



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112708595 B

(45) 授权公告日 2021.09.10

(21) 申请号 202110330753.9

(22) 申请日 2021.03.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112708595 A

(43) 申请公布日 2021.04.27

(73) 专利权人 北京益华生物科技有限公司
地址 100041 北京市石景山区实兴东街11
号院

(72) 发明人 姜粉军 仇志强 成彦文 何子
周慧

(74) 专利代理机构 北京纽乐康知识产权代理事
务所(普通合伙) 11210
代理人 刘艳艳

(51) Int. Cl.

C12N 5/0775 (2010.01)

(56) 对比文件

US 2012009673 A1, 2012.01.12

US 2015086517 A1, 2015.03.26

US 2020246386 A1, 2020.08.06

WO 2017064672 A1, 2017.04.20

CN 104480064 A, 2015.04.01

KR 20110105665 A, 2011.09.27

审查员 李宁

权利要求书1页 说明书5页 附图6页

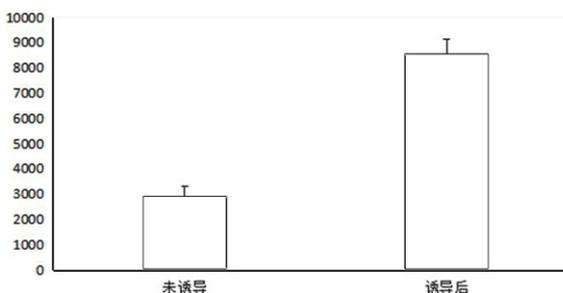
(54) 发明名称

一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培
养基及诱导方法

(57) 摘要

本发明公开了一种SD大鼠来源骨髓间充质
干细胞诱导培养基及诱导方法,该诱导培养基由
 α -MEM培养基和添加剂组成,以最终浓度计,所
述添加剂由5-100ng/ml转化生长因子- α 、10-
200ng/ml调节蛋白 β 1、100-3000nM海藻糖和50-
5000nM二丁酰环磷酸腺苷组成。本发明的SD大鼠
来源骨髓间充质干细胞诱导培养基及诱导方法
能够明显增加大鼠骨髓间充质干细胞的BDNF、
HGF、VEGF、GDNF等因子的分泌量,分泌的因子种
类也较为丰富而且能够长期稳定分泌;通过细胞
因子诱导的方法避免了其它方法如基因修饰等
带来的风险和不确定性,更适用于产业化和临床
应用。

BDNF (pg/10⁶ cells)



1. 一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基,其特征在于,由 α -MEM培养基和添加剂组成,以诱导培养基中的最终浓度计,所述添加剂由10ng/ml转化生长因子- α 、100ng/ml调节蛋白 β 1、1mM海藻糖和1mM二丁酰环磷酸腺苷组成。

2. 一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1 将第7代SD大鼠源骨髓间充质干细胞铺于六孔板上进行培养;

S2 取转化生长因子- α 、调节蛋白 β 1、海藻糖、二丁酰环磷酸腺苷加入 α -MEM培养基中,轻柔吹打均匀,得到诱导培养基,所述诱导培养基中转化生长因子- α 、调节蛋白 β 1、海藻糖、二丁酰环磷酸腺苷的终浓度分别为10 ng/ml、100ng/ml、1mM、1mM;

S3 步骤S1所述的SD大鼠源骨髓间充质干细胞生长密度达到80%时,将六孔板中的培养基上清吸出,用PBS缓冲液洗涤3次,然后将PBS缓冲液吸尽,沿六孔板壁缓慢加入步骤S2得到的诱导培养基,于5%CO₂的37°C培养箱中培养72小时。

3. 根据权利要求2所述的SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导方法,其特征在于,步骤S1采用的培养基为 α -MEM培养基。

一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基及诱导方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药技术领域,具体来说,涉及一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基及诱导方法。

背景技术

[0002] 随着干细胞研究的进展,干细胞移植为有效治疗缺血性脑卒中带来了新的曙光。在种类繁多的干细胞中,骨髓间充质干细胞因其取材方便、免疫原性低、扩增能力强等优点而成为一种理想的移植种子细胞。多项研究表明,骨髓间充质干细胞移植能够不同程度地改善由缺血性脑卒中导致的神经功能障碍。Kvortsova等通过静脉注射的方式将 BM-MSCs 移植到局灶性脑缺血大鼠模型体内,结果发现所移植的骨髓间充质干细胞主要集中分布在缺血性脑卒中部位,使大鼠神经功能缺损症状得以改善。Chopp等将骨髓间充质干细胞直接移植到大鼠缺血性脑卒中模型的损伤部位,发现大鼠神经功能明显改善,这些动物模型体内的研究证实大鼠骨髓间充质干细胞治疗的确减轻了疾病模型的症状。这些研究结果指明了一个治疗缺血性脑卒中的崭新方向并显示出了其广阔的应用前景。

[0003] 目前的研究进展显示移植的大鼠骨髓间充质干细胞主要通过分泌脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)等营养因子来发挥治疗作用,而这些因子发挥作用的一个重要前提是需要维持有效的血药浓度,也就是说需要较高的分泌水平。大鼠骨髓间充质干细胞在治疗缺血性脑卒中模型方面出现的比较明显的问题就是大鼠骨髓间充质干细胞各种因子分泌的水平较低,不一定能达到有效浓度以发挥作用;这对骨髓间充质干细胞治疗缺血性脑卒中的效果研究产生了巨大的影响。目前有使用脐带间充质干细胞进行诱导的技术,主要诱导GDNF的分泌,也是通过不同的诱导药物组合对细胞进行诱导实现的。但是诱导后的因子成分种类较为单一,仅为GDNF的分泌增高,而且并没有使与缺血性脑卒中治疗相关的BDNF分泌增高,另外脐带间充质细胞在缺血性脑卒中动物模型的治疗中,效果不如骨髓间充质干细胞明显,而且其诱导方案诱导的因子分泌水平并不高,同时其并不能长期稳定的高水平分泌。此外,一般都是使用低代次的细胞,一般都是第3-4代的细胞,这样每单位原代细胞的能诱导出来的细胞量就很受限制。

发明内容

[0004] 针对相关技术中的上述技术问题,本发明提出一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基及诱导方法,能够克服现有技术的上述不足。

