



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105284787 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201510695324. 6

(22) 申请日 2015. 10. 23

(71) 申请人 深圳爱生再生医学科技有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区高新区南
环路 29 号留学生创业大厦 15 楼 02 号

(72) 发明人 曾宪卓 鲁菲

(51) Int. Cl.

A01N 1/02(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

骨髓间充质干细胞的保存试剂及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种骨髓间充质干细胞的保存试剂,及其在骨髓间充质干细胞保存中的应用;保存试剂的成分包括 80 ~ 100mmol/L 的葡萄糖、40 ~ 50mmol/L 的甘露醇、24 ~ 28mmol/L 的磷酸氢二钾、12 ~ 16mmol/L 的磷酸二氢钾、3 ~ 4mmol/L 的腺嘌呤、1 ~ 1.5mmol/L 的肌苷、14 ~ 18mmol/L 枸橼酸钾、35 ~ 45mmol/L 的氯化铵、75 ~ 80mmol/L 的氯化钠及细胞抗氧化剂。采用本发明的上述骨髓间充质干细胞的保存试剂,通过葡萄糖、枸橼酸钾少数几种营养维持细胞基本生命代谢,同时不添加大量丰富的营养避免其大量快速代谢和增殖;并且进一步辅助腺嘌呤、肌苷、甘露醇维持细胞自身的形态和性状,保护细胞膜和酶活性的目的,使保存的过程中细胞活性不发生退化;最后以细胞抗氧化剂抑制细胞的氧化损伤,相比现有通常的保存液,保存后细胞具有更好的活性和品质。

1. 一种骨髓间充质干细胞的保存试剂,其特征在于,包括0~100mmol/L的葡萄糖、40~50mmol/L的甘露醇、24~28mmol/L的磷酸氢二钾、12~16mmol/L的磷酸二氢钾、3~4mmol/L的腺嘌呤、1~1.5mmol/L的肌苷、14~18mmol/L枸橼酸钾、35~45mmol/L的氯化铵、75~80mmol/L的氯化钠及细胞抗氧化剂。

2. 如权利要求1所述的骨髓间充质干细胞的保存试剂,其特征在于,所述细胞抗氧化剂包括超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、维生素C、维生素E及还原型谷胱甘肽中的至少一种。

3. 如权利要求2所述的骨髓间充质干细胞的保存试剂,其特征在于,所述细胞抗氧化剂中超氧化物歧化酶浓度为35000~45000U/L;

和/或,所述细胞抗氧化剂中谷胱甘肽过氧化物酶浓度为20000~25000U/L;

和/或,所述细胞抗氧化剂中维生素C浓度为3~10mmol/L;

和/或,所述细胞抗氧化剂中维生素E浓度为3~10mmol/L;

和/或,所述细胞抗氧化剂中还原型谷胱甘肽浓度为1~1.5mmol/L。

4. 如权利要求1至3任一项所述的骨髓间充质干细胞的保存试剂,其特征在于,所述骨髓间充质干细胞的保存试剂还包括有抗生素。

5. 如权利要求4所述的骨髓间充质干细胞的保存试剂,其特征在于,所述抗生素为5~10mmol/L的氯霉素。

6. 如权利要求1至5任一项所述的骨髓间充质干细胞保存液在骨髓间充质干细胞保存中的应用。

骨髓间充质干细胞的保存试剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于细胞保存液技术领域,具体涉及一种骨髓间充质干细胞的保存试剂及其应用。

背景技术

[0002] 干细胞治疗是将具有不断自我繁殖能力和多向化潜能的干细胞在体外培养后,再将其移植入患者受损或缺损组织,从而实现对损伤组织的补充和修复。而目前能实现人骨髓间充质干细胞分离并大规模培养的细胞很少,在细胞培养完成之后,同时还需要对细胞进行表型检测、细胞形状分析等等,之后将细胞保存在保存液中,待需要时再进行输注。在人骨髓间充质干细胞培养后进行保存的阶段中,既要维持细胞的基本生命代谢以防止其死亡,同时又要避免其代谢量过大而继续大量增殖产生的大量形状变异。所以细胞保存中,都采用 0.9WT%氯化钠注射液、5WT%葡萄糖注射液、复方电解质注射液 (PlasmaLyte A)、1 ~ 5WT%人血白蛋白溶液等作为细胞的保存介质来进行。

