



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116407562 A

(43) 申请公布日 2023.07.11

(21) 申请号 202310393399.3

(22) 申请日 2023.04.13

(71) 申请人 安徽科门生物科技有限公司

地址 230000 安徽省合肥市高新区望江西路5089号中国科学技术大学先进技术研究院研发楼103-B4室

(72) 发明人 张正亮

(74) 专利代理机构 合肥正则元起专利代理事务所(普通合伙) 34160

专利代理师 朱明里

(51) Int. Cl.

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/51 (2015.01)

A61P 11/00 (2006.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用

(57) 摘要

本发明公开了本发明的目的可以通过以下技术方案实现:脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用,包括以下步骤:取胎儿娩出后结扎的脐带或胎盘或脐血,置于二氧化碳恒温恒湿培养箱培养,并通过细胞培养监测系统对其进行实时监测;消化收获,得到P0代细胞,之后进行消化、传代,得到间充质干细胞;本发明将细胞培养监测系统应用到脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺中,可以对培养的脐带或胎盘或脐血细胞进行均匀度和平整度实时监测,保证其细胞培养质量,从而获取得到高质量的间充质干细胞,进而提高对慢阻肺治疗效果。

制备脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞



间充质干细胞治疗慢阻肺应用实验

1. 脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用,其特征在於,包括以下步骤:  
取胎儿娩出后结扎的脐带或胎盘或脐血,置于二氧化碳恒温恒湿培养箱培养,并通过细胞培养监测系统对其进行实时监测;消化收获,得到P0代细胞,之后进行消化、传代,得到间充质干细胞;

其中,监测过程如下:

通过图像采集模块采集细胞片层的生长状态;

步骤1:获取到采集模块的细胞片层面积 $S_x$ 和细胞片层厚度 $H_x$ ,并对细胞片层的均匀度和平整度进行监测判断;

步骤2:先对培养皿中出现调节信号的采集区域,判断是否需要合并;再判断是否对培养箱振荡频率进行调节;

步骤3:获取到调节模块的调节后振荡频率值 $P_t$ ,并发送给培养箱控制器,按照调节后振荡频率进行工作。

2. 根据权利要求1所述的脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用,其特征在於,在步骤1中,

获取到每个采集区域的细胞片层面积 $S_x$ ,以及细胞片层的位置 $L_z$ ;

利用公式 $ZJ = a_1 * S_x + a_2 * L_z$ ,计算得到该采集区域的细胞片层均匀度值 $ZJ$ ,其中, $a_1$ 、 $a_2$ 均为比例系数;

获取到每个采集区域的细胞片层厚度 $H_x$ ,以及细胞片层的位置 $L_z$ ;

利用公式 $ZP = b_1 * H_x + b_2 * L_z$ ,计算得到该采集区域的细胞片层平整度 $ZP$ ,其中, $b_1$ 、 $b_2$ 均为比例系数。

3. 根据权利要求2所述的脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用,其特征在於,步骤1还包括:

将得到细胞片层均匀度值 $ZJ$ 和细胞片层平整度 $ZP$ 代入到公式 $XJ = (c_1 * ZJ + c_2 * ZP) / (c_1 + c_2)$ 中,计算得到培养监测系数 $XJ$ ;其中, $c_1$ 、 $c_2$ 均为比例系数。

4. 根据权利要求3所述的脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用,其特征在於,

将得到的培养监测系数 $XJ$ 与监测系数阈值进行比较;

大于,则生成培养合格信号;

小于,则生成调节信号。

5. 根据权利要求4所述的脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用,其特征在於,细胞片层的位置 $L_z$ 为细胞片层中心点与采集区域中心点的距离值。

6. 根据权利要求5所述的脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用,其特征在於,在步骤2中,

获取到生成调节信号的采集区域的培养监测系数 $XJ$ ,以及与其相邻的采集区域的培养监测系数 $XJ$ ,进行差值计算,得到培养监测系数差值 $CXJ$ ;

将得到的培养监测系数差值 $CXJ$ 与培养监测系数差阈值进行比较;

若培养监测系数差值 $CXJ$ 大于培养监测系数差阈值,则将生成调节信号的采集区域与相邻的采集区域不合并;

