



团 体 标 准

T/CAS 947—2024

类器官在化学品毒性测试中的应用规范

Specifications for the use of organoids in chemical toxicity
testing

2024-09-12 发布

2024-09-12 实施

中国标准化协会 发布

中国标准化协会（CAS）是组织开展国内、国际标准化活动的全国性社会团体。制定中国标准化协会标准（以下简称：中国标协标准），满足市场需要，增加标准的有效供给，是中国标准化协会的工作内容之一。中国境内的团体和个人，均可提出制、修订中国标协标准的建议并参与有关工作。

中国标协标准按《中国标准化协会标准管理办法》进行制定和管理。

中国标协标准草案经向社会公开征求意见，并得到参加审定会议的 75%以上的专家、成员的投票赞同，方可作为中国标协标准予以发布。

在本标准实施过程中，如发现需要修改或补充之处，请将意见和有关资料寄给中国标准化协会，以便修订时参考。

本标准版权为中国标准化协会所有，除了用于国家法律或事先得到中国标准化协会的许可外，不得以任何形式或任何手段复制、再版或使用本标准及其章节，包括电子版、影印件，或发布在互联网及内部网络等。

中国标准化协会地址：北京市海淀区增光路 33 号中国标协写字楼

邮政编码：100048 电话：010-88416788 传真：010-68486206

网址：www.china-cas.org 电子信箱：cas@china-cas.org

目次

前言..... III

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 实验原理..... 1

5 试剂和耗材..... 1

6 仪器设备..... 2

7 试验方法..... 2

 7.1 类器官构建..... 2

 7.2 类器官毒性测试评价..... 4

附 录 A（资料性） 类器官生长速率检测..... 7

附 录 B（资料性） 类器官标志物表达水平检测..... 8

附 录 C（资料性） 神经元电生理活动检测（MEA 或钙成像）..... 9

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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：南京医科大学、同济大学附属东方医院、中国科学院上海营养与健康研究所、苏州疾病预防控制中心、天津大学、深圳市第二人民医院、安捷伦科技(中国)有限公司、北京孟晖生物科技有限公司、北京实安科技有限公司、北京市眼科研究所、北京医学检验学会、北京整合医学学会、创芯国际生物科技(广州)有限公司、东南大学、广州华医再生科技有限公司、杭州器官芯片技术有限公司、河北省食品检验研究院、黑玉星岩国际科学技术(北京)有限公司、洛阳华清天木生物科技有限公司、清华大学、清华大学深圳国际研究生院、山东第一医科大学附属省立医院、苏州大学、苏州骆华生物科技有限公司、深圳华源再生医学有限公司、深圳湾实验室、西安交通大学、浙江霍德生物工程有限公司、中山大学孙逸仙纪念医院、国军标(北京)标准化技术研究院、通标伟业(北京)标准化技术研究院等。

本文件主要起草人：顾爱华、蒋兆彦、徐进、翁振坤、刘倩、周勇、杨杨、梁静佳、邵文涛、赵鹏、胡佳、陈力群、聂国辉、黄卫人、张岩、杨菁喆、邓博文、李娜、金子兵、穆红、陈泽新、张娟、宋琛、叶嘉明、李一伟、王立言、王怡、邢新会、马少华、宋伟、李新宇、张秀莉、苗春光、王恒、徐冰、吴春生、范靖、周一鸣、戴其全、王庆国、王燕。

