Loughborough University

This item was submitted to Loughborough's Research Repository by the author.
Items in Figshare are protected by copyright, with all rights reserved, unless otherwise indicated.

Adhesive bandage type artificial active tissue constructed by using culture solution without serum or bovine pituitary extracts and construction method of adhesive bandage type artificial active tissue

PLEASE CITE THE PUBLISHED VERSION

http://www.pss-system.gov.cn/sipopublicsearch/insearch/showViewList.shtml

PUBLISHER STATEMENT

This work is made available according to the conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) licence. Full details of this licence are available at: https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/

LICENCE

CC BY-NC-ND 4.0

REPOSITORY RECORD

Sun, Tao. 2016. “Adhesive Bandage Type Artificial Active Tissue Constructed by Using Culture Solution Without Serum or Bovine Pituitary Extracts and Construction Method of Adhesive Bandage Type Artificial Active Tissue”. figshare. https://hdl.handle.net/2134/22570.

为了方便贵公司的沟通，以使贵公司的专利申请尽早完成，烦请填写下表。

<table>
<tr><td colspan="4">专利申请技术交底书</td></tr>
<tr><td rowspan="9">发明人基本资料</td><td rowspan="3">第一发明人
(对本发明做出最大贡献的人)</td><td>姓　名</td><td>SUN Tao</td></tr>
<tr><td>电　话</td><td></td></tr>
<tr><td>电子信箱</td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="3">第二发明人(对本发明做出次要贡献的人)</td><td>姓　名</td><td></td></tr>
<tr><td>电　话</td><td></td></tr>
<tr><td>电子信箱</td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="3">其它发明人(对本发明做出次要贡献的人)</td><td>姓　名</td><td></td></tr>
<tr><td>电　话</td><td></td></tr>
<tr><td>其它联系方式</td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="12">申请人基本资料</td><td rowspan="4">第一申请人</td><td>名　称</td><td></td></tr>
<tr><td>地　址、电 话</td><td></td></tr>
<tr><td>邮　编</td><td></td></tr>
<tr><td>单位代码</td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="4">第二申请人
(如果仅有一个此项不填)</td><td>名　称</td><td></td></tr>
<tr><td>地　址、电 话</td><td></td></tr>
<tr><td>邮　编</td><td></td></tr>
<tr><td>单位代码</td><td></td></tr>
<tr><td rowspan="4">其它申请人(如果仅有二个此项不填)</td><td>名　称</td><td></td></tr>
<tr><td>地　址、电 话</td><td></td></tr>
<tr><td>邮　编</td><td></td></tr>
<tr><td>单位代码</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">贵方案号：</td><td>我方案号：</td></tr>
<tr><td colspan="4">以上资料在申请专利时具有重要意义，请详细填写。</td></tr>
</table>

上海浦一知识产权代理有限公司

一、发明名称

((简单、准确地表明发明创造专利申请请求保护的主题和类型，一般不得超过 25 个字))

一种用无血清和牛垂体提取物培养液构建的创口贴式人工活性组织及其构建方法

二、技术领域

(说明发明技术方案所属或直接应用的具体技术领域)

本发明涉及组织工程、医学创面修复技术和医药生物技术领域，具体涉及一种人工活性组织的构建方法，该方法将自体或供体细胞进行体外培养和扩增形成的人工活性组织构建在医用生物膜上，在构建过程中不添加任何哺乳动物来源的血清、脑垂体提取物、胶原以及异种细胞等非人源生物成分，因此避免了潜在的动物源性病原体感染和异种移植排斥反应，可明显提高人工活性组织的生物安全性和移植存活率。

三、背景技术

(写明对发明的理解、检索、审查有用的背景技术，并且引证反映这些背景技术的文件，客观地指出背景技术中存在的问题和缺点。)

皮肤是人体最大的器官，是与外界环境接触的屏障。皮肤由内至外主要有表皮、真皮和皮下组织构成，表皮和真皮之间含有基底膜，皮下组织含有丰富的血管和神经。日常生活工作中由于各种原因，如烧伤、创伤、慢性疾病、手术等很容易造成皮肤的缺损。皮肤组织虽然具有较强的再生能力，但在大面积全层皮肤缺损的情况下，皮肤的再生能力明显减弱，极易产生大量瘢痕和瘢痕挛缩。

