



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106109496 B

(45)授权公告日 2019.11.05

(21)申请号 201610529860.3

A61K 47/26(2006.01)

(22)申请日 2016.07.06

A61P 39/06(2006.01)

A61P 17/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106109496 A

(43)申请公布日 2016.11.16

(73)专利权人 广东科玮生物技术股份有限公司

地址 510070 广东省广州市保税区保盈大道39号301、401房

(72)发明人 陈松彬 易萍 倪彦艳 张爱萍
刘杰森

(74)专利代理机构 广州胜沃园专利代理有限公司 44416

代理人 张帅

(51)Int.Cl.

A61K 9/19(2006.01)

A61K 35/28(2015.01)

(56)对比文件

CN 104523753 A,2015.04.22,说明书第25-37段实施例.

CN 105543313 A,2016.05.04,说明书第5-8段.

CN 101525594 A,2009.09.09,全文.

洪小杨等.“人脐带血间充质干细胞体外分离培养研究”.《中国误诊学杂志》.2005,第5卷(第17期),3218-3220.

范菊莉等.“冷冻干燥法保存人骨髓间充质干细胞的实验初探”.《世界科技研究与发展》.2012,第34卷(第1期),134-136.

审查员 段炼

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

人脐带间充质干细胞提取物冻干粉及制备方法

(57)摘要

本发明涉及人脐带间充质干细胞提取物冻干粉及制备方法,所述的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉的制备方法包括以下步骤:使用密度梯度离心法得到纯度较高的人脐带间充质原代干细胞,并将其进行传代培养,收集第3~18代的细胞培养上清液,将上清液与海藻糖混合制成冻干粉。本发明所得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉具有良好的外观性状;将冻干粉进行复溶,溶解较快,溶解完全;动物实验证明其刺激性小,安全性高,使用可靠。此外,本发明所述的冻干粉能有效地保存人脐带间充质干细胞培养上清液的各种具有生物活性的细胞因子,可防御皮肤紫外损伤,促进皮肤胶原蛋白合成,具有美白、延缓衰老的功效。

1. 一种人脐带间充质干细胞提取物冻干粉的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 干细胞的原代分离、纯化和培养:从新鲜人脐带中分离脐带沃顿胶,消化液消化,用150 μ m细胞过滤器进行过滤,收集滤液,将滤液置于1200r/min条件下离心5min,弃上清,用平衡盐缓冲液洗涤细胞沉淀2~3次,再用2倍体积的平衡盐缓冲液重悬细胞,利用密度梯度离心法纯化细胞悬液,得脐带间充质原代干细胞,将脐带间充质原代干细胞接种于含有100U/ml青霉素和100g/ml链霉素的无血清培养基中进行贴壁培养;

(2) 干细胞提取物的获取:待脐带间充质原代干细胞接近90%融合,更换新鲜的不含抗生素的无血清培养基,并进行传代培养,收集第3~18代的细胞培养上清液,将上清液用0.22 μ m的无菌过滤器过滤,取滤液,即得脐带间充质干细胞提取物;

(3) 干细胞提取物冻干粉的制备:将脐带间充质干细胞提取物与冻干保护剂混匀后,用0.22 μ m的无菌过滤器过滤除菌,然后使用注射用水调节蛋白浓度至 $45 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$,冷冻干燥,即得人脐带间充质干细胞提取物冻干粉;

所述冻干保护剂为海藻糖,冻干保护剂的用量为5%wt脐带间充质干细胞提取物;

所述冷冻干燥具体为:-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中预冻12h,然后置于真空冷冻干燥机中,-30 $^{\circ}\text{C}$ 保持1~2h,在真空度为 $1.0 \times 10^{-2} \sim 1.5 \times 10^{-2} \text{mbar}$, -5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下冻干10~12h,保持真空度,在20 $^{\circ}\text{C}$ 继续冻干2~4h,即得;

所述步骤(1)中的密度梯度离心法具体为:将细胞悬液缓慢加入到装有等体积分离液的离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$,2000r/min离心15~20min,收集中间白膜层,往白膜层中加入等体积的磷酸盐缓冲溶液,4 $^{\circ}\text{C}$,1000r/min离心5~15min,弃上清,再加入等体积的磷酸盐缓冲溶液,4 $^{\circ}\text{C}$,800r/min离心5~15min,弃上清,取沉淀,即得脐带间充质原代干细胞。

