

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2017年6月1日 (01.06.2017)



(10) 国际公布号  
WO 2017/088830 A1

- (51) 国际专利分类号:  
C12N 5/077 (2010.01) A61P 5/26 (2006.01)  
A61K 45/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/107361
- (22) 国际申请日: 2016年11月25日 (25.11.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201510845021.8 2015年11月27日 (27.11.2015) CN
- (71) 申请人: 中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY)  
[CN/CN]; 中国广东省广州市新港西路 135 号,  
Guangdong 510275 (CN)。
- (72) 发明人: 项鹏 (XIANG, Peng); 中国广东省广州市中山  
山二路 74 号, 中山大学中山医学院新科技楼干细胞  
与组织工程研究中心, Guangdong 510080 (CN)。  
姜美花 (JIANG, Meihua); 中国广东省广州市中山  
山二路 74 号, 中山大学中山医学院新科技楼干细胞  
与组织工程研究中心, Guangdong 510080 (CN)。  
李伟强 (LI, Weiqiang); 中国广东省广州市中山二路  
74 号, 中山大学中山医学院新科技楼干细胞与组织  
工程研究中心, Guangdong 510080 (CN)。
- (74) 代理人: 广州番禺容大专利代理事务所 (普通合  
伙) (GUANGZHOU PANYU RONDA PATENT

AGENCY); 中国广东省广州市越秀区东风中路 300  
号之一金安大厦 14 楼 B 室, Guangdong 510030  
(CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保  
护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR,  
IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR,  
LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,  
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,  
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保  
护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,  
RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH,  
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,  
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,  
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING LEYDIG CELLS BY CARRYING OUT INDUCED DIFFERENTIATION ON HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS, AND USE OF LEYDIG CELLS

(54) 发明名称: 人诱导多能干细胞向睾丸间质细胞的诱导分化方法及其用途

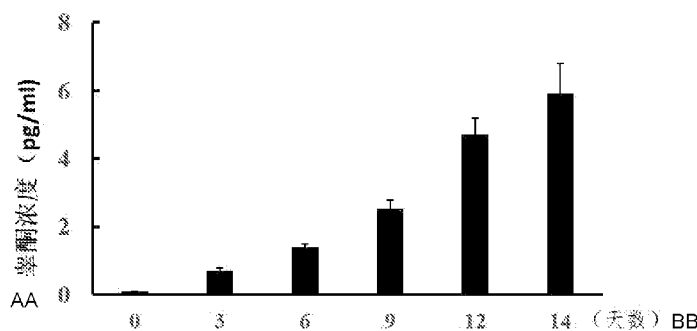


图 7

AA Testosterone concentration (pg/ml)  
BB (Number of days)

(57) Abstract: Provided is an in vitro orientation-induced differentiation method for differentiating human induced pluripotent stem cells (hiPS) into leydig cells (LCs) by means of neural crest stem cells (NCSCs).

(57) 摘要: 提供一种诱导人多能干细胞 (hiPS) 经神经嵴干细胞 (NCSCs) 分化为睾丸间质细胞 (LCs) 的体外定向诱导分化方法。

WO 2017/088830 A1

## 人诱导多能干细胞向睾丸间质细胞的诱导分化方法及其用途

本申请要求申请日为 2015 年 11 月 27 日的中国专利申请 CN201510845021.8 的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

### 技术领域

本发明涉及干细胞与组织工程技术领域，具体涉及人诱导多能干细胞向睾丸间质细胞(LCs)的诱导分化方法及其用途。

### 背景技术

睾丸间质细胞(Leydig cells, LCs)分布于睾丸生精细胞管之间的疏松结缔组织，其分泌的睾酮是成年男性体内睾酮的主要来源。目前，LOH（迟发性性腺功能减退症）的主要治疗方法是外源性雄激素药物替代疗法，但是该疗法存在补充剂量难以掌握、无法模拟生理性睾酮的分泌特点、需长期用药并伴随着多种并发症及各种副作用等缺点。由于外源性雄激素药物存在一系列的缺陷，导致目前仅有很少一部分雄激素低下性疾病患者在接受外源性雄激素药物的治疗，因此迫切需要探索一种治疗雄激素低下性疾病的新方法。LCs 移植是治疗 LOH 等睾酮缺乏相关疾病的最佳手段，它能够更好的模拟人体睾酮分泌的生理特点，使血清睾酮浓度和睾丸局部睾酮浓度都能得到有效的提高，可以获得更好的治疗效果的同时，尽量避免治疗过程中产生的不良后果。然而，由于 LC 发育起源不明，而且存在取材困难、数量稀少、扩增困难等缺陷明显制约了其临床应用前景。目前睾丸间质细胞常用的分离方法为密度梯度离心法(Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Papadopoulos V, Zirkin BR, Hardy MP. In search of rat stem Leydig cells: identification, isolation, and lineage-specific development. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 2719-2724;

Stanley E, Lin CY, Jin S, Liu J, Sottas CM, Ge R, et al. Identification, proliferation, and differentiation of adult Leydig stem cells. *Endocrinology* 2012; 153: 5002-5010.)。

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS 细胞)具备了与胚胎干细胞相似的自我更新和多向分化潜能,同时因其可来源于自身成体细胞,克服了胚胎干细胞存在的伦理与免疫源性等诸多问题,成为研究人类疾病发病机制、开展组织细胞替代治疗的重要细胞来源。个体来源的成体细胞经过转录因子(KLF4, SOX2, OCT4 和 c-MYC)导入重编程为多能干细胞,从而使自体移植成为可能。以 iPS 细胞作为“种子”细胞,可以将其在体外大量扩增并诱导分化为特定的组织细胞。

LCs 的可能来源包括肾上腺-性腺原基(adrenal-gonadal primordium)、神经嵴 (neural crest)、中肾 (mesonephros) 或者体腔上皮 (coelomic epithelium)[Barsoum, I.B. and H.H. Yao, Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *J Androl*, 2010. 31(1): p. 11-5.]。Davidoff 的研究发现,睾丸间质祖细胞表达神经干细胞标志 Nestin 和周细胞标志 NG2,进一步证实了 LC 细胞有可能是神经嵴起源[Davidoff, M.S., Middendorff, R., Enikolopov, G., Riethmacher, D., Holstein, A.F., Müller, D., Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol*, 2004. 167(5): p. 935-44.]。

## 发明内容

本发明人发现,诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)在体外经神经嵴干细胞(neural crest stem cells, NCSCs),可以分化为成熟睾丸间质细胞(Leydig cells, LCs)。本发明的目的是提供了一种人诱导多能干细胞(hiPS)经神经嵴干细胞(NCSCs)分化为睾丸间质细胞(LCs)的体外定向诱导分化方法,并利用动物模型证实来源于 hiPS 细胞的 LCs 具备再生衰老或损

伤 LCs 的能力，为性腺功能低下的病人尤其是 LOH 病人提供新的补充睾酮的方案。

本发明采用以下技术方案予以实现：

本发明一方面提供了一种经人诱导多能干细胞(hiPS)向睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)进行诱导分化的方法。

在进一步的的实施方案中，上述方法主要是以人诱导多能干细胞(hiPS)作为“种子”细胞，先将 hiPS 细胞诱导分化为特定的组织细胞，所述特定的组织细胞可在体外进一步定向分化为睾丸间质细胞(Leydig cells, LCs)，优选地，所述特定的组织细胞优选人神经嵴干细胞。

