



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107118552 B

(45)授权公告日 2018.12.18

(21)申请号 201710301853.2

C08J 5/18(2006.01)

(22)申请日 2017.05.02

C08J 3/28(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C08J 3/24(2006.01)

申请公布号 CN 107118552 A

C12N 5/0775(2010.01)

(43)申请公布日 2017.09.01

审查员 刘晓波

(73)专利权人 中山大学中山眼科中心

地址 510060 广东省广州市先烈南路54号

(72)发明人 欧阳宏 吴钧

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 单香杰

(51)Int.Cl.

C08L 77/08(2006.01)

C08L 89/00(2006.01)

C08L 71/02(2006.01)

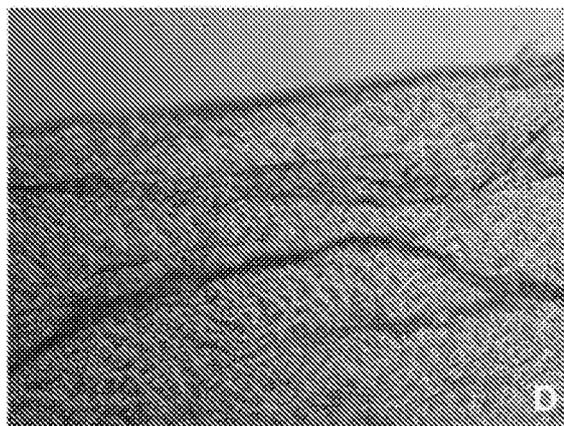
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种基于明胶和氨基酸的复合膜及在膜上培养角膜缘干细胞的方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于明胶和氨基酸的复合膜及在膜上培养角膜缘干细胞的方法。所述复合膜是利用明胶、甲基丙烯酸酐,杜氏磷酸缓冲液(DPBS)、蒸馏水在受控条件下制备甲基丙烯酸酐明胶(Gelma);利用聚乙二醇(PEG)、苯、三乙胺、丙烯酰氯、冰乙醚在受控条件下制备聚乙二醇双丙烯酸酯(PEGDA);利用氨基酸,二醇,二酸在受控条件下聚合或者甲基丙烯酸酐修饰获得不饱和聚合物(U-PEA);最后利用上述反应产物在光引发剂的作用下制备得到复合膜。该复合膜可作为基质层,支撑角膜缘干细胞(LSCs)在膜上生长。本发明操作极为简便,条件简单,重复性好,制备的产品性能可靠,极易实现产业化。



1. 一种基于明胶和氨基酸的复合膜,其特征在于,是利用明胶、甲基丙烯酸酐,杜氏磷酸缓冲液、蒸馏水在受控条件下制备甲基丙烯酸酐明胶;利用聚乙二醇、苯、三乙胺、丙烯酰氯、冰乙醚在受控条件下制备聚乙二醇双丙烯酸酯;利用氨基酸,二醇,二酸在受控条件下聚合或者甲基丙烯酸酐修饰获得不饱和聚合物;最后利用上述反应产物在光引发剂的作用下制备得到。

2. 根据权利要求1所述的复合膜,其特征在于,由包括以下步骤的方法制备得到:

S1. 合成Gelma材料:利用明胶溶液和甲基丙烯酸酐溶液反应,反应产物透析干燥后得到白色多孔泡沫产物即为Gelma材料;

S2. 合成PEGDA:PEG与苯混合,于避光下加入三乙胺和丙烯酰氯冰浴反应,反应后抽滤除去不溶性盐,并用冰乙醚对滤液进行后处理,所得固体产物即为PEGDA;

S3. 合成含有不饱和键的氨基酸聚合物:氨基酸、二醇和对甲苯磺酸反应制备成单体A,不饱和二酸酰氯与对硝基苯酚制备成单体B,单体A和单体B聚合反应,产物沉淀纯化即得含有不饱和键的氨基酸聚合物;

S4. 制备复合膜:用40~50℃的纯水溶解消毒PEGDA、Gelma材料和含有不饱和键的氨基酸聚合物后混合,加入光引发剂,紫外光照即得到Gelma/PEGDA复合膜。

3. 根据权利要求2所述的复合膜,其特征在于,步骤S1所述合成Gelma材料的具体方法为:将质量体积浓度为5~15%的明胶PBS溶液在5~15℃水浴中溶解后,以0.1~1mL/min的速度加入体积比5~30%的甲基丙烯酸酐,在50℃水浴中搅拌反应4~24h,所得液体透析后,经冷冻干燥得到白色多孔泡沫产物即为Gelma材料。