[0003] 但是细胞保存的过程中,采用上述 MSCs 的保存液进行保存,在需要保存时间较短时 (4h 以内) 细胞的性质和变化还能维持在比较正常的水平,细胞活性降低的程度还不会大幅降低治疗的品质。但是如果保存的时间上进一步增加,进行稍长时间的保存时,首先细胞具有表型异变、活性降低、聚集成团等倾向和性状变化更加明显,这些都会降低细胞的品质影响治疗的效果;而上述保存液本身不具有缓解或者降低这些保存过程中问题的能力,进行保存之后细胞活性大大降低,慢慢转向于休眠或者凋亡。

发明内容

[0004] 本发明实施的目的在于克服现有的缺陷,提供一种能在骨髓间充质干细胞保存中维持其细胞代谢状态和活性的保存试剂。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明实施例的技术方案如下:

[0006] 一种骨髓间充质干细胞的保存试剂,包括 0 ~ 100mmol/L 的葡萄糖、40 ~ 50mmol/L 的甘露醇、24 ~ 28mmol/L 的磷酸氢二钾、12 ~ 16mmol/L 的磷酸二氢钾、3 ~ 4mmol/L 的腺嘌呤、1 ~ 1.5mmol/L 的肌苷、14 ~ 18mmol/L 枸橼酸钾、35 ~ 45mmol/L 的氯化铵、75 ~ 80mmol/L 的氯化钠及细胞抗氧化剂。

[0007] 本发明的上述骨髓间充质干细胞的保存试剂,通过葡萄糖、枸橼酸钾少数几种营养维持细胞基本生命代谢,同时不添加大量丰富的营养避免其大量快速代谢和增殖;并且进一步辅助腺嘌呤、肌苷、甘露醇维持细胞自身的形态和性状,保护细胞膜和酶活性的目的,使保存的过程中细胞活性不发生退化;最后以细胞抗氧化剂抑制细胞的氧化损伤,相比现有通常的保存液,保存后细胞具有更好的活性和品质。

[0008] 在本发明的上述骨髓间充质干细胞的保存试剂的基础上,本发明进一步还提出其在骨髓间充质干细胞保存中的应用。采用上述保存试剂保存骨髓间充质干细胞,在保存中保护细胞的能量产生机构,使其维持正常结构和功能;并尽量减慢细胞代谢速度,减少能量

消耗并供应能量物质,同时还维持细胞的形态抑制和分化和损伤,相比现有通常的保存液保存后细胞具有更好的活性和形态。

具体实施方式

[0009] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0010] 本发明实例提出一种骨髓间充质干细胞的保存试剂,该保存试剂成分包括有80~100mmol/L的葡萄糖、40~50mmol/L的甘露醇、24~28mmol/L的磷酸氢二钾、12~16mmol/L的磷酸二氢钾、3~4mmol/L的腺嘌呤、1~1.5mmol/L的肌苷、14~18mmol/L枸橼酸钾、35~45mmol/L的氯化铵、75~80mmol/L的氯化钠及细胞抗氧化剂。

[0011] 本发明的上述骨髓间充质干细胞的保存试剂,是基于维持细胞基本代谢活性的同时,一方面是保护细胞的能量产生机构,使其维持正常结构和功能;二是尽量减慢细胞代谢速度,减少能量消耗并供应能量物质;并且辅助修复成分,降低保存过程中的细胞损伤。

[0012] 其中,细胞抗氧化剂比较中重要的补充性的细胞损伤修复和抑制工程成分,是能清除自由基和抑制自由基活动的物质,能够预防自由基的形成,或是在自由基形成之后防止它们与其他的细胞分子结合,从而阻止自由基造成细胞的衰老和氧化损伤。在实施中,上述细胞氧化剂可以采用超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶、维生素C、维生素E及还原型谷胱甘肽中的一种或多种。

