

(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12月7日 (07.12.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/206837 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 5/0735 (2010.01) *A61K 35/12* (2015.01)
C12N 5/0797 (2010.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/086336
- (22) 国际申请日: 2017年5月27日 (27.05.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610391309.7 2016年6月3日 (03.06.2016) CN
- (71) 申请人: 中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所 (INSTITUTE OF TRANSFUSION MEDICINE, ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES, PEOPLE'S LIBERATION ARMY OF CHINA) [CN/CN]; 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。
- (72) 发明人: 王韞芳 (WANG, Yunfang); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。王术勇 (WANG, Shuyong); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。张文成 (ZHANG, Wencheng); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。覃金华 (QIN, Jinhua); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。王璇 (WANG, Xuan); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。常铭洋 (CHANG, Mingyang); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。闫航 (YAN, Fang); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。裴雪涛 (PEI, Xuetao); 中国北京市海淀区太平路27号, Beijing 100850 (CN)。
- (74) 代理人: 北京尚诚知识产权代理有限公司 (SHANGCHENG & PARTNERS); 中国北京市平安里西大街28号光大国际中心18层, Beijing 100034 (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, KH, 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:** SMALL MOLECULE COMPOUND COMBINATION FOR REPROGRAMMING DIGESTIVE TRACT DERIVED EPITHELIAL CELLS TO ENDODERMAL STEM/PROGENITOR CELLS, REPROGRAMMING METHOD AND APPLICATION

(54) **发明名称:** 将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合、重编程方法及应用

(57) **Abstract:** Provided are a small molecule compound combination for reprogramming digestive tract derived epithelial cells to endodermal stem/progenitor cells, a reprogramming method and an application. Human gastric epithelial cells (hGECs) are used as initiating cells, human gastric myofibroblasts (aGSEMFs) are used as a trophoblast, a compound combination having all or a plurality of FBP, Bay K 8644, Bix01294, SB431542 or A83-01, VPA, RG108, PD0325901 and PS48 including SB or A83 is used to reprogram digestive tract derived epithelial cells to endodermal stem/progenitor cells, and the endodermal stem/progenitor cells can be used for inducing differentiation towards liver cells, pancreatic beta cells and intestinal cells.

(57) **摘要:** 提供将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合、重编程方法及应用, 以人胃上皮细胞 (hGECs) 作为起始细胞, 以人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs) 来作为滋养层, 用选自 FBP、Bay K 8644、Bix01294、SB431542 或 A83-01、VPA、RG108、PD0325901 和 PS48 中的全部或多个包括 SB 或 A83 在内的化合物组合将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞, 该内胚层干/祖细胞可用于向肝脏细胞、胰腺β细胞和肠细胞方向诱导分化。

WO 2017/206837 A1

将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合、重编程方法及应用

技术领域

本发明属于细胞工程技术领域，涉及一种可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞技术，包括在重编程过程中所用到的特定小分子化合物组合、重编程试剂盒、重编程方法及该内胚层干/祖细胞进一步向实质细胞诱导分化的应用。

背景技术

干细胞技术多次被《自然》、《科学》等杂志评为二十一世纪生命科学领域最具发展前景的技术，是攻克各种传统医学治疗手段力所不及的重大疾病的一种全新的医疗技术。干细胞具有自我更新和多向分化潜能，在器官组织再生、疾病模型建立、发育生物学及药物研发等领域具有广阔的应用前景。近 10 年来，干细胞理论与技术研究取得了飞速的发展，有望成为全新的疾病治疗方式，推动医学治疗的范式转换，引领新的医学革命。干细胞有多种不同的分类方法，从发育的角度来看，干细胞大致分为胚胎干细胞 (Embryonic stem cells) (ESCs) 和成体干细胞 (Adult stem cells) 两大类。ESCs 来源于囊胚期的内细胞团 (Inner cell mass) (ICM)，是一类具有无限自我更新和向人体所有细胞类型进行分化的多能性干细胞。1998 年，Thomson 在世界上首次建立了人胚胎干细胞系 (hESCs) [Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-7.]，由于其能够产生成体所有细胞类型，理论上能为基础研究、疾病治疗和药物研发提供理想的细胞来源。多年来利用 ESCs 已经产生了多种功能性细胞，包括心肌细胞、神经细胞、血细胞和肝脏细胞等 [Murry CE, Keller G. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. *Cell*. 132:661-80.]。然而，ESCs 的使用在国际上面临着伦理学的争议，而且 ESCs 来源的细胞移植后会产生免疫排斥反应，未分化的 ESCs 会形成畸胎瘤等诸多问题，因此大大限制了其走向临床的应用。而成体干细胞存在于出生后各个阶段的多种组织中，具有一定的自我更新能力并且能够向其来源组织中的成熟细胞进行分化，如造血干细胞、间充质干细胞、肝脏干细胞和神经干细胞等。由于其来源于成体组织且只能向固定的方向分化，因此不具有成畸胎瘤的风险，也没有伦理学的问题，所以是临床疾病治疗的良好种子细胞。但其来源毕竟有限，只能从人体组织中分离获得，而且分化潜能也很局限只能生成其所在谱系内的一种或几种成熟细胞类型，体外

