



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102559586 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201110404587. 9

(22) 申请日 2011. 12. 08

(71) 申请人 遵义医学院附属医院

地址 563000 贵州省遵义市大连路 149 号

(72) 发明人 方宁 陈代雄

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所

52100

代理人 吴无惧

(51) Int. Cl.

C12N 5/0735 (2010. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 15/10 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一种人羊膜间充质干细胞的分离纯化及鉴定方法

(57) 摘要

本发明公开了一种人羊膜间充质干细胞的分离纯化及鉴定方法, hAMSCs 的分离方法为将人羊膜剪成碎片, 用 EDTA 的胰蛋白酶, DNaseI 的胶原酶分二步旋转消化, 用钢网过滤, 收集细胞滤液即为分离的原始 hAMSCs ;hAMSCs 的纯化方法是原始 hAMSCs 用 LG-DMEM 培养基置于 CO₂ 培养箱培养, 在倒置显微镜下除去完全未贴壁生长的羊膜上皮细胞, 第 3 天更换新的培养基, 待细胞汇合度达 80~90% 后, 用胰蛋白酶—EDTA 溶液消化收集细胞即可获得高纯度的 hAMSCs ;hAMSCs 的鉴定方法采用免疫细胞化学染色波形蛋白和 CK19 以鉴别 hAMSCs 和羊膜上皮细胞, 采用流式细胞术检测 CD29、CD44、CD166、CD34 和 CD45 的表达。本发明方法具有 hAMSCs 高收率、高活性、高纯度优点, 鉴定方法简便、精准。

1. 一种人羊膜间充质干细胞的分离纯化方法,其特征在于:包括以下步骤:

第一,无菌采集人足月剖宫产胎盘,机械法将羊膜从胎盘组织上剥离,用 D-Hank' s 液冲洗数次以清除残留血迹,将羊膜剪成碎片;

第二,羊膜碎片加入含 0.02%EDTA 的 0.05% 胰蛋白酶消化溶液,于 37° C,旋转消化弃上清;重新加入消化液,于 37° C 旋转消化弃上清,留取未消化的羊膜碎片;

第三, D-Hank' s 液冲洗未消化的羊膜碎片,加入含有 0.075 mg/ml DNase I 的 0.75 mg/ml 的胶原酶,于 37° C,旋转消化约 2 h 至组织完全消化,300 目钢网过滤,收集细胞滤液,离心得到原始的人羊膜间充质干细胞;

第四,将分离的原始的人羊膜间充质干细胞重新悬浮于 LG-DMEM 培养基中,将细胞密度接种于 6 孔培养板,置于 CO₂ 培养箱培养,在倒置显微镜下除去完全未贴壁生长的羊膜上皮细胞,第 3 天更换新的培养基;待细胞汇合度达 80~90% 后,用胰蛋白酶—EDTA 溶液消化,加入培养基终止胰蛋白酶作用,离心弃上清,细胞沉淀用培养基重新悬浮,以 1×10⁷/L 的细胞密度传代。

2. 根据权利要求 1 所述的一种人羊膜间充质干细胞的分离纯化方法得到的人羊膜间充质干细胞的鉴定方法,其特征在于:包括以下步骤:

第一,免疫细胞化学染色:人羊膜间充质干细胞爬片用 PBS 缓冲液漂洗,多聚甲醛固定,PBS 漂洗,Triton-X100 作用 15~20 min, H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,PBS 漂洗,加正常羊血清封闭,滴加波形蛋白抗体或鼠抗人 CK19 抗体室温孵育,PBS 漂洗,滴加鼠兔通用型二抗室温孵育,PBS 漂洗,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封固,光学显微镜下观察,阴性对照组用 PBS 替代一抗;

第二,流式细胞术分析:调整人羊膜间充质干细胞密度为 1×10⁶/ml,每管 200 μL 细胞悬液,共 3 管,分别加入各 20 μL 荧光标记单抗 CD29-PE+CD44-FITC、CD34-PE+CD45-FITC 和 CD166-PE,混匀,室温避光孵育,每管加 2 ml 含 1 g/L NaN₃ 的磷酸盐缓冲液,混匀,离心弃上清,振荡悬浮细胞,每管加入 10 μg/L 多聚甲醛 300 μL,混匀,用流式细胞仪检测,用 Cell Quest 软件进行采集分析,用小鼠 IgG-FITC 或 IgG-PE 作为同型对照。

一种人羊膜间充质干细胞的分离纯化及鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种人羊膜间充质干细胞的分离、纯化及鉴定方法。

