

采用康宁® HYPERFlask® 多层细胞培养瓶 快速扩增人体脂肪干细胞

客户应用指南

CORNING

N.M. Vieira, V. Brandalise, E. Zucconi, M. Secco, M. Zatz
巴西圣保罗大学
生物科学研究所人体基因组研究中心

采用PBS 和 TrypLE™ (Invitrogen™) 收获培养物。采用
Guava ViaCount 试剂以Guava® EasyCyte™ 细胞分析仪
对细胞计数。

大量采用HYPERFlask细胞培养瓶后, hASCs保持其免疫
表型和多向分化的潜能。

摘要

人脂肪干细胞(hASCs)是一种丰富、易得的多能成体干细胞来源(1)。尽管我们可获取大量吸脂术后的脂肪, 细胞治疗应用所需的大量未分化存活细胞则需要高效的体外扩增方法才能得到。例如, 在一项旨在改善肌肉萎缩症, 并以小鼠为模型的治疗实验中, 我们在每月一次注射 10^6 个细胞时得到了阳性结果(2)。如果我们将其应用于人体, 估计一个体重 60 公斤的人每月大约需要 3×10^9 个干细胞。我们试验了多种体外扩增方案, 通过采用康宁 HYPERFlask 细胞培养瓶, 我们能够生产大量用于研究的间充质干细胞, 并开发出面向未来的细胞治疗手段。

结果

从任意吸脂手术中获取的脂肪组织中分离得到 hASCs。分离后以流式细胞仪鉴定 hASCs 细胞中 12 种细胞表面蛋白的表示。成脂、成软骨和成骨分化分别以成肌标志物的表达、脂质空泡、富含粘多糖的细胞外基质和钙沉积来表示(1,2)。

hASCs在HYPERFlask细胞培养瓶中很容易扩增(图1), 并且具有类似成纤维细胞的形态, 这一点和带通气盖的T175培养瓶中培养的hASCs(图2)一样。以标准增殖培养基(达尔伯克氏改良伊格尔培养基—高葡萄糖, 含10% FBS)培养hASCs细胞, 初始接种量: 每个康宁HYPERFlask细胞培养瓶为 1.72×10^7 个细胞。

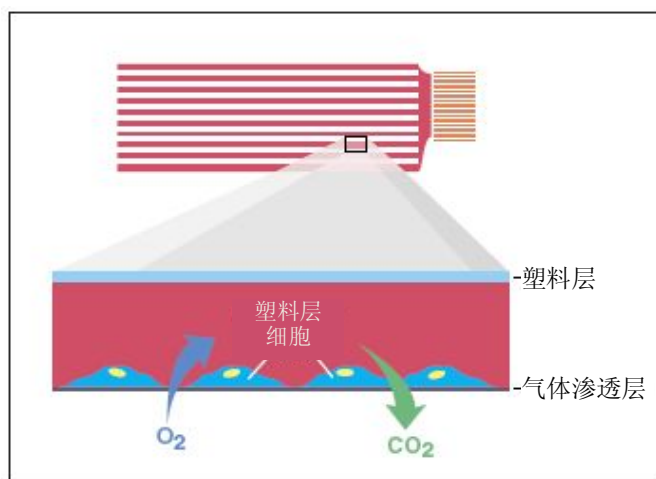


图 1: 康宁 HYPERFlask 细胞培养瓶工作原理。多层细胞培养瓶由 10 层含相同表面积的可透气膜材料构成。

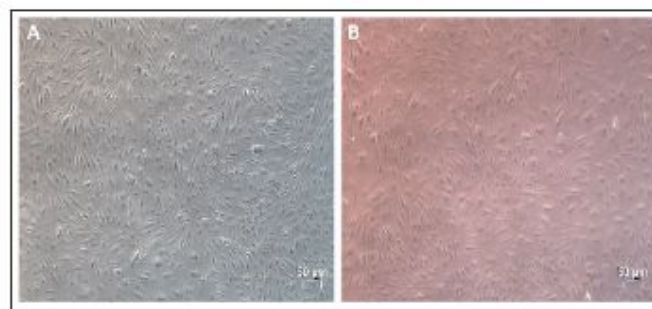


图 2: 在接种 45 分钟后 A)T-175 培养瓶和 B) HYPERFlask 细胞培养瓶中 hASCs 的典型形态

hASCs不表达内皮细胞标志物（CD31- PECAM1），也不表达造血标志物（CD34、CD45和CD117-c-kit）。大部分hASCs表达高水平的CD13、CD44、粘附标志物（CD29-integrin β 1, CD90-Thy-1)和间充质干细胞标志物。

