



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101407785 B

(45) 授权公告日 2015. 02. 11

(21) 申请号 200810174543. X

(22) 申请日 2002. 09. 20

(30) 优先权数据

60/323, 963 2001. 09. 20 US

(62) 分案原申请数据

02823052. 3 2002. 09. 20

(73) 专利权人 抗癌公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 李伶俐 杨萌

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 闵丹

(51) Int. Cl.

C12N 5/06 (2006. 01)

C12N 5/08 (2006. 01)

A61K 35/12 (2006. 01)

A61P 25/00 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

A61P 25/16 (2006. 01)

A61P 17/00 (2006. 01)

A61P 17/02 (2006. 01)

A61P 17/14 (2006. 01)

(56) 对比文件

Hiroaki Tani et al. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. 《PNAS》. 2000, 第 97 卷 (第 20 期), 10960 - 10965.

Jean G. Toma et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. 《NATURE CELL BIOLOGY》. 2001, 第 3 卷 778-784.

审查员 丁海

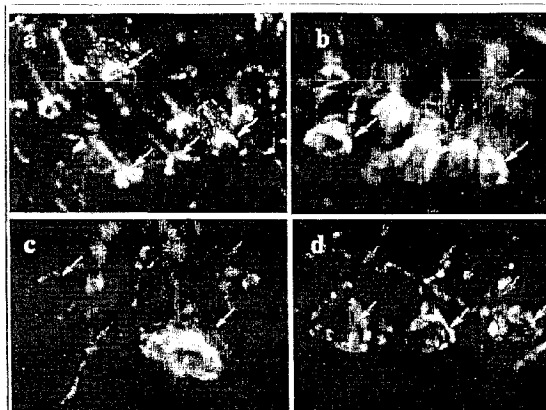
权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

表达巢蛋白的毛囊干细胞

(57) 摘要

毛囊干细胞是通过分离巢蛋白表达细胞的手段从哺乳动物中分离得到的。这些毛囊干细胞是用于同源或异源干细胞治疗的成熟干细胞来源之一。这些干细胞可以系统性地移植入哺乳动物或直接移植入器官。另外, 该干细胞可以在体外进一步分化, 然后系统性地或直接移植入哺乳动物。



1. 分离的毛囊干细胞,其在生长周期阶段中的毛发生长终期从哺乳动物永久性上部毛囊紧靠脂肪腺下方的毛囊膨出区获得,并且所述细胞表达巢蛋白,并且所述细胞当培养在包含 FBS、BDNF、PDGF 或 CNTF 的培养基中时,分化成神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞或脂肪细胞。

2. 通过培养权利要求 1 的细胞制备的神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞或脂肪细胞。

3. 包含权利要求 1 所述的细胞的组合物在制备治疗疾病的组合物中的用途,所述疾病是可以通过在包含将所述细胞施用到表现该疾病的哺乳动物受试者的方法中因产生分化的细胞而获益的疾病。

4. 包含权利要求 2 所述神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞或脂肪细胞的组合物在制备治疗哺乳动物受试者疾病的组合物中的用途,所述病症是由于将所述神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞或脂肪细胞移入所述受试者而获益的疾病。

表达巢蛋白的毛囊干细胞

[0001] 本申请是申请日为 2002 年 9 月 20 日、申请号为 02823052.3、发明名称为“表达巢蛋白的毛囊干细胞”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请根据 35 United States Code 119(e) 的规定,要求 2001 年 9 月 20 日提交的临时申请流水号 60/323,963 的优先权,其中的内容在此引入作为参考。

技术领域

[0004] 本发明涉及毛囊干细胞及其用途。明确地说,本发明涉及表达巢蛋白(nestin)的毛囊干细胞、分离该干细胞的方法以及使用该干细胞治疗疾病或障碍的方法。

背景技术

[0005] 尽管干细胞治疗的重要性已得到公认,但由于使用胚胎干细胞做这样的治疗,对干细胞治疗法一直存有争议。另外,来源于诸如骨髓的干细胞较难获得。如果有一种易于获得的成年干细胞,其能够提供与那些更有争议的以及更不易获得的干细胞同样的好处,对这个领域将是很有益的。本发明通过发现来自哺乳动物毛囊的干细胞,讨论了这一需求。涉及毛发的一个简要背景为本发明中的毛囊干细胞提供了基础。

[0006] 毛发生长是一种独特的循环再生现象。在哺乳动物的整个一生中,毛囊不断重复着生长(毛发生长期)、衰退(过渡期)以及休眠(毛发生长终期)的循环。毛囊干细胞的位置和功能是理解毛发生长的生物学和病理学的关键(Oshima, H. 等, Cell(2001)104:233-245)。标记滞留细胞是干细胞的特征之一,有人发现这种细胞位于毛囊的永久性上部(permanent upper portion),即所谓毛囊膨出区(bulge area)(Cotsarelis, G. 等, Cell(1990)61:1329-1337)。

[0007] Taylor, G. 等(Cell(2000)102:451-461)最近报道,毛囊膨出区干细胞很可能是双能性的(bipotent),因为它们不仅可以使毛囊发生,还可以使表皮发生。其它实验(Oshima 等,(前述))也提供新证据证明,成年小鼠触须囊的外根鞘上部包含多能干细胞,它们可分化成毛囊基质细胞、脂肪腺基底细胞和表皮。最近, Toma, J. G. 等(Nature Cell Biology(2001)3:778-784)报道,从哺乳动物真皮分离到的,称作皮肤衍生的前体(SKP)的成年多能干细胞,能够在培养中增殖并分化,产生神经元、神经胶质、平滑肌细胞和脂肪细胞。但是,这些干细胞在皮肤中的精确定位及其功能尚不清楚。

[0008] 从毛发中分离到与神经干细胞相关的干细胞,对本领域将是很有用的。本发明确立了毛囊干细胞和神经干细胞的相关性。

发明内容

[0009] 本发明涉及分离的毛囊干细胞以及从所述细胞分化得到的细胞。优选,所述细胞是基于标记(如巢蛋白)而分离得到的,更优选,巢蛋白连接于绿色荧光蛋白。

[0010] 本发明的另一方面涉及一种分离毛囊干细胞的方法,包括提供来自哺乳动物的含

有毛囊的皮肤,以及从中分离毛囊干细胞。优选,该皮肤是毛发生长终期的皮肤。

[0011] 本发明的另一方面,分离到的毛囊干细胞在培养基中进一步培养以产生分化的细胞。在优选的实施方案中,该培养基包括 FBS、BDNF、PDGF 或 CNTF。在更优选的实施方案中,分化的细胞是神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞或脂肪细胞。

[0012] 本发明的另一方面涉及一种治疗疾病的方法,优选神经性疾病或退化性疾病,包括将干细胞或由其分化来的细胞移植入表现该疾病的哺乳动物。所述细胞既可以是自体固有的也可以是异源的。在一个实施方案中,所述细胞是通过系统注射方式移植到哺乳动物中的,在另一个方案中是通过直接将所述细胞注射进哺乳动物的器官。优选的器官或组织是脑、肝或心血管组织。优选疾病为阿尔茨海默氏病 (Alzheimer' s)、帕金森氏病 (Parkinson' s)、与年龄相关的记忆力减退、毛发脱落、烧伤、皮肤老化以及皮肤置换 (skinreplacement)。

