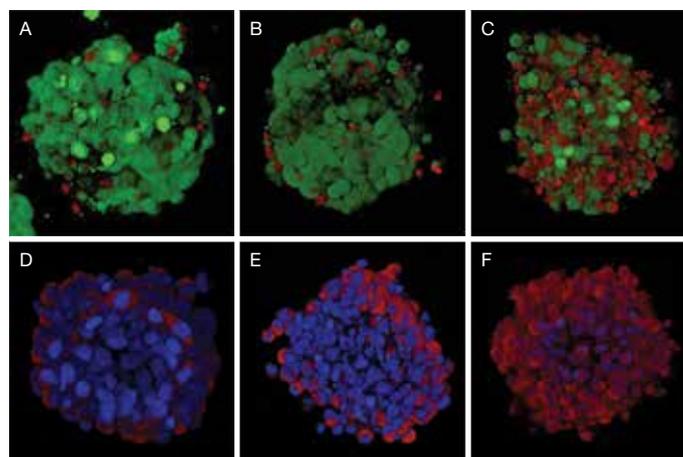


图4.经药物处理的HeLa球状体的细胞活性和氧化应激测定。 HeLa细胞在Gibco™ MEM中生长,并以600个细胞/孔的密度接种在Nunclon Sphera 96孔U型底孔板中,以200×g离心5分钟,培养3天以形成球状体。一组HeLa球状体(A)未经处理,或用(B)100 nM氯硝柳胺或(C)10 μM氯硝柳胺处理24小时,然后使用Invitrogen™ LIVE/DEAD™细胞成像试剂盒染色。第二组HeLa球状体未经处理,或在37°C下用(E)100 nM甲萘醌或(F)10 μM甲萘醌处理1小时以诱导氧化应激,然后用NucBlue Live ReadyProbes试剂和Invitrogen™ CellROX™深红色试剂染色。染色后,使用200 μL移液器吸头(切掉末端)将球状体转移到Thermo Scientific™ Nunc™玻底培养皿中,并在配备EC Plan-Neofluar™ 10×/0.3物镜、488 nm和561 nm激光器以及488/561 nm主分束器的Zeiss™ LSM 710共聚焦显微镜下成像;使用3D阴影渲染投影层叠。(A-C)在使用LIVE/DEAD细胞成像试剂盒测定的球状体中,活细胞发出绿色荧光,而细胞膜可被渗透的死细胞发出红色荧光。(D-F)在用CellROX深红色试剂和NucBlue Live ReadyProbes试剂染色的球状体中,显示氧化应激的细胞发出红色荧光,而活细胞核发出蓝色荧光。

A.8

使用3D球状体培养进行用于新药研发和开发的药物代谢途径基因表达谱分析

简介

基于细胞的检测是新药研发过程中的一个关键因素。与传统的二维(2D)细胞培养相比,三维(3D)细胞培养在复杂性、形态和表型方面更能再现体内生物学和微环境因素。因此,3D培养可作为具有较高价值的临床前模型,用于预测临床结果。

由于肝脏是大多数药物代谢的主要部位,因此识别肝脏中药物代谢酶的诱导是新药研发过程中的关键步骤。人原代肝细胞(PHH)被认为是研究肝脏生物学、肝功能和药物诱导肝毒性的金标准体外模型。然而,在传统的2D单层培养中生长的PHH会在一周内迅速去分化并丧失肝脏特定的功能。另一方面,最新开发的3D球状体培养物可模仿肝脏微环境,并至少维持肝功能5周。因此,已证明3D体外模型可以更准确地反映体内肝脏生物学^[1]。细胞色素P450(CYP450)酶是肝脏进行外来化学物质解毒和药物代谢所必需的酶。药物可能以多种方式与CYP450系统相互作用;它们可能仅通过一种CYP450酶代谢,也可能通过多种酶代谢。有三种关键的CYP450酶通常被用作识别肝诱导的3种主要核受体途径的标记物,包括:(1)用于芳香烃受体(AHR)活化的CYP1A2,(2)用于组成型雄甾烷受体(CAR)的CYP2B6,以及(3)用于孕烷X受体(PXR)的CYP3A4。

然而,对基因信号通路的更广泛评估为改善药物-药物相互作用的表征和临床结果的预测提供了可能性^[2]。在本研究中,我们使用Invitrogen™ QuantiGene™ Plex检测试剂盒探测了从PHH样本培养的3D球状体中,57个与药物吸收、分布、代谢和排泄(ADME)相关的基因以及看家基因。

材料和方法

肝细胞球状体培养及体外药物处理

肝细胞球状体是根据用户指南使用Gibco™经人球状体验证的肝细胞(货号HMCPSQ)在3D培养中形成的^[3]。每孔包含3,000个PHH。接种细胞后5天内形成球状体。从第5天开始,每48-72小时置换一半铺板培养基。在3D培养的第5天,使用相同批次的PHH,根据用户手册^[4],在包被I型胶原蛋白的24孔板中开始培养2D肝细胞培养物。

使用原型配体诱导与肝脏药物代谢相关的3个主要核受体途径。用50 μM奥美拉唑(AHR配体),1 mM苯巴比妥(CAR配体),10 μM利福平(PXR配体)或DMSO(介质对照)处理2D和3D培养物。2D培养在第2天和第3天进行处理,而3D培养在第6天和第7天进行处理。

QuantiGene Plex检测

使用QuantiGene Plex检测量一个包含57个基因的自定义panel, 其中包括42个ADME基因、7个凋亡基因和8个看家基因(图1)。将靶特异性捕获探针组和标记探针组与细胞裂解液和Luminex® MagPlex®微球在54°C下孵育过夜。这些微球被捕获探针组特有的捕获探针包被, 从而使每个靶基因与特定的微球杂交(图2)。过夜孵育后, 通过在50°C下与称为信号预放大探针、放大探针和标记探针的单链DNA寡核苷酸按顺序进行3次1小时的杂交, 构建了分支DNA信号扩增“

树”。在每次杂交之前洗涤微球。在与生物素化标记探针杂交并额外洗涤后, 将微球与检测试剂链霉亲和素藻红蛋白(SAPE)在室温下孵育30分钟。最后, 洗涤微球, 在SAPE缓冲液中重悬, 并在Luminex® FLEXMAP 3D®仪器上读数结果。

数据分析

使用集成了Applied Biosystems™转录组分析控制台(TAC)软件4.0.2的Invitrogen™ QuantiGene™分析软件分析从FLEXMAP 3D仪器导出的数据。

CYP1A1	CYP3A4	CYP1A2	CYP2C19	ABCB11	ACTB	SLCO1B1	ABCB1	AOX1	CYP3A5
MAOB	CYP2C9	CYP2D6	UGT1A9	SULT2B1	SLC22A1	ABCG2	UGT1A4	HPRT1	TBP
SLC10A1	SULT2A1	CYP2J2	UGT1A1	XDH	UGT1A6	GAPDH	UGT2B7	CYP2A6	SULT1A1
FMO3	GUSB	POLR2A	CYP2E1	UGT1A3	SLC3A1	HMGB1	SLC2A1	SLCO2B1	CYP2C8
PGK1	ABCC2	FMO1	ABCA1	CASP9	FMOS	PPIB	SLCO1B3	MAOA	CYP2B6
ABCC1	UGT2B15	RIPK1	BAX	TP53	BCL2	CASP3			

图1.包含57个基因的自定义QuantiGene Plex检测panel。ADME基因: 绿色; 凋亡基因: 蓝色; 看家基因: 黄色。

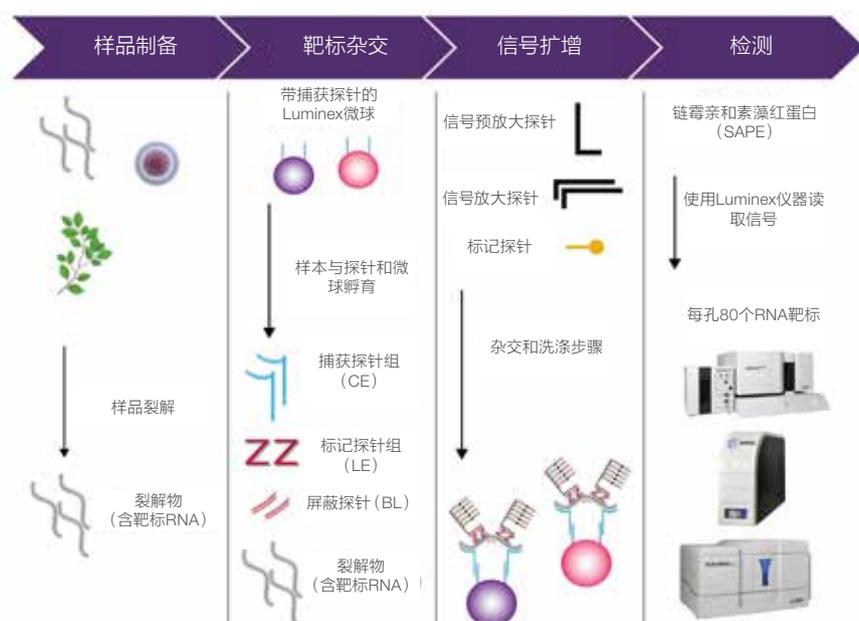


图2.QuantiGene Plex检测工作流程。

结果

PHH自组装为3D球状体及药物处理

Gibco™ 经人球状体验证的肝细胞 (货号: HMCPSQ) 从单个供体中分离并接种到 Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™ 96孔U型底孔板 (货号: 174925) 上, 细胞在5天内自组装为3D球状体, 如图3所示。之后, 在第6至7天用各种CYP450诱导剂处理球状体, 并在第8天使用 Invitrogen™ QuantiGene™ 样品处理试剂盒 (货号: QS0100) 制备裂解物, 以用于培养后的细胞。

3D培养物响应药物处理的基因表达测定—qPCR结果与 QuantiGene Plex检测的相关性

采用qPCR和QuantiGene Plex检测分析3个单独样品批次的PHH (Hu186X、Hu828X和Hu826X) 中CYP3A4和CYP2D6的mRNA水平。将靶基因表达归一化至管家基因的几何平均值。计算3D培养物表达水平相对于2D培养物第5天表达水平的倍数变化 (Δ)。与对应量的2D培养物相比, 在所有3D PHH培养物中检测到更高的转录表达, 这一检测结果在 QuantiGene Plex检测和qPCR数据中具有良好的相关性 (图4)。

