

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810061267.6

[51] Int. Cl.
C12N 5/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008年9月24日

[11] 公开号 CN 101270349A

[22] 申请日 2008.3.20

[21] 申请号 200810061267.6

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

[72] 发明人 王金福 袁文信 石东燕

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 张法高 赵杭丽

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

[54] 发明名称

胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法

[57] 摘要

本发明提供一种胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法，采用收集胎盘母体侧蜕膜组织细胞后，先进行原代细胞的贴壁扩增，再行正、负向免疫分选结合的方法纯化胎盘间充质干细胞，获得 CD34⁻CD105⁺ 细胞，在无血清体外培养体系中继代扩增培养。本发明方法每次只需少量原代细胞 (1×10^5 个细胞) 就可以达到比较好的分选效果，可进一步提高了胎盘间充质干细胞的纯化率。所用培养体系不但对胎盘间充质干细胞具有明显的扩增优势，并且扩增的细胞具备多分化潜能。可在纯化胎盘间充质干细胞和体外扩增培养中应用。

1. 一种胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法，通过以下方案实现：
取胎盘母体侧蜕膜，剪碎后用 0.1 % IV型胶原酶消化并收集细胞，以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基和 2 mM L-谷氨酰胺进行贴壁培养，再行负、正向免疫分选结合的方法纯化胎盘间充质干细胞，获得 CD34⁻ CD105⁺ 细胞，再在体外无血清培养体系中继代扩增培养，其中所述负向纯化是行阴性免疫筛选，所述正向纯化是行阳性免疫筛选，所述无血清体外培养体系含有无血清培养基和成纤维细胞生长因子-2。

2. 根据权利要求1所述的一种胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法，其特征是：所述无血清培养基含有DMEM/F12培养液、L-谷氨酰胺、β-巯基乙醇和非必需氨基酸，其组成比例为DMEM/F12培养液：1mM L-谷氨酰胺：0.1mM β-巯基乙醇：1%非必需氨基酸，无血清培养基与成纤维细胞生长因子-2的比例为1：5 ng/ml。

3. 根据权利要求1所述的一种胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法，其特征是：所述的阴性免疫筛选是采用 CD34 标记磁珠分选，获得 CD34⁻ 细胞。

4. 根据权利要求1所述的一种胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法，其特征是：所用的阳性免疫筛选是采用 CD105 标记磁珠分选，获得 CD34⁻CD105⁺细胞。

5. 根据权利要求1所述的一种胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法在纯化胎盘间充质干细胞中应用。

6. 根据权利要求1所述的一种胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法在胎盘间充质干细胞体外扩增培养中应用。

胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法

所属技术领域

本发明属生物技术，涉及一种胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养的方法。这种方法能有效地纯化胎盘间充质干细胞和提高其体外的扩增能力。

背景技术

人足月胎盘中存在一种具有多分化潜能的间充质干细胞。相关的研究已经表明这种干细胞可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和神经细胞等。这种干细胞被称为胎盘间充质干细胞（MSCs），将在医学上具有细胞移植和组织工程化的重大利用价值。

由于目前还尚未发现胎盘间充质干细胞专一的特异性标记分子，因此该干细胞的分离纯化采用的还是间接的方法：传统的方法是采用灌流方法通过脐血管冲出胎盘残留血液后，在分离血液中单个核细胞、并进行贴附培养的基础上，利用间充质干细胞的贴附性在细胞培养瓶内贴壁形成纺锤形的成纤维状细胞，并经过传代贴壁来逐步纯化间充质干细胞。另一类方法是剪切胎盘组织，并用胶原酶或胰酶消化组织后收集分散细胞，再行贴附培养方法进行间充质干细胞分离和纯化。这两种方法简单方便，但是这种方法分离的细胞实质是多种细胞的混合物，而非克隆化的间充质干细胞。这种多细胞混合物的继代培养和扩增能力较低，难以形成真正的间充质干细胞株系。虽然目前尚不清楚胎盘间充质干细胞的特异性标记分子，但公认为其表现为 CD31⁻、CD34⁻、CD45⁻、CD29⁺、CD73⁺、CD90⁺、CD105⁺和 CD166⁺。根据这些特点，如果能在细胞原代贴附培养、积聚一定的细胞数量基础上，再利用特异的抗体标记免疫磁珠进行分选，则能有效地提高胎盘间充质干细胞的纯化率。

