

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510015492.2

[43] 公开日 2006年6月14日

[11] 公开号 CN 1786154A

[22] 申请日 2005.10.18

[21] 申请号 200510015492.2

[71] 申请人 天津昂赛细胞基因工程有限公司

地址 300457 天津市泰达开发区第四大街天
大科技园 B3 - B4

[72] 发明人 韩忠朝 刘拥军

[74] 专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代理事
务所

代理人 陆 艺

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

人胎盘、脐带间充质干细胞库及其构建方法

[57] 摘要

本发明公开了一种人胎盘、脐带间充质干细胞库及其构建方法，本发明的构建步骤包括：(1)取人胎盘、脐带进行检测，用磷酸缓冲液冲洗后粉碎，加磷酸缓冲液稀释；(2)加入胶原酶消化；(3)加入磷酸缓冲液稀释；(4)加入胰酶消化；(5)将步骤(2)及步骤(4)所获得的细胞混合，离心，弃去上清液，用磷酸缓冲液洗涤，再离心，弃去上清液，即获得间充质干细胞；(6)将间充质干细胞置液氮冷冻，按其 ABO/Rh 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的细胞信息档案，即构建出人胎盘、脐带间充质干细胞库。本发明为新生儿储存胎盘及脐带间充质干细胞，为其本人、家属和他人提供间充质干细胞治疗疾病及其他应用。

1. 一种人胎盘、脐带间充质干细胞库，其特征是由下述步骤建成：

(1) 取人胎盘、脐带进行 ABO/Rh 血型检测、HLA 分型的检测、微生物免疫检测，用磷酸缓冲液冲洗去除残留血液，粉碎，加入 1~1.5 倍于粉碎物体积的磷酸缓冲液稀释；

(2) 加入步骤 (1) 所获得溶液体积的 1/2~1/3 的质量/体积比为 0.05%~0.2%的胶原酶磷酸缓冲液溶液消化，温度为 37℃，消化 40~70 分钟，过 100-200 目筛，将滤过的细胞混悬液与未消化组织分开；

(3) 向未消化组织中，加入 1~1.5 倍于未消化组织体积的磷酸缓冲液稀释；

(4) 加入步骤 (3) 所获得溶液体积的 1/2~1/3 的质量/体积比为 0.05%~0.2%的胰酶磷酸缓冲液溶液消化，消化温度为 37℃，消化时间为 10~30 分钟，在此 100ml 溶液中加入 1-2g 的血清终止胰酶作用，过 100-200 目筛，滤过液为细胞混悬液；

(5) 将步骤 (2) 及步骤 (4) 所获得的细胞混悬液混合，离心，弃去上清液，用磷酸缓冲液洗涤 1~3 次去除残余酶，再离心，弃去上清液，即获得间充质干细胞；

(6) 将间充质干细胞置液氮冷冻，按其 ABO/Rh 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的细胞信息档案，即构建出人胎盘、脐带间充质干细胞库。

2. 一种人胎盘、脐带间充质干细胞库的构建方法，由下述步骤组成：

(1) 取人胎盘、脐带进行 ABO/Rh 血型检测、HLA 分型的检测、微生物免疫检测，用磷酸缓冲液冲洗去除残留血液，粉碎，加入 1~1.5 倍于粉碎物体积的磷酸缓冲液稀释；

(2) 加入步骤 (1) 所获得溶液体积的 1/2~1/3 的质量/体积比为 0.05%~0.2%的胶原酶磷酸缓冲液溶液消化，温度为 37℃，消化 40~70 分钟，过 100-200 目筛，将滤过的细胞混悬液与未消化组织分开；

(3) 向未消化组织中，加入 1~1.5 倍于未消化组织体积的磷酸缓冲液稀释；

(4) 加入步骤 (3) 所获得溶液体积的 1/2~1/3 的质量/体积比为 0.05%~0.2%的胰酶磷酸缓冲液溶液消化，消化温度为 37℃，消化时间为 10~30 分钟，在此 100ml 溶液中加入 1-2g 的血清终止胰酶作用，过 100-200 目筛，滤过液为细胞混悬液；

