

# 团 体 标 准

T/SATA 095—2026

## 人成体干细胞来源肝脏类器官构建及技术 要求

Constructional and Technical Requirements for Human Adult Stem Cell-Derived  
Liver Organoids

2026 - 03 - 27 发布

2026 - 04 - 27 实施



## 目 次

前言 .....	III
引言 .....	IV
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 缩略语 .....	2
5 技术路线 .....	3
6 通用要求 .....	3
6.1 伦理要求 .....	3
6.2 生物安全要求 .....	3
6.3 数据要求 .....	4
6.4 质量要求 .....	4
附录 A（规范性） 人成体干细胞来源正常肝脏和肝癌类器官的构建 .....	5
A.1 概述 .....	5
A.2 仪器设备及试剂耗材 .....	5
A.2.1 仪器设备 .....	5
A.2.2 耗材 .....	5
A.2.3 试剂及培养基 .....	5
A.3 人正常肝脏和肝癌类器官制备 .....	6
A.3.1 组织样本的保存与运输 .....	6
A.3.2 组织样本的预处理 .....	6
A.3.3 组织块的清洗 .....	6
A.3.4 组织块的消化及组织细胞混悬液过滤 .....	6
A.3.5 细胞分选（可选） .....	6
A.3.6 细胞重悬及接种 .....	7
A.3.7 类器官培养 .....	7
A.3.8 类器官传代 .....	7
A.3.9 正常肝脏类器官分化 .....	7
A.4 人正常肝脏和肝癌类器官冻存和复苏 .....	8
A.4.1 类器官冻存 .....	8
A.4.2 类器官复苏 .....	8
附录 B（规范性） 人成体干细胞来源正常肝脏和肝癌类器官构建的技术要求 .....	9
B.1 概述 .....	9
B.2 细胞活性 .....	9
B.2.1 要求 .....	9
B.2.2 检测方法 .....	9
B.3 类器官光学形态学特征 .....	9

B. 3.1	要求	9
B. 3.2	检测方法	9
B. 4	类器官组织学特征	9
B. 4.1	要求	9
B. 4.2	检测方法	10
B. 5	类器官功能学	10
B. 5.1	要求	11
B. 5.2	检测方法	11
B. 6	类器官分子分型	11
B. 6.1	要求	11
B. 6.2	检测方法	11
B. 7	类器官的无菌性	11
B. 7.1	要求	11
B. 7.2	检测方法	11
B. 8	类器官的病毒携带	12
B. 8.1	要求	12
B. 8.2	检测方法	12
B. 9	遗传稳定性	12
B. 9.1	要求	12
B. 9.2	检测方法	12
	参考文献	13

## 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。

本文件由深圳市分析测试协会提出并归口。

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、深圳市前海蛇口自贸区人民医院、深圳市人民医院、深圳市第三人民医院、佛山人民医院、中山大学附属第五医院、澳门理工大学、香港大学、工大技术创新深圳有限公司、深圳深检集团医学检验实验室、黑玉星岩国际科学技术（北京）有限公司、山西白求恩医院、深圳市龙岗区人民医院、中国医学科学院北京协和医院、香港中文大学、南方科技大学医院、惠州市食品药品检验所。

本文件主要起草人：李亮、施明、石磊、杨涛、吴珺、陈俊辉、崔勇、张茹、廖启彬、李志伟、毛晓帆、严彦、李克峰、那溶、周大庆、肖伟敏、杨洋、冯慧晶、张煊、彭青、王筠、纪昕、陈山泉、毛一雷、杨华瑜、矫昕霖、林泽斌、朱文娟、黄秀丽、江冠民、杨国武。

## 引 言

近年来，组织工程与再生医学的迅猛发展，推动类器官构建技术成为模拟人体器官生理病理功能的关键环节。目前，减少动物实验，采用类器官等新型体外模型开展生命科学替代研究已成为国际共识。肝脏类器官可在体外精准重现肝脏的细胞构成、三维组织结构与生理功能特征，在肝脏发育研究、疾病模型构建及药物筛选等领域展现出巨大应用潜力。

由于相关技术的快速迭代革新，使得肝脏类器官的构建仍普遍存在着操作流程不统一、制备质量参差不齐、研究结果难以横向比对等共性问题。为此，本标准旨在建立统一规范的技术标准体系，提升肝脏类器官构建的稳定性与功能完整性，保障实验数据高质量产出，推动研发成果在细胞与基因治疗的疗效评价、药效及毒性筛选等临床前研究中的规范化应用，以长远助力肝脏疾病精准诊疗策略的创新与突破。

本文件的预期使用者主要包括从事肝脏发育与疾病机制研究的基础科研人员、开展药物筛选与毒性评价的医药研发工作者，以及致力于再生医学与细胞治疗的临床转化专家。

# 人成体干细胞来源肝脏类器官构建及技术要求

## 1 范围

本文件给出了人成体干细胞来源肝脏类器官及肝癌类器官的构建方法，并规定了相应的技术要求。本文件适用于科研机构、医疗机构等开展人成体干细胞来源的正常肝脏及肝癌类器官的构建、鉴定。本文件不适用于诱导多能干细胞来源的肝脏类器官。

