



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110938584 B

(45) 授权公告日 2021.12.03

(21) 申请号 201911166109.1

(22) 申请日 2019.11.25

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110938584 A

(43) 申请公布日 2020.03.31

(73) 专利权人 广州赛莱拉干细胞科技股份有限公司

地址 510000 广东省广州市开发区广州国际生物岛螺旋四路一号生产区第五层502单元

专利权人 广东省康琪莱精准医疗研究院

(72) 发明人 陈海佳 王小燕 李学家 姜交华

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 刘猛

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

(56) 对比文件

CN 102388130 A, 2012.03.21

CN 104774804 A, 2015.07.15

CN 107488629 A, 2017.12.19

汪雁归. 体外定向诱导胚胎干细胞分化为内皮细胞及其与脐静脉内皮细胞的比较.《中南大学学报》.2017,第42卷(第4期),

钟贞. 胚胎干细胞来源的内皮细胞构建内皮化血管支架.《复旦学报》.2007,第34卷(第3期),

Yu-Ting Wu. Defining Minimum Essential Factors to Derive Highly Pure Human Endothelial Cells from iPS/ES Cells in an Animal Substance-Free System.《Scientific Reports》.2015,

时洋. 人胚胎干细胞向内皮细胞的分化诱导.《中国组织工程研究》.2016,第20卷(第23期),

审查员 李召

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种人胚胎干细胞向内皮细胞诱导分化的方法

(57) 摘要

本发明涉及干细胞技术领域,公开了一种人胚胎干细胞向内皮细胞诱导分化的方法。本发明所述方法将人胚胎干细胞利用分散酶和拟胚体形成培养基制备成拟胚体;然后将拟胚体用中胚层诱导培养基诱导为中胚层细胞;最后将中胚层细胞用内皮诱导培养基定向诱导为内皮细胞。本发明通过拟胚体+单层两种方法顺次诱导,成功从人胚胎干细胞获得高纯度的内皮细胞,然后通过内皮细胞的富集及扩增步骤,获得了具备内皮细胞典型形态、免疫表型正常、纯度高且能够在体外连续传代培养8次以上的高品质内皮细胞,可解决目前内皮细胞临床治疗剂量不足的瓶颈问题。

1. 一种人胚胎干细胞向内皮细胞诱导分化的方法,其特征在于,包括:

步骤1、将人胚胎干细胞在玻璃粘连蛋白包被的培养皿中培养,培养基为E8胚胎干细胞培养基,至细胞汇合度为80-90%;去除培养基,PBS清洗,然后用分散酶消化,至倒置显微镜下观察细胞克隆边缘发亮卷边时,吸取分散酶,PBS清洗,然后在培养皿底部横向及纵向均匀划线,接着用吹打细胞,至显微镜下观察大部分细胞脱离培养皿底部,形成大小相对均匀的细胞团即可;

将上述细胞悬液静置,吸弃上清,然后用拟胚体形成培养基重悬细胞克隆团,并转移到低粘附的细胞培养板培养24h,获得拟胚体;所述拟胚体形成培养基以DMEM/F-12为基础培养基,含有20% KSR、2 mM NEAA、2mM L-glutamine 和0.1 mM beta-mercaptoethanol;

步骤2、所述拟胚体用中胚层诱导培养基诱导为中胚层细胞;所述中胚层诱导培养基以Stemline II无血清培养基为基础培养基,含有 $1 \times ITS-G$ 、1-100ng/ml 的BMP4和1-50ng/ml 的 bFGF;

步骤3、所述中胚层细胞用内皮诱导培养基定向诱导为内皮细胞;所述内皮诱导培养基以Stemline II无血清培养基为基础培养基,含有 $1 \times ITS-G$ 、1-100 ng/ml VEGF、1-50ng/ml bFGF和1-200ng/ml SCF;

步骤4、将诱导分化的内皮细胞用TrpLE细胞制备单细胞悬液,重新接种到新的细胞培养板,用市售内皮细胞扩增培养基继续培养,至细胞汇合度达90%左右时,进行传代培养。

2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,步骤2为:

收集拟胚体静置,吸弃上清,然后用中胚层诱导培养基诱导96h,第48h换液1次,获得所述中胚层细胞,拟胚体在整个中胚层诱导过程在低粘附的细胞培养板中进行。

3. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,步骤3为:

将所述中胚层细胞收集并静置,吸弃上清,然后用内皮诱导培养基重悬,接种到细胞培养板,诱导48h,获得所述内皮细胞。

一种人胚胎干细胞向内皮细胞诱导分化的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及干细胞技术领域,具体涉及一种人胚胎干细胞向内皮细胞诱导分化的方法。

背景技术

[0002] 1988年,美国威斯康星大学詹姆斯·汤姆森教授实验室建立了第一株人胚胎干细胞系,开启了人胚胎干细胞研究的先河。人胚胎干细胞具备强大的自我更新能力和多向分化潜能,使其成为功能细胞获得领域一种极具吸引力的种子细胞类型。

[0003] 内皮细胞通常指衬于心、血管和淋巴管内表面的单层扁平上皮,它形成血管的内壁。它们具有吞噬异物、细菌、坏死和衰老的组织,还参与机体免疫活动功能。内皮细胞在血管损伤修复、血管再生中发挥重要作用。

[0004] 目前,内皮细胞可以通过动脉或静脉的大血管、小血管及微血管原代分离获得,从血管直接分离的内皮细胞一般为分化程度较好的内皮细胞,体内传代次数及增殖能力有效,即使增殖能力相对较强的脐静脉/脐动脉内皮细胞体外传代次数也在10代以内,因此,临床剂量的内皮细胞很难通过原代分离的内皮细胞的培养扩增途径获得。

[0005] 考虑到人胚胎干细胞强大的自我更新能力以及向多种组织类型的细胞分化的潜能,通过人胚胎干细胞诱导分化获得内皮细胞为内皮细胞获得提供一种极具潜力的新的解决方法,为内皮细胞的临床应用奠定了重要基础。

[0006] 目前,通过人胚胎干细胞诱导分化获得内皮细胞已经较多文献报道,如Wu等报道的人胚胎干细胞向内皮细胞的定向诱导,该研究通过5天的顺次诱导获得了内皮细胞,建立了人胚胎干细胞向内皮细胞的诱导方法,但该文献主要研究了人多能干细胞向内皮细胞分化的机理及影响因素,对于诱导体系的优化及临床剂量内皮细胞的制备并未开展深入研究,没有形成一个明确的诱导分化方法,且在传代次数上也有不足,不能有效解决目前内皮细胞临床治疗剂量不足的瓶颈问题。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种人胚胎干细胞向内皮细胞诱导分化的方法,使得所述方法获得的内皮细胞具备较高纯度和分化率,且可以连续传代扩增8代以上。

[0008] 为了实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0009] 一种人胚胎干细胞向内皮细胞诱导分化的方法,包括:

[0010] 步骤1、将人胚胎干细胞利用分散酶和拟胚体形成培养基制备成拟胚体;

[0011] 步骤2、所述拟胚体用中胚层诱导培养基诱导为中胚层细胞;

[0012] 步骤3、所述中胚层细胞用内皮诱导培养基定向诱导为内皮细胞。

[0013] 针对现有人胚胎干细胞诱导分化为内皮细胞传代次数少的问题,本发明从诱导分化环节到传代扩增环节进行优化调整,使得所诱导分化的内皮细胞可以传代8代以上。

[0014] 作为优选,步骤1为:

[0015] 将人胚胎干细胞先进行培养至细胞汇合度为80-90%；

[0016] 去除培养基，PBS清洗，然后用分散酶(1mg/ml)消化，至倒置显微镜下观察细胞克隆边缘发亮卷边时，吸取分散酶，PBS清洗，然后用在培养皿底部横向及纵向均匀划线，接着用吹打细胞，至显微镜下观察大部分细胞脱离培养皿底部，形成大小相对均匀的细胞团即可；

[0017] 将上述细胞悬液静置，吸弃上清，然后用拟胚体形成培养基重悬细胞克隆团，并转移到到低粘附的细胞培养板培养24h，获得拟胚体。

[0018] 在本发明具体实施方式中，步骤1为：

[0019] 去除培养基，PBS洗2遍，然后用分散酶(Dispase)消化5-8min，倒置显微镜下观察细胞克隆边缘发亮卷边时，吸取Dispase，PBS洗2遍，然后用1ml Tip头在培养皿底部横向及纵向均匀划线，然后用巴氏吸管吹打细胞8-10次，显微镜下观察大部分细胞脱离培养皿底部，形成大小相对均匀的细胞团即可；

