

## 权 利 要 求 书

---

1、一种人胎盘间充质干细胞的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 将采集到的胎盘放入含 4 万 IU/L 硫酸庆大霉素的胎盘保护液中，于 2~8℃恒温条件下保存，并在 36 小时内送至采集地所属的干细胞库；

(2) 采集母血，并进行传染病检测，检测通过后取出胎盘，弃去覆盖在外侧的羊膜，并用无菌手术剪取靠近脐带附着处的 5cm<sup>2</sup> 左右大小的胎盘绒毛膜；

(3) 将剪取的胎盘绒毛膜放入盛有 75% 酒精的烧杯中浸泡 10~15s；

(4) 取出后用 D-Hanks 溶液清洗，并剔除附着在胎盘绒毛膜上的血管和绒毛组织；

(5) 再次用 D-Hanks 溶液清洗步骤(4)所得的胎盘绒毛膜至没有血色；

(6) 将清洗后的绒毛膜剪成 1~3mm<sup>2</sup> 的组织块；

(7) 将步骤(6)中的组织块使用爬片法以每瓶 $\geq 200$  块的密度均匀接种，然后于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 3~5 小时，然后取出培养瓶，每瓶加入含 10% 胎牛血清的完全培养基 15ml 后继续放入培养箱中培养；

(8) 培养 5~7 天后取出培养瓶，在显微镜下观察培养瓶壁，有少量大小不一、细胞数量密集细胞团或者培养基已经变成黄色时，进行一次全量换液，继续培养 3~5 天，在显微镜下观察到多个大小不一、细胞数量密集细胞团时，则获得人胎盘间充质干细胞原代细胞；

(9) 将人胎盘间充质干细胞原代细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后，离心处理，收集细胞，计数后按  $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$  个细胞/cm<sup>2</sup> 的密度接种，然后添加完全培养基置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 潮湿培养箱中传代培养；

(10) 冻存：当传代培养的细胞达到 80% 以上融合时进行细胞冻存，将传代培养后的人胎盘充质干细胞加入冻存液后按  $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$  个细胞/mL 密度冻存，冻存细胞经程序降温至 -80℃ 过夜后转入液氮罐中长期保存；

## 权 利 要 求 书

---

(11) 对步骤(10)获得的人胎盘间充质干细胞检测以下项目：细胞活性、细胞数量、支原体检测、无菌检测、细胞表面标志物，以确定制备出来的胎盘间充质干细胞是否符合间充质干细胞的一般特性及冻存要求；

(12) 冻存细胞的复苏：取出冻存管于 37℃融化，加入 D-Hanks 溶液混匀后离心，去除含有的冻存液和胎牛血清，加含 10%胎牛血清的完全培养基重悬细胞，并于体积分数为 5%CO<sub>2</sub>、温度为 37℃静置培养，第二天显微镜下观察细胞贴壁情况，若细胞已经贴壁说明细胞复苏成功；

(13) 建立包含上述步骤所有信息的人胎盘间充质干细胞的数据库，并使该数据库与步骤(10)的冻存细胞进行关联；

所述完全培养基成分为：DMEM-F12(Gibco)、Egf(0.025ug/ml)、10%的胎牛血清。

2、根据权利要求1所述的一种人胎盘间充质干细胞的制备方法，其特征在于，所述步骤(9)中离心处理的条件为：转速 2000~3000rpm，时间 10min。

3、根据权利要求1所述的一种人胎盘间充质干细胞的制备方法，其特征在于，所述步骤(9)传代培养过程中细胞接种密度为  $1 \times 10^4$  个细胞/cm<sup>2</sup>。

4、根据权利要求1所述的一种人胎盘间充质干细胞的制备方法，其特征在于，所述步骤(9)和所述步骤(10)中的计数方法为将所得细胞悬液进行细胞计数，取 50 μl 细胞悬液与 50 μl 0.4% 台盼蓝混匀后，用移液器打入血球计数板中，静置 1min 后，显微镜下观察计数。

5、根据权利要求1所述的一种人胎盘间充质干细胞的制备方法，其特征在于，所述步骤(10)中冻存液为胎牛血清：DMSO（二甲基亚砷）按照体积比=7:3 的比例混合而成。

6、根据权利要求1所述的一种人胎盘间充质干细胞的制备方法，其特征在

## 权 利 要 求 书

---

于, 所述步骤(10)中冻存时细胞密度为  $2 \times 10^6$  个细胞/mL。

7、根据权利要求1所述的一种人胎盘间充质干细胞的制备方法, 其特征在于, 所述步骤(12)中离心处理的条件为: 转速 1200~1800rpm, 时间 5~7min。

8、一种人胎盘间充质干细胞, 其特征在于, 是采用权利要求1~7任意一项权利要求所述的制备方法制备。

9、权利要求8所述的人胎盘间充质干细胞在治疗疾病的细胞制剂、药品上的应用。