[0013] 更具体地,本发明涉及如下方面:

[0014] 第 1 项. 分离的毛囊干细胞。

[0015] 第 2 项. 第 1 项的分离的毛囊干细胞,其中所述细胞表达巢蛋白。

[0016] 第 3 项. 分离第 1 项所述毛囊干细胞的方法,包括从含有毛囊的皮肤分离毛囊干细胞。

[0017] 第 4 项. 第 3 项的分离毛囊干细胞的方法,其中的皮肤被切取;且分离步骤进一步包括从毛囊中分离巢蛋白表达细胞,从而分离毛囊干细胞。

[0018] 第 5 项. 第 3 项的方法,其中的皮肤是毛发生长终期的皮肤。

[0019] 第 6 项. 第 3 项的方法,进一步包括在培养基中培养该毛囊干细胞,以便产生分化的细胞。

[0020] 第 7 项. 第 3 项的方法,其中的培养基包含 FBS、BDNF、PDGF 或 CNTF。

[0021] 第 8 项. 第 6 项的方法,其中分化的细胞是神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞或脂肪细胞。

[0022] 第 9 项. 第 4 项的方法,其中的巢蛋白与绿色荧光蛋白相连。

[0023] 第 10 项. 一种治疗疾病的方法,包括将第 1 项的干细胞或由其分化所得的细胞移植入表现该疾病的哺乳动物中。

[0024] 第 11 项. 第 10 项的方法,其中的疾病是神经性或退化性疾病。

[0025] 第 12 项. 第 10 项的方法,其中的移植步骤进一步包括将干细胞通过系统性注射方式注射到哺乳动物中。

[0026] 第 13 项. 第 10 项的方法,其中的移植步骤进一步包括直接将细胞注入哺乳动物的器官或组织中。

[0027] 第 14 项. 第 13 项的方法,其中的器官或组织是脑、肝或心血管组织。

[0028] 第 15 项. 第 10 项的方法,其中的疾病选自阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、与年龄相关的记忆力减退、脱发、烧伤、皮肤老化以及皮肤替换。

[0029] 第 16 项. 第 10 项的方法,其中的干细胞是自体细胞。

[0030] 第 17 项. 第 10 项的方法,其中的干细胞是异源细胞。

[0031] 第 18 项. 分化的细胞,其是从第 1 项的毛囊干细胞分离得到的。

[0032] 第 19 项. 第 18 项的分化细胞,它是在体外分化的。

[0033] 第 20 项. 包含第 1 项所述分离的细胞的组合物在制备治疗疾病的组合物中的用途, 所述疾病是可以通过在包含将所述细胞施用到表现该疾病的受试者的方法中因产生分化的细胞而获益的疾病。

[0034] 第 21 项. 分离的毛囊干细胞, 其在生长周期阶段中的毛发生长终期从哺乳动物永久性上部毛囊紧靠脂肪腺下方的毛囊膨出区获得, 并且所述细胞表达巢蛋白, 并且所述细胞当培养在包含 FBS、BDNF、PDGF 或 CNTF 的培养基中时, 分化成神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞或脂肪细胞。

[0035] 第 22 项. 通过培养第 21 项的细胞制备的神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞或脂肪细胞。

[0036] 第 23 项. 包含第 21 项所述的细胞的组合物在制备治疗疾病的组合物中的用途, 所述疾病是可以通过在包含将所述细胞施用到表现该疾病的受试者的方法中因产生分化的细胞而获益的疾病。

[0037] 第 24 项. 包含第 22 项所述神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞或脂肪细胞的组合物在制备治疗个体疾病的组合物中的用途, 所述病症是由于将所述神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞或脂肪细胞移入所述受试者而获益的疾病。

附图说明

[0038] 图 1a-d: 在巢蛋白 -GFP 转基因小鼠皮肤的毛发生长终期的毛囊巢蛋白 -GFP 表达细胞。皮肤样品是从巢蛋白 -GFP 转基因小鼠背部皮肤切下来后, 马上新鲜制备的。皮肤样品从皮下组织切出后使真皮侧朝上, 用荧光显微镜或共聚焦显微镜直接观察。(a、b 和 c) 是荧光显微镜图像。(d) 是共聚焦显微镜图像。注意独特的钟型结构以及毛囊巢蛋白 -GFP 表达细胞 (白箭头) 在每一个毛囊中的位置。毛囊巢蛋白 -GFP 表达细胞严格定位在紧靠脂肪腺 (图 1a, 白色虚线画出) 的下方, 与已定位的毛囊干细胞相同, 该区域被称作毛囊膨出区。注意在毛囊中的巢蛋白 -GFP 表达细胞, 互相之间是通过表达巢蛋白 -GFP 的神经样细胞网络 (灰箭头) 相连。放大倍数: a100X、b 和 c200X、d400X。

[0039] 图 2: 毛囊干细胞形成新生毛囊。在毛发生长终期的 GFP 表达型毛囊干细胞 (白箭头)。GFP 毛囊干细胞形成毛发生长期早期的新毛囊 (灰箭头)。原物放大 400X。

[0040] 图 3a-g: 共聚焦图像显示, 新毛囊从膨出区的巢蛋白 -GFP 表达细胞长出, 并在毛发循环发育。毛发生长期毛囊通过脱发作用引入, 脱发是通过在 6-7 周龄 C57B16 巢蛋白 -GFP 转基因小鼠背部皮肤上用热蜡造成, 该小鼠的毛发循环通过粉红色皮肤颜色判定在毛发生长终期。(a) 是即将脱发前的样品, 显示仅有膨出区巢蛋白 -GFP 细胞定位于该膨出区。(b) 是脱发后第 2 天的样品。注意具有巢蛋白 -GFP 表达的新毛囊芽刚刚直接从膨出区巢蛋白 -GFP 干细胞形成。(c 和 d) 是脱发后第 4 和第 5 天的样品, 显示出毛发生长期早期的毛囊。注意新毛囊持续生长和发育, 伴随着巢蛋白 -GFP 的表达。(e) 是脱发后第 8 天的样品, 显示出毛发生长期中期的毛囊。注意在外根鞘上部完全形成毛囊并有巢蛋白 -GFP 表达, 在毛囊球部 (bulb) 无巢蛋白 -GFP 表达。(f 和 g) 是脱发后第 19-20 天的样品, 显示过渡期的毛囊。注意毛囊已经退化并回复至毛发膨出状态。共聚焦显微镜。放大倍数: (a, b, c 和 d) 400X, (e 和 f) 100X, (g) 200x。

