



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107012116 A

(43)申请公布日 2017.08.04

(21)申请号 201710320167.X

(22)申请日 2017.05.09

(71)申请人 华东师范大学

地址 200062 上海市普陀区中山北路3663号

(72)发明人 王昕 张磊 刘明耀

(74)专利代理机构 上海麦其知识产权代理事务所(普通合伙) 31257

代理人 董红曼

(51)Int.Cl.

C12N 5/071(2010.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

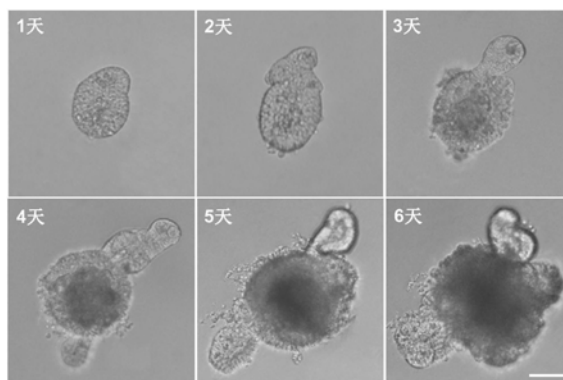
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种小肠3D类器官研究BCRP介导药物转运模型的构建方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种小鼠小肠3D类器官用于研究BCRP介导的药物转运模型的构建方法;首先从小鼠小肠消化分离出隐窝,混悬于基质胶后接入细胞培养板中,利用含有Respondin-1、m-noggin和m-EGF三种细胞分化生长因子的ADMEM/F12培养基促进隐窝分化形成3D类器官;然后进行形态学的观察,检测BCRP基因和蛋白表达水平以验证模型理论的可行性;最后采用共孵育的方法,使用BCRP的荧光底物Hoechst 33342及其抑制剂Ko143或YHO-13177研究BCRP在3D类器官中跨膜转运的活性。本发明首次构建了小鼠小肠3D类器官研究BCRP介导的药物跨细胞膜转运的体外模型,该模型构建方法操作简便、检测高效快速,可广泛应用于BCRP底物和抑制剂的体外筛选。



1. 一种小肠3D类器官的培养方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:
 - (1) 分离小肠隐窝:利用EDTA消化小鼠小肠分离得到小肠隐窝;
 - (2) 接种:用基质胶混悬后接种于培养板中;
 - (3) 培养:基质胶凝固后加入含有生长因子的ADMEM/F12完全培养基,进行培养。
2. 如权利要求1所述的培养方法,其特征在于,步骤(1)中,所述EDTA的浓度0.5mM-5mM;所述消化时间为15-30分钟。
3. 如权利要求1所述的培养方法,其特征在于,步骤(2)中,所述基质胶为低生长因子,无酚红基质胶;每微升基质胶中含5-10个隐窝。
4. 如权利要求1所述的培养方法,其特征在于,步骤(3)中,所述培养的温度为37℃;所述培养的时间为2-6天。
5. 如权利要求1所述的培养方法,其特征在于,步骤(3)中,所述ADMEM/F12完全培养基的组分和浓度为1mM N-乙酰,10mM谷氨酰胺,10mM HEPES,1x B27,1x N2和1x Primocin;所述生长因子的总浓度为650ng/mL。
6. 如权利要求4所述的培养方法,其特征在于,所述生长因子为Respondin-1,m-noggin和m-EGF三种细胞分化生长因子的组合;所述生长因子的浓度分别为500ng/mL Respondin-1,100ng/mL m-noggin和50ng/mL m-EGF。
7. 如权利要求1~6之任一项所述方法培养得到的小肠3D类器官,其特征在于,所述小肠3D类器官由上皮细胞、潘氏细胞以及干细胞等组成,其腔内侧模拟小肠绒毛结构,表达BCRP蛋白;相应的其外侧可模拟小肠的基底侧。
8. 一种用于培养小肠3D类器官的培养基,其特征在于,所述培养基包括以下组分:1mM N-乙酰,10mM谷氨酰胺,10mM HEPES,1x B27,1x N2,1x Primocin和650ng/mL生长因子,其余为水。
9. 如权利要求8所述的培养基在培养小肠3D类器官中的应用。
10. 一种用于研究BCRP介导的药物转运模型的构建方法,其特征在于,具体方法包括以下步骤:(1) 对按权利要求1~6之任一项所述方法培养得到的小肠3D类器官中BCRP mRNA表达水平进行测定;(2) 免疫组织化学方法检测小肠3D类器官中BCRP蛋白的表达水平;(3) 通过BCRP底物、BCRP抑制剂对小肠3D类器官进行功能验证;将小肠3D类器官与BCRP经典底物进行共孵育,同时将小肠3D类器官与BCRP抑制剂进行共孵育,通过测定底物的量来评价抑制剂的作用,进而对小肠3D类器官进行功能验证。
11. 如权利要求10所述的构建方法,其特征在于,步骤(1)中,所述方法包括:利用Trizol法提取小肠绒毛、隐窝以及小肠3D类器官中的总RNA,并使用逆转录试剂盒合成cDNA;以合成的cDNA为模板,进行实时荧光定量PCR检测BCRP在小肠绒毛、隐窝以及小肠3D类器官中的mRNA表达水平;定量PCR检测BCRP的引物序列:正向5'-GAACTCCAGAGCCGTTAGGAC-3'和反向5'-CAGAATAGCATTAAGGCCAGGTT-3'。
12. 如权利要求10所述的构建方法,其特征在于,步骤(2)中,所述方法包括:小肠绒毛、隐窝以及小肠3D类器官常规固定、脱水、石蜡包埋、切片;组织切片经过脱蜡、复水、抗原表位修复、灭内源性过氧化物酶、封闭后依次孵育抗小鼠BCRP的抗体,HRP标记羊抗兔二抗;最后DAB显色后封片拍照。
13. 如权利要求10所述的构建方法,其特征在于,所述步骤(3)中,所述BCRP底物的浓度

