(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103173401 A
(43)申请公布日 2013.06.26

(21)申请号 201210460386.5

(22)申请日 2006.12.21

(30)优先权数据
60/752989 2005.12.22 US

(62)分案原申请数据
200680053313.7 2006.12.21

(71)申请人 简·恩尼斯
地址 加拿大安大略省
申请人 拉胡尔·萨鲁加瑟
约翰·E·戴维斯

(72)发明人 简·恩尼斯 拉胡尔·萨鲁加瑟
约翰·E·戴维斯

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 杜艳玲 孟慧岚

(51)Int.Cl.
C12N 5/071(2010.01)
A01N 1/02(2006.01)

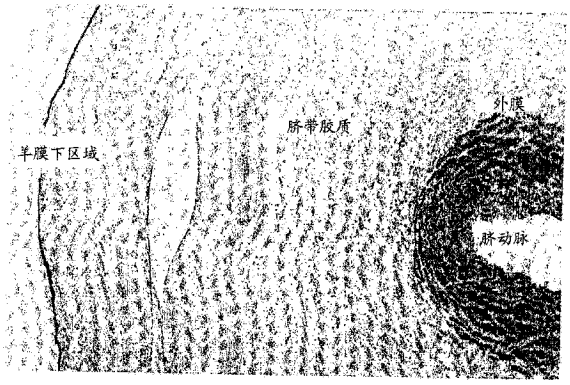
权利要求书2页 说明书22页 附图17页

(54)发明名称

来自冷冻的脐带组织的活细胞

(57)摘要

从冷冻的脐带组织提取活的祖细胞。在实施方案中,脐带组织是具有血管周围脐带胶质的血管,并且所提取的祖细胞是HUCPVCs。



CN 103173401 A

1. 用于从低温冷冻的脐带组织回收活细胞的方法，包括步骤：

1) 获得低温保存的脐带组织，其中脐带组织是 (1) 具有包含祖细胞的血管周围脐带胶质的脐带血管，(2) 所述血管的片段，或 (3) 获自所述血管的脐带胶质组织，并且已通过包括下述步骤的方法得以制备：

a) 获得包含活细胞的脐带组织，

b) 通过浸没于含有含血清细胞培养基和低温防护剂的低温防护溶液将所述脐带组织组合，和

c) 对组合物进行冷却处理，其中组合物在容许低温防护剂渗入组织的时间和温度下作为液体被冷却，

d) 冷冻所冷却的组合物以提供冷冻的组织，并任选地接着

e) 在低温条件下保存所冷冻的组织；

2) 使冷冻的脐带组织解冻；

3) 处理解冻的脐带组织以用水置换低温防护剂；以及

4) 从这样处理的脐带组织中回收活细胞。

2. 用于保留存在于脐带组织中的祖细胞的存活力的方法，包括步骤：

a) 获得包含活祖细胞的脐带组织，其中脐带组织是 (1) 具有包含所述祖细胞的血管周围脐带胶质的脐带血管，(2) 所述血管的片段，或 (3) 获自所述血管的脐带胶质组织，

b) 通过用含有含血清细胞培养基和低温防护剂的低温防护溶液浸没将所述脐带组织组合；

c) 对组合物进行冷却处理，其中组合物在容许低温防护剂渗入组织的时间和温度下作为液体被冷却，

d) 冷冻所冷却的组合物，并任选地，接着

e) 在低温条件下保存所冷冻的组合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中低温防护剂为 DMSO。

4. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中细胞培养基包含胎牛血清。

5. 根据权利要求 4 的方法，其中通过从脐带胶质提取来回收活细胞。

6. 处于低温保存状态并包含能以存活状态回收的祖细胞的脐带组织，只要通过根据权利要求 2-5 任一项的方法所制备。

7. 根据权利要求 6 的脐带组织，以包含多个容器和注明每个容器内含物的目录的组织库形式存在，其中每个容器包含所述脐带组织的样品。

8. 从冷冻的脐带组织回收活 HUCPVCs 的方法，包括步骤：

1) 获得低温保存的脐带组织，其中脐带组织为 (1) 具有包含所述 HUCPVC 祖细胞的血管周围脐带胶质的新鲜的、分离的脐带血管，(2) 所述血管的片段，或 (3) 获自所述血管的脐带胶质组织，并已通过包括下述步骤的方法得以制备：

a) 获得所述脐带组织，

b) 通过用含有含血清细胞培养基和 DMSO 的低温防护溶液浸没将所述脐带组织组合，

c) 对组合物进行冷却处理，其中组合物在容许 DMSO 渗入组织的时间和温度下作为液体被冷却，

d) 冷冻所冷却的组合物，和

e) 在低温条件下保存所冷冻的组合物一段时间；并接着

2) 使保存的脐带组织解冻；

3) 处理解冻的脐带组织以用水置换 DMSO；以及

4) 消化与保存的血管缔合的脐带胶质以释放活 HUCPVCs。

9. 根据任一前述权利要求的方法，其中所述脐带组织是具有包含所述 HUCPVC 祖细胞的血管周围脐带胶质的脐带血管的片段。

10. 根据权利要求 1-9 任一项的方法，其中所述脐带组织是包含 HUCPVC 祖细胞的脐带胶质，其中所述脐带胶质获自脐带血管的血管周围区。

来自冷冻的脐带组织的活细胞

[0001] 本申请是国际申请日为 2006 年 12 月 21 日、国际申请号为 PCT/CA2006/002092、进入国家阶段的申请号为 200680053313.7、发明名称为“来自冷冻的脐带组织的活细胞”的 PCT 申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明聚焦于从脐带 (UC) 结缔组织中收获一群快速增殖的人细胞 ;处于成骨、软骨形成、生脂和生肌条件中的这样的细胞的培养物 ;如它们缺少细胞表面组织相容性抗原所示的,证明了在这些细胞群中高百分比的细胞是无免疫能力的 ;以及这些细胞用作多能祖细胞的来源用于多种基于细胞的治疗的能力。更特别地,本发明涉及冷冻的组织作为上述有价值的祖细胞来源的应用。

[0003] 发明背景

[0004] UC 是在原肠胚形成 (三胚层形成) 后所最初形成的一种结构。当折叠开始时,胚盘经卵黄和尿囊血管通过原始中肠 (胚胎起源) 与原始卵黄囊 (胚胎外起源) 相连接,所述血管接着发育形成脐血管 (Haynesworth 等,1998 ;Pereda 和 Motta,2002 ;Tuchmann-Duplessis 等,1972)。这些血管被称为脐带胶质 (WJ) 的通常被认为是主要由胚外来源的原始间充质组织所支持并被其环绕 (Weiss,1983)。在妊娠期间,从该早期开始 UC 生长直至变成在分娩中所见的 30-50cm 的脐带。因此,预计 WJ 不仅含有已在文献 (参见下文) 中描述的成纤维细胞样或肌成纤维细胞样细胞,还含有能产生在胚胎和胎儿发育期间为支持脐带生长所必需的扩增体积的 WJ 的细胞的祖细胞群。

[0005] Thomas Wharton 首次描述了 WJ, 其在 1656 年出版了他的论文 Adenographia(Wharton TW. Adenographia. Freer S. 译 (1996). Oxford, U.K. :Oxford University Press,1656 ;242-248)。随后,其被定义为由分散于由包括透明质酸在内的蛋白聚糖 (Schoenberg 等,1960) 和不同类型的胶原 (Nanaev 等,1997) 组成的无定形基质中的细胞所组成的胶状的、松散的粘液性结缔组织。分散于该基质中的细胞已被描述为是在萎陷的脐带中呈星状以及在扩张的脐带中拉长的“成纤维细胞样”(Parry,1970)。最初在基质中观察到平滑肌细胞 (Chacko 和 Reynolds,1954),尽管 Parry(1970) 对此有争议,他将它们描述为在表面上类似于平滑肌细胞的有些“不寻常的成纤维细胞”。此后,在 1993 年 Takechi 等 (1993) 对这些细胞进行免疫组织化学研究之前,很少进行鉴定这些细胞的工作。他们将这些细胞描述为是“在无定形基质中“具有长胞质突的纺锤状或星状以及胶原纤维波形网络”的“成纤维细胞样”(Takechi 等,1993)。为了免疫组织化学染色,他们使用了针对肌动蛋白和肌球蛋白 (胞质可收缩蛋白)、波形蛋白 (胚胎间充质起源的成纤维细胞特有的) 以及结蛋白 (特异于肌原性起源的细胞) 的第一抗体,以便确定哪些类型的肌球蛋白与 WJ 成纤维细胞相关。他们观察到高水平的化学上可提取的肌动球蛋白 ;尽管成纤维细胞含有胞质肌动球蛋白,但是它们对肌动蛋白或肌球蛋白没有染色,而 WJ 成纤维细胞则对两者染色阳性。此外,观察到对于波形蛋白和结蛋白两者染色阳性,得出 WJ 中这些改变的成纤维细胞来源于原始间充质组织的结论 (Takechi 等,1993)。随后, Nanaev 等 (1997)

更近一些的研究证实了在早产脐带中增殖的间充质细胞祖细胞的五步分化。他们的发现支持了肌成纤维细胞存在于 WJ 基质中的提议。WJ 细胞的免疫组织化学鉴定表明非常类似于已知是骨形态发生中成骨细胞主要来源的周细胞，并且还可以在培养物中形成称为集落形成单位 - 成骨细胞 (CFU-O)(Aubin，1998) 的骨小结 (bonenodules)(Canfield 等，2000)。

[0006] 近来有出版物报道了从 UC 而非 UC 血中收获细胞的方法。Mitchell 等 (Mitchell 等，2003) 描述了一种方法，其中他们首次取出并弃去脐血管以收获残留的组织。然后将包括残留的 WJ（由于脐血管完整地包裹在 WJ 中，因此 WJ 中的一部分已与血管一起丢弃）和羊膜上皮的残留的组织切块以产生被转移到组织培养皿中的小的组织碎片。接着将这些组织碎片用作为细胞从中迁移到培养基上的原始外植体。

[0007] 在另一篇出版物中，Romanov 等 (2003) 指出他们成功地从脐带血管系统中分离了间充质干细胞样细胞，尽管他们还指出他们的培养物不含有来自 WJ 的细胞。具体来说，自脐静脉内部他们使用了单次 15 分钟的胶原酶消化，其产生了混合的一群血管内皮和内皮下细胞。Romanov 等表明在 7 天后少量成纤维细胞样细胞出现在该细胞收获物中。

[0008] 同样，美国专利 5,919,702 描述了一种从人 UC 的 WJ 中分离“前软骨细胞”的方法，以及它们用于产生软骨的用途。具体来说，该方法包括沿纵向在脐带上切开 1 英寸的切口，剥离血管并‘拉出’，然后弃去，并将 WJ 收集在无菌容器中，在其中切成 2-3mm^3 切片供培养用。在一种优选的方法中，通过将 WJ 的 2-3mm^3 切片放置于培养皿底部的载玻片上，用另一片载玻片覆盖，并培养 10-12 天以便使‘前软骨细胞’迁移到培养皿表面，从而分离细胞。

[0009] 在 2005 年 7 月 7 日公开的美国专利申请 US2005/0148074 中，Davies 等描述了从被称为血管周围区的特定区中的脐带胶质分离独特的祖细胞群。在该区中的脐带胶质位于脐带血管外壁上或与之结合，当血管从脐带切离时仍保持与它们结合。该祖细胞群具有非常短的倍增时间，并包含具有多种有价值的特性的祖细胞，包括多能细胞以及产生包括脂肪、骨、软骨、肌肉和内皮组织在内的多种间充质组织的细胞；自发分化为骨形成成骨细胞的细胞；和缺少 MHC I 类和 II 类标记的细胞。获得自人脐带血管系统的血管周围区中脐带胶质的祖细胞在此称为 HUCPVCs。

[0010] 因此，预示脐带组织是祖细胞以及用于组织工程学和其他医学方法的其他细胞的重要来源。当前实践容许脐带来源的细胞在低温条件下得以更长时间的保存，并从其中回收活细胞。然而，迄今所开发的技术只是容许从冷冻或低温保存的脐带组织中回收活细胞，而不同于脐带细胞自身。因此，在需要从脐带组织中回收活细胞情况下，当脐带组织是新鲜时，通常在脐带提取 24 小时之内，技术人员必须迅速行动来处理脐带组织，使得所需的组织能被提取，并且所需的细胞亦能分离、培养并冷冻保存，期间那些细胞仍有活性。显然，提供一种容许被保存的脐带组织作为按需的活细胞来源的方法应当是有用的。

[0011] 发明概述

[0012] 现已证实活细胞可回收自已冷冻的脐带组织。因此，本发明考虑到在分娩后的基础上低温“储藏”上述组织的习惯，提供了一种用于从冷冻的脐带组织中按需提取活细胞的稳定方法。

[0013] 更特别地，并根据其的一个方面，本发明包括获得分娩后脐带组织，以及冷冻分娩后脐带组织的步骤。在一个优选的方面中，使用一种包括获得包含活细胞的脐带组织，将脐带组织与含有含血清细胞培养基和低温防护剂的低温防护溶液组合，并对组合物进行冷冻

处理，其中组合物首先在容许低温防护剂渗入组织的时间和温度下作为液体冷却，然后冷冻该冷却的组合物，并接着在低温条件下保存冷冻的组合物的步骤的方法，本发明适用于保持存在于脐带组织中细胞的存活力。

[0014] 根据其的另一个方面，本发明提供了一种用于从脐带组织中获得活细胞的方法，包括以冷冻形式获得上述组织，解冻所冷冻的组织并从解冻的组织中提取活细胞的步骤。在一个优选的方面中，使用一种包括获得冷冻的脐带组织，并任选地低温保存，特别是通过本发明的方法低温保存，解冻所冷冻的组织，洗涤解冻的组织以除去低温防护剂并从所得到的组织中提取活细胞的步骤的方法，本发明适用于从脐带组织中回收活细胞。

[0015] 因此，在其的另一个方面中，本发明提供了一种用于从脐带组织中获得活细胞的方法，其中该细胞提取自之前冷冻的脐带组织。

[0016] 在一个进一步的方面中，本发明提供了以冷冻状态及任选地以低温保存状态存在的脐带组织，所述脐带组织包含只要是通过本发明的方法制备就能以存活状态回收的祖细胞。

[0017] 在本发明的一个相关方面中，提供了以包含多个容器和注明每个容器内含物的目录的组织库形式存在的脐带组织，其中每个容器包含所述冷冻的脐带组织的样品。在一个特定的实施方案中，容器为适合于低温保存的容器。

[0018] 在一个进一步的方面中，本发明提供了一种包括从之前冷冻的脐带组织中获得活细胞，并从那些活细胞中选择是祖细胞的细胞的步骤的方法。在一个特定的方面中，祖细胞为 HUCPVCs，并且本发明提供了一种用于从冷冻的脐带组织中回收活 HUCPVCs 的方法，包括步骤：

[0019] 1) 获得冷冻的脐带组织，该冷冻的脐带组织任选地为低温保存的脐带组织，其中脐带组织为具有缔合的血管周围脐带胶质的新鲜的、分离的人脐带血管或其片段，并已通过包括下述步骤的方法得以制备：

[0020] a) 获得所述脐带组织，

[0021] b) 将脐带组织与含有含血清细胞培养基和 DMSO 的低温防护溶液组合，

[0022] c) 对组合物进行冷却处理，其中组合物在容许 DMSO 渗入组织的时间和温度下作为液体被冷却，

[0023] d) 冷冻所冷却的组合物以提供冷冻的脐带组织，并任选地，

[0024] e) 在低温条件下保存所冷冻的脐带组织一段时间；并接着

[0025] 2) 使冷冻的脐带组织解冻；

[0026] 3) 处理解冻的脐带组织以用水置换 DMSO；以及

[0027] 4) 消化与保存的血管缔合的脐带胶质 (Wharton′ s jelly) 以释放活 HUCPVCs。

[0028] 参考附图本发明的方面现将得到更详细的描述，其中：

[0029] 附图简述

[0030] 图 1 是一张呈现人 UC 中三种不同的组织区域的光学显微照片；

[0031] 图 2 是一张胶原酶溶液中环状血管的典型例图；

[0032] 图 3 是一张已粘附于聚苯乙烯组织培养表面上的分离自 WJ 的细胞的光学显微照片；

[0033] 图 4 是一张图解说明 CFU-O 最初形成的光学显微照片；

[0034] 图 5 是一张图解说明成熟的 CFU-O 的光学显微照片；

[0035] 图 6 显示在 35mm 聚苯乙烯组织培养皿上于 UV 荧光下的四环素标记的 CFU-O；

[0036] 图 7 图解说明了并排放置的相同的四环素标记的 CFU-O 的相差光学显微照片和荧光显微照片；

[0037] 图 8 是一张在组织培养聚苯乙烯表面上的成熟的 CFU-O 的扫描电镜照片；

[0038] 图 9 是一张暴露作为基础的基质的 CFU-O 横切面的扫描电镜照片；

[0039] 图 10 是一张位于 CFU-O 前缘的轻度矿化的胶原纤维的扫描电镜照片；

[0040] 图 11 是一张通过分化成骨细胞铺在聚苯乙烯界面上的非胶原基质（被视为小球状体）的扫描电镜照片；

[0041] 图 12 是一张包含成熟的 CFU-O 中心的重度矿化的胶原的扫描电镜照片；

[0042] 图 13 图解说明了流式细胞术数据，显示 WJ 来源的细胞有 77.4％是 MHC Ⅰ和 MHC II 阴性；

[0043] 图 14 是一张骨小结横切片的 Masson 三色染色的黑白复制图，显示了已陷入胶原中的细胞（骨细胞）的分布，以及多层周围细胞，其中的一部分为复杂的 (elaborated) 细胞外基质所包围；

[0044] 图 15 显示了与定向骨祖细胞亚群和总的骨祖细胞亚群扩增有关的粘附的血管周围 WJ 群的潜在扩增；

[0045] 图 16 显示了从 0 至 144 小时的血管周围 WJ 细胞的增殖，图解说明了具有从 0 至 24 小时的延滞期、从 24 至 72 小时的对数期以及从 72 至 120 小时的平台期的正常生长曲线。在整个培养期内倍增时间为 24 小时，期间在对数期内倍增时间为 16 小时；

[0046] 图 17 显示了超过 5 次传代的 WJ 细胞的主要组织相容性复合体 (MHC) 的表达，它们表达的改变归因于冻融，而随后的表达则归因于再培养；

[0047] 图 18 显示了 HUCPVCs 的 CFU-F 频率；

[0048] 图 19 显示了从 P0 至 P9 的 HUCPVCs 的倍增时间。HUCPVCs 显示从 P2 至 P8 有 20 小时的相对稳定且快速的倍增时间；以及

