



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104263699 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201410482325. 8

(22) 申请日 2014. 09. 19

(71) 申请人 江苏华亿细胞组织工程有限公司

地址 225300 江苏省泰州市中国医药城药城  
大道一号 R18 研发楼

(72) 发明人 朱宁文 王凌仪

(51) Int. Cl.

C12N 5/074 (2010. 01)

C12N 5/071 (2010. 01)

权利要求书2页 说明书16页 附图2页

(54) 发明名称

细胞移植用临床治疗级真皮多能干细胞规模化制备培养方法

(57) 摘要

本发明公开了临床治疗级真皮多能干细胞的培养、筛选、扩增技术,这些瓶颈一直是生物学干细胞领域研究热点和难点,目前利用基底膜显著黏附特性进行分离纯化,采用三维培养扩增手段获得。该发明适合依赖扩增贴壁型细胞并提供三维高拟体内细胞外基质系统进行目标细胞水平的筛选与分离。高模拟体内贴附环境,体外培养成体(胚胎皮肤)干细胞的生物细胞新培养技术。高模拟底物所在环境黏附筛选培养目标真皮多能干细胞,具有高传代能力,高增殖能力,并可在体外环境下形成分化全层真皮结构。筛出免疫原性细胞安全获得免疫逃逸,延长移植时间增加组织工程临床应用,促进创面愈合与皮肤疾病提供了绝对优势临床治疗级细胞的解决方案。

1. 一种用于筛选和培养真皮多能干细胞的培养基组合,

配制培养液 A:灭活胎牛血清 40 ~ 60ml、转铁蛋白 5 ~ 15  $\mu$ g/ml、维生素 B40.5 ~  $1 \times 10^{-4}$ /L、维生素 C1 ~ 3  $\mu$ g/ml、胰岛素 2 ~ 4  $\mu$ g/ml、霍乱毒素 2.5 ~ 4.5u/L、维生素 C1 ~ 3  $\mu$ g/ml、EGF5 ~ 25ng/ml、氢化可的松 0.4  $\mu$ g/ml、商用培养基 DMEM/F12(3 : 1) 定容到 500ml。

配制培养液 B:灭活胎牛血清 80ml、转铁蛋白 6 ~ 17  $\mu$ g/ml、腺苷 10 ~ 25mg/ml、维生素 B40.5 ~  $1 \times 10^{-4}$ /L、霍乱毒素 2.5 ~ 3.5u/L、胰岛素 4 ~ 6  $\mu$ g/ml、EGF5 ~ 25ng/ml、bFGF10 ~ 18ng/ml、牛脑垂体提取物 (BPE) 1 ~ 3mg/L、干细胞生长因子 (SCF) 5 ~ 40ng/ml、氢化可的松 0.3  $\mu$ g/ml、商用培养基 DMEM 与商用培养基 F12(1 : 1) 定容到 500ml。PH7.2 ~ 7.4。

配制培养液 C:灭活胎牛血清 60ml、转铁蛋白 6 ~ 17  $\mu$ g/ml、腺苷 10 ~ 25mg/ml、维生素 B40.5 ~  $1 \times 10^{-4}$ /L、胰岛素 4 ~ 6  $\mu$ g/ml、EGF5 ~ 25ng/ml、bFGF10 ~ 18ng/ml、牛脑垂体提取物 (BPE) 2 ~ 3mg/L、干细胞生长因子 (SCF) 15 ~ 40ng/ml、氢化可的松 0.3  $\mu$ g/ml、商用培养基 DMEM 与商用培养基 F12(1 : 1) 定容到 500ml。PH7.2 ~ 7.4。

2. 一种制备高拟体内细胞外基质的方法,包括以下步骤:a) 取材及皮肤消毒处理;b) 脱细胞处理;优选地,还进一步包括将消毒或经脱细胞处理的皮肤进一步进行低温、脱水、辐照灭菌处理;更优选地步骤 b) 的脱细胞方法选自冷酶交联剂法、酶-非离子表面活性剂-络合剂联合法、络合剂加盐-阴离子表面活性剂法或胰酶联合 EDTA 交联液法。

3. 权利要求 2 所述方法,其中冷酶交联剂法是:加入 0.1 ~ 0.25% 蛋白酶冰浴冷消 12 ~ 48h。用含 0.25% 戊二醛磷酸缓冲溶液,PH 在 7.20 ~ 7.40 之间,交联 4 ~ 6h,超纯水或注射用水冲洗 8 ~ 10 次。

4. 权利要求 2 所述方法,其中酶-非离子表面活性剂-络合剂联合法是:0.1 ~ 0.25% 中性蛋白酶与 0.01 ~ 0.02% EDTA, TritonX-100(0.3 ~ 0.6%) 溶液,室温下作用 24 ~ 48h。

5. 权利要求 2 所述方法,其中络合剂加盐-阴离子表面活性剂法是:0.01 ~ 0.02% EDTA 含 0.6 ~ 0.8mol/L 氯化钠溶液,37°C 下作用 12 ~ 24h,后用 (0.2 ~ 0.5% SDS 溶液,室温下作用 30 ~ 60min)。

6. 权利要求 2 所述方法,其中胰酶联合 EDTA 交联液是:0.25 ~ 0.40% 胰蛋白酶和 0.02 ~ 0.04% EDTA(1 : 2),37°C 快速消化 10 ~ 60min。交联液中交联 4 ~ 6h。交联后用超纯水或注射用水冲洗 8 ~ 10 次。

7. 由权利要求 2-6 所述任一方法制备的高拟体内细胞外基质。

8. 权利要求 2-6 所述任一方法制备的高拟体内细胞外基质或者权利要求 7 所述的高拟体内细胞外基质在筛选皮肤干细胞中的用途。

9. 一种利用权利要求 1 所述的培养基组合和权利要求 7 所述的高拟体内细胞外基质筛选和培养真皮多能干细胞的方法,包括:

a) 制备真皮多能干细胞悬液:取材,消化,用权利要求 1 所述的培养液 A 终止消化,剥离表皮收集皮片,置消化液配制 B 或 C 中,收集细胞混悬液。离心后加入培养液 A 养液;

b) 真皮多能干细胞的筛选及培养:将权利要求 7 所述的高拟体内细胞外基质加入权利要求 1 所述的培养液 B,加入步骤 a) 制备的细胞悬液,培养,清洗,目标真皮多能干细胞贴壁

粘附于高拟体内细胞外基质,加入权利要求 1 所述的培养液 C 进行扩增培养;

c) 消化富集传代培养:消化,离心后加入权利要求 1 所述的培养液 C 进行扩增培养。

优选地,免疫逃逸方法处理取材前皮肤或获得细胞,免疫逃逸方法可以为射线法、低温冻融法。

## 细胞移植用临床治疗级真皮多能干细胞规模化制备培养方法

### 一、技术领域：

[0001] 本发明属于生物干细胞技术,组织工程领域。涉及一种体外构建高模拟体内贴附环境分离筛选,皮肤干细胞的培养、扩增技术。获得临床治疗级真皮多能干细胞应用于组织工程皮肤构建技术中的活性种子干细胞。

### [0002] 二、背景技术介绍：

[0003] 皮肤是人体最大的器官,参与抵御生物入侵、紫外线辐射以及防止水分丢失、调节体温维持个体外貌等方面起着十分重要的生理作用,其是人体免疫系统组成的重要的一部分,而皮肤细胞是构成这器官的基本单元,皮肤细胞基础研究领域是揭示皮肤健康、发育、预防、治疗的重要科研途径。

[0004] 细胞外基质(extracellular matrix,ECM)广泛存在于细胞间隙的基本填充成分,是细胞新陈代谢、生长、繁殖、分化、表达、传递、互惠所依赖的极其重要场所。早期研究学者认为,外基质只是一种组织内、细胞外的单纯的支持结构。Hauschka 和 Konigsberg 在 1966 年研究发现填充组织间隙的胶原与促进成肌细胞转化肌管的现象。并在两年之后,得以证明学者们才对这种稳定外物质微环境有了新的认识和思考。

[0005] Hay 在 11 年后报道了 ECM 对胚胎发育过程具有重要的诱导作用。ECM 影响细胞行为的现象得以关注并进行广泛的研究,但是并没有成型的理论基础佐证 ECM 与细胞的密切关系。直到 1982 年有学者提出证明并建立 ECM 与细胞骨架和核基质之间“动态互惠”的模型。在这个模中,ECM 分子与细胞表面受体互相作用,然后把信号通过细胞膜传导进入细胞浆中,引起从细胞骨架到细胞核的一系列变化,引起某些特定基因的表达。

