



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104928247 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201510390313. 7

(22) 申请日 2015. 07. 02

(71) 申请人 广州赛莱拉干细胞科技股份有限公司

地址 510000 广东省广州市国际生物岛螺旋  
四路一号生产区第五层 502 单元

(72) 发明人 陈海佳 王一飞 葛啸虎 万桦  
王小燕 李平

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 赵青朵

(51) Int. Cl.

C12N 5/0797(2010. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种神经干细胞培养基及神经干细胞贴壁培养方法

(57) 摘要

本发明涉及细胞培养技术领域,特别涉及一种神经干细胞培养基及神经干细胞贴壁培养方法。该神经干细胞培养基包括 DMEM/F12、非必需氨基酸、表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素、氢化可的松、WNT3a、Notch1 和牛血清白蛋白。本发明提供的神经干细胞培养基能够大大增强神经干细胞的增殖能力,同时能够使得神经干细胞在不用明胶预铺板的情况下贴壁生长,免除了繁琐的操作步骤简化了生产流程。

1. 一种神经干细胞培养基,其特征在于,包括 DMEM/F12、非必需氨基酸、表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素、氢化可的松、WNT3a、Notch1 和牛血清白蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的神经干细胞培养基,其特征在于,所述神经干细胞培养基中含有 10 ~ 20  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、10 ~ 20ng/mL 表皮生长因子、5 ~ 15ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、10 ~ 20  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、40 ~ 60nmol/L 氢化可的松、10 ~ 20nmol/L WNT3a、40 ~ 60nmol/L Notch1、40 ~ 60  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白。

3. 根据权利要求 2 所述的神经干细胞培养基,其特征在于,所述神经干细胞培养基中含有 10  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、15ng/mL 表皮生长因子、15ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、10  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、50nmol/L 氢化可的松、20nmol/L WNT3a、40nmol/L Notch1、50  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白。

4. 根据权利要求 2 所述的神经干细胞培养基,其特征在于,所述神经干细胞培养基中含有 15  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、20ng/mL 表皮生长因子、5ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、15  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、60nmol/L 氢化可的松、10nmol/L WNT3a、50nmol/L Notch1、60  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白。

5. 根据权利要求 2 所述的神经干细胞培养基,其特征在于,所述神经干细胞培养基中含有 20  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、10ng/mL 表皮生长因子、10ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、20  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、40nmol/L 氢化可的松、15nmol/L WNT3a、60nmol/L Notch1、40  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的神经干细胞培养基,其特征在于,所述神经干细胞培养基还包括纤连蛋白和四型胶原蛋白。

7. 根据权利要求 6 所述的神经干细胞培养基,其特征在于,所述神经干细胞培养基中含有 10 ~ 20  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、10 ~ 20ng/mL 表皮生长因子、5 ~ 15ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、10 ~ 20  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、40 ~ 60nmol/L 氢化可的松、10 ~ 20nmol/L WNT3a、40 ~ 60nmol/L Notch1、40 ~ 60  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白、15 ~ 35ng/mL 纤连蛋白、50 ~ 70ng/mL 四型胶原蛋白。

8. 一种神经干细胞贴壁培养方法,其特征在于,采用如权利要求 1 至 7 中任一项所述的神经干细胞培养基培养神经干细胞。

9. 根据权利要求 8 所述的培养方法,其特征在于,所述培养的条件为 5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^\circ\text{C}$ 。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的培养方法,其特征在于,所述培养的细胞密度为  $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5/\text{mL}$ 。

## 一种神经干细胞培养基及神经干细胞贴壁培养方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细胞培养技术领域,特别涉及一种神经干细胞培养基及神经干细胞贴壁培养方法。

### 背景技术

[0002] 神经系统损伤性疾病包括缺血性脑病、出血性脑病、运动神经元疾病等,是一种严重威胁人类健康的疾病,提高这类疾病的生存率,降低致残率,最大限度地提高患者的生活质量,是防治此类疾病的首要任务。由于神经干细胞的发现使得神经系统损伤性疾病的治疗有了新的研究方向,神经干细胞也成为了生物医学工程以及体外模型研究中所必须的种子细胞。