4. 根据权利要求2所述的复合膜,其特征在于,步骤S2所述合成PEGDA的具体方法为:PEG加入苯溶剂中,在油浴蒸馏使除去水后冷却至室温,于避光下加入三乙胺和丙烯酰氯,冰浴反应4~48h,反应后抽滤除去不溶性盐,并用冰乙醚对滤液进行后处理,所得固体产物即为PEGDA;其中,PEG在苯溶剂里面的质量体积比浓度为3~20%,PEG:三乙胺:丙烯酰氯的摩尔比为1:4~10:4~10。

5. 根据权利要求2所述的复合膜,其特征在于,步骤S3所述合成含有不饱和键的氨基酸聚合物的具体方法为:氨基酸、二醇和对甲苯磺酸在有机溶剂一中反应制备成单体A,不饱和二酸酰氯与对硝基苯酚制备成单体B,单体A和单体B溶于有机溶剂二中聚合反应,反应温度为50~150℃,产物用乙酸乙酯沉淀纯化即得含有不饱和键的氨基酸聚合物;其中所述有机溶剂一为苯或者甲苯,所述有机溶剂二为含有三乙胺或其他中和试剂的DMF、DMSO或DMA强极性溶剂。

6. 根据权利要求2所述的复合膜,其特征在于,步骤S4所述制备复合膜的具体方法为:将用40~50℃的纯水溶解消毒过的PEGDA、Gelma材料和含有不饱和键的氨基酸聚合物混合,加入光引发剂,紫外光照10~300s即制得复合膜。

7. 权利要求1~6任一所述复合膜在体外培养角膜缘干细胞方面的应用。

8. 一种不需要滋养层的角膜缘干细胞体外培养方法,其特征在于,是将角膜缘组织用PBS清理后,切碎后用IV型胶原蛋白酶进行酶解,酶解后的产物置于培养基中,先加入Matrigel和权利要求1~6任一所述复合膜,35~38℃孵育5~15分钟,再加入分离后的角膜缘干细胞,然后进行培养;所述IV型胶原蛋白酶的浓度为0.1~0.3%,酶解时间为1~3h;

其中,所述培养基包含如下组分:100 IU 青霉素,100μg/ml链霉素,10~20ng/ml人重

组EGF,5~10 μ g/ml胰岛素,1~5 $\times 10^{-9}$ M 3-碘甲状腺原氨酸,0.2~1 μ g/ml 氢化可的松,1~5 $\times 10^{-9}$ M霍乱毒素,余量为DMEM和/或 DMEM/F12。

一种基于明胶和氨基酸的复合膜及在膜上培养角膜缘干细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明属于组织工程技术领域。更具体地,涉及一种基于明胶和氨基酸的复合膜及在膜上培养角膜缘干细胞的方法。

背景技术

[0002] 角膜是存在于眼球前端的一层透明膜,在空间上具有一定的曲率半径。从生理学的角度上来说,角膜的外层包含了位于中间的连续光滑的上皮层细胞和位于边缘的角膜缘干细胞(LSCs),中间存在一层基质层,占角膜厚度的90%,主要由一型、五型胶原蛋白,粘合物和角化细胞构成。内皮层则由一层六角形内皮细胞所形成,与房水直接相连。角膜缘干细胞能不断向角膜中心分化角膜上皮细胞,对角膜透明、视力的维持起重要作用,而LSCs缺乏是世界性、灾难性的眼科疑难病症,严重威胁人类视觉质量,目前缺乏有效治疗手段。LSCs缺乏的传统的治疗方法包括羊膜移植和LSCs移植。但羊膜移植可导致角膜上皮表型改变,而传统的LSCs移植需要组织多、医源性损伤较大,临床治疗效果均不理想。自体角膜缘组织移植不适合双眼角膜缘病变的患者,异体角膜缘组织移植则存在排斥反应。因此,采用体外培养的角膜缘干细胞移植联合穿透性角膜移植治疗严重的角膜病变,近年来成为人们关注的热点。

[0003] 对于角膜缘干细胞的培养,目前方法主要采用酶消化法和组织切块法从角膜缘组织上取得原代细胞后滋养在人源羊膜、纤维蛋白胶、等离子聚合物图层,人重组胶原基底物等上。因受限于技术水平,体外培养的角膜缘干细胞都存在厚度过厚,外源性细胞容易引起免疫反应等缺点,使得移植效果并不良好。因此,寻找一种能良好支撑角膜缘干细胞,并使培养的细胞层具有一定的空间曲率,为进一步角膜缘干细胞移植提供条件是一件十分迫切的事情。

