(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106801032 B
(45)授权公告日 2021.03.02

(21)申请号 201710085128.6

(22)申请日 2017.02.17

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106801032 A

(43)申请公布日 2017.06.06

(73)专利权人 沈阳艾米奥生物工程技术研发中心有限公司
地址 110000 辽宁省沈阳市浑南新区智慧二街400-4号

(72)发明人 庞希宁 施萍 赵峰 郎宏鑫

(74)专利代理机构 沈阳智龙专利事务所(普通合伙) 21115
代理人 宋铁军

(51)Int.Cl.
C12N 5/0735(2010.01)
C12N 5/073(2010.01)
G01N 33/68(2006.01)
G01N 15/14(2006.01)

(56)对比文件
CN 106244521 A,2016.12.21
CN 102492651 A,2012.06.13
金玲等.人羊膜上皮细胞的干细胞特性.《中国组织工程研究与临床康复》.2011,
肖露等.人羊膜上皮细胞的临床应用前景.《现代妇产科进展》.2015,

审查员 申延昊

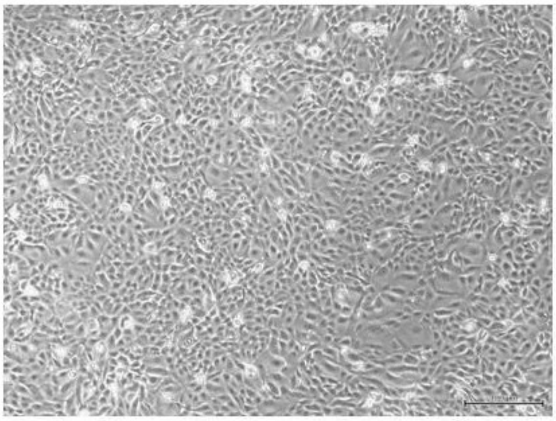
权利要求书3页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

人羊膜上皮干细胞库的构建方法

(57)摘要

本发明涉及一种人羊膜上皮干细胞库的构建方法。其方法是取人羊膜,用胰蛋白酶消化后,过滤制成单细胞悬液;在DMEM/F12培养基中添加人表皮细胞生长因子、人转铁蛋白、人胰岛素、亚硒酸钠、丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽、丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、脯氨酸和丝氨酸,使细胞在无血清条件下,置于37℃、饱和湿度、体积分数为5%的CO_2培养箱中培养,换液和传代。将体外培养和扩增获得细胞置液氮冷冻保存,建立可供检索的细胞信息档案,即构建人羊膜上皮干细胞库。本发明储存人羊膜上皮干细胞,其具有来源广泛、不受伦理限制的特点,细胞培养和储存介质无动物源性。可提供上皮干细胞进行细胞治疗及其他应用。



1.一种人羊膜上皮干细胞库的构建方法，其特征是包括下述步骤：

(1)人羊膜的选材严格遵循供体符合医学标准并建立资料档案；

(2)人羊膜收集及检测

取供体符合医学标准剖腹产或正常分娩的胎膜，在胎膜娩出5～10分钟内，从胎膜上钝性分离羊膜；进行ABO/Rh血型检测及HLA分型检测和微生物学检测，用磷酸盐缓冲液PBS或0.9%生理盐水反复漂洗后剪碎；用含1000U/ml庆大霉素和2.5μg/ml二性霉素B的磷酸盐缓冲液或0.9%生理盐水浸泡20～40分钟；

(3)人羊膜上皮干细胞分离及单细胞悬液的制备

取人羊膜先用终浓度 2.5g/L胰蛋白酶，室温消化30～60分钟，共2～4次，得到细胞悬液；用200目不锈钢网过滤将消化下来的细胞制成单细胞悬液，1000转/分钟～1500转/分钟，离心5分钟～10分钟，用PH 7.2磷酸缓冲液PBS洗2次；再离心，离心机的转速为1500转/分钟～2500转/分钟，时间为15分钟～30分钟，弃去上清液，即获得羊膜上皮干细胞；

(4)人羊膜上皮干细胞的无血清培养、纯化及扩增

将第(1)步所得细胞以2.5×10^{7} L^{-1}～2.5×10^{10} L^{-1}密度接种于无血清培养基中，置于37℃、饱和湿度、体积分数为5％的CO_2培养箱中进行培养，根据细胞生长情况，每24小时～48小时全量换液一次，待细胞达到80％～90％融合时，用终浓度2.5g/L胰蛋白酶消化，然后按1:2的比例或1:3的比例进行传代接种培养，并记为P1代，传代培养过程中每24小时～48小时全量换液，直至贴壁细胞彼此融合，铺满瓶底，重复上述操作进行传代培养，并记为P2代，继续上述传代培养过程使人羊膜上皮干细胞逐渐得到扩增和纯化；

所述无血清培养基采用

DMEM/F12按体积1:1混合15.0～15.6g/L

表皮细胞生长因子0.005～0.015 mg/L

人转铁蛋白1.0～7.0 mg/L

人胰岛素5.5～15 mg/L

亚硒酸钠$5.0\sim7.2\times10^{-3}$ mg/L

L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽300～500 mg/L

L-丙氨酸10～25 mg/L

L-天冬酰胺4.9～10.9 mg/L

L-天冬氨酸9.3～17.3 mg/L

L-谷氨酸10.7～18.7 mg/L

甘氨酸5.5 ～8.5 mg/L

L-脯氨酸 7.5～15.5 mg/L

L-丝氨酸6.5～11.5 mg/L

在上述第(4)步中，择优选择将第(3)步所得细胞以2.5×10^{7} L^{-1}-2.5×10^{10} L^{-1}密度接种于上述无血清培养基中培养；

无血清培养人羊膜上皮干细胞的增殖，应用MTS增殖检测分析检测在无血清培养基培养人羊膜上皮细胞的增殖能力，将P2代人羊膜上皮细胞按8×10^{3}/孔接种于96孔板内，待细胞贴壁后更换培养液，分别于24、48、72和96小时，加入20μL MTS/孔，于37 ℃、5% CO_2的孵箱内孵育1.5～2小时，检测各孔495nM处吸光值；

(5)人羊膜上皮干细胞库的构建

取培养P2～3代人羊膜上皮干细胞保存于无血清培养液加10%二甲基亚砜DMSO中，细胞浓度调整至1×10^5个/ml～1×10^8个/ml，分装于冷冻管中，标记冻存日期，置液氮冷冻；液氮冷冻温度为-196 ℃；按其新生儿性别和ABO/Rh分型及HLA分型进行保存，建立可供检索的细胞信息档案，即构建出人羊膜上皮干细胞库；