为1-5 μ M;所述BCRP抑制剂的浓度为15 μ M~20 μ M;所述共孵育的时间为20~100min;采用PBS孵育的方法促使BCRP底物从小肠3D类器官中释放;所述PBS孵育的温度为37℃;所述PBS孵育的时间为2-8小时。

14.一种如权利要求11~13之任一项所述方法构建得到的用于研究BCRP介导的药物转运模型。

15.一种用于研究BCRP介导的药物的转运方法,其特征在于,所述方法包括:(1)按权利要求1~6之任一项所述方法培养得到小肠3D类器官,(2)将BCRP与待测药物进行共孵育,将BCRP与抑制剂进行共孵育,通过测定待测药物的浓度,研究BCRP对药物的转运情况。

16.一种促使BCRP底物从所述小肠3D类器官中释放的方法,其特征在于,所述方法包括:向所述小肠3D类器官中加入PBS,进行孵育,使得3D类器官破裂,释放腔内的BCRP底物;其中,所述PBS孵育的温度为37℃;所述PBS孵育的时间为2-8小时。

17.一种检测小肠绒毛、隐窝以及小肠3D类器官中BCRP mRNA水平的方法,所述方法包括:利用Trizol提取小肠绒毛、隐窝以及小肠3D类器官中的总RNA,并使用逆转录试剂盒合成cDNA;以合成的cDNA为模板,进行实时定量PCR检测BCRP在小肠绒毛、隐窝以及小肠3D类器官中的表达水平;其中,BCRP的引物序列:正向5'-GAAGTCCAGAGCCGTTAGGAC-3'和反向5'-CAGAATAGCATTAAAGGCCAGGTT-3'。

18.一种小肠绒毛、隐窝以及小肠3D类器官BCRP蛋白表达水平的检测方法,其特征在于,所述方法包括:小肠绒毛、隐窝以及小肠3D类器官常规固定、脱水、石蜡包埋、切片;组织切片经过脱蜡、复水、抗原表位修复、灭内源性过氧化物酶、封闭后依次孵育抗小鼠BCRP的抗体,HRP标记抗兔的二抗;最后DAB显色后封片拍照;其中,抗小鼠BCRP抗体的稀释比例为1:100-1:1000;HRP标记的羊抗兔二抗的稀释比例为1:200-1:2000。

一种小肠3D类器官研究BCRP介导药物转运模型的构建方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种小肠3D类器官模型的构建及其在BCRP介导的药物转运研究中的应用。

背景技术

[0002] ABC转运蛋白超家族,由两个跨膜结构域及两个细胞质ATP结合域组成,参与多种内源和外源性底物的转运,例如胆固醇,肽,药物,毒素,胆汁盐,有机阴离子,核苷,铁,氯离子以及固醇等。到目前为止,已知发现49种人的ABC转运蛋白成员,并分为七个亚家族(ABC-A至ABC-G)。其中P-糖蛋白(P-gp, ABCB1),MDR相关蛋白-1(MRP1, ABCC1)和乳腺癌耐药蛋白(BCRP, ABCG2)与多药耐药现象密切相关,因此,ABC转运蛋白被认为是克服肿瘤耐药治疗的重要靶标。

[0003] 癌细胞的耐药性是癌症化疗中的主要问题。耐药的最主要机制是ATP结合盒转运蛋白超家族的成员以能量依赖的方式从细胞中泵出多种结构上不相关的抗癌药物,例如蒽环霉素,长春花生物碱和紫杉烷,导致药物在细胞内的积累减少。BCRP是关键的多药耐药蛋白之一,显著影响许多药物,尤其是抗癌药物的治疗效果。因此,确定某一药物或化合物是否为BCRP的底物,对该药物的临床使用和新药的研发具有很重要的意义。目前已经发现,BCRP可以外排米托蒽醌、甲氨蝶呤、黄酮吡醇、吉非替尼、伊马替尼和喜树碱类包括7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38,伊立替康的活性代谢物)及拓扑替康,减少细胞内的药物浓度,降低这类药物的治疗作用。一些证据表明,肠道中的BCRP是口服属于BCRP底物的药物如拓扑替康的生物利用度和功效的主要决定因素。此外,BCRP高表达于癌干细胞中,因此,抑制BCRP介导的药物外排作用将有利于癌症的治疗。BCRP的小分子抑制剂可用于逆转BCRP介导的耐药性,改善口服给药药物的生物利用度和药物的治疗效果。目前研究显示烟曲霉C、GF120918、雌激素如雌酮和17 β -雌二醇、新生霉素、香豆霉素和羟基类黄酮如染料木素等一些化合物在体外可以逆转BCRP介导的耐药性。尽管研发BCRP的抑制剂已经成为许多研究的主题,但是在体内对BCRP的抑制剂逆转药物的耐药性的研究相对较少,并且目前没有特异性靶向BCRP的抑制剂应用于临床。因此,可应用于临床的高效的特异性BCRP抑制剂的研发成为极其重要的研究主题。

[0004] 用于研究BCRP对药物的转运的模型主要有过表达BCRP的细胞株模型以及利用结肠癌细胞caco-2建立单细胞层转运模型。目前,部分研究者通过过表达BCRP得到MDCK-BCRP和LLC-PK1-BCRP细胞系用于研究BCRP介导的药物跨膜运输,该模型需要构建过表达载体,并且需要筛选稳定的过表达细胞株,操作繁琐。另外,应用最为广泛的研究BCRP底物跨细胞转运的模型是利用人的结肠癌细胞系caco-2建立单细胞层转运模型,该模型是在碳酸聚酯膜的Transwell上培养caco-2细胞,形成紧密连接的具有极性的单细胞层,用于研究BCRP底物的吸收和外排。尽管这一模型被认为是体外研究BCRP对药物转运的标准,但是仍然存在不足之处,首先caco-2是结肠癌细胞系,在形态和生理功能上与正常的肠上皮细胞差别

