



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106983704 A

(43) 申请公布日 2017. 07. 28

(21) 申请号 201610035875. 4

(22) 申请日 2016. 01. 20

(71) 申请人 北京泰盛生物科技有限公司

地址 102200 北京市昌平区科技园区回龙观
中关村生命科学园生命园路8号3号楼
A座一层(昌平示范区)

(72) 发明人 施松涛

(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 刘向昕

(51) Int. Cl.

A61K 8/98(2006. 01)

A61K 8/64(2006. 01)

A61Q 19/02(2006. 01)

A61Q 19/00(2006. 01)

A61Q 19/08(2006. 01)

权利要求书2页 说明书10页 附图14页

(54) 发明名称

间充质干细胞培养物或其培养上清的用途

(57) 摘要

本发明涉及间充质干细胞培养物或其培养上清的用途。具体地,本发明涉及间充质干细胞培养物、所述间充质干细胞培养物中的培养上清、间充质干细胞的分泌物、由培养物或培养上清或间充质干细胞的分泌物制得的冻干粉以及冻干粉溶解后得到的溶液用于制备化妆品组合物的用途。本发明还涉及含有TNF- α 、IL-6和IFN- γ 的化妆品组合物。本发明制得的化妆品组合物能够明显改善肤质,促进皮肤组织修复、减缓皮肤衰老,且间充质干细胞来源丰富,可以自体使用,更安全、方便,具有很好的应用前景。

1. 间充质干细胞培养物或其培养上清用于制备化妆品组合物的用途。
2. 间充质干细胞培养物或其培养上清用于制备改善皮肤肤质、促进皮肤组织修复、减轻和/或淡化瘢痕、或减缓皮肤衰老的制剂的用途。
3. 间充质干细胞的分泌物用于制备化妆品组合物的用途。
4. 间充质干细胞的分泌物用于制备改善皮肤肤质、促进皮肤组织修复、减轻和/或淡化瘢痕、或减缓皮肤衰老的制剂的用途。
5. 一种改善皮肤肤质、促进皮肤组织修复、减轻和/或淡化瘢痕、或减缓皮肤衰老的方法,所述方法包括给予有需要的受试者有效量的间充质干细胞培养物或其培养上清、或者间充质干细胞的分泌物、或者含有间充质干细胞培养物或其培养上清的化妆品组合物或制剂、或者含有间充质干细胞的分泌物的化妆品组合物或制剂的步骤。
6. 权利要求1或2的用途、或权利要求5的方法,其中所述的间充质干细胞培养物为由适合培养间充质干细胞的培养基培养间充质干细胞所得的培养物。
7. 权利要求3或4的用途、或权利要求5的方法,其中所述的间充质干细胞的分泌物为由适合培养间充质干细胞的培养基培养间充质干细胞所得的分泌物。
8. 权利要求6或7的用途或方法,其中所述的适合培养间充质干细胞的培养基不含有酚红。
9. 权利要求6或7的用途或方法,其中所述的由适合培养间充质干细胞的培养基培养间充质干细胞所得的培养物或其培养上清、或者所得的分泌物为由适合培养间充质干细胞的培养基培养间充质干细胞第三代或第四代所得的培养物或其培养上清、或者所得的分泌物。
10. 权利要求1-9任一项的用途或方法,其中所述的间充质干细胞选自牙龈干细胞、牙周膜干细胞、骨髓干细胞、根尖牙乳头干细胞、乳牙骨髓干细胞和牙囊前体干细胞、骨髓间充质干细胞(例如颌骨骨髓间充质干细胞)和脂肪间充质干细胞。
11. 权利要求6-9任一项的用途或方法,其中所述的适合培养间充质干细胞的培养基选自MEM培养基、DMEM培养基和DMEM:F12培养基。
12. 权利要求11的用途或方法,其中所述的适合培养间充质干细胞的培养基还含有血清。
13. 权利要求11或12的用途或方法,其中所述的适合培养间充质干细胞的培养基不含有抗生素。
14. 权利要求1-13任一项的用途或方法,其中所述的间充质干细胞培养物或其培养上清、或者所述的间充质干细胞分泌物含有TNF- α 、IL-6和IFN- γ 。
15. 权利要求1-14任一项的用途或方法,其中所述的间充质干细胞培养物或其培养上清、或者间充质干细胞的分泌物为冻干粉。
16. 权利要求1-14任一项的用途或方法,其中所述的间充质干细胞培养物或其培养上清、或者间充质干细胞的分泌物为溶液,所述溶液通过以下方法制备得到:将所述间充质干细胞培养物或其培养上清、或者间充质干细胞的分泌物制得的冻干粉溶解在溶剂中。
17. 权利要求16的用途或方法,其中所述溶剂选自血清、生理盐水、葡萄糖溶液(例如等渗葡萄糖溶液)和甘油。
18. 权利要求1-17任一项的用途或方法,其中所述的化妆品组合物或制剂还含有化妆

品组合物中可接受的辅料。

19. 权利要求2或4的用途或者权利要求5的方法,其中所述的改善皮肤肤质选自减轻皱纹、淡化色斑、使皮肤更紧致和使皮肤更红润。

20. 组合物,其含有TNF- α 、IL-6和IFN- γ 。

21. 权利要求20的组合物,其为化妆品组合物。

22. 权利要求20的组合物在制备化妆品组合物中的用途。

23. 权利要求22的用途,其中所述化妆品组合物用于改善皮肤肤质、促进皮肤组织修复、减轻和/或淡化瘢痕、或减缓皮肤衰老,优选地,其中所述改善皮肤肤质选自减轻皱纹、淡化色斑、使皮肤更紧致和使皮肤更红润。

24. 权利要求20的组合物在制备用于制备改善皮肤肤质、促进皮肤组织修复、减轻和/或淡化瘢痕、或减缓皮肤衰老的制剂或化妆品组合物的用途。

间充质干细胞培养物或其培养上清的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及间充质干细胞的用途,具体地,本发明涉及间充质干细胞培养物、所述间充质干细胞培养物中的培养上清、间充质干细胞的分泌物、由培养物或培养上清或间充质干细胞的分泌物制得的冻干粉以及冻干粉溶解后得到的溶液用于制备化妆品组合物的用途。本发明还涉及含有TNF- α 、IL-6和IFN- γ 的化妆品组合物。

背景技术

[0002] 干细胞是一类具有自我复制能力及多向分化潜能的未分化的细胞,具有再生人体各种组织器官的潜在功能,因此又被医学界称为“万能细胞”。多项研究证实干细胞在特定的诱导条件下,可分化为脂肪、骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带、神经、肝、心肌、内皮等多种组织细胞,不仅如此,干细胞经过连续传代培养和冷冻保存后仍能保存最初的多向分化潜能,可作为理想的种子细胞用于衰老和病变引起的组织器官损伤修复。

[0003] 目前的干细胞研究主要集中在抵抗衰老、器官移植、疾病治疗以及免疫系统自身修复等方面。美国食品药品监督管理局已批准了60余项干细胞临床试验,涉及:1. 增强造血功能、促使造血干细胞移植物的植入以及移植物抗宿主病的治疗。2. 组织损伤如骨、软骨、关节损伤、心脏损伤、肝脏损伤、脊髓损伤和神经系统损伤等修复。3. 自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮、硬皮病、炎症肠炎等疾病的治疗等诸多方面。近年来我国也已开始用干细胞在临床上治疗一些难治性疾病,如脊髓损伤、脑瘫、肌萎缩侧索硬化症、系统性红斑狼疮、系统性硬化症、克隆氏病、中风、糖尿病、糖尿病足、肝硬化等,均都取得明显的疗效。

[0004] 关于干细胞在皮肤再生和抗衰老方面的作用也已有一些研究。例如,蓝粉国际全球研发中心很早以来就开始该领域的研究,并成立了独立的试验部门,致力于研究人类肌肤干细胞,并已经发现这种新的生命之源:真皮层干细胞。它位于肌肤的最深层,对改善真皮基层细胞的活力起着至关重要的作用。

[0005] 另外,1962年,美国科学家科恩博士发现了决定皮肤年龄的“表皮生长因子”。并进一步证实:表皮生长因子的缺失,是导致皮肤衰老的根本原因,给皮肤补充表皮生长因子,可以使衰老的皮肤再年轻。从此,皮肤年轻与衰老的奥秘被揭开,人类再年轻的梦想变成现实。1986年12月10日,科恩博士因此获得了世界科学的最高奖之一诺贝尔奖。

[0006] 但目前尚没有将间充质干细胞特别是口腔组织来源的间充质干细胞的培养物用于皮肤组织修复、减缓皮肤衰老或制备化妆品的报道。

发明内容

[0007] 本发明的发明人出人意料地发现,间充质干细胞特别是口腔组织来源的间充质干细胞的细胞培养物或其培养上清、或者间充质干细胞的分泌物可促进皮肤组织修复、减轻和/或淡化瘢痕、减缓皮肤衰老,明显改善皮肤肤质,因而特别适合用于制备化妆品,由此完成了本发明。

[0008] 本发明第一方面涉及间充质干细胞培养物或其培养上清用于制备化妆品组合物

的用途。

[0009] 本发明第二方面涉及间充质干细胞培养物或其培养上清用于制备改善皮肤肤质、促进皮肤组织修复、减轻和/或淡化瘢痕、或减缓皮肤衰老的制剂的用途。

[0010] 本发明第三方面涉及间充质干细胞的分泌物用于制备化妆品组合物的用途。

[0011] 本发明第四方面涉及间充质干细胞的分泌物用于制备改善皮肤肤质、促进皮肤组织修复、减轻和/或淡化瘢痕、或减缓皮肤衰老的制剂的用途。

[0012] 本发明第五方面涉及一种改善皮肤肤质、促进皮肤组织修复、减轻和/或淡化瘢痕、或减缓皮肤衰老的方法,所述方法包括给予有需要的受试者有效量的间充质干细胞培养物或其培养上清、或者间充质干细胞的分泌物、或者含有间充质干细胞培养物或其培养上清的化妆品组合物或制剂、或者含有间充质干细胞的分泌物的化妆品组合物或制剂的步骤。

[0013] 以下对上述五个方面做进一步描述。

[0014] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的间充质干细胞培养物为由适合培养间充质干细胞的培养基培养间充质干细胞所得的培养物。

[0015] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的间充质干细胞培养物的培养上清是指由适合培养间充质干细胞的培养基培养间充质干细胞所得的培养物的培养上清,即去除间充质干细胞培养物中的间充质干细胞后所得的上清部分;其中去除培养物中细胞的方法为本领域所公知,例如离心、过滤等。

[0016] 在本发明的一个实施方案中,所述间充质干细胞培养物中含有间充质干细胞、适合培养间充质干细胞的培养基以及在培养细胞过程中细胞分泌产生的物质(即分泌物,例如细胞因子等)。

[0017] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的间充质干细胞的分泌物为由适合培养间充质干细胞的培养基培养间充质干细胞所得的分泌物。

[0018] 在本发明中,所述间充质干细胞的分泌物是指间充质干细胞在培养过程中所分泌的物质,例如所分泌的蛋白质,其中所述蛋白质例如包括酶、抗体、激素和细胞因子等。