在进一步的的实施方案中，一种人诱导多能干细胞(hiPS)向睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)的诱导分化方法，具体包括如下步骤：

(1) 使人诱导多能干细胞 (hiPS) 诱导分化为人神经嵴干细胞 (hiPS-hNCSCs)；

(2) 使步骤(1)中获得的人神经嵴干细胞(hiPS-hNCSCs)诱导分化为睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)。

在进一步的的实施方案中，所述步骤(1)包括将人诱导多能干细胞(hiPS)接种在低粘附性的培养皿中进行培养，优选 Petri 培养皿。

在进一步的的实施方案中，所述步骤(1)包括使人诱导多能干细胞(hiPS)在神经分化培养液中诱导分化为人神经嵴干细胞(hiPS-hNCSCs)。

在进一步的的实施方案中，所述步骤(1)包括使人诱导多能干细胞(hiPS)在神经分化培养液中进行培养，形成胚体后，用神经嵴干细胞培养液进行贴壁培养。

在一个具体的实施方案中，本发明的人诱导多能干细胞(hiPS)向睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)的诱导分化方法的步骤(1)包括将人诱导多能干细胞(hiPS)消化后重悬，将悬浮细胞接种在低粘附性的培养皿，优选 Petri 培养皿中，使用神经分化培养液进行悬浮培养，形成胚体，随后将胚体接种到用纤连蛋白包被的培养板中用神经嵴干细胞培养液进行贴壁培养，将贴壁培养

的细胞通过流式细胞仪分选出 P75+/HNK1+双阳细胞，即为人神经嵴干细胞 (hiPS-hNCSCs)。

在一个具体的实施方案中，使用含有 ROCK 抑制剂的 mTeSR 培养液重悬人诱导多能干细胞(hiPS)。

可以使用本领域已知的神经分化培养液。在一个优选的实施方案中，神经分化培养液含有 50-80% (V/V)Knockout™ DMEM、5-20% (V/V)Knockout™ SR、0.5-5%(V/V)青链霉素混合液、0.5-5 mM L-谷氨酰胺、0.05-0.5 mM 的 β-巯基乙醇；在进一步优选的实施方案中，神经分化培养液含有 80% (V/V)Knockout™ DMEM、18% Knockout™ SR、1%(V/V)青链霉素混合液、1 mM L-谷氨酰胺、0.1 mM 的 β-巯基乙醇。

可以使用本领域已知的神经嵴干细胞培养液。在一个优选的实施方案中，神经嵴干细胞培养液为按 1:0.1-1 比例将 DMEM-F12 培养基与 Neurobasal 培养基混合。在进一步优选的实施方案中，神经嵴干细胞培养液为按 1: 1 比例将 DMEM-F12 培养基与 Neurobasal 培养基混合。

在进一步优选的实施方案中，神经嵴干细胞培养液含有 0.1-5%(V/V)的 N2、0.5-10%(V/V)的 B27、0.5-5%(V/V)的青链霉素混合液、0.5-5 mM L-谷氨酰胺，0.05-0.5 mM 的 β-巯基乙醇，再加入 1-100ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 1-100 ng/mL 的表皮细胞生长因子 (EGF)。优选地，所述神经嵴干细胞培养液含有 1%(V/V)的 N2、2%(V/V)的 B27、1%(V/V)的青链霉素混合液、1 mM L-谷氨酰胺，0.1mM 的 β-巯基乙醇，再加入 10 ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 10 ng/mL 的表皮细胞生长因子 (EGF)。

在进一步优选的实施方案中，所述神经嵴干细胞培养液为按 1:0.1-1 比例将 DMEM-F12 培养基与 Neurobasal 培养基混合，并添加 0.1-5%(V/V)的 N2、0.5-10%(V/V)的 B27、0.5-5%(V/V)的青链霉素混合液、0.5-5 mM L-谷氨酰胺，0.05-0.5mM 的 β-巯基乙醇，再加入 1-100ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 1-100ng/mL 的表皮生长因子 (EGF)。

在一个具体的实施方案中，神经嵴干细胞培养液为按 1: 1 比例将 DMEM-F12 培养基与 Neurobasal 培养基混合，并添加 1%(V/V)N2、2%(V/V) B27、1%(V/V)青链霉素混合液、1mM L-谷氨酰胺和 0.1 mM 的  $\beta$ -巯基乙醇，再加入 10 ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 10 ng/mL 的表皮细胞生长因子 (EGF)。

在一个具体的实施方案中，胚体形成 5 天后接种到用纤连蛋白包被的培养板中。在一个优选的实施方案中，所述用纤连蛋白包被的培养板是用多聚赖氨酸/明胶/纤连蛋白包被的。

在一个具体的实施方案中，贴壁培养的细胞在贴壁 5-7 天后用流式细胞仪进行分选。

在一个具体的实施方案中，本发明的人诱导多能干细胞(hiPS)向睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)的诱导分化方法的步骤(2)包括扩增步骤(1)获得的人神经嵴干细胞(hiPS-hNCSCs)，随后更换为睾丸间质细胞(LCs)分化培养液诱导分化，获得睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)。

在一个具体的实施方案中，在上述步骤(2)中，扩增人神经嵴干细胞(hiPS-hNCSCs)使之达到 60%的密度时更换为 LC 分化培养液。

在优选的实施方案中，睾丸间质细胞(LCs)分化培养液为在 DMEM-F12 培养基中加入体积百分比为 0.1%- 20%(V/V) 的小牛血清(FCS)、0.1- 10nM 三碘甲腺原氨酸(T3)、0.1- 20ng/ml 促黄体生成素(LH)、5-100 ng/ml 类胰岛素生长因子(IGF-I)、1- 50ng/ml 血小板来源生长因子 BB (PDGFBB)。

在优选的实施方案中，睾丸间质细胞(LCs)分化培养液为在 DMEM-F12 培养基中加入 2%(V/V) 的小牛血清 (FCS)、1nM 三碘甲腺原氨酸 (T3)、1ng/ml 促黄体生成素(LH)、70 ng/ml 类胰岛素生长因子(IGF-I)、10ng/ml 血小板来源生长因子 BB (PDGF-BB)。

在一个具体的实施方案中，上述步骤(2)中的诱导时间为 14 天。

本发明的又一方面提供本发明的睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)在制备提高睾酮水平的药物中的应用，以及在制备治疗睾酮水平低下导致的相关

疾病的药物中的应用。

在一个具体的实施方案中，本发明的睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)可以提高血清睾酮水平。

本发明中所使用的“hNCSCs”或“hiPS-hNCSCs”是指由人诱导多能干细胞(hiPS)诱导分化获得的人神经嵴干细胞(hNCSCs)。

本发明中所使用的“hiPS-hNCSCs-LCs”或“hNCSCs-LCs”是指由人诱导多能干细胞(hiPS)诱导分化的人神经嵴干细胞(hNCSCs)诱导分化获得的睾丸间质细胞(LCs)。

本发明的方案是将人iPS细胞系诱导分化为神经嵴干细胞(hNCSCs)，随后进一步诱导分化为睾丸间质细胞(LCs)。其具体步骤如下：

(1)人iPS细胞系(hiPSCs)向神经嵴干细胞(hNCSCs或称hiPS-hNCSCs)的诱导分化：

①制备细胞悬液。将人iPS细胞系(hiPSCs)消化成小团块状后重悬。

其中可使用含有ROCK抑制剂的mTeSR培养液重悬细胞。

②诱导分化。将悬浮细胞接种在低粘附性的培养皿中，使用神经分化培养液进行培养形成胚体结构。

其中神经分化培养液可以，例如，含有80% Knockout™ DMEM、18% Knockout™ SR、1% 双抗、1 mM L-谷氨酸、和0.1 mM的β-巯基乙醇。

