



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104726406 B

(45)授权公告日 2018.05.01

(21)申请号 201510077480.6

(22)申请日 2015.02.13

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104726406 A

(43)申请公布日 2015.06.24

(73)专利权人 中国医科大学

地址 110122 辽宁省沈阳市沈北新区蒲河
路77号

专利权人 沈阳细胞治疗工程技术研发中心
有限公司

(72)发明人 于艳秋 宋冰 吕亚楠 荣耀星

邓雯雯 时兆田 张亭亭 李秀文

(74)专利代理机构 沈阳亚泰专利商标代理有限公司 21107

代理人 史力伏

(51)Int.Cl.

C12N 5/079(2010.01)

(56)对比文件

CN 103037872 A, 2013.04.10,

李远.改良法培养人牙髓间充质干细胞及其
向神经样细胞的分化.《中国组织工程研究与临
床康复》.2010, 9239-9243.

胡炜.人脱细胞羊膜对间充质干细胞向神经
系细胞分化的影响.《中国组织工程研究与临床
康复》.2009, 2611-2617.

审查员 孙婷婷

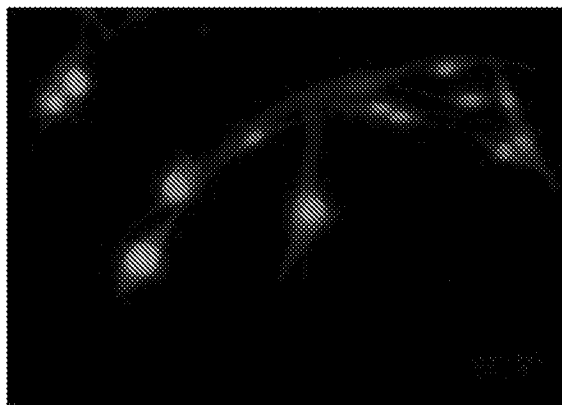
权利要求书1页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

一种诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细
胞的方法

(57)摘要

一种诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细
胞的方法,通过酶消化法提取牙髓间充质干细
胞,将其接种到已包被多聚赖氨酸和层粘连蛋白
的培养皿中,添加优化培养基并置于低氧条件下
培养扩增;然后使用脱细胞羊膜基质对收集的牙
髓间充质干细胞进行双层包被,另使用神经细胞
诱导液进行诱导分化;最后用神经细胞维持液维
持神经细胞长期培养。本发明使用优化培养基及
低氧条件培养,增加了牙髓间充质干细胞的数量;
利用双层脱细胞羊膜基质模拟神经鞘结构为
神经细胞的生长起到导向作用,同时使用神经细
胞诱导液诱导牙髓间充质干细胞向神经分化,提
高了分化速率;使用神经细胞维持液长期维持神
经细胞活性,便于临床医师灵活掌握治疗时机。



1. 一种诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1、羊膜干细胞的提取及羊膜干细胞培养上清的收集;

步骤2、制备脱细胞羊膜基质;

步骤3、智齿的采集及运输;

步骤4、将多聚赖氨酸及层粘连蛋白包被在培养皿底部;

步骤5、采用酶消化法提取牙髓间充质干细胞,接种于已包被的培养皿中,添加优化培养基并置于低氧条件下原代培养;

步骤6、原代牙髓间充质干细胞汇合率达70%时传代培养;

步骤7、对传代牙髓间充质干细胞进行流式细胞表型分析;

步骤8、将传代牙髓间充质干细胞接种于铺有脱细胞羊膜基质的培养皿中;

步骤9、牙髓间充质干细胞在脱细胞羊膜基质上贴附24h后弃掉培养基,在牙髓间充质干细胞上再覆盖一层新的脱细胞羊膜基质;

步骤10、待牙髓间充质干细胞汇合率达90%时弃掉培养基,改用神经细胞诱导液继续培养2-3天;

步骤11、观察到有60%的牙髓间充质干细胞被诱导为神经细胞时,弃掉神经细胞诱导液,改用神经细胞维持液继续培养神经细胞;

步骤12、对神经细胞进行免疫荧光法鉴定;

所述低氧条件为氧气8%、二氧化碳5%、氮气87%;

所述神经细胞诱导液为:含1%N2 supplement (N2添加剂)、15mM HEPES (4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液)、15mM L-谷氨酰胺、20ng/mL bFGF、20ng/mL EGF、20ng/mL层粘连蛋白2、20ng/mL层粘连蛋白8的无血清培养基;

所述神经细胞维持液为:含0.1mM NEAA (非必须氨基酸)、10ng/mLBDNF、10ng/mL NGF、10ng/mL NT-3、15mM L-谷氨酰胺、10 ng/mL TGF、10ng/mL层粘连蛋白2、10ng/mL层粘连蛋白8的DMEM培养基。

2. 如权利要求1所述的诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法,其特征在于,所述步骤4中多聚赖氨酸浓度为50 μ g/mL,层粘连蛋白浓度为20 μ g/mL。

3. 如权利要求1所述的诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法,其特征在于,所述步骤5酶消化法是指采用4mg/mL的中性蛋白酶和3mg/mL的I型胶原酶37 $^{\circ}$ C条件下消化1h。

4. 如权利要求1所述的诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法,其特征在于,所述优化培养基为含10%羊膜干细胞培养上清和0.32mmol/L α -酮戊二酸的无血清培养基。

5. 如权利要求1所述的诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法,其特征在于,所述原代培养中半量换液时间为7天后,全量换液时间为10天后。

一种诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞培养及干细胞的诱导分化领域,尤其涉及一种诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法。

背景技术

[0002] 干细胞是具有一定自我更新能力,并在适宜的微环境下具有多向分化潜能的原始细胞,可分化为脂肪、软骨、骨、肌肉、肌腱、神经、肝、心肌等多种组织细胞。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)来源于中胚层的非终末分化细胞,它既有间质细胞,又有内皮细胞及上皮细胞的特征,是细胞治疗和组织工程种子细胞的重要来源。间充质干细胞除来源于骨髓、外周血、脂肪、脐带外,人牙髓也是间充质干细胞的重要来源。

[0003] 牙髓间充质干细胞(Dental Pulp Stem Cell, DPSCs)是来源于神经嵴的多能干细胞,与骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)相比较,两者在人类4400个基因表达水平上是一致的,包括表达细胞外基质成分、细胞粘附分子、生长因子、转录调节因子等基因,并且具有相似的免疫表型,在形态上也很类似,但牙髓间充质干细胞与骨髓中提取的干细胞相比有明显的优势:(1)来源广泛,易于采集(乳牙自然脱落、智齿的拔除等);(2)自体应用,安全健康,且不产生免疫排斥反应;(3)分化能力和可塑性更强,可分化为更多种类的组织细胞;(4)具有更强的增殖能力和自我更新能力。

