



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105062966 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201510484136. 9

(22) 申请日 2015. 07. 31

(71) 申请人 何洁

地址 250200 山东省章丘市明水镇明堂路泉  
韵花苑 2 号楼 2-602

(72) 发明人 何洁

(51) Int. Cl.

C12N 5/0775(2010. 01)

C12N 5/073(2010. 01)

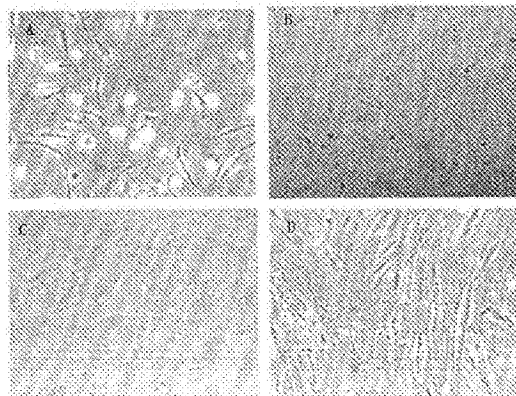
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的生产方法

(57) 摘要

本发明公开了一种人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的生产方法,包括以下步骤:胎盘标本处理,得处理后的胎盘组织;组织消化,得到细胞悬液;密度梯度密度分离,得到滋养细胞和胎盘间充质干细胞;滋养细胞的获得;胎盘间充质干细胞的培养。本发明采用 HyQTase 和 DNase I 共同消化组织,经密度梯度分离获得大量的纯度和活力都比较理想的滋养细胞和胎盘间充质干细胞,且去除了消化碎片、成纤维细胞和红细胞,并把滋养细胞和胎盘间充质干细胞区分开来,获得的细胞滋养细胞纯度可达 90%,胎盘间充质干细胞在培养时,在微重力环境下,依次通过电磁场和声波处理间充质干细胞,并注入一种抗氧化剂,一直可以传代至第九或十代。



1. 一种人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的生产方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 胎盘标本处理:无菌条件下将娩出胎盘剥除羊膜,剪除胎盘母体面 2.0 ~ 3.0mm 组织后,剪下胎盘小叶,称取 50g,浸泡于含有抗菌肽的保存液中,所述含有抗菌肽的保存液是将 10 ~ 100  $\mu$ g/ml 多聚赖氨酸加入到 10 ~ 100  $\mu$ g/ml 没食子酸酯 EGCG 中配制而成,浸泡预定时间后,将剪下的胎盘小叶用手术剪剪碎,用生理盐水反复冲洗血污,直至冲洗液接近无色,得处理后的胎盘组织;

(2) 组织消化:用 15mmol/L 三羟甲基氨基甲烷,加入哈特曼 -D 溶液,调节 pH 至 8.0,作为消化缓冲液,加入终浓度为 2.4g/L HyQTase 和 300U/mL DNase I 组成的消化液,取消化液 320mL,将冲洗后的胎盘组织分多次进行消化,每次在 37 $\pm$ 0.2 $^{\circ}$ C、180r/min 恒温气浴摇床消化 2min,消化完毕后,无菌去除 HyQTase 溶液,用新生牛血清终止消化反应,得到细胞悬液;

(3) 密度梯度密度分离:在 50mL 离心管中逐层铺入 7 个密度的 Percoll 分离液,每个密度 5mL,再缓缓加入 5mL 细胞悬液,使用水平离心机室温下 1200g 离心 20min,小心弃除离心管 20mL 刻度以上的液体,收集 12.5 ~ 20.0mL 刻度的细胞层和 12.5 ~ 7.5mL 刻度的液体,分别放入不同离心管里,用 D-Hank's 液稀释 5 倍后,室温下 1000g 离心 15min,得密度梯度分离后的滋养细胞和胎盘间充质干细胞;

(4) 滋养细胞的获得:用含体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM/F12、丙酮酸盐、10mg/L 亚硒酸钠胰岛素、2mg/L 乙醇胺和 20 毫  $\mu$ g/ml 的 bFGF 配制成悬浮液,将密度梯度离心后的滋养细胞进行重悬,用差速贴壁法去除成纤维细胞,获得滋养细胞;