较大;其次细胞的代数以及培养的条件对单层细胞转运模型的稳定性影响较大;最后caco-2需要21天培养周期才能形成紧密的单细胞层结构,形成时间过久不利于BCRP底物和抑制剂的高通量筛选。因此,急需建立一种新型的用于体外研究BCRP介导药物转运的模型。

发明内容

[0005] 由于现有的BCRP介导的药物转运模型存在各种不足,本发明直接利用培养小肠的3D类器官模型应用于BCRP介导药物转运的研究。

[0006] 本发明首次利用小鼠小肠的3D类器官应用于BCRP介导的药物转运的研究,并且利用荧光酶标仪对其底物hoechst33342的浓度进行检测。该方法操作简便、检测高效快速,可广泛应用于BCRP底物和抑制剂的体外筛选。

[0007] 本发明提出了一种小肠3D类器官的培养方法,所述方法包括以下步骤:

[0008] (1) 分离小肠隐窝:利用EDTA消化小鼠(如C57BL/6小鼠)小肠分离得到小肠隐窝;

[0009] (2) 接种:用基质胶混悬后接种于培养板中;

[0010] (3) 培养:基质胶凝固后加入含有生长因子的ADMEM/F12完全培养基,进行培养。

[0011] 其中,所述步骤(1)中,所述EDTA的浓度0.5mM-5mM;优选地,为2mM。

[0012] 其中,所述步骤(1)中,所述消化时间为15-30分钟;优选地,为25分钟。

[0013] 其中,所述步骤(2)中,所述培养板可以但不限于是96孔板或24孔板;96孔板每孔接种基质胶5 μ L,24孔板每孔接种基质胶50 μ L。

[0014] 其中,所述步骤(2)中,所述基质胶为低生长因子,无酚红基质胶。

[0015] 其中,所述步骤(2)中,所述基质胶和小肠隐窝的用量关系为每微升(μ L)基质胶中含5-10个隐窝为宜。

[0016] 其中,所述步骤(3)中,所述生长因子为Respondin-1,m-noggin和m-EGF三种细胞分化生长因子的组合。

[0017] 其中,所述步骤(3)中,所述ADMEM/F12完全培养基的组分和浓度为1mM N-乙酰,10mM谷氨酰胺,10mM HEPES,1x B27,1xN2,和1x Primocin。

[0018] 其中,所述步骤(3)中,所述ADMEM/F12完全培养基中生长因子的总浓度为650ng/mL;优选地,生长因子的浓度分别为500ng/mL Respondin-1,100ng/mL m-noggin和50ng/mL m-EGF。

[0019] 其中,所述步骤(3)中,所述基质胶和ADMEM/F12完全培养基的体积比1:20。

[0020] 其中,所述步骤(3)中,所述培养的温度为37 $^{\circ}$ C。

[0021] 其中,所述步骤(3)中,所述培养的时间为2-6天;优选地,为4天。

[0022] 其中,所述步骤(3)中,优选地,每2天换一次培养基。

[0023] 其中,所述步骤(3)中,所述培养的终点判断的依据为小肠类器官形成明显的三维密闭的球状结构,且形成新的隐窝结构。

[0024] 本发明中,在小肠隐窝分化培养形成3D类器官的过程中,隐窝首先将其上部的开口迅速密封形成腔状;随后,经历持续的“出芽”过程,形成新的隐窝,体积并进一步扩大,形成封闭的中空三维球状结构。小肠3D类器官由上皮细胞、潘氏细胞以及干细胞等组成,其腔内侧模拟小肠绒毛结构,表达BCRP蛋白;相应的其外侧相似于小肠的基底侧。

[0025] 本发明还提出了如上所述方法培养得到的小肠3D类器官,所述小肠3D类器官由上

皮细胞、潘氏细胞以及干细胞等组成,其腔内侧模拟小肠绒毛结构,表达BCRP蛋白;相应的其外侧可模拟小肠的基底侧。

[0026] 本发明还提出了用于培养上述小肠3D类器官的培养基,包括:1mM N-乙酰,10mM谷氨酰胺,10mM HEPES,1x B27,1xN2,1x Primocin和650ng/mL生长因子,其余为水。

[0027] 其中,所述生长因子为Respondin-1,m-noggin和m-EGF三种生长因子的组合。

[0028] 优选地,所述ADMEM/F12完全培养基中生长因子的浓度分别为500ng/mL Respondin-1, 100ng/mLm-noggin和50ng/mLm-EGF。

[0029] 即,优选地,本发明所述用于培养上述小肠3D类器官的培养基,包括:1mM N-乙酰,10mM谷氨酰胺,10mM HEPES,1x B27,1x N2,1x Primocin,500ng/mL Respondin-1, 100ng/mLm-noggin和50ng/mLm-EGF,其余为水。

[0030] 本发明还提出了所述培养基在培养上述小肠3D类器官中的应用。

[0031] 本发明还提出了一种用于研究BCRP介导的药物转运模型的构建方法,利用小肠3D类器官研究BCRP介导底物如Hoechst 33342转运的方法,具体方法包括以下步骤:(1)对按上述方法培养得到小肠3D类器官中BCRPmRNA表达水平进行测定;(2)免疫组织化学方法检测小肠3D类器官中BCRP蛋白的表达水平;(3)通过BCRP底物、BCRP抑制剂对小肠 3D类器官进行功能验证;即,将小肠3D类器官与BCRP经典底物进行共孵育,同时将小肠 3D类器官与BCRP抑制剂进行共孵育,通过测定底物的量来评价抑制剂的作用,进而对小肠 3D类器官进行功能验证。