2. 根据权利要求1所述的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中的密度梯度离心法具体为:将细胞悬液缓慢加入到装有等体积分离液的离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$,2000r/min离心20min,收集中间白膜层,往白膜层中加入等体积的磷酸盐缓冲溶液,4 $^{\circ}\text{C}$,1000r/min离心10min,弃上清,再加入等体积的磷酸盐缓冲溶液,4 $^{\circ}\text{C}$,800r/min离心10min,弃上清,取沉淀,即得脐带间充质原代干细胞。

3. 根据权利要求1或2所述的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉的制备方法,其特征在于,所述分离液为浓度为1.073g/mL的聚蔗糖-泛影酸钠溶液。

4. 根据权利要求1所述的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉的制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中的消化液消化具体为:按1:3的体积比加入消化液,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化3h,消化液为含有胶原酶II、透明质酸酶和EDTA的磷酸盐缓冲溶液,其中,胶原酶II、透明质酸酶和EDTA在磷酸盐缓冲溶液中的质量体积百分比终浓度分别为0.12%、0.06%、0.02%。

5. 人脐带间充质干细胞提取物冻干粉,其特征在于,根据权利要求1~4任一所述的制备方法得到。

人脐带间充质干细胞提取物冻干粉及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及干细胞领域,具体涉及人脐带间充质干细胞提取物冻干粉及制备方法。

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。目前,研究表明源于脐带的MSCs与其他来源的MSCs相比具有来源广泛、采集方便、增殖分化能力强、免疫原性弱、无伦理问题等诸多优点,在组织工程、基因工程等领域日益受到关注。

[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] 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。中国专利申请201510033971.0公开了人脐带间充质干细胞培养上清液活性因子及细胞裂解液的制备方法、产品与应用,该制备方法采用磁性无损分选方法进行健康人脐带间充质干细胞的分选提取,然后进行传代培养,收集2~10代之间全部细胞培养上清液及细胞裂解液,最后经低温真空制备得到细胞培养上清液及细胞裂解液的冻干粉,该发明以冻干粉形式有效地保存了人间充质干细胞培养上清中的各种具有生物活性的细胞因子混合物,为间充质干细胞培养上清的产业化应用奠定了基础。

发明内容

[0005] 为解决现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种产品纯度高,生物活性高的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉及制备方法,所述制备方法操作简单且全有效,能够实现人脐带间充质干细胞提取物冻干粉的产业化利用。

[0006] 本发明通过如下技术方案以实现上述目的:

[0007] 一种人脐带间充质干细胞提取物冻干粉的制备方法,包括以下步骤:

[0008] (1) 干细胞的原代分离、纯化和培养:从新鲜人脐带中分离脐带沃顿胶,消化液消化,用150 μ m细胞过滤器进行过滤,收集滤液,将滤液置于1200r/min条件下离心5min,弃上清,用平衡盐缓冲液洗涤细胞沉淀2~3次,再用2倍体积的平衡盐缓冲液重悬细胞,利用密度梯度离心法纯化细胞悬液,得脐带间充质原代干细胞,将脐带间充质原代干细胞接种于含有100U/ml青霉素和100g/ml链霉素的无血清培养基中进行贴壁培养;

[0009] (2) 干细胞提取物的获取:待脐带间充质原代干细胞接近90%融合,更换新鲜的不含抗生素的无血清培养基,并进行传代培养,收集第3~18代的细胞培养上清液,将上清液用0.22 μ m的无菌过滤器过滤,取滤液,即得脐带间充质干细胞提取物;

[0010] (3) 干细胞提取物冻干粉的制备:将脐带间充质干细胞提取物与冻干保护剂混匀后,用0.22 μ m的无菌过滤器过滤除菌,然后使用注射用水调节蛋白浓度至 $45 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$,冷冻干燥,即得人脐带间充质干细胞提取物冻干粉;

[0011] 所述冻干保护剂为海藻糖,冻干保护剂的用量为5%wt脐带间充质干细胞提取物;

[0012] 所述冷冻干燥具体为:-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中预冻12h,然后置于真空冷冻干燥机中,-30 $^{\circ}\text{C}$ 保持1~2h,在真空度为 $1.0 \times 10^{-2} \sim 1.5 \times 10^{-2}$ mbar,-5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下冻干10~12h,保持真空度,在20 $^{\circ}\text{C}$ 继续冻干2~4h,即得。