③贴壁培养。将形成的胚体接种于纤连蛋白包被的培养板中进行贴壁培养。

其中，接种时间可为胚体形成5天后。培养板可用多聚赖氨酸/明胶/纤连蛋白包被。培养板中可加入神经嵴干细胞培养液，所述神经嵴干细胞培养液可以是按1:1比例将DMEM/F12培养基与Neurobasal培养基混合，并添加1%(V/V)N2、2%(V/V) B27、1%(V/V)青链霉素混合液、1 mM L-谷氨酸和0.1 mM的β-巯基乙醇，再加入10 ng/mL的bFGF和10 ng/mL的EGF。

④流式分选。使用流式细胞仪分选出P75+/HNK1+的细胞，即神经嵴干细胞(hNCSCs或称hiPS-hNCSCs)。

所述神经嵴干细胞培养液可以是按1:1比例将DMEM/F12培养基与Neurobasal培养基混合，并添加1%(V/V)N2、2%(V/V) B27、1%(V/V)青链霉素混合液、1 mM L-谷氨酸和0.1 mM的 $\beta$ -巯基乙醇，再加入10 ng/mL的bFGF和10 ng/mL的EGF。

(2)使步骤(1)获得的神经嵴干细胞(hNCSCs或称hiPS-hNCSCs)向睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs或称hNCSCs-LCs)诱导分化。

步骤(2)可以是扩增步骤(1)获得的神经嵴干细胞(hNCSCs)，并在睾丸间质细胞(LCs)分化培养液中诱导分化14天，获得睾丸间质细胞(hNCSCs-LCs)。

其中，可以在神经嵴干细胞培养液中扩增获得的神经嵴干细胞(hNCSCs)。进一步，可以在hNCSCs扩增达到60%的密度时换成LCs分化培养液。LCs分化培养液可以是在DMEM-F12培养基中加入体积百分比为0.1%-20%的小牛血清(FCS)、0.1-10nM三碘甲腺原氨酸(T3)、0.1-20ng/ml促黄体生成素(LH)、5-100 ng/ml类胰岛素生长因子(IGF-I)、1-50ng/ml血小板来源生长因子BB(PDGFBB)。所获得的hNCSCs-LCs表达3 $\beta$ -HSD, P450C17, StAR, SF-1, 并分泌睾酮。

将通过本发明方法获得的睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)移植到去除睾丸间质细胞的大鼠动物模型(应用大鼠睾丸间质细胞的特异性凋亡诱导剂二甲磺酸乙烷(EDS)建立的睾丸间质细胞的凋亡模型，即EDS模型)，评价该细胞在睾丸微环境中的作用。结果发现，该细胞移植后可以提高血清睾酮的浓度，因此本发明的方法得到的睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)可以用于制备治疗睾酮水平低下相关疾病的药物。

本发明将人iPS细胞经诱导分化及细胞分选获得神经嵴干细胞，并在体外诱导培养基中诱导分化神经嵴干细胞，获得睾丸间质细胞并分泌睾酮。将本发明的睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)移植到用EDS消除了睾丸间质细胞的大鼠模型中，可提高模型动物的血清睾酮水平。

本文中出现的“V/V”均指各成分在培养液或培养基中所占的体积百分比。本发明的研究人员经过长期深入研究，为LOH等睾酮缺乏疾病的治疗提

供新的思路，即以人诱导多能干细胞(hiPS)作为睾丸间质细胞(Leydig cells, LCs)的来源，并且通过实验证实来源于 hiPS 细胞的 LC 具有再生衰老或损伤 LC 细胞的能力，以及能够更好的模拟人体睾酮分泌的生理特点，使血清睾酮浓度和睾丸局部睾酮浓度都能得到有效的提高，可以获得更好的治疗效果的同时，尽量避免治疗过程中产生的不良后果。从而一方面克服了传统外源性的雄激素药物疗法无法模拟机体睾酮的生理情况，存在补充剂量难以掌握、需长期用药并伴随着多种并发症及各种副作用等缺点，另一方面还解决了由于 LC 发育起源不明，存在取材困难、数量稀少、扩增困难等缺陷。

## 附图说明

图 1 是 hiPSCs 向 hNCSCs 的诱导分化过程中形成胚体和悬浮培养后的白光照片和分化后的 NCSCs 标志物的免疫荧光染色图。其中 A-C 为白光照片，A. 扩增培养的 hiPSCs；B. 悬浮培养的胚体；C. 贴壁培养的胚体，其形成神经花环结构，并向外迁移；D 是分化后细胞中 NCSCs 特异性标志物的表达(免疫荧光染色)。其中 Scale bar=100 $\mu$ m。

图 2 是对 hNCSCs 进行生物学特性分析的光和荧光染色照片。A. 用流式细胞仪检测 NCSCs 的标志物 HNK1 和 P75 在 hiPSCs 中的表达的图；B. 流式细胞分选后贴壁培养的 hNCSCs 的白光照片；C. 悬浮培养后的 hNCSCs 的白光照片；D. 扩增培养的 hNCSCs 中 NCSCs 特异性标志物 P75 和 Sox10 的表达图。Scale bar=100 $\mu$ m。

图 3 是 hNCSCs 向外周神经元和施旺细胞分化的白光和免疫荧光染色照片。A.白光光镜下观察 hNCSCs 向外周神经元分化前后的细胞形态。B-D 为免疫荧光染色结果。B. hNCSCs 分化形成 peripherin+/Tuj+外周神经元；C. hNCSCs 分化为 TH+/Tuj+ 外周交感神经元；D. hNCSCs 分化形成 GFAP+/S100B+施旺细胞。Scale bar=100 $\mu$ m。

图 4 是 hNCSCs 诱导分化为 hNCSCs-MS 的白光和组织化学染色照片。A. 白光光镜下观察 hNCSCs 诱导分化为 hNCSCs-MS 前后的细胞形态；B.

利用化学染色方法将 hNCSCs-MSCs 在合适的诱导分化液中培养一段时间以后的 Alizarin Red S 染色图、Toluidine Blue 染色图、和 Oil Red O 染色图；C，将 hNCSCs-MSCs 在合适的诱导分化液中培养一段时间以后的  $\alpha$ SMA 染色图。  
Scale bar=100 $\mu$ m。

图 5 是 hNCSCs-LCs 中 LC 标志物表达的图。

图 6 是 hNCSCs-LCs 体外培养条件下分泌睾酮的图。

图 7 是说明 hNCSCs-LCs 移植对 EDS 模型大鼠的血清睾酮水平的影响的图。

## 具体实施方式

可以理解的是，在此描述的特定实施方式通过举例的方式来表示，其并不作为对本发明的限制。在不偏离于本发明范围的情况下，本发明的主要特征可以用于各种实施方式。本领域的技术人员将会意识到或能够确认，仅仅使用常规实验，许多等同物都能应用于本文所描述的特定步骤中。这些等同物被认为处在本发明的范围之内，并且被权利要求所覆盖。

为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明了，下面结合具体实施方式并参照附图，对本发明进一步详细说明。应该理解，这些描述只是示例性的，而并非要限制本发明的范围。此外，在以下说明中，省略了对公知结构和技术的描述，以避免不必要地混淆本发明的概念。