目前，应对组织缺损的方式主要有四种：自体植皮、同种异体植皮、异种植皮、人工组织皮肤替代。自体植皮仍是临床治疗全层皮肤缺损最有效的方法，但该方法面临着自体皮供应不足的缺点，且是一种“以伤治伤”的方法。异体或异种植皮则受到免疫排斥的限制和感染供体病原体的潜在危险。人工组织皮肤替代是用组织工程方法体外培养组织替代物，然后应用于皮肤缺损处。最常见的体外培养组织替代物是胚胎或成人干细胞、分化的真皮成纤维细胞或/和表皮（角朊）细胞培养。通过体外培养细胞的倍增生长，可以形成组织替代物，原则上解决了皮源紧张的问题。然而目前构建人工组织需使用异种生物材料，是限制人工活性组织应用的一个重要因素。

人工活性组织构建体系中，细胞/组织培养液通常是在基础培养液中添加胎牛/小牛血清或/和脑垂体提取物等成分供给细胞生长所必需的营养。这些生物成分均属异种生物材料，存在传播人畜共患病毒、逆转录病毒、朊粒（引起疯牛病）和支原体等病原体的危险；另外异种生物材料能激发超敏反应，引起机体免疫病理损伤或组织排斥，不仅降低了人工活性组织的再生速度和存活率，甚至危及患者健康和生命，因此是影响人工活性组织的重要因素。若构建体系中剔除异种生物材料，则既可降低人工活性组织的构建成本，又提高了生物安全性，有利于促成人工活性组织的产业化生产和临床应用。

无血清细胞培养是体外构建活性细胞/组织替代物追求的方向之一。美国GIBICO公司研发了DK-SFM无血清培养液用于表皮细胞培养，然而仍需添加牛脑垂体提取物以促进原代和传代表皮细胞的增殖以及维持表皮细胞的逐渐分化。如果培养条件不变，添加成分中剔除脑垂体提取物，表皮细胞将停止增殖，逐渐脱落（Boyce and Ham, 1983; Wang, 1995）。从成本来看，脑垂体提取物价格昂贵；从疾病传播风险上看，脑部正是朊粒的发病部位，添加牛脑垂体提取物能否传播“疯牛病”，目前虽未见报道，但也不能排除其可能性。

另一种表皮细胞培养液，GREEN’S MEDIUM，无脑垂体提取物，但添加了胎牛血清以及多种维生素、氨基酸、嘌呤、生长因子、活性蛋白等物质。此培养液用于表皮细胞培养时，

同时需要射线照射的小鼠成纤维细胞（i3T3）作为饲养细胞，用以提供有丝分裂信号促使表皮细胞生长和维持表皮细胞精细分化（Rheinwald and Green，1975）。成纤维细胞和表皮细胞之间细胞-细胞和细胞-基质相互作用提供了一种组织样环境，这些相互作用促使细胞分泌胶原蛋白、粘多糖、网状纤维、弹性纤维、糖蛋白和各种细胞因子等，从而促进细胞增殖和分化，胞外基质发育和基底膜产生（Waelti et al., 1992; Dawson et al., 1996; Kim et al., 1999），形成人工活性组织。目前国外组织工程产品Myskin、Epicel即采用此项技术，通过射线照射限制i3T3分裂繁殖，但促进表皮细胞生长，形成以表皮细胞为主的人工活性组织。不过此类产品中仍不可避免含有痕量i3T3，在构建活性组织过程中也会产生一些对人体不利的代谢产物和抗原，可引起移植后的免疫排斥反应（Meyer AA, 1988）。改进的组织工程技术，采用人成纤维细胞作为饲养细胞，细胞来源于自体或异体（例如新生儿包皮），技术上解决了异种细胞的排斥问题，同时形成模拟皮肤结构的真皮-表皮细胞双层人工活性组织，其临床应用效果更佳（Gallico et al., 1984; MacNeil 2007）。国外产品Apligraf、OrCel和国内的艾尔肤均用此方法构建双层人工活性组织，但仍未解决培养体系中的胎牛血清问题。

