



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111206017 B

(45) 授权公告日 2022.02.18

(21) 申请号 202010104684.5

CN 101838310 A, 2010.09.22

(22) 申请日 2020.02.20

CN 105200008 A, 2015.12.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 105874058 A, 2016.08.17

申请公布号 CN 111206017 A

CN 101875693 A, 2010.11.03

CN 108642002 A, 2018.10.12

(43) 申请公布日 2020.05.29

CN 105874058 A, 2016.08.17

(66) 本国优先权数据

US 2013136721 A1, 2013.05.30

201910358837.6 2019.04.30 CN

CN 1800367 A, 2006.07.12

CN 106190946 A, 2016.12.07

(73) 专利权人 浙江大学

CN 104877963 A, 2015.09.02

地址 310000 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

CN 106164257 A, 2016.11.23

(72) 发明人 欧阳宏伟 张琴 章佳燕

刘振中等. 转化生长因子-β1噬菌体模拟肽促进成纤维细胞增殖的效果.《山东大学学报(医学版)》.2015,第53卷(第3期),

(74) 专利代理机构 杭州天昊专利代理事务所

(特殊普通合伙) 33283

高波等. 从噬菌体肽库中筛选生长因子模拟肽的研究进展.《国外医学药学分册》.2002,第29卷(第5期),

代理人 向庆宁

向军俭等. 人工合成VEGF表位模拟7肽的生物学功能研究.《细胞与分子免疫学杂志》.2005,第21卷(第1期),

(51) Int. Cl.

G12N 5/0775 (2010.01)

审查员 叶金金

(56) 对比文件

CN 106164257 A, 2016.11.23

JP 2007228815 A, 2007.09.13

权利要求书1页 说明书16页 附图2页

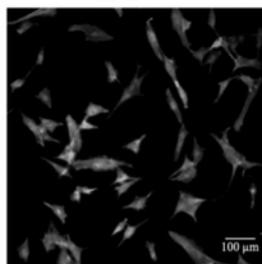
(54) 发明名称

一种干细胞无血清培养基及其应用

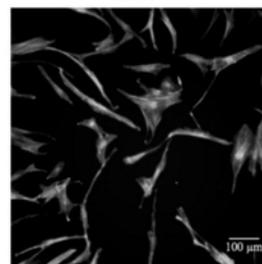
(57) 摘要

本发明公开了一种干细胞无血清培养基,该培养基包括基础培养基成分和适用于干细胞的血清代替物,所述血清代替物包括白蛋白、生长因子和粘附因子,其中,所述血清代替物还包括至少代替部分白蛋白的白蛋白代替物,所述白蛋白代替物为聚乙烯醇。本申请通过特异性地使用聚乙烯醇,减少了培养基中白蛋白的添加量,或以聚乙烯醇代替白蛋白,不仅使得培养基成本降低,而且有利于产品的分离提纯,并且体外培养干细胞达到了比血清培养基更优的增殖效果。

SFM



FBS



CN 111206017 B

1. 一种干细胞无血清培养基,由基础培养基成分和适用于干细胞的血清代替物组成,所述血清代替物包括白蛋白代替物、生长因子合成肽和粘附因子合成肽,其特征在于,所述白蛋白代替物为聚乙烯醇,聚乙烯醇浓度为10mg/mL;所述生长因子合成肽由重组人EGF合成肽1~100ng/mL、重组人bFGF合成肽1~100ng/mL、重组人IGF合成肽1~100ng/mL、重组人PDGF-AA合成肽1~100ng/mL、重组人PDGF-BB合成肽1~100ng/mL、重组人合成肽TGF- $\beta$ 1 1~50ng/mL组成;所述粘附因子合成肽为重组人纤连蛋白合成肽0.1~20 $\mu$ g/mL;所述重组人EGF合成肽的序列为Asp-Val-Val-Asp-Ala-Asp-Glu-Tyr-Leu-Ile-Pro-Gln或Cys-Met-His-Ile-Glu-Ser-Leu-Asp-Ser-Tyr-Thr-Cys,重组人bFGF合成肽的序列为Lys-Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu或Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Pro-Gly-His-Phe-Lys-Asp-Pro-Lys-Arg-Leu-Tyr,重组人IGF合成肽的序列为Tyr-Phe-Asn-Lys-Pro-Thr-Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr或Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr或Nap-FFG-GYGSSRRAPQT或Ala-Leu-Leu-Glu-Thr-Tyr-Cys-Ala-Thr-Pro-Ala-Lys-Ser-Glu,重组人PDGF-AA合成肽为重组人PDGF-AA,重组人PDGF-BB合成肽的序列为Cys-Ser-Arg-Asn-Leu-Ile-Asp-Cys-OH,重组人合成肽TGF- $\beta$ 1的序列为KVLALYNK-NH<sub>2</sub>,重组人纤连蛋白合成肽的序列为Trp-Gln-Pro-Arg-Ala-Arg-Ile。

2. 根据权利要求1所述的无血清培养基,其特征在于,所述血清代替物还包括激素、转运蛋白、多胺类、脂类、矿物质、糖类、有机酸、氨基酸、还原剂、维生素、微量元素、抗生素、缓冲剂和pH值调节剂中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的无血清培养基,其特征在于,所述基础培养基为DMEM、DMEM/F12、 $\alpha$ -MEM、IMDM、mTesR或E8培养基。

4. 如权利要求1~3任一项所述的干细胞无血清培养基在干细胞培养中的应用。

## 一种干细胞无血清培养基及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于细胞培养技术领域,具体涉及一种干细胞无血清培养基及其应用。

### 背景技术

[0002] 间充质干细胞作为一种成体干细胞,因来源广泛,取材方便,免疫原性低,不受伦理道德限制等优势,而被广泛应用于临床研究以及各种难治性病症。足够数量且高品质的细胞是保障治疗功效的必要条件,然而原始间充质干细胞数量有限,必须对分离得到的细胞进行体外扩增培养,才能达到临床使用的数量级。

[0003] 目前,在体外扩增培养过程中,传统的间充质干细胞培养液是使用基础培养基添加5%至20%的动物血清。血清是细胞生长不可或缺的成分,但动物血清作为异种血清不仅成分复杂,批间差异大,而且在病人治疗中容易引入外源病毒或病原体的风险,例如,疯牛症的朊毒体等。之后有使用人血清、血小板裂解液或脐带血清作为替代,但是也不能完全免除病原体或其他未知成分的威胁。因此,科学家转向开发不含动物来源成分且化学成分明确的无血清培养基以取代传统的细胞培养液,将血清的主要成分添加于基础培养基中,例如,将粘附因子、生长因子、必需的营养物质和激素等添加于基础培养基中来制备无血清培养基,优选使用基因重组法(recombinant)制备得到的生长因子或蛋白,从而减少血清带来的不利因素。目前市场上常用的无动物来源成分且化学成分明确的间充质干细胞培养基有 StemPro™MSC SFM XenoFree (Invitrogen, Gibco), MesenCult™-ACF Plus Medium (STEMCELL Technologies), Mesenchymal Stem Cell Growth Medium DXF (PromoCell) 以及 MSC NutriStem®XF (Biological Industries) 等。这些无血清培养基能够保证细胞的生长与增殖,同时维持间充质干细胞的表型和三系分化能力。但是,现有的无血清培养基配方复杂,重组蛋白价格昂贵,导致所需材料的成本相比动物血清高出数倍,限制了其普及性。另外,在现有的培养条件下,间充质干细胞在数代培养后,仍会出现增殖减慢、衰老等现象,极大影响其医疗效能。

[0004] 因此,迫切需要开发一款价廉物美的不含动物来源成分且化学成分明确的无血清培养基用于间充质干细胞的规模化培养,以保障间充质干细胞的安全性与有效性。

### 发明内容

[0005] 本发明小组为了达成上述目的进行了深入研究,结果惊讶的发现:通过在含有重组蛋白的培养基中,组合使用聚乙烯醇(PVA),能够使所得培养基在白蛋白含量降低的同时具有优异的培养效果。另外,组合使用生长因子或粘附因子的合成肽,能够使所得培养基在生长因子和粘附因子含量降低的同时具有优异的培养效果,从而完成了本发明。

[0006] 作为本发明的第一方面,本发明公开了一种干细胞无血清培养基。

[0007] 作为优选,所述无血清培养基,包括基础培养基成分和适用于干细胞的血清代替物,所述血清代替物包括白蛋白、生长因子和粘附因子,其中,所述血清代替物还包括至少代替部分白蛋白的白蛋白代替物。