[0004] 目前,影响牙髓间充质干细胞研究和临床应用的瓶颈主要是牙髓组织提取量少,一颗牙齿分离的牙髓间充质干细胞难以达到治疗量。通常牙髓间充质干细胞的分离方法主要是酶消化法和植块法。在酶消化法中,使用酶长时间消化,易对细胞造成一定的损伤,使其增殖能力下降甚至死亡,使得原本就少的干细胞变得更少,并且普通的培养方法扩增倍数有限,不能短时大量获取牙髓间充质干细胞;植块法(如专利CN102807967A)需要的培养时间过长,且组织利用不完全,造成了细胞的损失。专利CN103849595A采用生物发酵罐的方法提高牙髓间充质干细胞的产量,但是使用胎牛血清引入异种蛋白可能造成致敏,而且生产成本低,因此限制了其应用范围。

[0005] 生理学上体内细胞氧浓度在1-13%范围内,但大部分细胞培养在21%氧气浓度下完成。外界氧环境的变化可以改变培养基内的氧浓度,因此,通过调节细胞培养箱内的氧浓度即可改变培养基中的氧环境。体内间充质干细胞主要在低氧的环境中生长,低氧更符合其生理状态,富氧反而对细胞具有损伤作用。目前研究表明,低氧培养将提高间充质干细胞的增殖能力,迁移能力及黏附能力,并降低细胞衰亡率。但是低氧下会产生更多地乳酸,作为代谢副产物,过多的乳酸会对细胞产生毒性,限制细胞进一步生长。因此,选择合适的氧浓度是提高细胞增殖速度的关键。

[0006] 谷氨酰胺为细胞的生长提供能量的同时,也为嘌呤和嘧啶的合成提供氨基。但是在细胞代谢过程中谷氨酰胺会分解为氨和 α -酮戊二酸,其中氨会抑制细胞的生长,影响细胞的能量代谢,继而影响细胞的增殖速度。近年来研究发现, α -酮戊二酸可以干预谷氨酰胺的代谢,提高其利用率,并且 α -酮戊二酸可以为DNA的去甲基化提供能量,让整个基因组保

持开放状态,保留自己的分化能力。但是高浓度的 α -酮戊二酸则会产生更多的氨,从而影响干细胞的增殖。因此,选择合适的 α -酮戊二酸浓度是提高细胞增殖速度的关键。

[0007] 众所周知,干细胞的生长和分化方向取决于局部的微环境,细胞生长的微环境主要是由细胞外基质蛋白和细胞因子构成,细胞外基质蛋白主要成分有层粘连蛋白、纤连蛋白、胶原和基底膜蛋白聚糖等,而细胞因子包括生长因子、白细胞介素、生长转化因子等。作为细胞外基质蛋白的层粘连蛋白(laminin, LN)一直被认为是最有效的神经生长促进因子。层粘连蛋白是由1条重链(α 链)和2条轻链(β 链和 γ 链)经二硫键连接而成的异源三聚体,在空间上形成一个十字结构。迄今已证实有5条 α 链、4条 β 链、3条 γ 链,它们组合至少有16种亚型的层粘连蛋白。其中层粘连蛋白8和层粘连蛋白2是神经微环境中的重要蛋白质。它们既是神经细胞外基质蛋白又是神经鞘的组成成分,能够刺激胚胎中神经轴的生长,并促进成年动物的神经损伤后的再生。有研究表明,层粘连蛋白体外可促进神经元突起的纵向延伸,提供类似于体内神经的生长环境,而且生长速度显著提高。

[0008] 细胞因子是影响细胞生长的重要因素,例如:bFGF(碱性成纤维细胞生长因子),是重要的促有丝分裂因子,也是细胞形态发生和分化的诱导因子,体外低浓度即可发挥强烈的作用,能延长神经细胞的存活时间;EGF(表皮生长因子),最大的特点是能够促进细胞增殖分化,以新生细胞代替衰老和死亡细胞;NGF(神经生长因子),是具有神经元营养和促突起生长双重生物学功能的一种神经细胞生长调节因子,它对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均有重要的调控作用。BDNF(脑源性神经营养因子),是人体内分布最为广泛的具有神经营养作用的蛋白,能增加突触可塑性、促进神经发生以及神经元的发育和再生。TGF(转化生长因子),对细胞的生长、分化和免疫功能都有重要的调节作用,可促进细胞外基质如胶原蛋白、纤粘连蛋白的表达,抑制细胞外基质蛋白的降解,对细胞的形态发生、增殖和分化过程起着重要作用,有利于细胞修复;NT-3(神经营养因子3),能够促进神经元的存活、生长、分化,刺激神经突起的形成。

[0009] 羊膜组织中含有多种生物活性物质,是一种天然的生物材料。人羊膜组织由来源于外胚层的羊膜上皮细胞和中胚层的羊膜间充质干细胞组成。电镜下观察,羊膜的基本结构分为上皮层、基底膜层、致密层、纤维母细胞层、海绵层。羊膜干细胞能分泌多种生长因子,主要包括生长因子、转化生长因子 α 、神经生长因子、干细胞生长因子、表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、角蛋白生长因子、金属蛋白酶组织抑制因子等。这正是羊膜移植后能够抑制炎症和血管新生、抗纤维化抑制瘢痕形成、促进细胞增殖的分子基础。

[0010] 羊膜细胞外基质是人羊膜去除细胞后,保留的基膜及基质层,又被称为脱细胞羊膜基质。首先它是一个良好的半透膜,培养基中的营养物质可以自由渗透;其次,作为一种天然基质,能为细胞生存提供良好的微环境。尤其,脱细胞羊膜基质中含有多种能促进神经再生的蛋白成分,如胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白等,此类物质可以作为细胞的生长支架,有利于细胞的粘附、生长。

[0011] 现有的研究成果显示,诱导干细胞分化为神经细胞的方法主要是添加一些促神经分化的细胞因子或生化试剂,专利CN104004713A诱导培养液中添加了 β -巯基乙醇(β -ME)、二甲亚砜(DMSO)、青链霉素;专利CN103215222A诱导液中添加了香丹注射液;专利CN102559593A诱导培养液中添加了丁酸钠。以上方法均能诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞,但是添加了一些毒性生化试剂或抗生素,对临床应用的安全性造成了一定的威胁。