[0041] 图 4: 通过免疫组化染色确定的, GFP、巢蛋白和角蛋白 5/8 和 15 在毛囊膨出区干

细胞以及外根鞘细胞中的共定位。(a) 是活组织的共聚焦图像, 显示出表达巢蛋白-GFPd 的毛囊膨出区干细胞(灰箭头), 其形成了新毛囊(白箭头)。(b) 是石蜡包埋的组织切片, 用巢蛋白抗体(1:100) 进行免疫组化染色, 其展现了巢蛋白表达的准确模式, 如同(a) 中的巢蛋白-GFP 表达。灰箭头指示巢蛋白阳性毛囊膨出区干细胞。白箭头指示新形成的巢蛋白阳性毛囊。(c) 和(d) 是巢蛋白-GFP 转基因小鼠皮肤毛囊的两个系列纵向石蜡切片, 用 GFPmAb(1:100) 和角蛋白-15mAb(1:100) 进行双免疫组化染色。GFP 用色素原固红检测, 角蛋白-15 用色素原 DAB 检测。注意巢蛋白-GFP 和角蛋白-15 在膨出区毛囊干细胞中的定位。(e, f 和 g) 是巢蛋白-GFP 转基因小鼠皮肤毛囊的系列横向石蜡切片, 分别用 GFP mAb(e, 1:100)、角蛋白 5/8mAb(f, 1:100) 和巢蛋白 mAb(g, 1:100) 进行免疫组化染色。注意 GFP、角蛋白 5/8 和巢蛋白在毛囊外根鞘细胞中的共定位。放大倍数 400 $\times$ 。

[0042] 图 5: 毛囊中表达巢蛋白-GFP 的干细胞和毛囊间的神经样细胞网络。来自巢蛋白-GFP 转基因小鼠皮肤的毛发生长终期毛囊, 显示表达 GFP 的干细胞。注意毛囊膨出区中正处在脂肪腺下方的干细胞的独特结构(白箭头)。这些囊与表达 GFP 的神经样细胞网络(灰箭头) 相连。原物放大 100 $\times$ 。

[0043] 图 6: 从毛囊分离的巢蛋白-GFP 表达细胞在体外产生多种细胞类型。(a) 从毛囊的表达巢蛋白-GFP 的细胞中生长出来的神经球。(b) 在包被的板上铺板两天后, 神经球附着于表面; 细胞开始迁移并失去其 GFP 荧光。(c) 铺板一周后, 细胞开始表达神经元的标记 β -微管蛋白(纤维样结构); 有些细胞仍表达低水平的 GFP(相对圆的亮点)。(d) 铺板两周后, GABA 阳性神经元细胞很明显。(e) 铺板一周后, 细胞开始表达星形胶质细胞的标记 GFAP; 一些细胞仍表达低水平的 GFP。

[0044] 实施本发明的模式

[0045] 在一个方面, 本发明涉及分离的毛囊干细胞。已发现毛囊细胞表达中枢神经祖细胞(progenitor) 的一种标记, 如巢蛋白。因此, 在本发明的一个方面, 这些毛囊细胞是基于该标记(巢蛋白) 的表达来分离的。

[0046] 巢蛋白是一种中间丝(intermediate filament), 它是中枢神经系统祖细胞的标记。具体地, 带有在巢蛋白调控序列控制下的绿色荧光蛋白(GFP) 的转基因小鼠已经产生, 且已用于观察 CNS 干细胞的自我更新和多能性。虽然在一个优选实施方案中, 巢蛋白可以与一种检测剂如绿色荧光蛋白相结合以便促进分离过程, 但仍预期有这些细胞的其它标记以及任何其它可检测的试剂, 可用于分离毛囊干细胞。例如, 细胞可以在体外或在原位进行测定, 并测试带有标记的结合配对物、抗体或结合核酸。在毛囊干细胞附着于固相支持物的实施方案中, 测定可以使用其它类型的信号分子, 其中非结合的信号分子可以与结合于所述细胞的信号分子分离开来。举例来说, 信号分子可以用放射性同位素(例如 ^{121}I ^{131}I ^{35}S ^{32}P ^{14}C 或 ^3H)、光散射标记(Genicon Sciences Corporation, San Diego, CA; 美国专利 6, 214, 560)、酶或蛋白标记(如 GFP 或过氧化物酶)、或另外的发色标记或染料(例如德克萨斯红) 来进行标记。另外, FACS 或其它细胞分拣机制也可用于分离细胞。

[0047] 毛囊干细胞的位置根据毛发循环而变化。在巢蛋白-GFP 转基因小鼠的毛发生长期早期, 表达巢蛋白的细胞位于毛囊的永久性上部, 在毛囊膨出区中紧靠脂肪腺的下方, 即毛囊干细胞所在之处。毛囊膨出区的巢蛋白表达细胞相对较小、为椭圆形, 并围绕在毛发杆周围, 利用短树突使它们彼此相连。图 3 显示巢蛋白表达细胞在毛囊中的定位是依赖毛发

循环的。在毛发生长终期（实施例 1 和图 1）和毛发生长期早期，GFP 阳性细胞即巢蛋白-表达细胞主要位于毛囊膨出区。在图 2 中，表达 GFP 的毛囊干细胞可见于毛发生长终期和毛发生长期早期。由于来自毛发生长终期的毛囊干细胞看起来是最初级并且是局部化的，它们优选用于收获，但可以从毛发循环的任何时期收获细胞。

[0048] 在毛发生长期的中期和晚期，GFP 表达细胞位于外根鞘上部及毛囊膨出区，不在毛发基质球中。这些观察结果表明巢蛋白表达细胞形成外根鞘，这与观察到的毛囊干细胞行为一致。免疫组化染色结果显示，巢蛋白、GFP、角蛋白 5/8 和角蛋白 15 共定位在毛囊膨出区细胞、外根鞘细胞和脂肪腺的基底细胞，如实施例 3 和图 4 所示。这些数据进一步说明，毛囊膨出区的巢蛋白-GFP 表达细胞是毛囊干细胞。受巢蛋白驱动的 GFP 还发现在囊间神经样网络中高表达，如图 5 所示。巢蛋白在神经干细胞、毛囊干细胞和毛囊间神经样网络中的共同表达，表明了它们的共同来源。实施例 6 展示了巢蛋白-GFP 干细胞向神经球的转变，如本领域内已知，后者在适宜条件下可分化成神经细胞、星形胶质细胞及可能的其它细胞类型。

[0049] 在另一方面，本发明涉及一种分离毛囊干细胞的方法，包括从哺乳动物提供或切取皮肤以及分离毛囊干细胞。优选从皮肤分离巢蛋白表达细胞，从而分离毛囊干细胞。皮肤样品可从毛发循环的任何时期获得。优选皮肤样品从毛发生长终期获得，因为据信毛囊干细胞优选定位在这一阶段，因此容易收获。尽管与这一理论无关，在毛发生长终期阶段收获细胞还能使获得的细胞处于其最原始状态。但如上面所讨论的，巢蛋白表达细胞还发现存在于毛发生长期、毛发生长期中期和毛发生长期后期。这些细胞可以利用切取的皮肤以及如优选实施方案中的分离方法来分离，但其它分离方法也可以考虑。例如，细胞可以从受试对象原位获得。

[0050] 已发现这些分离的毛囊干细胞是多能性的或具有多潜能。因此，本发明的再一个方面涉及一种分化毛囊干细胞的方法，毛囊干细胞可在各种引导分化的选定条件下培养，并产生分化的细胞如神经元、星形胶质细胞、平滑肌细胞或角质细胞及脂肪细胞，还有其它细胞。产生神经元的培养基可包括 PDGF 或 CNTF。用于星形胶质细胞的培养基包括如 GFAP。另外，用于平滑肌组织的培养基包括如 FBS。下面参考中所述的分化细胞的条件及本领域所教授的那些条件，也可用于本发明分化细胞的方法中。

