



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101914495 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 201010238350.3

(22) 申请日 2010.07.22

(71) 申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街 2699
号

(72) 发明人 刘晋宇 李玉林

(74) 专利代理机构 长春吉大专利代理有限责任
公司 22201

代理人 邵铭康 朱世林

(51) Int. Cl.

C12N 5/0775(2010.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

用于体外大量扩增毛囊干细胞的培养方法

(57) 摘要

用于体外大量扩增毛囊干细胞的培养方法属细胞培养技术领域,本发明建立一种以微球作为细胞培养的载体、旋转瓶作为细胞增殖的发酵罐,体外大量扩增毛囊干细胞的方法,该方法操作简便,经济实用,避免反复传代细胞而导致的细胞增殖能力减弱、分化潜能降低等与传统扩增细胞方法相关的副作用,同时还节约培养液的用量;利用该方法扩增出来的毛囊干细胞增殖能力强,且仍保持原来的分化潜能,可用于:(1) 建立毛囊干细胞银行,为成体干细胞相关研究提供优质的种子细胞;(2) 移植修复病变的组织器官;(3) 构建组织工程化器官,用作自体器官的替代物,用于移植修复病变或缺失的器官;(4) 作为基因治疗的靶细胞,用于治疗相应的疾病。

1. 一种用于体外大量扩增毛囊干细胞的培养方法,其特征在于包括下列步骤:

1) 器具、材料的准备,包括:

①细胞培养旋转瓶:垂直旋转瓶和水平旋转瓶,容量为 10-10000ml,转速为 1-500 转/分;

②微载体:其材料由一种或多种可生物降解材料构成,或由非生物降解材料构成,或由可生物降解与非生物降解材料构成;

③细胞:包括哺乳动物毛囊干细胞和人毛囊干细胞;

④培养液:包括 DMEM、DMM-F12、EGM、KGM、IMDM、MEM、EBM,其中添加一种或两种及以上生物因子;

⑤细胞培养箱:CO₂ 孵箱。

2) 毛囊干细胞的培养,包括:

①将通过蛋白酶消化毛囊或毛囊组织块培养法而获得的人毛囊干细胞,以 1×10^3 - 1×10^9 细胞/克微载体的密度,接种在微载体上,悬浮于培养液中;

②将微载体连同种植在其上的细胞一起,转移到细胞培养旋转瓶中;

③依据细胞培养旋转瓶的容积,添加培养液至 50-1000ml;

④将细胞培养旋转瓶置于细胞培养箱内培养,细胞培养旋转瓶的转动模式设置为:转动 1-5 分钟/小时,转速 10-300 转/分钟。培养箱的设置为:37°C、5% CO₂;

⑤待细胞在微载体上贴附生长接近单层时,利用 0.25 胰蛋白酶-0.02% EDTA,将细胞从微载体上消化下来,经血清灭活胰蛋白酶,磷酸盐缓冲液冲洗掉其中的血清和抗生素后,待用。

2. 按权利要求 1 所述的用于体外大量扩增毛囊干细胞的培养方法,其特征在于步骤 1) 中②所述的可生物降解材料为胶原蛋白、血液纤溶蛋白、明胶、透明质酸、多聚乳酸、多聚乙醇酸、聚亚胺脂、壳聚糖;所述的非生物降解材料为玻璃、硅胶、金属、塑料。

3. 按权利要求 1 所述的用于体外大量扩增毛囊干细胞的培养方法,其特征在于步骤 1) 中④所述的生物因子为 IGF、bFGF、EGF、VEGF、磷酸盐维生素 C、的塞米松、胰岛素、转铁蛋白、动物脑垂体提取物、青-链霉素、两性霉素、含有或不含有人或动物血清。

4. 按权利要求 3 所述的用于体外大量扩增毛囊干细胞的培养方法,其特征在于所述的动物血清来自牛、羊、马、猪或其它哺乳动物,可以是其中的一种,也可以是其中的两种或两种以上。

用于体外大量扩增毛囊干细胞的培养方法

技术领域

[0001] 本发明属细胞培养技术领域,具体涉及一种体外大量快速扩增贴壁生长的细胞培养方法,特别是利用微球作为细胞培养的载体,旋转瓶作为发酵罐,体外大量扩增毛囊干细胞的生物反应器技术。