本文件为首次发布。

类器官在化学品毒性测试中的应用规范

1 范围

本文件描述了类器官（脑、心、肺、肠、肝、肾）在化学品毒性测试中的实验原理和试验方法，规定了试验方法所需的试剂耗材和仪器设备。

本文件适用于各类化学品对相应组织系统的毒性评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

类器官 organoid

由干细胞或前体细胞体外培养形成，由组织器官特异性的多种细胞组成，具有特定组织器官关键结构和功能特性的三维细胞培养物。

3.2

毒性测试 toxicity testing

给受试物进行不同途径、不同期限的染毒，检测各种毒性终点的实验。

4 实验原理

通过构建相应的脑、心、肺、肠、肝、肾类器官，检测化学物处理下，类器官各指标的变化情况，以反映化学物相应靶器官毒性大小。

5 试剂和耗材

5.1 试验中所用的试剂，在没有注明其他要求时，均指分析纯试剂；所使用的水，在未说明规格时，应符合 GB/T 6682 中纯水的规定。

5.2 试剂和耗材宜包括但不限于：

- a) DMEM/F12 培养基、Neurobasal 培养基、mTeSR1 培养基、STEMdiff APEL2 培养基、小鼠肺类器官培养基、小鼠肠类器官培养基、小鼠肝类器官培养基；
- b) Matrigel 基质胶、Vitronectin 基质胶；
- c) Accutase 消化液、胶原酶消化液；
- d) 胎牛血清；
- e) 细胞筛（30 μm 、70 μm 、100 μm ）；
- f) 青霉素、链霉素、胶质细胞源性神经营养因子（GDNF）、脑源性神经营养因子（BDNF）、环磷酸腺苷（cAMP）、维生素 C、B-27 添加剂（不含维生素 A）、成纤维细胞生长因子 2（Fibroblast Growth Factor 2, FGF2）、2-（4-吗啉基）-8-苯基-1（4H）-苯并吡喃-4-酮盐酸盐（LY294002）、激活素 A、骨形态发生蛋白 4（BMP4）、6-[[2-[[4-（2，4-二氯苯基）-5-（5-甲基-1H-咪唑-2-基）-2-嘧啶]氨基]乙基]氨基]-3-吡啶甲腈（CHIR-99021）、胰岛素、N-（6-甲基-2-苯并噻唑基）-2-[[（3，4，6，7-四氢-4-氧代-3-苯基噻吩并[3，2-d] 嘧啶-2-基）硫代]-乙酰胺-2（IWP-2）、视黄酸、血管内皮生长因子 A（VEGFA）、乙二胺四乙酸（EDTA）、中性蛋白酶（Dispase）、IV 型胶原酶、ROCK 抑制剂（Y-27632）、肝素、成纤维细胞生长因子 9（FGF9）；
- g) 磷酸盐缓冲液（PBS）、红细胞裂解液、DNA 酶溶液；
- h) T25 培养瓶（poly-HEMA 包被）、96 孔板（超低吸附）、细胞培养皿、transwell 小室。

6 仪器设备

仪器设备至少应包括：

- a) 生物安全柜；
- b) 激光共聚焦显微镜；
- c) 离心机；
- d) 细胞培养箱；
- e) 低速圆周摇床；
- f) 倒置显微镜；
- g) 移液枪；
- h) 无菌细胞培养皿；
- i) 多功能酶标仪；
- j) 医用冰箱。

7 试验方法

7.1 类器官构建

7.1.1 脑类器官构建

7.1.1.1 脑类器官宜采用人神经干细胞（hNSCs）或人神经前体细胞（hNPCs）构建，置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。

7.1.1.2 贴壁培养的 hNSCs/hNPCs 或悬浮培养的神经球，经 Accutase 消化液消化成单细胞后计数。

7.1.1.3 300 g 离心 3 min, 使用 Neurobasal 神经培养基 (含 20 ng/mL GDNF、20 ng/mL BDNF、10 μ M cAMP、200 μ M 维生素 C 和不含维生素 A 的 B-27 添加剂) 进行细胞重悬。

7.1.1.4 接种 1000 个~10000 个 hNSCs/hNPCs 细胞至圆底超低吸附 96 孔板内。

7.1.1.5 置于 37 °C 5 % CO₂ 细胞培养箱中的低速圆周摇床上摇动培养, 每 3 d~5 d 半量换液, 第 2 d 即可观察到每个孔内形成大小均一的神经球。

