(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106163572 B
(45)授权公告日 2021.09.14

(21)申请号 201580011343.0
(22)申请日 2015.03.03
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106163572 A
(43)申请公布日 2016.11.23
(30)优先权数据
10-2014-0025095 2014.03.03 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.08.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2015/002039 2015.03.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/133792 KO 2015.09.11
(73)专利权人 蔚山科学技术院
地址 韩国蔚山广域市
(72)发明人 金正范 朴秀容
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 王玮玮 郑霞
(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 9/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2012006440 A2,2012.01.12
WO 2013181326 A1,2013.12.05
WO 2013181326 A1,2013.12.05
审查员 杨光

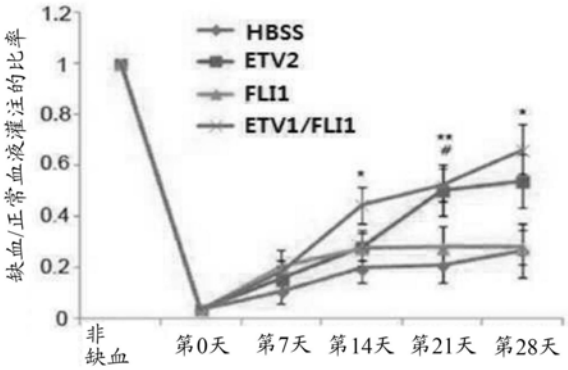
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

用于诱导体细胞直接转分化为血管祖细胞的组合物及其用途

(57)摘要

本发明涉及用于诱导体细胞直接转分化为血管祖细胞的组合物以及其用途，且更具体地，涉及一种用于诱导体细胞直接转分化为血管祖细胞的组合物、一种用于预防或治疗缺血性血管疾病的药物组合物、一种用于预防或治疗缺血性血管疾病的细胞治疗剂、一种用于筛选用于缺血性血管疾病的治疗药物的组合物、一种用于制备用于治疗缺血性血管疾病的人工组织的3D打印生物材料组合物、以及一种用于将体细胞直接转分化为血管祖细胞的方法。根据本发明通过制备由体细胞直接转分化的血管祖细胞，降低血管祖细胞的制备周期，并且避免是诱导多能干细胞的副作用的畸胎瘤的形成，由此使干细胞治疗剂的副作用最小化是可能的。



CN 106163572 B

1.一种用于诱导体细胞直接转分化为血管祖细胞的组合物，其中所述组合物包含选自由(1)FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)和(2)FLI1和ETV2(ETS变体基因2)的组合组成的组中的蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、或包含所述核酸分子的载体，作为活性成分，其中所述体细胞是选自由以下组成的组的细胞：成纤维细胞、肌细胞、神经细胞、胃粘膜细胞、杯状细胞、G细胞、周细胞、星形胶质细胞、B细胞、血细胞、上皮细胞、神经干细胞、造血干细胞、脐带血干细胞及间充质干细胞。

2.根据权利要求1所述的组合物，其中所述载体是选自由以下组成的组的至少一种：质粒载体、粘粒载体、病毒载体及附加型载体。

3.根据权利要求2所述的组合物，其中所述病毒载体是选自由以下组成的组的至少一种：逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒，及单纯疱疹病毒载体。

4.根据权利要求3所述的组合物，其中所述逆转录病毒载体是选自由以下组成的组的至少一种：慢病毒载体、HIV(人类免疫缺陷病毒)载体、MLV(鼠白血病病毒)载体、ASLV(禽肉瘤/白血病)载体、SNV(脾坏死病毒)载体、RSV(劳斯肉瘤病毒)载体、及MMTV(小鼠乳腺肿瘤病毒)载体。

5.一种血管祖细胞，所述血管祖细胞通过由将选自由(1)FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)和(2)FLI1和ETV2(ETS变体基因2)的组合组成的组中的蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、或包含所述核酸分子的载体引入至体细胞的直接转分化来诱导，其中所述体细胞是选自由以下组成的组的细胞：成纤维细胞、肌细胞、神经细胞、胃粘膜细胞、杯状细胞、G细胞、周细胞、星形胶质细胞、B细胞、血细胞、上皮细胞、神经干细胞、造血干细胞、脐带血干细胞及间充质干细胞。

6.一种用于预防或治疗缺血性血管疾病的药物组合物，其中所述组合物包含选自由(1)FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)和(2)FLI1和ETV2(ETS变体基因2)的组合组成的组中的蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、包含所述核酸分子的载体、或权利要求5所述的通过直接转分化诱导的血管祖细胞。

7.根据权利要求6所述的药物组合物，其中所述缺血性血管疾病是脑血管疾病、心血管疾病、肢体缺血、外周血管疾病或缺血性肌坏死。

8.一种用于制备用于治疗缺血性血管疾病的人工组织的3D打印的组合物，其中所述组合物包含选自由(1)FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)和(2)FLI1和ETV2(ETS变体基因2)的组合组成的组中的蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、包含所述核酸分子的载体、或权利要求5所述的通过直接转分化诱导的血管祖细胞。