[0008] 作为优选,所述白蛋白代替物为聚乙烯醇。

[0009] 作为优选,以培养基的总体积计,所述聚乙烯醇浓度为1~10mg/mL。

[0010] 作为优选,所述血清代替物还包括至少代替部分生长因子的生长因子合成肽和/或至少代替部分粘附因子的粘附因子合成肽。

[0011] 这也是本发明的另一方面,使用模拟生长因子或粘附因子的有效片段而合成的合成肽来代替生长因子或粘附因子,也是我们研究的另外一个重要的客体。一般认识到的生长因子或粘附因子的都是以蛋白三维结构的形式来展现活性,而本发明小组发现在培养基中使用某些短的肽链或者模拟的肽链仍然具有类似生长因子或粘附因子的活性,从而大大降低了培养基的成本,而且可以标准化生产。主要原因是由于生长因子或粘附因子一般是经过提取或通过体外重组表达获得的,使得这些生长因子或粘附因子不仅价格昂贵,而且活性不统一,不容易进行标准化生产。

[0012] 作为优选,合成肽包括是根据生长因子或粘附因子自身的有效片段或片段组合的氨基酸序列,和/或利用化学合成的方法所制得的具有相同氨基酸序列的多肽或寡肽。其中,关于生长因子或粘附因子的有效片段,可以根据已有文献报道找到对应氨基酸序列,然后通过设计引物进行合成或委托生物公司合成。文献未报道的,可以通过蛋白质酶解,肽谱分析的方法,寻找到最优化肽段,然后通过设计引物进行合成或委托生物公司合成。

[0013] 进一步地,合成多肽还可以包括细胞因子或粘附因子的模拟肽,利用已知细胞因子或粘附因子的受体从肽库内筛选细胞因子模拟肽或粘附因子模拟肽,这些模拟肽的氨基酸序列与其相应的细胞因子或粘附因子的氨基酸序列不同,但具有细胞因子或粘附因子的活性,并且具有相对分子质量小等优点,同理,细胞因子或粘附因子模拟肽可根据已知的细胞因子或粘附因子模拟肽氨基酸序列委托生物公司合成。

[0014] 本申请使用合成多肽替代价格昂贵的生长因子或/和粘附因子,即可用合成多肽来替换生长因子或者粘附因子,或者同时替换生长因子或者粘附因子。

[0015] 作为优选,以培养基的总体积计,所述生长因子包括重组人EGF 1~100ng/mL、重组人bFGF 1~100ng/mL、重组人VEGF 1~100ng/mL、重组人IGF 1~100ng/mL、重组人PDGF-AA1~100ng/mL、重组人PDGF-BB 1~100ng/mL、重组人TGF- $\beta$ 1 1~50ng/mL中的一种或多种;所述生长因子合成肽包括重组人EGF合成肽1~100ng/mL、重组人bFGF合成肽1~100ng/mL、重组人VEGF合成肽1~100ng/mL、重组人IGF合成肽1~100ng/mL、重组人合成肽PDGF-AA1~100ng/mL、重组人PDGF-BB合成肽1~100ng/mL、重组人合成肽TGF- $\beta$ 1 1~50ng/mL中的一种或多种。

[0016] 作为优选,以培养基的总体积计,所述粘附因子包括重组人纤连蛋白0.1~20 $\mu$ g/mL、重组人层粘连蛋白0.1~20 $\mu$ g/mL、重组人玻连蛋白0.1~20 $\mu$ g/mL、重组人胎球蛋白100~2000 $\mu$ g/mL、MaxGel<sup>TM</sup>ECM中的一种或多种;所述粘附因子合成肽包括重组人纤连蛋白合成肽0.1~20 $\mu$ g/mL、重组人层粘连蛋白合成肽0.1~20 $\mu$ g/mL、重组人玻连蛋白合成肽0.1~20 $\mu$ g/mL、重组人胎球蛋白合成肽100~2000 $\mu$ g/mL中的一种或多种。

[0017] 作为优选,所述血清代替物还包括激素、转运蛋白、多胺类、脂类、矿物质、糖类、有机酸、氨基酸、还原剂、维生素、微量元素、抗生素、缓冲剂和pH值调节剂中的一种或多种。

[0018] 作为优选,所述激素包括重组人胰岛素0.1~20 $\mu$ g/mL或重组人胰岛素的合成肽0.1~20 $\mu$ g/mL、皮质醇1~100nM、皮质酮1~100nM、孕酮1~100nM、黄体酮1~100nM、氢化可

的松1~100nM、低塞米松0.1~10 $\mu$ M、 $\beta$ -雌二醇1~100nM、三碘甲状腺原氨酸1~100nM中的一种或多种。

[0019] 作为优选,所述转运蛋白包括人脱铁转铁蛋白0.5~20 $\mu$ g/mL、人全铁转铁蛋白0.5~20 $\mu$ g/mL、ITS液体培养基添加剂100x中的一种或多种。

[0020] 作为优选,所述多胺类包括腐胺1~100 $\mu$ M和/或乙醇胺1~100 $\mu$ M。

[0021] 作为优选,所述脂类包括脂肪酸添加剂100~300 $\mu$ g/L、化学成分明确的脂质浓缩物0.1~1.0%、胆固醇100~300 $\mu$ g/L、亚油酸1~20 $\mu$ g/L、油酸1~20 $\mu$ g/L、亚麻酸1~20 $\mu$ g/L中的一种或多种。

[0022] 作为优选,所述矿物质包括亚硒酸钠、3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐、丙酮酸钠中的一种或多种,浓度分别为1~50ng/mL。

[0023] 作为优选,所述糖类包括葡萄糖1~50mM、肝素0.1~20 $\mu$ g/mL、半乳糖1~50mM、硫酸软骨素1~50mM中的一种或多种。

[0024] 作为优选,所述有机酸包括丙酮酸1~100mg/L和/或乳酸1~100mg/L。

[0025] 作为优选,所述氨基酸包括包括L-谷氨酰胺100~300mg/L、左旋肉碱100~300mg/L、腺嘌呤100~300mg/L、鸟嘌呤100~300mg/L、尿嘧啶100~300mg/L、胸腺嘧啶100~300mg/L、胞嘧啶100~300mg/L、核糖100~300mg/L、脱氧核糖100~300mg/L、MEM非必需氨基酸溶液100x中的一种或多种。

[0026] 作为优选,所述还原剂包括还原型谷胱甘肽、2-巯基醇、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶中的一种或多种,浓度分别为1~200 $\mu$ M。

[0027] 作为优选,所述维生素包括维生素A、B、C、D、E、K各族中的一种或多种,浓度分别为1~200 $\mu$ M。

[0028] 作为优选,所述微量元素包括铁、铜、锌、钴、锰、铬、硒、碘、镍、氟、钼、银、锡、铝、钡、硼、铷中的一种或多种。

[0029] 作为优选,所述抗生素包括链霉素50~100 $\mu$ g/mL、青霉素50~100IU/mL、庆大霉素50~100 $\mu$ g/mL中的一种或多种。

[0030] 作为优选,所述缓冲剂包括HEPES 10-50mM。

[0031] 作为优选,所述pH值调节剂包括酚红、磷酸二氢钠、磷酸三钠、焦磷酸钠、焦磷酸钾、碳酸氢钠、氢氧化钾、氢氧化铵、三乙醇胺、柠檬酸中的一种或多种。

[0032] 作为优选,所述基础培养基为DMEM、DMEM/F12、 $\alpha$ -MEM、IMDM、mTesR或E8培养基。

[0033] 作为本申请的第二方面,本申请提供本申请第一方面所述的干细胞无血清培养基在干细胞培养中的应用。

[0034] 本申请的有益效果:

[0035] 1) 本发明公开了一种干细胞增殖用的无血清培养基,该无血清培养基通过特异性地使用聚乙烯醇,减少了培养基中白蛋白的添加量,或以聚乙烯醇代替白蛋白,使得培养基成本降低,有利于产品的分离提纯,而且体外培养干细胞达到了比血清培养基更优的增殖效果;

[0036] 2) 本发明的无血清培养基通过特异性地使用模拟生长因子或粘附因子的合成肽,减少了培养基中生长因子或粘附因子的添加量,或以合成肽代替生长因子或粘附因子,使得培养基成本降低,而且体外培养干细胞达到了比血清培养基更优的增殖效果;

[0037] 3) 不含动物血清或其他异源成分,化学成分明确,配制方便,价格低廉,适用于规模生产应用;

[0038] 4) 市面上的无血清培养基产品大都需要提前对培养皿进行预coating,本申请的培养基无需预铺板蛋白处理,原代培养可用;