[0020] 将细胞悬液用巴氏吸管转移到15ml离心管，室温静置10min，小心吸弃上清，然后用拟胚体形成培养基重悬细胞克隆团，并转移到到低粘附的细胞培养版(CORNING, #3471)培养24h，获得拟胚体。

[0021] 其中，所述拟胚体形成培养基以DMEM/F-12为基础培养基，含有20%KSR、2mM NEAA、2mM L-glutamine和0.1mM beta-mercaptoethanol；所述将人胚胎干细胞先进行培养至细胞汇合度为80-90%具体为：将人胚胎干细胞在玻璃粘连蛋白包被的培养皿中培养，培养基为E8胚胎干细胞培养基，至细胞汇合度为80-90%。

[0022] 作为优选，步骤2为：

[0023] 收集拟胚体静置，吸弃上清，然后用中胚层诱导培养基诱导96h，第48h换液1次，获得所述中胚层细胞，拟胚体在整个中胚层诱导过程在低粘附的细胞培养板中进行。

[0024] 在本发明具体实施方式中，所述步骤2为：

[0025] 收集形成的拟胚体到15ml离心管，室温静置10min，小心吸弃上清，然后用中胚层诱导培养基，诱导时间为96h，第48h换液1次，获得所述中胚层细胞，拟胚体在整个中胚层诱导过程在低粘附的细胞培养板中进行。

[0026] 其中，所述中胚层诱导培养基以Stemline II无血清培养基(Sigma Aldrich, 货号：S0192)为基础培养基，含有1×ITS-G(Insulin, Transferrin, Selenium Solution (ITS-G), 100X, GIBCO公司, 货号：41400045)、1-100ng/ml的BMP4和1-50ng/ml的bFGF。在本发明具体实施方式中，所述中胚层诱导培养基以Stemline II无血清培养基(Sigma Aldrich, 货号：S0192)为基础培养基，含有1×ITS-G、20ng/ml的BMP4和5ng/ml的bFGF。

[0027] 作为优选，步骤3为：

[0028] 将所述中胚层细胞收集并静置，吸弃上清，然后用内皮诱导培养基重悬，接种到细胞培养板，诱导48h，获得所述内皮细胞。

[0029] 在本发明具体实施方式中，所述步骤3为：

[0030] 将所述中胚层细胞收集到15ml离心管，室温静置10min，小心吸弃上清，然后用内皮诱导培养基重悬，接种到细胞培养板，诱导48h，获得所述内皮细胞。

[0031] 其中，所述内皮诱导培养基以Stemline II无血清培养基为基础培养基，含有1×ITS-G、1-100ng/ml VEGF、1-50ng/ml bFGF和1-200ng/ml SCF。在本发明具体实施方式，所述

内皮诱导培养基以Stemline II无血清培养基为基础培养基,含有1×ITS-G、40ng/ml VEGF、5ng/ml bFGF和50ng/mlSCF。

[0032] 此外,本发明所述方法还包括内皮细胞的传代培养:

[0033] 将诱导分化的内皮细胞用TrpLE细胞制备单细胞悬液,重新接种到新的细胞培养板,用市售内皮细胞扩增培养基(lonza EGM-2MV EGM-2CC-3162)继续培养,至细胞汇合度达90%左右时,进行传代培养。

[0034] 在本发明具体实施方式中,传代培养方法为:

[0035] 将诱导分化的内皮细胞用TrpLE消化5min,加入等体积PBS后,吹打制备单细胞悬液,收集细胞后,离心(500g,5min),弃上清,重新接种到新的细胞培养板,用市售内皮细胞扩增培养基继续培养,等细胞汇合度达90%左右时,进行传代培养。

[0036] 本发明和现有诱导分化进行对比,结果显示,本发明能够传代至8代以上仍保持旺盛的细胞增殖能力,同时内皮细胞表面标志物无明显下降,而现有方法如果保持较佳的细胞增殖能力以及内皮细胞表面标志物无明显下降,其传代次数明显减少。