[0004] 组织工程支架材料是指能与组织活体细胞结合并植入生物体的细胞支架。它能支持细胞在其特定的三维构象中增殖和分化。目前组织工程支架材料应用广泛,囊括了骨,软骨,血管,神经,皮肤等各种器官。因此,结合组织工程设计一种支撑材料作为角膜缘干细胞的体外培养基质是一个十分可行的设想。同时,支架材料有以下几点要求:1、支架材料可以控制再生组织的结构,尺寸和外形,引导细胞组织生长分化成特定的形态。2、作为信号分子的载体,携带并缓慢释放生长因子,为细胞分化提供模拟的微环境。3、作为细胞分化代谢的场所,为细胞生长输送营养。4、具有一定的韧性和可加工性,可以适应各组织不同的生理特点。5、具有生物亲和性,并且能随时间在生物体内逐步降解。因此,如何获得具有以上5点技术要求的生物支架材料成为组织工程迫切需要解决的课题。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服上述现有技术的缺陷和不足,创造了一种能支撑角膜缘干细胞体外培养的复合膜,并在此基础上发明了一种在复合膜上培养角膜缘干细胞

的方法。所得到的角膜缘干细胞能形成一层致密的上皮层,易于与材料分离,为进一步的临床移植创造了条件。

[0006] 本发明的目的是提供一种基于明胶和氨基酸的复合膜。

[0007] 本发明另一目的是提供一种在上述复合膜上培养角膜缘干细胞的方法。

[0008] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0009] 一种基于明胶和氨基酸的复合膜,是利用明胶、甲基丙烯酸酐,杜氏磷酸缓冲液(DPBS)、蒸馏水在受控条件下制备甲基丙烯酸酐明胶(Gelma);利用聚乙二醇(PEG)、苯、三乙胺、丙烯酰氯、冰乙醚在受控条件下制备聚乙二醇双丙烯酸酯(PEGDA);利用甲基丙烯酸酐对氨基酸在受控条件下进行修饰(U-PEA);最后利用上述反应产物在光引发剂的作用下制备得到。

[0010] 具体地,所述的复合膜由包括以下步骤的方法制备得到:

[0011] S1.合成Gelma材料

[0012] 利用明胶溶液和甲基丙烯酸酐溶液反应,反应产物透析干燥后得到白色多孔泡沫产物即为Gelma材料;于低温干燥处储存;

[0013] S2.合成PEGDA

[0014] PEG与苯混合,于避光下加入三乙胺和丙烯酰氯冰浴反应,反应后抽滤除去不溶性盐,并用冰乙醚对滤液进行后处理,所得固体产物即为PEGDA,真空干燥后于干燥处避光保存;

[0015] S3.合成含有不饱和键的氨基酸聚合物

[0016] 氨基酸、二醇和对甲苯磺酸反应制备成单体A,不饱和二酸酐与对硝基苯酚制备成单体B,单体A和单体B聚合反应,产物沉淀纯化即得含有不饱和键的氨基酸聚合物;

[0017] S4.利用上述步骤S1、S2、S3的产物制备复合膜

[0018] 用40~50℃的纯水溶解消毒PEGDA、Gelma材料和含有不饱和键的氨基酸聚合物后混合,加入光引发剂,紫外光照即得到Gelma/PEGDA复合膜。

[0019] 更具体优选地,步骤S1所述合成Gelma材料的具体方法为:将质量体积浓度为5~15%的明胶PBS溶液在5~15℃水浴中溶解后,以0.1~1mL/min的速度加入体积比为5~30%的甲基丙烯酸酐,在50℃水浴中搅拌反应4~24h,加5倍量DPBS停止反应;将所得液体置于8~14KD透析袋中,于蒸馏水中透析3,经冷冻干燥后得到白色多孔泡沫产物即为Gelma材料,于低温干燥处下储存。

[0020] 优选地,步骤S1所述明胶的分子量为1万~30万,胶强度为50~400g Bloom。

[0021] 优选地,步骤S2所述合成PEGDA的具体方法为:PEG加入苯溶剂中,在油浴蒸馏使除去水后冷却至室温,于避光加入三乙胺和丙烯酰氯冰浴反应4~48h,反应后抽滤除去不溶性盐,并用冰乙醚对滤液进行后处理,所得固体产物即为PEGDA,真空干燥后于干燥处避光保存;其中,PEG在苯溶剂里面的质量体积比浓度为3~20%,PEG:三乙胺:丙烯酰氯的摩尔比为1:4~10:4~10。

