



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106995796 A

(43) 申请公布日 2017. 08. 01

(21) 申请号 201610053977. 9

(22) 申请日 2016. 01. 26

(71) 申请人 李建业

地址 518172 广东省深圳市龙岗区龙城街道  
五联社区规划路 15 号 501

(72) 发明人 李建业

(74) 专利代理机构 深圳市威世博知识产权代理  
事务所 (普通合伙) 44280

代理人 何青瓦

(51) Int. Cl.

C12N 5/071(2010. 01)

A61K 8/98(2006. 01)

A61K 8/64(2006. 01)

A61Q 19/00(2006. 01)

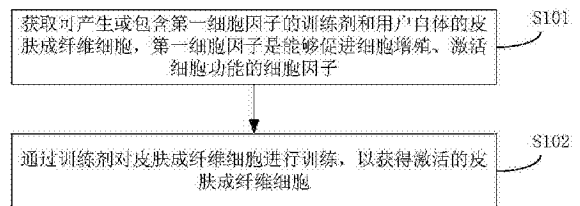
权利要求书2页 说明书15页 附图2页

(54) 发明名称

基于细胞因子的细胞处理方法、试剂盒及冻干粉

(57) 摘要

本发明公开了一种基于细胞因子的细胞处理方法、试剂盒及冻干粉,该方法包括:获取可产生或包含第一细胞因子的训练剂和用户自体的皮肤成纤维细胞,所述第一细胞因子是能够促进细胞增殖、激活细胞功能的细胞因子;通过所述训练剂对所述皮肤成纤维细胞进行训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞。通过上述方式,本发明能够最大限度地为用户自体提供皮肤保养或为达到最大限度地为用户自体提供皮肤保养而提供技术基础。



1. 一种基于细胞因子的细胞处理方法,其特征在于,包括:

获取可产生或包含第一细胞因子的训练剂和用户自体的皮肤成纤维细胞,所述第一细胞因子是能够促进细胞增殖、激活细胞功能的细胞因子;

通过所述训练剂对所述皮肤成纤维细胞进行训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述获取可产生第一细胞因子的训练剂的步骤,包括:

获取间充质干细胞,将所述间充质干细胞作为所述训练剂;

所述通过所述训练剂对所述皮肤成纤维细胞训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞的步骤,包括:

将所述间充质干细胞与所述皮肤成纤维细胞进行共培养,以获得所述激活的皮肤成纤维细胞。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述间充质干细胞来源于骨髓、脐带血和脐带组织、胎盘组织、脂肪组织或牙髓组织。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述获取可产生第一细胞因子的训练剂的步骤,包括:

获取间充质干细胞因子冻干粉;

通过第一溶媒将所述间充质干细胞因子冻干粉溶解为间充质干细胞因子溶液,将所述间充质干细胞因子溶液作为训练剂;

所述通过所述训练剂对所述皮肤成纤维细胞训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞的步骤,包括:

将所述间充质干细胞因子溶液与所述皮肤成纤维细胞进行共培养,以获得所述激活的皮肤成纤维细胞。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述第一细胞因子为成纤维细胞生长因子FGF、表皮细胞生长因子EGF、血小板衍生生长因子PDGF、胶质细胞源性神经营养因子GDNF、胰岛素样生长因子IGF、粒细胞集落刺激因子GCSF、转化生长因子 $\beta$ TGF- $\beta$ 、血管内皮生长因子VEGF、胎盘生长因子PIGF、干细胞因子SCF中的至少一种。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的方法,其特征在于,所述方法还包括:

利用所述激活的皮肤成纤维细胞获取皮肤成纤维细胞多种因子第一溶液;

将所述皮肤成纤维细胞多种因子第一溶液制成皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述方法还包括:

利用第二溶媒将所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子第二溶液,以供所述用户在自身皮肤上使用;或

利用第二溶媒和乳液将所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子乳液,以供所述用户在自身皮肤上使用;或

利用第二溶媒和凝胶将所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子凝胶,以供所述用户在自身皮肤上使用。

8. 一种皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉,其特征在于,所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉是根据权利要求6所述的方法制备的。

9. 一种皮肤成纤维细胞多种因子试剂盒,其特征在于,包括:

皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉,其是根据权利要求6所述的方法制备的;  
第二溶媒,其可溶解所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉,并可施加在皮肤上;  
或乳液,其可施加在皮肤上;  
或凝胶,其可施加在皮肤上;

其中,所述第二溶媒、所述第二溶媒和所述乳液、或所述第二溶媒和所述凝胶可以将所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子第二溶液、皮肤成纤维细胞多种因子乳液、或皮肤成纤维细胞多种因子凝胶,以供所述用户在自身皮肤上使用。

10.根据权利要求9所述的方法,其特征在于,所述第二溶媒的成份包括:无菌水、丙二醇、丙三醇、透明质酸以及薄荷醇中的至少一种。

11.一种基于细胞因子的细胞处理试剂盒,其特征在于,包括:

训练剂的细胞或冻干粉,所述训练剂可产生或包含第一细胞因子,所述第一细胞因子是能够促进细胞增殖、激活细胞功能的细胞因子;

冻存的用户自体的皮肤成纤维细胞;

其中,利用间充质干细胞培养基复苏和培养冻存的间充质干细胞,或利用第一溶媒溶解所述训练剂的冻干粉,获得训练剂,利用皮肤成纤维细胞培养基复苏和培养所述冻存的用户自体的皮肤成纤维细胞,获得用户自体的皮肤成纤维细胞,通过所述训练剂对所述皮肤成纤维细胞训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞。

## 基于细胞因子的细胞处理方法、试剂盒及冻干粉

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细胞技术领域,特别是涉及一种基于细胞因子的细胞处理方法、试剂盒及冻干粉。

### 背景技术

[0002] 细胞因子在面部皮肤保养方面的功能已为人们所熟悉,目前已有多种相关产品上市,比如含有成纤维细胞生长因子(Fibroblast Growth Factor,简写FGF)、表皮细胞生长因子(Epidermal Growth Factor,简写EGF)等类型的单类型重组细胞因子冻干粉。这种类型的产品将冻干粉和溶媒配合使用,多用于创面修复领域。

[0003] 研究发现,脐带和脂肪来源的间充质干细胞培养液可促进皮肤成纤维细胞的增殖,提升胶原蛋白合成量。因此,也有采集间充质干细胞培养上清或将间充质干细胞培养液和裂解液制作成冻干粉的技术,或者将培养上清制作成脂质体,添加到护肤品中的技术,以作为皮肤美容用途。同时,富血小板血浆(Platelet-rich Plasma,简写PRP)在美容方面也被广泛应用;也有多种采用手动离心或者仪器自动离心的方法进行PRP富集制作,并将PRP制作成冻干粉的技术。

[0004] 但是,上述采用来源于脐带间充质干细胞的因子、富血小板血浆或直接采用重组的细胞因子进行皮肤保养,其细胞因子配比,很难真正反映人体的皮肤需求。

### 发明内容

[0005] 本发明主要解决的技术问题是提供一种基于细胞因子的细胞处理方法、试剂盒及冻干粉,能够最大限度地为用户自体提供皮肤保养或为达到最大限度地为用户自体提供皮肤保养而提供技术基础。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用的一个技术方案是:提供一种基于细胞因子的细胞处理方法,包括:获取可产生或包含第一细胞因子的训练剂和用户自体的皮肤成纤维细胞,所述第一细胞因子是能够促进细胞增殖、激活细胞功能的细胞因子;通过所述训练剂对所述皮肤成纤维细胞进行训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞。