(5) 将步骤 (2) 及步骤 (4) 所获得的细胞混悬液混合，离心，弃去上清液，用磷酸缓冲液洗涤 1~3 次去除残余酶，再离心，弃去上清液，即获得间充质干细胞；

(6) 将间充质干细胞置液氮冷冻，按其 ABO/Rh 分型和 HLA 分型进行保存，建立可供检索的细胞信息档案，即构建出人胎盘、脐带间充质干细胞库。

3. 根据权利要求 2 所述一种人胎盘、脐带间充质干细胞库的构建方法，其特征是所述胶原酶消化时间为 60 分钟。

4. 根据权利要求 2 所述一种人胎盘、脐带间充质干细胞库的构建方法，其特征是所述胰酶消化时间为 20 分钟。

-
5. 根据权利要求 2 所述一种人胎盘、脐带间充质干细胞库的构建方法，其特征是所述步骤（5）的两次离心时，离心机的转速为 1500 转/分钟~2500 转/分钟，时间为 10~20 分钟。
 6. 根据权利要求 5 所述一种人胎盘、脐带间充质干细胞库的构建方法，其特征是所述步骤离心机的转速为 2000 转/分钟，时间为 15 分钟。
 7. 根据权利要求 2 所述一种人胎盘、脐带间充质干细胞库的构建方法，其特征是所述液氮冷冻的温度为-196℃。

人胎盘、脐带间充质干细胞库及其构建方法

技术领域

本发明涉及一种干细胞库及其构建方法，具体地说是涉及一种人胎盘、脐带间充质干细胞库及其构建方法。

技术背景：

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是干细胞的一种类型，具备干细胞的两个重要特征：很强的自我增殖能力和多分化潜能。MSCs 起源于中胚层，理论上讲，它可以向其它中胚层组织分化。近期研究表明，在适宜的体内或体外环境下 MSCs 不仅可以分化为中胚层的间质组织，还保持有内胚层的分化潜能，可分化为神经细胞、上皮细胞、心肌细胞以及成骨细胞等。将 MSCs 与胎鼠的中脑或纹状体细胞共同培养，它可分化为神经元和胶质细胞，而将 MSCs 移植到心肌缺血坏死区周围，3 周后渐与周围心肌细胞相似，并可见大量新生血管在新生心肌细胞周围，这些均表明 MSCs 的分化趋势与周围微环境密切相关。现在大多数学者认为 MSCs 的分化由特殊转录因子决定，不同的诱导条件可以决定其分化方向，可能是这些诱导条件启动了决定分化方向的转录因子。

MSCs 具有类似胚胎干细胞的多向分化潜能。因此从这个意义上讲，也许 MSCs 最为深远的潜在用途是生产细胞和组织，可作为当前的“细胞疗法”的一种应用方式。许多疾病及功能失调往往是由于细胞功能障碍或组织破坏所致。如今，一些捐赠的器官和组织常常用以取代生病的或遭破坏的组织。遗憾的是，受这些疾病折磨的病人数量远远超过了可供移植的器官数量。MSCs 经刺激后可发育分化为特定的细胞，使替代细胞和组织来源的更新成为可能，从而可用于治疗无数的疾病、身体不适状况和残疾，包括帕金森病、Alzheimer 病（痴呆症）、脊髓损伤、中风、烧伤、心脏病、糖尿病、骨关节炎和类风湿性关节炎。目前世界各国都投入了大量的人力、物力和财力进行了广泛而深入的研究，利用 MSCs 移植的方法，具有简单、实用、费用低和不存在免疫排斥等优点，而且 MSCs 无论从它的来源、分离方法及可分化的组织上都有其独特的优势，应用前景十分广阔。