若培养监测系数差值 $CXJ$ 小于培养监测系数差阈值,则将生成调节信号的采集区域与

相邻的采集区域合并,从而得到合并区域。

7.根据权利要求6所述的脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用,其特征在于,步骤2还包括:

获取到第一调节子模块的合并区域的面积和培养监测系数,并分别标记为合并面积SH和合并培养监测系数SXJ;

步骤2:将得到合并面积SH和合并培养监测系数SXJ,代入到公式 $X_b = \{(d_1 * |SH - SH_B| + d_2 * |SXJ - SXJ_B|)\} / (d_1 + d_2)$ 中,计算得到补偿系数 $X_b$ ;

其中, $d_1$ 、 $d_2$ 均为比例系数, $SH_B$ 表示为合并后标准面积, $SXJ_B$ 表示为合并后培养监测系数;

将得到的补偿系数 $X_b$ ,代入到公式 $P_t = (1 + X_b) * P_x$ 中,计算得到调节后振荡频率值 $P_t$ ;其中, $P_x$ 为现有培养箱振动频率。

## 脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及干细胞技术领域,具体涉及脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用。

### 背景技术

[0002] 中国专利CN104666347A公开了IFN- $\gamma$  预处理的脐带间充质干细胞在肺间质纤维化治疗中的应用,采用IFN- $\gamma$  预处理的间充质干细胞治疗小鼠肺间质纤维化,可明显提高小鼠成活率,减轻BLM诱导的肺纤维化肺部病变,明显降低小鼠肺组织病理学评分,在制备治疗肺间质纤维化的药品中将有广阔的应用前景;

[0003] 现有技术中,间充质干细胞治疗慢阻肺应用中,其对间充质干细胞进行细胞培养过程中,达不到对培养的脐带或胎盘或脐血细胞进行均匀度和平整度实时监测,使得培养得到的细胞质量不高等问题。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的就在于解决上述背景技术的问题,而提出脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用。

[0005] 本发明的目的可以通过以下技术方案实现:

[0006] 脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用,包括以下步骤:

[0007] 取胎儿娩出后结扎的脐带或胎盘或脐血,置于二氧化碳恒温恒湿培养箱培养,并通过细胞培养监测系统对其进行实时监测;消化收获,得到P0代细胞,之后进行消化、传代,得到间充质干细胞;

[0008] 其中,监测过程如下:

[0009] 通过图像采集模块采集细胞片层的生长状态;

[0010] 步骤1:获取到采集模块的细胞片层面积 $S_x$ 和细胞片层厚度 $H_x$ ,并对细胞片层的均匀度和平整度进行监测判断;

[0011] 步骤2:先对培养皿中出现调节信号的采集区域,判断是否需要合并;再判断是否对培养箱振荡频率进行调节;

[0012] 步骤3:获取到调节模块的调节后振荡频率值 $P_t$ ,并发送给培养箱控制器,按照调节后振荡频率进行工作。

[0013] 作为本发明进一步的方案:在步骤1中,

[0014] 获取到每个采集区域的细胞片层面积 $S_x$ ,以及细胞片层的位置 $L_z$ ;

[0015] 利用公式 $ZJ = a_1 * S_x + a_2 * L_z$ ,计算得到该采集区域的细胞片层均匀度值 $ZJ$ ,其中, $a_1$ 、 $a_2$ 均为比例系数;

[0016] 获取到每个采集区域的细胞片层厚度 $H_x$ ,以及细胞片层的位置 $L_z$ ;

[0017] 利用公式 $ZP = b_1 * H_x + b_2 * L_z$ ,计算得到该采集区域的细胞片层平整度 $ZP$ ,其中, $b_1$ 、 $b_2$ 均为比例系数。