[0019] 在本发明的一个实施方案中,所述间充质干细胞的分泌物含有TNF- α 、IL-6和IFN- γ 等细胞因子。

[0020] 在本发明的一个实施方案中,所述间充质干细胞的分泌物不含有生长激素(GH),表皮生长因子(EGF)和内皮细胞生长因子(ECGF)。

[0021] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的适合培养间充质干细胞的培养基不含有酚红。

[0022] 本领域公知,酚红作为酸碱指示剂常用于细胞培养基中;在本发明的一个实施方案中,考虑到酚红不适于制备化妆品,因此所述细胞培养基中不添加酚红,因而在间充质干细胞培养物中也不含有酚红。同样地,本领域技术人员能够理解,如果在细胞培养基中含有不适合用于化妆品的物质,而去掉该物质又不会影响间充质干细胞的生长,则在制备化妆品组合物时,细胞培养基中应不含有该物质,例如抗生素。

[0023] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的由适合培养间充质干细胞的培养基培养间充质干细胞所得的培养物或其培养上清为由适合培养间充质干细胞的培养基培养间充质干细胞第三代或第四代所得的培养物或其培养上清。

[0024] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的由适合培养间充质干细胞的培养基培养间充质干细胞所得的分泌物为由适合培养间充质干细胞的培养基培养间充质干细胞第三代或第四代所得的分泌物。

[0025] 在本发明中,刚刚分离得到的间充质干细胞为原代间充质干细胞,即第零代间充质干细胞,经过两次传代后得到第二代,经过三次传代后得到第三代,经过四次传代后得到第四代。在本发明的实施方案中,第三代或第四代间充质干细胞培养物或其培养上清用于制备化妆品的效果最好。

[0026] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的间充质干细胞选自牙龈干细胞(gingival mesenchymal stem cells,GMSC)、牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells,PDLSC)、牙髓干细胞(post-natal dental pulp stem cells,DPSC)、根尖牙乳头干细胞(stem cells from apical papilla,SCAP)、乳牙牙髓干细胞(stem cells from exfoliated deciduous teeth,SHED)、牙囊前体干细胞(dental follicle precursor cells,DFPC)、骨髓间充质干细胞(BMMSCs)和脂肪间充质干细胞(ADSCs)。在本发明的一个具体实施方案中,所述骨髓间充质干细胞为人颌骨骨髓间充质干细胞hABMMSCs(human alveolar bone marrow mesenchymal stem cells)。

[0027] 在本发明中,所述适合培养间充质干细胞的培养基为本领域所公知,例如选自MEM培养基、DMEM培养基和DMEM:F12培养基。在本发明的一个实施方案中,所述适合培养间充质干细胞的培养基为 α -MEM培养基。

[0028] 本领域公知,MEM培养基的配方并不是固定不变的,根据不同的培养需求可能有不同的加减变化,例如可参考<http://www.thermofisher.com/cn/zh/home.html>中对相关产品的描述。

[0029] 在本发明的一个具体实施方案中,所述的无酚红MEM培养基为Thermo Fisher公司旗下的GBICO产品,货号为:41061-029。

[0030] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的适合培养间充质干细胞的培养基还含有谷氨酰胺,其浓度例如为1-3mM。

[0031] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的适合培养间充质干细胞的培养基还含有血清(例如胎牛血清),其浓度例如为5%-20%。

[0032] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的适合培养间充质干细胞的培养基不含有抗生素。

[0033] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的间充质干细胞培养物或其培养上清中含有TNF- α 、IL-6和IFN- γ 。

[0034] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的间充质干细胞分泌物含有TNF- α 、IL-6和IFN- γ 。

[0035] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的间充质干细胞培养物或其培养上清为冻干后制得的冻干粉。

[0036] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的间充质干细胞的分泌物为冻干粉。

[0037] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的间充质干细胞培养物或其培养上清为溶液,所述溶液通过以下方法制备得到:将所述间充质干细胞培养物或其培养上清制得的冻干粉溶解在溶剂中。

[0038] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的间充质干细胞的分泌物为溶液,所述溶液通过以下方法制备得到:将所述间充质干细胞的分泌物制得的冻干粉溶解在溶剂中。

[0039] 在本发明的一个实施方案中,其中所述溶剂可以为任何可以溶解上述冻干粉并且适合药用或化妆品用的溶剂,例如选自血清、生理盐水、葡萄糖溶液(例如等渗葡萄糖溶液)和甘油。

[0040] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的化妆品组合物或制剂还含有化妆品组合物中可接受的辅料(例如载体或赋形剂)。

[0041] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的改善皮肤肤质选自减轻皱纹、淡化色斑、使皮肤更紧致和使皮肤更红润。

[0042] 本发明还涉及组合物,其含有TNF- α 、IL-6和IFN- γ 。

[0043] 在本发明的一个实施方案中,其中所述组合物为化妆品组合物。

[0044] 在本发明的一个实施方案中,其中所述化妆品组合物中还含有化妆品中可接受的辅料。

[0045] 在本发明中,所述化妆品中可接受的辅料为本领域所公知。本领域技术人员可以根据化妆品的种类适宜选择并配合通常化妆品中使用的原料,例如可以配合角鲨烯、液态石蜡、异链烷烃、凡士林、微晶蜡、地蜡、精炼地蜡、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、异硬脂酸、鲸蜡醇、硬脂醇、十六醇、油醇、鲸蜡基-2-乙基己酸酯、2-乙基己基棕榈酸酯、2-辛基十二烷基肉豆蔻酸酯、2-辛基十二基胶酯、新戊二醇-2-乙基己酸酯、异辛酸甘油三酯、2-辛基十二烷基油酸酯、异丙基肉豆蔻酸酯、异丙基棕榈酸酯、异硬脂酸甘油三酯、椰油脂肪酸甘油三酯、橄榄油、油梨油、蜜蜡、肉豆蔻酸肉豆蔻脂、貂油、羊毛脂等各种烃、高级脂肪酸、油脂类、酯类、高级醇、蜡类、硅油等油分、丙酮、甲苯、乙酸丁酯、乙酸乙酯等有机溶剂、醇酸树脂、丙烯酸树脂、尿素树脂等树脂、樟脑、柠檬酸乙酰基三丁酯等增塑剂、紫外线吸收剂、抗氧化剂、防腐剂、表面活性剂、保湿剂、香料、水、醇、增粘剂等。另外,作为化妆品中使用的粉体,例如可以使用滑石、高岭土、绢云母、白云母、合成云母、金云母、红云母、黑云母、鳞云母、蛭石、碳酸镁、碳酸钙、硅藻土、硅酸镁、硅酸钙、硅酸铝、硅酸钡、硫酸钡、硅酸锶、钨酸金属盐、二氧化硅、羟基磷灰石、沸石、氮化硼、陶瓷粉末等无机粉末,尼龙粉末、聚乙烯粉末、苯代三聚氰胺粉末、四氟乙烯粉末、二苯乙烯苯基针孔聚合物粉末、微晶纤维素粉等有机粉末,硅橡胶、硅树脂的粉末、氧化钛、氧化锌等无机白色颜料,氧化铁(铁丹)、钛酸铁等无机红色颜料, γ -氧化铁等无机褐色系颜料,黄色氧化铁、黄土等无机黄色颜料,黑色氧化铁、碳黑等无机黑色系颜料,芒果紫、钴紫等无机紫色颜料,氧化铬、氢氧化铬、钛酸钴等无机绿色颜料,群青、普鲁士蓝等无机蓝色颜料,氧化钛被覆云母、氧化钛被覆氯化氧铋、氯化氧铋、氧化钛被覆滑石、鱼鳞箔、染色氧化钛被覆云母等珠光颜料,铝粉、铜粉等金属粉末颜料,红色201号、红色202号、红色204号、红色205号、红色220号、红色226号、红色228号、红色405号、橙色203号、橙色204号、黄色205号、黄色401号和蓝色404号等的有机颜料,红色3号、红色104号、红色106号、红色227号、红色203号、红色401号、红色505号、橙色205号、黄色4号、黄色5号、黄色202号、黄色203号、绿色3号和蓝色1号的锆、钡或铝色淀等有机颜料,叶绿素、 β -胡萝卜素等天然色素,但不限于这些。

[0046] 在本发明的一个实施方案中,其中所述化妆品组合物中含有水,甘油聚甲基丙烯酸酯(和)丙二醇,矿脂,二辛基醚,PEG-5甘油硬脂酸酯,甘油,聚二甲基硅氧烷醇,鲸蜡醇,

甜杏仁油,丙烯酸/C10-30烷基丙烯酸聚合物,醋酸盐维他命E,苯氧乙醇,苯甲醇,乙二胺四乙基二钠,氢氧化钠和乳酸。

[0047] 本发明还涉及本发明任一项的组合物在制备化妆品组合物中的用途。

[0048] 在本发明的一个实施方案中,其中所述化妆品组合物用于改善皮肤肤质、促进皮肤组织修复、减轻和/或淡化瘢痕、或减缓皮肤衰老,优选地,其中所述改善皮肤肤质选自减轻皱纹、淡化色斑、使皮肤更紧致和使皮肤更红润。

[0049] 本发明还涉及本发明任一项的组合物在制备用于制备改善皮肤肤质、促进皮肤组织修复、减轻和/或淡化瘢痕、或减缓皮肤衰老的制剂或化妆品组合物的用途。

[0050] 在本发明的一个实施方案中,其中所述的改善皮肤肤质选自减轻皱纹、淡化色斑、使皮肤更紧致和使皮肤更红润。

[0051] 在本发明的一个实施方案中,利用细胞培养基培养间充质干细胞后的细胞培养上清与单纯的细胞培养基相比,细胞因子TNF- α 、IL-6和IFN- γ 的表达水平明显提高,因此其可作为有效成分用于改善肤质和促进皮肤组织修复。

[0052] 在本发明中,所述的间充质干细胞来源于哺乳动物,优选来源于人。所述的间充质干细胞培养物或其培养上清可用于自体或异体,优选用于自体。

[0053] 在本发明中,可以将间充质干细胞培养物或其培养上清注射或涂抹于皮肤,或者可以将培养物或其培养上清冻干后再用适当的溶剂溶解,然后再注射或涂抹于皮肤。在本发明的实施方案中,可以将间充质干细胞培养物或其培养上清与化妆品基质或其它化妆品基础成分混合,然后再注射或涂抹。

[0054] 在本发明中,所述瘢痕也称为疤痕,是各种创伤后所引起的正常皮肤组织的外观形态和组织病理学改变的统称,包括表浅性瘢痕、增生性瘢痕、萎缩性瘢痕和瘢痕疙瘩等多种类型。

[0055] 在本发明中,所述减轻和/或淡化瘢痕是指使瘢痕隆起减小、降低或变平,色泽淡化,更接近于正常皮肤。

[0056] 发明的有益效果

[0057] 本发明的发明人通过实验证明,间充质干细胞培养物或其培养上清可以有效促进皮肤组织修复、减缓皮肤衰老、改善皮肤肤质,并且证明了培养物或培养上清中的TNF- α 、IL-6和IFN- γ 起到了关键作用。

[0058] 本发明采用的是间充质干细胞,特别是口腔干细胞,其组织来源充足,受环境因素影响低,取材方便快捷,无需较大创伤,即可提取出大量口腔干细胞。尤其是牙龈干细胞提取过程极为简单,且其组织来源贴近上皮细胞,并且牙龈本身具有创伤后自行修复的能力,所以更为贴近肌肤,吸收效果更好。