[0022] 优选地,步骤S2中,PEG分子量为1000~50000。

[0023] 优选地,步骤S3所述合成含有不饱和键的氨基酸聚合物的具体方法为:氨基酸、二醇和对甲苯磺酸在有机溶剂一中反应制备成单体A,不饱和二酸酐与对硝基苯酚制备成单体B,单体A和单体B溶于有机溶剂二中聚合反应,反应温度为50~150℃,反应后于烘箱里

保存过夜,产物用乙酸乙酯沉淀纯化即得含有不饱和键的氨基酸聚合物;其中所述有机溶剂一为苯或者甲苯,所述有机溶剂二为含有三乙胺或其他中和试剂的DMF、DMSO及DMA等强极性溶剂。

[0024] 优选地,所述氨基酸为精氨酸、苯丙氨酸或者甘氨酸。

[0025] 优选地,步骤S4所述制备复合膜的具体方法为:用40~50℃的纯水溶解消毒过的PEGDA、Gelma材料和含有不饱和键的氨基酸聚合物混合,加入光引发剂,将混合液注入模具紫外光照10~300s即可制成膜。

[0026] 其中,优选地,PEGDA:Gelma材料:含有不饱和键的氨基酸聚合物的质量比为0.1~75%:0.1~75%:0.1~90%。

[0027] 优选地,光引发剂的使用量为复合膜质量的0.05~5%。

[0028] 另外,一种角膜缘干细胞的培养基,配方比例为:100IU青霉素,100μg/ml链霉素,10~20ng/ml人重组EGF,5~10μg/ml胰岛素,1~5×10⁻⁹M 3-碘甲状腺原氨酸,0.2~1μg/ml氢化可的松,1~5×10⁻⁹M霍乱毒素,余量为DMEM和/或DMEM/F12。

[0029] 更优选地,所述角膜缘干细胞的培养基的配方比例为:每500mL培养基含有5mL 10×双抗(青霉素和链霉素)、1mL人重组EGF、1mL胰岛素、1mL 3-碘甲状腺原氨酸、1mL氢化可的松、1mL霍乱毒素,220mL DMEM、220mL DMEM/F12、50mL FBS。

[0030] 另外,在上述制备了所述复合膜的基础上,本发明还提供了一种不需要滋养层的角膜缘干细胞体外培养方法,是将角膜缘组织用PBS清理后,用手术刀切碎后用IV型胶原蛋白酶进行酶解,酶解后的产物置于权利要求7所述的培养基中进行培养。

[0031] 其中,优选地,所述IV型胶原蛋白酶的浓度为0.1~0.3%。

[0032] 优选地,酶解时间为1~3h。

[0033] 更优选地,所述IV型胶原蛋白酶的浓度为0.2%,酶解时间为2h。

[0034] 优选地,将酶解后的产物置于培养基中进行培养之前,先加入Matrigel和复合膜,35~38℃孵育5~15分钟(优选37℃孵育10分钟),再加入分离后的角膜缘干细胞。

[0035] 即更优选地,所述不需要滋养层的角膜缘干细胞体外培养方法包括如下步骤:

[0036] (1) 将角膜缘组织用PBS清理后,用手术刀切碎后进行酶解;使用的酶为IV型胶原蛋白酶,置于37℃震荡摇床,酶解时间为2小时;加入含10%FBS的DMEM终止酶解,1000rpm离心5min,弃上清;

[0037] (3) 用上述角膜缘干细胞的培养基,将酶解离心得到的角膜缘干细胞重悬;

[0038] (4) 将Gelma/PEGDA复合膜与10%的Matrigel溶液平铺于6孔板中,于37℃温箱静置10分钟后吸干剩余的Matrigel溶液;

[0039] (5) 将重悬的角膜缘干细胞种植于铺了复合膜的6孔板中,置于37℃,5%CO₂培养箱中培养,隔天换液,并在显微镜中观察细胞的生长状态。

[0040] 本发明在寻找一种能提供给角膜缘干细胞体外培养使用的复合膜的制备方法的过程中发现,角膜中角膜上皮细胞和角膜缘干细胞都依托生长于基质层上,而基质层的主要成分为胶原蛋白;鉴于明胶的成分也主要来自于天然的胶原蛋白,因而将其作为支撑角膜缘干细胞体外培养的基底是可行的。但是由于明胶的机械稳定性较差,本发明引入了能在紫外光下固化交联的PEGDA来增强明胶的机械稳定性。该方法可制得具有较好物理学形状和生物学功能的承载材料。