专利CN101914493A诱导分四种培养基,诱导程序繁琐,并且使用胎牛血清引入异种蛋白,限制了其应用范围。

[0012] 最初,动物细胞的体外培养均依赖于胎牛血清,这样细胞在体外细胞才能较好的增殖生长。但由于胎牛血清成分复杂,使用含血清的培养基培养细胞存在潜在的细胞毒性作用、外源病毒和致病因子污染问题,使细胞培养的标准化和终产品纯化难度加大,异种血清的残留也易导致临床上的过敏反应。因此,动物细胞无血清培养基的开发和应用势在必行。所谓无血清培养基,是指不含有动物血清或其他生物提取液,但仍可以维持细胞在体外较长时间生长、繁殖的一种培养基。细胞工程中无血清培养技术的应用,在很大程度上可以避免含血清培养所带来的不利。优化培养基的成分可使不同细胞在最有利于细胞生长和表达目的产物的环境中维持高密度培养,降低生产成本。

发明内容

[0013] 针对上述问题,本发明提供一种诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法,通过优化牙髓间充质干细胞的培养方案,构建三维立体结构,模拟细胞体内生存环境,将其诱导为神经细胞,有效提高了牙髓间充质干细胞体外扩增培养的增殖速度,以及向神经方向诱导分化的效率。

[0014] 为实现本发明的上述目的,本发明提供一种诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法,包括以下步骤。

[0015] 步骤1、羊膜干细胞的提取及羊膜干细胞培养上清的收集。

[0016] 步骤2、制备脱细胞羊膜基质。

[0017] 步骤3、智齿的采集及运输。

[0018] 步骤4、将多聚赖氨酸及层粘连蛋白包被在培养皿底部。

[0019] 步骤5、采用酶消化法提取牙髓间充质干细胞接种于已包被的培养皿中,添加优化培养基并置于低氧条件下原代培养。

[0020] 步骤6、原代牙髓间充质干细胞汇合率达70%时传代培养。

[0021] 步骤7、对传代牙髓间充质干细胞进行流式细胞表型分析。

[0022] 步骤8、将传代牙髓间充质干细胞接种于铺有脱细胞羊膜基质的培养皿中。

[0023] 步骤9、牙髓间充质干细胞在脱细胞羊膜基质上贴附24h后弃掉培养基,在牙髓间充质干细胞上再覆盖一层新的脱细胞羊膜基质。

[0024] 步骤10、待牙髓间充质干细胞汇合率达90%时弃掉培养基,改用神经细胞诱导液继续培养2-3天。

[0025] 步骤11、观察到有60%的牙髓间充质干细胞被诱导为神经细胞时,弃掉神经细胞诱导液,改用神经细胞维持液继续培养神经细胞。

[0026] 步骤12、对神经细胞进行免疫荧光法鉴定。

[0027] 所述步骤4中多聚赖氨酸终浓度为50 μ g/mL,层粘连蛋白终浓度为20 μ g/mL。

[0028] 所述步骤5中酶消化法采用4mg/mL中性蛋白酶和3mg/mL I型胶原酶37 $^{\circ}$ C条件消化1h。

[0029] 所述优化培养基为含10%羊膜干细胞培养上清和0.32mmol/L α -酮戊二酸的无血清培养基。

- [0030] 所述低氧条件为氧气8%、二氧化碳5%、氮气87%。
- [0031] 所述低氧条件下原代培养的半量换液时间为7天后,全量换液时间为10天后。
- [0032] 所述神经细胞诱导液为:含1%N2 supplement(N2添加剂)、15mM HEPES(4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液)、15mM L-谷氨酰胺、20ng/mL bFGF、20ng/mL EGF、20ng/mL层粘连蛋白2、20ng/mL层粘连蛋白8的无血清培养基。
- [0033] 所述神经细胞维持液为:含0.1mM NEAA(非必需氨基酸)、10ng/mL BDNF、10ng/mL NGF、10ng/mL NT-3、15mM L-谷氨酰胺、10 ng/mL TGF、10ng/mL层粘连蛋白2、10ng/mL层粘连蛋白8的DMEM培养基。
- [0034] 与现有技术相比本发明的有益效果。
- [0035] 本发明提供的诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法,使用酶消化法提取牙髓间充质干细胞,将其接种到已包被多聚赖氨酸和层粘连蛋白的培养皿中,用优化培养基在低氧条件下进行培养,提高了牙髓间充质干细胞的纯度和扩增速度,减少了细胞体外培养的时间,并且,优化培养基的应用提高了临床应用的生物安全性;将传代牙髓间充质干细胞接种到脱细胞羊膜基质上,而后再覆盖一层新的脱细胞羊膜基质,使用神经细胞诱导液进行诱导分化培养,利用细胞因子诱导牙髓间充质干细胞向神经分化,同时利用脱细胞羊膜基质作为立体支架,模拟了神经细胞的神经鞘结构,为神经的生长起到导向作用,提高了神经细胞的分化速率;最后用神经细胞维持液进行神经细胞的维持培养,便于临床医师灵活掌握治疗时机。

附图说明

- [0036] 图1为牙髓间充质干细胞原代培养7天后细胞的生长状态。
- [0037] 图2为牙髓间充质干细胞原代培养10天后细胞的生长状态。
- [0038] 图3为牙髓间充质干细胞传代细胞的生长状态。
- [0039] 图4为牙髓间充质干细胞流式检测图。
- [0040] 图5为维持培养12d时的神经细胞生长状态。
- [0041] 图6为神经细胞的免疫荧光染色。

具体实施方式

- [0042] 下面结合具体实施例进一步详细说明本发明。
- [0043] 本发明提供一种诱导牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的方法,包括以下步骤。
- [0044] 步骤1、羊膜干细胞的提取及羊膜干细胞培养上清的收集。
- [0045] (1)胎盘的采集:经产妇知情同意,采集足月剖腹产健康胎儿胎盘,4℃保存,24小时内运送至实验室。在母体生产前7天内采集母血进行艾滋病检测、乙肝检测、丙肝检测、巨细胞病毒检测、梅毒检测、谷丙转氨酶检测、支原体检测,全部检测合格方可使用。
- [0046] (2)羊膜干细胞的原代提取:钝性分离胎盘脐带面的羊膜,用PBS缓冲液反复冲洗,去除血细胞;剪取大小约10cm²羊膜放入离心管中,用剪刀剪成面积为1mm²的羊膜碎片,加入胰酶,37℃静置消化10min;终止消化,PBS缓冲液充分洗涤,去除胰酶;添加IV型胶原酶继续消化60min,期间持续摇动离心管;终止消化,离心后重悬,无菌滤网过滤收集含有原代羊膜干细胞的单细胞悬液;收集的含有原代羊膜干细胞的单细胞悬液按照5000-6000个/cm²接