[0059] 本发明可以采用自体或异体的口腔干细胞,无需担忧免疫排斥反应及炎症反应,产品稳定性及安全性较高。

附图说明

[0060] 图1用无酚红 α -MEM培养基培养牙龈干细胞(GMSC)、根尖牙乳头干细胞(SCAP)后的上清液再去刺激骨髓干细胞(DPSC)、牙周膜干细胞(PDLSC)及颌骨骨髓干细胞(BMSC)生长得到的细胞使用BrdU细胞免疫组化方法染色后的显微镜下图,其中的标尺代表500 μ m;其中

的vehicle组代表对照组。

[0061] 图2用无酚红 α -MEM培养基培养牙龈干细胞(GMSC)、根尖牙乳头干细胞(SCAP)后的上清液再去刺激牙髓干细胞(DPSC)、牙周膜干细胞(PDLSC)及颌骨骨髓干细胞(BMSC)生长得到的生长增殖率,其中纵坐标代表5-溴脱氧尿嘧啶核苷阳性细胞,*代表 $P < 0.05$,**代表 $P < 0.01$,***代表 $P < 0.001$;其中的vehicle组代表对照组。

[0062] 图3无酚红 α -MEM培养基培养牙龈干细胞后,细胞上清液中检测到的TNF- α 、IL-6和IFN- γ 三个因子的含量较没有培养过细胞的无酚红 α -MEM培养基中的含量有显著提升,其中*代表与对照相比 $P < 0.05$,**代表与对照相比 $P < 0.01$ 。

[0063] 图4细胞上清液收集后的照片(左)及冻干后的照片(右)图

[0064] 图5使用化妆品基质和添加了本发明细胞培养上清的化妆品的作用效果图,其中A和B的左图为化妆品基质,右图为添加了本发明细胞培养上清的化妆品,其中A为左侧面部,B为右侧面部。

[0065] 图6使用化妆品前和使用了本发明细胞培养上清的化妆品30天后的作用效果图,其中图A为使用化妆品前,图B为使用了本发明细胞培养上清的化妆品30天后。

[0066] 图7原代培养的牙龈干细胞、牙周膜干细胞、根尖牙乳头干细胞、牙髓干细胞和乳牙牙髓干细胞的显微镜下图

[0067] 图8牙髓干细胞的细胞免疫表型鉴定

[0068] 图9牙髓干细胞的成脂、成骨分化鉴定

[0069] 图10牙周膜干细胞的细胞免疫表型鉴定

[0070] 图11牙周膜干细胞的成脂、成骨分化鉴定

[0071] 图12牙龈干细胞的细胞免疫表型鉴定

[0072] 图13牙龈干细胞的成脂、成骨分化鉴定

[0073] 图14根尖牙乳头干细胞的细胞免疫表型鉴定

[0074] 图15根尖牙乳头干细胞的成脂、成骨分化鉴定

[0075] 图16乳牙牙髓干细胞的细胞免疫表型鉴定

[0076] 图17乳牙牙髓干细胞的成脂、成骨分化鉴定

具体实施方式

[0077] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0078] α -MEM培养基购自Thermo Fisher公司旗下的Gibco品牌,货号11095-080。所用的无酚红 α -MEM培养基为Thermo Fisher公司旗下的GIBCO品牌,货号为:41061-029。

[0079] 实施例1口腔相关干细胞的培养

[0080] 本实施例中采用的细胞培养基均为不含酚红的 α -MEM培养基(货号为:41061-029)。

[0081] 1.细胞传代方法

[0082] 待原代提取的口腔组织干细胞(参见实施例4,包括牙龈干细胞,根尖牙乳头干细

胞、牙髓干细胞、牙周膜干细胞、乳牙牙髓干细胞和牙囊前体干细胞等),细胞生长融合率为90%以上,可进行传代培养。传代培养方法为本领域常用的方法,具体为:

[0083] 1.1从孵箱内将需处理的细胞取出,在倒置显微镜下观察其生长状态,确定其处于对数生长期后拿进超净台内。

[0084] 1.2将吸引器头插上黄枪头后,打开真空泵,吸弃上清液。

[0085] 1.3沿容器内壁加入适量PBS,略微晃动平皿,冲洗残余培养基,之后重复上述步骤1.2后。

[0086] 1.4依据容器规格,沿150mm的细胞培养皿内壁加入8-10ml胰蛋白酶进行消化,将细胞转移至显微镜下观察其消化程度,期间可将其放入37℃孵箱内加速其消化(其时间依据细胞种类、试剂不同进行摸索),期间不断晃动介质,加速细胞消化,镜下观察约80%—90%细胞漂动后,立即加入等倍体积的培养基终止消化反应。

[0087] 1.5提前准备好离心管,用移液管反复吹打介质底部每个角落,将吹打消化下来的细胞转移至离心管内,在配平前将介质放至倒置显微镜下观察细胞残余量之后,离心1200rpm/7min。

[0088] 1.6等待离心完毕,将离心管取出,倒弃上清液,转用移液枪枪头尽可能将剩余的上清吸干,按1:4的传代比例加入4ml培养基重悬沉淀,充分混匀后,在每个所需介质中接种1ml细胞重悬液,再向150mm细胞培养皿中加入20-25ml培养基。

[0089] 1.7在介质表面标记细胞名称、代数、传代日期、操作者姓名,充分晃动介质,确保接种均匀后,将细胞转移至孵箱内37℃,5%CO₂培养。

[0090] 传代后的细胞,每2-3天观察一次,若细胞未生长至对数生长期则采取换液,若生长至对数生长期则按传代操作,通常传代至第三代或第四代后可用于化妆品的制备,其中实施例2的细胞增殖实验是将细胞培养传代至第三代,实施例3化妆品的制作中采用的细胞是将细胞培养传代至第四代。

[0091] 2.细胞换液方法

[0092] 2.1从孵箱内取出已达到正常传代天数的细胞,于倒置显微镜下观察其生长状态,若其指数生长并未达到对数生长期,需进行换液操作。

[0093] 2.4参照消化传代步骤1.2吸弃上清液的方法,依据介质加适量新鲜完全的培养基①若介质内漂浮细胞或细胞碎屑较多时,都需要用PBS润洗1次后弃掉PBS,再依据介质加入适量培养基;②镜下观察时,无死细胞及碎屑产生,只是单纯的pH值改变,只需弃掉介质中的培养基,根据介质需要加适量培养基。

[0094] 2.5将换液后的介质转移到孵箱内37℃,5%CO₂继续培养。

[0095] 实施例2口腔相关干细胞的培养上清对其它细胞生长增殖的刺激作用

[0096] 一.Brdu增殖实验:

[0097] 按照实施例1方法将原代(即第零代)牙龈干细胞及根尖牙乳头干细胞培养至第三代,取其培养2天后的细胞上清液,转至刚刚接种于6孔板的第三代人牙周膜干细胞(PDLSC),颌骨骨髓干细胞(BMSC),牙髓干细胞(DPSC)中继续培养(培养基为无酚红培养基,货号41061-029,37℃,5%CO₂),每孔中含有1ml细胞重悬液以及从牙龈干细胞及根尖牙乳头干细胞转移来的2ml细胞上清液,随后检测人牙周膜干细胞,颌骨骨髓干细胞,牙髓干细胞的增殖比例。其中牙周膜干细胞和牙髓干细胞按照实施例1方法培养至第三代,颌骨骨髓

干细胞为人拔牙时牙槽窝中取出的骨片,离心收集后接种培养得到的,并且传代到第三代。其中对照组(vehicle)是用没有培养过细胞的 α -MEM培养基(货号11095-080)继续培养上述的第三代人牙周膜干细胞(PDLSC)、颌骨骨髓干细胞(BMSC)和牙髓干细胞(DPSC)。

- [0098] 1. 将待检测细胞接种于含有盖玻片的6孔板,生长24小时;
- [0099] 2. 将BrdU试剂与细胞培养基按1:100的比例进行配制,提前在37°C预热;
- [0100] 3. 吸弃步骤1的细胞上清液,加入先前准备好的步骤2的含BrdU的培养基;
- [0101] 4. 将细胞继续培养12-16小时;
- [0102] 5. 吸弃细胞上清液,用磷酸盐缓冲液洗2次;
- [0103] 6. 70%乙醇4°C固定30分钟;
- [0104] 7. 磷酸盐缓冲液洗3次,每次2分钟;
- [0105] 8. 依据BrdU染色试剂盒(染色试剂盒为Thermo Fisher公司,货号93-3944;BrdU为Thermo Fisher公司,货号00-0103)对细胞进行染色;
- [0106] 9. 将试剂2与纯水1:1混合,孵育细胞30分钟,之后磷酸盐缓冲液洗3次,每次2分钟;
- [0107] 10. 加入试剂3室温孵育10分钟,之后不洗;
- [0108] 11. 加入试剂4室温孵育60分钟,之后磷酸盐缓冲液洗3次,每次2分钟;
- [0109] 12. 加入试剂5室温孵育10分钟,之后磷酸盐缓冲液洗3次,每次2分钟;
- [0110] 13. 配制显色液,取6A,6B,6C各一滴至1ml纯水中,涡旋振荡;
- [0111] 14. 将显色液覆盖细胞表面,显微镜下观察其颜色变化,根据颜色的变化,决定显色时间,通常显色5分钟,之后用纯水终止显色反应;
- [0112] 15. 用超纯水洗一遍细胞,加入试剂7返蓝2分钟,之后用纯水洗一遍;
- [0113] 16. 将细胞依次在70%,80%,90%,95%,100%-1,100%-2乙醇中对细胞脱水1分钟,随后二甲苯-1,二甲苯-2对细胞进行透明3分钟;
- [0114] 17. 将细胞盖玻片取出,滴加试剂8于载玻片上,进行封片;
- [0115] 18. 显微镜下每张片子随机截取4个视野;
- [0116] 19. 对4个视野内的阳性细胞进行数量统计,随后进行统计学分析。实验结果见图1和图2。可以看出,根尖牙乳头干细胞和牙龈干细胞的培养上清可以显著刺激人牙周膜干细胞、颌骨骨髓干细胞和牙髓干细胞的增殖。

[0117] 二.ELISA检测细胞上清液成分实验:

[0118] 按照实施例1方法将原代(即第零代)牙龈干细胞培养至第三代,取其培养2天后的细胞上清液,使用R&D Systems进口分装试剂盒,检测人生长激素(GH),表皮生长因子(EGF),内皮细胞生长因子(ECGF),肿瘤坏死因子(TNF- α),白介素-6(IL-6)和 γ -干扰素(IFN- γ)的含量。对照为没有培养过细胞的原始无酚红 α -MEM培养基(货号41061-029)。

[0119] 此试剂盒除去所用辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体为自己本身以及标准品的浓度各不相同外,步骤均一致。

- [0120] 1. 从室温平衡20min后铝箔袋中取出所需板条。
- [0121] 2. 设置标准品孔,标准品孔各加不同浓度的标准品50 μ l
- [0122] 3. 样本孔先加待测样品10 μ l,在加样本稀释液40 μ l;空白孔不加
- [0123] 4. 除空白孔外,标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测