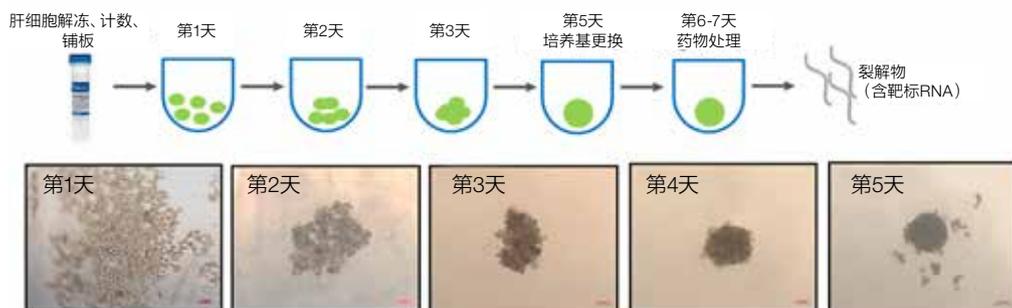


图3.人原代肝细胞5天后自组装为3D球状体。

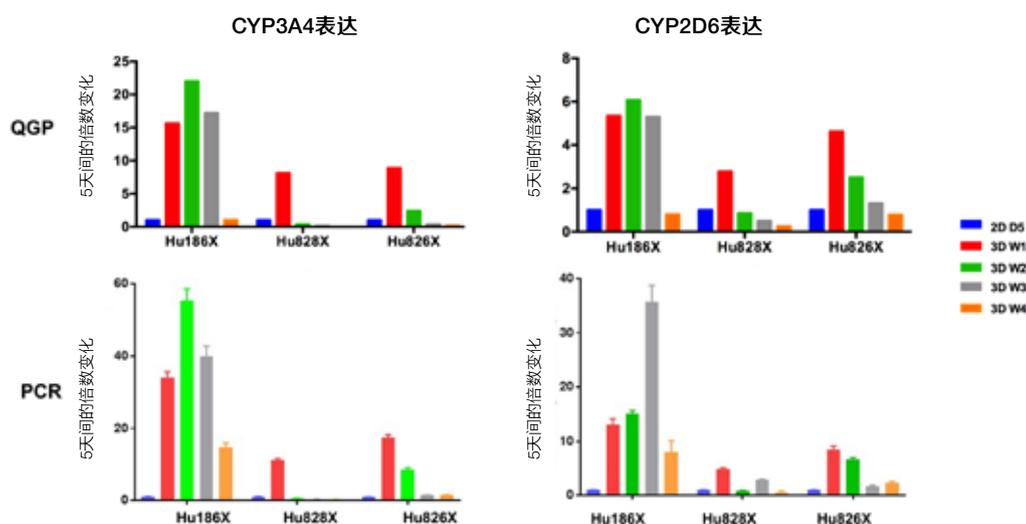


图4.QuantiGene Plex检测 (顶部面板) 和qPCR (底部面板) 均检测出3D PHH培养物中基因表达升高。

在载板系统中的Nunc插入式细胞培养器上构建人皮肤组织

摘要

Thermo Scientific™ Nunc™插入式细胞培养器为需要空气-液体界面的组织提供了出色的细胞生长系统，尤其是与相应的载板配合使用时。载板有多个位置来放置插入式容器，以便于操作容器并降低污染风险。使用这些插入位置可增加培养基的体积，从而延长组织生长过程中所需的培养基更换的间隔时间。在本文中，我们研究了载板系统中Thermo Scientific™ Nunc™插入式细胞培养器对构建3D表皮皮肤模型的有效性。

关键词

表皮，3D组织，人皮肤模型，插入式细胞培养器，载板，空气-液体界面，补料间隔，TEER

引言

人工生长的皮肤模型已成为模拟不同条件（如急性毒性、过敏性、炎症）对表皮组织影响的重要替代品。诱导角质形成细胞分化成不同的表皮层需要直接暴露在空气中，也需要暴露在为细胞生长和分化提供营养的培养基中。这种类型的空气-液体界面培养可以通过在一个精心定位在培养孔中的多孔膜上培养细胞来完成，使细胞的上表面暴露在空气中，而细胞的下表面则通过生长膜的孔被培养基饲养和润湿。

Nunc插入式细胞培养器是一种多孔膜装置，通常用于小规模3D皮肤生长。细胞接种在插入式细胞培养器中，插入式容器浸没在多孔板中的培养基中。在插入式容器的多孔膜上建立细胞层后，将膜上方的培养基移除，使细胞的上表面暴露在空气中。

这类系统的主要缺点是生长膜下方的空间有限，在空气-液体界面培养过程中，每个孔只允许容纳少量培养基维持细胞生长。这就要求在细胞分化和扩增所需的长时培养期间，有一个短的补料周期。使用插入式细胞培养器进行培养基更换可能是一项繁琐的任务，因为插入式容器没有牢固地固定在孔中，必须在移液步骤中绕过或移除容器，从而增加了污染和损坏3D模型或多孔膜的几率。Nunc载板系统通过将插入式细胞培养器悬挂在孔上方所需的高度解决了这些问题。在空气-液体界面培养期间使用载板使得能够在孔中使用更大体积的培养基，从而潜在地延长了两次培养基更换之间的时间间隔。如果需要，可以从孔中取出载板后再进行无菌操作，将所有已安装的插入式容器随其一起取下，以便从整个板上抽吸和吸移培养基。盖在载板上的盖子保护插入式容器和细胞免受潜在污染物的影响。

在本研究中，我们建立了一个有效的系统，使用装有Gibco™ EpiLife™生长培养基的Nunc插入式细胞培养器在体外培养3D表皮皮肤组织。我们还利用载板的高度可调节功能，简化了实验方案，延长了补料间隔并节省了时间和人力。

材料和方法

材料	货号
载板系统中的Nunc插入式细胞培养器, 24孔, 孔径0.4 μm	141002
成人表皮角质形成细胞 (HEKa)	C-005-5C
EpiLife培养基, 含60μM钙	M-EPI-500-CA
人角质形成细胞生长添加剂 (HKGS)	S-001-5
抗生素-抗真菌 (100×)	15240-062
包被基质试剂盒蛋白	R-011-K
FGF7 (KGF) 重组人蛋白	PHG0094
CyQUANT MTT细胞增殖检测试剂盒	V13154
抗坏血酸	A4544-25G

插入式容器上的空气-液体界面培养

通过添加HKGS、10 ng/mL KGF、1×抗生素-抗真菌溶液和140 μM氯化钙来制备EpiLife生长培养基。在使用培养基之前, 将50 μg/mL抗坏血酸补充进等分试样中。根据制造商的方案, 用Gibco™包被基质试剂盒中的蛋白质1:100稀释液对插入式细胞培养器进行预包装。

对于最初的细胞附着和扩增, 所有插入式容器都位于各自孔中载板的最低位置。将细胞以750,000个细胞/cm²的密度接种在预包装的插入式容器中。24孔插入式容器的培养面积为0.47 cm²。将0.5 mL生长培养基接种于下隔室, 0.5 mL细胞悬浮液接种于上隔室。在37°C和5% CO₂条件下培养2天后, 从培养孔和插入式细胞培养器内部抽吸所有培养基, 然后将适当体积的生长培养基添加到较低的隔室中, 并将插入式容器重新定位到24孔板中所需的悬挂高度, 从而建立气体-液体界面 (表1)。插入式细胞培养器内部的上隔室留空。随后进行培养基更换时, 从下隔室抽吸培养基, 并以所需的时间间隔 (表1) 用补充有额外1.5 mM氯化钙 (总共1.7 mM) 的新鲜培养基进行替换。

表1. 根据您所需的培养基更换时间间隔选择插入式容器的悬挂位置和培养基体积。

插入式容器悬挂位置	24孔板下隔室培养基体积*	培养基更换时间间隔
低	0.5 mL/孔	2天
中	1.0 mL/孔	3天
高	1.5 mL/孔	4天

*12孔载板的体积是24孔载板的两倍。

活性检测

培养23天后, 使用Invitrogen™ CyQUANT™ MTT细胞增殖检测试剂盒评估细胞活性和代谢状况。将MTT试剂加入插入式容器的上隔室中并孵育1小时。然后抽吸MTT溶液, 洗涤细胞。使用100%异丙醇从细胞层中过夜浸提甲氧氮染料。然后将浸提液转移到透明96孔板中的各个孔中, 并使用Thermo Scientific™ Varioskan™ Flash微孔板读数仪检测吸光度。在6个插入式容器中评估活性。

跨上皮电阻 (TEER) 测量

在皮肤组织生长期间的两个时间点 (接种后11天和23天) 测量了TEER。使用EVOM2™上皮伏特欧姆 (TEER) 计和探针 (World Precision Instruments) 进行测量。在记录过程中, 抽吸上、下两个隔室的细胞生长培养基, 并用0.5 mL磷酸盐缓冲液 (PBS) 进行替换。放置探针, 使一个电极浸入上隔室, 另一个浸入下隔室。在每个时间点记录6个插入式容器的TEER值。

显微镜检查

将皮肤组织接种到插入式容器中, 使其生长12天, 然后在4°C下用4%甲醛孵育过夜, 以进行固定。将插入内容物用石蜡包埋并切片, 然后进行苏木精和曙红 (H&E) 染色处理。在400倍放大倍数下拍摄组织切片照片, 以检查细胞层的分层情况。

结果

初步的细胞附着和扩增实验表明，Nunc插入式细胞培养器是人表皮角质形成细胞的优异生长底物。在气体-液体界面培养2周后，MTT检测显示所有检测孔内的活性良好（图1）。

用TEER法测定插入式容器中皮肤组织形成的屏障强度。一层成熟的皮肤组织应该阻止离子流过多孔生长膜，高水平电阻即指示其可阻止离子流过。我们在培养第11天和第23天进

行的测量显示出高水平的电阻，这表明早在第11天就形成了一个强大的屏障，并在空气暴露3周后的第23天持续成熟（图2）。

经过12天的气体-液体界面培养，在显微镜下观察固定和切片的人工皮肤组织，发现表皮层分化良好。在切片和染色的组织中可以观察到所有预期的细胞类型（图3）。

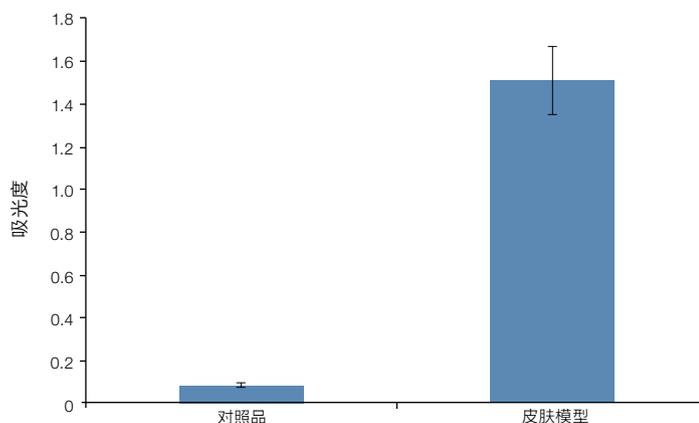


图1.MTT检测法评估细胞活性。皮肤模型样品浸提液与不含细胞的对照插入式容器的平均吸光度。误差条表示标准差。

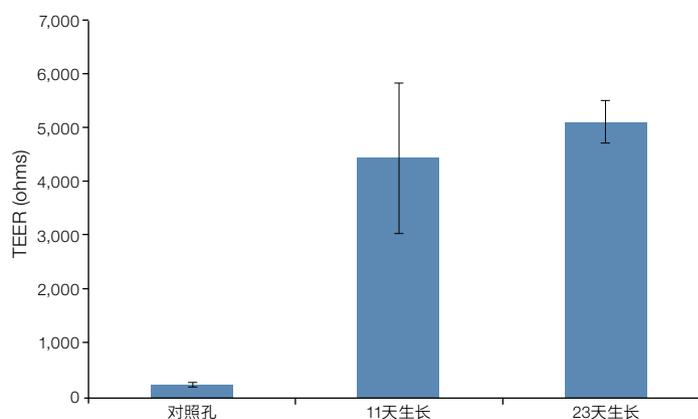


图2.通过TEER测量评估皮肤模型的完整性。在细胞初始接种到插入式容器中11天和23天后进行TEER测量。将TEER值与相同大小的无细胞对照组进行比较。误差条表示标准差。