在胎盘间充质干细胞的体外培养和扩增方面，目前一般采用的是含有一定比例（如 10-20%等）血清（如胎牛血清等）的培养基（如 DMEM-LG 等）进行贴壁培养扩增，也有人使用成纤维细胞生长因子（FGF-2）等促进胎盘间充质干细胞的增殖。但是，考虑到将来胎盘间充质干细胞在临床移植应用的需要，采用无血清培养基以及临床级细胞生长因子具有重要的实际应用意义。

发明内容

为了有效提高胎盘间充质干细胞的体外纯化率和扩增能力，本发明的目的

是提供一种胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法，通过以下方案实现：

取胎盘母体侧蜕膜，剪碎后用 0.1 % IV型胶原酶消化并收集细胞，以 DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) 培养基 (含 10% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司，杭州) 和 2 mM L-谷氨酰胺 (Sigma, 上海) 进行贴壁培养，再行负、正向免疫分选结合的方法纯化胎盘间充质干细胞，获得 CD34⁻ CD105⁺ 细胞，在无血清体外培养体系中继代扩增培养。

本发明对贴壁培养后收获的胎盘间充质干细胞第一步行负向纯化，即进行阴性免疫筛选。所用的阴性免疫筛选是采用 CD34 标记磁珠 (MACS, Miltenyi Biotech Inc., 上海) 分选，获得 CD34⁻细胞。

本发明对再次贴壁培养后收获的胎盘间充质干细胞第二步行正向纯化，即进行阳性免疫筛选。所用的阳性免疫筛选是采用 CD105 标记磁珠 (MACS, Miltenyi Biotech Inc., 上海) 分选，获得 CD34⁻CD105⁺细胞。

本发明所述的无血清体外培养体系，含有无血清培养基和成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2, Sigma, 上海)，其中无血清培养基含有 DMEM/F12 (Dulbeco's Modified Eagle Media/Nutrient Mixture F-12) 培养液 (GIBCO, 上海)、L-谷氨酰胺、β-巯基乙醇和非必需氨基酸 (Sigma, 上海)，其组成比例为 DMEM/F12 培养液 : 1mM L-谷氨酰胺 : 0.1mM β-巯基乙醇 : 1%非必需氨基酸。无血清培养基与 FGF-2 比例为无血清培养基 : 5 ng/ml FGF-2。

本发明的另一个目的是提供所述方法在胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养中应用。

本发明的有益效果是：

(1) 本发明提供的技术中采用收集胎盘母体侧蜕膜组织细胞后，先进行原代细胞的贴壁扩增，然后再行抗体标记免疫磁珠分选，这样每次只需少量原代细胞 (1×10^5 个细胞) 就可以达到比较好的分选效果。

(2) 采用正、负向免疫分选相结合的方法进一步提高了胎盘间充质干细胞的纯化率。由此方法纯化的胎盘间充质干细胞具有比较高的增殖潜能和分化潜能。与未分选的贴壁纺锤状细胞相比，其对数生长期可以提前 2-4 天，并且最快可以在 5 天的时间内完成细胞单层的形成；而未分选的细胞在培养瓶中铺层较慢，细胞生长期可达 9 天之久。

(3) 采用含有细胞生长因子的新培养体系能有效地提高了胎盘间充质干细胞的扩增能力，并且不含血清的培养系统将有利于临床安全移植应用。

(4) 新分选技术和培养体系不但对胎盘间充质干细胞具有明显的扩增优势，并且扩增的细胞具备多分化潜能。

附图说明

图 1 为原代第一代和双向分选后第一代胎盘间充质干细胞培养。

图 2 为原代第三代和双向分选后第一代细胞的扩增能力比较。

图 3 为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞和神经细胞定向诱导。

具体实施方式

本发明结合具体实施例和附图作进一步说明。应理解，这些实施例仅用于说明目的，而不适用于限制本发明范围。

实施例 1

本发明方法采取的一个具体方法是：取胎盘母体侧蜕膜，剪碎小块胎儿蜕膜侧胎盘组织，0.1% IV型胶原酶消化后收集细胞，以细胞培养基(含 DMEM、10%胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺)进行贴壁培养。