[0049] 图 20 显示了 HUCPVCs 的增殖，显示在 30 天的培养中可产生＞ 10^{14} 个细胞。随着该快速扩增，可在 24 天的培养中产生 1,000 个治疗剂量 (TDs)；

[0050] 图 21 显示了胶原酶浓度和消化时间对细胞收获的影响；以及

[0051] 图 22 提供了显示从低温保存中回收并在含青霉素 G(167 单位 /ml)、庆大霉素 (50μg/ml) 和两性霉素 B(0.3μg/ml) 的 5％ FBS 和 α-MEM 中于组织培养处理的表面上培养后第 4 天（图 A）和第 9 天（图 B），通过台盼蓝排除确定为活的细胞的存在的光学显微照片。图 C 是一张显示用于比较当之前没有冷却、在浸没于 10％ DMSO 后冷冻脐带时所获得结果的光学显微照片。

[0052] 发明详述

[0053] 在一个方面中，本发明涉及用于保存脐带组织的方法。该实践使与其来源对象组织相容的细胞的未来利用得以可能，例如由于医学原因如细胞或组织修复或再生所产生的未来需要。

[0054] 在本发明中，脐带组织是分娩后获得的，并进行了冷冻，然后将冷冻的脐带组织保存作为活细胞的未来来源。为从该冷冻的组织中获得活细胞，使组织得以解冻，然后提取以

提供当培养时显示存活力的细胞。

[0055] 本发明的方法可应用于多种脐带组织，如包括血管壁和内皮的血管系统、脐带胶质、羊膜上皮等。获得上述组织所的脐带可以是来自任何哺乳动物的脐带，并优选获得自人脐带。在本发明的一个实施方案中，脐带组织是脐带胶质。在一个优选的实施方案中，该组织是与脐带血管系统（优选人脐带血管系统）的血管周围区缔合的脐带胶质。在本发明的另一个实施方案中，脐带组织是血管组织。在一个优选的实施方案中，该组织为具结合了与血管周围区缔合的脐带胶质的血管组织。在一个特别优选的实施方案中，待冷冻的脐带组织为血管系统（即血管）以及缔合的脐带胶质，当该血管系统从切除的脐带中除去时该脐带胶质仍与之缔合。上述脐带组织包括全长的完整血管系统、单根血管、血液已任选地除去的其纵切片形式以及上述组织的横切片。

[0056] 因此，在本发明的所有方面中，优选的脐带组织为具有位于其外壁上或与之缔合的脐带胶质（即位于脐带血管周围区中的脐带胶质）的人脐带组织中的血管。位于该特定区中的脐带胶质是上述并进一步详述于下的祖细胞的丰富来源。该脐带胶质与血管壁如此紧密地缔合，以致于在操作上难以将其与血管壁分离。尽管如此，该血管周围脐带胶质自身以及不带有缔合的血管的回收在技术上仍是可行的，本发明因此进一步包括上述分离的血管周围脐带胶质作为脐带组织用作用于随后的活祖细胞收获的待冷冻的以及任选地低温保存的源材料的应用。

[0057] 脐带组织被期望作为分娩后组织，并在任选解剖以提供具有上述特性的组织后新鲜获得，然后以备冷冻。期望地，脐带组织从收获起约 24 小时内进行加工，如此提取的组织从收获起至少约 72 小时之内、更优选 48 小时之内以及特别是 24 小时之内被冷冻并期望地进入低温保存。在此期间可冷却该新鲜组织，并按照标准操作期望地进行洗涤以及任选地进行消毒灭菌，但不应在此期间进行如本文中所指明要求的冷冻，使得细胞存活力不受不利影响。

[0058] 在优选的实施方案中，其中要被保存的脐带组织为具有缔合的血管周围脐带胶质的脐带血管，可如下文所详述的以及 Davies 等在 US2005/0148074 中所描述的对该血管进行提取。简言之，通过轻轻地将血管从已纵向开口的脐带中拉出获得具有缔合的脐带胶质的完整脐带血管，并横向切割以产生 1-3 英寸（如约 4cm）长的血管片段。该处理去除了脐带中大部分的脐带胶质，但在与所提取的血管缔合的血管周围区中留下了脐带胶质。例如使用夹钳、缝合线等将血管末端打结以防止血管中残留的任何血液漏出。此外或在备选方案中，可通过在适合的载体如盐水或缓冲盐水（如 PBS）中反复漂洗除去血管中的血液。样品中不存在血液就确保了造血来源的祖细胞不会作为制备物中的污染物存在。在除去血液的情况下，应当理解可用于保存的脐带血管片段不仅包括通过横向切割血管所产生的片段，还包括通过纵向切割所产生的片段，尤其是横向切割，会产生作为原本是管状片段的条带的片段。具有血管周围脐带胶质的所有形式的脐带血管片段都能用于本发明的方法中。

[0059] 为了在活细胞可以回收的条件下保存组织，将脐带组织置于适合于冷冻处理的载体中，例如任何适合于低温保存的载体中。任选地，载体进一步包含适合于细胞培养的补充物。在一个实施方案中，载体包括二甲亚砜 (DMSO)，如 10-30％ DMSO，如 15-25％ DMSO，包括 20％ DMSO。在另一个实施方案中，其中载体包括细胞培养补充物，DMSO 以载体体积的 1-25％，如 5-20％，如 8-15％，即约 10％存在。在另一个实施方案中，补充物为基于血清

的补充物，如胎牛血清。在一个特定的实施方案中，按体积自身包含有 5-20％（如 10％或 15％）的 FBS 的胎牛血清培养基以载体体积的 75-99％，如 80-95％，即约 90％的存在。在一个更进一步的特定实施方案中，按体积载体包含 90％的 10％ FBS 溶液和 10％ DMSO。

[0060] 在本发明的一个特别优选的方面中，用于冷冻以及任选的低温保存的组织制备通过分阶段的、过渡的冷却处理得以进行，该冷却处理被特别设计以使低温防护剂能渗入组织，从而在保存过程中充分地保护组织以及存在于其中的细胞，并能置换在冷冻下会损伤组织和细胞的水。特别是，优选的冷冻 / 低温保存方法使用了如上所述包含低温防护剂和细胞营养培养基如补充有血清的细胞培养基的低温防护溶液。低温防护剂可以是任何保护组织以及存在于其中的细胞免于冷冻及结冰所造成的破坏作用的液体试剂或试剂溶液。最优选地，低温防护剂为二甲亚砜 (DMSO)。在备选方案中，低温防护剂可以是甘油或甘油和 DMSO 的混合物。甘油可以与关于 DMSO 在本文中所列的相同的方式及相同的浓度使用。DMSO 的特性使之特别适合用于本发明的低温保存方法中。

[0061] 存在于低温防护溶液中优选的补充血清的培养基为胎牛血清 (FBS)。可选地，该培养基可包含任何适合于细胞培养的营养培养基，如 DMEM、M 199、RPMI 1640 等，其添加有血清补充物如 FBS、人血清等。一般来说，仅仅取决于所选择的营养培养基的类型，该培养基的血清成分应包含约 5-30％血清，如 10-20％血清。如上所述，优选的低温防护溶液按体积包含约 10％ DMSO 和约 90％的培养基，如 FBS。

[0062] 为制备用于冷冻及随后低温保存的组织，可将组织与低温防护溶液组合，并在对于低温防护剂渗入组织从而期望地置换了缔合水有效的一段时间和温度下作为液体冷却。为了该目的，在此组织为具有血管周围脐带胶质的脐带血管片段时，该组织适合于在约 4C 的温度下保持约 15-60 分钟，例如 20-40 分钟以及优选 30 分钟。更低的温度是较不理想，因为在低于该温度下 DMSO 会凝固并且减少组织渗入。更高的温度是适合的，但还是期望使用较低的温度以便在操作期间减缓脐带中的代谢过程。冷却期可以改变。期望权衡轻重使得给予低温防护剂足以渗入组织的时间，同时减少脐带操作过程时间。一般而言，冷却时间应当不少于约 10 分钟并且可接近于最高达 60 分钟或更久。

[0063] 在冷却处理期间，根据标准操作，组织可温育于任何合适的容器中，例如离心管，如 50mL 体积的离心管。当组织为具有血管周脐带胶质的脐带血管时，每一容器可容纳约 5-10 个血管片段。不让容器塞满是有用的，能使得 DMSO 渗入不受阻碍。

[0064] 在冷却后，对血管进行冷冻处理。期望地，在将冷却的组织转移到低温容器之后进行该处理，使得冷冻的组织能随后易于转移至低温保存。在一个实施方案中，容器由可被消毒的不易碎的聚合物（例如聚丙烯等）制成，并以管或其他可接受的形式提供，所述其他可接受的形式适合于容纳可移除的盖子以使在保存期间该容器能驻留样品并使该样品在其后能放出。最值得期望的是，每一低温容器包含一份组织样品，如在组织为具有血管周围脐带胶质的脐带血管的情况下每一容器包含一个血管片段。所谓的低温管是适合的，如聚乙烯袋。如此，将冷却的血管转移到低温容器中，并与体积足以优选完全浸没组织的新鲜的低温防护溶液组合。

[0065] 接着，通过将样品置于冷冻单元中冷冻所制备的组织，其中冷冻单元的温度可控制在冷冻该组织所必需的低温下。在一个实施方案中，将包含组织和溶液的容器置于冷冻机中以将温度降低至约 -70C，如在约 -40C 下，持续至少约 6 小时，如至少约 8-12 小时。最

优选地，使用控速 -70C 冷冻机进行冷冻。

[0066] 应当理解冷冻的组织能直接用作为从中回收活细胞的起始材料。这样的冷冻材料当保持在 -70C 下时，可显示出至少某些细胞活性，并因此应可相对迅速地得到使用，从而避免了在该温度下随时间过去可能发生的细胞死亡。更优选地，根据本发明的方法，将冷冻的组织置于低温保存中，即在细胞代谢处于停滞的温度下保存。

[0067] 因此，在组织冷冻后，优选以业已开发用于保存类似细胞和组织的方法将含有冷冻的组织的容器转移至低温保存。适宜地，在约 -180C 至 -200C 下将容器保存于液氮的气相中。在备选方案中，冷冻的细胞可低温保存于除液氮之外的介质中，如液态二氧化碳或液态卤化碳。

[0068] 组织样品可在该低温状态中驻留几天、几周、几个月或几年的一段长时间用于当需要祖细胞来源时从中取出祖细胞。

[0069] 需要时，可利用根据本发明的回收方法获得驻留在保存的组织中的活细胞。更特别地，首先获得处于低温保存的容器中的组织并解冻以使得随后低温防护剂的除去得以进行。该组织可例如在温度通常不超过 40C 的温水浴中解冻。10C-40C 的温度是适合的，以及 37C 的温度是所期望的。一旦解冻，在 37C 下约 5-15 分钟，如 10 分钟，就可将组织转移至例如 50mL 管的容器中，并洗涤组织以稀释或除去 DMSO。期望地通过将组织浸没于冷的液体中，利用冷的（如冷却的，例如 4℃）液体如水或缓冲盐水如 PBS 进行该洗涤。期望地，避免对该组织的过分洗涤，使得对细胞的冲击或损伤最小化。浸没的组织可在冷冻机中保持又一段时间以使通过水对低温防护剂进行进一步的稀释和置换得以进行，并接着通过添加更多的冷的液体进行进一步的稀释。

[0070] 接着，利用与为从新鲜的脐带组织中回收活细胞所建立的实践操作相同的实践操作，所得到的恢复的组织可用于回收驻留在该组织中的活细胞。因此，本发明的方法能从已冷冻并低温保存的脐带组织中回收活细胞。可利用任何一种为该目的所建立的技术来证实这样的细胞的存活力。便利地，可通过台盼蓝排除（一种鉴定不能排除该染料的死细胞的方法）简单地或以一种更复杂的方法通过检测 BrdU 的掺入以证实发生 DNA 合成来证实所回收的细胞的存活力。因此，关于细胞在本文中使用的术语“活的”指细胞具有活性代谢，以及对于基于粘附培养的细胞所进一步期望地显示的，对培养基质的粘附特性和随后的播散和增殖。上述存活力的一个例子示于图 22 中，特别是图 A 和 B 中，其显示了活 HUCPVCs 的播散和增殖现象特性。

[0071] 在本发明的特定实施方案中，回收自保存的脐带组织的活细胞为祖细胞。在其他特定的实施方案中，如本文中所举例说明的，活的祖细胞回收自与保存的脐带血管或其片段缔合的血管周围脐带胶质。

[0072] 应当理解本发明的保存和回收方法使包含多个容器（每一容器都包含脐带组织样品）的保存收集物或“库”中脐带组织的组构变成可能。这样的脐带组织样品的收集物或库构成了本发明的另一个实施方案。每一组织库都会附有关于每种样品的目录指示，任何与每种样品相关的有用信息如样品来源，例如关于供者个体以及可能的其遗传史或病史，保存日期，生产该样品的机构或个人的身份等。利用该手段，组织库可作为储库 (repository) 用于组织及其内在细胞的未来使用，并且该目录可用于选择供特定患者或为治疗特定医学状况使用的特定的组织和细胞。

[0073] 在保存的组织为具有血管周脐带胶质的脐带血管或血管片段的情况下，为回收活的祖细胞，可参考在我们共同未决的国际专利申请WO04/072273（公开于2004年8月26日）和US 2005/0148074中所描述的方法，上述专利文献在此并入作为参考。更特别地，这样的祖细胞从新鲜的脐带组织中的分离以及它们的特性和最终用途描述如下。这些祖细胞称为人脐带血管周围细胞或“HUCPVCs”。

[0074] 所提到的参考文献教导了一种从人脐带的脐带胶质中提取细胞的方法，其产生了以快速增殖、存在骨祖细胞和包括不显示两种主要组织相容性标志中任何一种（人白细胞抗原(HLA)双阴性）的细胞在内的其他人祖细胞为特征的独特细胞群。该细胞群是生长成骨和其他结缔组织包括软骨、脂肪和肌肉的祖细胞的有用来源，并为了治疗目的用于自体和同种异体转移祖细胞给患者。

[0075] 更特别地，该方法提供了一种脐带胶质提取物，其中该提取物包含人祖细胞，并且是通过酶消化在有用地称为血管周围脐带胶质区的区域中邻近人脐带的血管系统的脐带胶质所获得的。处于该血管周围区中且祖细胞提取自其中的组织还可称为血管周围组织。该提取方法适宜地产生了基本上无脐带血的细胞、UC上皮细胞或内皮细胞以及来源于脐带血管结构的细胞的提取物，在此血管结构被规定为小动脉或静脉血管的内膜(tunicae intima)、中膜和外膜。所得到的提取物也不同于分离自己与血管结构相分离的大量脐带胶质组织的其他脐带胶质提取物。

[0076] 因此，该方法提供了一种用于获得人祖细胞的方法，包括从根据本发明所获得的脐带胶质提取物分离细胞的步骤。

[0077] 该方法提供了通过培养存在于脐带胶质提取物中的细胞获得的细胞群，包括骨祖细胞群和MHC-/-祖细胞群。

[0078] 所提取的祖细胞群具有在粘附条件下于培养所提取的细胞之后获得的粘附细胞群的特征。在另一个实施方案中，所提取的祖细胞群具有存在于在粘附条件下生长的所提取的细胞上清液级分中的非粘附（或“粘附后”）(PA)细胞群的特征。该PA级分是通过将最初铺板的HUCPVCs的上清液转移到新的T-75烧瓶中以容许到目前为止未粘附的细胞粘附于培养表面所得到的。使用这种新的T-75烧瓶重复该操作，将其培养基转移到另一个新的T-75烧瓶中以便收获任何残留的PA细胞。该PA细胞群包含当在粘附条件下培养时，快速增殖并自发形成骨小结和脂肪细胞的祖细胞亚群。这种技术提供了一种增加分离自酶消化细胞群的粘附细胞产量的手段。

[0079] 该方法还提供了特征在于具有当不存在对于这样的分化原本所必需的补充物的情况下培养时分化为骨细胞的特性的定向骨祖细胞群。

[0080] 还提供了一种用于产生包括骨组织、软骨组织、脂肪组织和肌肉组织的结缔组织的方法，其包括让获得自脐带胶质提取物的细胞处于有助于那些细胞分化为期望的结缔组织表型的条件下的步骤。在这方面，本发明进一步提供了这样的细胞在基于细胞的治疗中的应用，所述治疗包括细胞移植介导的医学状况、疾病和病症的治疗。

[0081] 还提供了一种组合物及其在组织工程化中的应用，所述组合物包含根据本发明的祖细胞或它们的分化的后代以及适合于将这样的细胞递送至所选择的组织部位的载体。

[0082] 提供了一种脐带胶质(WJ)的提取物，其作为包含包括骨祖细胞以及无免疫能力的细胞的人祖细胞的快速增殖细胞群的来源。

[0083] 所提取的细胞群可称为人脐带血管周 (HUCPV) 细胞。该 HUCPV 细胞群构成了在其表型上是独特的，特别是为包含在其中的多种细胞亚群所揭示的多能祖细胞的丰富来源。被提取的细胞所来源的脐带胶质的血管周围区可被称为血管周组织。

[0084] 当在本文中使用时，术语“祖细胞”指在控制和 / 或规定的条件下会分化为给定表型细胞的细胞。因此，骨祖细胞是一种当在为这样的定向和分化所建立的条件下培养时，会定向为成骨细胞谱系并最终形成骨组织的祖细胞。“无免疫能力的”或“非免疫原性的”祖细胞是一种具有与 I 类和 II 类主要组织相容性复合体 (MHC) 有关的表面抗原阴性表型的细胞。这样的祖细胞在本文中还被称为 HLA 双阴性或 MHC-/-。

[0085] 提取自 WJ 的 HUCPV 细胞群还具有“快速增殖”的特征，其指在用于祖细胞扩增的标准条件下，相对于其他已知的祖细胞群，所提取的细胞生长的速度。根据本文中所呈现的实验结果以及如图 16 中所示的，应当理解祖细胞群可在至少约 25 小时之内，以及在快达 7-15 小时之内倍增，并因此较其他已知的骨祖细胞群和提取自 WJ 的其他祖细胞群扩增快得多。