9.一种用于在体外将分离的体细胞直接转分化为血管祖细胞的方法，所述方法包括将选自由(1)FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)和(2)FLI1和ETV2(ETS变体基因2)的组合组成的组中的蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、或包含所述核酸分子的载体引入至所述分离的体细胞，其中所述体细胞是选自由以下组成的组的细胞：成纤维细胞、肌细胞、神经细胞、胃粘膜细胞、杯状细胞、G细胞、周细胞、星形胶质细胞、B细胞、血细胞、上皮细胞、神经干细胞、造血干细胞、脐带血干细胞及间充质干细胞。

用于诱导体细胞直接转分化为血管祖细胞的组合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于诱导体细胞直接转分化为血管祖细胞的组合物以及一种用于使用以上的组合物将体细胞直接转分化为血管祖细胞和血管细胞的方法，所述组合物包含选自由直接转分化因子ETV2和FLI1的每个的蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、以及用于通过引入编码所述蛋白的核酸分子表达所述蛋白的载体组成的组的至少一种。另外，本发明涉及药物组合物、细胞治疗剂、筛选药物的组合物或用于制备人工组织的3D打印生物材料组合物，其的每一个包含通过用于体细胞的直接转分化的以上的方法诱导的血管祖细胞和血管细胞，由此被用来预防或治疗缺血性血管疾病。

背景技术

[0002] 血管形成过程主要分为两种类型，即血管发生(vasculogenesis)和血管形成(angiogenesis)，在血管发生中成血管细胞或血管祖细胞分化以形成原始血管网，在血管形成中新血管由现存的血管形成。在血管发生期间，血管祖细胞分化为血管内皮细胞等，产生主要的血管。取决于血管祖细胞的分化模式，血管发生可包括1型血管发生和2型血管发生，在1型血管发生中，如在身体内的血管的产生中一样，血管内皮细胞原位分化；在2型血管发生中，如在心内膜或颅区域中的血管的形成中一样，当血管祖细胞迁移过某段显著的距离并然后分化时2型血管发生出现。这在炎症、肿瘤等的多种病理状态，以及生理状态(诸如伤口愈合、排卵和怀孕，包括胎儿发育过程)中充当重要的机制，并因此正在研究中。

[0003] 血管损伤引起多种缺血性疾病，且可从根本上通过恢复内源性细胞或移植用于形成血管的功能性血管细胞来治疗。在这方面，通过移植功能血管细胞的治疗是有问题的，由于分化血管细胞的有效方法不容易得到，并且由于获得大量的细胞是困难的。

[0004] 此外，已提出了诱导胚胎干细胞(ESC)及诱导多能(pluripotent)干细胞分化为血管细胞的方法，但，所述方法是不利的，由于诱导为感兴趣的细胞的效率是低的，且在分化为特定的细胞后存在来自胚胎干细胞或多能干细胞的活化肿瘤基因的风险。此外，尽管诱导的多能干细胞能够避免与胚胎破坏相关的伦理问题，并且耐受当被移植时的免疫系统排斥，如在胚胎干细胞中一样，它们不期望地易于形成畸胎瘤。

[0005] 另外，由体细胞通过直接转分化制备血管祖细胞的方法尚未被报道。特别地，由体细胞通过ETV2(ETS变体基因2)或FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1(Friend leukemia virus integration 1))的转导的直接转分化的血管细胞多潜能性(multipotency)的建立是未知的。

[0006] 公开内容

[0007] 技术问题

[0008] 因此，本发明的一个目的是提供了一种用于诱导体细胞直接转分化为血管祖细胞的组合物，所述组合物包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、或具有被引入至其的所述核酸分子的载体，作为活性成分。

[0009] 本发明的另一个目的是提供了一种用于预防或治疗缺血性血管疾病的药物组合物、一种用于预防或治疗缺血性血管疾病的细胞治疗剂、一种用于筛选用于治疗缺血性血管疾病的药物的组合物、或一种用于制备用于治疗缺血性血管疾病的人工组织的3D打印生物材料组合物，其的每一个包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、具有被引入至其的所述核酸分子的载体、或通过直接转分化诱导的血管祖细胞，作为活性成分。

[0010] 本发明的仍另一个目的是提供了一种用于体细胞直接转分化为血管祖细胞的方法。

[0011] 技术方案

[0012] 为了实现以上目的，本发明提供了一种用于诱导体细胞直接转分化为血管祖细胞的组合物，所述组合物包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、或包含所述核酸分子的载体，作为活性成分。

[0013] 另外，本发明提供了一种血管祖细胞，所述血管祖细胞通过由将选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、或包含所述核酸分子的载体引入至体细胞的直接转分化来诱导。

[0014] 另外，本发明提供了一种用于预防或治疗缺血性血管疾病的药物组合物，所述药物组合物包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、包含所述核酸分子的载体、或通过直接转分化诱导的血管祖细胞，作为活性成分。

[0015] 另外，本发明提供了一种用于预防或治疗缺血性血管疾病的细胞治疗剂，所述细胞治疗剂包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、包含所述核酸分子的载体、或通过直接转分化诱导的血管祖细胞，作为活性成分。

[0016] 另外，本发明提供了一种用于筛选用于治疗缺血性血管疾病的药物的组合物，所述组合物包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、包含所述核酸分子的载体、或通过直接转分化诱导的血管祖细胞，作为活性成分。

[0017] 另外，本发明提供了一种用于制备用于治疗缺血性血管疾病的人工组织的3D打印生物材料组合物，所述3D打印生物材料组合物包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、包含所述核酸分子的载体、或通过直接转分化诱导的血管祖细胞，作为活性成分。