目前 MSCs 的主要来源为成人骨髓，但成人骨髓源 MSCs 细胞数量及增殖分化潜能随年龄的增大而下降，病毒感染率较高，且供者 MSCs 的采集须行骨髓穿刺术，来源受到限制。研究发现，MSCs 在人胎儿和生后多种组织广泛存在，包括骨膜、脂肪、羊水、真皮、牙、骨骼肌、胎肺、胎肝和脐血等。但是，从胎儿体内提取 MSCs 需要将流产胎儿的身体组织破坏，因此此种技术的应用又受到道德伦理的质疑和传统观念的限制。因此，寻找新的 MSCs 的来源成为目前国内外研究的热点。我们开展了对胎盘及脐带源 MSCs 的研究。根据文献，采用传统的内皮消化法，从胎儿脐带内皮/内皮下分离 MSCs 样细胞时，我们发现所获细胞

数很少，且成功率低，只有 30%的标本可以得到 MSCs，70%的标本不能得到可多次传代的 MSCs。

干细胞库是在约为 -196°C 液氮中（深低温）储存干细胞或搜集存储干细胞资源相关资料的场所。一个完善的干细胞库应具备随时随地将健康干细胞提供临床使用的能力。目前在世界范围内，按所储存的干细胞来源和采集方式，干细胞库主要分为脐血干细胞库、骨髓和外周血干细胞库。脐血干细胞库所做的工作是将新生儿的脐血采集后经过分离冷冻并储存起来。在每份脐血中，大约含数百万个干细胞，足够供一个幼儿或少年患者使用。如果是在成年后发病，一份脐血所提供的干细胞数量就不够用了，但是将来可以通过干细胞的扩增技术得到解决。骨髓和外周血干细胞库可分为资料库和实物库。资料库所做的工作是将健康者提供的骨髓或外周血干细胞进行 HLA 配型和资料登记，待需要时再采集其骨髓。实物库则是在进行细胞配型和资料登记的同时，采集和储存健康提供者可供移植用的骨髓或外周血干细胞。干细胞库按提供方式又分为公共库和自体库。公共库所储存的干细胞是他人的干细胞，以满足需要移植但自体干细胞没有被保存的病人的需求。自体库则是储存在自己出生或健康时采集的部分干细胞，以备自己生病时用。目前世界上尚无胎盘及脐带间充质干细胞库，每年大量新生儿的胎盘和脐带被废弃，其中的干细胞资源白白流失。

发明内容：

本发明的目的在于提供一种充分利用新生儿的胎盘和脐带为资源的人胎盘、脐带间充质干细胞库。

本发明的第二个目的是提供一种人胎盘、脐带间充质干细胞库的构建方法。

本发明的技术方案概述如下：

一种人胎盘、脐带间充质干细胞库，是由下述步骤建成：

(1) 取人胎盘、脐带进行 ABO/Rh 血型检测、HLA 分型的检测、微生物免疫检测，用 pH 为 7.2-7.4 的磷酸缓冲液冲洗去除残留血液，粉碎，加入 1~1.5 倍于粉碎物体积的磷酸缓冲液稀释 (pH 为 7.2-7.4)；

(2) 加入步骤 (1) 所获得溶液体积的 $1/2\sim 1/3$ 的质量/体积比为 0.05%~0.2%的胶原酶磷酸缓冲液溶液消化，温度为 37°C ，消化 40~70 分钟，优选 60 分钟，过 100-200 目筛，将滤过的细胞混悬液与未消化组织分开；

(3) 向未消化组织中，加入 1~1.5 倍于未消化组织体积的磷酸缓冲液稀释 (pH 为 7.2-7.4)；

(4) 加入步骤 (3) 所获得溶液体积的 $1/2\sim 1/3$ 的质量/体积比为 0.05%~0.2%的胰酶磷酸缓冲液溶液消化，消化温度为 37°C ，消化时间为 10~30 分钟，优选 20 分钟，在此 100ml 溶液中加入 1-2g 的血清终止胰酶作用，过 100-200 目筛，滤过液为细胞混悬液；

(5) 将步骤 (2) 及步骤 (4) 所获得的细胞混悬液混合，离心，离心机的转速为 1500 转~2500 转/分钟，时间为 10~20 分钟，弃去上清液，用磷酸缓冲液 (pH 为 7.2-7.4) 洗涤 1~3 次去除残余酶，再离心，离心机的转速为 1500 转/分钟~2500 转/分钟，时间为 10~20 分钟，弃去上清液，即获得间充质干细胞，两次离心转速优选为 2000 转/分钟，时间为 15 分钟；

