



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106916787 B

(45)授权公告日 2019.01.01

(21)申请号 201710081633.3

(22)申请日 2017.02.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106916787 A

(43)申请公布日 2017.07.04

(73)专利权人 中山大学中山眼科中心

地址 510060 广东省广州市先烈南路54号

(72)发明人 欧阳宏

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理

事务所(普通合伙) 11371

代理人 齐云

(51)Int.Cl.

C12N 5/0797(2010.01)

审查员 李谦

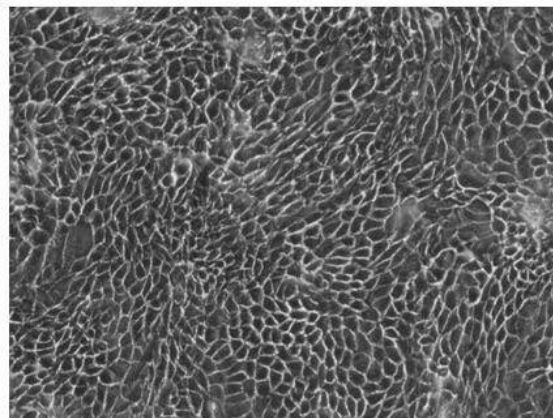
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种角膜缘干细胞培养基及其培养方法

(57)摘要

本发明公开了一种角膜缘干细胞培养基及其培养方法,培养基组分为:5mL 100×双抗、10~20ng/ml人重组EGF、5~10ug/ml胰岛素、1~5x10⁻⁹M 3-碘甲状腺原氨酸、0.2~1ug/ml氢化可的松、10~20ng/ml霍乱毒素、10~15%胎牛血清、余量为DMEM和/或DMEM/F12;采用I型胶原蛋白作为角膜缘干细胞生长的基底物质对培养板等材料做涂层处理,提高角膜缘干细胞的纯度及稳定性,采用本发明提供的培养基分离角膜缘干细胞,细胞中p63、Pax6抗体阳性率为96%~100%。建立了一种无滋养层、无载体的角膜缘干细胞培养方法,为角膜缘干细胞特异性机制研究和移植治疗提供了稳定的细胞来源。



1. 一种角膜缘干细胞的分离培养方法,其特征在于,是将角膜缘组织清洗后,对角膜缘组织进行酶解得角膜缘干细胞,加入角膜缘干细胞培养基进行培养即可;所述酶解是二次酶解;所述二次酶解是先用IV胶原酶酶解,再用碱性蛋白酶酶解;

其中,所述角膜缘干细胞培养基中含有以下组分:5mL 100×双抗、10-20ng/ml人重组EGF、5-10ug/ml胰岛素、 $1-5 \times 10^{-9}$ M 3-碘甲状腺原氨酸、0.2-1ug/ml氢化可的松、10-20ng/ml霍乱毒素、10-15%胎牛血清、余量为DMEM和/或DMEM/F12。

2. 根据权利要求1所述的角膜缘干细胞的分离培养方法,其特征在于,所述IV胶原酶的浓度为0.2-0.3%。

3. 根据权利要求1所述的角膜缘干细胞的分离培养方法,其特征在于,所述IV胶原酶的酶解时间为2-3h。

4. 根据权利要求1至3任一项所述的角膜缘干细胞的分离培养方法,其特征在于,在加入角膜缘干细胞进行培养之前,先加入I型胶原蛋白。

一种角膜缘干细胞培养基及其培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及干细胞培养技术领域,更具体地,涉及一种角膜缘干细胞培养基及其培养方法。

背景技术

[0002] 角膜缘干细胞为角膜和结膜、巩膜交界部分,与角膜的鉴别的标志是Bowman氏膜的终止处;与结膜的鉴别标志是不含杯状细胞,角膜缘干细胞宽约1~2mm,此处仅有上皮层和基质层,其上皮细胞层含10层细胞,排列不规则,细胞呈小的圆柱状,核深染。其深部基质细胞为一层小圆柱状或立方形细胞,细胞核为卵圆形,与表面平行,在基底部乳头形成,形成特殊的“栅栏”样上皮结构,其中含有色素和丰富的血管网,并与基底膜联系紧密。角膜上皮为有序排列的单层非角质化细胞,角膜上皮细胞的更新来源于角膜缘干细胞(LSCs),对角膜透明、视力的维持起重要作用。更新过程进行时,角膜缘干细胞向角膜中央迁移,并进行分化,这一完整的过程大概需要14天。LSCs缺乏是世界性、灾难性的眼科疑难病症,严重威胁人类视觉质量,目前缺乏有效治疗手段。常见原因包括眼外伤、碱烧伤和免疫性眼病等,在临床上,表现为角膜不透明化及视觉缺失;眼科检查以角膜上结膜化、出现新生血管、瘢痕及睑球粘连形成为诊断标准。