[0041] 本发明具有以下有益效果:

[0042] 本发明首先利用聚乙二醇双丙烯酸酯 (PEGDA)、甲基丙烯酸酯明胶 (Gelma) 和含有不饱和键的氨基酸聚合物在受控的条件下合成了一种复合膜,除了具备传统水凝胶便于固型、高生物相容性的优点外,其新优点在于:

[0043] (1) 光固化的特性使其在应用过程中更加便于对成品参数的精调整。在紫外光照射前,可以方便的将材料注入到特定形状,特定厚度的透明模具中固化。

[0044] (2) 制备过程中修饰过的氨基酸聚合物的加入,使复合膜能提供促进细胞分化的微环境。

[0045] (3) 明胶作为天然材料虽然与人体组织具有相同或者相近的化成成分,但是由于是非共价键交联,存在着极不稳定的特定,聚乙二醇双丙烯酸酯具有生物相容性且通过化学键交联,在机械性质上更加稳定。因此,本方法综合了这两种材料的优点。

[0046] 另外,在制备了上述复合膜的基础上,本发明还提供了一种不需要滋养层的角膜缘干细胞体外培养方法,该LSCs体外培养的方法无滋养层,细胞生长在前文所述的复合膜上,便于运输。在37摄氏度,5%CO₂的条件下能形成一层致密的上皮层,易于从复合材料上分离,为进一步移植创造有利条件。

附图说明

[0047] 图1:a,b为固化之后从模具中取出的复合膜。

[0048] 图2:a,b为封装好的复合膜。

[0049] 图3:取膜的过程。

[0050] 图4:在7.5%Gelma+2.5%PEG的膜上体外培养的角膜缘干细胞和角膜上皮细胞。

[0051] 图5:a为膜上体外培养的角膜缘干细胞LSC标记物Pax6的染色图;b为角膜特异性角蛋白基因K3/K12的染色图;证明LSC能成功适应复合膜的环境,正常增殖。

[0052] 图6:一层取自复合膜体上外培养的LSCs,形成了一片致密的上皮层。

具体实施方式

[0053] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0054] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0055] 本发明制备得到的复合膜以及利用该复合膜培养角膜缘干细胞的结果如附图1~6所示,具体实施案例如下所述:

[0056] 实施例1制备复合膜

[0057] 将10% (W/V) 的明胶PBS溶液在10℃水浴中溶解后,以0.5mL/min的速度加入体积比为5%的甲基丙烯酸酐,在50℃水浴中搅拌反应24h后加5倍量的DPBS停止反应。将所得液体置于8~14KD透析袋中,于蒸馏水中透析3d后经冷冻干燥后得到白色多孔泡沫产物即为Gelma材料,于低温干燥处下储存。

[0058] PEG与苯按照20% (W/V) 比例混合,在油浴蒸馏使除去水后冷却至室温,于避光加入三乙胺和丙烯酰氯冰浴反应48h (PEG:三乙胺:丙烯酰氯的摩尔比为1:4:4),反应后抽滤

除去不溶性盐,并用冰乙醚对滤液进行后处理,所得固体产物即为PEGDA,真空干燥后于干燥处避光保存。

[0059] 精氨酸、二醇和对甲苯磺酸在有机溶剂(苯或者甲苯)中反应制备成单体A,不饱和二酸酐与对硝基苯酚制备成单体B,单体A和单体B溶于有机溶剂(含有三乙胺或其他中和试剂的DMF、DMSO及DMA等强极性溶剂)中聚合反应,反应温度为50~150℃,反应后于烘箱里保存过夜,产物用乙酸乙酯沉淀纯化即得含有不饱和键的氨基酸聚合物。

[0060] 用50℃的纯水溶解消毒过的PEGDA、Gelma和含有不饱和键的氨基酸聚合物(各组成成分含量为25%:10%:65%),加入0.5%(W/W)的光引发剂,将混合液注入模具紫外光照(100s)即可制成膜,即为Gelma/PEGDA。

[0061] 实施例2制备复合膜

[0062] 将10%(W/V)的明胶PBS溶液在10℃水浴中溶解后,以0.5mL/min的速度加入体积比为5%的甲基丙烯酸酐,在50℃水浴中搅拌反应24h后加5倍量的DPBS停止反应。将所得液体置于8~14KD透析袋中,于蒸馏水中透析3d后经冷冻干燥后得到白色多孔泡沫产物即为Gelma材料,于低温干燥处下储存。