(5) 胎盘间充质干细胞的培养:用含体积分数为 10%胎牛血清的 DMEM/F12、丙酮酸盐、10mg/L 亚硒酸钠胰岛素、2mg/L 乙醇胺和 20 毫  $\mu$ g/ml 的 bFGF、增殖促进剂配制成悬浮液,将密度梯度离心后获得的胎盘间充质干细胞进行重悬,在微重力环境下,依次通过电磁场和声波处理间充质干细胞,计数并接种于 75mm 的培养瓶,放入 37 $^{\circ}$ C、二氧化碳浓度为 0.5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,2d 换液 1 次,细胞生长至 90% 融合后,消化并计数细胞,按 1 : 4 比例传代,细胞传代后生长速度较快,细胞形态比较均一,变化形态明显的第 2 天用 100ng/ml 的 BMP4 处理,第 3 天或 4 用 10ng/ml 的 BMP4 处理,第 5 天用 1ng/ml 的 BMP4 处理,传至第 8 代时细胞开始出现老化现象,细胞增殖缓慢,细胞体积增大,胞浆中出现很多黑色颗粒,此时需要注入一种抗氧化剂,所述抗氧化剂为聚乙二醇-缀合过氧化氢酶或 N-乙酰半胱氨酸,抑制间充质干细胞的衰老,用于增加干细胞产量,直到传至第九或十代。

2. 如权利要求 1 所述的一种人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的生产方法,其特征 在于所述增殖促进剂为凝结的脐带血液的液体成分。

3. 如权利要求 1 所述的一种人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的生产方法,其特征 在于所述微重力环境是通过多轴旋转所形成的模拟微重力环境。

## 一种人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的生产方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,具体是涉及一种人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的生产方法。

### 背景技术

[0002] 常规分离方法通常难以获得大量纯度较高的滋养细胞和胎盘间充质干细胞;应用流式细胞仪分选法或磁珠分选法获得的细胞虽然纯度好,但成本很高。

[0003] 滋养细胞在体外培养和传代比较困难,很多研究者都采用分离细胞后直接处理或干预的方案,因此一次性获得大量的滋养细胞对实验进行是非常有利的。胎盘间充质干细胞在胎盘组织的丰度低,想获得一定数量的原代细胞也需要很多的胎盘组织。

[0004] 现有技术中,胎盘的细胞成分较复杂,其中所包含的滋养细胞在母胎免疫耐受过程中起重要作用,胎盘间充质干细胞具有多向分化潜能以及抑制淋巴细胞增殖的特性,常规分离方法通常难以获得大量且纯度较高的上述两种细胞。

### 发明内容

[0005] 本发明解决的技术问题是针对现有技术存在的缺陷,提供一种人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的生产方法,可以达到一次操作即可同时获得大量、较高纯度的人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的目的。

[0006] 本发明解决上述技术问题的技术方案为:

[0007] 一种人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的生产方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 胎盘标本处理:无菌条件下将娩出胎盘剥除羊膜,剪除胎盘母体面 2.0 ~ 3.0mm 组织后,剪下胎盘小叶,称取 50g,浸泡于含有抗菌肽的保存液中,所述含有抗菌肽的保存液是将 10 ~ 100  $\mu$ g/ml 多聚赖氨酸加入到 10 ~ 100  $\mu$ g/ml 没食子酸酯 EGCG 中配制而成,浸泡预定时间后,将剪下的胎盘小叶用手术剪剪碎,用生理盐水反复冲洗血污,直至冲洗液接近无色,得处理后的胎盘组织;

[0009] (2) 组织消化:用 15mmol/L 三羟甲基氨基甲烷,加入哈特曼 -D 溶液,调节 pH 至 8.0,作为消化缓冲液,加入终浓度为 2.4g/L HyQTase(购于 HyClone 公司)和 300U/mL DNase I 组成的消化液,取消化液 320mL,将冲洗后的胎盘组织分多次进行消化,每次在 37 $\pm$ 0.2 $^{\circ}$ C、180r/min 恒温气浴摇床消化 2min,消化完毕后,无菌去除 HyQTase 溶液,用新生牛血清终止消化反应,得到细胞悬液;

[0010] (3) 密度梯度密度分离:在 50mL 离心管中逐层铺入 7 个密度的 Percoll 分离液,每个密度 5mL,再缓缓加入 5mL 细胞悬液,使用水平离心机室温下 1200g 离心 20min,小心弃除离心管 20mL 刻度以上的液体,收集 12.5 ~ 20.0mL 刻度的细胞层和 12.5 ~ 7.5mL 刻度的液体,在离心管 15 ~ 20mL 刻度处可见明显的白色云雾状细胞层,此处对应的 Percoll 相对密度为 1.046 ~ 1.059,是滋养细胞存在的区域;离心管 10mL 刻度附近可见不明显的细胞层,此处密度为 1.072,是淋巴细胞和胎盘间充质干细胞存在的区域,分别放入不同离心