[0003] 对于角膜缘干细胞缺乏传统的治疗手段包括羊膜移植和LSCs移植,但羊膜移植可导致角膜上皮表型改变,而传统的LSCs移植需要组织多、医源性损伤较大,临床治疗效果均不理想。自体角膜缘组织移植不适合双眼角膜缘病变的患者。异体角膜缘组织移植存在排斥反应。因此,采用体外培养的角膜缘干细胞移植联合穿透性角膜移植治疗严重的角膜病变,近年来成为人们关注的热点。

[0004] 对于角膜缘干细胞的培养,目前方法主要采用多种不同的基底层如鼠源NIH 373滋养层、人源羊膜、纤维蛋白胶、Myogel、等离子聚合物涂层、人重组胶原基底物等对角膜缘干细胞进行培养。这些方法都能获得上皮植片,并成功用于干细胞缺乏的补充用以治疗眼表疾病。

[0005] 现有角膜缘干细胞的培养方法虽能获得上皮细胞,但由于NIH 373细胞为外生非人源细胞,容易引起免疫反应及鼠源衍生病原体的传播;而人源羊膜由于难以获得,耗费大,需要进一步检测是否含有HIV,肝炎病毒等,且存在不透明,具有一定厚度的缺点,容易与角膜基质整合,对角膜厚度和结构有一定影响。上述因素都会影响培养得到的角膜缘干细胞在移植后眼部对光及视觉灵敏度,且现有方法只能用于角膜缘干细胞的一次性使用,无法对角膜缘干细胞进行稳定分离及培养。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术存在的上述缺陷,提供一种新型的角膜缘干细胞的培养基。

[0007] 本发明的第二个目的是提供一种角膜缘干细胞的培养方法。

[0008] 本发明的目的是通过以下技术方案予以实现的：

[0009] 一种角膜缘干细胞培养基，培养基中含有以下组分：5mL 100×双抗、10~20ng/ml人重组EGF、5~10ug/ml胰岛素、1~5x10⁻⁹M 3-碘甲状腺原氨酸、0.2~1ug/ml氢化可的松、10~20ng/ml霍乱毒素、10~15%胎牛血清、余量为DMEM和/或DMEM/F12。

[0010] 本发明建立了新型培养系统，以表皮生长因子EGF、胰岛素、3,3',5-Triiodo-L-Thyronine (3-碘甲状腺原氨酸)、氢化可的松、霍乱毒素等可促进LSCs增殖等因子作为培养基组分，能显著提高角膜缘干细胞的纯度和数量。

[0011] 本发明还提供一种角膜缘干细胞的分离培养方法，是将角膜缘组织清洗后，对角膜缘组织进行酶解得角膜缘干细胞，加入上述角膜缘干细胞培养基进行培养即可；所述酶解是一次酶解或者是二次酶解；所述二次酶解是先用IV胶原酶酶解，再用碱性蛋白酶酶解。

[0012] 本发明所述角膜缘组织的一次酶解可以采用传统的酶解方式，如利用复合酶酶解，或者单纯用胰蛋白酶酶解，所述胰蛋白酶的酶解时间为10min~20min。

[0013] 具体地，本发明所述角膜缘干细胞的分离培养方法是：取角膜缘组织，利用含双抗的PBS清洗后，进行酶解，将酶解后的产物以角膜缘干细胞的培养基进行培养后，传代。

[0014] 本发明可以使用IV胶原酶及胰蛋白酶二次酶解分离，使角膜缘组织在二次酶解下充分酶解，从而保证获得单个细胞、减少对细胞的损伤，增大细胞得率。

[0015] 优选地，当采用二次酶解时，所述IV胶原酶的浓度为0.2~0.3%；该IV胶原酶溶解于DMEM/F12中；所述IV胶原酶的酶解时间为2~3h；所述胰蛋白酶的酶解时间为10~20min。

[0016] 优选地，上述角膜缘干细胞的分离培养方法中，是在加入角膜缘干细胞进行培养之前，先加入I型胶原蛋白。

[0017] 具体地，所述角膜缘干细胞的分离培养方法包括以下步骤：

[0018] S1. 取角膜缘组织，利用含双抗的PBS清洗后，先用0.2% IV胶原酶解2h，除去胶原酶液，加入0.25%胰蛋白酶液酶解消化10min~20min，加入含有FBS的DMEM终止酶解消化，离心去除上清得分离后的角膜缘干细胞；

