



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117481109 B

(45) 授权公告日 2024.03.12

(21) 申请号 202311799067.1

(22) 申请日 2023.12.26

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 117481109 A

(43) 申请公布日 2024.02.02

(73) 专利权人 北京青藤谷禧干细胞科技研究院  
有限公司

地址 100093 北京市海淀区瀚河园26号楼3  
层02

(72) 发明人 王壮 雷起凤 尹娜 梁玉倩  
杨俊丽

(74) 专利代理机构 北京一诺通成知识产权代理  
事务所(普通合伙) 16145  
专利代理师 龚春娟

(51) Int. Cl.  
A01N 1/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 117279505 A, 2023.12.22

CN 110934132 A, 2020.03.31

CN 114982744 A, 2022.09.02

CN 110343245 A, 2019.10.18

CN 116569914 A, 2023.08.11

US 2018092348 A1, 2018.04.05

US 2022079140 A1, 2022.03.17

任丹丹等. 糖类保护剂在组织低温保存中的  
研究进展. 医学研究杂志. 2023, 第52卷(第7期),  
180-183.

Zhang M, Oldenhof H, Sydykov B, et  
al. .Freeze-drying of mammalian cells  
using trehalose: preservation of DNA  
integrity. Scientific reports. 2017, 第7卷  
(第1期), 6198.

审查员 廖慨

权利要求书2页 说明书11页

(54) 发明名称

一种细胞储存介质及储存方法

(57) 摘要

本发明提出了一种细胞储存介质及储存方法,属于细胞储存技术领域。将海藻糖与二酸酐反应后制得羧基化海藻糖,分液与脯氨酸和维生素C反应,产物加入大豆卵磷脂、胆固醇中,制备脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体,与甜菜碱、 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、亚精胺、海藻糖、甘油、HEPES缓冲溶液混合均匀,制得细胞储存介质。本发明制得的细胞储存介质对脂肪间充质干细胞具有很好的低温保护作用,能够明显改善单独添加海藻糖的效果,有一定的渗透性,减少胞内冰晶形成从而减少细胞损伤,同时安全无毒,能够促进干细胞分化,提高干细胞存活率和干性,具有广阔的应用前景。

1. 一种细胞储存介质的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1. 羧基化海藻糖的制备:将海藻糖与二酸酐在碱的存在下反应,制得羧基化海藻糖;

S2. 脯氨酸-海藻糖的制备:将脯氨酸和步骤S1制得的羧基化海藻糖在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羧基琥珀酰亚胺的存在下反应,制得脯氨酸-海藻糖;

S3. 氯化海藻糖的制备:将海藻糖与二氯亚砷反应,制得氯化海藻糖;

S4. 维生素C-海藻糖的制备:将步骤S3制得的氯化海藻糖与维生素C在碱的存在下反应,制得维生素C-海藻糖;

S5. 脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体的制备:将步骤S2制得的脯氨酸-海藻糖、步骤S4制得的维生素C-海藻糖与大豆卵磷脂、胆固醇溶于溶剂中,混合均匀,减压旋蒸挥发溶剂,然后加入HEPES缓冲溶液,加热水合,超声,微孔滤膜过滤,制得脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体;

S6. 活性剂的制备:将甜菜碱、 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、亚精胺混合均匀,制得活性剂;

S7. 细胞储存介质的制备:将步骤S5制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、步骤S6制得的活性剂、海藻糖、甘油、HEPES缓冲溶液混合均匀,制得细胞储存介质。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S1中所述海藻糖、二酸酐、碱的摩尔比为2-3:1:3-5,所述反应的温度为70-80 $^{\circ}$ C,时间为7-12h,所述碱选自三乙胺、二乙胺、NaOH、KOH中的至少一种,所述二酸酐选自乙二酸酐、马来酸酐、琥珀酸酐中的至少一种;步骤S2中所述脯氨酸、羧基化海藻糖、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羧基琥珀酰亚胺的摩尔比为1-1.2:1:1.8-2.2:1.8-2.2,所述反应的温度为35-45 $^{\circ}$ C,时间为17-20h。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S3中所述海藻糖与二氯亚砷的摩尔比为1.2-1.5:1,所述反应温度为室温,时间为0.5-1h;步骤S4中所述氯化海藻糖、维生素C、碱的摩尔比为1:1.1-1.2:3-5,所述反应温度为50-60 $^{\circ}$ C,时间为2-4h,所述碱选自三乙胺、二乙胺、NaOH、KOH中的至少一种。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S5中所述脯氨酸-海藻糖、维生素C-海藻糖、大豆卵磷脂、胆固醇的质量比为5-7:3-5:12-15:3-5,所述溶剂为二氯甲烷和乙醇的按照体积比为3-5:1的混合溶剂,所述HEPES缓冲溶液的浓度为8-12mmol/L,所述加热水合的温度为50-55 $^{\circ}$ C,时间为0.5-1h,所述超声的功率为800-1000W,时间为10-20min,所述微孔滤膜的孔径为0.22 $\mu$ m。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S6中所述甜菜碱、 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、亚精胺的质量比为3-5:0.5-1:0.1-0.3。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤S7中所述脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、活性剂、海藻糖、甘油、HEPES缓冲溶液的质量比为5-7:2-4:7-10:3-5:100-120,所述HEPES缓冲溶液的浓度为8-12mmol/L。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

