



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107748260 A

(43)申请公布日 2018.03.02

(21)申请号 201710757400.0

G01N 15/14(2006.01)

(22)申请日 2017.08.29

G01N 21/84(2006.01)

(71)申请人 西安组织工程与再生医学研究所

G01N 1/30(2006.01)

地址 710038 陕西省西安市灞桥区纺织产业园标准厂房B6-319

(72)发明人 朱斌 张浩 刘世宇 安莹
邱新毓 金岩

(74)专利代理机构 北京方圆嘉禾知识产权代理
有限公司 11385

代理人 董芙蓉

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

权利要求书3页 说明书9页 附图15页

(54)发明名称

一种脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法

(57)摘要

本发明公开了一种脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法，该方法通过二维共培养不同比例血管内皮细胞和脐带间充质干细胞，研究脐带间充质干细胞促进血管内皮细胞增殖和成血管分化的规律。此外，通过高温熔融的单糖制作微米级网状微血管支架，溶解于水凝胶构建三维水凝胶阴模的连续微孔道培养体系，通过灌注并悬浮培养上述两种细胞，评价其体外构建的微血管网结构以及基于此结构的工程化骨组织体内移植的效果，并阐明其参与并促进微血管网构建的机制。本发明为工程化组织、器官的体外预管化提供新的解决方案以及实验基础。



1.一种脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1.脐带间充质干细胞对血管再生微环境影响的实验

1.1人脐带间充质干细胞对人脐带静脉内皮细胞增殖的影响

1.3人脐带间充质干细胞对人脐带静脉内皮细胞成血管分化的影响

1.2.1Transwell间接共培养

将hUVECs以1*105个/孔接种于六孔板内,待细胞增殖至80%,实验组和对照组分别在Transwell小室以5*105个/孔接种hUCMScs和hUVECs;经过3天、7天、14天后根据不同实验要求进行不同检测;

1.2.2Western Blot检测ERK1/2和p-ERK1/2

将间接共培养后的hUVECs用冷的PBS洗两次后,加入裂解液+蛋白酶抑制剂并用细胞刮收集,进行7.5%SDS-PAGE电泳,转至PVDF膜上;将膜5%脱脂牛奶封闭2小时,加入兔抗ERK1/2和p-ERK1/2一抗,抗小鼠HRP二抗,ECL发光试剂检测;

1.3二维直接共培养观察两种细胞形成的组织结构不同比例直接共培养两种细胞

步骤2.脐带间充质干细胞和脐带静脉内皮细胞共培养构建微血管网状结构的体外应用研究

2.1水凝胶三维连续微孔道网状阴模培养体系的构建

利用棉花糖机将融化的单糖喷射出的细丝,缠绕形成微米级单糖细丝网结构,将水凝胶液态双组分剂按照1:1的比例混合后,将单糖细丝网浸没于液态组分中,光固化使水凝胶成为半固态;将这一体系置于40℃水域,将单糖细丝溶解,从而形成半固态水凝胶三维连续微孔道网阴模体系;

2.2两种细胞不同比例悬浮灌注共培养构建体外微血管网

将上述三维培养体系置于灌注培养发生器,将hUVECs:hUCMScs=1:1、3:1、5:1的比例悬浮于含10%胎牛血清的α-MEM培养液,进行灌注培养,流速为5ml/s;4小时更换含有不同比例细胞的培养液,经过3天、7天、14天后4%多聚甲醛固定,组织学切片后根据不同实验要求进行不同检测;

2.3 H&E染色

组织石蜡切片通过100%、95%、75%乙醇梯度脱蜡至水,苏木素染色5分钟后冲洗,盐酸酒精分化30秒;伊红染色2分钟后冲洗;通过75%、95%、100%乙醇梯度脱水至蜡;二甲苯透明后中性树胶封固片;

2.4 Masson三色染色

组织石蜡切片通过100%、95%、75%乙醇梯度脱蜡至水;weigert铁苏木素染5-10分,流水稍洗;1%盐酸酒精分化,流水冲洗数分;丽春红酸性品红染液染5-10分,流水稍冲洗;磷钼酸溶液处理5分钟,不用水洗,直接用苯胺蓝人染液复染5分钟;1%冰醋酸处理1分钟,95%酒精脱水多次;无水酒精脱水、二甲苯透明,中性树胶封固;

2.5免疫荧光染色

组织石蜡切片通过100%、95%、75%乙醇梯度脱蜡至水后,根据1.3.2实验步骤进行CD-31、VIII因子和Col-VI的免疫荧光检测;

步骤3.脐带间充质干细胞和脐带静脉内皮细胞共培养构建的微血管网状结构促进工

程化组织再生的体内应用研究

3.1 水凝胶三维微血管网阴模复合工程化骨支架材料的构建

利用棉花糖机将融化的单糖喷射出的细丝，缠绕形成微米级单糖细丝网结构，将水凝胶液态双组分剂按照1:1的比例混合后，加入HA/TCP粉末，充分混合均匀；将单糖细丝网浸没于液态组分中，光固化使水凝胶成为半固态；将这一体系置于40℃水域，将单糖细丝溶解，从而形成复合骨支架材料的水凝胶三维连续微孔道阴模体系；

3.2 悬浮灌注共培养构建体外微血管网

将hUVECs:hUCMSCs=1:1、3:1、5:1的比例悬浮于含10%胎牛血清的α-MEM培养液，在实验3.1所述培养体系进行灌注培养，流速为5ml/s；4小时更换含有不同比例细胞的培养液，经过3天、7天、14天后，4%多聚甲醛固定，组织学切片后根据不同实验要求进行不同检测；

3.3 裸鼠皮下异位实验

选取6周龄雄性裸鼠，1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉裸鼠；将实验3.2中得到的优化策略后的体系作为实验组，实验3.1得到的体系作为对照组分别植入裸鼠皮下，在不同时间点4w, 8w, 12w取材固定，进行组织切片，后根据不同实验要求进行不同检测；

3.4 兔颅骨极限缺损修复原位实验

3.5 形态学观察

根据实验2.3、2.4和2.5的步骤分别对实验3.3和3.4取得的组织学切片进行H&E染色、Masson三色染色和免疫荧光染色，观察形态学，成血管指标CD-31、VII因子和Col-VI以及成骨情况的表达；

3.6 Micro-CT检测骨缺损修复

将实验3.3和3.4得到的样本于4℃使用4%多聚甲醛固定24小时；Micro-CT扫描取材样本并使用图形软件三维重建分析颅骨缺损的修复情况；t检验进行统计分析。

2. 根据权利要求1所述的脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法，其特征在于，所述人脐带间充质干细胞对人脐带静脉内皮细胞增殖的影响包括：

1.1.1 人脐带间充质干细胞的分离培养以及鉴定

取体健适龄产妇的脐带，剪成长1.0cm的小段，洗净残留血液，去除脐动静脉，取Wharton胶剪碎至直径0.5cm大小的组织块，置于培养皿底贴壁，加入少量含10%胎牛血清的α-MEM培养液，4h后添加5mL培养液；

取第三代hUCMSCs，PBS液清洗冲悬；分装至EP管内，向每个EP管中加入2μL的相关抗体CD29、CD31、CD34、CD44、CD45和CD105抗体，4℃孵育一个小时，离心冲洗掉多余抗体，3%FBS的PBS液离心冲悬至200μL，使用流式细胞仪检测其表面标志物的表达情况；

1.1.2 人脐带静脉内皮细胞的分离培养以及鉴定

取体健适龄产妇的脐带，PBS冲洗，将注射器插入脐静脉，用粗丝线扎牢；注入PBS液灌净洗脐静脉；将脐带一端用止血钳夹闭，从另一端用注射器向脐静脉注入预热37℃的0.25%胰蛋白酶至血管充盈；37℃水浴中消化8-10min；收集消化液并终止消化，离心后接种于培养瓶，加入含10%胎牛血清的α-MEM培养液，置37℃、5%CO₂孵育箱中静止培养；

在6孔培养板按传代方法进行细胞接种，待细胞生长至近融合用PBS冲洗，放入乙醇-丙酮混合液中固定10min；分别滴加兔抗人CD-31抗原多抗工作液，37℃孵育60min；PBS冲洗浸泡10min；加入羊抗兔荧光抗体，37℃孵育30min；PBS冲洗浸泡15min；缓冲甘油封片；置于荧

光显微镜下观察；

1.1.3 MTT检测hUVECs增殖

将第二代hUVECs接种细胞于96孔培养板的7排孔中；每孔加入等体积10%FBS的α-MEM培养基，实验组加入等体积hUCMScs上清液，对照组加入等体积hUVECs上清液，培养7天；每天将一整排培养液吸出，PBS清洗两遍，给一排的前4孔每孔加入噻唑蓝溶液20μL,37℃孵育4小时，每孔加入DMSO150μL，避光震荡10分钟，然后在酶联免疫检测仪中590nm波长下检测吸光光度值；每天检测一排4个实验孔2个对照孔，检测7天。

3.根据权利要求2所述的脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法，其特征在于，所述二维直接共培养观察两种细胞形成的组织结构不同比例直接共培养两种细胞包括：

1.3.1以hUVECs:hUCMScs=1:1、3:1、5:1的比例，混合接种于六孔板的每个孔，每孔细胞总数维持在1*105个，每组重复三次；经过3天、7天、14天后4%多聚甲醛固定；

1.3.2免疫荧光染色

以免疫荧光检测CD-31表达为例，孔板或切片加入兔抗人CD-31孵育过夜；二抗用Alexa594红色驴抗兔，孵育4小时；Hoechst 33342衬染细胞核蓝色20秒；激光共聚焦显微镜下观察，CD-31红色，细胞核蓝色，以及二者之间的关系；相同方法检测Ⅷ因子和Col-VI。

4.根据权利要求3所述的脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法，其特征在于，所述兔颅骨极限缺损修复原位实验包括：

3.4.1兔脐带间充质干细胞和兔脐带静脉内皮细胞的分离、培养和鉴定

参照实验1.1.1和1.1.2人脐带间充质干细胞和人脐带静脉内皮细胞的分离、培养和鉴定的方法，选取相关兔的一抗进行实验；

3.4.2兔颅骨极限缺损修复

选取6月龄雄性新西兰大白兔，1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后制备直径2.0cm颅骨极限缺损；将实验3.2中得到的优化策略后的体系作为实验组，实验3.1得到的体系作为对照组分别植入兔颅骨极限缺损处，在不同时间点4w,8w,12w取材固定，后根据不同实验要求进行不同检测。

一种脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学技术领域,涉及一种脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法。