[0013] 当然,最优选的是超氧化物歧化酶(SOD),相对是人体不可缺少、重要的氧自由基清除剂,其以不稳定的自由基作为催化底物。这种酶对于需氧细胞的存活是比较重要的,它可以催化清除超氧自由基,也是目前为止发现的唯一的以自由基为底物的酶,所以在维护生物体内自由基产生与清除的动态平衡中起极其重要的作用。相比其他的基中细胞抗氧化剂,其直接清除氧自由基,效果上更加明确,对抑制氧化性细胞损伤的针对性更强一些。

[0014] 另外,谷胱甘肽过氧化物酶是机体内广泛存在的过氧化物分解酶,是以硒半胱氨酸结构为活性中心,能催化GSH变为GSSG,使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害,主要针对于细胞膜结构的损伤修复。其他的几种,维生素C、维生素E及还原型谷胱甘肽都是具有还原性的生物成分,能减缓造成细胞氧化性损伤的氧化物质的氧化损伤。

[0015] 进一步在实施的过程中,由于上述细胞抗氧化剂的类型和成分并不相同,超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶是属于蛋白质酶类,维生素C、维生素E是属于还原性维生素,还原型谷胱甘肽是寡肽,添加的过程中分别按照各自适合的量进行添加,相互之间并不存在统一的标准用量(酶类是以活力单位U计量、化学成分以mol、质量等方式计量)。比如,实施中超氧化物歧化酶在保存试剂中控制添加量35000~45000U/L比较适中;谷胱甘肽过氧化物酶其是过氧化物底物催化酶,相比产生的过氧化物量,控制添加20000~25000U/L的浓度范围即可;维生素C和维生素E这两者添加3~10mmol/L即可,在有上述的酶共同协作使用时,在上述范围中采用低量添加;同时,由于还原型谷胱甘肽自身也是多肽,添加量多有可能会作为C、N源进行能源代谢,可能也会诱导细胞产生分化,控制低量1~1.5mmol/L即可,在于上述多种抗氧化剂共同使用时,在上述范围下可以采用低量添

加。

[0016] 在细胞氧化损伤良好缓解的情形下,剩下的成分即是在上述保护细胞的能量产生机构使其维持正常结构和功能、以及减慢细胞代谢速度并供应能量物质进行的采用。比如,其中葡萄糖作为基本的生命能源;枸橼酸钾和氯化钠维持红细胞膜上钠钾泵($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$)的正常运转;腺嘌呤用于维持和恢复 ATP、DPG 水平,还能稳定干细胞形态;肌苷与磷酸盐一方面是形成缓冲系,维持环境 pH,同时还可以起到保护细胞膜和酶活性的目的;甘露醇和氯化钠能维持适合细胞生存的晶体和胶体物质,保持合适的细胞外渗透压,稳定细胞的膜结构。从上述选择可以看出,并不存在大量的多种营养,在保存中控制细胞代谢速度处于较低的水平。

[0017] 在上述基础功能的立意下,本身骨髓间充质干细胞是属于比较容易分化的干细胞,所以保存试剂如果自身具有了诱导细胞表型发生变化的成分,就很有可能会造成细胞在保存的过程中产生分化;结合本案中不添加细胞因子等具有诱导效果的成分,并用肌苷、甘露醇以及氯化钠在外环境中稳定细胞膜结构和形态,可以比较良好地抑制细胞的表型变化或发生分化。

[0018] 同时,保存试剂在使用过程中,很大多数情形下均是将细胞置于常规空间内,而不是无菌环境,所以有必要进一步添加抑制杂菌污染的抗生素试剂;基于本案中对骨髓间充质干细胞保存的情况,在保存试剂中采用添加 5 ~ 10mmol/L 的氯霉素,氯霉素相比其他类型的抗生素,其属于抑菌性广谱抗生素。本发明中一方面是基于其广谱性采用,以避免窄谱性的抗生素的抑菌类型过少而达不到良好的抑菌效果;另一方面,其主要是抑菌性的类型,而不是杀菌性的类型;这样可以最大化地避免对骨髓间充质干细胞自身的代谢产生杀伤。