S1. 羧基化海藻糖的制备:将2-3摩尔当量海藻糖、1摩尔当量二酸酐溶于乙腈中,加入3-5摩尔当量的碱,在70-80 $^{\circ}$ C条件下搅拌反应7-12h,制得羧基化海藻糖;

S2. 脯氨酸-海藻糖的制备:将1摩尔当量步骤S1制得的羧基化海藻糖、1.8-2.2摩尔当量1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、1.8-2.2摩尔当量N-羧基琥珀酰亚胺溶于

水中,冰水浴搅拌活化20-30min,加入1-1.2摩尔当量的脯氨酸,在35-45℃条件下搅拌反应17-20h,制得脯氨酸-海藻糖;

S3. 氯化海藻糖的制备:将1.2-1.5摩尔当量海藻糖溶于二氯甲烷中,在冰水浴条件下加入1摩尔当量二氯亚砷,室温搅拌反应0.5-1h,制得氯化海藻糖;

S4. 维生素C-海藻糖的制备:将1摩尔当量步骤S3制得的氯化海藻糖、1.1-1.2摩尔当量维生素C和3-5摩尔当量碱加入乙腈中,50-60℃反应2-4h,制得维生素C-海藻糖;

S5. 脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体的制备:将5-7重量份步骤S2制得的脯氨酸-海藻糖、3-5重量份步骤S4制得的维生素C-海藻糖、12-15重量份大豆卵磷脂、3-5重量份胆固醇溶于200重量份溶剂中,所述溶剂为二氯甲烷和乙醇的按照体积比为3-5:1的混合溶剂,混合均匀,减压至压强为90-100kPa,在50-60℃水浴中旋蒸挥干溶剂,然后加入浓度为8-12mmol/LHEPES缓冲溶液,加热至55-60℃,水合0.5-1h,800-1000W超声10-20min,用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤,制得脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体;

S6. 活性剂的制备:将3-5重量份甜菜碱、0.5-1重量份 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、0.1-0.3重量份亚精胺混合均匀,制得活性剂;

S7. 细胞储存介质的制备:将5-7重量份步骤S5制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、2-4重量份步骤S6制得的活性剂、7-10重量份海藻糖、3-5重量份甘油、100-120重量份浓度为8-12mmol/LHEPES缓冲溶液混合均匀,制得细胞储存介质。

8. 一种如权利要求1-7任一项所述的制备方法制得的细胞储存介质。

9. 一种脂肪间充质干细胞的储存方法,其特征在于,将脂肪间充质干细胞均匀分散在权利要求8所述的细胞储存介质中,细胞密度为 $10^6$ - $10^7$ 个/mL,然后将混合液在3-5℃平衡50-70min,以0.8-1.2℃/min的速度降至-78至-85℃保存。

## 一种细胞储存介质及储存方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细胞储存技术领域,具体涉及一种细胞储存介质及储存方法。

### 背景技术

[0002] 细胞是生命的基本单位,人体即是由200多种细胞组成的,例如心肌细胞,血细胞和干细胞。干细胞是拥有自我更新和分化能力的细。从脂肪组织中获取间充质干细胞是成体干细胞来源的最佳途径,它在体外增殖快、衰亡率低、分化能力强,同时具有储备量大、取材容易、经体外扩增后具有较低的免疫原性和良好的免疫调节功能等优点,非常具有临床应用潜力,可以治疗多种疑难病症并已取得了突破性进展。因此,脂肪间充质干细胞的储存有重要意义。

[0003] 目前,多采用二甲亚砷(10%)和胎牛血清蛋白(FBS)(90%)的冻存液冷冻保存干细胞,但是,这些冷冻剂中高浓度冷冻剂的细胞毒性作用,如二甲亚砷不利于细胞的恢复。也有人研究通过1,2-丙二醇、甘油替换二甲亚砷作为冷冻液,但是冷冻效果尚且不如二甲亚砷。

[0004] CN107306936B公开了一种常温条件下保存运输干细胞的方法及其所使用的基质。保存运输干细胞的方法包括:干细胞团块形成步骤;干细胞团块培养步骤;干细胞团块制品封装运输步骤;干细胞团块基质去除步骤。可见,该方法需要形成干细胞团块和去除干细胞团块基质的过程,过程比较复杂。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提出一种细胞储存介质及储存方法,具有很好的低温保护作用,能够明显改善单独添加海藻糖的效果,有一定的渗透性,减少胞内冰晶形成从而减少细胞损伤,同时安全无毒,能够促进干细胞分化,提高干细胞存活率和干性,具有广阔的应用前景。

[0006] 本发明的技术方案是这样实现的:

[0007] 本发明提供一种细胞储存介质的制备方法,将海藻糖与二酸酐反应后制得羧基化海藻糖,分液与脯氨酸和维生素C反应,产物加入大豆卵磷脂、胆固醇中,制备脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体,与甜菜碱、 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、亚精胺、海藻糖、甘油、HEPES缓冲溶液混合均匀,制得细胞储存介质。