- [0018] 作为本发明进一步的方案:步骤1还包括:
- [0019] 将得到细胞片层均匀度值ZJ和细胞片层平整度ZP代入到公式 $XJ = (c1 * ZJ + c2 * ZP) / (c1 + c2)$ 中,计算得到培养监测系数XJ;其中,c1、c2均为比例系数。
- [0020] 作为本发明进一步的方案:
- [0021] 将得到的培养监测系数XJ与监测系数阈值进行比较;
- [0022] 大于,则生成培养合格信号;
- [0023] 小于,则生成调节信号。
- [0024] 作为本发明进一步的方案:细胞片层的位置Lz为细胞片层中心点与采集区域中心点的距离值。
- [0025] 作为本发明进一步的方案:在步骤2中,
- [0026] 获取到生成调节信号的采集区域的培养监测系数XJ,以及与其相邻的采集区域的培养监测系数XJ,进行差值计算,得到培养监测系数差值CXJ;
- [0027] 将得到的培养监测系数差值CXJ与培养监测系数差阈值进行比较;
- [0028] 若培养监测系数差值CXJ大于培养监测系数差阈值,则将生成调节信号的采集区域与相邻的采集区域不合并;
- [0029] 若培养监测系数差值CXJ小于培养监测系数差阈值,则将生成调节信号的采集区域与相邻的采集区域合并,从而得到合并区域。
- [0030] 作为本发明进一步的方案:步骤2还包括:
- [0031] 获取到第一调节子模块的合并区域的面积和培养监测系数,并分别标记为合并面积SH和合并培养监测系数SXJ;
- [0032] 步骤2:将得到合并面积SH和合并培养监测系数SXJ,代入到公式 $Xb = \{ (d1 * |SH - SHB| + d2 * |SXJ - SXJB|) \} / (d1 + d2)$ 中,计算得到补偿系数Xb;
- [0033] 其中,d1、d2均为比例系数,SHB表示为合并后标准面积,SXJB表示为合并后培养监测系数;
- [0034] 将得到的补偿系数Xb,代入到公式 $Pt = (1 + Xb) * Px$ 中,计算得到调节后振荡频率值Pt;其中,Px为现有培养箱振动频率。
- [0035] 本发明的有益效果:
- [0036] 本发明通过图像采集模块采集细胞片层的生长状态,监测模块,获取到采集模块的细胞片层面积Sx和细胞片层厚度Hx,并对细胞片层的均匀度和平整度进行监测判断,调节模块先对培养皿中出现调节信号的采集区域,判断是否需要合并;再判断是否对培养箱振荡频率进行调节,执行模块,获取到调节模块的调节后振荡频率值Pt,并发送给培养箱控制器,按照调节后振荡频率进行工作;
- [0037] 本发明将细胞培养监测系统应用到脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺中,可以对培养的脐带或胎盘或脐血细胞进行均匀度和平整度实时监测,保证其细胞培养质量,从而获取得到高质量的间充质干细胞,进而提高对慢阻肺治疗效果。

## 附图说明

- [0038] 下面结合附图对本发明作进一步的说明。
- [0039] 图1是本发明的示意图。

## 具体实施方式

[0040] 下面将结合本发明实施例中的附图,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作出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

### [0041] 实施例1

[0042] 请参阅图1所示,本发明为脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺应用,包括以下步骤:

[0043] 步骤1、制备脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞:

[0044] 取胎儿娩出后结扎的脐带或胎盘或脐血,经冲洗、消毒,置于保存液中,2-8℃恒温保存,将华通氏胶体剪切成1-4mm<sup>3</sup>的组织匀浆块,加入培养基,放置于二氧化碳恒温恒湿培养箱培养,并通过细胞培养监测系统对其进行实时监测;第14-18天,细胞克隆团的面积百分比到达70-80%时,消化收获,得到P0代细胞,之后进行消化、传代,将需冻存的细胞放置于程序性降温仪中,按照标准冻存程序降至-80℃以下;

[0045] 步骤2、间充质干细胞治疗慢阻肺试验:取C57/B6雄性小鼠40只,随机分为4个组(PBS组,BLM组,BLM+MSC-CM组,BLM+MSC-IFN- $\gamma$ -CM组),每组10只,PBS组小鼠以3mg/kg体重给PBS,其他三组小鼠均以3mg/kg体重气管内直接给BLM,BLM+MSC-CM组小鼠气管内高压枪给予 $5 \times 10^6$ 个脐带间充质干细胞的上清的冻干浓缩液100u1,BLM+MSC-IFN- $\gamma$ -CM组小鼠气管内高压枪给予经IFN- $\gamma$ 预处理的 $5 \times 10^6$ 个脐带间充质干细胞的上清的冻干浓缩液100u1,观察小鼠体重变化,计算存活率,并在21天处死小鼠,取一侧肺组织,HE染色观察组织学改变,免疫组化检测 $\alpha$ -SMA表达的变化,另一侧肺组织匀浆,检测羟脯氨酸的变化;

