



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101735980 B

(45) 授权公告日 2011. 07. 27

(21) 申请号 201010111797. 4

崔红强. 骨髓间充质干细胞研究进展. 《西南军医》. 2009, 第 11 卷 (第 4 期), 715-717.

(22) 申请日 2010. 02. 11

审查员 刘苗

(73) 专利权人 中国人民解放军总医院  
地址 100853 北京市复兴路 28 号

(72) 发明人 赵亚力 郝好杰 韩为东 司艺玲  
伍志强

(74) 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理  
有限公司 11100

代理人 程凤儒

(51) Int. Cl.

C12N 5/0775 (2010. 01)

(56) 对比文件

CN 101525594 A, 2009. 09. 09, 全文.

WO 2005/076845 A2, 2005. 08. 25, 全文.

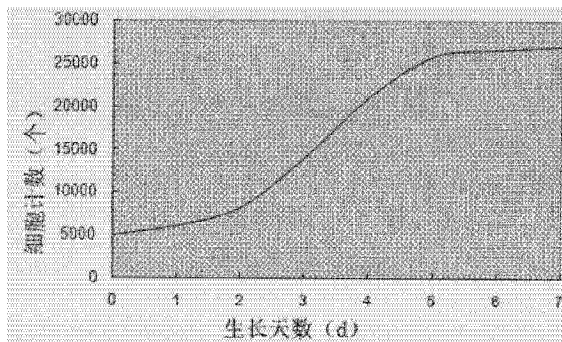
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 4 页

(54) 发明名称

体外培养骨髓间充质干细胞的完全培养基

(57) 摘要

本发明公开了一种体外培养骨髓间充质干细胞的完全培养基,其基础培养基为 DMEM-L 或 DMEM/F12 ;所述培养基中还添加有胰岛素、白蛋白、转铁蛋白、业硒酸钠、氢化可的松、碱性成纤维细胞生长因子、孕酮、还原型谷胱甘肽以及胎牛血清。本发明培养基采用低浓度的胎牛血清及其他添加成分进行复配,各成分起到协同作用,成功培养了骨髓间充质干细胞,从促进细胞增殖方面达到了与高浓度血清相同效果,在维持间充质干细胞干性方面优于胎牛血清。由于采用了低血清的浓度,大大避免了高浓度血清存在的批次间不稳定、细胞毒性、大量异源蛋白等缺陷,为骨髓间充质干细胞的基础研究和临床治疗提供了很好的工具。



1. 一种体外培养骨髓间充质干细胞的完全培养基,其是在基础培养基中还添加有胰岛素、白蛋白、转铁蛋白、亚硒酸钠、氢化可的松、碱性成纤维细胞生长因子、孕酮、还原型谷胱甘肽以及胎牛血清;

所述基础培养基为 DMEM-L 培养基或 DMEM/F12 培养基;

所述各添加成分的用量如下:

胰岛素 1 ~ 100  $\mu$ g/ml

白蛋白 1 ~ 50mg/ml

转铁蛋白 1 ~ 50ng/ml

亚硒酸钠 1 ~ 100ng/ml

氢化可的松 1 ~ 100  $\mu$ g/ml

孕酮 1 ~ 100nmol/L

还原型谷胱甘肽 1 ~ 10  $\mu$ g/ml

碱性成纤维细胞生长因子 1 ~ 100ng/ml

胎牛血清 1 ~ 50ul/ml。

2. 根据权利要求 1 所述的体外培养骨髓间充质干细胞的完全培养基,其特征在于,所述各添加成分的用量如下:

胰岛素 1 ~ 10  $\mu$ g/ml

白蛋白 1 ~ 10mg/ml

转铁蛋白 1 ~ 10ng/ml

亚硒酸钠 1 ~ 30ng/ml

氢化可的松 1 ~ 40  $\mu$ g/ml

孕酮 1 ~ 50nmol/L

还原型谷胱甘肽 1 ~ 5  $\mu$ g/ml

碱性成纤维细胞生长因子 1 ~ 50ng/ml

胎牛血清 5 ~ 20ul/ml。

3. 根据权利要求 2 所述的体外培养骨髓间充质干细胞的完全培养基,其特征在于,所述各添加成分的用量如下:

胰岛素 5  $\mu$ g/ml

白蛋白 5mg/ml

转铁蛋白 5ng/ml

亚硒酸钠 10ng/ml

氢化可的松 10  $\mu$ g/ml

孕酮 20nmol/L

还原型谷胱甘肽 1.5  $\mu$ g/ml

碱性成纤维细胞生长因子 5ng/ml

胎牛血清 10ul/ml。

4. 权利要求 1 至 3 中任意一项所述的完全培养基在体外培养骨髓间充质干细胞中的用途。

## 体外培养骨髓间充质干细胞的完全培养基

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种培养基,具体地说是一种用于高效培养体外骨髓间充质干细胞的完全培养基。

### 背景技术

[0002] 间充质干细胞是来源于中胚层的一类成体干细胞,可从骨髓、骨膜、滑膜、肌肉、脂肪等多种组织中分离出来,并且实验证实不同的诱导条件下,其具有向中胚层和神经外胚层组织细胞分化的能力,如向成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、内皮细胞等分化的能力。骨髓被认为是 MSCs 的主要居住场所。在整个生命过程中,组织器官无论在稳定状态还是环境改变而受到刺激都需要这些骨髓来源的 MSCs 不断补充、更新。由于骨髓具有:①取材方便且对机体无害;②在体外可大量培养扩增;③由它诱导而来的组织在进行移植时不存在组织配型及免疫排斥的问题;④转入外源性基因后不影响 MSCs 的特性,因此,骨髓 MSC 成为细胞治疗和组织工程理想的种子细胞。然而,骨髓中间充质干细胞数量较少,难以满足临床治疗和研究方面的需求,因此需要在体外对间充质干细胞进行大量扩增。

[0003] 目前,在 MSCs 的常规培养体系中均加入了一定比例动物血清,比较常用是胎牛血清。血清是由很多大小不同生物分子组成的极为复杂的混物,它对细胞在体外培养时的主要作用是提供生长因子、激素、结合蛋白,并提供保护作用。但它也含有一些不利于细胞生长的抑制因子或毒性物质,具有潜在的细胞毒性作用。动物血清可能存在动物携带的已知未知病原体,对以后可能的临床应用构成威胁,对用于规模化培养细胞增加了难度。且每个批次的血清之间存在批间差异,使得到的培养结果出现差异。尽管研究人员尝试了很多的无血清培养基的方案,但无血清培养基普遍存在生长缓慢、甚至负增值的问题,致使处于 RS 的细胞进展到 SR 状态而丢失分化的能力。因此,无血清培养基用于间充质干细胞培养的研究至今也未取得重大突破。随着骨髓干细胞研究进一步深入,干细胞的应用研究也有了逐步发展,进而如何安全、稳定、快速、高质量扩增间充质干细胞的问题也越来越突出,亟需开发一种骨髓间充质干细胞合适的培养基。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于,提供一种避免了高浓度胎牛血清带来的问题,并具有很好的促进细胞增殖功效的体外骨髓间充质干细胞的完全培养基。

[0005] 本发明人经过长期的实验及研究最终确定了本发明完全培养基成分,本发明是在现有无血清培养基的基础上添加低浓度的胎牛血清及碱性成纤维细胞生长因子,弥补了无血清对间充质干细胞扩增效率不高,而高浓度胎牛血清存在使用上的缺陷。具体的讲是在基础培养基中添加了胰岛素、转铁蛋白、白蛋白、丙酮酸钠、氢化可的松、孕酮、还原型谷胱甘肽等细胞生长因子成分,再补加低浓度的胎牛血清。

[0006] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 一种体外培养骨髓间充质干细胞的完全培养基,其基础培养基为 DMEM-L 或 DMEM/

