



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102876630 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201210437524. 8

(22) 申请日 2012. 11. 05

(71) 申请人 东南大学

地址 211189 江苏省南京市江宁开发区东南  
大学路 2 号

(72) 发明人 孙博 肖忠党

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所  
(普通合伙) 32204

代理人 柏尚春

(51) Int. Cl.

C12N 5/0775(2010. 01)

C12N 5/0789(2010. 01)

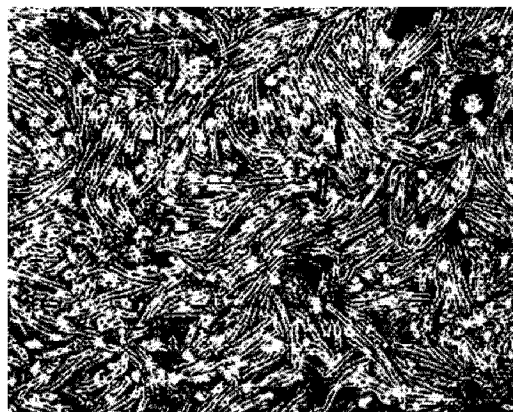
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

一种高效分离和扩增人脐带血间充质干细胞的方法

### (57) 摘要

本发明涉及对在细胞治疗中最为理想的脐带血间充质干细胞进行高效分离扩增的方法。已经证明脐带血中含有分化能力较高,免疫排斥反应较小的间充质干细胞。脐带血银行的建立为实现自体细胞移植提供基础。但是,由于脐带血中间充质干细胞含量极低( $1 \times 10^8$ 个单核细胞中仅含有 0.5-30 个),因此如何高效分离和扩增这些细胞成为了阻碍脐带血间充质干细胞向临床转化的难题。目前,多利用该细胞在培养皿的吸附能力,对脐带血间充质干细胞进行分离,但是成功率低,并且在扩增过程中难以保持干细胞特性。本发明包括利用蛋白成分对培养皿进行包被,配合添加多种生长因子的培养基,构建脐带血间充质干细胞扩增环境,实现了该细胞的高效扩增和分离。



1. 一种高效分离和扩增人脐带血间充质干细胞的方法,其特征在于该方法为:

a. 收集脐带血样品:所述脐带血样品自医院采集,或自脐带血库中获取的人脐带血样品,在无菌条件下获取正常或早产胎儿的脐带血,肝素抗凝;

b. 分离脐带血中单核细胞成分:所述脐带血血样品均应经过肝素抗凝,羟甲基纤维素裂解红细胞,密度梯度离心获取单核细胞成分之后进行接种;脐带血间充质干细胞的分离纯化过程在分娩后 24 小时内进行;

c. 将单核细胞成分接种于包被蛋白基质成分的培养皿:包被蛋白基质指层连蛋白和明胶蛋白按体积比 1:2 混合;

d. 分离间充质干细胞:细胞接种于上述包被的细胞培养板后,使用脐带血间充质干细胞培养基培养,及时除去未贴壁细胞并更换培养基,此时,脐带血间充质干细胞得到分离;

e. 培养和扩增间充质干细胞:继续使用脐带血间充质干细胞培养基培养,每 5-8 天换液一次,直至细胞为 80-95% 融合;细胞用胰酶进行消化,接种于一般培养板,使用脐带血间充质干细胞培养基继续培养,2-4 天换液一次,直至融合,并进行下一次传代,实现间充质干细胞的扩增。

2. 根据权利要求 1 所述的高效分离和扩增人脐带血间充质干细胞的方法,其特征在于其中所述脐带血间充质干细胞培养基其中包括: $\alpha$ -MEM, Pen-Strep, b-FGF, EGF, TGF- $\beta$ ; 其中, $\alpha$ -MEM 为  $\alpha$ -最小必需极限培养基;Pen-Strep 为青霉素-链霉素,b-FGF 为 b-成纤维细胞生长因子,EGF 为表皮细胞生长因子,TGF- $\beta$  为转化生长因子。

3. 根据权利要求 1 所述的高效分离和扩增人脐带血间充质干细胞的方法,其特征在于该方法包括:首先使用同体积  $\alpha$ -MEM 稀释抗凝过的脐带血,与 4-6g/L 的甲基纤维素按体积比 4:1 混合,静置 20-40 分钟,沉降红细胞。吸取上清,离心后,用 PBS 制成单细胞悬液,叠加到相对密度在 1-1.1 范围的淋巴细胞分离液上,在 2000-3000 转/分钟离心 15-30 分钟,取界面层,加 PBS 制成单细胞悬液,离心洗涤。将细胞加入用层连蛋白和明胶蛋白包被的细胞培养板上;细胞在  $\alpha$ -MEM 中培养,该培养基中含有 Pen-Strep, b-FGF, EGF, TGF- $\beta$  添加成分,细胞达到 80-95% 融合时,进行传代;传代时,使用普通培养皿,并在上述含有添加成分的培养基中进行细胞的扩增。