[0032] 其中,所述步骤(1)中,所述方法包括:利用Trizol提取小肠绒毛、隐窝以及培养的3D类器官中的总RNA,并使用逆转录试剂盒合成cDNA。以合成的cDNA为模板,进行实时荧光定量PCR检测BCRP在小肠绒毛、隐窝以及培养的3D类器官中的mRNA表达水平。定量PCR检测BCRP的引物序列:正向5'-GA A C T C C A G A G C C G T T A G G A C-3'和反向5'-C A G A A T A G C A T T A A G G C C A G G T T-3'。

[0033] 其中,所述步骤(2)中,所述方法包括:小肠组织(绒毛、隐窝)以及小肠3D类器官常规固定、脱水、石蜡包埋、切片;组织切片经过脱蜡、复水、抗原表位修复、灭内源性过氧化物酶、封闭后依次孵育抗小鼠BCRP的抗体,HRP标记羊抗兔二抗;最后DAB显色后封片拍照。

[0034] 其中,所述步骤(3)中,所述BCRP底物包括Hoechst 33342、米托蒽醌、马兜铃酸I;优选地,为Hoechst 33342。

[0035] 其中,所述步骤(3)中,所述BCRP抑制剂包括Ko143、YH0-13177、YH0-13351;优选地,为Ko143或YH0-13177。

[0036] 其中,所述步骤(3)中,所述BCRP底物的浓度为1-5 μ M;优选地,为2.5 μ M。

[0037] 其中,所述步骤(3)中,所述BCRP抑制剂的浓度为15 μ M~20 μ M;当BCRP抑制剂为Ko143时,其浓度为15 μ M;当BCRP抑制剂为YH0-13177时,其浓度为20 μ M。

[0038] 其中,所述步骤(3)中,所述共孵育的时间为20~100min;优选地,为40分钟。

[0039] 其中,所述步骤(3)中,采用PBS孵育的方法促使BCRP底物从小肠3D类器官中释放;其中,所述PBS孵育的温度为37℃;所述PBS孵育的时间为2-8小时,优选地,为4小时。其中,释放出的底物可通过离心的方式进行收集,所述离心的条件可以但不限于200 $\times$ g离心5分钟。

[0040] 其中,所述步骤(3)中,当为Hoechst 33342时,所述BCRP底物的测定方法为,释放

出的底物离心后,取上清至96孔板中,在 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=355\text{nm}/460\text{nm}$ 条件下,对底物进行荧光强度检测。

[0041] 本发明中,(1)所述用于BCRP介导药物转运模型的3D类器官培养的时间选择为4天,或当3D类器官形成明显的三维密闭的球状结构,且形成新的隐窝结构,形成的球状中空的内腔可以积累BCRP外排底物的收集,3D类器官具有构建BCRP介导药物转运的物理结构。(2)其次,3D类器官中BCRP的mRNA表达水平和小肠绒毛以及隐窝中的水平一致时,说明体外培养形成的隐窝具有体内BCRP表达的生理特征。(3)另外,BCRP蛋白表达分别位于小鼠小肠绒毛外侧和小肠3D类器官腔内侧边缘时,说明小肠3D类器官内部的腔相当于小鼠肠腔,说明3D类器官具有构建BCRP介导药物转运的生理结构。

[0042] 在一具体实施方式中,所述一种用于研究BCRP介导的药物的模型的构建方法包括①按上述方法培养小肠3D类器官,②3D类器官与BCRP底物Hoechst 33342的共孵育;Hoechst 33342与BCRP抑制剂Ko143或YH0-13177和3D类器官的共孵育;③3D类器官中Hoechst 33342测定。

[0043] 其中,所述步骤①中,小肠3D类器官的培养天数为4天。

[0044] 其中,底物的Hoechst 33342的浓度为 $2.5\mu\text{M}$;BCRP抑制剂Ko143的浓度为 $15\mu\text{M}$;YH0-13177的浓度为 $20\mu\text{M}$;所述孵育时间为20,40,60,80,100min;以5个时间点为横坐标,YH0-13177的浓度为纵坐标作图,观察BCRP抑制剂对Ko143和YH0-13177对Hoechst 33342在类器官中积累的影响。

[0045] 其中,所述步骤③中,采用PBS 37°C 条件下孵育的方法促使BCRP底物Hoechst 33342从类器官中释放,PBS的孵育时间为4小时。

[0046] BCRP表达于3D类器官的腔内侧,为一种外排的转运体,能够将其底物如Hoechst 33342排到类器官的腔内,使Hoechst 33342在腔内积累。BCRP的抑制剂Ko143和YH0-13177能够抑制BCRP对Hoechst 33342的转运,从而减少Hoechst 33342在3D类器官中的积累。

[0047] 本发明还提出了如上所述方法构建得到的用于研究BCRP介导的药物的模型。

[0048] 本发明还提出了一种用于研究BCRP介导的药物的转运方法,所述方法包括:(1)按上述方法培养得到小肠3D类器官,(2)将BCRP与待测药物进行共孵育,将BCRP与抑制剂进行共孵育,通过测定待测药物的浓度,研究BCRP对药物的转运情况。其中,各操作步骤参见上文内容。

[0049] 本发明还提出了一种促使BCRP底物从所述小肠3D类器官中释放的方法,所述方法包括:向所述小肠3D类器官中加入PBS,进行孵育,使得3D类器官破裂,释放腔内的BCRP底物。