F12 ;所述培养基中还添加有胰岛素、白蛋白、转铁蛋白、亚硒酸钠、氢化可的松、碱性成纤维细胞生长因子、孕酮、还原型谷胱甘肽以及胎牛血清。

[0008] 所述各添加成分的用量推荐如下：

[0009] 胰岛素 1 ~ 100  $\mu$ g/ml

[0010] 白蛋白 1 ~ 50mg/ml

[0011] 转铁蛋白 1 ~ 50ng/ml

[0012] 亚硒酸钠 1 ~ 100ng/ml

[0013] 氢化可的松 1 ~ 100  $\mu$ g/ml

[0014] 孕酮 1 ~ 100nmol/L

[0015] 还原型谷胱甘肽 1 ~ 10  $\mu$ g/ml

[0016] 碱性成纤维细胞生长因子 1 ~ 100ng/ml

[0017] 胎牛血清 1 ~ 50ul/ml。

[0018] 所述各添加成分的用量优选如下：

[0019] 胰岛素 1 ~ 10  $\mu$ g/ml

[0020] 白蛋白 1 ~ 10mg/ml

[0021] 转铁蛋白 1 ~ 10ng/ml

[0022] 亚硒酸钠 1 ~ 30ng/ml

[0023] 氢化可的松 1 ~ 40  $\mu$ g/ml

[0024] 孕酮 1 ~ 50nmol/L

[0025] 还原型谷胱甘肽 1 ~ 5  $\mu$ g/ml

[0026] 碱性成纤维细胞生长因子 1 ~ 50ng/ml

[0027] 胎牛血清 5 ~ 20ul/ml。

[0028] 所述各添加成分的最优用量如下：

[0029] 胰岛素 5  $\mu$ g/ml

[0030] 白蛋白 5mg/ml

[0031] 转铁蛋白 5ng/ml

[0032] 亚硒酸钠 10ng/ml

[0033] 氢化可的松 10  $\mu$ g/ml

[0034] 孕酮 20nmol/L

[0035] 还原型谷胱甘肽 1.5  $\mu$ g/ml

[0036] 碱性成纤维细胞生长因子 5ng/ml

[0037] 胎牛血清 10ul/ml。

[0038] 本发明所述的培养基在体外培养骨髓间充质干细胞中的用途。

[0039] 本发明主要发明点在于培养基配方,本发明培养基配制可按现有常规方法进行,推荐如下:按配方所示,在所述用量范围内选择所需用量,称取 DMEM(L) 干粉、胰岛素、白蛋白、转铁蛋白、亚硒酸钠、氢化可的松、胎牛血清、碱性成纤维细胞生长因子、孕酮、还原型谷胱甘肽,超纯水加至 1000ml,搅拌溶解,0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌,4℃ 保存备用。

[0040] 本发明所用原料均可通过市售够买得到。

[0041] 本发明的优点及有益效果：

[0042] 本发明培养基采用低浓度的胎牛血清及其他添加成分进行复配,各成分起到协同作用,成功培养了骨髓间充质干细胞,从促进细胞增殖方面达到了与高浓度血清相同效果,在维持间充质干细胞干性方面优于高浓度胎牛血清。培养速度快,由于采用了低血清的浓度,大大避免了高浓度血清存在的批次间不稳定、细胞毒性、大量异源蛋白等缺陷,为骨髓间充质干细胞的基础研究和临床治疗提供了很好的工具。

[0043] 下面结合附图及最佳实施方式对本发明做进一步说明,以使公众对发明内容有整体和充分的了解,而并非对本发明保护范围的限定。前述部分已经充分公开了本发明可以实施的保护范围,因此凡依照本发明公开内容进行的任何本领域公知的等同替换,均属于对本发明的侵犯。

#### 附图说明

- [0044] 图 1 为人骨髓间充质干细胞的形态特征  
[0045] (a :培养 2d、b :培养 7d、c :培养 12d) ;  
[0046] 图 2 人骨髓间充质干细胞生长曲线 ;  
[0047] 图 3 人骨髓间充质干细胞细胞生长周期 ;  
[0048] 图 4 人骨髓间充质干细胞向脂肪细胞诱导分化  
[0049] (a :诱导 10d、b :诱导 20d、c :诱导 20d 经油红 O 染色) ;  
[0050] 图 5 大鼠骨髓间充质干细胞的形态特征 (a :培养 3d、b :培养 8d) ;  
[0051] 图 6 大鼠骨髓间充质干细胞生长曲线 ;  
[0052] 图 7 大鼠骨髓间充质干细胞细胞生长周期 ;  
[0053] 图 8 大鼠骨髓间充质干细胞向脂肪细胞诱导分化  
[0054] (a :诱导 10d、b :诱导 20d、c :诱导 20d 经油红 O 染色)。

