



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101868536 B

(45) 授权公告日 2015.03.25

(21) 申请号 200880114557.0

(22) 申请日 2008.10.03

(30) 优先权数据

103843 2007.10.04 PT

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010.05.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2008/054067 2008.10.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/044379 EN 2009.04.09

(73) 专利权人 美鼎珐尔产品制药实验室股份公司

地址 葡萄牙阿马多拉

(72) 发明人 R·I·冈查斯索雷斯

M·C·巴普提斯塔克尔豪

J·M·希尔瓦桑图斯 J·P·玛丁斯

V·A·巴斯图

P·埃斯提利塔蒙提罗达克鲁兹

H·J·索雷斯达克鲁兹

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

C12N 5/08(2006.01)

(56) 对比文件

ALP CAN et al.. "Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells". 《Stem Cell》.2007, 第25卷(第11期), 第2892页右栏第3段-第2893页右栏第2段.

Lu-Lu Lu et al.. "Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials". 《Hematopoietic Stem Cells》.2006, 第91卷(第8期), 第1024页左栏最后一段-右栏第1段,第1025页左栏最后一段-右栏第1段.

MARK L. WEISS. et al.. "Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells: Preliminary Characterization and Effect of Transplantation in a Rodent Model of Parkinson's Disease". 《Stem Cell》.2006, 第24卷(第3期), 第782页左栏最后一段-右栏第2段,第785页左栏最后一段,第787页左栏第2段-至右栏.

审查员 蔺娜

权利要求书3页 说明书17页 附图7页

(54) 发明名称

从人脐带分离和保存前体细胞的优化且确定的方法

(57) 摘要

本发明涉及从人脐带分离和保存前体细胞的优化且确定。在所处理样品数方面除可重现外,且100%可靠,所述方法在短时间内产生比现有技术先前所述高且确定数的前体细胞,所述前体细胞是单次离体粘附和扩展/增殖期后得到的细胞中的大部分(因此承诺细胞表型)。用此方法,可在直接冷冻细胞条段后,且在大部分细胞的一次离体扩展/增殖期(P0末)后9天内获得约 $8.6(\pm 0.1) \times 10^5$ 细胞/克经处理脐带。反过来,

所述细胞的特征使得,例如在35天后,从100%经处理脐带样品中得到平均 7.7×10^{15} 具有前体表型的细胞。因为简单、稳健且100%可靠,所述方法可在优质生产规范(GMP)下在致力于人的细胞治疗的实验室中进行。而且,所述方法还应用于药、化妆品和生物技术领域。

CN 101868536 B

1. 从人脐带分离细胞的经简化和优化的筛选方法,包括下列步骤:

(A) 回收步骤,其中所述人脐带从血中分离,并于以下温度在无菌闭合的受体中运输至实验室设备,

所述温度为:

如果在收集后 72 小时的时期内处理,则为室温,或

如果在收集后 72 ~ 144 小时的时期内处理,则为 2°C ~ 8°C ;

所述无菌闭合的受体是:

干燥的,或

被浸入含以下成分的无菌溶液中:186 μ g/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、400 μ g/ml KCl 、60 μ g/ml KH_2PO_4 、200 μ g/ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8000 μ g/ml NaCl 、350 μ g/ml NaHCO_3 、90 μ g/ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2000 μ g/ml 葡萄糖、及青霉素和链霉素的 1% 等摩尔混合物;

(B) 三次脐带洗涤步骤,用含下列成分溶液洗涤脐带三次:186 μ g/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、400 μ g/ml KCl 、60 μ g/ml KH_2PO_4 、200 μ g/ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8000 μ g/ml NaCl 、350 μ g/ml NaHCO_3 和 90 μ g/ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;

(C) 外羊膜去除步骤,在无菌镊子的辅助下进行;

(D) 分段步骤,其中所述脐带在解剖刀的辅助下沿其纵轴被横向分段,以产生约 2.5cm 长的条段;

(E) 由 (D) 得到的条段的血块消除步骤,其中在解剖刀的辅助下在鉴定出血块的位置制作切口,并从该切口消除血块;

(F) 分组步骤,其中由 (E) 得到的条段合并每 7 个成组,在下列步骤中各自处理;

(G) 由 (F) 得到的各组 7 个条段的细胞解离步骤,

在无菌且密封的含缓冲 pH 的消化溶液的瓶中,通过以重量 / 总消化体积计的浓度 0.075% 的胶原酶 II 与以重量 / 总消化体积计的浓度 0.125% 的胰蛋白酶的组合作用来进行,保持组织以 g 计的质量、以 cm^2 计的瓶底表面积、以 ml 计的消化体积和以 ml 计的总瓶体积之间的约 1 : 2 : 2 : 37 的恒定比例,且其中所述瓶在确定的温育时间、温度、热扩散、环境湿度和搅拌条件下温育;更具体而言,从一组 7 个各约 2.5cm,其对应于 2.5g,的脐带条段开始,从血块中游离出;使用 35ml 的消化溶液体积;在不通气且闭合的培养瓶中,消化期间 615ml 的液上空间减去消化下 7 个条段的浸没体积;其中所述消化溶液除酶外,由下列成分组成:186 μ g/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、400 μ g/ml KCl 、60 μ g/ml KH_2PO_4 、200 μ g/ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8000 μ g/ml NaCl 、350 μ g/ml NaHCO_3 、90 μ g/ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1000 μ g/ml 葡萄糖和 76 μ g/ml,其对应于 0.260mM,EDTA;保持 pH 为 6.4 或更高;且其中所述酶反应于 37°C 恒定温度下在闭合干燥的温育箱中在 100 振荡 / 分钟的恒定速率搅拌下温育 4 小时;

(H) 第一细胞回收阶段,其中细胞如 (G) 中所述从所述组织中解离出,

通过于室温下在发生消化的瓶中静置卧式温育 30 分钟的时间来回收细胞,

随后将消化上清用移液器转移到 50ml 离心管中,避免吸出任何未消化组织;

随后从所述消化瓶中除去全部未消化组织;

向所述消化瓶中加入 35ml 体积的补充有脱氧核糖核苷、核糖核苷、谷氨酰胺、抗生素和 10% 胎牛血清的基础培养基;且

其中所述密封的瓶的盖替换为含通气盖的滤膜;

随后于 37°C 下在含 7% CO₂ 的湿润气氛中温育, 每 72 小时更换培养基, 以促进粘附和细胞生长 / 增殖, 至达到最大表面汇合率;

(I) 第二细胞回收阶段, 其中细胞如 (G) 中所述从所述组织中解离出, 并含于如 (H) 中所述得到的消化上清中,

通过于室温下对 (H) 中的 50ml 离心管以 350g 离心 10 分钟来回收细胞;

在离心后, 将 35ml 上清转移到静置培养瓶, 所述静置培养瓶具有含通气盖的滤膜;

向同一培养瓶中加入 35ml 补充有脱氧核糖核苷、核糖核苷、谷氨酰胺、抗生素和 10% 胎牛血清的基础培养基;

于 37°C 下在含 7% CO₂ 的湿润气氛中温育所述培养瓶, 每 72 小时更换培养基, 以促进粘附和细胞生长 / 增殖, 至达到最大表面汇合率;

(J) 第三细胞回收阶段, 其中细胞如 (G) 中所述从所述组织中解离出,

细胞被回收为细胞沉淀, 所述细胞沉淀通过离心如 (I) 所述的消化上清而得到,

将所述细胞沉淀重悬于 2ml 由含 10% 二甲基亚砷的胎牛血清组成的溶液中, 并

直接用控速冷冻器以 1°C / 分钟的温度下降速度在 2.5ml 含 2ml 细胞悬液和 0.5ml 液上空间的无菌冷冻管中冷冻至 -80°C;

(K) 如 (H) 和 (I) 所述得到的细胞群的冷冻阶段,

在细胞培养物达到最大表面汇合率后, 直接在 0.5ml 细胞悬液和 0.5ml 含 10% 二甲基亚砷的胎牛血清溶液的混合物的液氮汽相中冷冻, 从而使 1.5ml 最终含 1.0ml 细胞悬液和 0.5ml 液上空间的无菌冷冻管中的最终细胞密度为约 3×10^6 细胞 / ml。

2. 权利要求 1 的筛选方法, 其特征在于, 所述静置培养瓶是总体积为 650ml 的 T₁₇₅。

3. 权利要求 1 ~ 2 中任一项的筛选方法, 其特征在于, 衍化出细胞群,

其中大部分细胞具有在适于间质细胞的表面和培养基中粘附和生长的能力,

其中大部分细胞表达细胞表面标记物 CD44、CD73、CD90 和 CD105, 且

其中大部分细胞仅微量表达细胞表面标记物 CD14、CD31、CD34 和 CD45, 且

其中大部分细胞表现出至 18 期粘附和扩展 / 扩增的扩展能力, 保持约 1.7/24h 的生长速率, 保持成纤维细胞样形态, 且

其中所述大部分细胞保持部分或终端分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞和神经细胞的能力。

4. 权利要求 1 ~ 2 中任一项的筛选方法, 其特征在于, 在 9 天内, 在首次粘附和扩展循环末产生约 $(8.6 \pm 0.1) \times 10^5$ 细胞 / 克脐带。

5. 权利要求 3 的筛选方法, 其特征在于, 在 9 天内, 在首次粘附和扩展循环末产生约 $(8.6 \pm 0.1) \times 10^5$ 细胞 / 克脐带。

6. 权利要求 1 ~ 2 中任一项的筛选方法, 其特征在于, 用恒定细胞接种物, 以全部 5.0×10^3 细胞 / cm² 的传代, 在 35 天内产生共约 7.7×10^{15} 细胞。

7. 权利要求 3 的筛选方法, 其特征在于, 用恒定细胞接种物, 以全部 5.0×10^3 细胞 / cm² 的传代, 在 35 天内产生共约 7.7×10^{15} 细胞。

8. 权利要求 4 的筛选方法, 其特征在于, 用恒定细胞接种物, 以全部 5.0×10^3 细胞 / cm² 的传代, 在 35 天内产生共约 7.7×10^{15} 细胞。

9. 权利要求 5 的筛选方法, 其特征在于, 用恒定细胞接种物, 以全部 5.0×10^3 细胞 / cm²

的传代,在 35 天内产生共约 7.7×10^{15} 细胞。

10. 权利要求 1 ~ 2 中任一项的筛选方法,其特征在于,用恒定细胞接种物,以全部 2.0×10^4 细胞 / cm^2 的传代,在 65 天内产生共约 2.1×10^{17} 细胞。

11. 权利要求 3 的筛选方法,其特征在于,用恒定细胞接种物,以全部 2.0×10^4 细胞 / cm^2 的传代,在 65 天内产生共约 2.1×10^{17} 细胞。

12. 权利要求 4 的筛选方法,其特征在于,用恒定细胞接种物,以全部 2.0×10^4 细胞 / cm^2 的传代,在 65 天内产生共约 2.1×10^{17} 细胞。

13. 权利要求 5 的筛选方法,其特征在于,用恒定细胞接种物,以全部 2.0×10^4 细胞 / cm^2 的传代,在 65 天内产生共约 2.1×10^{17} 细胞。

14. 权利要求 6 的筛选方法,其特征在于,用恒定细胞接种物,以全部 2.0×10^4 细胞 / cm^2 的传代,在 65 天内产生共约 2.1×10^{17} 细胞。

15. 权利要求 7 ~ 9 中任一项的筛选方法,其特征在于,用恒定细胞接种物,以全部 2.0×10^4 细胞 / cm^2 的传代,在 65 天内产生共约 2.1×10^{17} 细胞。

从人脐带分离和保存前体细胞的优化且确定的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及从人脐带分离和保存前体细胞的优化且确定的方法。