[0039] 5) 能良好地支持干细胞,不仅提高了细胞扩增效率并保持了干细胞的生物特性,而且确保了细胞的质量达到临床应用标准。

## 附图说明

[0040] 图1为在本发明中实验组培养的干细胞形态。

[0041] 图2为在本发明中实验组培养的干细胞增殖的倍增时间。

[0042] 图3为在本实验中实验组培养的干细胞表型。

[0043] 图4为本实验中实验组培养的干细胞的三系分化能力(成脂、成骨和成软骨)。

[0044] 图5为本实验中合成肽FN、bFGF和PDGF分别替换生长因子后的细胞增殖曲线图。

[0045] 详细说明

[0046] 下面对本发明涉及的某些技术术语做进一步的说明。这些说明仅仅是采用举例的方式说明本发明的方式是如何实现的,并不能对本发明构成任何的限制。

[0047] 干细胞

[0048] 干细胞是指具有自我复制能力及分化/增长能力的未成熟细胞,包括全能干细胞、多能干细胞、单能干细胞等亚群,其中,全能干细胞是指具有能够分化为构成生物体的全部组织、细胞的能力的细胞;多能干细胞是指虽然不能分化为全部的种类、但具有能够分化为多种组织、细胞的能力的细胞;单能干细胞是指具有能够分化为特定组织、细胞的能力的细胞。

[0049] 全能干细胞包括但不限于胚胎干细胞(ES细胞)、胚胎生殖细胞(EG细胞)、人工多能干细胞(iPS细胞)以及通过应激或细胞刺激诱导筛选获得的全能干细胞等。多能干细胞包括但不限于间充质干细胞、造血干细胞、神经干细胞、髓样干细胞、生殖干细胞等,其中,间充质干细胞具有能够分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂细胞的能力。单能干细胞包括但不限于上皮组织基底层的干细胞、肌肉中的成肌细胞等。

[0050] 本申请的无血清培养基用于干细胞的增殖,特别适用于间充质干细胞的培养增殖。

[0051] 寡肽、多肽和蛋白质

[0052] 由2~10个氨基酸组成的肽称为寡肽,由10~50个氨基酸组成的肽称为多肽,由50个以上的氨基酸组成的肽就称为蛋白质。

[0053] 生长因子

[0054] 生长因子(growth factor)是存在于生物体内,对生物的生长、发育具有广泛调节作用的活性蛋白质或多肽类物质。多为广义的肽激素,包括胰岛素、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)、血小板来源增殖因子(platelet-derived growth factor,PDGF)以及生长激素释放抑制因子(somatostatin=SRIF)等。除肽激素之外,皮质醇和甲状腺素(T3)等也属于生长因子。在上述物质中,已发现除激素之外的其他物质可作为培养细胞的生长因素,因此这些物质也被推测是活体的发育因子。

[0055] 在本申请中,微生物生命活动不可缺少,而微生物自身又不能合成的微量有机物质都可称为生长因子。生长因子通过与特异的、高亲和的细胞膜受体结合,调节细胞生长。其一般特性是能与细胞膜特异受体结合,具有调控细胞生长、发育的作用,对人体的免疫、造血调控、肿瘤发生、炎症与感染、创伤愈合、血管形成、细胞分化、细胞凋亡、形态发生、胚胎形成等方面产生着重要的调控作用。生长因子广泛存在于机体的各种组织内,包括成熟组织和胚胎组织,通过自分泌和或旁分泌方式调节各种细胞的增殖和分化,并且许多体外培养的细胞也能释放生长因子。

[0056] 生长因子有多种,如血小板类生长因子(血小板来源生长因子PDGF;骨肉瘤来源生长因子ODGF)、表皮生长因子类(表皮生长因子EGF、转化生长因子TGF $\alpha$ 和TGF $\beta$ )、成纤维细胞生长因子( $\alpha$ FGF、 $\beta$ FGF)、类胰岛素生长因子(IGF-I、IGF-II)、神经生长因子(NGF)、白细胞介素类生长因子(IL-1、IL-1、IL-3等)、红细胞生长素(EPO)、集落刺激因子(CSF)等。许多生长因子已被提纯并确定了其结构组成,如血小板来源的生长因子(PDGF)是个热稳定、具较高正电荷的蛋白质,由含有二硫键的二聚体组成,分子量30000道尔顿左右。又如表皮生长因子(EGF)是个热稳定、含有53个氨基酸残基的多肽,分子量为6000道尔顿左右。各类生长因子都有其相应的受体,是普遍存在于细胞膜上的跨膜蛋白,不少受体具有激酶活性,特别是酪氨酸激酶活性(如PDGF受体、EGF受体等)。

[0057] 由于生长因子是由正常细胞分泌,既无药物类毒性,也无免疫反应,因此在研究其生理作用机制同时,有的已试用于临床治疗,如白细胞介素-2已用于治疗癌症,其对肾癌、黑色素瘤效果明显;也可用作免疫调节剂以及用于治疗自身免疫有关的疾病;白细胞介素-3用于治疗骨髓功能衰竭与血小板缺失等适应症;表皮生长因子用于人烧伤、创伤、糖尿病皮肤溃疡、褥疮、静脉曲张性皮肤溃疡和角膜损伤等,可促进伤口愈合。

#### [0058] 粘附因子

[0059] 粘附因子又称为细胞粘附分子(cell adhesion molecules,CAM),是众多介导细胞间或细胞与细胞外基质(extracellular matrix,ECM)间相互接触和结合分子的统称,是位于细胞表面或细胞基质中的糖蛋白,通常以受体和配体结合的形式发挥作用。粘附分子使细胞与细胞间,细胞与基质间发生粘附,从而参与细胞的识别、活化和信号传导,细胞增殖与分化,细胞的伸展与运动,是免疫应答,炎症发生,凝血,肿瘤转移,创伤愈合等一系列重要生理和病理过程的分子基础。

[0060] 粘附因子按结构特点分为选择素家族、整合素家族、免疫球蛋白基因超家族和钙粘依赖性粘附素,例如可举出:E-选择蛋白、P-选择蛋白、L-选择蛋白、vWF因子、血小板反应蛋白(TSP)、纤维连接蛋白(FN)、玻璃连接蛋白、整合蛋白、血管细胞粘附分子(VCAM)、细胞间粘附分子(ICAM)、血小板内皮细胞粘附分子(PECAM)、血小板膜糖蛋白(GP)、神经细胞粘附分子(NCAM)、钙粘连蛋白等。

#### [0061] 其它培养所必要的物质

[0062] 在一些实施方式中,本发明的培养基所使用的其它培养所必要的物质包括:激素、转运蛋白、多胺类、脂肪酸和脂质、矿物质、糖类、有机酸、氨基酸、维生素、微量元素、还原剂、抗生素、缓冲剂和pH值调节剂等中的一种或多种。上述必要物质的添加既节约成本又能维持无血清培养基性能的稳定,适用于干细胞的规模化扩增和临床应用。

#### [0063] 基础培养基

[0064] 在一些实施方式中,本发明中使用的基础培养基可以是本领域公知的基础培养基,只要不妨碍干细胞的增殖则没有特别限定。一般可以选择如下一些公知的基础培养基,例如Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 或组成相同、等同或基本相似的培养基(可获自Thermo Fisher Scientific,STEMCELL Technologies,GE Life Sciences,FUJIFILM Irvine Scientific,Zen-Bio,ATCC,ScienCell Research Laboratories),DMEM/F12(可获自Zen-Bio,Thermo Fisher Scientific,STEMCELL Technologies,GE Life Sciences,FUJIFILM Irvine Scientific), $\alpha$ -MEM(可获自Thermo Fisher Scientific,STEMCELL Technologies,GE Life Sciences,FUJIFILM Irvine Scientific),IMDM(可获自Thermo Fisher Scientific,STEMCELL Technologies,GE Life Sciences,ScienCell Research Laboratories,ATCC,FUJIFILM Irvine Scientific),mTesR(可获自STEMCELL Technologies),E8培养基等。

[0065] 本发明中,“无血清培养基”为在上述基础培养基中添加血清替代物而成的完整的培养基。

#### [0066] 血清替代物

[0067] 本发明中使用的血清替代物用以替代重要的常用的血清成分或血液制品,例如胎牛血清FBS、人血清、脐血清、富血小板血浆、血小板裂解物等。在本发明中使用的血清替代物可以含有本身公知的添加物,只要不妨碍干细胞的增殖则没有特别限定,优选在本身公知的浓度范围内含有各添加物。血清替代物可以列举如下:

#### [0068] 1) 白蛋白

[0069] 包括人血清白蛋白(HSA,1~100mg/mL,可以为从人血清中提取的人血清白蛋白或重组人血清白蛋白)、牛血清白蛋白(BSA,1~100mg/mL,可以为从牛血清中提取的牛血清白蛋白或重组牛血清白蛋白)以及白蛋白相关蛋白等中的一种或多种。白蛋白相关蛋白例如但不限于视网醇结合蛋白、 $\alpha$ -2-糖蛋白、甲状腺素运载蛋白、血红素结合球蛋白 $\alpha$ 、角蛋白前驱物等。