[0003] 神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是具有分化为神经神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力,能自我更新,并足以提供大量脑组织细胞的细胞群,是一类具有分裂潜能和自更新能力的母细胞,它可以通过不对等的分裂方式产生神经组织的各类细胞,包括神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞。1992年神经干细胞自成年动物脑纹状体内第一次被发现,从而打破了认为神经细胞不能再生的传统理论。根据分化潜能及产生子细胞种类神经干细胞可分为如下几类:

[0004] (1) 神经管上皮细胞:分裂能力最强,只存在胚胎时期,可以产生放射状胶质神经元和神经母细胞。

[0005] (2) 放射状胶质神经元:可以分裂产生本身并同时产生神经元前体细胞或是胶质细胞,主要作用是幼年时期神经发育过程中产生投射神经元完成大脑中皮质及神经核等的基本神经组织细胞。

[0006] (2) 神经母细胞:成年人体中主要存在的神经干细胞,分裂能力可以产生神经前体细胞和神经元和各类神经胶质细胞。

[0007] (4) 神经前体细胞:各类神经细胞的前体细胞,比如小胶质细胞是由神经胶质细胞前体产生的。

[0008] 神经干细胞作为生物医学工程以及体外模型研究中的种子细胞,需要将其在体外进行扩大培养,而如何在体外大规模培养神经干细胞便成为了医学研究的重点。现有的培养神经干细胞的常用培养基为GIBCO的含1% B27的Neurobasal培养基,使用明胶预处理过的培养瓶进行贴壁培养。但经过该培养基培养的神经干细胞增殖能力较弱。因此急需提供一种可增强神经干细胞增殖能力的培养基。

### 发明内容

[0009] 有鉴于此,本发明提供了一种神经干细胞培养基及神经干细胞贴壁培养方法。该神经干细胞培养基能够大大增强神经干细胞的增殖能力,同时能够使得神经干细胞在不用明胶预铺板的情况下贴壁生长,免除了繁琐的操作步骤简化了生产流程。

[0010] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0011] 本发明提供了一种神经干细胞培养基,包括 DMEM/F12、非必需氨基酸、表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素、氢化可的松、WNT3a、Notch1 和牛血清白蛋白。

[0012] 作为优选,神经干细胞培养基中含有 10 ~ 20  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、10 ~ 20ng/mL 表皮生长因子、5 ~ 15ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、10 ~ 20  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、40 ~ 60nmol/L 氢化可的松、10 ~ 20nmol/L WNT3a、40 ~ 60nmol/L Notch1、40 ~ 60  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白。

[0013] 在本发明提供的一些实施例中,神经干细胞培养基中含有 10  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、15ng/mL 表皮生长因子、15ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、10  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、50nmol/L 氢化可的松、20nmol/L WNT3a、40nmol/L Notch1、50  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白。

[0014] 在本发明提供的另一些实施例中,神经干细胞培养基中含有 15  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、20ng/mL 表皮生长因子、5ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、15  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、60nmol/L 氢化可的松、10nmol/L WNT3a、50nmol/L Notch1、60  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白。

[0015] 在本发明提供的另一些实施例中,神经干细胞培养基中含有 20  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、10ng/mL 表皮生长因子、10ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、20  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、40nmol/L 氢化可的松、15nmol/L WNT3a、60nmol/L Notch1、40  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白。

[0016] 作为优选,神经干细胞培养基还包括纤连蛋白和四型胶原蛋白。

[0017] 作为优选,神经干细胞培养基中含有 10 ~ 20  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、10 ~ 20ng/mL 表皮生长因子、5 ~ 15ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、10 ~ 20  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、40 ~ 60nmol/L 氢化可的松、10 ~ 20nmol/L WNT3a、40 ~ 60nmol/L Notch1、40 ~ 60  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白、15 ~ 35ng/mL 纤连蛋白、50 ~ 70ng/mL 四型胶原蛋白。

