

# 成体干细胞和组织来源细胞分化诱导肺类器官

## 1. 组织获取与原代成体干细胞富集

- 1.1 取0.3–0.5 cm<sup>3</sup>远端肺组织（4℃基础培养基2h内运输），切碎至<1 mm<sup>3</sup>，冰PBS洗涤后400g/4℃/5min离心弃上清；
- 1.2 经胶原酶37℃振荡消化30 min（120 r/min），吹打20次过100 μm滤网；2% FBS终止消化后，红细胞裂解（室温5min）及冰PBS清洗（400g/4℃/5min）获得细胞沉淀；
- 1.3 细胞沉淀重悬于基质胶（80–160 μL/0.5 cm<sup>3</sup>组织），分装40 μL/孔至预热24孔板（37℃固化10–15min），加500 μL扩增培养基，每2–3天换液。

## 2. 3D 成球培养与长期扩增

- 2.1 吹打培养孔，将混合液转至15 mL管；多孔样本补足冷基础培养基至10 mL，冰浴5分钟后400g/4℃/5min离心弃上清。
- 2.2 沉淀经预冷基础培养基洗涤离心后，移液管吹打20-40次机械剪切；
- 2.3 用冷基础培养基洗涤，400g/4℃/5min离心弃上清，获得高纯度细胞沉淀；
- 2.4 按1:5传代比例，将沉淀重悬于预冷基质胶；分装40 μL/孔至预热24孔板，37℃固化10-15min，每孔加500 μL扩增培养基，每2-3天换液。

## 3. 远端分化

- 3.1 扩增培养2周后，吹打解离基质胶，冰浴5-10分钟，400g/4℃/5min离心弃上清；沉淀经冷基础培养基洗涤离心，10× TrypLE重悬，37℃消化5分钟，加2% FBS终止反应。
- 3.2 吹打20-40次机械剪切，镜检确认单细胞状态（必要时重复），预冷基础培养基洗涤后经40 μm滤网过滤，400g/4℃/5min离心弃上清。
- 3.3 单细胞重悬于预温远端分化培养基（2×10<sup>5</sup> cells/mL），接种超低吸附24孔板（500 μL/孔），37℃/5% CO<sub>2</sub>培养；每2天补液100 μL，第3-4天观察薄壁囊泡形成，第10-14天囊泡达150-300 μm即成熟。

## 4. 近端分化

- 4.1 将肺类器官单细胞悬液，按1.5 × 10<sup>5</sup>细胞/100 μL扩增培养基接种于24孔Transwell上室，培养2天使细胞贴壁汇合；
- 4.2 待细胞完全汇合后，将Transwell上室培养基更换为pH 6.6（含PIPES）的近端分化培养基，下室更换为pH 7.4（不含PIPES）的近端分化培养基，开始分化。
- 4.3 维持分化：保持上室pH 6.6、下室pH 7.4的近端分化培养基配置，每2-3天更换一次培养基，持续培养10-14天完成近端分化。

## 常见问题解析

### 1. 手术取材后细胞活率低于85%，可能原因是什么？

①组织运输时间超过2小时，导致细胞缺氧坏死；②运输过程中温度未维持4°C，基质胶提前凝固或细胞代谢紊乱；③酶消化过度（胶原酶浓度过高或时间超过40分钟），破坏细胞膜完整性。

解决方法：严格控制取材后2小时内处理，运输时用冰袋维持4°C；消化时每10分钟镜检，出现大量单细胞时及时终止。

### 2. 原代细胞接种后难以贴壁或增殖，如何改善？

①组织消化后残留碎片过多，影响细胞附着；②首代培养未添加Heregulin-β1，导致干细胞存活信号不足；③基质胶包埋时温度过高（>37°C），破坏细胞活性。

解决方法：用40 μm滤网二次过滤去除碎片；首代扩增培养基中严格添加5 nM Heregulin-β1；包埋操作全程冰浴，基质胶微滴固化温度控制在37°C。

### 3. 3D球体直径差异大（50-300 μm），形态不规则，如何优化？

①细胞接种密度不均，建议用细胞计数仪精确调整至 $2-4 \times 10^5$ 细胞/40 μL基质胶；

②基质胶批次差异，不同批号需预实验验证成球效率，同一批实验使用同一批号；③换液时冲击过大，建议采用沿孔壁缓慢补液的方式，避免球体震荡破裂。

## 参考文献

[1] Zhou J, Li C, Sachs N, Chiu MC, et al. Differentiated human airway organoids to assess infectivity of emerging influenza virus [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol. 2018, 115, 26, 6822-6827.

[2] Chiu MC, Li C, Yu Y, et al. Establishing Bipotential Human Lung Organoid Culture System and Differentiation to Generate Mature Alveolar and Airway Organoids [J]. Bio Protoc. 2023, 13(8):e4657.