[0008] 作为本发明的进一步改进,包括以下步骤:

[0009] S1.羧基化海藻糖的制备:将海藻糖与二酸酐在碱的存在下反应,制得羧基化海藻糖;

[0010] S2.脯氨酸-海藻糖的制备:将脯氨酸和步骤S1制得的羧基化海藻糖在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺的存在下反应,制得脯氨酸-海藻糖;

[0011] S3.氯化海藻糖的制备:将海藻糖与二氯亚砷反应,制得氯化海藻糖;

[0012] S4. 维生素C-海藻糖的制备:将步骤S3制得的氯化海藻糖与维生素C在碱的存在下反应,制得维生素C-海藻糖;

[0013] S5. 脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体的制备:将步骤S2制得的脯氨酸-海藻糖、步骤S4制得的维生素C-海藻糖与大豆卵磷脂、胆固醇溶于溶剂中,混合均匀,减压旋蒸挥发溶剂,然后加入HEPES缓冲溶液,加热水合,超声,微孔滤膜过滤,制得脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体;

[0014] S6. 活性剂的制备:将甜菜碱、 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、亚精胺混合均匀,制得活性剂;

[0015] S7. 细胞储存介质的制备:将步骤S5制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、步骤S6制得的活性剂、海藻糖、甘油、HEPES缓冲溶液混合均匀,制得细胞储存介质。

[0016] 作为本发明的进一步改进,步骤S1中所述海藻糖、二酸酐、碱的摩尔比为2-3:1:3-5,所述反应的温度为70-80℃,时间为7-12h,所述碱选自三乙胺、二乙胺、NaOH、KOH中的至少一种,所述二酸酐选自乙二酸酐、马来酸酐、琥珀酸酐中的至少一种;步骤S2中所述脯氨酸、羧基化海藻糖、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺的摩尔比为1-1.2:1:1.8-2.2:1.8-2.2,所述反应的温度为35-45℃,时间为17-20h。

[0017] 作为本发明的进一步改进,步骤S3中所述海藻糖与二氯亚砷的摩尔比为1.2-1.5:1,所述反应温度为室温,时间为0.5-1h;步骤S4中所述氯化海藻糖、维生素C、碱的摩尔比为1:1.1-1.2:3-5,所述反应温度为50-60℃,时间为2-4h,所述碱选自三乙胺、二乙胺、NaOH、KOH中的至少一种。

[0018] 作为本发明的进一步改进,步骤S5中所述脯氨酸-海藻糖、维生素C-海藻糖、大豆卵磷脂、胆固醇的质量比为5-7:3-5:12-15:3-5,所述溶剂为二氯甲烷和乙醇的按照体积比为3-5:1的混合溶剂,所述HEPES缓冲溶液的浓度为8-12mmol/L,所述加热水合的温度为50-55℃,时间为0.5-1h,所述超声的功率为800-1000W,时间为10-20min,所述微孔滤膜的孔径为0.22 $\mu$ m。

[0019] 作为本发明的进一步改进,步骤S6中所述甜菜碱、 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、亚精胺的质量比为3-5:0.5-1:0.1-0.3。

[0020] 作为本发明的进一步改进,步骤S7中所述脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、活性剂、海藻糖、甘油、HEPES缓冲溶液的质量比为5-7:2-4:7-10:3-5:100-120,所述HEPES缓冲溶液的浓度为8-12mmol/L。

[0021] 作为本发明的进一步改进,具体包括以下步骤:

[0022] S1. 羧基化海藻糖的制备:将2-3摩尔当量海藻糖、1摩尔当量二酸酐溶于乙腈中,加入3-5摩尔当量的碱,在70-80℃条件下搅拌反应7-12h,制得羧基化海藻糖;

[0023] S2. 脯氨酸-海藻糖的制备:将1摩尔当量步骤S1制得的羧基化海藻糖、1.8-2.2摩尔当量1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、1.8-2.2摩尔当量N-羟基琥珀酰亚胺溶于水,冰水浴搅拌活化20-30min,加入1-1.2摩尔当量的脯氨酸,在35-45℃条件下搅拌反应17-20h,制得脯氨酸-海藻糖;

[0024] S3. 氯化海藻糖的制备:将1.2-1.5摩尔当量海藻糖溶于二氯甲烷中,在冰水浴条件下加入1摩尔当量二氯亚砷,室温搅拌反应0.5-1h,制得氯化海藻糖;

[0025] S4. 维生素C-海藻糖的制备:将1摩尔当量步骤S3制得的氯化海藻糖、1.1-1.2摩尔当量维生素C和3-5摩尔当量碱加入乙腈中,50-60℃反应2-4h,制得维生素C-海藻糖;

[0026] S5. 脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体的制备:将5-7重量份步骤S2制得的脯氨酸-海藻糖、3-5重量份步骤S4制得的维生素C-海藻糖、12-15重量份大豆卵磷脂、3-5重量份胆固醇溶于200重量份溶剂中,所述溶剂为二氯甲烷和乙醇的按照体积比为3-5:1的混合溶剂,混合均匀,减压至压强为90-100kPa,在50-60℃水浴中旋蒸挥干溶剂,然后加入浓度为8-12mmol/LHEPES缓冲溶液,加热至55-60℃,水合0.5-1h,800-1000W超声10-20min,用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤,制得脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体;