人工活性组织商品，除了具有成纤维细胞和表皮细胞外，还用医用薄膜或三维网状材料作为类似皮肤胞外基质的支架，使成纤维细胞和表皮细胞附着在支架上生长。目前产品常用的支架材料有脱细胞真皮、胶原海绵膜、透明质酸膜和聚乳酸/聚羟基乙酸等。脱细胞真皮和和胶原海绵膜主要成分是胶原，目前产品多用与人胶原类似的牛、猪 I 型和 VII 型胶原作为支架供体，而供体和人胶原成分的差异，使受体仍会激发一定的免疫排斥反应。产品 Apligraf、OrCel 和艾尔肤均不适用于对牛、猪胶原敏感的患者。采用透明质酸膜和聚乳酸/聚羟基乙酸等医用可降解生物材料作为支架贴合伤口，在 1～2 月内逐渐降解，会使伤口局部微环境酸化，不利于活性组织的存活和生长。支架的厚度和孔径也存在一定的问题，常规介于 0.3~2.0 mm, 孔径大小不一。由于支架直接贴合创面，支架太厚或孔径极细，支架上的活细胞难以迅速归巢到创面而形成种子细胞，产生有利于促进伤口愈合的糖、蛋白因子。人工活性组织若在移植早期，不迅速贴合创面和接触伤口组织血供，常因血供差，活细胞营养供应不足，导致细胞增殖缓慢，甚至死亡脱落，影响皮肤的再生。另一方面，支架材料位于创面，表皮细胞位于外侧，需要形成 10~15 层细胞的角质层，才能构成皮肤屏障。若对自体皮移植来说，从自体皮肤分离表皮细胞，直至角化形成，一般需 15～20 天，从产品的时效性来说还不够。因此，如何快速产生能够应用的产品，也是组织工程技术需要考虑的问题。

Boyce S, Ham RG (1983) Calcium-regulated differentiation of normal epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. J Invest Dermatol 81:33–8.

Dawson RA, Goberdhan NJ, Freedlander E, MacNeil S (1996) Influence of extracellular matrix proteins on human keratinocyte attachment, proliferation and transfer to a dermal wound model. Burns 22: 93–100.

Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde Q, Green H (1984) Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. New Eng J Med 311: 448–451.

Kim BM, Suzuki S, Nishimura Y, Um SC, Morota K, et al. (1999) Cellular artificial skin substitute by short period simultaneous culture of fibroblasts and keratinocytes. British Journal of Plastic Surgery 52: 573–578.

MacNeil S (2007) Progress and Opportunities in Tissue Engineering of Skin. Nature 445: 874–880.

Meyer AA, Manktelow A,Johson M,et al.(1988) Anotomy response to proteins in burn patients. J Trauma 23(7):1054-1064.

Rheinwald JG, Green H (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 6: 331–344.

Waelti ER, Inaebnit SP, Rast HP, Hunziker T, Limat A, et al. (1992) Co-culture of human keratinocytes on post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells: Production of large amounts of interleukin 6. J Invest Dermatol 98: 805–808.

Wang HJ. (1995) Human keratinocyte culture using porcine pituitary extract in serum-free medium. Burns 21:503–506.

四、发明内容：

1、要解决的技术问题(针对现有技术存在的技术问题，提出本发明要解决的技术问题。)

本发明的目的是提供一种快速构建生物安全的人工组织方法，发明涉及：

1）改良细胞培养液，建立了无血清和无牛脑垂体提取物的人工组织培养液, 培养液中的添加成分均为人源或重组活性物质，避免了潜在的动物源性疾病和异种移植排斥反应，确保人工组织的生物安全性。

2）摒弃常规应用的生物支架，对生物医用膜技术处理，将医用生物膜作为细胞培养和移植载体，人源成纤维细胞和表皮细胞在膜表面快速增殖，表皮细胞无需角化，4～7 天即可形成可应用的人工活性组织。使用时医用生物膜非侵入伤口位于外侧，培养扩增后的人工活性组织贴合于创面，通过与创面直接接触，一方面人工组织上的活细胞迅速归巢到创面，接触创面血供，细胞增殖和产生促进伤口愈合的胶原、粘蛋白、生长因子和细胞因子等；另一方面医用生物膜位于最外侧，形成隔离屏障，保护创面，预防伤口感染。医用生物膜的大小，透气透水特性，柔韧性和强度皆可依临床需要进行调整。

2、技术方案 清楚、完整地写明技术方案，包括解决本发明要解决的技术问题的全部必要技术特征。化合物发明需完整确切地定义化合物，提供化合物的化学名称、化学式、物理化学或生物化学特性参数及化合物的制备方法和用途；（药物）组合物发明需写明各组分及其含量和制备方法及用途；生物基因发明需提供基因的序列及制备方法和用途；方法发明写明该方法的原料物质（说明其成分、性能、制备方法或来源）、工艺步骤、工艺条件（温度、时间、压力等）

本发明是一种生物安全的人体活性细胞/组织的构建方法，发明体现在医用生物膜的处理，细胞培养液和人工组织培养液的改良；人体组织的酶解和细胞的分离；以及人工活性组织的构建。

