



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112043727 A

(43) 申请公布日 2020.12.08

(21) 申请号 202010979123.X

A61P 41/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.09.17

A61P 15/00 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

(71) 申请人 山西宾大干细胞生物科技有限公司

C12N 5/074 (2010.01)

地址 030000 山西省太原市综改示范区太
原学府园区创业街27号时代广场2204
室

A61K 35/28 (2015.01)

(72) 发明人 傅松涛

(74) 专利代理机构 北京世誉鑫诚专利代理有限
公司 11368

代理人 孙国栋

(51) Int. Cl.

A61K 35/48 (2015.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

权利要求书6页 说明书25页

(54) 发明名称

一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备
方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,包括:步骤一、子宫内膜干细胞的提取与培养,得到子宫内膜干细胞;步骤二、间充质干细胞的提取与培养,得到间充质干细胞;步骤三、温敏性壳聚糖水凝胶的制备;步骤四、细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备。本发明还公开了细胞复合型子宫内膜修复凝胶作为治疗宫腔粘连的应用。本发明具有以下有益效果:1、自体干细胞移植,基本没有排斥风险;2、自体子宫内膜干细胞和间充质干细胞复合移植,加快了内膜、微小血管和间质的再生,子宫内膜修复时间明显缩短;3、温敏凝胶可局部注射后成形,既可为干细胞提供三维存留空间,又可以防止再生粘膜的粘连。

1. 一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤一、子宫内膜干细胞的提取与培养,得到子宫内膜干细胞;

步骤二、间充质干细胞的提取与培养,得到间充质干细胞;

步骤三、温敏性壳聚糖水凝胶的制备;

步骤四、细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备。

2. 如权利要求1所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,步骤一包括以下步骤:

(1)、无菌条件下,取子宫内膜组织,用无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的PBS缓冲液冲洗至少三次,然后转入无菌培养皿中,并将其剪至体积小于 1mm^3 的小块;

(2)、向步骤(1)的无菌培养皿中加入1.5~3倍体积的0.1v/v%胶原酶水溶液,在 37°C 下,水浴振荡消化30~80min,收集消化液于离心管中,向离心管中加入DMEM/F12完全培养基终止消化,然后1000rpm离心10min,弃去上清,保留细胞沉淀;

(3)、向离心管中加4~8倍体积的红细胞裂解液,持续震荡,直到离心管内液体逐渐变为红色时,向离心管中添加10ml PBS缓冲液,再次1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

(4)、用PBS缓冲液洗涤上述细胞沉淀至少2次,弃上清,保留细胞沉淀;

(5)、用4倍体积的DMEM/F12完全培养基重悬步骤(4)保留的细胞沉淀,制备细胞悬液;

(6)、将细胞悬液依次过200目及400目网筛并用DMEM/F12完全培养基冲洗细胞网,收集400目下的细胞悬液,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

(7)、向步骤(6)保留的细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基重悬上述细胞沉淀,并转移到细胞培养瓶中,在 37°C 、5v/v% CO_2 培养箱中进行培养,于培养24~48h后首次用DMEM/F12完全培养基进行半量换液,以后每2-3天用DMEM/F12完全培养基进行一次全量换液,弃去未贴壁细胞,待原代细胞生长融合达80%~90%时,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液进行传代,并以 6×10^3 个细胞/ cm^2 的密度进行传代培养,传到三代及三代以上,得到子宫内膜干细胞,其中:

步骤(2)、步骤(5)、步骤(6)、步骤(7)中的DMEM/F12完全培养基含10v/v% FBS和1v/v% 青链霉素,余量为DMEM/F12。

3. 如权利要求2所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,对于步骤一得到的子宫内膜干细胞进行鉴定,鉴定合格后才能作为制备细胞复合型子宫内膜修复凝胶的原料,对于子宫内膜干细胞的鉴定包括子宫内膜干细胞表面标记物的鉴定、成骨分化的鉴定和成脂分化的鉴定,其中:

(a)、子宫内膜干细胞表面标记物的鉴定,包括以下步骤:

(a1)、取步骤(7)得到的融合度为90%~95%的第3代子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

(a2)、将步骤(a1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

(a3)、将步骤(a2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

(a4)、用PBS缓冲液重悬步骤(a3)得到的细胞沉淀得到细胞悬液,并进行计数;

(a5)、调节步骤(a5)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,然后取5个流式管,每管加入100ul细胞悬液,吹打混匀;

(a6)、将5个流式管分别加入10ul带有FITC或PE荧光标记的一抗,一抗分别为FITC同型抗体、PE同型抗体、CD29抗体、CD73抗体、CD90抗体、CD34抗体、CD45抗体、CD133抗体,在室温避光条件下孵育20-30min;

(a7)、孵育结束后,每管加入100ulPBS缓冲液轻轻吹打至单细胞悬液后,通过流式细胞仪检测其表面标记物荧光强度,子宫内膜干细胞显示CD29抗体、CD73抗体和CD90抗体阳性,CD34抗体、CD45抗体和CD133抗体阴性;

(b)、子宫内膜干细胞诱导成骨分化能力的鉴定

(b1)、取步骤(7)得到的融合度为90%~95%的第3代子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

(b2)、将步骤(b1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

(b3)、将步骤(b2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

(b4)、用PBS缓冲液重悬步骤(b3)得到的细胞沉淀,得到细胞悬液并进行计数;

(b5)、调节步骤(b4)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,在铺有明胶的6孔板中各加入100ul细胞悬液,再补充2ml DMEM/F12完全培养基进行细胞培养;

(b6)、待细胞融合度为60%-70%时,更换培养基为预热至37℃的含10%FBS的成人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基,每隔3天换液一次,诱导2-4周;

(b7)、诱导结束后,弃培养基,用PBS缓冲液清洗2遍,4%多聚甲醛固定30min,吸去多聚甲醛溶液,用PBS缓冲液洗脱固定液2次,每次5min;

(b8)、每孔加入1ml茜素红工作液,室温染色5min,用PBS缓冲液洗脱染色液,显微镜下观察成骨染色情况,成骨分化的子宫内膜干细胞内呈现深浅不同的红色矿化结节;其中:

成人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基为:成人脂肪间质干细胞成骨诱导分化基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成骨诱导分化培养基专用血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、抗坏血酸400ul、 β -甘油磷酸钠2ml、地塞米松20ul;

(c)、子宫内膜干细胞成脂分化的鉴定

(c1)、取步骤(7)得到的融合度为90%~95%的第3代、子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

(c2)、将步骤(c1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

(c3)、将步骤(c2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

(c4)、用PBS缓冲液重悬步骤(c3)得到的细胞沉淀,得到细胞悬液并进行计数;

(c5)、调节步骤(c4)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,在铺有明胶的6孔板中

各加入100ul细胞悬液,再补充2ml DMEM/F12完全培养基进行细胞培养;

(c6)、待细胞长至完全融合或过饱和时,更换培养基为含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A,三天后换液为成脂诱导分化培养基B,24h后吸去成脂诱导分化培养基B换回含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A进行诱导;

(c7)、含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A与成脂诱导分化培养基B交替使用5次后,单纯B液培养7天,每2-3天半量换液;

(c8)、诱导结束后弃培养基,用PBS缓冲液洗涤,清洗2遍,4%多聚甲醛固定30min,吸去多聚甲醛溶液,用PBS缓冲液洗脱固定液2次,每次5min;

(c9)、油红O溶液:蒸馏水=3:2稀释为工作液,每孔加入1ml油红O工作液,室温染色30min后,用PBS缓冲液洗脱染色液,显微镜下观察成脂染色情况,成脂分化的子宫内膜干细胞内出现多数橙子红色脂肪滴;其中:

含10%FBS的成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基A:成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基A液基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化用胎牛血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、胰岛素400ul、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤200ul、罗格列酮200ul、地塞米松200ul;成脂诱导分化培养基B:成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基B液基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化专用胎牛血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、胰岛素400ul。

4.如权利要求1所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,步骤二中的间充质干细胞为脐带间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

(1)、在无菌条件下,取健康的脐带标本10-20cm,置于含1v/v%双抗的PBS缓冲液中;

(2)、将步骤(1)得到的脐带标本移至超净工作台中,反复用PBS缓冲液冲洗脐带标本,以去除残留血液;

(3)、在培养皿中剥离脐带标本的外膜、脐带动静脉后,将剩余组织块剪碎至体积小于1mm³;

(4)、向培养皿中加入DMEM/F12完全培养基,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养,4d后进行半量换液,待发现有细胞爬出后,每3d进行换液一次,传至第3代,待第3代脐带间充质干细胞达80-90%融合时,用0.25wt%胰酶水溶液消化细胞,EMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打培养皿底部并收集细胞,1000rpm离心5分钟,弃上清,保留细胞沉淀;

(5)、向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,重悬细胞沉淀,并对其进行细胞计数,完成后即得到脐带间充质干细胞。

5.如权利要求4所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,步骤(4)中脐带间充质干细胞传代方法包括以下步骤:待脐带间充质干细胞达到80-90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打培养皿底部并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2-3的比例传代。

6.如权利要求1所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,步骤二中的间充质干细胞为脂肪间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

S21、无菌条件下,取脂肪组织,剔除血管筋膜,PBS冲洗,去除红细胞,剪碎至体积小于1mm³,然后置于50ml离心管中,加入5-10倍体积的0.1wt%的I型胶原酶,在37℃、100rpm的

水浴锅中振荡40-80min;

S22、向离心管中加入等体积的HG-DMEM完全培养基终止消化,在4℃、1500rpm条件下离心10min,弃上清及上层脂肪,留取细胞沉淀,其中:

HG-DMEM完全培养基包括15%v/vFBS和1v/v%青链霉素,余量为HG-DMEM;

S23、再向上述离心管中加入10-15mlHG-DMEM完全培养基,充分混悬,过200目滤网,留取滤液,在4℃、1500rpm条件下离心10min,弃上清,得到细胞沉淀;

S24、再向离心管中加入5mlHG-DMEM完全培养基,充分混悬,得到细胞悬液;

S25、将细胞悬液接种于T25细胞培养瓶中,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度培养箱中培养48-72h后首次半量换液,去除未贴壁细胞,然后每2-3d换液一次,传至第3代,待第3代脂肪间充质干细胞达到80%-90%时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,弃上清,向细胞沉淀中加入HG-DMEM完全培养基1ml,重悬细胞沉淀,并对其进行计数,完成后即得到第3代的脂肪间充质干细胞。

7.如权利要求6所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,脂肪间充质干细胞的传代方法为:待脂肪间充质干细胞达到80%-90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2-3的比例传代。

8.如权利要求1所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,步骤二中的间充质干细胞为骨髓间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

Step21、无菌条件下取出股骨和胫骨,从股骨干和胫骨干中间剪断,用DMEM/F12完全培养基反复冲洗骨髓腔得到冲洗液,其中:

DMEM/F12完全培养基包括10v/v%FBS和1v/v%青链霉素,余量为DMEM/F12;

Step22、将冲洗液用200目滤网过滤,取滤液,然后将滤液置于离心管中,1000rpm,离心5min,弃上清,得到细胞沉淀;

Step23、向离心管中加入5mlDMEM/F12完全培养充分混悬,得到细胞悬液,接种T25细胞培养瓶中,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度培养箱中培养,24-48h后首次换液,去除未贴壁细胞,然后每2-3d换液一次,传至第3代,待第3代骨髓间充质干细胞达到80%-90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶溶液细胞消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集洗吧,以1000rpm离心5min;弃上清,向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,充分混悬,并对其进行计数,完成后即得到第3代的骨髓间充质干细胞。