[0027] S6. 活性剂的制备:将3-5重量份甜菜碱、0.5-1重量份 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、0.1-0.3重量份亚精胺混合均匀,制得活性剂;

[0028] S7. 细胞储存介质的制备:将5-7重量份步骤S5制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、2-4重量份步骤S6制得的活性剂、7-10重量份海藻糖、3-5重量份甘油、100-120重量份浓度为8-12mmol/LHEPES缓冲溶液混合均匀,制得细胞储存介质。

[0029] 本发明进一步保护一种上述的制备方法制得的细胞储存介质。

[0030] 本发明进一步保护一种脂肪间充质干细胞的储存方法,将脂肪间充质干细胞均匀分散在上述细胞储存介质中,细胞密度为 $10^6$ - $10^7$ 个/mL,然后将混合液在3-5℃平衡50-70min,以0.8-1.2℃/min的速度降至-78至-85℃保存。

[0031] 本发明具有如下有益效果:

[0032] 海藻糖是一种无毒且生物相容性好的非膜渗透性的天然二糖,具有良好的抗低温、失水的能力,可以保证生物组织在低温失水状态下的存活,但只有当海藻糖同时存在于细胞膜两侧时,才能充分发挥保护作用。

[0033] 本发明制备了一种脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体,能够促进海藻糖组分与细胞膜融合从而进入细胞膜内,保证在细胞膜两侧均含有一定浓度的海藻糖,起到了很好的保护作用;而脯氨酸对海藻糖的改性,能够起到减少细胞渗透压损伤的作用,还可以抑制冰的结晶,从而有效减少细胞冷冻保存过程中的渗透损伤和冰晶的机械损伤的效果。维生素C对海藻糖的改性,能够提高干细胞的干性、多能性、自我更新和分化能力,促进诱导多能干细胞的产生。同时,脂质体中磷脂及胆固醇的存在,对冻存后细胞膜的损伤也能够进行修复的作用。

[0034] 因此,通过制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体和海藻糖的协同作用,在较低的浓度下就能对脂肪间充质干细胞起到很好的低温保护作用,整个保存系统可以在相对较慢的冷却速率下形成玻璃化,从而避免“胞内冰损伤”、“溶质性损伤”和“细胞骨架系统损伤”等。

[0035] 本发明活性剂包括甜菜碱、 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、亚精胺,其中, $\beta$ -烟酰胺单核苷酸是辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)的前体,能够适当延长脂肪间充质干细胞的寿命,具有抗衰老的作用。自噬是一个降解细胞中不需要的蛋白质的过程,是多能干细胞的产生所必需的,亚精胺是一种抗衰老自噬诱导剂,可以通过诱导自噬,降解细胞中不需要的蛋白质,促进多能干细胞的产生。甜菜碱能够维持胚胎干细胞自我更新,多向分化的能力。本发明活性剂多种小分子的协同作用,起到维持细胞干性或促进细胞重编程的能力,同时,具有安全性高、成本低和效率高的优势。

[0036] 甘油可以与水分子紧密结合,降低体系的冰点,增加粘滞性,减小低温和深低温情况下形成的冰晶大小,从而起到了减少对细胞膜的机械损伤的效果。

[0037] 本发明制得的细胞储存介质对脂肪间充质干细胞具有很好的低温保护作用,能够明显改善单独添加海藻糖的效果,有一定的渗透性,减少胞内冰晶形成从而减少细胞损伤,同时安全无毒,能够促进干细胞分化,提高干细胞存活率和干性,具有广阔的应用前景。

### 具体实施方式

[0038] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0039] 猪脂肪间充质干细胞,购于上海联祖生物科技有限公司。

[0040] 实施例1:本实施例提供一种细胞储存介质的制备方法,具体包括以下步骤:

[0041] 具体包括以下步骤:

[0042] S1. 羧基化海藻糖的制备:将0.2mol海藻糖、0.1mol乙二酸酐溶于200mL乙腈中,加入0.3mol NaOH,在70℃条件下搅拌反应7h,减压除去溶剂,乙醇和乙醚按照体积比1:3重结晶,制得羧基化海藻糖;

[0043] S2. 脯氨酸-海藻糖的制备:将0.1mol步骤S1制得的羧基化海藻糖、0.18mol 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、0.18mol N-羟基琥珀酰亚胺溶于200mL水中,冰水浴搅拌活化20min,加入0.1mol脯氨酸,在35℃条件下搅拌反应17h,反应结束后,产物过滤,洗涤,干燥,制得脯氨酸-海藻糖;

[0044] S3. 氯化海藻糖的制备:将0.12mol海藻糖溶于200mL二氯甲烷中,在冰水浴条件下加入0.1mol二氯亚砷,室温搅拌反应0.5h,减压除去溶剂,产物洗涤,干燥,制得氯化海藻糖;