[0046] 具体可参照中国专利CN104666347A公开的脐带间充质干细胞的培养上清在肺间质纤维化治疗中的应用。

### [0047] 实施例2

[0048] 基于上述实施例1,在步骤1中,细胞培养监测系统包括:

[0049] 图像采集模块,用于获取培养箱内培养皿的图像,以采集细胞片层的生长状态;

[0050] 该图像采集模块具体工作过程如下:

[0051] 将培养皿采集到的图像按照等面积划分成i个采集区域,获取到每个采集区域的培养信息;其中培养信息包括细胞片层的面积和厚度,并分别标记为S<sub>x</sub>和H<sub>x</sub>;

[0052] 监测模块,获取到采集模块的细胞片层面积S<sub>x</sub>和细胞片层厚度H<sub>x</sub>,并对细胞片层的均匀度和平整度进行监测判断;

[0053] 该监测模块具体工作过程如下:

[0054] 步骤1:获取到每个采集区域的细胞片层面积S<sub>x</sub>,以及细胞片层的位置,并标记为L<sub>z</sub>;

[0055] 其中,该细胞片层的位置L<sub>z</sub>指的是细胞片层中心点与采集区域中心点的距离值;

[0056] 利用公式 $ZJ = a_1 * S_x + a_2 * L_z$ ,计算得到该采集区域的细胞片层均匀度值ZJ,其中,a<sub>1</sub>、a<sub>2</sub>均为比例系数,a<sub>1</sub>取值为0.47,a<sub>2</sub>取值为0.65;

[0057] 步骤2:获取到每个采集区域的细胞片层厚度H<sub>x</sub>,以及细胞片层的位置L<sub>z</sub>;

[0058] 利用公式 $ZP = b_1 * H_x + b_2 * L_z$ ,计算得到该采集区域的细胞片层平整度ZP,其中,b<sub>1</sub>、

b2均为比例系数,b1取值为0.41,b2取值为0.16;

[0059] 步骤3:将得到细胞片层均匀度值ZJ和细胞片层平整度ZP代入到公式 $XJ = (c1*ZJ + c2*ZP) / (c1+c2)$ 中,计算得到培养监测系数XJ;其中,c1、c2均为比例系数,c1取值为1.66,c2取值为1.24;

[0060] 步骤4:将得到的培养监测系数XJ与监测系数阈值进行比较;

[0061] 若培养监测系数XJ大于监测系数阈值时,则表示脐带或胎盘或脐血的细胞培养均匀,并生成培养合格信号;

[0062] 若培养监测系数XJ小于监测系数阈值时,则表示脐带或胎盘或脐血的细胞培养不均匀,并生成调节信号;

[0063] 调节模块,包括第一调节子模块和第二调节子模块,第一调节子模块,对该培养皿中出现调节信号的采集区域,判断是否需要合并;

[0064] 第二调节子模块,根据第一调节子模块的信号,判断是否对培养箱振荡频率进行调节;

[0065] 第一调节子模块具体工作过程如下:

[0066] 步骤1:获取到生成调节信号的采集区域的培养监测系数XJ,以及与其相邻的采集区域的培养监测系数XJ,进行差值计算,得到培养监测系数差值CXJ;

[0067] 步骤2:将得到的培养监测系数差值CXJ与培养监测系数差阈值进行比较;

[0068] 若培养监测系数差值CXJ大于培养监测系数差阈值,则将生成调节信号的采集区域与相邻的采集区域不合并;

[0069] 若培养监测系数差值CXJ小于培养监测系数差阈值,则将生成调节信号的采集区域与相邻的采集区域合并,从而得到合并区域;

[0070] 第二调节子模块,获取到第一调节子模块的合并区域,并根据合并区域情况,对培养皿进行振动调节;

[0071] 该第二调节子模块具体工作过程如下:

[0072] 步骤1:获取到第一调节子模块的合并区域的面积和培养监测系数,并分别标记为合并面积SH和合并培养监测系数SXJ;

[0073] 步骤2:将得到合并面积SH和合并培养监测系数SXJ,代入到公式 $Xb = \{ (d1*|SH - SHB| + d2*|SXJ - SXJB|) \} / (d1+d2)$ 中,计算得到补偿系数Xb;

[0074] 其中,d1、d2均为比例系数,d1取值为1.25,d2取值为1.47,SHB表示为合并后标准面积,SXJB表示为合并后培养监测系数,其中SHB和SXJB由技术人员根据实际工艺设置的;

[0075] 步骤3:将得到的补偿系数Xb,代入到公式 $Pt = (1+Xb)*Px$ 中,计算得到调节后振荡频率值Pt;其中,Px为现有培养箱振荡频率;

[0076] 执行模块,获取到调节模块的调节后振荡频率值Pt,并发送给培养箱控制器,按照调节后振荡频率进行工作。

[0077] 本发明的工作原理:本发明通过图像采集模块采集细胞片层的生长状态,监测模块,获取到采集模块的细胞片层面积Sx和细胞片层厚度Hx,并对细胞片层的均匀度和平整度进行监测判断,调节模块先对培养皿中出现调节信号的采集区域,判断是否需要合并;再判断是否对培养箱振荡频率进行调节,执行模块,获取到调节模块的调节后振荡频率值Pt,并发送给培养箱控制器,按照调节后振荡频率进行工作;

[0078] 本发明将细胞培养监测系统应用到脐带或胎盘或脐血来源间充质干细胞治疗慢阻肺中,可以对培养的脐带或胎盘或脐血细胞进行均匀度和平整度实时监测,保证其细胞培养质量,从而获取得到高质量的间充质干细胞,进而提高对慢阻肺治疗效果。

[0079] 以上对本发明的一个实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,不能被认为用于限定本发明的实施范围。凡依本发明申请范围所作的均等变化与改进等,均应仍归属于本发明的专利涵盖范围之内。



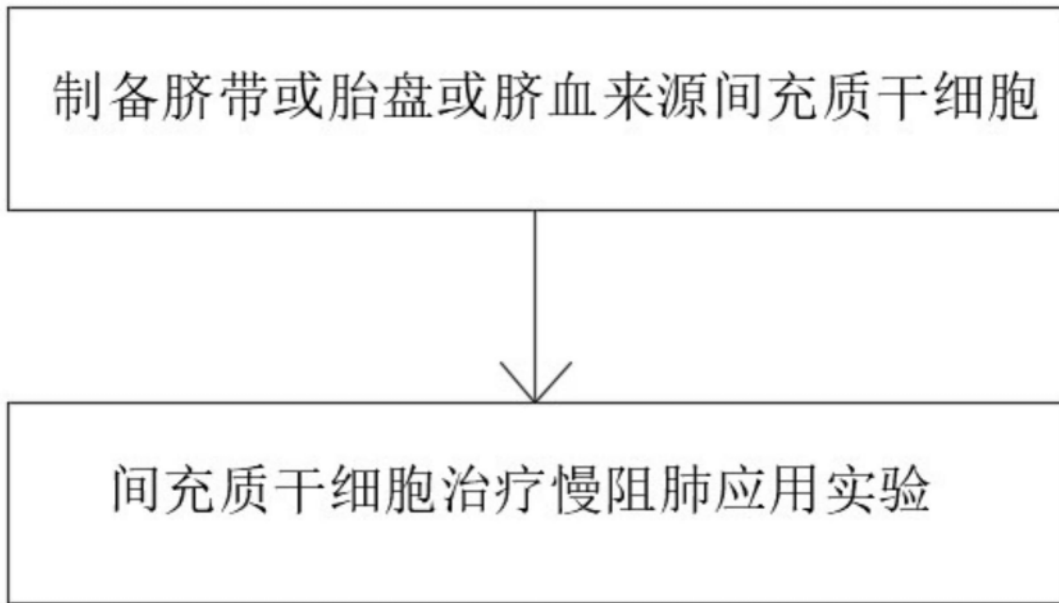


图1