ICS

CCS

团 体 标 准

T/CIXXX-2022

T/CI XXX-2024

人成体干细胞来源肝脏类器官构建及技术要求

Guidelines for the Construction and Application of Liver Organoids Derived from Human Adult Stem Cells

（征求意见稿）

2024-X-X发布 2024-X-X实施

xxxxxxxxxx 发布

目录

[前 言 3](#_Toc167976313)

[引言 4](#_Toc167976314)

[1范围 5](#_Toc167976316)

[2 规范性引用文件 5](#_Toc167976317)

[3 术语与定义 5](#_Toc167976318)

[4. 技术路线 6](#_Toc167976319)

[5 通则 6](#_Toc167976320)

[5.1方案制订 6](#_Toc167976321)

[5.2知情同意 6](#_Toc167976323)

[6 类器官制备 7](#_Toc167976325)

[8 类器官的鉴定 8](#_Toc167976326)

[11 废弃物处理 8](#_Toc167976327)

[12 质量控制 9](#_Toc167976328)

[附录A](#_Toc167976329) [（资料性）](#_Toc167976330)[人成体干细胞来源肝脏类器官制备、冻存、复苏操作要点 10](#_Toc167976331)

[10](#_Toc167976330)[A.1仪器设备及试剂耗材 10](#_Toc167976332)

[A.1.1仪器设备 10](#_Toc167976333)

[A.1.2耗材 10](#_Toc167976335)

[A.1.3试剂 10](#_Toc167976337)

[A.1.4人正常肝脏和肝癌类器官的扩增或分化培养基 10](#_Toc167976339)

[A.2人正常肝脏或肝癌类器官制备操作步骤 11](#_Toc167976350)

[A.2.1通则 11](#_Toc167976351)

[A.2.2组织样本的预处理 11](#_Toc167976353)

[A.2.3组织块的清洗 11](#_Toc167976355)

[A.2.4组织块的消化 11](#_Toc167976357)

[A.2.5组织细胞混悬液的过滤 12](#_Toc167976359)

[A.2.6细胞沉淀重悬及培养接种 12](#_Toc167976361)

[A.2.7类器官培养 12](#_Toc167976363)

[A.2.7.1人正常肝脏类器官3D基质胶培养 12](#_Toc167976364)

[A.2.7.2人肝癌类器官3D基质胶培养 12](#_Toc167976366)

[A.2.8类器官传代 12](#_Toc167976368)

[A.3人正常肝脏和肝癌类器官冻存和复苏核心步骤 13](#_Toc167976372)

[A.3.1类器官冻存 13](#_Toc167976373)

[A.3.2类器官复苏 13](#_Toc167976378)

[附录B14](#_Toc167976384)（资料性）[人成体干细胞来源肝脏类器官的鉴定和应用 14](#_Toc167976386)

[B.1概述 14](#_Toc167976387)

[B.2类器官显微镜下的形态学观察 14](#_Toc167976389)

[B.3类器官细胞活性分析 14](#_Toc167976391)

[B.3.1台盼蓝染色法 14](#_Toc167976392)

[B.3.2羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂（CFSE）染色法 14](#_Toc167976394)

[B.4类器官组织学特征分析 15](#_Toc167976396)

[B.4.1样品准备 15](#_Toc167976397)

[B.4.2石蜡包埋及切片 15](#_Toc167976399)

[B.4.3苏木素&伊红（H&E）染色 15](#_Toc167976404)

[B.4.4免疫组化检测 16](#_Toc167976413)

[B.5类器官分子分型鉴定 17](#_Toc167976439)

[B.6 类器官的应用场景举例 18](#_Toc167976441)

[B.6.1 药物筛选 18](#_Toc167976442)

[B.6.2 疾病建模 19](#_Toc167976464)

[B.6.3 再生医学 20](#_Toc167976489)

参考文献 22

# 前 言

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件起草单位：南方科技大学、中国人民解放军总医院第五医学中心、华中科技大学同济医学院附属协和医院、北京大学深圳医院、深圳市南山区蛇口人民医院、深圳市人民医院、深圳市第三人民医院。

本文件起草⼈：XX XXXX XX XXX XXX。

# 引言

近年来，随着组织工程和再生医学的快速发展，类器官技术在模拟人体组织和器官功能方面展现出巨大的潜力。类器官是由干细胞或前体细胞在三维培养条件下自组织形成的多细胞结构，能够在体外重现体内组织的细胞组成、形态和功能特性。肝脏类器官作为类器官技术的重要分支，因其在研究肝脏发育、疾病机制和药物筛选中的独特优势，成为生物医学领域的研究热点。