### 实施例 1 从 hiPS 细胞系向 hNCSCs 分化

1)制备细胞悬液：使用已建立的人 iPS 细胞系(hiPSCs, Hum Mol Genet. 2013,22(11): 2221 -33), hiPSCs 细胞在 Matrigel 上扩增培养时呈扁平的克隆样生长，细胞排列紧密，如图 1A 所示。将 hiPSCs 细胞用 0.5 mmol/L 的 EDTA 消化成小块状，用含有 ROCK 抑制剂的 mTeSR 培养液重悬细胞。其中所使用的 ROCK 抑制剂为 Y27632(Calbiochem, San Diego, CA)。

2)诱导分化：收集悬浮细胞，接种在 Petri 培养皿中，使用神经分化培养

液(80% Knockout™ DMEM、18% Knockout™ SR、1%(V/V) 青链霉素混合液、1 mM L-谷氨酸、0.1 mM 的 β-巯基乙醇)悬浮培养, 形成透亮球状的胚体, 如图 1B 所示(本实施例中所述神经分化培养液不限于采用如上配方, 所述神经分化培养液采用本发明所述的神经分化培养液含有体积百分比为 50-80% Knockout DMEM、体积百分比为 5-20% Knockout™ SR、体积百分比为 0.5-5% 青链霉素混合液、0.5-5mM L-谷氨酰胺、0.05-0.5mM 的 β-巯基乙醇中的任意一种具体组合时, 均可达到如附图 1B 所示的效果)。其中 Knockout™ DMEM 和 Knockout™ SR 均购自 Invitrogen, Carlsbad, CA。

3)贴壁培养: 悬浮培养形成胚体 5 天后, 将球状胚体接种到用多聚赖氨酸/明胶/纤连蛋白包被的培养板中进行贴壁培养, 使用神经嵴干细胞培养液(按 1:1 比例将 DMEM-F12 培养基与 Neurobasal 培养基混合, 并添加 1%(V/V)N2、2%(V/V) B27、1%(V/V)青链霉素混合液、1 mM L-谷氨酸和 0.1 mM 的 β-巯基乙醇, 再加入 10 ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子 bFGF (Invitrogen, 13256029) 和 10 ng/mL 的表皮细胞生长因子 EGF (PeproTech, NO.62253-63-8), 隔天换液。贴壁 2 天后即可见细胞团中央部位出现明显的神经花环结构, 并见细胞向外迁移, 如图 1C 所示。(本实施例中所述神经嵴干细胞培养液不限于采用如上配方, 所述神经嵴干细胞培养液采用本发明所述的神经嵴干细胞培养液为按 1:0.1-1 比例将 DMEM-F12 培养基与 Neurobasal 培养基混合, 并添加体积百分比为 0.1-5%的 N2、体积百分比为 0.5-10%的 B27、体积百分比为 0.5-5%的青链霉素混合液、0.5-5 mM L-谷氨酰胺, 0.05-0.5 mM 的 β-巯基乙醇, 再加入 1-100ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 1-100ng/mL 的表皮生长因子 (EGF) 中的任意一种具体组合时, 均可达到如附图 1C 所示的效果。)

对贴壁培养的细胞进行免疫荧光染色检测发现, 如图 1D 所示, Pax6、Sox2 等标志物主要表达在神经花环中央部位的细胞, 神经嵴干细胞特异性标志物 AP2α、Sox10、P75、HNK1 等主要表达在向外迁移的细胞中, 表明经

过胚体培养阶段再贴壁培养后，可以将 hiPSCs 诱导分化成 hNCSCs。

4)流式分选：贴壁 5 天后，将胚体消化成单个细胞，用抗 P75 和 HNK1 的流式抗体标记细胞后，进行 P75+/HNK1+双阳细胞的流式分选。分选时吸管吸去培养液，用 PBS 洗 2 遍，加入 Accutase 消化已分化的 hiPSCs，37℃ 作用 3-5 分钟后观察细胞变圆变透亮，加入培养基终止消化并用枪头把细胞吹散后，利用尼龙筛，过筛细胞并 1500rpm 离心 5min、弃去上清，加入 1mL PBS 后混匀，吸取 20 $\mu$ L 细胞悬液进行细胞计数。余下细胞分为四组进行抗体标记：IgG 阴性对照组、P75 抗体单标组、HNK1 抗体单标组和 P75+/HNK1+ 抗体样本组，每 10<sup>6</sup>细胞量加入 20 $\mu$ L 抗体标记。使用流式细胞仪(BD influx cell sorter)先对 IgG 阴性对照组细胞悬液进行流式上样，选出阴性荧光信号区域作为阴性对照，收集荧光强度高于阴性对照 10 倍以上的细胞。流式检测分析可见诱导分化后约 80-90%的 hiPSCs 细胞表达 NCSC 特异性标志物 HNK1 和 P75(图 2A)，说明经过诱导后多数细胞已分化为 hNCSCs。

通过流式分选即可获得纯化的 hNCSCs，按 5 $\times$ 10<sup>4</sup> -1 $\times$ 10<sup>5</sup>细胞/cm<sup>2</sup>进行贴壁培养，如图 2B 所示，贴壁培养的细胞形态较为均一。将 hNCSCs 消化传代后接种在低粘附性培养板中，如图 2C 所示，细胞形成大小较为均一的神神经球体。对分选获得的 hNCSCs 细胞进行免疫荧光检测，如图 2D 所示，可见细胞维持表达 NCSCs 特异性的标志物 P75、Sox10 等。这表明在现有的培养扩增条件下，细胞能够维持 NCSCs 的特性。

对 hNCSCs 进行生物学特性鉴定。将 hNCSCs 接种至用多聚赖氨酸/明胶/纤连蛋白包被的多孔板中后，换成相应细胞的诱导培养基进行诱导分化。如图 3A 所示，外周神经元诱导分化 2 周后可见细胞形态发生明显改变，细胞胞体变圆并有细长的丝状突起出现。3-4 周后对细胞进行染色鉴定，如图 3B 和 3C 所示，可见有 peripherin+/Tuj+外周神经元、TH+/Tuj+的交感神经元出现。对 hNCSCs 用施旺细胞诱导液进行诱导分化，4 周后进行染色，如图 3D 所示，可以见有 GFAP+/S100b+的施旺细胞出现。

将 hNCSCs 在 MSC 细胞培养液(低糖 DMEM, 10%FBS)中诱导分化 7 天

后, 分化为 MSC (mesenchymal stem cells, 间充质干细胞) 细胞, 如图 4A 所示, 可见细胞形态变为梭形, 并呈漩涡状生长。对 hNCSCs 诱导而来的 MSC(hNCSCs-MSC) 进一步进行多向分化能力鉴定。在合适的诱导分化液中培养一定时间后, 如图 4B 所示, Alizarin Red S 染色钙结节形成证实 hNCSCs-MSC 分化为成骨细胞, Tuluidine Blue 染色证实 hNCSCs-MSC 已向软骨细胞分化, Oil Red O 染色脂滴形成表明 hNCSCs-MSC 已向脂肪细胞分化。在合适的诱导分化液中培养一定时间后, 如图 4C 所示,  $\alpha$ SMA 染色显示 hNCSCs-MSC 已分化为平滑肌细胞。说明培养的 hNCSCs 具有多向分化能力。