[0005] 为实现上述技术目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0006] 一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基,由 α -MEM培养基和添加剂组成,以最终浓度计,所述添加剂由5-100ng/ml转化生长因子- α 、10-200ng/ml调节蛋白B1、100-3000nM海藻糖和50-5000nM二丁酰环磷酸腺苷组成。

[0007] 优选地,以最终浓度计,所述添加剂由10ng/ml转化生长因子- α 、100ng/ml调节蛋白B1、1mM海藻糖和1mM二丁酰环磷酸腺苷组成。

[0008] 根据本发明的另一方面,提供了一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导方法,包括以下步骤:

[0009] S1 将SD大鼠源骨髓间充质干细胞铺于六孔板上进行培养;

[0010] S2 取转化生长因子- α (TGF- α)、调节蛋白 β 1 (Heregulin β 1)、海藻糖、二丁酰环磷酸腺苷加入 α -MEM培养基中,轻柔吹打均匀,得到诱导培养基,所述诱导培养基中转化生长因子- α 、调节蛋白 β 1、海藻糖、二丁酰环磷酸腺苷的终浓度分别为10 ng/ml、100ng/ml、1mM、1mM;

[0011] S3 步骤S1所述的SD大鼠源骨髓间充质干细胞生长密度达到80%时,将六孔板中的培养基上清吸出,用PBS缓冲液洗涤3次,然后将PBS缓冲液吸尽,沿六孔板壁缓慢加入步骤S2得到的诱导培养基,于5%CO₂的37℃培养箱中培养72小时。

[0012] 优选地,步骤S1采用的培养基为 α -MEM培养基。

[0013] 优选地,步骤S1采用的SD大鼠源骨髓间充质干细胞为第7-8代的细胞。

[0014] 本发明的有益效果:

[0015] (1)本发明的SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基及诱导方法使用的成分较为简单,程序简易,利用普通 α -MEM培养基即可,从而在很大程度上增强了细胞的安全性且易产业化;

[0016] (2)本发明的SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基及诱导方法能够明显增加大鼠骨髓间充质干细胞的脑源性神经营养因子(BDNF)、肝细胞生长因子(HGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)等因子的分泌量,分泌的因子种类也较为丰富而且能够长期稳定分泌;

[0017] (3)本发明的SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导方法采用的骨髓间充质干细胞在脑卒中治疗中更有优势,并且本发明诱导用的细胞都是高代次的,一般第7-8代的细胞,从而使得每单位原代细胞就可以有更多的细胞被诱导出来,进而能够更高效的用于缺血性脑卒中的临床治疗研究;

[0018] (4)本发明的SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导方法通过细胞因子诱导的方法避免了其它方法如基因修饰等带来的风险和不确定性,更适用于通过大鼠骨髓间充质干细胞的因子分泌作用治疗大鼠缺血性脑卒中动物模型的机制研究,为该领域的研究提供了分泌能力更强的大鼠来源的骨髓间充质干细胞。

附图说明

[0019] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0020] 图1是实施例4与对比例1所得的每10⁶的细胞分泌的BDNF量的对比图;

[0021] 图2是实施例4与对比例1所得的每10⁶的细胞分泌的GDNF量的对比图;

[0022] 图3是实施例4与对比例1所得的每10⁶的细胞分泌的VEGF量的对比图;

[0023] 图4是实施例4与对比例1所得的每10⁶的细胞分泌的HGF量的对比图;

[0024] 图5是实施例5与对比例1所得的每10⁶的细胞分泌的BDNF量的对比图;

- [0025] 图6是实施例5与对比例1所得的每 10^6 的细胞分泌的GDNF量的对比图；
[0026] 图7是实施例5与对比例1所得的每 10^6 的细胞分泌的VEGF量的对比图；
[0027] 图8是实施例5与对比例1所得的每 10^6 的细胞分泌的HGF量的对比图；
[0028] 图9是实施例6与对比例1所得的每 10^6 的细胞分泌的BDNF量的对比图；
[0029] 图10是实施例6与对比例1所得的每 10^6 的细胞分泌的GDNF量的对比图；
[0030] 图11是实施例6与对比例1所得的每 10^6 的细胞分泌的VEGF量的对比图；
[0031] 图12是实施例6与对比例1所得的每 10^6 的细胞分泌的HGF量的对比图。

具体实施方式

[0032] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0033] 实施例1

[0034] 一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基,该诱导培养基由 α -MEM培养基和添加剂组成,以最终浓度计,所述添加剂由10ng/ml转化生长因子- α 、100ng/ml调节蛋白 β 1、1mM海藻糖和1mM二丁酰环磷酸腺苷组成。

[0035] 实施例2

[0036] 一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基,该诱导培养基由 α -MEM培养基和添加剂组成,以最终浓度计,所述添加剂由5ng/ml转化生长因子- α 、10ng/ml调节蛋白 β 1、100nM海藻糖和50nM二丁酰环磷酸腺苷组成。

[0037] 实施例3

[0038] 一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基,该诱导培养基由 α -MEM培养基和添加剂组成,以最终浓度计,所述添加剂由100ng/ml转化生长因子- α 、200ng/ml调节蛋白 β 1、3000nM海藻糖和5000nM二丁酰环磷酸腺苷组成。

[0039] 实施例4

[0040] 一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导方法,包括以下步骤:

[0041] S1将第7代SD大鼠源骨髓间充质干细胞铺于普通六孔板上进行培养,培养基为普通 α -MEM培养基;其生长密度达到80%,细胞生长状态良好,细胞活率 $>95\%$,形态符合骨髓间充质干细胞形态,细胞表面分子流式结果符合骨髓间充质干细胞相关分子指标:CD105 $>96.00\%$,CD73 $>96.00\%$,CD34 $<2.30\%$,CD11b $<1.20\%$;

[0042] S2取转化生长因子- α 、调节蛋白 β 1、海藻糖、二丁酰环磷酸腺苷加入普通 α -MEM培养基中,轻柔吹打均匀,配置完成后转化生长因子- α 、调节蛋白 β 1、海藻糖、二丁酰环磷酸腺苷的终浓度分别为10 ng/ml、100ng/ml、1mM、1mM;