[0051] 移植可按本领域内所知的任何方式来完成。在一个实施方案中，毛囊干细胞或由其分化所得的细胞经系统注射方式进入受试对象体内。在另一方面，毛囊干细胞或由其分化所得的细胞，直接注入受试对象的器官或组织中。优选该器官或组织是脑、肝或与心血管系统相关的器官或肌肉，如心脏。另外，在将被移植的合成支持物上附着或生长的细胞或组织也要予以考虑。毛囊干细胞或由其分化的细胞可以异源移植入与获得所述细胞的对象不同的受试对象中。然而，由于毛囊干细胞的易用性 (accessibility)，在一个优选实施方案中，所述细胞可以从将要治疗的受试对象获得，而且如果需要，可以使其生长以提供分化细胞，然后将这些干细胞或经分化的细胞用于自体移植。也可以考虑使用毛囊干细胞库，因为本发明中的干细胞是非常原始的 (primitive)，因此在移植时宿主将不太可能排斥这些细胞。

[0052] 很多报道 (Mezey, E. 等, Science (2000) 290 :1779-1782 ;Brazelton, T. R. 等, Science (2000) 290 :1775-1779 ;Jiang, Y. 等, Nature (2002) 418 :41-49 ;Krause, D. S. 等,

Cell (2001) 105 :369-377 ;Lagasse, E. 等, Nat. Med. (2000) 6 :1229-1234 ;Petersen, B. E. 等, Science (1999) 284 :1168-1170 ;Sata, M. 等, Nat. Med. (2002) 8 :403-409 ; Shimizu, K. 等, Nat. Med. (2001) 7 :738-741 ;Jackson, K. A. 等, J. Clin. Invest. (2001) 107 : 1395-1402 ;和 Orlic, D. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001) 98 :10344-10349) 已显示了来源于各种组织包括骨髓、皮肤和脑等的成年干细胞的可塑性。Mezey 等 (前述) 显示了移植的成年骨髓细胞迁移进小鼠的脑并分化成为可表达神经元特异性抗原的细胞。Brazelton 等 (前述), 将标记的成年小鼠骨髓细胞注射到经过致死性辐射处理的正常成年小鼠体内, 接下来观察到了来自供体的细胞在脑中表达神经元蛋白。Jiang 等 (前述) 报道, 与称为成年多能祖细胞或 MAPC 的间质干细胞共纯化的细胞, 其注入早期胚囊后可生成即使不是全部, 也是大多数的体细胞, 当其注入小鼠后, 可分化成为造血谱系以及肝、肺和肠的上皮组织。Krause 等 (前述) 显示成年骨髓细胞可分化成肝、肺、胃肠道、以及皮肤的上皮细胞。Lagasse 等 (前述) 报道成熟骨髓细胞注入 FAH(-/-) 小鼠, 即一种 I 型酪氨酸血症模型动物以后, 恢复了该小鼠肝的生化功能。

[0053] Petersen 等 (前述) 证明注射成年骨髓细胞可转变为再生的肝细胞。Sata 等 (前述) 证明骨髓细胞衍生出大多数参与小鼠动脉重建 (remodeling) 的平滑肌细胞 (SMC)。Shimizu 等 (前述) 使表达 β -半乳糖苷酶的细胞经骨髓移植进入接受了主动脉异体移植 (allograft) 的个体中, 结果证明内膜细胞包括骨髓来源的那些。Jackson 等 (前述) 发现富集的造血干细胞分化成为心肌细胞和内皮细胞, 并在小鼠中负责形成功能性组织。

[0054] Orlic 等 (前述) 报道, 在出现急性心肌梗塞时, 细胞因子介导的骨髓细胞移位可导致显著程度的心肌再生。

[0055] 然而, Terada, N. 等, Nature (2002) 416 :542-545 证明小鼠骨髓细胞在含有白细胞介素 -3 的体外培养中可自发地与胚胎干细胞融合。此外, 自发融合的骨髓细胞接下来可以采用受体细胞的表型, 这可解释为分化。另外, 最近 Wagers, A. J. 等, Science, (Sep 5, 2002) [印刷出版前已经有电子版的公开] 未能证明骨髓干细胞在体内转化成其它细胞类型。尽管这些结果提出了对成年干细胞可塑性的担心, 但表达巢蛋白的毛囊干细胞显示出更原始的分化并维持了其多能性。

[0056] 因此, 期望毛囊干细胞能提供与上述文献中报道的干细胞相似的结果, 并因此与本领域就胚胎、骨髓、脑和皮肤等其它来源的干细胞所知的一样, 可用于治疗各种疾病和情况。如此, 本发明的一个实施方案涉及一种治疗疾病的方法, 优选神经性疾病或退化性疾病, 该方法包括将分离到的毛囊干细胞移植入表现该疾病的哺乳动物中。

[0057] 预计, 经注射或移植的本发明毛囊干细胞, 在适当的条件下能分化成在脑中表达神经元蛋白的细胞, 或与上述文献中描述的体细胞类型, 造血组织, 心肌细胞, 内皮组织, 心肌组织, 肝、肺、肠、胃肠管道的上皮组织, 平滑肌组织, 皮肤, 肝组织, 动脉和心血管组织相关的细胞。在一个优选实施方案中, 毛囊干细胞或由其分化来的细胞, 用于治疗与这些器官和 / 或组织相关的疾病或障碍的方法中。

[0058] 预计, 毛囊干细胞一旦移植后, 能在体内分化并修复或再生诸如肝组织、脑组织、心血管组织等组织。另一方面, 毛囊干细胞在体外分化, 且分化的细胞同样可用于治疗疾病如神经疾病或退化疾病。在一个更优选实施方案中, 毛囊干细胞或由其分化的细胞用于治疗选自下组的疾病: 阿尔茨海默氏病, 帕金森氏病和与年龄相关的记忆力减退。另外, 毛囊

干细胞或由其分化的细胞可用于治疗脱发或皮肤替换,或治疗诸如烧伤或皮肤老化等与表皮相关的情况。此外,可用毛囊干细胞或由其分化的细胞治疗的疾病或障碍还涉及心血管疾病或肝病。对其它疾病的治疗如下详述。

[0059] 另外,本发明考虑利用表达系统来研究和治疗下文详述的疾病。本发明还考虑利用干细胞在体外测定毛囊干细胞的各种分化潜能。

[0060] 另外,对于上面所述的具体疾病和障碍来说,可以考虑将本发明的毛囊干细胞或由其分化的细胞用于干细胞治疗,以便治疗细胞增生和 / 或分化疾病、与骨代谢相关的疾病、心血管疾病、包括内皮细胞疾病、肝疾病、或脑疾病,优选脑或肝疾病,更详细的描述如下。

[0061] 细胞增生和 / 或分化疾病的实例包括癌症 (cancer), 例如癌 (carcinoma)、肉瘤、转移性疾病或造血性瘤形成疾病、例如白血病。转移性肿瘤可发生于多种原发性肿瘤类型,包括但不限于前列腺、结肠、肺、乳腺和肝来源的那些。