[0013] 本发明所述的无血清培养基(SYL-SF)为市售产品,由北京三有利科技发展公司自主研发,所述SYL-SF的基础培养基为 α -MEM,其中添加白蛋白、转铁蛋白、胰岛素、表皮生长因子、成纤维生长因子、氢化可的松、脂质等血清替代成分,不含任何动物来源血清和抗生素。

[0014] 进一步地,所述步骤(1)中的密度梯度离心法具体为:将细胞悬液缓慢加入到装有等体积分离液的离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$,2000r/min离心15~20min,收集中间白膜层,往白膜层中加入等体积的磷酸盐缓冲溶液,4 $^{\circ}\text{C}$,1000r/min离心5~15min,弃上清,再加入等体积的磷酸盐缓冲溶液,4 $^{\circ}\text{C}$,800r/min离心5~15min,弃上清,取沉淀,即得脐带间充质原代干细胞。

[0015] 优选地,所述步骤(1)中的密度梯度离心法具体为:将细胞悬液缓慢加入到装有等体积分离液的离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$,2000r/min离心20min,收集中间白膜层,往白膜层中加入等体积的磷酸盐缓冲溶液,4 $^{\circ}\text{C}$,1000r/min离心10min,弃上清,再加入等体积的磷酸盐缓冲溶液,4 $^{\circ}\text{C}$,800r/min离心10min,弃上清,取沉淀,即得脐带间充质原代干细胞。

[0016] 更进一步地,所述分离液为浓度为1.073g/mL的聚蔗糖-泛影酸钠溶液。

[0017] 进一步地,所述步骤(1)中的消化液消化具体为:按1:3的体积比加入消化液,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化3h,消化液为含有胶原酶II、透明质酸酶和EDTA的磷酸盐缓冲溶液,其中,胶原酶II、透明质酸酶和EDTA在磷酸盐缓冲溶液中的质量体积百分比终浓度分别为0.12%、0.06%、0.02%。

[0018] 一种人脐带间充质干细胞提取物冻干粉,通过上述制备方法制备得到。

[0019] 本发明采用海藻糖作为冻干保护剂,将人脐带间充质干细胞提取物制成冻干粉,所述的冻干粉具有良好的外观性状,将冻干粉进行复溶,溶解较快,溶解完全。动物实验证明其刺激性小,安全性高,使用可靠。所述的冻干粉能较好地保持人脐带间充质干细胞培养上清液细胞因子的生物活性。经细胞试验证明,本发明冻干粉可显著提高人皮肤成纤维细胞的活力,并显著增强细胞SOD活性,有效地对抗紫外线对人成纤维细胞氧化损伤。经动物

试验证明,本发明冻干粉可显著提高裸鼠皮肤弹性和水分含量,并促进裸鼠皮肤I型胶原蛋白和III型胶原蛋白合成,提高皮肤中胶原蛋白的含量。

[0020] 与现有技术相比,本发明的优势在于:

[0021] (1) 本发明采用密度梯度离心法纯化细胞悬液,得到纯度较高的人脐带间充质原代干细胞,分离得到的人脐带间充质原代干细胞在体外培养中具有活力高、分化能力好、扩增倍数高的特点,为实现人脐带间充质干细胞提取物的产业化应用奠定了基础。

[0022] (2) 本发明以海藻糖作为冻干保护剂,将人脐带间充质干细胞提取物制成冻干粉,能较好地保持人脐带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。