背景技术

[0002] 人羊膜间充质干细胞(human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs)发源于胚胎早期的胚外中胚层,具有与骨髓间充质干细胞相似的表型,如表达 SSEA-4、OCT-4、CD29、CD44、CD73、CD90、CD166 及波形蛋白,而不表达 CD34、CD45、CD80、CD86 及 HLA-DR;具有多系分化潜能,在适宜诱导条件下可分化成肝细胞、骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、胰岛细胞、神经元样细胞等;具有来源广泛,取材方便、无侵入性伤害、不牵涉医学伦理问题等优势,因此,hAMSCs 作为供体细胞资源在再生医学领域具有广泛的应用前景。此外,MSCs 还具有免疫调节作用,在器官移植、血液系统疾病和自身免疫性疾病的临床治疗领域显现出优于传统治疗的独特价值。

[0003] hAMSCs 的制备过程涉及 hAMSCs 的分离、纯化、鉴定、体外培养扩增等技术环节。目前关于 hAMSCs 的分离、纯化、鉴定尚无统一方案。hAMSCs 的分离方法有胰蛋白酶-胶原酶液化、胶原酶-中性蛋白酶、羊膜片贴壁培养分离等方法,酶消化法相对简便,而贴壁培养分离较为烦琐且收率不高。各家在采用胰蛋白酶-胶原酶液化法分离 hAMSCs 时所用胰蛋白酶和胶原酶的浓度、消化温度、消化时间等条件各不相同,分离效果(收率)存在较大差异,迄今尚无具有统计学意义的每份人羊膜的 hAMSCs 收率数据。hAMSCs 的纯化方法多采用原始分离样品贴壁培养。hAMSCs 的鉴定主要根据其表型特征通过高能量流式细胞术、免疫组织化学染色、免疫荧光检测 hAMCs 标志物,如 CD14、CD29、CD34、CD44、CD45、CD90、HLA-DR、SSEA-4、OCT-4 等;少数采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测其相关基因及全能性相关基因表达,如 LEFTYA、Cripto、Sox2、Nanog、Oct-4、ACTG2、ACTA2、MMP2 等。目前不仅缺乏统一的 hAMSCs 鉴定标准,而且存在诸多问题:①受检样品不一致,原代和传代细胞的表型标志不尽相同;② hAMCs 与羊膜上皮细胞的阳性标志物有交叉,如 CD44、CD90、SSEA-4、OCT-4 等,阴性标志物也有交叉如 CD14、CD34、CD45、HLA-DR 等,单凭这些标志物的检测不能区分 hAMCs 与羊膜上皮细胞;③有的检测方法如原位免疫组织化学染色和免疫荧光染色不能反映细胞群体的标志特征,有的检测方法如 PCR 较为烦琐且成本较高。

[0004] 鉴于上述存在的问题,本发明提供了一种人羊膜间充质干细胞的分离、纯化及鉴定方法,是一种高丰度、高纯度、高活力的分离方法、简便而明确的鉴定指标和适宜的体外扩增培养方案。

发明内容

[0005] 本发明解决的技术问题是:现有技术存在的问题,本发明提供了一种高收率、高纯度、高活力的人羊膜间充质干细胞分离、纯化方法以及简便、准确的人羊膜间充质干细胞鉴定方法。

[0006] 本发明采用的技术方案为：

本发明的人羊膜间充质干细胞的分离,包括以下步骤：

第一,无菌采集人足月剖宫产胎盘,机械法将羊膜从胎盘组织上剥离,用 D-Hank' s 液冲洗数次以清除残留血迹,将羊膜剪成碎片；

第二,羊膜碎片加入含 EDTA 的胰蛋白酶消化溶液旋转消化 10 分钟,弃上清；重新加入消化液,旋转消化弃上清,留取未消化的羊膜碎片；

第三,D-Hank' s 液冲洗未消化的羊膜碎片,加入含有 DNase I 的胶原酶,旋转消化至组织完全消化,300 目钢网过滤,收集细胞滤液,离心,收集细胞沉淀,得到原始的人羊膜间充质干细胞；

第四,将分离的原始的人羊膜间充质干细胞重新悬浮于 LG-DMEM 培养基(购自 Gibco 公司,货号:31600-026)中,将细胞密度接种于 6 孔培养板,置于 CO₂ 培养箱培养,在倒置显微镜下除去完全未贴壁生长的羊膜上皮细胞,第 3 天更换新的培养基；待细胞汇合度达 80~90% 后,用胰蛋白酶—EDTA 溶液消化,加入培养基终止胰蛋白酶作用,离心弃上清,细胞沉淀用培养基重新悬浮,以 1×10^7 /L 的细胞密度传代。