[0006] 并证明这些基因的表达产物又可以反过来对 ECM 发生作用,今天的许多研究证实了这个模型的合理性,并且证明细胞和 ECM 相互作用直接参与了细胞的黏附、生长、游走、分化和程序性死(凋亡)的过程;外基质参与调节细胞因子、生长因子的活性;还能够直接激活、启动细胞内信号传导机制。由于这种对细胞的调节和对信号的传导作用。因此,我们必须充分了解细胞外基质的化学的、物理的、生物学性质和功能及其在组织的形成和修复中的作用,才能更好地应用这些生物材料构建成为组织接受,乃至模拟组织完善再生的“生物构架”。我们建立的高拟细胞外基质材料利用的恰是反向理论,指导我们深入开展对 ECM 的认识,同时也反作用得到我们可利用的干细胞,这种研究模式促进学科前行及发展。

[0007] 皮肤干细胞在正常皮肤组织中含量极少,干细胞公认是一种在体内具有无限更新能力,且可分化形成相应全层组织分化细胞,体外培养具有长期生长潜能并可形成无限克隆。是愈合修复创面,皮肤更新代谢再生的重要参与者。但由于目前缺乏理想筛选方法,对干细胞进行筛选及鉴定方法报道较少。

### [0008] 三、皮肤干细胞名称概述

[0009] 1981 年 Potten 提出,皮肤干细胞(skin stem cell)。表皮干细胞(epidermal stem cell, ESC)或角朊干细胞(Keratinocyte stem cell, KSC);真皮干细胞(dermis stem cell)、或真皮多能干细胞(dermal multipotent stem cell)或称为皮肤前体细胞

(skin-derived precursor)。

[0010] 真皮间充质细胞又叫真皮多能干细胞,来源于发育早期的中胚层和外胚层,具有广泛的分化潜能,可向多种中胚层和外胚层来源的组织细胞分化。近年来发现,这类细胞广泛存在于成熟个体的多种组织中,并已证实间充质干细胞存在于骨髓、肌肉、大脑、骨膜等组织中。真皮多能干细胞在体外培养时能分化成神经元、神经纤维、肌肉、脂肪等多种细胞。

[0011] 真皮多能干细胞存在于真皮层内。其数量较少,周围血供良好,营养丰富、所处微环境具有优异性;在损伤或生长刺激等因素下可增殖,具有慢周期性;具有未分化细胞的特征;自我更新增殖能力强;体外克隆能力突出等优势细胞特征。创伤修复的再生重建重要愈合干性细胞。

#### [0012] 四、真皮多能干细胞概述

[0013] 真皮中多能干干细胞的研究起步较晚,对于它的生物学认识目前才刚刚开始,因而真皮多能干细胞目前尚未统一定义。但现在的研究结果证实,这种间充质干细胞来源的真皮多能干细胞在成体内参与皮肤的再生与修复过程。且皮肤创伤后造成的微环境对真皮多能干细胞具有一定的调控作用,这可能是由于创伤后皮肤局部因子发生改变,促进了真皮多能干细胞的迁移分化,从而加速了创伤的修复。因而,有人推测干细胞与微环境之间的相互作用是其参与修复的生理基础(Watt、Van、史春梦等、Shi等,2004)。真皮中多能干细胞可作为真皮修复细胞的来源细胞,在毛囊和非毛囊的真皮中都有分布,但目前对其在真皮内的具体定位尚不清楚。但越来越多的实验结果表明,在毛囊的毛乳头及毛囊真皮鞘中,有具克隆性生长的成体干细胞分布,这些细胞具有一定的分化潜能,而在毛乳头中富含更多的真皮多能干细胞(Jahoda等,2003;Legue等,2005)。

[0014] 由于真皮多能干细胞相对易于获得,同时能进行多向分化,从而它在自体干细胞基因治疗方面有广阔的基础及临床研究前景。

#### [0015] 五、真皮多能干细胞的特点

[0016] Toma等的研究表明,利用添加表皮生长因子(EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的培养液对分离得到的真皮多能干细胞进行体外培养,可形成球形克隆。目前的资料显示,真皮多能干细胞可在体外进行扩增培养,并能传20代以上,具有强的增殖能力。大量的实验结果显示:TGF- $\beta$ 抑制皮肤基底角质形成细胞的增殖,但可促进成纤维细胞的生长增殖。Yoko等研究证实在真皮多能干细胞的体外培养中添加TGF- $\beta$ ,在保证细胞特性稳定的前提下,可进一步促进真皮多能干细胞的增殖,TGF- $\beta$ 在真皮多能干细胞的增殖过程中具有一定的作用。

[0017] 在添加一定的因子(如地塞米松、维生素C、维A酸等)的分化诱导体系中培养,真皮多能干细胞可向骨样细胞、软骨样细胞、脂肪样细胞、神经样细胞进行分化,具有多向分化潜能(Dyce等,2004)。Gorio等将分离的大鼠真皮多能干细胞在体外培养扩增后,再自体移植入受损的脊索内,60~90d后观察到移植的细胞依然存活,且分化为具有胶质细胞及神经元细胞标志分子的细胞。研究表明,真皮多能干细胞可能具有异质性,含有一类小体积但功能更为原始的细胞群,人们利用基因芯片方法检测到真皮多能干细胞表达多种不同细胞类型的特定转录因子,包括骨细胞、神经细胞、肌肉等,这可能是其多向分化潜能的分子基础。

#### [0018] 六、真皮多能干细胞的分离及鉴别

[0019] 对真皮多能干细胞多采用贴壁筛选的方法进行分离,同时利用这一方法并结合相对特异标识分子、增殖活性、分化潜能等几方面对真皮多能干细胞加以鉴定。

[0020] 目前常根据特异性表面分子标识物和无限更新分化能力有无的特点来鉴别干细胞。现在对真皮多能干细胞的研究并未发现特异的表面标识物,但它能表达 CD90、CD59、CD44 等表面分子,特别在于真皮多能干细胞可表达表达 nes-tin,而与真皮成纤维细胞不同的是它不表达波形丝蛋白,也无胶原分泌功能。

[0021] 真皮多能干细胞在有毛区和无毛区的真皮中均有分布。史春梦等通过贴壁法分离培养了大鼠和人包皮的真皮多能干细胞,表现出多能分化潜能,经诱导可向成骨细胞及脂肪细胞分化。近年来,国外学者也通过干细胞培养基,分离培养了不同年龄段的人体真皮多能干细胞克隆;其在体外培养的克隆数、增殖能力的大小以及其分化能力,受年龄的影响。目前虽对真皮多能干细胞的研究刚刚起步,但已有研究表明其在组织工程、基因治疗及细胞治疗等方面具有潜在的应用前景。

#### [0022] 七、传统筛分方法介绍

[0023] 因为皮肤干细胞对基底膜有较强的粘附性,对细胞胞外基质的粘附速度要比其它类型细胞快得多,所以利用该种特性进行培养筛选。目前传统的皮肤干细胞筛选如下阐述:

[0024] 方法一(3T3 滋养层法):人类皮肤细胞体外培养研究已有一个世纪的历史背景,建立体外扩增培养体系于 1975 年由学者 Rheinwald 和 Green 所设计 3T3-J2 小鼠胚胎瘤的成纤维细胞株 3T3 滋养层细胞,并用  $\gamma$  射线致死剂量照射,防止干细胞受到异物种的影响。灭活 3T3 滋养层细胞作为培养皮肤细胞的滋养层能促进皮肤细胞筛选的贴附和生长,并具有未被论证的接触性抑制成纤维细胞生长的功能。实验室所选用的、功能较稳定的各亚系但还不能完全排除对它的顾虑,还需继续观察和探索有效的替代方法。Green 研究这种方法的 3T3 虽然它是一个异种的具有问变性质的细胞,有不少实验室曾试图用其他措施予以取代,但至今为止,它的效果在各种方法中仍是最有效的,继续被广泛应用。从第 1 例临床应用至今已近 30 年,尚未发现因它而造成的不良后果。

[0025] 方法二(纤维蛋白原及凝血酶底物法):Graziella P 学者研究用纤维蛋白原及凝血酶作为基质分离皮肤细胞;

[0026] 方法三(IV 型胶原黏附法):Jone PH 等利用上述方法从成人包皮或尸体皮经消化,利用 IV 型胶原做底物基质分离皮肤细胞,所选用底物为异种胶原,存在不同种属的污染可能性,并且底物昂贵,不适合产业化规模或长期培养,适合试验性小剂量研究;

