

类胚胎模型及其构建方法和用途

5 技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体地，本发明涉及一种类胚胎模型及其构建方法和用途，更具体地，本发明涉及一种干细胞体内、体外构建类胚胎模型的方法。

背景技术

10 在人的早期胚胎发育中，主要经历了从受精卵发育，到桑葚胚、囊胚、原肠运动、神经形成和器官发生的阶段。由于伦理问题和人类组织材料的难获得，很多发育阶段，比如原肠形成，仍然是人类发育中非常神秘的阶段。我们对发育的了解大多来源于小鼠等模式生物，而小鼠和人在早期胚胎上存在很大差异。比如在形态上，小鼠胚胎着床后，上胚层会形成杯状的结构，而人类胚胎则会形成双层的盘状结构。所以难以将其他物种的研究结果直接推导于人类本身。除了模式动物，基于人类干细胞的胚胎模型，
15 也是研究人类早期胚胎发育的重要工具。相比于人类胚胎，使用人类干细胞胚胎模型用于研究胚胎发育还可以进行基因编辑。

选择合适的体外胚胎模型进行研究，对于理解人类胚胎发育及相关疾病机制有很大的帮助。然而，目前的体外胚胎模型，尤其是模拟原肠胚时期的模型（如类原肠胚），由于其细胞类型少，只能有限地模拟胚胎发育中的关键事件，而不能真实地反应出其他事件。

20 因此，构建能够高效模拟胚胎复杂度的模型至关重要。

发明内容

本发明旨在开发一种可扩展、无需细胞因子、无需小分子通路干扰因子、单一起始细胞类型生成包括胚胎内和胚胎外组织的三维细胞聚集体的方法。

25 为此，本发明定义了一种由人多能干细胞/全能性细胞分化得到的包括胚胎内和胚胎外组织的三维细胞聚集体。发明人发现，该类胚胎组织包括了内胚层细胞及其衍生物、中胚层细胞及其衍生物、外胚层细胞及其衍生物；胚外组织包括了卵黄囊内胚层细胞及其衍生物、卵黄囊间皮细胞及其衍生物、胚外中胚层细胞及其衍生物、羊膜细胞及其衍生物。该模型细胞类型和人原肠运动时期细胞类型高度相似，可作为研究胚胎发育相关疾病的模型。

30 因此，在本发明的一个方面，提出了一种类胚胎模型的构建方法。根据本发明的实施例，所述方法包括：将原始态干细胞进行体外培养或将所述原始态干细胞注射到免疫缺陷动物体内分化，得到所述类胚胎模型。发明人发现采用此方法在制备类胚胎模型的过程中，无需添加细胞因子和小分子通路抑制剂或激活剂、且不需要进行基因编辑并且只采用单一起始细胞类型，该方法具有简单、重复性高、更有利于在大规模中应用的优点，且其制备得到的类胚胎模型为具有多谱系细胞类型的 3D 类胚胎模型，即具有除滋养外胚层外的所有胚胎外细胞谱系和所有胚胎内细胞谱系，能够模拟卡耐基 3 期的植入后胚胎到
35 卡耐基 9 期的神经胚的整个发育过程，从而可用于制备多种祖细胞谱系、疾病建模、药物筛选和科学研究等用途。

需要说明的是，本申请所述的“原始态干细胞（naïve PSCs）”是指多能干细胞的一种细胞状态。在体外培养中，多能干细胞至少存在两种以上完全不同的状态，原始态(naïve)和始发态(primed)，
40 这两种状态都能分化为胚胎内的三个胚层，即内胚层、中胚层和外胚层。根据本申请的实施例，本申请所使用的起始细胞为 naïve 态干细胞（人原始态细胞），根据本申请实施例的原始态细胞最接近内细胞团，具有分化为上胚层（之后发育为内中外三胚层）和下胚层（之后发育为完整卵黄囊）的潜能。

根据本发明的实施例，所述方法进一步包括如下附加技术特征的至少之一：

根据本发明的实施例，所述体外培养包括：将所述原始态干细胞在第一培养基和第二培养基中进行
45 第一培养处理，得到第一细胞群；将所述第一细胞群在第三培养基中进行第二培养处理，得到第二细胞群；将所述第二细胞群在第四培养基和第五培养基中进行第三培养处理，得到所述类胚胎模型。在不同

阶段采用的不同培养基都不需要添加细胞因子和小分子通路干扰因子，细胞在培养过程中处于自然分化状态，原始态干细胞无需人为干预诱导即可在培养过程中自发分化形成上胚层细胞和下胚层细胞，且不同阶段采用不同培养基培养制备能够得到胚胎外谱系较全的类胚胎模型，能够模拟胚胎发育（尤其是人原肠运动时期）、疾病建模、药物筛选和科学研究等用途。

5 根据本发明的实施例，将所述原始态干细胞预先进行预培养处理，所述预培养处理后的所述原始态干细胞在培养皿中覆盖度为 70~80%。

根据本发明的实施例，将预培养处理后的所述原始态干细胞进行消化处理。

根据本发明的实施例，所述消化处理是在 TrypLE™ Express 酶存在的条件下进行的。

需要说明的是，所述“TrypLE™ Express 酶”是一种商品酶，其可购买后直接使用，也可使用 EDTA 溶液对其进行稀释处理后使用。对其进行稀释处理时，TrypLE™ Express 酶与浓度为 0.3~0.7mM 的 EDTA 溶液的体积比为 1:(0.8~1.2)。

根据本发明的实施例，所述第一培养基包含人始发态多能干细胞完全培养基，盘尼西林-链霉素和 Rock 通路抑制剂。

需要说明的是，本发明所述的“人始发态多能干细胞完全培养基”可以选自 mTeSR 或其他等效培养基，其能够用于培养人始发态多能干细胞即可。

根据本发明的实施例，所述第二培养基包含人始发态多能干细胞完全培养基和盘尼西林-链霉素。所述培养基成分均为基础成分，不需要添加细胞因子和小分子通路干扰因子，细胞在培养过程中处于自然分化状态，原始态干细胞无需人为干预诱导即可在培养过程中自发分化形成上胚层细胞和下胚层细胞。

根据本发明的实施例，所述盘尼西林-链霉素在所述第一培养基或所述第二培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。

根据本发明的实施例，所述 Rock 通路抑制剂包括 Y27632。

根据本发明的实施例，所述 Y27632 在所述第一培养基中的终浓度为 45~55 μ M。

根据本发明的实施例，所述第一培养处理是在低吸附圆底 96 孔板、3D 支架或微流控装置中进行的。

根据本发明的实施例，所述第一培养处理的时间为 5~7 天。

25 根据本发明的具体实施例，所述第一培养处理的时间为 5 天。

根据本发明的实施例，所述第一培养处理包括第一阶段培养处理和第二阶段培养处理，所述第一阶段培养处理是在所述第一培养基中进行的，所述第二阶段培养处理是在所述第二培养基中进行的。

根据本发明的实施例，所述第一阶段培养处理的时间为 3 天。

根据本发明的实施例，将所述原始态干细胞在所述第一培养基中进行第一阶段培养处理 1 天后，更换所述第一培养基，继续将所述原始态干细胞在所述第一培养基中进行第一阶段培养处理 2 天。

根据本发明的实施例，所述第二阶段培养处理的时间为 2~4 天。

根据本发明的实施例，所述第二阶段培养处理的时间为 2 天。

根据本发明的实施例，所述第三培养基包含 DMEM-F12 基础培养基、N2 补充物、谷氨酰胺酶、非必需氨基酸、肝素和盘尼西林-链霉素。所述培养基成分均为基础成分，不需要添加细胞因子和小分子通路干扰因子，细胞在培养过程中处于自然分化状态，始发态干细胞无需人为干预诱导即可在培养过程中自发自然分化形成上胚层细胞和下胚层细胞。

根据本发明的实施例，所述 N2 补充物在所述第三培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。

根据本发明的实施例，所述谷氨酰胺酶在所述第三培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。

根据本发明的实施例，所述非必需氨基酸在所述第三培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。

40 根据本发明的实施例，所述肝素在所述第三培养基中的终浓度为 0.5~1.5 μ g/mL。

根据本发明的实施例，所述盘尼西林-链霉素在所述第三培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。

根据本发明的实施例，所述第二培养处理的时间为 3~5 天。

根据本发明的实施例，在进行所述第三培养处理之前，将所述第二细胞群与基质胶混合。

根据本发明的实施例，所述基质胶的体积与所述第二细胞群数量的比例为 30 μ L 基质胶：1 个第二细胞群。

需要说明的是，所述“第二细胞群”指代为已成型的组织块，即类胚胎模型，即所述基质胶的体积与所述类胚胎模型数量的比例为 30 μ L 基质胶/1 个类胚胎模型（EB/embryoid）。

根据本发明的实施例,所述第四培养基包含 DMEM-F12 基础培养基、神经基础培养基、N2 补充物、谷氨酰胺酶、非必需氨基酸、胰岛素、 β 巯基乙醇、盘尼西林-链霉素和不含有维生素 A 的 B27 补充物。所述培养基只包含营养补充物,但无血清、无细胞因子,因此细胞仍然处于自然分化状态。