肝脏是人体内最复杂的器官之一，具有代谢、解毒、胆汁分泌和免疫调节等多种功能。传统的肝脏研究方法，如动物模型和二维细胞培养，因种属差异和缺乏三维微环境而难以全面模拟人类肝脏的复杂结构和功能。相比之下，肝脏类器官能够在体外重现肝脏的关键特征，包括其三维结构、细胞组成和部分功能，为研究肝脏发育、疾病建模和药物筛选提供了更具生理相关性的工具。

人成体干细胞因其自我更新和多向分化潜能，成为构建肝脏类器官的重要细胞来源。通过优化的三维培养条件，成体干细胞可以分化为功能性肝细胞、胆管细胞等多种肝脏相关细胞类型，并自组织形成具有功能性和结构性完整的肝脏类器官。这些类器官不仅为研究肝脏疾病（如非酒精性脂肪性肝病、肝纤维化和肝癌）的发生发展提供了理想平台，还在药物筛选、毒性测试和再生医学中展现出广阔的应用前景。例如，肝脏类器官已被用于预测药物诱导性肝损伤（DILI），这一技术为药物开发和个性化医疗提供了重要支持。

尽管肝脏类器官技术取得了显著进展，但其在规模化应用和临床转化中仍面临诸多挑战，包括类器官大小、形状和细胞组成的不可控性，以及缺乏统一的构建方法和质量控制标准。因此，制定一套系统化的操作指南，规范肝脏类器官的构建流程和应用技术，显得尤为重要。

本指南旨在详细描述以人成体干细胞为基础，构建正常肝脏和肝癌类器官的具体操作步骤和技术要点。内容涵盖成体干细胞的分离与培养、三维培养基质的选择与应用、类器官形成与质量控制，以及最终在疾病建模、药物测试和再生医学等方面的应用。通过提供这一操作指南，我们希望为研究人员和临床医生提供一个强有力的工具，推动肝脏类器官在科学研究和临床转化中的应用，最终为肝脏疾病的诊断和治疗带来新的突破。

人成体干细胞来源肝脏类器官构建及技术要求1范围

本标准给出了人肝脏组织采样与运输、原代细胞的提取、3D基质胶培养的正常肝脏和肝癌类器官的制备、鉴定及应用等规范性操作与推荐方法。

本标准适用于科研院所、医疗机构、制药企业等制备人成体干细胞来源的肝脏类器官。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 37865-2019 人类干细胞研究伦理审查技术规范

GB 39707-2020 医疗废物处理处置污染控制标准

GB/T 27401-2008 实验室质量控制规范分子生物学实验  
GB/T 35520-2017 细胞培养技术规范

**3 术语与定义**

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 人正常肝脏类器官 Human Liver Organoids

来自人类正常肝脏组织的成体干细胞或诱导多能干细胞在体外经过特定培养条件生成的三维微型器官模型，它具有与人类正常肝脏类似的组成细胞类型、结构和功能。

3.2 人肝癌类器官 Human Liver Cancer Organoids

来自病人肝癌组织的成体干细胞或诱导多能干细胞在体外经过特定培养条件生成的三维微型器官模型，它具有与供体肝癌组织类似的组成细胞类型、结构和功能。

3.3 基质胶 Matrigel

一种由小鼠肿瘤细胞（通常为EHS肉瘤）分泌的基质提取物，主要成分包括层粘连蛋白（Laminin）、IV型胶原（Collagen IV）、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖（Heparan sulfate proteoglycan）以及多种生长因子（如EGF、FGF、IGF等）。它是一种模拟细胞外基质（ECM）的三维支架材料，广泛用于细胞培养和组织工程研究。