## **实施例 2 从 hNCSCs 诱导分化为睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs 或称 hNCSCs-LCs)**

扩增获得的 hNCSCs 细胞, 达到 60% 的密度时换成睾丸间质细胞(LCs) 分化培养液(DMEM-F12 培养基 (Hyclone, SH30023.018) 中加入体积百分比为 2% 的小牛血清 (FCS)、1nM 三碘甲腺原氨酸 (T3) (Sigma, T2877)、1ng/ml 促黄体生成素(LH) (Sigma, L6420)、70 ng/ml 类胰岛素生长因子 (IGF-I) (PeproTech, 100-11)、10ng/ml 血小板来源生长因子 BB (PDGF-BB) (PeproTech, 500-P47), 诱导 14 天, 进行细胞分化, 收集细胞上清, 固定细胞。通过免疫荧光检测成熟 LCs 相关标志物的表达(LCs 标志物  $3\beta$ -HSD、P450c17、steroidogenic acute regulatory protein (StAR)、以及 steroidogenic factor 1 (SF-1)), 如图 5 所示, 免疫染色分析表明 hNCSCs 诱导分化的细胞 (hNCSCs-LCs) 表达  $3\beta$ -HSD, P450C17, StAR, SF-1。通过睾酮 ELISA 检测来测定培养液中睾酮水平, 如图 6 所示, 发现在体外分化后的 hNCSCs-LCs 逐渐增加睾酮分泌, 表明 hNCSCs 可以分化为成熟的睾丸间质细胞。(本实施例中所述睾丸间质细胞(LCs) 分化培养液不限于采用如上配方, 所述睾丸间质细胞(LCs) 分化培养液采用本发明所述的睾丸间质细胞(LCs) 分化培养液 (DMEM-F12 培养基中加入体积百分比为 0.1%- 20% 的小牛血清 (FCS)、0.1-

10nM 三碘甲腺原氨酸 (T3)、0.1- 20ng/ml 促黄体生成素(LH)、5-100 ng/ml 类胰岛素生长因子(IGF-I)、1- 50ng/ml 血小板来源生长因子 BB (PDGFBB 中的任意一种具体组合时, 均可达到如附图 5 和图 6 所示的效果。)

### 实施例 3 hiPS-hNCSCs-LCs(或称 hNCSCs-LCs)在体内的作用

先前的研究表明用大鼠睾丸间质细胞的特异性凋亡诱导剂二甲磺酸乙烷(EDS)处理 4 天能够耗尽睾丸间质细胞, 因此向大鼠腹腔注射 EDS 建立 EDS 模型。选择三组成年大鼠, 分别为正常对照组、EDS-对照组、细胞移植组。正常对照组在第 0 天和第 4 天, 分别腹腔注射相同体积的生理盐水。EDS-对照组大鼠在第 0 天向腹腔注射 EDS(75mg/kg 体重), 在第 4 天向睾丸内注射 20 $\mu$ l 生理盐水(10 $\mu$ l/单侧睾丸)。细胞组的大鼠在第 0 天向腹腔内注射 EDS(75mg/kg 体重), 在第 4 天, 将 LC 培养液中培养了 5-7 天的 hNCSCs-LCs (1.5 $\times 10^6$ 重悬于 10 $\mu$ l PBS/单侧睾丸)移植到大鼠睾丸内。移植后第 10 天时测量血清睾酮浓度。结果如图 7 所示, 移植 hNCSCs-LCs 能够提高血清睾酮的水平。

应当理解的是, 本发明的上述具体实施方式仅仅用于示例性说明或解释本发明的原理, 而不构成对本发明的限制。因此, 在不偏离本发明的精神和范围的情况下所做的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。此外, 本发明所附权利要求旨在涵盖落入所附权利要求范围和边界、或者这种范围和边界的等同形式内的全部变化和修改例。

## 权 利 要 求 书

---

1. 一种经人诱导多能干细胞(hiPS)向睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)进行诱导分化的方法。

2. 根据权利要求 1 所述人诱导多能干细胞(hiPS)向睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)的诱导分化方法, 其特征在于:

(1) 使人诱导多能干细胞(hiPS)诱导分化为人神经嵴干细胞(hiPS-hNCSCs);

(2) 使步骤(1)中获得的人神经嵴干细胞(hiPS-hNCSCs)诱导分化为睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤(1)包括将人诱导多能干细胞(hiPS)接种在低粘附性的培养皿中进行培养。

4. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤(1)包括使人诱导多能干细胞(hiPS)在神经分化培养液中诱导分化为人神经嵴干细胞(hiPS-hNCSCs)。

5. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤(1)包括使人诱导多能干细胞(hiPS)在神经分化培养液中进行培养, 形成胚体后, 用神经嵴干细胞培养液进行贴壁培养。

6. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤(1)包括将人诱导多能干细胞(hiPS)消化后重悬, 将悬浮细胞接种在低粘附性的培养皿, 使用神经分化培养液进行悬浮培养, 形成胚体, 随后将胚体接种到用纤连蛋白包被的培养板中, 用神经嵴干细胞培养液进行贴壁培养, 将贴壁培养的细胞通过流式细胞仪分选出 P75+/HNK1+双阳细胞, 即为人神经嵴干细胞(hiPS-hNCSCs)。

7. 根据权利要求 3 或 6 所述的方法, 其特征在于, 所述低粘附性的培养皿为 Petri 培养皿。

8. 根据权利要求 4-7 任一项所述的方法, 其特征在于, 所述神经分化

培养液含有体积百分比为 50-80% Knockout DMEM、体积百分比为 5-20% Knockout™ SR、体积百分比为 0.5-5%青链霉素混合液、0.5-5mM L-谷氨酰胺、0.05-0.5mM 的  $\beta$ -巯基乙醇。

9. 根据权利要求 4-7 任一项所述的方法，其特征在于，所述神经分化培养液含有体积百分比为 80% Knockout™ DMEM、体积百分比为 18% Knockout™ SR、体积百分比为 1%青链霉素混合液、1mM L-谷氨酰胺、0.1mM 的  $\beta$ -巯基乙醇。

10.根据权利要求 5-6 任一项所述的方法，其特征在于，所述神经嵴干细胞培养液含有体积百分比为 0.1-5%的 N2、体积百分比为 0.5-10%的 B27、体积百分比为 0.5-5%的青链霉素混合液、0.5-5 mM L-谷氨酰胺，0.05-0.5mM 的  $\beta$ -巯基乙醇，再加入 1-100ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）和 1-100ng/mL 的表皮生长因子（EGF）。

11.根据权利要求 5-6 任一项所述的方法，其特征在于，所述神经嵴干细胞培养液含有体积百分比为 1%的 N2、体积百分比为 2%的 B27、体积百分比为 1%的青链霉素混合液、1mM L-谷氨酰胺，0.1 mM 的  $\beta$ -巯基乙醇，再加入 10ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）和 10ng/mL 的表皮生长因子（EGF）。

12. 根据权利要求 5-6 任一项所述的方法，其特征在于，所述神经嵴干细胞培养液为按 1:0.1-1 比例将 DMEM-F12 培养基与 Neurobasal 培养基混合，并添加体积百分比为 0.1-5%的 N2、体积百分比为 0.5-10%的 B27、体积百分比为 0.5-5%的青链霉素混合液、0.5-5 mM L-谷氨酰胺，0.05-0.5mM 的  $\beta$ -巯基乙醇，再加入 1-100ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）和 1-100ng/mL 的表皮生长因子（EGF）。