1、细胞在培养瓶内铺层后，弃去培养液及悬浮的细胞。用 Trypsin-EDTA 消化并收获贴壁的纺锤状细胞。收获的细胞用 PBS 洗涤一次后悬浮在 PBS 中。然后按 MACS 公司提供的操作说明，用吸附 CD14 单克隆抗体-磁珠分离系统 (MACS, Miltenyi Biotech Inc., 上海) 从悬浮细胞中分选 CD34⁻细胞。收集的 CD34⁻细胞再行贴壁培养铺层后，收获细胞，并经 PBS 洗涤一次后，再用吸附 CD105 单克隆抗体-磁珠分离系统 (MACS, Miltenyi Biotech Inc., 上海) 分选 CD34⁻CD105⁺细胞。

2、分选的 CD34⁻CD105⁺细胞在含有 FGF-2 的无血清培养体系(DMEM/F12 培养液、1mM L-谷氨酰胺、0.1mMβ-巯基乙醇、1% 非必需氨基酸、5 ng/ml FGF-2) 进行扩增培养。

实施例 2

分离纯化效率

用流式细胞术测定不同分离纯化技术获得细胞中不同标记性细胞表面抗原的比例见表 1。

表 1. 不同分离纯化技术获得细胞中不同标记性细胞表面抗原的比例 (%)

分离纯化方法	CD34 ⁺	CD45 ⁺	CD105 ⁺	CD29 ⁺
原代第一代贴壁细胞	7.22±2.12	11.65±3.04	47.14±8.15	34.62±5.47
原代第三代贴壁细胞	2.35±0.93	5.39±1.02	54.51±4.33	62.63±7.39
分选后第一代细胞	0.08±0.02	0.42±0.05	92.25±6.42	85.56±5.62

原代的胎盘母体侧蜕膜细胞中 CD34⁺、CD45⁺、CD105⁺和 CD29⁺细胞分别平均为 7.22%、11.65%、47.14%和 34.62%，说明原代贴壁纺锤状细胞中以间充质细胞为主。经过 2 次传代贴壁培养后，CD34⁺细胞和 CD45⁺细胞有所减少，而 CD90⁺和 CD105 细胞有所增加，但是其中还含有少量 CD34⁺细胞和 CD45⁺细胞。经过 CD14 单克隆抗体和 CD105 单克隆抗体-磁珠系统分选，获得的细胞基本上为 CD34⁻CD45⁻ CD105⁺CD29⁺细胞。根据上述平行代（原代第三代和分选第一代）比较，经过双向分选的细胞更具间充质干细胞表面抗原特征。

实施例 3

不同分选方法获得的细胞形态

参见图 1, IV型胶原酶消化的胎儿蜕膜侧胎盘组织细胞在接种后 24 小时可以见到长梭形细胞贴壁，并且成放射状或同心圆状排列。大量的集落出现在接种 4 天后，然后逐渐在培养瓶底部铺层。在 Teflen-25 培养瓶中细胞扩增形成单层需要 14-16 天时间。图 1A 显示在倒置显微镜下，细胞呈梭形，10×10 倍。细胞经 2 次传代后，细胞呈显著的纤维状细胞，细胞接种后经过 8-9 天形成细胞单层（图 1B）。经过 CD34 和 CD105 单克隆抗体-磁珠系统分选的胎盘间充质干细胞（CD34⁻ CD105⁺）在新的无血清培养体系（人参皂甙多糖/DMEM-LG/10%FBS）下进行第 1 代扩增培养，在 Teflen-25 培养瓶中经过 5-6 天形成了细胞单层。图 1C 显示在倒置显微镜下，细胞呈纤维形，10×10 倍。

分选细胞贴壁扩增后完全表现为细长的纤维状，并且在显微镜下看不见其他任何杂质细胞的存在。

实施例 4

扩增能力比较分析

收获原代第三代细胞，在不作任何筛选的情况下直接进行新的无血清培养体系下的扩增能力测定，同时也进行含血清培养体系下分选第一代胎盘间充质干细胞的扩增培养。上述两种实验结果再与新的无血清培养体系下分选第一代胎盘间充质干细胞的扩增培养进行比较，细胞数量增长动态参见图 2，其中 —◇—表示无血清培养体系下原代第三代细胞，—◆—表示含血清培养体系下分选第一代细胞，—■—表示无血清培养体系下分选第一代细胞。

从图 2 的比较结果分析，在培养的第 1-9 天内，两种培养体系下的分选第一代细胞都明显具有生长的优势：分选细胞贴壁后快速生长，在培养的第 3 天开始出现对数生长期，至第 5 天基本上达到铺层；未分选的细胞出现生长快速的时期比较滞后，大约在第 5 天出现对数生长期，至第 8-9 天才达到铺层。