CD73(SH3)。一些标志物（例如CD105（SH2））在捐赠者中的表示是可变的。hASCs的HLA 2类抗原（HLA-DR）呈阴性，HLA 1类抗原（HLA-ABC)呈阳性(图3)。

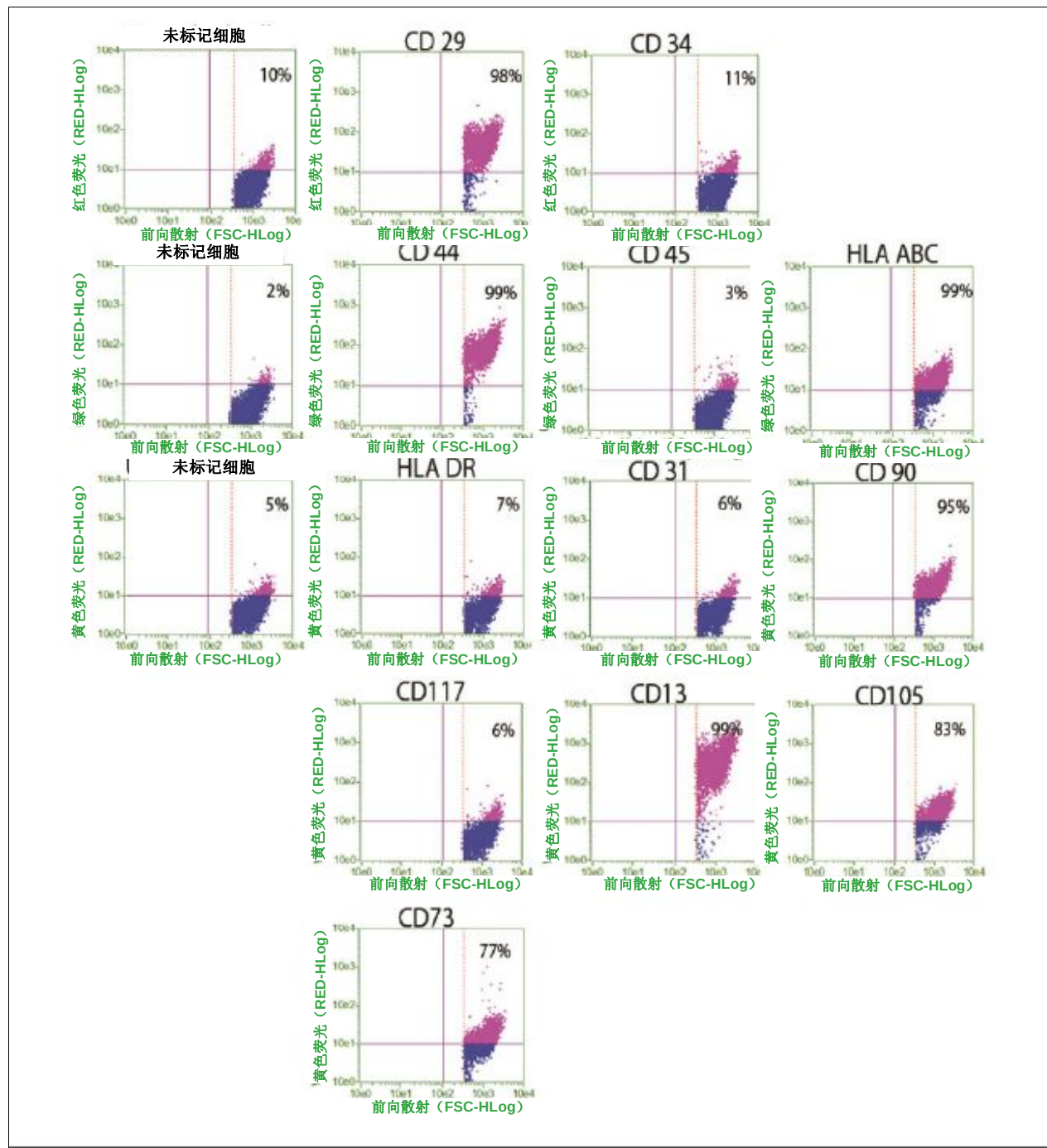


图 3: 在 HYPERFlask 细胞培养瓶中表达后 hASCs 细胞的免疫表型。数值为流式细胞仪分析的标记抗原 (indicated antigen) 染色呈阳性的所有细胞的平均百分比。图形显示了对荧光强度的向前散射。

成脂、成软骨和成骨分化的分化分别以以脂质空泡、富含粘多糖的细胞外基质和钙沉积来表示（图 4）。这些结果证明了扩增细胞的间充质细胞特性和多向分化的潜能。

结论和前瞻性研究

现研究结果证明了一种扩增未分化存活 hASCs 细胞的策略。研究人员曾经尝试过多种方式进行体外扩增，例如结合生长因子的静置培养，或采用共培养体系模拟天然的微环境。我们采用标准增殖培养基和每个康宁 HYPERFlask 细胞培养瓶 1.72×10^7 个细胞的初始接种量培养 hASCs。7 天后，我们将从每个培养瓶收获 1.72×10^8 个细胞。这些细胞可注入或接种至更大规模的培养容器中（例如康宁 CellSTACK®培养室或生物反应器）来进一步扩增。采用这种方法，我们可以生产大量研究用间充质干细胞以及面向未来的细胞治疗方法。

参考文献

1. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001; 7:211-228.