[0007] 其中,所述获取可产生第一细胞因子的训练剂的步骤,包括:获取间充质干细胞,将所述间充质干细胞作为所述训练剂;通过所述训练剂对所述皮肤成纤维细胞训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞的步骤,包括:将所述间充质干细胞与所述皮肤成纤维细胞进行共培养,以获得所述激活的皮肤成纤维细胞。

[0008] 其中,所述间充质干细胞来源于骨髓、脐带血和脐带组织、胎盘组织、脂肪组织或牙髓组织。

[0009] 其中,所述获取可产生第一细胞因子的训练剂的步骤,包括:获取间充质干细胞因子冻干粉;通过第一溶媒将所述间充质干细胞因子冻干粉溶解为间充质干细胞因子溶液,将所述间充质干细胞因子溶液作为训练剂;所述通过所述训练剂对所述皮肤成纤维细胞训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞的步骤,包括:将所述间充质干细胞因子溶液与所述皮肤

成纤维细胞进行共培养,以获得所述激活的皮肤成纤维细胞。

[0010] 其中,所述第一细胞因子为成纤维细胞生长因子FGF、表皮细胞生长因子EGF、血小板衍生生长因子PDGF、胶质细胞源性神经营养因子GDNF、胰岛素样生长因子IGF、颗粒细胞集落刺激因子GCSF、转化生长因子BTGF- $\beta$ 、血管内皮生长因子VEGF、胎盘生长因子PIGF、干细胞因子SCF中的至少一种。

[0011] 其中,所述方法还包括:利用所述激活的皮肤成纤维细胞获取皮肤成纤维细胞多种因子第一溶液;将所述皮肤成纤维细胞多种因子第一溶液制成皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉。

[0012] 其中,所述方法还包括:利用第二溶媒将所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子第二溶液,以供所述用户在自身皮肤上使用;或利用第二溶媒和乳液将所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子乳液,以供所述用户在自身皮肤上使用;或利用第二溶媒和凝胶将所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子凝胶,以供所述用户在自身皮肤上使用。

[0013] 为解决上述技术问题,本发明采用的另一个技术方案是:提供一种皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉,所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉是根据上述所述的方法制备的。

[0014] 为解决上述技术问题,本发明采用的又一个技术方案是:提供一种皮肤成纤维细胞多种因子试剂盒,包括:皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉,其是根据上述所述的方法制备的;第二溶媒,其可溶解所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉,并可施加在皮肤上;或乳液,其可施加在皮肤上;或凝胶,其可施加在皮肤上;其中,所述第二溶媒、所述第二溶媒和所述乳液、或所述第二溶媒和所述凝胶可以将所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子第二溶液、皮肤成纤维细胞多种因子乳液、或皮肤成纤维细胞多种因子凝胶,以供所述用户在自身皮肤上使用。

[0015] 其中,所述第二溶媒的成份包括:无菌水、丙二醇、丙三醇、透明质酸以及薄荷醇中的至少一种。

[0016] 为解决上述技术问题,本发明采用的又一个技术方案是:训练剂的细胞或冻干粉,所述训练剂可产生或包含第一细胞因子,所述第一细胞因子是能够促进细胞增殖、激活细胞功能的细胞因子;冻存的用户自体的皮肤成纤维细胞;

[0017] 其中,利用间充质干细胞培养基复苏和培养冻存的有多种来源的间充质干细胞,或利用第一溶媒溶解所述训练剂的冻干粉,获得训练剂,利用皮肤成纤维细胞培养基复苏和培养所述冻存的用户自体的皮肤成纤维细胞,获得用户自体的皮肤成纤维细胞,通过所述训练剂对所述皮肤成纤维细胞训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞。

[0018] 本发明的有益效果是:区别于现有技术的情况,本发明获取可产生或包含第一细胞因子的训练剂和用户自体的皮肤成纤维细胞,第一细胞因子是能够促进细胞增殖、激活细胞功能的细胞因子;通过训练剂对皮肤成纤维细胞进行训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞。由于训练剂对皮肤成纤维细胞进行训练,获得激活的皮肤成纤维细胞,而且,该皮肤成纤维细胞来源于用户自体,通过这种方式,能够为最大限度地真正促进用户自体皮肤保养做好准备,从而为满足皮肤保养的个体化需求提供技术基础。

## 附图说明

- [0019] 图1是本发明基于细胞因子的细胞处理方法一实施方式的流程图；
- [0020] 图2是本发明基于细胞因子的细胞处理方法另一实施方式的流程图；
- [0021] 图3是本发明基于细胞因子的细胞处理方法又一实施方式的流程图；
- [0022] 图4是本发明基于细胞因子的细胞处理方法又一实施方式的流程图。

### 具体实施方式

[0023] 在详细介绍本发明之前,先介绍一下与本发明相关的基础技术知识。

[0024] 体细胞是一个相对于生殖细胞的概念,它是一类细胞类型,其遗传信息不会像生殖细胞那样遗传给下一代。体细胞又分为干细胞和终末分化细胞两大类。

[0025] 干细胞具有自我更新特征和多向分化潜能,包括胚胎干细胞、成体干细胞等多种类型,在再生医学、疾病治疗、抗衰老等领域均具有较大的应用潜力。其中,成体干细胞是一类存在于成人的组织器官中的干细胞类型,在机体修复、更新等方面具有重要作用。科学家发现,成体干细胞减少是人体衰老的主要原因。目前常见的成体干细胞类型包括:来源于新生儿脐带、胎盘组织的间充质干细胞以及来源于成年人脂肪组织、骨髓组织的间充质干细胞。这类细胞贴壁生长,具有梭形形态特征,可分化为成骨、软骨、脂肪等多种细胞类型,并表达特定的表面抗原标记。

[0026] 终末分化体细胞包括组成人体皮肤在内的各类器官组织的多种细胞类型。这类细胞不再具有分化能力,只是执行机体的日常运行功能。其中,皮肤成纤维细胞存在于人体真皮组织中,在生长过程中可分泌多种细胞因子类型,主要包括:成纤维细胞生长因子(Fibroblast Growth Factor,简写FGF)、表皮细胞生长因子(Epidermal Growth Factor,简写EGF)等,这些细胞因子对于皮肤的更新、胶原蛋白的分泌具有重要作用。皮肤成纤维细胞也被用于多项临床研究,以探索其在抗衰老领域的潜在作用。

[0027] 另外,富血小板血浆(Platelet-rich Plasma,简写PRP)也是一种有效的细胞因子来源。PRP通过离心富集血液中的血小板,并激活因子释放而得到。其含有细胞因子类型丰富,如血小板衍生生长因子(Platelet-derived growth factor,简写PDGF)、转化生长因子 $\beta$ (Transforming Growth Factor $\beta$ ,简写TGF- $\beta$ )、血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor,简写VEGF)等。PRP及PRP因子在美容方面也被广泛应用。

[0028] 但是,采用来源于脐带间充质干细胞的因子、富血小板血浆或直接采用重组的细胞因子进行皮肤保养,其细胞因子配比,很难真正反映人体的皮肤需求。

[0029] 本发明通过可产生或包含细胞因子的训练剂对用户自体的皮肤成纤维细胞进行训练,从而获得用户自体的、激活的皮肤成纤维细胞,由于激活的皮肤成纤维细胞是用户自体的,其执行的细胞功能、分泌的细胞因子类型以及细胞因子配比真正反映用户自体的皮肤需求,因此,其分泌的细胞因子能够最大限度地对用户的皮肤进行保养,从而满足皮肤保养的个体化需求。

[0030] 下面结合附图和实施方式对本发明进行详细说明。

[0031] 参阅图1,图1是本发明基于细胞因子的细胞处理方法一实施方式的流程图,包括:

[0032] 步骤S101:获取可产生或包含第一细胞因子的训练剂和用户自体的皮肤成纤维细胞,第一细胞因子是能够促进细胞增殖、激活细胞功能的细胞因子。

[0033] 第一细胞因子是能够促进细胞增殖、激活细胞功能的细胞因子,这种类型的细胞

因子由于能够促进细胞增殖、激活细胞功能,因此,能够促进对应组织的再生与修复,特别是在皮肤保养、抗衰老等方面具有很大的潜力。第一细胞因子包括但不限于:成纤维细胞生长因子FGF、表皮细胞生长因子EGF、血小板衍生生长因子PDGF、胶质细胞源性神经营养因子GDNF、胰岛素样生长因子IGF、颗粒细胞集落刺激因子GCSF、转化生长因子BTGF- $\beta$ 、血管内皮生长因子VEGF、胎盘生长因子PIGF、干细胞因子SCF等等。

[0034] 训练剂可产生第一细胞因子,例如:间充质干细胞、富血小板血浆PRR等,间充质干细胞可以来源于骨髓、脐带血和脐带组织、胎盘组织、脂肪组织或牙髓组织等。

[0035] 或者,训练剂包含第一细胞因子,例如:可以是市售的成纤维细胞生长因子FGF、表皮细胞生长因子EGF等类型的单类型重组细胞因子;或者是市售的两种以上的单类型重组细胞因子混合得到的;或者,通过其它方式得到,只要包含第一细胞因子即可,例如间充质干细胞的培养上清、间充质干细胞培养液和裂解液等等。

[0036] 人体皮肤由外到内分为三层:表皮、真皮以及皮下组织;表皮是皮肤的最外层,能不断新生;真皮主要由胶原纤维及弹性纤维所构成,是与肌肤老化有直接关系的重要部位;皮下组织有防止散热、储备能量和抵御外来机械性冲击的功能。

[0037] 成纤维细胞是皮肤的主要细胞成分,其具有合成和分泌多种细胞因子的功能,在皮肤更新和创伤修复过程中,具有十分重要的作用。用户自体的皮肤成纤维细胞是采用来源于用户自体的皮肤成纤维前体细胞、通过细胞工程技术制备的皮肤成纤维细胞。

[0038] 可以通过现有技术的方法获取用户自体的皮肤成纤维细胞,大致包括如下过程:用户自体皮肤组织的获取、皮肤成纤维细胞的原代分离、皮肤成纤维细胞的传代培养。为了便于保存,还可以包括皮肤成纤维细胞的冻存。

[0039] 步骤S102:通过训练剂对皮肤成纤维细胞进行训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞。

[0040] 通过训练剂对皮肤成纤维细胞进行训练,也即是将训练剂和皮肤成纤维细胞进行共培养,从而获得激活的皮肤成纤维细胞。

[0041] 由于通过现有技术进行分离、培养和储存的皮肤成纤维细胞,多是在用户自体成年后取得的,已经在细胞活性和细胞功能方面存在一定程度的下降,而且,此时的皮肤成纤维细胞没有处在有效激活的状态下,其执行的细胞功能、分泌的细胞因子含量、细胞因子类型和细胞因子配比不能起到真正促进面部皮肤美容保养的作用。因此,本步骤通过训练剂对来源于用户自体的皮肤成纤维细胞进行训练,可以获得用户自体的、激活的皮肤成纤维细胞;在激活状态下的皮肤成纤维细胞,其细胞活性和细胞功能基本处于最好的状态,其分泌的细胞因子含量、细胞因子类型和细胞因子配比,能够最大限度地真正促进用户自体皮肤美容保养的作用。

[0042] 本发明实施方式获取可产生或包含第一细胞因子的训练剂和用户自体的皮肤成纤维细胞,第一细胞因子是能够促进细胞增殖、激活细胞功能的细胞因子;通过训练剂对皮肤成纤维细胞进行训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞。由于训练剂对皮肤成纤维细胞进行训练,获得激活的皮肤成纤维细胞,而且,该皮肤成纤维细胞来源于用户自体,通过这种方式,能够为最大限度地真正促进用户自体皮肤保养做好准备,从而为满足皮肤保养的个体化需求提供技术基础。

[0043] 其中,获取可产生第一细胞因子的训练剂的步骤,可以是:获取间充质干细胞,将

间充质干细胞作为训练剂。

[0044] 间充质干细胞是干细胞的一个研究分支,干细胞是一类具有自我复制和多向分化能力的细胞,它们可以不断地自我更新,并在特定条件下转变成为一种或多种构成人体组织或器官的细胞。其来源可以是骨髓、脐带血和脐带组织、胎盘组织、脂肪组织、牙髓组织等,具有独特的细胞因子分泌功能,能分泌多种细胞因子。

[0045] 可以通过现有技术的方法制备间充质干细胞,大概包括如下过程:间充质干细胞的原代分离和间充质干细胞的传代培养。为了便于长期保存,还包括间充质干细胞冻存的过程。

[0046] 当间充质干细胞作为训练剂时,步骤S102可以是:将间充质干细胞与皮肤成纤维细胞进行共培养,以获得激活的皮肤成纤维细胞。

[0047] 由于间充质干细胞能够分泌多种细胞因子,其在与皮肤成纤维细胞进行共培养时,可以通过旁分泌途径获得激活的皮肤成纤维细胞。

[0048] 在另一实施方式中,获取可产生第一细胞因子的训练剂的步骤,还可以通过下面的方式获得,请参见图2,具体包括子步骤S201和子步骤S202。

[0049] 子步骤S201:获取间充质干细胞因子冻干粉。

[0050] 包含第一细胞因子的间充质干细胞培养上清或将间充质干细胞培养液和裂解液,均不易保存,间充质干细胞因子冻干粉容易长时间保存。

[0051] 通过间充质干细胞或冻存的间充质干细胞,获得间充质干细胞因子溶液,然后将间充质干细胞因子溶液制备得到间充质干细胞因子冻干粉。

[0052] 子步骤S202:通过第一溶媒将间充质干细胞因子冻干粉溶解为间充质干细胞因子溶液,将间充质干细胞因子溶液作为训练剂。

[0053] 第一溶媒是溶解间充质干细胞因子冻干粉的溶媒,第一溶媒可以根据实际应用情况确定其组成成份。在一实施方式中,其成份包括:无菌水、丙二醇、丙三醇;其中,丙二醇的浓度是2%,丙三醇的浓度是3%。

[0054] 当将间充质干细胞因子溶液作为训练剂时,步骤S102可以是:将间充质干细胞因子溶液与皮肤成纤维细胞进行共培养,以获得激活的皮肤成纤维细胞。

[0055] 在一实施方式中,第一细胞因子成纤维细胞生长因子FGF、表皮细胞生长因子EGF、血小板衍生生长因子PDGF、胶质细胞源性神经营养因子GDNF、胰岛素样生长因子IGF、颗粒细胞集落刺激因子GCSF、转化生长因子 $\beta$ TGF- $\beta$ 、血管内皮生长因子VEGF、胎盘生长因子PIGF、干细胞因子SCF中的至少一种。这类第一细胞因子具有刺激细胞生长活性的特点。

[0056] 其中,请参见图3,该方法还可以包括:步骤S103和步骤S104。

[0057] 步骤S103:利用激活的皮肤成纤维细胞获取皮肤成纤维细胞多种因子第一溶液。培养激活的皮肤成纤维细胞,即可获得皮肤成纤维细胞多种因子第一溶液。

[0058] 步骤S104:将皮肤成纤维细胞多种因子第一溶液制成皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉。将皮肤成纤维细胞多种因子第一溶液制成皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉,可以便于保存。