[0062] 本文术语“癌症 (cancer)” (可与术语“增生性”和“致瘤性”交换使用) 是指有自主生长能力的细胞,即以细胞的迅速增殖为特征的非正常状态。癌症的疾病状况可以是病理性的,即表现或形成疾病状态,例如,恶性肿瘤生长;或可以是非病理性的,即偏离了正常状态而又不与疾病状态相关,例如,与创伤修复相关的细胞增殖。该术语包括所有类型的癌症生长或致癌过程、转移性组织或恶性转化的细胞、组织或器官,而不考虑组织病理学类型或入侵时期。术语“癌症”包括各种器官系统的恶病质,例如影响肺、乳房、甲状腺、淋巴、胃肠和泌尿生殖道的那些,还包括恶性腺癌如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和 / 或睾丸肿瘤,非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。术语“癌 (carcinoma)”为本领域认可,是指上皮或内分泌组织的恶病质,包括呼吸系统癌、胃肠系统癌、泌尿生殖系统癌、睾丸癌、乳房癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑色素瘤。典型的癌包括那些由宫颈、肺、前列腺、乳房、头部和颈部、结肠和卵巢的组织形成的癌。术语“癌”也包括肉瘤,例如包括由癌组织和肉瘤样组织组成的恶性肿瘤。“腺癌”是指从腺体组织衍生的癌或其中肿瘤细胞形成可辨认的腺体结构的癌。术语“肉瘤”为本领域认可,是指间叶细胞衍生的恶性肿瘤。

[0063] 本发明的毛囊干细胞或由其衍生的分化细胞可用于治疗各种增生性疾病。这些疾病包括造血性瘤形成疾病。本文术语“造血性瘤形成疾病”包括与造血来源的增生性 / 瘤形成性细胞,例如从髓细胞、淋巴或红细胞谱系、或其前体细胞生成的细胞相关的疾病。优选所述疾病起因于低分化急性白血病、如幼红细胞白血病和急性原始巨核细胞白血病。骨髓疾病的其它实例包括,但不限于急性前髓细胞白血病 (APML)、急性骨髓性白血病 (AML) 以及慢性骨髓性白血病 (CML) (综述于 Vaickus, L. (1991) Crit Rev. in Oncol. Hematol. 11: 267-297); 淋巴恶病质包括,但不限于急性淋巴母细胞白血病 (ALL), 其中包括 B- 谱系 ALL 和 T- 谱系 ALL, 慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、前淋巴细胞白血病 (PLL)、毛细胞 (hairy cell) 白血病 (HLL) 以及 Waldenstrom' s 巨球蛋白血症 (WM)。其它形式的淋巴恶病质包括,但不限于非-Hodgkin 淋巴瘤及其变体、外周 T 细胞淋巴瘤、成熟 T 细胞白血病 / 淋巴瘤 (ATL)、皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)、大颗粒淋巴细胞白血病 (LGL)、Hodgkin' s 疾病和 Reed-Sternberg 疾病。

[0064] 本发明的毛囊干细胞或由其分化所得细胞,可用于治疗与骨代谢相关的疾病。“骨代谢”是指骨骼结构的形成或退化中的直接或间接作用,如骨形成、骨吸收等,它们能最终

影响血清中钙和磷酸盐的浓度。该术语还包括骨骼细胞如破骨细胞和成骨细胞的活动,其导致骨骼形成和退化。例如,本发明中的毛囊干细胞或由其分化所得细胞,可用于治疗骨吸收性破骨细胞的不同活性,如刺激单核细胞和单核吞噬细胞分化成为破骨细胞。因此,本发明中的毛囊干细胞或由其分化所得细胞,可以用于产生可影响骨骼形成和退化的骨骼细胞,并因此可用于治疗骨骼疾病。此类疾病的实例包括,但不限于,骨质疏松、骨营养不良、骨软化症、佝偻病、囊性纤维性骨炎、肾性骨营养不良、骨硬化、抗惊厥治疗、骨质减少、骨纤维不全发生、次级甲状腺功能亢进、甲状腺功能减退、甲状腺功能亢进、硬化、阻塞性黄疸、药物诱导性新陈代谢、骨髓瘤、慢性肾病、佝偻病、肉状瘤病、糖皮质激素拮抗、吸收障碍综合征、脂肪泻、热带口炎性腹泻、先天血钙过多以及牛奶热。

[0065] 本文中,与心脏有关的疾病或“心血管疾病”包括,影响心血管系统,例如心脏、血管、和/或血液的疾病或障碍。心血管疾病可由动脉压力不平衡、心脏功能不良、或血管闭塞(如血栓引起)造成。心血管疾病包括,但不限于诸如动脉硬化、缺血再灌注损伤、再狭窄、动脉炎、脉管壁重塑、心室重塑、快速心室起搏、冠状微栓、心动过速、心搏徐缓、压力过载、大动脉弯曲、冠状动脉结扎、脉管心脏病、阀门疾病、心房纤维性颤动、长-QT 综合征、充血性心力衰竭、窦结官能疾病、心绞痛、心衰、高血压、心房纤维性颤动、心房扑动、心肌病、例如扩张性心肌病或特发性心肌病、心肌梗塞、冠状动脉疾病、冠状动脉痉挛、缺血性疾病、心律不齐、以及心血管发育疾病(例如动脉畸形、动静脉漏管、雷诺综合征、神经源性胸廓出口综合征、灼痛/反射交感神经营养失调、血管瘤、动脉瘤、海绵状血管瘤、大动脉阀狭窄、房间隔缺损、房室管、大动脉收缩、埃布施泰因异常、左心发育不全综合征、大动脉弓断裂、二尖瓣脱垂、动脉导管、开放性卵圆孔、局部异常肺静脉回流、肺动脉瓣闭锁伴随心室隔膜缺陷、肺动脉瓣闭锁不伴随心室隔膜缺陷、持续性胎循环、肺部阀门狭窄、单心室、全部异常肺静脉回流、大血管变换、三尖瓣闭锁、动脉干、心室隔膜缺陷)。心血管疾病或障碍也包括内皮细胞疾病。

[0066] 本文中,“内皮细胞疾病”包括以异常的、失控的、或不必要的内皮细胞活性为特征的疾病,例如增生、迁移、血管发生、或血管形成;或细胞表面粘附分子或血管发生相关基因,例如TIE-2,FLT和FLK的异常表达。内皮细胞疾病包括肿瘤发生、肿瘤转移、牛皮癣、糖尿病性视网膜病、子宫内膜异位、格雷夫斯病、缺血性疾病(例如,动脉粥样硬化),以及慢性炎症(例如,类风湿性关节炎)。

[0067] 可以用这里描述的方法治疗的疾病包括,但不限于此,与肝部纤维化组织累积相关的疾病,例如因细胞外基质的生成和降解失衡并伴随着现有纤维的萎缩和浓缩而产生的疾病。这里描述的方法可以用于治疗由多种因素引起的肝细胞坏死或损伤,所述因素包括扰乱内环境稳态的过程,如炎症过程,由毒性损伤或变化了的肝血流量引起的组织损伤,以及感染(例如,细菌性的、病毒性的和寄生性的)。例如,所述方法可用于治疗肝脏损伤,如门静脉高压或肝纤维化。