医用生物膜处理

医用生物膜的处理：医用生物膜首先灭菌处理， 然后用氧气离子体进行 3 秒～1 小时的处理，处理后的医用生物膜经清洗后可用于细胞的培养和扩增。

1）膜材料

各种来源的医用生物膜，使用但不限于胶原、透明质酸膜、壳聚糖和聚乳酸、聚羟基乙酸聚丙烯、聚氯乙烯、聚四氟乙烯、聚酰亚胺、聚酯、环氧树脂等高聚物医用生物材料。医用生物膜使用但不限于有孔或无孔、棉质或非棉质、可降解或不可降解、薄膜或网状等。其大小可根据临床需要任意裁剪。

2）膜处理

将一定大小的医用膜，消毒处理，并置于组织细胞培养器皿中，固定住，置于等离子清洗机（plasma cleaner）处理 3 秒钟到 1 小时，可用于人工组织培养。

细胞培养液和人工组织培养液的改良

根据伤口愈合的实际需求，本方法用于不同人体细胞（例如：人成纤维细胞，表皮细胞的培养）用于建立人工组织的细胞或者组织。培养液完全摒弃胎牛血清，不添加牛脑垂体提取物，生产具有生物安全的人工组织，培养液具体配方如下：

细胞培养液 A:其组分按 500ml 体积计包括，商用培养基 DMEM 500ml, 青霉素、链霉素双抗 1～5000 IU/ml;

细胞培养液 B:其组分按 500ml 体积计包括，商用培养基 DMEM 385ml, 商用培养基 HAM F-12 105ml, 青霉素、链霉素双抗 1～5000 IU/ml; 两性霉素 B 0.5~6000 ng/ml; 腺嘌呤 0.06~370 ng/ml; 胰岛素 0.02～530 ug/ml; 氢化可的松 0.05～490 ug/ml；三碘甲腺原氨酸 0.03～280 ng/ml；转铁蛋白 0.07～460 ug/ml。

细胞的分离（以成纤维细胞和表皮细胞的分离为例）

1）取材

人成纤维细胞和表皮细胞可源自多种组织，包括但不限于男性新生儿包皮、真皮、腱、肺、脐带、软骨、尿道、角膜基质、口腔粘膜和肠。细胞供体可在发育和年龄方面不同，细胞可来源于胚胎、新生儿或者更年长个人，包括成人的供体组织、胚胎祖细胞，例如间充质干细胞，可用于本发明并诱导分化，发育为期望的组织。成纤维细胞优选男性新生儿包皮和自体皮；人表皮细胞可选自体皮或者异体皮。

2）酶解消化表皮细胞和成纤维细胞

人体组织皮肤去除皮下脂肪组织、筋膜及毛细血管，用 0.05%胰蛋白酶中 4℃消化 4～24 小时，镊子剥离表皮和真皮，表皮经揉捏、离心分离获得表皮细胞；真皮切碎，继续用 0.1%的胶原酶，37℃消化 2～24 小时，离心分离，收集沉淀培养约两周，获得原代成纤维细胞。

成纤维细胞原代和传代培养

将真皮沉淀用少量细胞培养液 A 悬浮， 37℃，5%CO_2, 100%相对湿度的培养箱中培养，3～4 天换液，约两周可获得一定密度原代成纤维细胞。用 0.25%胰酶消化，37℃，5 分钟消化后，离心收集细胞，再次悬浮，以 5×10^3～$5\times10^5/cm^2$ 密度接种，继续培养，使细胞达到一定密度，则为传代成纤维细胞。

建立活性人工组织

1）建立含有成纤维细胞的真皮组织

传代培养的成纤维细胞，用细胞培养液 A 制成单细胞悬液，按 5×10^3～$5\times10^5/cm^2$ 接种于有医用生物膜的细胞培养器皿中，37℃，5%CO_2, 100%相对湿度的培养箱中培养 2～7 天。

2）建立含有表皮细胞的皮肤组织

将新鲜分离表皮细胞，用细胞培养液 B 制成单细胞悬液，按 5×10^3～$5\times10^5/cm^2$ 接种到含成纤维细胞真皮层的医用生物膜上。37℃，5%CO_2, 100%相对湿度的培养箱中培养 24 小时，更换新鲜细胞培养液，培养 2～7 天。