## 一种高效分离和扩增人脐带血间充质干细胞的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种人脐带血间充质干细胞高效分离及培养的方法。

### 背景技术

[0002] 干细胞是指生物体内能够进行自我更新,并维持机体各组织细胞新陈代谢的一群细胞。同时,在生物体内各种组织受到内源或外源性的损害时,干细胞可以被激活执行分化功能,从而达到修复该组织的目的。间充质干细胞在适当的条件下,具有强大的增值能力和分化能力,能够修复多种组织损伤,包括骨骼,肌肉,神经等组织,因此,间充质干细胞在再生医学治疗领域引起了越来越多的重视。

[0003] 骨髓当中含有丰富的间充质干细胞,因此得到了最为广泛和深入的研究。研究证实,骨髓间充质干细胞表达特定的表面抗原表型,比如,CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>和 CD105<sup>+</sup>。在体外和体内环境中可向骨骼,软骨,神经以及胰岛等细胞分化。另外,骨髓间充质干细胞具有免疫调节的功能,分泌多种免疫相关信号分子,从而在免疫性疾病治疗过程中发挥作用。但是,尽管骨髓间充质干细胞细胞较易分离和培养,但是,骨髓来源有限,难以满足临床大量的需求。即便是进行病人的自体移植,患者也必须承担额外的痛苦。在其他组织,比如肌肉,脂肪,脑以及脐带血等其它组织也能分离获得间充质干细胞。这些细胞有与骨髓间充质干细胞相似的抗原表型和分化能力。然而,除去脐带血外,应用其他组织的间充质干细胞面临着和应用骨髓间充质干细胞相同的问题,及样品稀缺,不足以满足临场需求。

[0004] 脐带血是指早产或正常分娩婴儿脐带内的血液。已经证实,脐带血中含有活性很强的干细胞群,包括造血干细胞和间充质干细胞。脐带血中的间充质干细胞与骨髓干细胞相似,有着相同的表面抗原表型,以及相似的分化能力。文献表明,脐带血干细胞有着更原始的干细胞特性和更低的免疫原性。同时,应用脐带血治疗糖尿病,神经损伤以及血管坏死等疾病也屡见报道。

### 发明内容

[0005] 技术问题:本发明的目的是提供一种高效分离和扩增人脐带血间充质干细胞的方法,通过获取脐带血,利用特定的细胞粘附蛋白而不是使用成分难以确定的细胞外基质,对其中的间充质干细胞进行分离纯化,并配合适当的培养基,实验对脐带血的高效扩增。

[0006] 技术方案:本发明的高效分离和扩增人脐带血间充质干细胞的方法具体为:

[0007] a. 收集脐带血样品:所述脐带血样品自医院采集,或自脐带血库中获取的人脐带血样品,在无菌条件下获取正常或早产胎儿的脐带血,肝素抗凝;

[0008] b. 分离脐带血中单核细胞成分:所述脐带血血样品均应经过肝素抗凝,羟甲基纤维素裂解红细胞,密度梯度离心获取单核细胞成分之后进行接种;脐带血间充质干细胞的分离纯化过程在分娩后 24 小时内进行;

[0009] c. 将单核细胞成分接种于包被蛋白基质成分的培养皿;包被蛋白基质指层连蛋

白和明胶蛋白按体积比 1 :2 混合 ;

[0010] d. 分离间充质干细胞 :细胞接种于上述包被的细胞培养板后,使用脐带血间充质干细胞培养基培养,及时除去未贴壁细胞并更换培养基,此时,脐带血间充质干细胞得到分离 ;

[0011] e. 培养和扩增间充质干细胞 :继续使用脐带血间充质干细胞培养基培养,每 5-8 天换液一次,直至细胞为 80-95% 融合 ;细胞用胰酶进行消化,接种于一般培养板,使用脐带血间充质干细胞培养基继续培养,2-4 天换液一次,直至融合,并进行下一次传代,实现间充质干细胞的扩增。