[0050] 其中,所述BCRP底物包括Hoechst 33342、米托蒽醌、马兜铃酸;优选地,为Hoechst 33342。

[0051] 其中,所述PBS孵育的温度为 37°C 。

[0052] 其中,所述PBS孵育的时间为2-8小时,优选地,为4小时。

[0053] 其中,优选地,加入前对PBS进行预热。

[0054] 其中,96孔板每孔加入 $100\mu\text{L}$ 的PBS。

[0055] 其中,释放出的底物可通过离心的方式进行收集,所述离心的条件可以但不限于 $200\times g$ 离心5分钟;当底物为Hoechst 33342时,取 $100\mu\text{L}$ 的上清至96孔板中,在 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=$

355nm/460 nm条件下进行荧光强度检测。

[0056] 在一具体实施方式中,本发明提出的促使Hoechst 33342从3D类器官中释放的方法,包括:采用加入150 μ L预热的PBS,在37 $^{\circ}$ C的条件下孵育4个小时,使得3D类器官破裂释放腔内的Hoechst 33342,200 $\times$ g离心5分钟后取100 μ L的上清至96孔板中,在 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=355$ nm/460nm条件下进行荧光强度检测。

[0057] 本发明还提出了一种检测小肠绒毛、隐窝以及3D类器官中BCRP mRNA水平的方法,所述方法包括:利用Trizol提取小肠绒毛、隐窝以及培养的3D类器官中的总RNA,并使用逆转录试剂盒合成cDNA;以合成的cDNA为模板,进行实时定量PCR检测BCRP在小肠绒毛、隐窝以及培养的3D类器官中的表达水平。

[0058] 其中,BCRP的引物序列:正向5'-GAACTCCAGAGCCGTTAGGAC-3'和反向5'-CAGAATAGCATTAAGGCCAGGTT-3'。

[0059] 本发明还提出了一种免疫组织化学方法检测BCRP蛋白表达水平的方法,所述方法包括:小肠组织和3D类器官常规固定、脱水、石蜡包埋、切片;组织切片经过脱蜡、复水、抗原表位修复、灭内源性过氧化物酶、封闭后依次孵育抗小鼠BCRP的抗体,HRP标记抗小鼠的二抗;最后DAB显色后封片拍照。

[0060] 其中,抗小鼠BCRP抗体的稀释比例为1:100-1:1000;优选地,为1:200。

[0061] 其中,HRP标记的羊抗兔二抗的稀释比例为1:200-1:2000;优选地,为1:1000。

[0062] 本发明直接利用培养小肠的3D类器官模型应用于BCRP介导药物转运的研究;首先从C57BL/6小鼠小肠消化分离出隐窝,混悬于基质胶后接入细胞培养板中,利用含有Respondin-1、m-noggin和m-EGF细胞分化生长因子的ADMEM/F12培养基促进隐窝分化形成3D类器官;然后进行形态学的观察,并检测了BCRP在基因和蛋白表达水平以验证模型理论的可行性;最后采用共孵育的方法,使用BCRP的荧光底物Hoechst 33342及其抑制剂Ko143或YHO-13177研究BCRP在3D类器官中跨膜转运的活性。本发明的有益效果在于:

[0063] (1)与Caco-2单层细胞模型相比,小肠3D类器官是直接由小肠隐窝中的干细胞分化而成,在结构和生理功能上更接近于小肠,能更好地模拟药物在体内的跨膜外排作用。

[0064] (2)Caco-2单层细胞模型培养需要21天,而用于BCRP药物转运研究的小肠3D类器官培养仅需4天,周期短,时间成本低。

[0065] (3)与MDCK-BCRP和LLC-PK1-BCRP等过表达BCRP细胞系相比,小肠3D类器官无需转染和筛选稳定表达的细胞株,模型建立更加简便易行。

[0066] (4)使用PBS孵育促使hoechst33342从3D类器官中释放,并且利用荧光酶标仪对底物如hoechst33342的浓度进行检测,检测限较低,且简单、快速、高效。

[0067] (5)本发明首次构建了小鼠小肠3D类器官研究BCRP介导的药物跨细胞膜转运的体外模型,该模型构建方法操作简便、检测高效快速,可广泛应用于BCRP底物和抑制剂的体外筛选。

附图说明

[0068] 图1分离的小肠隐窝培养分化形成3D类器官的过程。随着培养天数的增加,隐窝逐渐分化形成3D类器官,随后隐窝中的干细胞开始分化“出芽”形成新的隐窝结构。

[0069] 图2小鼠小肠绒毛、隐窝以及培养的3D类器官中BCRP mRNA的表达;以及BCRP在不

同培养天数的3D类器官中mRNA表达水平。

[0070] 图3小鼠小肠3D类器官中BCRP蛋白水平检测结果。箭头所指为BCRP的表达位置，BCRP蛋白表达位于小鼠小肠绒毛外侧和3D类器官囊腔内侧边缘。

[0071] 图4 BCRP底物Hoechst 33342的标准曲线。

[0072] 图5 BCRP的抑制剂Ko143和YH0-13177对Hoechst 33342跨3D类器官转运的影响。Ko143和YH0-13177能够明显抑制BCRP对Hoechst 33342向3D类器官囊腔内侧的外排作用，减少Hoechst 33342在3D类器官囊腔内的积累。

具体实施方式

[0073] 结合以下具体实施例和附图，对本发明作进一步的详细说明。实施本发明的过程、条件、实验方法等，除以下专门提及的内容之外，均为本领域的普遍知识和公知常识，本发明没有特别限制内容。