[0043] S3将六孔板中的普通 α -MEM培养基上清吸出,用PBS缓冲液洗涤3次,然后将该缓冲液吸尽,沿六孔板壁缓慢加入配置完成的诱导培养基,于培养箱 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养72小时后,收取细胞上清并进行细胞计数,后续进行BDNF、GDNF、VEGF、HGF等因子的Elisa检测,结果(即诱导后结果)如图1-4所示。

[0044] 实施例5

[0045] 一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导方法,包括以下步骤:

[0046] S1将第7代SD大鼠源骨髓间充质干细胞铺于普通六孔板上进行培养,培养基为普通 α -MEM培养基;其生长密度达到80%,细胞生长状态良好,细胞活率>95%,形态符合骨髓间充质干细胞形态,细胞表面分子流式结果符合骨髓间充质干细胞相关分子指标:CD105>96.00%,CD73>96.00%,CD34<2.30%,CD11b<1.20%;

[0047] S2取转化生长因子- α 、调节蛋白 β 1、海藻糖、二丁酰环磷酸腺苷加入普通 α -MEM培养基中,轻柔吹打均匀,配置完成后转化生长因子- α 、调节蛋白 β 1、海藻糖、二丁酰环磷酸腺苷的终浓度分别为5ng/ml、10ng/ml、100nM和50nM;

[0048] S3将六孔板中的普通 α -MEM培养基上清吸出,用PBS缓冲液洗涤3次,然后将该缓冲液吸尽,沿六孔板壁缓慢加入配置完成的诱导培养基,于培养箱37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养72小时后,收取细胞上清并进行细胞计数,后续进行BDNF、GDNF、VEGF、HGF等因子的Elisa检测,结果(即诱导后结果)如图5-8所示。

[0049] 实施例6

[0050] 一种SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导方法,包括以下步骤:

[0051] S1将第7代SD大鼠源骨髓间充质干细胞铺于普通六孔板上进行培养,培养基为普通 α -MEM培养基;其生长密度达到80%,细胞生长状态良好,细胞活率>95%,形态符合骨髓间充质干细胞形态,细胞表面分子流式结果符合骨髓间充质干细胞相关分子指标:CD105>96.00%,CD73>96.00%,CD34<2.30%,CD11b<1.20%;

[0052] S2取转化生长因子- α 、调节蛋白 β 1、海藻糖、二丁酰环磷酸腺苷加入普通 α -MEM培养基中,轻柔吹打均匀,配置完成后转化生长因子- α 、调节蛋白 β 1、海藻糖、二丁酰环磷酸腺苷的终浓度分别为100ng/ml、200ng/ml、3000nM和5000nM;

[0053] S3将六孔板中的普通 α -MEM培养基上清吸出,用PBS缓冲液洗涤3次,然后将该缓冲液吸尽,沿六孔板壁缓慢加入配置完成的诱导培养基,于培养箱37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养72小时后,收取细胞上清并进行细胞计数,后续进行BDNF、GDNF、VEGF、HGF等因子的Elisa检测,结果(即诱导后结果)如图9-12所示。

[0054] 对比例1

[0055] S1将第7代SD大鼠源骨髓间充质干细胞铺于普通六孔板上进行培养,培养基为普通 α -MEM培养基,其生长密度达到80%,细胞生长状态良好,细胞活率>95%,形态符合骨髓间充质干细胞形态,细胞表面分子流式结果符合骨髓间充质干细胞相关分子指标:CD105>96.00%,CD73>96.00%,CD34<2.30%,CD11b<1.20%。在诱导组进行诱导药物加入的相同时间点,将六孔板中的非诱导组细胞普通 α -MEM培养基上清吸出,用PBS缓冲液洗涤3次,然后将该缓冲液吸尽,沿六孔板壁缓慢加入普通 α -MEM培养基,于培养箱37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养72小时后,收取细胞上清并进行细胞计数,后续进行BDNF、GDNF、VEGF、HGF等因子的Elisa检测,结果如图1-12所示。

[0056] 由实施例4-6(即诱导组)与对比例1(即非诱导组)的结果对比可见,本发明的SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基及诱导方法能够明显增加骨髓间充质干细胞的BDNF、GDNF、VEGF、HGF等因子的分泌量。

[0057] 综上所述,借助于本发明的上述技术方案,本发明的SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基及诱导方法使用的成分较为简单,程序简易,利用普通 α -MEM培养基即可,从

而在很大程度上增强了细胞的安全性且易产业化;本发明的SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导培养基及诱导方法能够明显增加大鼠骨髓间充质干细胞的BDNF、HGF、VEGF、GDNF等因子的分泌量,分泌的因子种类也较为丰富而且能够长期稳定分泌;本发明的SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导方法采用的骨髓间充质干细胞在脑卒中治疗中更有优势,并且本发明诱导用的细胞都是高代次的,一般第7-8代的细胞,从而使得每单位原代细胞就可以有更多的细胞被诱导出来,进而能够更高效的用于缺血性脑卒中的临床治疗研究;本发明的SD大鼠来源骨髓间充质干细胞诱导方法通过细胞因子诱导的方法避免了其它方法如基因修饰等带来的风险和不确定性,更适用于通过大鼠骨髓间充质干细胞的因子分泌作用治疗大鼠缺血性脑卒中动物模型的机制研究,为该领域的研究提供了分泌能力更强的大鼠来源的骨髓间充质干细胞。

[0058] 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、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

