



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108186682 A

(43)申请公布日 2018.06.22

(21)申请号 201810102140.8

A61P 37/02(2006.01)

(22)申请日 2018.02.01

A61P 17/00(2006.01)

(71)申请人 伯仕利生物科技发展(盐城)有限公司

A61P 17/18(2006.01)

地址 224000 江苏省盐城市城南新区大数据产业园创新大厦北楼6层

A61K 8/99(2017.01)

A61K 8/02(2006.01)

A61Q 17/04(2006.01)

A61Q 19/08(2006.01)

(72)发明人 吴金芸 张炬

A61Q 19/02(2006.01)

(74)专利代理机构 苏州翔远专利代理事务所(普通合伙) 32251

A61Q 19/00(2006.01)

C12N 5/073(2010.01)

C12N 5/0775(2010.01)

代理人 王鑫

(51)Int.Cl.

A61K 35/28(2015.01)

A61K 9/19(2006.01)

A61P 37/06(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

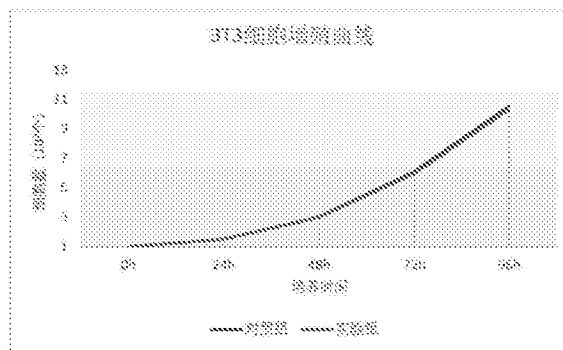
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种胎盘间充质干细胞冻干粉的制备方法

(57)摘要

本发明利用组织快法制备了胎盘干细胞,并采用超声波破碎法收集细胞内的细胞因子与上清中的细胞因子混合,在低温环境下冻干,充分保证了胎盘干细胞因子的浓度及活性。本发明的制备方法所制备的冻干粉有效地保存了人胎盘间充质干细胞中的各种具有生物活性的细胞因子混合物,保存期可延长到2年,有效地解决细胞因子溶液保存期有限这一瓶颈,为人胎盘间充质干细胞细胞因子的产业化应用奠定了基础。



1. 一种胎盘间充质干细胞冻干粉的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1)、胎盘干细胞的分离和培养:在无菌条件下,收取健康的胎盘,在GMP实验室生物安全柜将胎盘剪碎至1.5-2.5mm³大小的组织块,将其置于T175培养瓶所盛的DMEM-LG细胞培养液中,置37℃,5%CO₂培养箱中培养;每隔2-3天换液,直至胎盘干细胞析出,弃去组织块;细胞长满后,记为第一代,用0.28%胰酶进行消化传代;第二代后改用无抗生素DMEM-LG培养基,并进行传代培养;

(2)、细胞因子的收集:第三代后,细胞长至90%左右可开始收集细胞因子;将细胞状态良好的细胞收集起来,进行超声破碎,使其将细胞内未完全释放的细胞因子释放出来;并1500rpm离心10分钟,去除细胞碎片沉淀;

(3)、干细胞提取物的超低温冻干:将去除细胞碎片沉淀的胎盘干细胞培养原液加入10%BSA作为赋形剂,充分溶解后,用0.45um的无菌过滤器过滤除菌,并分装至2ml西林瓶中,每瓶1ml;分装后将西林瓶置于-80℃超低温冰箱中进行预冻干,预冻12h后取出,再置于冻干机内冷冻干燥;即得到胎盘间充质干细胞冻干粉。

(4)、冻干前后干细胞因子的活性检测:配制冻干粉溶媒;利用3T3细胞的增殖曲线,模拟成纤维细胞在细胞因子促进下的生长情况;将3T3培养后,采用胰酶消化,计数后,将细胞铺至四块六孔板,每两块一组,且每块四孔,其中每孔1*10³个细胞;设定第一组为对照组,在所述对照组中添加步骤(2)中收集的细胞;设定第二组为实验组,在所述实验组中添加冻干后用溶媒溶解的细胞因子;分别培养24h、48h、72h、96h后,每板取1孔计数,绘制生长曲线。

2. 根据权利要求1所述的胎盘间充质干细胞冻干粉的制备方法,其特征在于:步骤(1)中所述DMEM-LG细胞培养液中含10%FBS、bFGF 5ng/mL、L-谷氨酰胺2mM、青霉素100U/mL、链霉素100μg/mL和两性霉素B 1μg/mL。