9.如权利要求8所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,骨髓间充质干细胞的传代方法为:待骨髓间充质干细胞达到80%-90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2-3的比例传代。

10.如权利要求1所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,步骤二中的间充质干细胞为胎盘间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

步骤21、无菌条件下取靠近脐带部位胎盘小叶,剥除羊膜和底蜕膜部分,取胎盘胎儿面组织,然后用PBS反复冲洗至液体比较清亮,用眼科剪剪碎至体积小于1mm³,然后置于50ml离心管中;

步骤22、向上述离心管中加入2-4倍体积的0.1wt%胶原酶水溶液,在37℃、100rpm振荡20-50min,加入相同体积的DMEM/F12完全培养基,过200目滤网,得到细胞沉淀;

步骤23、向离心管中加入5ml DMEM/F12完全培养基充分混悬,得到细胞悬液,接种于T25细胞培养瓶中,置于37℃、5v/v% CO₂、饱和湿度培养箱中培养,24-48h后首次换液,去除未贴壁细胞,然后每2-3d换液一次,传至第3代,待第3代胎盘间充质干细胞达到80-90%融合时,用含0.02% EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,弃去上清,向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,充分混悬得到细胞悬液,并对其进行计数,完成后即得到第3代的胎盘间充质干细胞,其中:

DMEM/F12完全培养基包括10v/v% FBS和1v/v% 青链霉素,余量为DMEM/F12。

11. 如权利要求10所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,胎盘间充质干细胞的传代方法为:待胎盘间充质干细胞达到80%-90%融合时,用含0.02% EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2-3的比例传代。

12. 如权利要求1所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,步骤三包括以下步骤:

(31)、壳聚糖溶液的制备

称取0.2-0.3g脱乙酰度大于90%的壳聚糖粉末,并将其加入盛有10ml浓度为0.1M稀醋酸水溶液的无菌烧杯中,在搅拌机的搅拌下,使得壳聚糖溶液变得清澈透亮,留取备用;

(32)、I型胶原溶液的制备

称取25-50mg I型胶原粉末,并将其加入盛有10ml浓度为0.02M的稀醋酸水溶液的无菌烧杯中,并用洁净的玻璃棒搅拌至完全溶解得到I型胶原溶液;

(33)、β-甘油磷酸钠溶液的制备

称取0.4-0.6g β-甘油磷酸钠粉末,然后将其加入盛有1ml蒸馏水的5ml无菌烧杯中,并用洁净的玻璃棒搅拌至完全溶解得到β-甘油磷酸钠溶液;

(34)、海藻酸钠溶液的制备

称取0.15-0.25g海藻酸钠粉末,然后将其加入盛有10ml蒸馏水的无菌烧杯中,在搅拌机的搅拌下,使得海藻酸钠溶液变得清澈透亮,留取备用;

(35)、制备温敏性壳聚糖水凝胶

(351)、分别称取4ml步骤(31)得到的壳聚糖溶液、2ml步骤(32)得到的I型胶原溶液加入到无菌烧杯中,于冰上搅拌均匀,得到混合液,然后进入步骤(352);

(352)、在冰上,缓慢向步骤(351)的得到的混合液加入步骤(33)得到的β-甘油磷酸钠溶液形成混合液,然后进入步骤(353);

(353)、向步骤(352)得到的混合液中加入3ml步骤(34)得到的海藻酸钠溶液,搅拌均匀后形成混合液,进入步骤(354);

(354)、将步骤(353)得到的混合液加入EP管中,并立即放入37℃恒温培养箱中培养8-10min,即可得到温敏性壳聚糖水凝胶。

13. 如权利要求1所述的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,其特征在于,步骤四包括以下步骤:

(41)、将步骤一制备的子宫内膜干细胞用DMEM/F12完全培养基进一步稀释,稀释后的子宫内膜干细胞的细胞浓度为 $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml;

(42)、将步骤二制备的间充质干细胞用DMEM/F12完全培养基进一步稀释,稀释后的间充质干细胞悬液的细胞浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个/ml;

(43)、将步骤(41)得到的稀释后的子宫内膜干细胞悬液与步骤(42)得到的稀释后的间充质干细胞悬液按照体积比2:1的比例混合后形成子宫内膜干细胞和间充质干细胞混悬液,然后降温至 $18^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$,在冰浴容器中,将子宫内膜干细胞和间充质干细胞混悬液与步骤三制备的温敏性壳聚糖水凝胶充分混合后即得到细胞复合型子宫内膜修复凝胶。

14. 权利要求1-13任意一项所述的细胞复合型子宫内膜修复凝胶作为治疗宫腔粘连的应用。

15. 如权利要求14所述的应用,其特征在于,将细胞复合型子宫内膜修复凝胶进行宫腔局部移植后,在 37°C 体温环境下迅速发生凝集,使细胞在宫腔内停留并贴附于子宫内膜上,对子宫内膜进行修复。

一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学领域,具体涉及一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 根据文献报道,人工流产术、刮宫术所致的宫腔粘连发生率高达25%-30%,且术后再粘连发生率很高,尤其是重度宫腔粘连,术后再粘连率高达62.5%。

[0003] 如何能彻底治愈宫腔粘连是临床的棘手问题。近年来,国内外学者提出,宫腔粘连的发生与子宫内膜干细胞损伤相关,内膜损伤导致内膜干细胞减少或功能受损,子宫内膜无法完全再生,导致内膜瘢痕修复,最终导致宫腔粘连的发生。

[0004] 子宫内膜干细胞作为一种成体干细胞具有容易分离和扩增的特性,有更强的集落形成能力和更少的提取技术问题,拥有巨大的自体治疗潜力。而脐带本身为一种医疗垃圾,脐带间充质干细胞有很强的增殖分化能力,并且免疫原性低,对于局部微环境有改善及调理作用。

[0005] 目前对于宫腔粘连的治疗手段普遍存在临床治疗效果不佳,现有细胞移植出现排斥、细胞修复时间不足、术后再粘连等问题。因此,本发明公开了一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶,能够很好的解决上述问题。

发明内容

[0006] 发明目的:本发明针对上述现有技术的不足做出改进,即本发明的第一个目的在于公开了一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法。本发明的第二个目的在于公开了细胞复合型子宫内膜修复凝胶的用途。本发明使用复合有子宫内膜干细胞和脐带间充质干细胞的壳聚糖水凝胶,进行子宫局部移植,增加了细胞在宫腔内的停留时间,促进细胞的贴壁为促进子宫内膜的修复创造了条件。

[0007] 技术方案:一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,包括以下步骤:

[0008] 步骤一、子宫内膜干细胞的提取与培养,得到子宫内膜干细胞;

[0009] 步骤二、间充质干细胞的提取与培养,得到间充质干细胞;

[0010] 步骤三、温敏性壳聚糖水凝胶的制备;

[0011] 步骤四、细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备。

[0012] 进一步地,步骤一包括以下步骤:

[0013] (1)、无菌条件下,取子宫内膜组织,用无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的PBS缓冲液冲洗至少三次,然后转入无菌培养皿中,并将其剪至体积小于 1mm^3 的小块;

[0014] (2)、向步骤(1)的无菌培养皿中加入1.5~3倍体积的0.1v/v%胶原酶水溶液,在 37°C 下,水浴振荡消化30~80min,收集消化液于离心管中,向离心管中加入DMEM/F12完全培养基终止消化,然后1000rpm离心10min,弃去上清,保留细胞沉淀;

[0015] (3)、向离心管中加4~8倍体积的红细胞裂解液,持续震荡,直到离心管内液体逐

渐变为红色时,向离心管中添加10ml PBS缓冲液,再次1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0016] (4)、用PBS缓冲液洗涤上述细胞沉淀至少2次,弃上清,保留细胞沉淀;

[0017] (5)、用4倍体积的DMEM/F12完全培养基重悬步骤(4)保留的细胞沉淀,制备细胞悬液;

[0018] (6)、将细胞悬液依次过200目及400目网筛并用DMEM/F12完全培养基冲洗细胞网,收集400目下的细胞悬液,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0019] (7)、向步骤(6)保留的细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基重悬上述细胞沉淀,并转移到细胞培养瓶中,在37℃、5v/v%CO₂培养箱中进行培养,于培养24~48h后首次用DMEM/F12完全培养基进行半量换液,以后每2-3天用DMEM/F12完全培养基进行一次全量换液,弃去未贴壁细胞,待原代细胞生长融合达80%-90%时,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液进行传代,并以 6×10^3 个细胞/cm²的密度进行传代培养,传到三代及三代以上,得到子宫内膜干细胞,其中:

[0020] 步骤(2)、步骤(5)、步骤(6)、步骤(7)中的DMEM/F12完全培养基含10v/v%FBS和1v/v%青链霉素,余量为DMEM/F12。

[0021] 更进一步地,对于步骤一得到的子宫内膜干细胞进行鉴定,鉴定合格后才能作为制备细胞复合型子宫内膜修复凝胶的原料,对于子宫内膜干细胞的鉴定包括子宫内膜干细胞表面标记物的鉴定、成骨分化的鉴定和成脂分化的鉴定,其中:

[0022] (a)、子宫内膜干细胞表面标记物的鉴定,包括以下步骤:

[0023] (a1)、取步骤(7)得到的融合度为90%~95%的第3代子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0024] (a2)、将步骤(a1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0025] (a3)、将步骤(a2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0026] (a4)、用PBS缓冲液重悬步骤(a3)得到的细胞沉淀得到细胞悬液,并进行计数;

[0027] (a5)、调节步骤(a5)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,然后取5个流式管,每管加入100ul细胞悬液,吹打混匀;

[0028] (a6)、将5个流式管分别加入10ul带有FITC或PE荧光标记的一抗,一抗分别为FITC同型抗体、PE同型抗体、CD29抗体、CD73抗体、CD90抗体、CD34抗体、CD45抗体、CD133抗体,在室温避光条件下孵育20-30min;

[0029] (a7)、孵育结束后,每管加入100ulPBS缓冲液轻轻吹打至单细胞悬液后,通过流式细胞仪检测其表面标记物荧光强度,子宫内膜干细胞显示CD29抗体、CD73抗体和CD90抗体阳性,CD34抗体、CD45抗体和CD133抗体阴性;

[0030] (b)、子宫内膜干细胞诱导成骨分化能力的鉴定

[0031] (b1)、取步骤(7)得到的融合度为90%~95%的第3代子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0032] (b2)、将步骤(b1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0033] (b3)、将步骤(b2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0034] (b4)、用PBS缓冲液重悬步骤(b3)得到的细胞沉淀,得到细胞悬液并进行计数,

[0035] (b5)、调节步骤(b4)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,在铺有明胶的6孔板中各加入100ul细胞悬液,再补充2ml DMEM/F12完全培养基进行细胞培养;

[0036] (b6)、待细胞融合度为60%-70%时,更换培养基为预热至37℃的含10%FBS的成人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基,每隔3天换液一次,诱导2-4周;

[0037] (b7)、诱导结束后,弃培养基,用PBS缓冲液清洗2遍,4%多聚甲醛固定30min,吸去多聚甲醛溶液,用PBS缓冲液洗脱固定液2次,每次5min;

[0038] (b8)、每孔加入1ml茜素红工作液,室温染色5min,用PBS缓冲液洗脱染色液,显微镜下观察成骨染色情况,成骨分化的子宫内膜干细胞内呈现深浅不同的红色矿化结节;其中:

[0039] 成人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基为:成人脂肪间质干细胞成骨诱导分化基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成骨诱导分化培养基专用血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、抗坏血酸400ul、 β -甘油磷酸钠2ml、地塞米松20ul;

[0040] (c)、子宫内膜干细胞成脂分化的鉴定

[0041] (c1)、取步骤(7)得到的融合度为90%~95%的第3代、子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0042] (c2)、将步骤(c1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0043] (c3)、将步骤(c2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0044] (c4)、用PBS缓冲液重悬步骤(c3)得到的细胞沉淀,得到细胞悬液并进行计数;

[0045] (c5)、调节步骤(c4)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,在铺有明胶的6孔板中各加入100ul细胞悬液,再补充2ml DMEM/F12完全培养基进行细胞培养;

[0046] (c6)、待细胞长至完全融合或过饱和时,更换培养基为含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A,三天后换液为成脂诱导分化培养基B,24h后吸去成脂诱导分化培养基B换回含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A进行诱导;

[0047] (c7)、含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A与成脂诱导分化培养基B交替使用5次后,单纯B液培养7天,每2-3天半量换液;

[0048] (c8)、诱导结束后弃培养基,用PBS缓冲液洗涤,清洗2遍,4%多聚甲醛固定30min,吸去多聚甲醛溶液,用PBS缓冲液洗脱固定液2次,每次5min;

[0049] (c9)、油红O溶液:蒸馏水=3:2稀释为工作液,每孔加入1ml油红O工作液,室温染色30min后,用PBS缓冲液洗脱染色液,显微镜下观察成脂染色情况,成脂分化的子宫内膜干细胞内出现多数橙子红色脂肪滴;其中:

[0050] 含10%FBS的成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基A:成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基A液基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化用胎牛血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、胰岛素400u1、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤200u1、罗格列酮200u1、地塞米松200u1;成脂诱导分化培养基B:成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基B液基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化专用胎牛血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、胰岛素400u1。

[0051] 进一步地,步骤二中的间充质干细胞为脐带间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0052] (1)、在无菌条件下,取健康的脐带标本10-20cm,置于含1v/v%双抗的PBS缓冲液中;

[0053] (2)、将步骤(1)得到的脐带标本移至超净工作台中,反复用PBS缓冲液冲洗脐带标本,以去除残留血液;

[0054] (3)、在培养皿中剥离脐带标本的外膜、脐带动静脉后,将剩余组织块剪碎至体积小于1mm³;

[0055] (4)、向培养皿中加入DMEM/F12完全培养基,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养,4d后进行半量换液,待发现有细胞爬出后,每3d进行换液一次,传至第3代,待第3代脐带间充质干细胞达80-90%融合时,用0.25wt%胰酶水溶液消化细胞,EMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打培养皿底部并收集细胞,1000rpm离心5分钟,弃上清,保留细胞沉淀;

[0056] (5)、向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,重悬细胞沉淀,并对其进行细胞计数,完成后即得到脐带间充质干细胞。

[0057] 更进一步地,步骤(4)中脐带间充质干细胞传代方法包括以下步骤:待脐带间充质干细胞达到80-90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打培养皿底部并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2-3的比例传代。

[0058] 进一步地,步骤二中的间充质干细胞为脂肪间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0059] S21、无菌条件下,取脂肪组织,剔除血管筋膜,PBS冲洗,去除红细胞,剪碎至体积小于1mm³,然后置于50ml离心管中,加入5-10倍体积的0.1wt%的I型胶原酶,在37℃、100rpm的水浴锅中振荡40-80min;

[0060] S22、向离心管中加入等体积的HG-DMEM完全培养基终止消化,在4℃、1500rpm条件下离心10min,弃上清及上层脂肪,留取细胞沉淀,其中:

[0061] HG-DMEM完全培养基包括15%v/vFBS和1v/v%青链霉素,余量为HG-DMEM;

[0062] S23、再向上述离心管中加入10-15mlHG-DMEM完全培养基,充分混悬,过200目滤网,留取滤液,在4℃、1500rpm条件下离心10min,弃上清,得到细胞沉淀;

[0063] S24、再向离心管中加入5mlHG-DMEM完全培养基,充分混悬,得到细胞悬液;

[0064] S25、将细胞悬液接种于T25细胞培养瓶中,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度培养箱中培养48-72h后首次半量换液,去除未贴壁细胞,然后每2-3d换液一次,传至第3代,待第3代脂肪间充质干细胞达到80%-90%时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞, HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,弃上清,向细胞沉淀中加入HG-DMEM完全培养基1ml,重悬细胞沉淀,并对其进行计数,完成后即得到第3

代的脂肪间充质干细胞。

[0065] 更进一步地,脂肪间充质干细胞的传代方法为:待脂肪间充质干细胞达到80%-90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2-3的比例传代。

[0066] 进一步地,步骤二中的间充质干细胞为骨髓间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0067] Step21、无菌条件下取出股骨和胫骨,从股骨干和胫骨干中间剪断,用DMEM/F12完全培养基反复冲洗骨髓腔得到冲洗液,其中:

[0068] DMEM/F12完全培养基包括10v/v%FBS和1v/v%青链霉素,余量为DMEM/F12;

[0069] Step22、将冲洗液用200目滤网过滤,取滤液,然后将滤液置于离心管中,1000rpm,离心5min,弃上清,得到细胞沉淀;

[0070] Step23、向离心管中加入5mlDMEM/F12完全培养充分混悬,得到细胞悬液,接种T25细胞培养瓶中,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度培养箱中培养,24-48h后首次换液,去除未贴壁细胞,然后每2-3d换液一次,传至第3代,待第3代骨髓间充质干细胞达到80%-90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶溶液细胞消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集洗吧,以1000rpm离心5min;弃上清,向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,充分混悬,并对其进行计数,完成后即得到第3代的骨髓间充质干细胞。

[0071] 更进一步地,骨髓间充质干细胞的传代方法为:待骨髓间充质干细胞达到80%-90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2-3的比例传代。

[0072] 进一步地,步骤二中的间充质干细胞为胎盘间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0073] 步骤21、无菌条件下取靠近脐带部位胎盘小叶,剥除羊膜和底蜕膜部分,取胎盘胎儿面组织,然后用PBS反复冲洗至液体比较清亮,用眼科剪剪碎至体积小于1mm³,然后置于50ml离心管中;

[0074] 步骤22、向上述离心管中加入2-4倍体积的0.1wt%胶原酶水溶液,在37℃、100rpm振荡20-50min,加入相同体积的DMEM/F12完全培养基,过200目滤网,得到细胞沉淀;

[0075] 步骤23、向离心管中加入5mlDMEM/F12完全培养基充分混悬,得到细胞悬液,接种于T25细胞培养瓶中,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度培养箱中培养,24-48h后首次换液,去除未贴壁细胞,然后每2-3d换液一次,传至第3代,待第3代胎盘间充质干细胞达到80-90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,弃去上清,向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,充分混悬得到细胞悬液,并对其进行计数,完成后即得到第3代的胎盘间充质干细胞,其中:

[0076] DMEM/F12完全培养基包括10v/v%FBS和1v/v%青链霉素,余量为DMEM/F12。

[0077] 更进一步地,胎盘间充质干细胞的传代方法为:待胎盘间充质干细胞达到80%-90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2-3的比例传代。

[0078] 进一步地,步骤三包括以下步骤:

[0079] (31)、壳聚糖溶液的制备

[0080] 称取0.2-0.3g脱乙酰度大于90%的壳聚糖粉末,并将其加入盛有10ml浓度为0.1M

稀醋酸水溶液的无菌烧杯中,在搅拌机的搅拌下,使得壳聚糖溶液变得清澈透亮,留取备用;

[0081] (32)、I型胶原溶液的制备

[0082] 称取25-50mg I型胶原粉末,并将其加入盛有10ml浓度为0.02M的稀醋酸水溶液的无菌烧杯中,并用洁净的玻璃棒搅拌至完全溶解得到I型胶原溶液;

[0083] (33)、 β -甘油磷酸钠溶液的制备

[0084] 称取0.4-0.6g β -甘油磷酸钠粉末,然后将其加入盛有1ml蒸馏水的5ml无菌烧杯中,并用洁净的玻璃棒搅拌至完全溶解得到 β -甘油磷酸钠溶液;

[0085] (34)、海藻酸钠溶液的制备

[0086] 称取0.15-0.25g海藻酸钠粉末,然后将其加入盛有10ml蒸馏水的无菌烧杯中,在搅拌机的搅拌下,使得海藻酸钠溶液变得清澈透亮,留取备用;

[0087] (35)、制备温敏性壳聚糖水凝胶

[0088] (351)、分别称取4ml步骤(31)得到的壳聚糖溶液、2ml步骤(32)得到的I型胶原溶液加入到无菌烧杯中,于冰上搅拌均匀,得到混合液,然后进入步骤(352);

[0089] (352)、在冰上,缓慢向步骤(351)的到的混合液加入步骤(33)得到的 β -甘油磷酸钠溶液形成混合液,然后进入步骤(353);

[0090] (353)、向步骤(352)得到的混合液中加入3ml步骤(34)得到的海藻酸钠溶液,搅拌均匀后形成混合液,进入步骤(354);

[0091] (354)、将步骤(353)得到的混合液加入EP管中,并立即放入37℃恒温培养箱中培养8-10min,即可得到温敏性壳聚糖水凝胶。

[0092] 进一步地,步骤四包括以下步骤:

[0093] (41)、将步骤一制备的子宫内膜干细胞用DMEM/F12完全培养基进一步稀释,稀释后的子宫内膜干细胞的细胞浓度为 $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ 个/ml;

[0094] (42)、将步骤二制备的间充质干细胞用DMEM/F12完全培养基进一步稀释,稀释后的间充质干细胞悬液的细胞浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个/ml;

[0095] (43)、将步骤(41)得到的稀释后的子宫内膜干细胞悬液与步骤(42)得到的稀释后的间充质干细胞悬液按照体积比2:1的比例混合后形成子宫内膜干细胞和间充质干细胞混悬液,然后降温至18℃-20℃,在冰浴容器中,将子宫内膜干细胞和间充质干细胞混悬液与步骤三制备的温敏性壳聚糖水凝胶充分混合后即得到细胞复合型子宫内膜修复凝胶。

[0096] 上述的任意一项所述的细胞复合型子宫内膜修复凝胶作为治疗宫腔粘连的应用。

[0097] 进一步地,将细胞复合型子宫内膜修复凝胶进行宫腔局部移植后,在37℃体温环境下迅速发生凝集,使细胞在宫腔内停留并贴附于子宫内膜上,对子宫内膜进行修复。

[0098] 壳聚糖是一种具有良好生物相容性的天然阳离子多糖,是用途非常广的生物材料。壳聚糖溶液在室温下呈液态,可以包裹活性细胞和蛋白质,与 β -甘油磷酸钠混合后,注射入体内后,可在体温条件下于注射处原位形成生物可降解凝胶。I型胶原是细胞外基质成分,可以使细胞更好地生存。海藻酸钠的加入,为整个水凝胶体系提高了强度。该体系作为包裹活性细胞的载体,被成功地应用于生命体内传递生物活性生长因子及组织工程。因此,本发明利用子宫内膜干细胞和脐带间充质干细胞作为细胞来源,利用壳聚糖水凝胶作为细胞包裹材料和3D支架,经人工复合和温敏凝胶聚合为细胞修复子宫内膜提供了可能。