在无血清培养体系中培养的第一代分选细胞平均铺层时间为 6.3 天，在含血清培养体系中培养的第一代分选细胞平均铺层时间为 6.1 天，两种培养体系之间无显著性差异 ($P>0.05$)。说明无血清培养体系完全可以替代含血清培养体系来支持胎盘间充质干细胞的体外扩增培养。在无血清培养体系中培养的未分选第三代细胞平均铺层时间为 8.4 天。说明在相同的培养体系下，分选细胞比未分选细胞具有更强的体外扩增能力。

实施例 5

胎盘间充质干细胞向脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞和神经细胞的诱导分化

取分选后第 3 代胎盘间充质干细胞，制备制成单细胞悬液，以 2×10^4 个/培养皿接种于直径 30mm 的培养皿进行贴壁培养，待细胞达到铺层 80-90% 时，用脂肪细胞诱导液 (DMEM—LG 培养液, 10 %胎牛血清, 100U/ml 青霉素, 100g/ml 链霉素, 10 μ g/ml 胰岛素, 1 μ M 地塞米松, 0.5mM 1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤, 100 μ M 吲哚美辛) 进行脂肪细胞的定向诱导分化; 用成骨细胞诱导液 (DMEM—LG 培养液, 10 %胎牛血清, 100U/ml 青霉素, 100g/ml 链霉素, 0.1 μ M 地塞米松, 10 mM β -甘油磷酸钠, 50 μ M 2-磷酸-抗坏血酸) 进行成骨细胞定向诱导; 用软骨细胞诱导液 (DMEM—LG 培养液, 10 %胎牛血清, 10 ng/ml 类胰岛素生长因子 I (IGF-I)、10 ng/ml 转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 和 50 μ g/ml 的维生素 C (VC)) 进行软骨细胞定向诱导; 用神经细胞诱导液 (DMEM—LG 培养液, 2%二甲基亚砷, 200 μ M 丁化羟基苯甲醚 (BHA), 1 μ M 氢化可的松, 10ng/ml IGF-I, 0.5 μ M 全反式维甲酸 (ATRA)) 进行神经细胞定向诱导。

参见图 3A, 在脂肪细胞定向诱导分化实验中, 第 7 天起光镜下可见黄色的圆形脂滴沉着的细胞, 外形变为圆形, 椭圆形, 细胞核被脂滴挤于一侧。油红 O 染色示胞核呈蓝色, 脂滴呈红色。随着诱导时间的延长, 脂肪细胞的比例逐渐增高。图 3A 中, 为油红 O 染色后含有脂滴的细胞, 25 \times 10 倍。

参见图 3B, 在成骨细胞定向诱导分化实验中, 一般从第 5 天开始, 可以看到细胞形态转变为立方形, 折光性强, 随着诱导时间的延长, 立方形的细胞比例逐渐增高。细胞继续增殖, 形成复层。改良钙钴法碱性磷酸酶染色的诱导细胞胞浆深棕色或深黑色, 其中充满致密的黑色沉淀。图 3B 中, 为改良钙钴法碱性磷酸酶染色后的细胞, 25 \times 10 倍。

参见图 3C, 经软骨细胞分化诱导液诱导 21 天后, 细胞产生了大量的 II 型胶原蛋白。用 EnVision 二步免疫组化技术检测 II 型胶原蛋白表达, 发现经诱导

的细胞显示阳性红色反应。图 3C 中，为 EnVision 二步免疫组化染色的细胞， 25×10 倍。

参见图 3D，细胞在神经细胞诱导过程中梭形细胞的比例在明显下降，并开始转变为较为典型的神经元表型特征，如胞体呈现高折光率，且伸出长的分支，并在末端有锥状体出现，可能为神经元的曲张体。诱导后第 6 天有神经元特异性烯醇化酶的显著表达。图 3D 中，为表达神经元特异性烯醇化酶的细胞， 25×10 倍。

实例总结：

(1) 本分选技术有效地富集了胎盘间充质干细胞：

经原代贴壁培养后进行 CD34 阴性反应和 CD105 阳性反应筛选，CD90 阳性细胞比例达到 85.6%，CD105 阳性细胞比例达到 92.3%，并且基本上排除了 CD34 和 CD45 阳性细胞。