3.4 传代 passage

将类器官消化为单细胞或细胞簇后，再进行培养形成新的类器官的过程。

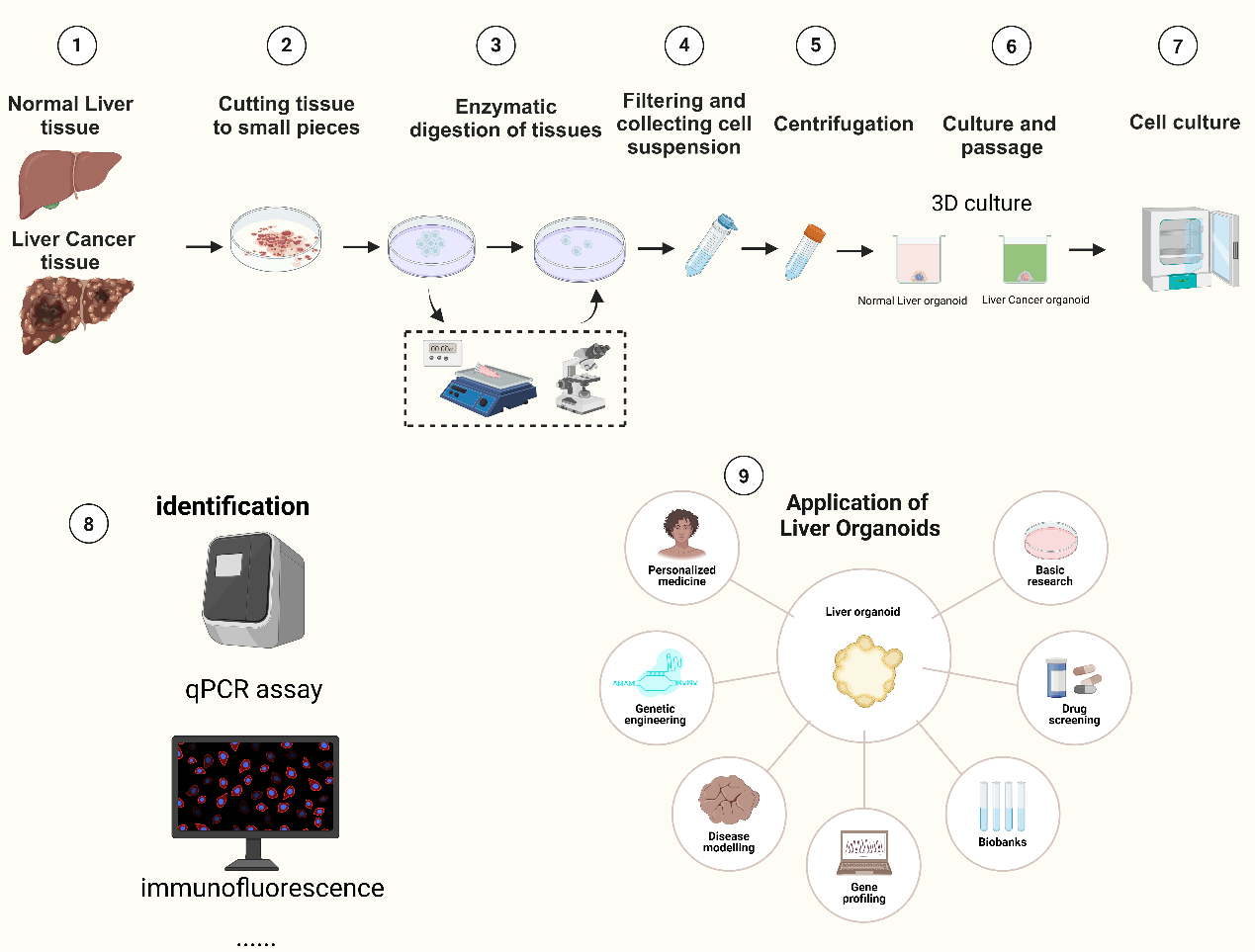
3.5 冻存 cryopreservation

将类器官经低温冷冻处理后在低温环境下长期保存并保持类器官细胞活力的技术。

3.6 复苏 recovery

将冻存的类器官解冻后进行培养，恢复类器官细胞组织活性的过程。

4. 技术路线

人源正常肝脏和肝癌类器官的构建及应用见图1.  


**图1 人源正常肝脏和肝癌类器官的构建及应用示意图**

5 通则

5.1方案制订

人成体干细胞来源肝脏类器官构建研究项目启动前应当制订工作方案。工作方案的内容包括但不限于：目标与任务、操作流程、工作条件、生物安全等级、操作人员资质、供体选择要求、类器官质量控制标准、参考文献等。供体选择要求中，建议将人正常肝脏和肝癌组织的生理特征及供体患者治疗方法与用药史等情况纳入重要考虑因素。

5.2知情同意

人体正常肝脏和肝癌组织的获取方法、处理手段、保存条件、使用目的等内容需获得伦理委员会审核批准，宜在充分尊重、告知人体组织提供者权益的前提下签署知情同意书，告知内容包括但不限于：组织的处置方案及可能涉及的应用场景。宜对组织提供者的个人信息进行隐私保护，严禁泄露可识别供体及亲属身份的信息，如：姓名、肖像、证件、社会关系等。

6 类器官制备

6.1组织样本采集：

6.1.1应当建立相应的生物安全管控体系及使用规范，严格控制因直接或间接接触人类组织样本 引起重大疾病传播的风险。

6.1.2 供体组织应当由医疗机构提供，人正常肝脏和肝癌组织样本可从通过活检穿刺或手术切除等手段获取，取样时应避免坏死区域；组织离体后宜尽快完成样本采集。

6.1.3 组织样本的采集人员需有相关专业的学习背景或培训经历。

6.2组织样本的保存和运输：

采集的组织样本应完全浸没于无菌的组织保存液中，应于低温（0℃~4℃）条件下进行保存和运输，应避免保存液和其中的组织样本冻结。所使用的保存液宜为组织保存、运输专用，所含成分对组织无毒害作用，不影响组织的生理功能。