[0019] S2. 将10% I型胶原蛋白置于冰浴中，培养皿加入I型胶原蛋白进行包被后，再加入分离后的角膜缘干细胞的培养基重悬细胞进行培养。

[0020] 与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

[0021] 本发明首先提供了角膜缘干细胞的培养基，培养基中含有以下组分：

[0022] 5mL 100×双抗、10~20ng/ml人重组EGF、5~10ug/ml胰岛素、1~5x10⁻⁹M 3-碘甲状腺原氨酸、0.2~1ug/ml氢化可的松、10~20ng/ml霍乱毒素、10~15%胎牛血清、余量为DMEM和/或DMEM/F12；将各组分进行优化，能够更好的维持角膜缘干细胞的低分化状态，本发明采用I型胶原蛋白作为角膜缘干细胞生长的基底物质对培养板等材料做涂层处理，提高了角膜缘干细胞的纯度及稳定性，以胎牛血清促进角膜缘干细胞的生长，能够选择性的分离角膜缘干细胞，且分离培养所得的角膜缘干细胞的纯度和数量皆较高，干性及增殖能力良好。试验表明，采用本发明提供的培养基分离角膜缘干细胞，细胞中p63、Pax6抗体阳性率为96%~100%。

[0023] 本发明建立了一种新型无滋养层、无载体的角膜缘干细胞培养方法，实现了均一、高效体外扩增功能性的角膜缘干细胞，提供了快速稳定的细胞来源。提高所得角膜缘干细胞的纯度，改善所得角膜缘干细胞的品质以建立细胞库作为备用，为角膜缘干细胞特异性

机制研究和移植治疗提供了快速稳定的细胞来源。

附图说明

[0024] 图1为无载体,无滋养层人角膜缘干细胞培养(显微镜下细胞形态)。

[0025] 图2为角膜缘干细胞特异性标志免疫细胞化学染色;图2A为P63(绿色,角膜缘干细胞标志);图2B为PAX6(红色);图2C为融合后(蓝色为DAP)。

[0026] 图3为利用实施例1所述培养基培养12天后的细胞形态图(显微镜下细胞形态,10×)。

[0027] 图4为利用对比例1所述培养基培养角膜缘干细胞的细胞形态图(显微镜下形态,10×)。

[0028] 图5为利用对比例2所述培养基培养角膜缘干细胞的细胞形态图(显微镜下形态,10×)。

[0029] 图6为利用对比例3所述培养基培养角膜缘干细胞的细胞形态图(显微镜下形态,10×)。

具体实施方式

[0030] 下面结合说明书附图和具体实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的简单修改或替换,均属于本发明的范围;若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0031] 10% I型胶原蛋白溶液:1mL I型胶原蛋白溶解于9mL DMEM/F12培养基中。

[0032] IV胶原酶:以DMEM/F12培养基配制成0.2wt% IV胶原酶溶液。

[0033] 人重组EGF储备液:以PBS配制,配成5 μ g/mL EGF储备液。

[0034] 胰岛素储备液:以0.005M HCl配制,浓度为2.5g/L。

[0035] 3,3',5-Triiodo-L-Thyronine储备液:13.6mg 3,3',5-Triiodo-L-Thyronine溶解于15mL 0.02M NaOH中,加入85mL PBS;取0.1ml配制好的液体,添加PBS至20ml,以作为储备液,浓度为:10⁻⁶M。

[0036] 氢化可的松储备液:5mg氢化可的松溶于1mL无水乙醇中,加入PBS至25mL,浓度为200 μ g/mL。

[0037] 霍乱毒素储备液:1mg霍乱毒素溶于1mL无菌细胞培养级纯水中,取其中0.1mL,加入PBS至20mL,浓度为:5 μ g/mL。

[0038] 实施例1

[0039] 角膜缘干细胞培养基:220mL DMEM,220mL DMEM/F12,50mL FBS,5mL 100×双抗(100IU青霉素、100 μ g/ml链霉素),1mL人重组EGF储备液,1mL胰岛素储备液,1mL 3,3',5-Triiodo-L-Thyronine储备液,1mL氢化可的松储备液,1mL霍乱毒素储备液,放置于4℃保存,使用前37℃复温。