3. 根据权利要求1所述的胎盘间充质干细胞冻干粉的制备方法,其特征在于:步骤(1)中所述无抗生素DMEM-LG培养基含10%FBS、bFGF 5ng/mL、L-谷氨酰胺2mM。

4. 根据权利要求1所述的胎盘间充质干细胞冻干粉的制备方法,其特征在于:步骤(3)中所述冻干机为真空冷冻干燥机。

5. 根据权利要求1所述的胎盘间充质干细胞冻干粉的制备方法,其特征在于:步骤(4)中所述冻干粉溶媒为2%透明质酸、10%甘油及双蒸水。

一种胎盘间充质干细胞冻干粉的制作方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种胎盘间充质干细胞冻干粉的制备方法。

背景技术

[0002] 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有自我更新、增殖和多向分化潜能的成体干细胞,可刺激组织生长和修复,增强组织的再生能力,影响免疫调节,在细胞治疗领域有着极为广阔的应用前景。MSCs可从骨髓、脐带血、脂肪、滑膜、胎盘、结缔组织等部位获得。

[0003] 然而, MSCs在组织中的丰度极低,因此,体外培养是实现MSCs应用价值的必需步骤,研究表明,与新鲜分离的MSCs不同,细胞经体外培养扩增后,其生物学特性会发生很大的变化,并随着培养时间的延长,细胞分化的能力逐渐丧失,这与体内外细胞所处的环境有关,体内的微环境组成相当复杂,不可能用稳定的温度、pH值和营养成分这些体外因素所模拟的。如何短时间获取大量功能状态良好的MSCs,维持MSCs的原始状态,及控制MSCs分化方向是当前研究的热点也是难点。另外,越来越多的证据表明,无论静脉注射还是局部注射,体外培养的MSCs进入到体内后,只有极少量的细胞生存,而这少数存活的细胞通过分泌大量的小分子物质,例如,细胞因子、生长因子、趋化因子等而发挥作用。

[0004] 胎盘间充质干细胞是一种多能干细胞,是具有自我复制能力的多潜能细胞。在一定条件下,它可以分化成多种功能细胞像APSC多能细胞。相较于其他干细胞,胎盘间充质干细胞具有来源方便,细胞数量充足,易于分离、培养、扩增和纯化,传代扩增30多代后仍具有干细胞特性。胎盘是目前证实干细胞的最佳来源。

[0005] 在胚胎发育中来源于中胚层。在机体正常的组织损伤修复过程中,胎盘间充质干细胞一种重要的参与组织再生的细胞库。在组织损伤引起的特殊信号作用下,胎盘间充质干细胞迁移到受损部位,在局部聚集增殖,依据不同的损伤信号沿着不同途径分化。胎盘间充质干细胞易于分离扩增,体外倍增能力旺盛,即使扩增1亿倍仍能保持其多向分化能力。因此,胎盘间充质干细胞是一种实用的组织修复种子细胞。胎盘干细胞具有免疫调节作用,通过负性免疫调节功能,抑制机体亢进的免疫反应,使机体免疫功能恢复平衡,从而可以用来治疗造血干细胞移植之后的免疫排斥反应以及克隆氏病、红斑狼疮,硬皮病等自身免疫系统疾病。

[0006] 干细胞在美容行业应用广泛。干细胞提取物一般是指干细胞培养液上清液及(或)细胞裂解液,其细胞培养液上清液含有大量的具有多种生物活性的蛋白质、多肽及细胞因子,它们参与细胞结构的维持运动信息交流以及组织修复与再生,具有较好的抗光老化、抗氧化、抗皱、美白肌肤、伤口愈合、细胞修复等功效。因此,随着干细胞提取物的应用价值越来越受到人们的关注,如何获得大量的、质量稳定可控的干细胞提取物成为人们致力研究的问题。干细胞上清液可以直接进行涂抹,操作简便。但是,液态的培养上清在常温保存时间短,这就阻碍了它的推广和应用。

发明内容

[0007] 为解决现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种胎盘间充质干细胞冻干粉的制备方法。

[0008] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明提供一种胎盘间充质干细胞冻干粉的制备方法,包括以下步骤:

[0009] (1)、胎盘干细胞的分离和培养:在无菌条件下,收取健康的胎盘,在GMP实验室生物安全柜将胎盘剪碎至1.5-2.5mm³大小的组织块,将其置于T175培养瓶所盛的DMEM-LG细胞培养液中,置37℃,5%CO₂培养箱中培养;每隔2-3天换液,直至胎盘干细胞析出,弃去组织块;细胞长满后,记为第一代,用0.28%胰酶进行消化传代;第二代后改用无抗生素 DMEM-LG培养基,并进行传代培养;