5 根据本发明的实施例,所述第五培养基包含 DMEM-F12 基础培养基、神经基础培养基、N2 补充物、谷氨酰胺酶、非必需氨基酸、胰岛素、 β 巯基乙醇、盘尼西林-链霉素和含有维生素 A 的 B27 补充物。所述培养基只包含营养补充物,但无血清、无细胞因子,因此细胞仍然处于自然分化状态。

根据本发明的实施例,所述 DMEM-F12 基础培养基与神经基础培养基的体积比为 1:(0.8~1.2)。

根据本发明的实施例,所述 N2 补充物在所述第四培养基或所述第五培养基中的质量体积分数为 0.2~0.7%。

10 根据本发明的实施例,所述谷氨酰胺酶在所述第四培养基或所述第五培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。

根据本发明的实施例,所述非必需氨基酸在所述第四培养基或所述第五培养基中的质量体积分数为 0.2~0.7%。

根据本发明的实施例,所述胰岛素在所述第四培养基或所述第五培养基中的终浓度为 1~1.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

15 根据本发明的实施例,所述 β 巯基乙醇在所述第四培养基或所述第五培养基中的终浓度为 0.1~0.25 μM 。

根据本发明的实施例,所述盘尼西林-链霉素在所述第四培养基或所述第五培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。

20 根据本发明的实施例,所述不含有维生素 A 的 B27 补充物在所述第四培养基中的质量体积分数为 0.2~0.7%。

根据本发明的实施例,所述含有维生素 A 的 B27 补充物在所述第五培养基中的质量体积分数为 0.2~0.7%。

根据本发明的实施例,所述第三培养处理包括第三阶段培养处理和第四阶段培养处理,所述第三阶段培养处理是在第四培养基中进行的,所述第四阶段培养处理是在第五培养基中进行的。

25 根据本发明的实施例,所述第三阶段培养处理的时间为 3~5 天。

根据本发明的具体实施例,所述第三阶段培养处理的时间为 4 天。

根据本发明的实施例,所述第四阶段培养处理的时间为 13~18 天。

根据本发明的具体实施例,所述第四阶段培养处理的时间为 16 天。

根据本发明的实施例,所述第四阶段培养处理是在摇床上进行的。

30 根据本发明的实施例,所述摇床的转速为 60~80 RPM。

根据本发明的实施例,将所述原始态干细胞注射到免疫缺陷动物体内分化之前,将所述原始态干细胞与含有基质胶的 DMEM-F12 基础培养基进行混合。

根据本发明的实施例,所述 DMEM-F12 基础培养基与所述基质胶的体积比为 1:(0.8~1.2)。

35 根据本发明的实施例,所述原始态干细胞的数量与所述含有基质胶的 DMEM-F12 的体积的比例为 5^4 个:(0.8~1.2) μL 。

根据本发明的实施例,所述动物选自但不限于免疫缺陷鼠、免疫缺陷兔、免疫缺陷牛、免疫缺陷猪或免疫缺陷猴。

根据本发明的实施例,所述原始态干细胞选自但不限于多能干细胞、全能干细胞、原始内胚层细胞和滋养外胚层细胞的至少之一。

40 根据本发明的实施例,所述原始态干细胞的来源选自但不限于人、牛、猴、猪或小鼠。

根据本发明的实施例,所述注射选自皮下注射。

根据本发明的实施例,所述体内分化时间为 13~70 天。

45 根据本发明的实施例,所述原始态干细胞是通过如下方法培养获得的:将始发态干细胞在第六培养基中进行第四培养处理,得到第四细胞群;将所述第四细胞群在第七培养基中进行第五培养处理,得到第五细胞群;将所述第五细胞群在第八培养基中进行第六培养处理,得到所述原始态干细胞。在其他一些实施例中,所述原始态干细胞还可以通过其他培养基诱导获得,例如 5iLAF 培养基, PXGL 培养基,

HENSM 培养基等。通过所述方法制备得到的原始态干细胞在用于后续制备类胚胎模型的过程中，无需添加细胞因子和小分子通路干扰因子，且不需要进行基因编辑并且只采用单一起始细胞类型就能够得到胚胎外谱系较全的类胚胎模型。

- 根据本发明的实施例，所述第六培养基包括人始发态多能干细胞完全培养基和 Rock 通路抑制剂。
- 5 根据本发明的实施例，所述 Rock 通路抑制剂包括 Y27632。
- 根据本发明的实施例，所述 Y27632 在第六培养基中的终浓度为 5~15 μ M。
- 根据本发明的实施例，所述第四培养处理的时间为 20~27 小时。
- 根据本发明的实施例，所述第七培养基和所述第八培养基包含神经基础培养基、DMEM-F12 基础培养基、N2 补充物、B27 添加剂、丙酮酸钠、非必需氨基酸、谷氨酰胺酶、盘尼西林-链霉素、DZNep（组
- 10 蛋白甲基转移酶 EZH2 抑制剂）、TSA（去乙酰化酶抑制剂）、MEK 抑制剂、WNT 信号通路抑制剂、重组人白血病抑制因子、激活素 A、L-抗坏血酸和基质胶。
- 根据本发明的实施例，所述神经基础培养基和所述 DMEM-F12 基础培养基的体积比为 1:1。
- 根据本发明的实施例，所述 N2 补充物在所述第七培养基或第八培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。
- 15 根据本发明的实施例，所述 B27 添加剂在所述第七培养基或第八培养基中的质量体积分数为 1~3%。
- 根据本发明的实施例，所述丙酮酸钠在所述第七培养基或第八培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。
- 根据本发明的实施例，所述非必需氨基酸在所述第七培养基或第八培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。
- 20 根据本发明的实施例，所述谷氨酰胺酶在所述第七培养基或第八培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。
- 根据本发明的实施例，所述盘尼西林-链霉素在所述第七培养基或第八培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%。
- 根据本发明的实施例，所述 DZNep 在所述第七培养基中的终浓度为 8~12nM。
- 25 根据本发明的实施例，所述 DZNep 在所述第八培养基中的终浓度为 45~55nM。
- 根据本发明的实施例，所述 TSA 在所述第七培养基中的终浓度为 4~6nM。
- 根据本发明的实施例，所述 TSA 在所述第八培养基中的终浓度为 15~25nM。
- 根据本发明的实施例，所述 MEK 抑制剂包括 PD0325901。
- 根据本发明的实施例，所述 PD0325901 在所述第七培养基或第八培养基中的终浓度为 0.5~1.5 μ M。
- 30 根据本发明的实施例，所述 WNT 信号通路抑制剂包括 IWR-1。
- 根据本发明的实施例，所述 IWR-1 在所述第七培养基或第八培养基中的终浓度为 3~6 μ M。
- 根据本发明的实施例，所述重组人白血病抑制因子在所述第七培养基或第八培养基中的终浓度为 15~25ng/mL。
- 根据本发明的实施例，所述激活素 A 在所述第七培养基或第八培养基中的终浓度为 15~25 ng/mL。
- 35 根据本发明的实施例，所述 L-抗坏血酸在所述第七培养基或第八培养基中的终浓度为 45~55 μ g/mL。
- 根据本发明的实施例，所述基质胶在所述第七培养基或第八培养基中的体积比为 0.1~0.3%。
- 根据本发明的实施例，所述第五培养处理的时间为 12~24 小时。
- 根据本发明的实施例，所述第六培养处理的时间为 12 天。
- 在本发明的第二方面，提出了一种类胚胎模型。根据本发明的实施例，所述类胚胎模型由第一方面所述的方法培养得到。制备得到的类胚胎模型的谱系较全，能够模拟胚胎发育（尤其是人原肠运动时期）、疾病建模、药物筛选和科学研究等用途。
- 在本发明的第三方面，提出了一种类胚胎模型。根据本发明的实施例，所述类胚胎模型包括胚胎外组织和胚胎内组织。因此，具有除滋养外胚层外的所有胚胎外细胞谱系和所有胚胎内细胞谱系，能够模拟卡耐基 3 期的植入后胚胎到卡耐基 9 期的神经胚的整个发育过程，从而可用于制备多种祖细胞谱系、
- 45 疾病建模、药物筛选和科学研究等用途。
- 根据本发明的实施例，所述类胚胎模型还可以进一步包括如下附加技术特征的至少之一：

根据本发明的实施例，所述胚胎外组织包括：内脏内胚层、前内脏内胚层、卵黄囊内胚层、胚外中胚层、间皮细胞、尿囊细胞、胚外中胚层来源的造血细胞前体中胚层祖细胞、胚外中胚层来源的血管母细胞、胚外中胚层来源的内皮细胞、胚外中胚层来源的动脉内皮细胞、胚外中胚层来源的造血细胞前体、胚外中胚层来源的巨核细胞、胚外中胚层来源的红细胞、胚外中胚层来源的髓系细胞前体、羊膜外胚层细胞和羊膜/非神经外胚层祖细胞。