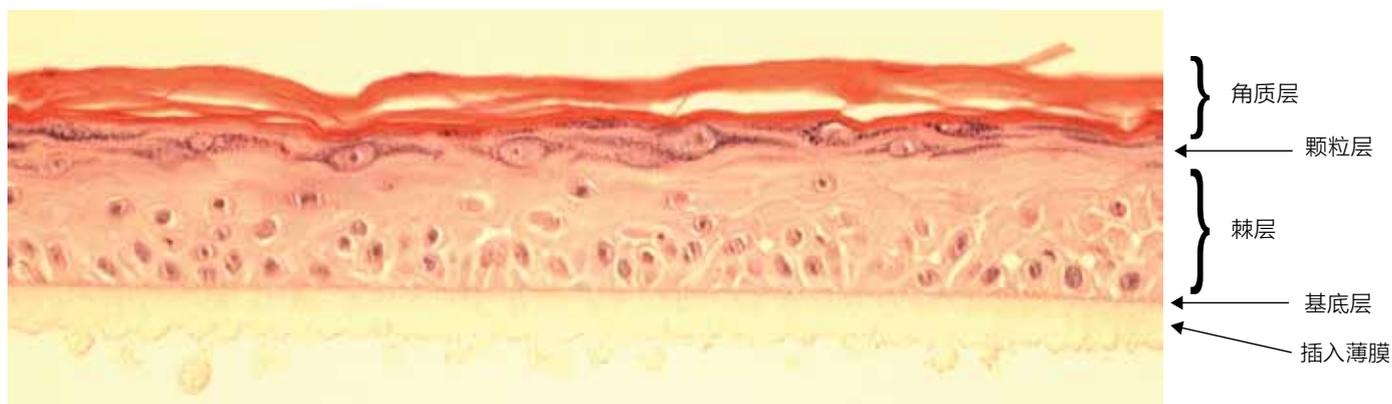


图3.H&E染色显示插入薄膜上表皮皮肤模型的分层情况。

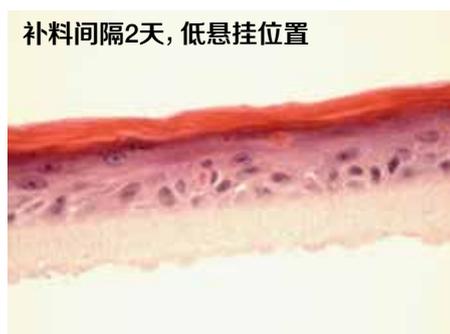
为了确定补料间隔对插入式细胞培养器中表皮组织的形成是否有显著影响, 还进行了其他实验。我们利用载板的多功能性, 测试了不同的插入悬挂位置, 以及使用不同培养基更换时间间隔 (2天、3天或4天) 时, 培养基体积的相应增加 (图4)。对于所有测试的时间间隔, 经过12天的气体-液体界面培养后, 所得到的皮肤组织显示出良好的细胞层分化, 这表明较长的间隔与较短的间隔一样有效, 并且在建立皮肤组织的过程中节省了时间和人力 (图5)。

结论

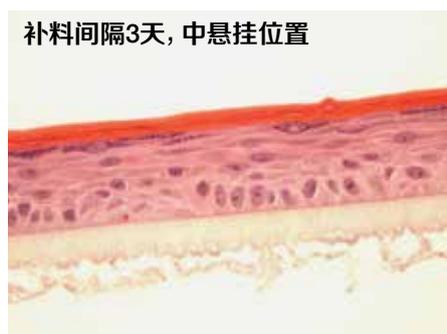
- 载板系统中的Nunc插入式细胞培养器为人皮肤组织的培养提供了一种简便易行的方法。
- 载板的多重高度设置允许在气体-液体界面培养过程中增加培养基的体积, 延长培养基更换时间间隔, 从而能够更方便地进行实验室程序。



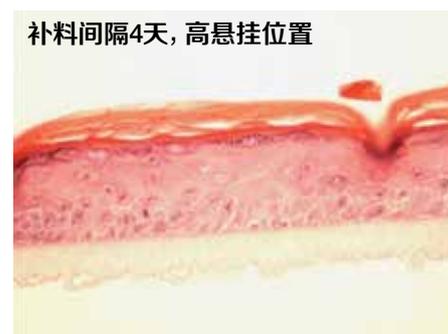
图4.Nunc载板中, Nunc插入式细胞培养器在3个悬挂位置时的横截面视图。



补料间隔2天, 低悬挂位置



补料间隔3天, 中悬挂位置



补料间隔4天, 高悬挂位置

图5.使用不同培养基更换时间间隔的12天气体-液体界面培养后, 表皮皮肤分层模型的H&E染色图。在载板上的不同插入悬挂位置采用不同体积的培养基, 以实现气体-液体界面培养。表皮组织在每孔0.5 mL、1.0 mL或1.5 mL培养基中进行培养, 分别每2天、3天或4天补料一次。组织切片用400×放大倍率拍摄。

癌症球状体的生成—提示和技巧

简介

生长为球状体的肿瘤细胞的复杂程度为中等，介于在2D单层细胞层生长的癌细胞和体内肿瘤中生长的癌细胞之间。这增强了它们作为模型系统的用途，可用于研究肿瘤进展以及对包括化学疗法和基于细胞的治疗在内的细胞毒性疗法进行高通量筛选。

当细胞在悬浮液中生长时，细胞会自发聚集或借助细胞外基质聚集，由此便会形成癌症球状体。癌症球状体高通量检测的可变性限制涉及两个关键因素。首先，多孔板中的每个孔都必须包含一个球状体，以减少读数的可变性。其次，球状体的形状和大小必须均匀，否则会导致实验之间的可变性。我们在自有实验室中测试了九种人类细胞系中的球状体生成条件，这些细胞系属于六种癌症类型。为了总结结果，我们编写了一个通用工作流程和一些提示和技巧，以帮助在Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™多孔板中实现均匀且可重现的球状体的高通量生成。这些提示特定于所测试的细胞类型，但也可以用于解决其他细胞类型中的球状体生成问题。

通用 workflow

1. 在实验当天，使用Gibco™ TrypLE™表达酶解离细胞，然后使用4倍体积的完全培养基（培养基因所选细胞系而异）中和酶。
2. 使用Invitrogen™ Countess™ 3 FL 自动细胞计数仪对细胞进行计数。细胞活性应>90%。
3. 在完全培养基或包含所需添加剂的培养基中，以1:10-1:20的比例稀释悬浮液。使用Thermo Scientific™ Finnpiptette™ F2多通道移液器，在Nunclon Sphera 96孔板的各孔中接种所需数量的细胞。

4. 在室温或4°C下，以所需速度（250-450×g）离心板5-10分钟，具体取决于添加剂的使用情况（例如，若添加Gibco™ Geltrex™基质，需为4°C；若添加型胶原蛋白，要求温度低于18°C）。
5. 根据需要更换培养基，直到球状体可以使用为止。沿孔侧面缓慢添加培养基，不要碰到球状体

癌症球状体生长的注意事项

球状体大小

根据细胞系的不同，球状体的紧密度有所不同。图1显示了四种不同细胞系的5,000个细胞中生成的癌症球状体。显而易见，接种细胞数量与球状体大小无关。因此，为了获得用于特定下游检测的特定直径的球状体，需对各细胞系的接种细胞密度进行标准化。除非另有说明，否则所有明场图像均使用Invitrogen™ EVOS™ M7000成像系统在4×物镜下采集。

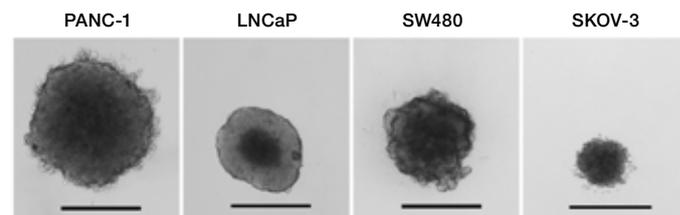


图1. Nunclon Sphera板上由癌细胞系生成的球状体。PANC-1: 胰腺癌；LNCaP: 前列腺癌；SW480: 大肠癌；SKOV-3: 卵巢癌。在每种情况下共接种5,000个细胞。比例尺: 500 μm。

时间

经证明, 3D培养中的细胞增殖速度慢于2D培养[1]。根据我们的观察, 根据细胞倍增时间的不同, 一些癌症球状体在24小时内便可准备就绪(例如A549和SKOV-3), 而有些可能需要4-9天(PC-3和T47D)。理想的球状体应为半透明, 并具有清晰的边界和极小的暗核。然而, 对于某些细胞, 特别是那些需要细胞外基质来形成球状体的细胞(见下一部分“细胞外基质”), 它们并未表现出理想形态。图2显示了T47D和SKOV-3球状体在培养过程中随时间的形态变化。T47D球状体的大小随着时间的推移逐渐增大, 其核颜色逐渐变深; 球状体在第5天时准备就绪。相比之下, SKOV-3球状体在第1天时便已准备就绪; 随着培养时间的推移, 紧密度随之增加(图2B), 且细胞似乎从球状体中分散出来。

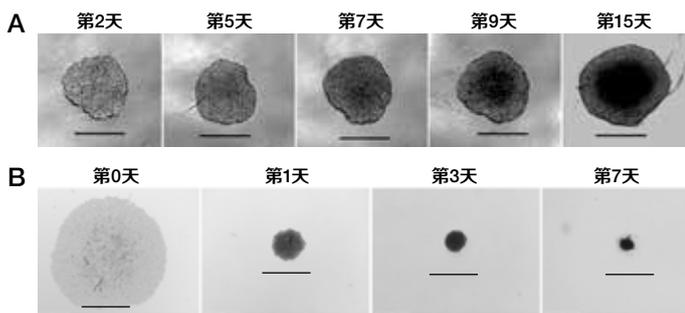


图2.不同球状体类型的形态变化。(A) 将4,000个T47D细胞和(B) 10,000个SKOV-3细胞接种至Nunclon Sphera 96孔板上, 并在指定日期进行观察。比例尺: 500 μm 。

细胞外基质

一些细胞系可自发形成球状体, 而另一些则会形成松散或紧密的细胞聚集体。要求苛刻的细胞系需要各种细胞外基质(ECM)的协助来形成球状体。例如, PC-3细胞需要Geltrex基质(图3)。为了优化MDA-MB-231细胞形成球状体的条件, 在Nunclon Sphera 96孔板中测试了各种ECM成分, 其中每孔接种 1×10^4 个细胞。铺板后第二天, 将包含各种ECM

的完全培养基添加到用过的培养基中, 并在第5天观察到细胞。如图4所示, 我们发现在这种情况下使用I型胶原蛋白最能够形成具有明确边界的球状体。在所有其他情况下, 细胞均形成聚集体。

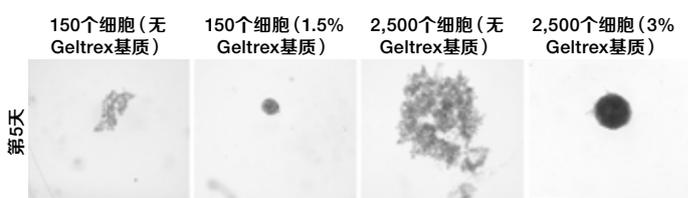


图3.在有或无Geltrex基质的情况下接种PC-3细胞以形成球状体。比例尺: 650 μm 。

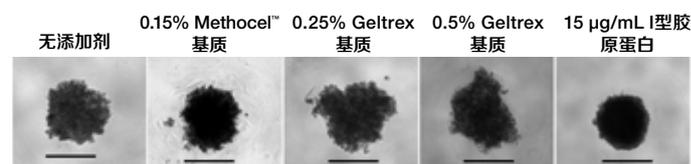


图4.ECM对球状体生长的影响。将10,000个MDA-MB-231细胞接种于添加有不同ECM的培养基中。比例尺: 500 μm 。

我们对球状体形成所需的I型胶原蛋白浓度进行了进一步标准化。随后的测试表明, I型胶原蛋白最终浓度为3 $\mu\text{g/mL}$ 时的效果最佳, 更高的浓度会破坏球状体形态, 并导致细胞从球状体中分散出来(图5)。