[0027] 方法四(流式细胞仪筛选法):学者 Van Rossum MMj 与 Kaur P 等从人小块活检组织中得到角朊细胞,利用整合素标记异性标志物利用流式细胞仪分离干细胞,选用方法复杂且技术要求高,大体应用 integrin  $\beta$  1,细胞黏附分子 CD49,增殖细胞核抗原(PCNA)等多种标记进行特征分离,虽然干细胞得以筛选,但是会留有标记物标记滞留干细胞无法有效去除,存在是否影响干细胞增殖、分化、变异性等。此方法适合标记鉴定测定干细胞,并不适合临床应用的干细胞富集方法;

[0028] 方法五(异种成纤维悬浮筛选法):学者 Hagar B 利用 DMEM、低钙离子鼠成纤维细胞条件培养液作为培养基,不用滋养层细胞。但有研究报导表皮干细胞与基底膜脱离可诱发进入分化周期,分化为过渡性扩充细胞,据猜想皮肤细胞与基底膜的高粘附性有可能是

维持皮肤细胞控制分化特性的可能条件。所以如果不利用滋养层,有可能长期培养过程中皮肤细胞分化引起后续研究的不可控发展;

[0029] 方法六(自体成纤维贴附筛选法):学者金岩等利用参考改进学者 Hagar B 和 Dunwald 鼠成纤维细胞,改成供体预先体外扩增的成纤维细胞为附着底物作为滋养层,培养自体皮肤细胞,但是专利并没有明确如何制备滋养层平皿的详细步骤,铺皿周期短,成纤维贴壁力低,筛选反复 PBS 清洗纯化过程会损失部分培养的目标贴附成功的成纤维细胞,从而降低目标干细胞的得率,皮肤细胞理论上具有自体同源性,另一技术问题在于,两种细胞在共有同一培养环境应考虑培养液的复杂性,两种细胞可能出现竞争性的生长增殖抑制等现象,后续分离皮肤细胞存在技术难度,并不能优于现有的六中常见方法,建议其可把此方法改成复方加入其它覆皿效果好黏附行为比较大的其它筛选物同用增加目标细胞得率,或灭活成纤维铺皿层细胞。

[0030] 方法七(甲基纤维素培养皿贴附筛选法):国外学者利用添加甲基纤维素,用含 2% B27 的 DMEN/F12 进行真皮多能干细胞培养。甲基纤维素易被微生物破坏而腐败,并且该方法制备培养基溶液粘度加大不利于细胞自由伸展扩增。影响相邻细胞间的融合物质交换如营养物质,气体交换等,诸多不确定不利因素。并且该无机材料不被机体吸收代谢,培养过程中引入不易清除,不适于临床治疗级细胞要求。

[0031] 综上所述,真皮多能干细胞对细胞外基质的黏附强快速特性,体外筛选培养的人真皮多能干细胞得以在国内外方法特异性快速发展。而真皮多能干细胞生物学性能,可以做到增进功能、本发明避免潜在有害基因及对真皮多能干细胞污染,在基础科研、临床治疗、干细胞研究方向、皮肤再生损伤修复、高拟组织工程皮肤的构建方面等均有历史时期的重要不可取代的指导意义。

[0032] 八、组织工程皮肤背景介绍

[0033] 再生组织工程细胞建立系工作始于本世纪(Harrison 1907, Carrel 1912),指引着生物学,临床医学材料等各大衔接领域,成为重要的基础科学之一。组织构建和细胞体外培养是至关重要的课题。从供体捐献者活体取组织,模拟体内生理环境等系列特定体外微环境体系,进行孵化培养、使得组织细胞健康生长。

[0034] 组织工程皮肤建立早期应用于修复烧伤和溃疡以及其它皮肤损伤领域,麻省总医院的 John F. Burke 与 MIT 的 Yannas I. V. 合作,制备首次人工皮肤替代物。但是这种组织皮肤替代物并不与细胞生物学相关,隶属于组织工程皮肤支架材料学范畴。随着细胞生物学的基础学科发展,人们开始整合两大学科,共同协作解决创伤皮肤修复构建,真正的含活性细胞组织工程皮肤在哈佛大学 Howard Green 与 MIT 的 Eugenen Bellhe 合作完成。早期定制皮肤移植救治取得了生物学医学界瞩目关注。

[0035] 20 世纪 80 年代初期支架材料被 FDA 许可上市,由胶原网格组成的复合皮肤移植材料被创造出来,内层为牛胶原和硫酸软骨素构成,外层为硅胶树脂,创面移植后内层与创面接触被缓慢降解,数周后硅胶树脂层移除,清创后覆盖自体移植皮肤,覆盖物被临床所接受。

[0036] MIT 的科学家 Bellhe 把材料学和生物学完美结合创造了组织工程皮肤并建立了世界上第一家组织工程再生公司(Organogenesis Inc),是科学界商人的典范。这家活性组织工程皮肤先驱引领公司仍然是在人工皮肤市场占有率最高的组织工程公司之一。

[0037] 1997 年通过美国 FDA 批准上市的第一个组织工程产品由 Advanced Bionhealing

公司生产的 TransCyte。用于烧伤创面修复治疗。该产品属于胶原支架材料种植灭活性的纤维细胞,成为商业化的第一个“异体无活性细胞组织工程真皮疗法”。Dermagraft 和 Integra 以及 Organogenesis Inc 制造的 Apligraf 也获得 FDA 批准,利用新生儿包皮经生物学体外培养活性细胞,制备的组织工程皮肤,用于溃疡皮肤和大面积烧伤再生治疗。该产品是严格意义上具有类皮肤组织工程人工皮肤,含活性 4 ~ 8 传代的细胞并具有完整表皮真皮细胞构建在组织工程支架之上可降解全层人工皮肤。并且部分剔除减少朗格汉斯细胞,降低了受体的免疫排斥反应,无活性的死亡细胞经过创面组织液及相关体液因子代谢的作用被分解可用于创面修复的小分子片段基础营养愈合物质被创面吸收利用。这种产品制成后置于 -70℃ 保存,37℃ 迅速复苏,复苏后有 50% 的活性细胞具有活性,活性维持 5 天通过快递邮寄到指定的医疗部门。

[0038] 这些产品的市场准入引领了崭新的再生医学组织工程皮肤时代开创。

[0039] 基于国内国际组织工程人工皮肤现状,建立组织工程皮肤干细胞 - 高拟体内细胞外基质,基质附着体外筛选方法设计首例含有表皮干细胞与真皮多能干细胞的全层组织工程人工皮肤产业化产品。

## 发明内容

[0040] 1. 一种用于筛选和培养真皮多能干细胞的培养基组合,

[0041] 配制培养液 A :灭活胎牛血清 40 ~ 60ml、转铁蛋白 5 ~ 15  $\mu$  g/ml、维生素 B40. 5 ~  $1 \times 10^{-4}$ /L、维生素 C1 ~ 3  $\mu$  g/ml、胰岛素 2 ~ 4ug/ml、霍乱毒素 2.5 ~ 4.5u/L、维生素 C1 ~ 3  $\mu$  g/ml、EGF5 ~ 25ng/ml、氢化可的松 0.4  $\mu$  g/ml、商用培养基 DMEM/F12(3 : 1) 定容到 500ml。

[0042] 配制培养液 B :灭活胎牛血清 80ml、转铁蛋白 6 ~ 17  $\mu$  g/ml、腺苷 10 ~ 25mg/ml、维生素 B40. 5 ~  $1 \times 10^{-4}$ /L、霍乱毒素 2.5 ~ 3.5u/L、胰岛素 4 ~ 6ug/ml、EGF5 ~ 25ng/ml、bFGF10 ~ 18ng/ml、牛脑垂体提取物 (BPE) 1 ~ 3mg/L、干细胞生长因子 (SCF) 5 ~ 40ng/ml、氢化可的松 0.3  $\mu$  g/ml、商用培养基 DMEM 与商用培养基 F12(1 : 1) 定容到 500ml。PH7.2 ~ 7.4。

[0043] 配制培养液 C :灭活胎牛血清 60ml、转铁蛋白 6 ~ 17  $\mu$  g/ml、腺苷 10 ~ 25mg/ml、维生素 B40. 5 ~  $1 \times 10^{-4}$ /L、胰岛素 4 ~ 6  $\mu$  g/ml、EGF5 ~ 25ng/ml、bFGF10 ~ 18ng/ml、牛脑垂体提取物 (BPE) 2 ~ 3mg/L、干细胞生长因子 (SCF) 15 ~ 40ng/ml、氢化可的松 0.3  $\mu$  g/ml、商用培养基 DMEM 与商用培养基 F12(1 : 1) 定容到 500ml。PH7.2 ~ 7.4。