[0018] 另外，本发明提供了一种用于将体细胞直接转分化为血管祖细胞的方法，所述方法包括将选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、或包含所述核酸分子的载体引入至体细胞。

[0019] 有益效果

[0020] 根据本发明，血管祖细胞可由体细胞通过直接转分化来制备，由此降低制备血管祖细胞所需的时间周期，并且避免是诱导的多能干细胞的功能障碍的畸胎瘤的形成，最终使干细胞治疗剂的副作用最小化。

附图说明

[0021] 图1示出了编码ETV2的互补DNA的慢病毒的切割图；

[0022] 图2示出了编码FLI1的互补DNA的慢病毒的切割图；

[0023] 图3示出了在感染5天之后的ETV2和FLI1的表达的RT-PCR结果；

[0024] 图4示出了通过转化ETV2、FLI1或ETV2/FLI1诱导的血管祖细胞随时间的相差图；

[0025] 图5是显示作为诱导的血管祖细胞的分化标志物的vWF、α-SMA和CD31的表达的免疫荧光图；

[0026] 图6示出了，在将诱导的血管祖细胞移植进小鼠之后，基于彩色直方图像素计算的随时间变化的血流量；以及

[0027] 图7示出了在将诱导的血管祖细胞移植进小鼠之后的缺血性/非缺血性肢体血流量比率。

[0028] 最佳模式

[0029] 本发明提出了一种用于诱导体细胞直接转分化为血管祖细胞的组合物，所述组合物包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、或具有被引入至其的所述核酸分子的载体，作为活性成分。

[0030] 在本发明中，ETV2(ETS变体基因2)是ETS(E26转化特异性因子或E-二十-六)家族的成员，并且以NCBI注册号NM_014209.3注册。已知ETS因子与胚胎血管发育相关。特别地，已知ETV2在血管内皮的分化中执行主要调控功能，但其用于诱导体细胞直接转分化为血管祖细胞的功能是完全未知的。

[0031] 此外，FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)是ETS家族的成员，并且以NCBI注册号NM_002017.4注册。通过组成型活化在成红血细胞中抑制红细胞的分化是已知的。特别地，FLI1用于诱导直接转分化为血管祖细胞的功能如同ETV2一样是完全未知的。

[0032] 在本发明中，ETV2、FLI1或其组合可以以蛋白或编码蛋白的核酸的形式来提供，且蛋白可包括来源于以下的任何ETV2或FLI1蛋白：人类或动物，诸如小鼠、马、绵羊、猪、山羊、骆驼、羚羊以及狗。此外，在本发明中使用的ETV2或FLI1蛋白不仅包括具有野生型氨基酸序列的蛋白，还包括ETV2或FLI1蛋白的蛋白变体。

[0033] 术语“蛋白变体”指至少一个氨基酸残基与ETV2或FLI1蛋白的天然氨基酸序列不同的蛋白，该不同起因于缺失、插入、非保守的或保守的取代或者其组合。变体可以是显示与天然蛋白相同生物活性的功能等同物，可以是其中蛋白的物理和化学性质根据需要被修改的变体，或可以是其的结构稳定性在某些物理或化学条件下增加或其的生理活性增加的变体。

[0034] 在本发明中，编码ETV2或FLI1的核酸可具有编码野生型或变体型ETV2或FLI1蛋白的碱基序列，并且可通过使至少一个碱基经历取代、缺失、插入或其组合进行突变。此外，它可经由从天然提取或使用化学合成方法来制备。具有编码ETV2或FLI1蛋白的碱基序列的核酸可以是单链或双链，并且可以是DNA分子(基因组DNA、cDNA)或RNA分子。

[0035] 在本发明中，载体可包括除了表达调控元件，诸如启动子、操纵基因、起始密码子、终止密码子、聚腺苷酸化信号或增强子，以外的信号序列或用于膜靶向或分泌的读码序列，并可被多样地制造以便适用于一些目的。载体的启动子可以是组成型的或诱导型的。此外，表达载体包含用于选择包含该载体的宿主细胞的选择性标志物，并且可复制的表达载体包

含复制起点。载体可以是自复制的，或者可被整合进宿主DNA中。

[0036] 载体包括质粒载体、粘粒载体、病毒载体以及附加型载体。优选地有用的是病毒载体。病毒载体的实例可包括，但不限于，来源于以下的载体：逆转录病毒，例如，HIV(人类免疫缺陷病毒)、MLV(鼠白血病病毒)、ASLV(禽(Avian)肉瘤/白血病)、SNV(脾坏死病毒)、RSV(劳斯肉瘤病毒)、MMTV(小鼠乳腺肿瘤病毒)、腺病毒、腺伴随病毒、单纯疱疹病毒等等。特别地，载体被用来增加直接转分化的效率。可使用表现出本发明的效果的任何载体，只要它使与待转化的细胞相关的基因在典型的体细胞中被过表达。特别地，载体可通过表达ETV2或FLI1的慢病毒载体，且特别是基于SF的慢病毒载体作为SFFV启动子来例示。

[0037] 此外，编码ETV2或FLI1蛋白的核酸可使用本领域已知的任何方法被转移或引入细胞中，例如，使用向量型裸DNA(vector-type naked DNA)，或使用脂质体、阳离子聚合物等。