[0099] 子宫内膜干细胞作为一种成体干细胞具有易于分离和扩增,有更强的集落形成能力和更少的提取技术问题,而且取自患者自身的子宫内膜,免疫排斥反应极低,细胞可以更好的定植于子宫内膜表面,从而发挥修复受损内膜修复的功能。因此,本发明采用子宫内膜干细胞作为种子细胞来进行子宫内膜的修复。

[0100] 间充质干细胞是一类具有多向分化潜能的成体干细胞,可诱导分化成成脂细胞、成骨细胞、心肌细胞和胰岛样细胞等。而脐带间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、骨髓间充质干细胞、胎盘间充质干细胞因易于获取、增殖能力强、不涉及伦理等优点,可作为种子细胞。研究证实,脐带间充质干细胞、骨髓间充质干细胞以及胎盘间充质干细胞不表达移植排斥相关的细胞表面标记CD80、CD86、CD40、CD40L,表明脐带间充质干细胞为低免疫原性、细胞移植后不会产生免疫排斥反应。而且,脐带间充质干细胞可以调节微环境,有助于子宫内膜干细胞的定植及发挥作用。胎盘间充质干细胞的来源为胎盘,胎盘是分娩后的医疗废物,并且胎盘体积较大,干细胞丰富,将胎盘提取为胎盘干细胞是一种废物利用,而且免疫原性低,免疫排斥反应小适合移植。脂肪干细胞,可以来源于患者脂肪组织,通过抽脂等手术获取脂肪,属于自体细胞体外扩增培养,免疫排斥反应极低。骨髓间充质干细胞,可以来源于患者自己血液,也可以来源于脐带血,两者免疫源性都低,利于移植后细胞的定植。

[0101] 综合以上因为,为避免子宫内膜修复过程中细胞移植出现免疫排斥反应和细胞停留时间过短、微环境不好等问题,我们选用复合有脐带间充质干细胞和子宫内膜干细胞的壳聚糖温敏水凝胶,在体温环境下细胞复合型水凝胶发生凝集,用于子宫内膜损伤的修复。

[0102] 有益效果:本发明公开的一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法及应用具有以下有益效果:

[0103] 1、自体干细胞移植,基本没有排斥风险;

[0104] 2、自体子宫内膜干细胞和间充质干细胞复合移植,加快了内膜、微小血管和间质的再生,子宫内膜修复时间明显缩短;

[0105] 3、温敏凝胶可局部注射后成形,既可为干细胞提供三维存留空间,又可以防止再生粘膜的粘连。

具体实施方式:

[0106] 下面对本发明的具体实施方式详细说明。

[0107] 具体实施例1

[0108] 一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,包括以下步骤:

[0109] 步骤一、子宫内膜干细胞的提取与培养,得到子宫内膜干细胞;

[0110] 步骤二、间充质干细胞的提取与培养,得到间充质干细胞;

[0111] 步骤三、温敏性壳聚糖水凝胶的制备;

[0112] 步骤四、细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备。

[0113] 进一步地,步骤一包括以下步骤:

[0114] (1)、无菌条件下,取子宫内膜组织,用无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的PBS缓冲液冲洗至少三次,然后转入无菌培养皿中,并将其剪至体积小于 1mm^3 的小块;

[0115] (2)、向步骤(1)的无菌培养皿中加入2倍体积的0.1v/v%胶原酶水溶液,在 37°C

下,水浴振荡消化50min,收集消化液于离心管中,向离心管中加入DMEM/F12完全培养基终止消化,然后1000rpm离心10min,弃去上清,保留细胞沉淀;

[0116] (3)、向离心管中加6倍体积的红细胞裂解液,持续震荡,直到离心管内液体逐渐变为红色时,向离心管中添加10ml PBS缓冲液,再次1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0117] (4)、用PBS缓冲液洗涤上述细胞沉淀至少2次,弃上清,保留细胞沉淀;

[0118] (5)、用4倍体积的DMEM/F12完全培养基重悬步骤(4)保留的细胞沉淀,制备细胞悬液;

[0119] (6)、将细胞悬液依次过200目及400目网筛并用DMEM/F12完全培养基冲洗细胞网,收集400目下的细胞悬液,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0120] (7)、向步骤(6)保留的细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基重悬上述细胞沉淀,并转移到细胞培养瓶中,在37℃、5v/v%CO₂培养箱中进行培养,于培养36h后首次用DMEM/F12完全培养基进行半量换液,以后每2.5天用DMEM/F12完全培养基进行一次全量换液,弃去未贴壁细胞,待原代细胞生长融合达85%时,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液进行传代,并以 6×10^3 个细胞/cm²的密度进行传代培养,传到三代及三代以上,得到子宫内膜干细胞,其中:

[0121] 步骤(2)、步骤(5)、步骤(6)、步骤(7)中的DMEM/F12完全培养基含10v/v%FBS和1v/v%青链霉素,余量为DMEM/F12。

[0122] 更进一步地,对于步骤一得到的子宫内膜干细胞进行鉴定,鉴定合格后才能作为制备细胞复合型子宫内膜修复凝胶的原料,对于子宫内膜干细胞的鉴定包括子宫内膜干细胞表面标记物的鉴定、成骨分化的鉴定和成脂分化的鉴定,其中:

[0123] (a)、子宫内膜干细胞表面标记物的鉴定,包括以下步骤:

[0124] (a1)、取步骤(7)得到的融合度为92%的第3代子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0125] (a2)、将步骤(a1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0126] (a3)、将步骤(a2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0127] (a4)、用PBS缓冲液重悬步骤(a3)得到的细胞沉淀得到细胞悬液,并进行计数;

[0128] (a5)、调节步骤(a5)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,然后取5个流式管,每管加入100ul细胞悬液,吹打混匀;

[0129] (a6)、将5个流式管分别加入10ul带有FITC或PE荧光标记的一抗,一抗分别为FITC同型抗体、PE同型抗体、CD29抗体、CD73抗体、CD90抗体、CD34抗体、CD45抗体、CD133抗体,在室温避光条件下孵育25min;

[0130] (a7)、孵育结束后,每管加入100ulPBS缓冲液轻轻吹打至单细胞悬液后,通过流式细胞仪检测其表面标记物荧光强度,子宫内膜干细胞显示CD29抗体、CD73抗体和CD90抗体阳性,CD34抗体、CD45抗体和CD133抗体阴性;

[0131] (b)、子宫内膜干细胞诱导成骨分化能力的鉴定

[0132] (b1)、取步骤(7)得到的融合度为92%的第3代子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0133] (b2)、将步骤(b1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0134] (b3)、将步骤(b2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0135] (b4)、用PBS缓冲液重悬步骤(b3)得到的细胞沉淀,得到细胞悬液并进行计数,

[0136] (b5)、调节步骤(b4)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,在铺有明胶的6孔板中各加入100ul细胞悬液,再补充2ml DMEM/F12完全培养基进行细胞培养;

[0137] (b6)、待细胞融合度为65%时,更换培养基为预热至37℃的含10%FBS的成人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基,每隔3天换液一次,诱导3周;

[0138] (b7)、诱导结束后,弃培养基,用PBS缓冲液清洗2遍,4%多聚甲醛固定30min,吸去多聚甲醛溶液,用PBS缓冲液洗脱固定液2次,每次5min;

[0139] (b8)、每孔加入1ml茜素红工作液,室温染色5min,用PBS缓冲液洗脱染色液,显微镜下观察成骨染色情况,成骨分化的子宫内膜干细胞内呈现深浅不同的红色矿化结节;其中:

[0140] 成人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基为:成人脂肪间质干细胞成骨诱导分化基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成骨诱导分化培养基专用血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、抗坏血酸400ul、 β -甘油磷酸钠2ml、地塞米松20ul;

[0141] (c)、子宫内膜干细胞成脂分化的鉴定

[0142] (c1)、取步骤(7)得到的融合度为92%的第3代、子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0143] (c2)、将步骤(c1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0144] (c3)、将步骤(c2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0145] (c4)、用PBS缓冲液重悬步骤(c3)得到的细胞沉淀,得到细胞悬液并进行计数;

[0146] (c5)、调节步骤(c4)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,在铺有明胶的6孔板中各加入100ul细胞悬液,再补充2ml DMEM/F12完全培养基进行细胞培养;

[0147] (c6)、待细胞长至完全融合或过饱和时,更换培养基为含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A,三天后换液为成脂诱导分化培养基B,24h后吸去成脂诱导分化培养基B换回含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A进行诱导;

[0148] (c7)、含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A与成脂诱导分化培养基B交替使用5次后,单纯B液培养7天,每2.5天半量换液;

[0149] (c8)、诱导结束后弃培养基,用PBS缓冲液洗涤,清洗2遍,4%多聚甲醛固定30min,吸去多聚甲醛溶液,用PBS缓冲液洗脱固定液2次,每次5min;

[0150] (c9)、油红O溶液:蒸馏水=3:2稀释为工作液,每孔加入1ml油红O工作液,室温染色30min后,用PBS缓冲液洗脱染色液,显微镜下观察成脂染色情况,成脂分化的子宫内膜干细胞内出现多数橙子红色脂肪滴;其中:

[0151] 含10%FBS的成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基A:成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基A液基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化用胎牛血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、胰岛素400u1、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤200u1、罗格列酮200u1、地塞米松200u1;成脂诱导分化培养基B:成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基B液基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化专用胎牛血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、胰岛素400u1。

[0152] 进一步地,步骤二中的间充质干细胞为脐带间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0153] (1)、在无菌条件下,取健康的脐带标本15cm,置于含1v/v%双抗的PBS缓冲液中;

[0154] (2)、将步骤(1)得到的脐带标本移至超净工作台中,反复用PBS缓冲液冲洗脐带标本,以去除残留血液;

[0155] (3)、在培养皿中剥离脐带标本的外膜、脐带动静脉后,将剩余组织块剪碎至体积小于1mm³;

[0156] (4)、向培养皿中加入DMEM/F12完全培养基,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养,4d后进行半量换液,待发现有细胞爬出后,每3d进行换液一次,传至第3代,待第3代脐带间充质干细胞达85%融合时,用0.25wt%胰酶水溶液消化细胞,EMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打培养皿底部并收集细胞,1000rpm离心5分钟,弃上清,保留细胞沉淀;

[0157] (5)、向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,重悬细胞沉淀,并对其进行细胞计数,完成后即得到脐带间充质干细胞。

[0158] 更进一步地,步骤(4)中脐带间充质干细胞传代方法包括以下步骤:待脐带间充质干细胞达到85%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打培养皿底部并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2.5的比例传代。

[0159] 进一步地,步骤三包括以下步骤:

[0160] (31)、壳聚糖溶液的制备

[0161] 称取0.25g脱乙酰度大于90%的壳聚糖粉末,并将其加入盛有10ml浓度为0.1M稀醋酸水溶液的无菌烧杯中,在搅拌机的搅拌下,使得壳聚糖溶液变得清澈透亮,留取备用;

[0162] (32)、I型胶原溶液的制备

[0163] 称取40mg I型胶原粉末,并将其加入盛有10ml浓度为0.02M的稀醋酸水溶液的无菌烧杯中,并用洁净的玻璃棒搅拌至完全溶解得到I型胶原溶液;