[0037] 由以上技术方案可知,本发明通过拟胚体+单层两种方法顺次诱导,成功从人胚胎干细胞获得高纯度和高分化率的内皮细胞,然后通过内皮细胞的富集及扩增步骤,获得了具备内皮细胞典型形态,免疫表型正常,纯度高,能够在体外连续传代培养8次以上的高品质内皮细胞,可解决目前内皮细胞临床治疗剂量不足的瓶颈问题。

附图说明

[0038] 图1所示为人胚胎干细胞向内皮细胞定向诱导过程关键节点细胞形态;其中,D1表示第一天拟胚体的形成(倍数40×),D5表示第5天中胚层细胞向内皮细胞定向诱导(倍数100×),D12表示第12天内皮细胞(p2)培养扩增(倍数100×);

[0039] 图2所示为人胚胎干细胞来源内皮细胞流式鉴定;其中,左图为p0代流式检测结果,右图为p3代流式检测结果;

[0040] 图3所示为P8代人胚胎干细胞来源的内皮细胞形态(本发明);其中,左图放大倍数为40×,右图为100×;

[0041] 图4所示为p3代人胚胎干细胞来源的内皮细胞形态(现有文献);其中,左图放大倍数为40×,右图为100×。

具体实施方式

[0042] 本发明公开了一种人胚胎干细胞向内皮细胞诱导分化的方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明所述方法已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述方法进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0043] 本发明所用的人胚胎干细胞可通过购买途径获得,在本发明中采用购自WiCell公司的人胚胎干细胞;

[0044] 以下就本发明所提供的一种人胚胎干细胞向内皮细胞诱导分化的方法做进一步说明。

[0045] 实施例1:诱导分化内皮细胞

[0046] 1、人胚胎干细胞的维持培养

[0047] 本发明人胚胎干细胞在玻璃粘连蛋白 (Vitronectin) 包被的培养皿中培养,培养基为E8胚胎干细胞培养基,该培养体系可以避免传统包被基质Matrigel及传统人胚胎干细胞培养基mTeSR中含有的动物源性成分的引入;

[0048] 2、拟胚体形成

[0049] 人胚胎干细胞在上述培养体系中培养4-5天,细胞汇合度达80-90%时,进行拟胚体形成实验(见附图1);具体步骤如下:

[0050] 去除E8培养基,PBS洗2遍,然后用分散酶 (Dispase) 消化5-8min,倒置显微镜下观察细胞克隆边缘发亮卷边时,吸取Dispase,PBS洗2遍,然后用1ml Tip头在培养皿底部横向及纵向均匀划线,然后用巴氏吸管吹打细胞8-10次,显微镜下观察大部分细胞脱离培养皿底部,形成大小相对均匀的细胞团即可;

[0051] 将细胞悬液用巴氏吸管转移到15ml离心管,室温静置10min,小心吸弃上清,然后用拟胚体形成培养基 (DMEM/F-12, 20%KSR, 2mM NEAA, 2mM L-glutamine, 0.1mM beta-mercaptoethanol) 重悬细胞克隆团,并转移到到低粘附的细胞培养版 (CORNING, #3471) 培养24h。

[0052] 3、内皮细胞诱导

[0053] 内皮细胞诱导分2步,分别为人胚胎干细胞向中胚层细胞定向诱导和中胚层细胞向内皮细胞定向诱导,步骤如下:

[0054] 1) 人胚胎干细胞向中胚层细胞定向诱导

[0055] 收集形成的拟胚体到15ml离心管,室温静置10min,小心吸弃上清,然后用中胚层诱导培养基 (Stemline II +1×ITS-G+细胞因子组A (20ng/ml BMP4+5ng/ml bFGF)),诱导时间为96h,第48h换液1次,拟胚体在整个中胚层诱导过程在低粘附的细胞培养板中进行;

[0056] 2) 中胚层细胞向内皮细胞诱导

[0057] 将上述中胚层定向诱导96h的拟胚体收集到15ml离心管,室温静置10min,小心吸弃上清,然后用内皮诱导培养基 (Stemline II +1×ITS-G+细胞因子组合B (40ng/ml VEGF、5ng/ml bFGF和50ng/mlSCF)) 重悬,接种到细胞培养板,诱导48h,代表性流式检测结果见图1中的D5。