背景技术

[0002] 体外预血管化对于工程化组织、器官体内移植的成功至关重要。基于血管内皮细胞和生物支架材料的血管再生取得了一定进展,但如何在体外构建连续稳定的三维网状微血管系统仍不清楚。近来,研究发现脐带间充质干细胞具有多向分化潜能并能分泌多种促增殖和分化的细胞因子。我们前期的工作表明,脐带间充质干细胞能够参与并促进血管内皮细胞的增殖以及成血管分化。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法,该方法通过二维共培养不同比例血管内皮细胞和脐带间充质干细胞,研究脐带间充质干细胞促进血管内皮细胞增殖和成血管分化的规律。此外,通过高温熔融的单糖制作微米级网状微血管支架,溶解于水凝胶构建三维水凝胶阴模的连续微孔道培养体系,通过灌注并悬浮培养上述两种细胞,评价其体外构建的微血管网结构以及基于此结构的工程化骨组织体内移植的效果,并阐明其参与并促进微血管网构建的机制。本发明为工程化组织、器官的体外预管化提供新的解决方案以及实验基础。

[0004] 利用棉花糖机将融化的单糖喷射出的细丝,制成微米级单糖血管网,而后溶解于半固态水凝胶,形成三维微血管网阴模。在水凝胶体系内悬浮共培养脐带间充质干细胞和血管内皮细胞,同时,在阴模孔道体系灌注共培养上述两种种细胞,通过水凝胶阴模体系构建成血管物理微环境,脐带间充质干细胞构建成血管生物微环境,在体外构建微血管三维网状结构。最后,在动物体内验证这一预成血管化结构对工程化组织移植的促进作用。

[0005] 其具体技术方案为:

[0006] 一种脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法,包括以下步骤:

[0007] 1. 脐带间充质干细胞对血管再生微环境影响的实验

[0008] 1.1 人脐带间充质干细胞对人脐带静脉内皮细胞增殖的影响

[0009] 1.2 人脐带间充质干细胞对人脐带静脉内皮细胞成血管分化的影响

[0010] 1.2.1 Transwell间接共培养

[0011] 将hUVECs以1*105个/孔接种于六孔板内,待细胞增殖至80%,实验组和对照组分别在Transwell小室以5*105个/孔接种hUCMScs和hUVECs。经过3天、7天、14天后根据不同实验要求进行不同检测。

[0012] 1.2.2 Western Blot检测ERK1/2和p-ERK1/2

[0013] 将间接共培养后的hUVECs用冷的PBS洗两次后,加入裂解液+蛋白酶抑制剂(99:1)并用细胞刮收集,进行7.5% SDS-PAGE电泳,转至PVDF膜上。将膜5%脱脂牛奶封闭2小时,加

入兔抗ERK1/2和p-ERK1/2一抗,抗小鼠HRP二抗,ECL发光试剂检测。

[0014] 1.3二维直接共培养观察两种细胞形成的组织结构不同比例直接共培养两种细胞

[0015] 2.脐带间充质干细胞和脐带静脉内皮细胞共培养构建微血管网状结构的体外应用研究 2.1水凝胶三维连续微孔道网状阴模培养体系的构建

[0016] 利用棉花糖机将融化的单糖喷射出的细丝,缠绕形成微米级单糖细丝网结构,将水凝胶液态双组分剂按照1:1的比例混合后,将单糖细丝网浸没于液态组分中,光固化使水凝胶成为半固态。将这一体系置于40℃水域,将单糖细丝溶解,从而形成半固态水凝胶三维连续微孔道网阴模体系。

[0017] 2.2两种细胞不同比例悬浮灌注共培养构建体外微血管网

[0018] 将上述三维培养体系置于灌注培养发生器,将hUVECs:hUCMScs=1:1、3:1、5:1的比例悬浮于含10%胎牛血清的α-MEM培养液,进行灌注培养,流速为5ml/s。4小时更换含有不同比例细胞的培养液,经过3天、7天、14天后4%多聚甲醛固定,组织学切片后根据不同实验要求进行不同检测。

[0019] 2.3 H&E染色

[0020] 组织石蜡切片通过100%、95%、75%乙醇梯度脱蜡至水,苏木素染色5分钟后冲洗,盐酸酒精分化30秒。伊红染色2分钟后冲洗。通过75%、95%、100%乙醇梯度脱水至蜡。二甲苯透明后中性树胶封固片。

[0021] 2.4 Masson三色染色

[0022] 组织石蜡切片通过100%、95%、75%乙醇梯度脱蜡至水。weigert铁苏木素(weigert铁苏木素A、B液等比例混和)染5-10分,流水稍洗。1%盐酸酒精分化,流水冲洗数分。丽春红酸性品红染液染5-10分,流水稍冲洗。磷钼酸溶液处理约5分钟,不用水洗,直接用苯胺蓝人染液复染5分钟。1%冰醋酸处理1分钟,95%酒精脱水多次。无水酒精脱水、二甲苯透明,中性树胶封固。

[0023] 2.5免疫荧光染色

[0024] 组织石蜡切片通过100%、95%、75%乙醇梯度脱蜡至水后,根据1.3.2实验步骤进行CD-31、VIII因子和Col-VI的免疫荧光检测。

[0025] 3.脐带间充质干细胞和脐带静脉内皮细胞共培养构建的微血管网状结构促进工程化组织再生的体内应用研究

[0026] 3.1水凝胶三维微血管网阴模复合工程化骨支架材料的构建

[0027] 利用棉花糖机将融化的单糖喷射出的细丝,缠绕形成微米级单糖细丝网结构,将水凝胶液态双组分剂按照1:1的比例混合后,加入HA/TCP粉末,充分混合均匀。将单糖细丝网浸没于液态组分中,光固化使水凝胶成为半固态。将这一体系置于40℃水域,将单糖细丝溶解,从而形成复合骨支架材料的水凝胶三维连续微孔道阴模体系。

[0028] 3.2悬浮灌注共培养构建体外微血管网

[0029] 将hUVECs:hUCMScs=1:1、3:1、5:1的比例悬浮于含10%胎牛血清的α-MEM培养液,在实验3.1所述培养体系进行灌注培养,流速为5ml/s。4小时更换含有不同比例细胞的培养液,经过3天、7天、14天后,4%多聚甲醛固定,组织学切片后根据不同实验要求进行不同检测。

[0030] 3.3裸鼠皮下异位实验

[0031] 选取6周龄雄性裸鼠,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉裸鼠。将实验3.2中得到的优化策略后的体系作为实验组,实验3.1得到的体系作为对照组分别植入裸鼠皮下,在不同时间点(4w,8w,12w)取材固定,进行组织切片,后根据不同实验要求进行不同检测。

[0032] 3.4兔颅骨极限缺损修复原位实验

[0033] 3.5形态学观察

[0034] 根据实验2.3、2.4和2.5的步骤分别对实验3.3和3.4取得的组织学切片进行H&E染色、Masson三色染色和免疫荧光染色,观察形态学,成血管指标CD-31、VIII因子和Col-VI以及成骨情况的表达。

[0035] 3.6 Micro-CT检测骨缺损修复

[0036] 将实验3.3和3.4得到的样本于4℃使用4%多聚甲醛固定24小时。Micro-CT(SIEMENS)扫描取材样本并使用图形软件(MIMICS)三维重建分析颅骨缺损的修复情况。*t*检验进行统计分析。

[0037] 进一步,所述人脐带间充质干细胞对人脐带静脉内皮细胞增殖的影响包括:

[0038] 1.1.1人脐带间充质干细胞的分离培养以及鉴定

[0039] 取体健适龄产妇的脐带,剪成长约1.0cm的小段,洗净残留血液,去除脐动静脉,取Wharton胶剪碎至直径0.5cm大小的组织块,置于培养皿底贴壁,加入少量含10%胎牛血清的α-MEM培养液,4h后添加5mL培养液。

[0040] 取第三代hUCMScs,PBS液清洗冲悬。分装至EP管内,向每个EP管中加入2μL(1:500)的相关抗体CD29、CD31、CD34、CD44、CD45和CD105抗体,4℃孵育一个小时,离心冲洗掉多余抗体,3%FBS的PBS液离心冲悬至200μL,使用流式细胞仪检测其表面标志物的表达情况。

[0041] 1.1.2人脐带静脉内皮细胞的分离培养以及鉴定

[0042] 取体健适龄产妇的脐带,PBS冲洗,将注射器插入脐静脉,用粗丝线扎牢;注入PBS液灌净洗脐静脉;将脐带一端用止血钳夹闭,从另一端用注射器向脐静脉注入预热37℃的0.25%胰蛋白酶至血管充盈;37℃水浴中消化8-10min;收集消化液并终止消化,离心后接种于培养瓶,加入含10%胎牛血清的α-MEM培养液,置37℃、5%CO₂孵育箱中静止培养。

[0043] 在6孔培养板按传代方法进行细胞接种,待细胞生长至近融合用PBS冲洗,放入乙醇-丙酮混合液(1:1)中固定10min;分别滴加兔抗人CD-31抗原多抗工作液,37℃孵育60min;PBS冲洗浸泡10min;加入羊抗兔荧光抗体,37℃孵育30min;PBS冲洗浸泡15min;缓冲甘油封片;置于荧光显微镜下观察。

[0044] 1.1.3 MTT检测hUVECs增殖

[0045] 将第二代hUVECs接种细胞于96孔培养板的7排孔中。每孔加入等体积10%FBS的α-MEM培养基,实验组加入等体积hUCMScs上清液,对照组加入等体积hUVECs上清液,培养7天。每天将一整排培养液吸出,PBS清洗两遍,给一排的前4孔每孔加入噻唑蓝溶液(5μg/mL)20μL,37℃孵育4小时,每孔加入DMSO150μL,避光震荡10分钟,然后在酶联免疫检测仪中590nm波长下检测吸光光度值。每天检测一排4个实验孔2个对照孔,检测7天。

[0046] 再进一步,所述二维直接共培养观察两种细胞形成的组织结构不同比例直接共培养两种细胞包括:

[0047] 1.3.1以hUVECs:hUCMScs=1:1、3:1、5:1的比例,混合接种于六孔板的每个孔,每

孔细胞总数维持在1*105个左右,每组重复三次。经过3天、7天、14天后4%多聚甲醛固定。

[0048] 1.3.2免疫荧光染色

[0049] 以免疫荧光检测CD-31表达为例,孔板或切片加入兔抗人CD-31孵育过夜。二抗用Alexa594(红色)驴抗兔,孵育4小时。Hoechst 33342衬染细胞核(蓝色)20秒。激光共聚焦显微镜下观察,CD-31(红色),细胞核(蓝色),以及二者之间的关系。相同方法检测VIII因子和Col-VI。

[0050] 再进一步,所述兔颅骨极限缺损修复原位实验包括:

[0051] 3.4.1兔脐带间充质干细胞和兔脐带静脉内皮细胞的分离、培养和鉴定

[0052] 参照实验1.1.1和1.1.2人脐带间充质干细胞和人脐带静脉内皮细胞的分离、培养和鉴定的方法,选取相关兔的一抗进行实验。

[0053] 3.4.2兔颅骨极限缺损修复

[0054] 选取6月龄雄性新西兰大白兔,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后制备直径2.0cm颅骨极限缺损。将实验3.2中得到的优化策略后的体系作为实验组,实验3.1得到的体系作为对照组分别植入兔颅骨极限缺损处,在不同时间点(4w,8w,12w)取材固定,后根据不同实验要求进行不同检测。

[0055] 与现有技术相比,本发明的有益效果:

[0056] (1)首次证明脐带间充质干细胞参与并促进血管内皮细胞成血管化。

[0057] (2)体外构建连续贯通的三维微血管网状结构。

[0058] (3)证实体外构建的三维微血管网状结构的再生组织植入手内的优越性,为工程化组织再生的预血管化提供新的途径。

附图说明

[0059] 图1是脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法的流程图;

[0060] 图2是脐带间充质干细胞的倒置相差显微镜照片;

[0061] 图3是脐带静脉内皮细胞的倒置相差显微镜照片;

[0062] 图4是hUCMSCs是CD-29表达率100%;

[0063] 图5是hUCMSCs是CD-31表达率0.9%;

[0064] 图6是hUCMSCs是CD-34表达率0.8%;

[0065] 图7是hUCMSCs是CD-90表达率99.7%;

[0066] 图8是hUCMSCs是CD-105表达率91.6%;

[0067] 图9是hUCMSCs是CD-45表达率0.6%;

[0068] 图10是hUCMSCs是CD-106表达率14.5%;

[0069] 图11是hUCMSCs成骨诱导28天茜素红染色;

[0070] 图12是hUCMSCs成脂诱导21天油红O染色;

[0071] 图13是hUCMSCs是接种1000细胞培养7天后甲苯胺蓝染色;

[0072] 图14是hUCMSCs是CD-31染色倒置荧光显微镜照片;

[0073] 图15是hUCMSCs是VEGF染色倒置荧光显微镜照片;

[0074] 图16是hUCMSCs是VIII因子染色倒置荧光显微镜照片;

[0075] 图17是实验组与对照组OD值检测.*号代表组间显著差异,P<0.05;

- [0076] 图18是实验组与对照组VEGF通路相关指标的Western Blot检测的荧光条带；
[0077] 图19是实验组与对照组VEGF通路相关指标的Western Blot检测计量条状图,*号代表组间显著差异,P<0.05；
[0078] 图20是hUECs:hUCMScs为1:1时在水凝胶上二维形成管腔的荧光显微镜照片(低倍)；
[0079] 图21是hUECs:hUCMScs为1:1时在水凝胶上二维形成管腔的荧光显微镜照片(高倍)；
[0080] 图22是hUECs:hUCMScs为1:3时在水凝胶上二维形成管腔的荧光显微镜照片(低倍)；
[0081] 图23是hUECs:hUCMScs为1:3时在水凝胶上二维形成管腔的荧光显微镜照片(高倍)；
[0082] 图24是hUECs:hUCMScs为1:5时在水凝胶上二维形成管腔的荧光显微镜照片(低倍)；
[0083] 图25是hUECs:hUCMScs为1:5时在水凝胶上二维形成管腔的荧光显微镜照片(高倍)；
[0084] 图26是hUECs:hUCMScs为1:1时在三维悬浮灌注共培养构建体外微血管网倒置荧光显微镜照片；
[0085] 图27是hUECs:hUCMScs为1:3时在三维悬浮灌注共培养构建体外微血管网倒置荧光显微镜照片；
[0086] 图28是hUECs:hUCMScs为1:5时在三维悬浮灌注共培养构建体外微血管网倒置荧光显微镜照片；
[0087] 图29是hUECs:hUCMScs为1:1时直接构建体外血管网与骨支架移植与裸鼠皮下8周后 Masson三色染色；
[0088] 图30是hUECs:hUCMScs为1:1时直接构建体外血管网与骨支架移植与裸鼠皮下8周后 H&E染色；
[0089] 图31是hUECs:hUCMScs为1:3时直接构建体外血管网与骨支架移植与裸鼠皮下8周后 Masson三色染色；
[0090] 图32是hUECs:hUCMScs为1:1时直接构建体外血管网与骨支架移植与裸鼠皮下8周后 H&E染色；
[0091] 图33是hUECs:hUCMScs为1:5时直接构建体外血管网与骨支架移植与裸鼠皮下8周后 Masson三色染色；
[0092] 图34是hUECs:hUCMScs为1:5时直接构建体外血管网与骨支架移植与裸鼠皮下8周后 H&E染色。

具体实施方式

- [0093] 下面结合附图和具体实施方案对本发明的技术方案作进一步详细地说明。
[0094] 参照图1,一种脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法,包括以下步骤：
[0095] 1. 脐带间充质干细胞对血管再生微环境影响的实验研究

- [0096] 1.1人脐带间充质干细胞对人脐带静脉内皮细胞增殖的影响
- [0097] 1.1.1人脐带间充质干细胞的分离培养以及鉴定
- [0098] 取体健适龄产妇的脐带,剪成长约1.0cm的小段,洗净残留血液,去除脐动静脉,取Wharton胶剪碎至直径0.5cm大小的组织块,置于培养皿底贴壁,加入少量含10%胎牛血清的 α -MEM培养液,4h后添加5mL培养液。
- [0099] 取第三代hUCMScs,PBS液清洗冲悬。分装至EP管内,向每个EP管中加入2 μ L(1:500)的相关抗体CD29、CD31、CD34、CD44、CD45和CD105抗体,4℃孵育一个小时,离心冲洗掉多余抗体,3%FBS的PBS液离心冲悬至200 μ L,使用流式细胞仪检测其表面标志物的表达情况。
- [0100] 1.1.2人脐带静脉内皮细胞的分离培养以及鉴定
- [0101] 取体健适龄产妇的脐带,PBS冲洗,将注射器插入脐静脉,用粗丝线扎牢;注入PBS液灌净洗脐静脉;将脐带一端用止血钳夹闭,从另一端用注射器向脐静脉注入预热37℃的0.25%胰蛋白酶至血管充盈;37℃水浴中消化8-10min;收集消化液并终止消化,离心后接种于培养瓶,加入含10%胎牛血清的 α -MEM培养液,置37℃、5%CO₂孵育箱中静止培养。
- [0102] 在6孔培养板按传代方法进行细胞接种,待细胞生长至近融合用PBS冲洗,放入乙醇-丙酮混合液(1:1)中固定10min;分别滴加兔抗人CD-31抗原多抗工作液,37℃孵育60min; PBS冲洗浸泡10min;加入羊抗兔荧光抗体,37℃孵育30min;PBS冲洗浸泡15min;缓冲甘油封片;置于荧光显微镜下观察。
- [0103] 1.1.3 MTT检测hUVECs增殖
- [0104] 将第二代hUVECs接种细胞于96孔培养板的7排孔中。每孔加入等体积10%FBS的 α -MEM 培养基,实验组加入等体积hUCMScs上清液,对照组加入等体积hUVECs上清液,培养7天。每天将一整排培养液吸出,PBS清洗两遍,给一排的前4孔每孔加入噻唑蓝溶液(5 μ g/mL)20 μ L,37℃孵育4小时,每孔加入DMSO150 μ L,避光震荡10分钟,然后在酶联免疫检测仪中590nm波长下检测吸光光度值。每天检测一排4个实验孔2个对照孔,检测7天。
- [0105] 1.2人脐带间充质干细胞对人脐带静脉内皮细胞成血管分化的影响
- [0106] 1.2.1 Transwell间接共培养
- [0107] 将hUVECs以 $1*10^5$ 个/孔接种于六孔板内,待细胞增殖至80%,实验组和对照组分别在 Transwell小室以 $5*10^5$ 个/孔接种hUCMScs和hUVECs。经过3天、7天、14天后根据不同实验要求进行不同检测。
- [0108] 1.2.2 Western Blot检测ERK1/2和p-ERK1/2
- [0109] 将间接共培养后的hUVECs用冷的PBS洗两次后,加入裂解液+蛋白酶抑制剂(99:1)并用细胞刮收集,进行7.5%SDS-PAGE电泳,转至PVDF膜上。将膜5%脱脂牛奶封闭2小时,加入兔抗ERK1/2和p-ERK1/2一抗,抗小鼠HRP二抗,ECL发光试剂检测。
- [0110] 1.3二维直接共培养观察两种细胞形成的组织结构
- [0111] 1.3.1不同比例直接共培养两种细胞
- [0112] 以hUVECs:hUCMScs=1:1、3:1、5:1的比例,混合接种于六孔板的每个孔,每孔细胞总数维持在 $1*10^5$ 个左右,每组重复三次。经过3天、7天、14天后4%多聚甲醛固定。
- [0113] 1.3.2免疫荧光染色
- [0114] 以免疫荧光检测CD-31表达为例,孔板或切片加入兔抗人CD-31孵育过夜。二抗用

Alexa594(红色)驴抗兔,孵育4小时。Hoechst 33342衬染细胞核(蓝色)20秒。激光共聚焦显微镜下观察,CD-31(红色),细胞核(蓝色),以及二者之间的关系。相同方法检测VIII因子和Col-VI。

[0115] 2. 脐带间充质干细胞和脐带静脉内皮细胞共培养构建微血管网状结构的体外应用研究 2.1水凝胶三维连续微孔道网状阴模培养体系的构建

[0116] 利用棉花糖机将融化的单糖喷射出的细丝,缠绕形成微米级单糖细丝网结构,将水凝胶液态双组分剂按照1:1的比例混合后,将单糖细丝网浸没于液态组分中,光固化使水凝胶成为半固态。将这一体系置于40℃水域,将单糖细丝溶解,从而形成半固态水凝胶三维连续微孔道网阴模体系。

[0117] 2.2两种细胞不同比例悬浮灌注共培养构建体外微血管网

[0118] 将上述三维培养体系置于灌注培养发生器,将hUVECs:hUCMCSs=1:1、3:1、5:1的比例悬浮于含10%胎牛血清的α-MEM培养液,进行灌注培养,流速为5ml/s。4小时更换含有不同比例细胞的培养液,经过3天、7天、14天后4%多聚甲醛固定,组织学切片后根据不同实验要求进行不同检测。

[0119] 2.3 H&E染色

[0120] 组织石蜡切片通过100%、95%、75%乙醇梯度脱蜡至水,苏木素染色5分钟后冲洗,盐酸酒精分化30秒。伊红染色2分钟后冲洗。通过75%、95%、100%乙醇梯度脱水至蜡。二甲苯透明后中性树胶封固片。