[0164] (33)、β-甘油磷酸钠溶液的制备

[0165] 称取0.5gβ-甘油磷酸钠粉末,然后将其加入盛有1ml蒸馏水的5ml无菌烧杯中,并用洁净的玻璃棒搅拌至完全溶解得到β-甘油磷酸钠溶液;

[0166] (34)、海藻酸钠溶液的制备

[0167] 称取0.2g海藻酸钠粉末,然后将其加入盛有10ml蒸馏水的无菌烧杯中,在搅拌机的搅拌下,使得海藻酸钠溶液变得清澈透亮,留取备用;

[0168] (35)、制备温敏性壳聚糖水凝胶

[0169] (351)、分别称取4ml步骤(31)得到的壳聚糖溶液、2ml步骤(32)得到的I型胶原溶液加入到无菌烧杯中,于冰上搅拌均匀,得到混合液,然后进入步骤(352);

[0170] (352)、在冰上,缓慢向步骤(351)的得到的混合液加入步骤(33)得到的 β -甘油磷酸钠溶液形成混合液,然后进入步骤(353);

[0171] (353)、向步骤(352)得到的混合液中加入3ml步骤(34)得到的海藻酸钠溶液,搅拌均匀后形成混合液,进入步骤(354);

[0172] (354)、将步骤(353)得到的混合液加入EP管中,并立即放入37℃恒温培养箱中培养9min,即可得到温敏性壳聚糖水凝胶。

[0173] 进一步地,步骤四包括以下步骤:

[0174] (41)、将步骤一制备的子宫内膜干细胞用DMEM/F12完全培养基进一步稀释,稀释后的子宫内膜干细胞的细胞浓度为 2×10^5 个/ml;

[0175] (42)、将步骤二制备的间充质干细胞用DMEM/F12完全培养基进一步稀释,稀释后的间充质干细胞悬液的细胞浓度为 1×10^6 个/ml;

[0176] (43)、将步骤(41)得到的稀释后的子宫内膜干细胞悬液与步骤(42)得到的稀释后的间充质干细胞悬液按照体积比2:1的比例混合后形成子宫内膜干细胞和间充质干细胞混悬液,然后降温至19℃,在冰浴容器中,将子宫内膜干细胞和间充质干细胞混悬液与步骤三制备的温敏性壳聚糖水凝胶充分混合后即得到细胞复合型子宫内膜修复凝胶。

[0177] 上述的任意一项所述的细胞复合型子宫内膜修复凝胶作为治疗宫腔粘连的应用。

[0178] 进一步地,将细胞复合型子宫内膜修复凝胶进行宫腔局部移植后,在37℃体温环境下迅速发生凝集,使细胞在宫腔内停留并贴附于子宫内膜上,对子宫内膜进行修复。

[0179] 具体实施例2

[0180] 与具体实施例1大致相同,区别仅仅在于步骤二中的工控条件不同:

[0181] 步骤二中的间充质干细胞为脐带间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0182] (1)、在无菌条件下,取健康的脐带标本10cm,置于含1v/v%双抗的PBS缓冲液中;

[0183] (2)、将步骤(1)得到的脐带标本移至超净工作台中,反复用PBS缓冲液冲洗脐带标本,以去除残留血液;

[0184] (3)、在培养皿中剥离脐带标本的外膜、脐带动静脉后,将剩余组织块剪碎至体积小于 1mm^3 ;

[0185] (4)、向培养皿中加入DMEM/F12完全培养基,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养,4d后进行半量换液,待发现有细胞爬出后,每3d进行换液一次,传至第3代,待第3代脐带间充质干细胞达80%融合时,用0.25wt%胰酶水溶液消化细胞,EMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打培养皿底部并收集细胞,1000rpm离心5分钟,弃上清,保留细胞沉淀;

[0186] (5)、向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,重悬细胞沉淀,并对其进行细胞计数,完成后即得到脐带间充质干细胞。

[0187] 更进一步地,步骤(4)中脐带间充质干细胞传代方法包括以下步骤:待脐带间充质干细胞达到80%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打培养皿底部并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2的比例传代。

[0188] 具体实施例3

[0189] 与具体实施例1大致相同,区别仅仅在于步骤二中的工控条件不同:

[0190] 步骤二中的间充质干细胞为脐带间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0191] (1)、在无菌条件下,取健康的脐带标本20cm,置于含1v/v%双抗的PBS缓冲液中;

[0192] (2)、将步骤(1)得到的脐带标本移至超净工作台中,反复用PBS缓冲液冲洗脐带标本,以去除残留血液;

[0193] (3)、在培养皿中剥离脐带标本的外膜、脐带动静脉后,将剩余组织块剪碎至体积小于1mm³;

[0194] (4)、向培养皿中加入DMEM/F12完全培养基,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养,4d后进行半量换液,待发现有细胞爬出后,每3d进行换液一次,传至第3代,待第3代脐带间充质干细胞达90%融合时,用0.25wt%胰酶水溶液消化细胞,EMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打培养皿底部并收集细胞,1000rpm离心5分钟,弃上清,保留细胞沉淀;

[0195] (5)、向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,重悬细胞沉淀,并对其进行细胞计数,完成后即得到脐带间充质干细胞。

[0196] 更进一步地,步骤(4)中脐带间充质干细胞传代方法包括以下步骤:待脐带间充质干细胞达到90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打培养皿底部并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:3的比例传代。

[0197] 具体实施例4

[0198] 一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,包括以下步骤:

[0199] 步骤一、子宫内膜干细胞的提取与培养,得到子宫内膜干细胞;

[0200] 步骤二、间充质干细胞的提取与培养,得到间充质干细胞;

[0201] 步骤三、温敏性壳聚糖水凝胶的制备;

[0202] 步骤四、细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备。

[0203] 进一步地,步骤一包括以下步骤:

[0204] (1)、无菌条件下,取子宫内膜组织,用无Ca²⁺和Mg²⁺的PBS缓冲液冲洗至少三次,然后转入无菌培养皿中,并将其剪至体积小于1mm³的小块;

[0205] (2)、向步骤(1)的无菌培养皿中加入1.5倍体积的0.1v/v%胶原酶水溶液,在37℃下,水浴振荡消化30min,收集消化液于离心管中,向离心管中加入DMEM/F12完全培养基终止消化,然后1000rpm离心10min,弃去上清,保留细胞沉淀;

[0206] (3)、向离心管中加4倍体积的红细胞裂解液,持续震荡,直到离心管内液体逐渐变为红色时,向离心管中添加10ml PBS缓冲液,再次1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0207] (4)、用PBS缓冲液洗涤上述细胞沉淀至少2次,弃上清,保留细胞沉淀;

[0208] (5)、用4倍体积的DMEM/F12完全培养基重悬步骤(4)保留的细胞沉淀,制备细胞悬液;

[0209] (6)、将细胞悬液依次过200目及400目网筛并用DMEM/F12完全培养基冲洗细胞网,收集400目下的细胞悬液,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0210] (7)、向步骤(6)保留的细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基重悬上述细胞沉淀,

并转移到细胞培养瓶中,在37℃、5v/v%CO₂培养箱中进行培养,于培养24h后首次用DMEM/F12完全培养基进行半量换液,以后每2天用DMEM/F12完全培养基进行一次全量换液,弃去未贴壁细胞,待原代细胞生长融合达80%时,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液进行传代,并以 6×10^3 个细胞/cm²的密度进行传代培养,传到三代及三代以上,得到子宫内膜干细胞,其中:

[0211] 步骤(2)、步骤(5)、步骤(6)、步骤(7)中的DMEM/F12完全培养基含10v/v%FBS和1v/v%青链霉素,余量为DMEM/F12。

[0212] 更进一步地,对于步骤一得到的子宫内膜干细胞进行鉴定,鉴定合格后才能作为制备细胞复合型子宫内膜修复凝胶的原料,对于子宫内膜干细胞的鉴定包括子宫内膜干细胞表面标记物的鉴定、成骨分化的鉴定和成脂分化的鉴定,其中:

[0213] (a)、子宫内膜干细胞表面标记物的鉴定,包括以下步骤:

[0214] (a1)、取步骤(7)得到的融合度为90%的第3代子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0215] (a2)、将步骤(a1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0216] (a3)、将步骤(a2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0217] (a4)、用PBS缓冲液重悬步骤(a3)得到的细胞沉淀得到细胞悬液,并进行计数;

[0218] (a5)、调节步骤(a5)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,然后取5个流式管,每管加入100ul细胞悬液,吹打混匀;

[0219] (a6)、将5个流式管分别加入10ul带有FITC或PE荧光标记的一抗,一抗分别为FITC同型抗体、PE同型抗体、CD29抗体、CD73抗体、CD90抗体、CD34抗体、CD45抗体、CD133抗体,在室温避光条件下孵育20min;

[0220] (a7)、孵育结束后,每管加入100ulPBS缓冲液轻轻吹打至单细胞悬液后,通过流式细胞仪检测其表面标记物荧光强度,子宫内膜干细胞显示CD29抗体、CD73抗体和CD90抗体阳性,CD34抗体、CD45抗体和CD133抗体阴性;

[0221] (b)、子宫内膜干细胞诱导成骨分化能力的鉴定

[0222] (b1)、取步骤(7)得到的融合度为90%的第3代子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0223] (b2)、将步骤(b1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0224] (b3)、将步骤(b2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0225] (b4)、用PBS缓冲液重悬步骤(b3)得到的细胞沉淀,得到细胞悬液并进行计数,

[0226] (b5)、调节步骤(b4)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,在铺有明胶的6孔板中各加入100ul细胞悬液,再补充2ml DMEM/F12完全培养基进行细胞培养;

[0227] (b6)、待细胞融合度为60%时,更换培养基为预热至37℃的含10%FBS的成人脂肪

间充质干细胞成骨诱导分化培养基,每隔3天换液一次,诱导2周;

[0228] (b7)、诱导结束后,弃培养基,用PBS缓冲液清洗2遍,4%多聚甲醛固定30min,吸去多聚甲醛溶液,用PBS缓冲液洗脱固定液2次,每次5min;

[0229] (b8)、每孔加入1ml茜素红工作液,室温染色5min,用PBS缓冲液洗脱染色液,显微镜下观察成骨染色情况,成骨分化的子宫内膜干细胞内呈现深浅不同的红色矿化结节;其中:

[0230] 成人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基为:成人脂肪间质干细胞成骨诱导分化基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成骨诱导分化培养基专用血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、抗坏血酸400ul、 β -甘油磷酸钠2ml、地塞米松20ul;

[0231] (c)、子宫内膜干细胞成脂分化的鉴定

[0232] (c1)、取步骤(7)得到的融合度为90%的第3代、子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0233] (c2)、将步骤(c1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0234] (c3)、将步骤(c2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0235] (c4)、用PBS缓冲液重悬步骤(c3)得到的细胞沉淀,得到细胞悬液并进行计数;

[0236] (c5)、调节步骤(c4)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,在铺有明胶的6孔板中各加入100ul细胞悬液,再补充2ml DMEM/F12完全培养基进行细胞培养;

[0237] (c6)、待细胞长至完全融合或过饱和时,更换培养基为含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A,三天后换液为成脂诱导分化培养基B,24h后吸去成脂诱导分化培养基B换回含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A进行诱导;

[0238] (c7)、含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A与成脂诱导分化培养基B交替使用5次后,单纯B液培养7天,每2天半量换液;

[0239] (c8)、诱导结束后弃培养基,用PBS缓冲液洗涤,清洗2遍,4%多聚甲醛固定30min,吸去多聚甲醛溶液,用PBS缓冲液洗脱固定液2次,每次5min;