[0063] PEG与苯按20%(W/V)比例混合,在油浴蒸馏使除去水后冷却至室温,于避光加入三乙胺和丙烯酰氯冰浴反应48h(PEG:三乙胺:丙烯酰氯的摩尔比为1:4:4),反应后抽滤除去不溶性盐,并用冰乙醚对滤液进行后处理,所得固体产物即为PEGDA,真空干燥后于干燥处避光保存。

[0064] 苯丙氨酸、二醇和对甲苯磺酸在有机溶剂(苯或者甲苯)中反应制备成单体A,不饱和二酸酐与对硝基苯酚制备成单体B,单体A和单体B溶于有机溶剂(含有三乙胺或其他中和试剂的DMF、DMSO及DMA等强极性溶剂)中聚合反应,反应温度为50~150℃,反应后于烘箱里保存过夜,产物用乙酸乙酯沉淀纯化即得含有不饱和键的氨基酸聚合物

[0065] 用50℃的纯水溶解消毒过的PEGDA、Gelma和含有不饱和键的氨基酸聚合物(各组成成分含量为25%:10%:65%),加入0.5%(W/W)的光引发剂,将混合液注入模具紫外光照(100s)即可制成膜,即为Gelma/PEGDA。

[0066] 实施例3制备复合膜

[0067] 将10%(W/V)的明胶PBS溶液在10℃水浴中溶解后,以0.5mL/min的速度加入体积比为5%的甲基丙烯酸酐,在50℃水浴中搅拌反应24h后加5倍量的DPBS停止反应。将所得液体置于8~14KD透析袋中,于蒸馏水中透析3d后经冷冻干燥后得到白色多孔泡沫产物即为Gelma材料,于低温干燥处下储存。

[0068] PEG与苯按20%(W/V)比例混合,在油浴蒸馏使除去水后冷却至室温,于避光加入三乙胺和丙烯酰氯冰浴反应48h(PEG:三乙胺:丙烯酰氯的摩尔比为1:4:4),反应后抽滤除去不溶性盐,并用冰乙醚对滤液进行后处理,所得固体产物即为PEGDA,真空干燥后于干燥处避光保存。

[0069] 甘氨酸、二醇和对甲苯磺酸在有机溶剂(苯或者甲苯)中反应制备成单体A,不饱和二酸酐与对硝基苯酚制备成单体B,单体A和单体B溶于有机溶剂(含有三乙胺或其他中和试剂的DMF、DMSO及DMA等强极性溶剂)中聚合反应,反应温度为50~150℃,反应后于烘箱里保存过夜,产物用乙酸乙酯沉淀纯化即得含有不饱和键的氨基酸聚合物

[0070] 用50℃的纯水溶解消毒过的PEGDA、Gelma和含有不饱和键的氨基酸聚合物(各组成成分含量为25%:10%:65%),加入0.5%(W/W)的光引发剂,将混合液注入模具紫外光照(100s)即可制成膜,即为Gelma/PEGDA。

成成分含量为25%:10%:65%),加入0.5% (W/W)的光引发剂,将混合液注入模具紫外光照(100s)即可制成膜,即为Gelma/PEGDA。

[0071] 实施例4角膜缘干细胞体外培养方法

[0072] 1、一种角膜缘干细胞的培养基,培养基中含有以下组分:每500mL培养基含有5mL 10×双抗、1mL人重组EGF、1mL胰岛素、1mL 3-碘甲状腺原氨酸、1mL氢化可的松、1mL霍乱毒素,220mL DMEM、220mL DMEM/F12、50mL FBS。

[0073] 2、角膜缘干细胞体外培养方法

[0074] (1)将角膜缘组织用PBS清理后,用手术刀切碎后进行酶解;使用的酶为IV型胶原蛋白酶,置于37℃震荡摇床,酶解时间为2小时;加入含10%FBS的DMEM终止酶解,1000rpm离心5min,弃上清;

[0075] (3)用上述角膜缘干细胞的培养基,将酶解离心得到的角膜缘干细胞重悬;

[0076] (4)将Gelma/PEGDA复合膜与10%的Matrigel溶液平铺于6孔板中,于37℃温箱静置10分钟后吸干剩余的Matrigel溶液;