[0038] 脂质体是通过与用于基因递送的阳离子磷脂诸如DOTMA或DOTAP混合得到的磷脂膜。当阳离子脂质体和阴离子核酸以预定的比率混合时，核酸-脂质体复合物可被形成，并由此可被引入进细胞中。

[0039] 特别在本发明中，编码ETV2或FLI1蛋白的核酸分子被包含在病毒载体中，并由此包括编码ETV2或FLI1蛋白的核酸的病毒载体可连同包装缺陷型辅助质粒一起被引入进体细胞中。病毒的实例可包括，但不限于，逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、单纯疱疹病毒等等。

[0040] 如本文使用的，术语“体细胞”指除了生殖细胞以外的任何细胞。体细胞的实例可包括成纤维细胞、肌细胞、神经细胞、胃粘膜细胞、杯状细胞、G细胞、周细胞、星形胶质细胞、B细胞、血细胞、上皮细胞、神经干细胞、造血干细胞、间充质干细胞以及脐带血干细胞。然而，不管具体的组织细胞种类如何，只要它起始于体细胞，就可应用直接转分化，并且本发明不限于体细胞的以上实例。在本发明的实施方案中，直接转分化使用成纤维细胞来诱导。

[0041] 如本文使用的，术语“血管祖细胞”指具有分化为构成体内血管的血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、周细胞或血管细胞的能力的祖细胞。此外，在本发明中，“iVPC”表示诱导的血管祖细胞，例如，根据本发明的方法由体细胞通过直接转分化获得的诱导的血管祖细胞。

[0042] 另外，本发明提出了一种用于预防或治疗缺血性血管疾病的药物组合物，所述药物组合物包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、具有被引入至其的所述核酸分子的载体、或通过直接转分化诱导的血管祖细胞，作为活性成分。

[0043] 另外，本发明提出了一种用于预防或治疗缺血性血管疾病的细胞治疗剂，所述细胞治疗剂包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、具有被引入至其的所述核酸分子的载体、或通过直接转分化诱导的血管祖细胞，作为活性成分。

[0044] 另外，本发明提出了一种用于筛选用于治疗缺血性血管疾病的药物的组合物，所述组合物包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、具有被引入至其的所述核酸分子的载体、或通过直接转分化诱导的血管祖细胞，作为活性成分。

[0045] 缺血性血管疾病指由于由外部或内部原因的血管受损(impairment)引起血流紊

乱的任何疾病且不限于体内在特定部位处产生的。缺血性血管疾病的具体实例可包括，但不限于，脑血管疾病、心血管疾病、肢体缺血、外周血管疾病和缺血性肌坏死。更具体地，脑血管疾病可以是脑梗塞，中风或脑出血，并且可包括可归因于脑血管损害的任何血流紊乱，但本发明并不限于以上疾病的实例。此外，心血管疾病可以是动脉硬化、缺血性再灌注损伤、再狭窄、动脉炎、血管壁重塑、心室重塑、快速心室起搏、冠状动脉微栓塞、心动过速、心动过缓、压力超负荷、冠状动脉结扎术、心律失常、中风、心绞痛、心肌梗塞、心脏衰竭或高血压，但可包括可归因于心血管损害的任何血流紊乱，并且本发明并不限于以上疾病的实例。

[0046] 如本文使用的，术语“细胞治疗剂”指用于用通过在从人类分离之后培养及专门的任务制备的细胞或组织治疗、诊断或预防疾病的目的的药物(美国FDA规定的)，特别是用于通过在体外增殖或筛选自体、异体或异种活细胞或以其他方式改变细胞的生物学特性以恢复细胞或组织的功能来治疗、诊断或预防疾病的目的的药物。

[0047] 另外，本发明提出了一种用于制备用于治疗缺血性血管疾病的人工组织的3D打印生物材料组合物，所述3D打印生物材料组合物包含选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、具有被引入至其的所述核酸分子的载体、或通过直接转分化诱导的血管祖细胞，作为活性成分。

[0048] 另外，本发明提出了一种用于将体细胞直接转分化为血管祖细胞的方法，所述方法包括，将选自在ETV2(ETS变体基因2)和FLI1(弗罗德白血病病毒整合因子1)中的至少一种蛋白、编码所述蛋白的核酸分子、或具有被引入至其的所述核酸分子的载体引入体细胞。

[0049] 更具体地，该方法包括：在培养基中培养体细胞，用包含ETV2、FLI1或其组合的基因的载体转导培养的体细胞，并且在用于诱导直接转分化的培养条件下培养被感染的体细胞。

[0050] 用于培养体细胞的培养基包括通常在本领域中培养不仅体细胞而且干细胞和祖细胞中有用的任何培养基。培养基通常包含碳源、氮源以及少量的元素。在本发明的特定实施方案中，转导的成纤维细胞被培养在补充有硫酸鱼精蛋白(Sigma)的培养基中，但除了硫酸鱼精蛋白以外可包含用于培养细胞必需的元素而不受限制。

[0051] 此外，用于诱导体细胞直接转分化的培养条件可包括通常在本领域中被用来诱导体细胞的直接转分化的任何培养基。在本发明的特定实施方案中，有用的是用于生长血管祖细胞的培养基，该培养基包括含10％FBS的最低必需培养基(MEM)、2mM L-谷氨酰胺、β-巯基乙醇、青霉素/链霉素及10ng/ml $VEGF_{165}$。