[0044] 2. 一种制备高拟体内细胞外基质的方法,包括以下步骤 :a) 取材及皮肤消毒处理 ;b) 脱细胞处理 ;优选地,还包括将消毒或经脱细胞处理的皮肤进一步进行低温、脱水、辐照灭菌处理 ;更优选地步骤 b) 的脱细胞方法选自冷酶交联剂法、酶 - 非离子表面活性剂 - 络合剂联合法、络合剂加盐 - 阴离子表面活性剂法或胰酶联合 EDTA 交联液法。

[0045] 3. 权利要求 2 所述方法,其中冷酶交联剂法是 :加入 0.1 ~ 0.25% 蛋白酶冰浴冷消 12 ~ 48h。用含 0.25% 戊二醛磷酸缓冲溶液,PH 在 7.20 ~ 7.40 之间,交联 4 ~ 6h,超纯水或注射用水冲洗 8 ~ 10 次。

[0046] 4. 权利要求 2 所述方法,其中酶 - 非离子表面活性剂 - 络合剂联合法是 :0.1 ~ 0.25% 中性蛋白酶与 0.01 ~ 0.02% EDTA, TritonX-100(0.3 ~ 0.6%) 溶液,室温下作用



24 ~ 48h。

[0047] 5. 权利要求 2 所述方法,其中络合剂加盐-阴离子表面活性剂法是:0.01 ~ 0.02% EDTA 含 0.6 ~ 0.8mol/L 氯化钠溶液,37℃下作用 12 ~ 24h,后用 (0.2 ~ 0.5% SDS 溶液,室温下作用 30 ~ 60min)。

[0048] 6. 权利要求 2 所述方法,其中胰酶联合 EDTA 交联液是:0.25 ~ 0.40% 胰蛋白酶和 0.02 ~ 0.04% EDTA(1 : 2),37℃快速消化 10 ~ 60min。交联液中交联 4 ~ 6h。交联后用超纯水或注射用水冲洗 8 ~ 10 次。

[0049] 7. 由权利要求 2-6 所述任一方法制备的高拟体内细胞外基质。

[0050] 8. 权利要求 2-6 所述任一方法制备的高拟体内细胞外基质或者权利要求 7 所述的高拟体内细胞外基质在筛选皮肤干细胞中的用途。

[0051] 9. 一种利用权利要求 1 所述的培养基组合和权利要求 7 所述的高拟体内细胞外基质筛选和培养真皮多能干细胞的方法,包括:

[0052] a) 制备真皮多能干细胞悬液:取材,消化,用权利要求 1 所述的培养液 A 终止消化,剥离表皮收集皮片,置消化液配制 B 或 C 中,收集细胞混悬液。离心后加入培养液 A 养液;

[0053] b) 真皮多能干细胞的筛选及培养:将权利要求 7 所述的高拟体内细胞外基质加入权利要求 1 所述的培养液 B,加入步骤 a) 制备的细胞悬液,培养,清洗,目标真皮多能干细胞贴壁粘附于高拟体内细胞外基质,加入权利要求 1 所述的培养液 C 进行扩增培养;

[0054] c) 消化富集传代培养:消化,离心后加入权利要求 1 所述的培养液 C 进行扩增培养。

[0055] 优选地,免疫逃逸方法处理取材前皮肤或获得细胞,免疫逃逸方法可以为射线法、低温冻融法

## 附图说明

[0056] 图 1 高拟体内细胞外基质制备流程

[0057] 图 2 细胞筛选培养

[0058] 一、高拟体内细胞外基质种类

[0059] (涉及的皮肤均为器官捐献,包皮环切皮肤、以及医疗救治过程中植皮取皮废弃皮肤组织)

[0060] 1.1 其特征在于:针对本发明技术的发展现状,本发明的目的是提供一种高拟体内真皮层作为细胞外基质为筛选贴附,成体或胚胎皮肤真皮多能干细胞筛选分离和体外培养的方法,并使获得的高纯度真皮多能干细胞。

[0061] 1.2 其特征在于:针对本发明技术的发展现状,本发明的目的是提供一种高拟体内全层皮肤作为为细胞外基质为筛选贴附,成体或胚胎皮肤皮肤干细胞筛选分离和体外培养的方法,并使获得的高纯度皮肤干细胞。皮肤细胞包括:(真皮多能干细胞、毛囊干细胞、表皮干细胞、及其它皮肤附件附属相关的干细胞及皮肤相关细胞)。

[0062] 这种筛选分离和体外培养的方法,获得的真皮多能干细胞细胞克服以上传统七种方法的缺陷。

[0063] 发明属生物成体(胎儿)干细胞细胞技术领域,涉及真皮多能干细胞的分离与培

养方法。方法特征包括：自体表皮、真皮、全层脱细胞表皮底物预备；自体真皮细胞的分离；利用高拟体内附着基质真皮多能干细胞的筛选及培养。目前用该法在体外已稳定培养传代超过 20 ~ 30 (代)，经体内外实验证实该细胞无细胞毒，具有强的增殖能力，并可以形成成熟的全层分化真皮层结构为有关皮肤干细胞在科研、教学及临床的应用起到不可估量的作用，同时孕育着巨大学术方向与社会效益和经济效益。通过此种方法理论基础推进我国其他干细胞的学术基础建立。

[0064] 二、高拟拟体内细胞基质构成：

[0065] 经分析含有多种胶原并包含 IV 型、其中 I 型胶原含量最大 (I 与 III 型胶原的比例为 10 : 1)，同时还保留了完整的基底膜结构。

[0066] 三、高拟体内细胞基质底物孔隙率与黏附表面特征：

[0067] 高拟底物电镜观察，测定表皮黏附的底物组织再生的基底膜孔隙直径为 32 ~ 145um，促进黏附真皮组织再生底物基底膜多孔孔隙直径为 72 ~ 191 μm。这种孔隙率所购建的空间黏附表面均有利于干细胞黏附附着生长、增殖、分化。

[0068] 通过以上制备方法；有效的保留了皮肤细胞外基质的微观构架和完整的基底膜结构，其主要成分包括各型胶原、弹性蛋白、蛋白多糖及糖胺多糖等不溶性基质成分，可为真皮干细胞等快速粘附、表皮干细胞、增殖扩展提供有力的支持。因此，高拟底物是目前最理想的组织工程皮肤干细胞筛选的解决方案。

[0069] 四、皮肤干细胞高拟拟体内细胞基质制备具体实施步骤与方法：

[0070] 一、包括以下两个步骤种方法：

[0071] 步骤一：皮肤消毒处理过程：取供体皮肤包括以下（胚胎皮肤、成体包皮外板、头皮、腋下皮肤、及躯干皮肤均可）含表皮真皮结构的断层皮肤，剪切成组织块浸泡在生理盐水稀释含 0.05 ~ 0.1% 苯扎溴铵溶液中 10 ~ 15min，消毒处理，用无菌生理盐水反复冲洗残余苯扎溴铵。

[0072] 步骤二：低温 -60 ~ -80℃ 冷冻干燥，真空度达到 20 ~ 110pa，脱去组织块 90 ~ 95% 以上水分，取出密封与真空包装，经辐照 25 ~ 60KGY 剂量灭菌。终品可以在室温中保存长达 5 年。启动只需浸泡 37℃，PBS 液或下面所述营养液复苏 15 ~ 30min 即可应用，浸泡延长至 10 ~ 12h 效果更佳。使用后并且应用去细胞漂洗液（见下方法中相应提及适合的脱细胞液）脱细胞处理、再经过上述过程永生反复使用的特点。

[0073] 1：步骤二具体实施方式：

[0074]

实施例	低温冷冻干燥	真空度	辐照剂量
	-60~-80℃	20~110pa	25~60KGY
1.1	60	20pa	25KGY
1.2	65	60pa	35KGY
1.3	70	80pa	50KGY
1.4	80	110pa	60KGY

[0075] 上述所提及的脱细胞液制备如下所述：

[0076] 二、方法：

[0077] 实例方法 1：皮片经处理后加入 0.1 ~ 0.25% 蛋白酶冰浴冷消 12 ~ 48h。用含 0.25% 戊二醛磷酸缓冲溶液调节 PH 在 7.20 ~ 7.40 之间用交联液冲洗组织块 3 ~ 6 次，最后放入交联液中交联 4 ~ 6h，结束后用超纯水（或注射用水）反复冲洗 8 ~ 10 次去除残留戊二醛，即可进行冷冻干燥脱水封装。