[0058] 4、内皮细胞的富集及扩增

[0059] 将上述诱导细胞产物用TrpLE细胞制备单细胞悬液,重新接种到新的细胞培养板,用内皮细胞扩增培养基 (lonza EGM-2MV EGM-2CC-3162) 继续培养,等细胞汇合度达90%左右时,进行传代培养(见附图1中的D12),细胞培养至p2-p3时,进行内皮细胞形态学及表面标志物鉴定,代表性流式检测结果见附图2。

[0060] 附图2中左图为p0代,右图为p3代,p0代内皮细胞的分化效率(约70%)较p3代内皮细胞的分化效率(约95%)明显偏低。

[0061] 本发明诱导分化方法获得的内皮细胞可以连续传代至8代以上,细胞仍能够保持旺盛的增殖能力和内皮细胞典型的形态特征(见附图3)。

[0062] 实施例2:内皮细胞的传代次数检测(对比试验)

[0063] 按照本发明背景技术中提到的对比文献 (Defining Minimum Essential Factors

to Derive Highly Pure Human Endothelial Cells from iPS/ES Cells in an Animal Substance-Free System;wu等)报道的人胚胎干细胞向内皮细胞的诱导分化方法进行3次独立实验(人胚胎干细胞与实施例1相同),诱导分化方法如下:

[0064] 1) iPS/ES向中胚层细胞诱导:诱导培养基为基础培养基(12g/L DMEM/F-12、3.56g/L HEPES、1.742g/L of丙酮酸钠、14ug/L硒酸钠、10.7mg/L重组人转铁蛋白、19.4mg/L重组人胰岛素、64mg/L Vc)+中胚层诱导剂组合(10mM Y-27632,250ng/cm² of VTN,3mM CHIR99021,and 2ng/ml Activin A),诱导时间为48h;

[0065] 2) 中胚层细胞向内皮细胞诱导:收集诱导获得的中胚层细胞,制备单细胞悬液,然后重新进行内皮细胞诱导,诱导分化培养基为基础培养基(同上)+内皮细胞诱导剂组合(2mg/ml PVA,10ng/ml of hVEGF-A),诱导时间为72h。

[0066] 因上述文献并未记载传代方法,故采用常规的传代方法进行传代,方法如下:待细胞汇合度达90%左右时,吸弃培养基,再用PBS洗一遍,然后用TrypLE(胰酶替代物,GIBCO,货号:12604013)消化5min,显微镜下观察大部分细胞发亮变圆时,用等体积的PBS终止消化,收集细胞后,离心(300g,5min),弃上清,用内皮细胞扩增培养基(1onza EGM-2MV EGM-2CC-3162)重悬,计数后按照 $2 \times 10^4/cm_2$ 的密度接种新的培养板上继续培养(37°C,5%CO₂)。每天观察,隔天换液,根据细胞的生长增殖情况,4-5天传代1次。

[0067] 结果显示,现有文献诱导分化效率(68.2±5.1%)与本发明无显著差异,但获得的细胞的扩增传代能力较差,传代2-3次细胞形态变大、失去增殖能力而无法继续传代培养(见附图4)。