(6) 将间充质干细胞置液氮冷冻，液氮冷冻的温度为 -196°C ，按其 ABO/Rh 分型和 HLA 分

型进行保存, 建立可供检索的细胞信息档案, 即构建出人胎盘、脐带间充质干细胞库。

在用胶原酶和胰酶消化时, 可用转子同时进行搅拌, 提高消化的程度

一种人胎盘、脐带间充质干细胞库的构建方法, 由下述步骤组成:

(1) 取人胎盘、脐带进行 ABO/Rh 血型检测、HLA 分型的检测、微生物免疫检测, 用磷酸缓冲液(pH 为 7.2-7.4)冲洗去除残留血液, 粉碎, 加入 1~1.5 倍于粉碎物体积的磷酸缓冲液稀释(pH 为 7.2-7.4);

(2) 加入步骤(1)所获得溶液体积的 1/2~1/3 的质量/体积比为 0.05%~0.2%的胶原酶磷酸缓冲液溶液消化, 温度为 37℃, 消化 40~70 分钟, 优选 50-60 分钟, 过 100-200 目筛, 将滤过的细胞混悬液与未消化组织分开;

(3) 向未消化组织中, 加入 1~1.5 倍于未消化组织体积的磷酸缓冲液稀释(pH 为 7.2-7.4);

(4) 加入步骤(3)所获得溶液体积的 1/2~1/3 的质量/体积比为 0.05%~0.2%的胰酶磷酸缓冲液溶液消化, 消化温度为 37℃, 消化时间为 10~30 分钟, 优选 15-20 分钟, 在此 100ml 溶液中加入 1-2g 的血清终止胰酶作用, 过 100-200 目筛, 滤过液为细胞混悬液;

(5) 将步骤(2)及步骤(4)所获得的细胞混悬液混合, 离心, 离心机的转速为 1500 转~2500 转/分钟, 时间为 10~20 分钟, 弃去上清液, 用磷酸缓冲液(pH 为 7.2-7.4)洗涤 1~3 次去除残余酶, 再离心, 离心机的转速为 1500 转/分钟~2500 转/分钟, 时间为 10~20 分钟, 弃去上清液, 即获得间充质干细胞, 两次离心转速优选为 2000 转/分钟, 时间为 15 分钟;

(6) 将间充质干细胞置液氮冷冻, 液氮冷冻的温度为-196℃, 按其 ABO/Rh 分型和 HLA 分型进行保存, 建立可供检索的细胞信息档案, 即构建出人胎盘、脐带间充质干细胞库。

在用胶原酶和胰酶消化时, 可用转子同时进行搅拌, 提高消化的程度。

上述全部过程均在无菌环境中进行操作。

本发明中所获得人胎盘、脐带间充质干细胞按 $1\sim 2\times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于塑料培养瓶, 用含 DMEM-LG/F12 (Sigma, USA), 5%FCS (Gibco BRL, USA) 的培养基, 置 37℃, 5%CO₂ 培养箱培养, 4 天后换液, 弃去非贴壁细胞, 以后每 3 天半量换液, 待细胞 80%融合, 0.25%胰酶 (Sigma, USA) 消化, 按 1: 3 传代, 可得到大量 (1×10^{10}) 1 人胎盘、脐带间充质干细胞用于临床及科研。

本发明所述的一种人胎盘、脐带间充质干细胞库及其构建方法, 可从人胎盘、脐带中获得大量的 MSCs, 建立系统工程技术储存库, 它是一种将现有资源充分利用的有效方法, 根据本发明的方法, 存储于库内的间充质干细胞, 经短期培养可获得 1×10^{10} MSCs, 可得到大量富有活性的胎盘及脐带间充质干细胞, 并能够长时间保存而不失其活性, 且操作简单易行, 建库成本低廉, 富有应用前景。

附图说明:

图 1、胎盘及脐带来源的 MSCs 的细胞形态: (A-C) 是采用本发明的方法获得的 MSCs 培养 7 天后的细胞形态; (D, E) 是 MSCs 传第一代 14-20 天后的细胞形态; (F, G, H) 是 MSCs 传第二代第 1、3、5 天的细胞形态; (I-L)、传统内皮消化法获得 MSCs 培养的细胞形态, 传二代后细胞形态发生变化;