[0078] 1.1：实例方法 1 具体实施方式：

[0079]

实施例	蛋白酶%	冷消	交联冲洗液冲洗次数	交联时间	水处理次数
	0.1~0.25%	12~48h	3~6 次	4~6h	8~10 次
1.1.1	0.1%	12h	3 次	4h	8 次
1.1.2	0.15%	20h	4 次	5h	9 次
1.1.3	0.2%	40h	5 次	5h	9 次

[0080]

1.1.4	0.25%	48h	6 次	6h	10 次
-------	-------	-----	-----	----	------

[0081] 方法一特点：交联剂可有效的是结缔组织蛋白不可容性交联构架，增强底物的抗降解性，保持底物完整，蛋白酶处理底物可使其柔任性增强。

[0082] 皮肤表皮层内含四层结构，各层细胞量为 10 ~ 30%，其中生发层称为基底细胞层是细胞最为活跃的附着分裂分化场所，有达 9 ~ 15 层之多；颗粒层结构含有大量间隙层状物，角化层多呈网状编织状，立体复杂的空间互穿行结构，体外支架材料很难模拟模仿。故此类底物基质是最适合细胞粘附增殖生长分化所需的理想微环境场所。

[0083] 实例方法 2：酶 - 非离子表面活性剂 - 络合剂联合法

[0084] 0.1 ~ 0.25% DisPase 中性蛋白酶与 0.01 ~ 0.02% EDTA 联合消化，中性蛋白酶作用于基底膜，选择性地分解纤维连接素与 IV 型胶原（4℃ 下作用 48h），然后应用非离子型表面活性剂使细胞溶解破坏 TritonX-100（聚乙二醇辛基苯基醚）（0.3 ~ 0.6% 溶液，室温下作用 24 ~ 48h）与生物膜中的磷脂等脂质结合形成复合物溶解于溶液中，同时 TritonX-100 中的亲油基端也能和细胞外膜蛋白结合破坏生物膜，从而达到脱弃细胞作用。

[0085] 消化后可选择性剥离表皮真皮，经方法 1 进行戊二醛交联步骤，即可进行冷冻干燥脱水封装。

[0086] 2.1：实例方法 2 具体实施方式：

[0087]

实施例	DisPase	EDTA	TritonX-100	交联冲洗液 冲洗次数	交联 时间	水处理 次数
	0.1~0.25%	0.01~0.02%	0.3~0.6% 24~48h	3~6 次	4~6h	8~10 次
2.1.1	0.1%	0.01%	0.3% 24h	3 次	4h	8 次
2.1.2	0.15%	0.01%	0.4% 30h	4 次	5h	9 次
2.1.3	0.2%	0.02%	0.5% 40h	5 次	5h	9 次
2.1.4	0.25%	0.02%	0.6% 48h	6 次	6h	10 次

[0088] 实例方法 3 :络合剂加盐 - 阴离子表面活性剂法

[0089] 利用高渗氯化钠溶液 (0.01 ~ 0.02% EDTA 含 0.6 ~ 0.8mol/L 氯化钠溶液, 37°C 下作用 12 ~ 24h) 使锚状细丝与表皮基底细胞的半桥粒分离开来, 从而完整去除表皮, 再用破膜剂十二烷基磺酸钠 (0.2 ~ 0.5% SDS 溶液, 室温下作用 30 ~ 60min) 将细胞成分从真皮中去除。

[0090] 以上步骤可选择性剥离表皮真皮, 保留全层经方法 1 进行戊二醛交联步骤, 即可进行冷冻干燥脱水封装。

[0091] 3.1 :实例方法 3 具体实施方式 :

[0092]

实施例	氯化钠%	EDTA%	作用时间	SDS	同 上 交 联 处 理
	0.6~0.8mol/L	0.01~0.02	12~24h	0.2~0.5% 30~60min	
3.1.1	0.6%	0.01%	12h	0.2% 30min	
3.1.2	0.7%	0.01%	18h	0.3% 40min	
3.1.3	0.75%	0.02%	20h	0.4% 50min	
3.1.4	0.8%	0.02%	24h	0.5% 60min	

[0093] 实例方法 4 :用 0.25 ~ 0.40% 胰蛋白酶和 0.02 ~ 0.04% EDTA (1 : 2) 混合液联合消化组织块, 37°C, 快速消化 10 ~ 60min, 反复漂洗脱细胞, 最后放入交联液中交联 4 ~ 6h, 结束后用超纯水 (或注射用水) 反复冲洗 8 ~ 10 次去除残留戊二醛, 即可进行冷冻干燥脱水封装。

[0094] 4.1 :实例方法 4 具体实施方式 :

[0095]

实施例	胰蛋白酶%	EDTA%	快速消化作用时间	同上 交 联 处 理
	0.25~0.4%	0.01~0.04	10~60min	
4.1.1	0.6%	0.01%	10min	
4.1.2	0.7%	0.01%	20min	
4.1.3	0.75%	0.02%	40min	
4.1.4	0.8%	0.02%	60min	

[0096] 以上方法均可组合制备出高拟体内细胞外基质所述:1.1、1.2进行筛选干细胞。

[0097] 上述方法制得略有差异,时间上成本上有异,但均可有效使得细胞成分被清除,基质的结构完整性被保留,含有弹力素、硫酸角质素、层粘素、IV型胶原、纤维连接素、结合素、HLA-DR的含量较多,基底膜结构成分均可以完整保留。

[0098] 对于附着性的种子干细胞提供了有利微环境,使其表达、生长、增殖、分化等起到及其重要,并且优于以上提及的7种常规筛选方法不可替代高模拟附着状态空间。我们称之为“细胞种植黑土壤环境”。

[0099] 高拟体内细胞外基质/基质筛选真皮多能干细胞培养法

[0100] 五、皮肤取材筛选:

[0101] 人干细胞筛选部位包括,胎儿皮肤、包皮外板、头皮、腋窝部位皮肤。

[0102] 高拟体内细胞外基质部位取材:胎儿皮肤、包皮外板、头皮、腋窝部位皮肤、其他部位皮肤均可。

[0103] 领用时以含有抗生素(青霉素80~100u/ml和80~100 $\mu$ g/ml链霉素)的PBS充分浸泡3~5min,修整标本尽量去除皮下组织。

[0104] 六、皮肤干细胞筛选培养步骤

[0105] 因为干细胞对基底膜有较强的粘附性,对细胞胞外基质的粘附速度要比其它类型细胞快得多,所以利用该种特性进行培养筛选。

[0106] 七、真皮多能干细胞筛选培养权利要求方法:

[0107] 1、培养液制备:

[0108] 配制培养液A:灭活胎牛血清40~60ml、转铁蛋白5~15 $\mu$ g/ml、维生素B40.5~1 $\times 10^{-4}$ /L、维生素C1~3 $\mu$ g/ml、胰岛素2~4 $\mu$ g/ml、霍乱毒素2.5~4.5u/L、EGF5~25ng/ml、氢化可的松0.4 $\mu$ g/ml、商用培养基DMEM/F12(3:1)定容到500ml。

[0109] A.1:配制培养液A具体实施方式

[0110]

实施例	血清	转铁蛋白	维生素B4	维生素C	胰岛素	霍乱毒素	EGF
A.1.1	40	5	0.5	1	2	2.5	5
A.1.2	45	8	0.7	2	2.5	3	15
A.1.3	50	12	0.8	2.5	3	4	20
A.1.4	60	15	1	3	4	4.5	25

[0111] 配制培养液B:灭活胎牛血清80ml、转铁蛋白6~17 $\mu$ g/ml、腺苷10~25mg/ml、维生素B40.5~1 $\times 10^{-4}$ /L、霍乱毒素2.5~3.5u/L、胰岛素4~6 $\mu$ g/ml、EGF5~25ng/ml、bFGF10~18ng/ml、牛脑垂体提取物(BPE)1~3mg/L、干细胞生长因子(SCF)5~40ng/ml、

氢化可的松  $0.3 \mu\text{g/ml}$ 、商用培养基 DMEM 与商用培养基 F12(1 : 1) 定容到 500ml。PH7.2 ~ 7.4。

[0112] B.1: 配制培养液 B 具体实施方式

[0113]

实施例	转铁蛋白	腺苷	维 B4	霍乱毒素	胰岛素	bEGF	EGF	BPE	SCF
B.1.1	6	10	0.5	2.5	4	10	5	1	5
B.1.2	10	15	0.7	3.0	4.5	13	15	1.5	20
B.1.3	15	20	0.9	3.4	5.5	15	20	2.5	30
B.1.4	17	25	1	3.5	6	18	25	3	40