## 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 19489 实验室生物安全通用要求
- GB 39707 医疗废物处理处置污染控制标准
- GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求
- GB/T 38736 人类生物样本保藏伦理要求
- WS 213 丙型肝炎诊断
- WS 293 艾滋病和艾滋病病毒感染诊断
- SZDB/Z 238 短串联重复序列基因分型法鉴定人源细胞系技术规范
- T/CSCB 0008 原代人肝细胞
- T/CHIA 21.1 组学样本处理与数据分析标准 第1部分：全基因组测序数据分析
- T/CHIA 21.3 组学样本处理与数据分析标准 第3部分：转录组样本处理
- T/CHIA 21.4 组学样本处理与数据分析标准 第4部分：转录组文库构建
- T/CHIA 21.5 组学样本处理与数据分析标准 第5部分：转录组测序数据分析
- 《中华人民共和国生物安全法》
- 《病原微生物实验室生物安全管理条例》
- 《医疗废物管理条例》
- 《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》
- 《药物临床试验质量管理规范》
- 《中华人民共和国药典》
- 《全国临床检验操作规程》

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**人正常肝脏类器官** human normal liver organoid

来自人类正常肝脏组织的成体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 organoid

来自患者肝癌组织的成体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

**支架材料** scaffold material

是指为细胞提供三维生长微环境的关键基质，为细胞提供附着点、机械支撑、生物化学信号以及必要的孔隙结构，以支持细胞的自组织、增殖、分化和极性形成。支架材料包括动物源性的基底膜基质提取物（例如 Matrigel®等）以及非动物源性的合成材料（例如螺旋聚异脲多肽水凝胶等）。

注：Matrigel®是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不代表对这一产品的认可。

### 3.4

#### 组织保存液 tissue storage medium

用于在离体状态下，于低温运输或短期储存肝脏组织的液体溶液。其主要功能是维持组织细胞的基本活性与结构完整性，减少缺血、缺氧及氧化应激对细胞造成的损伤，确保组织在后续处理中的活力与质量。

### 3.5

#### 基础培养基 basal medium

含有组织或类器官存活与代谢所必需的营养物质，不含促细胞生长的生长因子或血清的等渗溶液，是配制各类完全培养基的基础。

### 3.6

#### 正常肝脏类器官原代培养基 culture medium of primary normal liver organoid

用于从正常肝脏组织中解离的原代细胞进行第一代类器官培养的液体培养基。

### 3.7

#### 肝癌类器官培养基 liver cancer organoid medium

适用于肝癌组织来源的类器官的建立、维持和扩增的完全培养基。

### 3.8

#### 扩增培养基 expansion medium

用于正常肝脏类器官在体外第二代之后的增殖或传代培养的完全培养基。

### 3.9

#### 分化培养基 differentiation medium

诱导处于增殖状态的肝脏类器官向成熟肝类器官定向分化，并获得成熟肝脏细胞功能的专用培养基。

### 3.10

#### 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。

### 3.11

#### 冻存 cryopreservation

将类器官经低温冷冻处理后在低温环境下降低细胞代谢活性以实现长期保存的技术。

### 3.12

#### 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 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ALB: 白蛋白 (Albumin)

A83-01: 3-(6-甲基-2-吡啶基)-N-苯基-4-(4-喹啉基)-1H-吡唑-1-硫代甲酰胺  
(3-(6-methylpyridin-2-yl)-N-phenyl-4-quinolin-4-ylpyrazole-1-carbothioamide)

BMP7: 骨形态发生蛋白7 (Bone Morphogenetic Protein 7)

CYP450: 细胞色素P450酶 (Cytochrome P450)

DPBS: 杜氏磷酸盐缓冲液 (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)

EpCAM: 上皮细胞黏附分子 (Epithelial Cell Adhesion Molecule)

FGF10: 成纤维细胞生长因子10 (Fibroblast Growth Factor 10)

HGF: 肝细胞生长因子 (Hepatocyte Growth Factor)

hEGF: 人表皮生长因子 (human Epidermal Growth Factor)

NAC: N-乙酰-L-半胱氨酸 (N-Acetylcysteine)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (Phosphate-Buffered Saline)