图 2、胎盘及脐带来源的 MSCs 的细胞生长曲线：第三代 MSCs 按 2×10^4 细胞/孔接种在 24 孔板内，每隔 24h 消化 3 个孔，收集细胞，并用 0.4% 的台盼兰染色后计数活细胞，取 5 次实验结果的平均值，绘制生长曲线；

具体实施方式：

下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步的说明，但本发明并不受限于下述实施例。

实施例 1：

人胎盘脐带间充质干细胞的制备：

(1) 将人胎盘、脐带经过严格检测程序 (ABO/Rh 血型检测、HLA 分型的检测、梅毒抗体检测、HIV 免疫检测、CMV 抗体检测、乙型肝炎抗原抗体检测等) 确定安全性后，由 pH 为 7.2 的 PBS (磷酸缓冲液) 反复冲洗，去除残留血液，用无菌刀具将其切割至约 1mm^3 - 1.5mm^3 的小碎块或者用其他无菌工具将其粉碎至肉糜状 (1mm^3 - 1.5mm^3)，取肉糜 25 ml，加入 pH 为 7.2 的 PBS 至 50ml；

(2) 加入质量/体积比为 0.1% 的胶原酶磷酸缓冲液溶液 20ml，置 37°C 消化 1 小时，其间对该混合液进行持续磁力搅拌；将该混合物用 100 目筛网过滤，将滤过的细胞混悬液与未消化组织分开，将滤过的细胞混悬液置高速离心机中，2000 转/分钟，离心 15 分钟，弃去上清液，将沉淀的细胞置于振荡器上振荡，使细胞松散，收集该细胞备用；

(3) 将上一步骤收集的未消化组织 20 ml 加入 pH 为 7.2 的 PBS 至 40ml；

(4) 再加入质量/体积比为 0.125% 的胰酶磷酸缓冲液溶液 20ml，在 37°C 下消化 20min，其间对该混合液进行持续磁力搅拌，之后加入混合物终浓度 0.6g 的血清终止胰酶的作用，用 100 目筛网过滤，滤过的细胞混悬液，弃去未消化的组织；将细胞混悬液高速离心，离心机转速为 2000 转/分钟，离心 15 分钟，弃去上清液，振荡细胞使之松散，收集该细胞备用；

(5) 将步骤(2)和(4)所获得的细胞置于 50ml 管中，加 pH 为 7.2 的 PBS 至满，高速离心，离心机转速为 2000 转/分钟，离心 15 分钟，弃去上清液，振荡细胞使之松散，该步骤重复 2 次以洗净残留的酶；最后将离心后的细胞收集，即制备出建库所需的人胎盘、脐带间充质干细胞。

上述操作均在严格无菌环境内进行，为保证细胞不受污染，所有使用的 PBS 均加入了 1% 的青霉素和链霉素。

细胞形态学观察：采用本方法分离的原代细胞多于 24-48 小时内贴壁，培养 1-2 周，倒置显微镜可见贴壁细胞呈梭形、多角形，2 周以后增长速度较快，成为形态相对均一的梭形细胞，呈平行排列生长或旋涡状生长，于第 2-3 周可形成 80% 融合贴壁细胞层。连续传 20 代，细胞形态无明显改变。而采用文献报道的内皮消化法只有 30% 标本可以分离出 MSCs，70% 标本贴壁细胞传代不超过 2 代。(图 1) 本方法获得的细胞数与成功率明显高于依照文献内皮消化的普通方法。

细胞生长曲线的测定 将贴壁细胞用 0.25% 胰酶消化后，按 2×10^4 细胞/孔接种在 24

孔板内，每隔 24h 消化 3 个孔，收集细胞，并用 0.4%的胎盼兰计数活细胞，绘制生长曲线。细胞增殖较快，在对数生长期，细胞倍增时间均约为 30h（图 2）。细胞每传一代，细胞数约增长 2 倍。