[0074] 实施例1小鼠小肠隐窝的分离以及小肠3D类器官的培养

[0075] (1) 6-8周龄C57BL/6小鼠颈椎脱臼处死后，取出小肠放入预冷的PBS中。

[0076] (2) 用镊子小心去除肠系膜脂肪组织后，从中间剪开，用预冷的PBS洗净肠内容物，转移至无菌含预冷PBS的50mL离心管中，置于冰上。

[0077] (3) 在生物安全柜中，用含有青霉素/链霉素(P/S)的预冷的PBS清洗3-4次，小肠转移至25mL含有2mM EDTA的PBS中，于4℃冰箱消化25分钟。

[0078] (4) 将消化好的小肠转移至含有25mL预冷PBS的50mL离心管中，摇晃50下左右，收集悬液。

[0079] (5) 重复上一步骤，将悬液用70μm的细胞筛网过滤到50mL的离心管中，并加入2mL的10%的BSA，于4℃，200g离心5分钟。

[0080] (6) 小心弃去上清，沉淀重悬于2mL的ADMEM/F12培养基中；取5μL重悬液在显微镜下计数。

[0081] (7) 根据所需隐窝的数量，取重悬液于1.5mL的离心管中，加入终浓度为1%的BSA，4℃，200g离心5分钟。

[0082] (8) 小心弃去上清，取所需体积的基质胶重悬沉淀，用枪头小心充分混匀后5μL/孔接入37℃预热的96孔板中；置于37℃培养箱中10分钟，使基质胶凝固。

[0083] (9) 加入100μL/孔含有500ng/mL Respondin-1, 100ng/mL m-noggin和50ng/mL m-EGF 的ADMEM/F12完全培养基，5%CO₂，37℃培养；每2天更换一次完全培养基。

[0084] 实施例2小肠3D类器官形态学的观察

[0085] 利用Olympus DP 71倒置显微镜观察并拍摄培养1、2、3、4、5和6天3D类器官形成的过程，结果如图1显示，分离的隐窝随着培养时间的增加而逐渐分化成3D类器官，并且隐窝中的干细胞开始分化“出芽”形成新的隐窝结构。

[0086] 实施例3 BCRP mRNA水平检测

[0087] (1) 小肠绒毛的分离：按照实施例1中分离隐窝的方法，在步骤5后，收集70μm细胞筛网内的小肠绒毛。

[0088] (2) 小肠隐窝的分离：按照实施例1中分离的方法获取得到小鼠小肠隐窝。

[0089] (3) 3D类器官的获取：小肠隐窝分离培养4天后形成3D类器官，弃去培养基，用预冷

的PBS洗2遍,然后用1mL移液枪头破碎基质胶,并用PBS将其转移到1.5mL的离心管中,4℃,200g离心5分钟,弃上清,沉淀为3D类器官。

[0090] (4) mRNA的提取及逆转录:利用Trizol提取小肠绒毛、隐窝以及培养的3D类器官中的总RNA,并使用逆转录试剂盒合成cDNA。

[0091] (5) 利用cDNA为模板,进行实时定量PCR分析BCRP在小肠绒毛、隐窝以及培养的3D类器官中的表达水平。

[0092] 实施例4免疫组织化学方法检测BCRP蛋白的表达水平

[0093] (1) 小肠组织的固定:颈椎脱臼法处死小鼠,取出小肠后纵向剪开,用预冷的PBS洗净小肠内容物,用镊子卷起后用针头固定,放入4%的多聚甲醛中固定过夜。

[0094] (2) 3D类器官的固定:小肠隐窝分离培养4天后形成3D类器官,弃去培养基,用预冷的PBS洗2遍,然后用1mL移液枪头破碎基质胶,并用PBS将其转移到1.5mL的离心管中,4℃,200g离心5分钟,弃上清,沉淀重悬于4%的多聚甲醛中固定过夜。

[0095] (3) 冲洗:为了洗去固定液,小肠组织用自来水冲洗一天;3D类器官用PBS洗3次,每次15分钟。

[0096] (4) 脱水:小肠组织和3D类器官依次浸入50%、75%、85%、95%、100% I、100% II乙醇中1小时。

[0097] (5) 透明:小肠组织和3D类器官依次浸入二甲苯:无水乙醇(1:1, v/v) 20分钟;二甲苯 I和二甲苯II各15分钟。

[0098] (6) 浸蜡:将小肠组织和3D类器官浸入蜡I 1小时,蜡II 1小时,蜡III 2小时。

[0099] (7) 包埋:利用组织包埋机包埋小肠组织和3D类器官。

[0100] (8) 切片:将蜡块固定在组织切片机上,石蜡切片的厚度为5μm。

[0101] (9) 免疫组织化学染色:

[0102] ①脱蜡:将石蜡切片依次放入100%二甲苯I、100%二甲苯II中各10min,再放入二甲苯与乙醇1:1混合液中5min,进行脱蜡。

[0103] ②复水:切片依次浸入100%乙醇I 10分钟、100%乙醇II 10分钟、95%乙醇5分钟、85%乙醇5分钟、75%乙醇5分钟、50%乙醇5分钟。

[0104] ③蒸馏水洗:复水后的切片放入蒸馏水中洗5分钟。

[0105] ④抗原表位修复:枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)于微波炉中加热至沸腾,将切片浸于沸腾的缓冲液中,70℃烘箱保温10分钟,自然冷却至室温。