#### 具体实施方式

- [0055] 原料来源 :  
[0056] DMEM(L) 干粉 :美国 Hyclone 公司  
[0057] DMEM/F12 干粉 :Hyclone 公司  
[0058] 胰岛素 :Sigma 公司  
[0059] 白蛋白 :Sigma 公司  
[0060] 转铁蛋白 :Sigma 公司  
[0061] 亚硒酸钠 :Amresco 公司  
[0062] 氢化可的松 :Sigma 公司  
[0063] 孕酮 :Sigma 公司  
[0064] 还原型谷胱甘肽 :Sigma 公司  
[0065] 碱性成纤维细胞生长因子 :PeproTech 公司  
[0066] 胎牛血清 :Gibco 公司  
[0067] 实施例 1 本发明培养基制备  
[0068] 下述骨髓间充质干细胞培养液配制所用到的基础培养基可以是 DMEM(L)、也可以是 DMEM/F12。

[0069] 1000ml 骨髓间充质干细胞培养液的配制：

[0070] (1) 称取 10g DMEM(L) 干粉、1mg 胰岛素、10g 白蛋白、25ug 转铁蛋白、30ug 亚硒酸钠、20mg 氢化可的松、1ml 胎牛血清、30ug 碱性成纤维细胞生长因子、10mg 还原型谷胱甘肽、20nmol/L 孕酮，超纯水加至 1000ml，搅拌溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌，4℃ 存放。

[0071] (2) 称取 10g DMEM(L) 干粉、5mg 胰岛素、5g 白蛋白、5ug 转铁蛋白、10ug 亚硒酸钠、10mg 氢化可的松、10ml 胎牛血清、5ug 碱性成纤维细胞生长因子、1.5mg 还原型谷胱甘肽、20nmol/L 孕酮，超纯水加至 1000ml，搅拌溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌，4℃ 存放。

[0072] (3) 称取 10g DMEM/F12 干粉、50mg 胰岛素、50g 白蛋白、50ug 转铁蛋白、100ug 亚硒酸钠、80mg 氢化可的松、10ml 胎牛血清、50ug 碱性成纤维细胞生长因子、10mg 还原型谷胱甘肽、100nmol/L 孕酮，超纯水加至 1000ml，搅拌溶解，0.22 μm 滤膜过滤除菌，4℃ 存放。

[0073] 实施例 2 利用本发明培养基进行骨髓间充质干细胞体外培养

[0074] (1) 人骨髓间充质干细胞的分离、培养和扩增

[0075] 用骨穿针在髂后上棘抽取骨髓 5ml，装入 1ml 含 500u/ml 肝素的 PBS 的无菌离心管中，等量 PBS 稀释，加到等体积的比重为 1.073g/ml 的淋巴细胞分离液上。2000 转/min，离心 30min，取中间云雾状的单个核细胞层，用 DMEM(L) 培养液离心洗涤 2 次，每次 1000 转/min，离心 5min，弃去上清液。

[0076] 用实施例 1(2) 配制的间充质干细胞培养基混悬并计数细胞，按  $5 \times 10^6$ /ml 接种于的培养瓶中，置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。2 天后首次换液，弃去未贴壁细胞，以后每 3 天更换培养液 1 次。8~10d 后细胞融合达 50%~60% 时第一次传代，用 0.25% 胰蛋白酶+0.02% EDTA 37℃ 消化 2~2.5min。收取细胞悬液，1000 转/min，离心 5min。弃上清后用实施例 1(2) 所述培养基重新悬浮细胞按  $1 \times 10^4$ /ml 传代培养如图 1。

[0077] (2) 细胞生长曲线

[0078] 取 3 代的培养细胞，制备单细胞悬液，计数，调整细胞浓度为  $5 \times 10^3$ /ml，接种于 24 孔细胞培养板中，24h 后用胰酶消化孔板中 3 个孔中的细胞并计数，连续每天取 3 孔，直至细胞长满孔时停止计数，以时间 (d) 为横坐标，以细胞数为纵坐标，绘制生长曲线。结果如图 2，在接种后的第 1、2 天细胞数没有明显的变化，从第 3 天起，细胞大量增加，至第 6 天细胞量达到高峰，以后细胞增长速度减慢。