具体实施方式

[0023] 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。

[0024] 实施例1人脐带间充质干细胞分离、纯化、培养和鉴定

[0025] (1) 人脐带间充质干细胞分离、纯化和培养

[0026] 在无菌的条件,使用含有100U/ml青霉素和100g/ml链霉素的平衡盐缓冲液将新鲜采集的脐带反复漂洗3次,清洗干净后去除脐带外膜以及动、静脉,取血管之间、血管与外膜之间的胶状物(脐带沃顿胶)并剪成1mm³大小的组织块,按1:3的体积比加入消化液,37℃消化3h,其中,消化液为含有胶原酶II、透明质酸酶和EDTA的磷酸盐缓冲溶液,并且胶原酶II、透明质酸酶和EDTA在磷酸盐缓冲溶液中的质量体积百分比终浓度分别为0.12%、0.06%、0.02%。然后用150um细胞过滤器进行过滤,收集滤液,将滤液置于1200r/min条件下离心5min,弃上清,用平衡盐缓冲液洗涤细胞沉淀3次,再用2倍体积的平衡盐缓冲液重悬细胞,得细胞悬液。将细胞悬液缓慢加入到装有等体积的浓度为1.073g/mL的聚蔗糖-泛影酸钠溶液的离心管中,4℃,2000r/min离心20min,收集中间白膜层,往白膜层中加入等体积的磷酸盐缓冲溶液,4℃,1000r/min离心10min,弃上清,再加入等体积的磷酸盐缓冲溶液,4℃,800r/min离心10min,弃上清,取沉淀,即得脐带间充质原代干细胞。将脐带间充质原代干细胞接种于含有100U/ml青霉素和100U/ml链霉素的无血清培养基中,于37℃、5%CO₂培养箱中进行贴壁培养。

[0027] (2) 人脐带间充质干细胞鉴定

[0028] 通过流式细胞仪鉴定人脐带间充质干细胞表面标志物,利用流式细胞技术检测荧光标记抗体。根据抗原抗体结合原理,用特定荧光素标记的抗体对已知携有相应抗原的细胞进行染色。经荧光素标记抗体染色的细胞可以被流式细胞仪识别,并根据已知细胞所携带的荧光素的强度,对标记抗体进行定性,定量分析。

[0029] 结果表明,人脐带间充质干细胞不表达造血细胞标志物如:CD45、CD34、CD14、CD11b(呈阴性),而CD105、CD109、CD73、CD90等干细胞特征表面抗原呈阳性(见表1),表明经密度梯度离心法纯化细胞悬液,得到纯度较高的人脐带间充质原代干细胞。

[0030] 表1人脐带间充质干细胞表面标志物的检测结果

[0031]

检测指标	表达率	结论
CD105	99.7%	阳性

CD109	99.4%	阳性
CD73	99.8%	阳性
CD90	99.6%	阳性
CD45	0.1%	阴性
CD34	0.5%	阴性
CD14	0.2%	阴性
CD11b	0.4%	阴性

[0032] 实施例2人脐带间充质干细胞提取物冻干粉制备

[0033] (1) 人脐带间充质干细胞的提取物的获取:待脐带间充质干细胞接近90%融合,去除培养液,用磷酸盐缓冲溶液清洗3次,加入质量分数为0.25%的胰酶消化液,37℃消化10min,加入消化液等体积的不含抗生素的无血清培养基终止消化,1200r/min条件下离心5min,弃上清,获得细胞,使用无血清培养基重悬细胞,按照1:3的比例进行传代接种,置于37℃、5%CO₂培养箱中进行培养,每2天更换一次培养液,待脐带间充质干细胞接近80%融合,弃掉培养液,更换新鲜的无血清培养基继续72h,收集上清液,并用同样方法继续传代培养。

[0034] (2) 人脐带间充质干细胞的提取物冻干粉制备:合并第3~18代的细胞培养上清液,加入海藻糖,所述海藻糖的用量为5%wt细胞培养上清液,混匀,用0.22μm的无菌过滤器过滤除菌,然后使用注射用水调节蛋白浓度至45±0.5μg/ml,再置于-80℃超低温冰箱中预冻12h,再置于真空冷冻干燥机中,-30℃保持2h,在真空度为1.0×10⁻²mbar,-5℃条件下冻干12h,保持真空度,在20℃继续冻干2h,即得人脐带间充质干细胞提取物冻干粉。

[0035] 实施例3采用不同冻干保护剂制备人脐带间充质干细胞提取物冻干粉比较

[0036] 分别以甘露醇、无水乳糖、右旋糖酐替换本发明中的海藻糖作为冻干保护剂,按照实施例2的工艺将人脐带间充质干细胞提取物制成冻干粉,将所获得的冻干粉与实施例2制得的冻干粉进行比表,结果见表2。

[0037] 表2采用不同冻干保护剂制备人脐带间充质干细胞提取物冻干粉物理性状比较

[0038]