根据本发明的实施例，所述胚胎内组织包括上胚层、定型上胚层、原始生殖样细胞、定型内胚层、原条、涌现中胚层、晚期中胚层、神经上皮和神经嵴源性细胞。

根据本发明的实施例，所述类胚胎模型包括上胚层、定型上胚层、原始生殖样细胞、内胚层谱系、中胚层谱系、外胚层谱系。

根据本发明的实施例，所述内胚层谱系包括胚胎内组织和胚胎外组织。胚胎内组织包括定型内胚层；胚胎外组织包括内脏内胚层、前内脏内胚层和卵黄囊内胚层。

根据本发明的实施例，所述中胚层谱系包括胚胎内组织和胚胎外组织。胚胎内组织包括原条、涌现中胚层、晚期中胚层；胚胎外组织包括胚外中胚层、间皮细胞和尿囊细胞，以及胚外中胚层来源的造血细胞前体中胚层祖细胞、血管母细胞、内皮细胞、动脉内皮细胞、造血细胞前体、巨核细胞、红细胞和髓系细胞前体。

根据本发明的实施例，所述外胚层谱系包括胚胎内组织和胚胎外组织。胚胎内组织包括神经上皮、神经嵴源性细胞；胚胎外组织包括羊膜外胚层细胞和羊膜/非神经外胚层祖细胞。

根据本发明的实施例，所述内脏内胚层中表达的基因包括 *HNF4A* 和 *SOX17*；所述前内脏内胚层中表达的基因包括 *OTX2* 和 *CXCR4*；所述卵黄囊内胚层中表达的基因包括 *HNF4A*，且低表达或不表达 *SOX17*；所述胚外中胚层细胞中表达的基因包括 *ANXA1*, *LUM*, *NID2* 和 *FRZB*；所述间皮细胞中表达的基因包括 *AQP1*；所述尿囊细胞中表达的基因包括 *TBX4* 和 *HOXA13*；所述胚外中胚层来源的造血细胞前体中胚层祖细胞中表达的基因包括 *BMP4* 和 *WNT5A*；所述胚外中胚层来源的血管母细胞中表达的基因包括 *ETV2*, *TAL1*, *BMP4* 和 *WNT5A*；所述胚外中胚层来源的内皮细胞中表达的基因包括 *CDH5* 和 *CD34*；所述胚外中胚层来源的动脉内皮细胞中表达的基因包括 *GJA4* 和 *GJA5*；所述胚外中胚层来源的造血细胞前体中表达的基因包括 *RUNX1* 和 *SPN*；所述胚外中胚层来源的巨核细胞中表达的基因包括 *PPBP*；所述胚外中胚层来源的红细胞中表达的基因包括 *GATA1* 和 *HBE1*；所述胚外中胚层来源的髓系细胞前体中表达的基因包括 *CSF1R*；所述羊膜外胚层细胞中表达的基因包括 *ISL1* 和 *GABRP*；所述羊膜/非神经外胚层祖细胞中表达的基因包括 *CLDN10*, *AMR2*, *PCAT14* 和 *VGLL1*；所述上胚层中表达的基因包括 *POU5F1* 和 *DPP44*；所述定型上胚层中表达的基因包括 *TNFRSF12A* 和 *JUND*；所述原始生殖样细胞中表达的基因包括 *NANOG*, *NANOS3*, *TFAP2C* 和 *SOX17*；所述定型内胚层中表达的基因包括 *HHEX*；所述原条中表达的基因包括 *TBXT*；所述涌现中胚层中表达的基因包括 *LHX1*；所述晚期中胚层中表达的基因包括 *MYL7*，且低表达或不表达 *TBXT*；所述神经上皮中表达的基因包括 *PAX6*；所述神经嵴源性细胞中表达的基因包括 *SOX10* 和 *MPZ*。

根据本发明的实施例，内胚层谱系表达 *FOXA2*，即所述定型内胚层、所述内脏内胚层、所述前内脏内胚层和所述卵黄囊内胚层共同表达 *FOXA2*。

根据本发明的实施例，所述上胚层谱系中表达的基因包括 *POU5F1* 和 *DPP44*；所述定型上胚层中表达的基因包括 *TNFRSF12A* 和 *JUND*；所述原始生殖样细胞中表达的基因包括 *NANOG*, *NANOS3*, *TFAP2C* 和 *SOX17*；所述内胚层谱系中表达的基因包括 *FOXA2*；所述晚期中胚层中表达的基因包括 *TBXT* 和 *MYL7*；所述尿囊细胞中表达的基因包括 *TBX4* 和 *HOXA13*；所述羊膜/非神经外胚层祖细胞中表达的基因包括 *CLDN10*, *AMR2*, *PCAT14* 和 *VGLL1*；所述胚外中胚层中表达的基因包括 *ANXA1*, *LUM*, *NID2* 和 *FRZB*；所述定型内胚层中表达的基因包括 *HHEX*；所述内脏内胚层中表达的基因包括 *HNF4A* 和 *SOX17*；所述前内脏内胚层中表达的基因包括 *OTX2* 和 *CXCR4*；所述卵黄囊内胚层中表达的基因包括 *HNF4A* 且低表达 *SOX17*；所述原条中表达的基因包括 *TBXT*；所述涌现中胚层中表达的基因包括 *LHX1*；所述神经上皮中表达的基因包括 *PAX6*；所述神经嵴源性细胞中表达的基因包括 *SOX10* 和 *MPZ*；所述羊膜外胚层细胞中表达的基因包括 *ISL1* 和 *GABRP*；所述间皮细胞中表达的基因包括 *AQP1*；所述内皮细胞中表达的基因包括 *CDH5* 和 *CD34*；所述动脉内皮细胞中表达的基因包括 *GJA4* 和 *GJA5*；所述造血细胞前体中胚层祖细胞中表达的基因包括 *BMP4* 和 *WNT5A*；所述血管母细胞中表达的基因包括 *ETV2*, *TAL1*, *BMP4* 和 *WNT5A*；所述造血细胞前体中表达的基因包括 *RUNX1* 和 *SPN*；所述巨核细胞中表达的基因包括 *PPBP*；所述红细胞中表达的基因包括 *GATA1* 和 *HBE1*；所述髓系细胞前体中表达的基因包括

CSF1R。

根据本发明的实施例，所述胚胎外组织中各细胞类型的占比为：所述内脏内胚层 0.46%-11.57%、所述前内脏内胚层 0.14%-33.17%、所述卵黄囊内胚层 1.19%-4.24%、所述胚外中胚层 0.33%-32.35%、所述间皮细胞 4.22%-4.33%、所述尿囊细胞 0.14%-4.26%、所述胚外中胚层来源的造血细胞前体中胚层祖细胞 0.1%-0.5%、所述血管母细胞 0.1%-0.5%、所述内皮细胞 1.40%-4.79%、所述动脉内皮细胞 0.04%-0.1%、所述造血细胞前体 0.01%-0.1%、所述巨核细胞 0.01%-0.1%、所述红细胞 0.1%-0.5%和所述髓系细胞前体 0.01%-0.1%、所述羊膜外胚层细胞 0.21%-10.23%和所述羊膜/非神经外胚层祖细胞 0.09%-3.00%。

根据本发明的实施例，所述胚胎内组织中各主要细胞类型的占比为：所述上胚层 2.18%-33.61%、所述定型上胚层 2.57%-2.86%、所述原始生殖样细胞 0.02%-0.19%、所述定型内胚层 0.48%-1.63%、所述原条 0.31%-0.90%、所述涌现中胚层 0.15%-1.83%、所述晚期中胚层 1.61%-12.81%、所述神经上皮 0.18%-3.13%、所述神经嵴源性细胞 0.18%-2.84%。

根据本发明的实施例，所述胚胎外组织和胚胎内组织中各细胞类型的占比如图 5 所示。

根据本发明的实施例，所述类胚胎模型可模拟原肠胚时期的细胞类型。

在本发明的第四方面，提出了第二方面或第三方面所述的类胚胎模型在构建卡耐基发育阶段模型中的用途。

根据本发明的实施例，所述卡耐基发育阶段选自第 3 期到第 9 期的发育阶段。

在本发明的第五方面，提出了第二方面或第三方面所述的类胚胎模型在药物筛选中的用途，所述药物用于干预原肠胚时期胚胎发育。

在本发明的第六方面，提出了第二方面或第三方面所述的类胚胎模型在构建疾病模型中的用途，所述疾病模型选自发育疾病模型。

根据本发明的实施例，所述发育疾病模型选自胚胎植入缺陷模型或唐氏综合征模型。这一阶段的发育异常可能导致流产，器官和大脑发育缺陷。

在本发明的第七方面，提出了第二方面或第三方面所述的类胚胎模型在获得特定谱系祖细胞中的用途。

根据本发明的实施例，所述用途包括将所述类胚胎模型中的特定谱系进行扩大化培养处理，得到所述特定谱系祖细胞。

根据本发明的实施例，进一步包括对扩大化培养处理后的所述特定谱系进行基因编辑或细胞分化，或利用扩大化培养处理后的所述特定谱系进行细胞治疗。

本发明的第八方面，提出了第二方面或第三方面所述的类胚胎模型在构建特定类器官模型或细胞 3D 聚合体中的用途。

根据本发明的实施例，所述用途包括利用诱导手段将所述类胚胎模型诱导为特定的类器官模型或所述细胞 3D 聚合体。

根据本发明的实施例，所述诱导手段包括添加小分子化合物、细胞共培养或添加细胞因子。

在本发明的第九方面，提出了一种筛选药物的方法，所述药物用于干预原肠胚时期胚胎发育。根据本发明的实施例，将待筛选药物添加于第一方面所述的类胚胎模型的构建方法的培养过程中或将所述待筛选药物与第二方面或第三方面所述的类胚胎模型进行接触处理；基于第一方面所述的构建方法所获得的类胚胎模型或第二方面或第三方面所述的类胚胎模型是否发生预期变化，确定目标药物。