[0086] 细胞和细胞群可通过从人脐带的 WJ 中提取获得。和现有技术不同，这样的细胞提取自缔合即邻近脐带血管系统外壁的 WJ。与脐带血管系统外表面缔合或非常邻近的脐带胶质位于称为血管周围区的区域中，且当从脐带中切离血管（如从脐带中提取脐带胶质或从脐带中提取血管以及缔合的脐带胶质）时通常与该血管系统保持缔合。已显著地发现位于该血管周围区中且在现有技术实践中通常被弃去的脐带胶质是具有本文中所描述的特性的祖细胞的丰富来源。因此，利用了来自该脐带胶质的血管周围区的组织作为称为 HUCPVCs 的有用的人祖细胞来源。

[0087] 在实施方案中，HUCPV 细胞群的特点在于存在具有许多指示功能性间充质细胞（非造血）表型的标志（即 CD45-、CD34-、SH2+、SH3+、Thy-1+ 和 CD44+) 的祖细胞。特别有意义的是，该细胞群的特点在于通常作为 3G5 抗体阳性的容纳细胞 (harbouring cells)，该抗体是一种指示周细胞的标志。所提取的细胞群通常是一种在形态学上同质的成纤维细胞群，其表达 α - 肌动蛋白、结蛋白和波形蛋白，并提供非常有用的来源，期望细胞亚群可通过操纵培养条件并基于例如细胞分选原理和技术选择获得自所述来源。

[0088] 为从人脐带中提取这样的血管周围细胞，要注意在提取过程期间避免提取脐带血细胞、UC 上皮细胞或内皮细胞以及来源于脐带血管结构的细胞，在此血管结构被规定为动脉或静脉血管的内膜、中膜和外膜。可通过在解剖前仔细地冲洗并洗涤脐带，接着小心地将血管从脐带中解剖出来，就能获得基本上不含有这些不需要的细胞的提取物。还可小心地将这些血管从周围的脐带组织拉出来，在这样的情况下将血管周围组织与血管相切离。应当理解要小心以避免提取这些不需要的细胞，它们仍有可能少量存在于所得到的提取物中。可接受的前提条件是它们以如此低的以致于不干扰本文中所呈现的观察结果的频率出现，所述观察结果即对来源于间充质细胞以及特别是中胚层起源的细胞集落的观察、CFU-F、CFU-O 和 CFU-A 形成的频率和速度以及对在培养的细胞群中所观察到的 HLA 表型的表征。

[0089] 位于血管周围区中的组织是邻近脐带血管系统外壁的脐带胶质，并且通常位于由血管外壁向外延伸约 3mm 的区域内。适宜地，该靶提取区可位于三条血管中任何一条的外壁向外延伸约 2mm，如约 1mm 的范围内。利用实施例中所描述的技术能容易地实现从该区中提取 WJ。在该技术中，血管用作为 WJ 的载体，并且血管本身亦可用作为提取祖细胞的基质。

因此，通过外科手术或手工从已充分洗涤从而基本上除去所有脐带血污染物的新鲜的脐带上将具有血管周围组织薄覆盖层的脐带血管切离。然后在含有适合于消化期望细胞所驻留的血管周围组织的胶原基质的酶的提取介质如磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中于约 37C 下温育具有邻近的血管周围组织的血管或其切片。为了该目的，用约 0.1mg/mL-10.0mg/mL 或更多，如 0.5mg/mL 浓度的胶原酶进行消化是适合的。酶的类型、浓度和温育时间可以改变，并且可通过在所选择的条件下监测细胞表型和细胞群的产生，从而简单容易地确定可选的提取条件。举例来说，在约 3 小时（如 1-5 小时）的较短的消化时间内，4mg/mL（如 1-4mg/mL）的较高的胶原酶浓度也是适合的。在提取期间，打结或剪去血管末端，并可将其悬挂在提取介质上以避免血管中所包含的物质污染介质。因此，应当理解脐带胶质提取物基本上不含有脐带血细胞、脐带上皮细胞、血管内皮细胞和血管平滑肌细胞。

[0090] 根据本发明，这样的组织被冷冻并优选地低温保存，并以一种容许从所保存的组织提取活的 HUCPV 祖细胞的方式从冷冻或低温状态恢复。

[0091] 其他可用于该分离步骤的消化酶为 0.1-10mg/ml 透明质酸酶、0.05-10mg/ml 胰蛋白酶以及 EDTA。尽管较便宜的备选方案是使用 0.5mg/ml 消化 18-24 小时，但最佳的胶原酶浓度为 4mg/ml，消化时间为 3 小时。另一种胶原酶浓度的备选方案是如图 21 中所举例说明的。期望地，如图 21 中所示，在血管开始降解时或降解之前停止消化，取决于胶原酶浓度该降解在不同的时间点出现。

[0092] 在 0.5mg/mL 胶原酶提取介质中约 24 小时，如 12-36 小时，如 18-24 小时后，或在 4.0mg/mL 胶原酶提取介质中约 3 小时后，移除血管，留下含有人祖细胞的血管周围组织提取物。在用于祖细胞扩增的标准条件下扩增这些细胞。这些细胞能例如在聚苯乙烯上被选择以选取粘附细胞，例如在聚苯乙烯皿或烧瓶中，并接着保持在适合的培养基中。如 Baksh 等在 WO 02/086104（其内容在此并入作为参考）中所举例描述的，无论有否之前的粘附细胞选择，都可在搅动的悬浮液的条件下培养所提取的细胞用于扩增。

[0093] 所提取的 HUCPVCs 群可在粘附条件下培养，并回收驻留于上清液中的非粘附细胞用于进一步的培养。这些“粘附后”细胞的特征在于是一种具有自发形成骨小结和脂肪细胞倾向的细胞亚群。因此，该方法提供了一种提取自血管周围组织的分离的祖细胞群，这些细胞具有形成包括骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和肌肉细胞在内的几种分化细胞类型中的至少一种的倾向，其中这样的祖细胞构成了在粘附条件下培养的 HUCPVCs 的非粘附级分。通过在粘附条件下培养血管周围组织提取的 HUCPVCs、选择非粘附的细胞群并接着在对 (1) 扩增所述细胞群或 (2) 导致其分化为期望细胞表型有用的条件下培养该非粘附的细胞群，从而获得这样的细胞。用于其中的培养条件是如本文中所例证的对这样的扩增和分化已建立的那些条件。

[0094] 可在标准的粘附培养条件下培养并扩增 HUCPV 亚群。如本文中所揭示的，这样的粘附细胞群已知包含无免疫能力的或非免疫原性的祖细胞以及间充质祖细胞。

[0095] 可利用已建立的技术直接或在扩增之后保存存在于提取物中的细胞以提供富集所给定表型的细胞的能扩增的细胞亚群。因此，进一步提供了血管周围组织提取的富集多能的间充质祖细胞、骨祖细胞的细胞群，富集无免疫能力的祖细胞的细胞群以及富集无免疫能力的多能和骨祖细胞的细胞群。此外，细胞可被富集以只选择对周细胞标志 3G5 阳性的那些细胞，该选择利用了其 3G5 抗体，以及只选择对 MHC I 类和 II 类标志中任何一种或

两种阴性的那些细胞。还可通过针对其他表面标志的选择富集细胞群，如通过耗竭那些带有 CD45 的细胞以例如除去造血细胞。

[0096] 如图 17 中所显示的，通过冻融改变了祖细胞群中 MHC 标志的分布。新鲜的细胞刚一传代，MHC 双阴性细胞的频率就相对恒定地 / 微小增加。然而，在冷冻后铺板的细胞中祖细胞群中的 MHC 双阴性细胞的频率明显增加了。因此，在祖细胞群中，MHC 双阴性表型的细胞进一步的特征在于具有冷冻后频率增加的倾向。通过首先制备细胞等分试样，然后将细胞制备物保存一段期望的时间，以这种常用的方法进行这样的冷冻。应当理解如果需要的话这样的细胞可保存许多年。

[0097] 该方法通过获得如本文中所描述的血管周围组织提取物或其富含 MHC 双阴性细胞的级分，对该提取物或其级分进行冷冻，并接着培养该冷冻的细胞，从而具有产生 MHC 双阴性祖细胞的用途。如所注意到的，所得到的细胞在人受试者中能潜在地用于诱导组织形成或修复。

[0098] 获得自提取物或其适合的富集级分的细胞群直接或在它们扩增之后用于提供分化的细胞群。所有适合于它们分级分离和富集以及适合于它们扩增的方法都在现有技术中得以建立。例如，扩增可在诸如 IL-3 和干细胞因子的因子以及本领域中已知的类似试剂的存在下进行。使用为从其中生长骨组织所建立的条件，可让细胞群以及特别是其中的骨祖细胞分化。值得注意的是，被称为定向骨祖细胞的来源于祖细胞群培养的骨祖细胞亚群已显示在成骨补充物不存在下的分化能力。可选地，在补充有一种或多种刺激骨生成的试剂如地塞米松的培养基中培养骨祖细胞。此外，还可用适合于刺激分化为其他间充质细胞来源的结缔组织 (Caplan，1991)，包括软骨、肌肉、腱、脂肪等的补充物培养祖细胞，所有操作都与本领域中的标准操作一致。

[0099] 作为细胞群中细胞的体外培养的备选实践，应当理解可体内移植细胞以直接在患者中诱导期望组织形成。为了患有不同骨状况、疾病和病症，尤其包括骨折和骨质疏松的患者的利益，通过该途径，经移植骨祖细胞提供了骨原位形成。这样的治疗还可应用于减弱其他结缔组织例如但不限于软骨、脂肪和肌肉的疾病。存在于细胞群中的无免疫能力的祖细胞在这方面上是特别有价值的，因为基本上减弱了可预计在它们移植之后发生的排异反应。

[0100] 为了在移植中使用，细胞可作为进一步包含用于将它们递送至被选择用于工程化的组织部位的载体的组合物提供。细胞以对于预期效果有效的剂量存在。预计有效的细胞剂量将处于每剂 10^3-10^7 个细胞，如 10^4-10^6 个细胞，如 $2x10^5$ 个细胞。根据所建立的用于递送活细胞的方法，组合物中被选择用于那些细胞递送的载体可以改变。在实施方案中，细胞被用于骨组织工程化的目的。在一个实施方案中，细胞与以用来将细胞作为植入物定位在缺损或折断或经外科手术准备接受该植入物的骨部位的支架材料形式的载体一起存在。多种材料适合作为载体用于该目的。在一个特定的实施方案中，载体由诸如磷酸钙、PLGA 或它们的混合物的可再吸收材料形成。可使用等效材料，只要它们能让细胞在组合物形成和递送期间保持存活并且在植入部位是生理学上相容的即可。

[0101] 其他适合于祖细胞递送的载体包括诸如 PBS 和包括透明质酸、明胶等的凝胶的载体，等效物也是有用的，前提条件是它们具有细胞存活力必需的 pH 和其他特性。

[0102] 还应当理解细胞用作为宿主用于递送基因表达产物给期望的组织部位。换句话

说，可对细胞进行遗传工程化以接受并表达基因，所述基因表达后产生了在组织修复方法中有用的产物，如不同的生长因子，就骨组织来说，所述生长因子可有效地包括 PTH、BMPs、降钙素等。细胞还可被开发作为转基因细胞用于其他目的，如通过导入改变细胞表型的基因以使该细胞更强壮或更适合于给定的最终用途。

[0103] 本发明的实施方案描述于下列实施例中。

[0104] 从人脐带胶质中收获祖细胞

[0105] 在加拿大多伦多 Sunnybrook&Women′ s College 医院，从刚分娩的足月剖宫产婴儿中收集 UC。通过外科医生将 UC 转移到含有培养基 (80％ α-MEM、20％抗生素) 的无菌容器中，并马上运送到位于多伦多大学生物材料和生物医学工程学院 (Biomaterials& BiomedicalEngineering，University ofToronto) 的我们的实验室。

[0106] 从这一刻开始所有操作都在生物学安全工作橱中无菌进行。在磷酸盐缓冲盐水 (PBS)(-Mg^{2+}，-Ca^{2+}) 中洗涤 UC 三次，尽可能多地除去 UC 血液，然后移回具有培养基的容器中。用无菌剪刀剪下大约 6cm 长的脐带并置于无菌软木解剖板上。将剩余的脐带 (30-45cm) 送回填充培养基的容器中并置于 37℃保温箱中。将该 6cm 脐带切片逆着其螺旋‘扭开’，并钉住两端以暴露出 UC 上皮光滑且直的表面。使用精细手术剪沿 UC 长度方向将 UC 切开大约 1-2mm 深以暴露 WJ。从每条切开上皮的‘皮瓣’开始，使用解剖刀的钝缘从其内表面挑出 WJ，并钉住挑离的上皮 (大约 0.5mm 厚)。该步骤产生了暴露的 WJ，并带有从头到尾直的而非沿其纵轴成螺旋形的包埋在其中的三条血管。小心地不断地用 37℃ PBS 冲洗切片。用镊子分离一条血管的一个末端，沿 WJ 长度方向将其挑出直至其游离于大部分的 WJ 基质为止。可选地，拿着镊子可将中间一条的血管从基质中剥离，并在朝着其末端的任何一个方向上从基质中挑离。一旦为任何一种方法所释放，血管就被大约 1-2mm 的带细胞 WJ 基质围绕着。然后用手术钳或蚊式夹 (mosquito clip) 夹住或缝合解剖出血管的两端以形成‘环’，封闭液体进出血管的通道。马上将该‘环’与剪刀一起放置于含有 0.5mg/ml 胶原酶 PBS(-Mg^{2+}，-Ca^{2+}) 溶液的 50ml 管中，并置于 37℃保温箱中。以类似方式解剖出剩余的两条血管，成环并同样置于保温箱的胶原酶溶液中。在除去血管后，就能容易地从上皮上解剖出构成血管周围组织的 WJ 条带并置于具有胶原酶溶液的 50ml 管中。然后在生物危害废弃物容器中处理剩余的上皮层。将相同的实验方案用于剩余的 30-45cm 的 UC，产生了 15-25 管的‘环’或血管周围组织条带。

[0107] 脐带胶质祖细胞培养的开始

[0108] 在 18-24 小时后，借助于附在其上的吊夹或缝线以及移液管移除‘环’，然后用 PBS 稀释剩余的悬浮液 2-5 次并在 1150rpm 下离心 5 分钟以获得作为管底沉淀的细胞级分。在除去上清液后，在室温下将细胞重悬于 8 倍体积的 4％ NH_4Cl 中 5 分钟，以便裂解任何红细胞污染物。然后在 1150rpm 下再离心悬浮液 5 分钟以分离作为沉淀的细胞级分，并除去上清液。在借助于血细胞计数器对细胞计数后，将它们直接铺板于 T-75cm^2 聚苯乙烯组组织培养皿上，并在 37℃下温育 24-72 小时以便让细胞粘附于聚苯乙烯表面。之后每隔 2 天更换一次培养基。

[0109] 利用上述方法再次产生了详述于下的结果，但其中所进行的基于胶原酶的消化为在 4mg/mL 下 3 小时，在 2mg/ml 下 6 小时以及在 1mg/mL 下 12 小时。

[0110] 7 天后利用 0.1％胰蛋白酶溶液传代粘附细胞，此刻如通过光学显微镜所观察到

的它们显示 80-90％汇合，并如在相差显微镜下所揭示的以及通过预期的光学性质改变所显示的，证明了‘矿化的’积聚物形成。刚一传代，就以 $4x10^3$ 个细胞 $/cm^2$ 将细胞铺板于 35mm 组织培养聚苯乙烯皿或 6 孔平板的经补充的培养基 (SM)(75％ α -MEM 或 D-MEM、15％ FBS、10％抗生素）中，并用 10^{-8}M Dex、5mM β -GP 和 50μg/ml 抗坏血酸处理以测试这些细胞的成骨能力。对于原本称为‘骨小结’形成的 CFU-O，在培养的第 2、3、4 和 5 天观察这些平板。

[0111] 为了测试这些细胞的软骨形成能力，在 1150rpm 下离心 $2x10^5$ 个细胞 5 分钟以便获得作为沉淀的细胞。一旦除去上清液，就将细胞保持在补充有 10ng/ml 转化生长因子 -β (TGF-β)（以及任选地补充有 10^{-7}M 地塞米松）的 SM 中。每隔 2 天更换一次经补充的培养基，保持培养 3-5 周，此刻收获它们用于组织学（通过用 10％中性福尔马林缓冲液 (NFB) 固定）、包埋于石蜡中、切成 6μm 切片以及为胶原 II 的存在（抗体染色）以及氨基葡聚糖的存在（阿尔新蓝染色）进行染色。为了评价细胞的生脂分化能力，将它们最初于 6 孔平板的 SM（含有 D-MEM) 中培养，每隔 2 天更换一次培养基，直至它们达到 60％汇合为止。此刻用生脂诱导培养基 (AIM)(88％ D-MEM、3％ FBS、33μM 生物素、17μM 泛酸盐、5μMPPAR-γ、100nM 牛胰岛素、1μM 地塞米松、200μM 异丁基甲基黄嘌呤和 10％抗生素）更换培养基。每隔 2 天更换一次 AIM，持续 10 天，此刻在 10％ NFB 中固定细胞并用油红 O（其将脂肪细胞的脂质泡染成红色）染色。最后，为了评价细胞的生肌能力，将它们最初于 T-75cm^2 组织培养烧瓶的 SM（含有 D-MEM) 中培养，直至它们达到 80-90％汇合为止，此刻用生肌培养基 (MM)(75％ D-MEM、10％ FBS、10％马血清、50μM 氢化可的松和 10％抗生素）更换培养基。每隔 2 天更换一次 MM。培养 3-5 周后，从培养表面移出细胞（参见传代培养实验方案），裂解细胞以便获得它们的 mRNA，并通过 rtPCR 评价几种生肌基因的存在，所述生肌基因包括 :MyoG、MyoD1、Myf5、肌球蛋白重链、成肌蛋白和结蛋白。

[0112] 已采用了另一种对于获得血管周围组织来源的祖细胞培养物有用的方法，使用了下列实验方案 :

[0113] 1. 从剖宫产患者中获得无菌脐带 (UC) 并转移到生物学安全工作橱中，置于培养基 (80％ α -MEM、20％抗生素）中。

[0114] 2. 在无菌的 37℃磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中洗涤 UC3 次。