(6)人羊膜上皮干细胞复苏

羊膜上皮干细胞复苏方法 于60 ℃恒温水浴箱中，0.5～1 min内快速复苏，按$2.5\times10^3/cm^2$～$2.5\times10^5/cm^2$接种于塑料培养瓶内，用含DMEM/F12无血清培养基中培养，按1:3传代，扩增后获得大量人羊膜上皮干细胞，备用。

2.根据权利要求1所述的人羊膜上皮干细胞库的构建方法，其特征在于还包括细胞免疫荧光方法检测无血清培养人羊膜上皮细胞的表面标志物CK19、波形蛋白的表达的步骤：

(1)制备hAESCs细胞爬片：将处理好的干净的盖片，置入六孔板内，以2×10^5密度将经诱导分化后的hAESCs接种到放入盖片的六孔板内，置于37℃体积分数为5％的 CO_2饱和湿度培养箱中培养；

(2)固定：待细胞生长70-80％融合时，弃去培养液，用1×PBS洗2次，加入4％多聚甲醛溶液固定细胞，室温固定20分钟；

(3)洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS，50rpm/min洗涤5分钟，重复3次；

(4)封闭：加入封闭液(0.2%Triton-X-100通透，含2.5%驴血清的PBS中)，室温封闭30分钟～50分钟；

(5)一抗孵育：用500μl抗体稀释缓冲液(1×PBS，1％BSA)1∶200稀释一抗CK19、波形蛋白；覆盖盖片表面并置入湿盒内，4℃，过夜；

(6)洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS 1ml，50rpm/min洗涤5分钟，重复3次；

(7)二抗孵育：用500μl抗体稀释缓冲液(1×PBS，1％BSA)1∶500稀释二抗驴抗小鼠CK19、波形蛋白应用抗小鼠荧光二抗进行杂交，室温孵育1小时；

(8)洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS 1ml，50rpm/min洗涤5分 钟，重复3次；

(9)核染色：用去离子水(ddH_2O)按1∶1000的比例稀释二脒苯基吲哚(DAPI)储存液，工作液浓度为1μg/ml，染色1分钟，使用ddH_2O 洗3次，每次5分钟；

(10)封片：防淬灭剂封片，倒置荧光显微镜下观察。

3.根据权利要求1所述的人羊膜上皮干细胞库的构建方法，其特征在于还包括流式细胞仪检测在无血清培养基培养下羊膜上皮细胞的表面标志物的步骤；

流式细胞仪检测无血清培养人羊膜上皮细胞的表面标志物CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105，收集P1代人羊膜上皮细胞，接种于无血清培养基中，连续培养96小时；收取人羊膜上皮细胞，调整细胞密度为1×10^6/mL，取1mL细胞悬液，冷PBS洗细胞后100μl PBS重悬细胞，加入5μl单克隆抗体，设置未加抗体组作为阴性对照组，4℃避光孵育30min，冷PBS冲洗3次，用流式细胞仪检测CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105的表达。

4.根据权利要求1所述的人羊膜上皮干细胞库的构建方法，其特征在于所述的细胞扩增和纯化的过程优选如下：在第(3)步开始细胞培养后，培养48小时～72小时，更换培养液，弃去未贴壁的细胞，根据细胞生长情况，每24小时～48小时全量换液一次，待细胞达到80％

～90％融合时，用终浓度2.5g/L胰蛋白酶消化，然后按1:2的比例或1:3 的比例进行传代接种培养，并记为P1代，传代培养过程中每24小时～48小时全量换液，直至贴壁细胞彼此融合，铺满瓶底，重复上述操作进行传代培养，并记为P2代，继续上述传代培养过程。

人羊膜上皮干细胞库的构建方法

技术领域

[0001]　本发明属于生物技术领域的一种干细胞库的构建方法,具体涉及的是一种人羊膜上皮干细胞库的构建方法。

背景技术

[0002]　随着经济的发展,人民生活水平的提高,原先威胁人类健康的最大杀手——“传染病”在逐渐减少,而由于细胞、组织及器官损伤、病变及老化而引起的疾病逐渐增多。这些疾病仅仅靠传统的药物和医疗手段是不能解决的,而干细胞治疗将有望成为治疗这类疾病的主要手段。干细胞的自我更新和分化多能性的特点使之成为疾病发病机制研究,药物筛选以及细胞移植的理想对象和来源。干细胞治疗有望治疗细胞、组织及器官损伤、病变及老化而引起的疾病。

[0003]　细胞治疗实现产业化过程步骤包括细胞分离、培养、鉴定、建库、大量扩增、规模化生产等,构建人羊膜上皮干细胞库是实现转化医学研究,即临床细胞治疗的重要环节之一,建库是实现规模化生产先决条件。目前,细胞治疗需要提供细胞的来源主要为骨髓,但成人骨髓源干细胞数量及增殖分化潜能随年龄的增大而下降,病毒感染率较高,且供者骨髓细胞的采集须行骨髓穿刺术,来源受到限制。

[0004]　人羊膜上皮干细胞(human amniotic epithelial stem cells,简称hAESCs)是胎盘羊膜组织靠近胎儿侧的单层上皮细胞,来源于胚外外胚层。具有类似胚胎干细胞的多向分化潜能,及更好的外胚层分化潜能。属于多潜能干细胞,可分化成心肌样细胞、脂肪细胞和成骨细胞等。hAESCs含量丰富,分化能力强,可在体外进行分离、培养和扩增,且生物性能稳定,多次传代扩增仍能保持旺盛功能,可以为实验和临床提供充足的细胞来源;hAESCs不表达MHC-Ⅱ类抗原,仅表达少量的MHC-I类抗原,由于其不合成端粒酶,hAESCs植入体内并不形成畸胎瘤,hAESCs可产生许多细胞因子,有利于创伤的修复,适宜于不同个体之间的移植,也是细胞治疗的理想靶细胞。在干细胞治疗的安全性方面较一般干细胞更具临床应用潜力。具有比骨髓干细胞更强的扩增能力和免疫原性及成瘤性更低等骨髓干细胞无法比拟的优点。因此,构建国内外首个无血清培养细胞的“羊膜上皮干细胞库”,可为临床细胞治疗提供种子细胞库。

[0005]　由于hAESCs来源丰富,成本低廉,取材方便,为非创伤性,无伦理学问题,因此人羊膜上皮干细胞在临床疾病治疗中的作用也已在动物实验和人类疾病的治疗中取得进展和证实。这些疾病包括Alzheimer病(痴呆症)、脊髓损伤、中风、烧伤、心脏病、糖尿病、骨关节炎和类风湿性关节炎等。应用前景十分广阔。