根据本发明的实施例，添加药物后相比于添加药物前，第一方面所述的构建方法所获得的类胚胎模型发生预期变化，是待筛选药物为目标药物的指示。

根据本发明的实施例，接触处理后相比于接触处理前，第二方面或第三方面所述的类胚胎模型发生预期变化，是待筛选药物为目标药物的指示。

有益效果：

本发明分别建立了体内、体外生成包括胚胎内和胚胎外组织的三维聚集体（类胚胎模型）方法。体内和体外方法均无需细胞因子、无需小分子通路干扰因子、非基因编辑并且只有单一起始细胞类型，所述方法简单、重复性高，使得更有利于在大规模中应用。本发明中的类胚胎模型包括了类胚胎和胚胎外组织，相比于目前已有的胚胎发育模型，谱系多样化上更接近体内的状态，这为胚胎发育疾病建模提供了更好的模型。

本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出，部分将从下面的描述中变得明显，或通过本发明的实践了解到。

附图说明

5 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解，其中：

图 1 是根据本发明实施例的由多能干细胞/全能干细胞体内、体外产生类胚胎模型的方法示意图；

图 2 是根据本发明实施例的体内方法、体外方法实验的单细胞数据，展示特定标志基因在不同细胞类型中表达水平的气泡图，气泡大小代表基因在不同细胞类型中表达占比，气泡颜色代表基因表达的相对高低值；

图 3 是根据本发明实施例的人类胚胎（6-19 天）单细胞数据，通过体外方法 3D 培养产生的类胚胎模型的单细胞数据和通过体内方法畸胎瘤形成的类胚胎模型的单细胞数据整合后，各自单细胞 UMAP 图；

图 4 是根据本发明实施例的不同干细胞用本发明实施例体外、体内方法进行分化的发育潜能比较。上半部分为始发态多能干细胞和原始态多能干细胞在本发明实施例体外方法分化后的整合单细胞 UMAP 图，A 用颜色标记取样的不同时间点，B 用颜色标记不同的细胞类型；下半部分为始发态多能干细胞和原始态多能干细胞在本发明实施例畸胎瘤方法分化后的整合单细胞 UMAP 图，C 用颜色标记取样的不同时间点，D 用颜色标记不同的细胞类型；

图 5 是根据本发明实施例的不同干细胞用本发明实施例体外、体内方法进行分化后的细胞比例的气泡图；

图 6 是根据本发明实施例的上胚层谱系及其衍生谱系的亚分群 UMAP 图（左）和造血相关谱系的亚分群 UMAP 图（右）；

图 7 是根据实时荧光定量 PCR 和免疫荧光染色鉴定原始态干细胞。

具体实施方式

为了便于理解本技术，下面定义了许多术语和短语。在整个详细描述中阐述了额外的定义。

术语“干细胞”描述的是能够形成多种组织类型细胞的细胞。存在不同类型的干细胞。当精子使卵受精时，形成单个全能细胞，这个全能细胞具有形成整个生物体的能力。在受精后的第一个小时，这一细胞分裂为完全相同的全能细胞。受精后大约四天并经过几个周期的细胞分裂之后，这些全能干细胞开始特化。当全能细胞变得更加特化时，它们随之被称为“多潜能的(pluripotent)”。

30 多潜能细胞能够分化为身体中的每种细胞类型，但是不能形成胎盘或胎儿发育所必需的支持组织。由于多潜能干细胞的分化潜能不是“全体”的，因此不将这种细胞称为“全能”，而且它们不是胚胎。多潜能干细胞进一步特化为多能(multipotent)干细胞，其专用于分化为为特定功能特化的特定种系的细胞。多能细胞能够分化为它们所源自的组织中含有的细胞类型；例如血液干细胞只能分化为红血细胞、白血细胞和血小板。

35 术语“胚胎结构”反映了从受精到胎儿的发育过程中发生的任何结构，其中包括桑葚胚、胚泡和原肠胚的发育阶段。因此，术语胚胎结构包括尚未空化成囊胚的结构。

在受精第 2 周，内细胞群增殖分化，逐渐形成圆盘状的二胚层胚盘。由两个胚层组成，称二胚层胚盘。邻近滋养层的一层柱状细胞为上胚层，靠近胚泡腔侧的一层立方细胞为下胚层。内外胚层细胞紧密相贴构成二胚层胚盘，是胚体发育的原基。在哺乳动物胚胎学，当下胚层的立方细胞逐渐靠近囊胚细胞；

40 上胚层的柱状细胞与滋养层细胞相连接，上胚层也被称为第一外胚层，因为可以发展成之后的外胚层、中胚层、内胚层等三个胚层。这三个胚层之后会与原肠形成发育相关联。

自然环境下受精卵的细胞分裂产生桑葚胚，桑葚胚是一种包含 8 至 20 个细胞的球形胚胎细胞结构。桑葚胚细胞具有全能性，这意味着这些细胞能够分化成任何胚胎或胚胎外细胞类型。当桑葚胚成熟时，会形成一个充满液体的内部空腔。该事件与桑葚胚细胞分化为外层（滋养外胚层）和内细胞团（ICM 或胚细胞）相关。这种空化细胞结构称为囊胚。因此，囊胚是哺乳动物胚胎结构发育的一个阶段。囊胚的滋养层细胞围绕内细胞团（ICM）以及充满液体的囊胚腔。囊胚的滋养层细胞进一步发育形成外胎盘锥，

45

最终通过与子宫内壁结合形成胎盘。胎盘是一个将发育中的胎儿连接到子宫壁的器官，可以吸收营养物质，通过母亲的血液供应进行消除和气体交换。

内细胞团由具有分化成任何身体组织能力的细胞组成，因此具有多能性。此外，内细胞团细胞形成某些胚胎外组织，例如卵黄囊。囊胚通过滋养外胚层和 ICM 的细胞增殖和分化为胚胎干细胞以外的细胞而进一步自然发育。ICM 细胞发育的第一步导致形成上胚层（最终形成动物的组织）和下胚层（最终形成卵黄囊等的组织）。

在上胚层中，细胞通过形成三个组织层（胚胎胚层）继续分化。这些将共同形成成年动物中存在的所有不同的组织类型。胚胎的三个胚层是内胚层、外胚层和中胚层；内胚层将发育成胃肠道和呼吸道等，外胚层将发育成神经系统、毛发和指甲等，中胚层将发育成肌肉和结缔组织等。当三个胚胎胚层形成后，胚胎结构就变成了原肠胚。因为任何胚胎胚层中的细胞不能自然分化形成来自其他胚胎胚层之一的组织，所以胚胎胚层中的细胞是多能的，而不是全能或多能的。

对于本发明的范围，“胚胎”被定义为从囊胚开始并且包括所有后续发育阶段（包括例如原肠胚）直至胎儿形成的一系列发育结构中的任何一个，包括例如胚胎发育阶段、原肠胚、直至胎儿形成。因此，该术语仅指从囊胚阶段（自然）发育中发生的那些结构，并且包括直到胎儿阶段的后续结构。当所有器官基本形成时，胚胎就成为胎儿。

胎儿是胚胎期后、出生前处于发育阶段的哺乳动物，其器官已完全分化但尚未完全发育。因此，术语“胚胎”或“胚胎结构”不涵盖胎儿。

术语“卡耐基发育阶段”是指根据人类胚胎的观察和分类而提出的一种系统，用于描述和比较人类胚胎在不同发育阶段的特征和变化。卡耐基发育阶段将人类胚胎发育过程分为 23 个阶段，以卡耐基编号命名，编号从 1 到 23。每个阶段代表了胚胎的特定发育阶段和特征，包括胚胎大小、形态特征、器官形成和细胞分化等方面。所述 23 个阶段具体分为以下阶段：第 1-2 期：受精卵形成和细胞分裂；第 3 期：囊胚膨胀和植入；第 4-5 期：内胚层和外胚层形成；第 6-7 期：原肠胚形成；第 8-9 期：神经胚形成；第 10-11 期：器官原基的形成；第 12-13 期：器官系统的形成；第 14-15 期：胎儿特征的出现；第 16-17 期：神经系统和肌肉系统的发展；第 18-19 期：器官的完善和功能的增强；第 20-23 期：胚胎的最后发育阶段。

下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的，仅用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1 原始态干细胞和早期胚胎样全能干细胞的获得