在医用生物膜上建立活性人工组织后，可将医用生物膜的细胞面贴合于伤口，促进伤口愈合，例如包括手术创伤或烧伤在内的急性创伤，或者如静脉溃疡、糖尿病溃疡或褥疮的慢性创伤可得益于使用本发明的构建物而治愈。其它如先天性皮肤病，大疱性表皮松懈也可得益。本发明的构建方法可适用于产生角膜、活性重组蛋白和用于化妆品检测的皮肤结构。

3、有益效果

（清楚、客观地写明发明与现有技术相比所具有的有益效果。）

本发明建立一种生物安全的人工活性组织的制备方法，摒弃了异源生物材料，使用无血清、无脑垂体提取物培养液、无鼠源细胞，培养液中的添加成分均为人源或重组活性物质，确保培养体系的生物安全性和解决了异种排斥问题。该培养液成本低，安全性高，稳定性好，保质期长；培养液配制方法简便，利于企业化生产和商品化。

本发明将人工活性组织构建在医用生物膜上，类似于“创口贴”，细胞贴合创面而医用生物膜不侵入伤口。活性细胞直接与伤口粘合，接触伤口血供，使细胞获得营养，迅速归巢到伤口，有利于皮肤的再生。医用生物膜可有效的保护创面，预防和治疗皮肤愈合过程中的感染问题，且从创面揭下无伤痛；可根据治疗需要，剪裁大小，选择合适材料的医用生物膜、孔径和对膜改性，改变膜的透水透气性、柔韧性和强度等。

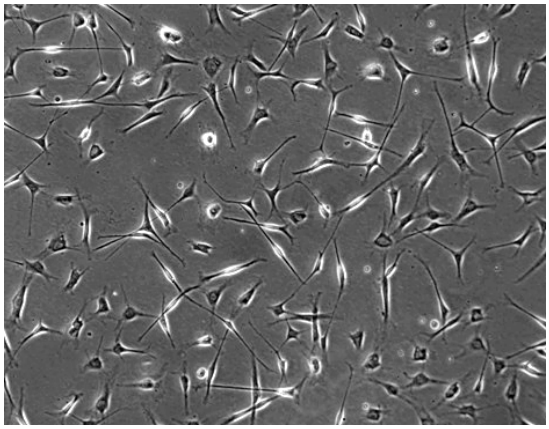
本发明制备工艺简单、快速，确保成纤维细胞和表皮细胞快速增殖，同时保证表皮细胞的精细分化，4～7 天即可获得具有活性细胞的人工组织。获得的人工组织中的成纤维细胞和表皮细胞活性强，归巢迅速，能很快在伤口重建皮肤结构，形成种子效应，产生促进伤口愈合的因子，利于皮肤再生。

本发明可用于浅 II、深 II 和浅 III 度的各种创伤，例如包括手术创伤或烧伤在内的急性创伤，或者如静脉溃疡、糖尿病溃疡或褥疮的慢性创伤，以及供皮区创面、网状植皮创面、烧伤后期残余创面等，可得益于使用本发明的构建物而治愈。其它如先天性皮肤病，大疱性表皮松懈也可得益。本发明的构建方法可适用于产生角膜、活性重组蛋白、和用于化妆品检测的皮肤结构。