[0010] (2)、细胞因子的收集:第三代后,细胞长至90%左右可开始收集细胞因子;将细胞状态良好的细胞收集起来,进行超声破碎,使其将细胞内未完全释放的细胞因子释放出来;并 1500rpm离心10分钟,去除细胞碎片沉淀;

[0011] (3)、干细胞提取物的超低温冻干:将去除细胞碎片沉淀的胎盘干细胞培养原液加入 10%BSA作为赋形剂,充分溶解后,用0.45um的无菌过滤器过滤除菌,并分装至2ml西林瓶中,每瓶1ml;分装后将西林瓶置于-80℃超低温冰箱中进行预冻干,预冻12h后取出,再置于冻干机内冷冻干燥;即得到胎盘间充质干细胞冻干粉。

[0012] (4)、冻干前后干细胞因子的活性检测:配制冻干粉溶媒;利用3T3细胞的增殖曲线,模拟成纤维细胞在细胞因子促进下的生长情况;将3T3培养后,采用胰酶消化,计数后,将细胞铺至四块六孔板,每两块一组,且每块四孔,其中每孔1×10³个细胞;设定第一组为对照组,在所述对照组中添加步骤(2)中收集的细胞;设定第二组为实验组,在所述实验组中添加冻干后用溶媒溶解的细胞因子;分别培养24h、48h、72h、96h后,每板取1孔计数,绘制生长曲线。

[0013] 上述方案中,相关内容解释如下:

[0014] 1、上述方案中,步骤(1)中所述DMEM-LG细胞培养液中含10%FBS、bFGF 5ng/mL、L-谷氨酰胺2mM、青霉素100U/mL、链霉素100μg/mL和两性霉素B 1μg/mL。

[0015] 2、上述方案中,步骤(1)中所述无抗生素DMEM-LG培养基含10%FBS、bFGF 5ng/mL、L-谷氨酰胺2mM。

[0016] 3、上述方案中,步骤(3)中所述冻干机为真空冷冻干燥机。

[0017] 4、上述方案中,步骤(4)中所述冻干粉溶媒为2%透明质酸、10%甘油及双蒸水。

[0018] 5、上述方案中,干细胞细胞因子美容的原理是通过细胞因子刺激皮肤成纤维细胞新生而达到从根本上解决衰老皮肤的问题;因此测试冻干粉细胞因子的活性至关重要。

[0019] 与现有技术相比,本发明的优势在于:

[0020] (1)、本发明利用组织快法制备了胎盘干细胞,并采用超声波破碎法收集细胞内的细胞因子与上清中的细胞因子混合,在低温环境下冻干,充分保证了胎盘干细胞因子的浓度及活性。本发明的制备方法所制备的冻干粉有效地保存了人胎盘间充质干细胞中的各种具有生物活性的细胞因子混合物,保存期可延长到2年,有效地解决细胞因子溶液保存期有限这一瓶颈,为人胎盘间充质干细胞细胞因子的产业化应用奠定了基础。

[0021] (2)、本发明将胎盘间充质干细胞提取物制成冻干粉,能较好地保持胎盘间充质干细胞提取物的生物活性,在长期储存过程中不易降解,且使用方便。

附图说明

图1为本发明中利用3T3细胞的增殖曲线。

具体实施方式

[0022] 以下通过具体实施方式进一步描述本发明,但本发明不仅仅限于以下实施例。

[0023] 实施例1:

[0024] 一种胎盘间充质干细胞冻干粉的制备方法,包括以下步骤:

[0025] (1)、胎盘干细胞的分离和培养:在无菌条件下,收取健康的胎盘,在GMP实验室生物安全柜将胎盘剪碎至1.5-2.5mm³大小的组织块,将其置于T175培养瓶所盛的DMEM-LG细胞培养液中,置37℃,5%CO₂培养箱中培养;每隔2-3天换液,直至胎盘干细胞析出,弃去组织块;细胞长满后,记为第一代,用0.28%胰酶进行消化传代;第二代后改用无抗生素 DMEM-LG培养基,并进行传代培养;所述DMEM-LG细胞培养液中含10%FBS、bFGF 5ng/mL、L-谷氨酰胺2mM、青霉素100U/mL、链霉素100μg/mL和两性霉素B 1μg/mL;所述无抗生素DMEM-LG培养基含10%FBS、bFGF 5ng/mL、L-谷氨酰胺2mM。

[0026] (2)、细胞因子的收集:第三代后,细胞长至90%左右可开始收集细胞因子;将细胞状态良好的细胞收集起来,进行超声破碎,使其将细胞内未完全释放的细胞因子释放出来;并 1500rpm离心10分钟,去除细胞碎片沉淀;