6.3 类器官制备、培养和传代

类器官制备、培养

6.3.1.1 制备前应对采集的组织样本进行清洗，组织清洗液建议使用置于4℃冰箱中预冷处理的DPBS缓冲液，清洗时上下左右迅速摇晃，摇晃力度适中，直至清洗液澄清;

6.3.1.2 选择组织消化液和/或机械破碎方法获得细胞簇或单细胞，组织消化液应保证无菌，建议采用胶原酶进行组织消化，结合适当的温和的机械吹打；

6.3.1.3 根据组织来源选择合适的培养基，人正常肝脏和肝癌类器官可依据生长特性选择不同的培养基；

* + - 1. 根据实验目的选择合适的培养器皿（如细胞培养板或芯片）、培养装置和培养条件，详细操作规程和推荐的方法参见附录A。

6.3.2**类器官的传代**

6.3.2.1 根据需要对类器官进行传代处理，并记录新培养类器官的代次。传代时机的选择依据类器官的大小、活性、使用要求等指标综合判定。

6.3.2.2详细操作规程和推荐的方法参见附录A。

7 **类器官冻存和复苏**

7.1 对正常肝脏和肝癌类器官一般通过梯度降温的方法进行冷冻，然后采用适宜的低温条件进行保存，宜尽量避免冻融现象发生，记录冻存的条件与时间。

7.2 人正常肝脏和肝癌类器官复苏时，需要先对冻存的类器官在37 ℃下快速解冻处理，然后去除冻存液后进行类器官的再次培养或其他处理。详细操作规程和推荐的方法参见附录A。

8 类器官的鉴定

根据需要对建立的类器官进行鉴定，合理设定鉴定内容，可参考的鉴定指标如：类器官显微镜下的形态学、类器官组织学特征、类器官分子分型、类器官细胞活性等。

详细操作规程和推荐的方法参见附录**B。**

9 类器官的应用

目前，类器官应用在多种生物医学领域， 涵盖疾病模型、药物筛选、再生医学、个性化医学、感染疾病研究和发育生物学等多个研究方向，有关人肝脏类器官在生物医学的应用详细介绍参见附录B。

10 数据管理

10.1应结合类器官的使用目的，制订数据管理规范，包括但不限于数据内容及保存时间、数据管理与使用的权限及责任。

10.2 详细的临床样本数据管理可参照国家药品监督管理局颁布的《药物临床试验质量管理规范》（GCP)中的数据管理部分内容。

11 废弃物处理

在组织样本获取、类器官培养、鉴定和冻存等操作过程中产生的废弃物，应按照GB19489-2008中7.19和GB/T38736—2020中3.1的要求，遵循《医疗废物管理条例》丢弃到指定地点妥善处置。对于使用过的类器官或不合格的类器官须严格按照生物样本处置与管理规范操作。

12 质量控制

类器官的质量控制包括但不限于类器官光镜下形态学观察，类器官细胞活力鉴定和类器官常见标志物表达，如Ki67增殖指标的表达等。类器官培养状态鉴定参见附录 B。

**附录A**

**（资料性）**

**人成体干细胞来源正常肝脏和肝癌类器官制备、冻存、复苏操作要点**

A.1仪器设备及试剂耗材

A.1.1仪器设备

生物安全柜、低温离心机、二氧化碳细胞培养箱、光学显微镜、37 ℃水浴锅、低温冰箱（4 ℃、-20 ℃、-80 ℃）、液氮罐等。

A.1.2耗材

细胞培养孔板、15mL和50mL无菌离心管、各种移液器和吸头、无菌镊子、无菌眼科剪、细胞冻存盒、细胞冻存管等。

A.1.3试剂

组织保存液、DPBS、胶原酶、支架材料、类器官培养基、细胞级别二甲基亚砜

A.1.4人正常肝脏和肝癌类器官的扩增和分化培养基

A.1.4.1 基础培养基：Advance DMEM/F12，补充1× GlutaMAX、1×Penicillin/streptomycin和10mM HEPES。

A.1.4.2 正常肝脏组织分离培养基：在基础培养基中添加B27 supplement without VitA、N2 Supplement、N-Acetyl-cysteine、R-spondin-1、Nicotinamide、Gastrin、hEGF、FGF10、HGF、Forskolin、TGF-β (A83-01)、hNoggin、Wnt3a和ROCK inhibitor (Y-27632)补充剂和细胞因子。