[0059] 参见图4,该方法还可以包括步骤S105:利用第二溶媒将皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子第二溶液,以供用户在自身皮肤上使用;或利用第二溶媒和乳液将皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子乳液,以



供用户在自身皮肤上使用;或利用第二溶媒和凝胶将皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子凝胶,以供用户在自身皮肤上使用。

[0060] 第二溶媒是溶解皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉的溶媒,第二溶媒可以根据实际应用情况确定其组成成份。例如:第二溶媒可以是用于化妆品中的任何具备保湿功能的液体,在一实施方式中,其成份包括:无菌水、丙二醇、丙三醇、透明质酸、薄荷醇中的至少一种。乳液可以是用于化妆品中的任何乳液,在一实施方式中,乳液的主要成份包括橄榄油、乳木果脂、堪地里拉蜡、天然有机橄榄乳化蜡。凝胶可以是用于化妆品中的任何凝胶,在一实施方式中,乳液的主要成份包括凝胶形成剂或冰晶形成剂、无菌水、纯露以及透明质酸。不管以何种形式使用,皮肤成纤维细胞多种因子第二溶液、皮肤成纤维细胞多种因子乳液或皮肤成纤维细胞多种因子凝胶于4度冷藏的时间不能太长,一般不超过2天。

[0061] 本发明还提供一种皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉,皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉是根据上述的方法制备的,详细说明请参见上述方法部分,在此不再赘叙。

[0062] 本发明还提供一种皮肤成纤维细胞多种因子试剂盒,该试剂盒包括:皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉和第二溶媒。该皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉是根据上述的方法制备的;该第二溶媒可溶解皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉,并可施加在皮肤上;其中,第二溶媒可以将皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子第二溶液,以供用户在自身皮肤上使用。

[0063] 其中,第二溶媒的成份包括:无菌水、丙二醇、丙三醇、透明质酸以及薄荷醇中的至少一种。在一实施方式中,第二溶媒的成份包括:无菌水、丙二醇、丙三醇、透明质酸以及薄荷醇,且丙二醇浓度为2%,丙三醇浓度为3%,透明质酸的浓度为0.02%,薄荷醇的浓度为0.02%。

[0064] 本发明还提供另一种皮肤成纤维细胞多种因子试剂盒,该试剂盒包括:皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉、第二溶媒以及乳液。该皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉是根据上述的方法制备的;该第二溶媒可溶解皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉,并可施加在皮肤上;该乳液可施加在皮肤上;其中,第二溶媒和乳液可以将皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子乳液,以供用户在自身皮肤上使用。

[0065] 其中,第二溶媒的成份包括:无菌水、丙二醇、丙三醇、透明质酸以及薄荷醇中的至少一种。在一实施方式中,第二溶媒的成份包括:无菌水、丙二醇、丙三醇、透明质酸以及薄荷醇,且丙二醇浓度为2%,丙三醇浓度为3%,透明质酸的浓度为0.02%,薄荷醇的浓度为0.02%。

[0066] 在一实施方式中,乳液的成份包括:橄榄油、乳木果脂、堪地里拉蜡以及天然有机橄榄乳化蜡。

[0067] 本发明还提供一种皮肤成纤维细胞多种因子试剂盒,该试剂盒包括:皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉、第二溶媒以及凝胶。其中,皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉是根据上述的方法制备的;第二溶媒可溶解所述皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉,并可施加在皮肤上;凝胶可施加在皮肤上;其中,第二溶媒和凝胶可以将皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉配置成皮肤成纤维细胞多种因子凝胶,以供用户在自身皮肤上使用。

[0068] 其中,第二溶媒的成份包括:无菌水、丙二醇、丙三醇、透明质酸以及薄荷醇中的至少一种。在一实施方式中,第二溶媒的成份包括:无菌水、丙二醇、丙三醇、透明质酸以及薄

荷醇,且丙二醇浓度为2%,丙三醇浓度为3%,透明质酸的浓度为0.02%,薄荷醇的浓度为0.02%。

[0069] 在一实施方式中,凝胶的成份包括:凝胶形成剂或冰晶形成剂、无菌水、纯露以及透明质酸。

[0070] 本发明还提供一种基于细胞因子的细胞处理试剂盒,该试剂盒包括:训练剂的细胞或冻干粉和冻存的用户自体的皮肤成纤维细胞。其中,训练剂可产生或包含第一细胞因子,第一细胞因子是能够促进细胞增殖、激活细胞功能的细胞因子;利用间充质干细胞培养基复苏和培养冻存的间充质干细胞,或利用第一溶媒溶解训练剂的冻干粉,获得训练剂,利用皮肤成纤维细胞培养基复苏和培养冻存的用户自体的皮肤成纤维细胞,获得用户自体的皮肤成纤维细胞,通过训练剂对皮肤成纤维细胞训练,以获得激活的皮肤成纤维细胞。第一溶媒和细胞培养基可以根据实际应用情况现用现配。当然也可以在该细胞处理试剂盒中配备已经配制好的第一溶媒和细胞培养基,这样更好方便用户直接使用。

[0071] 下面以具体的处理过程为例来说明上述的方法和产品。需要说明的是,在不同的应用情况和应用环境下,具体的处理过程存在差别,在此并不作限定。

[0072] 一、自体皮肤成纤维细胞分离培养:

[0073] 1)皮肤组织的获取:由专业人员使用医用皮肤取样器获取用户自体一定大小的皮肤块,快速放入含有皮肤成纤维细胞完全培养基的保存液中。在培养皿中,用PBS溶液充分冲洗皮肤组织上的血迹,并将皮肤组织剪成多个小块,继续用PBS溶液充分冲洗。

[0074] 2)皮肤成纤维细胞的原代分离:将冲洗后的皮肤组织块转移至稍大的离心管中,并加入合适浓度的分散酶进行消化。消化完成后,肉眼观察消化状态,并用一定体积的PBS溶液洗涤多次,充分去除酶消化液。用器械分离表皮组织和真皮组织,取真皮组织,转入新的离心管,并加入一定浓度的I型胶原酶进行消化,肉眼观察消化状态,并用PBS溶液洗涤多次,充分去除酶消化液。在消化完成的组织中,加入皮肤成纤维细胞完全培养基,混合均匀后,整体转入有培养基的培养皿中,在二氧化碳培养箱中进行培养。观察细胞形态,一定天数后添加皮肤成纤维细胞完全培养基,观察培养至细胞融合度达预定要求(例如:80%以上)。

[0075] 3)皮肤成纤维细胞的传代培养:吸取细胞融合度达预定要求(例如:80%以上)的培养皿中的培养基,并用PBS冲洗培养皿,用一定浓度的胰酶消化细胞,将消化后的细胞转入T175培养瓶中继续扩大培养。

[0076] 4)皮肤成纤维细胞的冻存:在T175培养瓶中,细胞融合度达预定要求(例如:80%以上)后,用一定浓度的胰酶消化细胞,用皮肤成纤维细胞完全培养基吹打培养瓶底部,并收集细胞悬液。用PBS溶液洗涤细胞悬液,离心获取细胞沉淀。取等体积的皮肤成纤维细胞完全培养基和胎牛血清,混合均匀后悬浮细胞块,用细胞计数仪计算细胞浓度,并按照要求的浓度(例如: $5 \times 10^6$ /ml)进行稀释,稀释液为50%的皮肤成纤维细胞完全培养基和50%的胎牛血清混合液。在每个冻存管中加入冻存管1/2体积稀释后的细胞悬液,加入一定浓度(例如10%)的二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide,简称DMSO)。将分装了细胞的冻存管放入程序降温仪中,按照设定的程序进行降温,随后转入气相液氮罐中进行长期储存。