[0027] (3)、干细胞提取物的超低温冻干:将去除细胞碎片沉淀的胎盘干细胞培养原液加入10%BSA作为赋形剂,充分溶解后,用0.45um的无菌过滤器过滤除菌,并分装至2ml西林瓶中,每瓶1ml;分装后将西林瓶置于-80℃超低温冰箱中进行预冻干,预冻12h后取出,再置于冻干机内冷冻干燥;即得到胎盘间充质干细胞冻干粉。所述冻干机为真空冷冻干燥机。

[0028] 冻干机设置冻干曲线如表:

[0029]

温度(℃)	时间(小时)
-30	5
-20	5
-5	10
5	20
4	保存至取出

[0030] (4)、冻干前后干细胞因子的活性检测:配制冻干粉溶媒;干细胞细胞因子美容的原理是通过细胞因子刺激皮肤成纤维细胞新生而达到从根本上解决衰老皮肤的问题;因此测试冻干粉细胞因子的活性至关重要。

[0031] 如图1所示,利用3T3细胞的增殖曲线,模拟成纤维细胞在细胞因子促进下的生长情况;将3T3培养后,采用胰酶消化,计数后,将细胞铺至四块六孔板,每两块一组,且每块四孔,其中每孔1*10³个细胞;设定第一组为对照组,在所述对照组中添加步骤(2)中收集的细胞;设定第二组为实验组,在所述实验组中添加冻干后用溶媒溶解的细胞因子;分别培

养 24h、48h、72h、96h后,每板取1孔计数,绘制生长曲线。所述冻干粉溶媒为2%透明质酸、10%甘油及双蒸水。

[0032]

[0033] 本发明利用组织快法制备了胎盘干细胞,并采用超声波破碎法收集细胞内的细胞因子与上清中的细胞因子混合,在低温环境下冻干,充分保证了胎盘干细胞因子的浓度及活性。本发明的制备方法所制备的冻干粉有效地保存了人胎盘间充质干细胞中的各种具有生物活性的细胞因子混合物,保存期可延长到2年,有效地解决细胞因子溶液保存期有限这一瓶颈,为人胎盘间充质干细胞细胞因子的产业化应用奠定了基础。

[0034] 本发明将胎盘间充质干细胞提取物制成冻干粉,能较好地保持胎盘间充质干细胞提取物的生物活性,在长期储存过程中不易降解,且使用方便。

[0035] 在此描述并且要求保护的本发明不限于在此披露的特定方面的范围,因为这些方面旨在作为本发明若干方面的说明。预期任何等效方面都处于本发明的范围内。实际上,除在此所示和描述的那些之外,本发明的不同修改对于本领域普通技术人员而言从前述描述将变得清楚。此类修改也旨在落入所附权利要求书的范围内。在有冲突的情况下,以包括定义的本披露为准。

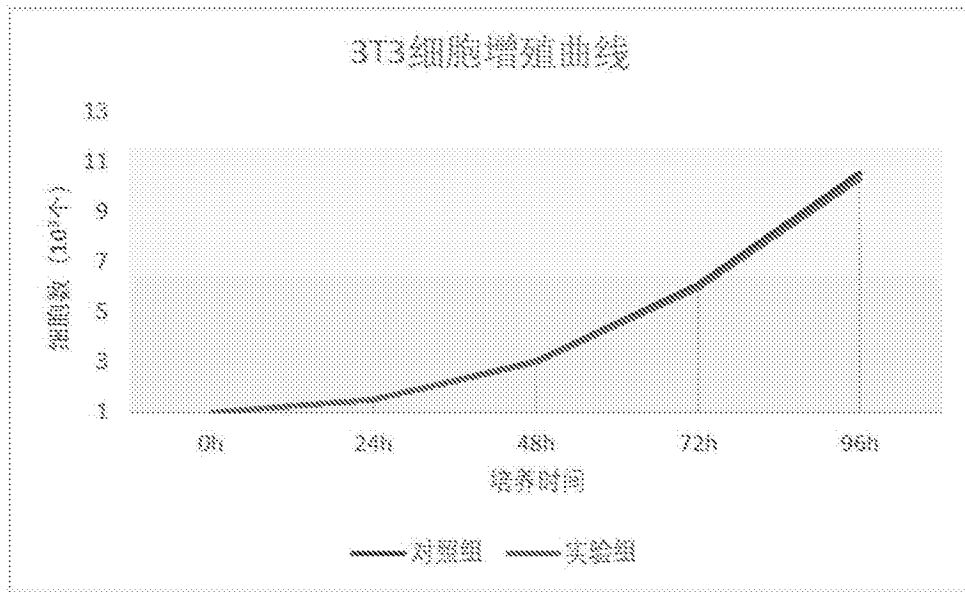


图1