[0045] S4. 维生素C-海藻糖的制备:将0.1mol步骤S3制得的氯化海藻糖、0.11mol维生素C和0.3mol NaOH加入200mL乙腈中,50℃反应2h,减压除去溶剂,产物用乙醚重结晶,制得维生素C-海藻糖;

[0046] S5. 脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体的制备:将5重量份步骤S2制得的脯氨酸-海藻糖、3重量份步骤S4制得的维生素C-海藻糖、12重量份大豆卵磷脂、3重量份胆固醇溶于200重量份溶剂中,搅拌混合15min,减压至压强为90kPa,在50℃水浴中旋蒸挥干溶剂,然后加入浓度为8mmol/L HEPES缓冲溶液,加热至55℃,水合0.5h,800W超声10min,用0.22μm微孔滤膜过滤,制得脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体;

[0047] 所述溶剂为二氯甲烷和乙醇的按照体积比为3:1的混合溶剂;

[0048] S6. 活性剂的制备:将3重量份甜菜碱、0.5重量份β-烟酰胺单核苷酸、0.1重量份亚精胺搅拌混合20min,制得活性剂;

[0049] S7. 细胞储存介质的制备:将5重量份步骤S5制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、2重量份步骤S6制得的活性剂、7重量份海藻糖、3重量份甘油、100重量份浓度为8mmol/L HEPES缓冲溶液搅拌混合20min,制得细胞储存介质。

[0050] 实施例2:本实施例提供一种细胞储存介质的制备方法,具体包括以下步骤:

[0051] 具体包括以下步骤:

[0052] S1. 羧基化海藻糖的制备:将0.3mol海藻糖、0.1mol乙二酸酐溶于200mL乙腈中,加

入0.5mol KOH,在80℃条件下搅拌反应12h,减压除去溶剂,乙醇和乙醚按照体积比1:3重结晶,制得羧基化海藻糖;

[0053] S2.脯氨酸-海藻糖的制备:将0.1mol步骤S1制得的羧基化海藻糖、0.22mol 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、0.22mol N-羧基琥珀酰亚胺溶于200mL水中,冰水浴搅拌活化30min,加入0.12mol脯氨酸,在45℃条件下搅拌反应20h,反应结束后,产物过滤,洗涤,干燥,制得脯氨酸-海藻糖;

[0054] S3.氯化海藻糖的制备:将0.15mol海藻糖溶于200mL二氯甲烷中,在冰水浴条件下加入0.1mol二氯亚砷,室温搅拌反应1h,减压除去溶剂,产物洗涤,干燥,制得氯化海藻糖;

[0055] S4.维生素C-海藻糖的制备:将0.1mol步骤S3制得的氯化海藻糖、0.12mol维生素C和0.5mol KOH加入200mL乙腈中,60℃反应4h,减压除去溶剂,产物用乙醚重结晶,制得维生素C-海藻糖;

[0056] S5.脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体的制备:将7重量份步骤S2制得的脯氨酸-海藻糖、5重量份步骤S4制得的维生素C-海藻糖、15重量份大豆卵磷脂、5重量份胆固醇溶于200重量份溶剂中,搅拌混合15min,减压至压强为100kPa,在60℃水浴中旋蒸挥干溶剂,然后加入浓度为12mmol/L HEPES缓冲溶液,加热至60℃,水合1h,1000W超声20min,用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤,制得脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体;

[0057] 所述溶剂为二氯甲烷和乙醇的按照体积比为5:1的混合溶剂;

[0058] S6.活性剂的制备:将5重量份甜菜碱、1重量份 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、0.3重量份亚精胺搅拌混合20min,制得活性剂;

[0059] S7.细胞储存介质的制备:将7重量份步骤S5制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、4重量份步骤S6制得的活性剂、10重量份海藻糖、5重量份甘油、120重量份浓度为12mmol/L HEPES缓冲溶液搅拌混合20min,制得细胞储存介质。

[0060] 实施例3:本实施例提供一种细胞储存介质的制备方法,具体包括以下步骤:

[0061] 具体包括以下步骤:

[0062] S1.羧基化海藻糖的制备:将0.25mol海藻糖、0.1mol乙二酸酐溶于200mL乙腈中,加入0.4mol三乙胺,在75℃条件下搅拌反应10h,减压除去溶剂,乙醇和乙醚按照体积比1:3重结晶,制得羧基化海藻糖;

[0063] S2.脯氨酸-海藻糖的制备:将0.1mol步骤S1制得的羧基化海藻糖、0.2mol 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、0.2mol N-羧基琥珀酰亚胺溶于200mL水中,冰水浴搅拌活化25min,加入0.11mol脯氨酸,在40℃条件下搅拌反应18h,反应结束后,产物过滤,洗涤,干燥,制得脯氨酸-海藻糖;

[0064] S3.氯化海藻糖的制备:将0.135mol海藻糖溶于200mL二氯甲烷中,在冰水浴条件下加入0.1mol二氯亚砷,室温搅拌反应1h,减压除去溶剂,产物洗涤,干燥,制得氯化海藻糖;