[0240] (c9)、油红O溶液:蒸馏水=3:2稀释为工作液,每孔加入1ml油红O工作液,室温染色30min后,用PBS缓冲液洗脱染色液,显微镜下观察成脂染色情况,成脂分化的子宫内膜干细胞内出现多数橙子红色脂肪滴;其中:

[0241] 含10%FBS的成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基A:成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基A液基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化用胎牛血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、胰岛素400ul、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤200ul、罗格列酮200ul、地塞米松200ul;成脂诱导分化培养基B:成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基B液基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化专用胎牛血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、胰岛素400ul。

[0242] 进一步地,步骤二中的间充质干细胞为脂肪间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0243] S21、无菌条件下,取脂肪组织,剔除血管筋膜,PBS冲洗,去除红细胞,剪碎至体积

小于 1mm^3 ,然后置于50ml离心管中,加入5倍体积的0.1wt%的I型胶原酶,在 37°C 、100rpm的水浴锅中振荡40min;

[0244] S22、向离心管中加入等体积的HG-DMEM完全培养基终止消化,在 4°C 、1500rpm条件下离心10min,弃上清及上层脂肪,留取细胞沉淀,其中:

[0245] HG-DMEM完全培养基包括15%v/vFBS和1v/v%青链霉素,余量为HG-DMEM;

[0246] S23、再向上述离心管中加入10mlHG-DMEM完全培养基,充分混悬,过200目滤网,留取滤液,在 4°C 、1500rpm条件下离心10min,弃上清,得到细胞沉淀;

[0247] S24、再向离心管中加入5mlHG-DMEM完全培养基,充分混悬,得到细胞悬液;

[0248] S25、将细胞悬液接种于T25细胞培养瓶中,置于 37°C 、5v/v% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养48h后首次半量换液,去除未贴壁细胞,然后每2d换液一次,传至第3代,待第3代脂肪间充质干细胞达到80%时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,弃上清,向细胞沉淀中加入HG-DMEM完全培养基1ml,重悬细胞沉淀,并对其进行计数,完成后即得到第3代的脂肪间充质干细胞。

[0249] 更进一步地,脂肪间充质干细胞的传代方法为:待脂肪间充质干细胞达到80%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2的比例传代。

[0250] 进一步地,步骤三包括以下步骤:

[0251] (31)、壳聚糖溶液的制备

[0252] 称取0.2g脱乙酰度大于90%的壳聚糖粉末,并将其加入盛有10ml浓度为0.1M稀醋酸水溶液的无菌烧杯中,在搅拌机的搅拌下,使得壳聚糖溶液变得清澈透亮,留取备用;

[0253] (32)、I型胶原溶液的制备

[0254] 称取25mg I型胶原粉末,并将其加入盛有10ml浓度为0.02M的稀醋酸水溶液的无菌烧杯中,并用洁净的玻璃棒搅拌至完全溶解得到I型胶原溶液;

[0255] (33)、 β -甘油磷酸钠溶液的制备

[0256] 称取0.4g β -甘油磷酸钠粉末,然后将其加入盛有1ml蒸馏水的5ml无菌烧杯中,并用洁净的玻璃棒搅拌至完全溶解得到 β -甘油磷酸钠溶液;

[0257] (34)、海藻酸钠溶液的制备

[0258] 称取0.15g海藻酸钠粉末,然后将其加入盛有10ml蒸馏水的无菌烧杯中,在搅拌机的搅拌下,使得海藻酸钠溶液变得清澈透亮,留取备用;

[0259] (35)、制备温敏性壳聚糖水凝胶

[0260] (351)、分别称取4ml步骤(31)得到的壳聚糖溶液、2ml步骤(32)得到的I型胶原溶液加入到无菌烧杯中,于冰上搅拌均匀,得到混合液,然后进入步骤(352);

[0261] (352)、在冰上,缓慢向步骤(351)的到的混合液加入步骤(33)得到的 β -甘油磷酸钠溶液形成混合液,然后进入步骤(353);

[0262] (353)、向步骤(352)得到的混合液中加入3ml步骤(34)得到的海藻酸钠溶液,搅拌均匀后形成混合液,进入步骤(354);

[0263] (354)、将步骤(353)得到的混合液加入EP管中,并立即放入 37°C 恒温培养箱中培养8min,即可得到温敏性壳聚糖水凝胶。

[0264] 进一步地,步骤四包括以下步骤:

[0265] (41)、将步骤一制备的子宫内膜干细胞用DMEM/F12完全培养基进一步稀释,稀释后的子宫内膜干细胞的细胞浓度为 2×10^4 个/ml;

[0266] (42)、将步骤二制备的间充质干细胞用DMEM/F12完全培养基进一步稀释,稀释后的间充质干细胞悬液的细胞浓度为 1×10^5 个/ml;

[0267] (43)、将步骤(41)得到的稀释后的子宫内膜干细胞悬液与步骤(42)得到的稀释后的间充质干细胞悬液按照体积比2:1的比例混合后形成子宫内膜干细胞和间充质干细胞混悬液,然后降温至 18°C ,在冰浴容器中,将子宫内膜干细胞和间充质干细胞混悬液与步骤三制备的温敏性壳聚糖水凝胶充分混合后即得到细胞复合型子宫内膜修复凝胶。

[0268] 上述的任意一项所述的细胞复合型子宫内膜修复凝胶作为治疗宫腔粘连的应用。

[0269] 进一步地,将细胞复合型子宫内膜修复凝胶进行宫腔局部移植后,在 37°C 体温环境下迅速发生凝集,使细胞在宫腔内停留并贴附于子宫内膜上,对子宫内膜进行修复。

[0270] 具体实施例5

[0271] 与具体实施例4大致相同,区别仅仅在于步骤二的工控条件不同:

[0272] 步骤二中的间充质干细胞为脂肪间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0273] S21、无菌条件下,取脂肪组织,剔除血管筋膜,PBS冲洗,去除红细胞,剪碎至体积小于 1mm^3 ,然后置于50ml离心管中,加入10倍体积的0.1wt%的I型胶原酶,在 37°C 、100rpm的水浴锅中振荡80min;

[0274] S22、向离心管中加入等体积的HG-DMEM完全培养基终止消化,在 4°C 、1500rpm条件下离心10min,弃上清及上层脂肪,留取细胞沉淀,其中:

[0275] HG-DMEM完全培养基包括15%v/vFBS和1v/v%青链霉素,余量为HG-DMEM;

[0276] S23、再向上述离心管中加入15mlHG-DMEM完全培养基,充分混悬,过200目滤网,留取滤液,在 4°C 、1500rpm条件下离心10min,弃上清,得到细胞沉淀;

[0277] S24、再向离心管中加入5mlHG-DMEM完全培养基,充分混悬,得到细胞悬液;

[0278] S25、将细胞悬液接种于T25细胞培养瓶中,置于 37°C 、5v/v% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养36h后首次半量换液,去除未贴壁细胞,然后每3d换液一次,传至第3代,待第3代脂肪间充质干细胞达到90%时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,弃上清,向细胞沉淀中加入HG-DMEM完全培养基1ml,重悬细胞沉淀,并对其进行计数,完成后即得到第3代的脂肪间充质干细胞。

[0279] 更进一步地,脂肪间充质干细胞的传代方法为:待脂肪间充质干细胞达到90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:3的比例传代。

[0280] 具体实施例6

[0281] 与具体实施例4大致相同,区别仅仅在于步骤二的工控条件不同:

[0282] 进一步地,步骤二中的间充质干细胞为脂肪间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0283] S21、无菌条件下,取脂肪组织,剔除血管筋膜,PBS冲洗,去除红细胞,剪碎至体积小于 1mm^3 ,然后置于50ml离心管中,加入8倍体积的0.1wt%的I型胶原酶,在 37°C 、100rpm的水浴锅中振荡80min;

[0284] S22、向离心管中加入等体积的HG-DMEM完全培养基终止消化,在4℃、1500rpm条件下离心10min,弃上清及上层脂肪,留取细胞沉淀,其中:

[0285] HG-DMEM完全培养基包括15%v/vFBS和1v/v%青链霉素,余量为HG-DMEM;

[0286] S23、再向上述离心管中加入112mlHG-DMEM完全培养基,充分混悬,过200目滤网,留取滤液,在4℃、1500rpm条件下离心10min,弃上清,得到细胞沉淀;

[0287] S24、再向离心管中加入5mlHG-DMEM完全培养基,充分混悬,得到细胞悬液;

[0288] S25、将细胞悬液接种于T25细胞培养瓶中,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度培养箱中培养60h后首次半量换液,去除未贴壁细胞,然后每2.5d换液一次,传至第3代,待第3代脂肪间充质干细胞达到85%时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,弃上清,向细胞沉淀中加入HG-DMEM完全培养基1ml,重悬细胞沉淀,并对其进行计数,完成后即得到第3代的脂肪间充质干细胞。

[0289] 更进一步地,脂肪间充质干细胞的传代方法为:待脂肪间充质干细胞达到85%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2.5的比例传代。

[0290] 具体实施例7

[0291] 一种细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备方法,包括以下步骤:

[0292] 步骤一、子宫内膜干细胞的提取与培养,得到子宫内膜干细胞;

[0293] 步骤二、间充质干细胞的提取与培养,得到间充质干细胞;

[0294] 步骤三、温敏性壳聚糖水凝胶的制备;

[0295] 步骤四、细胞复合型子宫内膜修复凝胶的制备。

[0296] 进一步地,步骤一包括以下步骤:

[0297] (1)、无菌条件下,取子宫内膜组织,用无Ca²⁺和Mg²⁺的PBS缓冲液冲洗至少三次,然后转入无菌培养皿中,并将其剪至体积小于1mm³的小块;

[0298] (2)、向步骤(1)的无菌培养皿中加入3倍体积的0.1v/v%胶原酶水溶液,在37℃下,水浴振荡消化80min,收集消化液于离心管中,向离心管中加入DMEM/F12完全培养基终止消化,然后1000rpm离心10min,弃去上清,保留细胞沉淀;

[0299] (3)、向离心管中加8倍体积的红细胞裂解液,持续震荡,直到离心管内液体逐渐变为红色时,向离心管中添加10ml PBS缓冲液,再次1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0300] (4)、用PBS缓冲液洗涤上述细胞沉淀至少2次,弃上清,保留细胞沉淀;

[0301] (5)、用4倍体积的DMEM/F12完全培养基重悬步骤(4)保留的细胞沉淀,制备细胞悬液;

[0302] (6)、将细胞悬液依次过200目及400目网筛并用DMEM/F12完全培养基冲洗细胞网,收集400目下的细胞悬液,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0303] (7)、向步骤(6)保留的细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基重悬上述细胞沉淀,并转移到细胞培养瓶中,在37℃、5v/v%CO₂培养箱中进行培养,于培养48h后首次用DMEM/F12完全培养基进行半量换液,以后每3天用DMEM/F12完全培养基进行一次全量换液,弃去未贴壁细胞,待原代细胞生长融合达90%时,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液进

行传代,并以 6×10^3 个细胞/ cm^2 的密度进行传代培养,传到三代及三代以上,得到子宫内膜干细胞,其中:

[0304] 步骤(2)、步骤(5)、步骤(6)、步骤(7)中的DMEM/F12完全培养基含10v/v%FBS和1v/v%青链霉素,余量为DMEM/F12。

[0305] 更进一步地,对于步骤一得到的子宫内膜干细胞进行鉴定,鉴定合格后才能作为制备细胞复合型子宫内膜修复凝胶的原料,对于子宫内膜干细胞的鉴定包括子宫内膜干细胞表面标记物的鉴定、成骨分化的鉴定和成脂分化的鉴定,其中:

[0306] (a)、子宫内膜干细胞表面标记物的鉴定,包括以下步骤:

[0307] (a1)、取步骤(7)得到的融合度为95%的第3代子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0308] (a2)、将步骤(a1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0309] (a3)、将步骤(a2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0310] (a4)、用PBS缓冲液重悬步骤(a3)得到的细胞沉淀得到细胞悬液,并进行计数;

[0311] (a5)、调节步骤(a5)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,然后取5个流式管,每管加入100ul细胞悬液,吹打混匀;

[0312] (a6)、将5个流式管分别加入10ul带有FITC或PE荧光标记的一抗,一抗分别为FITC同型抗体、PE同型抗体、CD29抗体、CD73抗体、CD90抗体、CD34抗体、CD45抗体、CD133抗体,在室温避光条件下孵育30min;

[0313] (a7)、孵育结束后,每管加入100ulPBS缓冲液轻轻吹打至单细胞悬液后,通过流式细胞仪检测其表面标记物荧光强度,子宫内膜干细胞显示CD29抗体、CD73抗体和CD90抗体阳性,CD34抗体、CD45抗体和CD133抗体阴性;

[0314] (b)、子宫内膜干细胞诱导成骨分化能力的鉴定

[0315] (b1)、取步骤(7)得到的融合度为95%的第3代子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0316] (b2)、将步骤(b1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0317] (b3)、将步骤(b2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0318] (b4)、用PBS缓冲液重悬步骤(b3)得到的细胞沉淀,得到细胞悬液并进行计数,

[0319] (b5)、调节步骤(b4)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,在铺有明胶的6孔板中各加入100ul细胞悬液,再补充2ml DMEM/F12完全培养基进行细胞培养;

[0320] (b6)、待细胞融合度为70%时,更换培养基为预热至37℃的含10%FBS的成人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基,每隔3天换液一次,诱导4周;

[0321] (b7)、诱导结束后,弃培养基,用PBS缓冲液清洗2遍,4%多聚甲醛固定30min,吸去多聚甲醛溶液,用PBS缓冲液洗脱固定液2次,每次5min;

[0322] (b8)、每孔加入1ml茜素红工作液,室温染色5min,用PBS缓冲液洗脱染色液,显微镜下观察成骨染色情况,成骨分化的子宫内膜干细胞内呈现深浅不同的红色矿化结节;其中:

[0323] 成人脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基为:成人脂肪间质干细胞成骨诱导分化基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成骨诱导分化培养基专用血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、抗坏血酸400ul、 β -甘油磷酸钠2ml、地塞米松20ul;

[0324] (c)、子宫内膜干细胞成脂分化的鉴定

[0325] (c1)、取步骤(7)得到的融合度为95%的第3代、子宫内膜干细胞,弃掉培养基,加入PBS缓冲液清洗两遍,加入含0.02%EDTA的0.25%的胰酶进行消化,待细胞大多变圆浮起时,加入等体积的DMEM/F12完全培养基终止消化,得到细胞悬液;

[0326] (c2)、将步骤(c1)得到的细胞悬液转移到离心管中,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0327] (c3)、将步骤(c2)得到的细胞沉淀用PBS缓冲液清洗2遍,以1000rpm离心5min,弃上清,保留细胞沉淀;

[0328] (c4)、用PBS缓冲液重悬步骤(c3)得到的细胞沉淀,得到细胞悬液并进行计数;

[0329] (c5)、调节步骤(c4)得到的细胞悬液的细胞浓度为 2×10^6 个/ml,在铺有明胶的6孔板中各加入100ul细胞悬液,再补充2ml DMEM/F12完全培养基进行细胞培养;

[0330] (c6)、待细胞长至完全融合或过饱和时,更换培养基为含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A,三天后换液为成脂诱导分化培养基B,24h后吸去成脂诱导分化培养基B换回含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A进行诱导;

[0331] (c7)、含10%FBS的成人成脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基A与成脂诱导分化培养基B交替使用5次后,单纯B液培养7天,每3天半量换液;

[0332] (c8)、诱导结束后弃培养基,用PBS缓冲液洗涤,清洗2遍,4%多聚甲醛固定30min,吸去多聚甲醛溶液,用PBS缓冲液洗脱固定液2次,每次5min;

[0333] (c9)、油红O溶液:蒸馏水=3:2稀释为工作液,每孔加入1ml油红O工作液,室温染色30min后,用PBS缓冲液洗脱染色液,显微镜下观察成脂染色情况,成脂分化的子宫内膜干细胞内出现多数橙子红色脂肪滴;其中:

[0334] 含10%FBS的成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基A:成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基A液基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化用胎牛血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、胰岛素400ul、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤200ul、罗格列酮200ul、地塞米松200ul;成脂诱导分化培养基B:成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基B液基础培养基175ml、成人脂肪间质干细胞成脂诱导分化专用胎牛血清20ml、双抗2ml、谷氨酰胺2ml、胰岛素400ul。

[0335] 进一步地,步骤二中的间充质干细胞为骨髓间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0336] Step21、无菌条件下取出股骨和胫骨,从股骨干和胫骨干中间剪断,用DMEM/F12完全培养基反复冲洗骨髓腔得到冲洗液,其中:

[0337] DMEM/F12完全培养基包括10v/v%FBS和1v/v%青链霉素,余量为DMEM/F12;

[0338] Step22、将冲洗液用200目滤网过滤,取滤液,然后将滤液置于离心管中,1000rpm,

离心5min,弃上清,得到细胞沉淀;

[0339] Step23、向离心管中加入5mlDMEM/F12完全培养充分混悬,得到细胞悬液,接种T25细胞培养瓶中,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度培养箱中培养,48h后首次换液,去除未贴壁细胞,然后每3d换液一次,传至第3代,待第3代骨髓间充质干细胞达到90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集洗吧,以1000rpm离心5min;弃上清,向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,充分混悬,并对其进行计数,完成后即得到第3代的骨髓间充质干细胞。

[0340] 更进一步地,骨髓间充质干细胞的传代方法为:待骨髓间充质干细胞达到90%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:3的比例传代。

[0341] 进一步地,步骤三包括以下步骤:

[0342] (31)、壳聚糖溶液的制备

[0343] 称取0.3g脱乙酰度大于90%的壳聚糖粉末,并将其加入盛有10ml浓度为0.1M稀醋酸水溶液的无菌烧杯中,在搅拌机的搅拌下,使得壳聚糖溶液变得清澈透亮,留取备用;

[0344] (32)、I型胶原溶液的制备

[0345] 称取50mg I型胶原粉末,并将其加入盛有10ml浓度为0.02M的稀醋酸水溶液的无菌烧杯中,并用洁净的玻璃棒搅拌至完全溶解得到I型胶原溶液;

[0346] (33)、β-甘油磷酸钠溶液的制备

[0347] 称取0.6gβ-甘油磷酸钠粉末,然后将其加入盛有1ml蒸馏水的5ml无菌烧杯中,并用洁净的玻璃棒搅拌至完全溶解得到β-甘油磷酸钠溶液;

[0348] (34)、海藻酸钠溶液的制备

[0349] 称取0.25g海藻酸钠粉末,然后将其加入盛有10ml蒸馏水的无菌烧杯中,在搅拌机的搅拌下,使得海藻酸钠溶液变得清澈透亮,留取备用;

[0350] (35)、制备温敏性壳聚糖水凝胶

[0351] (351)、分别称取4ml步骤(31)得到的壳聚糖溶液、2ml步骤(32)得到的I型胶原溶液加入到无菌烧杯中,于冰上搅拌均匀,得到混合液,然后进入步骤(352);

[0352] (352)、在冰上,缓慢向步骤(351)的到的混合液加入步骤(33)得到的β-甘油磷酸钠溶液形成混合液,然后进入步骤(353);

[0353] (353)、向步骤(352)得到的混合液中加入3ml步骤(34)得到的海藻酸钠溶液,搅拌均匀后形成混合液,进入步骤(354);

[0354] (354)、将步骤(353)得到的混合液加入EP管中,并立即放入37℃恒温培养箱中培养10min,即可得到温敏性壳聚糖水凝胶。

[0355] 进一步地,步骤四包括以下步骤:

[0356] (41)、将步骤一制备的子宫内膜干细胞用DMEM/F12完全培养基进一步稀释,稀释后的子宫内膜干细胞的细胞浓度为 2×10^6 个/ml;

[0357] (42)、将步骤二制备的间充质干细胞用DMEM/F12完全培养基进一步稀释,稀释后的间充质干细胞悬液的细胞浓度为 1×10^7 个/ml;

[0358] (43)、将步骤(41)得到的稀释后的子宫内膜干细胞悬液与步骤(42)得到的稀释后的间充质干细胞悬液按照体积比2:1的比例混合后形成子宫内膜干细胞和间充质干细胞混

悬液,然后降温至20℃,在冰浴容器中,将子宫内膜干细胞和间充质干细胞混悬液与步骤三制备的温敏性壳聚糖水凝胶充分混合后即得到细胞复合型子宫内膜修复凝胶。

[0359] 上述的任意一项所述的细胞复合型子宫内膜修复凝胶作为治疗宫腔粘连的应用。

[0360] 进一步地,将细胞复合型子宫内膜修复凝胶进行宫腔局部移植后,在37℃体温环境下迅速发生凝集,使细胞在宫腔内停留并贴附于子宫内膜上,对子宫内膜进行修复。

[0361] 具体实施例8

[0362] 与具体实施例7大致相同,区别仅仅在于步骤二的工控条件不同:

[0363] 进一步地,步骤二中的间充质干细胞为骨髓间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0364] Step21、无菌条件下取出股骨和胫骨,从股骨干和胫骨干中间剪断,用DMEM/F12完全培养基反复冲洗骨髓腔得到冲洗液,其中:

[0365] DMEM/F12完全培养基包括10v/v%FBS和1v/v%青链霉素,余量为DMEM/F12;

[0366] Step22、将冲洗液用200目滤网过滤,取滤液,然后将滤液置于离心管中,1000rpm,离心5min,弃上清,得到细胞沉淀;

[0367] Step23、向离心管中加入5mlDMEM/F12完全培养充分混悬,得到细胞悬液,接种T25细胞培养瓶中,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度培养箱中培养,36h后首次换液,去除未贴壁细胞,然后每2.5d换液一次,传至第3代,待第3代骨髓间充质干细胞达到85%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集洗吧,以1000rpm离心5min;弃上清,向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,充分混悬,并对其进行计数,完成后即得到第3代的骨髓间充质干细胞。

[0368] 更进一步地,骨髓间充质干细胞的传代方法为:待骨髓间充质干细胞达到85%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2.5的比例传代。

[0369] 具体实施例9

[0370] 与具体实施例7大致相同,区别仅仅在于步骤二的工控条件不同:

[0371] 进一步地,步骤二中的间充质干细胞为骨髓间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0372] Step21、无菌条件下取出股骨和胫骨,从股骨干和胫骨干中间剪断,用DMEM/F12完全培养基反复冲洗骨髓腔得到冲洗液,其中:

[0373] DMEM/F12完全培养基包括10v/v%FBS和1v/v%青链霉素,余量为DMEM/F12;