[0114] 配制培养液 C: 灭活胎牛血清 60ml、转铁蛋白  $6 \sim 17 \mu\text{g/ml}$ 、腺苷  $10 \sim 25\text{mg/ml}$ 、维生素 B4  $0.5 \sim 1 \times 10^{-4}/\text{L}$ 、胰岛素  $4 \sim 6 \mu\text{g/ml}$ 、EGF5  $\sim 25\text{ng/ml}$ 、bFGF10  $\sim 18\text{ng/ml}$ 、牛脑垂体提取物 (BPE)  $2 \sim 3\text{mg/L}$ 、干细胞生长因子 (SCF)  $15 \sim 40\text{ng/ml}$ 、氢化可的松  $0.3 \mu\text{g/ml}$ 、商用培养基 DMEM 与商用培养基 F12(1 : 1) 定容到 500ml。PH7.2 ~ 7.4。

[0115] C.1: 配制培养液 C 具体实施方式

[0116]

实施例	转铁蛋白	腺苷	维 B4	胰岛素	bEGF	EGF	BPE	SCF
-----	------	----	------	-----	------	-----	-----	-----

[0117]

C.1.1	6	10	0.5	4	10	5	2	15
C.1.2	10	15	0.7	4.5	13	15	2.5	20
C.1.3	15	20	0.9	5.5	15	20	2.8	30
C.1.4	17	25	1	6	18	25	3	40

[0118] 说明此配方为原代培养, 建系稳定后继续传代减少胎牛血清使用量, 培养驯化细胞无血清培养习性。其他如胰岛素、氢化可的松相应进行递减性驯化培养。构建组织工程表皮层时调节 EGF、bEGF 用量使其分化建立真皮结构。其他基础配方不变。

[0119] 2、消化液配制法:

[0120] 消化液配制 A: 含溶质中性蛋白酶 0.1% 无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、无血清培养液为溶剂, 配制溶液。

[0121] 消化液配制 B: 含溶质 0.15% 胰酶和 0.01% EDTA I 型胶原酶 0.1% 胶原酶 (1 : 1 : 1) 无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、无血清培养液为溶剂, 配制溶液。

[0122] 3、皮肤及筛选细胞冻融保存液制备:

[0123] 抗冻溶质组分包括: 维生素 B4  $5 \sim 15 \mu\text{g/ml}$ 、维生素 C  $2 \sim 6 \mu\text{g/ml}$ 、硫酸软骨素 3 ~ 6%, 聚乙二醇 4ml、灭活小牛血清 10 ~ 15%、甘油 20%、甘露醇 3ml、细胞松弛素  $2.7 \mu\text{g/ml}$ 、二甲基亚砜 (DMSO) 10%、保存液以 DMEM/F12(1 : 1) 46 ~ 50% 为溶剂制备抗冻溶液。PH 控制在 7.3 ~ 7.4,  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤过除菌。

[0124] 3.1:3 皮肤及筛选细胞冻融保存液制备具体实施方式:

[0125]

实施例	维生素 B4	维生素 C	硫酸软骨素	血清	DMEM/F12
	5~15 $\mu\text{g} / \text{ml}$	2~6 $\mu\text{g} / \text{ml}$	3~6%	10~15%	46~50%
3.1.1	5	2	3	10	46
3.1.2	8	3	4	12	47
3.1.3	12	5	5	14	48
3.1.4	15	6	6	15	50

[0126] 说明,其特征在于:该冷冻液不仅可以通过冷冻长期保存皮肤及皮肤细胞活性、配方设计还可以具有抑制朗格汉斯细胞呈递功能而起到可降低皮肤的免疫原性。

[0127] 4、皮肤标本照射低温储存免疫逃逸抗原性细胞方法:

[0128] 3.1 免疫逃逸方法射线法:表皮标本处理:取五所述的皮肤,浸泡在培养液 A 中经紫外线 B/C(UVB 中紫外线, UVC 远紫外线)照射 10 ~ 30min。

[0129] 说明:紫外线照射、 $\gamma$  射线会降低免疫排斥反应,紫外线照射能够有效减少朗格汉斯细胞数量、显著抑制朗格汉斯细胞的抗原呈递能力。

[0130] 目前并未揭示照射如何影响 APC 功能,射线可影响表皮细胞产生如 IL-10、角质层中的尿苷酸(顺式咪唑丙烯酸)等一些免疫抑制物以此降低移植所产生的免疫排斥效应。临床治疗经照射后的皮肤移植存活时间显著延长已经被广泛学者医生认可。

[0131] 3.2 免疫逃逸方法冻融法:

[0132] 表皮标本处理:取五所述的皮肤,浸泡皮肤冻融保存液经抗冻液处理,分别放置在 -40、-60、-90、-100、-196 $^{\circ}\text{C}$  环境中 12 ~ 48h。

[0133] 说明:经低温保存后朗格汉斯细胞细胞膜 HLA-DR 表达变化不明显,但其共刺激分子 CD86 却显著减少了,移植这样的皮肤,被受体接受时间明显延长。同时低温使朗格汉斯细胞的功能受限、胞突消失、数量减少、体积变小、经试验小鼠移植试验表明这些温度点都可以明显降低移植排斥现象,趋势呈现温度越低免疫逃逸现象越明显。

[0134] 7、真皮多能干细胞筛选步骤方法:

[0135] 步骤 1、取皮肤细胞筛选中分离的真皮层皮肤组织标本(取 0.5 $\times$ 1.0cm、1 $\times$ 2cm 大小或其它规格的皮肤组织标本,以含抗生素的 PBS 冲洗 3 ~ 6 次,置消化液配制 A 中 4 $^{\circ}\text{C}$  冷消化 12 ~ 18h 取出标本,剥离表皮、真皮层),以含抗生素的 PBS 冲洗 3 ~ 6 次,将真皮皮片,置消化液配制 B 中。37 $^{\circ}\text{C}$  40 ~ 60min 消化,用配制培养液 B 终止消化,600 ~ 1000r/min 离心 5 ~ 10min,弃取上清液,加入配制培养液 A,细胞浓度调整至  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5 / \text{ml}$ 。

[0136] 步骤 2、取高拟体内细胞外基质选 1.1、也可选备 1.2,用含抗生素的 PBS 冲洗 3 次,再用配制培养液 B 冲洗 3 次,于 37 $^{\circ}\text{C}$ ,浸泡在培养液 B 中复苏 10 ~ 12h 备用。

[0137] 步骤 3、真皮多能干细胞的筛选及培养:取预备好的 1.1 放入平皿加入配制培养液 B,加入细胞浓度  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4 / \text{ml}$  真皮细胞悬液,37 $^{\circ}\text{C}$ ,气相 5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 4 ~ 6h 取出,取出转移 1.1, PBS 或培养液 B 清洗 3 ~ 6 次,目标真皮多能干细胞贴壁粘附于 1.1 上。换皿加入配制培养液 B 培养,后每 2 ~ 4d 换液一次继续扩增培养。

[0138] 步骤 4、消化富集传代培养:

[0139] 上述真皮多能干细胞经扩增后,加入消化液配制 B 消化 1.1 基质,4 $^{\circ}\text{C}$  消化 24h,培养液 B 终止消化;吸管充分吹打,过 40  $\mu\text{m}$  孔径的细胞筛,收集滤液,4 $^{\circ}\text{C}$  静置 20 ~ 30min;然后,以 800 ~ 1000r/min 的速度离心 10min。弃上清液,加入配制的培养液 C,重悬细胞,以

1 ~ 3×10<sup>6</sup>/ml 的密度转移含滋养层的皿中培养,置 37℃、气相 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,每 2 ~ 4d 换配制培养液 C 一次继续扩增培养。

[0140] 步骤 5、真皮干细胞的生物学特性的鉴定

[0141] 取第 3 代贴壁细胞,以 5×10<sup>5</sup>/孔接种于培养瓶中,按上述方法继续培养,倒置显微镜下观察细胞生长情况,分别于第 1、3、6、9、12、15、18d 台盼蓝染色计数活细胞,绘制生长曲线,取 1、3、6d 培养细胞做流式细胞周期分析。

[0142] 步骤 6、免疫组织化学法检:

[0143] 以上培养方法进行分别检测结果:

[0144] 真皮多能干细胞在有毛区和无毛区的真皮中均有分布,目前尚未发现真皮多能干细胞的表面标记物。取第 3d 贴壁细胞,使其在盖玻片上生长,1d 后取出,弃去培养液,PBS 液轻洗 3 次,4%多聚甲醛固定。