种于培养皿中,37℃、5%CO₂培养箱内培养。观察细胞生长情况,细胞汇合率达到80%时收集原代羊膜干细胞。

[0047] (3) 羊膜干细胞培养上清的收集:收集的原代羊膜干细胞按照5000-6000个/cm²的密度接种于培养瓶内,进行传代培养,观察细胞汇合率达到80%时收集第一代细胞,然后继续进行传代培养,当羊膜干细胞汇合率达到70-80%时收集第二代细胞,将培养瓶内的培养液单独收集,离心后获得羊膜干细胞培养上清液,置于4℃保存备用。

[0048] 步骤2、制备脱细胞羊膜基质。

[0049] 剪取100cm²的羊膜2块,用PBS缓冲液清洗去除表面红细胞;清洗后的羊膜经甘油脱水及PBS缓冲液水化处理;加入0.25%的胰酶37℃消化;用细胞刮子刮除残存的羊膜上皮细胞,然后用PBS缓冲液清洗;倒置显微镜下观察,证实无细胞后,即得到所需的脱细胞羊膜基质,置于DMEM中4℃保存备用。

[0050] 步骤3、智齿的采集及运输:从沈阳市某医院牙科获得畸形矫正16-20岁患者非感染的智齿,放置在预冷的含双抗(青霉素和链霉素)的DMEM培养基中,运送至实验室。

[0051] 步骤4、将多聚赖氨酸及层粘连蛋白包被在培养皿底部:使用PBS缓冲液配制多聚赖氨酸和层粘连蛋白混合溶液,并使用0.2μm的无菌过滤器过滤除菌,其中多聚赖氨酸终浓度为50μg/mL,层粘连蛋白终浓度为20μg/mL;向培养皿中添加2mL多聚赖氨酸和层粘连蛋白混合溶液,4℃孵育6h后,吸取多余溶液,室温下晾干,即得到包被好的细胞培养皿。

[0052] 步骤5、采用酶消化法提取牙髓间充质干细胞,接种于已包被的培养皿中,添加优化培养基并置于低氧条件下原代培养。

[0053] (1) 原代牙髓间充质干细胞的提取:在生物安全柜内使用含双抗(青霉素和链霉素)的生理盐水清洗,碘化物消毒牙齿;分别用21号刀片和组织钳刮除或剥除牙周组织,用切钳切开牙齿,牙髓针从髓室内取出牙髓组织;将牙髓组织剪碎,加入4mg/mL中性蛋白酶和3mg/mL I型胶原酶37℃条件消化1h,消化期间每15min轻轻摇匀一次;终止消化,离心弃上清(离心力800g、离心5min),用含10%羊膜干细胞培养上清、0.32mmol/L α-酮戊二酸的无血清培养基重悬,过滤得到含有原代牙髓间充质干细胞的单细胞悬液。

[0054] (2) 原代培养:将步骤4得到的牙髓间充质干细胞按5000-6000个/cm²接种于已包被的培养皿中,加入4mL优化培养基,放置在饱和湿度的三气培养箱中低氧培养(条件为5%二氧化碳、8%氧气、87%氮气)。

[0055] (3) 计算细胞首次传代收获数量,选择优化培养基的最优配比,如表1、表2、表3所示,其中,表1为10%羊膜干细胞培养上清时α-酮戊二酸的浓度优化实验结果,表2为羊膜干细胞培养上清的浓度优化实验结果,表3为氧浓度优化实验结果。

[0056] 表1:α-酮戊二酸的浓度优化实验结果。

[0057]

组别	羊膜干细胞培养上清	α-酮戊二酸	首次传代收获的细胞数(个)
1	10%	0	0.9×10^5
2	10%	0.16 mmol/L	1.0×10^5
3	10%	0.32 mmol/L	2.1×10^5
4	10%	0.63 mmol/L	2.1×10^5
5	10%	1.25 mmol/L	1.8×10^5

6	10%	2.5 mmol/L	1.0×10^5
---	-----	------------	-------------------

[0058] 由表1可知,随着 α -酮戊二酸浓度的增加,首次传代收获的细胞数在逐渐增多,并且在添加0.32mmol/L和0.63mmol/L α -酮戊二酸时,首次传代收获的细胞数量最多,但是当浓度增至1.25mmol/L时,细胞数逐步减少,当浓度增至2.5mmol/L时,细胞数继续减少。由此可见, α -酮戊二酸含0.32mmol/L和0.63 mmol/L时首次传代收获的细胞数最多,促进牙髓间充质干细胞的增殖率最高。但是在细胞数量增至 2.1×10^5 个时不再有明显增加,考虑到成本原因,优选0.32mmol/L α -酮戊二酸。

[0059] 在优选0.32 mmol/L α -酮戊二酸的基础上,考察采用不同羊膜干细胞培养上清,首次传代收获的细胞数,结果见表2。

[0060] 表2:羊膜干细胞培养上清的浓度优化实验结果。

[0061]

组别	羊膜干细胞培养上清	α -酮戊二酸	首次传代收获的细胞数(个)
1	0	0.32 mmol/L	1.0×10^5
2	5%	0.32 mmol/L	1.7×10^5
3	10%	0.32 mmol/L	2.1×10^5
4	15%	0.32 mmol/L	2.2×10^5
5	20%	0.32 mmol/L	2.2×10^5

[0062] 由表2可知,随着羊膜干细胞培养上清的浓度变大,首次传代收获的细胞数在逐渐变多,但是在细胞数量增至 2.1×10^5 个时不再有明显增加,表明添加羊膜干细胞上清大于10%时所取得的有益效果不大,因此,优选10%的羊膜干细胞培养上清。

[0063] (3) 计算细胞首次传代收获数量,选择优化培养条件。表3为氧浓度优化实验结果。

[0064] 表3:氧浓度优化实验结果。

[0065]

组别	氧浓度	第三代扩增时间	首次传代收获的细胞总数(个)
1	3%	24d	4.5×10^6
2	8%	21d	15.7×10^6
3	15%	24d	8.2×10^6
4	21%	26d	6.4×10^6

[0066] 由表3可知,随着氧浓度的增加,首次传代收获的细胞数在逐渐变多,并且在氧浓度为8%时,培养时间最短且细胞数量最多,但是当氧浓度超过15%时,培养时间变长且细胞数开始逐步减少。由此可见,在8%的低氧环境下首次传代收获的细胞总数最多,促进牙髓间充质干细胞的增殖率最高。因此,优选8%的低氧条件。