[0079] (3) 细胞周期检测

[0080] 培养的 MSCs，胰酶消化，PBS 液漂洗 2~3 次后，70% 乙醇 4℃ 固定 16h，加 50 μg/ml 碘化丙锭和 50 μg/ml 核糖核酸酶，4℃ 孵育 30min，取 100ul 细胞悬液到流式管底部，流式细胞仪检测（计数 104 个细胞）。结果如图 3，G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期为 54.53%，G<sub>2</sub>-M 期为 16.31%，S 期为 29.16%。高比例的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞显示着骨髓间充质干细胞具有高度的分化潜能。

[0081] (4) 向脂肪细胞诱导分化

[0082] 收集消化后的第 4 代 BM-MSc，按  $2 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> 接种于 6 孔板，待细胞融合达 50% 以上后，用含 10% FCS 的低糖 DMEM 培养液，加入脂肪诱导体系（地塞米松 1 μmol/L、人胰岛素 5mg/L、IBMX 0.5mmol/L、消炎痛 100 μmol/L），每 3 天全量换液，维持 3 周。细胞经油红 O 染色，镜下观察细胞内脂肪小滴形成情况。结果如图 4，加入脂肪诱导体系后约 7 天，少数细胞内就出现微小明亮的脂肪滴。随着诱导时间延长，出现脂滴的细胞增多，细胞也变成方形或角形。培养至 3 周，融合的脂肪滴几乎充满整个细胞，油红 O 染色呈明亮的橙红色。

[0083] 采用实施例 1 配制的间充质干细胞培养基,成功用于对人骨髓间充质干细胞进行扩增,从生长曲线看符合间充质干细胞的生长特性。细胞周期显示其具有高比例的 G0/G1 期的干细胞所具有的高度分化潜能。获得的骨髓间充质干细胞具有向脂肪细胞的分化潜能。

[0084] 实施例 3 本发明培养基对大鼠骨髓间充质干细胞培养实验

[0085] (1) 大鼠骨髓间充质干细胞的分离和培养

[0086] SD 大鼠断颈处死,充分消毒。无菌条件下解剖出股骨及胫骨,剪去股骨、胫骨两端骨髓,显露骨髓腔。用 5ml 针管穿刺骨髓腔,用添加了肝素的 DMEM 培养基反复冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞悬浮液。悬浮液贴壁轻轻加入到预置等体积 1.077g/L 的淋巴细胞分离液的离心管中,2000r/min 离心 20min。吸取中间乳白色的界面层,加入 5 倍体积的 DMEM 培养基,混匀后 1000r/min 离心 10min。弃上清,留取离心管底端白色絮状物,加入实施例 1 制备的 (3) 间充质干细胞培养基,混匀后以  $2.0 \times 10^6/\text{ml}$  的密度接种于培养瓶中,放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。48h 后换液,去除未贴壁细胞。以后每 3d 换液 1 次。当细胞铺满瓶底 60-70% 时,倒掉培养液,用 0.25% 胰蛋白酶 +0.02% EDTA 将贴壁细胞消化 2-3min,见细胞回缩,形态变圆,间隙增大时,终止反应。加入培养液吹打制成细胞悬液,按 1 : 3 传代培养,结果如图 5 所示。

[0087] (2) 细胞生长曲线

[0088] 取 3 代的培养细胞,制备单细胞悬液,计数,调整细胞浓度为  $5 \times 10^3/\text{ml}$ ,接种于 24 孔细胞培养板中,24h 后用胰酶消化孔板中 3 个孔中的细胞并计数,连续每天取 3 孔,直至细胞长满孔时停止计数,以时间 (d) 为横坐标,以细胞数为纵坐标,绘制生长曲线。结果如图 6,在接种后的第 1,2 天细胞数没有明显的变化,从第 3 天起,细胞大量增加,至第 6 天细胞量达到高峰。

[0089] (3) 细胞周期检测

[0090] 培养的 MSCs,胰酶消化,PBS 液漂洗 2-3 次后,70% 乙醇 4℃ 固定 16h,加 50 μg/ml 碘化丙锭和 50 μg/ml 核糖核酸酶,4℃ 孵育 30min,取 100ul 细胞悬液到流式管底部,流式细胞仪检测 (计数 104 个细胞)。结果如图 7, G0/G1 期为 58.07%, G2-M 期为 26.44%, S 期为 36.36%。高比例的 G0/G1 期细胞显示着骨髓间充质干细胞具有高度的分化潜能。