13. 根据权利要求 5-6 任一项所述的方法，其特征在于，所述神经嵴干细胞培养液为按 1: 1 比例将 DMEM-F12 培养基与 Neurobasal 培养基混合，并添加体积百分比为 1%的 N2、体积百分比为 2%的 B27、体积百分比为 1%的青链霉素混合液、1 mM L-谷氨酰胺，0.1mM 的  $\beta$ -巯基乙醇，

再加入 10ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 10ng/mL 的表皮生长因子 (EGF)。

14. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤(2)包括扩增步骤(1)获得的 hiPS-hNCSCs, 随后更换为睾丸间质细胞(LCs)分化培养液诱导分化, 获得睾丸间质细胞(hiPS-hNCSCs-LCs)。

15. 根据权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述睾丸间质细胞 (LCs) 分化培养液为在 DMEM-F12 培养基中加入体积百分比为 0.1%-20% 的小牛血清 (FCS)、0.1- 10nM 三碘甲腺原氨酸 (T3)、0.1- 20ng/ml 促黄体生成素(LH)、5-100 ng/ml 类胰岛素生长因子(IGF-I)、1- 50ng 血小板来源生长因子 BB (PDGF-BB)。

16. 根据权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述睾丸间质细胞 (LCs)分化培养液为在 DMEM-F12 培养基中加入体积百分比为 2% 的小牛血清 (FCS)、1nM 三碘甲腺原氨酸 (T3)、1ng/ml 促黄体生成素(LH)、70 ng/ml 类胰岛素生长因子(IGF-I)、10ng/ml 血小板来源生长因子 BB (PDGF-BB)。