[0052] 在本发明中，通过直接转分化诱导的血管祖细胞与现存的血管分化和相关血管细胞增殖相关，因此有助于新血管形成，并且可增加血管细胞的数量和密度两者，由此表现出对缺血性疾病的优异的治疗效果。

[0053] 发明模式

[0054] 可通过以下实施例获得本发明的更好的理解，陈述以下实施例以进行说明，但不被理解为限制本发明的范围。提供本发明的实施例以向具有本发明所属技术领域的普通知识的那些技术人员充分地描述本发明。

[0055] 实施例1.诱导的血管祖细胞(iVPC)的制备

[0056] 将皮肤成纤维细胞在成纤维细胞培养基(含10％FBS的DMEM高葡萄糖、2mM L-谷氨酰胺、1x MEM非必需氨基酸、β-巯基乙醇、1x青霉素/链霉素)中培养。

[0057] 293细胞使用Fugene 6转染试剂(Roche)用SFFV启动子,即,编码ETV2和FLI1的互补DNA的基于SF的慢病毒载体,及用包装缺陷型辅助质粒进行感染。在48小时之后,根据Zaehres,H.&Daley,G.Q.,(2006),Methods Enzymol 420,49-64中公开的方法获得病毒上清液。

[0058] 将皮肤成纤维细胞以$1x10^4$个细胞的密度等分进0.1%明胶涂覆的6孔板中,并连同包含ETV2和FLI1(1:1)的病毒上清液一起培养24小时,并补充有6μg/ml硫酸鱼精蛋白(Sigma)。转染效率使用SF-GFP对照病毒进行计算。

[0059] 在注射两天之后,将细胞再次等分进新的成纤维细胞培养基中,并且培养基用血管祖细胞生长培养基(含10%FBS的最低必需培养基(MEM,Sigma)、2mM L-谷氨酰胺、β-巯基乙醇、青霉素/链霉素、10ng/ml $VEGF_{165}$(Peprotech))来替换。此后,以三天的时间间隔用新的培养基替换培养基,并且将集落物理分离以用于增殖。

[0060] 实施例2.使用RT-PCR和相差显微镜检查ETV2和FLI1的表达

[0061] 在感染五天之后,使用RT-PCR观察ETV2和FLI1的表达。

[0062] 具体地,在感染五天之后,总RNA使用RNeasy试剂盒(Qiagen)从各细胞提取,且cDNA使用Omniscript RT(Qiagen)来合成。PCR使用重组Taq DNA聚合酶(Invitrogen)来进行。

[0063] 在RT-PCR之后,通过使用GAPDH作为对照,负载到琼脂糖凝胶上证实表达(图3)。

[0064] 如在图4中示出的,使用相差显微镜,在感染之后10至11天内,集落开始出现在用ETV2和ETV2/FLI1感染的细胞群中,并且集落的数目随时间增加。

[0065] 在感染之后30天内,本发明人观察到在用FLI1感染的细胞群中的集落。为了增殖集落,将细胞群物理分离并在明胶涂覆的培养皿内培养。

[0066] 实施例3.使用免疫细胞化学体外分析血管祖细胞

[0067] 为了进行免疫细胞化学,将细胞在4%多聚甲醛中固定10min,并用0.1%Triton X-100处理10min以成为可渗透的。将细胞在4%FBS/PBS封闭溶液中培养30min,并然后在室温与用封闭溶液稀释的一抗反应1小时。使用的一抗体如下:vWF(1:400,Abcam)、CD31(1:200,Chemicon)和α-SMA(1:200,Abcam)。

[0068] 在与一抗反应之后,用0.05%PBST(吐温20/PBS)将细胞洗涤三次。此后,第二荧光抗体用PBS稀释,并然后与细胞反应1小时(Alexa Fluor 488和568;1:1000,Molecular Probes)。细胞用0.05%PBST洗涤三次,且细胞核使用Hoechst 33342(Thermo Scientific)复染15秒。在染色之后,细胞使用Olympus Cell^TIRF(UOBC center,UNIST)显微镜进行观察。

[0069] 血管祖细胞具有使得它们能够分化为血管内皮细胞和平滑肌细胞的性质,并且CD31和vWF被用作血管内皮细胞的标志物,且α-SMA被用作平滑肌细胞的标志物。通过免疫细胞化学分析证实了通过ETV2、FLI1和ETV2/FLI1的每个转化获得的诱导的血管祖细胞(iVPC)(图5)。

[0070] 实施例4.诱导的血管祖细胞对缺血性疾病的治疗的效果

[0071] 在缺血性肢体模式中,评价了通过用ETV2、FLI1和ETV2/FLI1转化获得的诱导的血管祖细胞(诱导的-VPC、iVPC)对恢复血流是否有效。为此,将诱导的血管祖细胞移植进该模式中。在预定的时间周期之后,测量血流量。

[0072] 具体地，无胸腺的裸小鼠(雄性、8至10周龄、体重17g至22g)用160mg/kg戊巴比妥进行麻醉，以用于切开股动脉和激光多普勒灌注成像。将股动脉切开至股动脉从近端组织分为大隐静脉和腘静脉作为髂外动脉的分支的远心点。在动脉结扎后，将小鼠分为以下测试组：ETV2、FLI1和ETV2/FLI1iVPC及对照(HBSS；盐水注射)(每组n＝8)。