[0006]　经专利检索比对发现申请专利号CN104480533A公开“一种胎盘干细胞库的构建方法及胎盘组织复苏方法”虽提及人羊膜上皮干细胞,但由于其细胞培养技术手段的局限性,例如在细胞培养基中仍含有异种胎牛血清等实际问题的存在,始终存在着临床应用生物安全隐患,长期以来一直困扰着人们无法从根本上得以解决,无法在临床上推广应用。如何研究发现用多种细胞因子和氨基酸等细胞营养成分培养基代替含异种胎牛血清的细胞培养

hAESCs是非常复杂困难的开辟性工作。需要研究人员作大量反复的科学实验才有解决。

发明内容

[0007] 本发明针对上述现有干细胞来源或者受伦理限制或数量有限的问题，而提供一种来源广泛、同种异体、不受伦理限制及无免疫原性问题的人羊膜上皮干细胞库的构建方法。同时，本发明还解决了以往人羊膜上皮干细胞库在临床应用方面所存在的安全隐患等问题，采用无血清培养基，不含异种动物原成分，以满足临床应用安全可靠的要求，有利于临床推广应用。

[0008] 本发明技术方案如下：人羊膜上皮干细胞库的构建方法，包括以下步骤：

[0009] (1)人羊膜的选材严格遵循供体符合医学标准并建立资料档案；

[0010] (2)人羊膜收集

[0011] 取供体符合医学标准剖腹产或正常分娩的胎膜，在胎膜娩出5～10分钟内，从胎膜上钝性分离羊膜；进行ABO/Rh血型检测及HLA分型检测和微生物学检测；用磷酸盐缓冲液(PBS)或0.9％生理盐水反复漂洗后剪成膜片；用含1000U/ml庆大霉素和2.5μg/ml二性霉素B的磷酸盐缓冲液或0.9％生理盐水浸泡20～30分钟。

[0012] (3)人羊膜上皮干细胞分离及单细胞悬液的制备

[0013] 取人羊膜10×10cm^2，先用终浓度2.5g/L胰蛋白酶，室温消化30分钟～60分钟，共2～4次，得到细胞悬液；用200目～300目不锈钢网过滤将消化下来的细胞制成单细胞悬液，1000转/分钟～1500转/分钟，离心5分钟～15分钟，用PH 7.2磷酸缓冲液PBS洗2次；再离心，离心机的转速为1500转/分钟～2500转/分钟，时间为15分钟～35分钟，弃去上清液，即获得羊膜上皮干细胞；

[0014] (4)人羊膜上皮干细胞的无血清培养、纯化及扩增

[0015] 将第(3)步所得细胞接种于无血清培养基中，置于37℃、饱和湿度、体积分数为5％的CO_2培养箱中进行传代培养，每24小时～48小时全量换液一次，使人羊膜上皮干细胞通过换液和传代逐渐得到扩增和纯化；

[0016] 所述人羊膜上皮干细胞无血清培养基，包括：

[0017] DMEM/F12(按体积1:1混合)15.0～15.6g/L

[0018] 表皮细胞生长因子0.005～0.015mg/L

[0019] 人转铁蛋白1.0～7.0mg/L

[0020] 人胰岛素5.5～15mg/L

[0021] 亚硒酸钠5.0～7.2×10^{-3}mg/L

[0022] L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽300～500mg/L

[0023] L-丙氨酸10～25mg/L

[0024] L-天冬酰胺4.9～10.9mg/L

[0025] L-天冬氨酸9.3～17.3mg/L

[0026] L-谷氨酸10.7～18.7mg/L

[0027] 甘氨酸5.5～-8.5mg/L

[0028] L-脯氨酸7.5～15.5mg/L

[0029] L-丝氨酸6.5～11.5mg/L

[0030] 在上述第(2)步中，择优选择将第(1)步所得细胞以2.5×10^{7} L^{-1}～2.5×10^{10} L^{-1}密度接种于上述无血清培养基中培养；

[0031] (5)人羊膜上皮干细胞库的构建

[0032] 取培养P2～3代人羊膜上皮干细胞保存于无血清培养液加10％二甲基亚砜DMSO中，细胞浓度调整至1×10^{5}个/ml～1×10^{8}个/ml，分装于冷冻管中，标记冻存日期，置液氮冷冻；液氮冷冻温度为-196℃；按其新生儿性别和ABO/Rh分型及HLA分型进行保存，建立可供检索的细胞信息档案，即构建出人羊膜上皮干细胞库；

[0033] (6)人羊膜上皮干细胞复苏

[0034] 羊膜上皮干细胞复苏方法于60℃恒温水浴箱中，0.5～1min内快速复苏，按2.5×10^{3}/cm^{2}～2.5×10^{5}/cm^{2}接种于塑料培养瓶内，用含DMEM/F12无血清培养基中培养，按1:3传代，扩增后获得大量人羊膜上皮干细胞，备用。

[0035] 本发明还包括细胞免疫荧光方法检测无血清培养人羊膜上皮细胞的表面标志物CK19、波形蛋白的表达的步骤：

[0036] 1、制备hAESCs细胞爬片：将处理好的干净的盖片，置入六孔板内，以2×10^{5}密度将经诱导分化后的hAESCs接种到放入盖片的六孔板内，置于37℃体积分数为5％的CO_2饱和湿度培养箱中培养；

[0037] 2、固定：待细胞生长70-80％融合时，弃去培养液，用1×PBS洗2次，加入4％多聚甲醛溶液固定细胞，室温固定20分钟；

[0038] 3、洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS，50rpm/min洗涤5分钟，重复3次；

[0039] 4、封闭：加入封闭液(0.2％Triton-X-100通透，含2.5％驴血清的PBS中)，室温封闭30分钟～50分钟；

[0040] 5、一抗孵育：用500μl抗体稀释缓冲液(1×PBS，1％BSA)1∶200稀释一抗CK19、波形蛋白；覆盖盖片表面并置入湿盒内，4℃，过夜；

[0041] 6、洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS 1ml，50rpm/min洗涤5分钟，重复3次；

[0042] 7、二抗孵育：用500μl抗体稀释缓冲液(1×PBS，1％BSA)1∶500稀释二抗驴抗小鼠CK19、波形蛋白应用抗小鼠荧光二抗进行杂交，室温孵育1小时；

[0043] 8、洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS 1ml，50rpm/min洗涤5分钟，重复3次；

[0044] 9、核染色：用去离子水(ddH_2O)按1∶1000的比例稀释二脒苯基吲哚(DAPI)储存液，工作液浓度为1μg/ml，染色1分钟，使用ddH_2O洗3次，每次5分钟；