STR：短串联重复序列（Short Tandem Repeat）

## 5 技术路线

人成体干细胞来源正常肝脏和肝癌类器官的构建流程见图1。

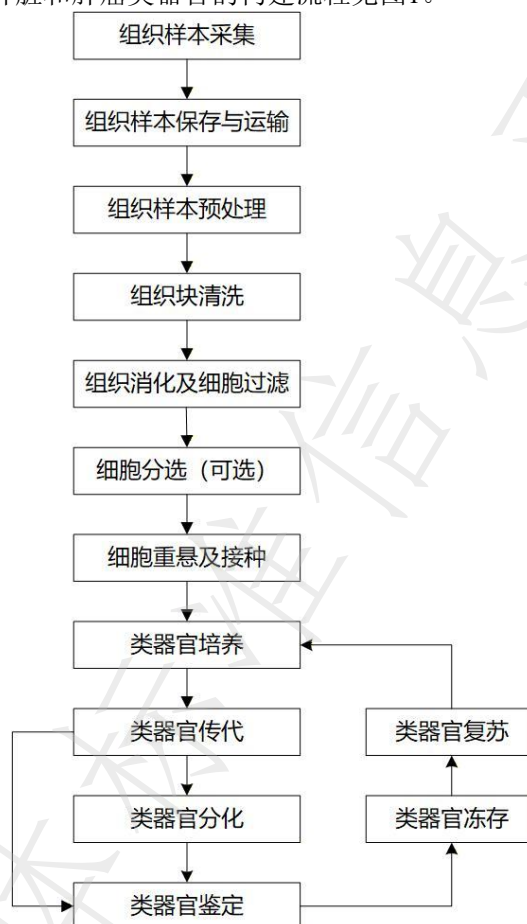


图1 人成体干细胞来源正常肝脏和肝癌类器官的构建示意图

## 6 通用要求

### 6.1 伦理要求

6.1.1 人体正常肝脏和肝癌类器官构建相关研究方案应通过伦理审查，伦理审查应遵循《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》。

6.1.2 应在样本采集前获得类器官组织/细胞源供者的书面知情同意，知情同意书应包含以下核心条款：

- a) 使用范围声明：明确类器官仅用于特定研究（应列明项目编号），禁止用于人类生殖系基因编辑等受限领域；
- b) 二次使用条款：若需用于衍生研究（如构建基因编辑模型），应重新获取伦理审批；
- c) 知识产权归属：告知供体可能产生的知识产权归属；
- d) 退出权保障：类器官细胞源供者有权在类器官使用前撤回同意，已生成类器官应在 30 d 内销毁并留存影像证据。
- e) 隐私保护：类器官细胞源供者享有个人隐私权，其个人隐私信息的保密和保护应符合 GB/T 38736 的要求。

### 6.2 生物安全要求

6.2.1 从事类器官构建及培养的机构和研究人员应遵守《中华人民共和国生物安全法》、《病原微生物

物实验室生物安全管理条例》及《实验室生物安全通用要求》（GB 19489）等相关法律法规及标准。

6.2.2 应当建立相应的生物安全管控体系及使用规范，明确生物安全责任人、管理人及各类人员的职责，严格控制直接或间接接触人类组织样本引起重大疾病传播的风险。

6.2.3 依据 GB 19489 确定生物安全等级，配置匹配的生物安全柜及二级防护设施。开展实验活动的实验室必须符合 GB 19489 的规定。实验室的生物安全防护水平应基于所操作生物因子的危害等级、实验活动类型及风险评估结果来确定。

6.2.4 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 GB 19489 相关要求，遵循《医疗废物管理条例》和 GB 39707 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。

### 6.3 数据要求

6.3.1 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。

6.3.2 详细的临床样本数据管理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》中的数据管理部分内容。

6.3.3 详细记录供体信息以及后续的培养过程和最终的鉴定结果。

6.3.4 采用 GB/T 37864 生物样本库标识系统，确保从供体组织到类器官成品的全链条可追溯。

6.3.5 类器官构建过程中产生的组学数据应符合国家基因组科学数据中心的数据要求。

### 6.4 质量要求

6.4.1 所构建的类器官特征应与来源组织相符。

6.4.2 在类器官冻存及使用之前，均须对每一批次进行质量检测。

6.4.3 类器官的质量控制包括细胞活性、类器官光镜下形态学特征、组织学特征、类器官功能和类器官分子分型指标等。类器官鉴定见附录 B。

## 附录 A (规范性)

### 人成体干细胞来源正常肝脏和肝癌类器官的构建

#### A.1 概述

本附录规定了从人成体组织中构建正常肝脏及肝癌类器官的一种方法，步骤包括类器官制备、冻存及复苏。除本附录所述构建方法外，采用其他替代方法获得的正常肝脏与肝癌类器官，只要在组织学、分子分型及功能学等关键技术指标上满足标准附录 B 的要求，均可认定为构建成功。所用培养基既可按本文件规定自行配制，也可选用具有同等功能的商业化培养基。

#### A.2 仪器设备试剂耗材

##### A.2.1 仪器设备

II级生物安全柜、低温离心机(4℃)、二氧化碳细胞培养箱、光学显微镜(配置4×、10×和20×物镜)、37℃水浴锅、37℃恒温摇床(需可达到120 rpm)、冰箱(4℃、-20℃、-80℃)、液氮罐等。

##### A.2.2 耗材

细胞培养孔板、细胞培养皿、15 mL和50 mL 无菌离心管、移液器(2 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 mL)和无菌吸头(10 μL、200 μL、1 mL)、细胞筛网(40 μm、70 μm、100 μm)、细胞冻存程序降温盒、无菌镊子、无菌眼科剪、无菌手术刀、细胞冻存盒、细胞冻存管等。

##### A.2.3 试剂及培养基

###### A.2.3.1 组织保存液

在改良型DMEM/F12培养基(Advanced DMEM/F12)中添加以下成分至终浓度: 10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, HEPES)、100 U/mL 青霉素(Penicillin)、100 μg/mL 链霉素(Streptomycin)、2.5 μg/mL 两性霉素B (Amphotericin B) 和 10 μmol/L Y-27632二盐酸盐(Y-27632 dihydrochloride)。