[0002] 本发明中的“前体细胞”指能够在表面和确定的生长培养基中粘附和扩展 / 增殖的一类细胞,其中培养物中的大部分细胞表达细胞表面标记物 CD44、CD73、CD90 和 CD105,且大部分细胞表现出细胞表面标记物 CD14、CD31、CD34 和 CD45 的仅残量表达,其中大部分细胞能够经历至 18 次扩展 / 增殖期,保持约 1.7/24 小时的恒定的翻倍因数,恒定的成纤维细胞样形态,及部分或终端分化为特定细胞(如成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞和神经胶质细胞 / 神经细胞)的能力。

[0003] 本发明的目标给现有技术添加了稳健的方法,其允许有关组织样品加工的 100% 的效力,且有关从每脐带质量分离的干细胞数及消耗时间的效力。

[0004] 作为本发明的基础的技术革新基本上构成为:将细胞分离过程分为三个独立的细胞回收阶段,及沿流程优化多个技术参数。所述参数远未被现有技术所提及或定义。

[0005] 所述三阶段回收方法基于从三个不同独立来源随分离过程解离的细胞的依次回收:

[0006] 阶段 1:回收能够粘附于细胞培养瓶表面的第一组细胞,在所述细胞培养瓶中进行消化反应。粘附在消化温育期过后随即发生,所述瓶仍保持水平位置,室温下 30 分钟,且仍在消化溶液存在下。在培养条件下温育所述粘附细胞,且使所述细胞经历扩展和增殖至汇合率接近 100% ;

[0007] 阶段 2:阶段 1 后,从通过离心所述消化溶液所得上清中回收第二组细胞。然后使这些细胞在培养条件下温育,并将能够粘附于细胞培养瓶表面的细胞经历扩展和增殖至汇合率接近 100% ;

[0008] 阶段 3:从通过离心阶段 2 所得沉淀中回收第三组细胞。可不经粘附、扩展和增殖而将这些细胞冷冻保存。

[0009] 有关随流程优化的技术参数,这些是:

[0010] 1. 机械操作类型和初始脐带条段尺寸,

[0011] 2. 脐带血管中是否有血块,

[0012] 3. 酶的类型、单独或组合作用、及消化溶液中酶的浓度,

[0013] 4. 消化溶液的组成,

[0014] 5. 消化反应期间的 pH 变化,

[0015] 6. 温育时期 / 时间,

[0016] 7. 搅拌类型(缓和或剧烈),

[0017] 8. 温育气氛类型(干或湿),及

[0018] 9. 冷冻保存期间的细胞密度。

[0019] 用于解离细胞回收的三阶段方法与上述技术方面的优化的组合产生了与在细胞治疗(基于细胞施用)中的用途更一致的方法。这是由于方法的稳健性(100%效力)及由于在相对短的时间段内得到的高细胞产量。而且,还优化了冷冻保存的方法,以最大化用于将来使用的细胞活力

[0020] 用新建的方法可能在 9 天内,在直接冷冻细胞条段后,且在大部分细胞两次独立的单阶段离体粘附和扩展 / 增殖 (P0 末) 后,从 100% 的经处理脐带样品中得到相比现有技术空前的约 $8.6(\pm 0.1) \times 10^5$ 细胞 / 克经处理脐带的产量。所述效力代表可从一个脐带 (平均 35cm 长) 得到共 3.0×10^9 细胞的可能性。相反,所述细胞的特征使得在 35 天内 (P6 末),用 5.0×10^5 细胞 / cm^2 恒定接种物经 6 次传代,从 100% 的经处理脐带条段中得到例如平均 7.7×10^{15} 细胞。最后,所述效力代表用现有技术中已存在的相似流程得到相同细胞数所需时间减少约 56%。根据早先所述,为用相同的初始接种物得到接近 1.0×10^{15} 细胞的数量,最少需要 80 天 (Harris et al., 2006 ;Can 和 Karahuseyinoglu, 2007)。

[0021] 尽管专门开发用于细胞治疗,所述新方法也适合用于创建的细胞库,所述细胞库:

[0022] ● 待用于基因治疗方案,

[0023] ● 待成为药理学和化妆组合物的基础,

[0024] ● 待产生细胞,所述细胞:

[0025] ■ 用于生产分子或分子成分,

[0026] ■ 用于生产细胞培养支持用细胞层,及

[0027] ■ 用于通过基因操作生产细胞系。

背景技术

[0028] 前体细胞 (干细胞、生殖细胞、未分化细胞、或原始细胞) 是一类在显著期间具有自我再生能力,尤其是具有部分或终端分化为其他更特化的细胞类型的能力的细胞。

[0029] 尽管胚胎前体细胞的巨大分化潜能,但它们在研究或 / 和治疗应用是有争议的,且已引起了严重的伦理学和安全问题。因此,此领域的研究已聚焦于替代性的非胚胎干细胞 (例如从骨髓、骨膜、骨小梁、脂肪组织、滑膜区域、骨骼肌、乳牙髓和终牙 (definitive teeth) 髓、及嗅粘膜得到的细胞) 的鉴定和评估 (Barry and Murphy, 2004 ;Roisen et al., 2001)。已证实从这些组织中分离的细胞有能力体外及体内分化为尤其是:软骨细胞、脂肪细胞、成骨细胞、成肌细胞、心肌细胞、星形细胞和肌腱细胞 (tenocyte) (Carvalho et al., 2007 ;Majumdar et al., 1998 和 Pittenger et al., 1999)。所述分离自非胚胎来源,且能够分化为非造血特化细胞,源自三胚层 (内胚层、中胚层和外胚层) 的前体细胞被称为间质干细胞。

[0030] 利用间质前体细胞的主要限制在临床实践期间 (即细胞收获期间) 发生。收集间质细胞一定涉及对供体的侵入性方法 (如手术操作 (例如,从骨髓收集干细胞),其甚至涉及全身麻醉)。而且,由于间质干细胞稀少,最终所得细胞数一般低。

[0031] 作为替代,脐带组织已被描述为可能的成体前体细胞来源 (Romanov et al., 2003)。例如,脐带血已知是前体细胞的丰富来源,但主要是造血性质的 (血谱系)。因为间质干细胞以有限数量存在于脐带血中,从该组织中分离这些细胞的尝试受阻,并且,甚至是使用甚高量血液的最成功的尝试,相对经处理组织样品总数,也未超过 60% 的成功率。怀疑终究仍在有关所分离细胞的来源上;即细胞来源是否真的是血液,或是胎儿组织 (Chul-Wan et al., 2003 ;Bieback et al., 2004)。

[0032] 其他报道描述了从其他间质特性比脐带血显著更丰富脐带组成组织中分离间质干细胞。这些方法中的一些例子基于脐带基质 (也被称为脐带胶质 (Wharton's jelly))

(Purchio et al.,1998 ;Mitchell et al.,2003 ;Davies et al.,2004 ;Wang et al.,2006))、脐带静脉 (Romanov et al.,2003 ;Auger et al.,2005)、动脉组织 (Kadner et al.,2004)、或其他衬组织 (如羊膜 (Phan et al.,2004))。

[0033] 详细分析揭示,所述方案要么这样要么那样受限于所得细胞的特性,或所分离细胞数方面的成功率和效率相当不确定。实际上,这些方案的限制性特点必然导致所分离细胞群的表型多样性的丧失,主要由于不必要的聚焦于脐带组织结构内的特定组织或几何位置。而且,最终可得到的实际干细胞数必然不确定。

[0034] 因此,例如细胞研究公司提出方案,其仅基于羊膜为间质干细胞来源,衍化出的细胞已保藏为内皮细胞系 (Phan et al.,2004)。

[0035] 此外,至今所报道的方法中尚无表现出成功的经处理组织样品数方面的效力,以足以可靠应用于细胞治疗方案。换言之,尽管从脐带基质分离间质细胞的成功率高于从脐带血 (或甚至骨髓) 分离间质细胞的成功率,但至今尚无方法保证经处理组织样品数方面的 100% 的分离成功率,以使最终结果足以稳健而用于细胞治疗 (Deryl 和 Weiss,2008)。

[0036] 而且,导入不必要的结构操作步骤 (如提取脐带血管 (Purchio et al.,1998 ; Mitchell et al.,2003 ;Davies et al.,2004 ;Wang et al.,2006)、机械浸渍 (Seyda et al.,2006)) 使得已有方案难以标准化和重现,更无法保证用于细胞治疗的足够的细胞数。

[0037] 而且,过度组织操作诱导不期望 (如果期望保持前体细胞表型) 的细胞分化 (Gardner et al.,2000 ;Claes et al.,2002 ;Cullinane et al.,2003)。

[0038] 基于脐带血管本身的方案也显示出局限性,这些方案涉及复杂的动脉或脐带静脉提取,并将间质干细胞的分化潜能限制于内皮下和内皮细胞系 (Romanov et al.,2003 ; Auger et al.,2005 ;Kadner et al.,2004 ;Sarugaser et al.,2005)。

[0039] 最后,不欠复杂的是基于脐带胶质 (Wharton's jelly) (WJ) 为间质干细胞来源的方案。这些报道不一致,也缺乏应用方法学的定义和标准。因此,当 Purchio et al.,1998、 Mitchell et al.,2003、和 Wang et al.,2006 进行复杂且难以重现的最初血管提取,处理留存的组织用于细胞分离 ;Davies et al.,2004 也移出脐带血管,但相比使用留存的组织,他们处理了仍连接在血管周围的组织用于细胞分离,丢弃了第一种方案。不仅如此,所有作者都异口同声地肯定他们的方案基于仅 WJ (Purchio et al.,1998 ;Mitchell et al.,2003 ; Davies et al.,2004 ;Wang et al.,2006)。这些方法之间的差异无法分辨,且这两种方案中的既存组织的过度组织操作发掘队前体表型维持的期望的影响,并威胁到通常群分离和冷冻保存服务中分离的前体细胞的利用。

[0040] 现有技术中明显漏掉了基于简单、稳健和确定的方案的方法,以使保证效力和效率的重现。只要间质干细胞可应用于细胞治疗,有必要向患者保证用于细胞分离的方法会提供治疗剂必要的质量和数量。既然至今现有技术所述的方案缺乏保证,预期本发明会缓解对具有上述特征的方法的需求。

[0041] 发明概述

[0042] 本发明旨在针对现有技术增添具有特定间质特征的从人脐带分离的前体细胞的筛选方法,所述方法基于通过特殊消化胶原 (脐带基质 (Wharton's jelly) 的支持物质) 的筛选策略。

[0043] 细胞释放无需初始组织的机械操作即发生,保证了原细胞表型完整,且保持细胞

活力。本发明中所述“机械操作”指浸渍和 / 或破碎脐带的羊膜下、血管间、和血管周围区中的任意组织 ; 及 / 或提取脐带血管 ; 及 / 或任意其他可干扰稳定性, 及由此干扰存在于脐带基质 (Wharton' s jelly) 中的表型和活力的机械作用,

[0044] 除除去机械操作外, 导入三个独立的细胞回收解离阶段及沿过程的多个技术参数的优化使所述方法变得简单、稳健、在效力方面 100% 可靠, 且在随着时间所得细胞数方面高效。结果, 所述方法可应用于细胞治疗服务, 及对分离所得间质干细胞的冷冻保存 (用于将来使用)。

[0045] 根据导入各参数后所得总细胞产量评估导入用于细胞分离的依次三阶段过程和优化个技术特征 (现有技术远未提及或以不确定的方式描述) 的结果。总细胞产量对应于在液氮汽相中直接冷冻而未经历粘附和扩展 / 增殖期的小细胞部分, 加上两组之前从组织消化随即的第一粘附筛选阶段和消化产物离心随即的第二粘附阶段分离的细胞。所述两组经历一个阶段的粘附和扩展 / 增殖, 且一旦对应的培养物在任何传代 (P0 末) 前达到最大汇合率就冷冻。