为了获得原始态干细胞（naïve PSCs），将人的始发态 PSCs（包括 H9，H1 等商品化人类多能干细胞系，或诱导多能干细胞）用 DPBS 洗涤一次，使用 TrypLE™ Express : 0.5mM EDTA (体积比为 1:1) 将人的始发态 PSCs 解离成单细胞，并以 1000–1500 个细胞/cm² 的密度铺在含有浓度为 10 μM Y-27632 的人始发态多能干细胞完全培养基培养基的培养皿中。24 小时后，将培养基更换为 4CL 培养基，该 4CL 培养基由神经基础培养基（Gibco, 21103049）和 DMEM/F12 基础培养基（Gibco, 12634028）、质量体积分数为 0.5~1.5% 的 N2 补充物（Gibco, 17502048）、质量体积分数为 1~3% 的 B27 添加剂（Gibco, 17502048）、质量体积分数为 0.5~1.5% 的丙酮酸钠（Corning, 25000CL）、质量体积分数为 0.5~1.5% 的非必需氨基酸（Corning, 25025CL）、质量体积分数为 0.5~1.5% 的谷氨酰胺酶（Gibco, 35050061）、质量体积分数为 0.5~1.5% 盘尼西林-链霉素（HyClone, SV30010）、10nM DZNep（Selleck, S7120），5 nM TSA（Vetec, V900931），1 μM PD0325901（Axon, 1408），5 μM IWR-1（Sigma, I0161），20ng/mL 重组人白血病抑制因子（Peprotech, 300-05），20ng/mL 激活素 A（Peprotech, 120-14E），50μg/ml L-抗坏血酸（Sigma, A8960）和 0.2% (v/v) Geltrex 或 Matrigel。每天更换 4CL 培养基，每 3-4 天将细胞进行传代处理（1:5 至 1:8），培养约 12 天（3 代）后得到 4CL 原始态干细胞（naïve PSCs）。

早期胚胎样全能干细胞的获取有两种方法。第一种，将原始态干细胞解离成单细胞，并按 2000–3000 个细胞/cm² 的密度铺在含有浓度为 5 μM Y-27632 的 4CL 培养基的培养皿中，培养 24h 后，更换为 e4CL 培养基。e4CL 培养基与 4CL 培养基组成成分相同，但其中 DZNep 的浓度为 50 nM、TSA 浓度为 20 nM。培养 5 天，每天更换 e4CL 培养基。第二种，为了使原始态干细胞在 e4CL 培养基中直接产生早期胚胎

样全能干细胞，将人始发态胚胎干细胞解离成单细胞，并按 2000–3000 个细胞/cm² 的密度铺在含有浓度为 10μM Y-27632 的人始发态多能干细胞完全培养基培养基或 TeSR-E8 培养基的培养皿中。培养 24 小时后，将培养基换成 e4CL 培养基，每天更换培养基。细胞在第 4 天时消化为单细胞进行传代，继续在 e4CL 条件下培养 4 天，得到早期胚胎样全能干细胞。

5

实施例 2 4CL 原始态干细胞鉴定

对实施例 1 培养获得的原始态干细胞，使用 RT-qPCR 实验方法检测原始态标志基因 *DPPA3*, *DPPA5*, *KLF17*, *DNMT3L*, *MAEL* 等基因的表达水平。如图 7 所示，与始发态 (Primed) 细胞相比，原始态干细胞的 *DPPA3*, *DPPA5*, *KLF17*, *DNMT3L*, *MAEL* 表达水平显著上升且多能性基因 *OCT4*, *NANOG* 表达水平基本稳定。同时通过免疫荧光实验检测到原始态干细胞高表达相关蛋白 KLF17，证明细胞是处于原始态。

10

实施例 3 体外 3D 环境生成胚胎内和胚胎外组织

按照图 1 所示的方法进行体外培养，将实施例 1 培养得到的原始态干细胞或早期胚胎样全能干细胞在体外三维环境下进行培养，通过 3D 培养类器官方法生产类胚胎模型，该方法无需细胞因子、无需小分子通路干扰因子、非基因编辑，具体地，该方法包括细胞准备、低吸附圆底 96 孔板中用拟胚体培养基使细胞成球、再使用诱导培养基使得细胞进行分化、进而在长期分化培养基中进长期培养。具体步骤为：

15

第 0 天：细胞（实施例 1 培养得到的原始态干细胞或早期胚胎样全能干细胞）生长比例占培养板面积的 70-80%时，用 Accutase 酶（Gibco 公司）将克隆消化成单细胞，用 150μL 拟胚体培养基（具体成分见表 1 所示）重悬 9000 个细胞接种于 96 孔的低吸附培养板中。

20

表 1. 拟胚体培养基

拟胚体培养基	
成分	浓度
人始发态多能干细胞完全培养基 (mTesR 培养基, STEM CELL 公司)	
盘尼西林-链霉素 (Hyclone 公司)	1%
Y27632 (Axon Medchem 公司 1681)	50μM

25

第 1 天：24 h 后在组织培养显微镜下观察，可以观察到边界清晰的小的拟胚体，在 37℃ 和 5%CO₂ 的细胞培养箱中继续培养拟胚体。

第 2 天：避免触碰到培养板底部的拟胚体的前提下移除旧的拟胚体培养基，将 150μL 新鲜拟胚体培养基加入培养板中。

30

第 4 天：向培养板中加入不含 Y27632 的新鲜的拟胚体培养基（即由 mTesR 和 1%的盘尼西林-链霉素组成）。

第 6 天：用 200μL 的扩口枪头转移拟胚体至 24 孔低吸附板并向其中添加 500μL 的诱导培养基（具体成分见表 2 所示）。

35

表 2. 诱导培养基

诱导培养基	
成分	添加量
DMEM-F12 基础培养基 (Invitrogen 公司 cat. no. 11330-032 or 31330-038, depending on location)	480 mL
N2 补充物 (Invitrogen 公司)	5 mL
谷氨酰胺酶 TM (Invitrogen 公司 cat. no. 35050-038)	5 mL
非必需氨基酸 (Sigma 公司 cat. no. M7145)	5 mL
肝素 (Sigma 公司 cat. no. H3149)	500 μg
盘尼西林-链霉素 (Hyclone 公司)	5 mL

40

45

- 第 8 天：移除旧的诱导培养基，向培养板中加入 500μL 新鲜的诱导培养基。
- 第 10 天：所述拟胚体已经成球，成为组织块，将组织块转移于 Matrigel 基质胶中，
- 1) Matrigel 基质胶于 4℃ 溶解 30 分钟。
 - 2) 将封口膜放在 200μL 规格的装枪头处，面积为 (4×4) 16 孔大小，用手指按压封口膜形成小的凹陷。紫外杀菌 30 分钟。
 - 3) 用 200μL 的扩口枪头将组织块应转移到提前制备好的每个小凹槽中。
 - 4) 用 200μL 的枪头小心移去每个凹槽中多余的培养基。
 - 5) 立即在每个凹槽中的组织块上滴加约 30μL 体积的减生长因子的 Matrigel 基质胶(BD Biosciences 公司，356230)填满凹槽。
 - 6) 用 10μL 的枪头将组织块尽量拨至液滴中心。
 - 7) 将凹槽装置放置于 60 mm² 培养盘中，37℃ 培养 20-30 分钟，目的是为了 Let Matrigel 基质胶液滴包紧组织块。
 - 8) 向 60mm² 培养盘中加入 5mL 不含维生素 A 的 B27 补充物的长期分化培养基（具体成分见表 3 所示）。
 - 9) 使用无菌镊子转动封口膜片，并通过摇晃培养皿使 Matrigel 基质胶液滴从封口膜片上脱落。如果液滴在封口膜上仍有残留，可以通过镊子固定住封口膜的一端并在培养基中晃动封口膜，使剩余的液滴脱落。将脱落下来的 Matrigel 基质胶液滴放置于细胞培养箱中继续培养。
- 第 12 天：向培养盘中加入 5mL 不含维生素 A 的 B27 补充物的长期分化培养基。
- 第 14 天：向培养盘中加入 5mL 含有维生素 A 的 B27 补充物的长期分化培养基（具体成分见表 3 所示），转移培养盘至放有 70rpm 转速摇床的培养箱中，每 3-4 天更换一次培养基。

表 3. 长期分化培养基

长期分化培养基	
成分	添加量
DMEM-F12(Invitrogen 公司 cat. no. 11330-032 or 31330-038, depending on location)	250 mL
神经基础培养基 (Neurobasal™ Medium, Thermo Fisher)	250 mL
N2 补充物(Invitrogen 公司)	2.5 mL
谷氨酰胺酶 TM (Invitrogen 公司 cat. no. 35050-038)	5 mL
非必需氨基酸 (Sigma 公司 cat. no. M7145)	2.5 mL
胰岛素(Sigma 公司 cat. no. I9278-5ML)	125 μL
β 巯基乙醇 (Merck 公司 cat. no. 8057400005)	1.75 μL
盘尼西林-链霉素(Hyclone 公司)	5 mL
B27 补充物不含维生素 A (Invitrogen 公司 cat. no. 12587010)/ B27 补充物含维生素 A (Invitrogen 公司 cat. no. 17504044)	5 mL