###### A.2.3.2 基础培养基

在改良型DMEM/F12培养基中添加以下成分至终浓度: 1×谷氨酰胺(Gluta-MAX)、10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸以及100 U/mL 青霉素和100 μg/mL 链霉素。

###### A.2.3.3 染色缓冲液

在DPBS中添加牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA) 10 mg/mL。

###### A.2.3.4 正常肝脏类器官原代培养基

在基础培养基中添加以下成分至终浓度: 1×B27添加剂(不含维生素A)(B27 Supplement minus Vitamin A)、1×N2添加剂(N2 Supplement)、1.25 mmol/L NAC、10% R-脊椎蛋白1条件培养基((R-spondin 1 conditioned medium)、10 mmol/L 烟酰胺(Nicotinamide)、10 nmol/L 胃泌素(Gastrin)、50 ng/mL hEGF、100 ng/mL FGF10、25 ng/mL HGF、10 μmol/L 毛喉素(Forskolin)、5 μmol/L A83-01、30% Wnt3a条件培养基(Wnt3a conditioned medium)、25 ng/mL 人头蛋白(human Noggin)以及 10 μmol/L Y-27632二盐酸盐。

###### A.2.3.5 肝癌类器官培养基

在基础培养基中添加以下成分至终浓度: 1×B27添加剂(不含维生素A)、1× N2添加剂、1 mmol/L NAC、10% R-脊椎蛋白1条件培养基、10 mmol/L 烟酰胺、10 nmol/L 胃泌素、50 ng/mL hEGF、100 ng/mL FGF10、25 ng/mL HGF、10 μmol/L 毛喉素和5 μmol/L A83-01。

###### A.2.3.6 扩增培养基

在基础培养基中添加以下成分至终浓度：1×B27添加剂(不含维生素A)、1×N2添加剂、1.25 mmol/L NAC、10% R-脊椎蛋白1条件培养基、10 mmol/L 烟酰胺、10 nmol/L 胃泌素、50 ng/mL hEGF、100 ng/mL FGF10、25 ng/mL HGF、10 μmol/L 毛喉素、5 μmol/L A83-01。

#### A. 2. 3. 7 分化培养基

在基础培养基中添加以下成分至终浓度：1×B27添加剂(不含维生素A)、1×N2添加剂、1.25 mmol/L NAC、10 nmol/L 胃泌素、25 ng/mL HGF、0.5 μmol/L A83-01、25 ng/mL BMP7、3 μmol/L 地塞米松(Dexamethasone)、10 μmol/L γ-分泌酶抑制剂 N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰基]-S-苯基甘氨酸叔丁酯(N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester, DAPT)和100 ng/ml 成纤维细胞生长因子19(Fibroblast Growth Factor 19, FGF19)。

### A. 3 人正常肝脏和肝癌类器官制备

#### A. 3. 1 组织样本的保存与运输

采集的组织样本在运输过程中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。

#### A. 3. 2 组织样本的预处理

组织离体后48 h 内进行处理。利用眼科剪和镊子去除非上皮成分，包括肌肉和脂肪组织。对于肝脏组织样本，去除明显坏死的组织成分。

#### A. 3. 3 组织块的清洗

将上述预处理后的组织样本转移至50 mL 离心管中，用含有100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和2.5 μg/mL 两性霉素的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. 3. 4 组织块的消化及组织细胞混悬液过滤

将组织样本转移至适当大小的细胞培养皿中(根据组织块大小选择，以操作便利为宜)，使用手术剪或手术刀将组织样本剪碎呈现肉糜状态。根据组织量加入大于10倍于组织块体积的MCE组织消化液(Tissue Dissociation Solution)(总体积需≥10 mL)，置于37℃ 恒温摇床中消化。每10 min ~15 min 混合1次并观察消化情况，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。在4℃，以200×g 离心5 min，弃上清，保留沉淀置于冰上。将沉淀重悬于基础培养基中，并用70 μm 或者100 μm 细胞滤网过滤。在4℃，以200×g 离心5 min，弃上清，保留沉淀置于冰上。使用适量预冷的DPBS重悬沉淀(具体体积根据沉淀量调整，使细胞浓度便于计数)，使用台盼蓝染色，计数并记录消化后的细胞存活率。

#### A. 3. 5 细胞分选(可选)

将制备好的单细胞悬液在4℃，以200×g 离心5 min，弃上清，加入预冷的染色缓冲液重悬，调整细胞浓度至 $1 \times 10^7$  cells/mL。每100 μL细胞悬液，加入5 μL BeyoRCTM FcR封闭剂，涡旋混匀后于冰上孵育10 min ~15 min。随后加入1 μL BD 565388 Horizon™ Fixable Viability Stain 780染料，涡旋混匀后避光在冰上孵育15 min。在4℃，350×g 离心5 min，弃上清后加入1 mL 预冷的染色液清洗一次，涡旋混匀后在4℃，350×g 离心5 min，弃上清，用100 μL 清洗液重悬细胞。按照1:400稀释比用染色缓冲液配制Proteintech 抗EpCAM抗体(21050-1-AP)工作液。取100 μL 工作液加入细胞悬液中，吹打混匀后避光在冰上孵育30 min。孵育后加入1 mL 染色缓冲液，混匀后在4℃，350×g 离心5 min，弃上清并重复清洗一次。按照1:1000稀释比用染色缓冲液配制Thermo Fisher A-11005 Alexa Fluor 594荧光二抗工作液，取100 μL 工作液加入细胞沉淀中，吹打重悬后避光在冰上孵育30 min。孵育后加入1 mL 染色缓冲液，混匀后在4℃，350×g 离心5 min，弃上清，加入500 μL 染色缓冲液重悬细胞，并通过40 μm 细胞筛过滤至流式上样管中，立即进行分选。根据流式分选仪使用说明和所选抗体的荧光特性进行分选，分选活细胞且EpCAM阳性细胞。分选结束后，在4℃，300×g 离心5 min，弃上清，加入500 μL 基础培养基重悬，并进行细胞计数和存活率复测。