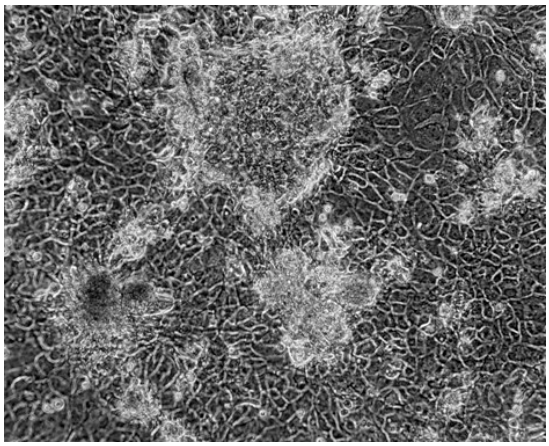
五、附图及附图说明

（提供能反映本发明技术方案的必要附图，如实验效果对比图，必要时也可提供有关现有技术附图。）

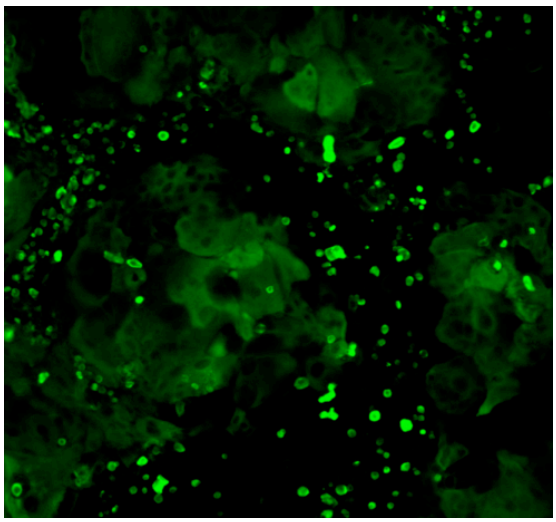
附图一：成纤维细胞在医用生物膜上的生长



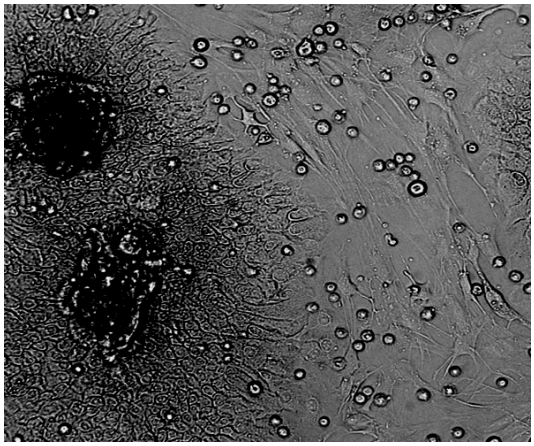
附图二：表皮细胞在医用生物膜上的生长



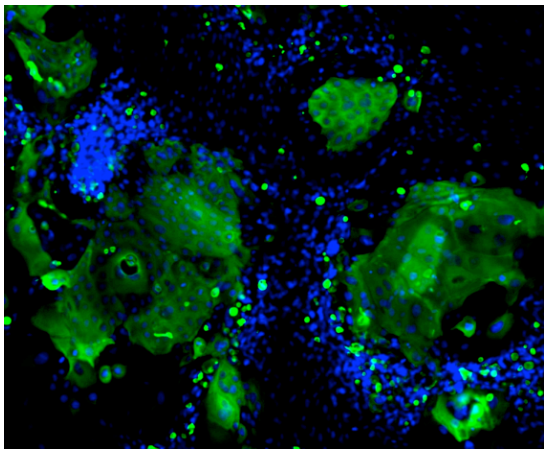
附图三：表皮细胞（绿色荧光）在医用生物膜上的生长



附图四：表皮细胞和成纤维细胞在医用生物膜上的生长



附图五：表皮细胞（绿色和蓝色荧光重叠处）和成纤维细胞（蓝色荧光）在医用生物膜上的生长



六、具体实施方式

(详细描述申请人认为实现发明优选的具体实施方式，适当情况下，应当举例说明，实施例至少包括制备实施例，最好提供用途或使用效果的实验数据；对于药物发明，还应提供其医药用途或药理作用，同时应提供其有效量及使用方法。实施例应至少公开权利要求中所述范围的上限、下限和中间一点。有附图的，应当结合附图具体描述，应当体现申请中解决技术问题所采用的技术方案，并对技术方案中的技术特征给予详细说明，使本领域的技术人员按照所描述的内容能够重现发明或实用新型，不必再花费创造性劳动。)

本发明是一种生物安全的活性人工组织的构建方法，包括人体组织中分离成纤维细胞和表皮细胞，成纤维细胞原代和传代培养，成纤维细胞和表皮细胞构建在医用生物膜上，相应细胞培养液的配制，具体步骤包括：

实施 1 细胞培养液配制

细胞培养液 A (人工组织成纤维细胞培养液)：其组分按 500ml 体积计包括，商用培养基 DMEM 500ml, 青霉素、链霉素双抗 1～5000 IU/ml;

细胞培养液 B (人工组织成纤维细胞和表皮细胞培养液): 其组分按 500ml 体积计包括，商用培养基 DMEM 385ml, 商用培养基 HAM F-12 105ml, 青霉素、链霉素双抗 1～5000 IU/ml;

两性霉素 B 0.5~6000 ng/ml; 腺嘌呤 0.06~370 ng/ml; 胰岛素 0.02～530 ug/ml; 氢化可的松 0.05～490 ug/ml；三碘甲腺原氨酸 0.03～280 ng/ml；转铁蛋白 0.07～460 ug/ml。