管里,用 D-Hank's 液稀释 5 倍后,室温下 1000g 离心 15min;离心管底可见白色细胞团得梯度密度分离后的滋养细胞和胎盘间充质干细胞;

[0011] (4) 滋养细胞的获得:用含体积分数为 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12、丙酮酸盐、10mg/L 亚硒酸钠胰岛素、2mg/L 乙醇胺和 20 毫  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 bFGF 配制成悬浮液,将密度梯度离心后的滋养细胞进行重悬,用差速贴壁法去除成纤维细胞,获得滋养细胞;经计数,获得的滋养细胞量可达  $(5.48 \pm 1.98) \times 10^8$  个;

[0012] (5) 胎盘间充质干细胞的培养:用含体积分数为 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12、丙酮酸盐、10mg/L 亚硒酸钠胰岛素、2mg/L 乙醇胺和 20 毫  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 bFGF、增殖促进剂配制成悬浮液,将密度梯度离心后获得的胎盘间充质干细胞进行重悬,在微重力环境下,依次通过电磁场和声波处理间充质干细胞;计数并接种于 75mm 的培养瓶,在培养基中补充 4mg/ml 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、10ng/ml N-乙酰基-L-半胱氨酸、100ng/ml 氯化钙,放入 37°C、二氧化碳浓度为 0.5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,2d 换液 1 次,细胞生长至 90%融合后,消化并计数细胞,按 1:4 比例传代,细胞传代后生长速度较快,细胞形态比较均一,变化形态明显的第 2 天用 100ng/ml 的 BMP4 处理,第 3 天或 4 用 10ng/ml 的 BMP4 处理,第 5 天用 1ng/ml 的 BMP4 处理,传至第 8 代时细胞开始出现老化现象,细胞增殖缓慢,细胞体积增大,胞浆中出现很多黑色颗粒,此时需要注入一种抗氧化剂,所述抗氧化剂为聚乙二醇-缀合过氧化氢酶(PEG-过氧化氢酶)或 N-乙酰半胱氨酸,或使用抗氧化剂,所述抗氧化剂为 1-500  $\mu\text{M}$  丙酮酸乙酯(EP),抑制间充质干细胞的衰老,用于增加干细胞产量,直到传至第九或十代。

[0013] 进一步地,所述增殖促进剂为凝结的脐带血液的液体成分,以促进细胞生长。

[0014] 进一步地,所述微重力环境是通过多轴旋转所形成的模拟微重力环境,可以获得具有更小的平均气泡尺寸的间充质干细胞。

[0015] 本发明的有益效果是:

[0016] (1) 本发明采用 HyQTase 和 DNase I 共同消化组织,经梯度密度分离后,可同时一次性获得大量的滋养细胞和较多的胎盘间充质干细胞,对细胞损伤小,所获得细胞纯度和活力都比较理想;

[0017] (2) 使用不连续梯度的 Percoll 细胞分离液可以去除消化碎片、成纤维细胞和红细胞,并把滋养细胞和胎盘间充质干细胞区分开来;获得的细胞滋养细胞在经差速贴壁法贴除成纤维细胞后,纯度可达 90%,而且成本较低。

[0018] (3) 密度梯度分离后获得的胎盘间充质干细胞在培微重力环境下,依次通过电磁场和声波处理间充质干细胞,并注入一种抗氧化剂,一直可以传代至第九或十代。

#### 附图说明

[0019] 图 1 为本发明实施例中各个浓度 Percoll 分布位置、相对密度和对应的细胞种类图;

[0020] 图 2 为本发明实施例中梯度密度分离后接种培养的胎盘间充质干细胞生长形态( $\times 100$ )图,A:第四代,B:第八代,C:第九代,D:第十代;

[0021] 图 3 为本发明实施例中胎盘间充质干细胞的成骨分化潜能( $\times 100$ )图,A:诱导实验组,B:对照组。

### 具体实施方式

[0022] 下面结合实验室进行的具体试验对本发明的技术方案作进一步详细说明,但本发明不限于以下列举的特定例子。

[0023] 一种人胚胎滋养细胞和胎盘间充质干细胞的生产方法,包括以下步骤:

[0024] (1) 胎盘标本处理:无菌条件下将娩出胎盘剥除羊膜,剪除胎盘母体面 2.0mm 组织后,剪下胎盘小叶,称取 50g,浸泡于含有抗菌肽的保存液中,所述含有抗菌肽的保存液是将 10  $\mu$ g/ml 多聚赖氨酸加入到 10  $\mu$ g/ml 没食子酸酯 EGCG 中配制而成,浸泡预定时间后,将剪下的胎盘小叶用手术剪剪碎,用生理盐水反复冲洗血污,直至冲洗液接近无色,得处理后的胎盘组织;

[0025] (2) 组织消化:用 15mmol/L 三羟甲基氨基甲烷,加入哈特曼 -D 溶液,调节 pH 至 8.0,作为消化缓冲液,加入终浓度为 2.4g/L HyQTase(购于 HyClone 公司)和 300U/mL DNase I 组成的消化液,取消化液 320mL,将冲洗后的胎盘组织分多次进行消化,每次在 36.8 $^{\circ}$ C、180r/min 恒温气浴摇床消化 2min,消化完毕后,无菌去除 HyQTase 溶液,用新生牛血清终止消化反应,得到细胞悬液;

[0026] (3) 密度梯度密度分离:在 50mL 离心管中逐层铺入 7 个密度的 Percoll 分离液,每个密度 5mL,如表 1 所示,再缓缓加入 5mL 细胞悬液,使用水平离心机室温下 1200g 离心 20min,小心弃除离心管 20mL 刻度以上的液体,收集 12.5~20.0mL 刻度的细胞层和 12.5~7.5mL 刻度的液体,在离心管 15~20mL 刻度处可见明显的白色云雾状细胞层,此处对应的 Percoll 相对密度为 1.046~1.059,是滋养细胞存在的区域;离心管 10mL 刻度附近可见不明显的细胞层,此处密度为 1.072,是淋巴细胞和胎盘间充质干细胞存在的区域,见图 1,分别放入不同离心管里,用 D-Hank's 液稀释 5 倍后,室温下 1000g 离心 15min;离心管底可见白色细胞团得梯度密度分离后的滋养细胞和胎盘间充质干细胞;

[0027]

表1 梯度密度分离液的配制和密度梯度。  
Table 1 Dilution scheme for preparation of Percoll gradients.

90% Percoll., (mL).,	D-Hank's., (mL).,	Density.,	Final concentration., (%).,
14.4.,	5.6.,	1.085.,	55.,
12.2.,	7.8.,	1.072.,	55.,
10.0.,	10.0.,	1.059.,	45.,
7.8.,	12.2.,	1.046.,	35.,
5.6.,	14.4.,	1.033.,	25.,
3.3.,	16.7.,	1.020.,	15.,
1.1.,	18.9.,	1.007.,	5.,

[0028] (4) 滋养细胞的获得 :用含体积分数为 10%胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/F12、丙酮酸盐、10mg/L 亚硒酸钠胰岛素、2mg/L 乙醇胺和 20 毫  $\mu$ g/mL 的 bFGF 配制成悬浮液,将密度梯度离心后的滋养细胞进行重悬,用差速贴壁法去除成纤维细胞,获得滋养细胞 ;

[0029] 滋养细胞的鉴定 :所获滋养细胞取部分细胞,用 PBS 洗涤 2 次,调整细胞密度至  $1 \times 10^9/L$ 。0.5ml EP 管中加入 0.1mL 细胞悬液,按顺序加入小鼠抗人细胞角蛋白 7 单克隆抗体和 FITC 标记的羊抗鼠二抗孵育,设置一抗和 FITC 对照,流式细胞仪计数 10000 个细胞。经流式细胞仪检测,细胞角蛋白 7 阳性率为  $(90.00 \pm 4.36) \%$ 。