#### [0070] 2) 生长因子

[0071] 包括不含动物成分的重组人EGF【1~100ng/mL,重组EGF是6.2kDa的球状蛋白,含有53个氨基酸残基,包括3个分子内二硫键】或重组人EGF的合成肽(1~100ng/mL,合成肽的氨基酸序列可以为Asp-Val-Val-Asp-Ala-Asp-Glu-Tyr-Leu-Ile-Pro-Gln或者为Cys-(Acm)-Met-His-Ile-Glu-Ser-Leu-Asp-Ser-Tyr-Thr-Cys(Acm))、重组人bFGF【1~100ng/mL,重组人bFGF呈碱性,是由146个氨基酸残基组成的16.4kDa蛋白质】或重组人bFGF的合成肽(1~100ng/mL,合成肽段的氨基酸序列可以为Lys-Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu或者为Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Pro-Pro-Gly-His-Phe-Lys-Asp-Pro-Lys-Arg-Leu-Tyr)、重组人VEGF【1~100ng/mL,重组人VEGF是38.2kDa,二硫键连接的同型二聚体蛋白,由两条165个氨基酸的多肽链组成】或重组人VEGF的合成肽(1~100ng/mL,合成肽的氨基酸序列可以为Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg或者为Cys-7Ahp-QIMRIKPHQHIGETS-NH<sub>2</sub>)、重组人IGF【1~100ng/mL,重组人IGF-I和IGF-II是分别含有70和67个氨基酸和3个分子内二硫键的球状蛋白质,分子量为7.6kDa】或重组人IGF的合成肽(1~100ng/mL,合成肽的氨基酸序列可以为Tyr-Phe-Asn-Lys-Pro-Thr-Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr或者为Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-

Gln-Thr或者为Nap-FFG-GYGSSRRAPQT或者为Ala-Leu-Leu-Glu-Thr-Tyr-Cys-Ala-Thr-Pro-Ala-Lys-Ser-Glu)、重组人PDGF-AA/BB【1~100ng/mL,其中,重组人PDGF-AA是28.5kDa二硫键连接的两条A链同源二聚体,总共250个氨基酸;重组人PDGF-BB是两个β链的24.3kDa二硫键连接的同型二聚体,总共218个氨基酸】或重组人PDGF-AA/BB的合成肽(1~100ng/mL,重组人PDGF-BB合成肽的氨基酸序列可以为Cys-Ser-Arg-Asn-Leu-Ile-Asp-Cys-OH(S-S BONDED))、重组人TGF-β1【1~50ng/mL,重组人TGF-β1是25.0kDa蛋白质,由通过单个二硫键连接的两条相同的112个氨基酸多肽链组成】或重组人TGF-β1的合成肽(1~50ng/mL,合成肽的氨基酸序列可以为KVLALYNK-NH<sub>2</sub>)。

[0072] 在本申请的无血清培养基中,所含有的生长因子可以是上述生长因子中的一种或者多种的组合。

[0073] 3) 粘附因子

[0074] 包括重组人纤连蛋白(0.1~20μg/mL)或重组人纤连蛋白合成肽(0.1~20μg/mL,合成肽的氨基酸序列可以为Trp-Gln-Pro-Pro-Arg-Ala-Arg-Ile)、重组人层粘连蛋白(0.1~20μg/mL)或重组人层粘连蛋白合成肽(0.1~20μg/mL)、重组人玻连蛋白(0.1~20μg/mL)或重组人玻连蛋白合成肽(0.1~20μg/mL)、重组人胎球蛋白(100~2000μg/mL)或重组人胎球蛋白合成肽(100~2000μg/mL)、MaxGel™ECM等中的一种或多种。

[0075] 4) 激素

[0076] 包括重组人胰岛素(0.1~20μg/mL)或重组人胰岛素的合成肽(0.1~20μg/mL,其中,A chain的氨基酸序列可以为GIVEQCCTSICSLYQLENYCN,B chain的氨基酸序列可以为FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT)、无动物源性成分的皮质醇溶液(1~100nM)、皮质酮(1~100nM)、孕酮(1~100nM)、黄体酮(1~100nM)、氢化可的松(1~100nM)、低塞米松(0.1~10μM)、β-雌二醇(1~100nM)、三碘甲状腺原氨酸(1~100nM)中的一种或多种。

[0077] 5) 转运蛋白

[0078] 包括人脱铁转铁蛋白(0.5~20μg/mL)、人全铁转铁蛋白(0.5~20μg/mL)、ITS液体培养基添加剂(100x)等中的一种或多种。

[0079] 6) 多胺类

[0080] 包括腐胺(1~100μM)、乙醇胺(1~100μM)等中的一种或多种。

[0081] 7) 脂类

[0082] 包括脂肪酸添加剂(100~300μg/L)、化学成分明确的脂质浓缩物(0.1~1.0%,v/v)、胆固醇(100~300μg/L)、亚油酸(1~20μg/L)、油酸(1~20μg/L)、亚麻酸(1~20μg/L)等中的一种或多种。

[0083] 8) 矿物质

[0084] 包括亚硒酸钠(1~50ng/mL)、3,3',5-三碘-L-甲状腺原氨酸钠盐(1~50ng/mL)、丙酮酸钠(1~50ng/mL)等中的一种或多种。

[0085] 9) 糖类

[0086] 包括葡萄糖(1~50mM)、肝素(0.1~20μg/mL)、半乳糖(1~50mM)、硫酸软骨素(1~50mM)等中的一种或多种。

[0087] 10) 有机酸

[0088] 包括丙酮酸(1~100mg/L)、乳酸(1~100mg/L)等中的一种或多种。

[0089] 11) 氨基酸

[0090] 包括L-谷氨酰胺(100~300mg/L)、左旋肉碱(100~300mg/L)、腺嘌呤(100~300mg/L)、鸟嘌呤(100~300mg/L)、尿嘧啶(100~300mg/L)、胸腺嘧啶(100~300mg/L)、胞嘧啶(100~300mg/L)、核糖(100~300mg/L)、脱氧核糖(100~300mg/L)、MEM非必需氨基酸溶液(NEAA,100x)等中的一种或多种。

[0091] 12) 还原剂

[0092] 包括还原型谷胱甘肽(1~200 $\mu$ M)、2-巯基醇(1~200 $\mu$ M)、过氧化氢酶(1~200 $\mu$ M)、超氧化物歧化酶(1~200 $\mu$ M)等中的一种或多种。

[0093] 13) 维生素

[0094] 包括维生素A、B、C、D、E、K各族(1~200 $\mu$ M),例如,维生素A、B1、B2、B3、B5、B6、B7、B9、B12、C、D2、D3、E、K1、K2、K3、K4等中的一种或多种。

[0095] 14) 微量元素

[0096] 包括铁(500~1500 $\mu$ g/L)、铜(0.1~20 $\mu$ g/L)、锌(500~1500 $\mu$ g/L)、钴(0.1~20 $\mu$ g/L)、锰(0.1~20 $\mu$ g/L)、铬(0.1~20 $\mu$ g/L)、硒(0.1~20 $\mu$ g/L)、碘(0.1~20 $\mu$ g/L)、镍(0.1~20 $\mu$ g/L)、氟(0.1~20 $\mu$ g/L)、钼(0.1~20 $\mu$ g/L)、银(0.1~20 $\mu$ g/L)、锡(0.1~20 $\mu$ g/L)、铝(0.1~20 $\mu$ g/L)、钡(0.1~20 $\mu$ g/L)、硼(0.1~20 $\mu$ g/L)、铷(0.1~20 $\mu$ g/L)等中的一种或多种。

[0097] 15) 抗生素

[0098] 包括链霉素(50~100 $\mu$ g/mL)、青霉素(50~100IU/mL)、庆大霉素(50~100 $\mu$ g/mL)等中的一种或多种。

[0099] 16) 缓冲剂

[0100] 包括4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES,10-50mM)、L-磷酸甘油二钠盐水合物(10-50mM)中的一种或多种。

[0101] 17) pH值调节剂

[0102] 包括酚红、磷酸二氢钠、磷酸三钠、焦磷酸钠、焦磷酸钾、碳酸氢钠、氢氧化钾、氢氧化铵、三乙醇胺、柠檬酸等中的一种或多种。

[0103] 白蛋白代替物

[0104] 在本发明中,白蛋白代替物是指添加于无血清培养基中用于代替白蛋白的物质,其可能通过发挥与白蛋白相似的功能从而使得无血清培养基中减少白蛋白的添加量或无需添加白蛋白也能获得同样的甚至更优的培养成绩。在本申请一些优选的实施方式中,白蛋白代替物可以为聚乙烯醇或B27细胞培养添加剂,优选为聚乙烯醇。