抗体100 μ l,用封板膜封住反应孔,37度水浴锅或恒温温箱孵育60min。

[0124] 5.弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加满洗涤液,静置1min,甩去洗涤液,吸水纸上拍干,如此重复洗板5次。

[0125] 6.每孔加入底物A、B各50 μ l,37度避光孵育15min。

[0126] 7.每孔加入终止液50 μ l,15min内,在450nm波长处测定各孔的OD值。

[0127] 8.绘制标准曲线:在Excel工作表中,以标准品浓度为横坐标,对应OD值作纵坐标,绘制标准品线性回归曲线,按照曲线方程计算各样品浓度值。结果见图3。

[0128] 从图3可以看出,不含酚红的 α -MEM培养基培养细胞所得的培养上清与不含酚红的原始 α -MEM培养基相比,培养过细胞的培养上清中TNF- α 、IL-6和IFN- γ 的含量显著上升(与未培养过细胞的培养基相比,分别为TNF- α ,37.5pg/ml vs.30.5pg/ml;IL-6,485pg/ml vs.360pg/ml;IFN- γ ,213pg/ml vs.175pg/ml),而生长激素(GH),表皮生长因子(EGF)和内皮细胞生长因子(ECGF)的含量没有显著差异,表明培养后的干细胞向培养基分泌了TNF- α 、IL-6和IFN- γ 。

[0129] 实施例3口腔相关干细胞的培养上清用于改善皮肤的效果实验

[0130] 1)细胞培养上清的冻干

[0131] 取第四代牙龈干细胞的培养上清液。将培养上清液用移液管转移至一新的150mm培养皿中,冻存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中24小时或以上,之后将冷冻的上清液放入冻干机中,-50 $^{\circ}$ C以上冻干至样品呈干粉状,结果见图4。

[0132] 2)细胞培养上清冻干粉的溶解以及与化妆品基质的混合

[0133] 取冻干后的1个150mm培养皿中的冻干粉,加5ml血清溶解,然后与100g化妆品基质混合,所述基质为Cetaphil舒特肤润肤膏。Cetaphil舒特肤润肤膏的成分包括:水,甘油聚甲基丙烯酸酯(和)丙二醇,矿脂,二辛基醚,PEG-5甘油硬脂酸酯,甘油,聚二甲基硅氧烷醇,鲸蜡醇,甜杏仁油,丙烯酸/C10-30烷基丙烯酸聚合物,醋酸盐维他命E,苯氧乙醇,苯甲醇,乙二胺四乙基二钠,氢氧化钠,乳酸。

[0134] 3)本发明制备得到的含细胞培养上清的化妆品与普通化妆品的效果比较

[0135] 将上述2)中含有细胞上清溶解液的化妆品与化妆品基质本身进行对比,使用的是牙龈干细胞上清液,对人体皮肤无任何特殊要求,每天早晚各涂抹一次,连续使用30天,效果图分别见图5和图6。

[0136] 其中,图5的上图左图和下图左图是左右脸均使用化妆品基质20天后的左右脸效果图,上图右图和下图右图为使用化妆品基质之后又使用了30天含细胞培养上清的化妆品基质的左右脸效果图。

[0137] 从图5可以看出,本发明含细胞培养上清的化妆品与化妆品基质相比,可以明显改善肤质,包括减轻甚至消除皱纹,淡化色斑,使皮肤更紧致、红润。

[0138] 图6中的左图为使用化妆品前,右图为使用本发明的含细胞培养上清的化妆品30天后的效果图,使用方法同上。可以看出,与使用前相比,疤痕隆起明显降低,并且色泽明显淡化。

[0139] 实施例4本发明口腔相关干细胞的分离制备方法

[0140] 本发明的口腔相关干细胞可以采用本领域公知的分离制备方法,例如通常采用I型胶原酶与分散酶1:1比例混合后的酶消化法提取,消化时间为1h,或者例如可参考Lan

Ma, Yusuke Makino, Haruyoshi Yamaza, et al. Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Is a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine., PLoS One. 2012;7(12):e51777.

[0141] 本发明分离制备得到的口腔相关干细胞(包括牙龈干细胞、牙周膜干细胞、牙髓干细胞、根尖牙乳头干细胞、乳牙牙髓干细胞和牙囊前体干细胞)原代培养后在显微镜下的生长状况如图7所示。

[0142] 细胞表型鉴定方法和成脂、成骨分化鉴定方法参见以下文献:

[0143] GANG DING, WEI WANG, YI LIU, et al. Effect of Cryopreservation on Biological and Immunological Properties of Stem Cells From Apical Papilla. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, J. Cell. Physiol. 223:415-422, 2010.

[0144] F Feng¹, K Akiyama², Y Liu, et al, Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. Oral Diseases (2010) 16, 20-28.

[0145] Takayoshi Yamaza, Akiyama Kentaro, Chider Chen, et al.

[0146] Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Stem Cell Research & Therapy 2010, 1:5.

[0147] 牙髓干细胞的细胞免疫表型鉴定及成脂、成骨分化鉴定结果分别如图8和9所示;

[0148] 牙周膜干细胞的细胞免疫表型鉴定及成脂、成骨分化鉴定结果分别如图10和11所示;

[0149] 牙龈干细胞的细胞免疫表型鉴定及成脂、成骨分化鉴定结果分别如图12和13所示;

[0150] 根尖牙乳头干细胞的细胞免疫表型鉴定及成脂、成骨分化鉴定结果分别如图14和15所示;

[0151] 乳牙牙髓干细胞的细胞免疫表型鉴定及成脂、成骨分化鉴定结果分别如图16和17所示。

[0152] 可以看出,分离培养得到的牙髓干细胞、牙周膜干细胞、牙龈干细胞、根尖牙乳头干细胞和乳牙牙髓干细胞符合间充质干细胞的表达特性(例如:间充质干细胞高度表达CD44, CD59, CD146, STRO-1;不表达CD34, CD45),并且具有多项分化的能力,能够分化为骨组织和脂肪组织,因而属于间充质干细胞。

[0153] 尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述,本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导,可以对那些细节进行各种修改和替换,这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