17. 根据权利要求 1-16 任一项的方法获得的睾丸间质细胞 (hiPS-hNCSCs-LCs)在制备提高睾酮水平的药物中的应用。

18. 根据权利要求 1-16 任一项的方法获得的睾丸间质细胞 (hiPS-hNCSCs-LCs)在制备治疗睾酮水平低下导致的相关疾病的药物中的应用。

19. 根据权利要求 15 或 16 的方法, 其中睾酮水平为血清睾酮水平。

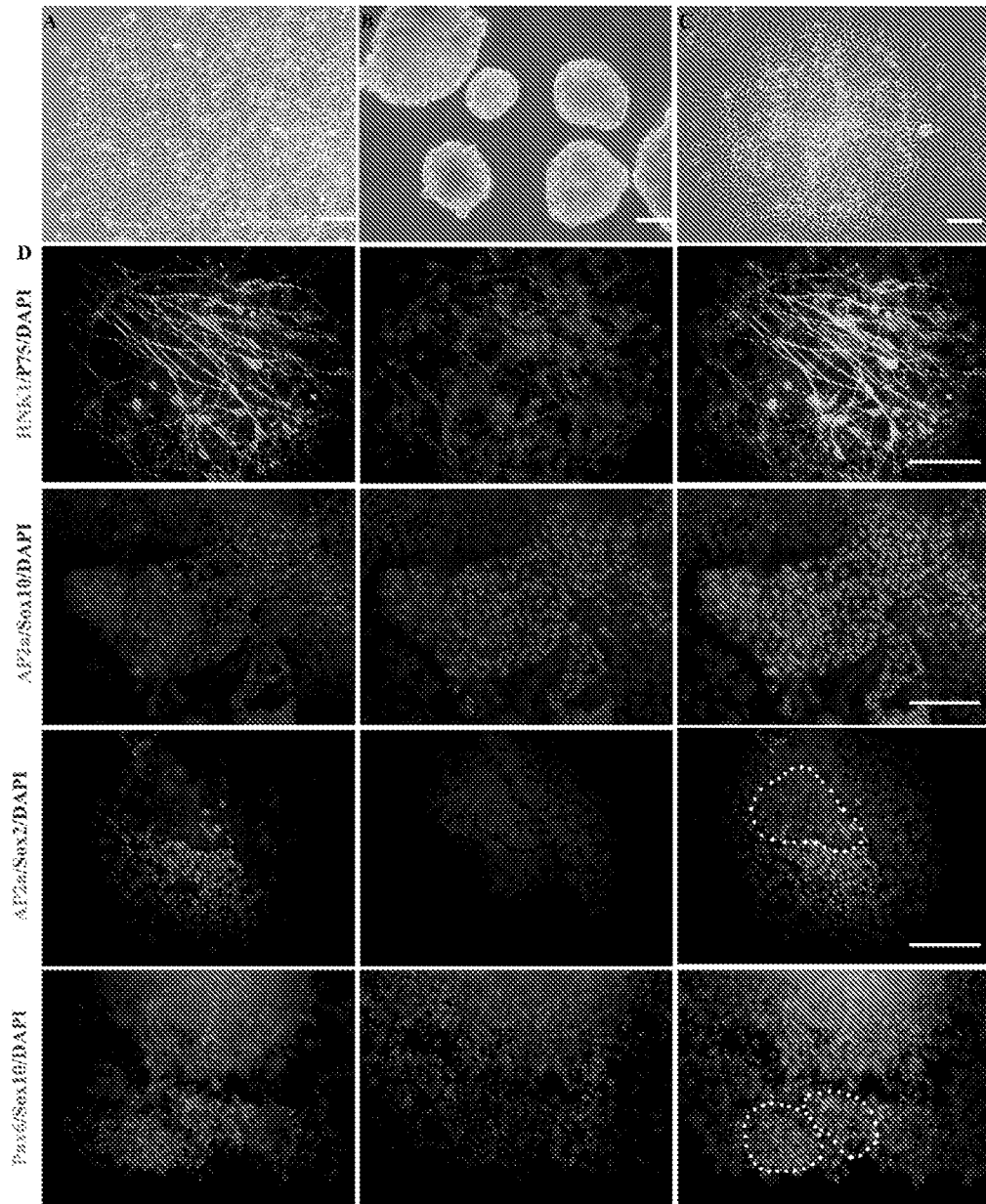


图 1

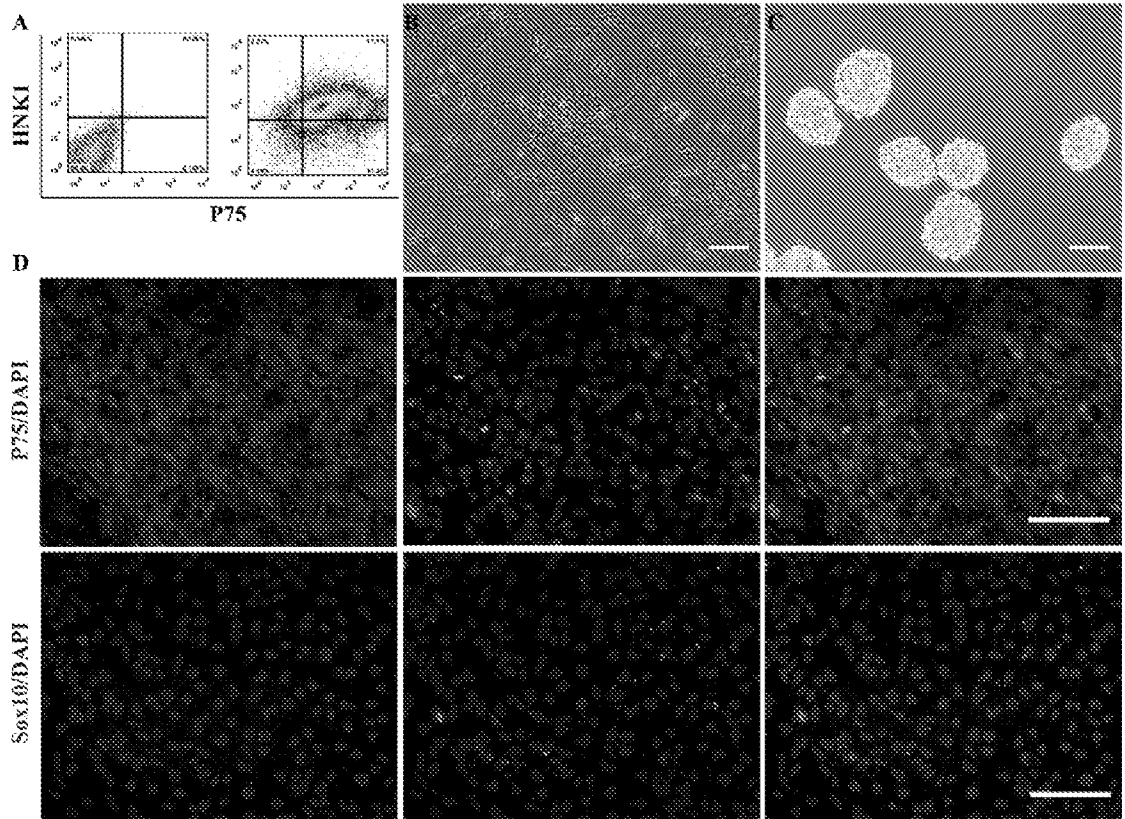


图 2

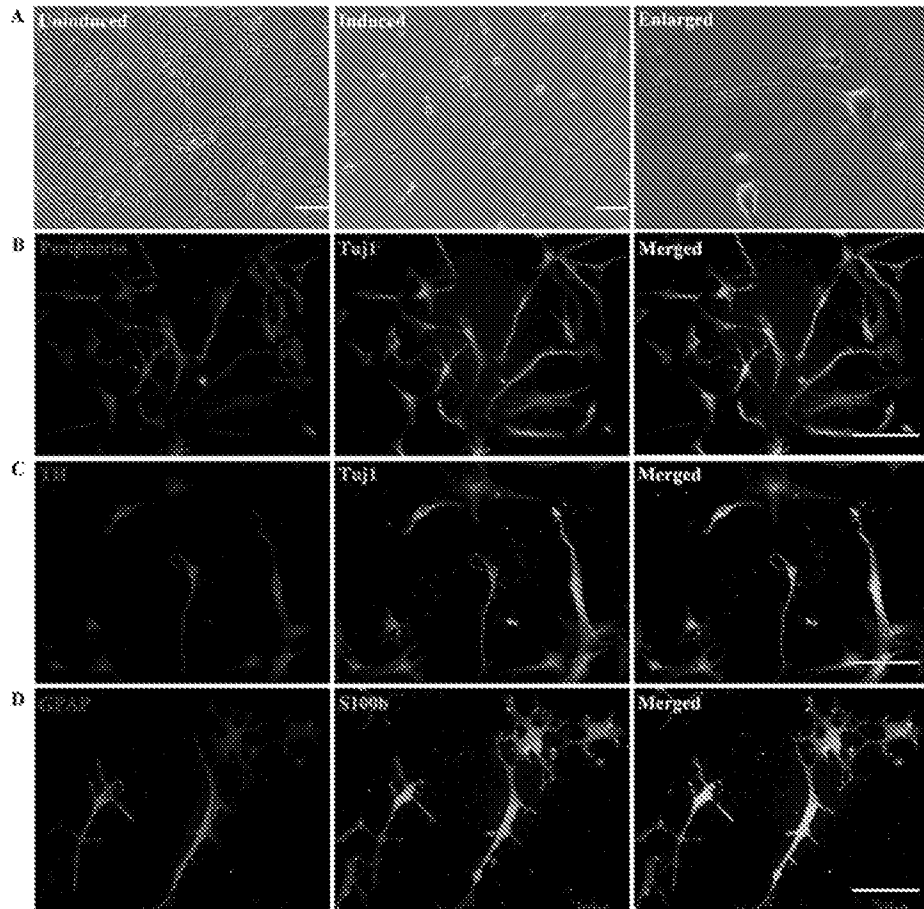


图 3

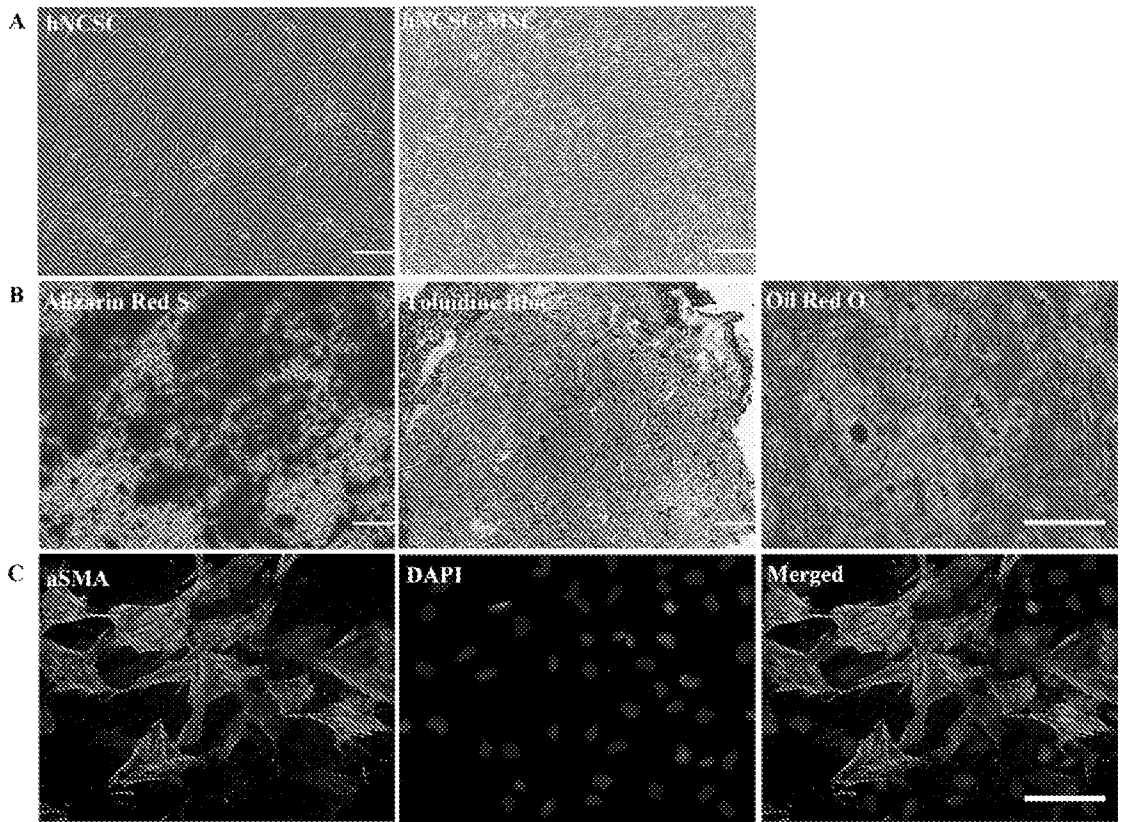


图 4

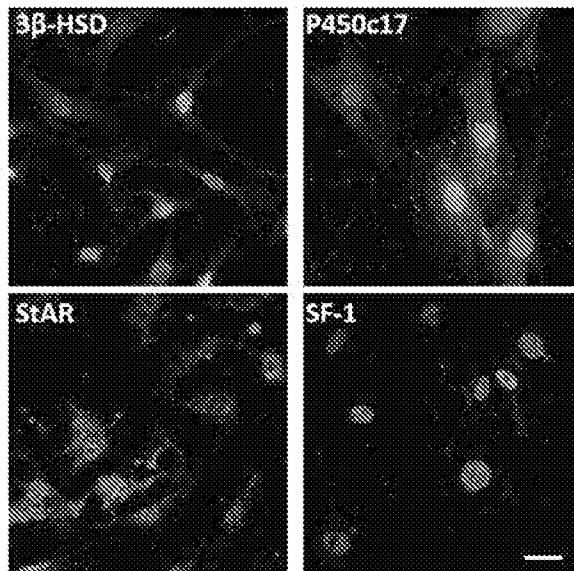


图 5

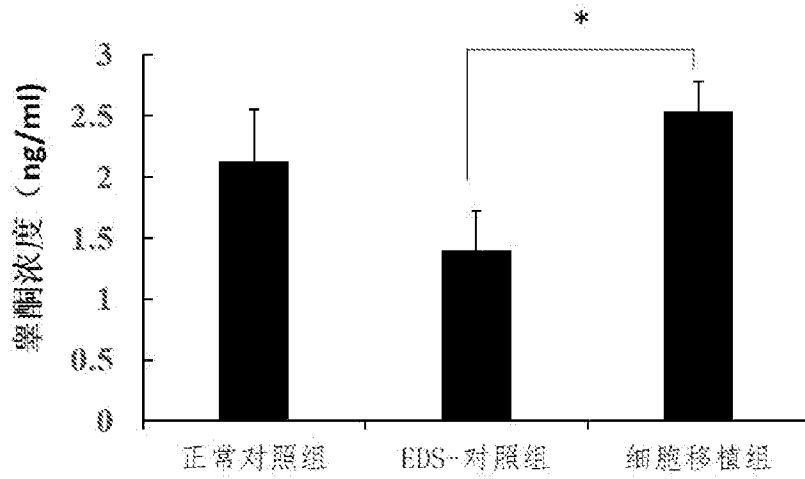


图 6

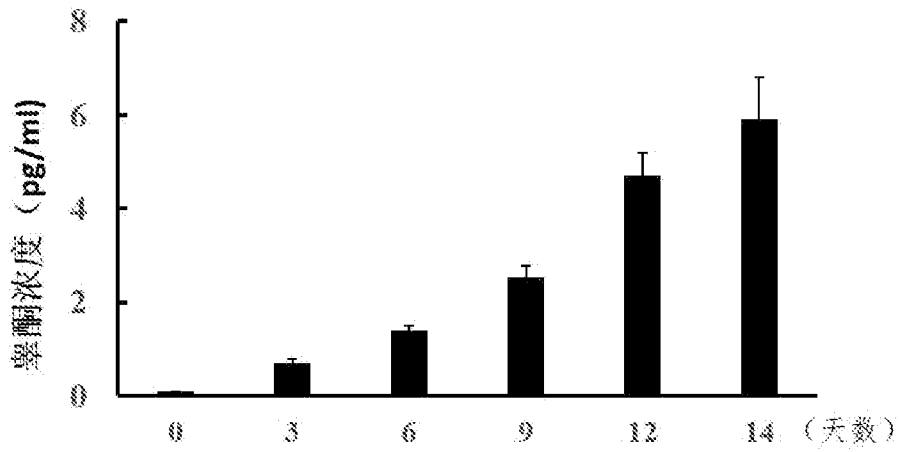


图 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2016/107361**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/077 (2010.01) i; A61K 45/00 (2006.01) i; A61P 5/26 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, ISI Web of Knowledge, PUBMED: induced pluripotent stem cell, iPS cell, leydig cell, neural crest stem cell

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105255826 A (SUN YAT-SEN UNIVERSITY), 20 January 2016 (20.01.2016), see abstract, and claims 1-19	1-19
A	CN 101892190 A (ZHEJIANG UNIVERSITY), 24 November 2010 (24.11.2010), see abstract, claims 1-2, and embodiments 1-7	1-19
A	WO 2007117472 A2 (LOS ANGELES BIOMEDICAL RES INST AT HARBO), 18 October 2007 (18.10.2007), see the whole document	1-19
A	YAZAWA, T. et al., "Differentiation of Adult Stem Cells Derived from Bone Marrow Stroma into Leydig or Adrenocortical Cells", ENDOCRINOLOGY, volume 147, number 9, 25 May 2006 (25.05.2006), ISSN: 0013-7227, see pages 4104-4111	1-19
A	CN 102952777 A (SHANDONG UNIVERSITY), 06 March 2013 (06.03.2013), see the whole document	1-19

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search

17 February 2017 (17.02.2017)

Date of mailing of the international search report

**28 February 2017 (28.02.2017)**

Name and mailing address of the ISA/CN:  
 State Intellectual Property Office of the P. R. China  
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao  