[0145] 操作步骤按照试剂盒说明书进行:

[0146] 检测 vimentin、nestin、CD34、CD90、CD59、CD44、VIII 因子、CK19 的表达:vimentin 一抗为小鼠抗人的单克隆抗体,CD34、CD90、CD59、CD44、nestin、VIII 因子和 CK19 一抗为人的单克隆抗体。工作浓度均为 1:100。

[0147] 测定结果:细胞表面波形蛋白(vimentin)、CD34、CD90、CD59、CD44 表达阳性,细胞角蛋白 19(cytoKeratin19)、VIII 因子和巢蛋白(nestin)表达阴性。可排除表皮干细胞及血管内皮细胞可能。

[0148] 流式细胞分析仪:流式细胞仪细胞周期分析显示,体外培养原代 DNA 合成前期细胞(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期)为 87 ~ 89%,DNA 合成期细胞(S 期)为 11-12%。

[0149] 结论:高拟体内细胞外基质 1.1 与 1.2 筛选法富集的真皮组织中获得真皮多能干细胞。

[0150] 原代接种后 6h 少量出现贴壁行为 24 ~ 30h 开始大量贴壁细胞呈克隆样生长增殖现象,3 ~ 6d 就可进入细胞对数生长期,显微镜下干细胞培养见长梭型细胞、呈多三角形,增殖克隆明显加快,传 2 代后 10 ~ 28h 干细胞便出现贴壁增殖现象,呈球形克隆样生长可采用低密度连续稀释法,以获得可扩增的多能干细胞克隆。8 ~ 14 天进入平台期,可保持传代培养 20 ~ 30 代传代能力。

[0151] 综上真皮多能干细胞的经免疫组织化学法鉴定,快速贴壁的基础上,体外传代增殖能力强,所获得的细胞为目标真皮多能干细胞。

[0152] 八、临床治疗级真皮多能干细胞发明的具有以下优点:

[0153] 本发明公开了皮肤干细胞的培养、筛选、扩增技术,这些瓶颈一直是生物学干细胞领域研究热点和难点,目前利用基底膜显著黏附特性进行分离纯化,采用三维培养扩增手段获得。

[0154] 该发明适合依赖扩增贴壁型细胞并提供三维高拟体内细胞外基质系统进行目标细胞水平的筛选与分离。

[0155] 本发明属于高模拟体内贴附环境,体外培养成体(胚胎皮肤)干细胞的生物细胞新型培养技术。其特征在于:细胞基质底物为供体脱细胞表皮,真皮为基质底物筛选最佳黏附场所筛选干细胞的制备方法;相应表皮真皮干细胞高模拟底物所在环境黏附筛选培养目标干细胞。用该方法取得的干细胞,具有高传代能力,高增殖能力,并可在体外环境下形成



分化全层真皮皮层结构,此方法比传统意义上的干细胞筛选更具科研与教学临床应用及深入研究干细胞生长增殖分化提供不可估量的科研学术价值,开创体外高拟体内贴壁附着培养的新纪元,此方法提出为国内国际首创。

[0156] 通过这种高目标模式的筛选,结合组织工程免疫原性细胞如何安全获得免疫逃逸,延长移植时间增加组织工程临床应用,促进创面愈合与皮肤疾病提供了绝对优势的解决方案。

[0157] 1、组织工程皮肤;自体-高拟体内细胞外基质,基质附着体外筛选方法对种子真皮多能干细胞进行筛选与于体内的微环境一致性是目前任何方法不可取代的,并且制备简单可反复使用;是构建世界首例含真皮多能干细胞组织工程全层皮肤基础;

[0158] 2、特异性强,通过免疫组化检测、透射电镜观察及流式细胞仪检测,结果表明本发明的皮肤干细胞纯度高;

[0159] 3、创伤修复中的应用、在基因研究方面、美容整形修复,口腔疾病、皮肤病领域;

[0160] 4、干细胞科研价值:真皮多能干细胞细胞谱系的研究,深入探讨研究干细胞黏附,生长、增殖、分化、免疫表达等学科基础研究;

[0161] 5、该方法可为其它器官体外培养再生提供良好的科研理论基础。

[0162] 6、真皮多能干细胞的规模化产业化制备扩增

[0163] 参考文献:

[0164] [1] 黎鳌 黎鳌烧伤学 [M]. 上海:上海科学技术出版社,2001.

[0165] [2] 史济湘,廖镇江,方培耀主编. 烧伤治疗学 [M]. 浙江:浙江科技出版社,2006.

[0166] [3] 陈意生,史景泉主编. 烧伤病理学 [M]. 重庆:重庆出版社,1993.

[0167] [4] 司徒镇强,吴军正主编. 细胞培养. [M]. 世界图书出版公司,1996.

[0168] [5] 胡敏主编. 人体组织工程学. [M]. 北京. 人民军医出版社,2006.

[0169] [6] D. L. 斯佩克特, R. D. 戈德曼, L. A. 莱茵万德,黄培堂译. 细胞实验指南 [M]. 北京:科学出版社,2001.

[0170] [7] 赵春华主编. 干细胞原理、技术与临床. [M]. 北京. 现代生物技术与医药科技出版中心, [M]. 2006.

[0171] [8] Robert Lanza,, John Gearhart, Brigid Hogan. Essentials of Stem Cell Biology [M]. AMSTERDAM:ELSEVIER ACADEVIER PRESS,2006.

[0172] [9] Ghadially R. Epidermal stem cell. [J]. AdvDermatol,2005,21 :335.

[0173] [10] Taylor G, Michael S, Lehrer P J, et al. Involvement follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis [J]. Cell,2000,110 :451.

[0174] [11] Yang A, Kaghad M, Caput D, et al. On the shoulders of giants: p53, p73 and the rise of p53 [J]. Trends Geaet,2002,18(2) :195.

[0175] [12] Kim DS, Cho HJ, Choi HR, et al. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents. Cell Mol Life Sci 2004; 61(21) :2774-1781.

[0176] [13] Jones P H, Watt F M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and

expression[J]. Cell, 1993, 73(4) :713-724.

[0177] [14] Peneg, im G, Dellambra E, Golisano O, et al. P63 identifies keratinocyte stem cells[J]. PNAS, 2001, 98(6) :3156.

[0178] [15] Albert M R, Forster R A, Vogel JC. Murine epidemrallabel-retaining cells isolated by flow cytometry do not express the stem cell markers CD34, Sca-1, or Flk-1[J]. J Invest Dermatol, 2001, 117(4) :943-948.

[0179] [16] Medina RJ, Kataok K, Tskaishi M, et al. Isolation of Epithelial Stem Cells From Dermis by a Three-Dimensional Culture System. J Cell Biochem 2006 ; 98(1) :174-184.

[0180] [17] Michel M, Torok N, Godbout MJ, et al. Keratin 19 as abiochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro :keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culturestage. Cell Sci 1996 ;109 :1017-1028.

[0181] [18] Trempus CS, Morris RJ, Bortner C D, et la. Enirch-ment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34[J]. J Invest Dermatol, 2003, 120(4) :501-511.

[0182] [19] Lyle S, Christofidou SM, Liu Y, et al. Human hair follicle bulge cells are biochemically distinct and possess an epithelial stem cell phenotype. J Investig Dermatol Symp Proc 1999 ;4(3) :296-301.

[0183] [20] Webb A, Lia, Kaur P. Location and phenotyPe of human a-dult keratinocyte stem cells of the skin [J]. Differentiation, 2004, 72(8) :387-395.

[0184] [21] Poblet E, Jimenez F, Godinez J M, et al. The immunohis-tochemical expression of CD-34 in human hair follicles :a compar-ative study with the bulge marker CK15[J]. Clin Exp Dermatol, 2006, 31(6) :807-812.

[0185] [22] Toma JG, AKhavan M, Femandes KJ, Bamabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD(2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the demis of mammalian skin. Nature Cell Biology. 2001 ;60(43) :121. 1. 24-926

[0186] [23] Karl JK, McKenzie IA, Mill P, et al. A dermla niche for multipotent adult skin-derived precursor cels. Nat Cell Biol, 2004, 6 :1082-1093.

[0187] [24] Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawklns K, Thomas K, Anstin T, Edwards C, Cuzzort J, Duenzl M, Lueas PA, Black AC Jr. Human reserve Pluripptent mesenchymal stem cells are Present in the connective tissues of skeletal Musele and dermis derived from fetal, adult, and geriatrie donors. Anat Rec, 2001 ;264(1) :51-62

[0188] [25] YU H, FANG D, KUMAR S M, et al. Isolation of a novel popu-lation of multipotent adult stem cells from human hair follicles[J]. Am J Pathol, 2006, 168(6) :1879-1888.