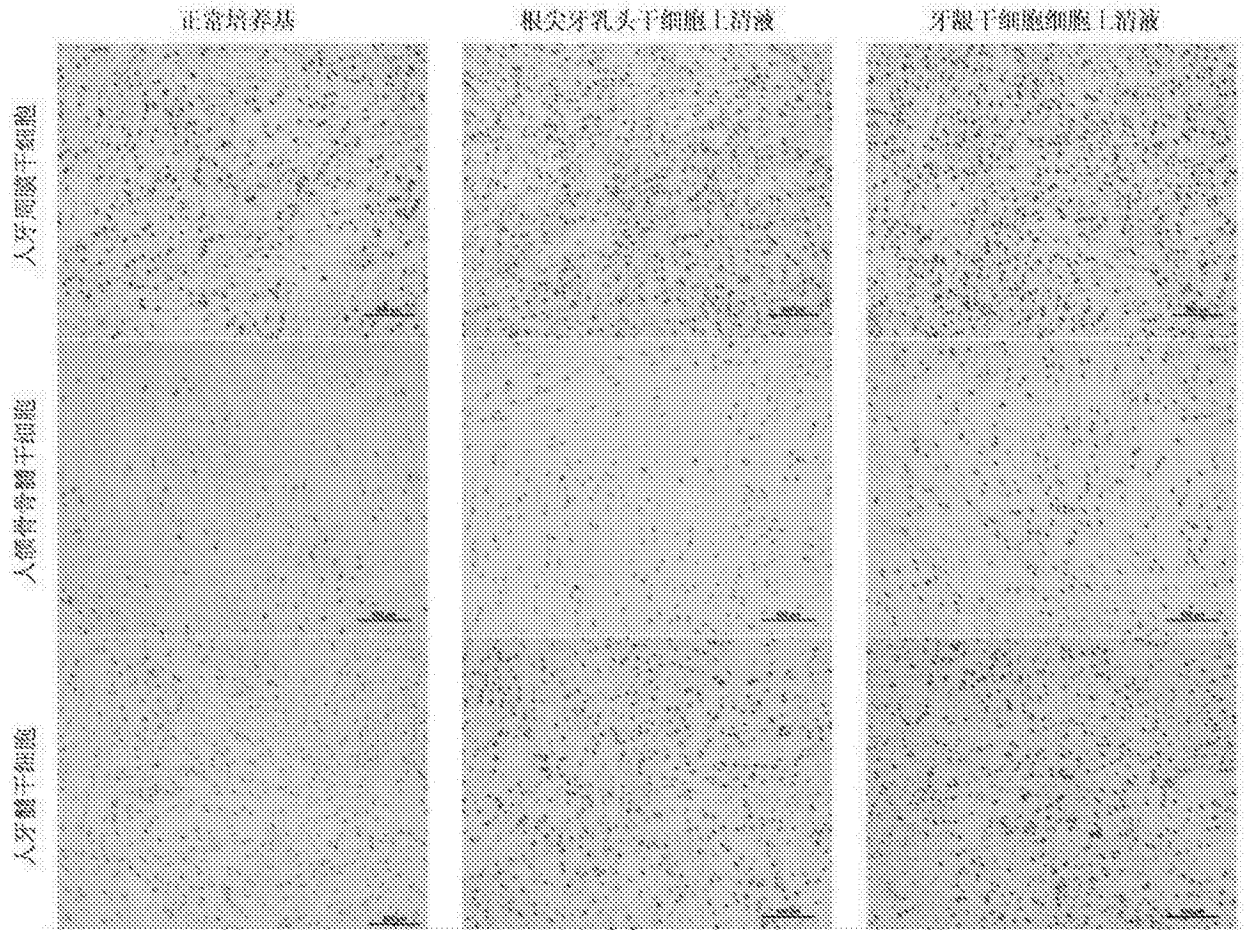


图1

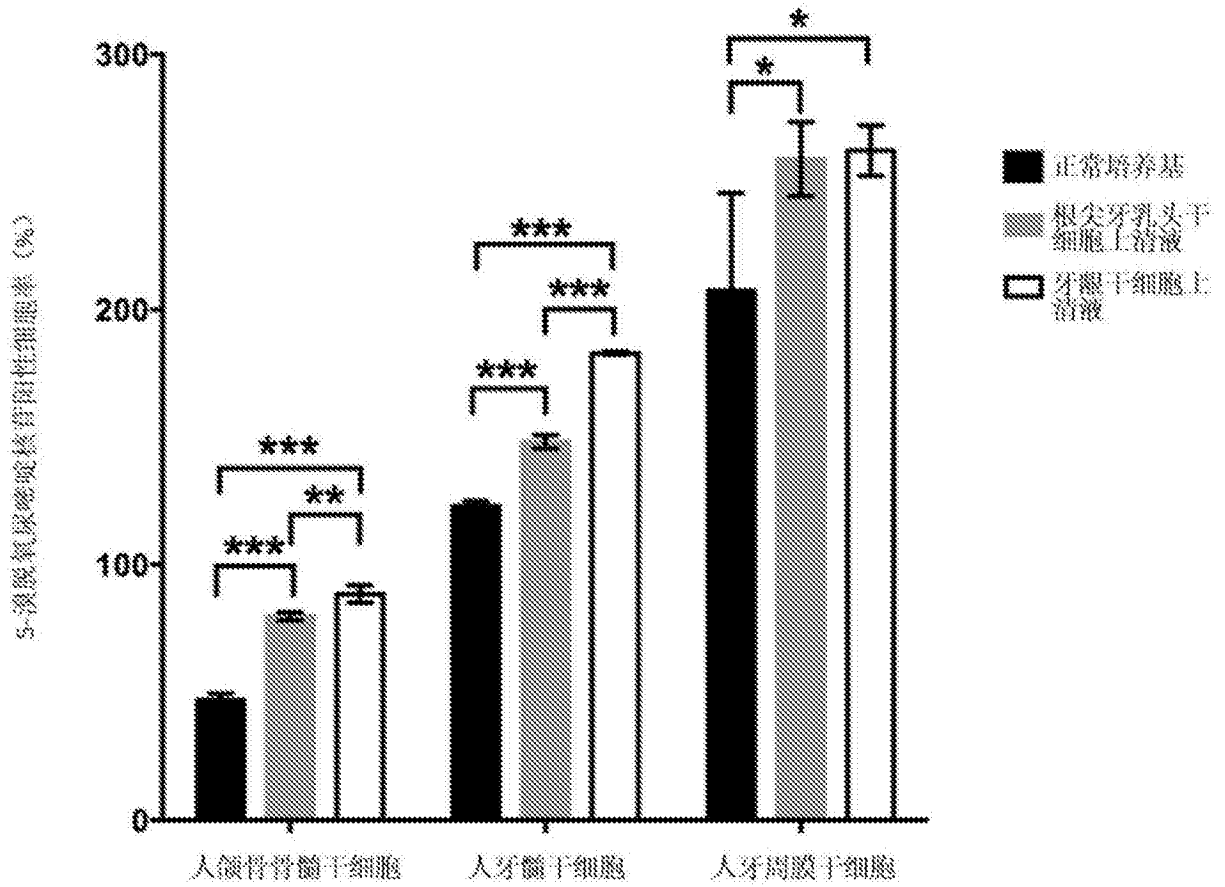


图2

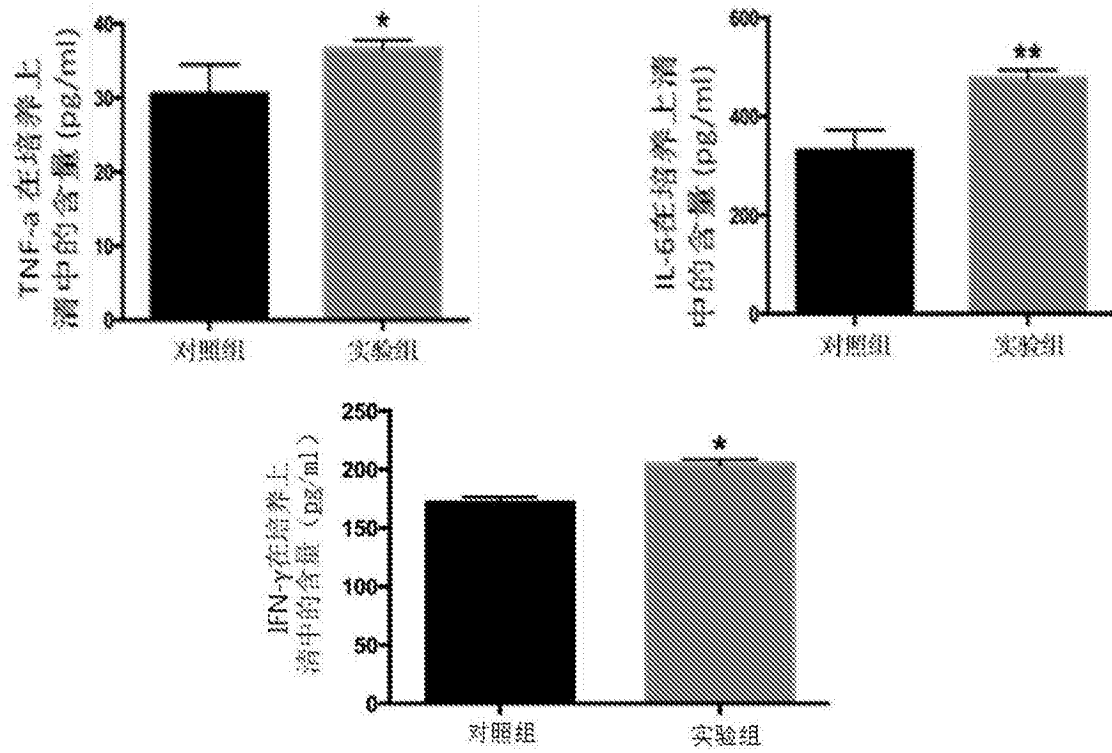


图3

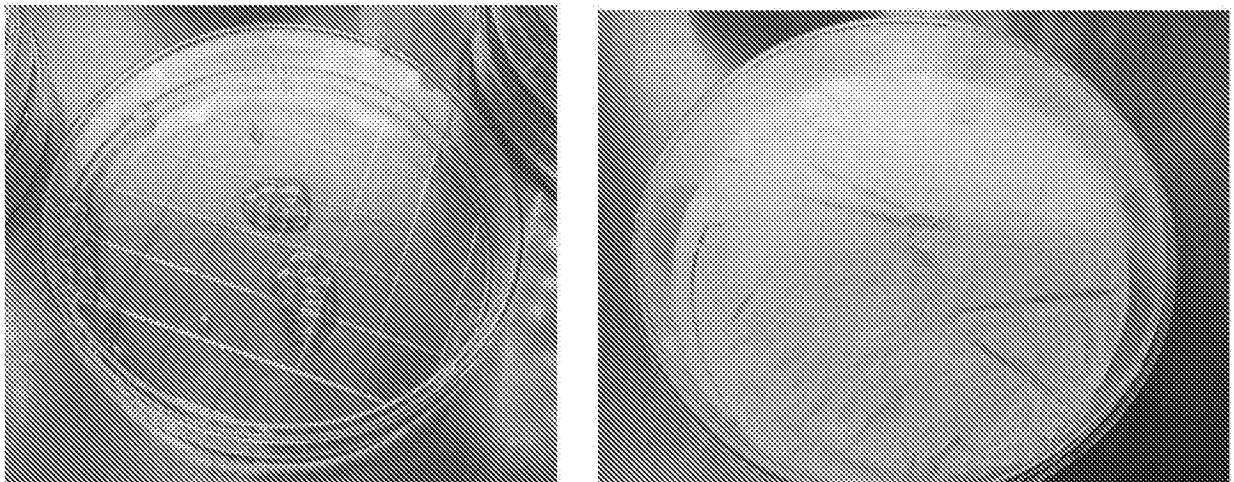
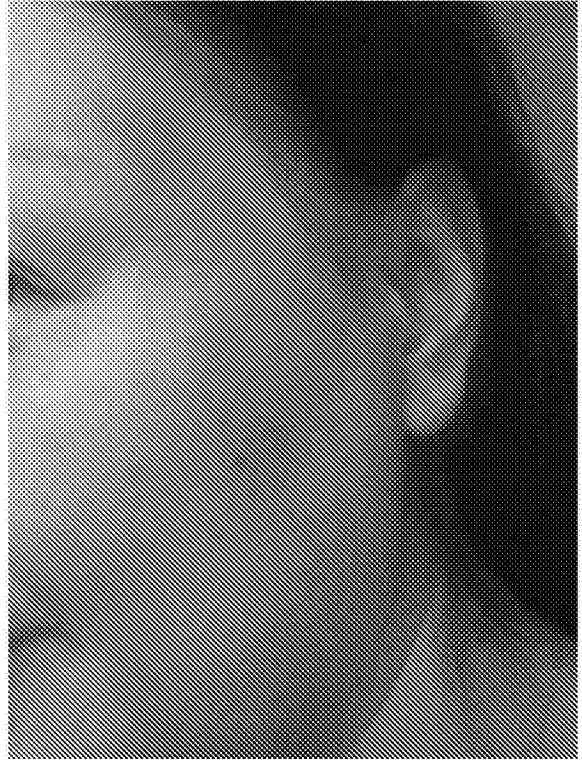