[0106] ⑤PBS洗3次,每次5分钟。

[0107] ⑥灭活内源性过氧化物酶:切片放入3% H₂O₂ 10分钟灭活内源性过氧化物酶。

[0108] ⑦PBS洗3次,每次5分钟。

[0109] ⑧封闭:加入含2%的山羊血清的PBS 37℃下封闭2小时。

[0110] ⑨一抗孵育:切片甩干后加入封闭液稀释的BCRP抗体(1:500),4℃孵育过夜。

[0111] ⑩PBS洗3次,每次5分钟。

[0112] ⑪二抗孵育:加入封闭液稀释的HRP-羊抗兔(1:1000),室温反应2小时。

[0113] ⑫PBS洗3次,每次5分钟。

[0114] ⑬DAB显色:将混匀的DAB显色液加在切片上,显色10分钟,流水冲洗去DAB显色液。

[0115] ⑭苏木精染色:用苏木精染色5分钟,自来水冲洗2-3次之后再用75%酒精(含1%

盐酸) 分色20秒。

[0116] ⑮蒸馏水洗3次,每次5分钟。

[0117] ⑯凉干:将切片置于室温中自然凉干。

[0118] ⑰透明:二甲苯透明10分钟。

[0119] ⑱中性树胶封片后放入70℃烘箱内烘干。

[0120] ⑲镜检:切片置于配备有LEICA DFC310 FX拍照系统的LEICA DM4000 B LED显微镜下观察,并进行拍摄照片。结果如图3所示,BCRP蛋白表达分别位于小鼠小肠绒毛外侧和小肠3D类器官腔内侧边缘。结果说明小肠3D类器官内部的腔相当于小鼠小肠的腔。

[0121] 实施例53D类器官中BCRP介导的药物转运研究

[0122] (1) 用PBS梯度稀释Hoechst 33342,浓度分别为312.5nM,156.25nM,78.125nM,39.062nM,19.531nM,9.766nM,4.883nM;加入96孔板,每孔100μL,每个浓度3个平行。利用荧光酶标仪FLUOStar OPTIMA,在 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=355nm/460nm$ 条件下进行荧光强度检测。以Hoechst 33342的浓度为横坐标,荧光强度为纵坐标,并进行线性回归,结果如图4所示,相关系数 $R^2>0.99$,表明标准曲线回归线性很好。

[0123] (2) 按照实施例1描述的方法,在96孔板中培养所需的由小肠隐窝分化而成的3D类器官。

[0124] (3) 3D类器官培养至4天,用1mL的移液器枪头小心破碎基质胶,然后将3D类器官转移至1.5mL的离心管中,4℃,200g离心3分钟。

[0125] (4) 弃去上清,用预冷的1mL PBS重悬沉淀,在冰上静置10分钟以融化基质胶。

[0126] (5) 4℃,200g离心3分钟,弃上清,加入所需体积的培养基重悬。

[0127] (6) 将3D类器官接入96孔板中,每孔体积为50μL,然后置于显微镜下计数。

[0128] (7) 在避光的条件下,对照组加入只含有Hoechst 33342的50μL培养基,实验组加入含Ko143或YHO-13177与Hoechst 33342的50μL培养基。

[0129] (8) 37℃培养箱孵育20、40、60、80、100分钟,用预冷的PBS将3D类器官转移至1.5mL离心管中,用预冷的PBS洗3遍,4℃,200g离心3分钟。

[0130] (9) 加入150μLPBS 37℃培养箱孵育4小时。

[0131] (10) 4小时后,3D类器官破裂,囊腔中的Hoechst 33342释放到PBS中,4℃,200g离心3分钟,取100μL上清加入96孔板中,在 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=355nm/460nm$ 条件下检测荧光强度。

[0132] (11) 利用Hoechst 33342标准曲线回归的方程计算样品中的Hoechst 33342的浓度,并用3D类器官的个数进行校准,以消除每孔类器官个数差异带来的浓度差异。实验结果如图5所示,BCRP的抑制剂Ko143和YHO-13177能够明显抑制BCRP对Hoechst 33342的外排作用,最终导致3D类器官中的Hoechst 33342积累降低。因此,BCRP抑制剂可以明显抑制3D类器官内Hoechst 33342的积累,说明3D类器官用于BCRP介导药物转运模型建立成功。

[0133] 本发明的保护内容不局限于以上实施例。在不背离发明构思的精神和范围下,本领域技术人员能够想到的变化和优点都被包括在本发明中,并且以所附的权利要求书为保护范围。