人胎盘、脐带间充质干细胞库的构建：

将所获得的间充质干细胞装进冷冻袋内，用冷冻保护液预处理之后，抽取空气，密封，放进干细胞储存盒，采用 1010 型冷冻系统（Forma Scientific Inc, USA）冷冻，然后将储存盒保存在-196℃低温的液氮罐中。留取小部分细胞储存在-80℃冰箱里，作为库存产品信息的复查样本。将其详细信息（包括供者姓名，供者父母姓名、地址、联系方式，干细胞的配型信息等）输入电脑数据库，建立完善的数据档案备查询。

实施例 2：

(1) 将人胎盘、脐带经过严格检测程序（ABO/Rh 血型检测、HLA 分型的检测、梅毒抗体检测、HIV 免疫检测、CMV 抗体检测、乙型肝炎抗原抗体检测等）确定安全性后，由 pH 为 7.4 的 PBS 反复冲洗，去除残留血液，用无菌刀具将其切割至约 1mm^3 - 1.5mm^3 的小碎块或者用其他无菌工具将其粉碎至肉糜状（ 1mm^3 - 1.5mm^3 ），取肉糜 20 ml，加入 pH 为 7.4 的 PBS 至 50ml；

(2) 加入质量/体积比为 0.05%的胶原酶磷酸缓冲液溶液 25ml，置 37℃消化 70 分钟，其间对该混合液进行持续磁力搅拌；将该混合物用 200 目筛网过滤，将滤过的细胞混悬液与未消化组织分开，将滤过的细胞混悬液置高速离心机中，1500 转/分钟，离心 20 分钟，弃去上清液，将沉淀的细胞置于振荡器上振荡，使细胞松散，收集该细胞备用；

(3) 将上一步骤收集的未消化组织 20 ml 加入 pH 为 7.4 的 PBS 至 50ml；

(4) 再加入质量/体积比为 0.05%的胰酶磷酸缓冲液溶液 25ml，在 37℃下消化 30min，其间对该混合液进行持续磁力搅拌，之后加入 1.5g 血清终止胰酶的作用，用 200 目筛网过滤，滤过的细胞混悬液，弃去未消化的组织；将细胞混悬液高速离心，离心机转速为 1500 转/分钟，离心 20 分钟，弃去上清液，振荡细胞使之松散，收集该细胞备用；

(5) 将步骤(2)和(4)所获得的细胞置于 50ml 管中，加 pH 为 7.4 的 PBS 至满，高速离心，离心机转速为 1500 转/分钟，离心 20 分钟，弃去上清液，振荡细胞使之松散，该步骤重复 3 次以洗净残留的酶；最后将离心后的细胞收集，即制备出建库所需的人胎盘、脐带间充质干细胞。

上述操作均在严格无菌环境内进行，为保证细胞不受污染，所有使用的 pH 为 7.4 的 PBS 均加入了 1%的青霉素和链霉素。

(6) 干细胞入库之前，按 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于塑料培养瓶，用含 DMEM-LG/F12(Sigma, USA)，5%FCS (Gibco BRL, USA) 的培养基，置 37℃，5%CO₂ 培养箱培养，4-5 天后换液，弃去非贴壁细胞，以后每 3-4 天半量换液。待细胞 80%融合，0.25%胰酶 (Sigma, USA) 消化，按 1:3 传代，扩增后得到大量干细胞，将所获得细胞分为 5 份装进冷冻袋内，用 50%DMSO 和 5%右旋糖苷冷冻保护剂预处理之后，将其放入保存细胞专用的小型存储罐内，采用 BioArchive™ 系统分步冷冻，将其保存在-196℃低温的液氮罐中。留取小部分细胞储存在-80

℃冰箱里，作为库存产品信息的复查样本。将其详细信息（包括供者姓名，供者父母姓名、地址、联系方式，干细胞的配型信息等）输入电脑数据库，建立完善的数据档案备查询。

实施例 3:

(1) 将人胎盘、脐带经过严格检测程序（ABO/Rh 血型检测、HLA 分型的检测、梅毒抗体检测、HIV 免疫检测、CMV 抗体检测、乙型肝炎抗原抗体检测等）确定安全性后，由 PBS（pH 为 7.4）反复冲洗，去除残留血液，用无菌刀具将其切割至约 1mm^3 - 1.5mm^3 的小碎块或者用其他无菌工具将其粉碎至肉糜状（ 1mm^3 - 1.5mm^3 ），取肉糜 25 ml，加入 PBS（pH 为 7.4）至 50ml；

(2) 加入质量/体积比为 0.2% 的胶原酶磷酸缓冲液溶液 16.7ml，置 37℃ 消化 40 分钟，其间对该混合液进行持续磁力搅拌；将该混合物用 100 目筛网过滤，将滤过的细胞混悬液与未消化组织分开，将滤过的细胞混悬液置高速离心机中，2500 转/分钟，离心 10 分钟，弃去上清液，将沉淀的细胞置于振荡器上振荡，使细胞松散，收集该细胞备用；

(3) 将上一步骤收集的未消化组织 20 ml 加入 PBS（pH 为 7.4）至 40ml；

(4) 再加入质量/体积比为 0.2% 的胰酶磷酸缓冲液溶液 16.7ml，在 37℃ 下消化 10min，其间对该混合液进行持续磁力搅拌，之后加入 0.7g 血清终止胰酶的作用，用 100 目筛网过滤，滤过的细胞混悬液，弃去未消化的组织；将细胞混悬液高速离心，离心机转速为 2500 转/分钟，离心 10 分钟，弃去上清液，振荡细胞使之松散，收集该细胞备用；

(5) 将步骤(2)和(4)所获得的细胞置于 50ml 管中，加（pH 为 7.4）PBS 至满，高速离心，离心机转速为 2500 转/分钟，离心 10 分钟，弃去上清液，振荡细胞使之松散，洗净残留的酶；最后将离心后的细胞收集，即制备出建库所需的人胎盘、脐带间充质干细胞。

上述操作均在严格无菌环境内进行，为保证细胞不受污染，所有使用的（pH 为 7.4）PBS 均加入了 1% 的青霉素和链霉素。

人胎盘、脐带间充质干细胞的制备方法（同实施例 1）；人胎盘、脐带间充质干细胞库构建：将所获得细胞装进冷冻袋内，用 50% DMSO 和 5% 右旋糖苷冷冻保护剂预处理之后，将其放入透明包装袋密封，再装入干细胞储存盒，采用 BioArchive™ 系统冷冻，然后将其保存在 -196℃ 低温的液氮罐中。留取小部分细胞储存在 -80℃ 冰箱里，作为使用前 HLA 配型的复查样本。将其具体信息输入电脑数据库，建立完善的数据档案备查询。

待使用前，将细胞取出解冻，按 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于塑料培养瓶，用含 DMEM-LG/F12 (Sigma, USA)，5% FCS (Gibco BRL, USA) 的培养基，置 37℃，5% CO₂ 培养箱培养，4-5 天后换液，弃去非贴壁细胞，以后每 3-4 天半量换液。待细胞 80% 融合，0.25% 胰酶 (Sigma, USA) 消化，按 1: 3 传代。扩增后得到大量干细胞，应用于制备各种干细胞制剂。

胶原酶 I/II 型，GIBCO 公司，100mg 包装，溶于 100ml PBS 中可得质量/体积比为 0.1% 酶溶液，然后再稀释使用；胰蛋白酶（即胰酶），GIBCO 公司，100mg 包装，使用时也是按质量/体积比来配制。