[0018] 在本发明提供的一些实施例中,神经干细胞培养基中含有 10  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、15ng/mL 表皮生长因子、15ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、10  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、50nmol/L 氢化可的松、20nmol/L WNT3a、40nmol/L Notch1、50  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白、35ng/mL 纤连蛋白、50ng/mL 四型胶原蛋白。

[0019] 在本发明提供的另一些实施例中,神经干细胞培养基中含有 15  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、20ng/mL 表皮生长因子、5ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、15  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、60nmol/L 氢化可的松、10nmol/L WNT3a、50nmol/L Notch1、60  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白、15ng/mL 纤连蛋白、60ng/mL 四型胶原蛋白。

[0020] 在本发明提供的另一些实施例中,神经干细胞培养基中含有 20  $\mu\text{mol/mL}$  非必需氨基酸、10ng/mL 表皮生长因子、10ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、20  $\mu\text{g/mL}$  胰岛素、40nmol/L 氢化可的松、15nmol/L WNT3a、60nmol/L Notch1、40  $\mu\text{g/mL}$  牛血清白蛋白、25ng/mL 纤连蛋白、70ng/mL 四型胶原蛋白。

[0021] 作为优选,非必需氨基酸为谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸、天门冬氨酸、胱氨酸、脯氨酸、丝氨酸或酪氨酸中的一种或两者以上的混合物。

[0022] 在本发明提供的一些实施例中,非必需氨基酸购买于 Gibco 公司。

[0023] 本发明还提供了一种贴壁培养神经干细胞的培养方法,采用本发明提供的神经干细胞培养基培养神经干细胞;

[0024] 在本发明提供的一些实施例中,培养的条件为 5%  $\text{CO}_2$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0025] 在本发明提供的一些实施例中,培养的细胞密度为  $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5/\text{mL}$ 。

[0026] 本发明提供了一种神经干细胞培养基及神经干细胞贴壁培养方法。该神经干细胞培养基包括 DMEM/F12、非必需氨基酸、表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、胰岛素、氢化可的松、WNT3a、Notch1 和牛血清白蛋白。本发明至少具有如下优势之一：

[0027] 本发明提供的神经干细胞培养基能够大大增强神经干细胞的增殖能力。流式检测结果显示，本发明培养基能够使 P6 代的神经干细胞的表面标志物 Nestin<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> 的比例能够达到 33.3%，而传统培养基在 P6 代的 Nestin<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> 的比例仅为 9.8%；本发明培养基培养的神经干细胞在 3~6 天时具有明显的对数生长期，细胞增殖较快，而采用传统培养基培养的神经干细胞的生长曲线显示细胞生长缓慢，无明显对数增殖；

[0028] 本发明培养基添加纤连蛋白和四型胶原蛋白，能够使得神经干细胞在不用明胶预铺板的情况下贴壁生长，免除了繁琐的操作步骤简化了生产流程。

### 附图说明

[0029] 图 1 示试验组 1 培养的神经干细胞在 P6 代的标志物 Nestin<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup> 的流式检测结果；

[0030] 图 2 示试验组 2 培养的神经干细胞在 P6 代的标志物 Nestin<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup> 的流式检测结果；

[0031] 图 3 示试验组 3 培养的神经干细胞在 P6 代的标志物 Nestin<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup> 的流式检测结果；

[0032] 图 4 示试验组 1 培养的神经干细胞生长曲线；

[0033] 图 5 示试验组 2 培养的神经干细胞生长曲线；

[0034] 图 6 示试验组 3 培养的神经干细胞生长曲线；

[0035] 图 7 示对比例 1 中传统培养基培养的神经干细胞在 P6 代的标志物 Nestin<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup> 的流式检测结果；

[0036] 图 8 示对比例 1 中传统培养基培养的神经干细胞生长曲线。

### 具体实施方式

[0037] 本发明公开了一种神经干细胞培养基及神经干细胞贴壁培养方法，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

[0038] 本发明提供的神经干细胞培养基及神经干细胞贴壁培养方法中所用试剂、仪器、试验动物等均可由市场购得。其中，WNT3a 购自上海华雅思创，Notch1 购自武汉福来生物；非必需氨基酸购自 Gibco，货号为 11140，MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10mM(100X)。