7.1.1.6 使用神经培养基持续培养至 30 d 以上, 获得成熟人脑类器官。

7.1.2 心脏类器官构建

7.1.2.1 心脏类器官宜采用人诱导多能干细胞 (hPSCs) 构建, 培养于 37 °C 5 % CO₂ 培养箱中。

7.1.2.2 使用 mTeSR1 培养基培养 hPSCs, 使其在超低吸附 96 孔板底部形成圆形细胞颗粒, 并在细胞培养箱中孵育 1 d, 形成聚集体。

7.1.2.3 聚集体形成 1 d 后, 计为第 0 d, 吸出 mTeSRTM1 培养基, 加入 DMEM/F12 培养基 (含 30 ng/mL FGF2, 5 μ M LY294002, 50 ng/mL 激活素 A、10 ng/mL BMP4、3 μ M CHIR-99021、1 μ g/mL 胰岛素)。

7.1.2.4 第 2 d, 更换 DMEM/F12 培养基 (含 10 ng/mL BMP4、8 ng/mL FGF2、10 μ g/mL 胰岛素、5 μ M IWP-2、0.5 μ M 视黄酸、100 ng/mL VEGFA), 第 3 d~5 d 每天更换新鲜的培养基。

7.1.2.5 第 6 d, 更换 DMEM/F12 培养基 (含 10 ng/mL BMP4、8 ng/mL FGF2、10 μ g/mL 胰岛素、100 ng/mL VEGFA), 第 7 d 更换新鲜的培养基。

7.1.2.6 第 8 d, 更换 DMEM/F12 培养基 (含 100 ng/mL VEGFA), 以后每 2 d 更换 1 次新鲜的培养基, 第 14 d 即得到心脏类器官。

7.1.3 肺类器官构建

7.1.3.1 肺类器官宜采用小鼠肺组织构建, 置于 37 °C 5 % CO₂ 培养箱中培养。

7.1.3.2 将小鼠用 75 % 酒精彻底消毒皮肤, 无菌分离肺组织并置于预冷的无菌 PBS 溶液中漂洗, 清除结缔组织及肺内主支气管, 分离肺叶, 清洗 2 次~3 次去血。

7.1.3.3 无菌镊子转移清洗后的肺叶于新的培养皿中, 吸除残留的 PBS, 用眼科手术剪将肺组织均匀剪成约 1 mm³ 的组织块, 转移至预热的胶原酶消化溶液中, 37 °C 恒温摇床 (100 r/min) 消化 45 min~60 min。

7.1.3.4 加入等量的含有 10 % 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/F12 培养基终止消化, 吹打混匀后, 使用 100 μ m 细胞筛过滤; 过滤液 4 °C 300 g 离心 5 min, 弃上清。

7.1.3.5 加入 3 mL 红细胞裂解液重悬细胞沉淀, 室温孵育 1 min~2 min, 加入 6 mL DMEM/F12 培养基混匀, 4 °C 300 g 离心 5 min, 弃上清; 重复上述步骤 2 次, 直至细胞沉淀变白。

7.1.3.6 加入 4 mL DNA 酶溶液 (20 U/mL) 重悬细胞沉淀, 室温手摇 3 min~5 min; 加入 6 mL DMEM/F12 培养基混匀, 4 °C 300 g 离心 5 min, 弃上清。