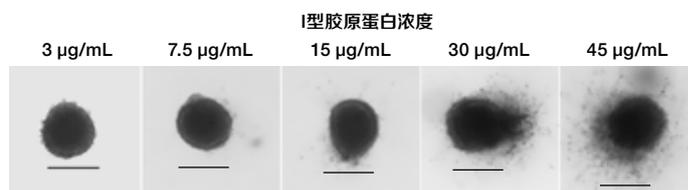


图5.标准化I型胶原蛋白浓度。将10,000个MDA-MB-231细胞接种于添加有不同浓度的I型胶原蛋白的培养基中。比例尺: 500 μm 。

为了验证球状体的形成, 我们用亲脂性膜染料Invitrogen™ DiI对细胞实体进行染色。染料可轻松进入聚集体中的所有细胞, 而球状体的紧密性阻止了染料进入核心(图6)。

MDA-MB-231细胞可以使用单一浓度的ECM, 而SW480等细胞系则需要根据接种密度使用不同的ECM浓度。如图7所示, 3 μg/mL的I型胶原蛋白浓度仅适用于625-2,500个细胞。但是, 与使用单一较低浓度的I型胶原蛋白相比, 在高密度细胞中使用更高的胶原浓度更有利于形成球状体。

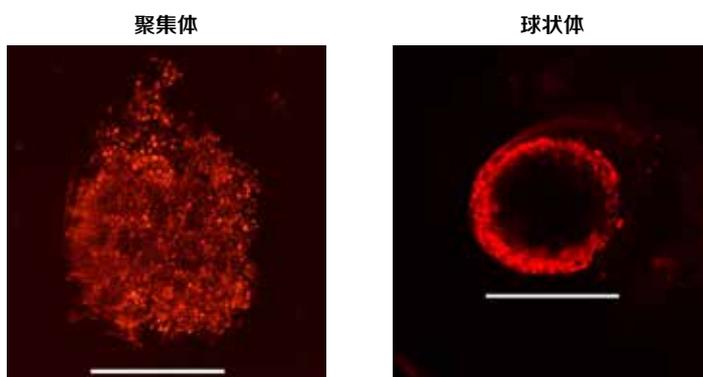


图6.球状体形成验证。在Nunclon Sphera板上, 将5,000个MDA-MB-231细胞接种于含或不含I型胶原蛋白的培养基中, 并在4天后用DiI染色。使用Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7高内涵分析平台, 在4x物镜下采集图像。比例尺: 400 μm。

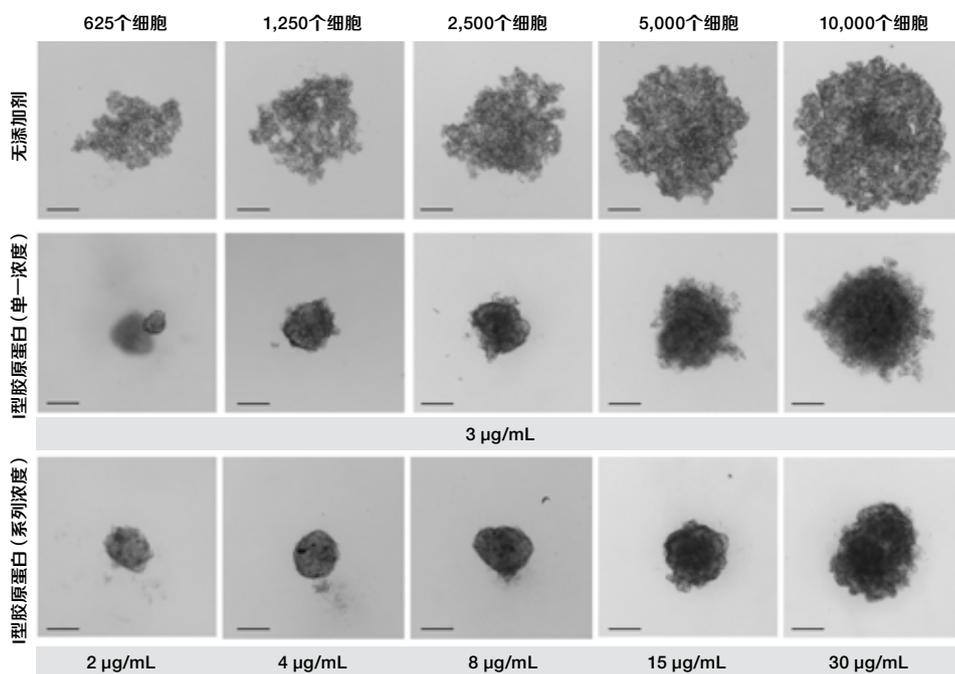


图7.较高的播种密度可能需要浓度更高的ECM。将SW480细胞接种(细胞接种密度逐渐增加)在不含添加剂的培养基中, 或添加单一浓度或系列浓度I型胶原蛋白的培养基中。比例尺: 650 μm。

塑料耗材表面

球状体形成的首要要求是非粘附表面。Nunclon Sphera孔板有助于防止细胞在底部沉淀，并促进在离心后形成均匀的球状体。我们比较了这种表面与Corning™ ULA板的球状体形成情况。据我们的观察，在9个被测试的细胞系中，大约50%的细胞系在Corning ULA表面的球状体周围形成卫星集落。这在细胞密度较高时更为明显，如HepG2（图8A，下图）。另一方面，对于测试的所有细胞系，Nunclon Sphera板都能够实现各孔中形成的单个球状体的一致性。

结论

通过使用正确的塑料表面、培养基和细胞外基质，并遵循提示和技巧，可以轻松地生成均匀且可重现的癌症球状体。在我们的观察中，具有圆形形态的细胞和成簇生长的细胞可以自行形成球状体。无法成簇生长的细胞需要ECM支持。具有细长形态的细胞对ECM的要求各不相同，因此需要针对每种细胞系优化球状体生成条件。我们的产品组合支持3D癌症球状体的稳健生成，并支持对其进行特性研究、高通量应用和分析。

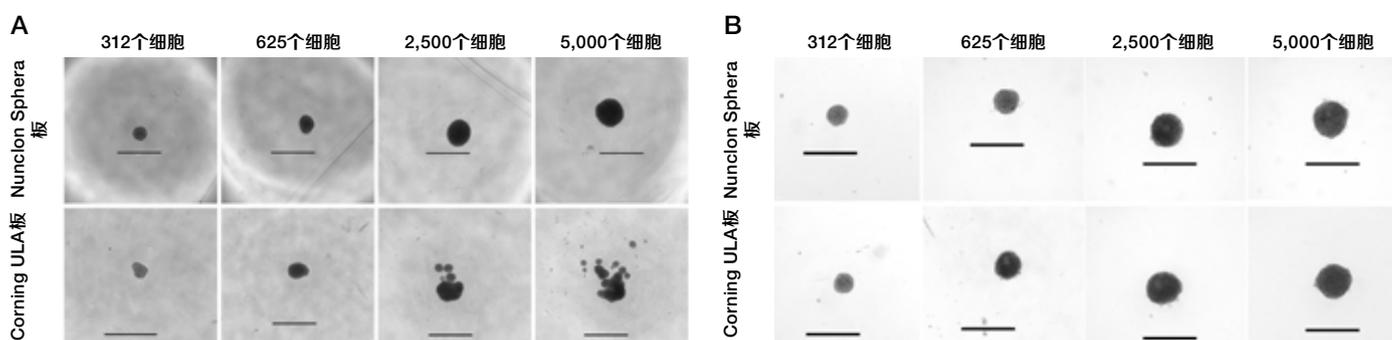


图8.表面对不同细胞系中球状体形成的影响。(A) 将HepG2细胞接种于Nunclon Sphera板(上图)和Corning ULA板(下图)上以形成球状体。**(B)** 将PC-3细胞接种于Nunclon Sphera板(上图)和Corning ULA板(下图)上添加有Geltrex基质的培养基中,以形成球状体。比例尺:1,000 μm。

参考文献

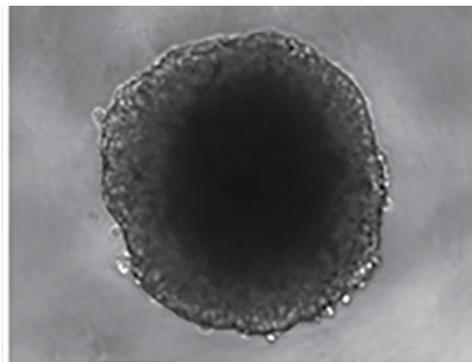
1. Anna C et al. (2013) Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS One* 8(3):e59689.

在研究中利用新维度： 全面了解球状体培养

简介

与体内生长的细胞相比，2D培养的细胞在生理和细胞反应方面都有所不同。这些不同之处促使了3D培养技术的流行。越来越多的证据表明，3D培养细胞更能代表体内环境，创造更多的生理细胞模型，甚至3D培养细胞的基因表达谱也能比2D培养细胞更准确地反映临床表达谱^[1, 2]。球状体或球体培养已经成为3D体外培养中一个特别令人兴奋的领域，因为它们的研究恶性和正常组织的生长和功能的研究中具有巨大的潜力。这些球体培养能准确地反映体内系统的情况，因而为我们了解细胞反应作出了很多贡献。细胞通常不会单独生长或相互作用，而是与其他细胞和周围的微环境形成复杂的相互作用。而建立一个包含球状体的3D环境更接近于体内条件，并允许研究人员在其体外模型中纳入细胞间相互作用、营养梯度和扩散动力学。

球状体在肿瘤生物学中有着特殊的优势，因为它们具有几个关键的组织形态学和功能特征，包括细胞间接触的形成、增殖的减少、存活率的提高和缺氧核心，因此其在研究肿瘤的生长和行为方面具有巨大的价值^[3, 4]。随着越来越多的研究者认识到球状体培养作为一种细胞模型所带来的益处，开发工作也在增加，以更好地帮助完成球状体的生成、培养和规模化。研究人员目前正在研究先进的培养方法，利用缺氧条件或者与不同细胞类型共培养，开发出越来越精确的疾病和生理学体外模型。



球状体发展简史

自1950年代以来，研究人员就开始在聚集体中培养细胞^[5]，但直到1971年，才在用中国仓鼠V79肺细胞作为结节性癌模型的研究中创造了“球状体”一词，因为这些细胞恰好形成了完美的球型^[6]。Robert Sutherland的早期研究不仅提供了一些关于营养和氧合对细胞生长影响的初步见解，还允许测定药物或辐射治疗后的生长分数。

到了20世纪80年代，Mina Bissell和她的团队在劳伦斯伯克利国家实验室开始开创性地使用3D技术建立更精确的体内细胞模型。这种偏离传统2D培养体系的转变首次通过论文发表，强调了细胞外基质（ECM）的重要性以及微环境的关键作用^[7]。这些观察结果对于推动球状体培养的应用至关重要，球状体培养作为一种普遍的、与生物学相关的系统，与广泛使用的单层培养方法相比具有明显的优点。

此后，该领域迅速扩展，用于研究从小规模疾病模型到大规模、高通量筛选（HTS）平台的许多主题，以应对现有药物研发项目中不断上升的损耗率。

ECM: 一个有影响力的网络

业界已对这些变化作出了响应, 通过开发专门的培养和维持设备和方案支持研究中的球状体培养, 包括培养板、合成包被和细胞支架。有几种常用的生成球状体的方法。这些方法包括液滴重叠法^[9]、转瓶^[9]、回转法^[10]和悬滴法^[11], 或者最近出现的在单个孔中通过悬浮培养进行高通量分析的方法^[12]。在初次形成球状体之后, 可以利用多种技术维持和培养球状体。根据预期用途, 球状体培养可利用细胞外基质或支架、改性表面、旋转生物反应器、微载体、磁悬浮、悬挂滴板或磁性3D生物打印。