图4

A



B

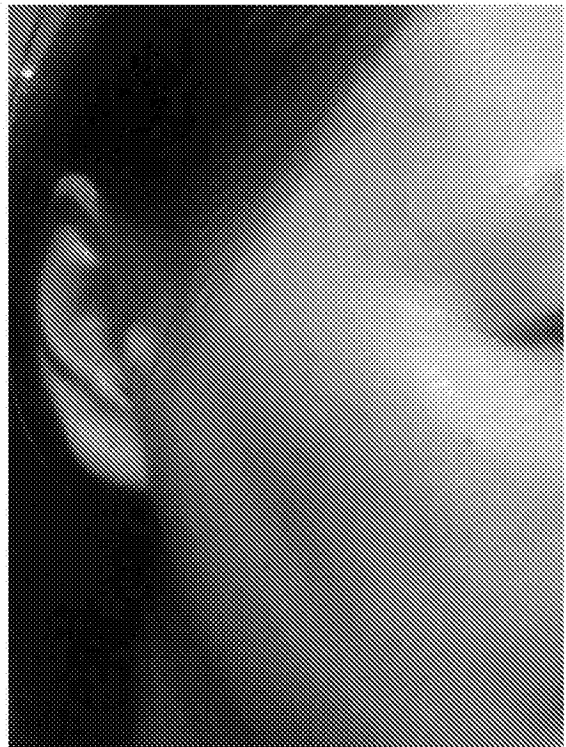


图5

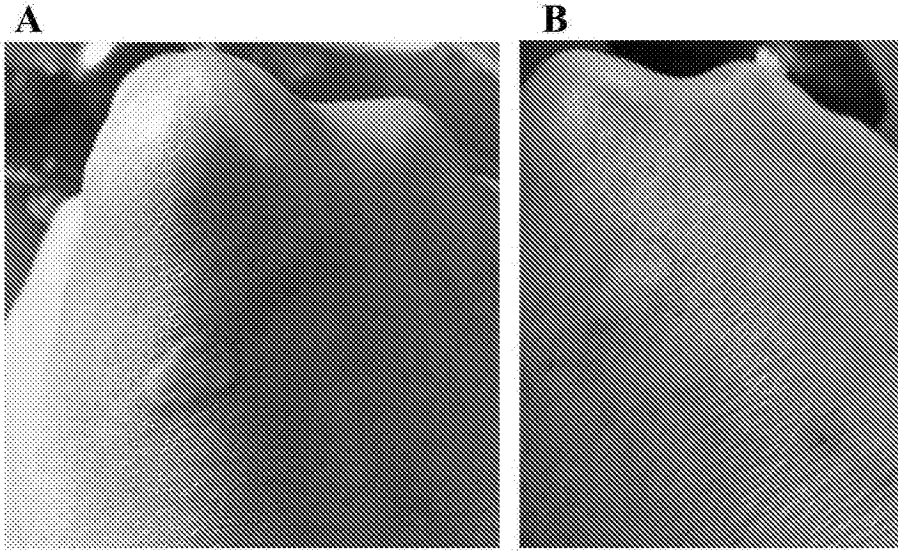


图6

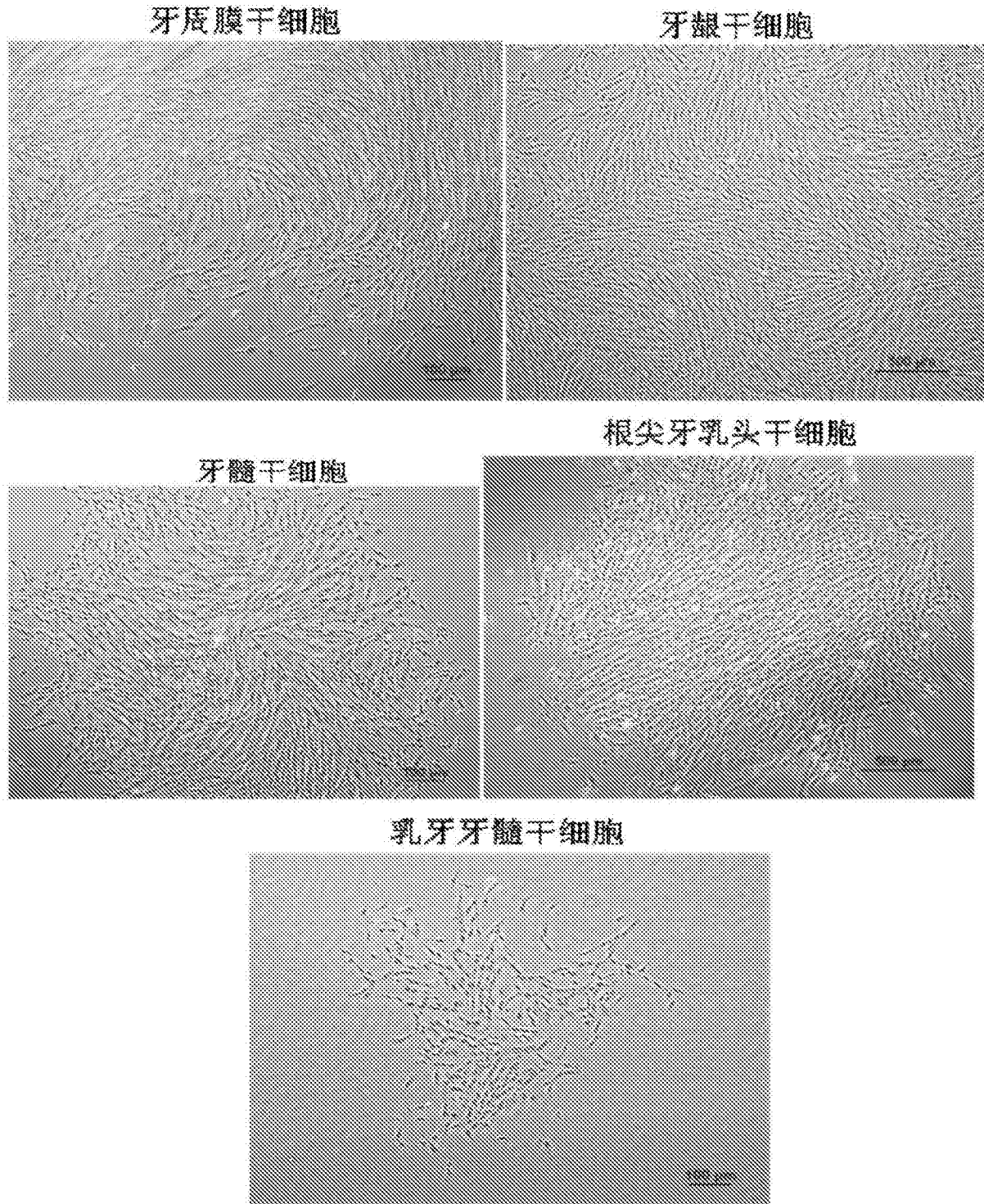
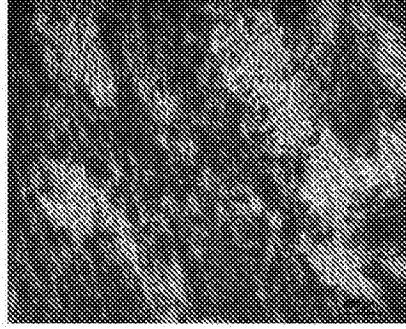