[0077] 二、训练剂的准备和制作:

[0078] 1)间充质干细胞的分离培养,分别以来源于脐带组织和脂肪组织的为例:

[0079] a1. 脐带间充质干细胞的原代分离:由专业人员取一定长度的脐带组织,快速放入含有脐带间充质干细胞完全培养基的保存液中。在培养皿中,用PBS溶液充分冲洗脐带组织上的血迹,抽取静脉和动脉,并用器械剪开脐带组织,剥离华通氏胶组织,并将华通氏胶组织转移到新的培养皿中,继续充分冲洗,收集进稍大的离心管中,并剪成多个小组织块,称量组织块重量。在组织块中加入脐带间充质干细胞完全培养基,在每个T75培养瓶中加入一定体积的组织块,再加入一定体积的完全培养基,放入预设条件的二氧化碳培养箱中进行培养。在培养后的一个星期左右,显微镜下观察细胞贴壁情况,并在瓶中加入脐带间充质干细胞完全培养基,继续培养一个星期左右,并倾斜吸取培养瓶的培养基,重新加入新的脐带间充质干细胞完全培养基,放入二氧化碳培养箱中进行培养。每天观察细胞生长情况,至细胞融合度达预定要求(例如:80%以上)。

[0080] b1. 脐带间充质干细胞的传代培养:对于细胞融合度达预定要求(例如:80%以上)的培养瓶,吸取培养基并用PBS冲洗,用胰酶消化细胞,并将消化后的细胞转入T175培养瓶中继续扩大培养。

[0081] c1. 脐带间充质干细胞的冻存:在T175培养瓶中细胞融合度达预定要求后,用胰酶消化细胞,用脐带间充质干细胞完全培养基吹打培养皿底部,并收集细胞悬液。用PBS溶液洗涤细胞悬液,离心获取细胞块。取等体积的脐带间充质干细胞完全培养基和胎牛血清,混合均匀后悬浮细胞沉淀,用细胞计数仪计算细胞浓度,并按照预定浓度进行稀释,稀释液为50%的脐带间充质干细胞完全培养基和50%的胎牛血清混合液。在每个冻存管中加入1/2稀释后的细胞悬液,加入DMSO。将分装了细胞的冻存管放入程序降温仪中,按照设定的程序进行降温,随后转入气相液氮罐中进行长期储存。

[0082] a2. 脂肪间充质干细胞的原代培养:由专业人员取一定体积的脂肪组织,将PBS溶液加入装有脂肪组织的离心管中,反复吹打,静置,然后用吸管吸出脂肪组织下层的液体。重复这一过程,直至所吸出的液体透明,不带红色血细胞。在清洗后的脂肪组织中加入与脂肪组织同体积的消化液,消化液的主要成分为胰酶和I型胶原酶,在其中一种配方中,胰酶的浓度为0.2%,I型胶原酶的浓度为0.15%。在37℃恒温摇床中,震荡消化。消化后,液面分为三层,吸取最下层含细胞的液体放入新的离心管中,并加入脂肪间充质干细胞完全培养基终止酶消化过程。将离心管离心,去除上清,然后加入脂肪间充质干细胞培养基轻轻吹打成细胞悬液,将各离心管中的细胞悬液收集到一起,混合均匀,用细胞计数仪测定细胞悬液浓度。在每个T75培养瓶中加入一定量细胞悬液,再加入完全培养基,放入预设条件(例如37℃,5%CO<sub>2</sub>浓度)的二氧化碳培养箱中进行培养。24小时后,镜下观察,如已有细胞贴壁即可进行第一次换液。此后每天观察细胞生长情况,至细胞融合度达预定要求(例如:80%以上)。

[0083] b2. 脂肪间充质干细胞的传代培养:对于细胞融合度达80%以上的培养瓶,吸取培养基并用PBS冲洗,用0.25%的胰酶消化细胞5分钟,并将消化后的细胞转入T175培养瓶中继续扩大培养;

[0084] c2. 脂肪间充质干细胞冻存:对于一个细胞融合度达预定要求(例如:80%以上)的培养瓶,用胰酶消化细胞,用脂肪间充质干细胞完全培养基吹打培养皿底部,并收集细胞悬液。用PBS溶液洗涤细胞悬液两次,离心获取细胞块。取等体积的脂肪间充质干细胞完全培养基和胎牛血清,混合均匀后悬浮细胞沉淀,用细胞计数仪计算细胞浓度,并按照预定浓度

进行稀释,稀释液为50%的脂肪间充质干细胞完全培养基和50%的胎牛血清混合液。在每个冻存管中加入1/2稀释后的细胞悬液,加入DMSO。将分装了细胞的冻存管放入程序降温仪中,按照设定的程序进行降温,随后转入气相液氮罐中进行长期储存。

[0085] 2)脐带间充质干细胞因子冻干粉的制作:

[0086] a.间充质干细胞因子溶液的制备:取生长良好且传代不超过5次的脐带间充质干细胞,将大多数培养皿内的间充质干细胞培养基转移到新的试管中,用剩余的间充质干细胞完全培养基吹打培养瓶底部,收集细胞悬液,并用PBS溶液洗涤细胞悬液,离心获取细胞沉淀,并悬浮在之前收集的间充质干细胞培养基中,用超声破碎的方式裂解细胞。将超声破碎后的细胞液离心,将上清液转移至新的离心管中,并用无菌的0.22 $\mu$ m过滤筛过滤,得到间充质干细胞因子溶液。

[0087] b.间充质干细胞因子冻干粉的制作:将间充质干细胞因子溶液的蛋白含量调整至预定浓度,加入冻干保护剂,混合均匀,并用无菌的0.22 $\mu$ m过滤筛过滤。在每个西林瓶中放入一定体积滤好的间充质干细胞因子溶液,放入程序降温盒中在-80度冰箱放置一晚进行预冷,然后放入预冷至-50 $^{\circ}$ C的真空冻干机中,在-50 $^{\circ}$ C冷冻干燥一天左右,检查冻干状况,并压盖密封。

[0088] c.间充质干细胞因子溶媒(即第一溶媒)的制作:溶媒主要成分包括无菌水、丙二醇、丙三醇,在一实施方式中,丙二醇浓度为2%,丙三醇浓度为3%,混合完成后用无菌的0.22 $\mu$ m过滤筛过滤。在每个西林瓶中放入一定体积的溶媒,压盖密封,置于4 $^{\circ}$ C干燥处储存。

[0089] 三、细胞处理过程:

[0090] 1)自体皮肤成纤维细胞-脐带间充质干细胞的训练:

[0091] 方法一:间充质干细胞共培养训练:

[0092] a.从液氮罐中取传代不超过5代的自体皮肤成纤维细胞,在37 $^{\circ}$ C水浴中复苏,并在六孔板的每个孔内接种例如 $1 \times 10^5$ 细胞,贴壁培养24小时左右,至状态稳定。

[0093] b.同时,取传代不超过五代的脐带间充质干细胞,在T75培养瓶中,观察生长状态是否良好。如是,将 $1 \times 10^5$ 脐带间充质干细胞放入适用于六孔板的细胞培养小室(transwell)中。

[0094] c.将六孔板内的培养基换成细胞训练系统完全培养基,并将transwell放入对应的六孔板内。在预设条件的二氧化碳培养箱中将两种细胞共同培养48小时左右,对于自体皮肤成纤维细胞进行充分训练。

[0095] 方法二:间充质干细胞因子溶液的训练:

[0096] a.从液氮罐中取传代不超过5代的自体皮肤成纤维细胞,在37 $^{\circ}$ C水浴中复苏,并在T75培养瓶内接种例如 $1 \times 10^6$ 细胞,贴壁培养例如24小时,至状态稳定。

[0097] b.取按照“二、训练剂的准备和制作”所述方法制作的间充质干细胞因子冻干粉一瓶,将溶媒加入因子冻干粉中,混合均匀,静置稍待液体清澈。取混合后的间充质干细胞因子溶液,加入自体皮肤成纤维细胞培养瓶中,在预设条件的二氧化碳培养箱中将两种细胞共同培养例如48小时左右,对于自体皮肤成纤维细胞进行充分训练。

[0098] 2)训练效果测定:

[0099] a.细胞训练系统对自体成纤维细胞增殖活性的作用:

[0100] 同时设置两套相同细胞来源和数量的自体皮肤成纤维细胞培养体系,一套接受本

发明训练剂的训练,一套不接受训练。在训练周期结束时,收集细胞,测定细胞数量和活率,并使用流式细胞仪对于整体细胞周期进行测定。

[0101] 具体地,同时设置四套相同细胞来源和数量的自体皮肤成纤维细胞培养体系,其中两套:起始自体皮肤成纤维细胞数量 $1 \times 10^5$ ,贴壁生长24小时,一套接受间充质干细胞训练剂的训练,与间充质干细胞共培养48小时,一套不接受训练;另外两套:起始自体皮肤成纤维细胞数量 $1 \times 10^6$ ,贴壁生长24小时,一套接受间充质干细胞因子冻干粉训练剂的训练,与间充质干细胞因子冻干粉所配制的间充质干细胞因子溶液共培养48小时,一套不接受训练。在训练周期结束时,收集细胞,测定细胞数量和活率,并使用流式细胞仪对于整体细胞周期进行测定。具体数据请参见表1:

[0102] 表1

[0103]

		间充质干细胞		间充质干细胞因子冻干粉	
		对照组	训练组	对照组	训练组
细胞数量		$(3.07 \pm 0.015) \times 10^5$	$(3.34 \pm 0.021) \times 10^5$	$(3.12 \pm 0.015) \times 10^6$	$(3.43 \pm 0.028) \times 10^6$
细胞活率		$(90 \pm 2)\%$	$(95 \pm 2)\%$	$(90 \pm 2)\%$	$(95 \pm 3)\%$
细胞周期	G0/G1	$50.7 \pm 3.1$	$25.8 \pm 2.9$	$52.1 \pm 2.9$	$26.2 \pm 3.1$
	S	$31.7 \pm 4.8$	$48.7 \pm 3.5$	$30.1 \pm 3.9$	$49.9 \pm 3.3$
	G2/M	$17.6 \pm 2.9$	$25.5 \pm 3.1$	$17.8 \pm 3.0$	$23.9 \pm 2.8$

[0104] 备注:G0/G1代表DNA合成前期,S代表DNA合成期,G2/M代表DNA合成后期和分裂期。

[0105] 从表1可以看到:以间充质干细胞和间充质干细胞因子冻干粉为训练剂时,训练组的细胞数量比对照组的细胞数量多8%~10%左右,训练组的细胞活率比对照组的细胞活率多5.6%左右。训练组中处于细胞DNA合成期的细胞的占比远远大于对照组中处于DNA合成期的细胞的占比,这说明训练组的细胞大部分是处于DNA积极合成状态,增值活性强。

[0106] b.细胞训练系统对自体成纤维细胞迁移能力的影响:

[0107] 在六孔板的每个孔内接种例如 $5 \times 10^5$ 细胞,在设置条件为 $37^\circ\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$ 浓度二氧化碳培养箱中培养至细胞铺满板底。用1ml规格的枪头垂直于底部,制造尽量均一的细胞划痕,并用PBS冲洗去划痕产生的细胞碎片。在一半的孔内加入细胞训练剂,一半设置为不加细胞训练剂的同期对照,比较细胞训练系统对人成纤维细胞迁移能力的影响。

[0108] 具体地,以间充质干细胞为训练剂时,起始自体皮肤成纤维细胞数量 $1 \times 10^5$ (也记为 $1 \times 10^5$ ),贴壁生成24小时,接收训练的一套,划痕后与间充质干细胞共培养8小时;以间充质干细胞因子冻干粉为训练剂时,起始自体皮肤成纤维细胞数量 $1 \times 10^6$ (也记为 $1 \times 10^6$ ),贴壁生成24小时,接收训练的一套,划痕后与间充质干细胞因子冻干粉所配制的间充质干细胞因子溶液共培养8小时。在一半的孔内加入细胞训练剂,一半设置为不加细胞训练剂的同期对照,比较细胞训练系统对人成纤维细胞迁移能力的影响。具体数据请参见表2:

[0109] 表2

		间充质干细胞		间充质干细胞因子冻干粉	
		对照组	训练组	对照组	训练组
[0110]	起始划痕宽度	1	1	1	1
	终末划痕宽度	0.72 ± 0.08	0.35 ± 0.05	0.68 ± 0.08	0.35 ± 0.03

[0111] 备注:起始划痕宽度减去终末划痕宽度,为细胞迁移走过的相对宽度,相对宽度越长,细胞迁移速度越快。

[0112] 从表2可以看出,以间充质干细胞和间充质干细胞因子冻干粉为训练剂时,训练组的细胞的迁移速度明显要比对照组的快很多,将近快一倍左右。

[0113] c. 细胞训练系统对自体皮肤成纤维细胞胶原蛋白分泌能力的影响:

[0114] 在六孔板的每个孔内接种例如 $5 \times 10^5$ 细胞,在设置条件为 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 浓度的二氧化碳培养箱中培养24小时,在一半的孔内加入训练剂,一半的孔内不加训练剂,继续培养72小时。取上清50 $\mu\text{l}$ 于试管中,100 $^\circ\text{C}$ 烘干后加入一定浓度的NaOH溶液50 $\mu\text{l}$ ,高氯酸溶液1ml和氯胺T溶液1ml,于65 $^\circ\text{C}$ 水浴中震荡显色15分钟,在550nm下用分光光度计测A值,并计算胶原蛋白分泌量。

[0115] 具体地,以间充质干细胞为训练剂时,起始自体皮肤成纤维细胞数量 $1 \times 10^5$ (也记为 $1 \times 10^5$ ),贴壁生成24小时,接收训练的一套,然后与间充质干细胞共培养72小时;以间充质干细胞因子冻干粉为训练剂时,起始自体皮肤成纤维细胞数量 $1 \times 10^6$ (也记为 $1 \times 10^6$ ),贴壁生成24小时,接收训练的一套,然后与间充质干细胞因子冻干粉所配制的间充质干细胞因子溶液共培养72小时。具体数据请参见表3:

[0116] 表3

		间充质干细胞		间充质干细胞因子冻干粉	
		对照组	训练组	对照组	训练组
[0117]	胶原蛋白分泌能力的倍数	1	1.62 ± 0.45	1	1.58 ± 0.42

[0118] 备注:胶原蛋白分泌能力的倍数是指训练组胶原蛋白的分泌量相对于对照组的倍数。

[0119] 从表3可以看出,以间充质干细胞和间充质干细胞因子冻干粉为训练剂时,训练组的细胞的胶原蛋白分泌的能力比对照组的高将近60%左右。

[0120] d. 细胞训练系统对自体皮肤成纤维细胞内SOD酶活性的影响:

[0121] 同时设置两套相同细胞来源和数量的自体皮肤成纤维细胞培养体系,一套接受训练,一套不接受训练。在训练周期结束时候,收集细胞,将离心后的细胞沉淀悬浮在预冷的缓冲液中超声破碎,并离心,收集离心上清,并按照SOD酶检测试剂盒说明方法进行操作、分析和比较。

[0122] 具体地,以间充质干细胞为训练剂时,起始自体皮肤成纤维细胞数量 $1 \times 10^5$ (也记为 $1 \times 10^5$ ),贴壁生成24小时,接收训练的一套,然后与间充质干细胞共培养48小时;以间充

质干细胞因子冻干粉为训练剂时,起始自体皮肤成纤维细胞数量 $1 \times 10^6$ (也记为 $1 \times 10^6$ ),贴壁生成24小时,接收训练的一套,然后与间充质干细胞因子冻干粉所配制的间充质干细胞因子溶液共培养48小时。具体数据请参见表4:

[0123] 表4

	间充质干细胞		间充质干细胞因子冻干粉	
	对照组	训练组	对照组	训练组
[0124] SOD值(SOD活性增加的倍数)	1	1.22 ± 0.03	1	1.20 ± 0.03

[0125] 备注:SOD活性增加的倍数是指相对于对照组的倍数。

[0126] 从表4可以看出,以间充质干细胞和间充质干细胞因子冻干粉为训练剂时,训练组的细胞的SOD酶活性比对照组的高将近20%左右。

[0127] e.细胞训练系统对自体皮肤成纤维细胞抗紫外损伤的影响:

[0128] 在六孔板的每个孔内接种例如 $1 \times 10^5$ 细胞,在设置条件为 $37^\circ\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$ 浓度的二氧化碳培养箱中培养,长至80%融合度时,用UVA紫外线照射细胞,每天照射两小时,共计四天。同时设置一个同样细胞来源和数量的六孔板,作为不接受紫外照射的阴性对照。第五天,在接受紫外照射的六孔板内,一半加入训练剂,一半设置为不加训练剂的同期对照;在未接受紫外照射的六孔板内,同样一半加入训练剂,一半设置为不加训练剂的同期对照。训练48小时后,收集细胞,提取RNA,进行实时RT-PCR,比较与皮肤成纤维细胞胶原分泌等功能紧密相关的基因(包括COL1A1、COL4A1、COL5A1等)表达量。具体数据请参见表5:

[0129] 表5

	间充质干细胞			间充质干细胞因子冻干粉		
	未接受紫外损伤阴性对照	接受紫外损伤、未训练组	接受紫外损伤、训练组	未接受紫外损伤阴性对照	接受紫外损伤、未训练组	接受紫外损伤、训练组
[0130] COL1A1 (阴性对照的倍数)	1	0.58 ± 0.01	1.06 ± 0.01	1	0.56 ± 0.01	1.02 ± 0.02
COL4A1 (阴性对照的倍数)	1	0.65 ± 0.02	1.05 ± 0.01	1	0.67 ± 0.01	1.07 ± 0.01
COL5A1 (阴性对照的倍数)	1	0.47 ± 0.01	0.86 ± 0.01	1	0.48 ± 0.01	0.88 ± 0.01

[0131] 备注:阴性对照的倍数是指接收紫外线照射、未训练组和接收紫外线照射、训练组的基因含量COL1A1、COL4A1、COL5A1相对阴性对照的倍数。

[0132] 从表5可以看出:接收紫外线照射、未训练组的基因含量COL1A1、COL4A1、COL5A1相

对阴性对照来说均大大降低,接收紫外线照射、训练组的基因含量COL1A1、COL4A1、COL5A1相对阴性对照来说均保持基本稳定,这说明训练组有很强的抗紫外损伤的能力。

[0133] f. 细胞因子含量测定:

[0134] 同时设置两套相同细胞来源和数量的自体皮肤成纤维细胞培养体系,一套接受训练,一套不接受训练。在训练周期结束时候,收集细胞,用ELISA试剂盒对于主要细胞因子的浓度进行测定和比较。

[0135] 具体地,以间充质干细胞为训练剂时,起始自体皮肤成纤维细胞数量 $1 \times 10^5$ (也记为 $1 \times 10^5$ ),贴壁生成24小时,接收训练的一套,然后与间充质干细胞共培养48小时;以间充质干细胞因子冻干粉为训练剂时,起始自体皮肤成纤维细胞数量 $1 \times 10^6$ (也记为 $1 \times 10^6$ ),贴壁生成24小时,接收训练的一套,然后与间充质干细胞因子冻干粉所配制的间充质干细胞因子溶液共培养48小时。具体数据请参见表6:

[0136] 表6

	间充质干细胞		间充质干细胞因子冻干粉	
	对照组	训练组	对照组	训练组
FGF (FGF 增加的倍数)	1	1.14 ± 0.01	1	1.13 ± 0.01
EGF (EGF 增加的倍数)	1	1.10 ± 0.01	1	1.12 ± 0.01
GDNF (GDNF 增加的倍数)	1	1.16 ± 0.02	1	1.15 ± 0.01
IGF2 (IGF2 增加的倍数)	1	1.20 ± 0.01	1	1.22 ± 0.01

[0137] 备注:增值的倍数是指相对于对照组的倍数;GDNF:胶质细胞源性神经营养因子,glial cell-derived neurotrophic factor;IGF2:胰岛素样生长因子2,insulin-like growth factor 2。

[0139] 从表6可以看出,以间充质干细胞和间充质干细胞因子冻干粉为训练剂时,训练组的细胞所分泌的细胞因子比对照组的高,大于10%以上。

[0140] 四、训练后的自体皮肤成纤维细胞多种因子冻干:

[0141] 1) 训练后的自体皮肤成纤维细胞多种因子溶液的制备:

[0142] 取训练后的自体皮肤成纤维细胞,吸取培养上清,用胰酶消化,用皮肤成纤维细胞完全培养基吹打培养瓶底部,收集细胞悬液,并用PBS溶液洗涤细胞悬液,离心获取细胞沉淀,并悬浮在无菌水中,用超声破碎的方式裂解细胞。将超声破碎后的细胞液离心,将上清液转移至新的离心管中,并用无菌的0.22 $\mu$ m过滤筛过滤,得到训练后的自体皮肤成纤维细胞多种因子溶液。



[0143] 2)训练后的自体皮肤成纤维细胞多种因子的冻干:

[0144] 将训练后的自体皮肤成纤维细胞多种因子溶液的蛋白含量调整至预定浓度,加入冻干保护剂,混合均匀,并用无菌的0.22 $\mu$ m过滤筛过滤。在每个西林瓶中放入例如1mL过滤好的自体皮肤成纤维细胞多种因子溶液,放入程序降温盒中在例如-80 $^{\circ}$ C冰箱放置例如12小时左右预冷,然后放入预冷至例如-50 $^{\circ}$ C的真空冻干机中,在-50 $^{\circ}$ C冷冻干燥例如24小时左右,检查冻干状况,并压盖密封。

[0145] 五、产品的完整性和包装:

[0146] 1)训练后的自体皮肤成纤维细胞多种因子试剂盒(商品可以称为自体细胞衍生品)的包装:

[0147] a.第二溶媒配置:第二溶媒主要成分包括无菌水、丙二醇、丙三醇、透明质酸、薄荷醇,在一实施方式中,丙二醇浓度为2%,丙三醇浓度为3%,透明质酸浓度为0.02%,薄荷醇的浓度为0.02%。混合完成后用无菌的0.22 $\mu$ m过滤筛过滤。在每个例如5mL规格的西林瓶中放入例如3mL溶媒,压盖密封,置于4 $^{\circ}$ C干燥处储存。