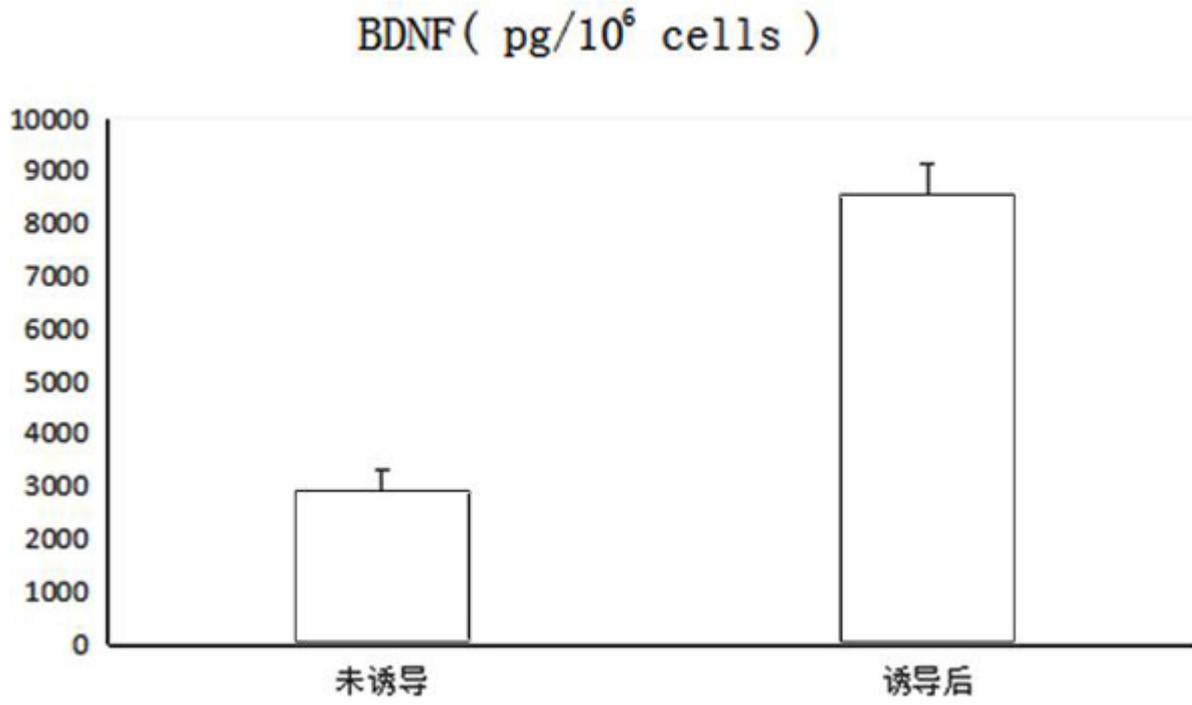


图1

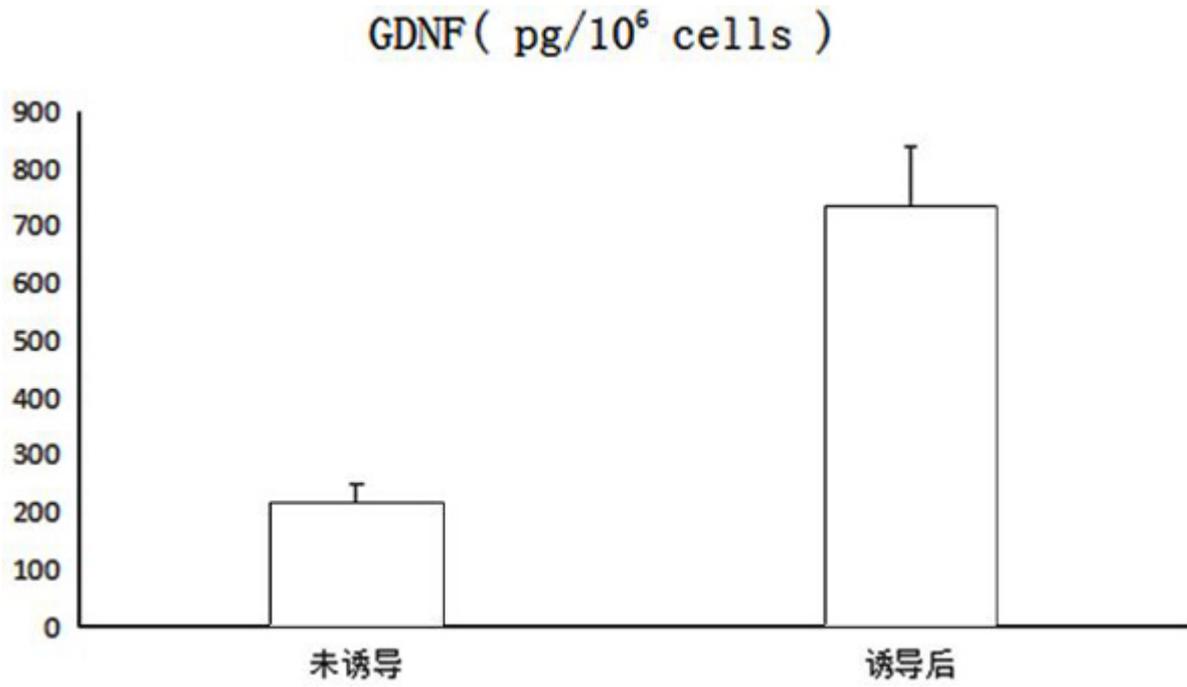


图2