[0115] 3. 使用锋利的剪刀将 UC 切成大约 1-2 英寸的切片。

[0116] 4. 在无菌 37℃ PBS 中洗涤每一 UC 切片 2 次以尽可能多地除去残留的脐带血 (UCB)。

[0117] 5. 分离一个 UC 切片置于干燥的无菌皿上。

[0118] 6. 利用两副镊子，夹持大约 2mm 间隔的上皮，并彼此拉离，撕裂上皮。

[0119] 7. 夹住上皮，沿着 UC 切片的长度方向持续撕裂上皮，暴露底下的 WJ。

[0120] 8. 类似于步骤 6，持续撕裂上皮为‘条带’，直至大约一半的上皮撕掉为止。

[0121] 9. 脐血管应当通过 WJ 清晰可见，并且血管末端松散地搭 UC 切片的切口上。

[0122] 10. 通过用一副镊子夹住上皮的剩余部分，并用另一副镊子夹住血管的末端，可将血管从带有环绕其的血管周围组织 (PVT) 的大部分 WJ 中“拉出”。

[0123] 11. 对每一条血管重复该处理，直至所有三条血管都不含有底下的 WJ 基质为止。

[0124] 12. 一旦释放，就将每一条血管置于 37℃ PBS 中。

[0125] 13. 对每一 UC 切片重复步骤 5-12，直至所有的血管都分离于无菌的充满 37℃ PBS

的烧杯中为止。

[0126] 14. 然后，通过将每条血管单独置于清洁的、无菌表面上，利用缝合线打双结将血管末端连接在一起形成‘环’。

[0127] 15. 一旦所有的血管都已连接成环，就将环置于无菌的50ml管中的0.5mg/ml胶原酶溶液中。在备选的方案中，并根据本发明，可冷冻血管，低温保存并接着恢复，利用本发明的方法保持驻留的祖细胞(HUCPVCs)的存活力，还可利用步骤15中一开始的方法回收驻留在解冻和处理的脐带组织中的活的祖细胞。

[0128] 16. 将该50ml管置于旋转器中，于37℃，5％ CO_2 的保温箱中过夜。

[0129] 17. 第二天，用1ml胎牛血清(FBS)灭活胶原酶，并将环从悬浮液中移除。

[0130] 18. 用PBS稀释残留的悬浮液，在1150rpm下离心5分钟，并弃去上清液。

[0131] 19. 然后在室温下将沉淀重悬于8倍体积的4％ NH_4Cl 中5分钟以裂解所有红细胞污染物，接着在1150rpm下离心5分钟，并弃去上清液。

[0132] 20. 将保留在沉淀中的细胞重悬于经补充的培养基(SM)(75％ α-MEM、15％FBS、20％抗生素）中，并在血细胞计数器上对等分试样计数，

[0133] 21. 接着，将细胞悬浮液铺板于T-75组织培养聚苯乙烯烧瓶上，并使之增殖。

[0134] 22.2天后，从烧瓶中将上清液转移到新的T-75烧瓶中，以便收获“粘附后”(PA)细胞。

[0135] 23.2天后，从第一PA烧瓶中将上清液转移到新的T-75烧瓶中，以便收获任何残留的PA细胞。

[0136] 24. 每隔2天更换一次所有三个T-75烧瓶中的SM，直至细胞达到亚汇合(1-2周）为止，此刻它们是传代培养的（传代的）。

[0137] 完整的脐带血管的低温保存

[0138] 本发明容许从低温保存的脐带组织中回收活细胞，使用了下列例证性的方法：

[0139] 冷冻

[0140] 如上所述分离单条脐带血管，并如上所述用缝合线将血管末端打结形成环。将血管置于15mL聚丙烯管中，每一聚丙烯管含有5mL的由90％胎牛血清(FBS)和10％二甲亚砜(DMSO)组成的低温保存培养基。然后将制备好的管置于-70C冷冻机中过夜，并在第2天转移到液氮中进行长期保存。

[0141] 解冻

[0142] 在保存3天后将含有所制备的样品的管从液氮中移出，并立刻置于37C水浴中。一旦完全解冻，大约5分钟，就将样品环置于如上所述的胶原酶消化介质中并放置在37C保温箱的旋转架(rotisserie)中。在18-24小时温育后，移除被消化的血管，并使用上述方法分离祖细胞。亦如上所述，在铺于组织培养平板上并在5-15％FBS补充的培养基中培养之后，通过台盼蓝排除鉴定活细胞。

[0143] 如下所述还开发了一种改良的方法。使用如上所述的取出技术从脐带上取出具有缔合的脐带胶质的血管并切成约1-2英寸或约4cm长的片段。然后将取出的血管片段（约5-10个片段／管，以避免拥挤）置于50mL离心管的10％DMSO和90％FBS（冷却的，@4℃）中，每条血管1mL。可使用不同的含血清混合物或掺和物取代90％FBS，如10％血清(FBS或其他）和80％DMEM或其他适合于细胞培养的培养基。接着通过首先在4℃冰箱中温育

30 分钟过渡地冷却含有处于 DMSO/ 血清溶液中的血管片段的管。然后将管取出，并将血管转移到被称为低温管的低温保存容器中。一条血管片段添加到一个管中。向含有血管的低温管添加每 4cm 血管切片 1mL 或足以完全浸没血管的低温防护溶液（如上所述 90％血清，10％ DMSO）。

[0144] 接着将低温管藏的血管片段置于控速冷冻机中过夜（约 6-12 小时），降温温度并保持在约 -70℃。此后，将管转移到液氮储存（气相）中，标记用于识别，并在 -196℃下保持约 1 周。

[0145] 为解冻血管，从液氮储存中移出低温管。从低温管中取出血管，并在 37℃水浴中让其解冻 10 分钟。接着将血管片段转移到 50mL 管中，并在冷的 (4C)PBS 中洗涤，每条血管片段使用约 1mL 的 PBS。然后在 4℃下于冰箱中温育含有处于 PBS 中的血管片段的管，以除去 DMSO。然后加倍每个管中冷的 PBS 的量，并在冰箱中将管温育额外的 5 分钟。

[0146] 在该步骤后，特别是根据本文中进一步描述的祖细胞提取、培养和分化技术，血管片段就随时可作为活的祖细胞包括 HUCPVCs 的来源。

[0147] 为证实活细胞可回收自如此保存的组织，对血管片段进行如上所述的消化步骤，根据图 22 所描述的将所释放的细胞铺板，并使用台盼蓝排除在 ViCell-XR 机器中对细胞计数。在此之后，将确定为活的细胞铺于如本文中所提及的标准培养基中，并如图 22A 和 B 中所示的证实它们形成集落和增殖的能力。

[0148] 该方法产生了生物学等价于从标准消化步骤中取出的细胞的细胞。

[0149] 已尝试了其他方法，包括将解剖出的组织浸没于 10％ DMSO 中，然后的步骤是在 -70C 下冷冻，接着低温保存。如图 22C 中所示，这些方法产生了非常少的活细胞。

[0150] 祖细胞测定

[0151] 细胞增殖测定

[0152] 在每周一次的传代步骤中（每隔 6 天发生一次），将 3x 10^4 个细胞的等分试样铺于 24 块 6- 孔组织培养聚苯乙烯平板的每个孔中。在培养的第 1、2、3、4、5 和 6 天，对 6- 孔平板中的 4 个孔进行传代并计数细胞。对这些细胞的指数扩增进行作图，并计算在这些培养中细胞的平均倍增时间。结果示于图 16 中。注意到在整个培养过程中 PVWJ 细胞培养的倍增时间为约 24 小时。在对数期，值得注意的是倍增时间为 16 小时。将其与文献所报道的骨髓间充质细胞的约 33-36 小时 (Conget 和 Minguell，1999) 以及来源于脂肪组织的间充质干细胞的约 3.2 天 (Sen 等，2001) 的倍增时间相比较。为了观察具有连续传代的增殖，将 3x10^5 个细胞铺于 4 个 T-75 烧瓶 (n ＝ 4) 中并用 SM 补料，每隔 2 天更换一次。在培养 6 天后，传代培养细胞（参见上述传代培养实验方案），并借助于血细胞计数器计数。将 3x10^5 个细胞的等分试样接种于 4 个新的 T-75 烧瓶中，培养 6 天，并重复计数步骤。对于 4 个脐带样品从 P0 至 P9 重复该步骤。

[0153] 图 18 图解说明了 HUCPVCs 的 CFU-F 频率。1 ： 300 的频率明显高于对其他间充质祖细胞源所观察到的，包括新生儿 BM(1 ： 10^4)(Caplan，1991) 和脐带血来源的“不受限制的体干细胞”(USSCs)(Kogler 等，2004)，其出现频率为 1 ： 2x10^8。图 19 图解说明了连续传代时 HUCPVCs 的增殖率。在 P0 最初的 60 小时倍增时间下降到在 P1 的 38 小时，从 P2-P8 其下降并自身保持在 20 小时。此后细胞开始进入衰老并且它们的增殖速度开始快速下降。有趣的是，当在培养的最初 30 天期间观察时（图 20），在 30 天内 HUCPVCs 产生了

$2x10^{10}$ 个细胞。由于一个治疗剂量 (TD) 定义为 $2x10^5$ 个细胞 (Horwitz 等,1999)(Horwitz EM, ProckopDJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M 等 Transplantabilityand therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells inchildren with osteogenesis imperfecta. Nat Med 1999 ;5 :309-313.),因此在 10 天的培养中 HUCPVCs 可产生 1TD,并且在 24 天的培养中产生了 1,000TDs。

[0154] 如图 15 中所示,血管周围组织来源的祖细胞包含不同的祖细胞亚群。在该细胞群中,存在特征在于如本文中所示的在诱导这样的分化通常所需的培养补充物不存在下,如在地塞米松存在下培养,具有形成骨小结能力的所谓的“定向”骨祖细胞。因此,这些定向骨祖细胞自发分化形成骨小结。还包含在祖细胞群中的是当在必需因子如地塞米松、β-磷酸甘油和抗坏血酸存在下培养时可被诱导形成骨小结的成骨细胞。因此,描绘于图 15 中的“总成骨祖细胞”亚群诱导了“定向成骨祖细胞”群以及“未定向成骨祖细胞”群,并揭示了沿着成骨分化途径可被诱导分化的细胞总数。在“定向”和“未定向”细胞群之间的实际比率为大约 1 ： 1,并且在“总成骨祖细胞”群和“定向成骨祖细胞”群之间这样的比率为约 2 ： 1。如下所述进行祖细胞成骨特性的分析。

[0155] 还已观察到细胞的软骨形成、生脂和生肌分化。尽管自发观察到成骨分化和偶然的生脂分化,但仅在用于相应表型的特定诱导条件下培养时才观察到其他表型。

[0156] 连续稀释和 CFU-F 测定

[0157] 将 HUCPVCs 的 $1x10^5$、$5x10^4$、$2.5x10^4$、$1x10^4$、$5x10^3$、$1x10^3$ 稀释物接种在 6-孔组织培养平板 (Falcon#353046) 上并每隔 2 天补料 SM 一次。在培养的第 10 天计数每个孔中包含 ＞ 16 个细胞的集落的数目,并在第 14 天确认。从而,将 CFU-F 频率 (产生一个集落所需的细胞平均数目) 确定为 1CFU-F/300 个铺板的 HUCPVCs。基于该频率,计算提供 300HUCPVCs 所需的单位体积 (对 3 条脐带的每一条重复三次),将 8 倍增加的单位体积的 HUCPVCs 接种在 6- 孔平板的单个孔中。再一次,在培养的第 10 天计数包含 ＞ 16 个细胞 (CFU-Fs) 的集落以测定采用增加接种的 CFU-F 频率。

[0158] CFU-O 测定

[0159] 在每周一次的传代步骤期间,将测试细胞群的等分试样直接铺于组织培养聚苯乙烯中的骨形成培养基上,该骨形成培养基含有 75％ α-MEM,15％ FBS(StemCell 批号 : S13E40),含有青霉素 G(167 单位 /ml)、庆大霉素 (50μg/ml) 和两性霉素 B(0.3μg/ml) 的 10％抗生素储液,和 Dex(10^{-8}M),β-磷酸甘油 (5mM) 以及 L-抗坏血酸 (50ug/ml),细胞接种密度为 $1x10^4$ 个细胞 /cm^2。每隔 2 天对培养物再补料一次,持续 12 天。保持培养物直至观察到作为骨小结检测到的矿化的小结区为止 (通常 3 天),此刻在最后一次培养物再补料中用含四环素培养基对培养物再补料,然后在 Karnovsky 氏固定剂中固定并准备用于分析。在相差和 UV 荧光下用 Leitz Aristoplan 显微镜 (Esselte Leitz GmbH&Co KG,Stuttgart, Germany) 观察四环素标记的培养物,并用 Hitachi S-2000 扫描电镜在 15kV 的加速电压下来产生证实存在形态学上可辨认的骨基质的图像。

[0160] CFU-C 测定

[0161] 为了测试这些细胞的软骨形成能力,在 1150rpm 下离心 $2x10^5$ 个细胞 5 分钟以便获得作为沉淀的细胞。一旦除去上清液,就将细胞保持在补充有 10ng/ml 转化生长因子 -β (TGF-β)(以及任选地补充有 10^{-7}M 地塞米松) 的 SM 中。每隔 2 天更换一次经补充

的培养基，保持培养物3-5周，此刻收获它们用于组织学（通过用10％中性福尔马林缓冲液(NFB)固定）、包埋于石蜡中、切成6μm切片以及为胶原II的存在（抗体染色）以及氨基葡聚糖的存在（阿尔新蓝染色）进行染色。染色证实在诱导条件下形成软骨细胞。

[0162] CFU-A测定

[0163] 为了评价细胞的生脂分化能力，将它们最初于6孔平板的SM（含有D-MEM）中培养，每隔2天更换一次培养基，直至它们达到60％汇合为止。此刻用生脂诱导培养基(AIM)(88％D-MEM、3％FBS、33μM生物素、17μM泛酸盐、5μM PPAR-γ、100nM牛胰岛素、1μM地塞米松、200μM异丁基甲基黄嘌呤和10％抗生素）更换培养基。每隔2天更换一次AIM，持续10天，此刻在10％NFB中固定细胞并用油红O（其将脂细胞的脂质泡染成红色）染色。染色证实了不仅在诱导条件下，还在这些条件不存在的情况下（即自发地）形成了脂肪细胞。

[0164] CFU-M测定

[0165] 为了评价细胞的生肌能力，将它们最初于T-75cm^2组织培养烧瓶的SM（含有D-MEM）中培养，直至它们达到80-90％汇合为止，此刻用生肌培养基(MM)(75％D-MEM、10％FBS、10％马血清、50μM氢化可的松和10％抗生素）更换培养基。每隔2天更换一次MM。在培养3-5周后，从培养表面移出细胞（参见传代培养实验方案），裂解以便获得它们的mRNA，并通过rtPCR评价几种生肌基因的存在，所述生肌基因包括：MyoG、MyoD1、Myf5、肌球蛋白重链、成肌蛋白和结蛋白。结果证实在这些诱导条件下存在肌细胞。

[0166] 数据分析

[0167] 四环素染色

[0168] 在终止前添加四环素(9μg/ml)到培养物中。在终止时，在Karnovsky氏固定剂中固定细胞过夜，然后通过UV-激发的荧光成像观察小结区矿物成分的四环素标记。

[0169] 扫描电子显微术(SEM)

[0170] 通过首先将CFU-O培养物置于70％、80％、90％和95％乙醇中1小时，然后浸没于100％乙醇中3小时，制备用于SEM的CFU-O培养物的代表性样品。接着在临界点干燥它们。用Polaron SC515SEM涂层系统将大约3nm的金层溅涂在样品上，然后在Hitachi S-2000扫描电镜中于15kV的加速电压下在不同的放大倍率下观察。将所产生的图像用于证实形态学上可辨认的骨基质的存在。

[0171] 用于HLA-分型的流式细胞术

[0172] 在含有2％FBS(StemCell批号：S13E40)的PBS中洗涤＞1x10^5个细胞的测试细胞群，并在4℃下重悬于具有饱和浓度（1：100稀释）的下列缀合的小鼠IgG1HLA-A,B,C-PE和HLA-DR,DP,DQ-FITC的PBS+2％FBS中30分钟。用PBS+2％FBS洗涤细胞悬浮液两次，用1μg/ml 7-AAD(BD Biosciences)染色并重悬于PBS+2％FBS中用于在使用ExpoADCXL4软件(Beckman-Coulter)的流式细胞仪(XL,Beckman-Coulter,Miami,FL)上的分析。阳性染色定义为超过来自于用匹配的同种型抗体(FITC-和PE-缀合的小鼠IgG1，κ单克隆同种型抗体标准物，BD Biosciences)染色的对照细胞群的＞99％的细胞所获得的水平的荧光信号发射。对于每一样品，收集至少10,000个列表形式(list mode)的事件。在EXPO32ADC分析软件中产生所有的图。

[0173] 除HLA分型之外，还评价了HUCPV细胞群的其他标志，结果如下：

[0174]

标志	表达
CD105(SH2)	++
CD73(SH3)	++
CD80(rhy1)	++
CD44	++
CD117(c-klt)	15% +
MHCI	75% +
MHCII -	
CD108(VCAM1) -	
STRO1 -	
CD123(IL-3) -	
SSEA-4 -	
Oct-4 -	
HLA-G -	
CD34 -	
CD235a(血型糖蛋白 A) -	
CD45 -	

[0175] 结果

[0176] 骨小结集落的光学显微照片

[0177] 图3、4和5图解说明了在第3天和第5天CFU-O存在于培养物中。它们证实了环绕在小结区域周围的“成纤维细胞样”细胞的汇合层由产生骨基质的多角形细胞的‘聚集物’所代表。在Dex(+)和Dex(-)培养物中都观察到了这些CFU-O,并在连续传代期间显示类似的形态学。

[0178] CFU-O培养物的四环素标记

[0179] 培养物的四环素标记用于标记与骨的生物矿化阶段有关的新形成的磷酸钙。通过将培养物暴露于紫外线显示,培养物的四环素标记与矿化小结区符合。图6和7描绘了祖细胞培养第3天和第5天的四环素标记的CFU-O培养物。这些图像是通过UV-激发的荧光成像产生并拍照的。

[0180] 扫描电子显微术

[0181] 对于矿化胶原基质的形成,在SEM下观察CFU-O,其证实了从最初的胶原形成阶段到成熟的CFU-O中稠密矿化的基质的CFU-O形成。图8、9、10、11、12和14是CFU-O的扫描电镜照片。

[0182] 流式细胞术和HLA-分型

[0183] 鉴定表现两种主要组织相容性复合体(MHCs)的细胞表面抗原的流式细胞术证实了77.4%的分离的细胞群为MHC-/-。图13图解说明了相对于阴性对照的流式细胞术结果。图17显示了在祖细胞群中冻融对MHC-/-细胞频率的影响。对该冻融影响的研究如下:

[0184] 在含有2%FBS的PBS中洗涤>$1x10^5$个细胞的测试细胞群,并在4℃下重悬于具有饱和浓度(1:100稀释)的下列缀合的小鼠IgG1HLA-A,B,C-PE(BD Biosciences#555553, 批号M076246)(MHC I)、HLA-DR,DP,DQ-FITC(BD Biosciences#555558, 批号M074842)(MHCII)和CD45-Cy-Cychrome(BD Biosciences#555484,批号0000035746)的PBS+2%FBS中30分钟。用PBS+2%FBS洗涤细胞悬浮液两次,并重悬于PBS+2%FBS中用于在使用ExpoADCXL4软件(Beckman-Coulter)的流式细胞仪(XL,Beckman-Coulter,Miami,FL)上的分析。阳性染色定义为超过来自于用匹配的同种型抗体(FITC-、PE-和Cy-cy chrome-缀合的小鼠IgG1,κ单克隆同种型标准物,BDBiosciences)染色的对照细胞群的>99%的细胞所获得的水平的荧光信号发射,其通过人BM样品的阳性荧光得以证实。对于每一样品,收集至少10,000个列表形式(list mode)的事件。在EXPO 32ADC分析软件中产生所有的图。

[0185] 传代培养和细胞接种

[0186] 7天后利用0.1%胰蛋白酶溶液传代培养(传代)粘附细胞,此刻如通过光学显微镜所观察到的它们显示80-90%汇合。刚一传代,就通过流式细胞术观察到细胞表达MHC-A,B,C、MHC-DR、DP、DQ和CD45。然后以$4x10^3$个细胞/cm^2将它们铺于T-75组织培养聚苯乙烯烧瓶的SM中,并用10^{-8}M Dex、5mM β-GP和50μg/ml抗坏血酸处理以测试这些细胞的成骨能力。在为了CFU-O或骨小结形成的培养的第2、3、4、5和6天观察这些烧瓶。还对任何来自传代步骤的残留细胞进行低温保存供未来使用。

[0187] 细胞的低温保存

[0188] 在由90%FBS,10%二甲亚砜(DMSO)(Sigma D-2650,批号11K2320)组成的1ml总体积中制备$1x10^6$个PVT细胞的细胞等分试样,并移液到1ml聚丙烯低温管形瓶中。将管形瓶置于-70℃冷冻机中过夜,第二天转移到-150℃冷冻机中进行长期保存。在低温保存

一周后，解冻 PVT 细胞并通过流式细胞术观察 MHC-A，B，C、MHC-DR，DP，DQ 和 CD45 的表达。使用了另一种实验方案，其中在一周低温保存后解冻 PVT 细胞，再培养一周，接着通过流式细胞术再次分析传代培养中 MHC-A，B，C、MHC-DR，DP，DQ 和 CD45 的表达。

[0189] 结果示于图 17 中。注意到通过几次传代新鲜细胞群中 MHC-/- 的频率仍得以保持。当在传代后于 -150℃冷冻新鲜的细胞 1 周并立刻分析 MHC 表型时，该被分析的细胞群显示显著增加的 MHC-/- 表型细胞频率。因此，通过冷冻，MHC-/- 表型的细胞能有效地富集自 PVT 细胞群。刚一传代前述冷冻细胞的培养物，就能实现更进一步的富集。特别是，并如图 17 中所见的，低温保存的细胞的第一次传代增加 MHC-/- 细胞的相对群体至大于 50％，并且继续冷冻和传代的那些细胞产生了大于 80％、85％、90％和 95％的 MHC-/- 群。由于它们的非免疫原性特性，在人类治疗中冷冻的 PVT 细胞自身可能是非常有用的。

[0190] 粘附后 HUCPV 细胞级分的收获

[0191] 可以如下方式增加回收自血管周围组织的祖细胞的产量。为了收获 HUCPVCs 的“粘附后”(PA) 级分，将最初接种的 HUCPV 收获物的上清液重新铺于新的 T-75 烧瓶上，并在 37C，5％ CO_2 下温育 2 天。然后用新鲜的 SM 补料最初接种的 HUCPV 烧瓶。2 天后，将上清液再次转移到新的 T-75 烧瓶中，并给粘附的细胞补料新鲜的 SM。最后，吸出第三次接种的烧瓶的上清液，并给烧瓶补料新鲜的 SM（因此，对于每一脐带，产生了 3 个烧瓶：最初接种的烧瓶、第一 PA 级分和第二 PA 级分）。类似于与最初接种的细胞相比较所见的这些细胞的相同的特性，证实了通过分离这些 PA 级分获得了更高的细胞产率。类似于最初接种的 HUCPVCs，这些 PA 细胞在培养中具有快速的增殖速度、自发产生骨小结，并能被诱导分化为其他三种细胞系：软骨、脂肪和肌肉。

[0192] 包含祖细胞的组织工程化组合物

[0193] 在该实施例中，将细胞与以通常用于骨工程化领域的 CAP/PLGA 形式存在的载体结合。为了接种 CAP/PLGA 支架，将它们切成 5mmx5mm 的圆柱体。然后，将 200μl 的 $2x10^5$HUCPVCs 的悬浮液置于无菌的 1.5ml eppendorf 管中，并将支架放入该悬浮液中。利用改变的移液管口（具有 5mm 的吸口直径），吸入细胞悬浮液并通过往复移液操作彻底洗涤支架几次。然后，在 37℃，5％ CO_2 下将支架在该悬浮液中温育 4 小时，以容许细胞与支架附着。4 小时后，从悬浮液中取出支架并置于无组织培养处理的 24- 孔平板的各个孔中，补料 1ml 的 SM 并在 37℃，5％ CO_2 下温育 14 天，每隔 2 天更换一次 SM。然后将支架在 Karnovsky 氏固定剂中固定并准备用于 SEM 分析（见上）。在 14 天培养后，HUCPVCs 完全覆盖了支架。

[0194] 如所述的，通过在适合于这样的分化的条件下培养，PVT 祖细胞群还可用于产生间充质细胞以及除骨之外的组织。为了产生脂肪细胞，例如，制备 10^4 个细胞 /cm^2 浓度的祖细胞并铺于 35mm 组织培养皿中。细胞在前脂肪细胞培养基 (PM)(DMEM/Ham′ s F-10(1 ： 1，v/v)、10％胎牛血清、15mM HEPES、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素、0.25μg/ml 两性霉素 B) 中培养 3 天。在 3 天后，除去 PM，并将生脂培养基 (DMEM/Ham′ s F-10 营养肉汤，1 ： 1，v/v；HEPES 缓冲液 (15mM)；胎牛血清 (3％)；生物素 (33MVI)、泛酸盐 (17P-M)、人胰岛素 (100nM)、地塞米松 (0.5H-M)、PPARY 激动剂 (1H-M) 和抗生素）补料给细胞，接着培养 3 天。在诱导 3 天后，除去生脂培养基，并将培养物于脂肪细胞培养基 (AM)(DMEM/Ham′ s F-10(1 ： 1，v/v)、3％胎牛血清、1μM 地塞米松、100nM 人胰岛素、33μM D- 生物素、17μM 泛酸钠、15mMHEPES、100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素，0.25μg/ml 两性霉素 B) 中培养，每

隔 3 天定期补料，确保仅除去一半的培养基，再补料相等体积的 AM，因为如果除去所有的培养基，脂细胞会浮起。在四次补料（12 天）后，细胞看起来环绕着脂质小滴。可通过用油红 O 和尼罗红染色证实间充质细胞分化为脂细胞的阳性鉴定。

[0195] 类似地，可利用以 10^4 个细胞 /cm^2 浓度制备并铺于 35mm 组织培养皿中的细胞悬浮液产生软骨细胞。为促进软骨形成，在没有血清以及具有转化生长因子 -β 3 下培养细胞。在培养期间细胞沉淀发展为多层的富集基质的形态学，并且在组织学上显示增加的富集蛋白多糖的细胞外基质。

[0196] 为了产生成肌细胞，制备 10^4 个细胞 /cm 浓度的细胞悬浮液并铺于 35mm 组织培养皿中。将细胞在补充了 15％胎牛血清 (FBS) 的 MCDB120 培养基的中保持 1 周（成肌细胞增殖培养基，MPM)。在 1 周时，基础培养基 (MPM) 中血清水平下降至 2％（成肌细胞分化培养基，MDM)，并在 7 天后终止培养。用适当的培养基对培养物再补料，一周三次。

[0197] 因此，应当理解本发明提供了可作为活的人祖细胞有效来源的低温保存的脐带组织，所述活的人祖细胞具有用于产生不同的结缔组织，包括骨以及无免疫能力的且理想地用于移植给人患者以治疗结缔组织状况，包括骨疾病和病症的祖细胞的特性。该人祖细胞产生自从邻近脐带血管外壁伸出的称为血管周围区的人脐带胶质特定区域的提取物。提取自该区域的细胞群显示了值得注意的特性，包括快速增殖、细胞形态改变，为如下事实所证明：在所有的传代培养烧瓶（大约 7-10 次倍增）中第 7 天前出现细胞集落形成和不添加成骨补充物到培养基中出现骨小结形成，以及相对高频率的 MHC 双阴性细胞，刚一培养已冷冻的细胞其频率就增加。

[0198] 当在本文中使用时，术语“约”指为该术语所限定的值 +/-10％的值。因此，“约 -70C”的温度可指载 63C-77C 范围内的温度。

[0199] 下列文献在此并入作为参考：

[0200] 引用的参考文献

[0201] Aubin, JE, 1998, Bone stem cells :JCell Biochem Suppl, v. 30-31, p. 73-82.

[0202] Canfield, AE, M J Doherty, B A Ashton, 2000, Osteogenic potential of vascularpericytes, in JE Davies(ed), Bone Engineering :Toronto, EM Squared, Inc., p. 143-151.

[0203] Caplan, AI, 1991, Mesenchymal stem cells :J Orthop. Res, v. 9, p. 641-650.

[0204] Chacko, AW, SRM Reynolds, 1954, Architecture of deistended and nondistendedhuman umbilical cord tissues, with special reference to the arteries and veins. :Carnegie Institution of Washington, Contributions to Embryology, v. 35, p. 135-150, Conget, P, JJ Minguell, 1999, Phenotypical and functional properties of human bonemarrow mesenchymal progenitor cells :J. Cell Physiol, v. 181, p. 67-73.

[0205] Haynesworth, SE, D Reuben, A I Caplan, 1998, Cell-based tissue engineeringtherapies :the influence of whole body physiology. :Adv DrugDeliv Rev, v. 33, p. 3-14.

[0206] Kogler, G, S Sensken, J A Airey, T Trapp, M Muschen, N Feldhahn, S Liedtke, R VSorg, J Fischer, C Rosenbaum, S Greschat, A Knipper, J Bender, O Degistirici,

J Gao, A I Caplan, EJColletti, G Almeida-Porada, H W Muller, E Zanjani, P Wernet, 2004, A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotentdifferentiation potential :J Exp.Med., v.200, p.123-135.

[0207] Mitchell, KE, M L Weiss, B M Mitchell, P Martin, D Davis, L Morales, B Helwig, MBeerenstrauch, K Abou-Easa, T Hildreth, D Troyer, 2003, Matrix cells fromWharton' s jelly form neurons and glia :Stem Cells, v.21, p.50-60.

[0208] Parry, EW, 1970, Some electron microscope observations on the mesenchymalstructures of full-term umbilical cord :Journal of Anatomy, v.107, p, 505-518.

[0209] Pereda, J, P M Motta, 2002, New advances in human embryology : morphofunctionalrelationship between the embryo and the yolk sac :Medical Electron Microscopy, v.32, p.67-78.

[0210] Romanov, YA, V A Svintsitskaya, V N Smirnov, 2003, Searching for alternativesources of postnatal human mesenchymal stemcells :Candidate MSC-like cells fromumbilical cord :Stem Cells, v.21, p.105-110.

[0211] Schoenberg, MD, A Hinman, R D Moore, 1960, Studies on connective tissue V, Feberformation in Wharton' s Jelly. :L aboratory Investigation, v.9, p.350-355.

[0212] Sen, A, Y R Lea-Currie, D Sujkowska, D M Franklin, W O Wilkison, Y D Halvorsen, J M Gimble, 2001, Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells frommultiple donors is heterogeneous :J.Cell Biochem., v.81, p.312-319.

[0213] Takechi, K, Y Kuwabara, M Mizuno, 1993, Ultrastructural and immunohistochemicalstudies ofWharton' s jelly umbilical cord cells :Placenta, v.14, p.235-245.

[0214] Tuchmann-Duplessis, H, G David, P Haegel, 1972, Illustrated Human Embryology, New York, Springer-Verlag, p.54-61.

[0215] Weiss, L, 1983, Histology :cell and tissue biology, New York, Elseiver Biomedical, p.997-998.

[0216] Wharton, TW, 1656, Adenographia, Translated by Freer S. (1996). Oxford, U.K., Oxford University Press, p.242-248.