[0067] 因此,所述优化培养基为含10%羊膜干细胞培养上清、0.32mmol/L α -酮戊二酸的无血清培养基,且优化培养条件为氧气8%。

[0068] 本发明模拟间充质干细胞体内生长环境,使用8%低氧条件可以维持牙髓间充质干细胞的未分化状态,而且细胞的生长速率也较常氧状态(21%)更好;使用优化培养基提高了牙髓间充质干细胞的纯度和扩增速率,减少了细胞体外培养的时间。优化培养基中添加0.32mmol/L α -酮戊二酸可以促进去甲基化,让整个基因组保持开放,保留自己的分化能力,还可提高谷氨酰胺的利用效率,刺激细胞的增殖;同时添加10%羊膜干细胞培养上清,为

牙髓间充质干细胞的生长增殖提供了营养基础;采用无血清培养基进行培养,无异种蛋白的加入,免受异源病原微生物的威胁、减少过敏和排异反应,提高了临床应用的安全性,无血清培养基的使用也减少了分化的潜在发生,保持了牙髓间充质干细胞良好的特性。

[0069] (4)换液:所述低氧条件下培养7天后,轻轻晃动培养皿,进行半量换液,10天后轻轻晃动培养皿,进行全量换液。

[0070] 在细胞培养中,贴壁细胞首次换液的时间很关键,传统方法在细胞贴壁24h后即进行换液,但是牙髓间充质干细胞含量本来就少,经消化后其贴壁能力较弱,如果在短时间内就进行换液,势必会损失一部分细胞,本发明在7天后进行首次半量换液,可以给细胞充分的时间以适应新的生长环境,有利于细胞的稳定贴壁和生长增殖。牙髓间充质干细胞原代培养7天后细胞的生长状态见图1。牙髓间充质干细胞原代培养10天后细胞的生长状态见图2。

[0071] 步骤6、原代牙髓间充质干细胞汇合率达70%时,使用胰酶消化,进行传代培养。

[0072] 当细胞汇合率达到70%时,弃掉培养基,用PBS缓冲液洗涤一次,加入0.25%的胰酶消化2-3min,至细胞由梭形变得浑圆,然后终止消化,使用移液管轻轻吹打,将细胞从培养皿底吹下来,转移到离心管中,离心力800g离心5min,重悬后进行细胞计数,将细胞按 1×10^4 个/cm²的密度接种于已包被的培养皿中,在低氧条件下进行细胞培养。牙髓间充质干细胞传代细胞的生长状态见图3。

[0073] 步骤7、对传代牙髓间充质干细胞进行流式细胞表型分析。

[0074] 流式细胞检测:收集第二代培养的牙髓间充质干细胞做流式细胞检测,流式细胞仪分析细胞表面标记时,所用抗体包括下列细胞表面分子的抗体:CD90、CD73、CD79a、CD14、HLA-DR、CD29、CD105、STRO-1、CD34、CD45,具体流式检测结果如表4所示,不同氧浓度下第三代细胞的流式检测如表5所示。牙髓间充质干细胞流式检测图见图4。

[0075] 表4:第二代牙髓间充质干细胞流式细胞检测结果。

[0076]

抗体	第二代
CD90	98.65
CD73	97.61
CD105	98.69
CD29	99.12
STRO-1	98.91
CD14	1.14
HLA-DR	0.92
CD79a	1.42
CD34	1.60
CD45	1.10

[0077] 由表4可知,本发明所获取的第二代牙髓间充质干细胞符合国际细胞治疗协会关于间充质干细胞的标准:阳性表达率 $\geq 95\%$,阴性表达率 $\leq 2\%$,表明所获得的牙髓间充质干细胞可作为临床研究和应用的种子细胞。

[0078] 表5:不同氧浓度下第三代牙髓间充质干细胞流式检测。

[0079]

氧浓度	CD29	CD90	CD73	CD34	CD45
3%	99.24	99.61	99.07	0.14	0.52
8%	98.93	99.54	99.35	0.17	1.14
15%	99.10	98.83	99.29	1.10	1.05
21%	99.12	99.18	98.42	0.1	1.02

[0080] 由表5可知,不同氧浓度条件下培养的牙髓间充质干细胞第三代细胞,均符合国际细胞治疗协会关于间充质干细胞的标准:阳性表达率 $\geq 95\%$,阴性表达率 $\leq 2\%$;且不同氧浓度条件培养的细胞检测结果一致,表明低氧条件对牙髓间充质干细胞的生长没有影响。

[0081] 步骤8、将传代牙髓间充质干细胞接种于铺有脱细胞羊膜基质的培养皿中。

[0082] 用灭菌载玻片将脱细胞羊膜基质铺平在细胞培养皿底,备用;当传代牙髓间充质干细胞汇合率达70%时,弃掉培养基,用PBS缓冲液洗涤一次,加入0.25%的胰酶消化2-3min,至细胞由梭形变得浑圆,然后终止消化,使用移液管轻轻吹打,将细胞从培养皿底吹下来,转移到离心管中,离心力800g离心5min,优化培养基重悬后进行细胞计数,最后将细胞按5000-6000个细胞/ cm^2 的密度接种于脱细胞羊膜基质上,24h内牙髓间充质干细胞几乎全部贴壁。

[0083] 步骤9、待牙髓间充质干细胞在脱细胞羊膜基质上贴附24h后,弃掉培养基,然后用眼科镊另夹起一层新的脱细胞羊膜基质,覆盖在牙髓间充质干细胞上,加入优化培养基继续培养。由此可见,对牙髓间充质干细胞进行双层包裹的基质为脱细胞羊膜基质。

[0084] 步骤10、牙髓间充质干细胞汇合率达90%时弃掉培养基,用PBS缓冲液清洗2次,然后加入神经细胞诱导液培养2-3天,即可观察到有60%的神经细胞。不同时间点观察分化为神经细胞的百分数对比结果如表6所示。

[0085] 所述神经细胞诱导液为:含1%N2 supplement、15mM HEPES、15mM L-谷氨酰胺、20ng/mL bFGF、20ng/mL EGF、20ng/mL层粘连蛋白2、20ng/mL层粘连蛋白8的无血清培养基。所述神经细胞诱导液需新鲜配制,即现用现配。

[0086] 表6:不同时间点观察分化为神经细胞的百分数对比。

[0087]