[0045] 10、封片：防淬灭剂封片，倒置荧光显微镜下观察。

[0046] 本发明还包括检测在无血清培养基培养下羊膜上皮细胞的增殖能力的步骤；

[0047] 无血清培养人羊膜上皮干细胞的增殖，应用MTS增殖检测分析检测在无血清培养基培养人羊膜上皮细胞的增殖能力，将P2代人羊膜上皮细胞按8×10^{3}/孔接种于96孔板内，待细胞贴壁后更换培养液，分别于24、48、72和96小时加入20μL MTS/孔(5mg/ml)，于37℃、5％CO_2的孵箱内孵育1.5～2小时。检测各孔495nM处吸光值；

[0048] 本发明还包括流式细胞仪方法检测无血清培养人羊膜上皮细胞的表面标志物CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105的表达的步骤：

[0049] 流式细胞仪检测无血清培养人羊膜上皮细胞的表面标志物CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105

[0050] 收集P1代人羊膜上皮细胞，接种于无血清培养基中，连续培养96小时；收取人羊膜上皮细胞，调整细胞密度为1×10^{6}/mL。取1mL细胞悬液，冷PBS洗细胞后100μL PBS重悬细胞，加入5μL单克隆抗体，设置未加抗体组作为阴性对照组，4℃避光孵育30min，冷PBS冲洗3次，用流式细胞仪检测CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105的表达。

[0051] 本发明所述的人羊膜上皮干细胞的无血清培养、纯化及扩增步骤优选如下：在第(3)步开始细胞培养后，培养48小时～72小时，更换培养液，弃去未贴壁的细胞，根据细胞生长情况，每24小时～48小时全量换液一次，待细胞达到80%～90%融合时，用终浓度2.5g/L胰蛋白酶消化，然后按1:2的比例或1:3的比例进行传代接种培养，并记为P1代，传代培养过程中每24小时～48小时全量换液，直至贴壁细胞彼此融合，铺满瓶底，重复上述操作进行传代培养，并记为P2代，继续上述传代培养过程。

[0052] 本发明的优点在于：本发明人羊膜上皮干细胞，采用无血清培养基与用含有胎牛血清的培养基培养人羊膜上皮干细胞相比，具有无动物源性、来源广泛、不受伦理限制及异种免疫原性等优越性。储存于库内的羊膜上皮干细胞，经过短期培养可获得$2\sim3\times10^{10}$个/ml大量富有活性人羊膜上皮干细胞，并能长期保存，而不失去活性，操作简单易行，建库成本低廉，富有应用前景。

附图说明

[0053] 图1为原代培养hAESCs倒置显微镜(×40)镜下所见图；

[0054] 图2为细胞免疫荧光方法检测提取培养原代(P0)代hAESCs中上皮标志物上皮角蛋白CK19(×100)和间质细胞标志物波形蛋白(×100)表达的镜下所见图；

[0055] 图3为无血清培养基培养P1代hAESCs培养96小时倒置显微镜(×40)镜下所见图；

[0056] 图4为人羊膜上皮细胞增殖检测分析示意图；

[0057] 图5为流式细胞分析技术鉴定无血清培养96小时hAESCs中分化抗原簇(Cluster of differentiation，简称CD)CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105表达图。

具体实施方式

[0058] 下面结合附图和实施例详细描述本发明：

[0059] 实施例1

[0060] 如图1所示，原代培养hAESCs倒置显微镜(×40)的示意图。从人羊膜提取的原代羊膜上皮细胞形态均一，呈鹅卵石样排列。

[0061] 如图2所示，细胞免疫荧光方法检测鉴定提取的hAESCs表面标志物，原代提取培养的P0代hAESCs中上皮标志物上皮角蛋白CK19(×100)和间质细胞标志物波形蛋白(×100)表达的示意图。上皮细胞标志物上皮角蛋白CK19表达强阳性；间质细胞标志物波形蛋白表达弱阳性。

[0062] 如图3所示，羊膜上皮细胞增殖检测分析示意图：取第2代的hAESCs按2×10^{3}细胞/孔接种于24孔板内，每隔24小时消化3个孔，收集细胞，并用0.4%台盼兰染色后计数活细胞，取5次结果的平均值，绘制生长曲线。

[0063] 如图4所示，无血清培养基对P1代hAESCs进行培养96小时倒置显微镜图(×40)。镜下细胞形态均一，细胞呈鹅卵石样排列。

[0064] 如图5所示，流式细胞分析技术鉴定无血清培养96小时hAESCs中分化抗原簇(cluster of differentiation，简称CD)CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105表达图。hAESCs阳性表达CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90和CD105。

[0065] 本发明人羊膜上皮干细胞库的构建方法，包括以下步骤：

[0066] (1)人羊膜的选材严格遵循供体符合医学标准并建立资料档案；

[0067] (2)人羊膜收集

[0068] 取供体符合医学标准剖腹产或正常分娩的胎膜，在胎膜娩出5分钟内，从胎膜上钝性分离羊膜；进行ABO/Rh血型检测及HLA分型检测和微生物学检测；用磷酸盐缓冲液(PBS)反复漂洗后剪成膜片；用含1000U/ml庆大霉素和2.5μg/ml二性霉素B的磷酸盐缓冲液浸泡20分钟；

[0069] (3)人羊膜上皮干细胞的分离及单细胞悬液的制备

[0070] 在无菌条件下取正常足月剖腹产后废弃的羊膜；进行ABO/Rh血型检测及HLA分型检测和微生物学检测；检测甲型肝炎抗体、乙型肝炎病毒表面抗原、乙型肝炎病毒表面抗体、乙型肝炎病毒e抗原、乙型肝炎病毒e抗体、乙型肝炎核心抗体IgM、丙型肝炎抗体、戊型肝炎抗体、艾滋病病毒抗体、梅毒螺旋体抗体等其他相关传染性指标均呈阴性；在无菌超净台上钝性分离胎盘脐带面的羊膜5×5cm^2，用PH7.2磷酸缓冲液(PBS)充分冲洗，将羊膜置于含1000U/ml庆大霉素和2.5μg/ml二性霉素B的生理盐水中，浸泡20分钟；将羊膜尽可能的剪碎，按每克组织加入终浓度2.5g/L胰蛋白酶5ml，搅拌使之与羊膜充分混和，置入37℃温箱消化30分钟后取消化液1000rpm，离心5min，弃上清液；如此共3次，得细胞悬液；用200目不锈钢网过滤将消化下来的细胞制成单细胞悬液，1000rpm离心5分钟，用PBS洗2次，用台盼兰染色，计数活细胞，以2.5×10^8 L^{-1}的密度将所得细胞接种于25cm^{2}培养瓶内；在接种时的细胞密度可采用2.5×10^7 L^{-1}；