实施例 4 体内生成胚胎内和胚胎外组织

按照图 1 所示的方法进行体内培养，通过细胞移植到免疫缺陷鼠体内形成畸胎瘤从而生产细胞聚集体，该方法包括将实施例 1 培养得到的原始态干细胞或早期胚胎样全能干细胞和基质胶混合后，注射到小鼠体内，使其形成具有 3D 结构的细胞聚集体。具体操作步骤为：

- 1) 动物准备
雄性 NOD-scid-IL2Rg-/- 小鼠（药明康德公司）在 SPF 设施环境中培养维持到 4-6 周龄。
- 2) 细胞准备
将 100 万个实施例 1 培养得到的原始态干细胞或早期胚胎样全能干细胞从培养基中分离出来，收集后用 200 μL 预冷的体积比为 1:1 的 DMEM/F12 基础培养基(Invitrogen 公司 cat. no. 11330-032 or 31330-038)

和 Matrigel® 基质胶的混合液进行重悬，得到重悬液。在进行移植之前，重悬液被放置在冰上。移植应立即进行。

3) 移植实验

将步骤 2) 中重悬液收集到 1ml 注射器中，通过皮下注射至 4-6 周龄雄性 NOD-scid-IL2Rg^{-/-} 小鼠。

5 为了避免应激反应，小鼠至少需要提前一周做好准备。畸胎瘤形成实验，需取用 200μl 预冷的体积比为 1:1 的 DMEM/F12 基础培养基和 Matrigel 混合液，在 1mL 无菌注射器中计数 100 万个细胞。将小鼠的腹部暴露出来以便于注射，将无菌注射器的针头斜穿入小鼠腹部皮肤。将细胞悬液注射至 4-6 周龄雄性 NOD-scid IL2Rg^{-/-} 小鼠皮下，将无菌注射器的针头缓慢拔出，以防止细胞悬液从注射位置流出。

4) 畸胎瘤形成过程中的动物监测

10 注射后小鼠在 SPF 级设施中维持培养至 2-3 周。肉眼观察注射部位生长的畸胎瘤大小。通常，在注射后 2-3 周，分离畸胎瘤。

5) 从畸胎瘤中收集人的细胞

注射后 2-3 周处死小鼠，分离畸胎瘤。收集的畸胎瘤用于冷冻切片、细胞分离、单细胞转录组分析或其他用途。

15

实施例 5 单细胞测序鉴定体内、体外分化方法产生的胚胎内和胚胎外细胞类型

为了系统地解析原始态干细胞衍生的类胚胎和畸胎瘤模型中的整个细胞系，使用 DNBelab C4 液滴平台对类胚胎(第 10、20 和 30 天)和畸胎瘤(第 14 和 21 天)进行了单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)分析。在质量控制后，从类胚胎中获得 75,326 个单细胞，从畸胎瘤中获得 397,684 个单细胞进行进一步分析。如图 2 所示，统一流形近似和投影(UMAP)分析鉴定出胚胎样的细胞类型，包括上胚层(Epi, *POU5F1*+和 *DPPA4*+), 定系上胚层 (Committed epiblast, *TNFRSF12A*+/*JUND*+), 特别包括原始生殖细胞样细胞(PGCLC, *NANOG*+/*NANOS3*+/*TFAP2C*+/*SOX17*+); 内胚层谱系(*FOXA2*+)包括定系内胚层(DE, *HHEX*+), 胚内内胚层(VE, *HNF4A*+/*SOX17*+), 前胚内内胚层(AVE, *OTX2*+/*CXCR4*+), 卵黄囊内胚层(YE, *HNF4A*+/*SOX17*-); 中胚层谱系包括原条(PS, *TBXT*+), 涌现中胚层(EM, *LHX1*+); 晚期中胚层细胞(AM, *TBXT*-/*MYL7*+), 尿囊细胞(AI, *TBX4*+/*HOXA13*+), 羊膜/非神经外胚层祖细胞(*CLDN10*, *AMR2*+/*PCAT14*+/*VGLL1*+), 和胚外中胚层细胞(EXMC)表达中胚层特征(*ANXA1*, *LUM*, *NID2*/*FRZB*), 但不表达任何胚胎对应物的标记; 中胚层来源的间皮细胞(*AQP1*+), 内皮细胞(*CDH5*+/*CD34*+), 动脉内皮细胞 (*GJA4*+/*GJA5*+), 造血细胞前体中胚层祖细胞 (*BMP4*+/*WNT5A*+), 血管母细胞 (*ETV2*+/*TAL1*+/*BMP4*+/*WNT5A*+), 造血细胞前体 (*RUNX1*+/*SPN*+), 巨核细胞 (PPBP), 红细胞 (*GATA1*+/*HBE1*+), 和髓系细胞前体 (*CSF1R*+); 外胚层谱系包括神经上皮(NE, *PAX6*+), 神经嵴源性细胞(NCC, *SOX10*+/*MPZ*+), 和羊膜外胚层细胞(*ISL1*+/*GABRP*+). 进一步亚分群, 如图 6 所示, 还鉴定出定系上胚层 (Committed epiblast, *TNFRSF12A*+/*JUND*+), 动脉内皮细胞 (*GJA4*+/*GJA5*+), 造血细胞前体中胚层祖细胞 (*BMP4*+/*WNT5A*+), 血管母细胞 (*ETV2*+/*TAL1*+/*BMP4*+/*WNT5A*+), 造血细胞前体 (*RUNX1*+/*SPN*+), 巨核细胞 (PPBP), 红细胞 (*GATA1*+/*HBE1*+), 和髓系细胞前体 (*CSF1R*+), 等细胞类型。

35 为了评估解析原始态干细胞衍生的类胚胎和畸胎瘤的发育进程，将 scRNAseq 数据与人类胚胎参考数据集进行了整合，其中包括原肠形成前阶段(E6-E14)的人类囊胚，以及人类原肠形成的卡耐基 7 期(CS7; E16-E19)胚胎。如图 3 所示，UMAP 投影不仅显示了胚胎和胚胎外谱系的细胞类型特征的极好匹配，而且还表明细胞类型分化遵循与发育相同的过程。值得注意的是，本发明的模型包括神经外胚层细胞，以及在 CS7 原肠胚形成过程中发现的所有其他细胞类型，这表明本发明的模型已经超越原肠胚形成阶段，进入早期器官发生阶段。通过整合猴胚胎数据集(CS7 至 CS11)进一步验证了神经外胚层谱系的身份。畸胎瘤和类胚胎都不包含滋养外胚层谱系(后来发育为胎盘)。这一限制意味着本发明的模型无法完成完整的胚胎。

实施例 6 不同胚胎干细胞在体外 3D 培养方法下的分化潜能比较

45 细胞准备: 人的始发态 PSCs 使用 mTeSR 培养基(STEM CELL 公司)维持培养，待人的始发态 PSCs

的长至 70-80%，进行传代或体外 3D 培养实验时，移除培养基，沿培养皿壁加入 1 mL PBS，轻轻清洗细胞，洗去残余培养基，移除 PBS；加入 1 mL TrypLE™ Express : 0.5mM EDTA (体积比为 1:1)消化液，放置 37 °C 培养箱消化约 5 min，然后于显微镜下观察；当细胞消化呈现边缘清晰时，用移液枪吸取 1 mL 新鲜培养液吹打细胞，将细胞悬液转移至 1.5 mL EP 管中；300 g 离心 3 min。移除上清液，用适量的新鲜培养基重悬细胞，计数板或细胞计数仪计数。用 150μL 拟胚体培养基（具体成分见表 1 所示）重悬 9000 个细胞接种于 96 孔的低吸附培养板中。后续的体外 3D 培养具体步骤见实施例 3。

为了比较始发态干细胞和原始态干细胞在体外方法下的分化潜能的不同。将培养到特定时间点的始发态和原始态干细胞衍生 3D 产物，用 TrypLE™ Express : 0.5mM EDTA (体积比为 1:1)消化成单细胞，再使用 DNBelab C4 液滴平台(ref)对 3D 分化产物(第 10、20 和 30 天)进行单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)建库分析。如图 4，图 5 所示，始发态干细胞和原始态干细胞衍生分化产物以胚胎细胞类型上胚层细胞类型为主，而胚外细胞类型，如下胚层来源的前内胚层内胚层和内脏内胚层仅在原始态干细胞衍生分化产物中存在，而在始发态干细胞衍生分化产物中完全不存在。此外，从图 5 中可以看出原始态干细胞中胚胎外组织中各细胞类型的占比为：内脏内胚层 0.46%-11.57%、前内胚层内胚层 0.14%-33.17%和、卵黄囊内胚层 1.19%-4.24%、胚外中胚层 0.33%-32.35%、间皮细胞 4.22%-4.33%和、尿囊细胞 0.14%-4.26%、胚外中胚层来源的造血细胞前体中胚层祖细胞 0.1%-0.5%、血管母细胞 0.1%-0.5%、内皮细胞 1.40%-4.79%、动脉内皮细胞 0.04%-0.1%、造血细胞前体 0.01%-0.1%、巨核细胞 0.01%-0.1%、红细胞 0.1%-0.5%和、髓系细胞前体 0.01%-0.1%、羊膜外胚层细胞 0.21%-10.23%、羊膜/非神经外胚层祖细胞 0.09%-3.00%；胚胎内组织中各主要细胞类型的占比为：上胚层 2.18%-33.61%、定型上胚层 2.57%-2.86%、原始生殖样细胞 0.02%-0.19%、定型内胚层 0.48%-1.63%、原条 0.31%-0.90%、涌现中胚层 0.15%-1.83%、晚期中胚层 1.61%-12.81%、神经上皮 0.18%-3.13%、神经嵴源性细胞 0.18%-2.84%。