球状体的成功形成和培养与ECM有很大关系。ECM通常由可溶性蛋白质和不溶性胶原蛋白纤维组成。胶原蛋白形成刚性结构, 允许组织承受拉伸等机械应力, 而ECM内的蛋白质会参与多种其他过程。例如, 蛋白聚糖有助于信号传导、结合生长因子和结合激素, 而层粘连蛋白和纤连蛋白等多粘附基质蛋白可以结合胶原蛋白和其他ECM成分。

ECM与细胞质膜接触的点为粘着斑。它们在不同的组织中有所不同, 但通常都由整合素分子组成, 这些整合素分子与细胞内和细胞外基质成分结合, 使这些细胞外基质成分成为细胞内信号传递的功能单元。

当涉及到粘附作用时(不仅是细胞间的粘附, 而且也涉及细胞与培养容器的粘附), 细胞外基质也很重要。培养球状体

时, 介导粘附的ECM蛋白会自动粘附在培养容器的表面。这可能会干扰完整球状体的形成, 并可能导致形成多个球状体或卫星集落。为了优化球状体的形成, 制造商们已经开发了許多经过合成修饰的培养容器表面, 这些表面专门抑制ECM蛋白的吸附, 阻止细胞和培养容器之间的粘附, 从而促进细胞间聚集和球状体的形成。

Nunclon Sphera表面在培养癌症球状体方面表现优异

Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™亲水性聚合物包被表面已被证明能够最大程度地减少表面可变性。这种聚合物包被可阻止ECM吸附到表面, 从而支持形成一致的球状体(图1)。

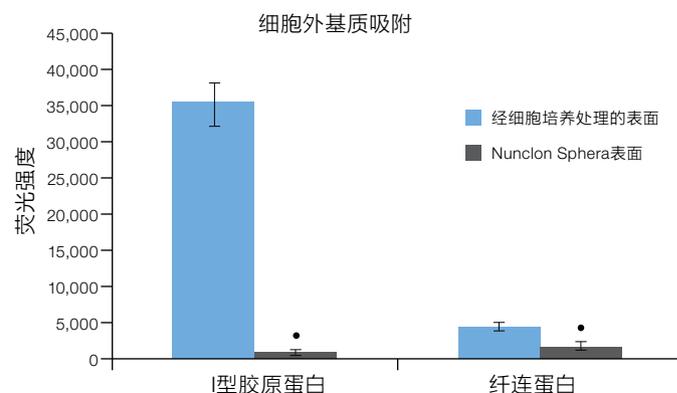


图1. 细胞外基质吸附。与经标准细胞培养处理的表面相比, Nunclon Sphera表面对I型胶原蛋白和纤连蛋白的吸附极低。学生t检验, $P < 0.01$ 。

通过将亲水性聚合物涂层与U型孔相结合,可以在不产生卫星集落的情况下培养球状体。将HCT 116人结肠癌细胞接种到Nunclon Sphera 96孔U型底孔板上。以同样的方法将细胞接种在未经处理的96孔U型底孔板中含3%甲基纤维素的完全DMEM中。以不同密度接种HCT 116人结肠癌细胞,可以在每个单独的孔中一致地生成边缘清晰的单个球状体(图2)。

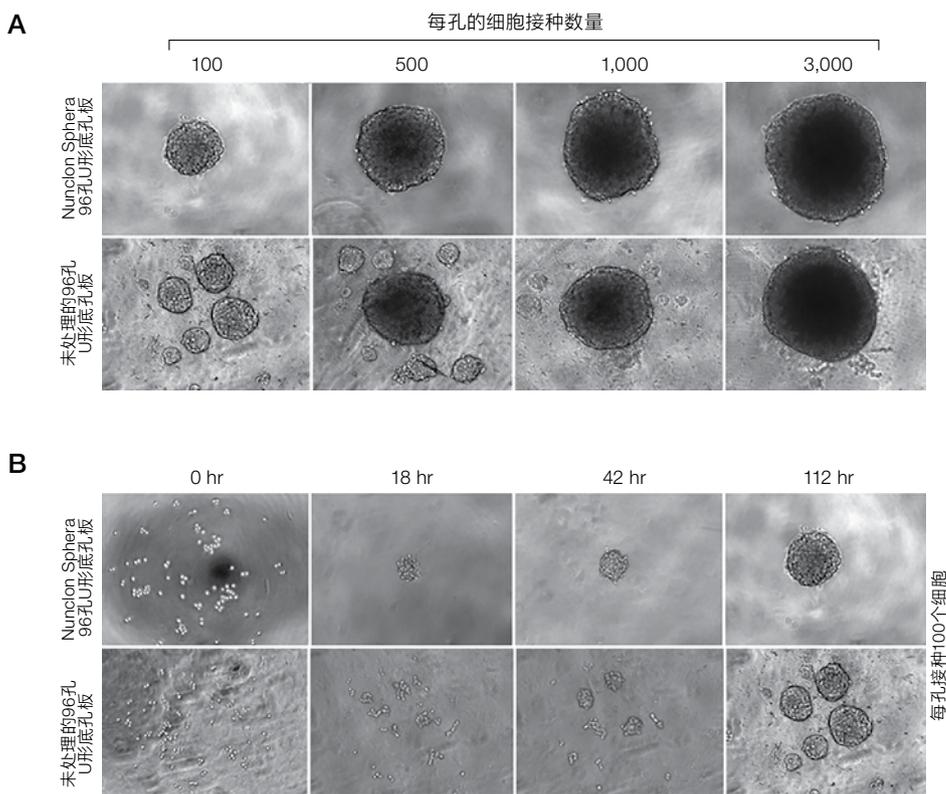


图2. Nunclon Sphera板相较于未处理的板和含甲基纤维素培养基的优点。(A) 在Nunclon Sphera孔板上生长的癌症球状体质量高且稳定。(B) 在Nunclon Sphera 96孔U型底孔板上较早形成单个癌症球状体。(由维也纳医科大学医学遗传学研究所的Dolznic教授提供)

为了展示球状体的生长,在Nunclon Sphera板上以不同密度培养A549人腺癌细胞和HCT 116人结肠癌细胞2周。根据尺寸测量的结果,两种细胞类型都显示出球状体的充分生长(图3A)。此外,使用Invitrogen™ PrestoBlue™细胞活性检测试剂盒评估A549和HCT 116球状体的细胞健康状况(图3B)。

数据根据球状体大小进行归一化,以便进行一致的定量比较,比率更高表示球状体更健康。通过Invitrogen™ LIVE/DEAD™ 荧光染料检测试剂盒进一步证实了癌症球状体的细胞活性(图3C)。所有参数表明,在Nunclon Sphera板上生长的癌症球状体健康且稳健,并且Nunclon Sphera 96孔U型底孔板是常规和高通量癌症球状体应用的可靠且方便的工具。

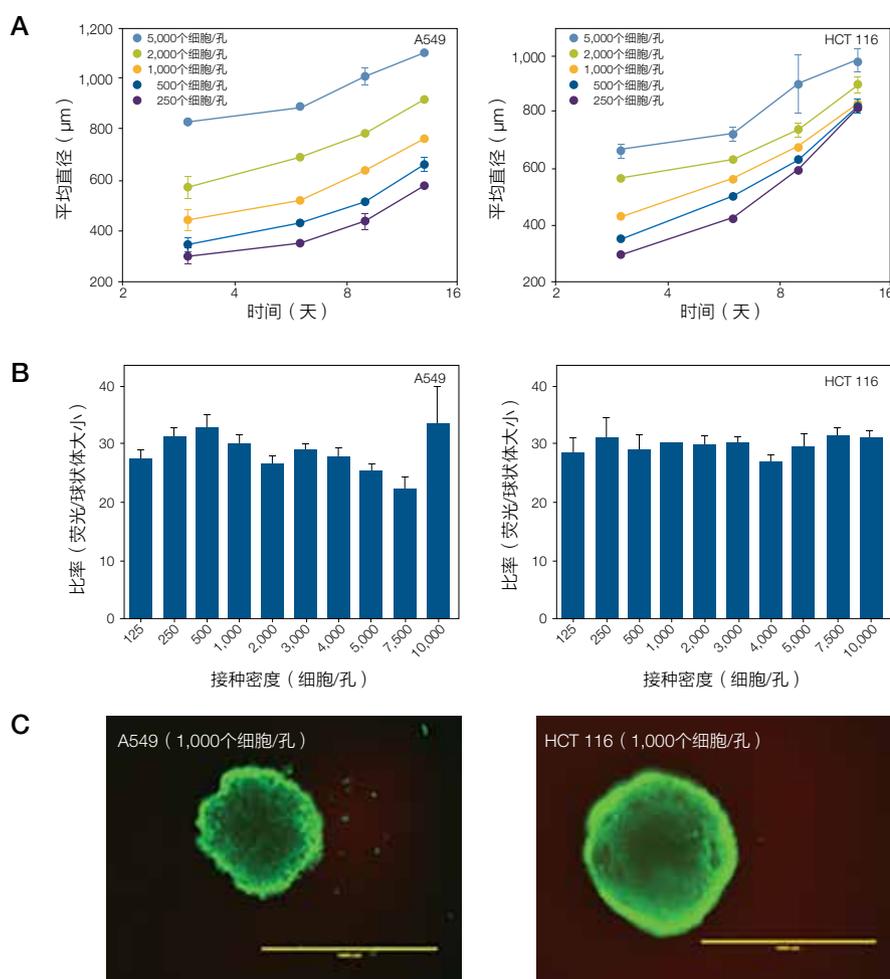


图3. Nunclon Sphera板上球状体生长、细胞健康状况和活性的评估。(A) Nunclon Sphera板上A549和HCT 116癌症球状体历时13天的生长动力学评价。数据代表每个细胞数3份平行样本的平均值± SD。**(B)** 在Nunclon Sphera板上使用PrestoBlue细胞活性检测试剂盒评估球状体细胞的健康状况,数据按球状体大小进行了归一化。**(C)** 通过LIVE/DEAD染色检测试剂盒评价球状体细胞的活性,其中活细胞染成绿色,死细胞染成红色。比例尺=1,000μm。

缺氧培养条件

除了专门的培养容器外，培养球状体还需要精确控制非生物条件，例如温度、湿度和pH值。气体条件是细胞培养的另一个重要条件，这通常意味着需要模拟大气中的氧气压力，并补充5-10%的二氧化碳。然而，虽然大气中的氧气含量约为20%，但人体内的氧气含量在12%到低至1%的范围内。鉴于此，一些研究者开始在缺氧条件下培养他们的细胞。

早在1972年，Alan Richter和他的同事通过在1-3%的氧气中进行培养来提高小鼠和大鼠胚胎组织的铺板效率，氧气的作用就已得到重视^[13]。21世纪是细胞培养真正走向成熟的时代，从常规细胞培养到细胞治疗，再到个性化药物的开发，各方面都占据了一席之地。这些应用重新激发了人们对细胞培养中氧含量的兴趣，在过去的十年左右，缺氧元素成为球状体培养的前沿焦点。

在缺氧条件下培养的细胞生长更快、寿命更长、压力更小。细胞培养箱除了控制二氧化碳外，还额外控制氮气，这是达到缺氧状态的最佳方法。所谓的三气培养箱，如Thermo Scientific™ Heracell™ VIOS培养箱，可以优化低氧培养条件，提供最佳生长环境并保证培养稳定性。然而，术语“三气”是误称，因为它仅提供了二氧化碳和氮气，从而将内部氧气含量降低至1%。