[0046] 本发明中所述“传代 (P)”指: 由于粘附细胞在确定的生长培养基中扩展 / 增殖, 为同时增加粘附和扩展表面、及生长培养基的总体积, 通过在粘附细胞达到在生长表面接近 100% 的汇合率 (细胞密度) 后, 用胰蛋白酶消化所述粘附细胞来进行重接种, 以启动新的扩展 / 增殖期。

[0047] 本发明中所述“最大汇合率”指培养支持物的生长表面被单层细胞均匀覆盖。

[0048] 包括三阶段方法的 3 个依次的回收阶段是:

[0049] 阶段 1: 在消化溶液仍存在的情况下回收能够粘附于细胞培养瓶表面的第一组细胞, 在所述细胞培养瓶中进行消化反应。

[0050] 阶段 2: 从消化溶液的离心回收能够在由上清和培养基组成的溶液中粘附于另一细胞培养瓶表面的第二组细胞。

[0051] 阶段 3: 从通过离心阶段 2 所得沉淀中回收第三组细胞。所述细胞无需粘附和扩展 / 增殖而直接冷冻。

[0052] 所优化的技术参数是:

[0053] 1. 消化溶液中的待用初始组织条段尺寸, 保持组织质量 (g)、瓶底表面积 (cm^2)、消化体积 (ml)、和总瓶体积 (ml) 之间的约 1 : 2 : 2 : 37 的恒定比例, 考虑到 1cm 人脐带条段的重量约 1g。在除去羊膜后, 测试了几种类型的分段方法: 低 (5cm 条段)、中 (2.5cm 条段)、高 (0.3cm 条段)、和组织糜。在解剖刀的辅助下进行全部分段, 并用实际上同一条件处理样品。得出, 当使用 2.5cm 条段时得到最佳产量 (在 P0 末的总细胞 / 脐带质量 / 时间方面)。

[0054] 2. 组织血管 (1 个静脉和 2 个动脉) 内血块的有无: 已知红细胞裂解有毒性, 降低细胞的体外活力。因此, 在进行消化时, 在有无血块的情况下比较了细胞产量。对于后者, 用解剖刀在血管中纵切, 以制作待去除所述块的孔。得出, 血块对总细胞产量具有负面影响。

[0055] 3. 酶的性质、浓度和在组织消化步骤中使用的酶的单独或组合作用: 在培养基存在下, 细胞直接粘附于培养瓶, 无消化, 且因此在缺少酶的情况下; 用单种酶解离组织: 测试了 0.075% (w/v) 胶原酶 II 或 2.0% (w/v) 链霉菌蛋白酶。因为仅利用胶原酶 II 是最有效的方法, 就将此酶与其他酶组合, 尤其与 0.125% (w/v) 胰蛋白酶 (在有无 0.260mM EDTA

的情况下)组合、与仅 0.5% (w/v) 透明质酸酶组合、且与 0.5% (w/v) 透明质酸酶和 2.0% (w/v) 链霉蛋白酶的组合作用得到最佳产量(在 P0 末的总细胞/脐带质量/时间方面)。此外,当改变胶原酶 II 的浓度(0.0375%、0.075%和 0.15% w/v)时,保持胰蛋白酶浓度 0.125% (w/v),在 0.260mM EDTA 的存在下,证实,0.075% (w/v) 的胶原酶 II 浓度提供最佳结果,保持之前优化的条件恒定。

[0056] 4. 消化溶液的成分:测试了几种酶消化溶液的成分,即补充有 20% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 α -Mem;补充有 EDTA(更具体为 186mg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、400mg/ml KCl、60mg/ml KH_2PO_4 、200mg/ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、8000mg/ml NaCl、350mg/ml NaHCO_3 、90mg/ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1000mg/ml 葡萄糖和 76mg/ml (0.260mM)EDTA)的盐缓冲溶液(如 HBSS);补充有 5mM CaCl_2 的前述 HBSS 溶液;补充有 5mM CaCl_2 的 25mM HEPES 缓冲液。补充有 0.260mM EDTA 的盐缓冲溶液(HBSS)产生最佳产量。

[0057] 5. 监控消化反应期间 pH 变化:随着消化过程监控 pH,观察到培养基的酸化。平均情况为,当使用 0.075% (w/v) 的胶原酶 II 与 0.125% (w/v) 胰蛋白酶的组合作用时,在补充有 0.260mM EDTA 的汉克斯盐溶液(HBSS)中,初始 pH 为 7.2,在 4 小时温育后降低至 6.4,在 16 小时后降低至 5.9。培养基酸化可解释为在长期培养(16 小时)中细胞分离缺乏效率。尽管长期培养后消化会更完全,但培养基酸化会开始有害于细胞活力。溶液 pH 因此被考虑为计算温育时间时的参数,且决不能低于 6.4,此 pH 以下将有害于所述方法的有效性(如通过对可分离的活细胞的计数所确定)。尽管在 16 小时观察到更完全的消化,发现更长的时间对细胞活力具有负面影响,并导致培养基显著酸化。

[0058] 6. 消化反应的温育时期/时间:测试了几个温育时间(2 小时、4 小时、6 小时、和 16 小时)。得出,4 小时温育时间产生最佳产量。

[0059] 7. 消化反应温育期间的振荡类型(温和或剧烈):用温和或剧烈振荡速率定轨振荡水浴来进行温育,所述振荡速率分别由 100 振荡/分钟(opm)和 140 振荡/分钟(opm)组成。100opm 的温和振荡导致在细胞产量方面更佳的结果。

[0060] 8. 酶消化的温育气氛(干或湿):于 37°C 在两种环境下进行温育:干或湿。为此测试,在浸渍的定轨振荡器(其中热交换通过水和饱和空气发生)中或在干室(其中热交换通过干空气发生)中平行处理组织样品。在干室中温育导致更佳的细胞产量。

[0061] 9. 在经历一个阶段粘附和扩展/增殖后细胞冷冻保存效率中细胞密度的影响:在 P0 末,在液氮汽相中以不同密度(细胞/ml),在由 10%二甲基亚砜(DMSO)和 90%胎牛血清(FBS)组成的溶液中冷冻 1ml 细胞悬液。测定了解冻后各条件下的细胞活力(活细胞/总细胞)和细胞恢复(解冻后计数的活细胞/冷冻保存前计数的活细胞)。所得结果显示 3×10^6 细胞/ml 的细胞密度最可能保证冷冻保存后所测试条件下活细胞的适当保持和恢复。

[0062] 一般而言,假定上述优化,本发明基于从人脐带分离细胞的筛选方法,其中各脐带的血被除去,并被运输到实验室含葡萄糖和抗生素的盐缓冲液中,始终在无菌环境中,如在 48 小时内处理,则优选在室温下。对于更长时间储存,则可推荐 2°C~8°C 之间的温度。

[0063] 下列步骤(包括处理脐带及分离前体细胞)在无菌条件下,在竖通层流通风橱室(vertical flux laminar flow hood chamber)中进行。

[0064] 首先,剥离羊膜,且用新盐溶液洗涤脐带,其中所述羊膜为衬结构,所述羊膜已在

组织收集期间与空气接触,并因此更易被微生物污染。

[0065] 一般而言,为分离期望前体细胞,所述方法始于以确定尺寸分段,所述尺寸源于优化的组织分段,其不涉及组织的机械操作,如可应用,包括任意提取除脐带内的血块之外的器官的内部结构。

[0066] 从脐带组织释放细胞受针对脐带基质的酶消化促进,遵守组织质量(g)、附着组织消化瓶表面(cm^2)、消化溶液体积(ml)、和消化瓶总体积(ml)之间已建立的约 1 : 2 : 2 : 37 的比例关系;考虑 1cm 脐带条段平均重 1g。

[0067] 为用酶消化处理,使用酶的特定组合,以特定浓度,在确定组成的溶液中,在温育期间,以特定最小 pH,及振荡类型和温育气氛也特选。

[0068] 解离细胞的回收在 3 个阶段进行,其中第一阶段回收一组能够粘附于细胞培养瓶(在其中进行组织消化反应)表面的细胞。粘附在消化温育期过后随即发生,于室温下使瓶仍保持水平位置站立 10 ~ 120 分钟之间,优选 30 分钟。在第二阶段,在阶段 1 后,从消化溶液离心得到的上清中回收新的一组细胞。在阶段 1 和 2 中,将细胞在培养条件下温育,能够粘附于细胞培养瓶表面的细胞经历一个阶段的扩展/增殖至达到近 100% 的汇合率。最后在步骤 3,从阶段 2 中离心得到的沉淀中回收一组细胞,并不经历任何轮的粘附和扩展/增殖而直接冷冻保存。

[0069] 优化依次细胞回收及全部其他上述优化因素,由此所述方法在所选和所分离细胞数方面表现出 100% 效力和最高效率。反过来,得到的细胞群可通过细胞能够在表面和确定的生长培养基中粘附和扩展/增殖来鉴定,其中培养物中的大部分细胞表达细胞表面标记物 CD44、CD73、CD90 和 CD105,且大部分细胞表现出细胞表面标记物 CD14、CD31、CD34 和 CD45 的仅残量表达,其中大部分细胞能够经历至 18 次扩展/增殖期,保持约 1.7/24 小时的恒定的翻倍因数,恒定的成纤维细胞样形态,及部分或终端分化为特定细胞(如成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞和神经胶质细胞)的能力。

[0070] 此外,本发明涉及用于经历一轮粘附和扩展/增殖的细胞的冷冻保存的细胞密度(细胞/体积)的优化,以有助于最大化将来使用的细胞活力方面的效率。

[0071] 用新方法可在直接冷冻细胞条段后,且在两次独立的离体粘附和扩展/增殖期后(P0 末),在 9 天内,从每脐带样品中得到相比现有技术空前的约 $8.6(\pm 0.1) \times 10^5$ 细胞/克脐带的产量。所述效力代表可从一个脐带(回收后平均 35cm 长,约 35g)得到共 3.0×10^9 细胞的可能性。相反,因为所分离的间质干细胞一般表现出 1.7/24 小时的翻倍因数,在具有 175cm^2 的生长表面的细胞培养瓶中的 7 轮(6 次传代, P6) 粘附和扩展/增殖期间,使用 5.0×10^5 细胞/ cm^2 恒定接种物,可在 35 天内得到平均 7.7×10^{15} 细胞。这代表用现有技术中所述相似流程得到相同细胞数所需时间减少约 56%,其中为用相同的 5.0×10^5 细胞/ cm^2 的初始接种物达到相同细胞数,需要 80 天(Harris et al., 2006; Canand Karahuseyinoglu, 2007)。

[0072] 尽管新方法被开发主要用于细胞治疗方案,但其也适于其他方面,例如:细胞储蓄、基因治疗方案、药物和化妆组合物、分子或分子化合物的生产、细胞培养支持用细胞层的生产、及通过基因操作的细胞系生产。

[0073] 附图简述

[0074] 图 1:脐带基质衍生细胞的流式细胞术结果。细胞用连接于 PE 或 FITC 的抗

CD44(97%阳性细胞)、CD73(99%阳性细胞)、CD90(97%阳性细胞)和CD105(95%阳性细胞)(均为间质基底细胞的阳性标记物)的抗体进行免疫标记。

[0075] 图2:脐带基质衍生细胞的流式细胞术结果。细胞用连接于PE或FITC的抗已知为间质细胞系的阴性标记物的抗原(CD14(单核细胞系(<1%阳性细胞))、CD34(特异于造血细胞系(1.2%阳性细胞))、CD31(内皮标记物(1%阳性细胞))和CD45(全白细胞标记物(1.1%阳性细胞)))的抗体进行免疫标记。