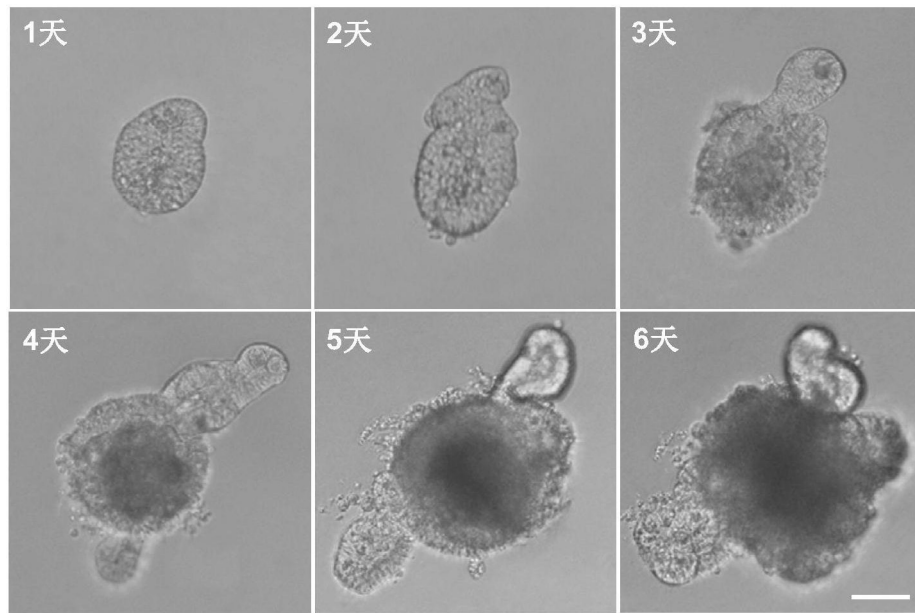


图1

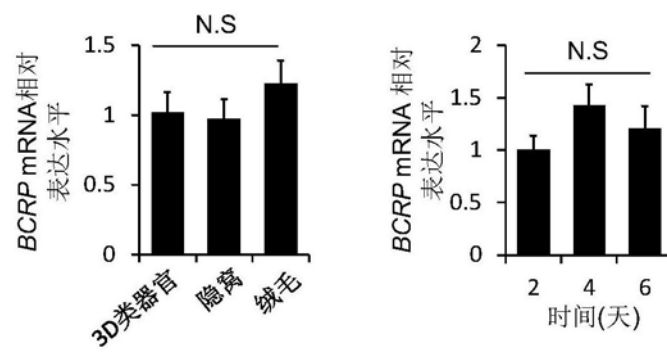


图2

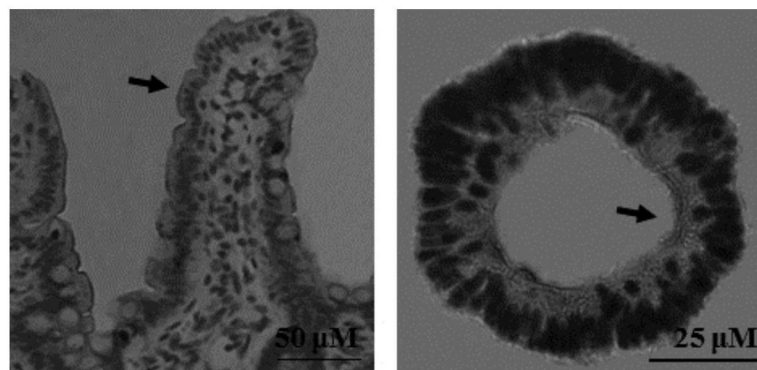


图3

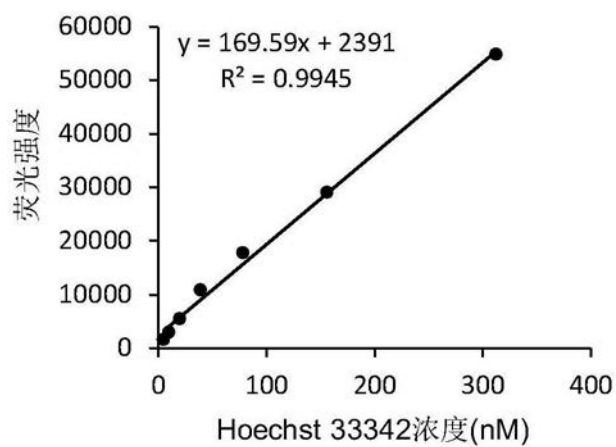


图4

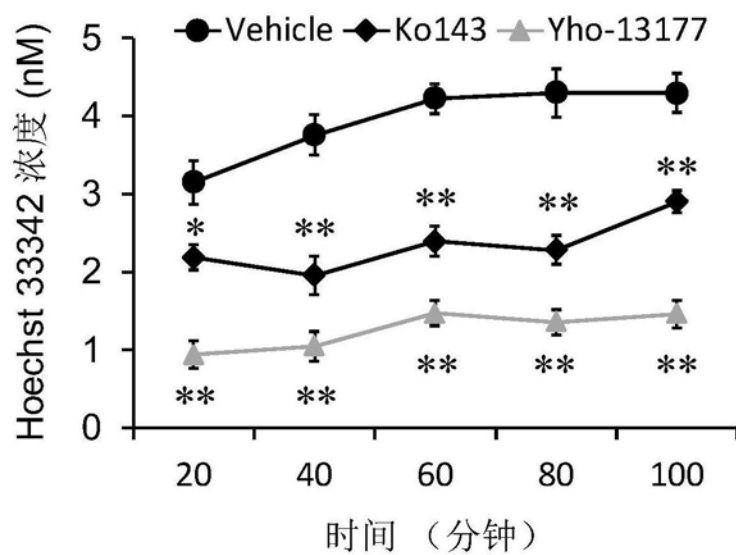


图5

专利名称(译)	一种小肠3D类器官研究BCRP介导药物转运模型的构建方法与应用		
公开(公告)号	CN107012116A	公开(公告)日	2017-08-04
申请号	CN2017110320167.X	申请日	2017-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	华东师范大学		
[标]发明人	王昕 张磊 刘明耀		
发明人	王昕 张磊 刘明耀		
IPC分类号	C12N5/071 G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/68		
CPC分类号	C12N5/0602 C12N5/0625 C12N5/0679 C12N2500/30 C12N2500/32 C12N2501/10 C12Q1/6886 C12Q2600/106 G01N33/53 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种小鼠小肠3D类器官用于研究BCRP介导的药物转运模型的构建方法；首先从小鼠小肠消化分离出隐窝，混悬于基质胶后接入细胞培养板中，利用含有Respondin-1、m-noggin和m-EGF三种细胞分化生长因子的ADMEM/F12培养基促进隐窝分化形成3D类器官；然后进行形态学的观察，检测BCRP基因和蛋白表达水平以验证模型理论的可行性；最后采用共孵育的方法，使用BCRP的荧光底物Hoechst 33342及其抑制剂Ko143或YHO-13177研究BCRP在3D类器官中跨膜转运的活性。本发明首次构建了小鼠小肠3D类器官研究BCRP介导的药物跨细胞膜转运的体外模型，该模型构建方法操作简便、检测高效快速，可广泛应用于BCRP底物和抑制剂的体外筛选。