(2) 分选的细胞具有扩增和继代培养的优势：

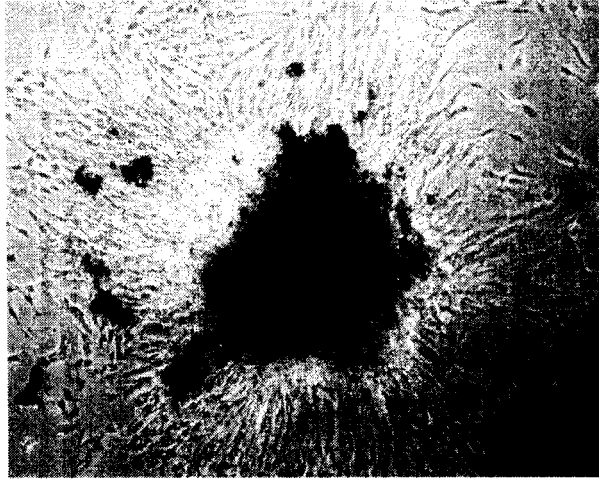
经本分选技术分选的细胞具有显著的扩增能力。分选细胞的对数生长期比未分选细胞要提前 2-4 天，由此导致分选细胞的快速贴壁和形成细胞单层，并在 5-6 天之内完成一个世代的铺层。

(3) 新无血清扩增培养体系有效促进了胎盘间充质干细胞的扩增效率：

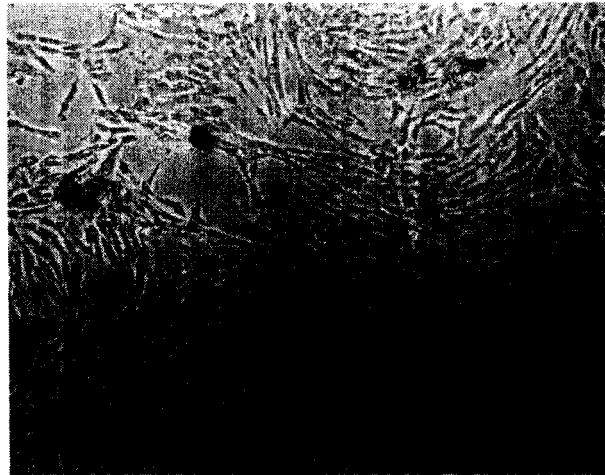
在细胞分选后的培养中，设计的新无血清培养体系对胎盘间充质干细胞的贴壁和扩增具有和含血清培养基相当的作用，并且可安全使用于临床移植。

(4) 扩增的分选细胞具有分化多潜能性：

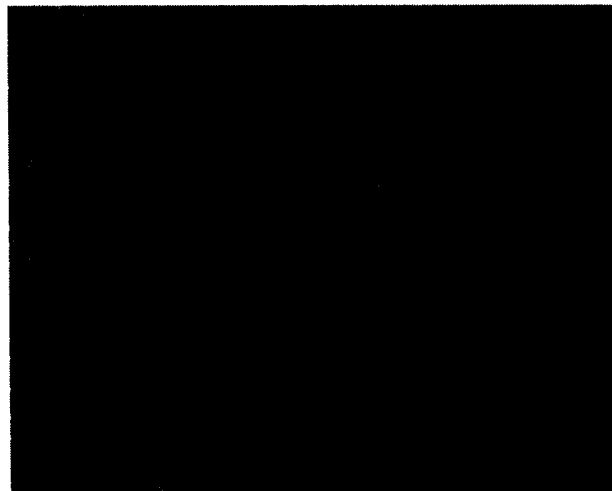
分选细胞经扩增数代后仍具备分化多潜能性，能定向诱导成脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞和神经细胞。