[0076] 图3:细胞密度对细胞粘附和扩展/增殖后细胞冷冻保存效率的影响:

[0077] A:不同细胞密度的解冻后活力(活细胞/总细胞×100%)。

[0078] B:细胞恢复(解冻后回收的活细胞/初始冷冻活细胞数)。

[0079] 用 3×10^6 细胞/ml的细胞密度得到所测条件(含1ml细胞悬液和0.5ml液上空空间的1.5ml无菌冷冻管)的最佳结果。

[0080] 图4:体外扩展解冻细胞。所观察到的翻倍因数是1.7/24小时,近似于这些细胞冷冻保存前的翻倍因数。在解冻后36小时观察到80~90%的汇合率(24小时后更换培养基):A:解冻后12小时(培养基更换前)的前体细胞。B:解冻后36小时的前体细胞(24小时后进行培养基更换)。标尺:100 μm。

[0081] 图5:分离的前体细胞分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞。

[0082] A:正常生长培养基中对照细胞(非分化细胞)的细胞形态。

[0083] B:成骨分化:将细胞接种于成骨分化培养基中,并保持3周,后用碱性磷酸酶染色。

[0084] C:脂肪形成分化:将脂肪形成分化培养基加于完全汇合的细胞培养物上,且保持细胞3周,后用油-O-红染色。

[0085] D:软骨形成分化:将细胞重悬,并在离心管中的软骨形成分化培养基中保持4周。

[0086] 然后将细胞用阿辛蓝和苏木精染色。标尺:100 μm。

[0087] 图6:分离的前体细胞分化为心肌细胞。

[0088] A:正常生长培养基(补充有10% FBS和1%青霉素/链霉素的α-MEM)中对照细胞(非分化细胞)的细胞形态。

[0089] B:心肌形成分化后的细胞形态。

[0090] C:用DAPI和抗肌钙蛋白T(心肌细胞特异性标记物)的抗体标记的对照细胞(非分化细胞)。仅观察到DAPI标记的核。

[0091] D:用DAPI和抗肌钙蛋白T的抗体标记的分化细胞。可兼观察到DAPI标记的核和肌钙蛋白T标记的细胞骨架。

[0092] 图7:分离的前体细胞分化为神经胶质细胞/神经细胞。

[0093] A:正常生长培养基(补充有10% FBS和1%青霉素/链霉素的α-MEM)中对照细胞(非分化细胞)的细胞形态。

[0094] B:神经胶质/神经分化后的细胞形态。

[0095] C:用DAPI和抗β-微管蛋白III(特异性神经元蛋白)抗体标记的对照细胞(非分化细胞)。仅观察到DAPI标记的核。

[0096] D:用DAPI和抗β-微管蛋白III抗体标记的分化细胞。可兼观察到DAPI标记的核和β-微管蛋白III标记的细胞骨架。

[0097] 发明详述

[0098] 在应用所述方法前,应从血中分离人脐带,并于以下温度在无菌闭合的受体中运输至实验室设备,

[0099] ●所述温度为:

[0100] ■如果在收集后 72 小时的时期内处理,则优选为室温,或

[0101] ■如果在收集后 48 ~ 144 小时的时期内处理,则为 2 ~ 8℃,优选为 4℃;

[0102] ●所述收集为不用或优选用无菌盐溶液收集,所述盐溶液如 HBSS;

[0103] ●所述无菌闭合的受体是:

[0104] ■干燥的,或

[0105] ■优选被浸入含以下成分的无菌溶液中:186 μg/ml CaCl₂ · 2H₂O、400 μg/ml KCl、60 μg/ml KH₂PO₄、200 μg/ml MgSO₄ · 7H₂O、8000 μg/ml NaCl、350 μg/ml NaHCO₃、90 μg/ml NaH₂PO₄ · 7H₂O、2000 μg/ml 葡萄糖、及青霉素和链霉素的 1% 等摩尔混合物;

[0106] 所述盐溶液可补充有营养物和抗生素,例如 1g/l 葡萄糖、100U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素。

[0107] 所述方法应在无菌环境中进行,所述无菌环境如层流通风橱内。用汉克斯盐缓冲溶液 (HBSS) 洗涤脐带 3 次,并在无菌镊子的辅助下去除脐带周围的羊膜。

[0108] 然后在解剖刀的辅助下将所述脐带横向分段为约 2.5cm 的条段。考虑到人脐带的平均密度 (接近 1g/cm),各条段对应约 2.5g 的组织。

[0109] 如果这些条段中存在血块,则应在解剖刀的辅助下去除。在下列步骤中,各自处理各组 7 个 2.5g 无血块的条段。

[0110] 通过解离各组 7 个条段来得到细胞,所述解离在无菌且密封的含缓冲 pH 的消化溶液的瓶中,通过浓度 0.075% (重量 / 总消化体积) 的胶原酶 II 与浓度 0.125% (重量 / 总消化体积) 的胰蛋白酶的组合作用来进行,保持组织质量、瓶底表面积、消化体积、和总瓶体积之间的约 1 : 2 : 2 : 37 的恒定比例,且其中所述瓶在确定的温育时间、温度、加热环境、环境湿度和搅拌条件下温育;

[0111] 更具体地,

[0112] ●从一组 7 个各约 2.5cm (2.5g) 的脐带条段开始,从血块中游离出;

[0113] ●使用 35ml 的消化溶液体积;

[0114] ●在不通气且闭合的培养瓶中,所述不通气且闭合的培养瓶如总体积 650ml 的 T₁₇₅,且消化期间 615ml 的液上空间减去消化物下 7 个条段的浸没体积;

[0115] ●其中所述消化溶液除酶外,由下列成分组成:186 μg/ml CaCl₂ · 2H₂O、400 μg/ml KCl、60 μg/ml KH₂PO₄、200 μg/ml MgSO₄ · 7H₂O、8000 μg/ml NaCl、350 μg/ml NaHCO₃、90 μg/ml NaH₂PO₄ · 7H₂O、1000 μg/ml 葡萄糖、和 76 μg/ml (0.260mM) EDTA;

[0116] ●保持 pH 为 6.4 或更高;且

[0117] ●其中所述酶反应于 37℃ 恒定温度下在闭合干燥的温育箱中在 100 振荡 / 分钟 (opm) 的恒定速率搅拌下温育 4 小时。

[0118] 以三个阶段 (三阶段法) 进行从组织解离得到的细胞的回收。

[0119] 在第一阶段,从解离组织回收细胞,更具体通过于室温下在发生消化的瓶中静置水平温育 5 ~ 300 分钟 (优选 30 分钟) 的时间来回收细胞。将消化上清通过用移液器移溶液来转移到 50ml 离心管中,避免吸出任何未消化组织。除去全部未消化组织。这里,向

所述消化瓶中加入 35ml 体积的补充有脱氧核糖核苷、核糖核苷、谷氨酰胺、抗生素和 10% 胎牛血清 (FBS) 的基础培养基。所述不通气的瓶盖替换为含通气盖的滤膜,并于 37°C 下在含 7% CO₂ 的湿润气氛中温育。应每 72 小时更换总培养基,以促进水平温育期 (筛选期) 间粘附的细胞生长,至达到最大表面汇合率。

[0120] 在第二回收阶段,通过于室温下对所述 50ml 离心管中的消化上清以 350g 离心 10 分钟来回收细胞。在离心后,将 35ml 上清转移到具有含通气盖的滤膜的静置培养瓶 (T₁₇₅); 并加入 35ml 补充有脱氧核糖核苷、核糖核苷、谷氨酰胺、抗生素和 10% 胎牛血清 (FBS) 的基础培养基。于 37°C 下在含 7% CO₂ 的湿润气氛中温育所述培养瓶,每 72 小时更换总培养基,以促进粘附和扩展 / 增殖,至达到最大表面汇合率。

[0121] 从第一和第二阶段回收的细胞群在第一轮粘附和扩展 / 增殖 (P0 末) 后冷冻保存。这在于直接在 0.5ml 含期望总细胞数的细胞悬液与相同体积的含 10% 二甲基亚砜 (DMSO) 的胎牛血清 (FBS) 溶液的混合物的液氮汽相中冷冻,以在 1.5ml 无菌冷冻管 (因此含 1.0ml 细胞悬液和 0.5ml 液上空间) 中得到约 3×10⁶ 细胞 /ml 的终浓度。

[0122] 第三且最后阶段的细胞回收在于直接冷冻保存由之前所述的消化 上清离心得到的细胞沉淀,将所述细胞沉淀重悬于 2ml 由含 10% 二甲基亚砜 (DMSO) 的胎牛血清 (FBS) 组成的溶液中,用控速冷冻器以 1°C / 分钟的温度下降速度在 2.5ml 含 2ml 细胞悬液和 0.5ml 液上空间的无菌冷冻管中冷冻至 -80°C。

[0123] 可根据需要通过在 37°C 水浴中快速解冻来恢复冷冻保存的细胞,然后将细胞于相同温度下,以 1 : 10 的稀释倍数重悬于培养基中。可用 5.0×10³ 细胞 /cm² ~ 2.0×10⁴ 细胞 /cm² 之间的免疫接种密度进行随后的扩展循环,每 72 小时更换总培养基。细胞一般表现出 1.7/24 小时的翻倍因数。

实施例

[0124] 实施例 1:优化机械操作和条段尺寸的类型和量

[0125] 优化了机械操作类型和初始组织片段的尺寸,保持组织质量 (g)、消化瓶底表面积 (cm²)、消化体积 (ml)、和总瓶体积 (ml) 之间的约 1 : 2 : 2 : 37 的恒定比例,考虑 1cm 人脐带条段重约 1g。在除去羊膜后,测试了几种类型的脐带分段:低 (5cm 条段);中 (2.5cm 条段);高 (0.3cm 条段);及组织糜。所有分段均在解剖刀的辅助下进行,并用实质相同的条件处理样品。得出,当使用 2.5cm 条段时,得到在 P0 末总细胞 / 脐带质量 / 时间方面的最佳产量。表 1 总结了得到的定量结果。

[0126] 表 1 :分段优化 :细胞产量

[0127]

| 低 (5cm) | 中 (2.5cm) | 高 (0.3cm) | 组织糜 |
|---------|-----------|-----------|-----|
| + | ++ | + | - |

[0128] 注释 :+++ = 优, ++ = 甚良, + = 良, - = 合理, -- = 差, 0 = 不成功

[0129] 实施例 2 :有关脐带血管 (1 个静脉和 2 个动脉) 内有无血块的优化

[0130] 已知红细胞裂解有毒性,降低细胞体外活力。因此,比较了在有 无血块的情况下进行消化时的细胞产量。对于后一实验,在解剖刀的辅助下除去血块。得出,血块对 P0 末总细胞 / 脐带质量 / 时间方面的产量具有负面作用。表 2 总结了所得定量结果。

[0131] 表 2 :血块 :对细胞产量的影响

[0132]

| | |
|---|----|
| 有 | 无 |
| - | ++ |

[0133] 注释 :+++ = 优, ++ = 甚良, + = 良, - = 合理, -- = 差, 0 = 不成功

[0134] 实施例 3 : 有关消化溶液中的酶性质、单独或组合的酶作用、及酶浓度的优化

[0135] 为最大化具有期望特征的分离自初始组织的细胞数方面的产量, 有关酶消化采用了两个初始方法 : 在存在培养基、无消化, 因此缺乏酶的情况下细胞直接粘附到培养瓶, 并用单个酶 : 0.075% (w/v) 胶原酶 II 或 2.0% (w/v) 链霉菌蛋白酶解离组织。