[0077] (5)将重悬的角膜缘干细胞种植于铺了复合膜的6孔板中,置于37℃,5%CO₂培养箱中培养,隔天换液,并在显微镜中观察细胞的生长状态。

[0078] 3、结果如附图4~6所示。结果显示,LSC能成功适应复合膜的环境,正常增殖;而且复合膜体外培养的LSCs形成了一片致密的上皮层。

[0079] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

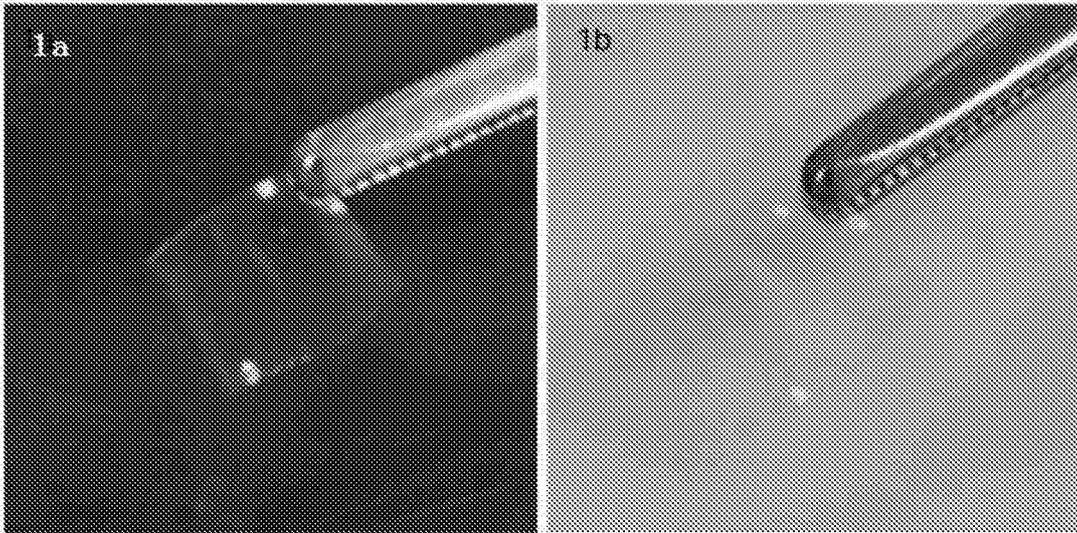