A.1.4.3 肝癌组织分离培养基：在基础培养基中添加ROCK inhibitor (Y-27632)、B27 supplement without VitA、N2 Supplement、N-Acetyl-cysteine、Nicotinamide、Gastrin、hEGF、FGF10、HGF、Forskolin、TGF-β (A83-01)和Dexamethasone补充剂和细胞因子。

A.1.4.4 扩增培养基：在基础培养基中添加B27 supplement without VitA、N2 Supplement、N-Acetyl-cysteine、R-spondin-1、Nicotinamide、Gastrin、hEGF、FGF10、HGF、Forskolin和TGF-β (A83-01)补充剂和细胞因子，正常肝脏组织扩增为胆管类器官，需分化培养基诱导进一步分化为肝脏类器官，肝癌类器官在此培养基下扩增。

A.1.4.5 分化培养基：在基础培养基中添加B27 supplement without VitA、N2 Supplement、N-Acetyl-cysteine、Gastrin、hEGF、HGF、TGF-β (A83-01)、BMP7、Dexamethasone、DAPT和FGF19等补充剂。

A.2**人正常肝脏或肝癌类器官制备操作步骤**

A.2.1通则

所有类器官的制备、培养、冻存和复苏应在生物安全柜中保证无菌操作。所用试剂、洗液和器材等应无菌。

A.2.2组织样本的预处理

评估获取的组织样本中上皮细胞的含量，利用眼科剪和镊子尽可能去除非上皮成分，包括肌肉和脂肪组织。对于肝脏组织样本，宜去除明显坏死的组织成分。

A.2.3组织块的清洗

将上述预处理后的组织样本转移至50mL离心管中，用含有抗生素的4℃预冷的DPBS溶液/或基础培养基漂洗组织样本数次，直至漂洗液呈清液状态。

A.2.4组织块的消化

将样本转移至10cm的细胞培养皿中，使用手术剪或手术刀将组织样本尽可能剪碎呈现肉糜状态；根据组织量加入适量的组织消化液（≥10mL），置于37℃水浴锅中消化。仔细观察消化情况，每10min~15min 混合1次：当混合物中组织块被明显解离破碎，光学显微镜下观察到大量细胞簇或单细胞出现时即可终止消化，4℃下，200×g离心5min，弃上清，保留沉淀置于冰上。

A.2.5组织细胞混悬液的过滤

将沉淀重悬于基础培养基中，并用70mm或者 100m细胞滤网过滤。4℃下,200×g离心5min,弃上清，保留沉淀置于冰上。

A.2.6使用基质胶重悬细胞及培养接种

使用合适的基质胶重悬正常肝脏或肝癌细胞沉淀，以20 μL的体积分别接种于合适底面积的细胞培养板中，于37℃、5%的CO2培养箱中孵育 30min, 待基质胶凝固后，向培养板中加入各自合适体积的分离培养基继续培养。

A.2.7类器官培养

A.2.7.1正常肝脏组织类器官的3D基质胶培养

用消化酶消化或均匀机械吹打胆管细胞的为单个细胞，取适量的基质胶重悬相当的细胞量，并加上扩增培养基培养4~5天。待类器官平均直径为150μm~250μm，更换为分化培养基，一般分化培养天数为7天。通常，向分化前一代细胞的扩增培养基中补充25ng/ml BMP7，研究表明，这有助于肝类器官功能蛋白（ALB等）的表达。

A.2.7.2 肝癌类器官的3D基质胶培养

使用消化酶消化为单个细胞，取适量的基质胶重悬肝癌类器官单个细胞，并加上扩增培养基培养4~5天。

A.2.8类器官传代

A.2.8.1 待胆管类器官平均直径为100 μm~300 μm时，即可进行传代；一般而言，在此平均直径范围内的类器官生长活力较好；

A.2.8.2 传代时需要将肝癌或胆管类器官尽量消化为单个细胞；

A.2.8.3 胆管类器官或肝癌类器官体外连续传代次数尽量控制在10代以内；但应对传代类器官定期做分子分型鉴定。

A.3**人正常肝脏和肝癌类器官冻存和复苏核心步骤**

A.3.1**类器官冻存**

A.3.1.1 预先准备含有10% DMSO的胎牛血清细胞冻存液，现配现用；

A.3.1.2 使用配置好的冻存液重悬细胞簇或单细胞沉淀，并按500 μL~1mL体积分装至细胞冻存管中；

A.3.1.3 将细胞冻存管放入细胞冻存盒中，置于-80℃保存24h后，将细胞冻存管转移至液氮罐中长期保存。

A.3.2**类器官复苏**

A.3.2.1 预先准备一个装有10mL基础培养基的15mL离心管；

A.3.2.2 将冻存管从液氮罐中取出后，宜立即放入37℃水浴中，轻轻摇动冻存管，尽量使其在短时间内全部融化；

A.3.2.3 将融化后的类器官冻存液悬液吸出，逐滴加入到15mL离心管中，使液体中二甲基亚砜总量低于1%，4℃下，200g离心5min，弃上清，保留类器官沉淀置于冰上；