[0105] 其中,聚乙烯醇(polyvinyl alcohol,PVA)是一种分子链中含有大量羟基基团的高分子水溶性聚合物,具有强的水溶性及亲水性,分子式为 $[-CH_2CH(OH)-]_n$ ,其中n是包含在100至10000之间的整数。PVA根据其聚合度可分为低聚合度(粘度为 $5 \times 10^{-3}$ Pa.S)、中聚合度(粘度为 $20 \sim 30 \times 10^{-3}$ Pa.S)和高聚合度(粘度为 $40 \sim 50 \times 10^{-3}$ Pa.S)三种;根据水解度分为82%、86%、88%、90%、97%、98%、99%、100%等,其中大于98%者称为完全水解型,其余为部分水解型。在本申请一些优选的实施方式中,所使用的聚乙烯醇具有10000至100000Da的分子量,具有 $40 \sim 50 \times 10^{-3}$ Pa.S的聚合度,具有75%~90%的水解度。在本申请一些优选的实施方式中,无血清培养基中聚乙烯醇的终浓度为1~10mg/mL。在本申请一些优选的实施方式中,所使用的PVA是Selvol™ PVA203。

[0106] 在本申请一些优选的实施方式中,B27细胞培养添加剂购自Gibco,货号为17504-044。

[0107] 生长因子合成肽、粘附因子合成肽

[0108] 在本申请中,生长因子或粘附因子合成肽包括:1)根据生长因子或粘附因子自身的有效片段或片段组合的氨基酸序列;或,2)利用化学合成的方法制得与生长因子或粘附因子具有相同氨基酸序列的多肽或寡肽,或,3)细胞因子或粘附因子的模拟肽,这些模拟肽可以是利用已知细胞因子或粘附因子的受体从肽库内筛选获得,其氨基酸序列与其相应的细胞因子或粘附因子的氨基酸序列不同,但具有细胞因子或粘附因子的活性,并且具有相对分子质量小的优点。

[0109] 其中,关于生长因子或粘附因子有效片段,可以根据已有文献报道找到对应氨基酸序列,然后通过设计引物进行合成或委托生物公司合成;文献未报道的,可以通过蛋白质酶解,肽谱分析的方法,寻找到最优化肽段,然后通过设计引物进行合成或委托生物公司合成。同理,细胞因子或粘附因子模拟肽可根据已知的细胞因子或粘附因子模拟肽氨基酸序列委托生物公司合成。

[0110] 生长因子合成肽列举如下:重组人EGF的合成肽(氨基酸序列可以为Asp-Val-Val-Asp-Ala-Asp-Glu-Tyr-Leu-Ile-Pro-Gln或者为Cys-(Acm)-Met-His-Ile-Glu-Ser-Leu-Asp-Ser-Tyr-Thr-Cys(Acm))、重组人bFGF的合成肽(氨基酸序列可以为Lys-Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu或者为Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Asp-Gly-Gly-Ser-Gly-Ala-Phe-Pro-Pro-Gly-His-Phe-Lys-Asp-Pro-Lys-Arg-Leu-Tyr)、重组人VEGF的合成肽(氨基酸序列可以为Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg或者为Cys-7Ahp-QIMRIKPHQHIGETS-NH<sub>2</sub>)、重组人IGF的合成肽(氨基酸序列可以为Tyr-Phe-Asn-Lys-Pro-Thr-Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr或者为Gly-Tyr-Gly-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Ala-Pro-Gln-Thr或者为Nap-FFG-GYGS SSRRAPQT或者为Ala-Leu-Leu-Glu-Thr-Tyr-Cys-Ala-Thr-Pro-Ala-Lys-Ser-Glu)、重组人PDGF-BB合成肽(氨基酸序列可以为Cys-Ser-Arg-Asn-Leu-Ile-Asp-Cys-OH(S-S BONDED))、重组人TGF-β1的合成肽(氨基酸序列可以为KVLALYLNK-NH<sub>2</sub>)等。

[0111] 粘附因子合成肽列举如下:重组人纤连蛋白的合成肽(氨基酸序列可以为Trp-Gln-Pro-Pro-Arg-Ala-Arg-Ile)、重组人层粘连蛋白的合成肽、重组人玻连蛋白的合成肽、重组人胎球蛋白的合成肽等。

[0112] 在本申请一些优选的实施方式中,培养基中添加本申请上述生长因子或粘附因子合成肽的一种或多种,从而减少培养基中生长因子或粘附因子的添加量。在本申请另一些优选的实施方式中,使用等摩尔浓度合成肽替换生长因子或粘附因子,使得培养基中无需添加生长因子或粘附因子。

[0113] 在培养基中使用天然的生长因子或粘附因子至少具有以下缺点:1)需要应用动物载体进行生产,存在伦理学和疾病传播等问题,且产量较低,生产成本较高;2)分子量大,结构复杂,作用多样化,难以控制;3)稳定性差,易降解失活,对培养基使用环境要求较高。以生长因子或粘附因子的合成肽代替生长因子或粘附因子至少具有以下优点:1)分子量小,作用单一,可进行根据稳定性和性能要求进行结构调整;2)生产成本较低,可直接进行大量合成制备,有效降低了培养基的制造成本;3)不需要借助动物载体进行生产,避免了在无血清培养基中引入异源成分,使得培养基成分更加明确。

## 具体实施方式

[0114] 本发明以举例的方式来原因说明本发明是如何实现的,这些仅仅是在本发明精髓下的有限列举,并不对本发明构成任何限制。

### [0115] 实施例1

[0116] 本实例中,配置二组培养基,分别为无血清培养基(SFM)和对照组培养基(FBS)。其中对照组培养基为DMEM低糖培养基加入10%胎牛血清。培养的细胞为人脂肪干细胞。

[0117] 以下为详细的实验及检测步骤:

[0118] 1、培养基的配置(配置的时候不需要包被)

[0119] 本实施例的无血清培养基组分如下:每500mL的DMEM低糖基础培养基(GIBCO)中加入添加下列组分,并使得添加组分在该无血清培养基中的浓度为:

[0120] 重组人血清白蛋白 20mg/mL

[0121] 重组人PDGF-AA 20ng/mL

[0122] 重组人PDGF-BB 20ng/mL

[0123] 重组人bFGF 5ng/mL

[0124] 重组人TGF- $\beta$ 1 5ng/mL

[0125] 重组人EGF 20ng/mL

[0126] 重组IGF 20ng/mL

[0127] 重组人纤粘蛋白 5 $\mu$ g/mL

[0128] 肝素 5 $\mu$ g/mL

[0129] 脂质浓缩物 0.1% (v/v)

[0130] 重组人胰岛素 2 $\mu$ g/mL

[0131] 转铁蛋白 1 $\mu$ g/mL

[0132] 亚硒酸钠 1ng/mL

[0133] 半乳糖 20mM

[0134] L-谷氨酰胺 292mg/L

[0135] 腐胺 50 $\mu$ M

[0136] 黄体酮 20nM

[0137] 氢化可的松 100nM

[0138] 维生素C 200 $\mu$ M

[0139] 维生素A 50 $\mu$ M

[0140] 碳酸氢钠 20.5mM

[0141] 青霉素(10000U) 5mmol

[0142] 链霉素(10000U) 5mmol

[0143] 对照组培养基:每500mL的DMEM低糖培养基(GIBCO)中添加55mL的胎牛血清、5mmol的10000U的青霉素和10000U的链霉素。

[0144] 2、培养细胞的处理

[0145] 实验组:将从脂肪组织得到的人脂肪干细胞接种至10cm<sup>2</sup>培养皿中,以5000cell/cm<sup>2</sup>的细胞密度接种,培养基使用无血清培养基,两天换一次液。培养5天后,进行消化传代,在不同代次检测细胞形态、增殖、细胞表型以及三系分化能力。

[0146] 对照组:培养方法和检测方法与实验组一致,培养基为含血清的培养基。

[0147] 3、实验结果分析

[0148] 1) 细胞形态学观察

[0149] 在上述培养细胞的处理过程中,用荧光显微镜观察并记录实验组和对照组中的人脂肪干细胞的形态。请参阅图1,其依序分别是本实施例中的实验组和对照组中的人脂肪干细胞在荧光显微镜下的细胞形态,从图可以看出,人脂肪干细胞在无血清培养环境中细胞面积更小,核质比增加。

[0150] 2) 细胞增殖情况。

[0151] 细胞计数使用台盼蓝计数法,首先将消化得到的细胞进行离心,制备单细胞悬液,并作适当稀释( $10^6$ 细胞/mL),取1mL细胞悬液移入EP中,加0.1mL 0.4%台盼蓝溶液,混匀,加入血细胞计数板,观察计数。如果细胞膜完整,细胞不为台盼蓝染色,则为正常细胞;如果细胞膜不完整、破裂,台盼蓝染料进入细胞,细胞变蓝,即为坏死细胞。