组别	外观	复溶溶解时间(s)	复溶后溶液的澄明度	pH
实施例2	致密粉末状	4	澄清、透明	6.5~7.5
甘露醇组	部分萎缩粉末状	8	澄清、透明	6.5~7.5
无水乳糖组	块状物	12	产生乳光、浑浊	6.0~7.0
右旋糖酐组	块状物	15	澄清、透明	6.0~7.0

[0039] 由上表可知,采用海藻糖作为冻干保护剂制得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉具有良好的外观性状;将冻干粉进行复溶,溶解较快,溶解完全。

[0040] 实施例4人脐带间充质干细胞提取物冻干粉安全性评价

[0041] (1) 小鼠口服人脐带间充质干细胞提取物冻干粉的急性毒性试验

[0042] 取10只昆明小鼠(雌雄各半,平均体重为23.5g),给小鼠一次灌胃给予实施例2制得的冻干粉10倍标示浓度的药量,观察其毒性反应,当未引起动物死亡,则不再进行多个剂量的急性经口毒性试验。结果显示,小鼠没有出现任何不良反应,没有动物出现死亡,表明本发明制得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉安全性高。

[0043] (2) 兔子涂抹人脐带间充质干细胞提取物冻干粉的皮肤刺激性试验

[0044] 取10只日本大耳白兔(雌雄各半,体重2kg左右),实验前24h用脱毛剂对用药区(背部两侧)进行脱毛处理,去毛范围左右各3cm×3cm。对兔子进行保定,将兔子背部左侧定位为对照区,右侧定位为试验区,对照区给生理盐水0.5ml,试验区给实施例2制得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉用生理盐水复溶后的溶液0.5ml,加纱布覆盖保护,用胶布固定。24h后擦除受试物,温水洗净,观察30min,2h,6h,12h涂敷部位有无红斑和水肿情况。结果显示,试验区和对照区均无出现红斑和水肿情况,表明本发明制得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉对皮肤刺激性小。

[0045] 实施例5人脐带间充质干细胞提取物冻干粉对紫外线诱导人皮肤成纤维细胞损伤的保护作用

[0046] 1. 实验材料:实施例2制得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉、实施例3所述的分别以甘露醇、无水乳糖、右旋糖酐替换本发明中的海藻糖作为冻干保护剂制得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉、人皮肤成纤维细胞(广州吉妮欧生物科技有限公司)。

[0047] 2. 实验方法:将处于对数生长期的人皮肤成纤维细胞接种于96孔板,待细胞单层贴壁后(24h),弃培养液,每孔加入200 μ lPBS,分别使用30J/cm²的UVA照射,空白对照组用铝箔盖住,每天照射2h,连续照射4天后随机分为空白对照组、模型组、实施例2组、甘露醇组、无水乳糖组和右旋糖酐组。其中,空白对照组和模型组给予等体积的生理盐水,实施例2组给予实施例2制得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉,蛋白质终浓度分别为40 μ g/ml,甘露醇组、无水乳糖组和右旋糖酐组分别给予实施例3所述的以甘露醇、无水乳糖和右旋糖酐作为冻干保护剂制成的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉,蛋白质终浓度均为40 μ g/ml,。48h后,向每孔加入20 μ lMTT(5mg/ml),继续培养4h后弃上清,每孔加150 μ lDMSO溶解,室温振荡10min,使结晶溶解,酶标仪检测各孔492nm处的光吸收(OD)值,然后计算细胞活力,细胞活力(%)=实验组光吸收值/空白对照组光吸收值×100%,并对细胞的超氧化物歧化酶(SOD)活性进行检测,结果见表3。

[0048] 3. 实验结果

[0049] 表3人脐带间充质干细胞提取物冻干粉对人皮肤成纤维细胞活力的影响

组别	浓度 (μ g/ml)	OD值	活力 (%)	SOD (U/mg.prot)
[0050] 空白对照组	-	0.876 \pm 0.076	100	47.685 \pm 6.276
模型组	-	0.492 \pm 0.075***	56.2	26.250 \pm 5.425**
[0051] 实施例2组	40	0.674 \pm 0.064###	76.9	45.164 \pm 5.270###
甘露醇组	40	0.550 \pm 0.062	62.5	35.058 \pm 4.314
无水乳糖组	40	0.501 \pm 0.065	55.4	29.146 \pm 4.120
右旋糖酐组	40	0.527 \pm 0.069	60.2	32.269 \pm 4.258