[0121] 2.4 Masson三色染色

[0122] 组织石蜡切片通过100%、95%、75%乙醇梯度脱蜡至水。weigert铁苏木素(weigert 铁苏木素A、B液等比例混和)染5-10分,流水稍洗。1%盐酸酒精分化,流水冲洗数分。丽春红酸性品红染液染5-10分,流水稍冲洗。磷钼酸溶液处理约5分钟,不用水洗,直接用苯胺蓝人染液复染5分钟。1%冰醋酸处理1分钟,95%酒精脱水多次。无水酒精脱水、二甲苯透明,中性树胶封固。

[0123] 2.5免疫荧光染色

[0124] 组织石蜡切片通过100%、95%、75%乙醇梯度脱蜡至水后,根据1.3.2实验步骤进行CD-31、VIII因子和Col-VI的免疫荧光检测。

[0125] 3. 脐带间充质干细胞和脐带静脉内皮细胞共培养构建的微血管网状结构促进工程化组织再生的体内应用研究

[0126] 3.1水凝胶三维微血管网阴模复合工程化骨支架材料的构建

[0127] 利用棉花糖机将融化的单糖喷射出的细丝,缠绕形成微米级单糖细丝网结构,将水凝胶液态双组分剂按照1:1的比例混合后,加入HA/TCP粉末,充分混合均匀。将单糖细丝网浸没于液态组分中,光固化使水凝胶成为半固态。将这一体系置于40℃水域,将单糖细丝溶解,从而形成复合骨支架材料的水凝胶三维连续微孔道网阴模体系。

[0128] 3.2悬浮灌注共培养构建体外微血管网

[0129] 将hUVECs:hUCMCSs=1:1、3:1、5:1的比例悬浮于含10%胎牛血清的α-MEM培养液,在实验3.1所述培养体系进行灌注培养,流速为5ml/s。4小时更换含有不同比例细胞的培养液,经过3天、7天、14天后,4%多聚甲醛固定,组织学切片后根据不同实验要求进行不同检测。

[0130] 3.3裸鼠皮下异位实验

[0131] 选取6周龄雄性裸鼠,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉裸鼠。将实验3.2中得到的优化策略后的体系作为实验组,实验3.1得到的体系作为对照组分别植入裸鼠皮下,在不同时间点(4w,8w,12w)取材固定,进行组织切片,后根据不同实验要求进行不同检测。

[0132] 1.4兔颅骨极限缺损修复原位实验

[0133] 3.4.1兔脐带间充质干细胞和兔脐带静脉内皮细胞的分离、培养和鉴定

[0134] 参照实验1.1.1和1.1.2人脐带间充质干细胞和人脐带静脉内皮细胞的分离、培养和鉴定的方法,选取相关兔的一抗进行实验。

[0135] 3.4.2兔颅骨极限缺损修复

[0136] 选取6月龄雄性新西兰大白兔,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后制备直径2.0cm颅骨极限缺损。将实验3.2中得到的优化策略后的体系作为实验组,实验3.1得到的体系作为对照组分别植入兔颅骨极限缺损处,在不同时间点(4w,8w,12w)取材固定,后根据不同实验要求进行不同检测。

[0137] 3.5形态学观察

[0138] 根据实验2.3、2.4和2.5的步骤分别对实验3.3和3.4取得的组织学切片进行H&E染色、Masson三色染色和免疫荧光染色,观察形态学,成血管指标CD-31、VIII因子和Col-I-VI以及成骨情况的表达。

[0139] 3.6 Micro-CT检测骨缺损修复

[0140] 将实验3.3和3.4得到的样本于4℃使用4%多聚甲醛固定24小时。Micro-CT(SIEMENS)扫描取材样本并使用图形软件(MIMICS)三维重建分析颅骨缺损的修复情况。t检验进行统计分析。

[0141] 实施例

[0142] 1.脐带间充质干细胞的原代细胞培养。如图2所示。

[0143] 2.脐带静脉内皮细胞原代培养。如图3所示。

[0144] 3.脐带间充质干细胞表面标志物检测。如图4-图10所示。

[0145] 4.脐带间充质干细胞成骨分化检测。如图11所示。

[0146] 5.脐带间充质干细胞成脂分化检测。如图12所示。

[0147] 6.脐带间充质干细胞克隆形成率染色。如图13所示。

[0148] 7.脐带静脉内皮细胞阳性表达CD-31。如图14所示。

[0149] 8.脐带静脉内皮细胞阳性表达VEGF。如图15所示。

[0150] 9.脐带静脉内皮细胞阳性表达VIII因子。如图16所示。

[0151] 10.hUCMScs促进hUVECs增殖。

[0152] 图17所示,通过实验组hUCMScs上清液和对照组hUVECs上清液间接培养hUVECs 7天。如图5,前3天,两组脐带静脉内皮细胞的OD值没有显著差异。从第4天至第7天hUCMScs上清液诱导的hUVECs吸光光度值明显高于对照组,说明hUCMScs显著促进hUVECs增殖。如图18-图19所示。通过Transwell间接共培养7天,实验组是hUCMScs和hUVECs,对照组是hUVECs和hUVECs。提取hUVEC的蛋白进行VEGF信号通路的ERK1/2和p-ERK1/2的 Western Blot检测,如图7,结果实验组的ERK1/2和p-ERK1/2均显著高于对照组,其中实验组高于对照组将近两倍,表明hUVECs的VEGF通路的MAPK通路被激活,结果证实hUCMScs 促进了hUVECs的成

血管分化。

[0153] 11.hUCMSCs促进hUVECs在体外二维界面上成管腔能力

[0154] 如图20-图25所示,结果显示,当hUVECs:hUCMSCs为1:5时,在水凝胶二维体系中,形成的微管腔结构数量最多,形态结构最完整,最符合微血管再生需要。

[0155] 12.hUCMSCs促进hUVECs在体外三维界面上成管腔能力

[0156] 如图26-图28所示,结果显示,当hUVECs:hUCMSCs为1:5时,在三维悬浮灌注共培养构建体外微血管网中,静脉内皮细胞对管腔内壁的贴附最佳,细胞数量最多。

[0157] 13.hUCMSCs促进hUVECs体内成血管进而促进异位骨再生。如图29-图34所示,结果显示,在三维悬浮灌注共培养构建体外微血管网与骨支架材料混合后植入裸鼠皮下8周后,在 hUCMSCs:hUVECs为5:1时实验组中裸鼠皮下异位成骨最佳。

[0158] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,本发明的保护范围不限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,可显而易见地得到的技术方案的简单变化或等效替换均落入本发明的保护范围内。