注：MCE组织消化液、BeyoRCTM FcR封闭剂、BD 565388 Horizon™ Fixable Viability Stain 780染料、Proteintech 抗EpCAM抗体(21050-1-AP)和Thermo Fisher A-11005 Alexa Fluor 594荧光二抗是适合的市售产品的实例。给

出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不代表对这一产品的认可。

### A.3.6 细胞重悬及接种

细胞存活率检测合格后在4℃，300×g离心5 min，弃上清，使用支架材料重悬正常肝脏或肝癌细胞沉淀并接种到培养板。以基质胶为例，以20 μL的基质胶为一个胶滴，每胶滴中细胞数为1×10<sup>5</sup>~5×10<sup>5</sup>个接种于细胞培养板中。于37℃、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中孵育30 min，使基质胶凝固。

### A.3.7 类器官培养

#### A.3.7.1 原代正常肝脏组织类器官培养

正常肝脏组织解离后的原代细胞接种到孔板后，根据培养板尺寸，加入合适体积的正常肝脏类器官原代培养基（A.2.3.4）进行培养。例如，6孔板添加2.5 mL~3 mL培养基。每2 d更换一次培养基。通常7 d~10 d内可观察到类器官形成，该时间段可能因个体差异而有所不同。

#### A.3.7.2 肝癌原代类器官培养

肝癌组织解离后的原代细胞接种到孔板后，加入肝癌类器官培养基（A.2.3.5）进行培养，每3 d更换一次培养基。通常7 d~14 d内可观察到类器官形成，该时间段可能因个体差异而有所不同。

### A.3.8 类器官传代

#### A.3.8.1 正常肝脏类器官传代

待原代类器官或扩增期类器官平均直径为150 μm~350 μm时进行传代。吸弃原培养基，加入等体积4℃预冷的基础培养基，用移液枪反复吹打基质胶包埋的类器官，随后转移至15 mL离心管中（每管最多收集6个胶滴），吹打10次~15次使类器官和基质胶分离，补充基础培养基至10 mL体积，在4℃，以300×g~400×g离心5 min收集沉淀。加入3 mL基础培养基，吹打10次~15次后取10 μL混合液镜检，观察类器官是否机械解离为10个~15个细胞大小的片段，若否，则重复吹打，直至类器官充分分散，补充基础培养基至10 mL体积，在4℃，以300×g~400×g离心5 min收集沉淀。

向细胞沉淀中加入基质胶重悬混匀重新接种于培养板，固化基质胶等操作同原代类器官培养步骤（A.3.6）。待基质胶凝固后，加入扩增培养基进行培养，每2 d更换一次培养基。通常4 d~6 d内可观察到类器官形成，该时间段可能因个体差异而有所不同。正常肝脏扩增期类器官体外连续传代次数建议控制在10代以内。建议使用第3至第10代的类器官进行后续应用实验。

#### A.3.8.2 肝癌类器官传代

待原代类器官或扩增培养的类器官平均直径为50 μm~100 μm时进行传代。吸弃原培养基，加入大于10倍基质胶体积的1×TrypLE™ Express酶，吹打后转移至15 mL离心管中（每管最多收集6个胶滴）置于37℃水浴锅中消化。每2 min~3 min取出，吹打混匀后取10 μL混合液镜检，观察类器官是否解离为5个~10个细胞大小的细胞团或单个细胞，若否，则继续消化。消化完成后补充基础培养基至10 mL体积，轻柔吹打混匀终止消化，在4℃，以250×g离心3 min收集沉淀。继续用基础培养基清洗3次（每次至少使用2 mL基础培养基）以去除残留消化液。

清洗完成后向细胞沉淀中加入基质胶重悬混匀重新接种于培养板，固化基质胶等操作同原代类器官培养步骤（A.3.6）。待基质胶凝固后，加入肝癌类器官培养基进行培养，每3 d更换一次培养基。通常6 d~8 d内可观察到类器官形成，该时间段可能因个体差异而有所不同。肝癌类器官体外连续传代次数建议控制在10代以内。建议使用第3至第10代的类器官进行后续应用实验。

注：TrypLE™ Express酶是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不代表对这一产品的认可。

### A.3.9 正常肝脏类器官分化

正常肝脏扩增期类器官平均直径为150 μm~350 μm时可进行分化。在分化前一代细胞的扩增培养基中补充终浓度为25 ng/mL BMP7，以助于肝类器官功能蛋白的表达。吸弃原培养基，加入与原培养基体积相同的分化培养基（A.2.3.7）继续培养。每2 d更换一次培养基，通常5 d~8 d内可观察到类器官分化成熟，该时间段可能因个体差异而有所不同。