[0068] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

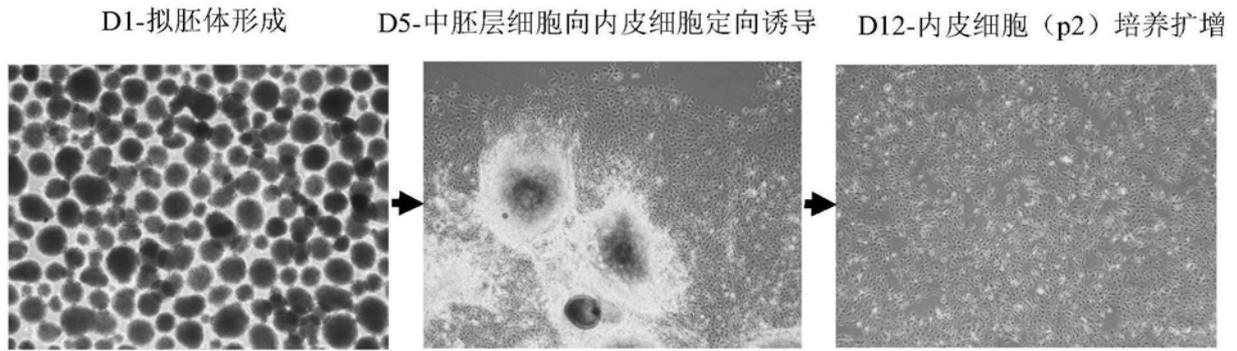


图1

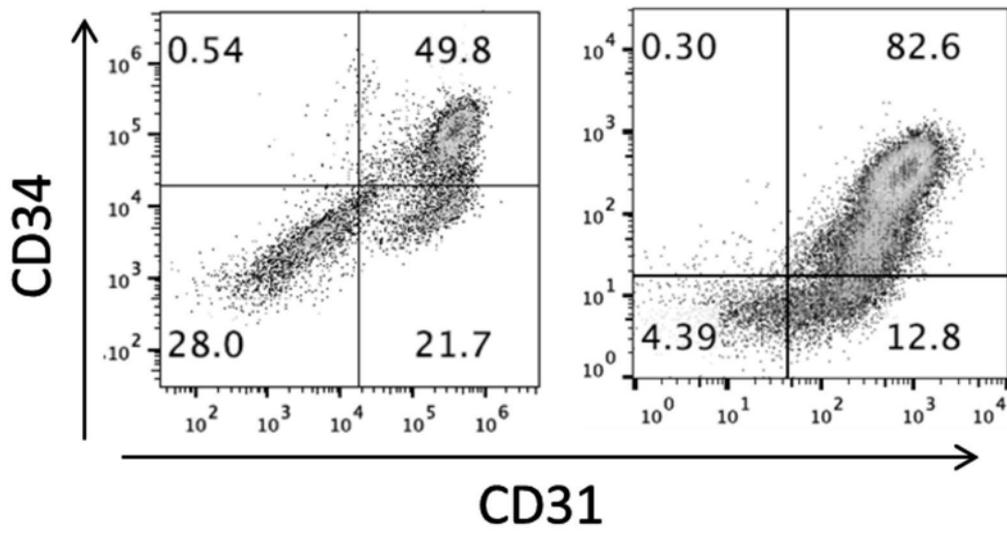


图2

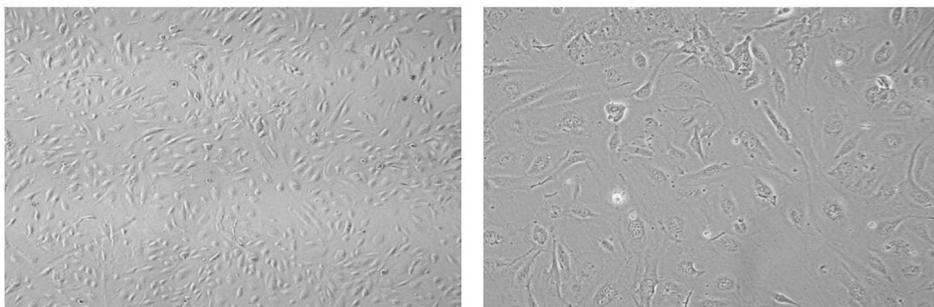


图3

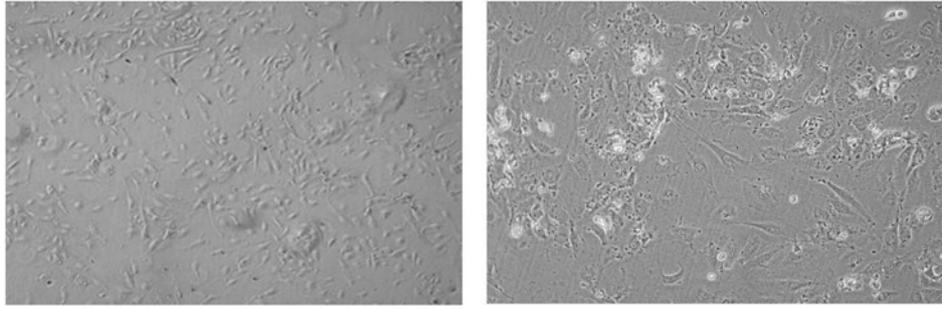


图4