[0136] 由于仅利用胶原酶 II 是最有效的方法, 就将此酶与其他酶组合, 尤其是与 0.125% (w/v) 胰蛋白酶 (在有无 0.260mM EDTA 的情况下) 组合、与仅 0.5% (w/v) 透明质酸酶组合、且与 0.5% (w/v) 透明质酸酶和 2.0% (w/v) 链霉菌蛋白酶的组组合。

[0137] 为此测试, 使用了优化的 2.5cm 的条段尺寸, 且保持了组织质量 (g)、瓶底表面积 (cm²)、消化体积 (ml)、和总瓶体积 (ml) 之间的约 1 : 2 : 2 : 37 的恒定比例。

[0138] 结果显示, 通过 0.075% (w/v) 胶原酶 II 与 0.125% (w/v) 胰蛋白酶的组合作用得到在 P0 末总细胞 / 脐带质量 / 时间方面的最佳产量。此外, 当改变胶原酶 II 的浓度 (0.0375%、0.075% 和 0.15% w/v) 时, 保持胰蛋白酶浓度 0.125% (w/v), 在 0.260mM EDTA 的存在下, 证实, 0.075% (w/v) 的胶原酶 II 浓度提供最佳结果, 表 3 定量总结了这些结果。

[0139] 表 3 : 酶性质、组合作用和浓度 : 对细胞产量的影响。

[0140]

| | 无酶 | 链霉菌蛋白酶 (2.0%) | Col II (0.0375%) | Col II (0.075%) | Col II (0.150%) |
|--------------------------------|----|---------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 无酶 | 0 | -- | - | + | -- |
| 胰蛋白酶 (0.125%) | X | X | + | + | -- |
| 胰蛋白酶 (0.125%) + EDTA (0.260mM) | X | X | X | ++ | X |
| 透明质酸酶 (0.5%) | X | X | X | + | X |
| 链霉菌蛋白酶 (2.0%) + 透明质酸酶 (0.5%) | X | X | X | + | X |

[0141] 注释 :+++ = 优, ++ = 甚良, + = 良, - = 合理, -- = 差, 0 = 不成功

[0142] 实施例 4 : 酶溶液的化学成分优化[0143] 测试了几种酶消化溶液的成分, 即补充有 20% FBS 和 1% 青霉素 / 链霉素的 α -Mem ; 补充有 EDTA (更具体为 186mg/ml CaCl₂ · 2H₂O、400mg/ml KCl、60mg/ml KH₂PO₄、200mg/ml MgSO₄ · 7H₂O、8000mg/ml NaCl、350mg/ml NaHCO₃、90mg/ml NaH₂PO₄ · 7H₂O、1000mg/ml 葡萄糖和 76mg/ml (0.260mM) EDTA) 的盐缓冲溶液 (如 HBSS) ; 补充有 5mM CaCl₂ 的前述 HBSS 溶液 ; 补充有 5mM CaCl₂ 的 25mMHEPES 缓冲液。

[0144] 为此测试, 保持之前优化的条件, 即由 0.075% (w/v) 胶原酶 II 与 0.125% (w/v) 胰蛋白酶组成的酶组合。

[0145] 补充有 0.260mM EDTA 的盐缓冲溶液 (HBSS) 得到最佳结果。

[0146] 表 4 : 酶溶液的成分 : 对细胞产量的影响。

[0147]

| | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------------|
| | α -Mem+20% FBS+1%青霉素 / 链霉素 | HBSS+0.26mMEDTA | HBSS+5mM CaCl ₂ | 25mM HEPES+5mM CaCl ₂ |
| Co1 II(0.075%)+胰蛋白酶(0.125%) | -- | ++ | - | + |

[0148] 注释 :+++ = 优, ++ = 甚良, + = 良, - = 合理, -- = 差, 0 = 不成功

[0149] 实施例 5:酶消化温育时间和 pH 变化的优化

[0150] 测试了几个温育时间(2 小时、4 小时、6 小时、和 16 小时)。从所得结果来看,最佳温育时间是 4 小时。尽管在 16 小时时观察到更完全的消化,发现更长时间对细胞活力有负面影响,导致培养基显著酸化。表 5 定量总结了所得结果。

[0151] 表 5:温育时间和酶消化溶液的 pH:对细胞产量的影响。

[0152]

| | | | | |
|---|---------------|----------------|---------------|---------------|
| | 2 小时 | 4 小时 | 6 小时 | 16 小时 |
| HBSS 中 Co1 II(0.075%) + 胰蛋白酶(0.125%) +0.26mM EDTA | + (pH 6.9) | ++ (pH 6.4) | - (pH 6.1) | + (pH 5.9) |

[0153] 注释 :+++ = 优, ++ = 甚良, + = 良, - = 合理, -- = 差, 0 = 不成功

[0154] 实施例 6:消化期间振荡模式(温和对剧烈)的优化

[0155] 在定轨振荡水浴中用温和(100opm)或剧烈(140opm)振荡速率进行了酶消化溶液的温育。100opm 的温和振荡得到细胞产量方面最佳的结果。表 6 定量总结了所得结果。

[0156] 表 6:振荡速率:对细胞产量的影响。

[0157]

| | |
|--------|--------|
| 100opm | 140opm |
| ++ | + |

[0158] 注释 :+++ = 优, ++ = 甚良, + = 良, - = 合理, -- = 差, 0 = 不成功

[0159] 实施例 7:酶消化期间温育气氛的优化(干对湿)

[0160] 于 37°C 在两种环境下进行酶消化溶液的温育:干或湿。为此测试,在浸渍的定轨振荡器(其中热交换通过水和饱和空气发生)中或在干室(其中热交换通过干空气发生)中平行处理组织样品。在干室中温育导致更佳的细胞产量。表 7 定量总结了所得结果。

[0161] 表 7:温育环境:对细胞产量的影响。

[0162]

| | |
|----|-----|
| 水浴 | 干室 |
| ++ | +++ |

[0163] 注释 :+++ = 优, ++ = 甚良, + = 良, - = 合理, -- = 差, 0 = 不成功

[0164] 实施例 8:冷冻保存期间的细胞密度的优化

[0165] 为评估细胞密度对冷冻保存后细胞恢复的影响,将细胞于 P1 末,在含 0.5ml 细胞悬液和相同体积的由 FBS(90%)和 DMSO(10%)组成的溶液的 1.5ml 冷冻管中,以跨 1×10^6 细胞/ml 和 10×10^6 细胞/ml 之间的不同密度,在液氮汽相中冷冻。

[0166] 将细胞冷冻保存至少 30 天,然后通过将所述冷冻管置于保持在 37°C 的水浴中来解冻。将解冻的细胞重悬于之前加热至 37°C 的 10ml 培养基中。对总细胞和活细胞进行计数,并随后以 1:10 的稀释倍数接种于组织培养瓶(NUNC)中。

[0167] 24 小时后,将所述培养基更换为新鲜培养基,并如上所述保持细胞。

[0168] 为测定最佳细胞冷冻保存密度,测定了各条件下的解冻后细胞活力(活细胞/总

细胞)和细胞恢复(解冻后计数的活细胞/冷冻保存前计数的活细胞)。所得结果显示, 3×10^6 细胞/ml 的细胞密度最可能保证冷冻保存后所测试条件下活细胞的适当保持和恢复(含 1ml 细胞悬液和 0.5ml 液上空间的 1.5ml 冷冻管)。

[0169] 监控了解冻后细胞的体外扩展能力。细胞一般表现出 1.7 翻倍/天的翻倍因数,类似于冷冻保存前观察到的值(图 4)。

[0170] 实施例 9:使用所建立的方法从人脐带分离前体细胞

[0171] 获得伦理委员会收集脐带的指示的批准及产妇的知情同意后,于生产后收集多个脐带。从胎盘分离脐带,去掉血,并在含无菌盐溶液(补充有营养和抗生素(例如 1g/L 葡萄糖、100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素)的 HBSS)的无菌闭合的瓶中运输至实验室设备。

[0172] 运输至所述设备在室温下进行。所述方法在层流通风橱内的无菌环境中进行。

[0173] 用汉克斯盐缓冲溶液(HBSS)洗涤各脐带 3 次,用无菌镊子除去围绕脐带的羊膜。

[0174] 然后将各脐带在解剖刀的辅助下横向分段为 2.5cm 条段。考虑到人脐带的平均线性密度(1g/cm),各条段对应约 2.5g 组织。这些条段中,在解剖刀的辅助下除去确定的血块。各自处理各组 7 个 2.5g 的无血块的条段。

[0175] 通过解离各组 7 个条段来得到细胞,所述解离在无菌且密封的含缓冲 pH 的消化溶液的瓶中,通过浓度 0.075% (重量/总消化体积)的胶原酶 II 与浓度 0.125% (重量/总消化体积)的胰蛋白酶的组合作用来进行,保持组织质量、瓶底表面积、消化体积、和总瓶体积之间的约 1:2:2:37 的恒定比例。所述瓶在确定的时间、温度、加热环境、环境湿度和搅拌条件下温育;

[0176] 更具体地,

[0177] ●从一组 7 个各约 2.5g 的脐带条段开始,从血块中游离出;

[0178] ●使用 35ml 的消化溶液体积;

[0179] ●在不通气且闭合的培养瓶中,所述不通气且闭合的培养瓶如总体积 650ml 的 T₁₇₅,且消化期间 615ml 的液上空间减去消化物下 7 个条段的浸没体积;

[0180] ●其中所述消化溶液除酶外,由下列成分组成:186mg/ml CaCl₂ · 2H₂O、400mg/ml KCl、60mg/ml KH₂PO₄、200mg/ml MgSO₄ · 7H₂O、8000mg/ml NaCl、350mg/ml NaHCO₃、90mg/ml NaH₂PO₄ · 7H₂O、1000mg/ml 葡萄糖、和 76mg/ml (0.260mM) EDTA;

[0181] ●保持 pH 为 6.4 或更高。

[0182] 其中所述酶反应于 37°C 恒定温度下在闭合干燥的温育箱中在 100 振荡/分钟(opm)的恒定速率搅拌下温育 4 小时。

[0183] 以三个阶段进行从组织解离得到的细胞的回收。

[0184] 在第一阶段,从解离组织回收细胞,更具体通过于室温下在发生消化的瓶中静置水平温育 5 ~ 300 分钟(优选 30 分钟)的时间来回收细胞。将消化上清通过用移液器移溶液来转移到 50ml 离心管中,避免吸出任何未消化组织。除去全部未消化组织。这里,向所述消化瓶中加入 35ml 体积的补充有脱氧核糖核苷、核糖核苷、谷氨酰胺、抗生素和 10% 胎牛血清(FBS)的基础培养基。所述不通气的瓶盖替换为含通气盖的滤膜,并于 37°C 下在含 7% CO₂ 的湿润气氛中温育。应每 72 小时更换总培养基 7 天,以促进水平温育期间粘附的细胞生长,至达到最大表面汇合率。

[0185] 在第二回收阶段,通过于室温下对所述 50ml 离心管以 350g 离心 10 分钟来回收细

胞,并在离心后,将 35ml 上清体积转移到具有含通气盖的滤膜的静置培养瓶(如 T₁₇₅);向所述培养瓶中加入 35ml 补充有脱氧核糖核苷、核糖核苷、谷氨酰胺、抗生素和 10%胎牛血清(FBS)的基础培养基;于 37℃下在含 7% CO₂的湿润气氛中温育所述培养瓶,每 72 小时更换总培养基,以促进粘附和扩展/增殖,至达到最大表面汇合率。

[0186] 从第一和第二阶段回收的细胞群在第一轮扩展循环末(P0 末)冷冻保存。这在于直接在 0.5ml 含期望总细胞数的细胞悬液与相同体积的含 10%二甲基亚砜(DMSO)的胎牛血清(FBS)溶液的混合物的液氮汽相中冷冻,以在 1.5ml 无菌冷冻管(含 1.0ml 细胞悬液和 0.5ml 液上空间)中得到约 3×10^6 细胞/ml 的终浓度。