#### A.4 人正常肝脏和肝癌类器官冻存和复苏

##### A.4.1 类器官冻存

细胞冻存程序降温盒温度平衡至室温。将待冻存的类器官通过机械吹打或酶消化解离为细胞团，操作同类器官传代（A.3.8）。清洗完成后向细胞沉淀中添加适当体积预冷的MCE干细胞冻存液使细胞密度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞/mL，吹打混匀后按0.5 mL~1 mL体积分装至细胞冻存管中。细胞冻存管应提前做好标记，记录信息包括但不限于类器官编号、类器官种类、代次、细胞数、日期、操作人等。

将细胞冻存管放入程序降温盒中，置于-80℃保存24 h至温度稳定后，将细胞冻存管转移至液氮罐中长期保存。

注：MCE干细胞冻存液是适合的市售产品的实例。给出这一信息是为了方便本文件的使用者，并不代表对这一产品的认可。

##### A.4.2 类器官复苏

提前准备37℃预热的扩增培养基和冰上解冻的基质胶。将冻存管从液氮罐中取出后，立即放入37℃水浴中，轻轻摇动冻存管，快速解冻；将融化后的类器官-冻存液悬液转移至15 mL离心管，逐滴加入等体积预热的扩增培养基，继续补充培养基使冻存液总量低于10%，在室温下，以 $250 \times g$ 离心3 min收集沉淀置于冰上，用基质胶重悬后接种于孔板中，固化基质胶、加入培养基等操作同类器官传代步骤（A.3.8）。类器官复苏后前3 d使用正常肝脏类器官原代培养基，3 d后更换为扩增培养基。

## 附录 B (规范性)

### 人成体干细胞来源正常肝脏和肝癌类器官构建的技术要求

#### B.1 概述

本附录规定了人成体干细胞来源正常肝脏和肝癌类器官构建的技术要求,包括了细胞活性、形态学特征、组织学特征、功能学、分子分型、无菌性、病毒携带以及遗传稳定性的要求和检测方法。

#### B.2 细胞活性

##### B.2.1 要求

组织清洗解离后用于类器官培养的活细胞比率应大于 90%。若低于此数值,则需要进行细胞筛选。细胞存活率进行计数时,重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值,不得超过算术平均值的 20%。

##### B.2.2 检测方法

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。在组织解离并清洗后,取细胞悬液按 1:1 的体积比,将台盼蓝染液(用磷酸盐缓冲液稀释至 0.4% 质量浓度)进行染色,染色后的细胞转移至血球计数板使用光学显微镜计数手动计数,或者使用细胞计数仪计数。

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。

#### B.3 类器官光学形态学特征

##### B.3.1 要求

在基质胶中培养,其形态应满足如下要求:人成体干细胞来源正常肝脏扩增期上皮类器官在基质胶呈囊状结构,分化后正常肝脏类器官壁增厚且出现清晰的多角形肝上皮样细胞结构。肝癌类器官呈实心状,直径大小不一。形态特点可参考图 B.1。