A.3.2.4 将细胞沉淀用相对应的培养基重悬后，接种于培养孔板上，置于37℃二氧化碳细胞培养箱中进行培养。

附录B

（资料性）

**人成体干细胞来源呼肝脏类器官的鉴定和应用**

B.1概述

根据需要对培养的类器官进行鉴定，应科学规划鉴定内容，可参考的鉴定指标如：形态、活性、组织学特征、分子分型等，作为参照来评估培养形成的类器官与来源组织的相似性。目前，肝脏类器官应用于肝炎病毒感染机制研究，肝癌或抗病毒药物筛选、再生医学等多个研究领域，具有广阔应用前景。

B.2类器官显微镜下的形态学观察

在类器官培养的第2天，即可在光学显微镜下进行形态学观察。人源正常胆管上皮细胞在基质胶呈囊状结构，在分化培养基培养7天后，可分化为肝脏类器官，表现为一定的肝脏功能，例如ALB的分泌，糖原的积累等。此时，观察到肝脏类器官细胞呈清晰的六边形肝上皮样细胞。肝癌类器官在基质胶中呈实心状，直径大小不一，在进行大规模类器官培养及应用时，应关注各组类器官的大小、形态及数量的均一性。

B.3类器官细胞活性分析

B.3.1台盼蓝染色法

台盼蓝染料对死细胞的着色，在光学显微镜下可以通过颜色区分死活细胞。使用细胞消化液将类器官解离成单细胞，使用台盼蓝染液进行染色，染色后的细胞转移至血球计数板，置于光学显微镜下统计未染色细胞总数和着色细胞总数，根据公式：活细胞比率（%）=未染色细胞总数/（未染色细胞总数+着色细胞总数）×100% 计算分析活细胞比率。一般情况下，计算或统计出的类器官活细胞比率>90%时则表示培养的类器官活力优秀，质量良好。

B.3.2羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂（CFSE）染色法

CFSE 能够轻易穿透细胞膜，在活细胞内与胞内蛋白共价结合，水解后释放出绿色荧光，而死细胞无法着色。具体检测步骤包括：类器官消化成单个细胞后，离心弃上清，沉淀用Advanced DMEM/F12培养基重悬（约1mL），吹打混匀后加入 CFSE 溶液（终浓度为2.5umo1/1~5 μmol/L)，在37℃水浴锅中孵育10min。用40%体积的预冷胎牛血清立即终止染色标记10min。离心洗涤两次后，用适量的完全培养液重悬细胞。取100 μL左右细胞悬液置于干净的细胞培养皿中，放置于倒置显微镜下，使用488nm激发光观察细胞着色情况。同时，剩余的单细胞悬液可以使用流式细胞仪进行细胞活性定量分析。一般情况下，计算及统计出的类器官活细胞比率>90%时则表示培养的类器官活力优秀，质量良好。

B.4类器官组织学特征分析

B.4.1样品准备

从来源组织中选取1~2块具有代表性的组织块，用组织固定液进行固定保存。收集3D基质胶培养的正常肝脏和肝癌类器官，使用4%PFA常温固定30 min，用2~3%琼脂糖预包埋,使用组织脱水仪对样本进行脱水。

B.4.2石蜡包埋及切片

B.4.2.1 梯度乙醇脱水（建议使用浓度为70%、80%、95%以及100%的乙醇依次处理，每个梯度5min~10min），二甲苯透明处理大约5min，直至类器官呈半透明状态；

B.4.2.2 完成石蜡包埋，制作类器官切片，建议每张切片厚度在5μm左右。

B.4.3苏木素&伊红（H&E）染色

B.4.3.1 将类器官切片置于烘片机上烘烤，增加类器官的黏附性，防止在后续染色过程中类器官。

B.4.3.2 脱蜡：依次将类器官切片浸泡于二甲苯溶液中3次，100%乙醇溶液中3次，95%乙醇溶液中3次，每次3min，再置于超纯水中3min，使组织细胞间的石蜡完全置换为水；

B.4.3.3 细胞核染色：在类器官上滴加苏木精染料，用量以覆盖整个组织为宜（约40μL），时间约 10s；

B.4.3.4 在流水下冲洗数分钟洗去浮色，再依次利用盐酸酒精溶液及碳酸氢钠溶液进行返蓝处理;

B.4.3.5 细胞质染色：放入伊红溶液中浸泡，时间约10s, 接着依次浸泡于95%乙醇溶液中3次，100%乙醇溶液中3次，二甲苯溶液中3次中，每次3min;