[0068] 此外,所述方法可以应用于治疗由先天性新陈代谢错误导致的肝脏纤维化,例如,由贮积病如戈谢病(脂质异常)或肝糖元贮积病、AI-抗胰蛋白酶缺乏引起的纤维化;调控外源物质积聚(如贮存)的疾病,如,血色素沉着病(铁超载综合征)和铜贮积病(威尔逊病);由毒性代谢物(如,酪氨酸血症、果糖血症和半乳糖血症)积聚和过氧化物疾病(如,泽尔韦格综合征)引起的疾病。此外,这里描述的方法可用于与多种化学品或药物服

用有关的肝脏损伤的治疗,如氨甲蝶呤、异烟肼、酚丁、甲基多巴、氯丙嗪、甲苯磺丁脲或酒精,或表现肝脏显性的血管疾病,如或者肝内或者肝外的胆汁流阻塞或由例如慢性心力衰竭、静脉闭塞病、门静脉血栓症或巴-吉综合征引起的肝循环改变。

[0069] 涉及脑的疾病包括但不限于涉及神经元的疾病以及涉及神经胶质的疾病,诸如星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞以及小胶质细胞;脑水肿、颅内压升高和形成氘、以及脑积水;畸形和发育疾病如神经管缺陷、前脑异常、后窝异常、以及脊髓空洞症和脊髓积水;围产期脑损伤;脑血管疾病如那些涉及缺氧、局部缺血、以及梗塞、包括血压过低、低灌注和低流速状态-球形脑局部缺血和焦点脑局部缺血-来自局部供血疾病的梗塞、颅内出血、包括脑内(实质内)出血、蛛网膜下出血和浆果样动脉瘤破裂、以及脉管畸形、高血压脑血管疾病、包括腔隙梗塞、裂隙出血、以及高血压脑病;感染如急性脑膜炎、包括急性化脓性(细菌)脑膜炎和急性无菌性(病毒)脑膜炎、急性焦点化脓性感染、包括脑脓肿、硬膜下积脓症、以及硬膜外脓肿、慢性细菌脑膜炎、包括肺结核和分支杆菌、神经梅毒、以及神经螺旋体病(莱姆病)、病毒性脑膜炎、包括节肢动物来源(Arbo)的病毒脑炎、I型单纯疱疹病毒、II型单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒(带状疱疹)、巨细胞病毒、脊髓灰质炎、狂犬病、以及人类免疫缺陷病毒1、包括HIV-1脑膜炎(亚急性脑炎)、空泡脊髓病、AIDS-有关的肌病、外周神经病、以及小孩中的AIDS、进行性多灶性脑白质炎、亚急性硬化全脑炎、真菌性脑膜炎、其它神经系统的传染性疾病;可遗传的海绵状脑病(朊病毒疾病);脱髓鞘疾病、包括多发性硬化症、多发性硬化症变体、急性弥散型脑脊髓炎以及急性坏死性出血脑脊髓炎、以及其它有脱髓鞘现象的疾病;退化性疾病、如影响脑皮质的退化性疾病、包括阿耳茨海默氏病和Pick疾病、基本神经中枢和脑干的退化性疾病、包括帕金森病、先天帕金森疾病(agitans 麻痹)、进行性核上瘫痪、皮质基层的退化、多重系统萎缩、包括纹状体黑质变性、ShyDrager 综合症、以及橄榄体脑桥小脑萎缩症、和Huntington 疾病;脊髓小脑退化、包括脊髓小脑共济失调、包括Friedreich 共济失调、以及毛细血管扩增共济失调、影响运动神经元的退化性疾病、包括肌萎缩侧面硬化症(运动神经元疾病)、脊柱球萎缩(Kennedy 综合症)、以及脊柱肌肉萎缩;先天性新陈代谢偏差、如脑白质营养不良、包括Krabbe 疾病、异染性脑白质营养不良、肾上腺白质营养不良、佩-梅病疾病、以及Canavan 疾病、线粒体脑脊髓疾病、包括Leigh 疾病和其它线粒体脑脊髓疾病;中毒和获得性新陈代谢疾病、包括维生素缺陷如硫胺素(维生素B1)缺陷和维生素B12缺陷、新陈代谢疾病造成的神经后遗症、包括低血糖症、高血糖症、以及肝脑病、中毒性疾病、包括一氧化碳、甲醇、乙醇、以及辐射、包括混合的氨甲蝶呤和辐射诱导伤害;肿瘤、如神经胶质瘤、包括星细胞瘤、包括原纤维(扩散)星细胞瘤和多形性成胶质细胞瘤、纤维状细胞星细胞瘤、多行性黄色星细胞瘤、以及脑干神经胶质瘤、少突神经胶质瘤、以及室管膜瘤和有关的心室旁大面积损伤、神经元瘤、缺乏分化瘤、包括成神经管细胞瘤、其它实质瘤、包括初级脑淋巴瘤、病菌细胞瘤、以及松果腺实质瘤、脑膜瘤、转移性肿瘤、伴瘤形成综合症、外周神经鞘肿瘤、包括神经鞘及纤维神经瘤、以及恶性外周神经鞘瘤(恶性神经鞘)、以及神经皮肤综合症(斑痣性错构瘤病)、包括神经纤维瘤病、包括I型神经纤维瘤病(NF1)和2型神经纤维瘤病(NF2)、结节硬化症、以及Von Hippel-Lindau 病。

[0070] 下面的实施例目的在于说明而不是限制本发明。

[0071] 实施例 1

[0072] 对毛发生长终期巢蛋白-表达细胞的观察

[0073] 巢蛋白是一种中间丝 (IF) 基因,是中枢神经系统 (CNS) 祖细胞和神经上皮干细胞的标记 (Lendahl, U. 等, Cell(1990)60 :585-596)。携带受巢蛋白第二内含子增强子控制的强化绿色荧光蛋白 (EGFP) 的巢蛋白-EGFP 转基因小鼠,可用于研究和观察 CNS 干细胞的自我更新和多能性 (Lendahl 等, (supra) ;Zimmerman, L 等, Neuron(1994)12 :11-24 ; and Kawaguchi, A., Molecular and Cellular Neuroscience(2001)259-273)。我们在巢蛋白-EGFP 小鼠中观察到,巢蛋白在毛囊干细胞以及毛囊间神经样网络中强表达。

[0074] 对毛发生长终期的巢蛋白-GFP 皮肤样品,使真皮朝上、表皮朝下,在配有荧光镜片的尼康荧光显微镜下直接观察。另外,使用固定在尼康 Optiphot 上的 MRC-600 共聚焦图像系统 (Bio-Rad),用 10X PlanApo 物镜,对这些皮肤样本进行共聚焦显微镜观察。结果发现,巢蛋白表达细胞仅仅出现在毛囊膨出区中以及毛发生长终期的毛囊的永久性上部、正好位于脂肪腺之下,并且在这些部位为优势群体 (图 1)。这些细胞相对较小、为纺锤形、椭圆形或圆形 (图 2)。