以上培养液 DMEM、HAM F-12 均按配方加入相应体积液体，青霉素、链霉素双抗、两性霉素 B、腺嘌呤、胰岛素、氢化可的松、三碘甲腺原氨酸、转铁蛋白配成一定浓度的母液，按配方浓度加入相应体积液体，调 pH7.2~7.4, 终体积 500 ml，用 0.2 um 无菌滤膜过滤，分装使用。

实施 2

真皮成纤维细胞分离与培养

1）取材：

人成纤维细胞可源自多种组织，包括但不限于男性新生儿包皮、真皮、腱、肺、脐带、软骨、尿道、角膜基质、口腔粘膜和肠。细胞供体可在发育和年龄方面不同，细胞可来源于胚胎、新生儿或者更年长个人，包括成人的供体组织、胚胎祖细胞，例如间充质干细胞，可用于本发明并诱导分化，发育为期望的组织。成纤维细胞优选男性新生儿包皮和自体皮。

经手术分离的以上皮源，置入无菌生理盐水中，送入细胞培养室。

2）消化

用剪刀仔细去除皮下脂肪组织、筋膜及毛细血管，用磷酸盐缓冲盐水（1×PBS）漂洗两次，剪成约 0.5cm 条状，浸于 0.05%胰蛋白酶中 4℃过夜。消化 4～24 小时后，将皮肤倒入无菌平皿，观察皮肤降解情况，用镊子剥离表皮和真皮，刀片刮拭真皮正面和背面。1×PBS 漂洗三次。将真皮切碎，移入含 0.1%的胶原酶的无菌平皿中，37℃消化 2～24 小时， 2000 rpm/min 离心 5 分钟，弃去上清，收集沉淀。

3）原代培养

将沉淀用少量细胞培养液 A 悬浮，放入细胞培养瓶中。37℃，5%CO_2, 100%相对湿度的培养箱中培养，一周后观察是否有成纤维细胞游离，若有成纤维细胞，3～4 天换液，使细胞达到一定密度。

4）传代培养

当细胞培养密度达到 60～100%时，经 1×PBS 漂洗三次，0.25%胰酶消化，37℃，1～5 分钟。加入细胞培养液 A 终止消化，移入离心管中，1500 rpm/min 离心 5 分钟，弃去上清液，加入 10ml 细胞培养液 A 培养液，混匀，台盼蓝染色计数。计数后制成单细胞悬液，按 5×10^3～$5\times10^5/cm^2$ 接种于细胞培养瓶中。3～4 天换液，直到细胞培养密度达到 60～100%时，再传代培养。

实施 3

表皮细胞的分离

1）取材：

人表皮细胞可源自多种组织，包括但不限于男性新生儿包皮、真皮、腱、肺、脐带、软骨、尿道、角膜基质、口腔粘膜和肠。细胞供体可在发育和年龄方面不同，细胞可来源于胚胎、新生儿或者更年长个人，包括成人的供体组织、胚胎祖细胞，例如间充质干细胞，可用于本发明并诱导分化，发育为期望的组织。人表皮细胞可选自体皮或者异体皮。

经手术分离的以上皮源，置入无菌生理盐水中，送入细胞培养室。

2）消化

用剪刀仔细剪去皮下脂肪组织、筋膜及毛细血管，用 1×PBS 漂洗两次，剪成约 0.5cm 条状，浸于 0.05%胰蛋白酶中 4℃过夜。

3）分离表皮细胞

消化 4～24 小时后，将皮肤倒入无菌平皿中，观察皮肤降解情况，将皮肤移入无菌平皿中，用镊子剥离表皮和真皮，刀片刮拭表皮背面和真皮正面，反复用镊子揉捏表皮，经 200 目不绣钢滤网过滤，收集滤液，2000 rpm/min 离心 10 分钟，加入细胞培养液 B 10 ml, 混匀，台盼蓝染色计数，细胞活力大于 85%。分离的细胞用于构建人工活性组织。

实施 4

人工活性组织构建

1）膜材料

各种来源的医用生物膜，使用但不限于胶原、透明质酸膜、壳聚糖或聚乳酸、聚羟基乙酸、聚丙烯、聚氯乙烯、聚四氟乙烯、聚酰亚胺、聚酯、环氧树脂等高聚生物医药材料等。医用生物膜使用但不限于有孔或无孔、棉质或非棉质、可降解或不可降解、薄膜或网状等。大小可依临床需要剪裁。

2）膜处理

将一定大小的医用膜，灭菌处理，使用时，置于细胞培养皿中，固定住，置于等离子清洗机槽内，关闭清洗机封门，真空状态处理 3 秒～1 小时，待压力平衡，打开封门，取出细胞培养皿。