缺氧状态实时检测通常使用在特定条件下发出荧光信号的化学物质来进行。以荧光化合物形式存在的一种特殊的缺氧探针具有活细胞渗透性，当氧含量低于5%时会开始发出荧光，可实现对细胞内缺氧状态的可靠和可重复的测量（图4）。这种试剂比使用哌莫硝唑加合物更可取，因为哌莫硝唑加合物只对极低水平的氧气（分压 ≤ 10 mHg）有反应，低于可能发生缺氧的水平可能产生假阴性结果。Invitrogen™ Image-iT™缺氧试剂的灵敏度范围更广，对氧气水平变化的反应迅速，是检测3D培养物、球状体或神经细胞缺氧状况的理想工具^[14, 15]。

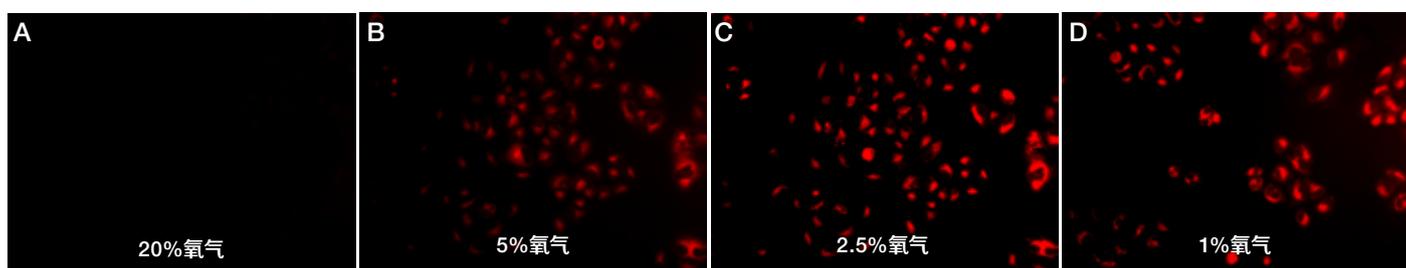


图4. 缺氧条件的检测。 A549细胞在Thermo Scientific™ Nunc™ 35 mm玻底培养皿的完全培养基上生长，密度为105个细胞/皿。将细胞接种在含5 μ M Image-iT缺氧试剂（红色）的Gibco™ FluoroBrite™ DMEM中，于（A）20%、（B）5%、（C）2.5%和（D）1%氧气条件下，在连接Invitrogen™ EVOS™ FL自动成像系统的Invitrogen™ EVOS™台式培养室中孵育1小时。每个氧气水平下，均在孵育1小时后拍摄图像。氧含量在5%时即可检测到缺氧信号，2.5%和1%时信号强度增加。

癌症生物学中的球状体

球状体培养方法为我们对细胞生物学的基本理解以及癌症生物学的深入研究做出了重大贡献。多细胞肿瘤球状体 (MCTS) 模型使用200-500 μm 的球状体, 适用于癌症生物学, 因为正如前面提到的那样, 它更精确地模拟了癌症生理学。在这个模型中, 球状体形成了氧气、营养和分解代谢的化学梯度, 就像体内的肿瘤一样, 并且二者具有相似的组织形态学和功能特征^[16]。球状体内部具有与实体瘤相同的缺氧核心 (图5), 在那里细胞生长迅速, 血液供应不足, 使得肿瘤中心的氧气浓度极低。肿瘤的慢性缺氧区域对治疗具有高度抵抗力, 因为化疗很难穿透这些区域^[17]。

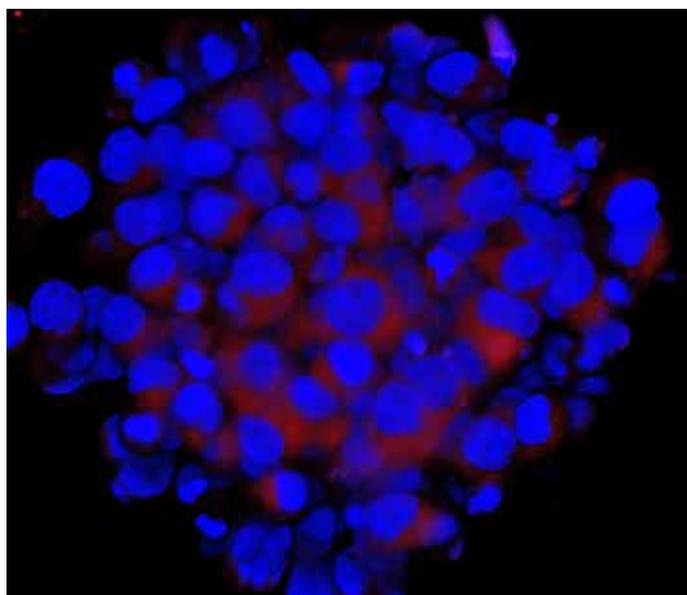


图5.用于缺氧核心评估的单个HeLa球状体。将HeLa细胞以1,000个细胞/孔的密度铺板。在Nunclon Sphera 96孔U型底孔板上培养两天, 然后用Image-iT缺氧试剂 (红色) 和Invitrogen™ NucBlue™ Live Ready Probes™ 试剂 (蓝色) 对HeLa球状体进行染色。在共聚焦显微镜下拍摄图像。

此球状体中的氧梯度从外围的常氧细胞发展到核心处的缺氧细胞, 为评估新的药物制剂和药物输送方法提供了一个优异的模式。MCTS模型可用于验证在缺氧条件下活化的化合物, 因此专用于评估缺氧核心, 并评价药物和信号通路^[18, 19]。

癌症球状体复制肿瘤关键元素 (如缺氧、坏死、血管生成和细胞粘附[20]等) 的能力令人感兴趣, 而3D细胞培养也已被用于研究活性、克隆形成、LD50和广泛条件下的转移潜能。球状体系统提供的多功能性改变了我们对癌症治疗的理解和开发。

结论

细胞培养的球状体系统不仅对我们初步了解细胞、组织和细胞外基质之间的相互作用如何影响癌症等病理状态具有重要意义, 而且对开发更强大的药物筛选程序和改进器官型模型也具有重要意义。

- Nunclon Sphera表面显示出极低的ECM结合特性; 因此它能有效地阻止细胞附着并促进球状体的形成
- Nunclon Sphera 96孔U型底孔板支持癌症球状体在常用癌细胞系中的一致形成和生长
- 癌症球状体中缺氧核心的证据表明, 在Nunclon Sphera板上进行3D癌症球状体培养提供了一个理想的用于体外肿瘤建模的系统

方法: 癌症球状体培养

在对癌细胞系进行球状体培养之前, 将其保存在Thermo Scientific™ Nunc™经细胞培养处理过的EasYFlasks™培养瓶中。为了形成癌症球状体, 将细胞以每孔100-5,000个细胞的密度接种到Nunclon Sphera 96孔U型底孔板中, 每孔含200 μL Gibco™ DMEM, 添加有GlutaMAX™添加剂、10%FBS、1×MEM非必需氨基酸、100 U/mL青霉素-链霉素和25 mM HEPES。将未处理的平板以同样的方式接种在含有3%甲基纤维素的完全DMEM培养基中。将板以250×g短暂离心5分钟。然后在37°C和5% CO₂下培养细胞, 每72小时重新补充一次培养基, 即从每个孔中小心地移出100 μL培养基, 再使用多通道移液器补充100 μL新鲜生长培养基。使用Invitrogen™ EVOS™成像系统检查球状体的形成和生长。

参考文献

1. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J et al. (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol* 31(2):108–15.
2. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C et al. (2010) Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* 148(1):3–15.
3. Heylman C, Sobrino A, Shirure VS et al. (2014) A strategy for integrating essential three-dimensional microphysiological systems of human organs for realistic anticancer drug screening. *Exp Biol Med* 239(9):1240–54.
4. Tanner K, Gottesman MM (2015) Beyond 3D culture models of cancer. *Sci Transl Med* 7(283):283ps9.
5. Moscona A (1957) The development *in vitro* of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 43(1):184–94.
6. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR (1971) Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 46(1):113–20.
7. Bissell MJ, Hall HG, Parry G (1982) How does the extracellular matrix direct gene expression? *J Theor Biol* 99(1):31–68.
8. Carlsson J, Yuhas JM (1984) Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res* 95:1–23.
9. Sutherland RM, Durand RE (1984) Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. *Recent Results Cancer Res* 95:24–49.
10. Moscona A (1961) Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells: a quantifiable approach to cell interactions *in vitro*. *Exp Cell Res* 22:455–75.
11. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ et al. (2003) Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 83(2):173–80.
12. Ivascu A, Kubbies M (2006) Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen* 11(8):922–32.
13. Richter A, Sanford KK, Evans VJ (1972) Influence of oxygen and culture media on plating efficiency of some mammalian tissue cells. *J Natl Cancer Inst* 49(6):1705–12.
14. Mandavilli BS, Chen A, Robinson V et al. (2015) Intracellular detection of hypoxia in live cells. Presentation at American Association for Cancer Research (AACR), Poster 3007.
15. Zhang S, Hosaka M, Yoshihara T et al. (2010) Phosphorescent light-emitting iridium complexes serve as a hypoxia-sensing probe for tumor imaging in living animals. *Cancer Res* 70(11):4490–8.
16. Thoma CR, Zimmerman M, Agarkova I et al. (2014) 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Del Rev* 69–70:29–41.
17. Das V, Bruzzese F, Konecny P et al. (2015) Pathophysiologically relevant *in vitro* tumor models for drug screening. *Drug Disc Today* 20(7):848–55.
18. Dufau I, Frongia C, Sicard F et al. (2012) Multicellular tumor spheroid model to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics: application to the gemcitabine/CHK1 inhibitor combination in pancreatic cancer. *BMC Cancer* 12:15.
19. Mead S, Foster R (2015) A multicellular tumor model: Applications for evaluating drugs and signaling pathways in a 3D system. Application note available from <http://www.horizondiscovery.com/>
20. Benien P, Swami A (2014) 3D tumor models: history, advances and future perspectives. *Future Oncol* 10(7):1311–27.