[0073] 在移植之前，细胞用CM-Dil(Invitrogen)标记。此后，各小鼠的大腿中央内的股薄肌的四个点用$1x10^6$个细胞(80μL)或HBSS肌内注射。在细胞移植进缺血性和正常的肢体之后的第7天、第14天和第28天，以及在移植的当天，测量使用激光多普勒灌注成像(LDPI)分析仪(Moor instruments,Devon,UK)来进行(图6)。

[0074] 缺血和非缺血肢体的血流量基于彩色直方图的像素来计算。红色和蓝色分别指示高血流量和低血流量。血流量通过相应于缺血/非缺血肢体血流量比率的LDPI指数来代表。在图7中，在手术之前的比率1指示两种肢体内相同的血流量。

[0075] 关于测量结果，如在图6和7中示出的，在缺血性肢体模型中，所有移植iVPC的组表现出血流量恢复。特别地，与对照相比，ETV2/FLI1组显示显著增加的血流量恢复。

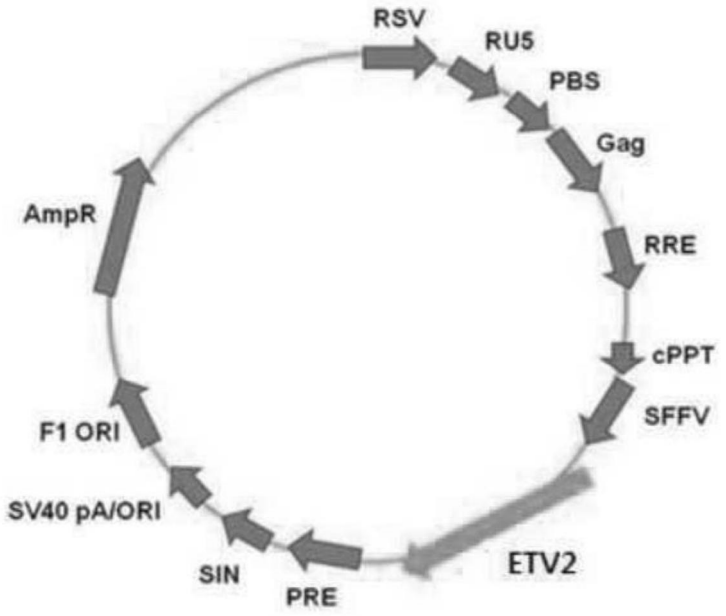

RSV
RU5
PBS
Gag
RRE
cPPT
SFFV
ETV2
PRE
SIN
SV40 pA/ORI
F1 ORI
AmpR

图1