[0091] (4) 向脂肪细胞诱导分化

[0092] 收集消化后的第 4 代 BM-MSc,按  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$  接种于 6 孔板,待细胞融合达 50% 以上后,用含 10% FCS 的低糖 DMEM 培养液,加入脂肪诱导体系 (地塞米松 1 μmol/L、人胰岛素 5mg/L、IBMX 0.5mmol/L、消炎痛 100 μmol/L),每 3 天全量换液,维持 3 周。细胞经油红 O 染色,镜下观察细胞内脂肪小滴形成情况。结果如图 8,加入脂肪诱导体系后约 7 天,少数细胞内就出现微小明亮的脂肪滴。随着诱导时间延长,出现脂滴的细胞增多,细胞也变成方形或角形。培养至 3 周,融合的脂肪滴几乎充满整个细胞,油红 O 染色呈明亮的橙红色。

[0093] 采用实施例 1 配制的间充质干细胞培养基,成功用于对大鼠骨髓间充质干细胞进行扩增,从生长曲线看符合间充质干细胞的生长特性。细胞周期显示其具有高比例的 G0/G1 期的干细胞所具有的高度分化潜能。获得的骨髓间充质干细胞具有向脂肪细胞的分化潜能。

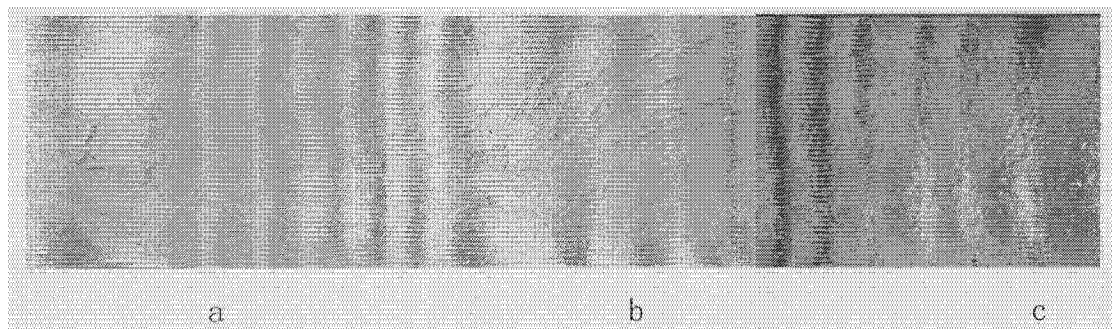


图 1

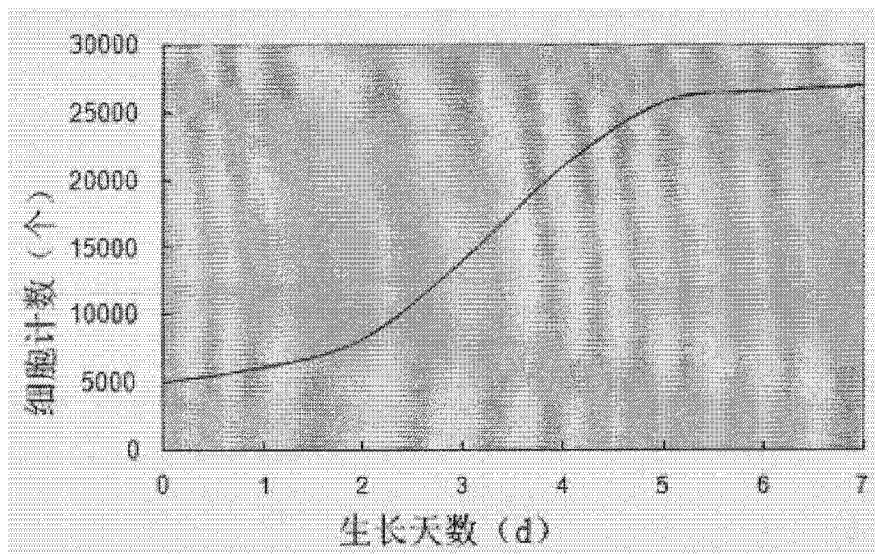