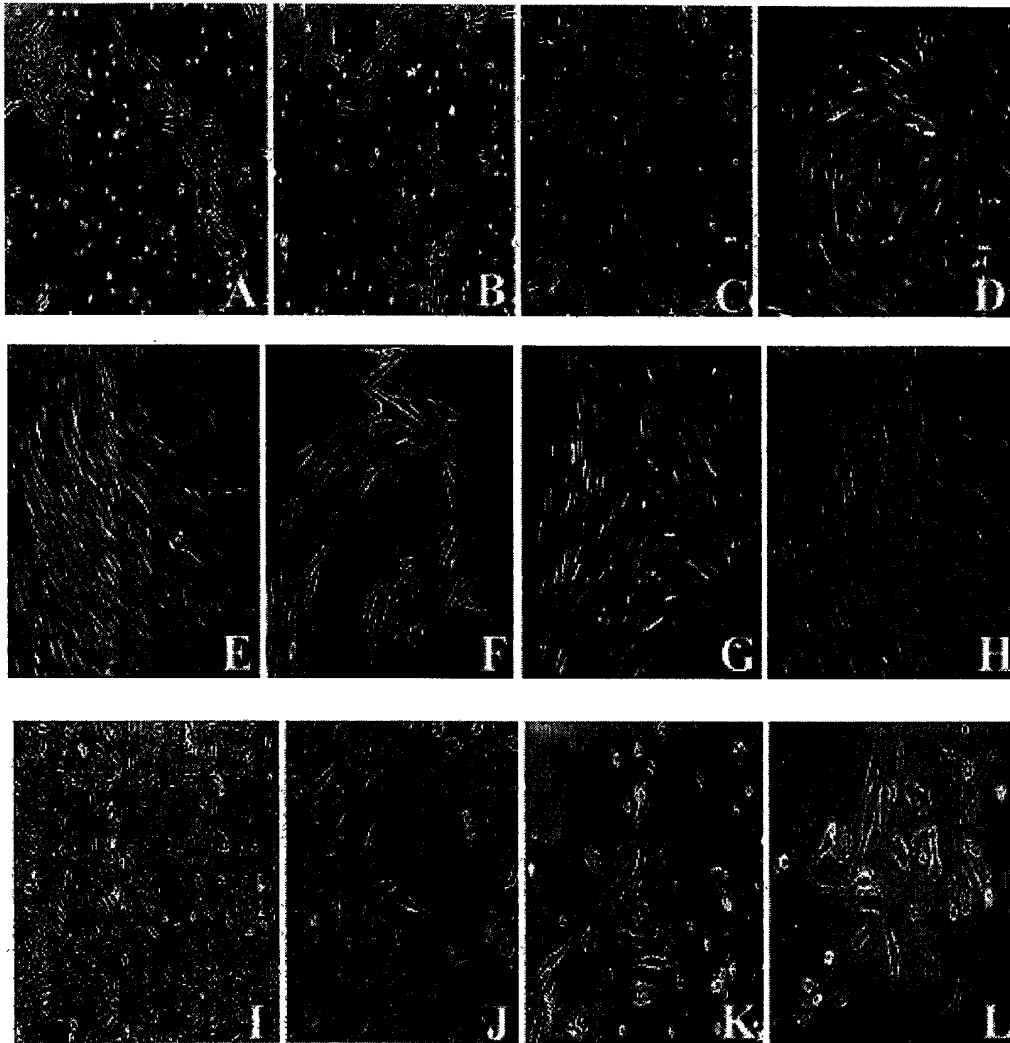


图 1

生长曲线

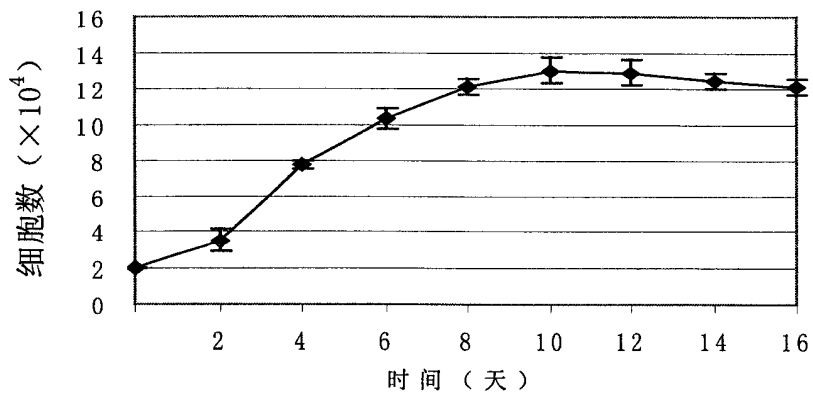


图 2