[0374] Step22、将冲洗液用200目滤网过滤,取滤液,然后将滤液置于离心管中,1000rpm,离心5min,弃上清,得到细胞沉淀;

[0375] Step23、向离心管中加入5mlDMEM/F12完全培养充分混悬,得到细胞悬液,接种T25细胞培养瓶中,置于37℃、5v/v%CO₂、饱和湿度培养箱中培养,24h后首次换液,去除未贴壁细胞,然后每2d换液一次,传至第3代,待第3代骨髓间充质干细胞达到80%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集洗吧,以1000rpm离心5min;弃上清,向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,充分混悬,并对其进行计数,完成后即得到第3代的骨髓间充质干细胞。

[0376] 更进一步地,骨髓间充质干细胞的传代方法为:待骨髓间充质干细胞达到80%融合时,用含0.02%EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2的比例传代。

[0377] 具体实施例10

[0378] 与具体实施例7大致相同,区别仅仅在于步骤二中的间充质干细胞不同:

[0379] 步骤二中的间充质干细胞为胎盘间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0380] 步骤21、无菌条件下取靠近脐带部位胎盘小叶,剥除羊膜和底蜕膜部分,取胎盘胎儿面组织,然后用PBS反复冲洗至液体比较清亮,用眼科剪剪碎至体积小于 1mm^3 ,然后置于50ml离心管中;

[0381] 步骤22、向上述离心管中加入2倍体积的0.1wt%胶原酶水溶液,在 37°C 、100rpm振荡20min,加入相同体积的DMEM/F12完全培养基,过200目滤网,得到细胞沉淀;

[0382] 步骤23、向离心管中加入5ml DMEM/F12完全培养基充分混悬,得到细胞悬液,接种于T25细胞培养瓶中,置于 37°C 、5v/v% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养,24h后首次换液,去除未贴壁细胞,然后每2d换液一次,传至第3代,待第3代胎盘间充质干细胞达到80%融合时,用含0.02% EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,弃去上清,向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,充分混悬得到细胞悬液,并对其进行计数,完成后即得到第3代的胎盘间充质干细胞,其中:

[0383] DMEM/F12完全培养基包括10v/v% FBS和1v/v% 青链霉素,余量为DMEM/F12。

[0384] 更进一步地,胎盘间充质干细胞的传代方法为:待胎盘间充质干细胞达到80%融合时,用含0.02% EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2的比例传代。

[0385] 具体实施例11

[0386] 与具体实施例7大致相同,区别仅仅在于步骤二中的间充质干细胞不同:

[0387] 步骤二中的间充质干细胞为胎盘间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0388] 步骤21、无菌条件下取靠近脐带部位胎盘小叶,剥除羊膜和底蜕膜部分,取胎盘胎儿面组织,然后用PBS反复冲洗至液体比较清亮,用眼科剪剪碎至体积小于 1mm^3 ,然后置于50ml离心管中;

[0389] 步骤22、向上述离心管中加入4倍体积的0.1wt%胶原酶水溶液,在 37°C 、100rpm振荡50min,加入相同体积的DMEM/F12完全培养基,过200目滤网,得到细胞沉淀;

[0390] 步骤23、向离心管中加入5ml DMEM/F12完全培养基充分混悬,得到细胞悬液,接种于T25细胞培养瓶中,置于 37°C 、5v/v% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养,48h后首次换液,去除未贴壁细胞,然后每3d换液一次,传至第3代,待第3代胎盘间充质干细胞达到90%融合时,用含0.02% EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,弃去上清,向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,充分混悬得到细胞悬液,并对其进行计数,完成后即得到第3代的胎盘间充质干细胞,其中:

[0391] DMEM/F12完全培养基包括10v/v% FBS和1v/v% 青链霉素,余量为DMEM/F12。

[0392] 更进一步地,胎盘间充质干细胞的传代方法为:待胎盘间充质干细胞达到90%融合时,用含0.02% EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:3的比例传代。

[0393] 具体实施例12

[0394] 与具体实施例7大致相同,区别仅仅在于步骤二中的间充质干细胞不同:

[0395] 步骤二中的间充质干细胞为胎盘间充质干细胞,步骤二包括以下步骤:

[0396] 步骤21、无菌条件下取靠近脐带部位胎盘小叶,剥除羊膜和底蜕膜部分,取胎盘胎儿面组织,然后用PBS反复冲洗至液体比较清亮,用眼科剪剪碎至体积小于 1mm^3 ,然后置于50ml离心管中;

[0397] 步骤22、向上述离心管中加入3倍体积的0.1wt%胶原酶水溶液,在 37°C 、100rpm振荡30min,加入相同体积的DMEM/F12完全培养基,过200目滤网,得到细胞沉淀;

[0398] 步骤23、向离心管中加入5ml DMEM/F12完全培养基充分混悬,得到细胞悬液,接种于T25细胞培养瓶中,置于 37°C 、5v/v% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养,36h后首次换液,去除未贴壁细胞,然后每2.5d换液一次,传至第3代,待第3代胎盘间充质干细胞达到85%融合时,用含0.02% EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,DMEM/F12完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,弃去上清,向细胞沉淀中加入DMEM/F12完全培养基1ml,充分混悬得到细胞悬液,并对其进行计数,完成后即得到第3代的胎盘间充质干细胞,其中:

[0399] DMEM/F12完全培养基包括10v/v% FBS和1v/v% 青链霉素,余量为DMEM/F12。

[0400] 更进一步地,胎盘间充质干细胞的传代方法为:待胎盘间充质干细胞达到85%融合时,用含0.02% EDTA的0.25%的胰酶水溶液消化细胞,HG-DMEM完全培养基终止消化,轻轻吹打瓶底并收集细胞,1000rpm离心5min,按1:2.5的比例传代。

[0401] 验证试验:

[0402] 一、构建大鼠宫腔粘连模型

[0403] 未交配雌性SD大鼠饲养于SPF级屏障系统,昼夜各12h,温度 $20-26^{\circ}\text{C}$,湿度50%-60%,自由采食、饮水。

[0404] 选择4只(8个子宫)有正常动情周期的雌鼠,采用无水乙醇宫腔注射的方法建造宫腔粘连模型。

[0405] ①大鼠术前禁食12h,按 $0.3\text{mL}/100\text{g}$ 剂量腹腔注射10%水合氯醛,待角膜反射及翻正反射消失后手术;

[0406] ②手术板上铺一次性使用手术单,大鼠取仰卧位固定在其上,下腹部备皮,75%酒精消毒。在距耻骨联合上1.5cm,下腹部正中做一纵形切口,依次切开皮肤、腹壁各层;

[0407] ③分离子宫,一侧子宫近端和远端分别用2个止血钳轻轻夹住,用无齿镊轻轻把子宫拉直;

[0408] ④注射器针头进入宫腔,于子宫一端缓慢注入无水乙醇,保持宫腔处于充盈状态,针头停留4-5min。吸出残留的无水乙醇,生理盐水冲洗2次,针头缓慢取出,松开止血钳;

[0409] ⑤另一侧子宫采用同样方法处理;

[0410] ⑥为防止粘连,复位子宫后,用生理盐水冲洗腹腔,并用无菌纱布吸干,逐层关腹。

[0411] 手术中观察,大鼠子宫术前呈粉红色,有弹性;注入无水乙醇后子宫变苍白,质地变硬。

[0412] 大鼠苏醒前注意保温,术后连续三天腹腔注射青霉素(10万单位,一日一次)预防感染。经过三个动情周期后的动情期,开腹取子宫,4%多聚甲醛固定,观察大体标本。

[0413] 二、大鼠宫腔粘连模型建立的检测

[0414] (1) HE染色

[0415] ①切片的制备:多聚甲醛固定后,组织分组垂直置于包埋盒。将包埋的石蜡制成4 μ m的切片,轻轻放入预热的恒温水面,切片逐渐展平,用载玻片轻轻捞起石蜡切片,置于60℃烤箱内过夜;

[0416] ②脱蜡水化:石蜡切片先后置于二甲苯I、II、III、IV中,各为10min;再依次置于梯度酒精中,即无水乙醇I、无水乙醇II、95%酒精I、95%酒精II中,各为30s;自来水冲洗,PBS浸泡5min;

[0417] ③HE染色:苏木素染色10min,自来水流水返蓝30min,伊红染色1min后,于显微镜下观察切片染色情况;

[0418] ④脱水、透明、封片:切片置于梯度酒精中,即95%酒精I、95%酒精II、无水乙醇I、无水乙醇II中,各为30s,二甲苯I 1min,二甲苯II 2min,中性树脂封片,光学显微镜下观察,摄片。

[0419] (2) 子宫内膜厚度测量

[0420] 采用上述HE染色法制片,于光学显微镜下观察,摄片。采用Image-Pro Plus 6.0图像处理软件测量子宫内膜厚度,即子宫内膜肌层交接处至宫腔的垂直距离,每张切片选取4个部位,即内膜最宽、最窄、2个等分点或对称点测量,取其平均值作为该切片子宫内膜厚度。

[0421] 三:对照试验:

[0422] 大鼠宫腔粘连治疗

[0423] 将4只SD大鼠随机分为以下组别,每组各1只。

[0424] ①凝胶/EDSCs组:建立动物模型后,在宫腔局部注射具体实施例1制备的10-25 μ l含有 1×10^6 个EDSCs的凝胶混合物;

[0425] ②EDSCs组:建立动物模型后,在宫腔局部注射10-25 μ l含有 1×10^6 个EDSCs的PBS;

[0426] ③凝胶组:建立动物模型后,在宫腔局部注射10-25 μ l凝胶;

[0427] ④阴性对照组:建立动物模型后,在宫腔局部注射10-25 μ l PBS;

[0428] ⑤正常对照组:取正常雌性大鼠,不给予药物及凝胶/EDSCs。

[0429] 然后进行以下操作:

[0430] 沿原切口打开腹腔,分离出左侧内膜损伤侧子宫,用注射器分别将四种移植成分缓慢注射至四组SD大鼠宫腔内,留针20s后,复位子宫,用生理盐水冲洗腹腔,并用无菌纱布吸干,逐层关腹。各组大鼠标记后,将其移至37℃恒温板上,麻醉醒后送回动物房。

[0431] 2. 大鼠宫腔粘连治疗效果评价

[0432] 凝胶/EDSCs或PBS液移植后,经过三个动情周期的动情期,麻醉过量法处死大鼠,开腹分离并取下子宫,4%多聚甲醛固定。经HE染色以及子宫内膜的测量后,凝胶/子宫内膜组子宫内膜厚度增加明显高于其他几组,与正常组厚度基本一致。

[0433] (1) 自体干细胞移植,凝胶/EDSCs组和EDSCs组未见子宫内膜有炎性反应;

[0434] (2) 自体子宫内膜干细胞和间充质干细胞复合移植,加快了内膜、微小血管和间质的再生,凝胶/EDSCs组和EDSCs组子宫内膜均在3个月经周期明显得到修复,其他组子宫内膜厚度变化不明显;

[0435] (3) 温敏凝胶可局部注射后成形,为干细胞提供三维存留和增值空间,既防止干细

胞悬液经宫颈口和输卵管流出,又可以防止再生粘膜的粘连。

[0436] 上面对本发明的实施方式做了详细说明。但是本发明并不限于上述实施方式,在所属技术领域普通技术人员所具备的知识范围内,还可以在不脱离本发明宗旨的前提下做出各种变化。