[0030] (5) 胎盘间充质干细胞的培养 :用含体积分数为 10%胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/F12、丙酮酸盐、10mg/L 亚硒酸钠胰岛素、2mg/L 乙醇胺和 20 毫  $\mu$ g/mL 的 bFGF、增殖促进剂配制成悬浮液,所述增殖促进剂为凝结的脐带血液的液体成分,以促进细胞生长,将密度梯度离心后获得的胎盘间充质干细胞进行重悬,在通过多轴旋转所形成的模拟微重力环境下,依次通过电磁场和声波处理间充质干细胞,以获得具有更小的平均气泡尺寸的间充质干细胞 ;计数并接种于 75mm 的培养瓶,在培养基中补充 4mg/ml 碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、10ng/ml N-乙酰基-L-半胱氨酸、100ng/ml 氯化钙,放入 37℃、二氧化碳浓度为 0.5%的 CO<sub>2</sub>培养箱中培养,2d 换液 1 次,细胞生长至 90%融合后,消化并计数细胞,按 1 : 4 比例传代,细胞传代后生长速度较快,细胞形态比较均一,变化形态明显的第 2 天用 100ng/ml 的 BMP4 处理,第 3 天或 4 用 10ng/ml 的 BMP4 处理,第 5 天用 1ng/ml 的 BMP4 处理,传至第 8 代时细胞开始出现老化现象,细胞增殖缓慢,细胞体积增大,胞浆中出现很多黑色颗粒,此时需要注入一种抗氧化剂,所述抗氧化剂为聚乙二醇-缀合过氧化氢酶 (PEG-过氧化氢酶) 或 N-乙酰半胱氨酸,或使用抗氧化物,所述抗氧化物为 1  $\mu$ M 丙酮酸乙酯 (EP),抑制间充质干细胞的衰老,用于增加干细胞产量,直到传至第九或十代,见图 2。

[0031] 胎盘间充质干细胞的鉴定 :

[0032] 细胞表型检测 :取第 3 代细胞,调整密度至  $1 \times 10^9/L$ ,每管加入 0.1mL 细胞

悬液。阴性对照管加入鼠 IgG-FITC, IgG-PE ;其他管分别加入鼠抗人抗体 CD14-PE, CD45-PE, CD34-PE, CD29-FITC, CD44-FITC, HLA-DR-FITC, 室温孵育 30min, 流式细胞仪计数 10000 个细胞。流式细胞仪检测结果显示, 第 3 代胎盘间充质干细胞表面标志物比较均一, 强表达透明质酸受体 CD44 和整合素家族成员 CD29, 阳性率分别为  $(99.86 \pm 0.05) \%$ ,  $(98.50 \pm 1.26) \%$  ;不表达造血干细胞标志物 CD34, CD45 和 CD14, 阳性率分别为  $(1.62 \pm 0.87) \%$   $(2.26 \pm 1.95) \%$ ,  $(2.08 \pm 0.97) \%$  ;强表达 HLA-ABC, 阳性率为  $(99.00 \pm 1.58) \%$ , 不表达 HLA-DR, 阳性率为  $(1.66 \pm 0.84) \%$ 。

[0033] 成骨潜能检测 :取第 3 代细胞接种于 12 孔板上, 每个标本 3 孔, 2 孔进行诱导, 1 孔作为阴性对照。每孔加 1mL 完全培养基, 含  $1 \times 10^4$  个细胞。放入培养箱中培养, 每 2d 换液 1 次, 直到细胞生长至 70% -80% 融合后开始诱导。成骨细胞诱导分化培养基为含体积分数为 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养基, 5mmol/L  $\beta$ -磷酸甘油, 50mg/L 维生素 C, 1nmol/L 地塞米松。每 2d 更换 1 次诱导分化培养基, 诱导 20d, 直至细胞出现聚集现象。将分化的胎盘间充质干细胞用 1mL PBS 洗 2 遍 ;每孔加入 1mL 体积分数为 10% 的中性甲醛, 室温固定细胞 10min。使用 10g/L 的茜素红 (pH 4.1) 染色, 室温 30min。再用去离子水洗除茜素红, 直到阴性对照孔背景染色基本消除。诱导 4 周后茜素红染色, 胎盘间充质干细胞可被染成鲜艳的橙红色, 但阴性对照孔基本不上色, 见图 3。

[0034] 以上所述为本发明最佳实施方式的举例, 其中未详细述及的部分均为本领域普通技术人员的公知常识。本发明的保护范围以权利要求的内容为准, 任何基于本发明的技术启示而进行的等效变换, 也在本发明的保护范围之内。