[0039] 下面结合实施例，进一步阐述本发明：

[0040] 实施例 1 培养基的制备

[0041] 培养液配方成分为：DMEM/F12、10 μmol/mL 非必需氨基酸、15ng/mL 表皮生长因子、15ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、10 μg/mL 胰岛素、50nmol/L 氢化可的松、20nmol/L

WNT3a、40nmol/L Notch1、50  $\mu$ g/mL 牛血清白蛋白、35ng/mL 纤连蛋白、50ng/mL 四型胶原蛋白。

[0042] 培养基制备方法为：使用时按照规定量将所有成分混合均匀。

[0043] 实施例 2 培养基的制备

[0044] 培养液配方成分为：DMEM/F12、15  $\mu$ mol/mL 非必需氨基酸、20ng/mL 表皮生长因子、5ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、15  $\mu$ g/mL 胰岛素、60nmol/L 氢化可的松、10nmol/L WNT3a、50nmol/L Notch1、60  $\mu$ g/mL 牛血清白蛋白、15ng/mL 纤连蛋白、60ng/mL 四型胶原蛋白。

[0045] 培养基制备方法为：使用时按照规定量将所有成分混合均匀。

[0046] 实施例 3 培养基的制备

[0047] 培养液配方成分为：DMEM/F12、20  $\mu$ mol/mL 非必需氨基酸、10ng/mL 表皮生长因子、10ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子、20  $\mu$ g/mL 胰岛素、40nmol/L 氢化可的松、15nmol/L WNT3a、60nmol/L Notch1、40  $\mu$ g/mL 牛血清白蛋白、25ng/mL 纤连蛋白、70ng/mL 四型胶原蛋白。

[0048] 培养基制备方法为：使用时按照规定量将所有成分混合均匀。

[0049] 实施例 4 本发明培养基培养神经细胞实例

[0050] 出生 1 ~ 4 天的新生小鼠，脱颈处死后取新生小鼠大脑，剥去脑膜后用 4 $^{\circ}$ C PBS 清洗 2 次，加入 2mL 神经干细胞培养液（试验组 1 采用实施例 1 培养基，试验组 2 采用实施例 2 培养基，试验组 3 采用实施例 3 培养基），并用手术剪将大脑剪碎，接着用 1mL 手动移液器将碎片吹散成混悬液，然后调整细胞密度到  $5 \times 10^4$ /mL。将混悬液加入 6 孔板，每孔 2mL 在 5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 培养箱中放置 2 小时，2 小时后吸取 6 孔板中的上清液，加入另一个 6 孔板中继续培养，原 6 孔板弃去不要。培养 24 小时后弃去 6 孔板中的上清液，每孔加入 2mL 神经干细胞培养液（试验组 1 采用实施例 1 培养基，试验组 2 采用实施例 2 培养基，试验组 3 采用实施例 3 培养基），之后每 2 ~ 3 天换液一次。直到细胞融合度达到 80% 时倒去培养基并用含 0.04v/v% EDTA 的浓度为 0.25v/v% 的胰蛋白酶消化细胞 1 分钟，使其脱落，然后用各组所用培养基按照加入胰酶体积的 5 倍终止消化；离心后去除上清液，将沉淀细胞用各组所用培养基重悬，按照  $5 \times 10^4$ /mL 的密度加入培养瓶中，标记为 P1 代细胞。重复传代至 P6 代。

[0051] 将上述各组培养的神经干细胞进行流式检测，在 P6 代的标志物 Nestin<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup> 的流式检测数据见图 1 ~ 3。

[0052] 各组培养的神经干细胞生长曲线见图 4 ~ 6。

[0053] 由图 1 ~ 3 可知，与传统培养基相比，本发明实施例 1 至 3 的培养基能够使 P6 代的神经干细胞的表面标志物 Nestin<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup> 的比例能够达到 33.3%、29.5%、24.3%，而传统培养基在 P6 代的 Nestin<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup> 的比例仅为 9.8%（图 7）。