[0065] S4.维生素C-海藻糖的制备:将0.1mol步骤S3制得的氯化海藻糖、0.115mol维生素C和0.4mol三乙胺加入200mL乙腈中,55℃反应3h,减压除去溶剂,产物用乙醚重结晶,制得维生素C-海藻糖;

[0066] S5.脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体的制备:将6重量份步骤S2制得的脯氨酸-海藻糖、4重量份步骤S4制得的维生素C-海藻糖、13.5重量份大豆卵磷脂、4重量份

胆固醇溶于200重量份溶剂中,搅拌混合15min,减压至压强为95kPa,在55℃水浴中旋蒸挥干溶剂,然后加入浓度为10mmol/L HEPES缓冲溶液,加热至57℃,水合1h,900W超声15min,用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤,制得脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体;

[0067] 所述溶剂为二氯甲烷和乙醇的按照体积比为4:1的混合溶剂;

[0068] S6. 活性剂的制备:将4重量份甜菜碱、0.7重量份 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、0.2重量份亚精胺搅拌混合20min,制得活性剂;

[0069] S7. 细胞储存介质的制备:将6重量份步骤S5制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、3重量份步骤S6制得的活性剂、8.5重量份海藻糖、4重量份甘油、110重量份浓度为10mmol/L HEPES缓冲溶液搅拌混合20min,制得细胞储存介质。

[0070] 实施例4:与实施例3相比,不同之处在于,步骤S7中脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体的添加量为1重量份。

[0071] 实施例5:与实施例3相比,不同之处在于,步骤S7中脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体的添加量为12重量份。

[0072] 对比例1

[0073] 与实施例3相比,不同之处在于,步骤S5中未添加脯氨酸-海藻糖。

[0074] 具体如下:

[0075] S5. 维生素C-海藻糖脂质体的制备:将10重量份步骤S4制得的维生素C-海藻糖、13.5重量份大豆卵磷脂、4重量份胆固醇溶于200重量份溶剂中,搅拌混合15min,减压至压强为95kPa,在55℃水浴中旋蒸挥干溶剂,然后加入浓度为10mmol/L HEPES缓冲溶液,加热至57℃,水合1h,900W超声15min,用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤,制得维生素C-海藻糖脂质体;

[0076] 所述溶剂为二氯甲烷和乙醇的按照体积比为4:1的混合溶剂。

[0077] 对比例2

[0078] 与实施例3相比,不同之处在于,步骤S5中未添加维生素C-海藻糖。

[0079] 具体如下:

[0080] S5. 脯氨酸-海藻糖脂质体的制备:将10重量份步骤S2制得的脯氨酸-海藻糖、13.5重量份大豆卵磷脂、4重量份胆固醇溶于200重量份溶剂中,搅拌混合15min,减压至压强为95kPa,在55℃水浴中旋蒸挥干溶剂,然后加入浓度为10mmol/L HEPES缓冲溶液,加热至57℃,水合1h,900W超声15min,用0.22 $\mu$ m微孔滤膜过滤,制得脯氨酸-海藻糖脂质体;

[0081] 所述溶剂为二氯甲烷和乙醇的按照体积比为4:1的混合溶剂。

[0082] 对比例3

[0083] 与实施例3相比,不同之处在于,步骤S5中为脯氨酸-海藻糖和维生素C-海藻糖的混合,未进行脂质体包埋制备。

[0084] 具体如下:

[0085] S5. 脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合物的制备:将6重量份步骤S2制得的脯氨酸-海藻糖、4重量份步骤S4制得的维生素C-海藻糖混合均匀,制得脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合物;

[0086] 所述溶剂为二氯甲烷和乙醇的按照体积比为4:1的混合溶剂。

[0087] 对比例4

[0088] 与实施例3相比,不同之处在于,步骤S6中未添加甜菜碱。

[0089] 具体如下:

[0090] S6. 活性剂的制备: 将0.7重量份 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、0.2重量份亚精胺搅拌混合20min, 制得活性剂。

[0091] 对比例5

[0092] 与实施例3相比, 不同之处在于, 步骤S6中未添加 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸。

[0093] 具体如下:

[0094] S6. 活性剂的制备: 将4重量份甜菜碱、0.2重量份亚精胺搅拌混合20min, 制得活性剂。

[0095] 对比例6

[0096] 与实施例3相比, 不同之处在于, 步骤S6中未添加亚精胺。

[0097] 具体如下:

[0098] S6. 活性剂的制备: 将4重量份甜菜碱、0.7重量份 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸搅拌混合20min, 制得活性剂。

[0099] 对比例7

[0100] 与实施例3相比, 不同之处在于, 步骤S7中未添加活性剂。

[0101] 具体如下:

[0102] S7. 细胞储存介质的制备: 将6重量份步骤S5制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、8.5重量份海藻糖、4重量份甘油、110重量份浓度为10mmol/L HEPES缓冲溶液搅拌混合20min, 制得细胞储存介质。

[0103] 对比例8

[0104] 与实施例3相比, 不同之处在于, 步骤S7中未添加脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体。

[0105] 具体如下:

[0106] S7. 细胞储存介质的制备: 将3重量份步骤S6制得的活性剂、8.5重量份海藻糖、4重量份甘油、110重量份浓度为10mmol/L HEPES缓冲溶液搅拌混合20min, 制得细胞储存介质。

[0107] 对比例9

[0108] 与实施例3相比, 不同之处在于, 步骤S7中未添加海藻糖。

[0109] 具体如下:

[0110] S7. 细胞储存介质的制备: 将6重量份步骤S5制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、3重量份步骤S6制得的活性剂、4重量份甘油、110重量份浓度为10mmol/L HEPES缓冲溶液搅拌混合20min, 制得细胞储存介质。

[0111] 对比例10

[0112] 与实施例3相比, 不同之处在于, 步骤S7中未添加甘油。

[0113] 具体如下:

[0114] S7. 细胞储存介质的制备: 将6重量份步骤S5制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体、3重量份步骤S6制得的活性剂、8.5重量份海藻糖、110重量份浓度为10mmol/L HEPES缓冲溶液搅拌混合20min, 制得细胞储存介质。

[0115] 实施例6: 一种脂肪间充质干细胞的储存方法, 将猪脂肪间充质干细胞均匀分散在实施例1制得的细胞储存介质中, 细胞密度为 $2 \times 10^6$ 个/mL, 然后将混合液在3°C平衡50min,

以0.8℃/min的速度降至-78℃保存。

[0116] 实施例7:一种脂肪间充质干细胞的储存方法,将猪脂肪间充质干细胞均匀分散在实施例2制得的细胞储存介质中,细胞密度为 $10^7$ 个/mL,然后将混合液在5℃平衡70min,以1.2℃/min的速度降至-85℃保存。

[0117] 实施例8:一种脂肪间充质干细胞的储存方法,将猪脂肪间充质干细胞均匀分散在实施例3制得的细胞储存介质中,细胞密度为 $5 \times 10^6$ 个/mL,然后将混合液在4℃平衡60min,以1℃/min的速度降至-80℃保存。

[0118] 实施例9-10和对比例11-20与实施例8相比,不同之处在于,细胞储存介质分别由实施例4-5或对比例1-10制得的细胞储存介质替代。

[0119] 测试例1 细胞毒性测试

[0120] 用含有10%(v/v)胎牛血清、1%(v/v)双抗的DMEM复合培养基,在5%的CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养L929细胞。当细胞生长密度达到70%左右时,用胰蛋白酶消化L929细胞,将消化后的细胞种在96孔板( $1 \times 10^5$ /孔)中,各添加200μL的DMEM培养基,继续培养24h后,用移液枪去除96孔板中的培养基,实验组加入分别200μL实施例1-5和对比例1-10制得的细胞储存介质,继续培养24h,对照组为10mmol/L HEPES缓冲溶液。培养结束后,去除介质,在避光处向每孔中加入含有5mg/ml L-13-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐的10mmol/L HEPES缓冲溶液20μL,继续避光培养4h。之后去除缓冲液,每孔加入150μL DMSO,在37℃摇床中孵化30min后,使用酶标仪测定其在490nm处的吸光度。

[0121] 细胞存活率(%)=OD(样品组)/OD(对照组)×100%

[0122] 结果见表1。

[0123] 表1

组别	细胞存活率(%)
实施例 1	92.14
实施例 2	92.07
实施例 3	92.59
实施例 4	91.02
实施例 5	89.27
对比例 1	87.89
对比例 2	86.01
对比例 3	85.96
对比例 4	89.27
对比例 5	83.19
对比例 6	85.27
对比例 7	80.16
对比例 8	84.02
对比例 9	89.97
对比例 10	90.12

[0124] 由上表可知,加入本发明实施例1-3制得的细胞储存介质后,L929细胞存活率高于90%,对细胞几乎没有细胞毒性,具有较好的生物相容性。

[0126] 测试例2

[0127] 将猪脂肪间充质干细胞程序升温解冻后用 $\alpha$ -MEM完全培养液重悬细胞,在37°C和5%二氧化碳加湿培养箱中培养进行体外培养,待细胞密度为60-70%时,用PBS溶液冲洗细胞,接种到无血清培养基中,接种后细胞密度为 $2 \times 10^7$ 个/mL,培养36h后,收集细胞,获得猪脂肪间充质干细胞。

[0128] 将获得的猪脂肪间充质干细胞分别按照实施例6-10和对比例11-20中得到进行储存30天,然后将样品以2°C/min的速率升温至-20°C,放入0°C冰水混合物中解冻30min,在37°C恒温培养箱解冻1h,然后将样品浸入50mmol/L柠檬酸钠溶液中,轻轻摇动5min,离心收集细胞并用新鲜培养基重悬。

[0129] 细胞存活率测试:

[0130] 使用台盼蓝染色法评估细胞存活率。将细胞悬液用等体积的0.4%台盼蓝染色剂在室温下孵育2min。使用细胞计数器测试活细胞数量,并通过计算获得细胞存活率。