[0071] (4)人羊膜上皮干细胞的无血清培养、纯化及扩增

[0072] 将上述人羊膜上皮细胞接种在25cm^{2}培养瓶培养，内含15ml无血清培养液，包括：

[0073] 基础培养基DMEM/F12(按体积1:1混合)15.0g/L

[0074] 表皮细胞生长因子0.01mg/L

[0075] 人转铁蛋白5.5mg/L

[0076] 人胰岛素10mg/L

[0077] 亚硒酸钠6.7×10^{-3}mg/L

[0078] 氯化钠8.5×10^{3}mg/L

[0079] L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽434.4mg/L

[0080] L-丙氨酸15mg/L

[0081] L-天冬酰胺-水合物8.9mg/L

[0082] L-天冬氨酸13.3mg/L

[0083] L-左旋谷氨酸14.7mg/L

[0084] 甘氨酸7.5mg/L

[0085] L-脯氨酸11.5mg/L

[0086] L-丝氨酸10.5mg/L

[0087] 接种时的细胞密度采用2.5×10^7 L^{-1}；

[0088] 置于37℃体积分数为5％的CO_2饱和湿度培养箱中培养。培养48小时～72小时后，更换培养液，弃去未贴壁的细胞，根据细胞生长情况，每24小时～48小时全量换液一次；待细胞达到80％～90％融合时，用2.5g/L胰蛋白酶消化，然后按1:2或1:3的比例进行传代接种培养，并记为P1代。传代培养过程中每2天全量换液，直至贴壁细胞彼此融合，铺满瓶底，再重复上述操作进行传代，此传代培养记为P2代，然后继续上述传代培养过程。hAESCs呈鹅卵石样排列，随着传代的进行，hAESCs的胞体逐渐增大，出现部分宽大扁平的细胞，失去增殖和分化能力，而大部分细胞仍然维持细长的梭形，保持增生和分化能力；体外培养5代以后，细胞的增殖速度明显减慢，细胞出现老化现象。

[0089] (5)细胞免疫荧光方法检测无血清培养人羊膜上皮细胞的表面标志物CK19、波形蛋白的表达

[0090] 制备hAESCs细胞爬片：将处理好的干净的盖片，置入六孔板内，以2×10^5密度将经诱导分化后的hAESCs接种到放入盖片的六孔板内，置于37℃体积分数为5％的CO_2饱和湿度培养箱中培养；固定：待细胞生长70-80％融合时，弃去培养液，用1×PBS洗2遍，加入4％多聚甲醛溶液固定细胞，室温固定20分钟；洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS，50rpm/min洗涤5分钟，重复3次；封闭：加入封闭液(0.2％Triton-X-100通透，含2.5％驴血清的PBS中)，室温封闭30分钟～50分钟；一抗孵育：用500μl抗体稀释缓冲液(1×PBS，1％BSA)1∶200稀释一抗CK19、波形蛋白；覆盖盖片表面并置入湿盒内，4℃，过夜；洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS 1ml，50rpm/min洗涤5分钟，重复3次；二抗孵育：用500μl抗体稀释缓冲液(1×PBS，1％BSA)1∶500稀释二抗驴抗小鼠CK19、波形蛋白应用抗小鼠荧光二抗进行杂交，室温孵育1小时；洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS 1ml，50rpm/min洗涤5分钟，重复3次；核染色：用去离子水(ddH_2O)按1∶1000的比例稀释二脒苯基吲哚(DAPI)储存液，工作液浓度为1μg/ml，染色1分钟，使用ddH_2O洗3次，每次5分钟；封片：防淬灭剂封片，倒置荧光显微镜下观察。

[0091] (6)无血清培养人羊膜上皮干细胞的细胞增殖

[0092] 应用MTS增殖检测分析检测无血清培养基培养下人羊膜上皮细胞的增殖能力。将P2代人羊膜上皮细胞按8×10^3/孔接种于96孔板内。待细胞贴壁后更换培养液。分别于24、48、72和96小时加入20μl MTS/孔(5mg/ml)，于37℃、5％CO_2的孵箱内孵育2小时。检测各孔495nM处吸光值。

[0093] (7)无血清培养人羊膜上皮细胞的干细胞标记

[0094] 收集P1代人羊膜上皮细胞，接种于无血清培养基(含DMEM/F12(按体积1:1混合)15.0g/L，表皮细胞生长因子0.01mg/L、人转铁蛋白5.5mg/L、人胰岛素10mg/L、亚硒酸钠6.7×10^{-3}mg/L、氯化钠8.5×10^3mg/L、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽434.4mg/L、L-丙氨酸15mg/L、L-天冬酰胺-水合物8.9mg/L、L-天冬氨酸13.3mg/L、L-左旋谷氨酸14.7mg/L、甘氨酸7.5mg/L、L-脯氨酸11.5mg/L和L-丝氨酸10.5mg/L的DMEM/F12培养基)中，连续培养96小时。

[0095] 收集P1代人羊膜上皮细胞，接种于无血清培养基中，连续培养96小时；收取人羊膜上皮细胞，调整细胞密度为1×10^6/ml。取1ml细胞悬液，冷PBS洗细胞后100μl PBS重悬细胞，加入5μl单克隆抗体，设置未加抗体组作为阴性对照组，4℃避光孵育30min，冷PBS冲洗3次，用流式细胞仪检测CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105的表达；

[0096] (8)人羊膜上皮干细胞库的构建

[0097] 取P2～3代羊膜上皮干细胞，保存于上述无血清培养液加冷冻保护液10％二甲基

亚砜(DMSO)中，细胞浓度调整至1×10^{7}个/ml，分装于标记冻存日期的冷冻管中，置液氮冷冻。液氮冷冻温度为-196℃；按其新生儿性别和ABO/Rh分型及HLA分型进行保存，建立可供检索的细胞信息档案，将其具体信息包括供者姓名，供者父母姓名、地址、联系方式，干细胞的配型信息等输入电脑数据库，建立完善的数据档案备查询。即构建出人羊膜上皮干细胞库。

[0098] 实施例2

[0099] 本发明人羊膜上皮干细胞库的构建方法，包括以下步骤：

[0100] (1)人羊膜的选材严格遵循供体符合医学标准并建立资料档案；

[0101] (2)人羊膜收集

[0102] 取供体符合医学标准剖腹产或正常分娩的胎膜，在胎膜娩出10分钟内，从胎膜上钝性分离羊膜；进行ABO/Rh血型检测及HLA分型检测和微生物学检测；用0.9%生理盐水反复漂洗后剪成膜片；用含1000U/ml庆大霉素和2.5μg/ml二性霉素B的磷酸盐缓冲液浸泡30分钟；