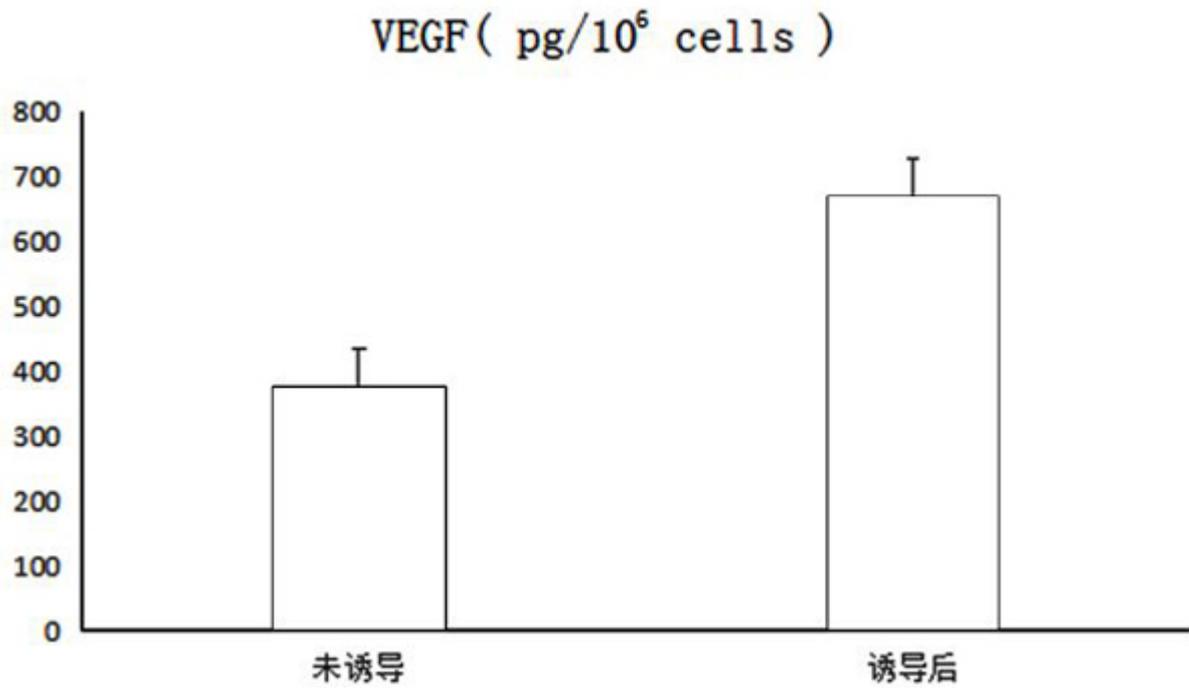


图3

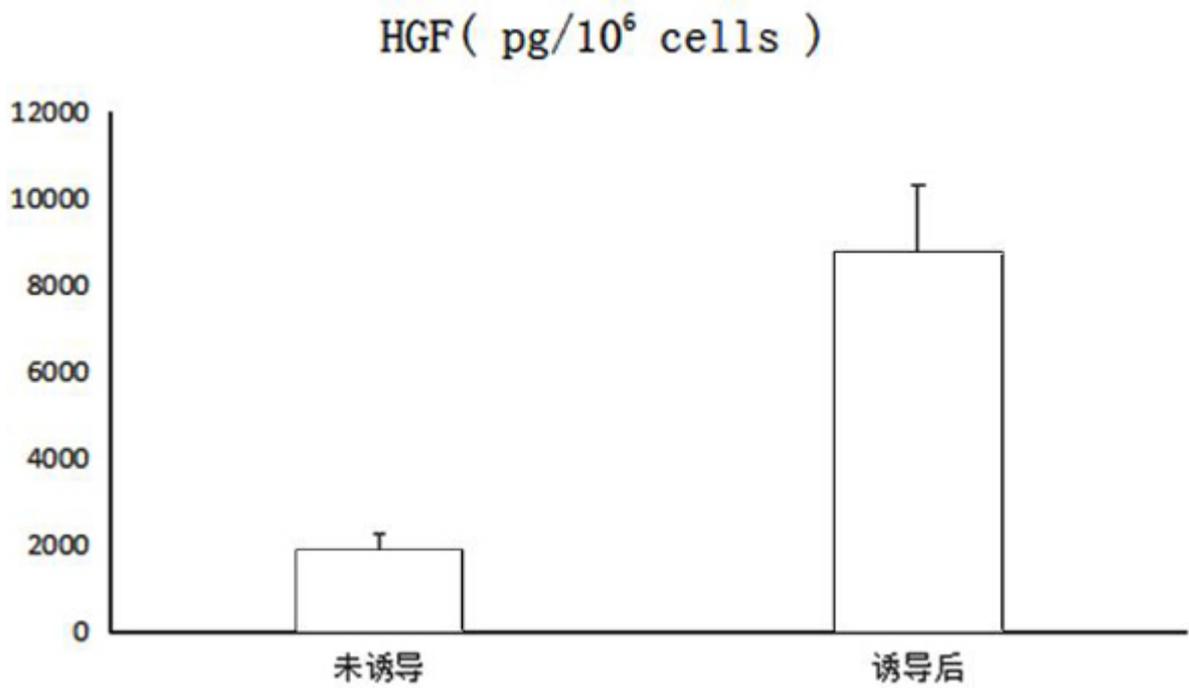


图4

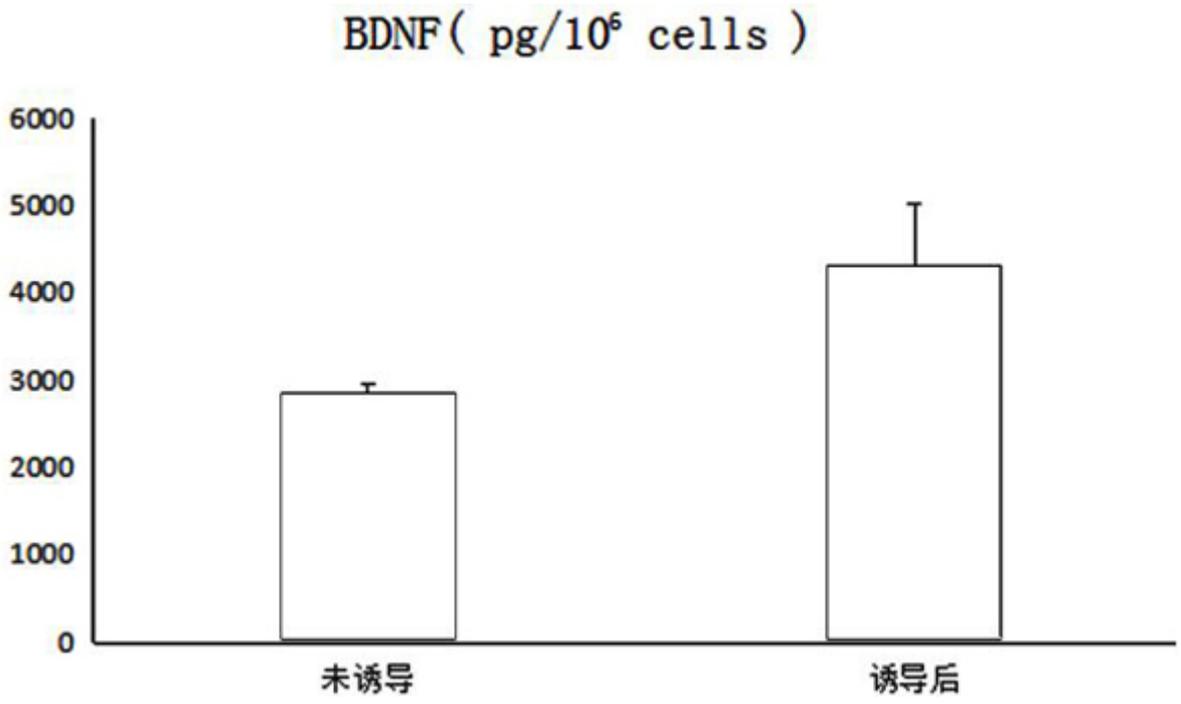