处理方法	6h	1d	2d	3d	4d
优化培养基	0	0	0	0	0
普通诱导培养基	5.1%	7.2%	21.5%	37.6%	67.4%
神经细胞诱导液	5.4%	10.4%	28.2%	50.1%	89.9%
神经细胞诱导液+脱细胞羊膜基质	6.1%	12.5%	48.3%	65.6%	95.1%

[0088] 由表6可知,本发明中优化培养基不会造成牙髓间充质干细胞的分化,并且神经细胞诱导液配合两层脱细胞羊膜基质促进牙髓间充质干细胞分化为神经细胞的速率比普通诱导培养基快2倍左右。其中细胞因子bFGF、EGF、层粘连蛋白2和层粘连蛋白8作为诱导向神经分化的关键因子,触发了牙髓间充质干细胞向神经分化;脱细胞羊膜基质作为立体支架,为神经细胞提供了神经鞘结构,为神经的生长起到导向作用,提高了向神经细胞分化的速度,获取的神经细胞数量增加。

[0089] 步骤11、弃掉神经细胞诱导液后,用PBS清洗,然后加入神经细胞维持液继续培养,

同时注意在显微镜下随时观察细胞生长状态以及细胞形态,并拍照记录结果。维持培养12d时神经细胞生长状态见图5。

[0090] 所述神经细胞维持液为:含0.1mM NEAA、10ng/mL BDNF、10ng/mL NGF、10ng/mL NT-3、15mM L-谷氨酰胺、10ng/mL TGF、10ng/mL层粘连蛋白2、10ng/mL层粘连蛋白8的DMEM培养基。所述神经细胞维持液需新鲜配制,即现用现配。

[0091] 所述神经细胞维持液可以对神经细胞持续培养10天以上,其含有NT-3、BDNF、NGF、层粘连蛋白2、层粘连蛋白8,起到营养和保护的作用,可保持神经细胞较高的细胞活性,不会出现细胞大量增殖而导致的细胞逐步衰老死亡的现象,便于临床医生灵活掌握治疗时间。

[0092] 步骤12、免疫荧光法进行神经细胞鉴定,具体步骤如下。

[0093] (1)将神经细胞从脱细胞羊膜基质上消化后进行细胞计数。

[0094] (2)在24孔板内放置玻片。

[0095] (3)按照 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种细胞,待细胞贴壁后,吸除上清,用PBS缓冲液清洗3次,用小镊子取出玻片。