[0007] 本发明的人羊膜间充质干细胞的鉴定方法,包括以下步骤：

第一,免疫细胞化学染色:人羊膜间充质干细胞爬片用 PBS 缓冲液漂洗,多聚甲醛固定,PBS 漂洗,Triton-X100 作用 15~20 min, H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,PBS 漂洗,加正常羊血清封闭,滴加波形蛋白抗体或鼠抗人 CK19 抗体室温孵育,PBS 漂洗,滴加鼠兔通用型二抗室温孵育,PBS 漂洗,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封固,光学显微镜下观察,阴性对照组用 PBS 替代一抗；

第二,流式细胞术分析:调整人羊膜间充质干细胞密度为 1×10^6 /ml,每管 200 μ L 细胞悬液,共 3 管,分别加入各 20 μ L 荧光标记单抗 CD29-PE+CD44-FITC、CD34-PE+CD45-FITC 和 CD166-PE,混匀,室温避光孵育,每管加 2 ml 含 1 g/L NaN₃ 的磷酸盐缓冲液,混匀,离心弃上清,振荡悬浮细胞,每管加入 10 g/L 多聚甲醛 300 μ L,混匀,用流式细胞仪检测,用 Cell Quest 软件进行采集分析,用小鼠 IgG-FITC 或 IgG-PE 作为同型对照。

[0008] 结合免疫细胞化学染色和流式细胞术分析结果,hAMSCs 的鉴定标志为波形蛋白阳性,CK19 阴性,CD29、CD44、和 CD166 均阳性,CD34 和 CD45 均阴性。

[0009] 本发明达到的有益效果：

(1) 本发明人羊膜间充质干细胞的分离的有益效果:从羊膜分离的原代 hAMSCs 数 $> 6 \times 10^7$ / 份,通过原代培养细胞数可扩增 12 倍,这样的细胞产率已能满足临床细胞治疗的需用量。(理论上,一个成熟的完整人羊膜含有 4×10^8 个 hAMSCs)

(2) 本发明人羊膜间充质干细胞的纯化的有益效果:所获的 hAMSCs 其纯度 $> 99\%$,用台盼蓝染色其活细胞率达 98%；如果不经过贴壁生长培养纯化步骤,其纯度则不到 85%,更重要的是纯度低的样品将大大影响后续实验及实验结果的评价。

[0010] (3) 本发明人羊膜间充质干细胞的鉴定方法的有益效果:①原代分离样品因受消化酶的影响可能致表面标志丢失,而用第 2 代 hAMSCs 作为鉴定样品更能准确反映 hAMSCs 的表型特征；②通过免疫细胞化学染色波形蛋白和 CK19,可鉴别 hAMSCs 和羊膜上皮细胞；③我们通过流式细胞术反复检测证明 hAMSCs 稳定表达 CD29、CD44、和 CD166,而不表达 CD34 和 CD45,该表型谱可作为鉴定 hAMSCs 的表型,不必过多检测其它表面标志；④本鉴定

方案方法简便、准确。

具体实施方式

[0011] 实施例 1

本发明的人羊膜间充质干细胞的分离,包括以下步骤:

第一,无菌采集人足月剖宫产胎盘,机械法将羊膜从胎盘组织上剥离,用 D-Hank' s 液冲洗数次以清除残留血迹,将羊膜剪成 2mm×2mm 大小的碎片;

第二,羊膜碎片加入含 0.02%EDTA 的 0.05% 胰蛋白酶消化溶液,于 37° C,200 转/分旋转消化 10 分钟,弃上清;重新加入消化液,于 37° C,200 转/分旋转消化 30 分钟,弃上清,留取未消化的羊膜碎片;

第三,D-Hank' s 液冲洗未消化的羊膜碎片,加入含有 0.075 mg/ml DNase I 的 0.75 mg/ml 的胶原酶,于 37° C,200 转/分旋转消化约 2 h 至组织完全消化,300 目钢网过滤,收集细胞滤液,1500 转/分,离心 10 分钟,收集细胞沉淀即原始 hAMSCs,本次从羊膜分离的原代 hAMSCs 数达 6.7×10^7 /份;