[0187] 第三且最后阶段的从解离组织的细胞回收在于直接冷冻保存通过消化上清离心得到的细胞沉淀,将所述细胞沉淀重悬于 2ml 由含 10%二甲基亚砜(DMSO)的胎牛血清(FBS)组成的溶液中,用控速冷冻器以 1℃/分钟的温度下降速度在 2.5ml 含 2ml 细胞悬液和 0.5ml 液上空间的无菌冷冻管中冷冻至 -80℃。

[0188] 31 天后,通过在 37℃水浴中快速解冻来恢复冷冻保存的细胞。然后于相同温度,以 1:10 的稀释倍数将细胞重悬于培养基中。可用 5.0×10^3 细胞/cm² ~ 2.0×10^4 细胞/cm² 之间的免疫接种密度进行随后的扩展步骤,每 72 小时更换总培养基。细胞一般表现出 1.7 翻倍/天的生长速率 18 次传代。

[0189] 实施例 10:分离的前体细胞的间质表型的确定

[0190] 除在前体间质细胞用选择培养基中粘附和增殖的能力外,还通过流式细胞术表征了分离的细胞的 P1 末。

[0191] 当细胞在 P1 末达到 80%~90%的汇合率,移除培养基,并用磷酸盐缓冲液(无 Ca²⁺ 和 Mg²⁺)的洗涤细胞表面。加入 0.25%的胰蛋白酶,且细胞一离开瓶表面就加入 2 体积的培养基。然后将细胞悬液以 350g 离心 10 分钟,除去上清。将含细胞的沉淀重悬于阻断溶液(含 0.2% BSA 的 dPBS)中,至达到 2×10^6 细胞/ml ~ 10×10^6 细胞/ml 之间的终细胞浓度。于室温下温育 10 分钟后,将 100 μl 细胞悬液加入各含缀合荧光标记物(藻红蛋白(PE)或异硫氰酸荧光素(FITC))的第一抗体的管中。振荡细胞悬液,并在冰中避光温育 20~40 分钟。此过程后,将 1.5ml dPBS 加入各管中,重悬细胞,并以 350g 离心 5 分钟。除去上清,将含细胞的沉淀重悬于 500 μl 1%的多聚甲醛中。

[0192] 将细胞悬液储存于 4℃待用。在 BD Biosciences 公司的 FACScalibur 中进行流式细胞术,检测 CD44、CD73、CD90 和 CD105 表面抗原作为间质细胞的阳性标记物。为此,使用了缀合 FITC 或 PE 的第一抗体(图 1)。研究了阴性标记物 CD14、CD31、CD34 和 CD45 表面抗原的存在情况。这些特异于造血细胞(CD34)、单核细胞(CD14)、内皮细胞(CD31)和全白细胞(CD45)系,且所有这些抗体均缀合 FITC(图 2)。如预期,绝大部分分离的间质细胞呈 CD44、CD73、CD90 和 CD105 阳性,及呈对所述阴性标记物阴性或残量阳性。

[0193] 实施例 11:分离的细胞的前体表型的证实:骨形成分化

[0194] 根据本发明详述,从人脐带条段中分离的前体细胞表现出分化为不同特化的细胞类型的能力。在此实施例中,证实了这些细胞分化为成骨细胞的能力。

[0195] 将细胞于 P3 以 2.0×10^4 细胞/cm² 的密度接种于含补充有 10%胎牛血清(FBS)、10mM β-甘油磷酸、100U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、50 μg/ml 抗坏血酸-2-磷酸酯、100nM 地塞米松的 α-Mem 基础培养基(含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和超谷氨酰胺)的

骨形成分化培养基中 (Hung et al., 2002)。

[0196] 每周更换整个培养基 3 周, 此后进行使用茜素红和碱性磷酸酶的特异性染色步骤, 两种染色均呈阳性。对于茜素红染色, 从组织培养瓶中小心吸出培养基, 并于室温下用 4% 的多聚甲醛固定细胞 10 分钟。

[0197] 用 PBS 洗涤细胞, 并用特异性染色溶液 (茜素红 S, 40mM, pH4. 2) 于室温下温育 15 分钟。除去茜素红 S 溶液, 并用水小心洗涤细胞 (Kotobuki et al., 2006)。

[0198] 在碱性磷酸酶 (Sigma-Aldrich) 测试中, 也于室温下用 4% 的多聚甲醛固定细胞 10 分钟。然后用 PBS 洗涤细胞, 并浸于 2.5ml 柠檬酸溶液中温育 30 秒钟。

[0199] 然后除去柠檬酸溶液, 并用去离子水 (milliQ) 洗涤细胞, 并用染色溶液 (中性红) 温育 2 分钟。然后除去所述溶液, 用水小心洗涤细胞 (Shim, et al., 2004)。测试对于骨形成分化为阳性 (图 5)。

[0200] 实施例 12 : 分离的细胞的前体表型的证实 : 脂肪形成分化

[0201] 为将细胞分化为脂肪细胞, 将细胞于 P3 以 2.0×10^4 细胞 / cm^2 的密度铺种于含补充有 10% FBS、100U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 α -Mem 基础培养基 (含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和超谷氨酰胺) 中, 并在此培养基中保持。当汇合时, 将所述培养基更换为由含 10% FBS、100U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素、10 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素、200 μM 吲哚美辛、0.5mM 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤和 1 μM 地塞米松的 DMEM-LG 组成的脂肪形成分化培养基 (Shih et al., 2005)。

[0202] 3 周间每周更换 2 次整个培养基, 此后进行使用油红 O 的特异性染色测定, 并证实了脂肪形成分化。为此, 从组织培养瓶 (NUNC) 中通过吸液小心移除培养基, 并于室温下用 4% 的多聚甲醛固定细胞 10 分钟。用 PBS 洗涤细胞, 并于室温下与经过滤的油红 O 溶液 (2 : 3) 温育至少 10 分钟。然后除去油红 O 溶液, 并用水小心洗涤细胞 (Do, et al., 2006)。测试对于脂肪形成分化为阳性 (图 5)。

[0203] 实施例 13 : 分离的细胞的前体表型的证实 : 软骨形成分化

[0204] 对于软骨形成分化, 重悬细胞至 1.1×10^6 细胞 / ml 的终密度, 并置于 15ml 的圆锥形管中, 以形成软骨球。所用培养基是由含 1% FBS、6.25 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素、10ng/ml TGF β 1 和 50 μM 抗坏血酸 -2- 磷酸酯的 DMEM-LG 组成的软骨形成分化培养基 (Shih et al., 2005)。

[0205] 每周特别小心更换 (以不干扰软骨球) 整个培养基 2 次 4 周, 此后, 用阿辛蓝和苏木精进行特异性染色测定, 并证实了软骨形成分化。为此, 通过吸液从管中移除整个培养基, 并用 PBS 洗涤软骨球。然后将软骨球浸于琼脂中, 并在液氮汽相中冷冻。

[0206] 在切片机的辅助下, 将琼脂切成 5 μm 厚的组织切片。将这些切片于室温下用 1% 阿辛蓝温育 5 分钟, 并用 PBS 洗涤。将固定于显微镜载玻片上的制剂转移到苏木精溶液, 并于室温下温育 5 分钟。通过最后一步洗涤步骤用 PBS 除去苏木精 (Okada, et al., 2005)。测试结果对软骨形成分化呈阳性 (图 5)。

[0207] 实施例 14 : 分离的细胞的前体表型的证实 : 心肌形成分化

[0208] 发生心肌形成分化 18 天, 期间使用不同的培养基 (Lee et al., 2004)。将细胞以 3000 细胞 / cm^2 的密度铺种于包被鸟氨酸的 16 孔室玻片上。将细胞铺种于由补充有 10% FBS、100U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 α -Mem 基础培养基 (含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸和超谷氨酰胺) 组成的培养基 C0 中。铺种后 24 小时, 将培养基替换为由补充有

10% FBS、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、2mM L-谷氨酰胺、10ng/ml β -FGF 和 10 μ M 5-氮胞苷的 DMEM-LG 组成的另一培养基（培养基 C1）。将细胞铺种于培养基 C1 中后 24 小时，进行第二次培养基替换至培养基 C2。培养基 C2 由补充有 10% FBS、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、2mM L-谷氨酰胺和 10ng/ml β -FGF 的 DMEM-LG 基础培养基组成。将细胞保持于培养基 C2 中 2 周，每 72 小时更换培养基。

[0209] 平行地，将对照（非分化）细胞以 5000 细胞/cm² 的密度铺种和保持于培养基 0 中。分化阶段后，用抗典型肌肉蛋白（心脏肌钙蛋白 T，特异于心肌细胞）的第一抗体进行免疫荧光测定。为定位测定用细胞，用特异于核酸的荧光染料（DAPI）染色细胞核。如预期，仅经心肌形成分化步骤的细胞（已显示典型的心肌细胞形态）产生荧光信号（图 6D）。

[0210] 实施例 15：分离的细胞的前体表型的证实：神经形成 / 神经胶质分化

[0211] 发生神经形成分化 12 天，期间使用不同的培养基 (Lee et al., 2004)。将细胞以 3000 细胞/cm² 的密度铺种于包被鸟氨酸的 16 孔室玻片上。将细胞铺种于由补充有 10% FBS、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、2mM L-谷氨酰胺 (Sigma)、5ng/ml β -FGF、0.5 μ M 视黄酸和 1mM 2-巯基乙醇的 IMDM 基础培养基组成的培养基（培养基 N1）中。

[0212] 铺种 3 天后，将培养基 N1 替换为含补充有 10% FBS、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、2mM L-谷氨酰胺、1mM 环腺苷酸 (cAMP) 和 100 μ M 抗坏血酸-2-磷酸酯的 IMDM 基础培养基的培养基 N2。

[0213] 铺种 3 天后，将培养基 N2 替换为含补充有 10% FBS、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、2mM L-谷氨酰胺、1mM 环腺苷酸 (cAMP) 和 10 μ M 氢化可的松的 IMDM 基础培养基的培养基 N3。

[0214] 最后，铺种 3 天后，将培养基 N3 替换为含补充有 10% FBS、100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、2mM L-谷氨酰胺、20ng/ml FGF-1、10ng/ml SHH、10ng/ml NGF、25ng/ml 玻连蛋白、100 μ M 抗坏血酸-2-磷酸酯、100 μ M 异丁基甲基黄嘌呤、10 μ M 福司柯林和 20nM PMA 的 IMDM 基础培养基的培养基 N4。

[0215] 平行地，将对照（非分化）细胞以 5000 细胞/cm² 的密度铺种和保持于培养基 N0 中（见心肌形成分化步骤）。

[0216] 分化阶段后，用抗 β -微管蛋白 (III 型，特异于神经细胞) 的第一抗体免疫荧光测定。为定位测定用细胞，将细胞核用特异于核酸的荧光染料 (DAPI) 染色细胞核。如预期，仅经神经形成 / 神经胶质分化步骤的细胞（已显示出典型的神经胶质形态（图 7B））产生荧光信号（图 7D）。

[0217] 参考文献

[0218] Auger F. A., Germain L., Remy-Zolghadri M. and C. J. Hayward (2005). Method of isolating cells from umbilical cord. WO2005001081.

[0219] Barry F. P. and J. M. Murphy (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int. J. Biochem. & Cell Biol. 36: 568-584.

[0220] Can A. and S. Karahuseyinoglu (2007). Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. Stem Cells (on line - www.StemCells.com); DOI:10.1634/stemcells.2007-0417.