[0103] (3)人羊膜上皮干细胞的分离及单细胞悬液的制备

[0104] 在无菌条件下取正常足月剖腹产后废弃的羊膜；进行ABO/Rh血型检测及HLA分型检测和微生物学检测；检测甲型肝炎抗体、乙型肝炎病毒表面抗原、乙型肝炎病毒表面抗体、乙型肝炎病毒e抗原、乙型肝炎病毒e抗体、乙型肝炎核心抗体IgM、丙型肝炎抗体、戊型肝炎抗体、艾滋病病毒抗体、梅毒螺旋体抗体等其他相关传染性指标均呈阴性；在无菌超净台上钝性分离胎盘脐带面的羊膜$5\times5cm^{2}$，用PH7.2磷酸缓冲液(PBS)充分冲洗，将羊膜置于含1000U/ml庆大霉素和2.5μg/ml二性霉素B的生理盐水中，浸泡20分钟；将羊膜尽可能的剪碎，按每克组织加入终浓度2.5g/L胰蛋白酶5ml，搅拌使之与羊膜充分混和，置入37℃温箱消化30分钟后取消化液1000rpm离心5min，弃上清液；如此共3次，获得细胞悬液；用200目不锈钢网过滤将消化下来的细胞制成单细胞悬液，1000rpm，离心5min～10min，用PBS洗2次，用台盼兰染色，计数活细胞，以$2.5\times10^{8}\ L^{-1}$的密度将所得细胞接种于$25cm^{2}$培养瓶内；在接种时的细胞密度可采用$2.5\times10^{9}\ L^{-1}$；

[0105] (4)人羊膜上皮干细胞的无血清培养、纯化及扩增

[0106] 将上述人羊膜上皮细胞接种在$25cm^{2}$培养瓶培养，内含10ml无血清培养液，包括：

[0107] 基础培养基DMEM/F12(按体积1:1混合)15.0g/L

[0108] 表皮细胞生长因子0.01mg/L

[0109] 人转铁蛋白5.5mg/L

[0110] 人胰岛素10mg/L

[0111] 亚硒酸钠6.7×10^{-3}mg/L

[0112] 氯化钠8.5×10^{3}mg/L

[0113] L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽434.4mg/L

[0114] L-丙氨酸15mg/L

[0115] L-天冬酰胺-水合物8.9mg/L

[0116] L-天冬氨酸13.3mg/L

[0117] L-左旋谷氨酸14.7mg/L

[0118] 甘氨酸7.5mg/L

[0119] L-脯氨酸11.5mg/L

[0120] L-丝氨酸10.5mg/L

[0121] 接种时的细胞密度采用2.5×10^7 L^{-1}；

[0122] 置于37℃体积分数为5％的CO_2饱和湿度培养箱中培养。培养72小时后，更换培养液，弃去未贴壁的细胞，根据细胞生长情况，每2448小时全量换液一次；待细胞达到90％融合时，用2.5g/L胰蛋白酶消化，然后按1:3的比例的比例进行传代接种培养，并记为P1代。传代培养过程中每2天全量换液，直至贴壁细胞彼此融合，铺满瓶底，再重复上述操作进行传代，此传代培养记为P2代，然后继续上述传代培养过程；hAESCs呈鹅卵石样排列。随着传代的进行，hAESCs的胞体逐渐增大，失去增殖和分化能力，而大部分细胞仍然维持呈鹅卵石样排列，保持增生和分化能力；体外培养6代以后，细胞的增殖速度明显减慢，细胞出现老化现象。

[0123] (5)细胞免疫荧光方法检测无血清培养人羊膜上皮细胞的表面标志物CK19、波形蛋白的表达

[0124] 制备hAESCs细胞爬片：将处理好的干净的盖片，置入六孔板内，以2×10^5密度将经诱导分化后的hAESCs接种到放入盖片的六孔板内，置于37℃体积分数为5％的CO_2饱和湿度培养箱中培养；固定：待细胞生长70-80％融合时，弃去培养液，用1×PBS洗2遍，加入4％多聚甲醛溶液固定细胞，室温固定20分钟；洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS，50rpm/min洗涤5分钟，重复3次；封闭：加入封闭液(0.2％Triton-X-100通透，含2.5％驴血清的PBS中)，室温封闭30min～50min；一抗孵育：用500μl抗体稀释缓冲液(1×PBS，1％BSA)1∶200稀释一抗CK19、波形蛋白；覆盖盖片表面并置入湿盒内，4℃，过夜；洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS 1ml，50rpm/min洗涤5分钟，重复3次；二抗孵育：用500μl抗体稀释缓冲液(1×PBS，1％BSA)1∶500稀释二抗驴抗小鼠CK19、波形蛋白应用抗小鼠荧光二抗进行杂交，室温孵育1小时；洗涤：吸净多聚甲醛，加入1×PBS 1ml，50rpm/min洗涤5分钟，重复3次；核染色：用去离子水(ddH_2O)按1∶1000的比例稀释二脒苯基吲哚(DAPI)储存液，工作液浓度为1μg/ml，染色1分钟，使用ddH_2O洗3次，每次5min；封片：防淬灭剂封片，倒置荧光显微镜下观察。

[0125] (6)无血清培养人羊膜上皮干细胞的增殖

[0126] 应用MTS增殖检测分析检测无血清培养基培养下人羊膜上皮细胞的增殖能力。将P2代人羊膜上皮细胞按8×10^3/孔接种于96孔板内。待细胞贴壁后更换培养液。分别于24、48、72和96小时加入20μl MTS/孔(5mg/ml)，于37℃、5％CO_2的孵箱内孵育2小时。检测各孔495nM处吸光值。

[0127] (7)无血清培养人羊膜上皮细胞的干细胞标记

[0128] 收集P1代人羊膜上皮细胞，接种于无血清培养基(含DMEM/F12(按体积1:1混合)15.0g/L，表皮细胞生长因子0.01mg/L、人转铁蛋白5.5mg/L、人胰岛素10mg/L、亚硒酸钠6.7×10^{-3}mg/L、氯化钠8.5×10^3mg/L、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽434.4mg/L、L-丙氨酸15mg/L、L-天冬酰胺-水合物8.9mg/L、L-天冬氨酸13.3mg/L、L-左旋谷氨酸14.7mg/L、甘氨酸7.5mg/L、L-脯氨酸11.5mg/L和L-丝氨酸10.5mg/L的DMEM/F12培养基)中，连续培养96小时。

[0129] 收集P1代人羊膜上皮细胞，接种于无血清培养基中，连续培养96小时；收取人羊膜上皮细胞，调整细胞密度为1×10^6/mL。取1mL细胞悬液，冷PBS洗细胞后100μl PBS重悬细胞，加入5μl单克隆抗体，设置未加抗体组作为阴性对照组，4℃避光孵育30min，冷PBS冲洗3