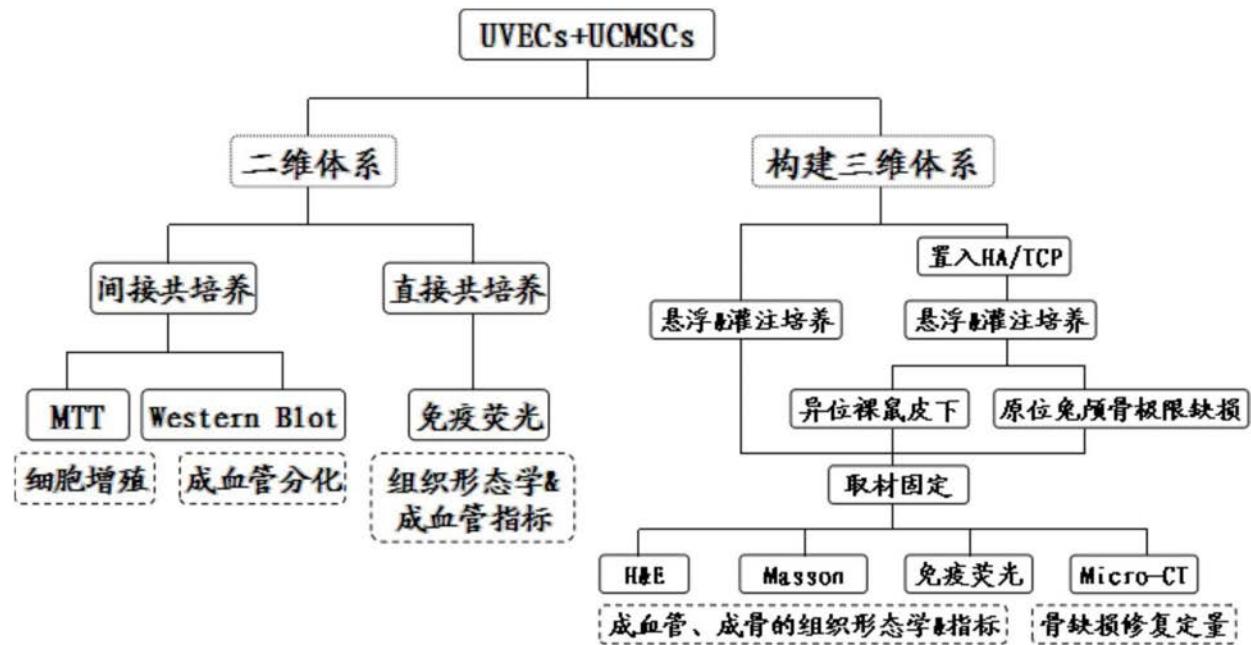


图1

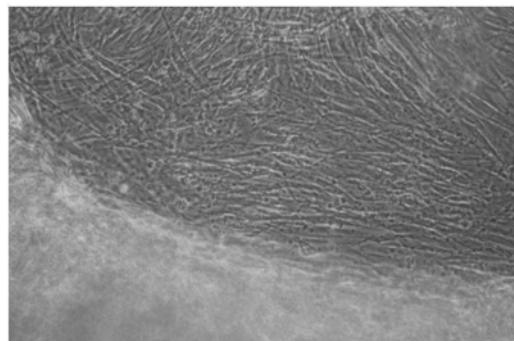


图2

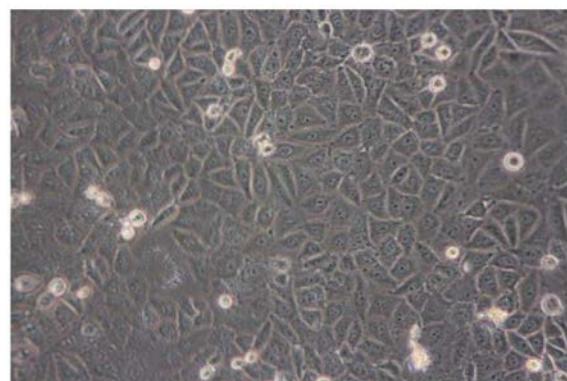


图3

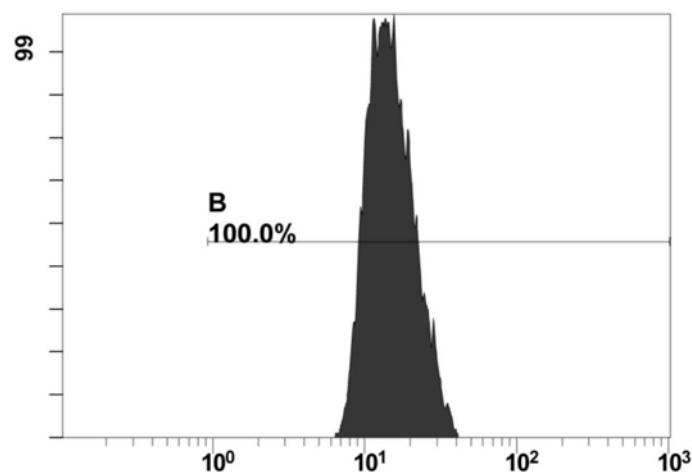


图4

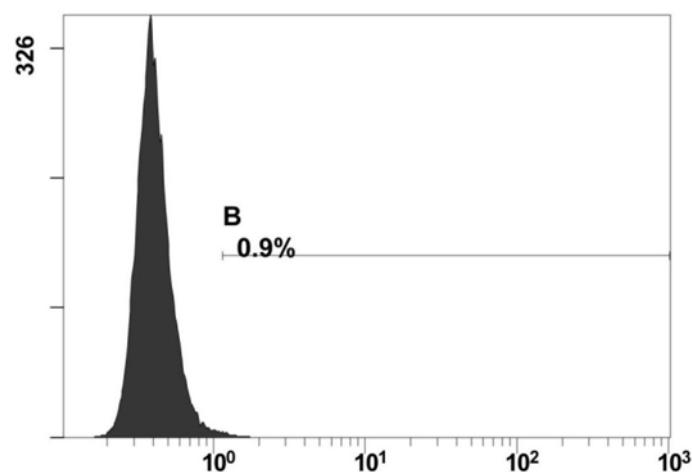


图5

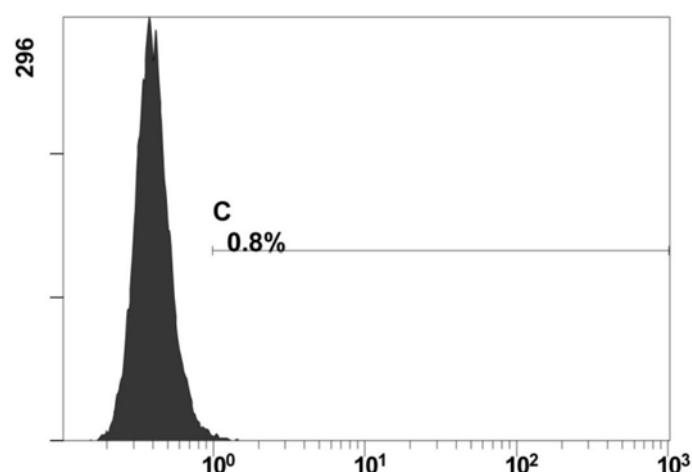


图6

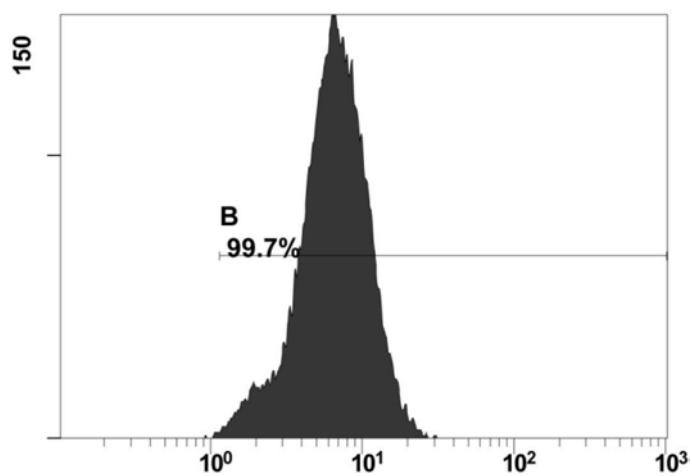


图7

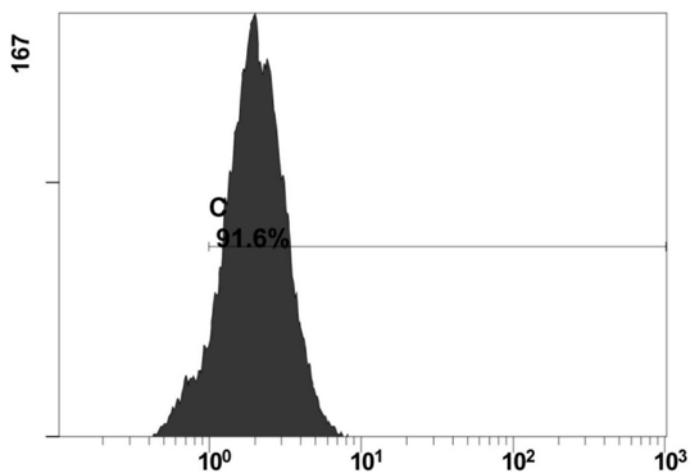


图8

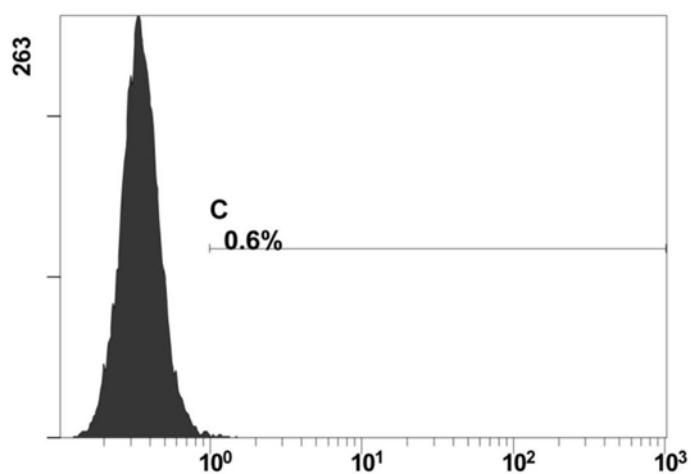


图9

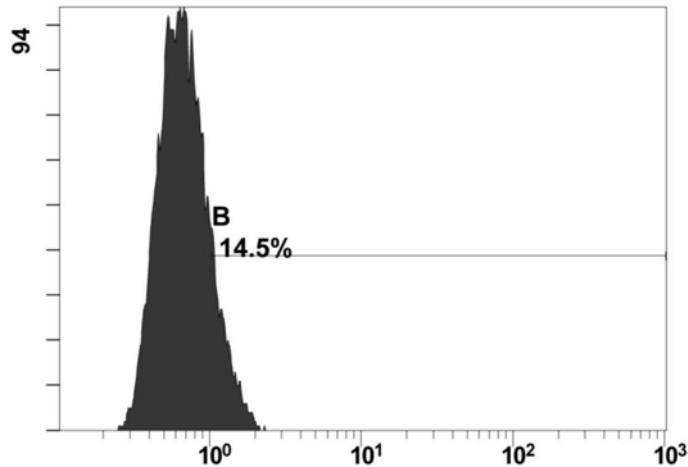


图10

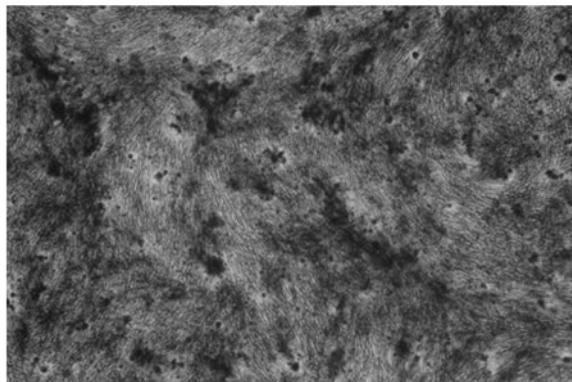


图11

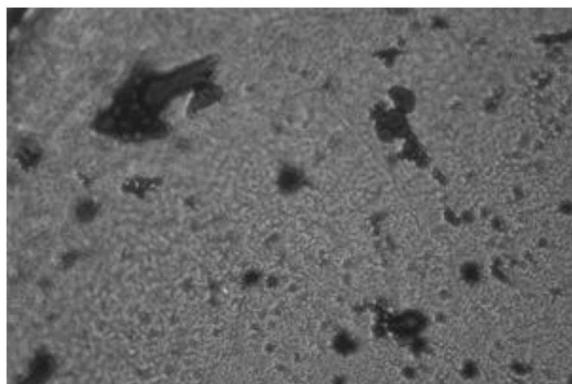


图12

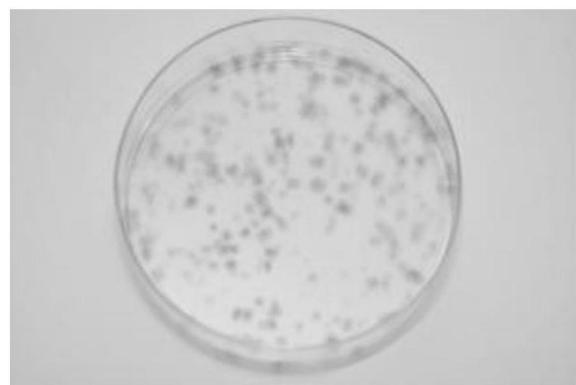


图13