[0012] 其中所述脐带血间充质干细胞培养基其中包括 : $\alpha$ -MEM, Pen-Strep, b-FGF, EGF, TGF- $\beta$  ;其中, $\alpha$ -MEM 为  $\alpha$ -最小必需极限培养基 ;Pen-Strep 为青霉素 - 链霉素, b-FGF 为 b-成纤维细胞生长因子, EGF 为表皮细胞生长因子, TGF- $\beta$  为转化生长因子。

[0013] 该方法包括 :首先使用同体积  $\alpha$ -MEM 稀释抗凝过的脐带血,与 4-6g/L 的甲基纤维素按体积比 4:1 混合,静置 20-40 分钟,沉降红细胞。吸取上清,离心后,用 PBS 制成单细胞悬液,叠加到相对密度在 1-1.1 范围的淋巴细胞分离液上,在 2000-3000 转 / 分钟离心 15-30 分钟,取界面层,加 PBS 制成单细胞悬液,离心洗涤。将细胞加入用层连蛋白和明胶蛋白包被的细胞培养板上 ;细胞在  $\alpha$ -MEM 中培养,该培养基中含有 Pen-Strep, b-FGF, EGF, TGF- $\beta$  添加成分,细胞达到 80-95% 融合时,进行传代 ;传代时,使用普通培养皿,并在上述含有添加成分的培养基中进行细胞的扩增。

[0014] 有益效果 :本发明使用了成分确定的包被成分对细胞培养板进行包被,有效提高了分离的纯度和效率。在  $\alpha$ -MEM 中添加 b-FGF, EGF, TGF- $\beta$  等细胞因子能够稳定的维持干细胞生长,能够实现脐带血间充质干细胞的大量扩增,从而完成了本发明。

#### 附图说明

[0015] 通过下面结合附图的详细阐述,本发明前述以及其它目的、特征和优点将变得显而易见,其中 :

[0016] 图 1 :为本发明培养脐带血间充质干细胞 20 天后的结果。

#### 具体实施方式

[0017] 具体而言,为达到本发明所述目的,本发明提出相同浓度的层连蛋白和明胶蛋白按照 1:2 的体积比混合,可以比较好的分离和纯化脐带血中的间充质干细胞,从而既提高了分离纯化效率,也避免了使用化学成分极其复杂的细胞外基质。同时,本发明使用含有  $\alpha$ -MEM, Pen-Strep, b-FGF, EGF, TGF- $\beta$  的培养基,在前期可以配合包被蛋白(层连蛋白和明胶蛋白)维持原代细胞的活性,在后期可以高效扩增脐带血间充质干细胞。

[0018] 本发明所述的分离和扩增脐带血间充质干细胞的主要步骤如下 :

[0019] 在无菌条件下获取正常或早产胎儿的脐带血,25-200ml,肝素抗凝。脐带血间充质干细胞的分离纯化过程在分娩后 24 小时内进行。

[0020] 首先,使用同体积  $\alpha$ -MEM 稀释抗凝过的脐带血,与 5g/L 的甲基纤维素按 4:1 混合,静置 30 分钟,沉降红细胞。吸取上清,离心后,用 PBS 制成单细胞悬液,叠加到相对密度 1.077 的淋巴细胞分离液上,2500rpm 离心 20min,取界面层,加 PBS 制成单细胞悬液,离心洗

涤。将细胞加入用层连蛋白和明胶蛋白包被的细胞培养板上。细胞在  $\alpha$ -MEM 中培养,该培养基中含有 Pen-Strep, b-FGF, EGF, TGF- $\beta$  等添加成分。细胞达到 90% 融合时,进行传代。传代时,使用普通培养皿,并在上述含有添加成分的培养基中进行细胞的扩增。

[0021] 现结合以下实例来更加详细的描述本发明的用于脐带血中间充质干细胞分离和扩增的方法。提供实例的目的仅在于示例性的阐述本发明,不能将其理解为是对本发明范围和实质的限制。

[0022] 实施例 1:包被细胞培养板

[0023] 将层连蛋白(Laminin;BD Bioscience, CA) 和明胶蛋白(Gelatin;BD Bioscience, CA)按照说明分别稀释 2mg/ml. 按照体积比 1:2 混合后,转移到细胞培养板,室温下放置 1 小时。在无菌环境下,可在 4°C 存 3 个月。