A.12

通过高通量筛选检测分析癌症球状体

简介

在形态、结构复杂性、表型和对化学疗法的灵敏度方面，以球状体生长的癌细胞比单细胞层中生长的细胞更接近人类肿瘤。作为更具有生理相关性的模型系统，它们可以更好地预测药物谱分析和细胞毒性。因此，药物的早期筛选越来越依赖于3D细胞培养。近年来，肿瘤源性球状体已被用于优化卵巢癌和肝细胞癌的癌症疗法。然而，使用球状体进行药物筛选面临着一些挑战：首先，每个孔中的球状体数量以及球状体形状和大小需保持一致，以便减少平行样本之间的可变性。为了应对这一挑战，我们在附录A.10中标题为“癌症球状体的生成—提示和技巧”的应用指南中汇编了为高通量筛选（HTS）检测生成均匀且可重现的癌症球状体的提示。我们还在图1中概述了用于稳健生成3D癌症球状体的工作流程。

生成3D癌症球状体的图形化工作流程



图1.在Thermo Scientific™ Nunclon™ Sphera™板上生成球状体的过程示意图。

使用球状体进行筛选的另一个挑战是确定药物渗透性以优化治疗时间。此外，球状体的使用会使实验设计和解释变得复杂，但这可以通过使用正确种类的试剂、设备和方案加以解决。本指南概述了可用于癌症球状体以评估药物反应的不同种类的HTS检测。我们还提供了一些有用的指南，可用于处理球状体和采集数据以获得最有意义的结果。所有球状体均在Nunclon Sphera孔板上使用适当的Gibco™细胞培养基生成。

使用读板仪读数进行检测

使用Invitrogen™ PrestoBlue™ HS细胞活性试剂进行细胞活性和细胞毒性检测。

这种直观的检测利用刃天青监测细胞健康状况。进入健康细胞后，刃天青在线粒体中被还原为试卤灵，从而产生荧光（激发/发射560/590 nm）。我们使用此检测比较了2D和3D培养中细胞对阿霉素（一种化疗药物）的反应。考虑了两种不同类型的癌细胞（HepG2和PANC-1）。铺板后4天（HepG2）或7天（PANC-1）用阿霉素处理球状体和单细胞层，并孵育72小时。然后将PrestoBlue HS试剂以1:10（v/v）添加到用过的培养基中，并将球状体在37°C下孵育6小时。

然后，使用Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX多模式微孔板读数仪获取高通量读数。我们建议选取最高读数，以实现重复实验之间的同质性。使用GraphPad Prism™ 5.01，通过对数（抑制剂）vs.反应的可变斜率的非线性回归分析计算IC50。如PANC-1所示（图2A），阿霉素处理导致球状体随着剂量的增加而分解，表明存在细胞毒性。对于两种细胞系，3D培养阿霉素的IC50至少是2D培养的两倍（图2B），表明2D培养对药物的灵敏度更高。

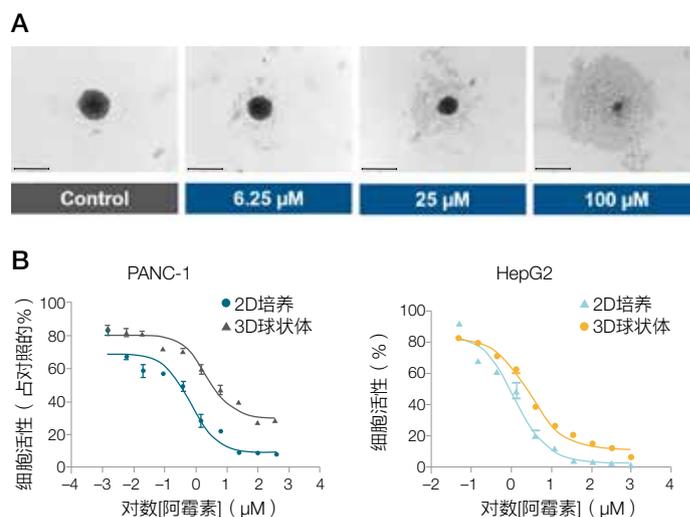


图2. 2D和3D培养中的球状体形态以及阿霉素处理的有效性。(A) 处理后72小时，对照和经阿霉素处理的PANC-1球状体的形态。使用Thermo Scientific™ EVOS™ M7000成像系统在4×物镜下采集图像。比例尺：650 μm。**(B)** 2D和3D培养中经阿霉素处理的PANC-1（左）和HepG2（右）球状体的剂量反应曲线。

使用Invitrogen™ PSA（总）/KLK3人类ELISA试剂盒分析PSA水平

血清中的前列腺特异性抗原（PSA）是用于前列腺癌诊断的已知生物标志物。已成功将PSA（总）/KLK3人类ELISA试剂盒用于2D培养的细胞培养上清液中PSA的检测[4]。根据制造商的说明，我们比较了2D和3D细胞培养中的PSA分泌情况。我们选择了内源性表达KLK3基因（反过来编码PSA）的LNCaP细胞系。以来自PC-3细胞的培养基（不会内源性产生PSA）作为阴性对照。铺板后4天，使用2 nM二氢睾酮（DHT，可增强PSA表达）或80 μM顺铂（抑制PSA表达）处理LNCaP单细胞层和球状体，并孵育48小时。收集培养上清液，在稀释缓冲液中以1:20进行稀释，并使用PSA（总）/KLK3人类ELISA试剂盒和Varioskan LUX多模式微孔板读数仪获取比色读数，以检测分泌的PSA。根据试剂盒的说明，使用比色读数计算相对PSA水平。

在2D和3D培养中, DHT处理分别导致PSA分泌增加17%和21%, 而顺铂处理使内源性PSA分泌减少22-23% (图3)。然而, 3D培养与2D培养相比在休眠或诱导PSA水平上未显示出任何重大差异。此例说明了如何将来自球状体的条件培养基用于高通量的非细胞相关检测。事实上, 使用适当的读数也可以执行多重检测。

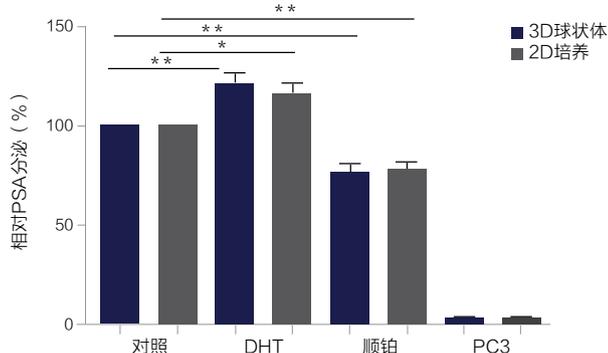


图3. 使用DHT和顺铂进行处理后, 通过ELISA对PSA分泌进行定量。误差直方图表示平均值的标准误差。N=2。通过单因素方差分析, 与未处理对照的差异为* $P < 0.01$ 和** $P < 0.001$ 。

使用基于图像的读数进行检测

使用Invitrogen™ LIVE/DEAD™试剂盒进行细胞活性/细胞毒性检测

LIVE/DEAD试剂盒是一种双色检测试剂盒, 可根据质膜完整性和酯酶活性测量细胞活性。它通过用Invitrogen™钙黄绿素AM对活细胞进行染色来区分活细胞和死细胞, 钙黄绿素AM在具有细胞内酯酶活性的活细胞转化为绿色荧光钙黄绿素, 而死细胞则带有红色荧光乙锭均二聚物-1 (EthD-1), 表示质膜完整性损失。培养1天后, 以不同浓度的化疗药物紫杉醇将SKOV-3球状体处理72小时, 然后分别与1 μM 的钙黄绿素AM和EthD-1在37°C下孵育3小时。在此之后, 用1xPBS交换一半的培养基以洗涤球状体, 然后进行成像。我们发现, 从孔侧面轻轻交换培养基比将板离心的效果更

好, 并且有助于球状体保持在孔的中心, 从而有助于进行图像采集 (图4A)。使用DAPI通道自动对焦球状体 (球状体与Invitrogen™ NucBlue™ Live ReadyProbes™试剂一起孵育, 并使用钙黄绿素AM和EthD-1染色), 并使用位于中心且强度最大的图像投影来采集Z层叠图像。使用Thermo Scientific™ CellInsight™ CX7高内涵筛选平台采集图像, 并使用Thermo Scientific™ HCS Studio细胞分析软件4.0上的细胞活性工具进行分析。将经处理的样品中的钙黄绿素荧光值归一化为对照样品的钙黄绿素荧光值, 以计算活细胞百分比。使用GraphPad Prism软件绘制紫杉醇浓度值曲线。紫杉醇浓度增加导致细胞活性降低 (图4B)。

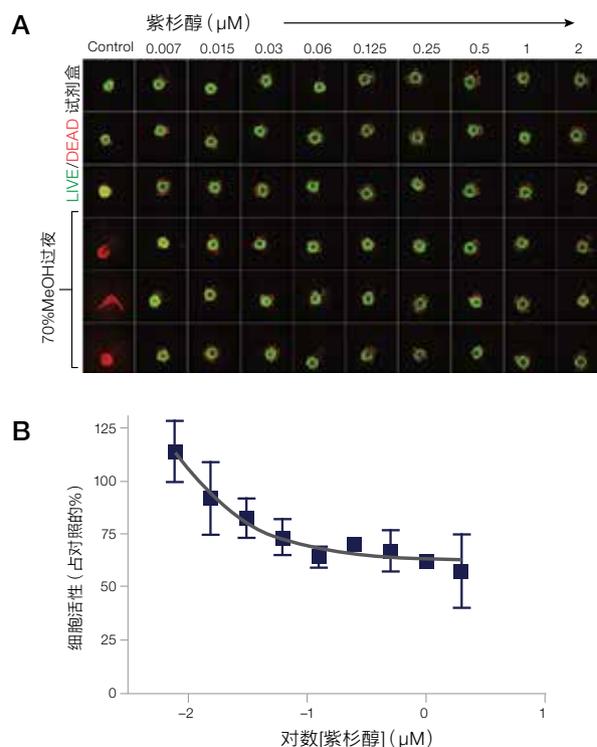


图4. 细胞活性检测分析。(A) 图像合成图显示紫杉醇处理后SKOV-3球状体的活细胞/死细胞染色。使用CellInsight CX7 HCS平台在4x物镜和共聚焦模式下采集图像。在指定的孔中用70%甲醇处理细胞 (杀死细胞), 将其用作阴性对照。(B) 随着紫杉醇浓度增加的细胞活性百分比曲线。在GraphPad Prism软件中, 将使用HCS Studio软件获得的值绘制成曲线, 并使用非线性回归进行拟合缩放。N=2。

使用Invitrogen™ CellEvent™ Caspase-3/7 Green检测试剂进行细胞凋亡检测

该试剂是与核酸结合染料偶联的四-氨基酸肽 (DEVD)。除非DEVD被活性caspase-3/7裂解, 否则染料是非荧光的。DEVD裂解后, 染料能够与DNA结合并发出荧光信号, 从而提供用于检测经历caspase-3/7依赖性细胞凋亡的细胞的方法。如前所述, 使用I型胶原蛋白形成MDA-MB-231球状体, 并在第4天用不同浓度的caspase依赖性凋亡诱导药物依托泊苷处理72小时。然后将球状体与每毫升中含2 μ M CellEvent Caspase-3/7绿色检测试剂和1滴Invitrogen™ NucBlue™试剂的PBS在37°C下孵育2小时。如果在此阶段使用PBS, 则无需进一步洗涤球状体。在共聚焦模式下, 使用4 \times 物镜在CellInsight CX7高内涵筛选平台上采集图像, 并使用HCS Studio软件4.1的点测量工具进行分析。

与对照相比, 随着依托泊苷浓度的增加, caspase-3/7信号增强。然而, 当依托泊苷后超过6 μ M后, caspase-3/7信号逐渐降低, 这可能与细胞死亡增加有关 (图5A、B)。另一点需要注意的是, 细胞外基质在染色过程中产生了背景, 并且已使用HCS Studio软件中的绿色通道背景去除功能将其去除 (图5C)。

使用Invitrogen™ Click-iT™ EdU细胞增殖试剂盒进行细胞增殖检测

该试剂盒使用“点击”化学检测经历新DNA合成的细胞。使T-47D细胞形成球状体24小时, 然后使用100 nM秋水仙碱进行处理, 秋水仙碱是细胞周期中有丝分裂期的抑制剂。处理约30小时后, 使用包含20 μ M EdU的新鲜培养基交换50%用过的培养基, 并在37°C下孵育过夜。