原始态干细胞的这种独特分化能力模拟了囊胚内细胞团的特征，即可同时产生上胚层和下胚层谱系。除此之外，在第 20 天和第 30 天，原始态干细胞衍生分化产物中包含了更多的谱系，如胚外谱系和原始生殖样细胞类型，而始发态干细胞衍生分化产物中主要有神经外胚层细胞类型组成。由此可见，原始态干细胞在体外 3D 培养方法下优于始发态干细胞的分化潜能。

25

实施例 7 不同胚胎干细胞在畸胎瘤形成的分化潜能比较

待人的始发态 PSCs 长至 70-80%，加入 1 mL PBS，轻轻清洗细胞，洗去残余培养基，移除 PBS；加入 1 mL TrypLE™ Express : 0.5mM EDTA (体积比为 1:1)。

将其消化成单细胞，取 100 万人的始发态 PSCs 用 100 μL 预冷的体积比为 1:1 的 DMEM/F12 基础培养基(Invitrogen 公司 cat. no. 11330-032 or 31330-038 和 Matrigel®基质胶的混合液进行重悬，得到重悬液。在进行移植之前，重悬液被放置在冰上。移植应立即进行。后续的移植实验和具体实验步骤见实施例 4。

为了比较始发态干细胞和原始态干细胞在畸胎瘤形成方法下的分化潜能的不同。对所获得的畸胎瘤(第 14 和 21 天)进行了单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)建库分析。如图 4，图 5 所示，始发态干细胞衍生的畸胎瘤谱系与原始态干细胞衍生的体外 3D 培养分化产物谱系相当；与原始态干细胞衍生的畸胎瘤谱系相比，始发态干细胞衍生的畸胎瘤谱系主要包含神经外胚层细胞类型和少量胚外谱系，而原始态干细胞衍生的畸胎瘤有更多的胚外谱系和原始生殖样细胞类型。此外，从图 5 中还可以看出原始态干细胞衍生的畸胎瘤中胚胎外组织中各细胞类型的占比为：内脏内胚层 0.46%-11.57%、前内胚层内胚层 0.14%-33.17%和、卵黄囊内胚层 1.19%-4.24%、胚外中胚层 0.33%-32.35%、间皮细胞 4.22%-4.33%和、尿囊细胞 0.14%-4.26%、胚外中胚层来源的造血细胞前体中胚层祖细胞 0.1%-0.5%、血管母细胞 0.1%-0.5%、内皮细胞 1.40%-4.79%、动脉内皮细胞 0.04%-0.1%、造血细胞前体 0.01%-0.1%、巨核细胞 0.01%-0.1%、红细胞 0.1%-0.5%和、髓系细胞前体 0.01%-0.1%、羊膜外胚层细胞 0.21%-10.23%、羊膜/非神经外胚层祖细胞 0.09%-3.00%；胚胎内组织中各主要细胞类型的占比为：上胚层 2.18%-33.61%、定型上胚层 2.57%-2.86%、原始生殖样细胞 0.02%-0.19%、定型内胚层 0.48%-1.63%、原条 0.31%-0.90%、涌现中胚层 0.15%-1.83%、晚期中胚层 1.61%-12.81%、神经上皮 0.18%-3.13%、神经嵴源性细胞 0.18%-2.84%。

由此可见，原始态干细胞在畸胎瘤形成方法下优于始发态干细胞的分化潜能。

45

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权 利 要 求 书

1. 一种类胚胎模型的构建方法, 其特征在于, 包括: 将原始态干细胞进行体外培养或将所述原始态干细胞注射到免疫缺陷动物体内分化, 得到所述类胚胎模型。
- 5 2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述体外培养包括:
将所述原始态干细胞在第一培养基和第二培养基中进行第一培养处理, 得到第一细胞群;
将所述第一细胞群在第三培养基中进行第二培养处理, 得到第二细胞群;
将所述第二细胞群在第四培养基和第五培养基中进行第三培养处理, 得到所述类胚胎模型。
- 10 3. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 将所述原始态干细胞预先进行预培养处理, 所述预培养处理后的所述原始态干细胞在培养皿中覆盖度为 70~80%;
任选地, 将预培养处理后的所述原始态干细胞进行消化处理;
任选地, 所述消化处理是在 TrypLE™ Express 酶存在的条件下进行的。
4. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述第一培养基包含人始发态多能干细胞完全培养基、盘尼西林-链霉素和 Rock 通路抑制剂;
- 15 任选地, 所述第二培养基包含人始发态多能干细胞完全培养基和盘尼西林-链霉素;
任选地, 所述盘尼西林-链霉素在所述第一培养基或所述第二培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%;
任选地, 所述 Rock 通路抑制剂包括 Y27632;
任选地, 所述 Y27632 在所述第一培养基中的终浓度为 45~55 μM ;
任选地, 所述第一培养处理是在低吸附圆底 96 孔板、3D 支架或微流控装置中进行的;
- 20 任选地, 所述第一培养处理的时间为 5~7 天, 优选 5 天;
任选地, 所述第一培养处理包括第一阶段培养处理和第二阶段培养处理, 所述第一阶段培养处理是在所述第一培养基中进行的, 所述第二阶段培养处理是在所述第二培养基中进行的;
任选地, 所述第一阶段培养处理的时间为 3 天, 任选地, 将所述原始态干细胞在所述第一培养基中进行第一阶段培养处理 1 天后, 更换所述第一培养基, 继续将所述原始态干细胞在所述第一培养基中进行第一阶段培养处理 2 天;
- 25 任选地, 所述第二阶段培养处理的时间为 2~4 天, 优选 2 天。
5. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述第三培养基包含 DMEM-F12 基础培养基、N2 补充物、谷氨酰胺酶、非必需氨基酸、肝素和盘尼西林-链霉素;
任选地, 所述 N2 补充物在所述第三培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%;
- 30 任选地, 所述谷氨酰胺酶在所述第三培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%;
任选地, 所述非必需氨基酸在所述第三培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%;
任选地, 所述肝素在所述第三培养基中的终浓度为 0.5~1.5 $\mu\text{g/mL}$;
任选地, 所述盘尼西林-链霉素在所述第三培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%;
任选地, 所述第二培养处理的时间为 3~5 天。
- 35 6. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 在进行所述第三培养处理之前, 将所述第二细胞群与基质胶混合。
7. 根据权利要求2~6 任一项所述的方法, 其特征在于, 所述第四培养基包含 DMEM-F12 基础培养基、神经基础培养基、N2 补充物、谷氨酰胺酶、非必需氨基酸、胰岛素、 β 巯基乙醇、盘尼西林-链霉素和不含有维生素 A 的 B27 补充物;
- 40 任选地, 所述第五培养基包括 DMEM-F12 基础培养基、神经基础培养基、N2 补充物、谷氨酰胺酶、非必需氨基酸、胰岛素、 β 巯基乙醇、盘尼西林-链霉素和含有维生素 A 的 B27 补充物;
任选地, 所述 DMEM-F12 基础培养基与神经基础培养基的体积比为 1:(0.8~1.2);
任选地, 所述 N2 补充物在所述第四培养基或所述第五培养基中的质量体积分数为 0.2~0.7%;
任选地, 所述谷氨酰胺酶在所述第四培养基或所述第五培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%;
- 45 任选地, 所述非必需氨基酸在所述第四培养基或所述第五培养基中的质量体积分数为 0.2~0.7%;
任选地, 所述胰岛素在所述第四培养基或所述第五培养基中的终浓度为 1~1.5 $\mu\text{g/mL}$;
任选地, 所述 β 巯基乙醇在所述第四培养基或所述第五培养基中的终浓度为 0.1~0.25 μM ;
任选地, 所述盘尼西林-链霉素在所述第四培养基或所述第五培养基中的质量体积分数为 0.5~1.5%;
任选地, 所述不含有维生素 A 的 B27 补充物在所述第四培养基中的质量体积分数为 0.2~0.7%;
- 50 任选地, 所述含有维生素 A 的 B27 补充物在所述第五培养基中的质量体积分数为 0.2~0.7%;
任选地, 所述第三培养处理包括第三阶段培养处理和第四阶段培养处理, 所述第三阶段培养处理是在第四培养基中进行的, 所述第四阶段培养处理是在第五培养基中进行的;