背景技术

[0002] 疾病对人类的健康和生存构成重大威胁、是世界各国普遍面临的最重要的社会问题。干细胞移植技术的问世和进展,为传统治疗手段认为是“不治之症”的患者带来了新的生机和希望。但干细胞的来源、移植治疗的安全性和有效性一直是干细胞再生医学研究中需要解决的重大科学问题。

[0003] 毛囊是皮肤的附属器之一,起源于表皮和间充质间的相互作用。毛囊中除了含有表皮干细胞、黑色素干细胞外,还含有间充质样干细胞。这种毛囊间充质样干细胞不仅能够自我更新,还能够分化成骨、软骨、脂肪和血管平滑肌等多种组织特异性细胞。毛囊干细胞的自我更新和多向分化,为包括毛囊在内的多种组织器官的再生医学奠定了细胞学基础。毛囊来源丰富、获取方便,而且收获毛囊基本不会对机体产生任何损害作用。因此毛囊干细胞是目前已知的成体干细胞中最具有临床应用潜能的种子细胞。但收获毛囊,分离干细胞,开展再生医学研究,需要大量的、未分化的种子细胞。传统细胞培养上,大量收获诸如毛囊干细胞等贴壁生长的细胞,通常是通过反复传代而实现的。然而细胞经过反复传代后,不仅增值能力迅速下降,而且还失去向多种组织特异性细胞分化的潜能,甚至移植后有可能诱发肿瘤的形成。已知贴壁生长细胞的收获量和培养面积成正比,即:培养面积越大,收获的细胞量就越多。微载体含有很高的面积/体积比。1克直径为100-300微米的微载体,如:Cultisphere-G所拥有的表面积大约是1平方米。这样利用微载体作为细胞培养的基床,在少量的培养基中,就能够生产出大量的、贴壁生长的细胞,这样既满足开展干细胞再生医学研究所必须的细胞的数量,也避免因反复传代而可能导致的细胞增值能力、多向分化潜能的下降以及移植后诱发肿瘤形成的风险,还降低了生产成本。因此利用微载体作为细胞培养的基床,来大量培养贴壁增长的细胞,已被广泛地应用于细胞生物学研究和临床应用中,取得了令人满意的结果。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种可作为种子细胞,用于开展细胞疗法,治疗和修复病变组织器官的体外大量快速扩增毛囊干细胞的培养方法。

[0005] 本发明包括下列步骤:

[0006] 1. 器具、材料的准备,包括:

[0007] ①细胞培养旋转瓶:垂直旋转瓶和水平旋转瓶,容量为10-10000ml,转速为1-500转/分;

[0008] ②微载体:其材料由一种或多种可生物降解材料构成,或由非生物降解材料构成,

或由可生物降解与非生物降解材料构成；

[0009] 可生物降解材料为胶原蛋白、血液纤溶蛋白、明胶、透明质酸、多聚乳酸、多聚乙醇酸、聚亚胺脂、壳聚糖；所述的非生物降解材料为玻璃、硅胶、金属、塑料；

[0010] ③细胞：包括哺乳动物毛囊干细胞和人毛囊干细胞；

[0011] ④培养液：包括 DMEM、DMM-F12、EGM、KGM、IMDM、MEM、EBM，其中添加一种或两种以上生物因子；

[0012] 生物因子为 IGF、bFGF、EGF、VEGF、磷酸盐维生素 C、的塞米松、胰岛素、转铁蛋白、动物脑垂体提取物、青-链霉素、两性霉素、含有或不含有人或动物血清；

[0013] 动物血清来自牛、羊、马、猪或其它哺乳动物，可以是其中的一种，也可以是其中的两种或两种以上。

[0014] 2. 毛囊干细胞的培养，包括：

[0015] ①将通过蛋白酶消化毛囊或毛囊组织块培养法而获得的人毛囊干细胞，以 1×10^3 – 1×10^9 细胞 / 克微载体的密度，接种在微载体上，悬浮于培养液中；

[0016] ②将微载体连同种植在其上的细胞一起，转移到细胞培养旋转瓶中；

[0017] ③依据细胞培养旋转瓶的容积，添加培养液至 50–1000ml；

[0018] ④将细胞培养旋转瓶置于细胞培养箱内培养，细胞培养旋转瓶的转动模式设置为：转动 1–5 分钟 / 小时，转速 10–300 转 / 分钟。培养箱的设置为：37°C、5% CO₂；