[0189] [26] TOMAJG, AKHAVAN M, FERNANDESK J, et al Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(9) :

778-784.

[0190] [27] Zhu N. (2009) PROGRESS&OPPORTUNITIES-Skin Banking and Tissue Engineering of Skin. Invited lecture at the 15th Annual Conference of the Life Science Society for Chinese Bioscientists in the UK. Sept 2009, London, England.

[0191] [28] Zhu N. (2009) Latest Developments in Treatment of Burns and Chronic Wounds in Europe-Clinical Applications of Tissue Engineered Skin. Invited lecture at the Annual Conference of the Chinese Burns Surgery Association. June 2009, Xian China.

[0192] [29] Zhu N, Warner RM, Simpson C, Glover M, Kelly J, Fraser S, Brotherson TM, Ralston DR, MacNeil S (2007) Treatment of Burns and Chronic Wounds Using A New Chemically Defined Carrier for Delivery of Autologous Keratinocytes. Presented at the European Tissue Repair Society and European Wound Management Association Conference. 2-4 May 2007, Glasgow, Scotland.

[0193] [30] Zhu N. (2006) 皮肤组织工程与干细胞治疗进展 (Invited lecture). 台北国际微整形与干细胞治疗大会. 2006年10月. 中国. 台北.

[0194] [31] Zhu N, Warner RM, Simpson C, Glover M, Kelly J, Fraser S, Brotherson TM, Ralston DR, MacNeil S (2005) Treatment of Burns and Chronic Wounds Using a New Cell Transfer Dressing for Delivery of Autologous Keratinocytes. European Journal of Plastic Surgery. 28, 319-330. ISSN : 0930-343X (print version), ISSN : 1435-0130 (electronic version).

[0195] [32] Zhu N. (2012) Progress of TGF- $\beta$  Family and Fetal Wound Healing. Invited lecture at the Annual Scientific Conference of the Craniofacial Society of Great Britain and Ireland. April 2012, Bristol, England.

[0196] [33] 朱宁文 中华人民共和国科学技术部国家高技术研究发展计划《细胞治疗制品临床级皮肤细胞生物反应器规模化无血清制备及高效生物载体细胞移植关键技术研究》(863计划) 课题实施方案计划书 [M], 2014-2016.

[0197] [34] 朱宁文 生物反应器组织工程活性人工皮肤产业化生产含有活化素 A 的无血清培养液及其配制方法授权专利

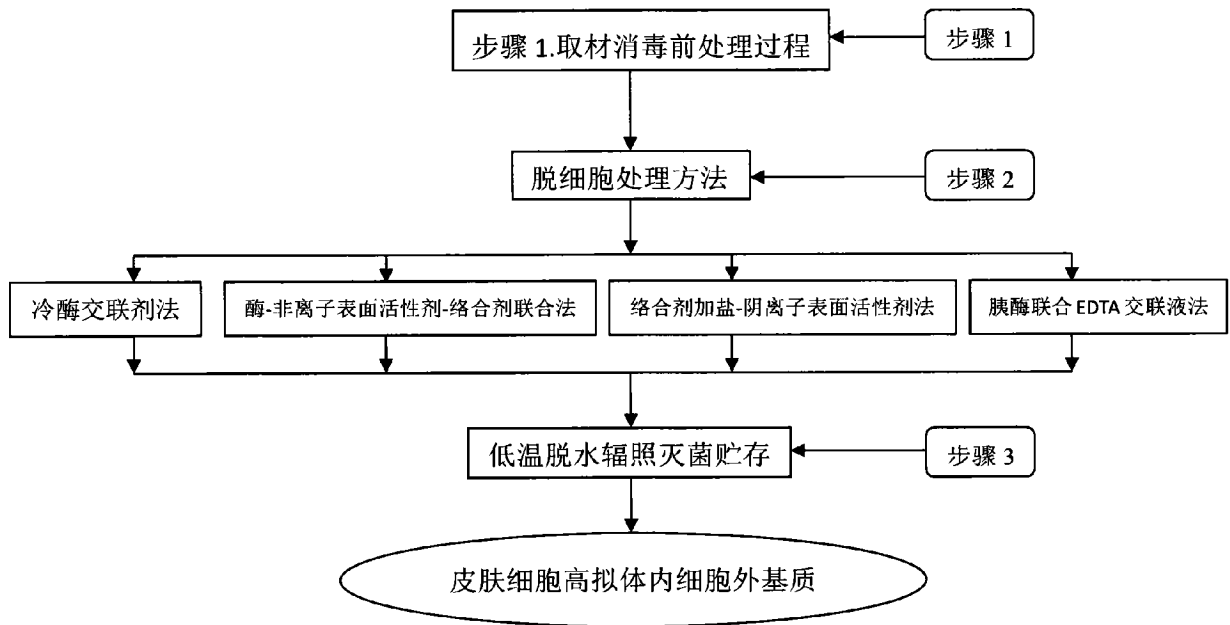


图 1

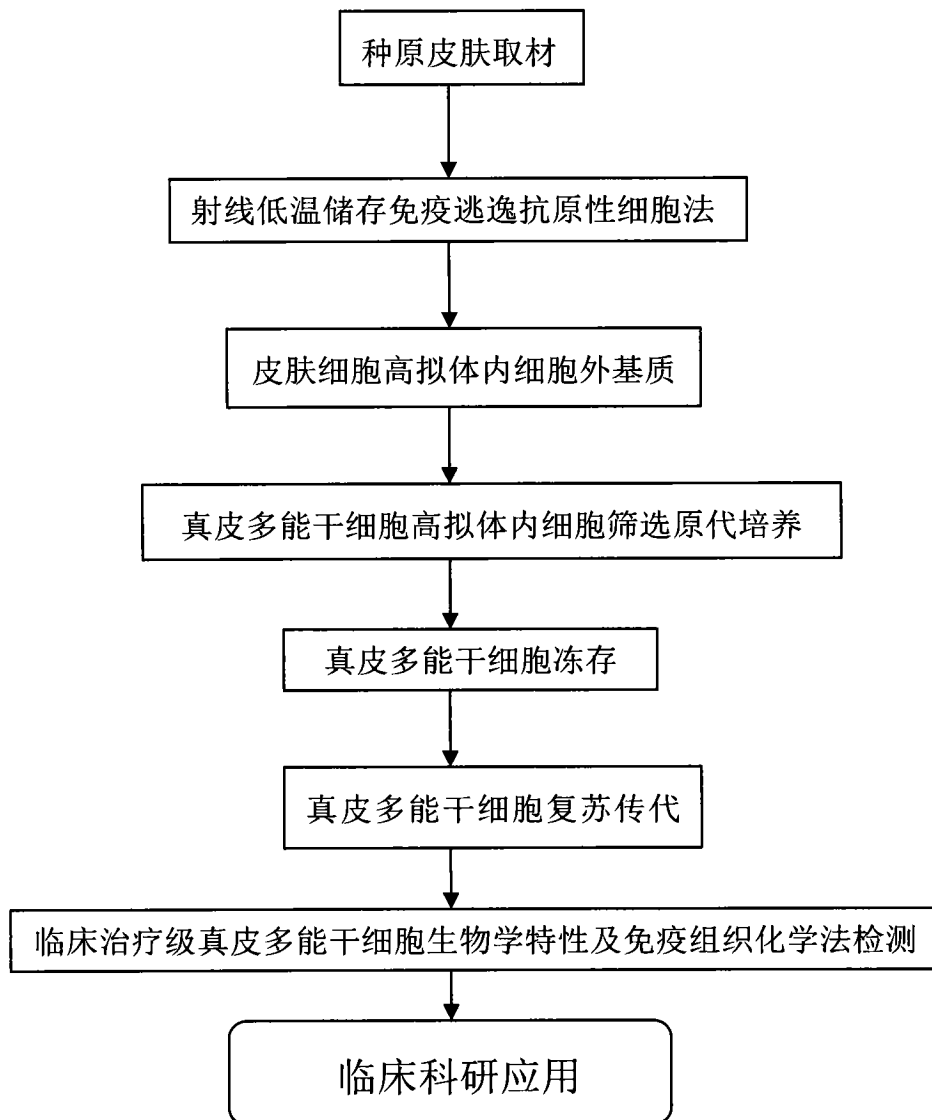


图 2