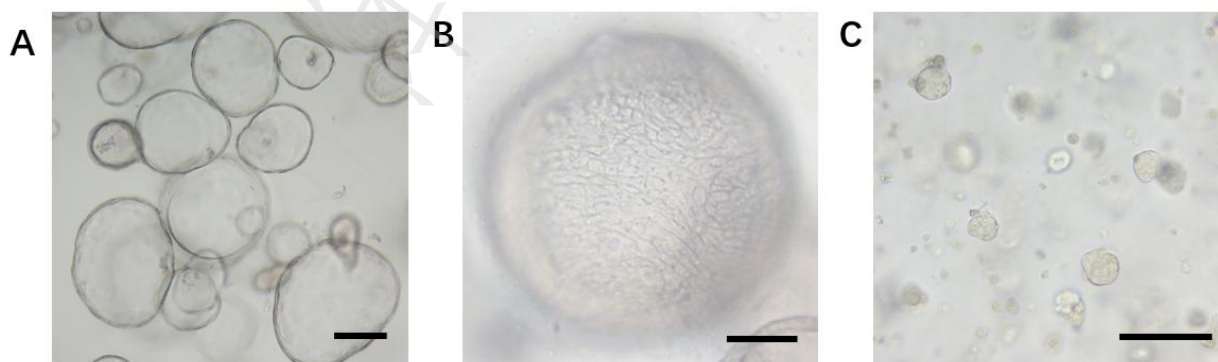


图 B.1 基质胶内正常肝脏类器官及肝癌类器官形态学特点

<sup>a</sup> (A) 扩增期正常肝脏类器官形态举例; (B) 分化成熟正常肝脏类器官形态举例; (C) 肝癌类器官形态举例。比例尺: 50 μm。

##### B.3.2 检测方法

使用倒置显微镜进行形态学观察及记录,从培养第二天起对培养物记录包括结构特征及直径范围等信息。

#### B.4 类器官组织学特征

##### B.4.1 要求

根据类器官所处的不同培养阶段,采用免疫组化或免疫荧光法检测时,类器官应呈现以下染色特征:处于增殖期的正常肝脏类器官中,角蛋白7(Keratin 7, KRT7)、角蛋白19(Keratin 19, KRT19)、Y染色体性别决定区-盒转录因子9(Sex-determining region of Y chromosome (SRY)-Box Transcription Factor 9, SOX9)、富含亮氨酸重复序列的G蛋白偶联受体5(Leucine-Rich Repeat-Containing G-Protein Coupled Receptor 5, LGR5)、细胞增殖标志物Ki-67(Proliferation Marker Protein Ki-67, Ki67)及EpCAM中至少两项标志物呈阳性;分化成熟的正常肝脏类器官标志物ALB、肝细胞核因子4 $\alpha$ (Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha, HNF4 $\alpha$ )染色应均呈阳性。肝癌类器官标志物染色情况应与来源组织相符。

## B. 4. 2 检测方法

### B. 4. 2. 1 样品准备

从来源组织中选取1块~2块具代表性组织块,置入包埋盒,用组织固定液固定后,经组织脱水仪进行脱水处理。收集培养的正常肝脏类器官及肝癌类器官,用4%多聚甲醛室温固定30 min,随后加入50℃~60℃预热的2%~3%液态琼脂糖进行预包埋,待琼脂糖室温凝固后,将包埋块转移至包埋盒中,使用组织脱水仪进行脱水处理。脱水程序:依次经梯度乙醇(70%、80%、90%、100%)处理,每个梯度30 min;再用100%乙醇处理30 min;随后使用二甲苯透明30 min;透明后的组织浸入液态石蜡三次,每次处理1 h。完成浸蜡后,从脱水仪取出组织,进行石蜡包埋,制作组织及类器官切片,切片厚度为3  $\mu\text{m}$ ~5  $\mu\text{m}$ 。

### B. 4. 2. 2 免疫组化检测

- 将切片置于烘片机上烘烤,增加黏附性,防止在后续染色过程中脱片。随后依次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3 min,再置于超纯水中3 min,使组织细胞间的石蜡完全置换为水。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。冷却后,将切片转移至装有0.3%聚乙二醇叔辛基苯基醚(Triton X-100)PBS溶液的染缸中,浸泡20 min,随后用PBS浸洗3次,每次5 min。
- 在清洗后的切片中滴加含有5%山羊血清的PBS,滴加体积能覆盖样本面积为宜(约40  $\mu\text{L}$ ),封闭30 min~60 min;随后吸去山羊血清,滴加用封闭液稀释的一抗(浓度根据不同抗体而定,依据抗体说明书配置),以覆盖类器官为宜(约40  $\mu\text{L}$ ),置于4℃孵育过夜;完成一抗孵育后吸去一抗,将切片再次放入染缸中,用PBS浸洗切片3次,每次5 min。
- 加反应增强液,覆盖类器官为宜(约40  $\mu\text{L}$ ),室温孵育20 min后吸去反应增强液,将切片再次放入染缸中,用PBS浸洗切片浸洗3次,每次5 min。
- 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40  $\mu\text{L}$ ),室温孵育1 h;随后弃除二抗,滴加3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine, DAB)反应液,覆盖类器官为宜(约40  $\mu\text{L}$ )。当类器官呈棕色后迅速放入流水下冲洗3 min左右;加苏木精染料进行细胞核染色,约10 s,在流水下冲洗5 min~10 min;最后将切片放入1%盐酸酒精溶液分化约1 min,流水冲洗后,再用0.1%碳酸氢钠水溶液返蓝1 min,继续用流水冲洗1 min。
- 流水下冲洗后,依次浸泡于95%乙醇、100%乙醇、二甲苯中,每次3 min,每个梯度重复3次;随后用中性树脂封片,并在显微镜下观察拍照,分析染色结果。

### B. 4. 2. 3 免疫荧光检测

- 常规脱蜡复水,抗原修复以及一抗孵育并清洗(B. 4. 2. 2中a-b)。
- 选择对应一抗的荧光二抗试剂,按说明稀释并滴加于类器官上,覆盖类器官为宜(约40  $\mu\text{L}$ ),室温孵育1 h;随后吸去二抗,将切片再次放入染缸中,用PBS浸洗切片3次,每次5 min;清洗完成后,滴加带有细胞核染料的封片剂,加盖盖玻片封片;最后使用荧光成像设备(例如荧光显微镜、共聚焦显微镜、高内涵显微镜、荧光全景扫描片仪等)观察拍照,分析染色结果。

## B. 5 类器官功能学

### B.5.1 要求

分化后的正常肝脏类器官中ALB阳性的细胞应不少于总细胞数量 50%。分化后的正常肝脏类器官的CYP450酶活性应可检测到对非那西汀、睾酮和安非他酮其中一种或多种底物的代谢产物。分化后的正常肝脏类器官过碘酸雪夫染色（Periodic Acid-Schiff staining, PAS）染色应为阳性。

### B.5.2 检测方法

#### B.5.2.1 ALB 阳性细胞检测方法

选用以下任意一种方法：

- a) 按照 B.4.2.2 或 B.4.2.3 中描述的方法对切片进行免疫组化或免疫荧光染色，选取每个样本的五个非连续切片进行全片扫描，定量统计 ALB 阳性细胞的比例。
- b) 采用流式细胞术参照 T/CSCB 0008 中方法分析 ALB 阳性细胞比例。