[0019] 同时,本发明的上述保存试剂在制备的过程中,虽然基本上绝大多数成分都是水溶性的(维生素 E 属于脂溶性),同时氯霉素在冷水中溶解比较慢且溶解度非常低;所以本案的保存液在配置的过程中可以将除细胞抗氧化剂的酶类之外的成分全部添加完成之后,整体可能并不能直接完全溶解,而是呈胶状的悬液,可以采用适当加热至悬液呈现比较均匀之后进行分装和高温灭菌处理;并且在灭菌处理完成之后,最后再添加超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶,以避免提前添加导致在后续的灭菌处理中变性失活。同时,由于配置之后,可能并不一定会立即将上述试剂进行细胞保存,而长期存放的过程中超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶可能自身可能还是容易降解或者失活,所以长期保存可以按照上述方式配置好之后冰冻保存;或者是配置完成之后,暂时不添加超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶这两种,而在使用之间添加即可。

[0020] 采用本发明的上述骨髓间充质干细胞的保存试剂,通过葡萄糖、枸橼酸钾少数几种营养维持细胞基本生命代谢,同时不添加大量丰富的营养避免其大量快速代谢和增殖;并且进一步辅助腺嘌呤、肌苷、甘露醇维持细胞自身的形态和性状,保护细胞膜和酶活性的目的,使保存的过程中细胞活性不发生退化;最后以细胞抗氧化剂抑制细胞的氧化损伤,尽可能地维持细胞的活性和品质。

[0021] 在本发明的上述骨髓间充质干细胞的保存试剂的基础上,本发明进一步还提出其在骨髓间充质干细胞保存中的应用,采用上述保存试剂保存骨髓间充质干细胞,在保存中保护细胞的能量产生机构,使其维持正常结构和功能;并尽量减慢细胞代谢速度,减少能量消耗并供应能量物质,同时还维持细胞的形态抑制和分化和损伤,相比现有通常的保存液

保存后细胞具有更好的活性和形态。

[0022] 为使本发明的上述保存试剂的制备在骨髓间充质干细胞保存中实施能更易于本领域技术人员的理解和实施参考,同时凸显出本发明保存试剂的品质效果,以下通过具体的实施例进行举例说明。

[0023] 实施例 1

[0024] S10,配置本发明的骨髓间充质干细胞保存试剂,按照如下保存试剂成分的浓度,按照配置 5L 体积的量计算并获取各成分:

[0025] 葡萄糖 90mmol/L、甘露醇 45mmol/L、磷酸氢二钾 25mmol/L、磷酸二氢钾 14mmol/L、腺嘌呤 3.5mmol/L、肌苷 1.3mmol/L、枸橼酸钾 16mmol/L、氯化铵 40mmol/L、氯化钠 77mmol/L;

[0026] 以及,氯霉素 7mmol/L、超氧化物歧化酶 40000U/L、维生素 C 3mmol/L。

[0027] 然后按照如下步骤配置本案的骨髓间充质干细胞保存试剂:

[0028] 将氯霉素和超氧化物歧化酶之外的上述成分用 3L 注射用水溶解制成主液;

[0029] 然后将购买的装有氯霉素的小瓶中加入注射用水并摇晃 1~2min 后,用注射器转移至上述 3L 主液中;当然,氯霉素加入至主液中可以分多次重复进行,同时装有氯霉素的小瓶用注射用水多次清洗后转移至主液中;

[0030] 将主液用水浴略微加热,到主液悬浊降低至溶液较为均一后进行灭菌处理,灭菌后于冰浴保存;等到冰浴足够时间后,最后再加入超氧化物歧化酶,溶解后定容至 5L,继续冰浴保存备用。(当然该实施中,抗氧化剂采用的只有超氧化物歧化酶一种,如果在实施中还搭配有高温溶液失活的谷胱甘肽过氧化物酶,则可以采用与 SOD 同样的加入步骤加入)