 Haidian District, Beijing 100088, China  
 Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer

**SONG, Zhigang**

Telephone No.: (86-10) **62411078**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2016/107361**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105255826 A	20 January 2016	None	
CN 101892190 A	24 November 2010	None	
WO 2007117472 A2	18 October 2007	US 2007280907 A1	06 December 2007
		WO 2007117472 A3	24 April 2008
		US 2011177039 A1	21 July 2011
		US 2015258149 A1	17 September 2015
CN 102952777 A	06 March 2013	None	

A. 主题的分类 C12N 5/077(2010.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 5/26(2006.01)n 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CPRSABS、CNABS、DWPI、SIPOABS、CNKI、ISI Web of Knowledge、PUBMED: 诱导多能干细胞, 睾丸间质细胞, 神经嵴干细胞, induced pluripotent stem cell, iPS cell, leydig cell, neural crest stem cell		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 105255826 A (中山大学) 2016年 1月 20日 (2016 - 01 - 20) 参见摘要、权利要求1-19	1-19
A	CN 101892190 A (浙江大学) 2010年 11月 24日 (2010 - 11 - 24) 参见摘要、权利要求1-2, 实施例1-7	1-19
A	WO 2007117472 A2 (LOS ANGELES BIOMEDICAL RES INST AT HARBO) 2007年 10月 18日 (2007 - 10 - 18) 参见全文	1-19
A	Yazawa T, 等. "Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells." 《Endocrinology》, 第147卷, 第9期, 2006年 5月 25日 (2006 - 05 - 25), ISSN: 0013-7227, 参见第4104-4111页	1-19
A	CN 102952777 A (山东大学) 2013年 3月 6日 (2013 - 03 - 06) 参见全文	1-19
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2017年 2月 17日	国际检索报告邮寄日期 2017年 2月 28日	
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	授权官员 宋智刚 电话号码 (86-10)62411078	

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/107361

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	105255826	A	2016年 1月 20日	无			
CN	101892190	A	2010年 11月 24日	无			
WO	2007117472	A2	2007年 10月 18日	US	2007280907	A1	2007年 12月 6日
				WO	2007117472	A3	2008年 4月 24日
				US	2011177039	A1	2011年 7月 21日
				US	2015258149	A1	2015年 9月 17日
CN	102952777	A	2013年 3月 6日	无			