次,用流式细胞仪检测CD29、CD31、CD34、CD44、CD45、CD73、CD90、CD105的表达;
[0130] (8)人羊膜上皮干细胞库的构建
[0131] 取P2～3代羊膜上皮干细胞,保存于DMEM/F12(按体积1:1混合)15.0g/L、表皮细胞生长因子0.01mg/L、人转铁蛋白5.5mg/L、人胰岛素10mg/L、亚硒酸钠6.7×10^{-3}mg/L、氯化钠8.5×10^{3}mg/L、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽434.4mg/L、L-丙氨酸15mg/L、L-天冬酰胺-水合物8.9mg/L、L-天冬氨酸13.3mg/L、L-左旋谷氨酸14.7mg/L、甘氨酸7.5mg/L、L-脯氨酸11.5mg/L、L-丝氨酸10.5mg/L等无血清培养液加冷冻保护液10%二甲基亚砜(DMSO)中,细胞浓度调整至1×10^{7}个/ml,分装于标记冻存日期的冷冻管中,置液氮冷冻。液氮冷冻温度为-196℃;按其新生儿性别和ABO/Rh分型及HLA分型进行保存,建立可供检索的细胞信息档案,将其具体信息包括供者姓名,供者父母姓名、地址、联系方式,干细胞的配型信息等输入电脑数据库,建立完善的数据档案备查询,即构建出人羊膜上皮干细胞库。
[0132] (9)、人羊膜上皮干细胞复苏
[0133] 羊膜上皮干细胞复苏方法于60℃恒温水浴箱中,0.5min内快速复苏,按2.5×10^{5}/cm^{2}接种于塑料培养瓶内,用无血清培养基,即DMEM/F12(按体积1:1混合)15.0g/L、表皮细胞生长因子0.01mg/L、人转铁蛋白5.5mg/L、人胰岛素10mg/L、亚硒酸钠6.7×10^{-3}mg/L、氯化钠8.5×10^{3}mg/L、L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽434.4mg/L、L-丙氨酸15mg/L、L-天冬酰胺-水合物8.9mg/L、L-天冬氨酸13.3mg/L、L-左旋谷氨酸14.7mg/L、甘氨酸7.5mg/L、L-脯氨酸11.5mg/L、L-丝氨酸10.5mg/L中培养,按1:3传代,扩增后获得大量人羊膜上皮干细胞,备用。
[0134] 实施例3
[0135] 本发明人羊膜上皮干细胞库的构建方法,其特征是包括下述步骤:
[0136] (1)人羊膜的选材严格遵循供体符合医学标准并建立资料档案;
[0137] (2)人羊膜收集及检测
[0138] 取供体符合医学标准剖腹产或正常分娩的胎膜,在胎膜娩出8分钟内,从胎膜上钝性分离羊膜;进行ABO/Rh血型检测及HLA分型检测和微生物学检测,用磷酸盐缓冲液PBS反复漂洗后剪碎;用含0.9%生理盐水浸泡30分钟;
[0139] (3)人羊膜上皮干细胞分离及单细胞悬液的制备
[0140] 取人羊膜先用终浓度2.5g/L胰蛋白酶,室温消化40分钟,共3次,得到细胞悬液;用200目不锈钢网过滤将消化下来的细胞制成单细胞悬液,1200转/分钟,离心8min,用PH 7.2磷酸缓冲液PBS洗2次;再离心,离心机的转速为1800转/分钟,时间为20min,弃去上清液,即获得羊膜上皮干细胞;
[0141] (4)人羊膜上皮干细胞的无血清培养、纯化及扩增
[0142] 将第(1)步所得细胞以2.5×10^{8} L^{-1}密度接种于无血清培养基中,置于37℃、饱和湿度、体积分数为5%的CO_2培养箱中进行培养,根据细胞生长情况,每30小时全量换液一次,待细胞达到85%融合时,用终浓度2.5g/L胰蛋白酶消化,然后按1:2的比例或1:3的比例进行传代接种培养,并记为P1代,传代培养过程中每30小时全量换液,直至贴壁细胞彼此融合,铺满瓶底,重复上述操作进行传代培养,并记为P2代,继续上述传代培养过程使人羊膜上皮干细胞逐渐得到扩增和纯化;
[0143] 所述无血清培养基采用

[0144] DMEM/F12按体积1:1混合15.3g/L

[0145] 表皮细胞生长因子0.010mg/L

[0146] 人转铁蛋白4.0mg/L

[0147] 人胰岛素10mg/L

[0148] 亚硒酸钠6.2×10^{-3}mg/L

[0149] L-丙氨酰-L-谷氨酰胺二肽400mg/L

[0150] L-丙氨酸15mg/L

[0151] L-天冬酰胺7.9mg/L

[0152] L-天冬氨酸12.3mg/L

[0153] L-谷氨酸13.7mg/L

[0154] 甘氨酸6.5mg/L

[0155] L-脯氨酸10.5mg/L

[0156] L-丝氨酸9.5mg/L

[0157] 在上述第(4)步中,择优选择将第(3)步所得细胞以2.5×10^{8} L^{-1}密度接种于上述无血清培养基中培养;

[0158] (5)人羊膜上皮干细胞库的构建

[0159] 取培养P2代人羊膜上皮干细胞保存于无血清培养液加10%二甲基亚砜(DMSO)中,细胞浓度调整至1×10^{6}个/ml,分装于冷冻管中,标记冻存日期,置液氮冷冻;液氮冷冻温度为-196℃;按其新生儿性别和ABO/Rh分型及HLA分型进行保存,建立可供检索的细胞信息档案,即构建出人羊膜上皮干细胞库;

[0160] (6)人羊膜上皮干细胞复苏

[0161] 羊膜上皮干细胞复苏方法于60℃恒温水浴箱中,0.8min内快速复苏,按2.5×10^{4}/cm^{2}接种于塑料培养瓶内,用含DMEM/F12无血清培养基中培养,按1:3传代,扩增后获得大量人羊膜上皮干细胞,备用。