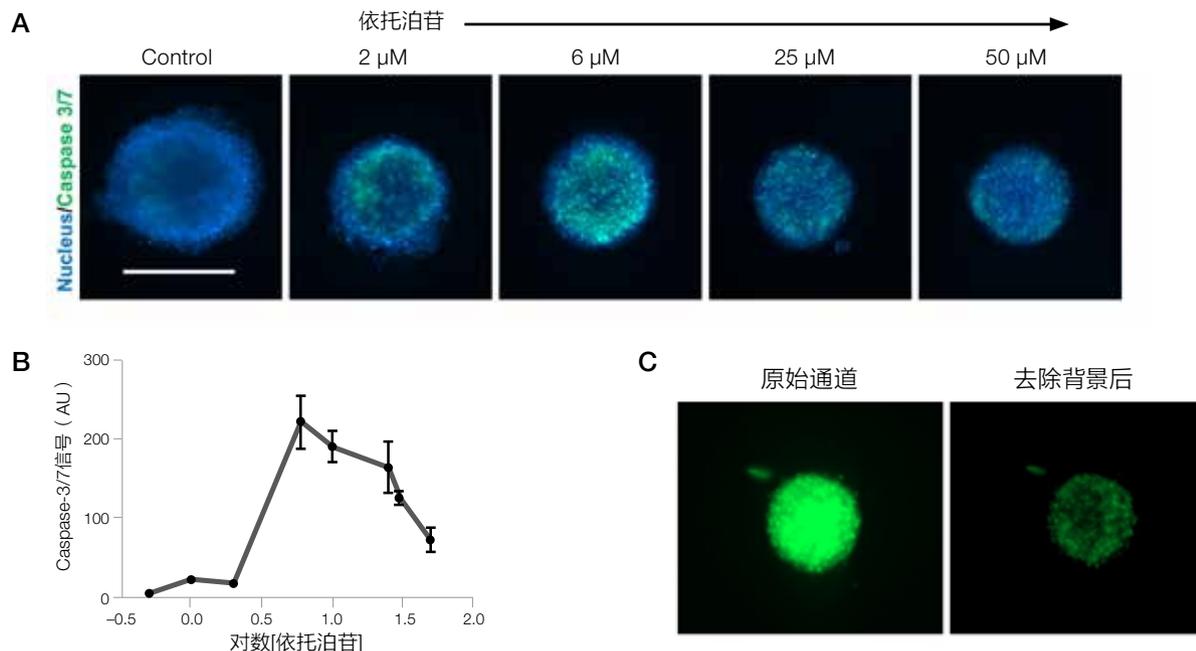


图5. 细胞凋亡检测分析。 (A) 对照和经依托泊苷处理的MDA-MB-231球状体的代表性图像。比例尺: 500 μ m。 (B) Caspase-3/7信号强度与依托泊苷浓度增加的关系图。每种处理浓度均考虑六个球状体。根据从HCS Studio软件获得的数据, 使用GraphPad Prism软件生成绘图。误差条代表标准差; N=2。 (C) MDA-MB-231球状体的原始通道 (左) 和经过背景校正的通道图像 (右) 表示。

使用Click-iT-EdU细胞增殖试剂盒检测包含EdU的增殖细胞,但略微改变了制造商的方案。简单来说,在3.7% Thermo Scientific™ Pierce™甲醛中固定细胞30分钟,并用0.25% Thermo Scientific™ Triton™ X-100清洁剂透化1小时,然后用Click-iT™ EdU染料检测混合物孵育过夜(而试剂盒说明书中为在室温下孵育30分钟)。由于方案中涉及多次洗涤,球状体可能会从孔中心移出。因此,它们并非始终完全落在光路中。这导致读数错误且平行样本之间存在可变性。因此,在将球状体可视化后进行分析,以获得更有意义的数

据。示例如图6A所示。图中的两个球状体均从孔中心移出,而右侧板中的球状体(箭头所示)仅在视场中被部分捕获。因此,将其排除在分析之外。此外,必须在检测中使用小型球状体(200-400 μm),以便在Thermo Scientific™ CellInsight CX7和CX7 LZR HCS平台上捕获大部分球状体。然而,这一挑战已通过一种新的软件技术,即Thermo Scientific™ EurekaScan™ Finder得以解决。EurekaScan Finder可为CellInsight CX7 LED和LZR HCS平台提供“查找与发现”功能,旨在以逐步提高的放大倍率来自动识别和捕获不规则接种的生物样品(包括球状体),以此加速发现进程。使用EurekaScan Finder功能可在低放大倍率“查找”操作中识别标本,并且可在“发现”标本后以更高的放大倍率进行有效扫描,以获得最佳分辨率。EurekaScan Finder使科学家能够首先使用低放大倍率在较大表面上识别样品,并在中等放大倍率下捕获样品,然后对样品进行罕见事件评价,或在更高放大倍率下改善分辨率。

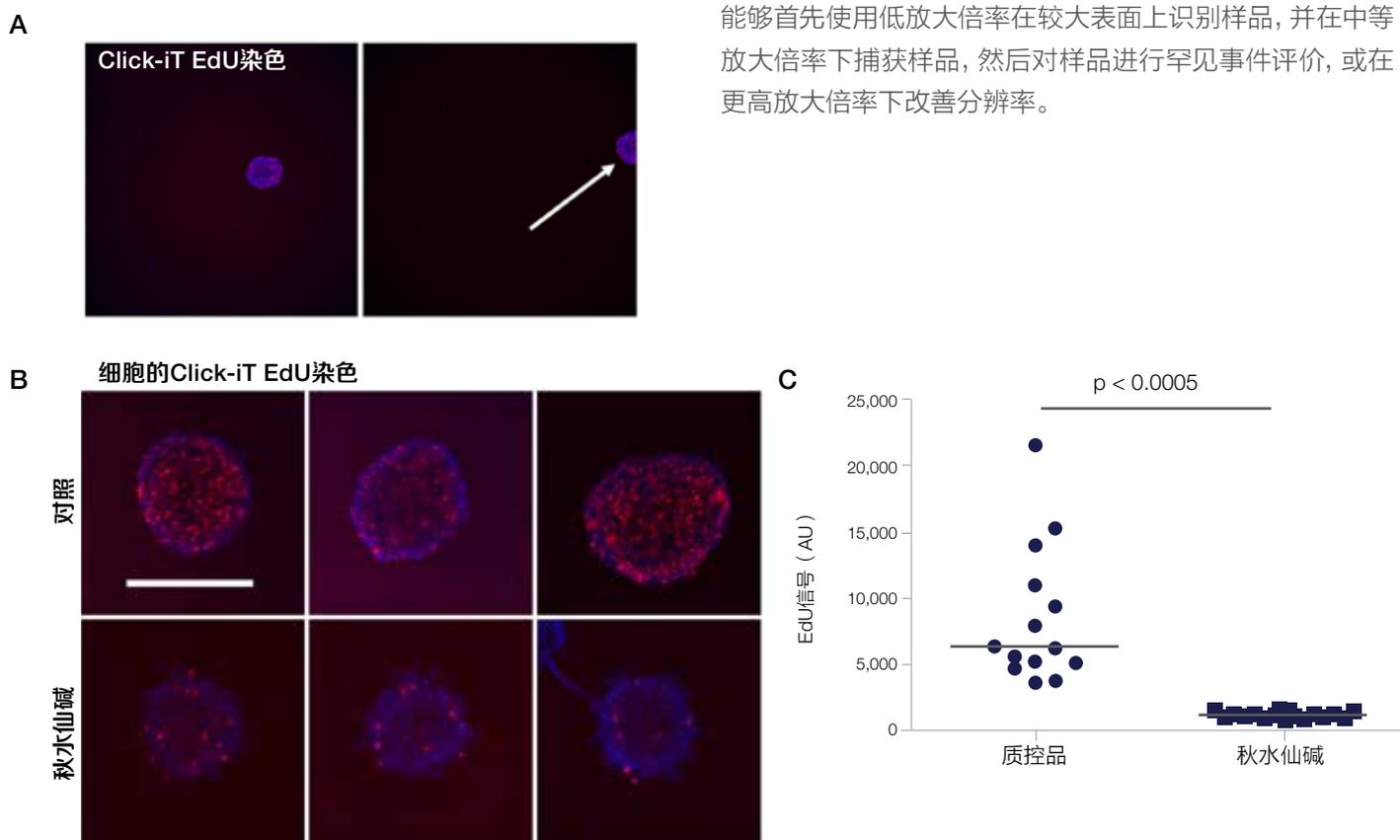


图6. 细胞增殖检测分析。 (A) 完全捕获(左)和部分捕获(右)球状体的视图,后者在洗涤过程中移出。(B) 代表性图像显示未经秋水仙碱和经秋水仙碱处理的T-47D球状体中的Click-iT EdU染色(红色)。使用CellInsight CX7 HCS平台在4×物镜和共聚焦模式下采集图像。比例尺: 200 μm。(C) 未经秋水仙碱和经秋水仙碱处理的T-47D球状体中细胞增殖的点图分析。使用HCS Studio软件4.0中的通用强度测量工具分析Click-iT EdU信号(y轴); N=2。通过非配对t检验得到的与对照的差异, $P < 0.0005$ 。

但是, 应谨慎进行缓冲液交换, 因为孔中的划痕会在成像过程中产生背景信号, 从而导致分析噪声。

为了进行细胞增殖分析, 将球状体掩盖以消除背景信号强度。如图6B (定性) 和6C (定量) 所示, 秋水仙碱处理导致球状体中的增殖细胞显著减少, 表现为EdU信号的减少。

结论

尽管与在标准2D条件下培养的细胞相比, 球状体的分析更为复杂, 但我们已经证明, 可对各种基于细胞以及基于培养上清液的检测进行优化, 以测试3D生长的癌细胞中的药物反应。在大多数情况下, 增加药物和3D培养检测试剂的孵育时间有助于使试剂更好地穿透球状体, 并产生更有意义的数。我们建议尽量减少洗涤次数, 并进行培养基交换作为代替。根据我们的观察, 多次离心包含球状体的板并不能帮助球状体在底部沉淀, 尤其是在球状体固定的情况下。因此, 我们建议沿孔侧面小心、轻柔地交换缓冲液。对于可以在培养基而非细胞上进行分析的比较研究, 例如PrestoBlue HS试剂或ELISA, 基于微孔板的读数是首选方法。然而, 当读数基于细胞且涉及多个缓冲液交换步骤时, 例如用于细胞凋亡研究的CellEvent Caspase-3/7 Green检测试剂或用于细胞增殖研究的Click-iT EdU检测试剂盒, 基于图像的读数将产生有关药物细胞效应的更为可靠且可重现的信息。

赛默飞世尔科技

上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588*2570

生命科学产品和服务业务

上海市长宁区仙霞路99号21-22楼
邮编 200051
电话 021- 61453628 / 021-61453637

北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易中心C座7层/8层
邮编 100000
电话 010-87946888

广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景星辉广场北塔204-206单元
邮编 510000
电话 020-82401600

成都

成都市临江西路1号锦江国际大厦1406室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

南京

南京市中央路201号南京国际广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

武汉

武汉市东湖高新技术开发区高新大道生物园路
生物医药园C8栋5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

昆明

云南省昆明市五华区三市街6号柏联广场写字
楼908单元
邮编 650021
电话 0871-63118338*7001

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众账号

赛默飞世尔科技在全国有共21个办事处。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

详情请访问 thermofisher.com/3dculture



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982
信息咨询邮箱：cnbidmarketing@thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. B-27 is a trademark of Southern Illinois University. Corning is a trademark of Corning Incorporated. EVOM2 is a trademark of World Precision Instruments. GraphPad Prism is a trademark of GraphPad Software, Inc. Hoechst is a trademark of Hoechst GmbH. Luminex, MagPlex, and FLEXMAP 3D are trademarks of Luminex Corporation. Methocel is a trademark of The Dow Chemical Company. Olympus is a trademark of Olympus Corporation. P450-Glo and CellTiter-Glo are trademarks of Promega Corporation. PluriTest is a trademark of Jeanne F. Loring. TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license. Triton is a trademark of Union Carbide Corporation. Tween is a trademark of Croda International PLC. Zeiss and Plan-Neofluar are trademarks of Carl Zeiss AG. **COL33275 0820**