[0054] 一般增殖能力强的细胞，生长曲线会呈“S”型，可分为 3 个生长时期：第一阶段为适应期，细胞增殖较慢；第二阶段为对数生长期，细胞增殖速度变快，呈对数生长；第三阶段为平台期，细胞增殖减缓。根据神经干细胞 P6 代七天的细胞生长曲线图（图 4 ~ 6），可看到 0 ~ 2 天为适应期，3 ~ 6 天为对数生长期，细胞增殖较快，第 7 天细胞增殖变慢，进入了平台期。细胞生长曲线图可知，该细胞的增殖能力较强。而采用传统培养基培养的神经

干细胞的生长曲线显示细胞生长缓慢,无明显对数增殖(图8)。

[0055] 可见,本发明提供的神经干细胞培养基能够大大增强神经干细胞的增殖能力。

[0056] 同时本发明的培养基能够使得神经干细胞在不用明胶预铺板的情况下贴壁生长,免除了繁琐的操作步骤简化了生产流程。

[0057] 对比例 1 传统培养基培养神经细胞实例

[0058] 传统培养基是指 GIBCO 的 Neurobasal 培养基 +1% B27 添加物。培养基配制方法为:将 Neurobasal 培养基和 B27 添加物混合,比例为 500mL 培养基 +5mLB27 添加物。

[0059] 铺板:将 0.1% (质量体积分数) 的明胶加入 6 孔板中,加入量为每孔 1mL 明胶,将明胶摇匀使之铺满培养瓶底部,将 6 孔板放入 37°C 培养箱中静置 1 小时备用。

[0060] 细胞分离:出生 1-4 天的新生小鼠,脱颈处死后取新生小鼠大脑,剥去脑膜后用 4°C PBS 清洗 2 次,加入 2mL 传统培养基并用手术剪将大脑剪碎,接着用 1mL 手动移液器将碎片吹散成混悬液,然后调整细胞密度到  $5 \times 10^4$ /mL。将混悬液加入已经铺板的 6 孔板种,每孔 2mL,在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 培养箱中放置 2 小时,2 小时后吸取 6 孔板中的上清液,加入另一个已经铺板的 6 孔板中继续培养,原 6 孔板弃去不要。培养 24 小时后弃去 6 孔板中的上清液,每孔加入 2mL 培养液 A,之后每 2 ~ 3 天换液一次。

[0061] 传代:直到细胞融合度达到 80% 时倒去培养基并用含 0.04v/v% EDTA 的浓度为 0.25v/v% 的胰蛋白酶消化细胞 1 分钟,使其脱落,然后用培养基 A 按照加入胰酶体积的 5 倍终止消化;离心后去除上清液,将沉淀细胞用本发明培养基重悬,按照  $5 \times 10^4$ /mL 的密度加入培养瓶中,标记为 P1 代细胞。重复传代至 P6 代。

[0062] 将上述培养的神经干细胞进行流式检测,在 P6 代的标志物 Nestin、CD133<sup>+</sup> 的流式检测数据见图 7。培养的神经干细胞生长曲线见图 8。

[0063] 由图 7 可知,传统培养基在 P6 代的 Nestin<sup>+</sup>、CD133<sup>+</sup> 的比例仅为 9.8%。采用传统培养基培养的神经干细胞的生长曲线显示细胞生长缓慢,无明显对数增殖(图 8)。可见,本发明提供的神经干细胞培养基能够大大增强神经干细胞的增殖能力。

[0064] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,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。