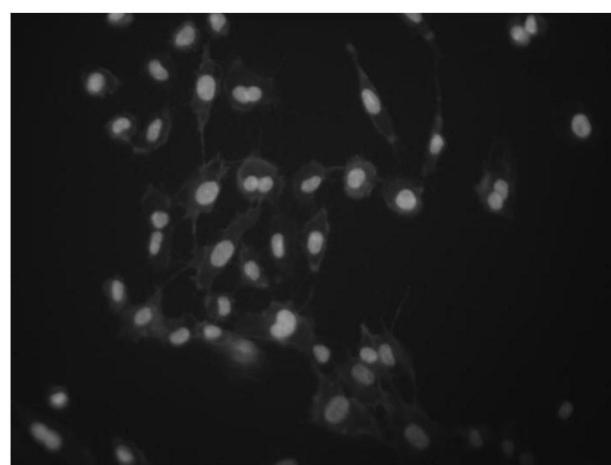


图14

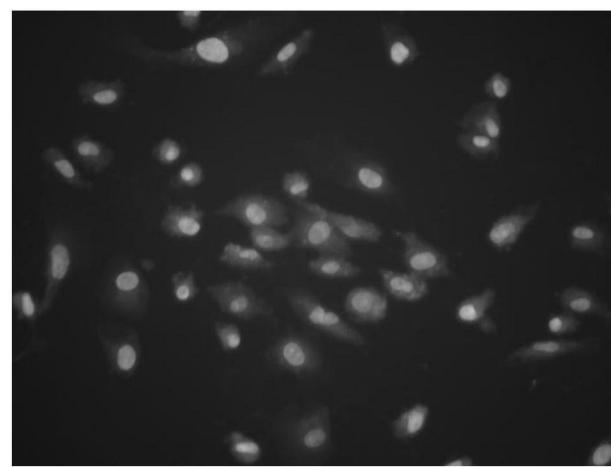


图15

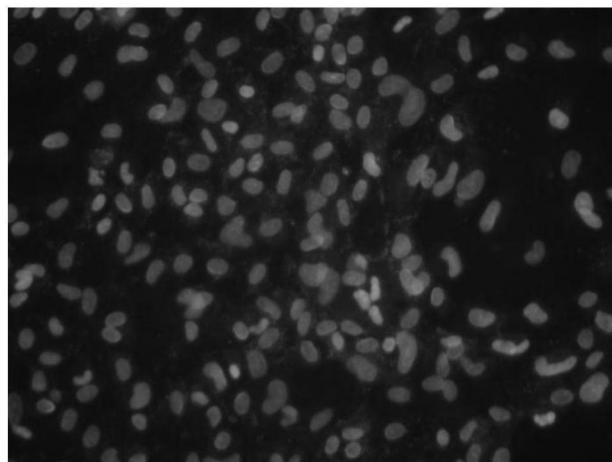


图16

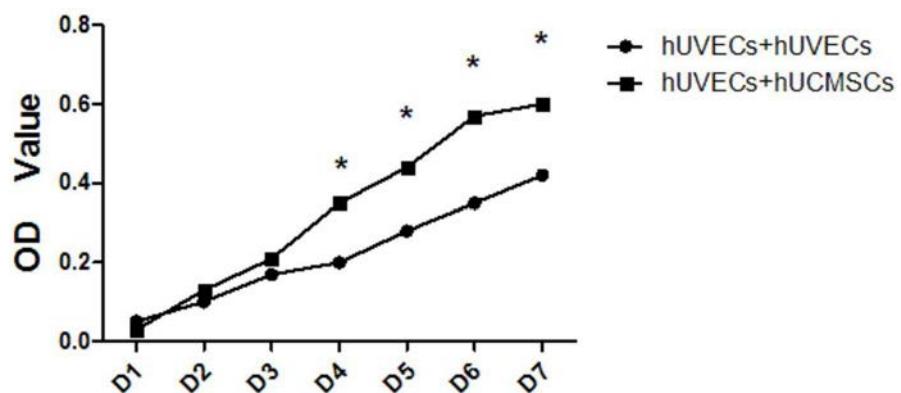


图17

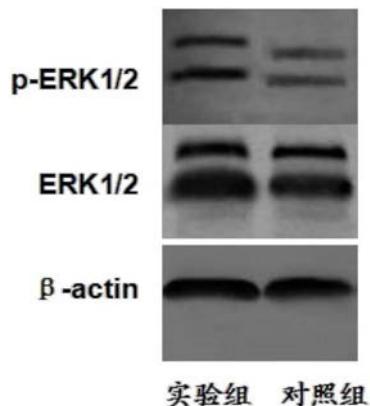


图18

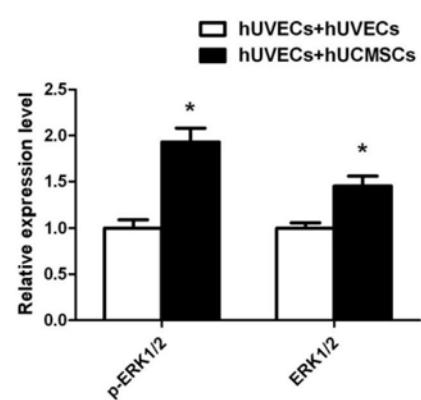


图19

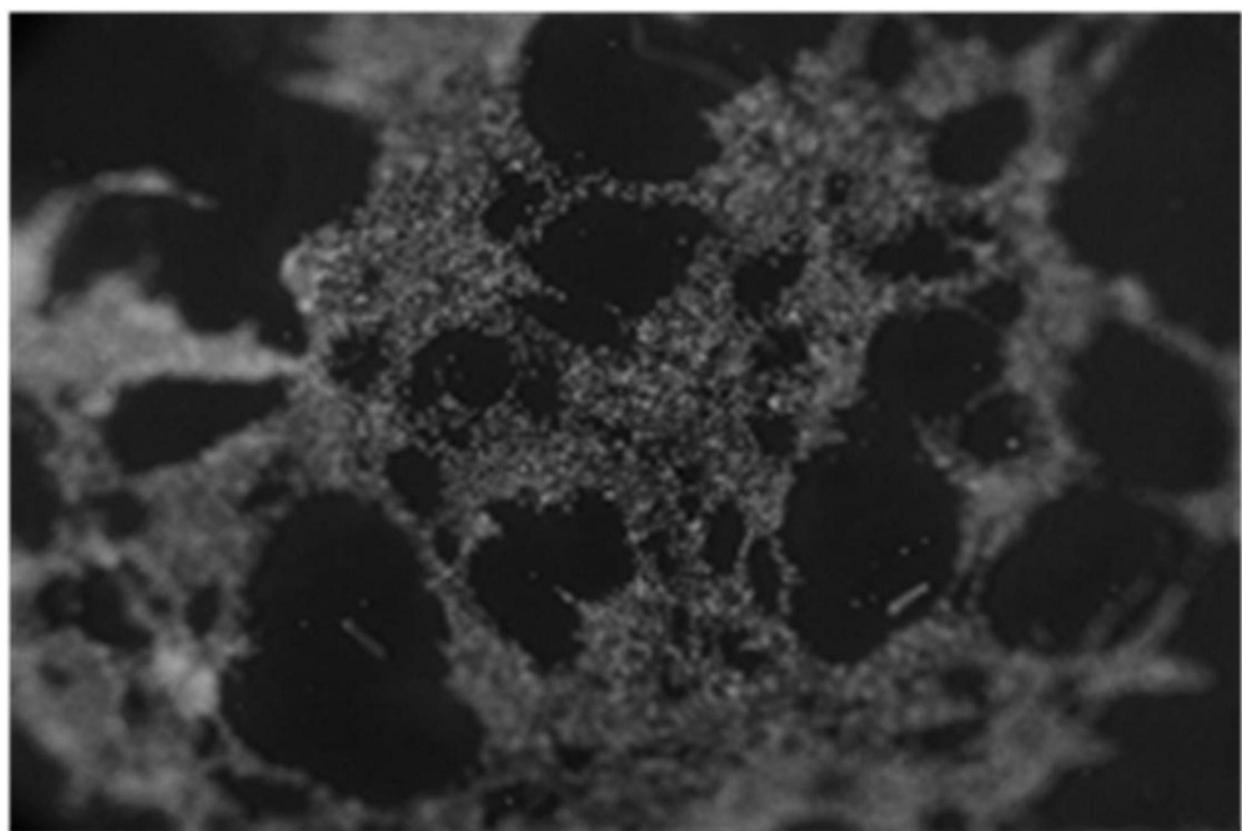


图20

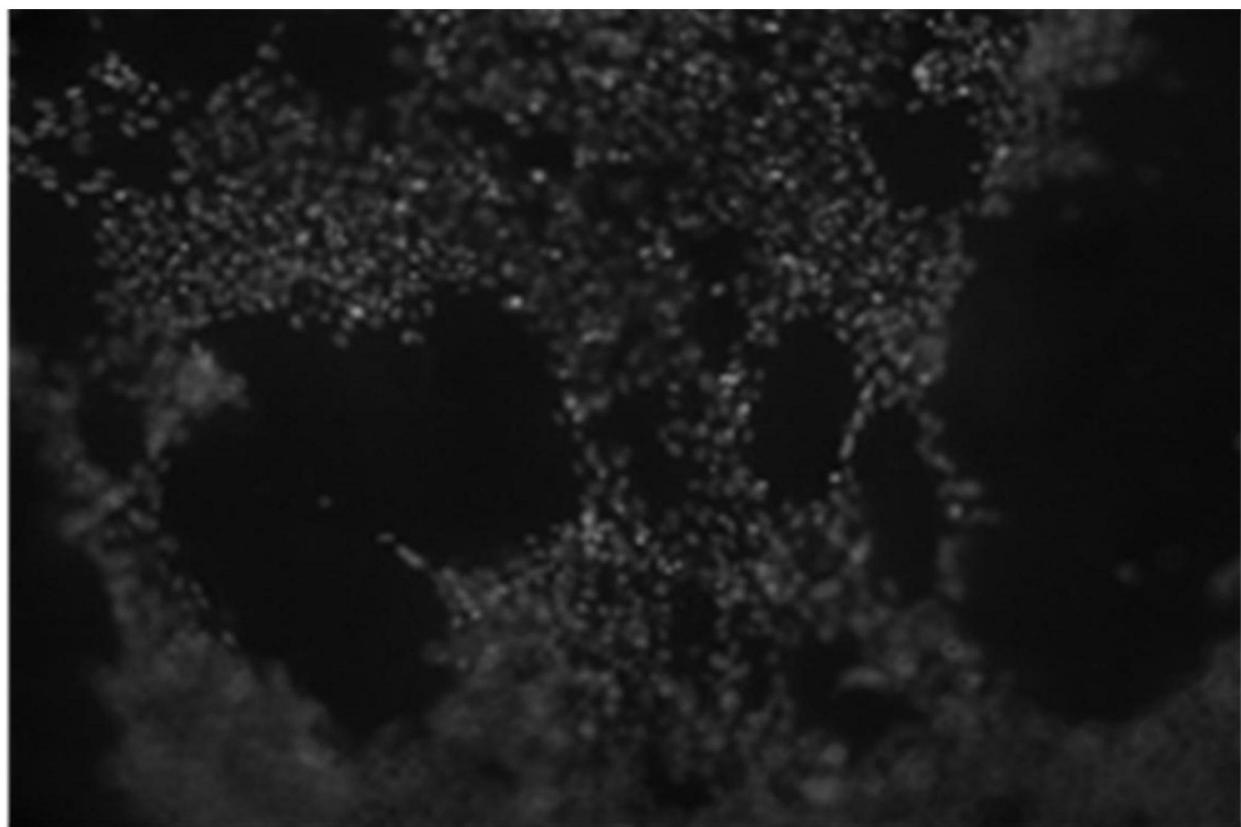


图21

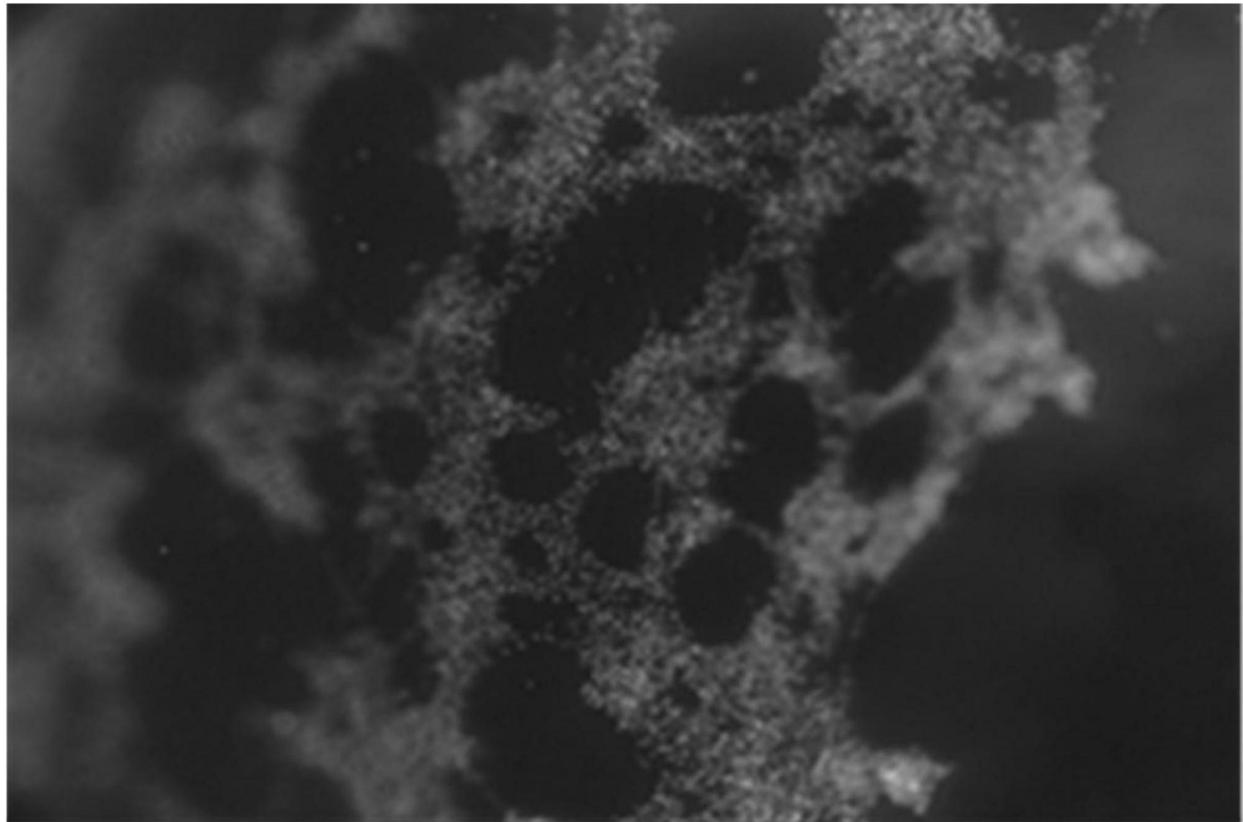


图22

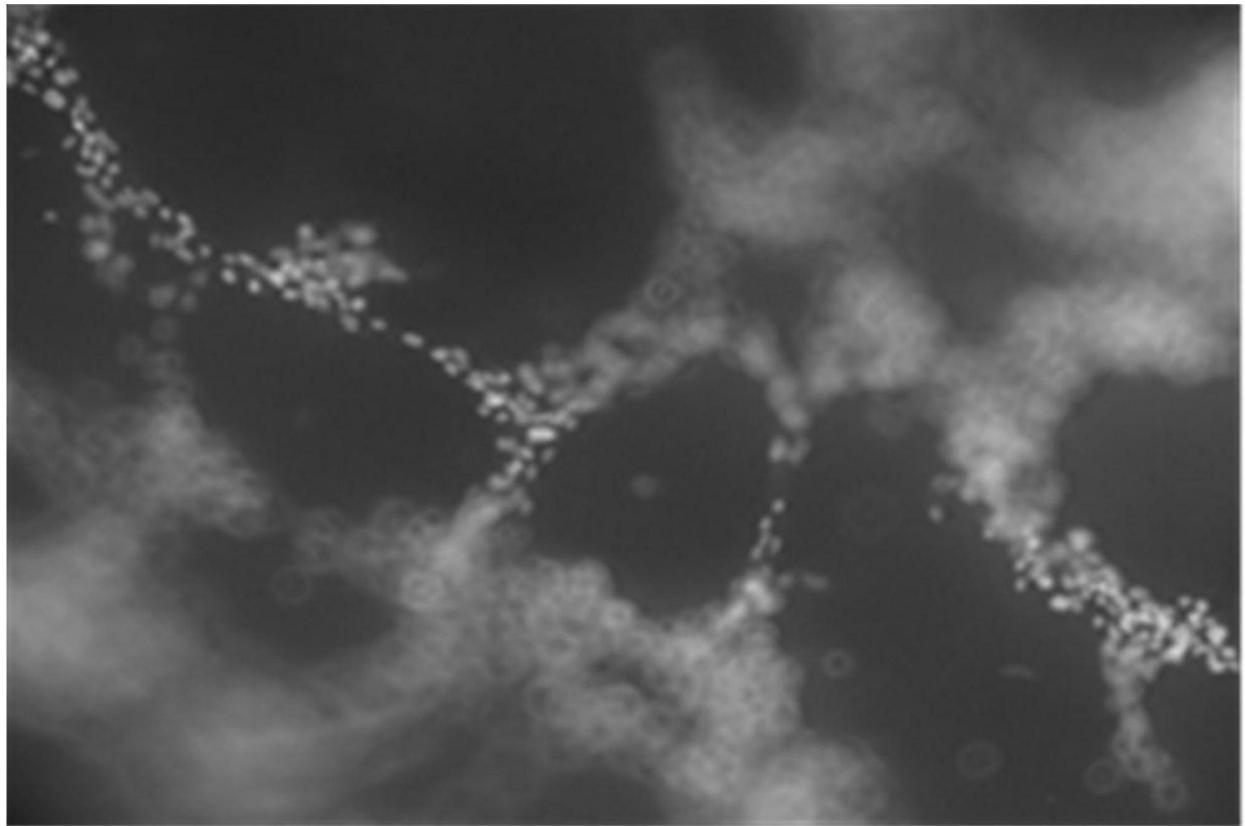


图23

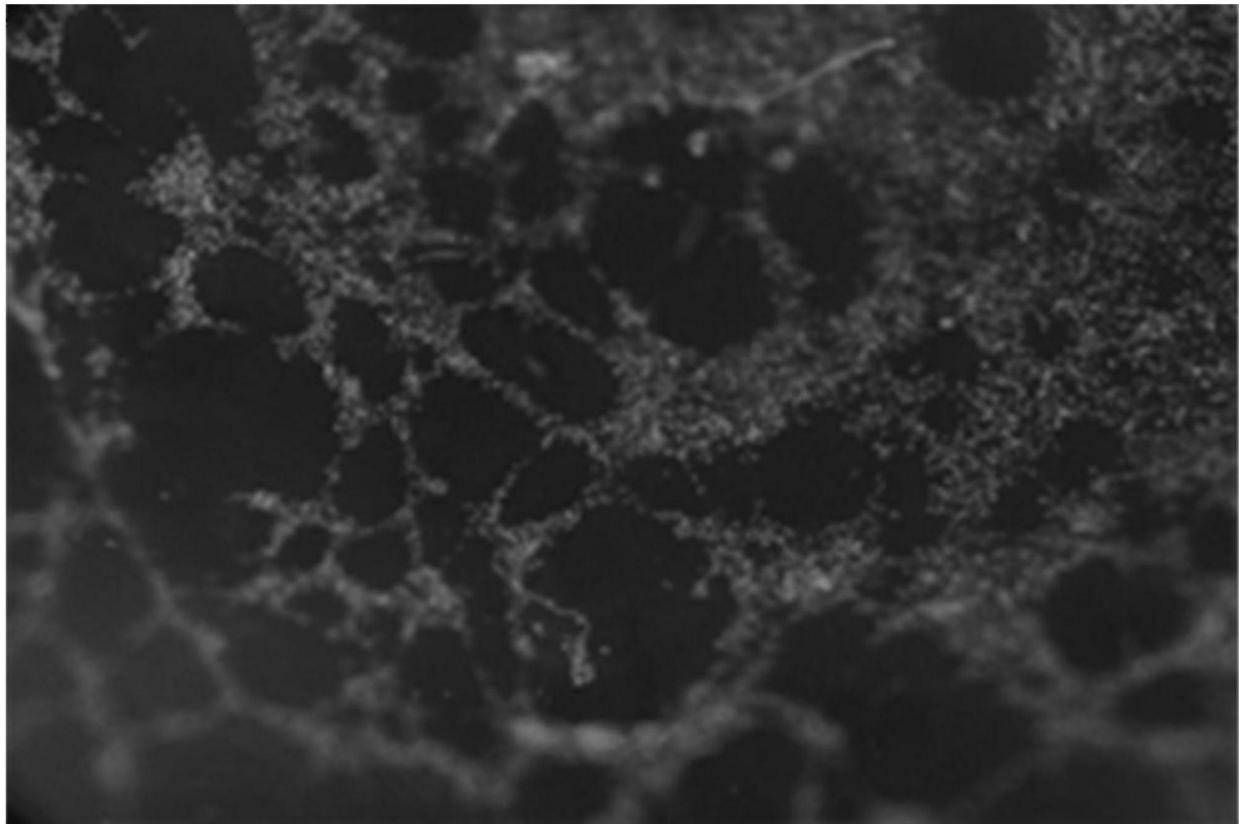


图24

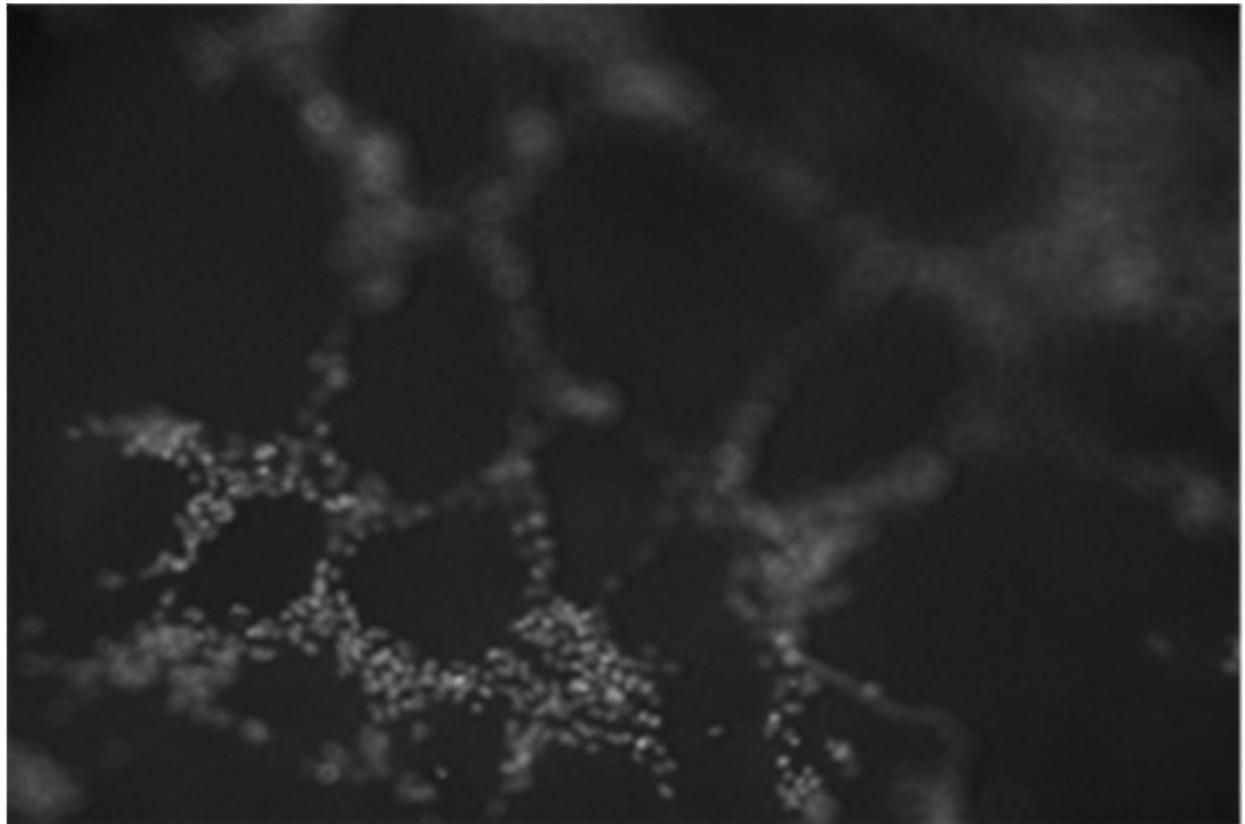


图25

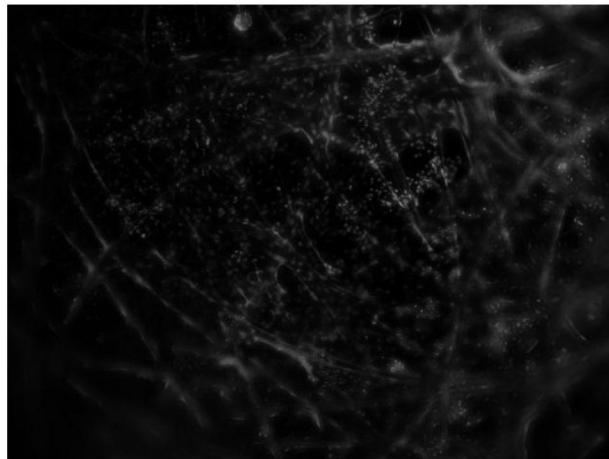


图26