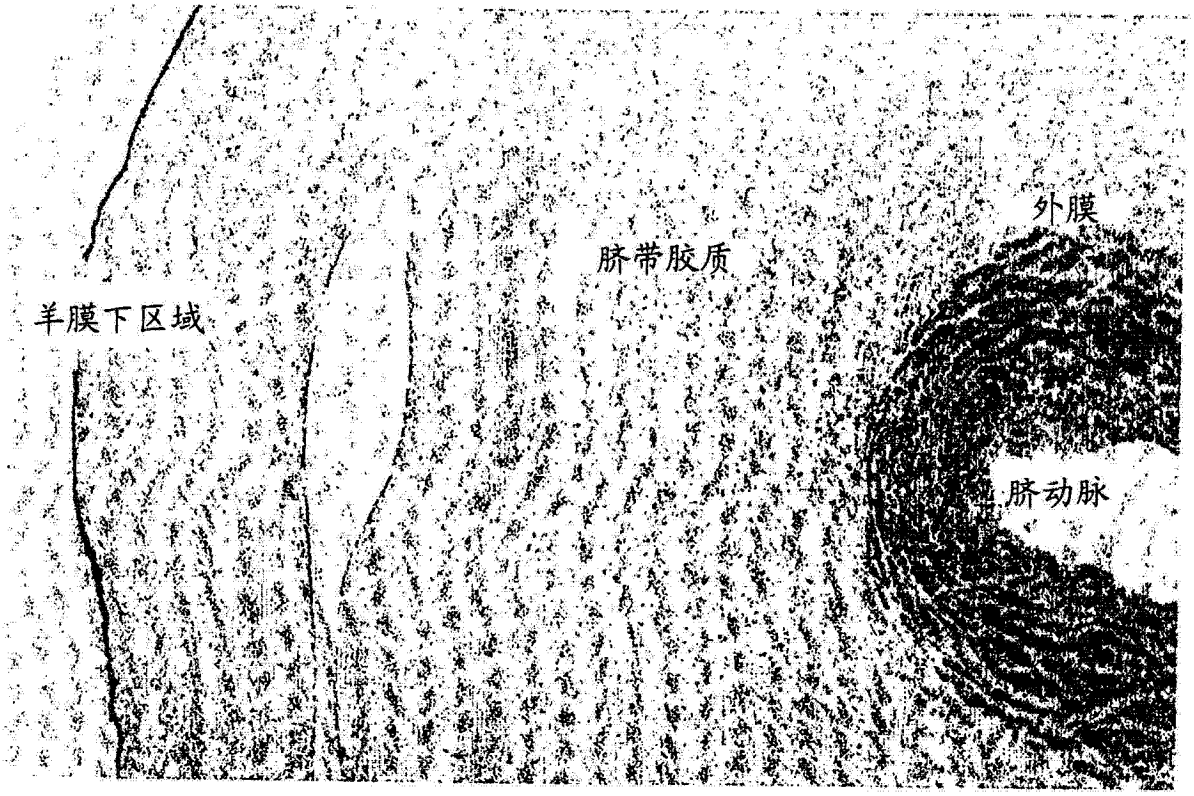


图 1

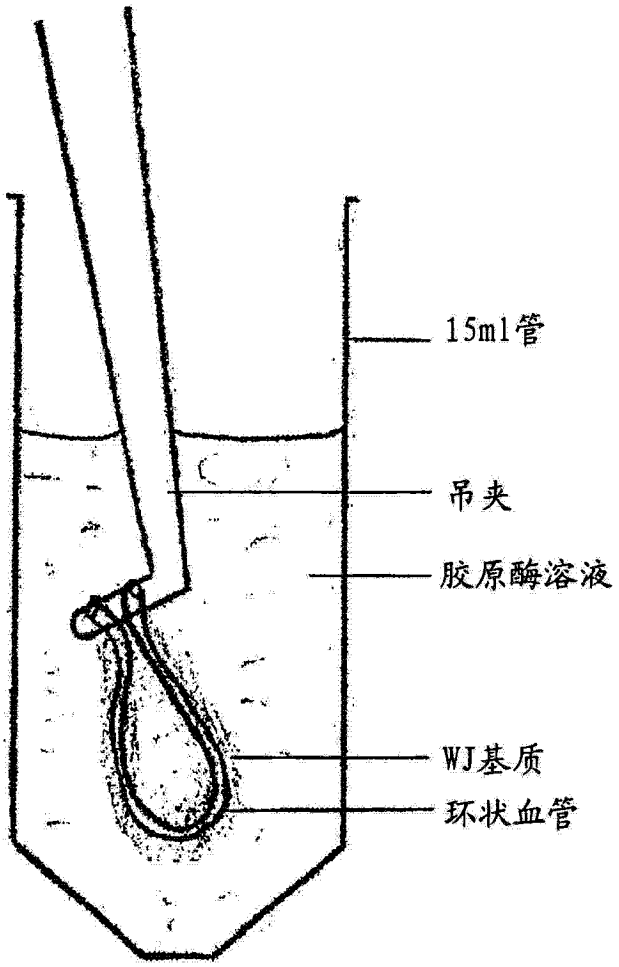


图 2

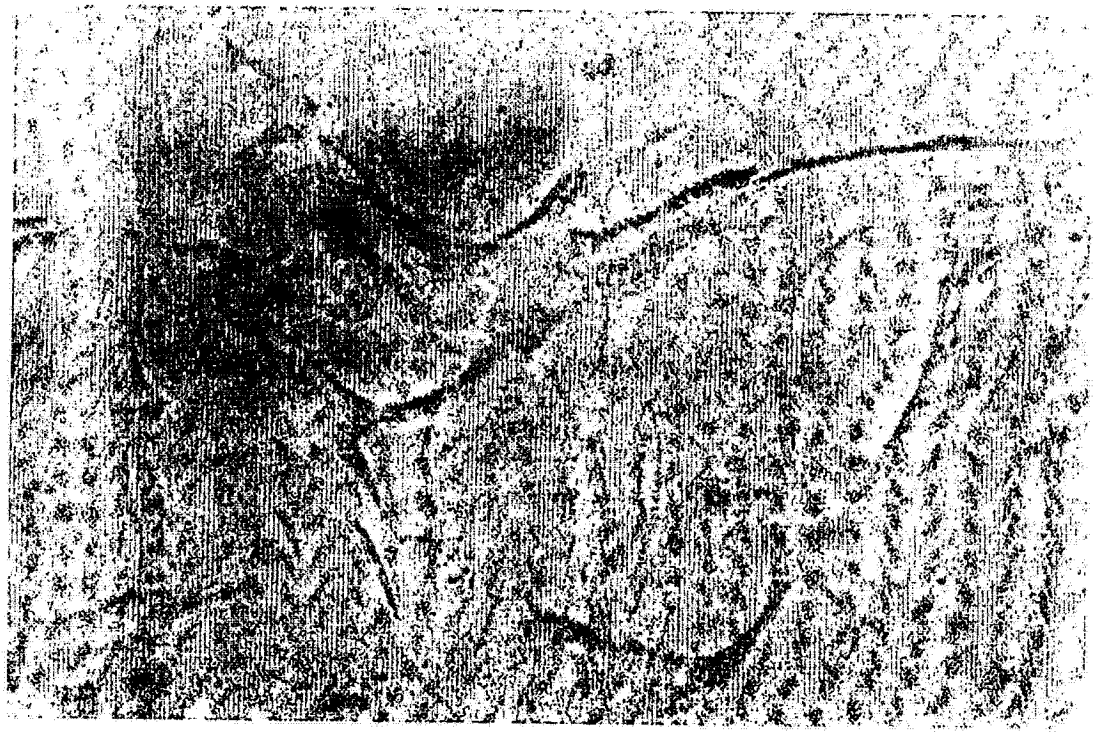


图 3

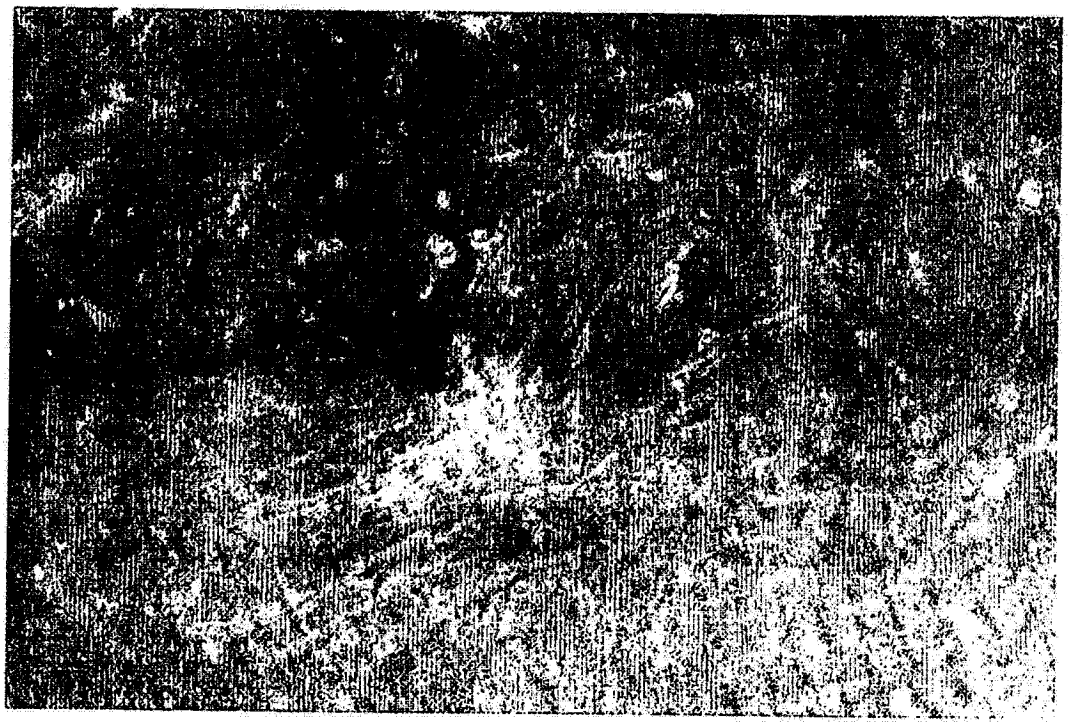


图 4

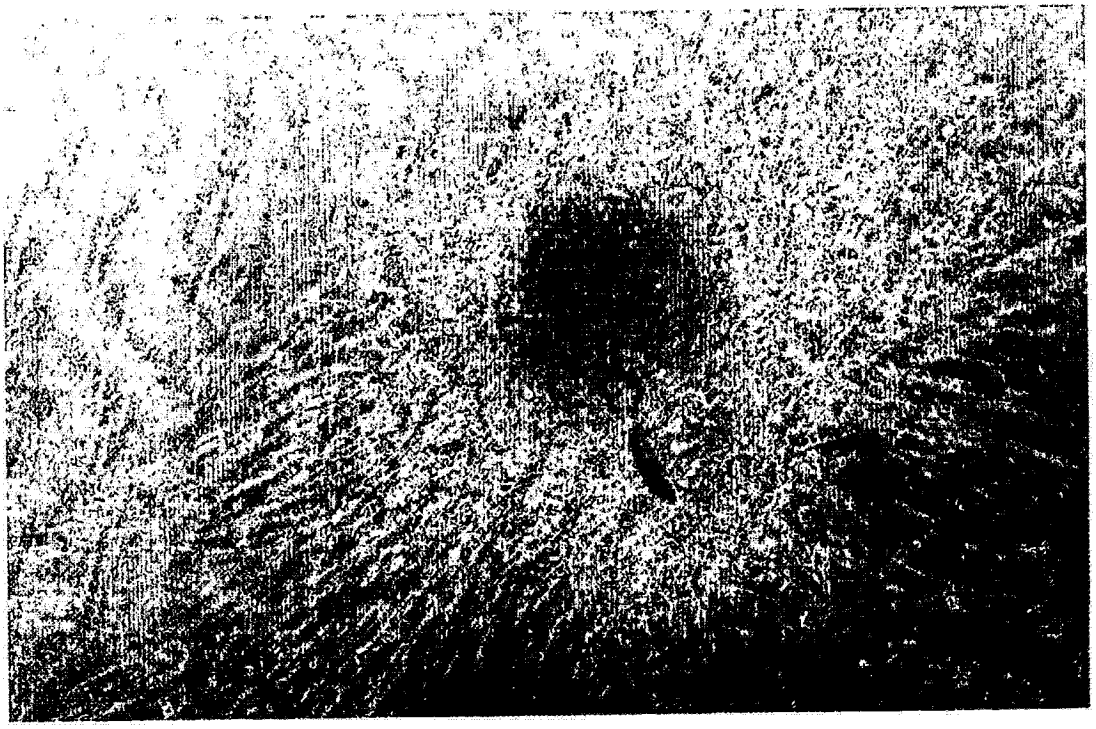


图 5

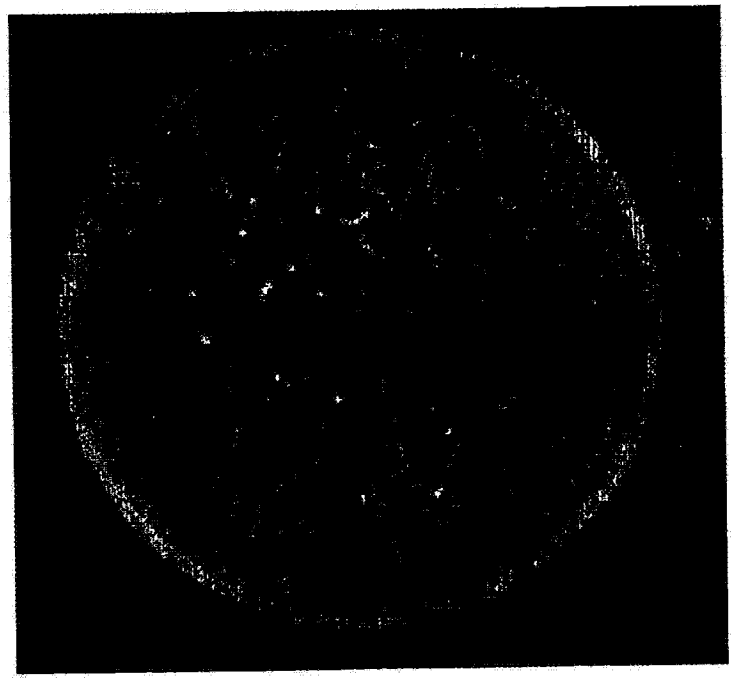


图 6

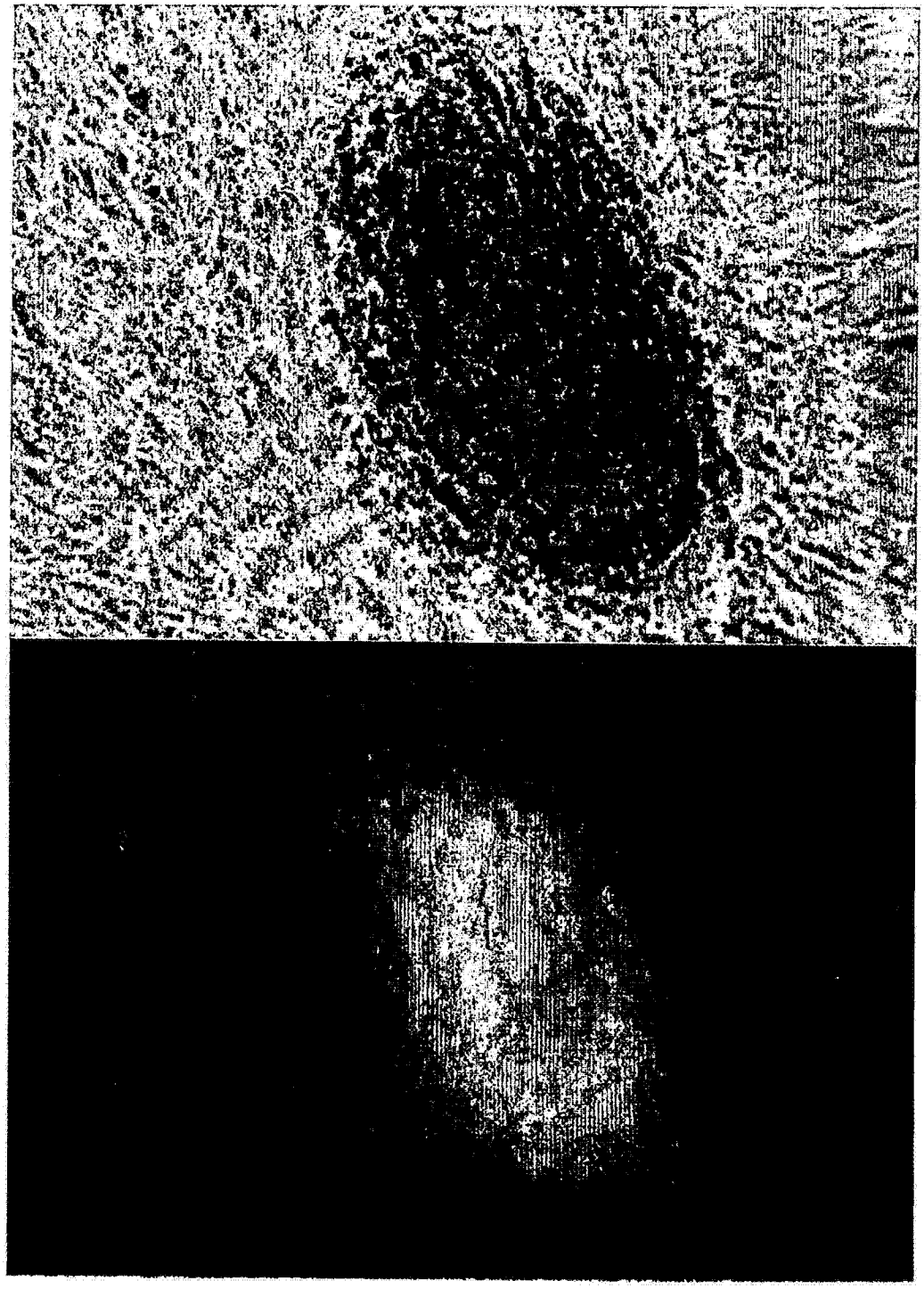


图 7

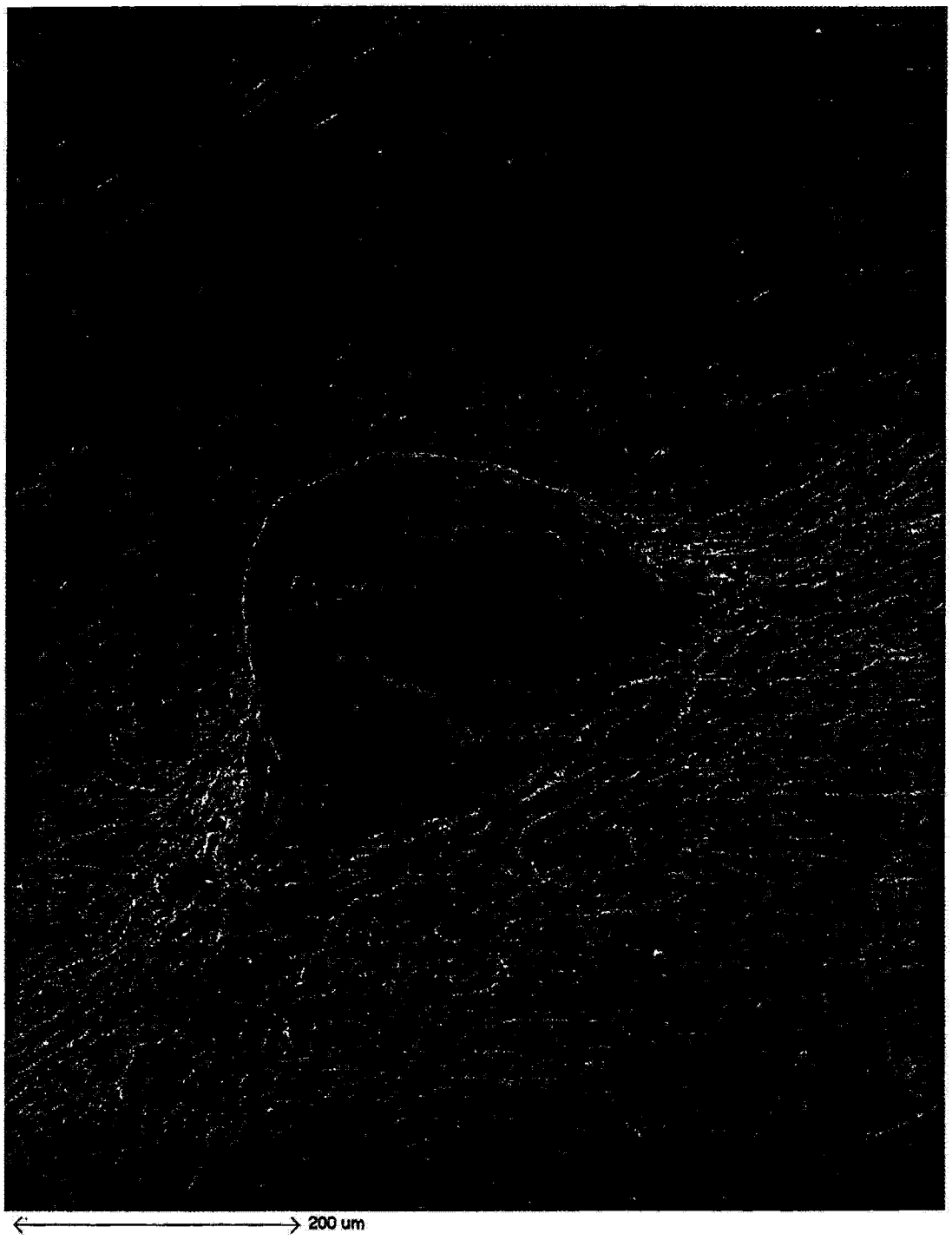


图 8

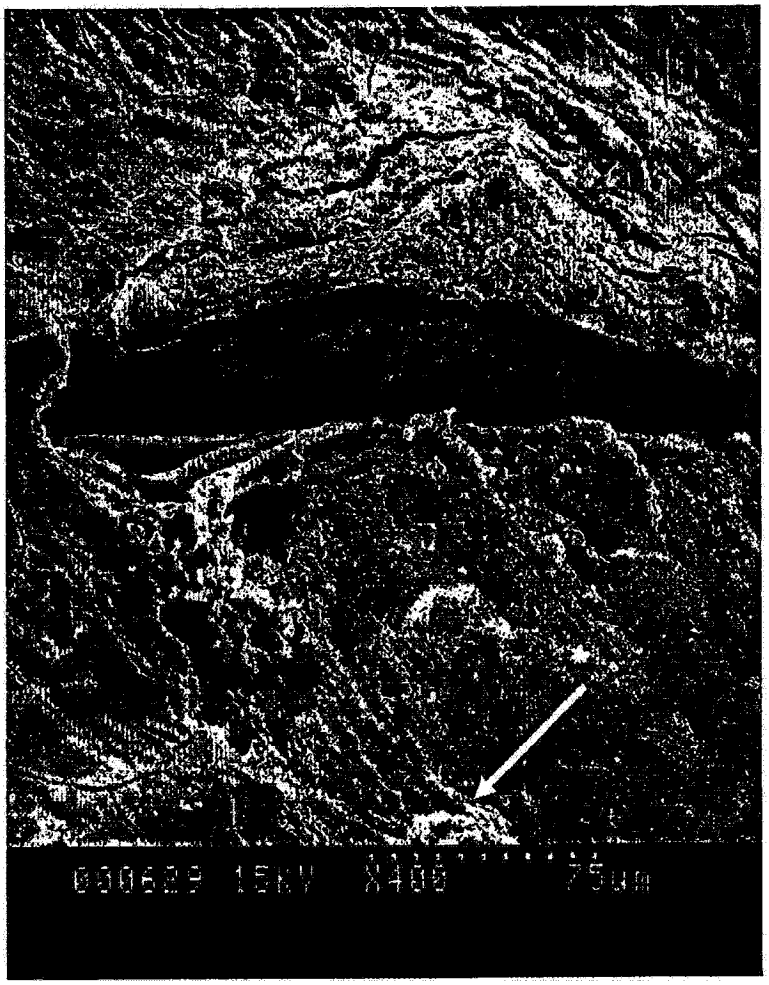


