

# 多能干细胞诱导分化肺部类器官

## 1. 细胞培养和传代

- 1.1 将4° C过夜解冻的基质胶以1 mL/孔包被6孔板，轻旋均匀后于37°C孵育10 min凝固，使用前室温静置1 h；
- 1.2 将hPSCs接种于基质胶包被的6孔板中，每孔加3 mL mTeSR1，于37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养至细胞汇合度达75-85%且呈未分化状态；
- 1.3 向hPSCs中加入1 mL分散酶（1 mg/mL），于37°C解离10 min直至细胞完全以小细胞块或单细胞形式漂浮；
- 1.4 向每孔加入5 mL DMEM-F12以终止分散酶消化作用。

## 2. 内胚层和前肠球体的定向分化

- 2.1 细胞密度达60%后，用定型内胚层分化培养基培养4天：第1天用RPMI + 0% FBS + 100 ng/mL 激活素 A，第2天用RPMI + 0.2% FBS + 100 ng/mL 激活素A，第3-4天用RPMI + 2% FBS + 100 ng/mL 激活素A。
- 2.2 第5-9天更换为前肠内胚层分化培养基（每日更换0.5 mL），其组成为DMEM/F12 + 1×N-2 + 1×B27 + 10 mM HEPES + 2 mM L-谷氨酰胺 + 1×青霉素-链霉素，并添加10 μM SB431542、200 ng/mL Noggin、1 μM SAG、500 ng/mL FGF4 和 2 μM CHIR99021。

## 3. 悬浮前肠球体收集

- 3.1 显微镜下识别并轻柔吸出24孔板中的游离前肠球体，转移至1.5 mL离心管沉降5-10 min；
- 3.2 将沉降的球状体迅速轻柔重悬于200 μL基质胶（8 mg/mL）中，避免气泡产生；
- 3.3 将基质胶-球状体混合物分装为8份（25 μL/份）滴加于新24孔板孔中央，静置10 min凝固后每孔加入0.5 mL人肺类器官分化培养基。

## 4. 肺部类器官生成与维持

- 4.1 向含球体的孔中加入500 μL含1%胎牛血清和500 ng/mL FGF10的前肠基础培养基（每3-5天更换），培养约50天至形成具气道样结构的成熟类器官（最佳使用期50-85天）；
- 4.2 每2-3周（或当类器官出现碎片堆积/沉底时），用剪尖吸头刮取并吸取含类器官的基质胶液滴转移至培养皿；
- 4.3 在无菌条件下，使用无菌手术器械小心剥离并去除类器官周围的旧基质胶，避免损伤组织；
- 4.4 将洁净类器官转移至1.5 mL管，去除培养基后与200 μL冰上基质胶轻柔混合，分装成4份（50 μL/份）滴加至新24孔板孔中央（每滴1-3个类器官），静置10 min凝固后每孔加500 μL培养基；
- 4.5 每2-3周重复步骤4.2-4.4进行类器官传代/重新包埋。

## 常见问题解析

**1.在人多能干细胞定向分化过程中，前肠球状体无法形成。导致球状体形成失败的原因有哪些？**

①人多能干细胞的初始接种密度过高；②人多能干细胞集落在24孔板中生长过大；③生长因子在4° C下储存时间过长，导致活性丧失；④人多能干细胞系培养状态不佳，或分化启动时的传代次数过高。通常情况下，应使用传代次数< 90的人多能干细胞。

**2.将球状体接种到基质胶中后，球状体及由此形成的类器官会沉到基质胶液滴底部并黏附在塑料培养皿上，类器官“沉底”的可能原因有哪些？**

若出现这种情况，务必尽快将类器官重新接种到新鲜的基质胶液滴中，所有已黏附在培养皿上且形态呈“扁平状”的类器官都应丢弃。可能原因如下：①距离上一次传代已超过2-3周；②基质胶在4° C下存放时间过长，由于黏附在容器上导致蛋白质浓度降低；③基质胶液滴过大，未能形成高穹顶状结构，从而无法为三维生长提供充足空间。

**3. 培养到第30天后类器官开始大量死亡，是何原因？**

长时间培养中常见的细胞死亡与结构崩解可能与以下因素有关：营养因子衰减、代谢废物积聚、氧气弥散不足或结构内细胞信号失衡。类器官中央常出现低氧、低pH微环境，导致核心区细胞坏死。

操作建议：增加换液频率（推荐每日两次）；使用摇床微速晃动促进物质交换；可在后期加入低剂量抗氧化剂（如抗坏血酸）以维持细胞应激平衡。

## 参考文献

- 1 Miller AJ, Dye BR, Ferrer-Torres D, et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro [J]. Nat Protoc. 2019, 14(2):518-540.