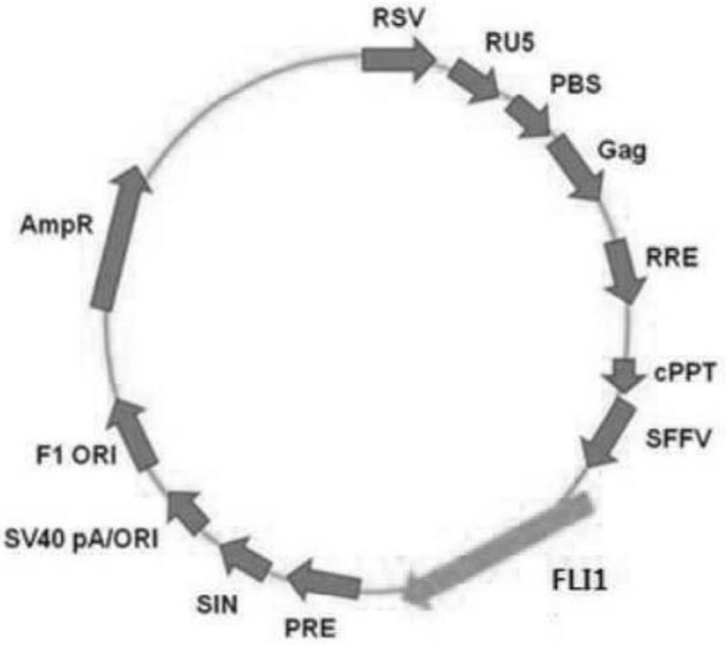

RSV
RU5
PBS
Gag
RRE
cPPT
SFFV
FLI1
PRE
SIN
SV40 pA/ORI
F1 ORI
AmpR

图2

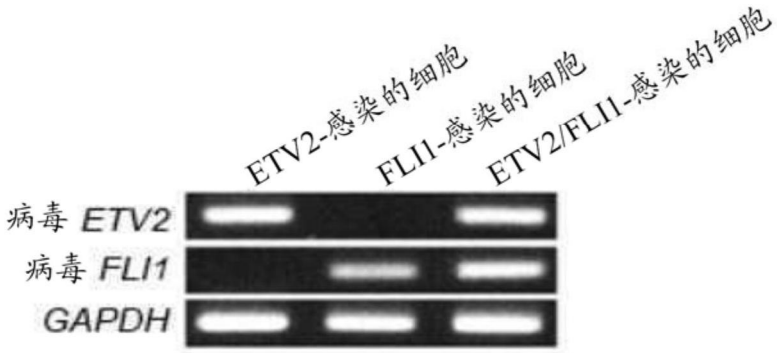

ETV2-感染的细胞
FLI1-感染的细胞
ETV2/FLI1-感染的细胞
病毒 ETV2
病毒 FLI1
GAPDH

图3

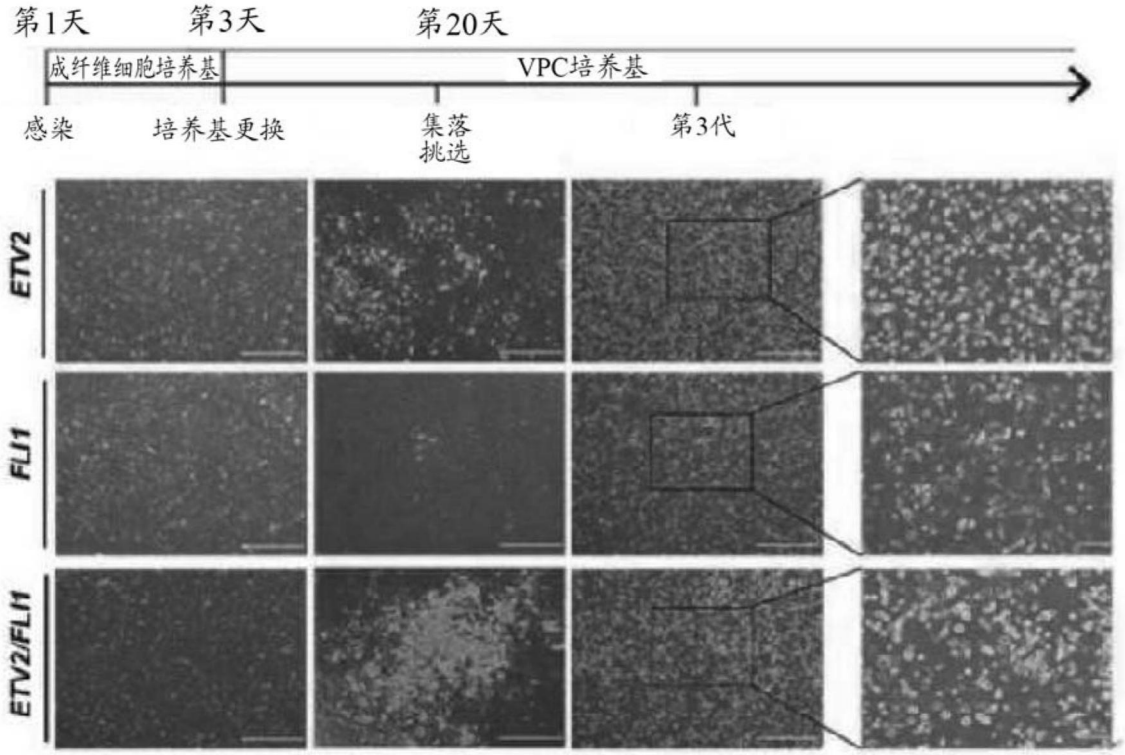

第1天
第3天
第20天
成纤维细胞培养基
VPC培养基
感染
培养基更换
集落挑选
第3代
ETV2
FLI1
ETV2/FLI1

图4

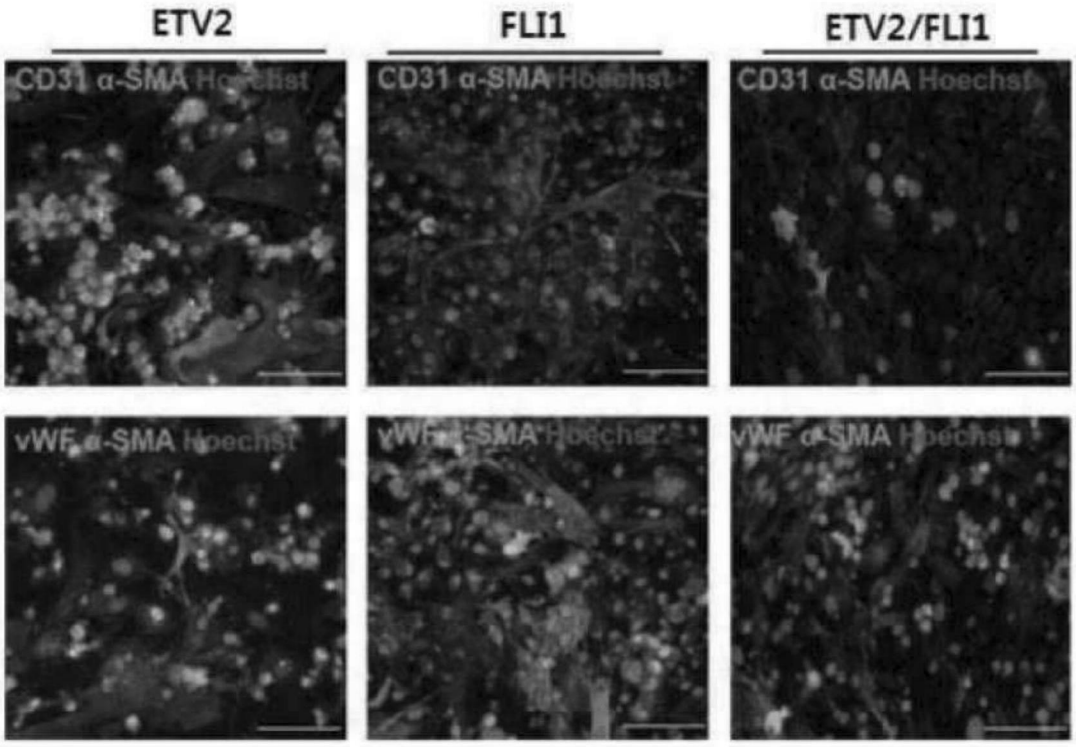

ETV2
FLI1
ETV2/FLI1
CD31 α-SMA Hoechst
CD31 α-SMA Hoechst
CD31 α-SMA Hoechst
vWF α-SMA Hoechst
vWF α-SMA Hoechst
vWF α-SMA Hoechst