B.4.3.6用中性树脂封片保存；

B.4.3.7光学显微镜下观察拍照，分析染色结果。

B.4.4**免疫组化检测**

B.4.4.1 将类器官切片（B.4.2）置于烘片机上烘烤，增加类器官的黏附，防止在后续染色过程中类器官脱落；

B.4.4.2 脱蜡：依次将类器官切片浸泡于二甲苯，100%乙醇，95%乙醇，每次3min，以上步骤

B.4.4.3 重复3次，再置于超纯水中3min，使组织细胞间的石蜡完全置换为水；

B.4.4.4取出切片放入装有抗原修复液的容器中，加热容器使溶液沸腾后，置于通风处自然冷却至室温；

B.4.4.5 转移至装有0.3% Triton X-100 PBS 溶液的染缸中,浸泡20min;

B.4.4.6建议用PBS浸洗3次，每次5min;

B.4.4.7 滴加山羊血清，覆盖类器官为宜（约40μL)，封闭30min ～60 min;

B.4.4.8 吸去山羊血清，滴加一定比例的用封闭液稀释的一抗（浓度根据不同抗体而定），以覆盖类器官为宜（约40μL），置于4℃孵育过夜；

B.4.4.9 吸去一抗，将切片再次放入染缸中，用PBS 浸洗切片 3次，每次5min;

B.4.4.10加反应增强液，覆盖类器官为宜（约40 μL)，室温孵育20min;

B.4.4.11吸去反应增强液，将切片再次放入染缸中，用PBS浸洗切片浸洗3次，每次5min;

B.4.4.12 选择对应一抗的辣根过氧化物酶联二抗试剂，滴加于类器官上，覆盖类器官为宜（约40μL），室温孵育 1h;

B.4.4.13 弃除二抗，滴加DAB反应液，覆盖类器官为宜（约40L）。当类器官呈棕色后迅速放入流水下冲洗3min左右；

B.4.4.14 加苏木精染料进行细胞核染色，约 10s，在流水下冲洗 5min ～ 10min;

B.4.4.15 切片放入盐酸酒精溶液和碳酸氢钠溶液，各1min，进行返蓝处理；

B.4.4.16 流水下冲洗后，依次浸泡于95%乙醇、100%乙醇、二甲苯中，每次3min，以上步骤重复3次;

B.4.4.17 中性树脂封片保存；

B.4.4.18光学显微镜下观察拍照，分析染色结果。

B.5类器官分子分型鉴定

通过免疫荧光检测胆管上皮细胞、肝脏细胞和肝癌细胞的表面标记物如KRT19、 SOX9、HNF4α、ALB、EPCAM、Ki67和AFP等确认肝脏细胞和肝癌类器官是否表达相应的蛋白标志物。以上识别人源正常肝脏和肝癌的生物标志物均可用于分子层面的鉴定，包括但不限于RNA-seq或者荧光定量PCR实验用于检测目标基因的转录水平变化，免疫印迹实验用于检测目标蛋白表达水平变化等。

B.6 类器官的应用场景举例

B.6.1 药物筛选

B.6.1.1 肝癌类器官在药物筛选中具有巨大的应用潜力，主要表现在其提供的更加生理相关的体外模型。以下是肝癌类器官用于药物筛选的几种方法和步骤：

B.6.1.2 建立肝癌类器官模型，首先，从患者的肝癌组织样本或干细胞培养肝癌类器官，以确保模型具有与人体生理条件相近的结构和功能。

B.6.1.3 高通量筛选，利用多孔板（如96孔板或384孔板）进行高通量药物筛选。每个孔中培养一个或多个类器官，以测试多个药物或药物组合。

B.6.1.4 药物处理，向类器官模型中添加不同浓度的候选药物。可以通过滴定法确定最佳浓度，以识别药物的最小有效浓度和毒性阈值。

B.6.1.5 观察和监测，使用多种技术监测药物对类器官的影响，包括：活细胞成像：如明场显微镜、荧光显微镜或共聚焦显微镜，实时观察类器官的生长、存活和形态变化。细胞活性检测：如MTT、CellTiter-Glo等试剂，评估细胞的代谢活性和存活情况。免疫荧光分析：使用特定的Marker，评估细胞类型和功能的变化。基因表达分析：如qPCR或RNA测序，研究药物对基因表达的影响。

B.6.1.6 数据分析，收集并分析实验数据，以确定药物的有效性和潜在毒性。比较不同药物或药物组合的效果，找到最有前景的候选药物。

B.6.1.7 个性化药物筛选，利用患者来源的类器官进行个性化药物筛选，预测个体对特定药物的反应，有助于个性化医疗和精准治疗。

B.6.1.8 实例应用，抗病毒药物筛选：用于检测对肝炎病毒（如HBV、HDV和HEV）的抑制效果。抗炎药物筛选：用于研究肝纤维化、原发性硬化性胆管炎等炎症性疾病的治疗药物。抗肿瘤药物筛选：肝癌类器官可用于筛选和评估针对肺癌的抗肿瘤药物。