- 任选地,所述第三阶段培养处理的时间为3~5天,优选4天;
任选地,所述第四阶段培养处理的时间为13~18天,优选16天;
任选地,所述第四阶段培养处理是在摇床上进行的;
任选地,所述摇床的转速为60~80 RPM。
- 5 8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,将所述原始态干细胞注射到免疫缺陷动物体内分化之前,将所述原始态干细胞与含有基质胶的DMEM-F12基础培养基进行混合;
任选地,所述DMEM-F12基础培养基与所述基质胶的体积比为1:(0.8~1.2);
任选地,所述原始态干细胞的数量与所述含有基质胶的DMEM-F12基础培养基的体积的比例为 5^4 个:(0.8~1.2) μ L。
- 10 9. 根据权利要求1或8所述的方法,其特征在于,所述动物选自免疫缺陷鼠、免疫缺陷兔、免疫缺陷牛、免疫缺陷猪或免疫缺陷猴;
任选地,所述原始态干细胞选自多能干细胞、全能干细胞、原始内胚层细胞和滋养外胚层细胞的至少之一;
任选地,所述原始态干细胞的来源选自人、牛、猴、猪或小鼠;
15 任选地,所述注射选自皮下注射;
任选地,所述体内分化时间为13~70天。
10. 一种类胚胎模型,其特征在于,由权利要求1~9任一项所述的方法培养得到。
11. 一种类胚胎模型,其特征在于,包括胚胎外组织和胚胎内组织。
12. 根据权利要求11所述的类胚胎模型,其特征在于,所述胚胎外组织包括:内脏内胚层、前内脏
20 内胚层、卵黄囊内胚层、胚外中胚层、间皮细胞、尿囊细胞、胚外中胚层来源的造血细胞前体中胚层祖细胞、胚外中胚层来源的血管母细胞、胚外中胚层来源的内皮细胞、胚外中胚层来源的动脉内皮细胞、胚外中胚层来源的造血细胞前体、胚外中胚层来源的巨核细胞、胚外中胚层来源的红细胞、胚外中胚层来源的髓系细胞前体、羊膜外胚层细胞和羊膜/非神经外胚层祖细胞;
任选地,所述胚胎内组织包括上胚层、定型上胚层、原始生殖样细胞、定型内胚层、原条、涌现中
25 胚层、晚期中胚层、神经上皮和神经嵴源性细胞。
13. 根据权利要求12所述的类胚胎模型,其特征在于,所述内脏内胚层中表达的基因包括 *HNF4A* 和 *SOX17*;所述前内脏内胚层中表达的基因包括 *OTX2* 和 *CXCR4*;所述卵黄囊内胚层中表达的基因包括 *HNF4A*,且低表达或不表达 *SOX17*;所述胚外中胚层细胞中表达的基因包括 *ANXA1*, *LUM*, *NID2* 和 *FRZB*;所述间皮细胞中表达的基因包括 *AQP1*;所述尿囊细胞中表达的基因包括 *TBX4* 和 *HOXA13*;所述胚外
30 中胚层来源的造血细胞前体中胚层祖细胞中表达的基因包括 *BMP4* 和 *WNT5A*;所述胚外中胚层来源的血管母细胞中表达的基因包括 *ETV2*, *TAL1*, *BMP4* 和 *WNT5A*;所述胚外中胚层来源的内皮细胞中表达的基因包括 *CDH5* 和 *CD34*;所述胚外中胚层来源的动脉内皮细胞中表达的基因包括 *GJA4* 和 *GJA5*;所述胚外中胚层来源的造血细胞前体中表达的基因包括 *RUNX1* 和 *SPN*;所述胚外中胚层来源的巨核细胞中表达的基因包括 *PPBP*;所述胚外中胚层来源的红细胞中表达的基因包括 *GATA1* 和 *HBE1*;所述胚外中
35 胚层来源的髓系细胞前体中表达的基因包括 *CSF1R*;所述羊膜外胚层细胞中表达的基因包括 *ISL1* 和 *GABRP*;所述羊膜/非神经外胚层祖细胞中表达的基因包括 *CLDN10*, *AMR2*, *PCAT14* 和 *VGLL1*;所述上胚层中表达的基因包括 *POU5F1* 和 *DPPA4*;所述定型上胚层中表达的基因包括 *TNFRSF12A* 和 *JUND*;所述原始生殖样细胞中表达的基因包括 *NANOG*, *NANOS3*, *TFAP2C* 和 *SOX17*;所述定型内胚层中表达的基因包括 *HHEX*;所述原条中表达的基因包括 *TBXT*;所述涌现中胚层中表达的基因包括 *LHX1*;所述晚
40 期中胚层中表达的基因包括 *MYL7*,且低表达或不表达 *TBXT*;所述神经上皮中表达的基因包括 *PAX6*;所述神经嵴源性细胞中表达的基因包括 *SOX10* 和 *MPZ*;
任选地,所述定型内胚层、所述内脏内胚层、所述前内脏内胚层和所述卵黄囊内胚层共同表达 *FOXA2*。
14. 根据权利要求12所述的类胚胎模型,其特征在于,所述胚胎外组织中各细胞类型的占比为:所述
45 内脏内胚层0.46%-11.57%、所述前内脏内胚层0.14%-33.17%、所述卵黄囊内胚层1.19%-4.24%、所述胚外中胚层0.33%-32.35%、所述间皮细胞4.22%-4.33%、所述尿囊细胞0.14%-4.26%、所述胚外中胚层来源的造血细胞前体中胚层祖细胞0.1%-0.5%、所述血管母细胞0.1%-0.5%、所述内皮细胞1.40%-4.79%、所述动脉内皮细胞0.04%-0.1%、所述造血细胞前体0.01%-0.1%、所述巨核细胞0.01%-0.1%、所述红细胞0.1%-0.5%、所述髓系细胞前体0.01%-0.1%、所述羊膜外胚层细胞0.21%-10.23%、所述羊膜/非神经
50 外胚层祖细胞0.09%-3.00%;
任选地,所述胚胎内组织中各主要细胞类型的占比为:所述上胚层2.18%-33.61%、所述定型上胚层2.57%-2.86%、所述原始生殖样细胞0.02%-0.19%、所述定型内胚层0.48%-1.63%、所述原条0.31%-0.90%、所述涌现中胚层0.15%-1.83%、所述晚期中胚层1.61%-12.81%、所述神经上皮0.18%-3.13%、所述神经

畸源性细胞 0.18%-2.84%。

15. 根据权利要求 11~14 任一项所述的类胚胎模型，其特征在于，所述胚胎外组织和胚胎内组织中各细胞类型的占比如图 5 所示。

5 16. 根据权利要求 10~15 任一项所述的类胚胎模型，其特征在于，所述类胚胎模型可模拟原肠胚时期的细胞类型。

17. 权利要求 10~16 任一项所述的类胚胎模型在构建卡耐基发育阶段模型中的用途；

任选地，所述卡耐基发育阶段选自第 3 期到第 9 期的发育阶段。

18. 权利要求 10~16 任一项所述的类胚胎模型在药物筛选中的用途，所述药物用于干预原肠胚时期胚胎发育。

10 19. 权利要求 10~16 任一项所述的类胚胎模型在构建疾病模型中的用途，所述疾病模型包括发育疾病模型；

任选地，所述发育疾病模型包括胚胎植入缺陷模型或唐氏综合征模型。

20. 权利要求 10~16 任一项所述的类胚胎模型在获得特定谱系祖细胞中的用途。

15 21. 根据权利要求 20 所述的用途，其特征在于，包括将所述类胚胎模型中的特定谱系进行扩大化培养处理，得到所述特定谱系祖细胞；

任选地，进一步包括对扩大化培养处理后的所述特定谱系进行基因编辑或细胞分化，或利用扩大化培养处理后的所述特定谱系进行细胞治疗。

22. 权利要求 10~16 任一项所述的类胚胎模型在构建特定类器官模型或细胞 3D 聚合体中的用途。

20 23. 根据权利要求 22 所述的用途，其特征在于，包括利用诱导手段将所述类胚胎模型诱导为特定的类器官模型或所述细胞 3D 聚合体；

任选地，所述诱导手段包括添加小分子化合物、细胞共培养或添加细胞因子。

24. 一种筛选药物的方法，所述药物用于干预原肠胚时期胚胎发育，其特征在于，将待筛选药物添加于权利要求 1~9 任一项所述的类胚胎模型的构建方法的培养过程中或将所述待筛选药物与权利要求 10~16 任一项所述的类胚胎模型进行接触处理；

25 25. 根据权利要求 1~9 任一项所述的构建方法所获得的类胚胎模型或权利要求 10~16 任一项所述类胚胎模型是否发生预期变化，确定目标药物。

26. 根据权利要求 24 所述的方法，其特征在于，添加药物后相比于添加药物前，权利要求 1~9 任一项所述的构建方法所获得的类胚胎模型发生预期变化，是待筛选药物为目标药物的指示。

30 26. 根据权利要求 24 所述的方法，其特征在于，接触处理后相比于接触处理前，权利要求 10~16 任一项所述的类胚胎模型发生预期变化，是待筛选药物为目标药物的指示。