图7

成骨分化



成脂肪分化

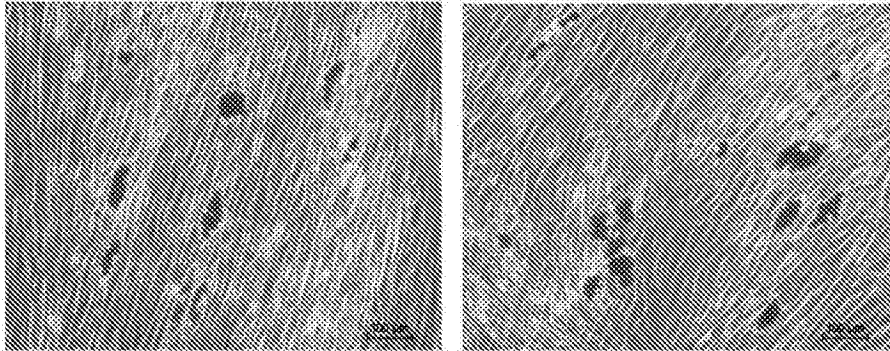


图8

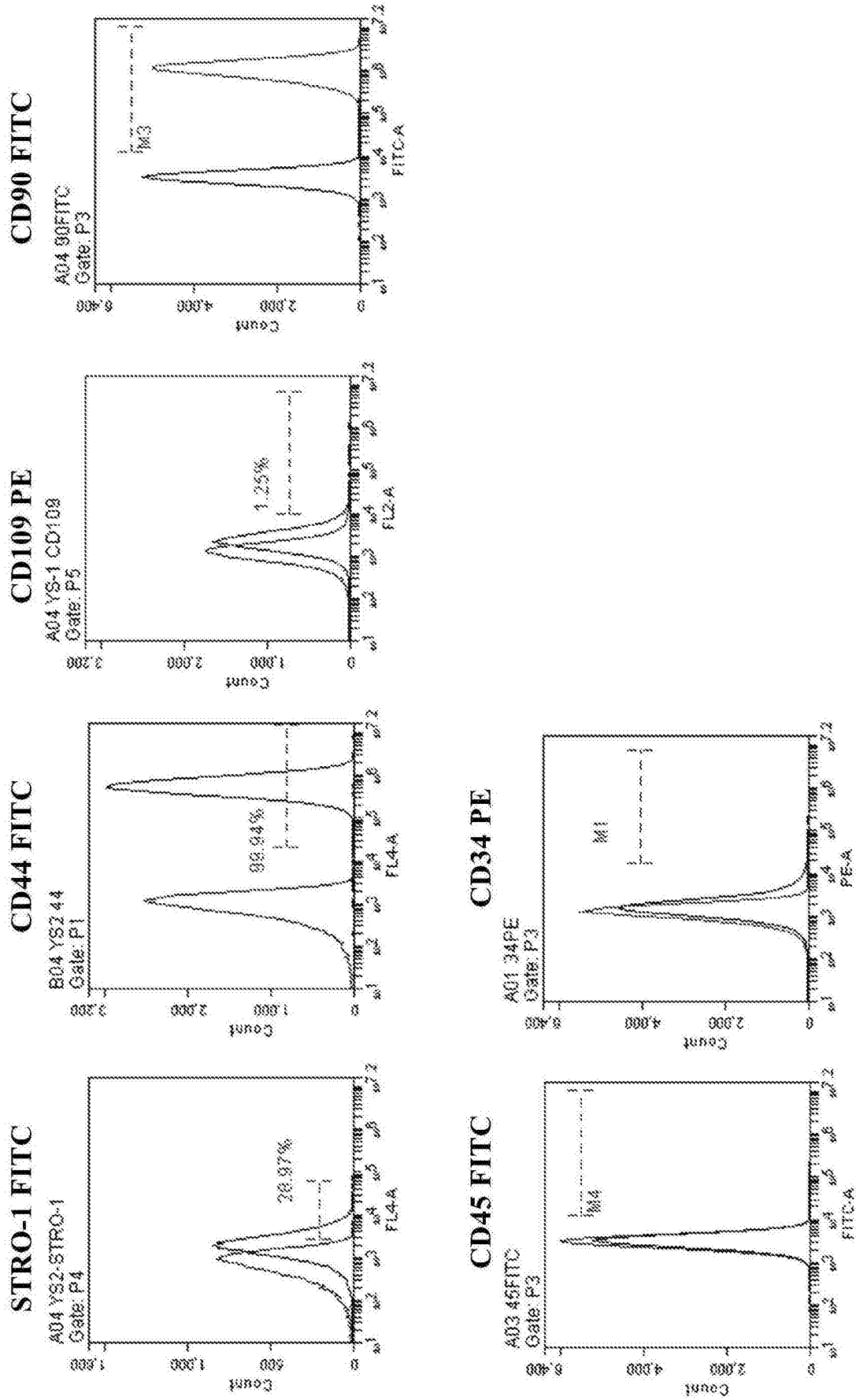


图9

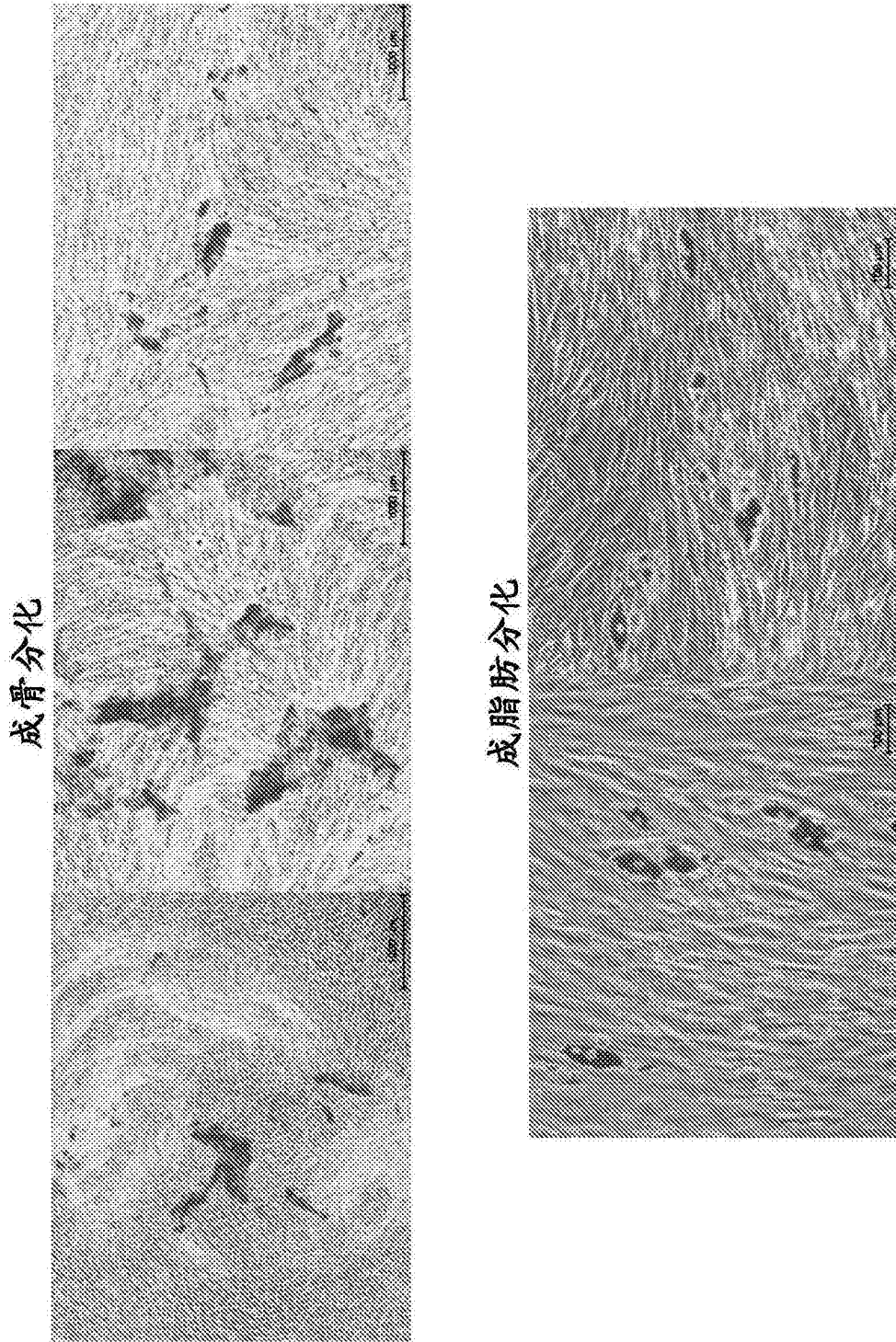


图10

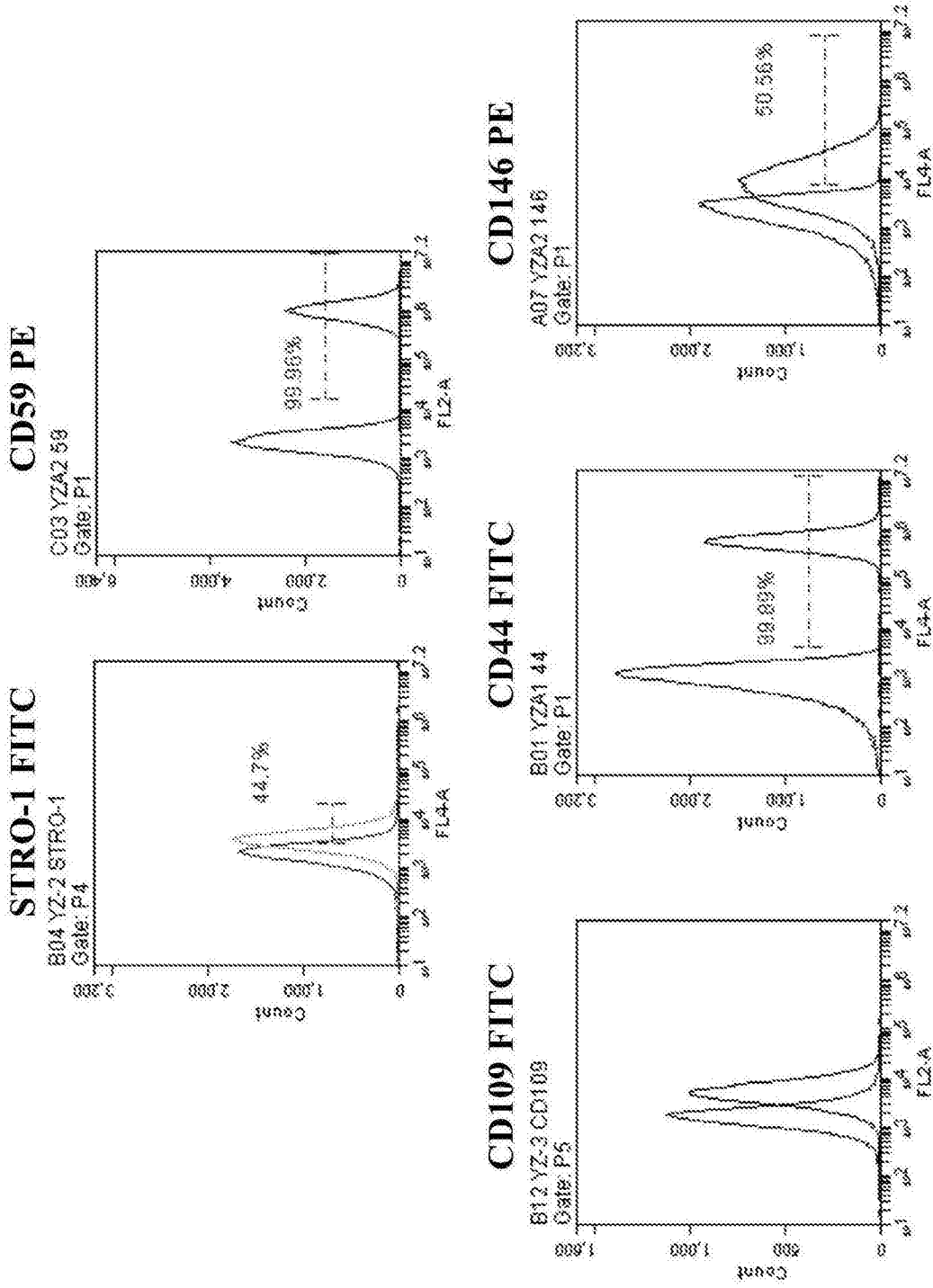


图11

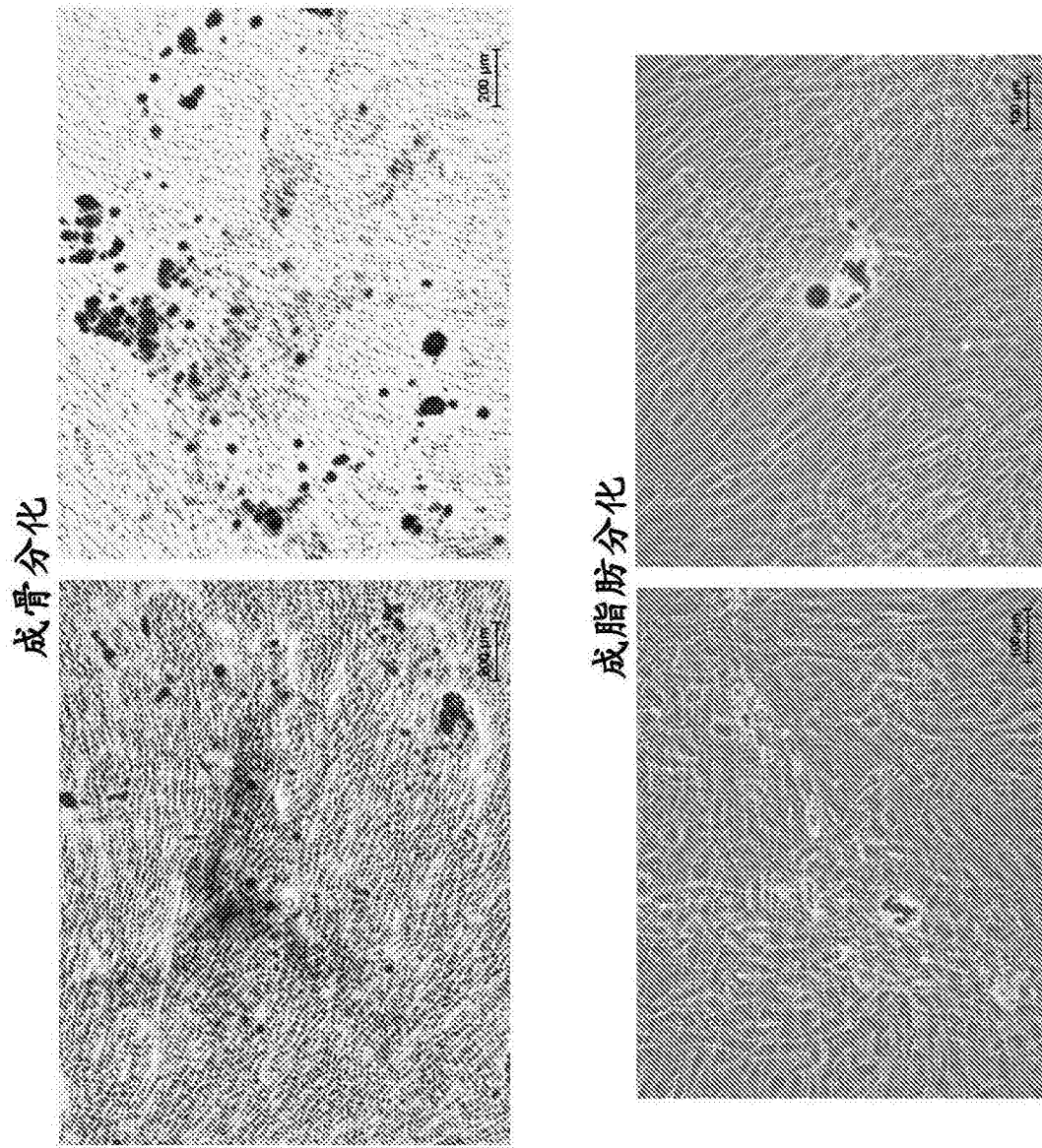


图12

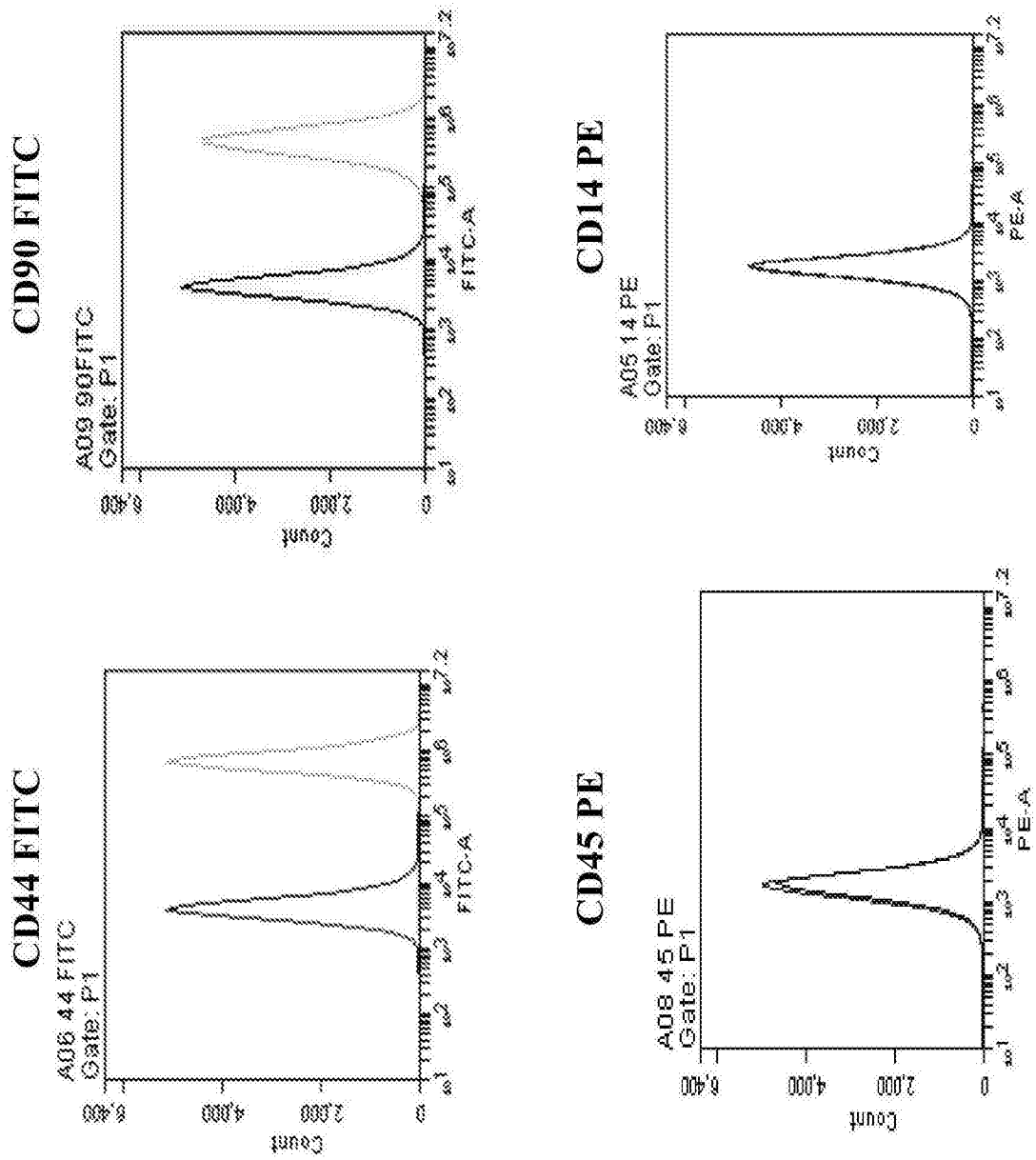
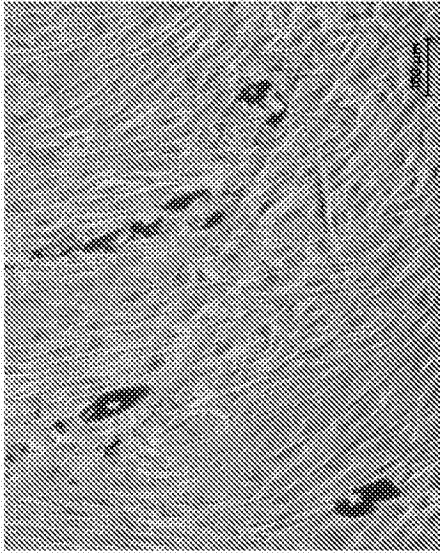