图 2



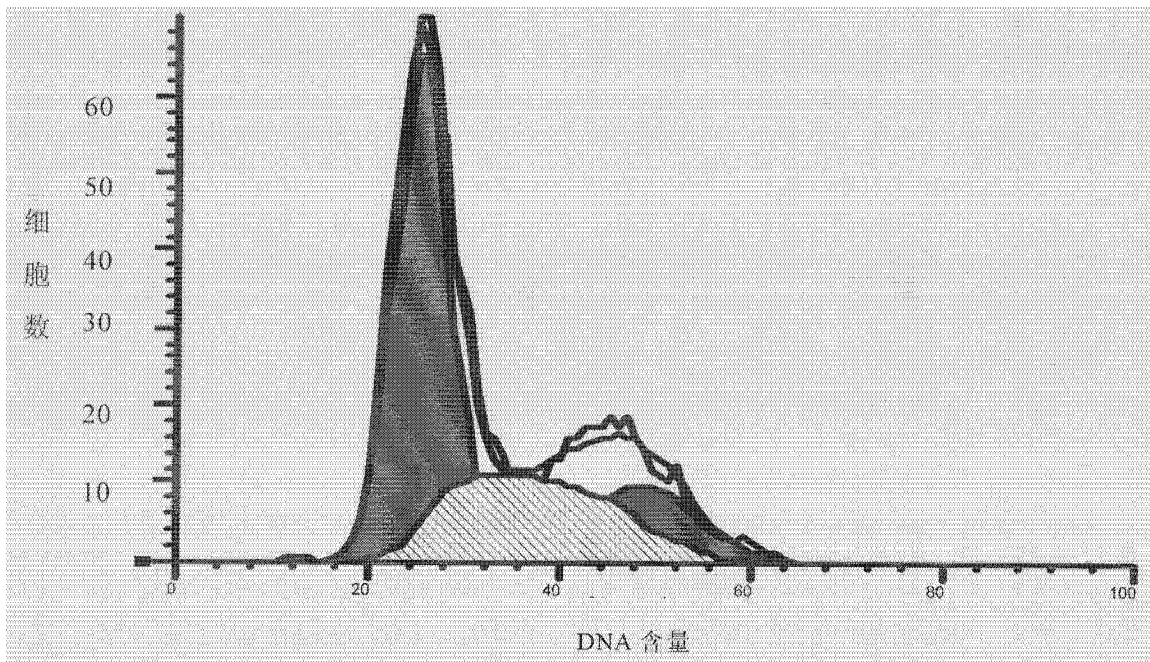


图 3

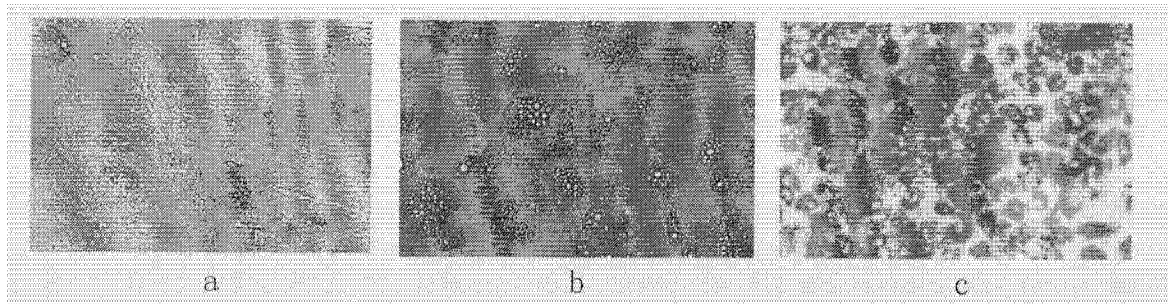


图 4

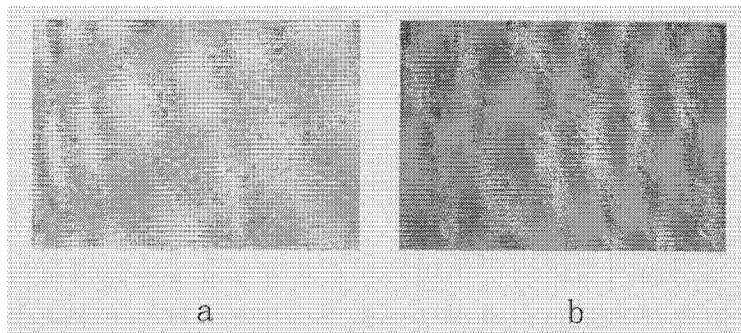


图 5

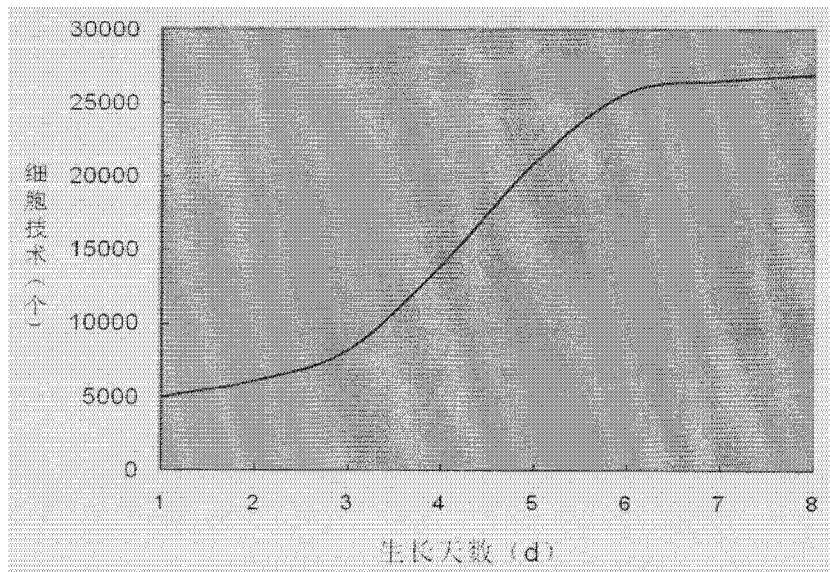


图 6

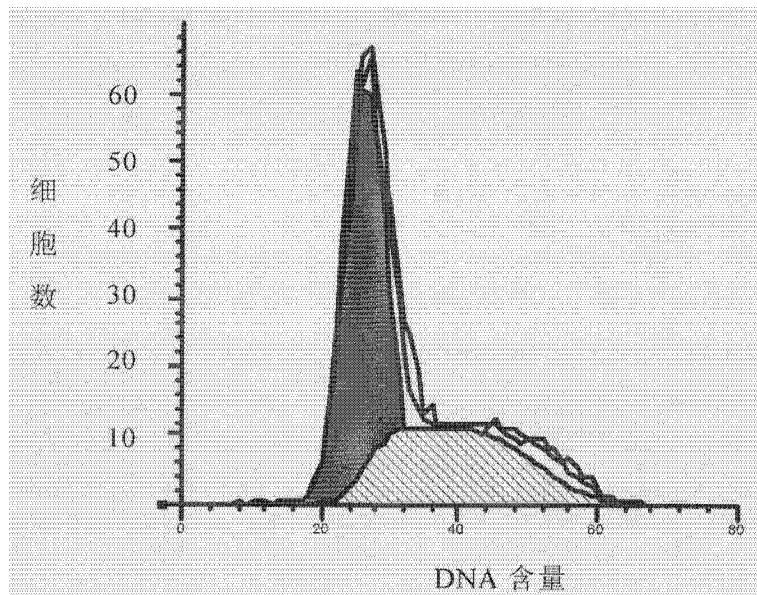


图 7

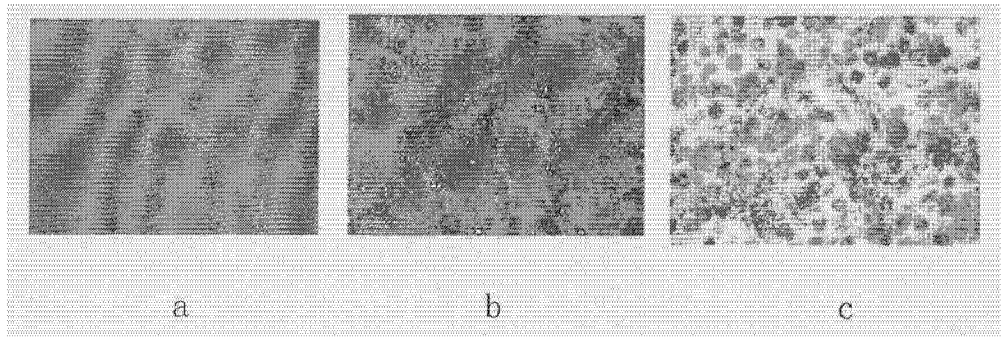


图 8