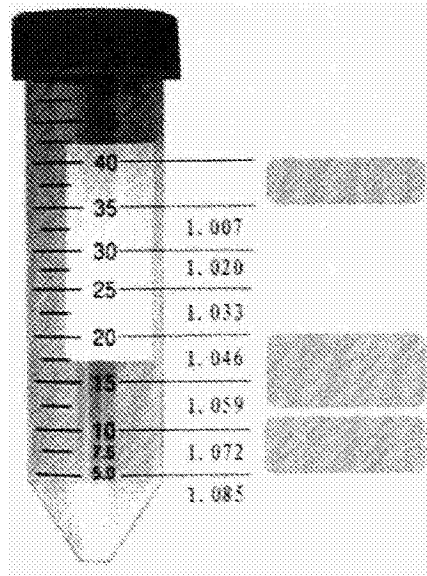


图 1

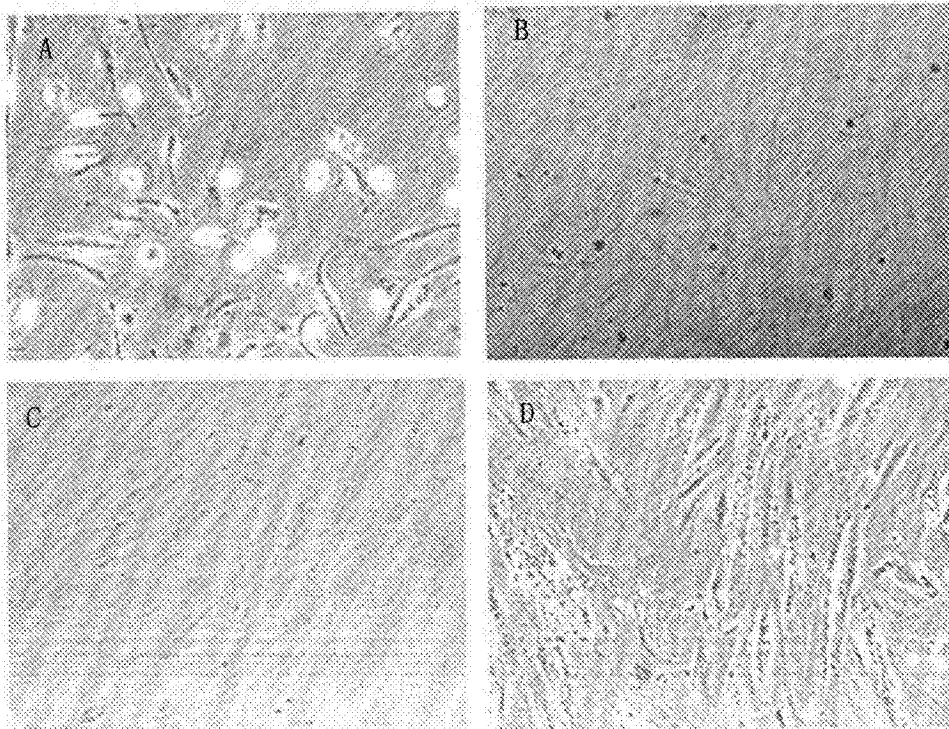


图 2



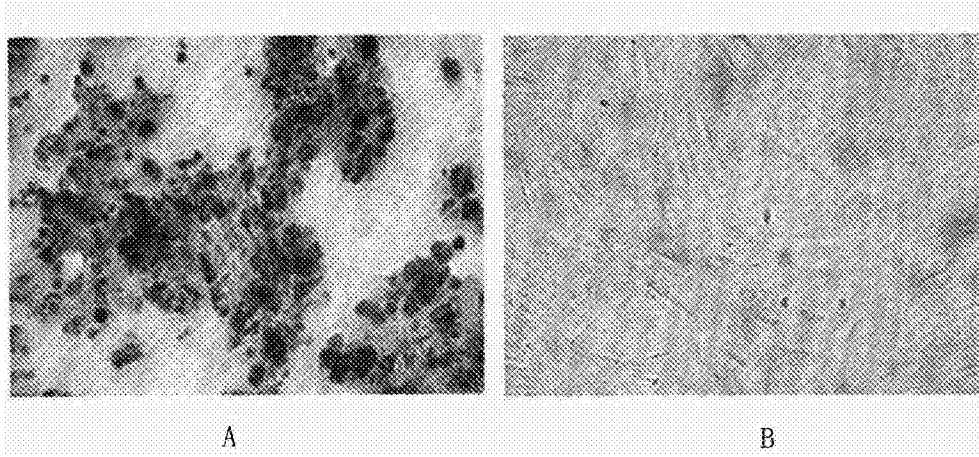


图 3