[0096] (4)玻片用冰冷的丙酮浸泡10min,进行固定,取出后用PBS缓冲液清洗。

[0097] (5)用含0.05%TirtionX-100的PBS缓冲液混合10%山羊血清溶液室温下封闭1h。

[0098] (6)吸干封闭缓冲液,在玻片上滴加足量的鼠抗人 β -tubulinⅢ单抗,于37℃水浴孵育45min。

[0099] (7)吸去鼠抗人 β -tubulinⅢ单抗,用PBS缓冲液洗涤3次,在玻片上滴加相应的羊抗鼠荧光二抗,于37℃水浴孵育1h。

[0100] (8)吸去羊抗鼠荧光二抗,用PBS缓冲液洗涤4次,置于荧光显微镜下观察并拍照记录。牙髓间充质干细胞诱导为神经细胞的免疫荧光染色见图6。

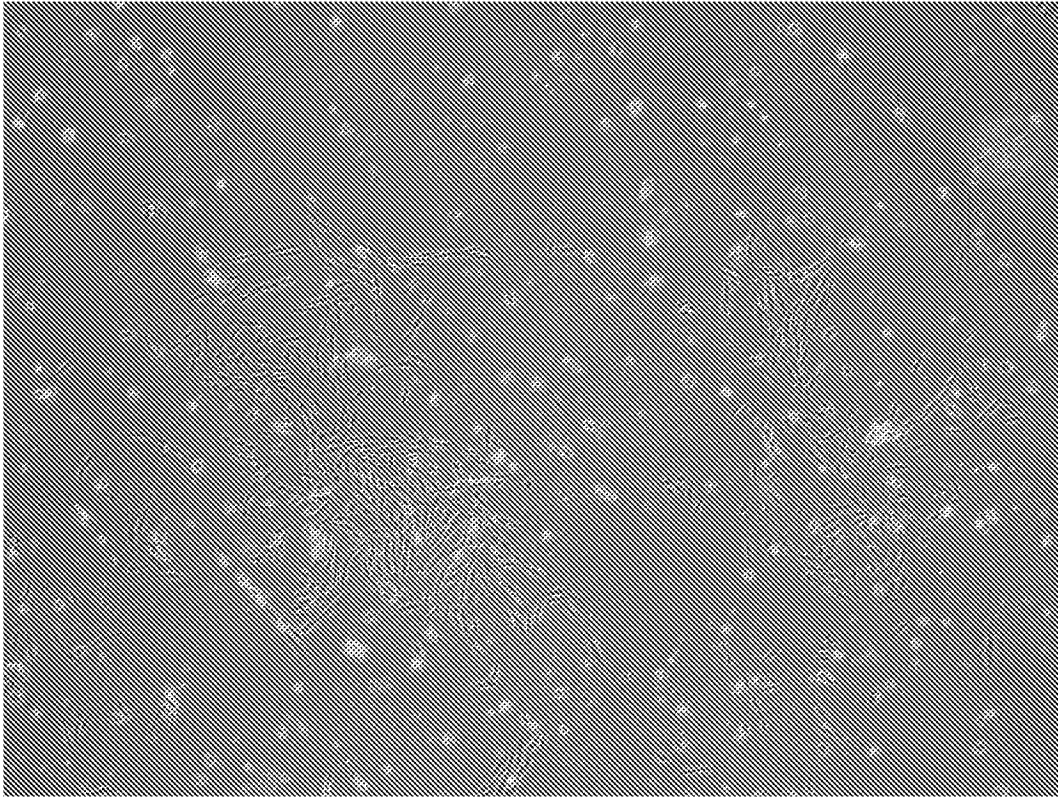


图1

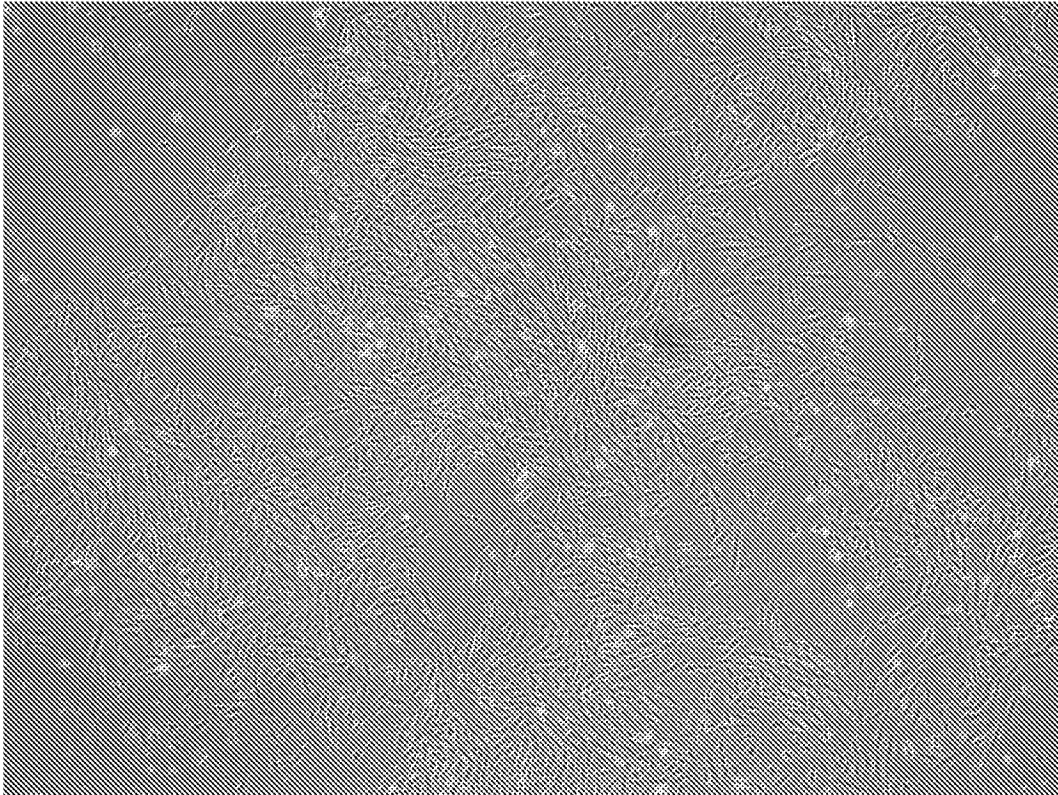


图2

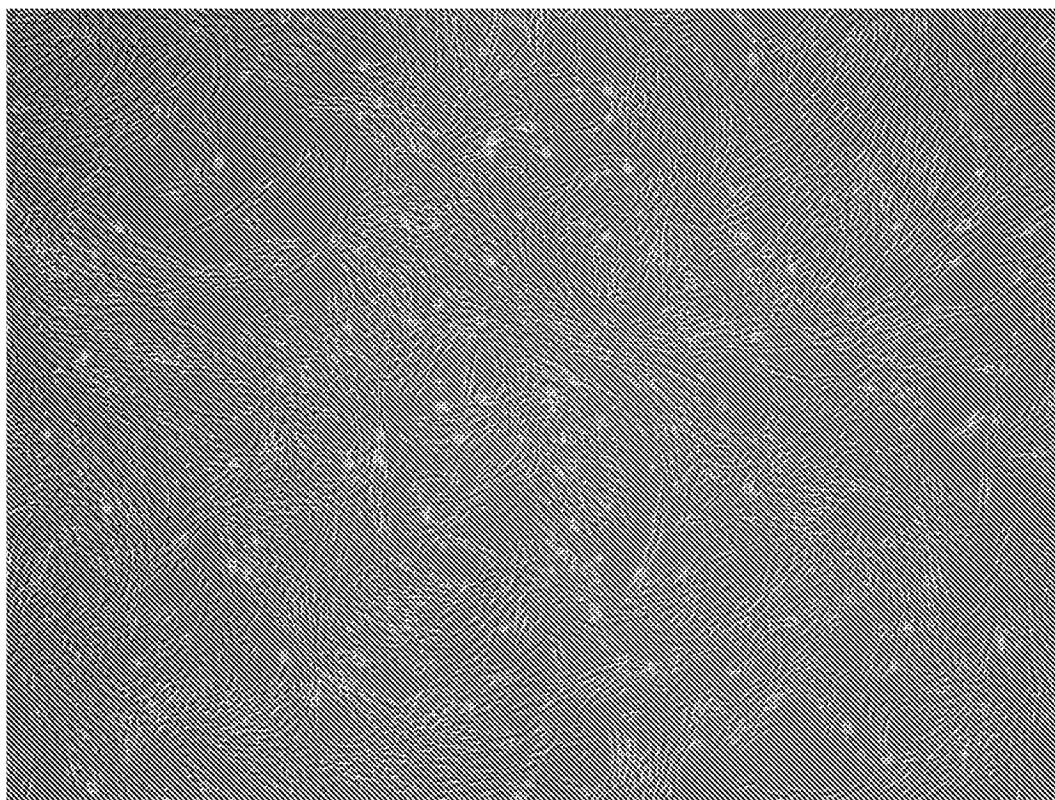


图3

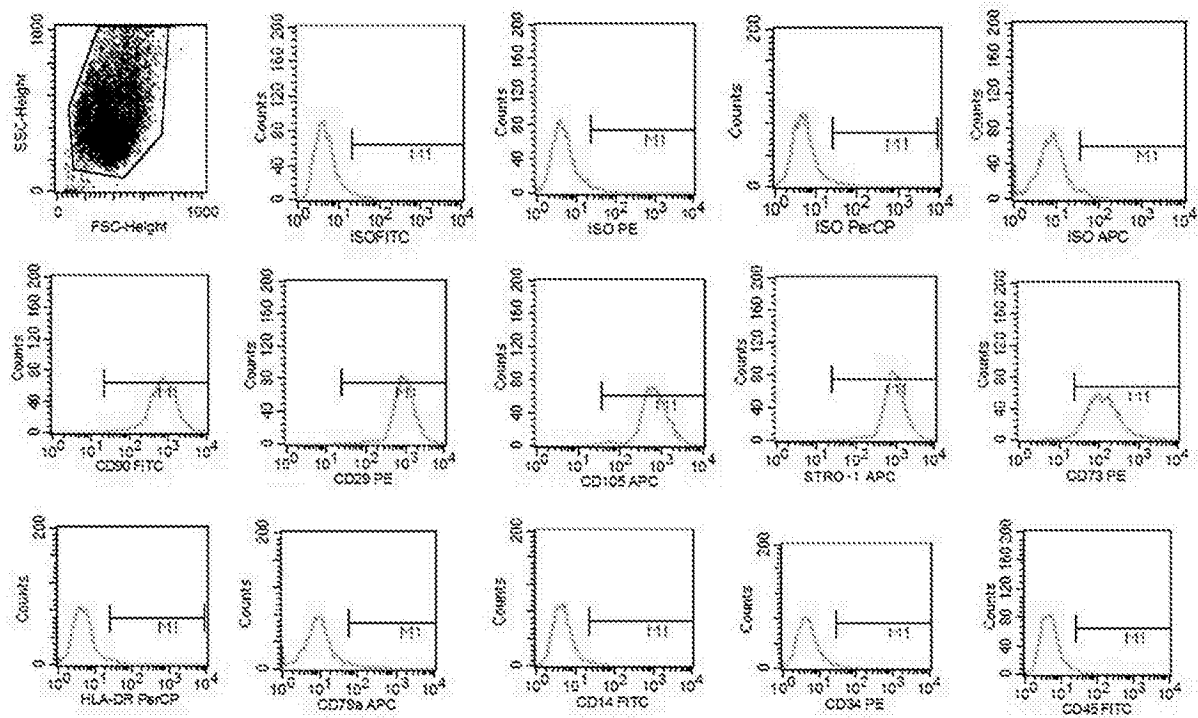


图4

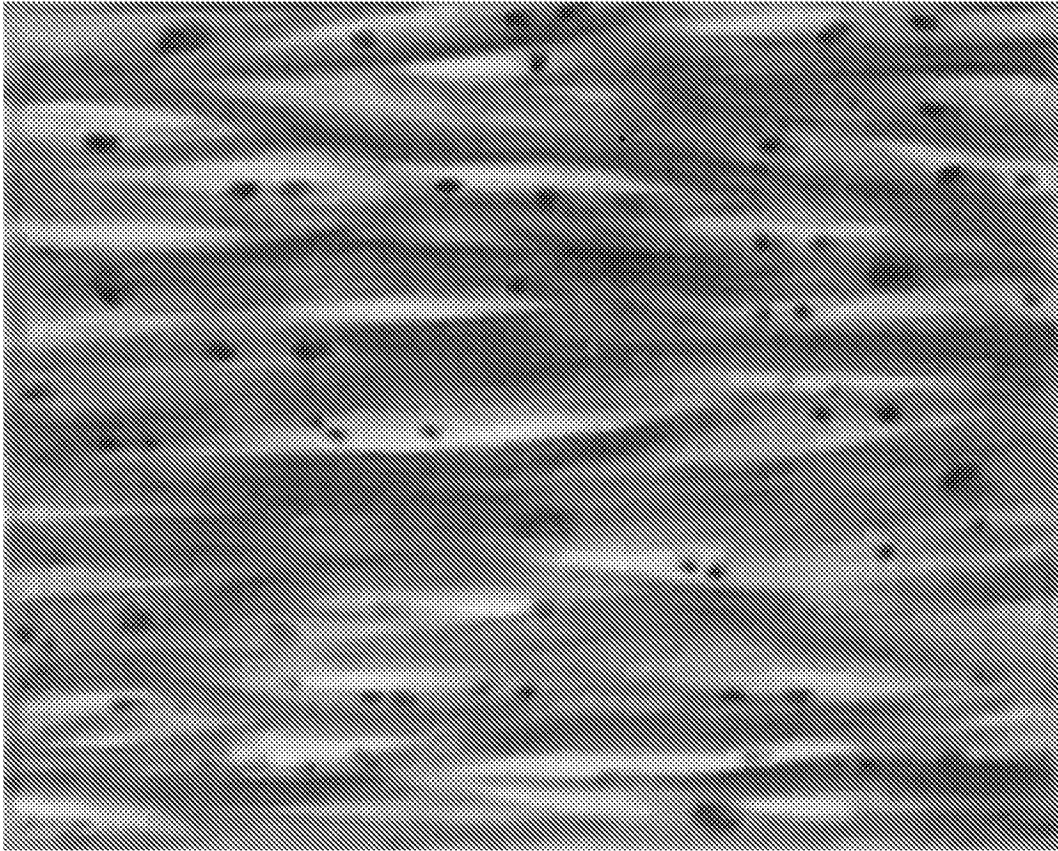


图5

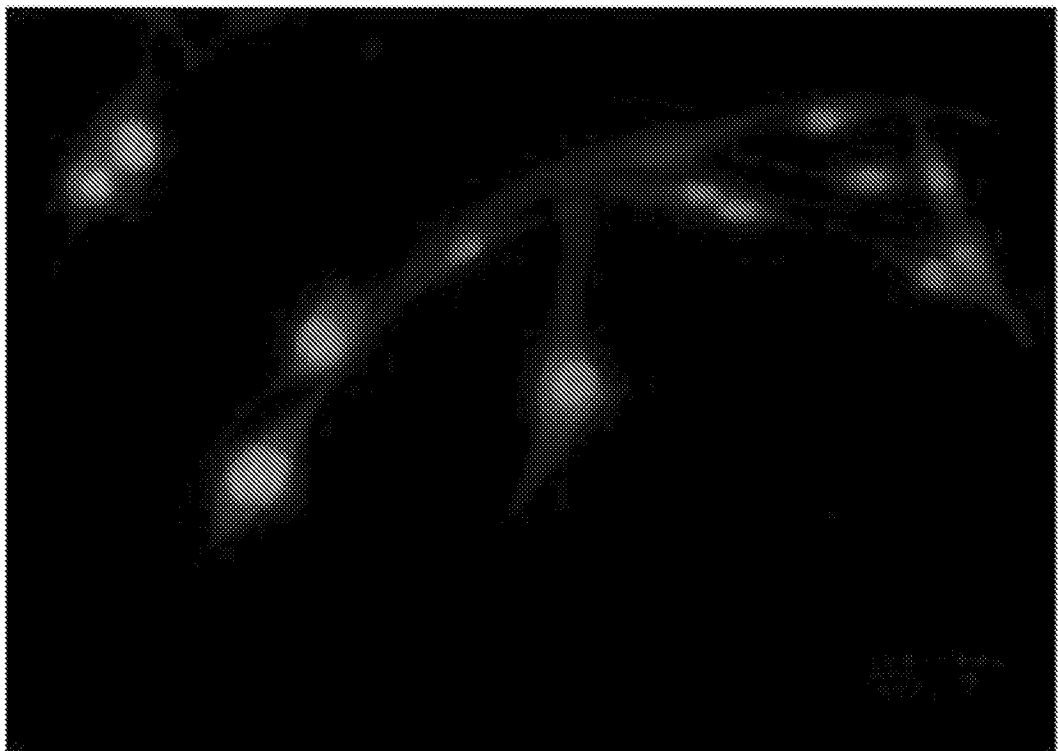


图6