图13

成脂肪分化



成骨分化

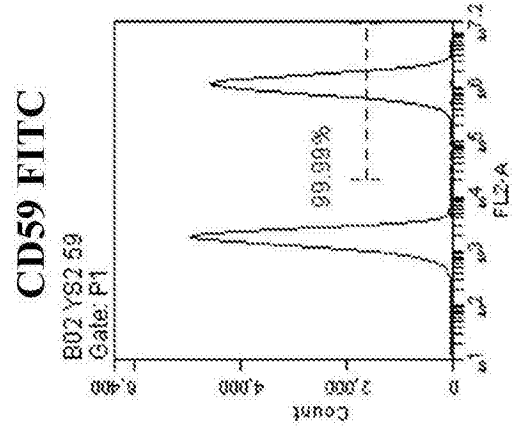
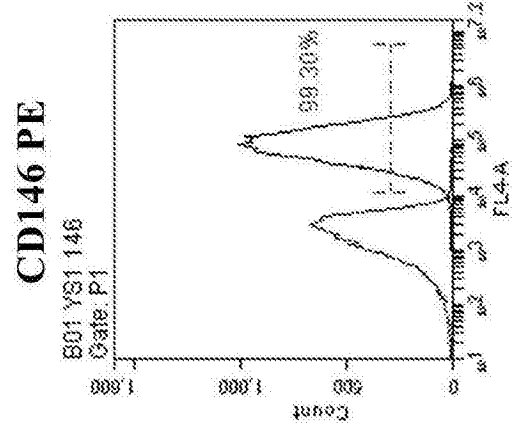
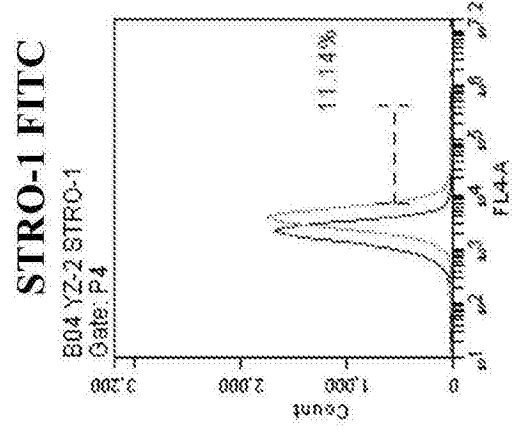
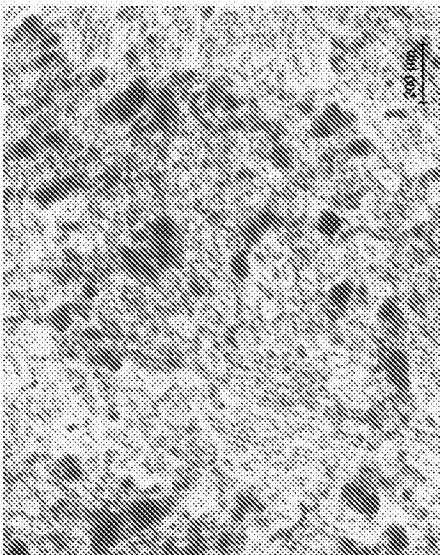
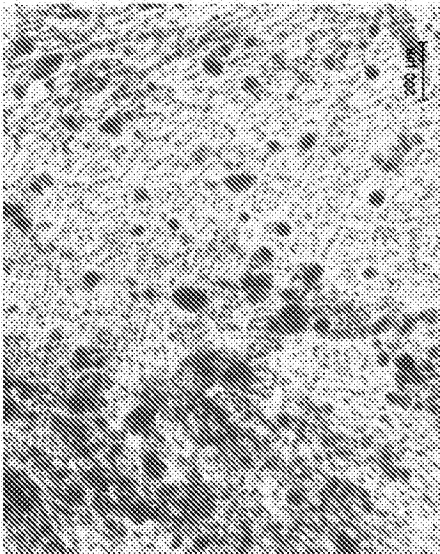


图15

图14

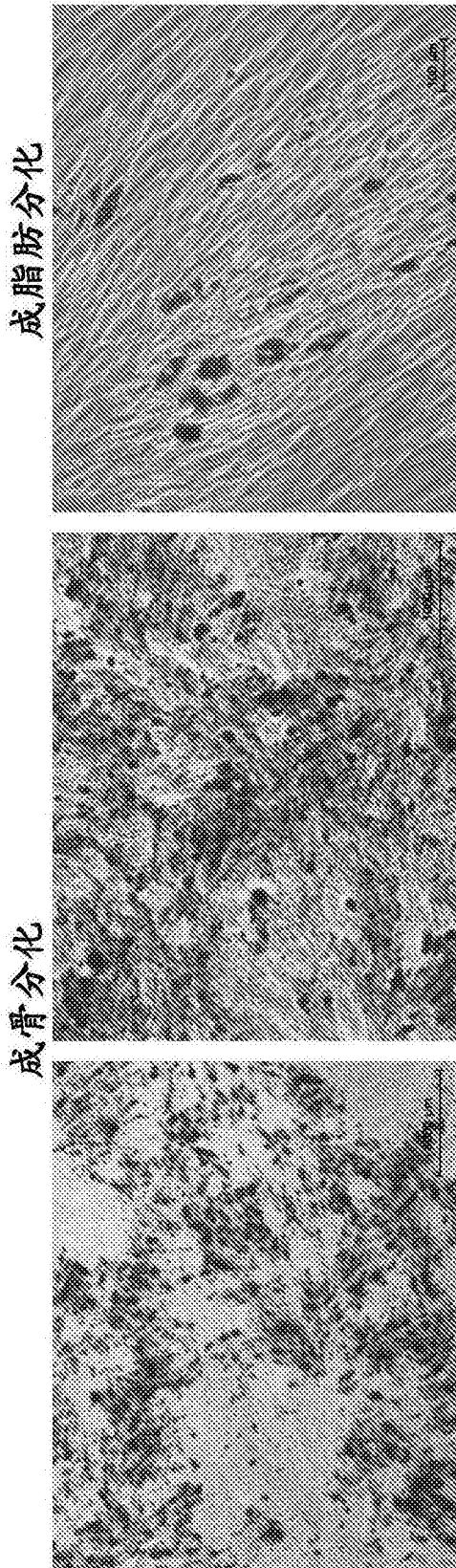


图16

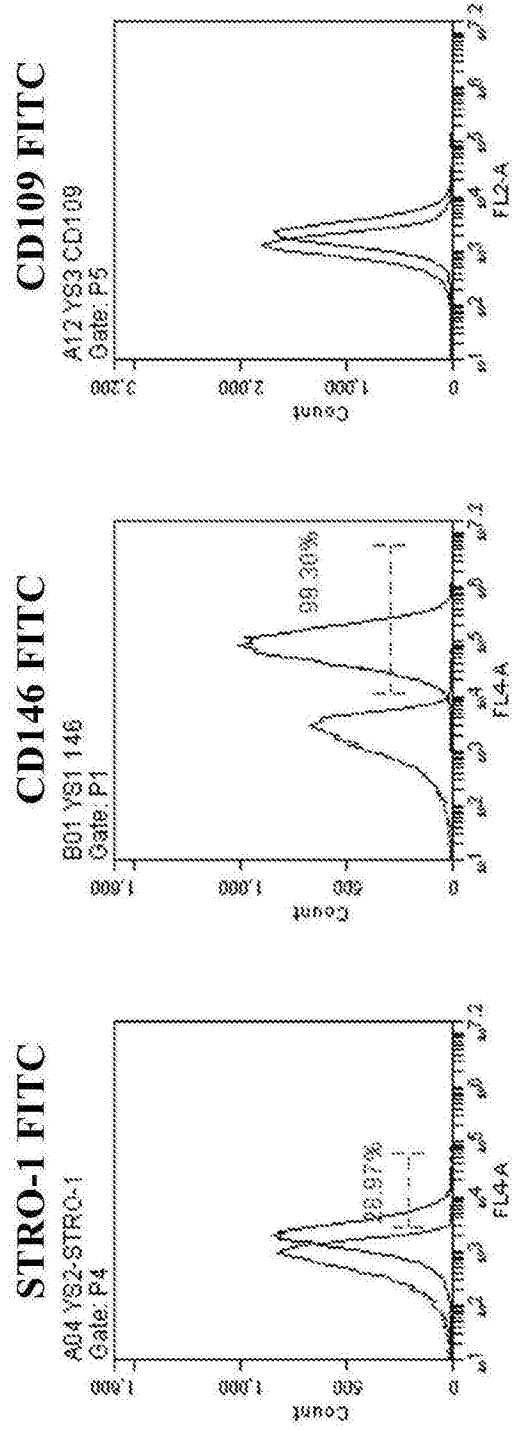


图17