[0040] 在手术显微镜下,用组织镊和角膜剪剪取人角膜缘组织于无菌环境中用含双抗(青霉素-链霉素,1×)的PBS冲洗2次,每次5min;再用剪刀把组织剪碎。

[0041] 根据组织块的体积,每1cm³组织块加入5ml 0.2wt% IV胶原酶液,37℃轻柔振荡消

化2h后,除去IV胶原酶液,加入5mL 0.25%胰蛋白酶液,均匀混悬细胞后,用100 μ m网筛过滤,再置于37 $^{\circ}$ C进一步消化15min,加入含10%FBS的DMEM终止消化,1000rpm离心5min,弃除上清。

[0042] 将10%I型胶原蛋白置于冰浴中,6孔板中每孔加入1mL 10%I型胶原蛋白进行包被,置于37 $^{\circ}$ C,含5%CO₂培养箱中孵育40min,用PBS冲洗,除去PBS。

[0043] 加入2mL复温的角膜缘干细胞培养基重悬消化后的细胞,分别种植于包被有10%I型胶原蛋白的孔中,置于37 $^{\circ}$ C,含5%CO₂培养箱中培养,隔天换液,并在显微镜中观察细胞的生长状态。

[0044] 实施例2

[0045] 实验方法同实施例1,唯一不同的是,本实施例所用的角膜缘干细胞培养基组成为:204.5mL DMEM,204.5mL DMEM/F12,75mL FBS,5mL 100 \times 双抗(100IU青霉素、100ug/ml链霉素),2mL人重组EGF储备液,2mL胰岛素储备液,2.5mL 3,3',5-Triiodo-L-Thyronine储备液,2.5mL氢化可的松储备液,2mL霍乱毒素储备液。

[0046] 对比例1

[0047] 实验方法同实施例1,唯一不同的是EGF在角膜缘干细胞培养基中的浓度为2ug/ml,其结果发现细胞生长缓慢,丧失表皮细胞的形态,细胞呈梭形。

[0048] 对比例2

[0049] 实验方法同实施例1,唯一不同的是,血清浓度从10%降低到2%(即FBS的加入量为10mL),结果发现细胞的细胞变大,细胞核变小,细胞贴壁能力差等。

[0050] 对比例3

[0051] 实验方法同实施例1,唯一不同的是胰岛素在角膜缘干细胞培养基中的浓度为2ug/ml,其结果发现细胞生长缓慢,表皮细胞的形态不明显,细胞与细胞间连接松散,死亡细胞较多。