[0075] 实施例 2

[0076] 毛发循环中巢蛋白表达细胞的比较

[0077] 我们观察到巢蛋白表达细胞的定位是依赖毛发循环的。为了确定这些巢蛋白-GFP-表达细胞是如何与毛囊发育相关联的,将 7-8 周龄、处于毛发生长终期的小鼠通过脱毛来诱导毛发生长期。分别在将要脱毛前 (毛发生长终期),以及脱毛后 1、2、3、4 和 5 天 (毛发生长期早期)、8 和 10 天 (毛发生长期中期)、15 和 16 天 (毛发生长期晚期)、19 和 20 天 (过渡期),从背部皮肤切取皮肤样品 (5x5 mm²)。如上面所提到的,在毛发生长终期,毛囊中的巢蛋白表达细胞仅位于毛囊膨出区的永久性上部。当新的毛发循环被诱导后,毛发生长期毛囊开始生长。在脱毛两到三天后,表达巢蛋白的新毛囊细胞直接从位于膨出区的巢蛋白-GFP-表达细胞增殖。在毛发循环处于再生期的中期和晚期时,表达巢蛋白的毛囊细胞特异性定位于外根鞘上部三分之二处,而在毛囊或毛发基质球的下部三分之一没有表达。表达巢蛋白的外根鞘细胞在整个毛发生长期和过渡期都可观察到。在过渡期,当毛发球基质细胞经受衰退和退化时,外根鞘巢蛋白-GFP-表达细胞存留下来并随着毛囊的收缩而减少,最终在新的毛发生长终期到来时发现仅存在于毛囊膨出区 (图 3)。

[0078] 膨出区巢蛋白-GFP-表达细胞在毛发循环中的动力学循环模式强烈提示它们是毛囊干细胞,并首次提供了活干细胞形成新毛囊结构的直接证据。通过在毛发循环期间跟踪巢蛋白-GFP 表达细胞,我们的观察证实膨出区细胞实际上形成了毛囊结构。我们的结果被其它人的发现有力支持。最近,Oshima 等.(上述)报道,成年小鼠触须囊外根鞘的上部区域含有多能干细胞,它们能够应答形态信号来产生复毛囊、脂肪腺和表皮。这些发现与我们对根鞘外部巢蛋白-GFP-表达的观察一致。

[0079] 实施例 3

[0080] 巢蛋白-表达毛囊干细胞的进一步鉴定

[0081] 为了进一步鉴定这些巢蛋白-GFP-表达型毛囊干细胞,在石蜡包埋的野生型 C57B16 和巢蛋白-GFP 转基因小鼠皮肤中,通过免疫组化测定巢蛋白 (1:80, Rat401, DSHB, University of Iowa, Iowa City, IA)、GFP (1:100, Boehringer Mannheim)、角蛋白 5/8 (1:250, Chemico International, Temecula, CA) 以及作为毛囊干细胞潜在标记之一的角蛋白

15(1:100, Chemico International, Temecula, CA) 的共定位。免疫组化染色使用了 DAKO ARK animal research kit 或 DAKO EnVision Doublestain System 以及色素原 DAB(3,3'-二氨基联苯胺) 或核固红。免疫组化染色结果(图 4) 说明, 巢蛋白、GFP、角蛋白 5/8 和角蛋白 15 共定位在毛囊膨出区细胞、外根鞘细胞和脂肪腺基底细胞中。这些数据进一步证明毛囊膨出区的巢蛋白 -GFP- 表达细胞是毛囊干细胞。

[0082] 我们还观察到整个皮肤层中巢蛋白 - 表达细胞的“神经样”三维网络, 所述皮肤层包括联系着毛囊的表皮、毛囊、真皮、皮下和肉膜(图 5)。这些细胞的真实特点和功能还需进一步证实。因此, 巢蛋白在毛囊干细胞及毛囊间神经样网络中的表达, 提示与神经干细胞的相关性。

[0083] 实施例 4

[0084] 毛囊干细胞的分离

[0085] 为了进一步鉴定这些巢蛋白 -GFP 表达型毛囊干细胞是否多能干细胞, 我们分离了毛囊膨出区的巢蛋白 -GFP- 表达干细胞, 并对它们进行了体外培养。将毛发生长终期的巢蛋白 -GFP 转基因小鼠皮肤样品切下并切碎。接着将切碎的组织用胰蛋白酶(0.25%)、胶原酶(0.4%) 和分散酶(1.0%) 的混合物在 37℃ 消化 2 小时。在配有荧光镜片的解剖显微镜下, 分离出毛囊膨出区中带有巢蛋白 -GFP 表达细胞的单个毛囊。然后在荧光解剖显微镜下, 进一步用精细的注射器分离出毛囊膨出区的巢蛋白 -GFP 表达细胞。

[0086] 实施例 5

[0087] 干细胞的生长

[0088] 将来自毛囊膨出区的巢蛋白 -GFP- 表达细胞转移至没有补加生长因子的 M21 培养基, 该培养基是用来培养神经球的典型的神经维持培养基(Uchida, N. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(2000)97:14720-14725)。12 天后出现神经球样集落。在另一个实验中, 从毛囊膨出区分离的巢蛋白 -GFP- 表达细胞以 10 细胞/mm² 生长于含有甲基纤维素(1.2%) 的神经干细胞培养基中, 并每两天补加表皮生长因子(EGF)(20ng/ml)、成纤维细胞生长因子(FGF)(20ng/ml) 和白血病抑制因子(Lif)(10ng/ml)。当球在培养基中出现后, 将其转移至新的无甲基纤维素的培养板中。从初级球产生了次级球。接下来对这些球的分化潜力进行检测。

[0089] 实施例 6

[0090] 分化培养试验

[0091] 将球接种在多鸟氨酸/层粘连蛋白包被的培养板上, 在分别存在胎牛血清(FBS)(5%)、脑源神经生长因子(BDNF)(10ng/ml)、血小板衍生生长因子(PDGF)(10ng/ml) 和睫状神经生长因子(CNTF)(10ng/ml) 的 Dulbecco's 改良型 Eagles 培养基(DMEM)-F12 上培养。然后, 这些细胞用针对神经元(β -III 微管蛋白, 1:500, Promega)、星形胶质细胞(GFAP, 1:300, Sigma)、平滑肌细胞(SMA, 1:300, Sigma) 和角质细胞(Pan-keratin, 1:100, Sigma) 的标记进行免疫化学染色来分析。脂肪细胞通过目测观察来确定(图 6)。

[0092] 在有 BDNF 时生长的球对 β -III 微管蛋白和 GABA 具有免疫反应性, 表明存在神经元。在有 PDGF 时生长的球主要产生神经元, 有时产生 GFAP 阳性细胞, 表明存在星形胶质细胞。在有 CNTF 时生长的细胞仅产生 β -III 微管蛋白阳性细胞, 表明为神经元。所有在 FBS 存在下生长的球分化成为平滑肌肌动蛋白(SMA) 阳性细胞, 少数为角质细胞。