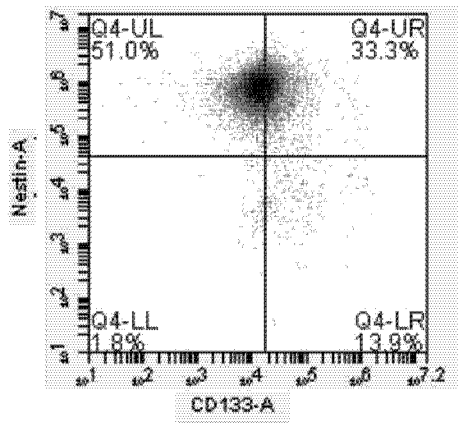


图 1

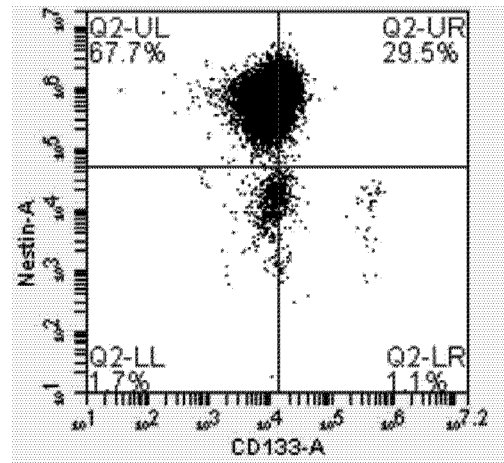


图 2

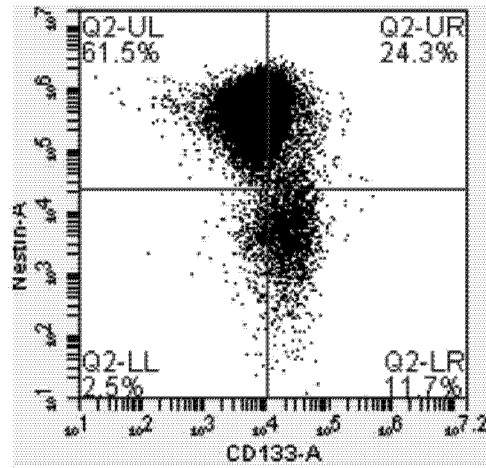


图 3



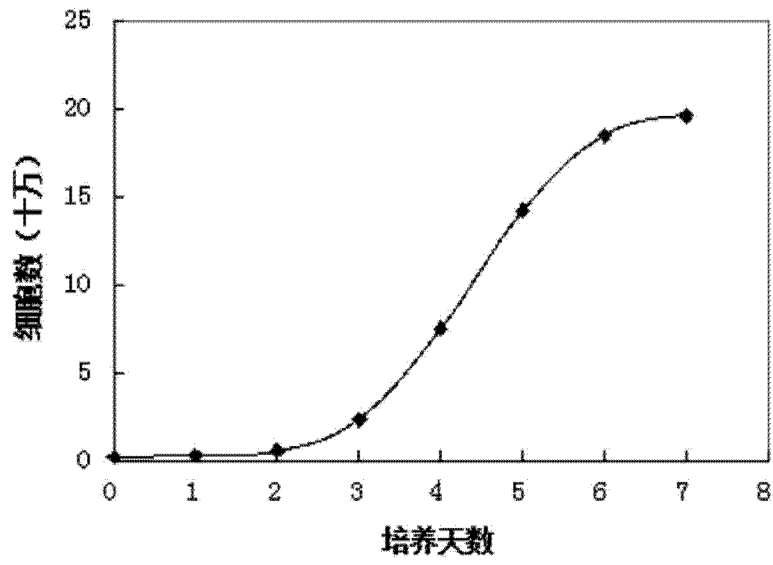


图 4