- [0221] Carvalhal A.V., Lima, C., Basto V., Cunha C., Escada P., Cruz P. and H. Cruz(2007).Adult human neuronal stem/progenitor cells fromthe olfactory epithelium and olfactory lamina propria, isolationmethod, proliferation and differentiation in serum free culturemedium and utilization for transplantation. WO2007020611.
- [0222] Claes L., Eckert-Hubner K. and P. Augat(2002).The effect ofmechanical stability on local vascularization and tissue differentiationin callus healing. J. Orthop. Res. 20 :255-266.
- [0223] Cullinane D.M., Salisbury K.T., Alkhiary Y., Eisenberg S., Gerstenfield L. and T.A. Einhorn(2003).Effects of local mechanicalenvironment on vertebrate tissue differentiation during repair :doesrepair recapitulate development ? J. Exp. Biol. 206 :2459-2471.
- [0224] Chul-Won H. A., Yoon-Sun Y. and Y. Sung-Eun(2003) Isolationand culture-expansion methods of mesenchymal stem/progenitor cellsfrom umbilical cord blood, and differentiation method of umbilicalcord blood-derived mesenchymal stem/progenitor into variousmesenchymal tissues. WO 03070922.
- [0225] Davies J.E., Dolores B., Raúl S., Morris H. and A. D. S. Lickorish(2004). Progenitor cells from Wharton's jelly of humanumbilical cord. WO2004072273.
- [0226] Deryl L. T. and M. L. Weiss(2008).Concise review :Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. Stem Cells, 26 :591-599.
- [0227] Do M., Jeong H., Choi B., Hunter L., Langley S., Pazmany L. andP. Trayhurn(2006). Inflammatory gene expression patterns revealedby DNA microarray ahalysis in TNF-treated SGBS humanadipocytes. Yonsei Medical Journal, Vol. 47, N°5, 729-736.
- [0228] Gardner T. N., Stoll T., Marks L., Mishra S. and M. K. Tate(2000). The influence of mechanical stimulus on the pattern of tissuedifferentiation in a long bone fracture -a FEM study. J. Biomech. 33 :415-425.
- [0229] Harris I. R., Messina D. J., Kihm A. and A. Seyda(2006).
- [0230] Postpartum cells derived from umbilical cord tissue, and methods ofmaking and using the same. WO2006/071794.
- [0231] Hung S.-C., Chen N.-J., Hsieh S.-L., Li H., Ma H.-L. and W.-H. Lo(2002). Isolation and Characterization of Size-Sieved Stem Cellsfrom Human Bone Marrow. Stem Cells 20 :249-258
- [0232] Kadner A., Zund G., Maurus C., Breymann C., Yakarisik S., Kadner G., Turina M. and S. P. Hoerstrup(2004).Human umbilicalcord cells for cardiovascular tissue engineering :a comparative study. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery 25 :635-641.
- [0233] Kotobuki N., Kawagoe D., Nomura D., Katou Y., Muraki K., Fujimori H., Goto S., Ioku K. and H. Ohgushi(2006). Observationand quantitative analysis of rat bone marrow stromal cells cultured invitro on newly formed transparent β -tricalcium

phosphate. *J. Mat. Sci. :Mat. Med.* 17 :33-41.

[0234] Lee O. K. , Kuo T. K. , Chen W. M. , Lee K. D. , Hsieh S. L. and T. H. Chen (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103 :1669-1675.

[0235] Majumdar M. K. , Thiede M. A. and J. D. Mosca (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell Physiol* 176 :57-66.

[0236] Mitchell K. E. , Weiss M. L. , Mitchell B. M. , Martin P. , Davis D. , Morales L. , Helwig B. , Beerenstrauch M. , Abou-Easa K. , Hildreth T. and D. Troyer (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 21 :50-60, 2003.

[0237] Nanaev A. K. , Kohnen G. , Milovanov A. P. , Domogatsky S. P. and P. Kaufmann (1997). Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta* 18 :53-64.

[0238] Okada A. , Shiomi T. , Aoki Y. and M. Fujiwara (2005). Phenytoin stimulates chondrogenic differentiation in mouse clonal chondrogenic EC cells, ATDC5. *J. Toxicol. Sci.* , Vol. 30, N°3, 145-156.

[0239] Phan T. T. and I. J. Lim (2006). Isolation of stem/progenitor cells from amniotic membrane of umbilical cord. WO2004019357.

[0240] Pittenger M. F. , Mackay A. M. and C. B. Beck (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284 :143-147.

[0241] Purchio A. F. , Naughton B. A. and J. San Roman (1998). Production of cartilage tissue using cells isolated from Wharton's jelly. WO199801779.

[0242] Roisen F. J. , Klueber K. M. , Lu C. L. , Hatcher L. M. , Dozier A. , Shields C. B. and S. Maguire (2001) Adult human olfactory stem cells. *Brain Res.* 890 :11-22.

[0243] Romanov Y. A. , Svintsitskaya V. A. and V. N. Smirnov (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells : candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 21 :105-110.

[0244] Seyda A. and A. Gosiewska (2006). Postpartum cells derived from umbilical cord tissue, and methods of making, culturing, and using the same. WO2006101548.

[0245] Shih D. T. -B. , Lee D. -C. , Chen S. -C. , Tsai R. -Y. , Huang C. -T. , Tsai C. -C. , Shen E. -Y. and W. -T. Chiu (2005). Isolation and Characterization of Neurogenic Mesenchymal Stem Cells in Human Scalp Tissue. *Stem Cells* 23 :1012-1020.

[0246] Shim W. S. N. , Jiang S. , Wong P. , Tan J. , Chua Y. L. , Tan Y. S. , Sin Y. K. , Lim C. H. , Chua T. , Teh M. , Liu T. C. and E. Sim (2004). Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 324 :481-488.

[0247] Wang H. S. , Hung S. C. , Peng S. T. , Huang C. C. , Wei H. M. , Guo Y. J. , Fu Y. S. , Lai M. C. and C. C. Chen (2006). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the umbilical cord, *Stem Cells* 22 :1330-1337.

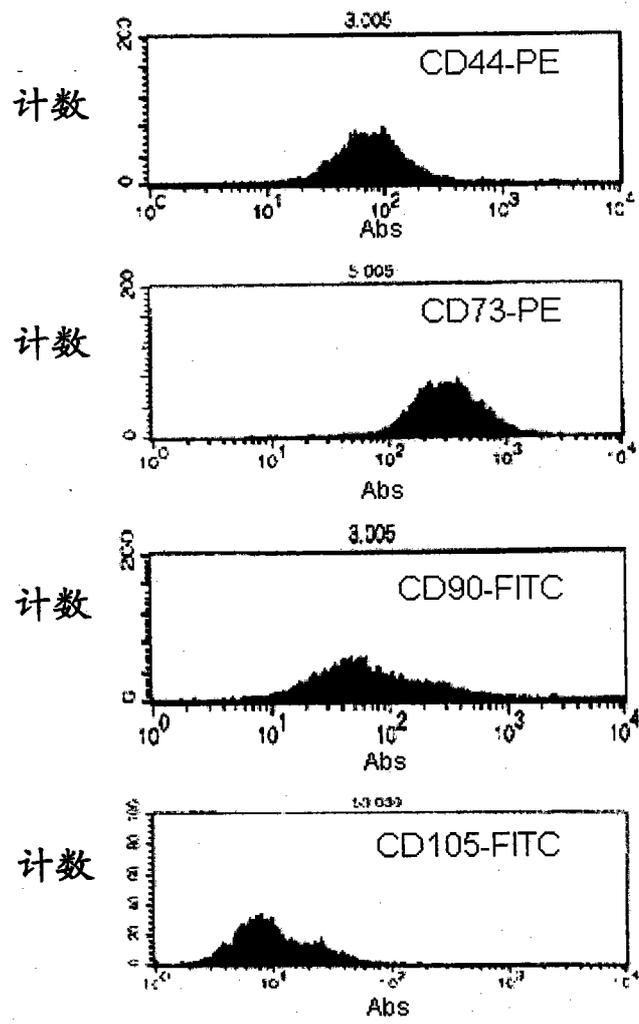


图 1

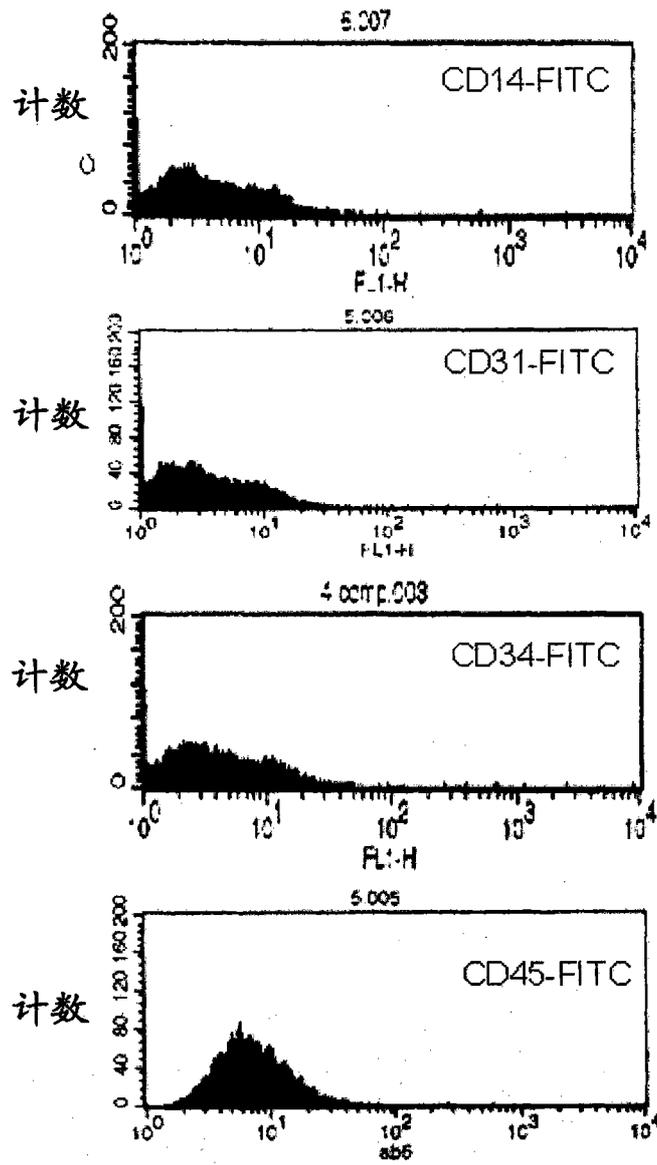


图 2

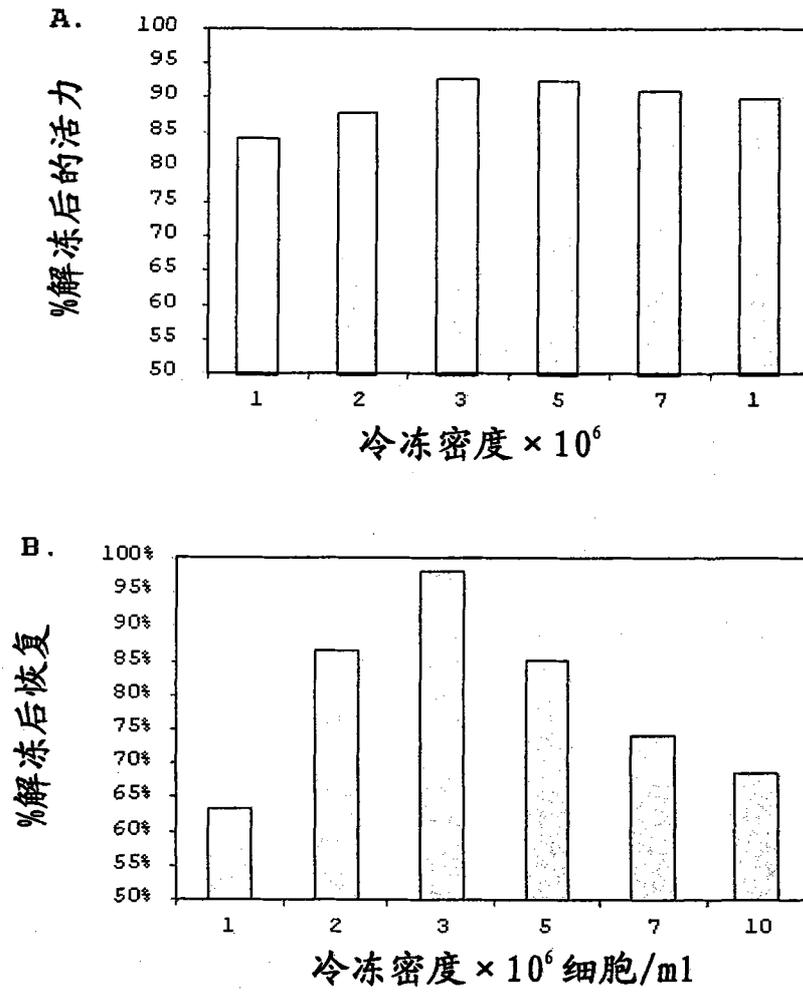


图 3

A.