#### B.5.2.2 药物代谢酶功能检测

使用预冷的PBS将肝类器官从基质胶中分离，随后用含有1 μmol/L 的底物（非那西汀、睾酮和安非他酮其中一种或多种）的肝脏类器官培养基混匀后，立即取100 μL 细胞悬液与300 μL 冰乙腈混合，即为0 h 时间点。其余样本放在置于细胞培养箱中孵育，期间每隔0.5 h 轻轻摇晃培养物使试剂充分混匀。随后，分别在0.5 h, 2 h 和4 h 进行取样，取100 μL 细胞悬液与300 μL 冰乙腈混合，终止反应。同时时间点设置无类器官组为阴性对照。终止反应后的样本涡旋混匀，离心后取上清150 μL 参照T/CSCB 0008中方法进行液相串联质谱分析。

#### B.5.2.3 糖原储存功能检测

常规脱蜡复水 (B.4.2.2 A)后，根据试剂盒说明书完成染色。一般步骤为：滴加阿利新蓝染色液孵育20 min~30 min并流水冲洗5 min；随后放入氧化剂中氧化5 min，用流水冲洗1min后使用纯水浸洗2次，每次5 min。随后使用Schiff染色液浸染15 min，流水冲洗10 min；再用苏木素染色液染色5 min，流水冲洗5 min；使用分化液分化水洗后，用Scott蓝化液返蓝3 min，流水冲洗3 min。最后常规乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封固 (B.4.2.2 E) 后记录分析结果。

## B.6 类器官分子分型

### B.6.1 要求

患者来源的类器官最重要的优势是保留供体的分子和功能特征。而由于类器官的分子谱在体外扩增培养过程中可能会发生变化，因此应在类器官的不同培养阶段表征其分子谱，例如类器官构建之初、冻存之前、复苏之后以及应用之前。并对检测信息进行详细记录，包括但不限于样本处理流程、参数选择等。

### B.6.2 检测方法

对原代组织和所构建类器官进行分子谱的检测包括但不限于基因组、转录组、表观组、蛋白组等数据信息。检测方法参考《T/CHIA 21.1 组学样本处理与数据分析标准 第1部分：全基因组测序数据分析》、《T/CHIA 21.3 组学样本处理与数据分析标准 第3部分：转录组样本处理》、《T/CHIA 21.4 组学样本处理与数据分析标准 第4部分：转录组文库构建》、《T/CHIA 21.5 组学样本处理与数据分析标准 第5部分：转录组测序数据分析》以及《中华人民共和国药典》中“9024蛋白质组学分析方法及应用指导原则”进行检测。

## B.7 类器官的无菌性

### B.7.1 要求

真菌、细菌、支原体检测结果均应为阴性。

### B.7.2 检测方法

按照《中华人民共和国药典》中“1101无菌检查法”项，对真菌和细菌进行检测。按照《中华人民共和国药典》中“3301支原体检测法”项，对支原体进行检测。

## B.8 类器官的病毒携带

### B.8.1 要求

由于原代组织病毒含量各异，应对原代组织及其构建的类器官均按照检验方法进行病毒检测，并详细记录结果。类器官的病毒检测结果应为阴性，或与原代组织一致。

### B.8.2 检测方法

按照WS293核酸法对人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)进行检测。按照《全国临床检验操作规程》核酸法对甲型肝炎病毒(Hepatitis A Virus, HAV)和乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)进行检测。按照WS213核酸法对丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus, HCV)进行检测。

## B.9 遗传稳定性

### B.9.1 要求

所构建类器官染色体核型应与来源组织相同，正常核型为46, XY或46, XX。所构建类器官STR基因分型应与其对应原始组织STR基因分型数据匹配率 $\geq 80\%$ ，且无样本间交叉污染。

### B.9.2 检测方法

按照《中华人民共和国药典》中“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”检测进行染色体核型检测。按照SZDB/Z 238《短串联重复序列基因分型法鉴定人源细胞系技术规范》进行STR检测。

## 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.
- [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, Versteegen 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.
- [9] Broutier L, Andersson-Rolf A, Hindley CJ, Boj SF, Clevers H, Koo BK, et al. Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat Protoc*. 2016;11(9):1724-43.
- [10] Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Hamer K, Blokzijl F, Versteegen Monique MA, et al. Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver. *Cell*. 2015;160(1):299-312.
- [11] Rimland CA, Tilson SG, Morell CM, Tomaz RA, Lu WY, Adams SE, et al. Regional Differences in Human Biliary Tissues and Corresponding In Vitro-Derived Organoids. *Hepatology*. 2021;73(1):247-267
- [12] Mun SJ, Ryu J-S, Lee M-O, Son YS, Oh SJ, Cho H-S, et al. Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids. *Journal of hepatology*. 2019;71(5):970-85.
- [13] Marsee A, Roos FJM, Versteegen MMA, Marsee A, Roos F, Versteegen M, et al. Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids. *Cell Stem Cell*. 2021;28(5):816-32.
-