B.6.2 疾病建模

B.6.2.1正常肝脏和肝癌类器官在疾病建模中具有重要作用，它们可以精确模拟人正常肝脏或病人肝癌组织的结构和功能，从而用于研究多种肝脏疾病。以下是具体步骤和应用：建立类器官模型，从患者获取正常肝脏或肝癌组织，分离并培养出上皮细胞或干细胞,在相关信号通路因子的培养下建立生理功能相似的类器官。

B.6.2.2疾病相关的基因改造，使用基因编辑技术（如CRISPR/Cas9）在肝脏类器官中引入或敲除与某种疾病相关的基因，以建立特定的疾病模型。例如：单基因肝病阿拉吉尔综合征（Alagille Syndrome），JAG1突变导致类器官分化为成熟胆管细胞的能力延迟，并且无法形成和维持胆管结构。

B.6.2.3病原体感染，正常肝脏类器官可以用于模拟病原体（如病毒、细菌等）感染，通过检测宿主细胞对感染的免疫反应，研究病原体的致病机制。例如：病毒感染：如HBV，用于研究病毒的感染机制和传播途径。

B.6.2.4药物反应和测试，疾病模型肝脏类器官可以用于药物筛选和疗效测试，以确定最有效的治疗方法。例如：抗病毒药物测试：评估抗病毒药物（如瑞德西韦）对病毒感染类器官的作用。抗炎药物测试：研究类器官在炎症状态下对抗炎药物（如类固醇）的反应。

B.6.2.5 药物毒性研究（Drug Toxicity Studies），利用健康供体或患者来源的肝脏类器官进行药物毒性研究，预测潜在药物引起的肝损伤（如药物诱导性肝损伤，DILI）。

B.6.2.6 实例应用，阿拉吉尔综合征：建立JAG1突变的肝脏类器官导致类器官分化为成熟胆管细胞的能力延迟，并且无法形成和维持胆管结构。非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）和非酒精性脂肪性肝炎（NASH）：利用肝细胞类器官，在自由脂肪酸处理后，模拟了NAFLD和NASH的部分特征，包括脂质积累和纤维化。肝细胞癌（HCC）和胆管癌（CC）：通过患者来源的肝癌类器官（PDOs）模型，研究了肿瘤的异质性和药物反应性。药物毒性研究利用健康供体或患者来源的肝脏类器官进行药物毒性研究，预测潜在药物引起的肝损伤（如药物诱导性肝损伤，DILI）。

B.6.3 再生医学

肝脏类器官在再生医学中具有重要的潜在应用，研究表明，在肝细胞增殖受损的情况下，肝脏仍然能够通过“管状反应”（ductular reaction）激活胆管细胞增殖并重新填充肝脏。这一机制为肝脏类器官的再生医学应用提供了理论基础。以下是具体步骤和应用：

组织移植与替代，移植前准备:利用患者自身细胞生成的类器官，可以避免免疫排斥反应，提高移植成功率。移植手术:在移植手术中，类器官可以作为桥梁，帮助修复损伤的肝脏组织。例如终末期肝衰竭患者。

**参考文献**

[1]中华人民共和国国务院，中华人民共和国人类遗传资源管理条例. 2019-05-28.

42(10):781-797.

[2] 北京干细胞与再生医学研究院等，T/CSCB 0001-2022 人干细胞研究伦理审查技术规范，北京：中国标准出版社，2022.

[3]国家药典委员会.中华人民共和国药典，北京：中医药科技出版社，2020.

[4]国际干细胞研究学会 （ISSCR）,干细胞研究和临床转化指南. Stem Cell Report.2021-05-27. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.05.012.

[5] Prior N, Inacio P, Huch M. Liver organoids: from basic research to therapeutic applications. Gut. 2019 Dec;68(12):2228-2237. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319256. Epub 2019 Jul 12. PMID: 31300517; PMCID: PMC6872443.

[6] Zhang CJ, Meyer SR, O'Meara MJ, et al. A human liver organoid screening platform for DILI risk prediction. *J Hepatol*. 2023;78(5):998-1006. doi:10.1016/j.jhep.2023.01.019.

[7] Broutier L, Mastrogiovanni G, Verstegen MM, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med*. 2017;23(12):1424-1435. doi:10.1038/nm.4438.

[8] Huch M, Gehart H, van Boxtel R, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell*. 2015;160(1-2):299-312. doi:10.1016/j.cell.2014.11.050.