[0152] 该计数方法为:(四大格细胞总数/4)  $\times 10^4 \times$  稀释倍数 = 细胞悬液细胞数/mL

[0153] 利用细胞计数法绘制生长曲线,在生长曲线上细胞数量增加1倍所需时间即为PDT,计算公式:按细胞倍增时间公式计算细胞群体倍增时间。

$$[0154] \quad \text{PTD} = \frac{t \times \log 2}{\log N_t - \log N_0}$$

[0155] 其中,t:培养时间; $N_0$ :接种后起始细胞数; $N_t$ :培养t小时后的细胞数。

[0156] 请参阅图2,其是本实施例的实验组和对照组的细胞生长曲线图,可以看出,在P5代次以前,实验组相较于对照组显现出更快的细胞增殖能力。

[0157] 3) 细胞表型

[0158] 收集培养得到的人脂肪干细胞,用CD73、CD90、CD105、CD34和CD45抗体进行孵育,通过流式细胞仪进行鉴定检测。

[0159] 请参阅图3,其是本实施例的实验组和对照组的细胞表型检测结果图,可以看出,实验组培养的人脂肪干细胞CD73、CD90和CD105阳性表达物达97%以上,不表达CD34和CD45阴性表达物,符合国际细胞治疗协会制定的有关间充质基质细胞的标准定义。

[0160] 4) 干细胞功能

[0161] 三系分化能力鉴定:将培养得到的人脂肪干细胞分别进行成脂肪、骨和软骨诱导分化。

[0162] 脂肪系分化诱导过程:将人脂肪干细胞以100个细胞/ $\text{cm}^2$ 接种于M孔培养板中,利用脂肪诱导培养基(溶剂:H-DMEM,添加:10%FBS,100U/mL青霉素,100U/mL链霉素,0.5mM 3-异丁基-1-甲基 (IBMX),10 $\mu$ M胰岛素,0.5 $\mu$ M地塞米松)进行诱导14天。

[0163] 成脂肪分化鉴定方法:油红染色,脂滴着色红。

[0164] 骨系分化诱导过程:将人脂肪干细胞以100个细胞/ $\text{cm}^2$ 接种于M孔培养板中,利用骨诱导培养基(溶剂:10%FBS,100U/mL青霉素,100U/mL链霉素,50 $\mu$ M抗坏血酸,10mM $\beta$ -甘油磷酸钠,0.1 $\mu$ M地塞米松)进行诱导14天。成骨分化鉴定结果:ALP碱性磷酸酶表达阳性。

[0165] 软骨系分化鉴定:细胞团块三维软骨诱导模型:将软骨干细胞胰酶消化后以 $2 \times 10^5$ 个细胞/0.5ml软骨诱导液/离心管分装,300g离心5分钟。直立放入培养箱,进行三维软骨诱导,隔2天换液一次,21天后收集样本。软骨诱导液配方:L-DMEM+10ng/mL TGF- $\beta$ 1,0.1 $\mu$

M地塞米松,50mg/mL维生素C。

[0166] 成软骨分化鉴定方法:组织学包埋固定后,进行番红-0染色。细胞团块的基质呈红色,代表有糖胺聚糖分泌,软骨诱导成功。

[0167] 请参阅图4,其是本实施例的实验组和对照组的三系分化图,可见实验组培养的人脂肪干细胞具有更优的成骨、软骨分化能力。

[0168] 实施例2

[0169] 本实例中,配置二组培养基,分别为无血清培养基(SFM)和对照组培养基(FBS)。其中对照组培养基为DMEM低糖培养基加入10%胎牛血清。培养的细胞为人脂肪干细胞。

[0170] 以下为详细的实验及检测步骤:

[0171] 1、培养基的配置

[0172] 无血清培养基:每500mL的DMEM低糖培养基(GIBCO)中加入添加组分,并使得添加组分在该无血清培养基中的浓度为:

[0173] 聚乙烯醇水解率 75~90%

[0174] PVC 10mg/mL

[0175] PDGF合成肽 20ng/mL

[0176] 重组人bFGF 5ng/mL

[0177] 重组人TGF- $\beta$ 1 5ng/mL

[0178] 重组人EGF 20ng/mL

[0179] 重组IGF 20ng/mL

[0180] 纤粘蛋白FN合成肽 5 $\mu$ g/mL

[0181] 肝素 5 $\mu$ g/mL

[0182] 脂质浓缩物 0.1% (v/v)

[0183] 重组胰岛素 2 $\mu$ g/mL

[0184] 转铁蛋白 1 $\mu$ g/mL

[0185] 亚硒酸钠 1ng/mL

[0186] 半乳糖 20mM

[0187] L-谷氨酰胺 292mg/L

[0188] 腐胺 50 $\mu$ M

[0189] 黄体酮 20nM

[0190] 氢化可的松 100nM

[0191] 维生素C 200 $\mu$ M

[0192] 维生素A 50 $\mu$ M

[0193] 碳酸氢钠 20.5mM

[0194] 青霉素(10000U) 5mmol

[0195] 链霉素(10000U) 5mmol

[0196] 对照组培养基:每500mL的DMEM低糖培养基(GIBCO)中添加55mL的胎牛血清、5mmol的10000U的青霉素和10000U的链霉素。

[0197] 细胞培养方法与实例1一致,实验发现本实施例的培养基相较于对照组和实施例1的培养基显现出了更快的细胞增殖能力,说明聚乙烯醇完全可以代替白蛋白,所制备的培

培养基培养成绩良好。

[0198] 实施例3

[0199] 细胞为人脐带干细胞,细胞培养方法一致。

[0200] 无血清培养基:每500mL的DMEM/F12 (GIBCO) 中加入添加组分,并使得添加组分在该无血清培养基中的浓度为:

[0201] 聚乙烯醇水解率75~90%

[0202] PVC 10mg/mL

[0203] 重组人PDGF-AA 20ng/mL

[0204] 重组人FGF 5ng/mL

[0205] 重组人TGF- $\beta$ 1 5ng/mL

[0206] 重组人EGF 20ng/mL

[0207] 重组人IGF 20ng/mL

[0208] 重组人纤粘蛋白FN 5 $\mu$ g/mL

[0209] 肝素 5 $\mu$ g/mL

[0210] 脂质浓缩物 0.1% (v/v)

[0211] 重组胰岛素 2 $\mu$ g/mL

[0212] 转铁蛋白 1 $\mu$ g/mL

[0213] 亚硒酸钠 1ng/mL

[0214] 半乳糖 20mM

[0215] L-谷氨酰胺 292mg/L

[0216] 腐胺 50 $\mu$ M

[0217] 黄体酮 20nM

[0218] 氢化可的松 100nM

[0219] 维生素C 200 $\mu$ M

[0220] 维生素A 50 $\mu$ M

[0221] 碳酸氢钠 20.5mM

[0222] 青霉素(10000U) 5mmol

[0223] 链霉素(10000U) 5mmol

[0224] 以FN合成肽、bFGF合成肽和PDGF-AA合成肽分别替换上述培养基中的FN、bFGF和PDGF获得不同的培养基进行人脂肪干细胞的培养,细胞培养方法与实例1一致。其中,以培养基总体积计,分别以2 $\mu$ g/mL、5 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL FN合成肽代替培养基中的人重组纤粘蛋白FN,分别以5 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、20 $\mu$ g/mL bFGF合成肽代替生长因子bFGF,分别以5 $\mu$ g/mL、10 $\mu$ g/mL、20 $\mu$ g/mL PDGF-AA合成肽代替生长因子PDGF-AA。

[0225] 图5是以不同浓度FN合成肽、bFGF合成肽和PDGF合成肽分别替换FN、bFGF和PDGF后人脂肪干细胞的增殖曲线图(第5天)。结果可见,相较于含FN、bFGF和PDGF的无血清培养组,含FN合成肽、bFGF合成肽和PDGF合成肽的无血清培养组更能促进细胞增殖。

[0226] 实施例4

[0227] 本实施例的无血清培养基含重组人血清白蛋白10mg/mL,含聚乙烯醇1mg/mL,其他组分及组分浓度同实施例1。

[0228] 实施例5

[0229] 本实施例的无血清培养基含重组人血清白蛋白5mg/mL,含聚乙烯醇5mg/mL,其他组分及组分浓度同实施例1。

[0230] 实施例6

[0231] 本实施例的无血清培养基组分同实施例1,不同的是以聚乙烯醇代替重组人血清白蛋白,培养基中聚乙烯醇终浓度为10mg/mL。

[0232] 实施例7

[0233] 本实施例的无血清培养基,每500mL的DMEM低糖基础培养基中加入添加组分,并使得添加组分在该无血清培养基中的浓度为:

[0234] 重组人血清白蛋白20mg/mL、重组人PDGF-AA 5ng/mL、重组人PDGF-AA合成肽1ng/mL、重组人PDGF-BB 5ng/mL、重组人PDGF-BB合成肽1ng/mL、重组人bFGF 3ng/mL、重组人bFGF合成肽1ng/mL、重组人TGF- $\beta$ 1 3ng/mL、重组人TGF- $\beta$ 1合成肽1ng/mL、重组人EGF5ng/mL、重组人EGF合成肽1ng/mL、重组IGF 3ng/mL、重组IGF合成肽1ng/mL、重组人纤粘蛋白5 $\mu$ g/mL、肝素5 $\mu$ g/mL、脂质浓缩物0.1% (v/v)、重组人胰岛素2 $\mu$ g/mL、转铁蛋白1 $\mu$ g/mL、亚硒酸钠1ng/mL、半乳糖20mM、L-谷氨酰胺292mg/L、腐胺50 $\mu$ M、黄体酮20nM、氢化可的松100nM、维生素C 200 $\mu$ M、维生素A 50 $\mu$ M、碳酸氢钠20.5mM、青霉素(10000U) 5mmol、链霉素(10000U) 5mmol。

[0235] 与实施例1相比,本实施例的无血清培养基中生长因子PDGF-AA、PDGF-BB、bFGF、TGF- $\beta$ 1、EGF和IGF的浓度降低,并添加了相应的生长因子合成肽,其中,各生长因子合成肽的浓度为1ng/mL,其他组分同实施例1。

[0236] 实施例8

[0237] 本实施例的无血清培养基,每500mL的DMEM低糖基础培养基中加入添加组分,并使得添加组分在该无血清培养基中的浓度为:

[0238] 重组人血清白蛋白20mg/mL、重组人PDGF-AA 1ng/mL、重组人PDGF-AA合成肽20ng/mL、重组人PDGF-BB 1ng/mL、重组人PDGF-BB合成肽20ng/mL、重组人bFGF 1ng/mL、重组人bFGF合成肽20ng/mL、重组人TGF- $\beta$ 1 1ng/mL、重组人TGF- $\beta$ 1合成肽20ng/mL、重组人EGF1ng/mL、重组人EGF合成肽20ng/mL、重组IGF 1ng/mL、重组IGF合成肽20ng/mL、重组人纤粘蛋白5 $\mu$ g/mL、肝素5 $\mu$ g/mL、脂质浓缩物0.1% (v/v)、重组人胰岛素2 $\mu$ g/mL、转铁蛋白1 $\mu$ g/mL、亚硒酸钠1ng/mL、半乳糖20mM、L-谷氨酰胺292mg/L、腐胺50 $\mu$ M、黄体酮20nM、氢化可的松100nM、维生素C 200 $\mu$ M、维生素A 50 $\mu$ M、碳酸氢钠20.5mM、青霉素(10000U) 5mmol、链霉素(10000U) 5mmol。

[0239] 与实施例1相比,本实施例的无血清培养基中生长因子PDGF-AA、PDGF-BB、bFGF、TGF- $\beta$ 1、EGF和IGF的浓度降低,并添加了相应的生长因子合成肽,其中,各生长因子合成肽的浓度为20ng/mL,其他组分同实施例1。

[0240] 实施例9

[0241] 本实施例的无血清培养基中分别以PDGF-AA合成肽、PDGF-BB合成肽、bFGF合成肽、TGF- $\beta$ 1合成肽、EGF合成肽和IGF合成肽代替生长因子PDGF-AA、PDGF-BB、bFGF、TGF- $\beta$ 1、EGF和IGF,其中,PDGF-AA合成肽、PDGF-BB合成肽、bFGF合成肽、EGF合成肽和IGF合成肽的浓度为100ng/mL,TGF- $\beta$ 1合成肽的浓度为50ng/mL,其他组分同实施例1。

## [0242] 实施例10

[0243] 本实施例的无血清培养基含重组人纤粘蛋白1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,含重组人纤粘蛋白合成肽5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,其他组分及组分浓度同实施例1。

## [0244] 实施例11

[0245] 本实施例的无血清培养基组分同实施例1,不同的是以重组人纤粘蛋白合成肽代替重组人纤粘蛋白,培养基中重组人纤粘蛋白合成肽的浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## [0246] 实施例12

[0247] 本实施例的无血清培养基组分同实施例1,不同的是分别以PDGF-AA合成肽、PDGF-BB合成肽、bFGF合成肽、TGF- $\beta$ 1合成肽、EGF合成肽和IGF合成肽代替生长因子PDGF-AA、PDGF-BB、bFGF、TGF- $\beta$ 1、EGF和IGF,其中,PDGF-AA合成肽、PDGF-BB合成肽、bFGF合成肽、EGF合成肽和IGF合成肽的浓度为100 $\text{ng}/\text{mL}$ ,TGF- $\beta$ 1合成肽的浓度为50 $\text{ng}/\text{mL}$ ,并以重组人纤粘蛋白合成肽代替重组人纤粘蛋白,其中,重组人纤粘蛋白合成肽的浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

## [0248] 实施例13

[0249] 本实施例的无血清培养基组分同实施例12,不同的是以聚乙烯醇代替重组人血清白蛋白,培养基中聚乙烯醇终浓度为10 $\text{mg}/\text{mL}$ 。

## [0250] 实施例14

[0251] 本实施例的无血清培养基组分同实施例13,不同的是还添加有人重组层粘连蛋白合成肽20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和人重组玻连蛋白合成肽20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0252] 上述实施例无血清培养基的培养效果检测:

[0253] 取汇合度为80%的人脂肪干细胞接种至10 $\text{cm}^2$ 培养皿中,以5000 $\text{cell}/\text{cm}^2$ 的细胞密度接种,分别使用上述实施例1、2、4~14的无血清培养基以及血清培养基,两天换一次液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 的培养箱中培养。培养5天后,用PBS冲洗2遍,往细胞中加入0.015 $\text{mL}/\text{cm}^2$ 的0.25%的胰酶和0.04%EDTA消化2分钟,用10倍于消化液的DMEM-F12终止酶解,然后用0.4%台盼蓝染色,于显微镜下计算活细胞数及死细胞数,计算细胞活率,细胞活率=活细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ ,检测结果如下表所示:

[0254]

实验组别	细胞数量	细胞活率
实施例1	3.8 $\times 10^6$ 个	87.2%
实施例2	7.3 $\times 10^6$ 个	96.1%
实施例4	8.1 $\times 10^6$ 个	97.8%
实施例5	8.5 $\times 10^6$ 个	97.3%
实施例6	8.3 $\times 10^6$ 个	98.0%
实施例7	7.9 $\times 10^6$ 个	98.5%
实施例8	9.0 $\times 10^6$ 个	97.6%
实施例9	8.4 $\times 10^6$ 个	96.9%
实施例10	8.7 $\times 10^6$ 个	96.7%
实施例11	9.2 $\times 10^6$ 个	97.3%
实施例12	8.7 $\times 10^6$ 个	98.1%
实施例13	9.3 $\times 10^6$ 个	98.4%
实施例14	8.5 $\times 10^6$ 个	97.5%

血清培养基	$8.9 \times 10^5$ 个	69.3%
-------	---------------------	-------

[0255] 实施例1与实施例4~6相比可知,使用聚乙烯醇部分代替重组人血清白蛋白或完全代替重组人血清白蛋白后所制备的无血清培养基的培养成绩不仅没有降低,而且效果明显优于实施例1,说明聚乙烯醇是一种能够代替培养基中白蛋白的有效代替物,通过在培养基中添加聚乙烯醇可以减少白蛋白的添加或无需添加白蛋白,有效解决了目前的高成本、高蛋白含量对无血清培养基应用水平的限制。聚乙烯醇是具有良好的水溶性的一种廉价的高分子物质,其和水分子之间存在较强的氢键,可能是由于聚乙烯醇能够对细胞膜表面的某些受体产生直接或间接的作用,从而为细胞的增殖提供了某种信号,具体的作用机理有待进一步研究。

[0256] 实施例1与实施例7~12相比可知,使用生长因子合成肽部分代替生长因子或完全代替生长因子,和使用粘附因子合成肽部分代替粘附因子或完全代替粘附因子,以及使用生长因子合成肽和粘附因子合成肽完全代替生长因子和粘附因子所制备的无血清培养基的培养成绩不仅没有降低,而且效果明显优于实施例1,说明生长因子合成肽和粘附因子合成肽能够完全代替生长因子和粘附因子在无血清培养基中发挥作用,有效解决了目前在无血清培养基中使用生长因子和粘附因子所具有的成本高、稳定性差的缺陷。