7.1.3.7 按照 2×10^7 /mL 细胞数量重悬于 40 μ L Matrigel 基质胶中, 并接种至 24 孔板中央。

7.1.3.8 待 Matrigel 基质胶凝固后, 加入 600 μ L 小鼠肺类器官培养基, 每隔 2 d 更换培养基, 第 14 d 即得到肺类器官。

7.1.4 肠类器官构建

7.1.4.1 肠类器官宜采用小鼠肠组织构建, 置于 37 °C 5 % CO₂ 培养箱中培养。

7.1.4.2 在靠近小鼠胃的一端取长度约 20 cm 小肠, 去除肠道绒毛、血管和脂肪。

7.1.4.3 将肠段纵向切开, 用预冷的 PBS 轻轻洗涤肠道, 直至清洗干净。

- 7.1.4.4 将肠组织剪成 2 mm 片段，用预冷的 PBS 反复冲洗，直至上清液澄清。
- 7.1.4.5 除去上清液，将组织碎片重悬于 4 mL 含有 5 mM EDTA PBS 中。
- 7.1.4.6 用枪头吹打、重悬含有消化液的组织碎片，使组织反复穿过移液管以产生机械剪切力，从而使肠隐窝与基层分离。
- 7.1.4.7 加入 4 mL 小鼠肠类器官培养基终止消化。
- 7.1.4.8 用 100 μm 细胞筛过滤组织悬液，过滤液 4 $^{\circ}\text{C}$ 300 g 离心 5 min，弃上清。
- 7.1.4.9 显微镜下计数肠隐窝数量。
- 7.1.4.10 按照每 10 μL Matrigel 基质胶含 200 个~600 个肠隐窝密度，接种至 24 孔板中。
- 7.1.4.11 待 Matrigel 基质胶凝固后，加入 600 μL 小鼠肠类器官培养基，每隔 2 d 更换培养基，第 7 d 即得到肠类器官。

7.1.5 肝类器官构建

- 7.1.5.1 肝类器官宜采用小鼠肝组织构建，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5 % CO_2 培养箱中培养。
- 7.1.5.2 取小鼠肝脏，放入预冷的 DMEM/F12 培养基中漂洗 2 次。
- 7.1.5.3 使用无菌剪刀将肝脏剪碎至 1 mm^3 大小，转移至离心管中，静置 2 min 后，去除上清。
- 7.1.5.4 放入消化液 10 mL (Dispase、IV 型胶原酶、DMEM/F12 培养基，按 1: 1: 6 配比)，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min。
- 7.1.5.5 机械吹打后，静置 1 min，去除上清。
- 7.1.5.6 上述步骤重复 3 次，收集上清液，冰上保存。
- 7.1.5.7 用 70 μm 细胞筛过滤组织悬液，收集过滤液。
- 7.1.5.8 用 30 μm 细胞筛过滤，收集细胞筛网截留的肝细胞。
- 7.1.5.9 按照 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 细胞数量重悬于 40 μL Matrigel 基质胶中，并接种至 24 孔板中央。
- 7.1.5.10 待 Matrigel 基质胶凝固后，加入 600 μL 小鼠肝类器官培养基，每隔 2 d 更换培养基，第 14 d 即得到肝类器官。

7.1.6 肾类器官构建

- 7.1.6.1 肾类器官宜采用人诱导多能干细胞 (hPSCs) 构建，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5 % CO_2 培养箱中培养。
- 7.1.6.2 将 0.65×10^5 个 hPSCs 接种在 6 孔板中，并加入 mTeSR1 培养基 (含 10 μM Y-27632) 培养。
- 7.1.6.3 24 h 后，更换 STEMdiff APEL2 培养基 (含 8 μM CHIR99021) 培养 4 d。
- 7.1.6.4 第 5 d，更换 STEMdiff APEL2 培养基 (含 200 ng/mL FGF9、1 $\mu\text{g/mL}$ 肝素) 培养 3 d。
- 7.1.6.5 在第 8 d，采用 Accutase 消化液将细胞解离成单细胞；350 g 下离心 2 min，弃上清。
- 7.1.6.6 将 5×10^5 个细胞转移到 transwell 小室，并置于 STEMdiff APEL2 培养基 (含 5 μM CHIR99021) 中，37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h。
- 7.1.6.7 更换 STEMdiff APEL2 培养基 (含 200 ng/mL FGF9、1 $\mu\text{g/mL}$ 肝素)，继续培养 5 d。
- 7.1.6.8 更换 STEMdiff APEL2 培养基，每隔一天更换，继续培养第 30 d，得到肾类器官。

7.2 类器官毒性测试评价

7.2.1 评价方法

采用类器官培养基，将受试化学品按一定比例 (推荐 1: 4) 逐级稀释，生成具有梯度浓度的稀释液 (不少于 3 个梯度)。小心吸出培养皿中培养基 (不要触碰胶滴)，加入含受试化学品的培养基 (每个浓度梯度不少于 3 个平行样) 进行培养。根据类器官种类不同，检测相应的指标，以反映