[0093] 基于我们的观察和实验数据,我们得出结论:1) 巢蛋白-GFP 表达证明膨出区细胞是毛囊干细胞。这是首次证明膨出区细胞实际上有干细胞功能。2) 毛囊干细胞表达巢蛋白的事实提示它们与神经干细胞有关。3) 毛囊通过表达巢蛋白-GFP- 的神经样网络相联系。4) 毛囊干细胞在适当的条件下可以形成包括神经元细胞在内的多种细胞类型,提示它们在体内有形成脑细胞的潜能。

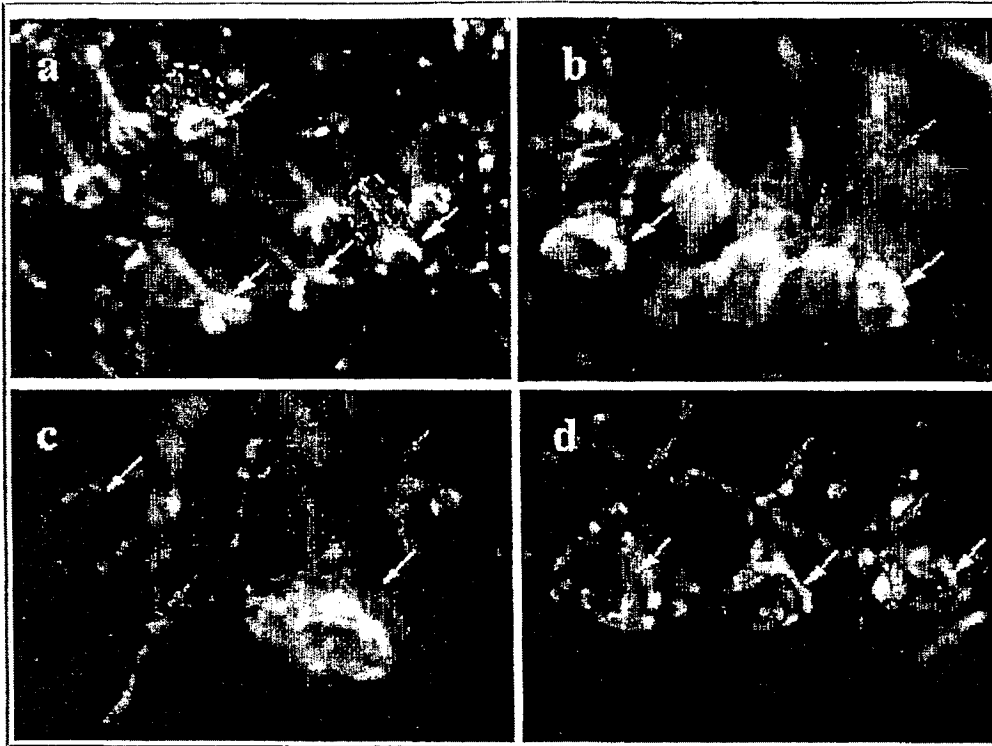


图 1



图 2

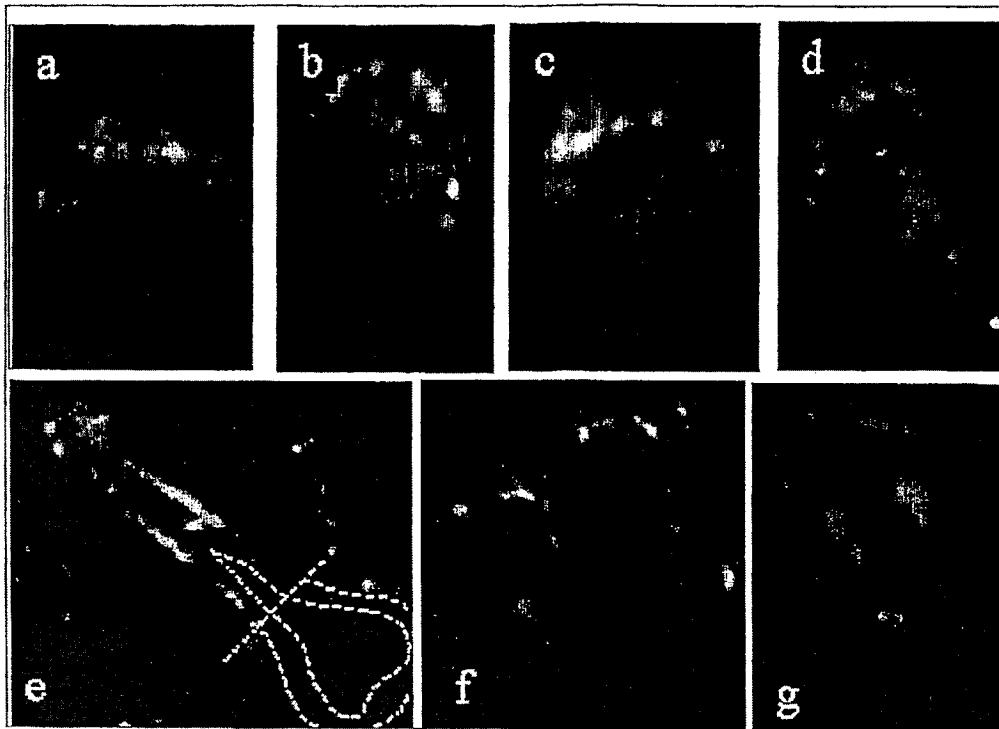


图 3



图 4



图 5

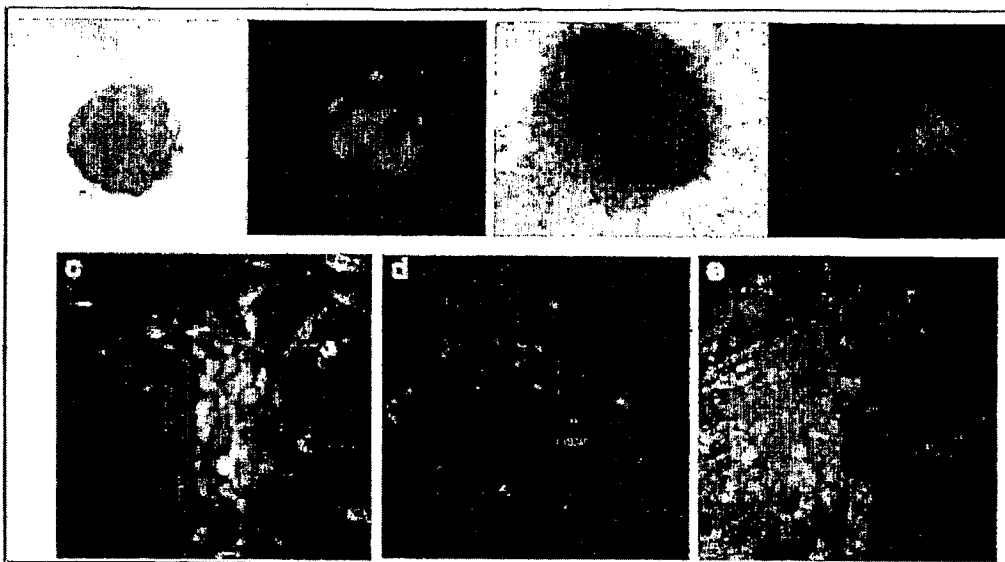


图 6