图5

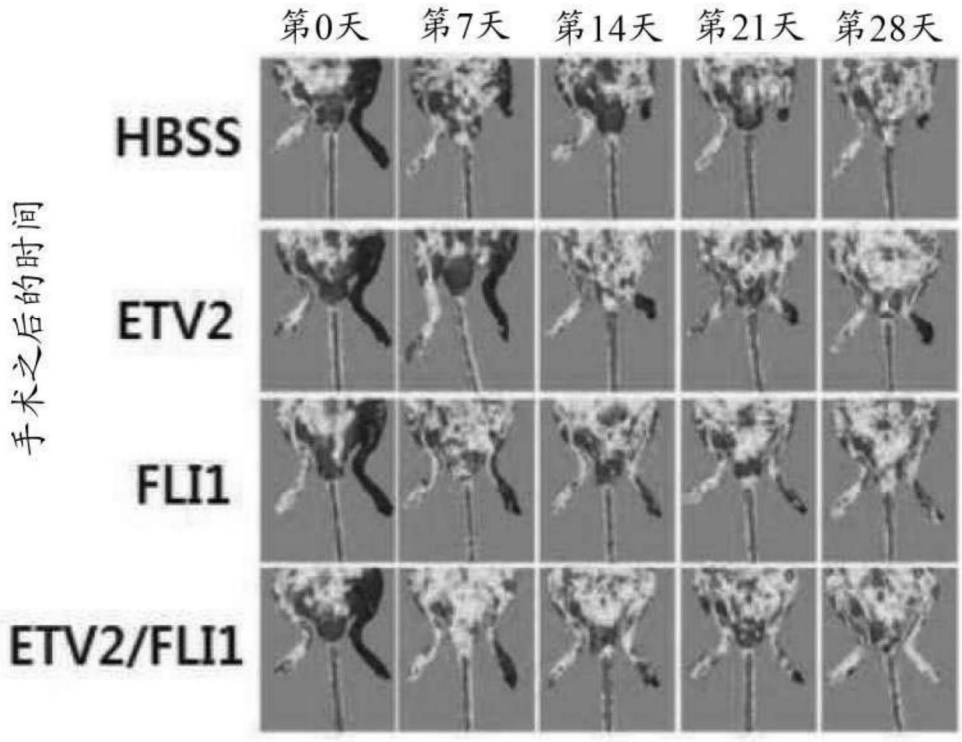

第0天
第7天
第14天
第21天
第28天
HBSS
ETV2
FLI1
ETV2/FLI1
手术之后的时间

图6

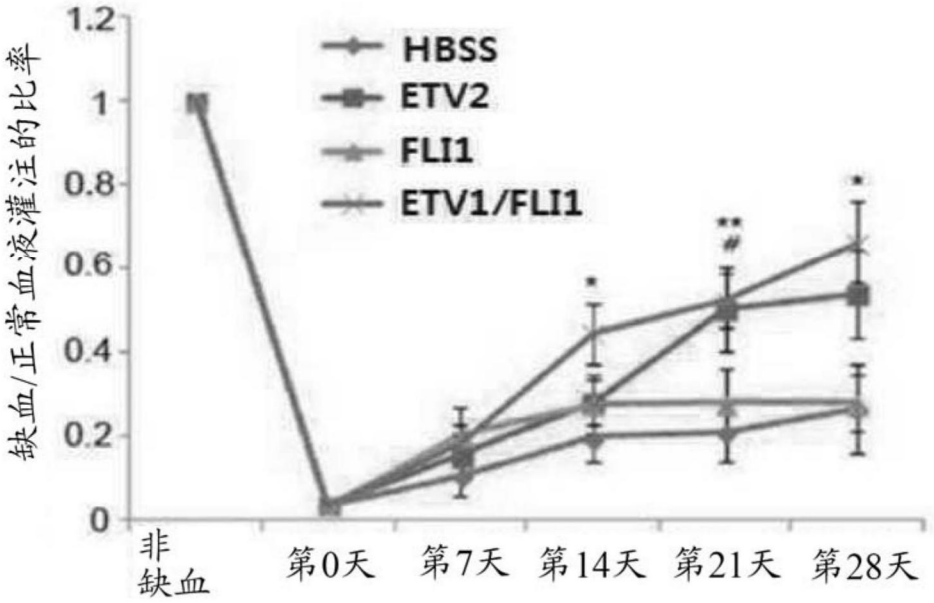

缺血/正常血液灌注的比率
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
HBSS
ETV2
FLI1
ETV1/FLI1
非缺血
第0天
第7天
第14天
第21天
第28天

图7