化学品对类器官毒性的大小。

7.2.2 评价指标

7.2.2.1 脑类器官

检测指标应包括但不限于下列内容。

- a) 类器官生长速率，参考附录 A 的方法检测。
- b) 参考附录 B 的方法，检测脑类器官标志物表达水平，包括：
 - 1) 神经元标志物，如微管相关蛋白 2 (MAP2) 和神经 III 类 β 微管蛋白 (TUJ1)；
 - 2) 胶质细胞标志物，如胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 和 S100b。
- c) 神经元电生理活动检测，如超柔性微电极阵列 (multi-electrode array, MEA) 和钙成像，参考附录 C 的方法检测。

7.2.2.2 心脏类器官

检测指标应包括但不限于下列内容。

- a) 类器官生长速率。
- b) 参考附录 B 的方法，检测心类器官标志物表达水平，包括：
 - 1) 肌成纤维细胞，如钙调蛋白 (calponin)；
 - 2) 内皮细胞，如血小板内皮细胞粘附分子-1 (CD31)、VE-钙粘蛋白 (CD144)。

7.2.2.3 肺类器官

检测指标应包括但不限于下列内容。

- a) 类器官生长速率。
- b) 参考附录 B 的方法，检测肺类器官分子标志物变化水平，包括：
 - 1) 上皮标志物，如角蛋白 14 (Krt14)、上皮细胞粘附分子 (EpCAM)、p63；
 - 2) 增殖标志物，如 Ki-67；
 - 3) 分化标志物，如 Acetylated Tubulin。

7.2.2.4 肠类器官

检测指标应包括但不限于下列内容。

- a) 类器官生长速率。
- b) 参考附录 B 的方法，检测肠类器官分子标志物变化水平，包括：
 - 1) 肠内分泌细胞，如嗜铬粒蛋白 A (ChgA)；
 - 2) 簇状细胞，如双皮质素样激酶 1 (DCLK1)；
 - 3) 杯状细胞，如黏蛋白 2 (Muc2)；
 - 4) 潘氏细胞，如溶菌酶 (Lyz)；
 - 5) 吸收细胞，如钙调肌动蛋白 (Villin)。

7.2.2.5 肝类器官

检测指标应包括但不限于下列内容。

- a) 类器官生长速率。
- b) 参考附录 B 的方法，检测肝类器官分子标志物变化水平，包括：
 - 1) 白蛋白 (ALB)；

- 2) 甲胎蛋白（AFP）；
- 3) 细胞角蛋白 19（CK19）。

7.2.2.6 肾类器官

检测指标应包括但不限于以下内容。

- a) 类器官生长速率。
- b) 参考附录 B 的方法，检测肾类器官标志物表达水平，包括：
 - 1) 肾小管标志物，如莲花翅荚豌豆凝集素（LTL）；
 - 2) 肾小球标志物，如肾母细胞瘤 1（WT1）；
 - 3) 足细胞标志物，如突触足蛋白（SYNPO）。

附 录 A
(资料性)
类器官生长速率检测

A.1 仪器设备

仪器设备包括但不限于：

- a) 光学显微镜；
- b) 台式定轨振荡器（含加热功能）；
- c) 多功能酶标仪。

A.2 试剂

CCK-8 试剂。

A.3 试验方法

试验方法如下：

- a) 采用光学显微镜，每天拍照记录类器官大小，计算类器官平均直径和面积；
- b) 采用巴氏管上下吹打，使类器官和 Matrigel 基质胶分离；
- c) 将培养板放在台式定轨振荡器上，以 37 °C 和 120 rpm 的速度孵育 30 min；
- d) 吸取 100 μL 悬液转移至 96 孔板中，每孔加入 10 μL CCK-8 溶液，37 °C 孵育 30 min~3 h；
- e) 多功能酶标仪（450 nm）测定吸光度值，以反映类器官增长速率。

附 录 B

(资料性)