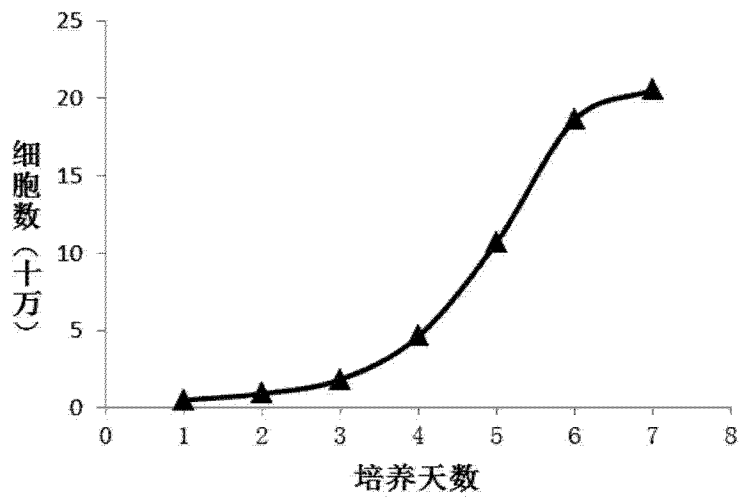


图 5

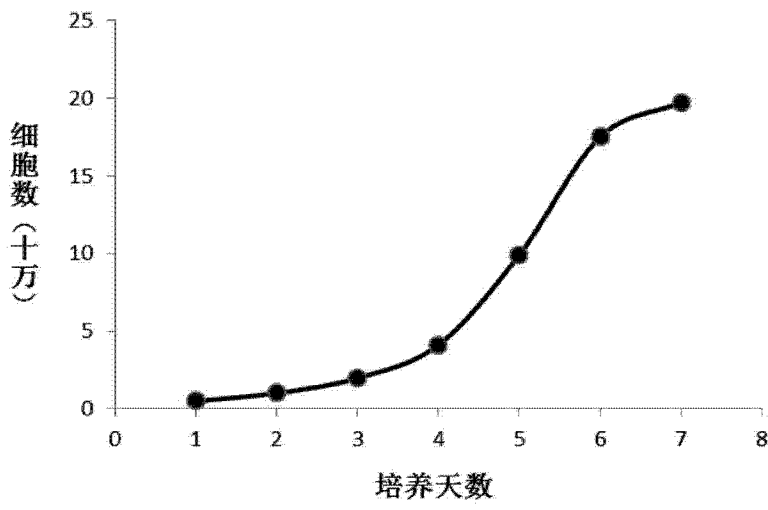


图 6

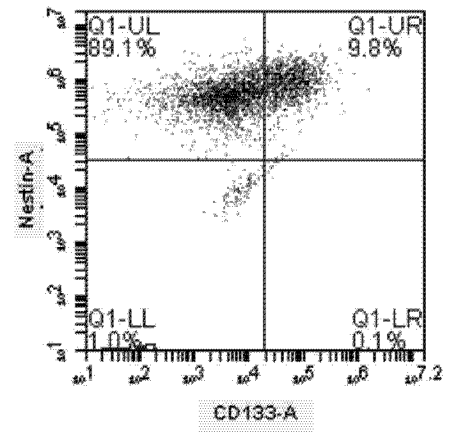


图 7

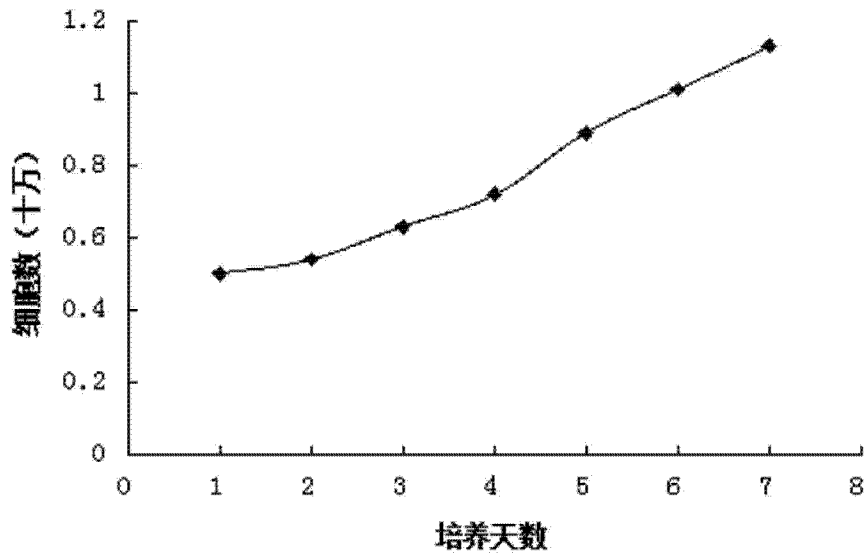


图 8