图5

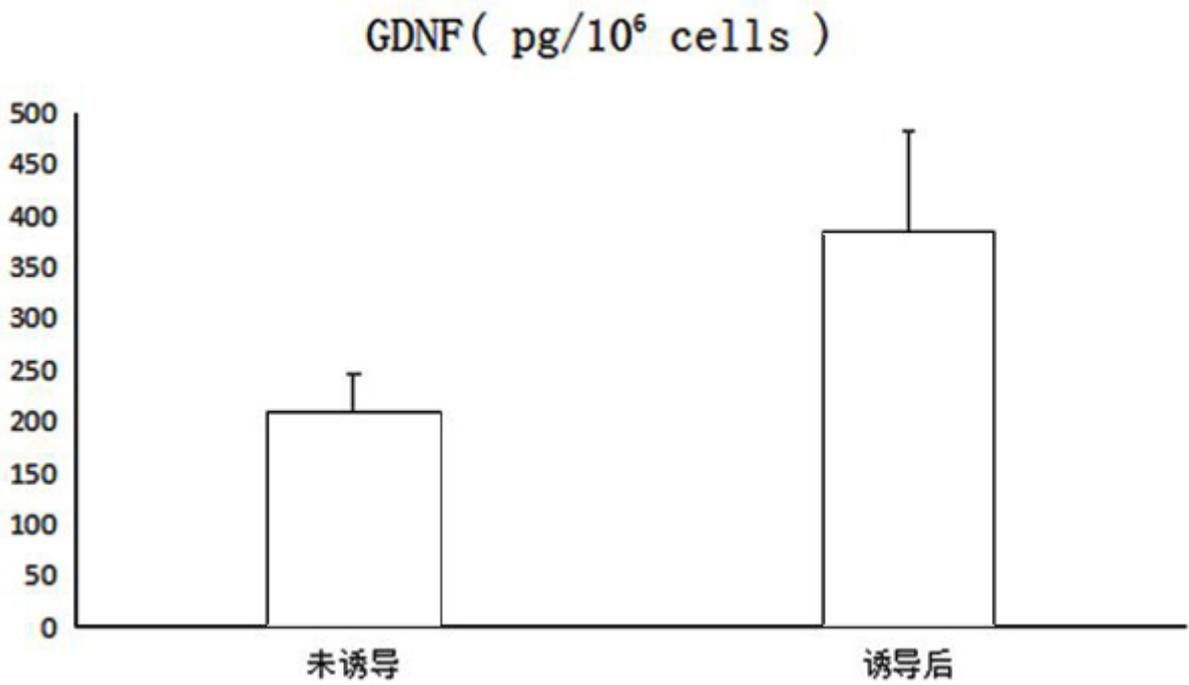


图6

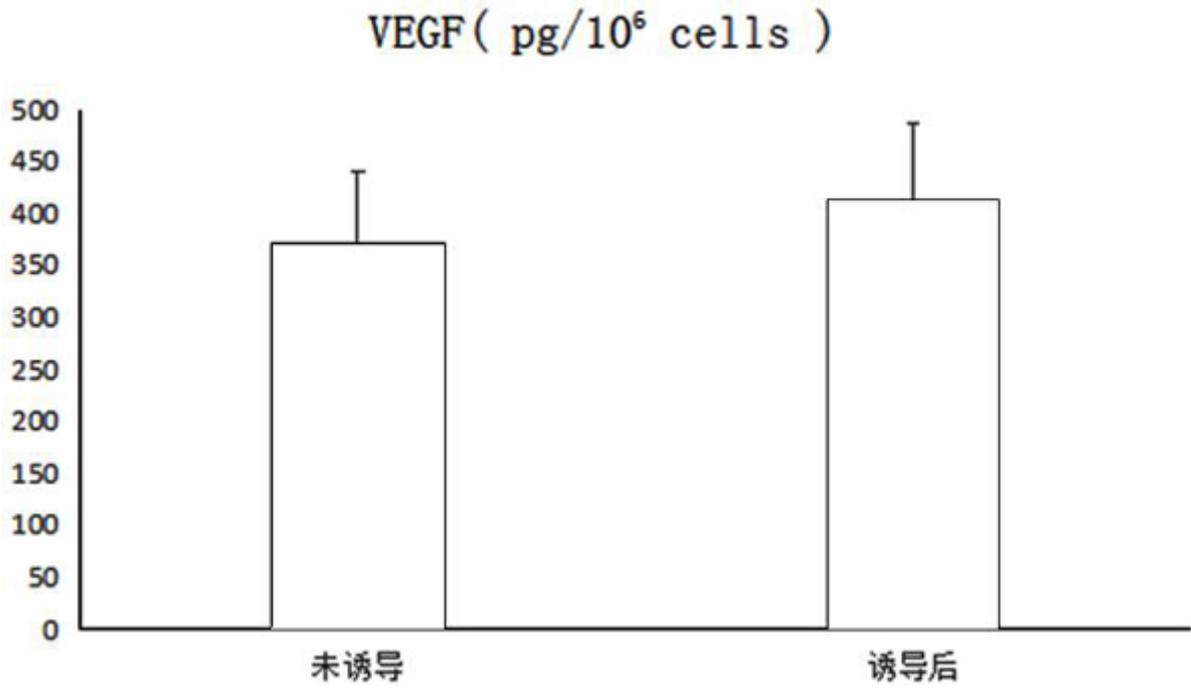


图7