B.

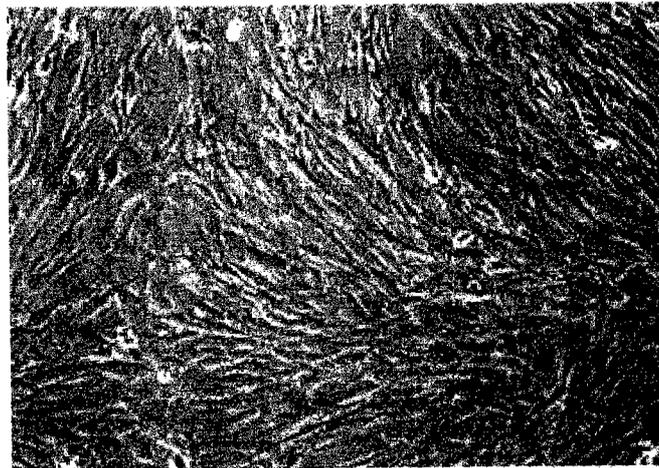


图 4

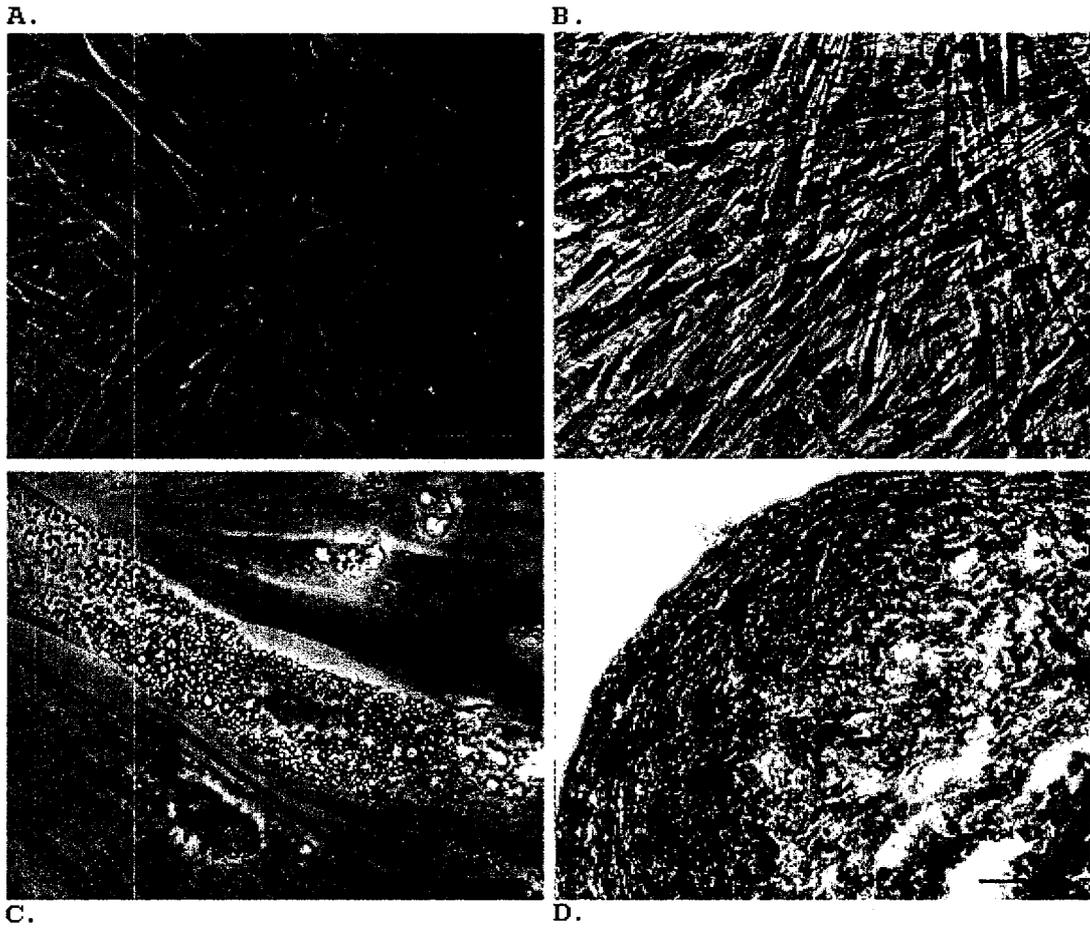


图 5

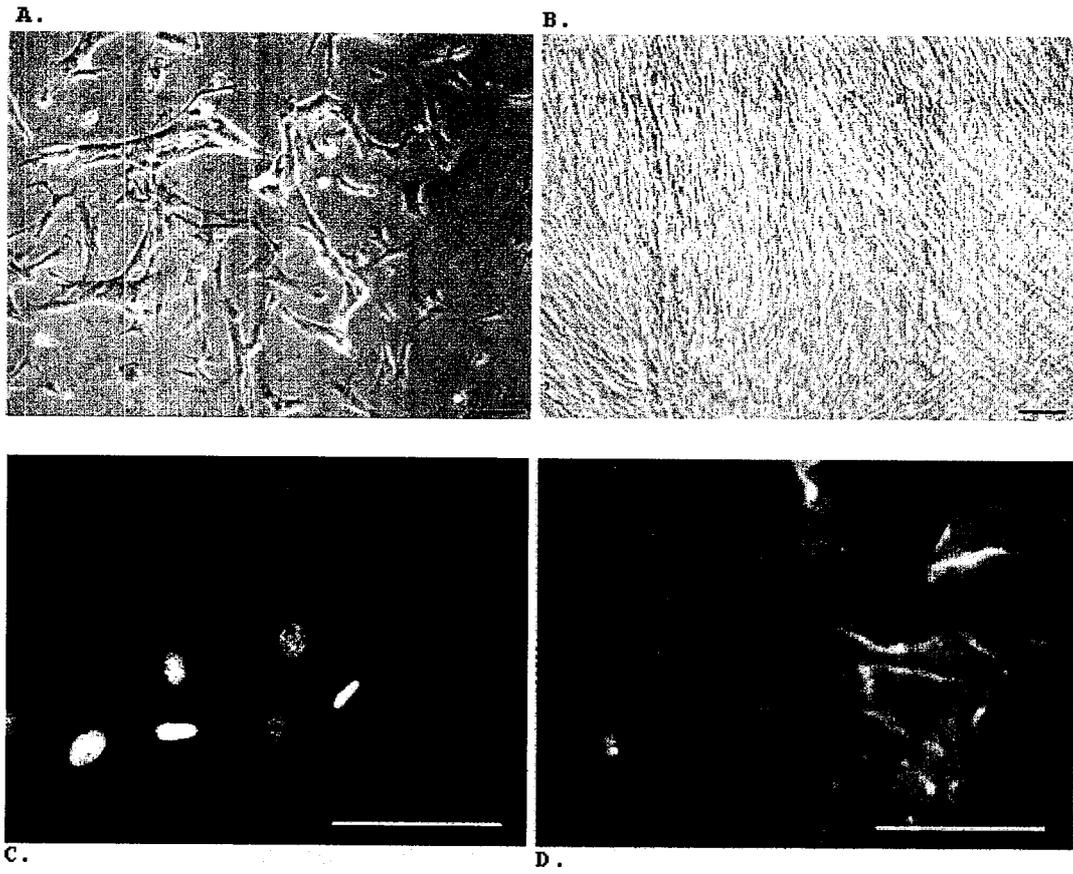


图 6

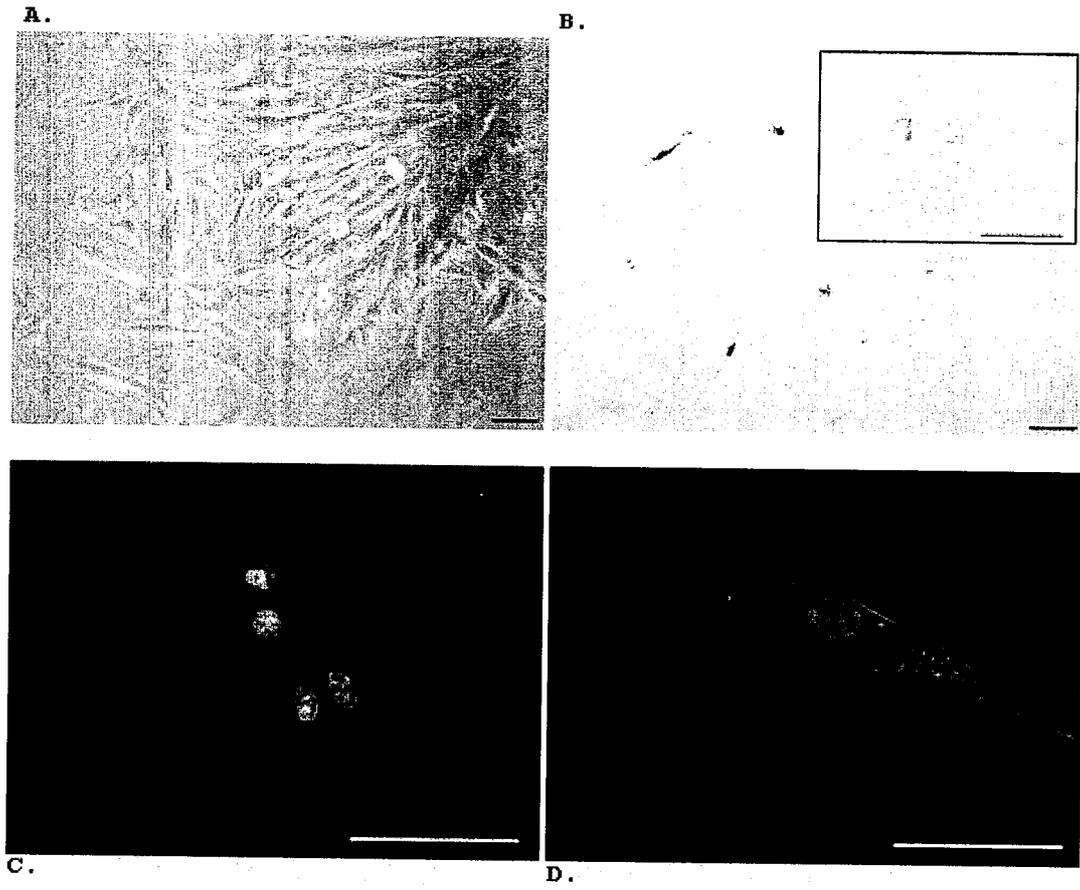


图 7