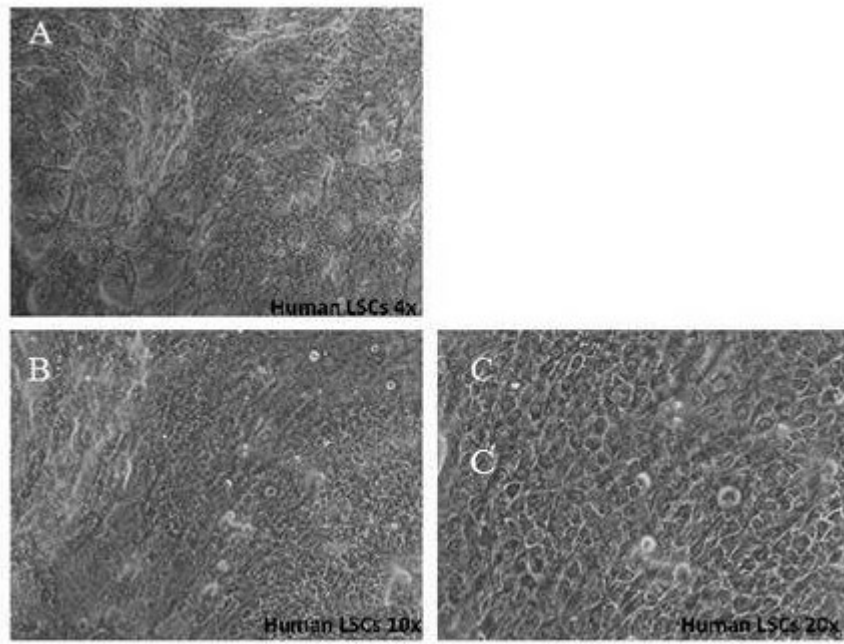


图1

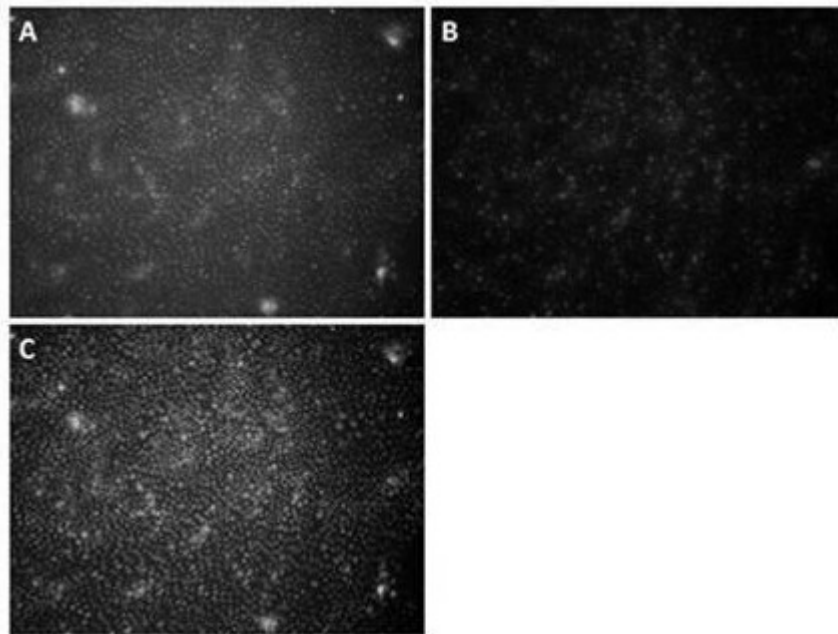


图2

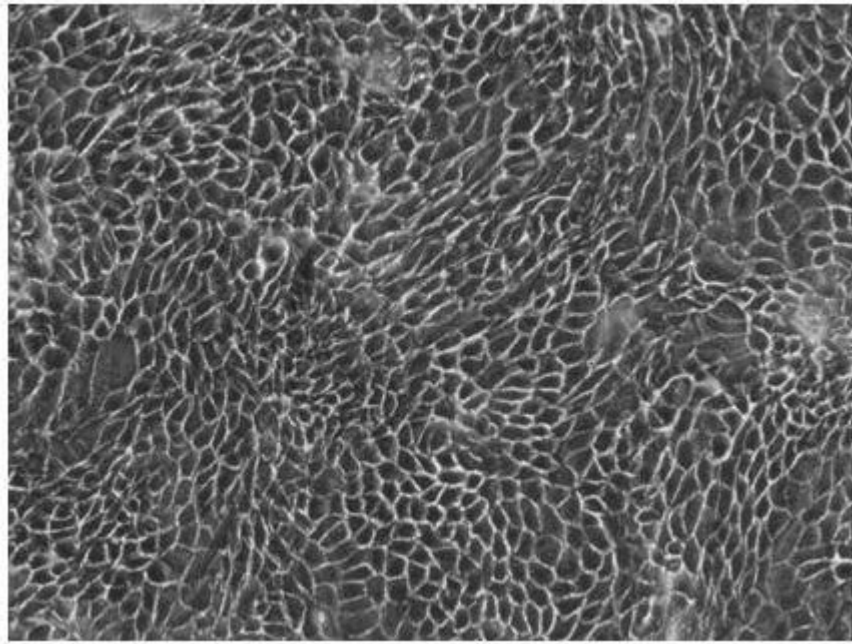


图3