[0031] S20,获取骨髓间充质干细胞:

[0032] 取人髌关节手术或下肢骨开放性手术时收集用于原代 MSCs 分离和培养的骨髓标本,肝素抗凝;

[0033] 每份骨髓标本按 1:2 的比例加在密度为 1.073g/ml 的 percoll 分离液上 2300rpm 离心 30min,取中层单核细胞,加入消毒 PBS 缓冲液,1000rpm 离心 10min,洗涤 3 次,弃上清液后得到的细胞即为 MSCs。

[0034] 所得 MSCs 在光学显微镜下计数,调整至 1×10^7 /培养瓶 (25ml) 密度用于细胞原代培养,培养的方式采用血清培养体系培养,具体培养基为含 10% 胎牛血清、氢化可的松 (10^{-6} mol/L)、青霉素 (100U/ml) 及链霉素 (100mg/ml) 的低糖 DMEM(L-DMEM)。

[0035] S30, MSCs 传代与体外扩增:

[0036] 当步骤 S10 的细胞生长到几乎完全融合时,倾去旧培养基,用 PBS 液漂洗 2~3 次,倾去 PBS 液,加入 0.25% 的胰蛋白酶 (内含 0.02% EDTA),加入量以使胰蛋白酶可以完全覆盖瓶底的细胞为准。

[0037] 将培养瓶置于倒置显微镜下观察,见胞质回缩,细胞间隙增大后,立即加入含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养终止消化,吸管顺序轻轻吹打瓶底,倒置显微镜下观察细胞完全脱壁后,按 1:2~1:3 比例传代接种于 25ml 培养瓶 (培养基与步骤 S20 采用相同),放置于 37℃、5% CO₂、95% 湿度的培养箱中培养,直至细胞生长到几乎完全融合时,再次进行传代;每日在倒置显微镜下观察细胞形态及生长情况。

[0038] S40,将步骤 S20 的细胞培养至 P3 代完成时,获取 P3 代的骨髓间充质干细胞用于

保存试验：用 0.25%胰酶消化后，细胞悬液进行细胞计数，约 1×10^6 个 /ml，以每孔 1×10^4 个接种于 96 孔培养板中，于 CO_2 培养箱 37°C 静置培养 30h 后，吸取剩余培养液后，用相应保存液洗涤 2 遍后加入 3ml 现有保存液（0.9WT%氯化钠注射液、5WT%葡萄糖注射液、复方电解质注射液（PlasmalyteA）、1WT%人血白蛋白溶液或 5WT%人血白蛋白溶液作为对照）及本发明保存液，各组设 3 个相同复孔；换液后于 4°C 放置 4h、8h、12h、24h 后分别进行活性评价。

[0039] 上述步骤 S40 用不同的保存液保存之后的细胞的活性评价的方式中，首先检测保存之后的细胞存活率，方法采用台盼蓝染色法检测：

[0040] 将用不同保存液（即现有的几种保存液和）保存后的 MSCs 经过对应保存时间点离心，1000rpm、5min 弃去上清；PBS 重悬细胞沉淀，充分混匀，取 $18 \mu\text{l}$ 细胞悬液与 $2 \mu\text{l}$ 的 0.4% 台盼蓝染液充分混匀；取适量悬液滴加到血球计数板计数腔内，加盖玻片，显微镜下观察；分别计数活细胞与死细胞，计数过程在 3min 内完成，未着色的细胞为活细胞，染成蓝色的细胞为死细胞。

[0041] 细胞存活率（%）= 活细胞数 / 总细胞数 $\times 100\%$ 。

[0042]