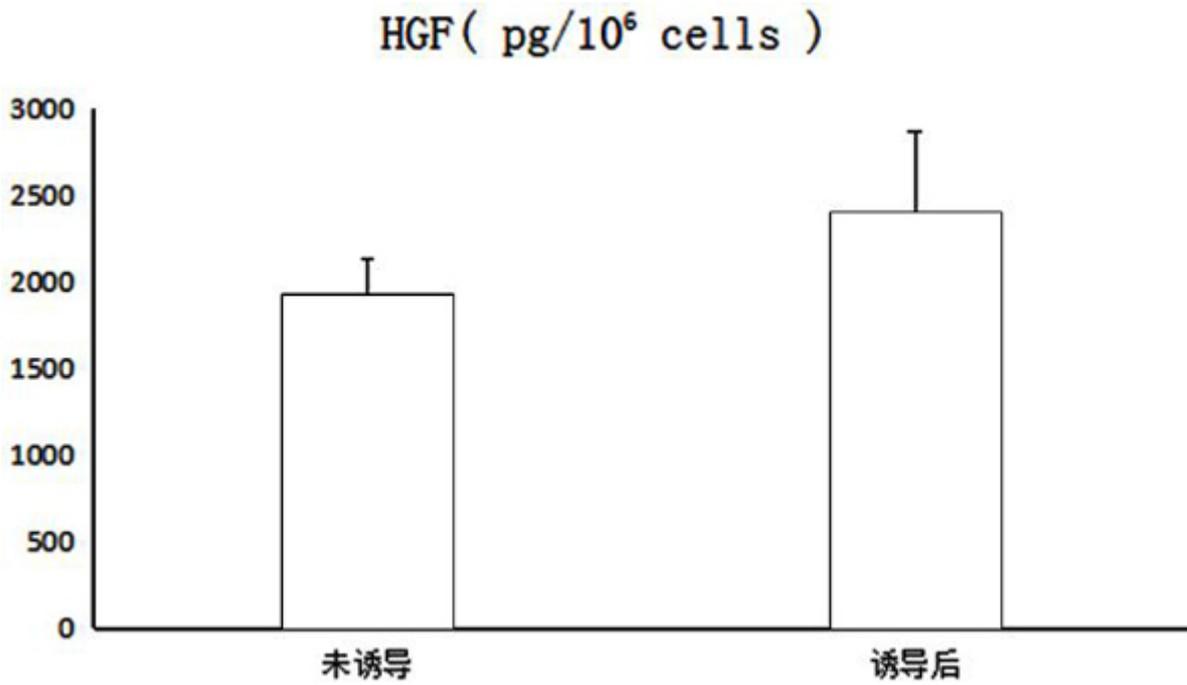


图8

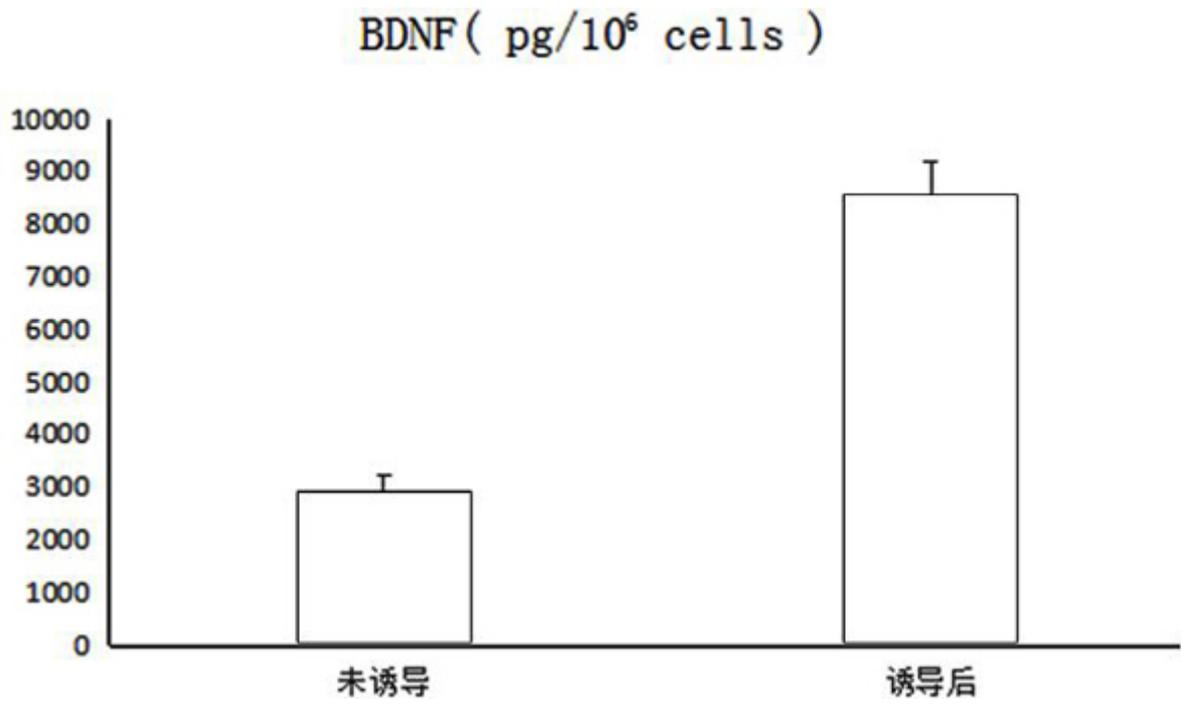


图9

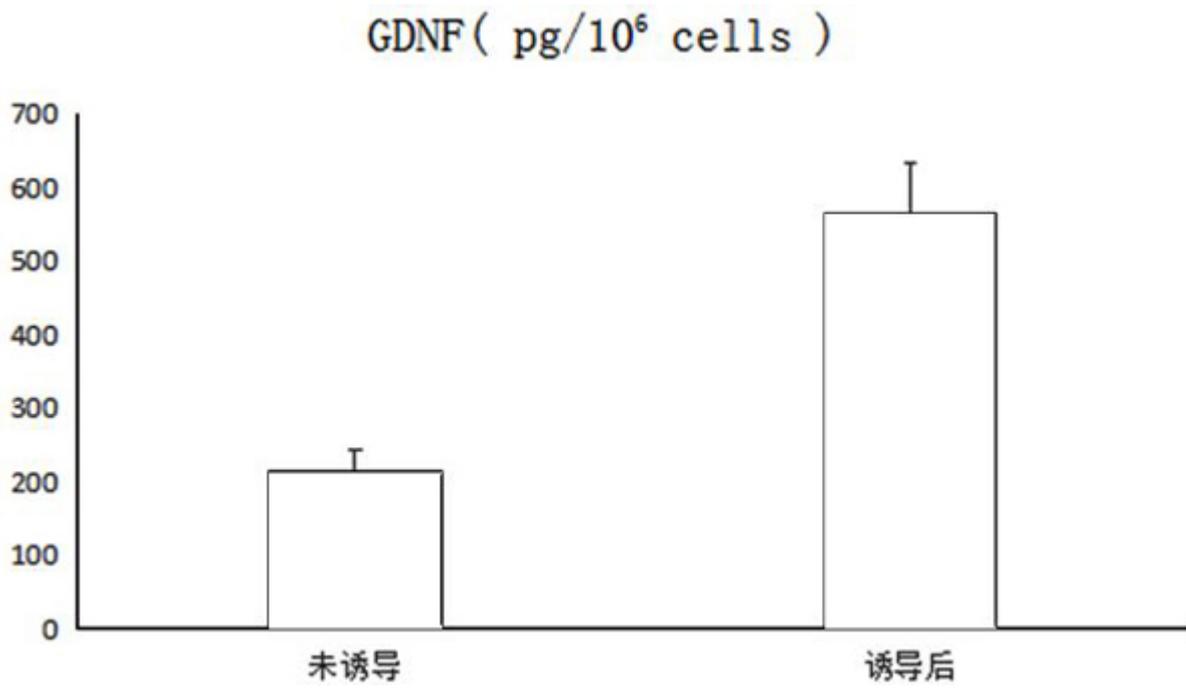