[0019] ⑤待细胞在微载体上贴附生长接近单层时，利用 0.25 胰蛋白酶–0.02% EDTA，将细胞从微载体上消化下来，经血清灭活胰蛋白酶，磷酸盐缓冲液冲洗掉其中的血清和抗生素后，待用。

[0020] 本发明建立一种以微球作为细胞培养的载体、旋转瓶作为细胞增殖的发酵罐，体外大量扩增毛囊干细胞的方法，该方法操作简便，经济实用，避免反复传代细胞而导致的细胞增殖能力减弱、分化潜能降低等与传统扩增细胞方法相关的副作用，同时还节约培养液的用量；利用该方法扩增出来的毛囊干细胞增殖能力强，且仍保持原来的分化潜能，可用于：(1) 建立毛囊干细胞银行，为成体干细胞相关研究提供优质的种子细胞；(2) 移植修复病变的组织器官；(3) 构建组织工程化器官，用作自体器官的替代物，用于移植修复病变或缺失的器官；(4) 作为基因治疗的靶细胞，用于治疗相应的疾病。

[0021] 通过本发明获得的毛囊干细胞，经蛋白酶消化后，从微载体上释放下来，可作为种子细胞，用于开展细胞疗法，治疗病变的组织器官，或用于构建组织工程化器官，用以移植治疗病变或缺失的器官，也可以用作基因治疗的靶细胞，用于移植治疗代谢性或先天遗传性疾病。还可以将可生物降解微载体，连同在其上贴附生长的毛囊干细胞一起，直接移植到病变的部位，用于治疗相应的组织器官的病变，或改善相应病变器官的状态，提高其功能，从而达到修复组织器官的目的。

具体实施方式

[0022] 本发明包括下列步骤：

[0023] 1. 器具、材料的准备，包括：

[0024] ①细胞培养旋转瓶：垂直旋转瓶和水平旋转瓶，容量为 10–10000ml，转速为 1–500 转 / 分；

[0025] ②微载体:其材料由一种或多种可生物降解材料构成,或由非生物降解材料构成,或由可生物降解与非生物降解材料构成;

[0026] 可生物降解材料为胶原蛋白、血液纤溶蛋白、明胶、透明质酸、多聚乳酸、多聚乙醇酸、聚亚胺脂、壳聚糖;所述的非生物降解材料为玻璃、硅胶、金属、塑料;

[0027] ③细胞:包括哺乳动物毛囊干细胞和人毛囊干细胞;

[0028] ④培养液:包括 DMEM、DMM-F12、EGM、KGM、IMDM、MEM、EBM,其中添加一种或两种以上生物因子;

[0029] 生物因子为 IGF、bFGF、EGF、VEGF、磷酸盐维生素 C、的塞米松、胰岛素、转铁蛋白、动物脑垂体提取物、青-链霉素、两性霉素、含有或不含有人或动物血清;

[0030] 动物血清来自牛、羊、马、猪或其它哺乳动物,可以是其中的一种,也可以是其中的两种或两种以上。

[0031] 2. 毛囊干细胞的培养,包括:

[0032] ①将通过蛋白酶消化毛囊或毛囊组织块培养法而获得的人毛囊干细胞,以 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^9$ 细胞/克微载体的密度,接种在微载体上,悬浮于培养液中;

[0033] ②将微载体连同种植在其上的细胞一起,转移到细胞培养旋转瓶中;

[0034] ③依据细胞培养旋转瓶的容积,添加培养液至 50-1000ml;

[0035] ④将细胞培养旋转瓶置于细胞培养箱内培养,细胞培养旋转瓶的转动模式设置为:转动 1-5 分钟/小时,转速 10-300 转/分钟。培养箱的设置为:37°C、5% CO₂;

[0036] ⑤待细胞在微载体上贴附生长接近单层时,利用 0.25 胰蛋白酶-0.02% EDTA,将细胞从微载体上消化下来,经血清灭活胰蛋白酶,磷酸盐缓冲液冲洗掉其中的血清和抗生素后,待用。