[0131] 细胞存活率(%)=活细胞数/总细胞数 $\times$ 100%。

[0132] 结果见表2。

[0133] 表2

组别	细胞存活率 (%)
实施例 6	94.52
实施例 7	94.77
实施例 8	95.06
实施例 9	88.11
实施例 10	90.02
对比例 11	83.92
对比例 12	85.74
对比例 13	74.59
对比例 14	80.11
对比例 15	84.58
对比例 16	86.02
对比例 17	78.57
对比例 18	64.59
对比例 19	66.28
对比例 20	72.24

[0134] 由上表可知,本发明实施例1-3制得的细胞储存介质能明显提高冻存细胞的存活率。

[0135] 细胞克隆率测试:

[0136] 将细胞接种至10cm细胞培养皿中,每皿接种200个细胞,每皿加入10mL培养基,缓慢晃动培养皿,使细胞均匀分布,将培养皿置于37°C和5%二氧化碳加湿培养箱中培养3周,取出,去培养基,杜氏磷酸盐缓冲液清洗3次,加入5mL甲醇固定15min,去固定液,加入1mL Giemsa染色1,混匀,1min后加入2mL Giemsa染色2,混匀后室温染色10min,流水洗去染色液,晾干,计数大于10个细胞的克隆数,计算克隆形成率。以未进行冻存的干细胞作为对照组。

[0137] 克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数) $\times$ 100%

[0139] 结果见表3。

[0140] 表3

组别	克隆形成率 (%)
对照组	90.17
实施例 6	86.54
实施例 7	87.02
实施例 8	87.75
实施例 9	83.45
实施例 10	84.08
对比例 11	82.01
[0141] 对比例 12	77.58
对比例 13	80.38
对比例 14	83.85
对比例 15	81.02
对比例 16	78.79
对比例 17	76.04
对比例 18	75.86
对比例 19	79.09
对比例 20	85.78

[0142] 由上表可知,采用本发明实施例1-3制得的细胞储存介质进行冻存,对干细胞的克隆形成率影响不大,不会明显减少克隆团的数量。

[0143] 实施例4、5与实施例3相比,步骤S7中脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体的添加量为1重量份或12重量份。冻存细胞存活率下降,克隆形成率下降。合适的浓度对于提高冻存细胞存活率和保持克隆性能具有明显的影响。

[0144] 对比例1、2与实施例3相比,步骤S5中未添加脯氨酸-海藻糖或维生素C-海藻糖。对比例3与实施例3相比,步骤S5中为脯氨酸-海藻糖和维生素C-海藻糖的混合,未进行脂质体包埋制备。对比例8与实施例3相比,步骤S7中未添加脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体。冻存细胞存活率下降,克隆形成率下降。本发明制备了一种脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体,能够促进海藻糖组分与细胞膜融合从而进入细胞膜内,保证在细胞膜两侧均含有一定浓度的海藻糖,起到了很好的保护作用;而脯氨酸对海藻糖的改性,能够起到减少细胞渗透压损伤的作用,还可以抑制冰的结晶,从而有效减少细胞冷冻保存过程中的渗透损伤和冰晶的机械损伤的效果。维生素C对海藻糖的改性,能够提高干细胞的干性、多能性、自我更新和分化能力,促进诱导多能干细胞的产生。同时,脂质体中磷脂及胆固醇的存在,对冻存后细胞膜的损伤也能够进行修复的作用。

[0145] 对比例4、5、6与实施例3相比,步骤S6中未添加甜菜碱、 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸或亚精胺。对比例7与实施例3相比,步骤S7中未添加活性剂。细胞毒性提高,冻存细胞存活率下降,克隆形成率下降。本发明活性剂包括甜菜碱、 $\beta$ -烟酰胺单核苷酸、亚精胺,其中, $\beta$ -烟酰胺单核苷酸是辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸( $NAD^+$ )的前体,能够适当延长脂肪间充质干细胞的寿命,具有抗衰老的作用。自噬是一个降解细胞中不需要的蛋白质的过程,是多能干细胞的产生所必需的,亚精胺是一种抗衰老自噬诱导剂,可以通过诱导自噬,降解细胞中不需要的蛋

白质,促进多能干细胞的产生。甜菜碱能够维持胚胎干细胞自我更新,多向分化的能力。本发明活性剂多种小分子的协同作用,起到维持细胞干性或促进细胞重编程的能力,同时,具有安全性高、成本低和效率高的优势,三者具有协同增效的作用。

[0146] 对比例9与实施例3相比,步骤S7中未添加海藻糖。冻存细胞存活率下降,克隆形成率下降。通过制得的脯氨酸-海藻糖/维生素C-海藻糖混合脂质体和海藻糖的协同作用,在较低的浓度下就能对脂肪间充质干细胞起到很好的低温保护作用,整个保存系统可以在相对较慢的冷却速率下形成玻璃化,从而避免“胞内冰损伤”、“溶质性损伤”和“细胞骨架系统损伤”等。

[0147] 对比例10与实施例3相比,步骤S7中未添加甘油。冻存细胞存活率下降。甘油可以与水分子紧密结合,降低体系的冰点,增加粘滞性,减小低温和深低温情况下形成的冰晶大小,从而起到了减少对细胞膜的机械损伤的效果。

[0148] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。