图 9

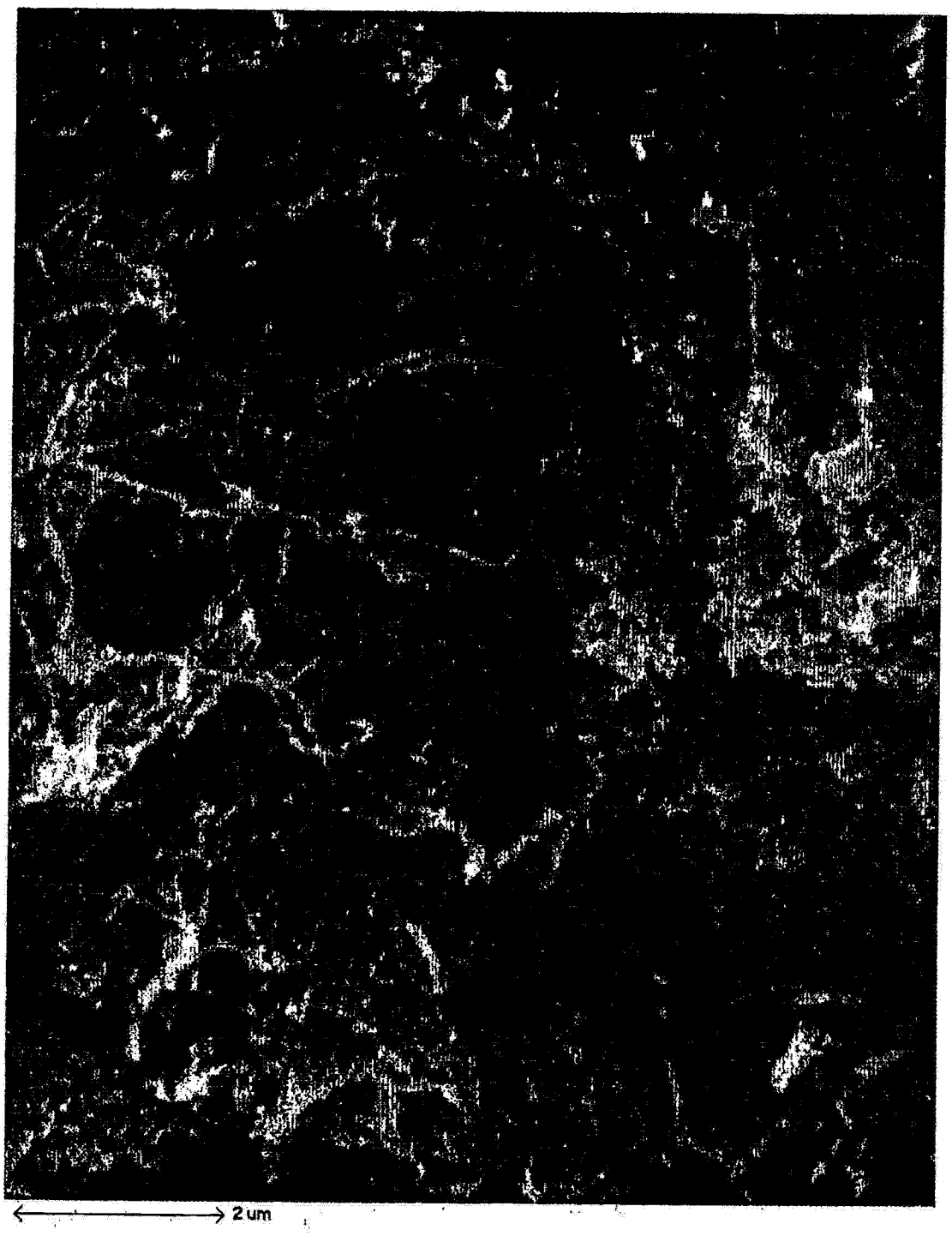


图 10

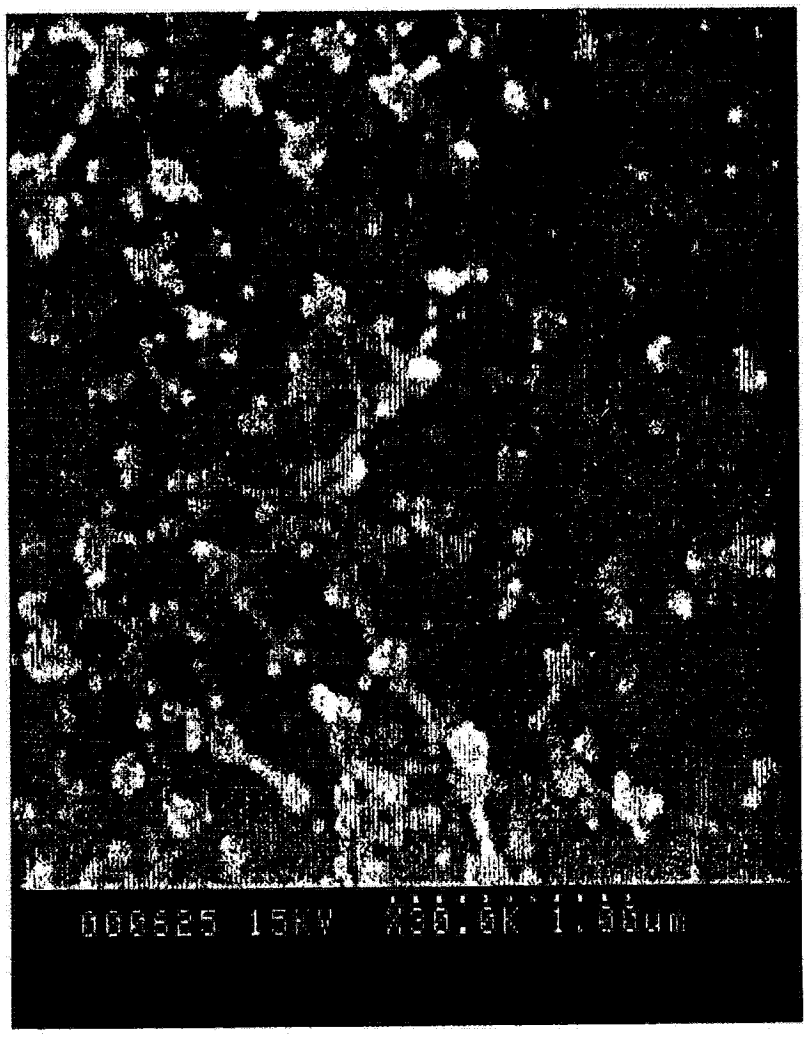


图 11

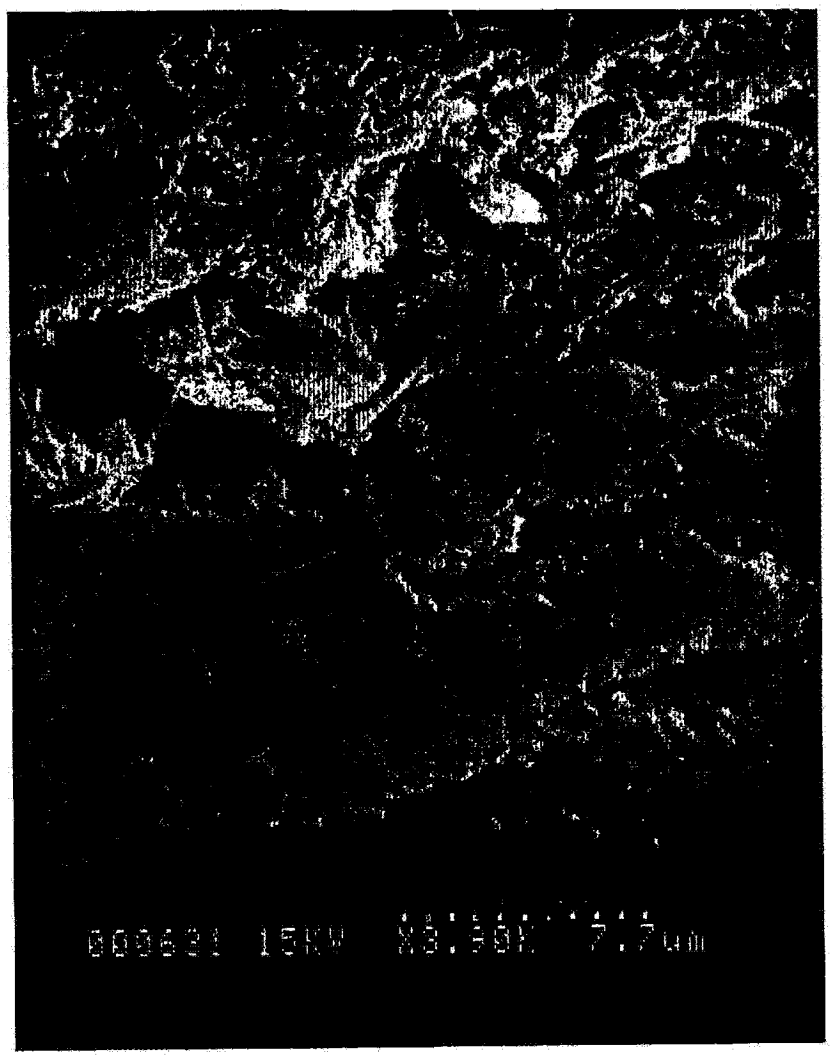


图 12

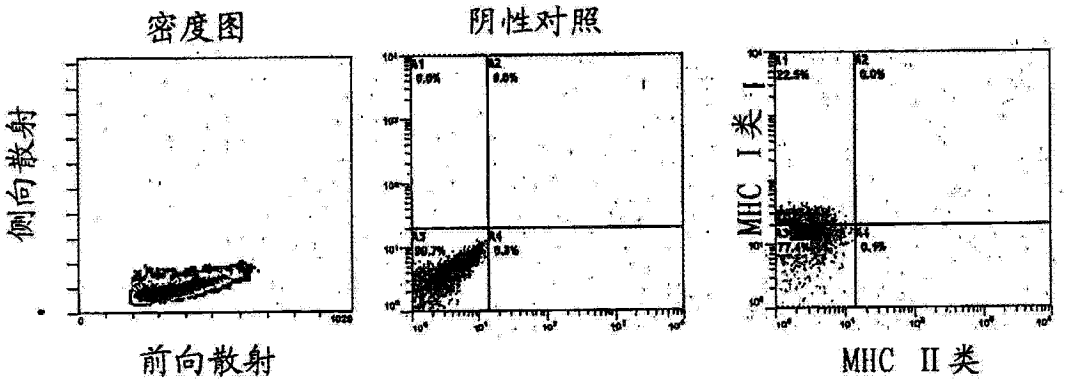


图 13

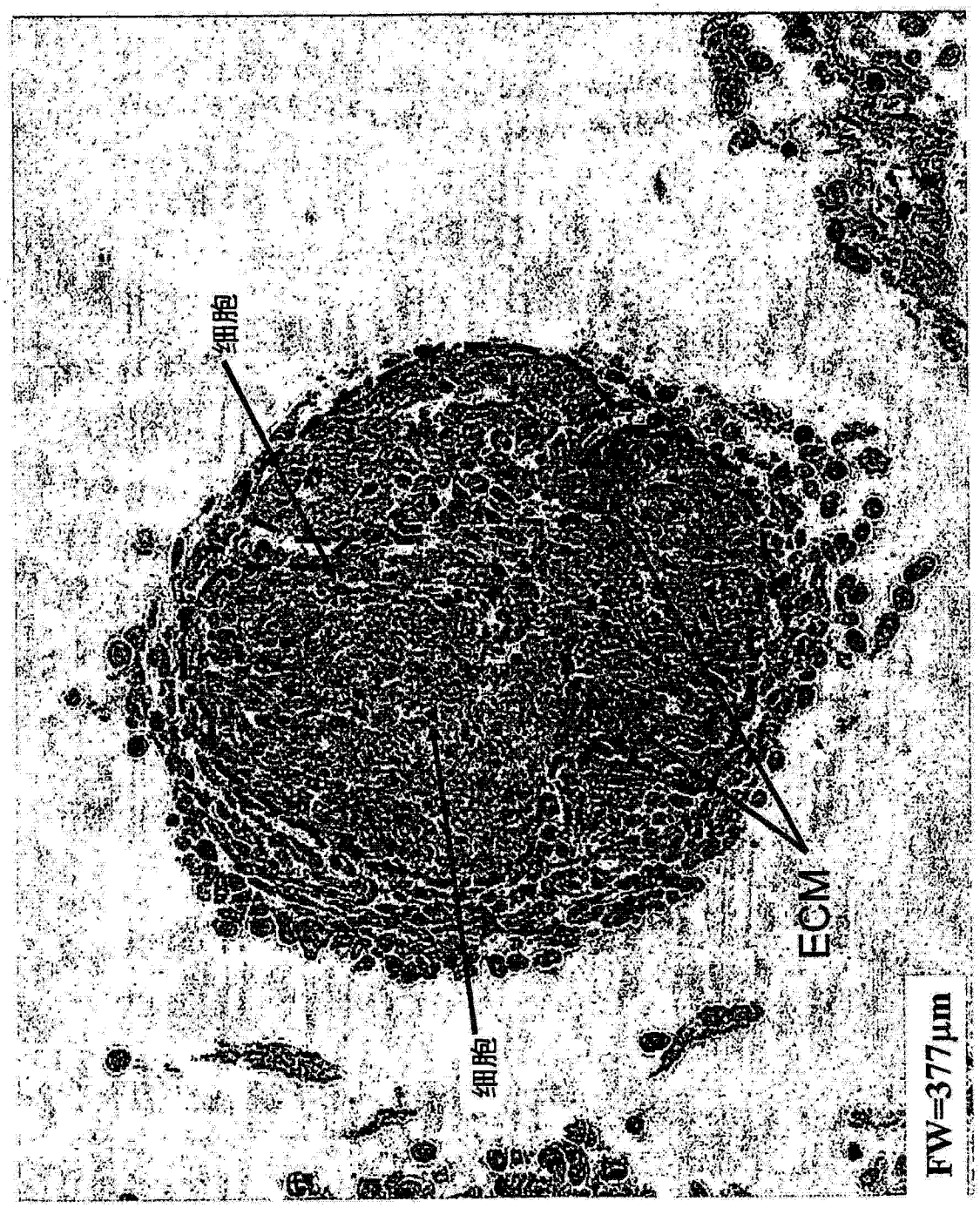


图 14

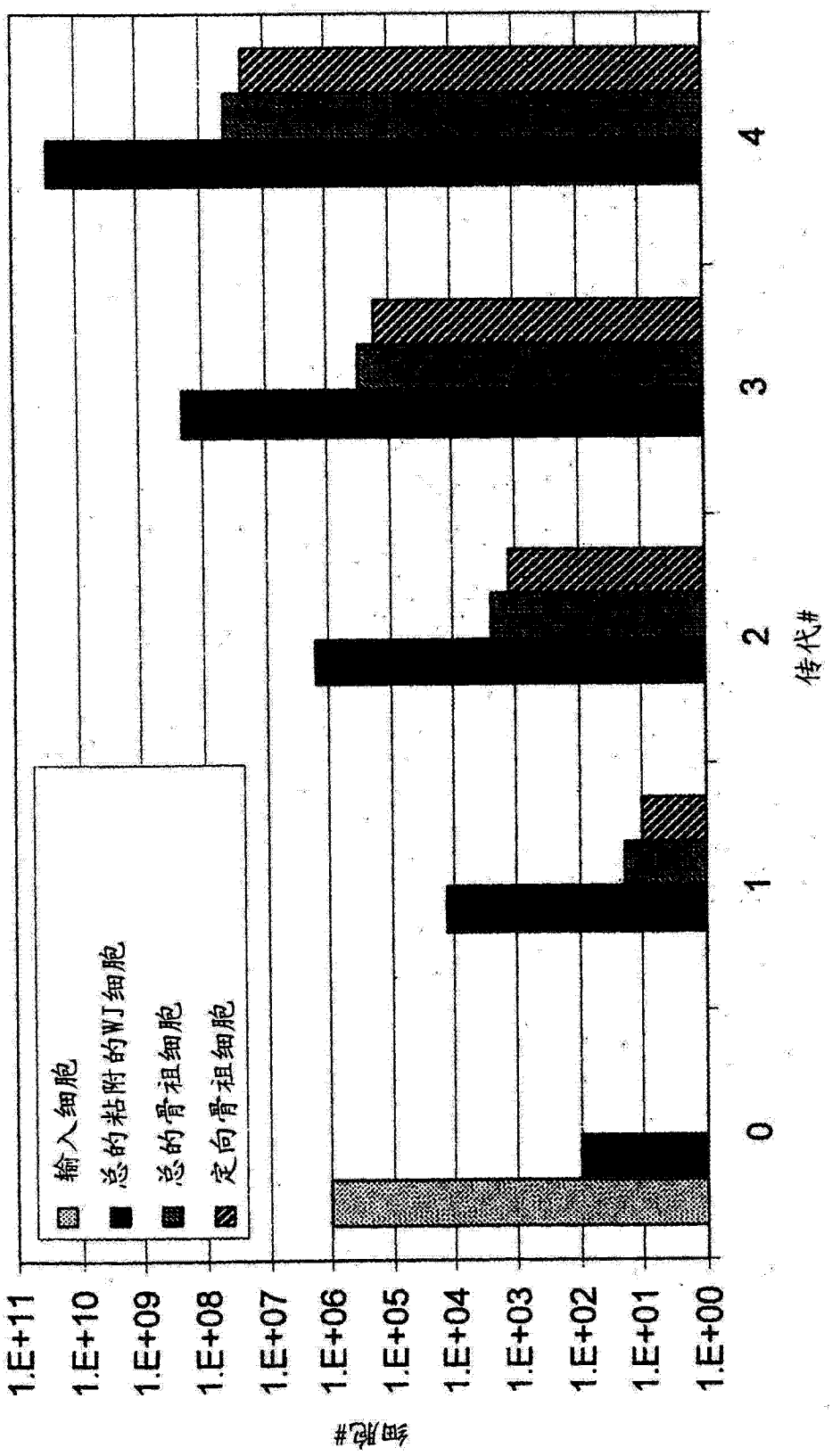

输入细胞
总的粘附的WJ细胞
总的骨祖细胞
定向骨祖细胞
1.E+11
1.E+10
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
1.E+01
1.E+00
细胞#
0
1
2
3
4
传代#