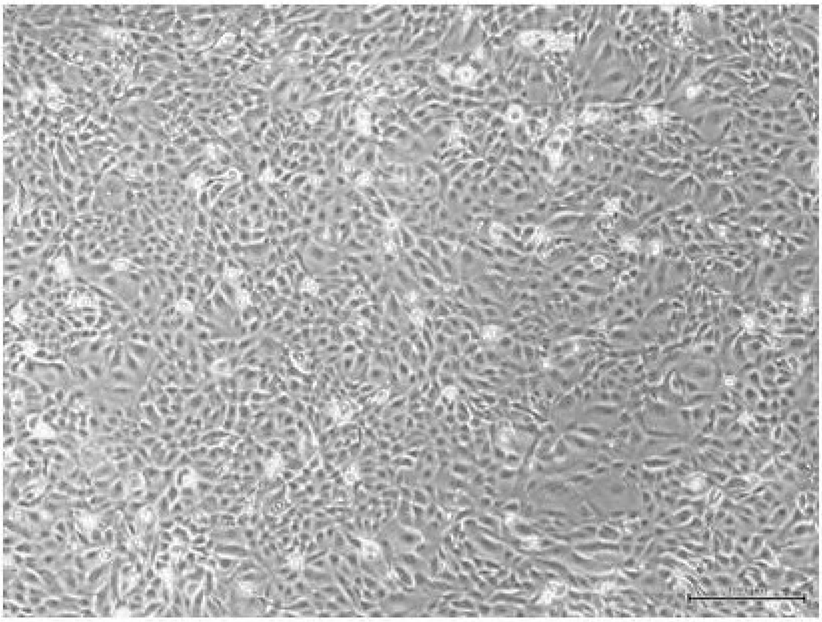


图1

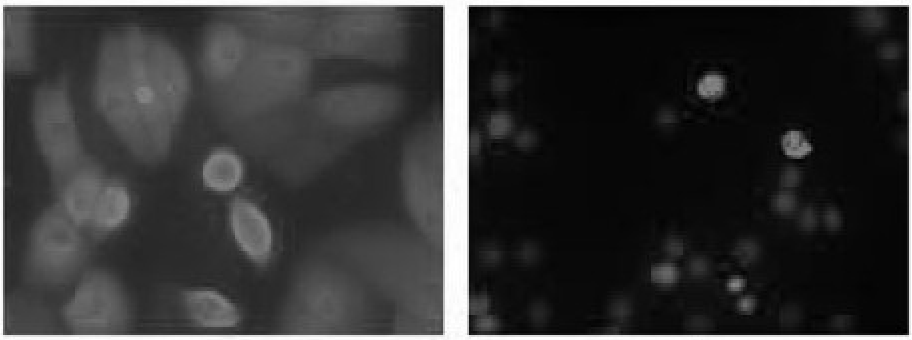


图2

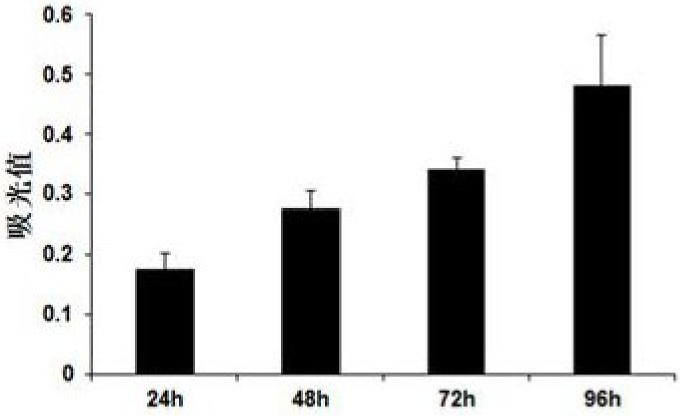


图3

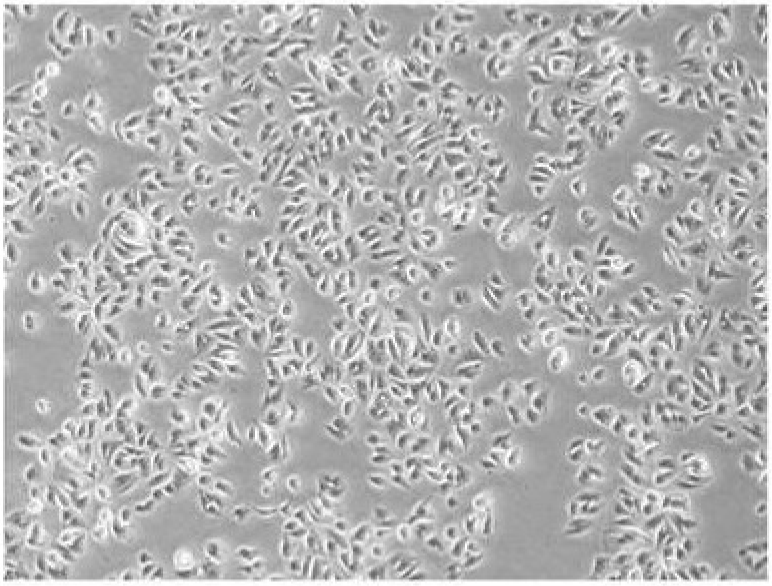


图4

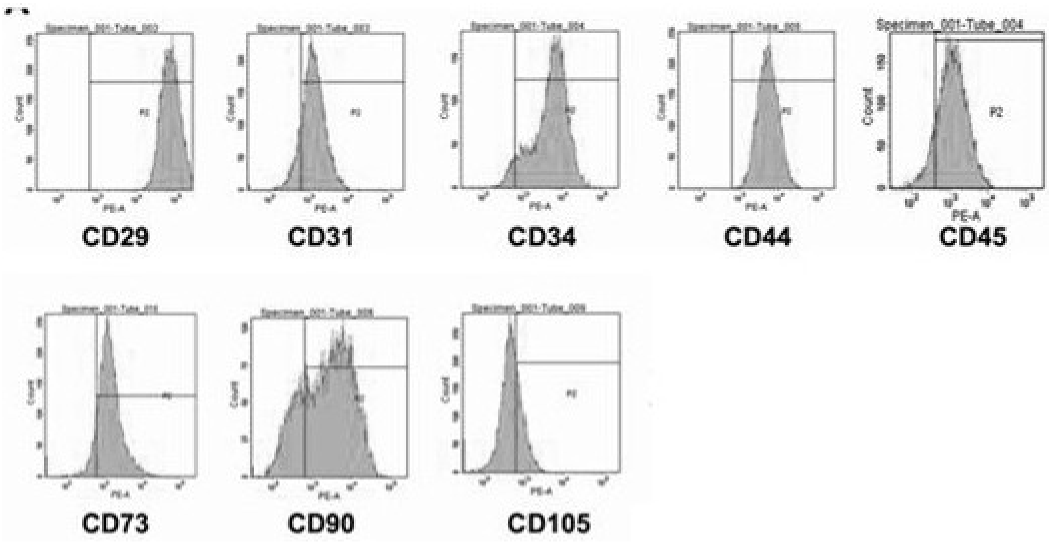


图5