	氯化钠注射液	葡萄糖注射液	人白蛋白溶液	复方电解质注射液	本发明
4h	72.37 \pm 10.32%	78.54 \pm 9.64%	85.62 \pm 8.45%	75.24 \pm 8.67%	90.52 \pm 11.69%
8h	43.70 \pm 10.28%	51.12 \pm 6.47%	60.42 \pm 7.97%	52.84 \pm 6.12%	81.26 \pm 12.91%
12h	21.94 \pm 4.34%	23.65 \pm 5.65%	30.36 \pm 6.45%	25.13 \pm 6.25%	59.88 \pm 10.30%
24h	4~6%	4~7%	8.21 \pm 3.51%	4~7%	27.70 \pm 5.29%

[0043] 从上表的各种保存液保存 4h 后的细胞存活率的计算结果，可以看出除了生理盐水（氯化钠）之外，其他几种保存液保存之后细胞存活率相差不大，虽然本发明的存活率稍高一些，但是幅度差异却并不非常大。一方面原因是因为时间比较短，保存的时间为 4h，还无法有非常大的体现的效果。在保存时间继续延长之后，通常保存液的保存后的细胞凋亡数的降低幅度比较大，到最后 24h 后常规保存液保存后的细胞存活率不足 10%，本案明显要高。延长保存时间之后可以体现出各保存液的优劣，首先常规的人白蛋白溶液是作为比较平衡的生命物质，所以比其他的基中保存液的保存后的细胞存活率高，而本发明中有几种氨基酸和葡萄糖共同维持生命，营养更加均衡，在长时间保存后还能具有相对较高的存活率。

[0044] 在上述基础存活率检测的基础上，继续进一步进行细胞贴壁率测定，骨髓间充干是一种贴壁型细胞，其存活的一项指标就是细胞能够贴壁、增殖，因此骨髓间充干贴壁性的差异即反映了细胞活力的差异；检测贴壁率用来反映其存活细胞的细胞表型变化程度和细胞的活性能力：

[0045] 将上述培养的 P3 代细胞消化后用 PBS 制成细胞悬液，以 2×10^6 / 组保存在相应保存介质与保存温度下；按时间点分别保存 4h、8h 结束后，离心 1000rpm、5min，弃上清；用正常完全培养基轻轻漂洗细胞一次；再用完全培养基重悬细胞，每组以 2×10^4 / 孔接种于 24

孔板中,放置于细胞培养箱中培养 24h;待细胞贴壁后,微量移液器移除培养液,用 PBS 轻轻漂洗 2 次,去除未贴壁细胞;70%乙醇固定 20min 后 PBS 轻轻漂洗 1~2 次;结晶紫染液染色 15min(100 μ l,没过孔板底部);去离子水轻轻漂洗 2~3 次,尽可能去除背景颜色;置于显微镜下观察、计数、拍照;细胞贴壁率=已贴壁细胞总数/接种细胞数 \times 100%。

[0046]

	氯化钠注射液	葡萄糖注射液	人白蛋白溶液	复方电解质注射液	本发明
4h	55.23 \pm 9.53%	48.22 \pm 7.58%	46.65 \pm 7.89%	51.22 \pm 11.80%	72.83 \pm 13.62%
8h	25.62 \pm 4.21%	23.67 \pm 4.85%	15.68 \pm 2.54%	23.21 \pm 3.97%	54.97 \pm 17.61%

[0047] 在保存上述保存 4h 后的细胞贴壁率的结构对比可以看出,贴壁率的对比已经比较明显,在现有的常规的保存液中复方电解质注射液相对细胞的损伤或者引起其细胞表型改变的情况更少一些,其他的基中相比可能更大一些,而且相比本发明的保存液保存的细胞应当是贴壁能力弱化至半贴壁程度,所以结构的差异在这一方面即可体现。而当保存时间继续延长至 8h 后,数据更能体现上述结果,由于 8h 后,通常的保存液基本上细胞贴壁性能已经比较弱,继续延长时间至 12h、24h 再行检测基本上可以预测贴壁在 10%左右,在已经能对比体现差异的情形下,本案未进行继续检测。说明本发明的保存液在维持细胞的活性、防止细胞凋亡和转向休眠的问题上有明显的优势。

[0048] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包括在本发明的保护范围之内。