[0257] 实施例1与实施例13和14相比可知,使用聚乙烯醇完全代替白蛋白以及生长因子合成肽和粘附因子合成肽完全代替生长因子和粘附因子所制备的无血清培养基的培养成绩优良,能够用于培养获得大量干细胞。

[0258] 通过与血清培养基相比可知,本申请实施例的无血清培养基培养效果明显较好,并且有效避免了异源污染。

[0259] 进一步地,本发明小组发现使用本申请的无血清培养基进行间充质干细胞培养时,细胞能够保持良好的贴壁性,呈现出梭形的成纤维细胞形态,同时经多代培养后,细胞仍可保持正常状态,具有高扩增效率。并进一步进行细胞免疫表型发现CD29、CD73、CD90和CD105阳性表达物达95%以上,而CD14、CD34、CD45、CD79a和HLA-DR等阴性表达物检测显示在2%以下,达到了临床应用水平。

[0260] 综上所述,本申请通过调整干细胞体外扩增过程中所使用的培养基的添加剂以及添加含量,获得了一种能够提高干细胞在体外增殖中的活性,降低细胞的死亡率的无血清培养基,该培养基排除了血清中含有许多不确定物质(如不同的抗原、抗体、激素和细胞因子等)对于干细胞体外扩增的存活率以及细胞增殖过程的干扰,使得培养获得的干细胞能更好的应用于临床。

[0261] 以上描述仅为本申请的较佳实施例以及对所运用技术原理的说明。本领域技术人员应当理解,本申请中所涉及的发明范围,并不限于上述技术特征的特定组合而成的技术方案,同时也应涵盖在不脱离所述发明构思的情况下,由上述技术特征或其等同特征进行任意组合而形成的其它技术方案。例如上述特征与本申请中公开的(但不限于)具有类似功能的技术特征进行互相替换而形成的技术方案。

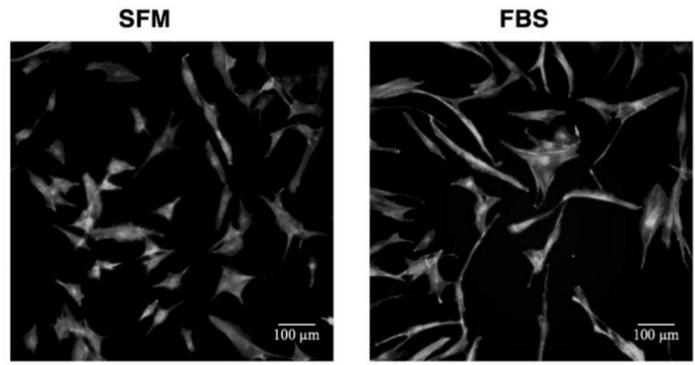


图1

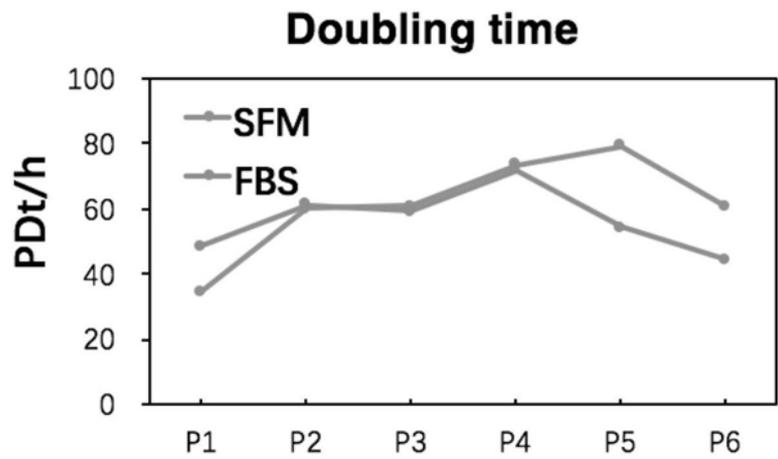


图2

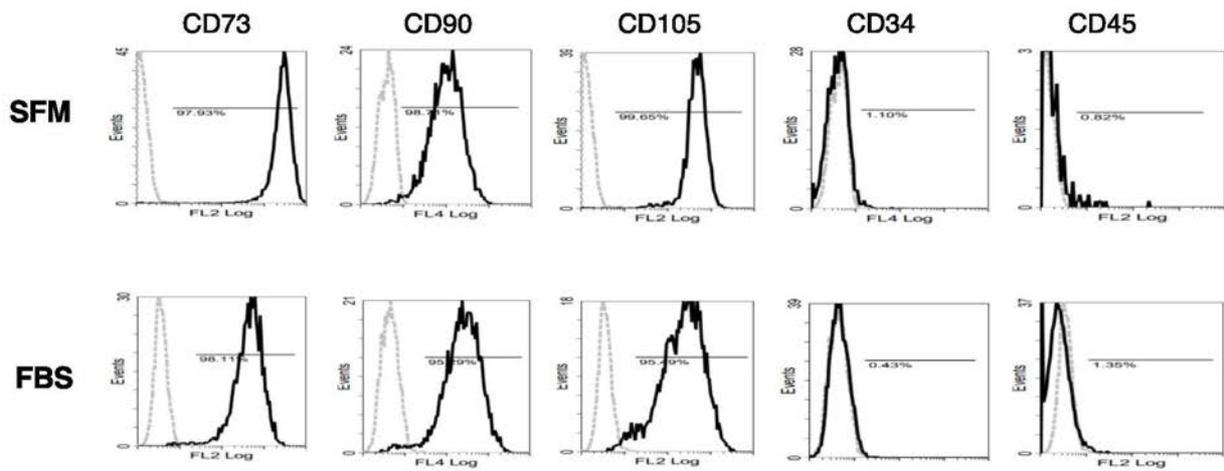


图3

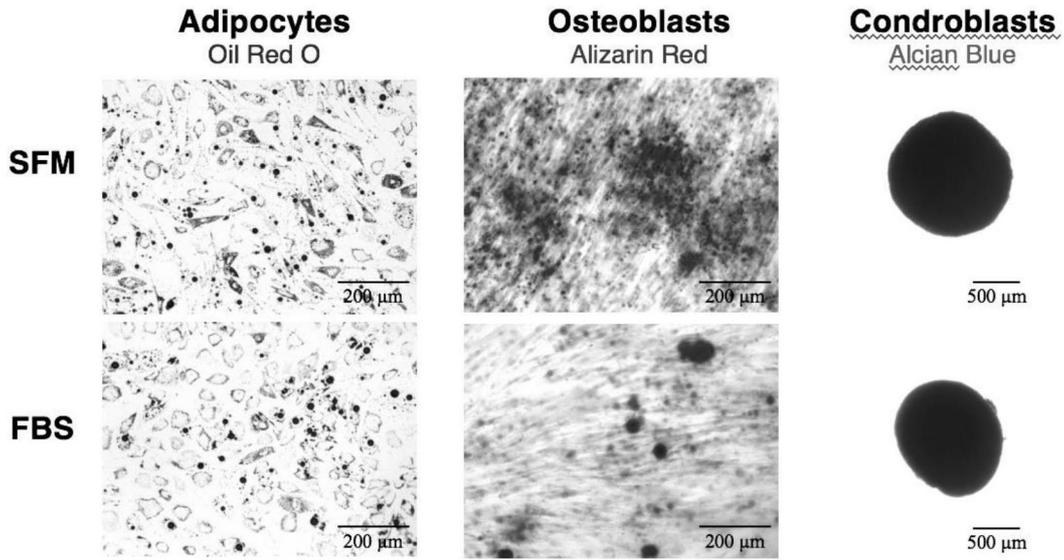


图4

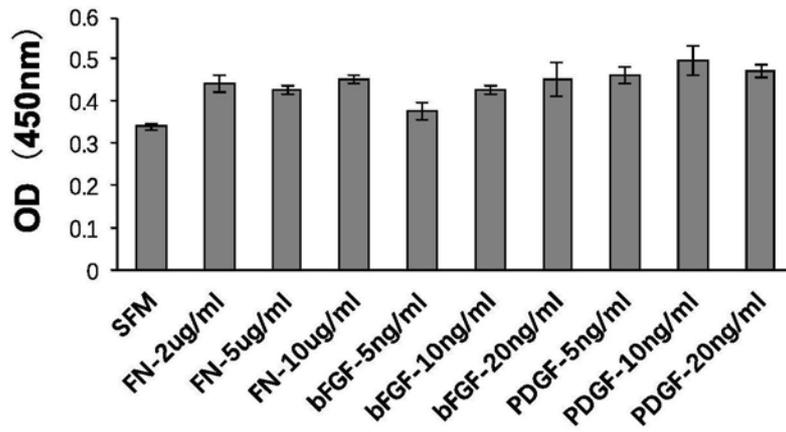


图5