A



B



C

图1

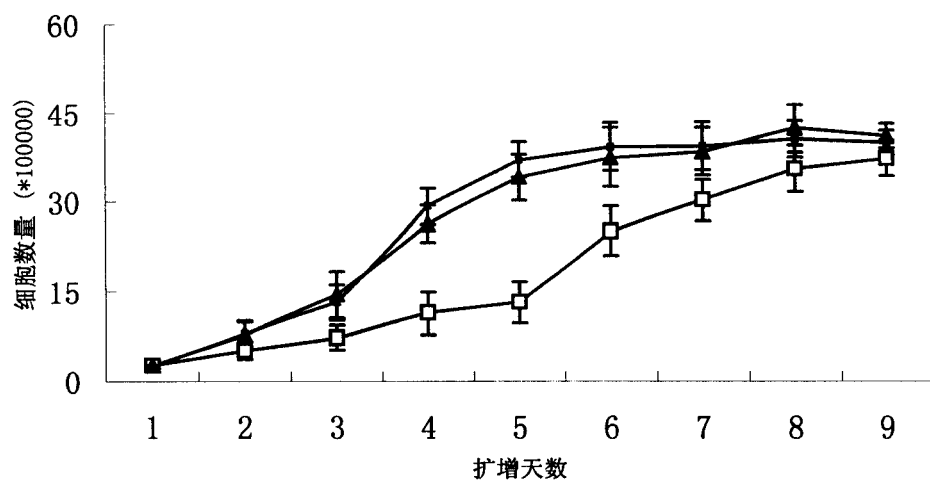


图2

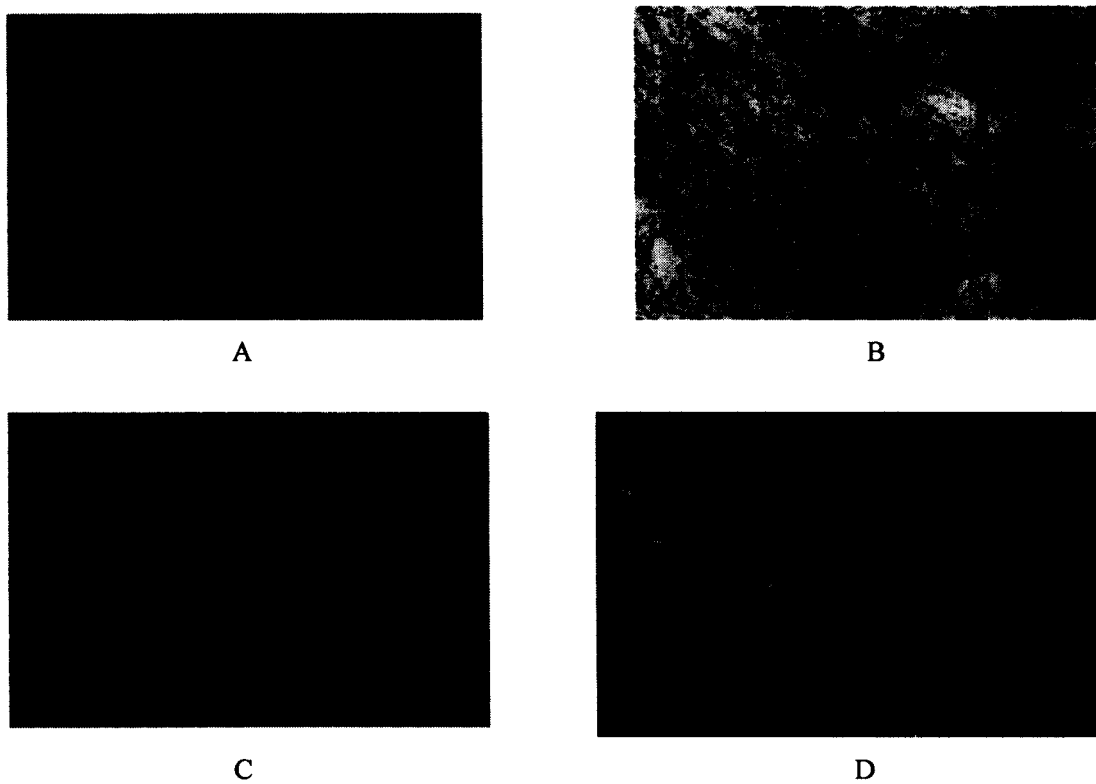


图3

专利名称(译)	胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法		
公开(公告)号	CN101270349A	公开(公告)日	2008-09-24
申请号	CN200810061267.6	申请日	2008-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	王金福 袁文佶 石东燕		
发明人	王金福 袁文佶 石东燕		
IPC分类号	C12N5/08 G01N33/53 C12N5/0775		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种胎盘间充质干细胞分离和体外扩增培养方法，采用收集胎盘母体侧蜕膜组织细胞后，先进行原代细胞的贴壁扩增，再行正、负向免疫分选结合的方法纯化胎盘间充质干细胞，获得CD34 - CD105+细胞，在无血清体外培养体系中继代扩增培养。本发明方法每次只需少量原代细胞(1×10⁵个细胞)就可以达到比较好的分选效果，可进一步提高了胎盘间充质干细胞的纯化率。所用培养体系不但对胎盘间充质干细胞具有明显的扩增优势，并且扩增的细胞具备多分化潜能。可在纯化胎盘间充质干细胞和体外扩增培养中应用。