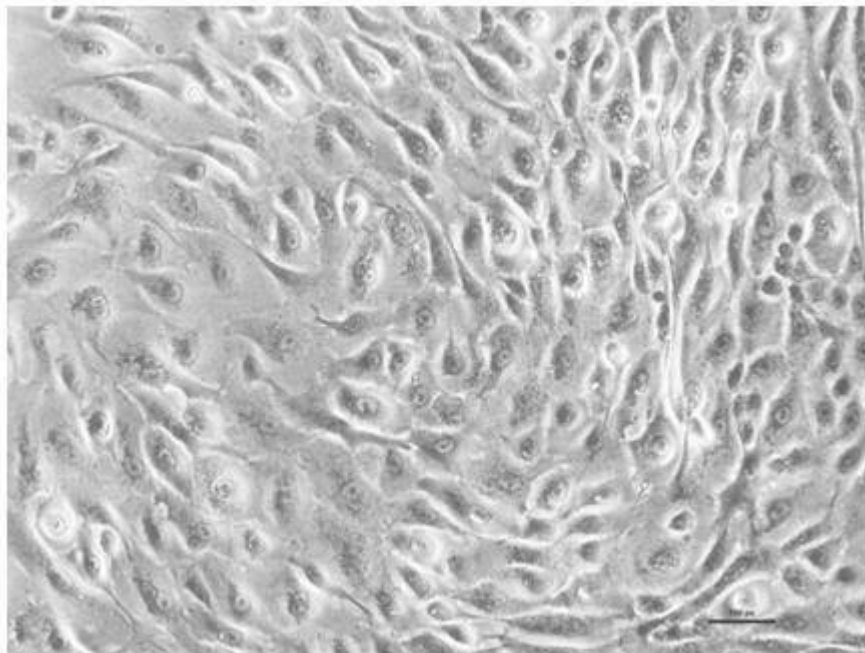


图4

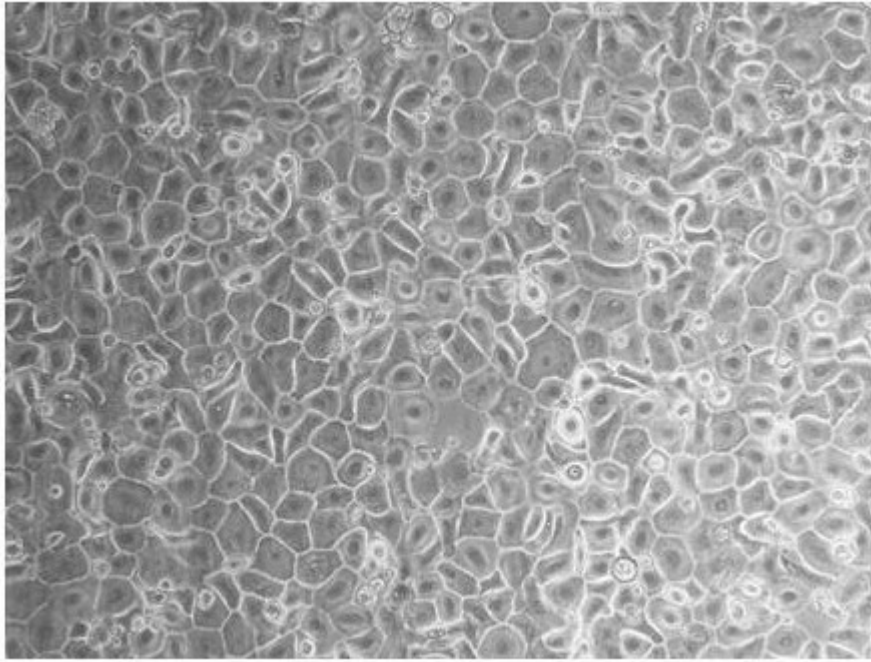


图5

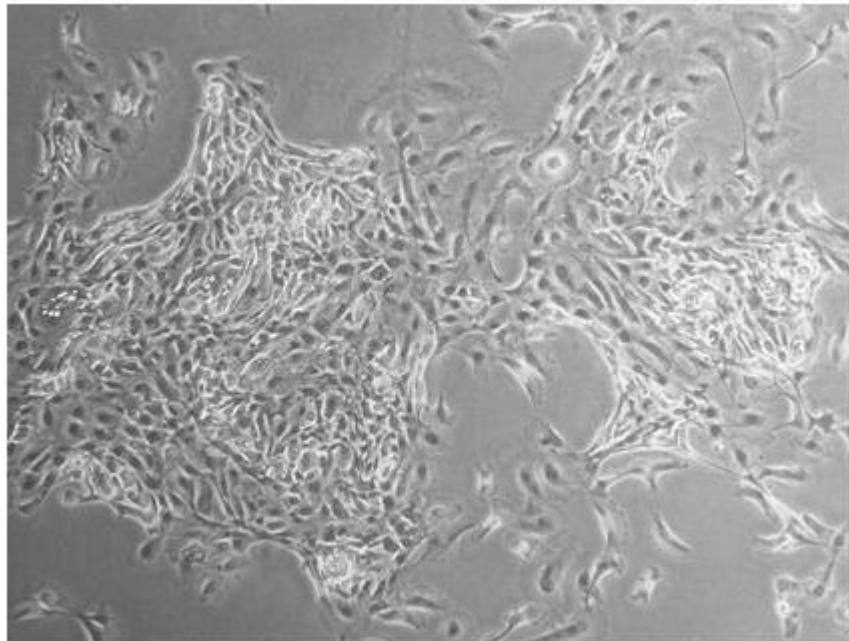


图6