图10

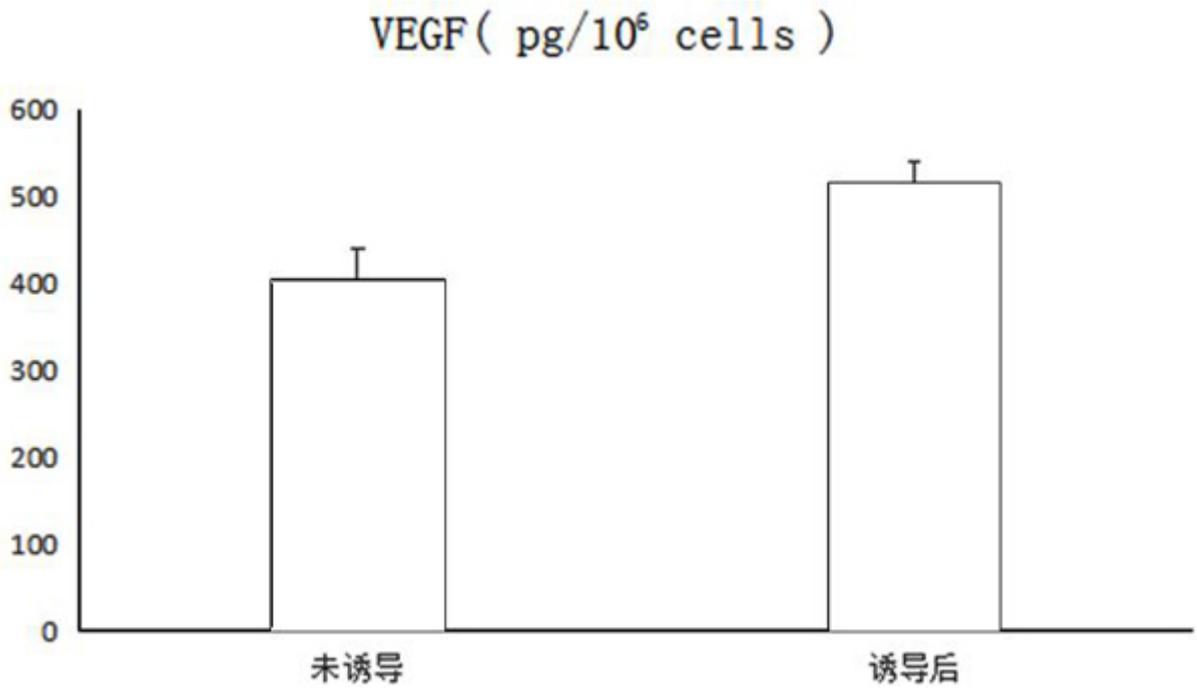


图11

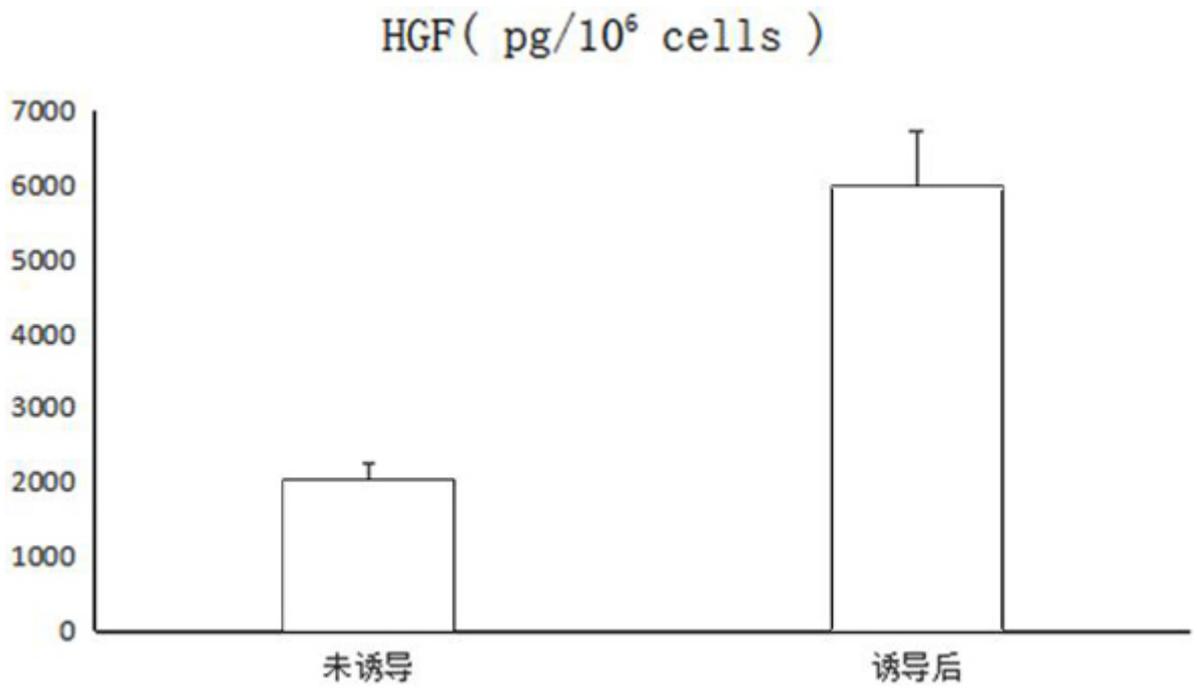


图12