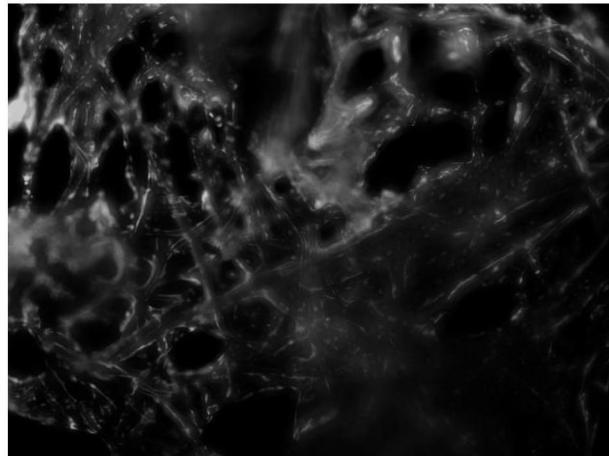


图27

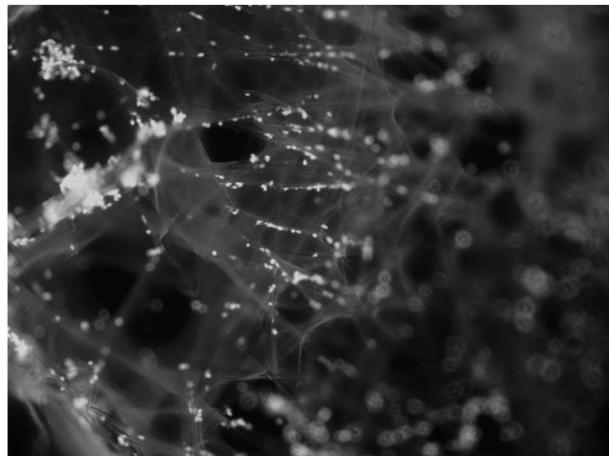


图28

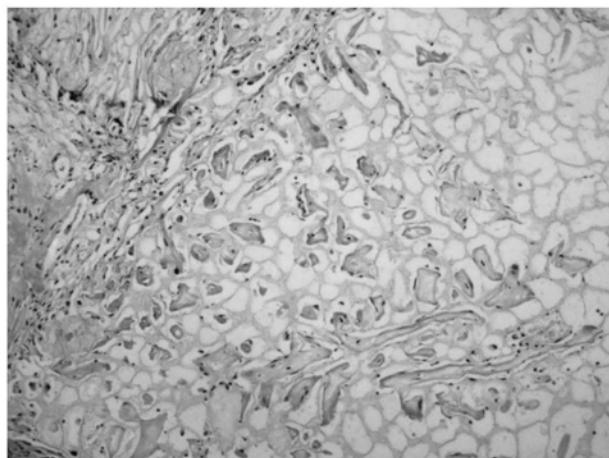


图29

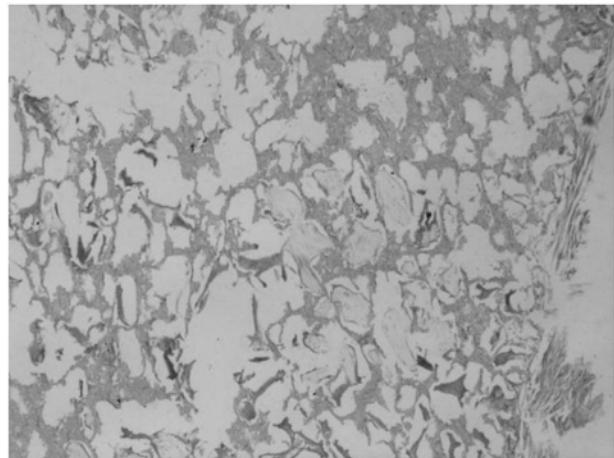


图30

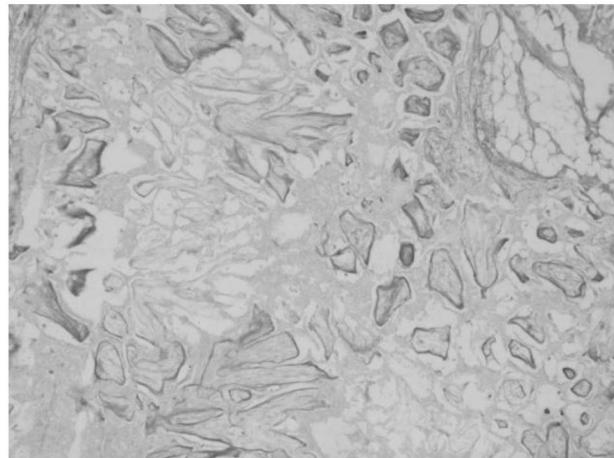


图31



图32

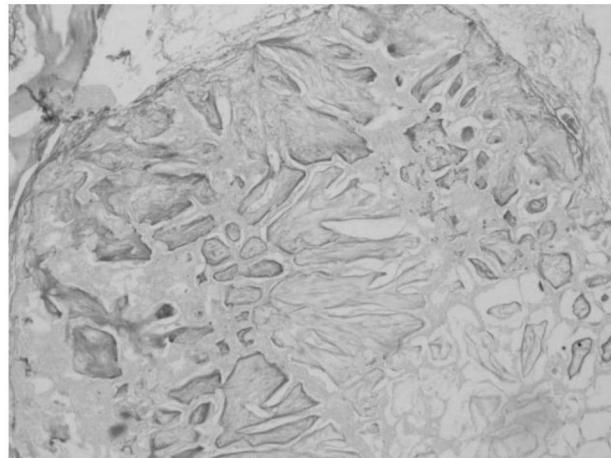


图33

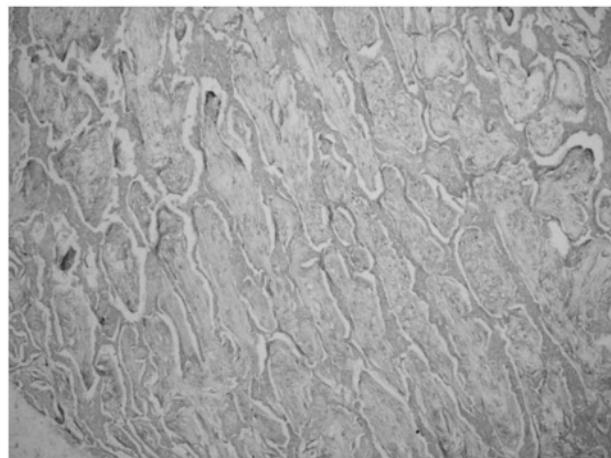


图34

专利名称(译)	一种脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法		
公开(公告)号	CN107748260A	公开(公告)日	2018-03-02
申请号	CN201710757400.0	申请日	2017-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	西安组织工程与再生医学研究所		
申请(专利权)人(译)	西安组织工程与再生医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	西安组织工程与再生医学研究所		
[标]发明人	朱斌 张浩 刘世宇 安莹 邱新毓 金岩		
发明人	朱斌 张浩 刘世宇 安莹 邱新毓 金岩		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/68 G01N33/533 G01N33/50 G01N15/14 G01N21/84 G01N1/30		
CPC分类号	G01N1/30 G01N15/14 G01N21/84 G01N33/5005 G01N33/533 G01N33/582 G01N33/6803 G01N2015/0065 G01N2015/1006		
代理人(译)	董芙蓉		
其他公开文献	CN107748260B		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种脐带间充质干细胞促进组织工程预血管化的实验方法，该方法通过二维共培养不同比例血管内皮细胞和脐带间充质干细胞，研究脐带间充质干细胞促进血管内皮细胞增殖和成血管分化的规律。此外，通过高温熔融的单糖制作微米级网状微血管支架，溶解于水凝胶构建三维水凝胶阴模的连续微孔道培养体系，通过灌注并悬浮培养上述两种细胞，评价其体外构建的微血管网结构以及基于此结构的工程化骨组织体内移植的效果，并阐明其参与并促进微血管网构建的机制。本发明为工程化组织、器官的体外预管化提供新的解决方案以及实验基础。