[0024] 实施例 2:分离和扩增脐带血间充质干细胞

[0025] 将在无菌条件下采集的脐带血以体积比 1:1 与细胞在  $\alpha$ -MEM 混合稀释,与 5g/L 的甲基纤维素按 4:1 混合,静置 30 分钟,沉降红细胞。吸取上清,离心后,用 PBS 制成单细胞悬液,叠加到相对密度 1.077 的淋巴细胞分离液 Ficoll-Hypaque 上,2500rpm 离心 20min,取界面层,加 PBS 制成单细胞悬液,离心洗涤。

[0026] 因为 Ficoll-Hypaque 的比重为 1.077g/ml, 其比单核细胞重但比红细胞轻,因此可以将单核细胞与残留的红细胞分离。收集界面层即可收集到比较纯的单核细胞。

[0027] 将获取的单核细胞用 PBS 稀释,2000rpm,离心 10min, 去掉上清液,并加入新的 PBS 打散,稀释。以同样的条件再洗涤一次,可见沉积于离心管底部的细胞。

[0028] 随后,使用添加 10% 胎牛血清的脐带血间充质干细胞培养基均匀打散收集到的细胞。脐带血间充质干细胞培养基是指在添加 1%Pen-Strep, 50ng/ml b-FGF, 10ng/ml EGF, 10ng/ml TGF- $\beta$  等生长因子的  $\alpha$ -MEM 培养基。

[0029] 细胞打散后,接种于实施例 1 制备的细胞培养板,7 天后更换培养基。洗涤培养板,除去未贴壁细胞。继续使用添加 10% 胎牛血清的脐带血间充质干细胞培养基培养,每 7 天换液一次,直至细胞接近 90% 融合。

[0030] 将 90% 融合细胞用胰酶进行消化,接种于一般培养板,使用 10% 胎牛血清的脐带血间充质干细胞培养基培养,3 天换液一次。直至融合,并进行下一次传代。

[0031] 实施例 3:培养的间充质干细胞的细胞表面抗原表征

[0032] 为了确定上述所获得的细胞具有间充质干细胞表面抗原的特征,使用 FACs 对细胞表面进行分析。结果显示于表 1。

[0033] 表 1

[0034]

指示剂	反应
CD34	-
CD45	-
CD3	-

CD73	+
CD105	+
CD90	+

[0035] 表 1 证实,对于本发明所分离和培养的干细胞,CD34、CD45 及 CD3 为阴性,而 CD73、CD105 及 CD90 为阳性。此结果表明本发明所分离并扩增的细胞是间充质干细胞。

[0036] 本发明不局限与所述的实施例,本领域的技术人员在不脱离本发明的要旨、构思和宗旨的情况下,可以对本分所述混合物和方法或方法中个步骤的前后次序进行改动、添加和替换。

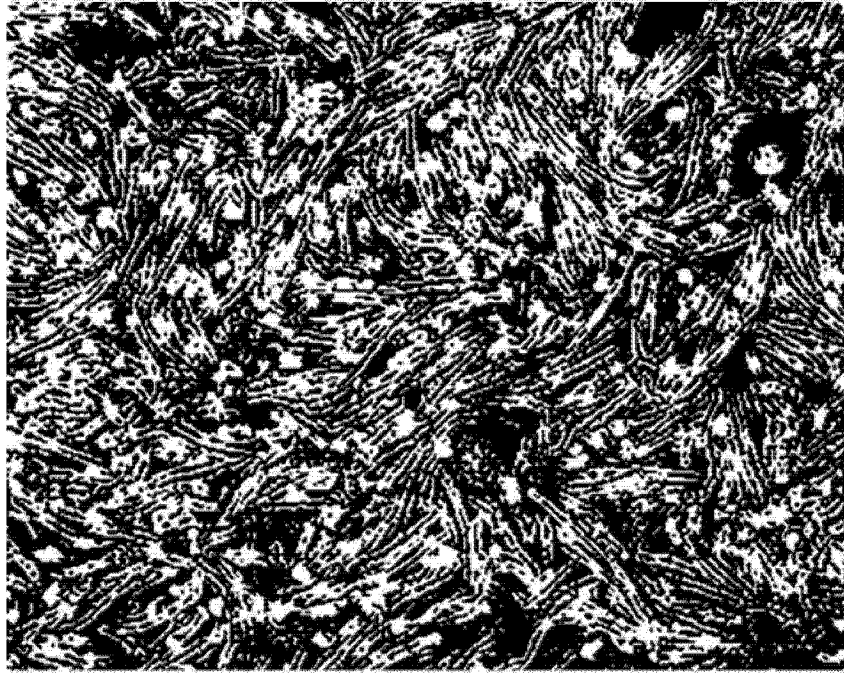


图 1