2. Vieira NM, Bueno Jr CR, Brandalise V, et al. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. Stem Cells. 2008; 26:2391-2398.

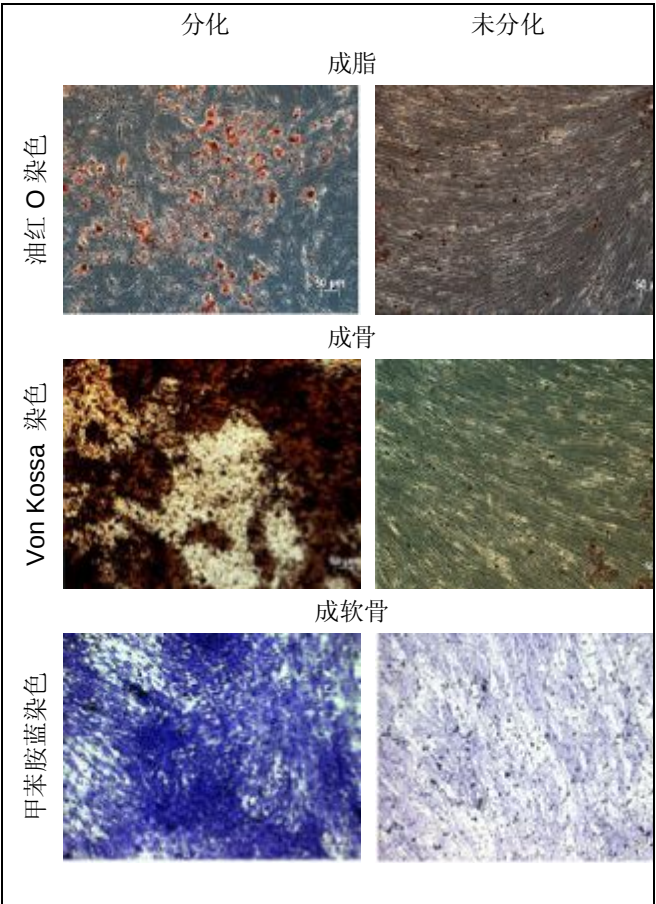


图 4：在 HYPERFlask 细胞培养瓶中扩增后 hASCs 的分化潜能。

更多产品和技术资讯，请浏览 www.corning.com/lifesciences 或致电 1-800-492-1-110。美国以外地区请拨打 978-442-2200。

康宁

康宁有限公司 生命科学 Tower 2, 4 th Floor 900 Chelmsford St. Lowell, MA 01851 电话 800.492.1110 电话 978.442.2200 传真 978.442.2476 www.corning.com/lifesciences	全球支持办事处 亚太地区 澳大利亚/新西兰 电话 65 6733-6511 传真 65 6735-2913 中国 电话 86-21-5467-4666 传真 86-21-5407-5899 印度 电话 91 124 4604000 传真 91 124 4604099	日本 电话 81 3-3586 1996 传真 81 3-3586 1291 韩国 电 话 82 2-796-9500 传真 82 2-796-9300 新加坡 电话 65 6733-6511 传真 65 6861-2913 台湾 电话 886 2-2716-0338 传真 886 2-2716-0339	欧洲 法国 电话 0800 916 882 传真 0800 918 636 德国 电话 0800 101 1153 传真 0800 101 2427 荷兰 电话 31 20 655 79 28 传真 31 20 659 76 73 英国 电话 0800 376 8660 传真 0800 279 1117	所有其他欧洲国家 电话 31(0)20 659 60 51 传真 31(0)20 659 76 73 拉丁美洲 巴西 电话 (55-11) 3089-7419 传真 (55-11) 3167-0700 墨西哥 电话 (52-81) 8158-8400 传真 (52-81) 8313-8589
--	--	--	---	---

康宁和 HyperFlask 是位于纽约康宁的康宁有限公司的注册商标。
本文件中使用的所有其他商标是各自所有人的财产。
Corning Incorporated, One Riverfront Plaza, Corning, NY 14831-0001