[0148] b.乳液配置:乳液主要成分包括橄榄油、乳木果脂、堪地里拉蜡、天然有机橄榄乳化蜡。

[0149] c.凝胶配置:凝胶主要成分包括凝胶形成剂或冰晶形成剂、无菌水、纯露以及透明质酸。

[0150] d.产品规格:取1支溶媒倒入1支自体皮肤成纤维细胞多种因子冻干粉中,摇匀溶解,总量为例如3mL。可以液体方式涂抹使用,或者将液体加入乳液中,混合使用。建议1支多种因子冻干粉,无论以何种形式使用,分2天用完。

[0151] e.产品储存:多种自体皮肤成纤维细胞因子溶液开封后,无论以液体形式还是乳液形式、凝胶形式,必须在2-8 $^{\circ}$ C环境中冷藏,冷藏使用时间不超过2天。

[0152] 2)细胞训练系统的包装:

[0153] a.产品规格:取1支溶媒倒入1支训练剂(间充质干细胞因子)冻干粉中,摇匀溶解,溶液总量为例如3mL。在每 $1 \times 10^6$ 自体皮肤成纤维细胞的训练体系中,加入例如0.5mL训练剂溶液。

[0154] b.产品储存:未用完的训练剂溶液,可以分装至1.5mLEppendorf管中,紧密管口,在2-8 $^{\circ}$ C环境中冷藏,冷藏时间不超过一个月。

[0155] 通过本发明的方法,有以下效果:

[0156] 1)经训练后的自体皮肤成纤维细胞,增殖能力变强、迁移速度增高、胶原蛋白分泌能力变强、抗紫外损伤能力增强、SOD酶活性增加、与细胞功能活性相关基因表达量增高,镜下染色发现衰老细胞比例减少。

[0157] 2)以冻干粉的形式储存训练系统的训练剂,可在急需情况下有效提升训练进度,是新鲜的间充质干细胞以及PRP的一个可长期储存的替代剂。

[0158] 3)训练后的皮肤成纤维细胞多种细胞因子冻干后,可在4度条件下长期储存,保证使用的便利性。同时,将冻干溶液加入到乳液或凝胶中的使用方法,也提升产品在颈部等较难延展区域使用的便捷性。

[0159] 以上所述仅为本发明的实施方式,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的

技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

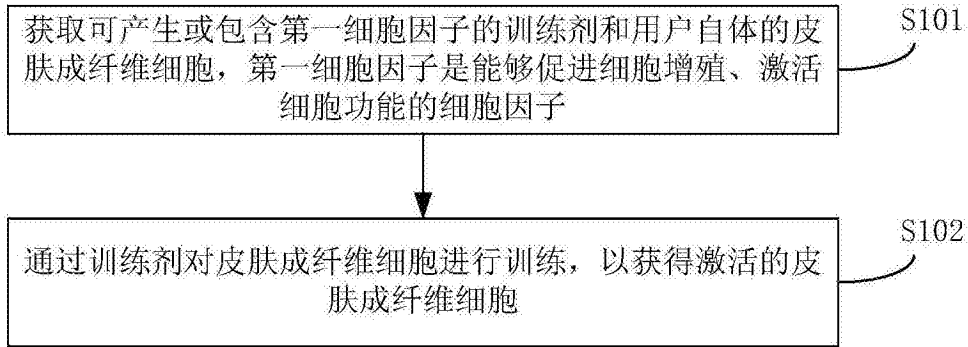


图1

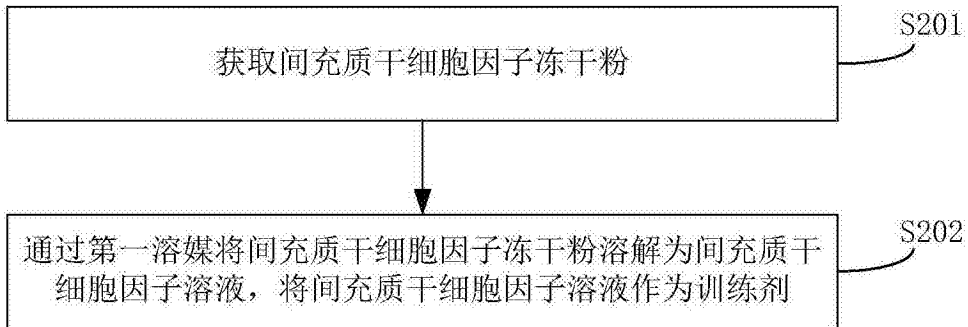


图2

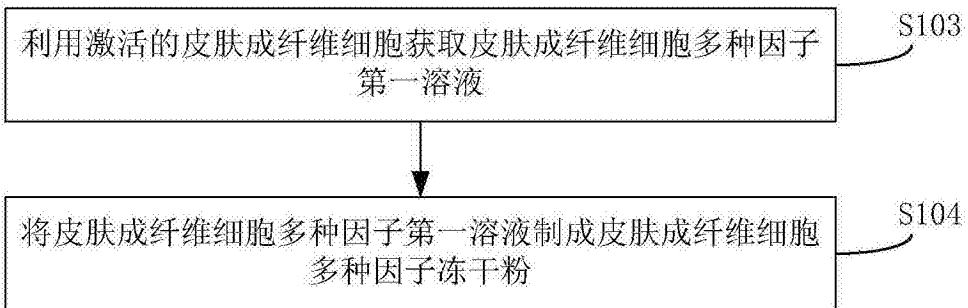


图3

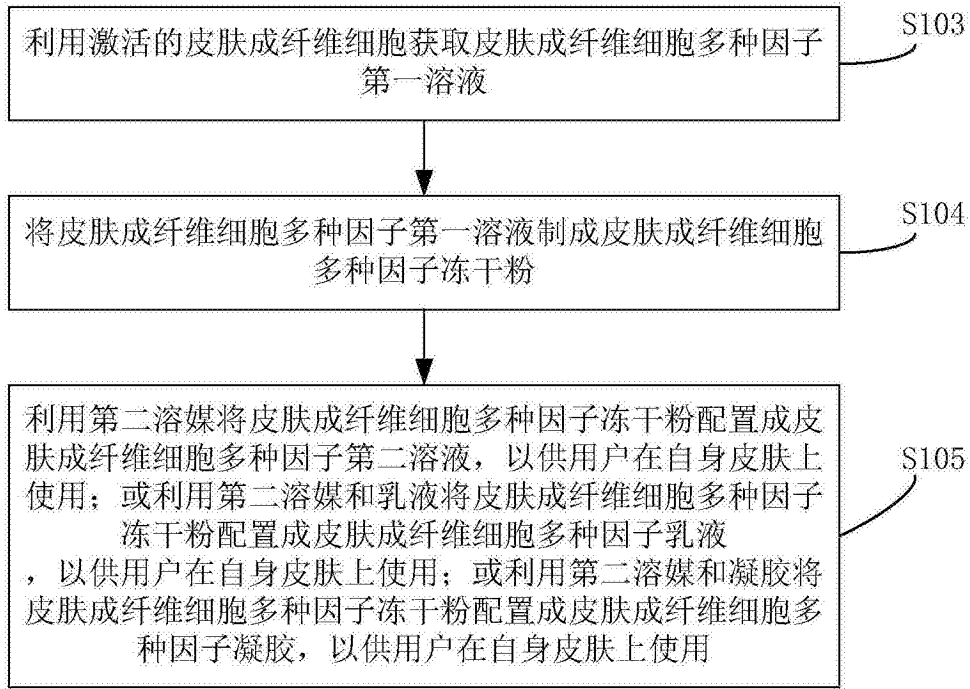


图4