第四,将分离的原始 hAMSCs 重新悬浮于 LG-DMEM 培养基中(含 10% FBS、10 μg/ml bFGF、55 μmol/L 2-巯基乙醇,100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素),以 1.25×10^5 /ml 的细胞密度接种于 6 孔培养板,置于 37° C、饱和湿度、体积分数为 5%CO₂ 的 CO₂ 培养箱培养 36~48 小时,在倒置显微镜下除去完全未贴壁生长的羊膜上皮细胞,这一点非常重要。第 3 天更换新的培养基。待细胞汇合度达 80~90%后,用 0.25% 胰蛋白酶—0.02% EDTA 溶液于 37° C 消化 2~3 分钟,加入培养基终止胰蛋白酶作用,1000 转/分,离心 5 分钟,弃上清,细胞沉淀用培养基重新悬浮,以 1×10^7 /L 的细胞密度传代。所获的 hAMSCs 其纯度为 99.2% (根据波形蛋白阳性率判定),用台盼蓝染色其活细胞率为 98.5%。通过原代培养可扩增 12 倍,产生的 hAMSCs 数达 8×10^8 。

[0012] 实施例 2

本发明的人羊膜间充质干细胞的鉴定方法,包括以下步骤:

第一,免疫细胞化学染色:hAMSCs 爬片用 PBS 缓冲液漂洗,40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, PBS 漂洗,0.3%Triton-X100 作用 15~20 min,3%H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶 10 min, PBS 漂洗,加正常羊血清封闭 30 min,滴加波形蛋白抗体或鼠抗人 CK19 抗体室温孵育 1 h, PBS 漂洗,滴加鼠兔通用型二抗室温孵育 1 h, PBS 漂洗, DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封固,光学显微镜下观察。阴性对照组用 PBS 替代一抗。结果应为 hAMSCs 表达波形蛋白,而不表达上皮细胞标志 CK19,以此可排除分离 hAMSCs 过程中是否有羊膜上皮细胞的混杂,同时可判断所分离的 hAMSCs 的纯度;

第二,流式细胞术分析:调整 hAMSCs 密度为 1×10^6 /ml,每管 200 μL 细胞悬液,共 3 管,分别加入荧光标记单抗 CD29-PE+CD44-FITC、CD34-PE+CD45-FITC 和 CD166-PE,每种抗体各 20 μL,混匀,室温避光孵育 25 分钟。每管加 2 ml 含 1 g/L NaN₃ 的磷酸盐缓冲液,混匀,1000 转/分离心 5 分钟,弃上清,振荡悬浮细胞。每管加入 10 g/L 多聚甲醛 300 μL,混匀,用流式细胞仪检测,每一样品采集细胞 ≥ 20 000 个,用 Cell Quest 软件进行采集分析,用小鼠 IgG-FITC 或 IgG-PE 作为同型对照。

[0013] 根据免疫细胞化学染色和流式细胞术分析结果,本次分离、纯化的 hAMSCs 其波形

蛋白阳性率为 99.2%，而 CK19 为阴性；CD29、CD44、和 CD166 表达率分别为 99.5%、80.1% 和 92.7%，而不表达 CD34 和 CD45，可判定为 hAMSCs。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种人羊膜间充质干细胞的分离纯化及鉴定方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN102559586A | 公开(公告)日 | 2012-07-11 |
| 申请号 | CN201110404587.9 | 申请日 | 2011-12-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 遵义医学院附属医院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 遵义医学院附属医院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 遵义医学院附属医院 | | |
| [标]发明人 | 方宁 陈代雄 | | |
| 发明人 | 方宁 陈代雄 | | |
| IPC分类号 | C12N5/0735 G01N33/53 G01N15/10 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种人羊膜间充质干细胞的分离纯化及鉴定方法，hAMSCs的分离方法为将人羊膜剪成碎片，用EDTA的胰蛋白酶，DNaseI的胶原酶分二步旋转消化，用钢网过滤，收集细胞滤液即为分离的原始hAMSCs；hAMSCs的纯化方法是原始hAMSCs用LG-DMEM培养基置于CO2培养箱培养，在倒置显微镜下除去完全未贴壁生长的羊膜上皮细胞，第3天更换新的培养基，待细胞汇合度达80~90%后，用胰蛋白酶—EDTA溶液消化收集细胞即可获得高纯度的hAMSCs；hAMSCs的鉴定方法采用免疫细胞化学染色波形蛋白和CK19以鉴别hAMSCs和羊膜上皮细胞，采用流式细胞术检测CD29、CD44、CD166、CD34和CD45的表达。本发明方法具有hAMSCs高收率、高活性、高纯度优点，鉴定方法简便、精准。