图 15

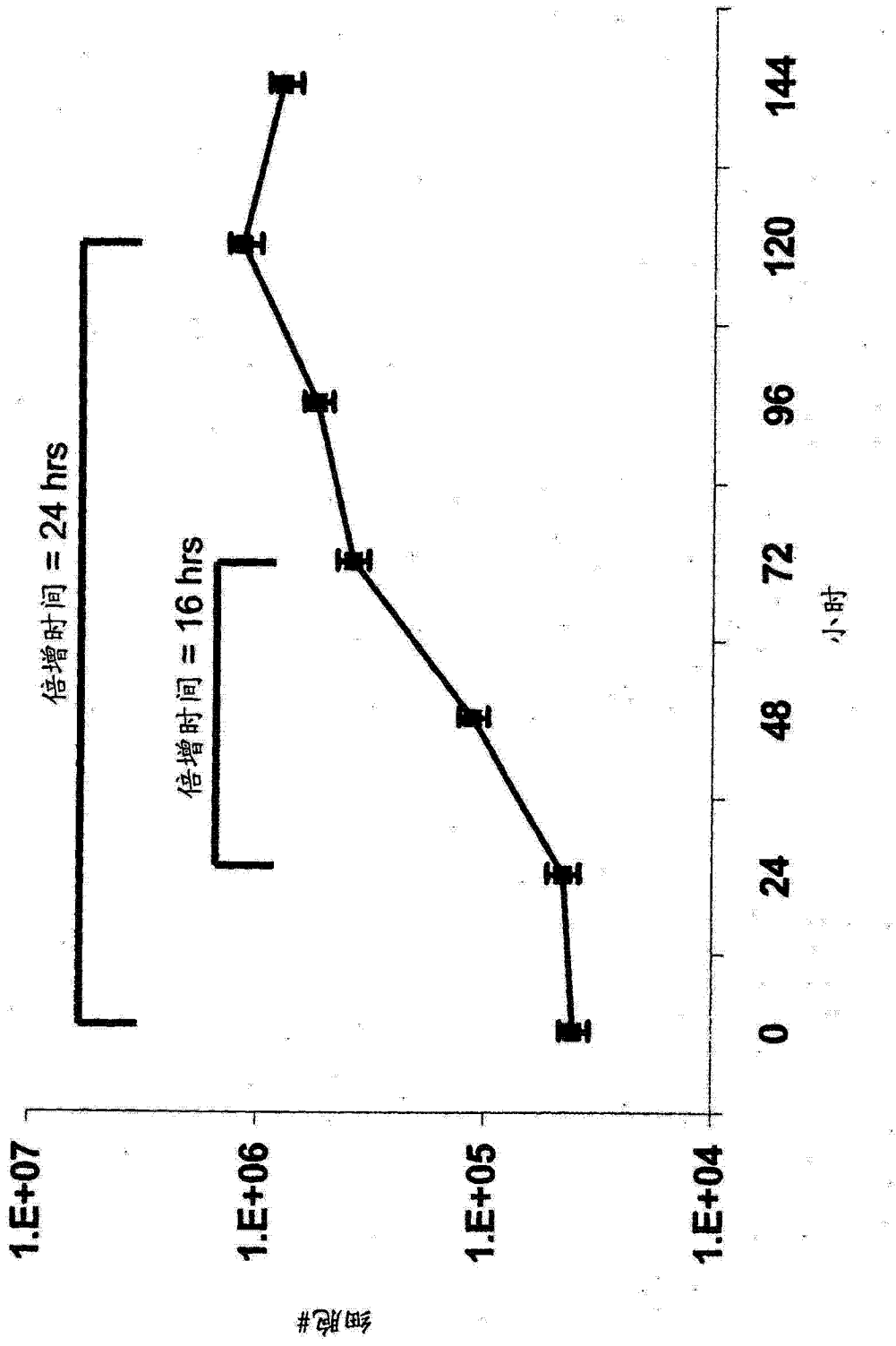

倍增时间 = 24 hrs
倍增时间 = 16 hrs
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
细胞#
0
24
48
72
96
120
144
小时

图 16

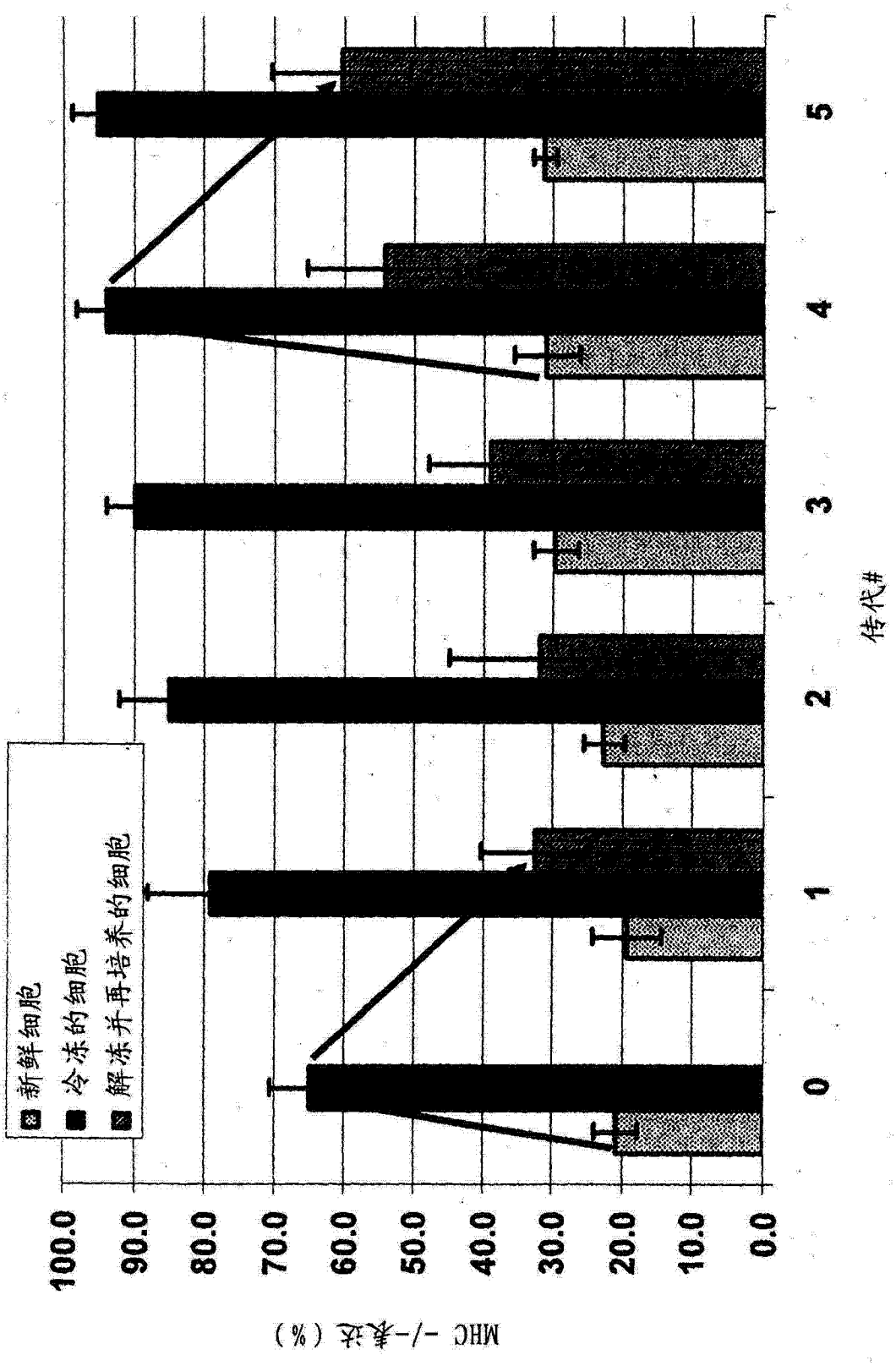

新鲜细胞
冷冻的细胞
解冻并再培养的细胞
100.0
90.0
80.0
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
MHC -/-表达（%）
0
1
2
3
4
5
传代#

图 17

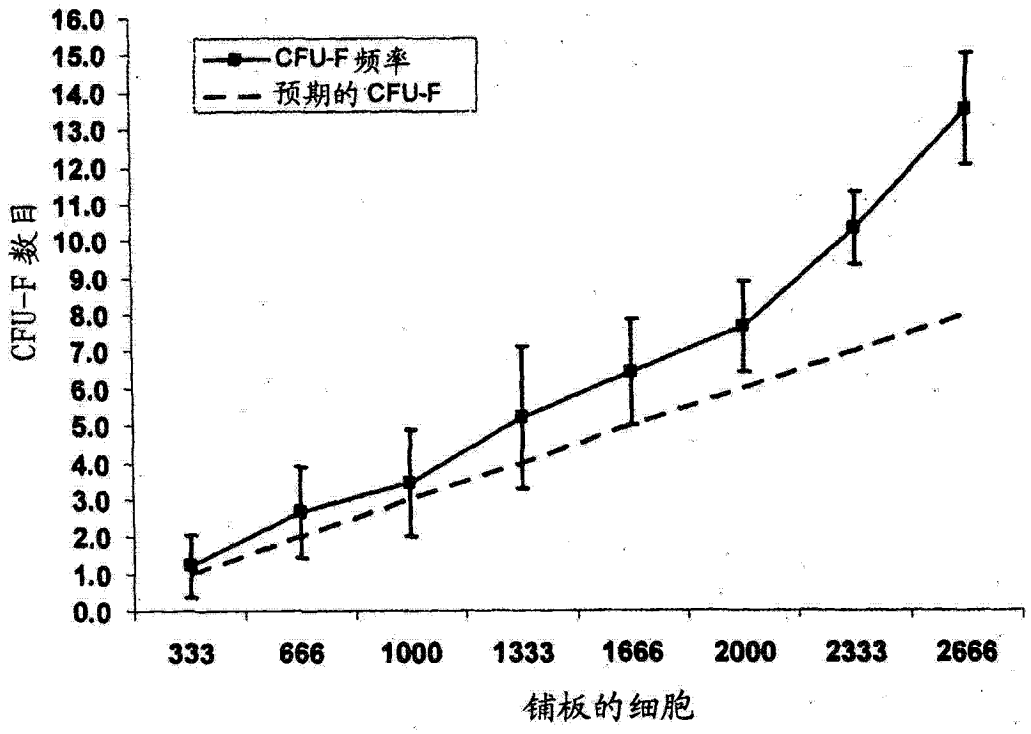

16.0
15.0
14.0
13.0
12.0
11.0
10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
CFU-F 数目
CFU-F 频率
预期的 CFU-F
333
666
1000
1333
1666
2000
2333
2666
铺板的细胞

图 18

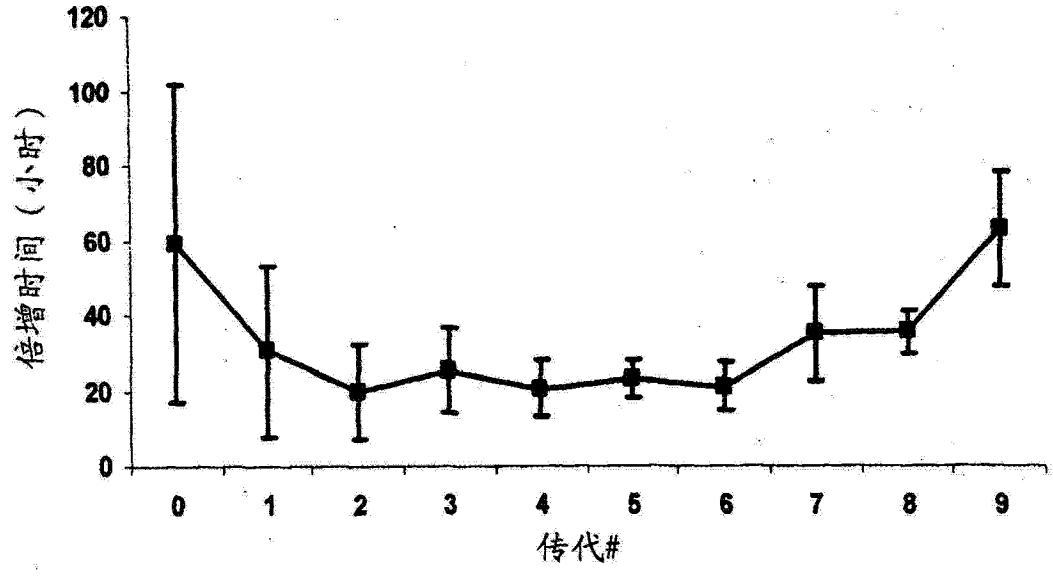

120
100
80
60
40
20
0
倍增时间（小时）
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
传代#

图 19

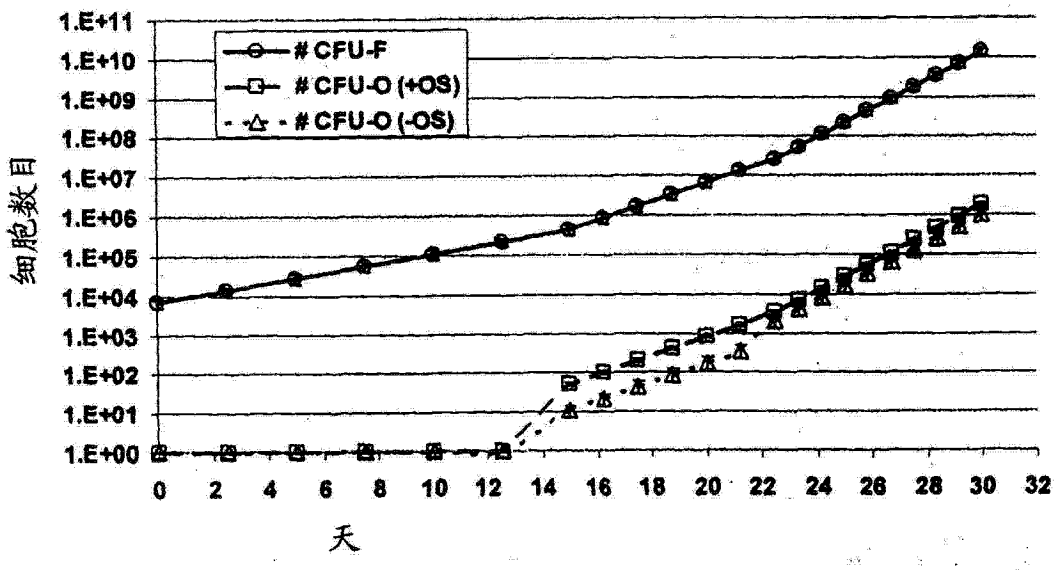

1.E+11
1.E+10
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
1.E+01
1.E+00
细胞数目
CFU-F
CFU-O (+OS)
CFU-O (-OS)
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32
天

图 20

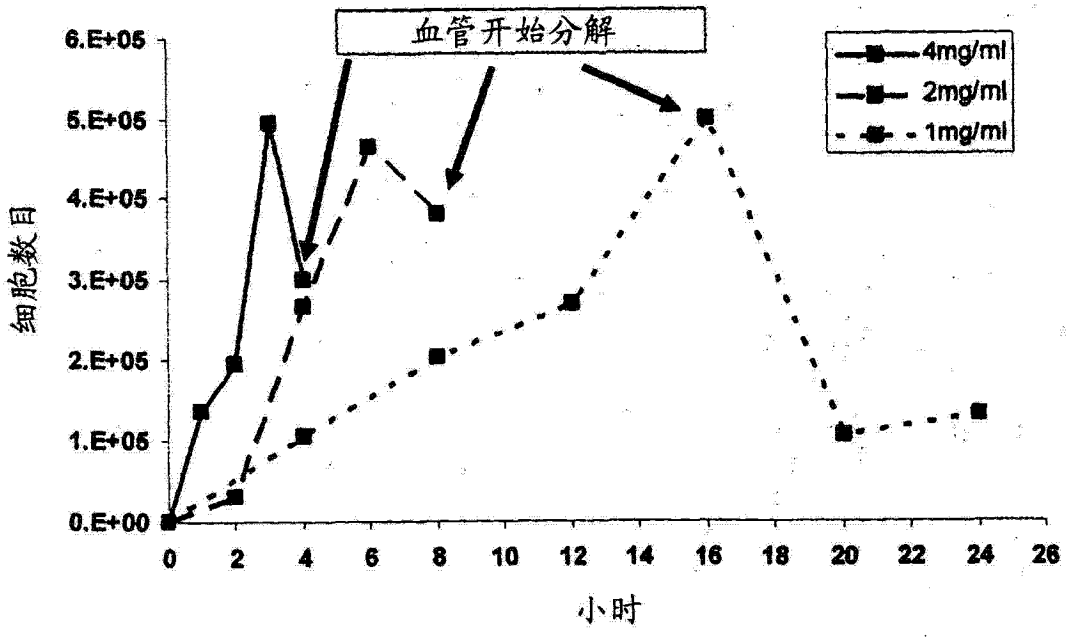

血管开始分解
6.E+05
5.E+05
4.E+05
3.E+05
2.E+05
1.E+05
0.E+00
细胞数目
4mg/ml
2mg/ml
1mg/ml
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26
小时

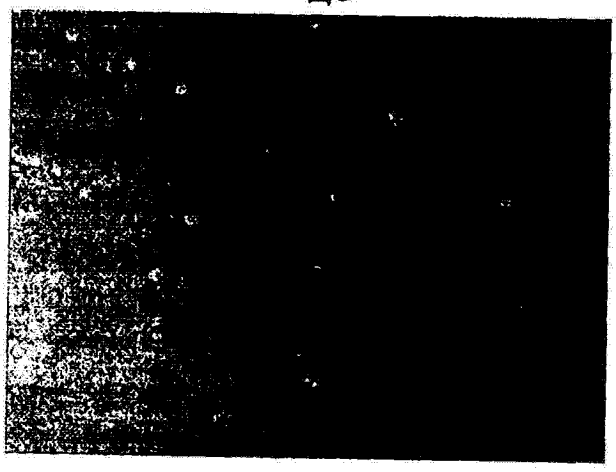
图 21



图A



图B



图C

图 22