图1

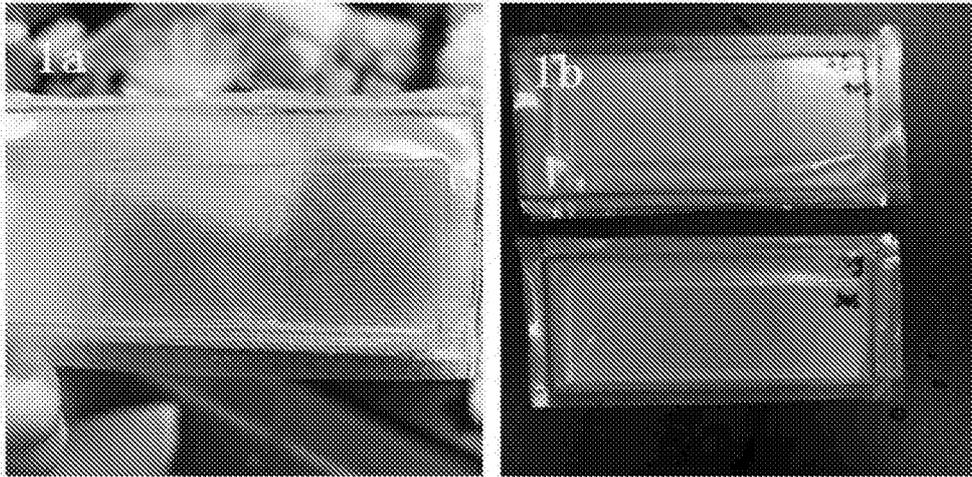


图2

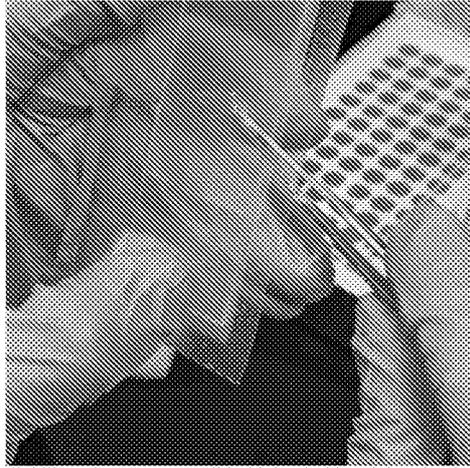


图3

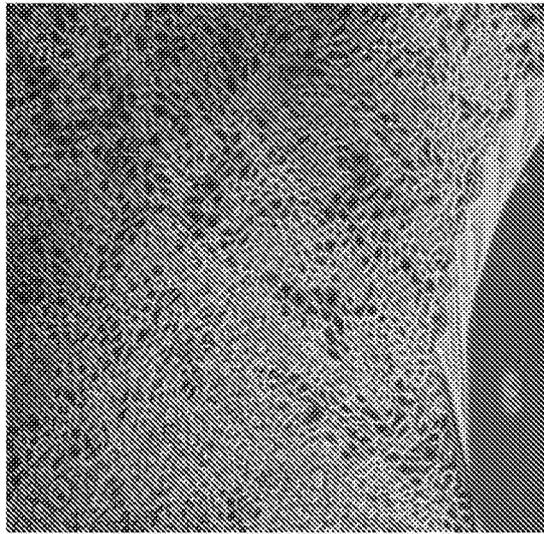


图4

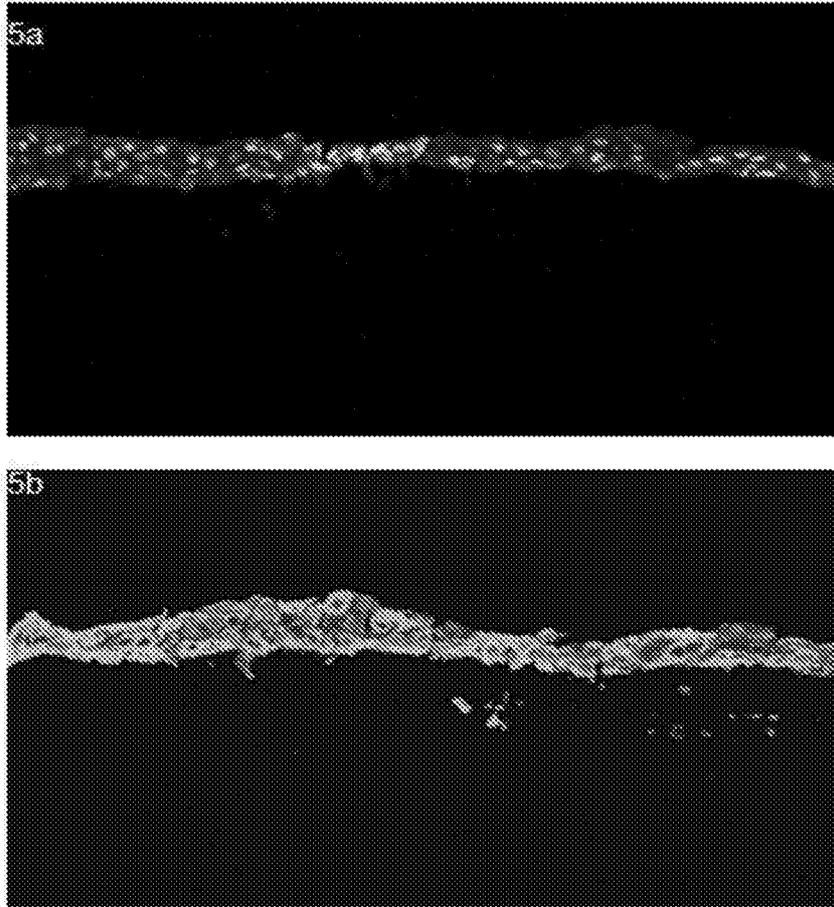


图5

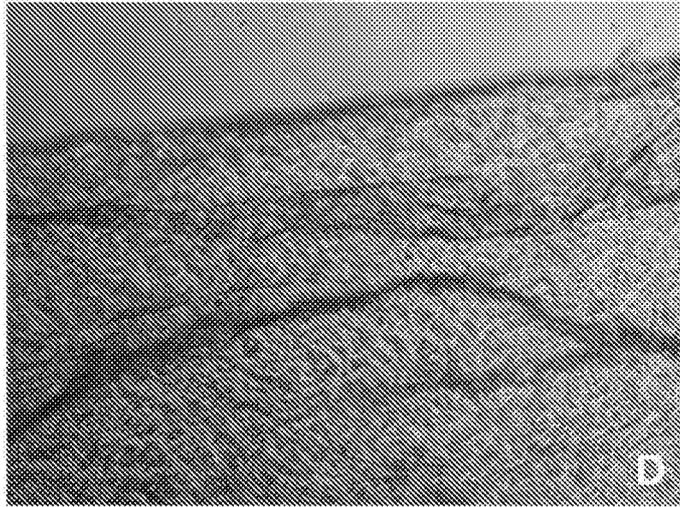


图6