[0052] 注:与空白对照组比较,**P<0.01;***P<0.001;与模型组比较,###P<0.01。

[0053] 由上表可知,以海藻糖作为冻干保护剂制得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉

可显著提高人皮肤成纤维细胞的活力,并显著增强细胞SOD活性,有效地对抗紫外线对人成纤维细胞氧化损伤,表明实施例2制得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉可有效保存人脐带间充质干细胞培养上清液的各种具有生物活性的细胞因子,而以甘露醇、无水乳糖和右旋糖酐作为冻干保护剂均不能有效地保存人脐带间充质干细胞提取物的活性,尤其以无水乳糖组的效果最差。

[0054] 实施例6人脐带间充质干细胞提取物冻干粉对皮肤胶原合成的影响

[0055] 1. 实验方法:取6周龄的BALB/C裸鼠40只,雌雄各半,由广东省动物实验中心提供。分为实施例2组、甘露醇组、无水乳糖组和右旋糖酐组,每组10只。分别在各组裸鼠背部皮肤的右半边涂抹实施例2、实施例3所述的以甘露醇、无水乳糖和右旋糖酐作为冻干保护剂制成的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉用生理盐水复溶后的水溶液,左半边的背部皮肤则涂上生理盐水作为对照,每次涂抹200 μ l,3次/天,6周后使用专门的皮肤弹性(含水量)测试仪来测量裸鼠背部皮肤的弹性和含水量。根据皮肤在短时间内恢复的状况来评定弹性的大小,弹性值1为最大,即皮肤100%恢复原状。实验结束后处死裸鼠,剥离裸鼠背部的皮肤组织,左右侧各取0.1g,采用RT-PCR检测组织中的I型胶原和III型胶原转录水平。结果见表4和表5。

[0056] 2. 实验结果

[0057] 表4人脐带间充质干细胞提取物冻干粉对裸鼠皮肤弹性和水分的影响

[0058]

组别	左侧(对照组)		右侧(给药组)	
	皮肤弹性	水分含量	皮肤弹性	水分含量
实施例2组	0.639 \pm 0.120	21.18 \pm 2.47	0.892 \pm 0.106*	28.58 \pm 2.64*
甘露醇组	0.632 \pm 0.122	21.20 \pm 2.45	0.735 \pm 0.114	24.65 \pm 2.38
无水乳糖组	0.634 \pm 0.125	21.15 \pm 2.42	0.656 \pm 0.110	22.27 \pm 2.45
右旋糖酐组	0.637 \pm 0.124	21.17 \pm 2.44	0.697 \pm 0.108	23.84 \pm 2.24

[0059] 注:与对照组比较,*P<0.05。

[0060] 表5人脐带间充质干细胞提取物冻干粉对裸鼠皮肤胶原蛋白转录水平的影响

[0061]

组别	左侧(对照组)		右侧(给药组)	
	I型胶原	III型胶原	I型胶原	III型胶原
实施例2组	0.712 \pm 0.128	0.630 \pm 0.132	1.350 \pm 0.114**	1.258 \pm 0.105**
甘露醇组	0.710 \pm 0.125	0.632 \pm 0.130	0.935 \pm 0.118	0.826 \pm 0.112
无水乳糖组	0.714 \pm 0.122	0.628 \pm 0.134	0.786 \pm 0.120	0.726 \pm 0.104
右旋糖酐组	0.713 \pm 0.124	0.631 \pm 0.129	0.862 \pm 0.116	0.812 \pm 0.119

[0062] 注:与对照组比较,**P<0.01。

[0063] 由上表4和5可知,以海藻糖作为冻干保护剂制得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉可显著提高裸鼠皮肤弹性和水分含量,并促进裸鼠皮肤I型胶原蛋白和Ⅲ型胶原蛋白合成,提高皮肤中胶原蛋白的含量。表明实施例2制得的人脐带间充质干细胞提取物冻干粉可有效保存人脐带间充质干细胞培养上清液的各种具有生物活性的细胞因子,而以甘露醇、无水乳糖和右旋糖酐作为冻干保护剂均不能有效地保存人脐带间充质干细胞提取物的活性,尤其以无水乳糖组的效果最差。

[0064] 以上仅是本发明的优选实施方式,应当指出的是,上述优选实施方式不应视为对本发明的限制,本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明的精神和范围内,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。