类器官标志物表达水平检测

B.1 仪器设备

仪器设备包括但不限于：

- a) NanoDrop 微量分光光度计；
- b) 台式定轨振荡器（含加热功能）；
- c) 实时定量荧光 PCR 检测仪。

B.2 试剂

试剂包括但不限于：

- a) TRIzol 试剂盒；
- b) 逆转录试剂盒；
- c) SYBR 荧光定量 PCR 检测试剂盒。

B.3 试验方法

试验方法如下：

- a) 采用巴氏管上下吹打，使类器官和 Matrigel 基质胶分离；
- b) 将培养板放在台式定轨振荡器上，以 37 ° C 和 120 rpm 的速度孵育 30 min；
- c) 采用 TRIzol 试剂盒提取类器官核糖核酸（RNA），NanoDrop 微量分光光度计测定 RNA 浓度；
- d) 采用逆转录试剂盒将提取的 RNA 逆转录成互补脱氧核糖核酸（cDNA）；
- e) 采用 SYBR 荧光定量 PCR 检测试剂盒检测类器官标志物表达水平[以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）作为内参， $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值反映标志物表达水平高低]，表达水平越低，提示化学品毒性越大。

附录 C

(资料性)

神经元电生理活动检测 (MEA 或钙成像)

C.1 仪器设备

仪器设备包括但不限于:

- a) 荧光显微镜;
- b) 生物安全柜;
- c) Maestro 多孔板微电极阵列 (MEA)。

C.2 试剂

试剂包括但不限于:

- a) 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO);
- b) Fluo-4;
- c) 丙烯酰胺 (Acrylamide, AM);
- d) Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS);
- e) 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 缓冲液;
- f) 20×Borate 缓冲液;
- g) 聚乙烯亚胺 (Polyethyleneimine, PEI);
- h) 神经培养基;
- i) 层粘连蛋白 (laminin, LN)。

C.3 试验方法

C.3.1 钙成像检测

检测步骤如下:

- a) 使用 DMSO 溶解 Fluo-4, AM 配制成 1 mM 的 Fluo-4, AM 储存液;
- b) 使用 HBSS 将 1 mM Fluo-4, AM 的储存液稀释成 1 μ M~5 μ M 的 Fluo-4, AM 工作液;
- c) 取出分化好待检测的脑类器官培养板, 移除培养基, 使用 HBSS 溶液清洗细胞 3 次, 向孔板中加入可覆盖脑类器官的 Fluo-4, AM 工作液;
- d) 将脑类器官培养板放置在 37 °C 5 % CO₂ 培养箱中孵育 60 min;
- e) 移除脑类器官培养板中的 Fluo-4, AM 工作液, 使用 HEPES 缓冲盐水清洗漂洗脑类器官 3 次后向孔板中加入 HEPES 缓冲盐水;
- f) 将脑类器官培养板放置在 37 °C 5 % CO₂ 培养箱中孵育 40 min;
- g) 使用荧光显微镜在激发波长 494 nm, 发射波长 516 nm 条件下持续拍摄 5 min 视频记录脑类器官的钙信号;
- h) 使用 ImageJ 统计分析视频中细胞的荧光强度变化并绘制成曲线图。

C.3.2 MEA 检测

检测步骤如下：

- a) 使用超纯水将 20×Borate 缓冲液配制成 1×Borate 缓冲液；
 - b) 使用 1×Borate 缓冲液将 PEI 配制成 5 % PEI 贮存液；
 - c) 使用 1×Borate 缓冲液将 5 % PEI 贮存液配制成 0.1 % PEI 工作液；
 - d) 使用 0.1 % PEI 工作液对 MEA 电极板进行包被；
 - e) 将脑类器官接种到 MEA 电极板上；
 - f) 向接种了脑类器官的各孔中加入神经培养基；
 - g) 将 MEA 电极板放置在 37℃ 5 % CO₂ 培养箱中进行培养，每隔 4 d 进行一次换液，培养至合适时间；
 - h) 通过 MEA 设备收集培养物的电生理信号 5 min 的数据；
 - i) 分析收集到的电生理信号的数值。
-

ICS 11.100

CCS C 50

关键词：类器官、毒性测试