3）建立含成纤维细胞的真皮组织

将传代培养的成纤维细胞，经 1×PBS 漂洗三次，0.25%胰酶消化，37℃，5 分钟。终止消化，移入离心管中，1500 rpm/min 离心 5 分钟，弃去上清液，加入 10ml 细胞培养液 A，混匀，台盼蓝染色计数。计数后制成单细胞悬液，按 5×10^3～$5\times10^5/cm^2$ 接种于含医用生物膜的细胞培养皿中，37℃，5%CO_2, 100%相对湿度的培养箱中培养 2～7 天, 形成具有成纤维细胞的真皮组织，此人工组织可应用于皮肤损伤的烧伤或糖尿病足溃疡、小腿静脉溃疡病人。

4）建立含表皮细胞的皮肤组织

将新鲜分离，具有 85%以上活性的表皮细胞，用细胞培养液 B 悬浮，接种到含成纤维细胞的医用生物膜上，接种细胞密度为 5×10^3～$5\times10^5/cm^2$。37℃，5%CO_2, 100%相对湿度的培养箱中培养 24 小时，更换新鲜细胞培养液 B，继续培养 2～7 天，形成含表皮细胞的皮肤组织，此人工组织可应用于全层皮肤损伤的烧伤或糖尿病足溃疡、小腿静脉溃疡病人。

以上所述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行描述，并非对本发明的范围进行限定，在不脱离本发明设计精神的前提下，对本发明的细胞培养液和技术方案作出的各种变形和改进，均应落入本发明的权利要求书确定的保护范围内。

七、权利要求书

(申请人通过本发明想要保护的内容，即本发明与现有技术相比的区别技术特征，也就是本发明的发明点)

1. 本发明涉及组织工程、医学创面修复技术和医药生物技术领域，具体涉及一种人工活性组织的构建方法，此方法首先将医用生物膜进行处理，作为细胞扩增和移植的载体，本方法中使用的细胞/组织培养液中不添加任何哺乳动物来源的血清、脑垂体提取物以及异种细胞，培养液中的添加成分均为人源或重组活性物质，避免了潜在的动物源性疾病和异种移植排斥反应。构建在医用生物膜的人工活性组织中的活细胞均为人源，可降低异种排斥，明显提高了人工组织的生物安全性和移植存活率。

2. 根据权利要求 1，涉及一种无胎牛血清，无脑垂体提取物的细胞培养液，其含有以下成分：商用培养基 DMEM 385 ml, 商用培养基 HAM F-12 105 ml, 青霉素、链霉素双抗 1～5000 IU/ml; 两性霉素 B 0.5~6000 ng/ml; 腺嘌呤 0.06~370 ng/ml; 胰岛素 0.02～530 ug/ml; 氢化可的松 0.05～490 ug/ml；三碘甲腺原氨酸 0.03～280 ng/ml；转铁蛋白 0.07～460 ug/ml。

3. 根据权利要求 1，涉及一种将一或两种人体细胞（例如成纤维细胞或/和表皮细胞）的人工活性组织构建在医用生物膜上。

4. 根据权利要求 3，成纤维细胞优选男性新生儿包皮和自体皮中成纤维细胞，包括但不限于干细胞, 皮肤或口腔来源的成纤维细胞、皮肤毛乳头细胞、软骨细胞、成骨细胞、内皮细胞、星形胶质细胞、角膜细胞以及基因工程改造的上述细胞。

5. 根据权利要求 3，表皮细胞优选皮肤或口腔粘膜来源的自体表皮细胞，包括但不限于成人皮肤干细胞、胚胎干细胞、黑色素细胞、角膜上皮细胞、角膜干细胞、肠粘膜表皮细胞、尿道上皮细胞、膀胱上皮细胞、神经胶质细胞、神经细胞、肝细胞和表皮细胞以及基因工程改造的上述细胞。

6. 根据权利要求 3，医用生物膜使用但不限于胶原、透明质酸膜、壳聚糖或聚乳酸、聚羟基乙酸、聚丙烯、聚氯乙烯、聚四氟乙烯、聚酰亚胺、聚酯、环氧树脂等高聚生物医用材料。

7. 根据权利要求 6，医用生物膜使用但不限于有孔或无孔、棉质或非棉质、可降解或不可降解、薄膜或网状。

8. 根据权利要求 2 和 3，所配制的细胞培养液和人工活性组织构建方法，可用于企业化生产和产生相应的人工活性组织商品。