也很难大规模的扩增，所以其临床应用也有很大的局限性。多年来，众多的研究都在致力于寻求更为理想的细胞类型来进行疾病的治疗、药物研发和机制研究。

传统的表观遗传学观点认为谱系的特化、细胞的分化是单向的、不可逆的过程，多能的细胞状态只能向终末成熟的细胞状态进行命运特化(Waddington' epigenetic landscape)。而诱导多能性干细胞(induced Pluripotent Stem Cells)简称 iPSCs 的出现深刻的改变了这一观念。2006 年日本科学家 Yamanaka 利用 ESCs 特异性的 4 个多能性相关的转录因子 OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC (OSKM) 成功的将成纤维细胞转换为类似 ESCs 的多能性干细胞 iPSCs, 首次证实了终末分化的细胞在多能性相关转录因子的作用下可以重新获得分化多能性，这就是经典的重编程技术[Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell.126:663-76. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell.131:861-72.]。iPSCs 的出现具有里程碑式的意义：首先，它突破了经典的表观遗传全景模式，极大的丰富了细胞命运转换的理论，引领了细胞命运研究和干细胞研究的范式转换，给再生医学的基础研究和临床应用开辟了广阔前景。其次，iPSCs 具有 ESCs 的无限自我更新和向体内所有细胞类型进行分化的潜能，同时避免了 ESCs 研究和应用的伦理学争议。再次，由于成纤维细胞可取自病人自体因此也避免了 ESCs 分化产生的终末细胞移植入体内带来的免疫排斥问题。最后，病人自体来源的 iPSCs 可以建立个体特异性的疾病细胞模型和个体化的药物筛选平台。iPSCs 的出现不仅给疾病的基础研究，药物筛选带来新的研究模式，而且使多能性干细胞(PSCs)走向临床应用跨进一大步。利用 iPSCs 已经成功的产生了多种功能性细胞类型，而且 iPSCs 来源的视网膜色素上皮治疗致盲性眼病的临床试验正在开展。Yamanaka 也因此项技术而获得 2012 年的诺贝尔生理学或医学奖。

尽管 iPSCs 具备多方面的优势，是一种非常具有治疗前景的细胞类型，然而由于同样具有 ESCs 类似的多能性依然难以避免致畸胎瘤的风险，此外 iPSCs 向功能性细胞进行分化的过程中存在随机性分化的问题，会产生多种非预期细胞类型，这些问题都会对大规模的临床应用带来安全性的风险。为了弥补这一缺陷，近年来基于 iPSCs 技术和原理发展而来的谱系重编程(lineage reprogramming) 技术日益受到广泛的重视。谱系重编程主要使用目的细胞谱系特异性的转录因子(lineage specific transcriptional factors) 而非多能性的转录因子(OSKM) 在起始细胞主要是皮肤成纤维细胞或血细胞中进行过表达，进而将起始细胞直接转换为目的细胞。谱系重编

程的出现同样是干细胞领域具有里程碑意义的重要事件。首先，由于不经过 iPSCs 的多能性阶段，谱系重编程避免了 iPSCs 的致畸胎瘤风险；其次，谱系重编程可以根据使用的转录因子和培养条件的不同直接获得终末成熟的功能细胞或者具有扩增能力的成体干细胞，而且得到的目的细胞类型相对均一；再次，谱系重编程也具有 iPSCs 的无免疫排斥及个体化的优势，因此在干细胞与再生医学研究和疾病治疗上显示出了更为广阔的应用前景 [Sancho-Martinez I, Baek SH, Izpisua Belmonte JC. Lineage conversion methodologies meet the reprogramming toolbox. *Nat Cell Biol.* 2012;14:892-9.]. 最后，谱系重编程的出现极大的丰富了细胞命运转换和重编程理论的内涵，使人们对于细胞命运特化和调控的理解更为全面和深刻，并将这一概念应用到更为广阔的领域。

从 2008 年首次实现在同一胚层内的胰腺外分泌细胞向内分泌 β 细胞的谱系重编程 [Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature.* 2008;455:627-32.] 到 2010 年开始实现跨胚层的成纤维细胞向神经细胞的转换 [Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010;463:1035-41.]，谱系重编程领域取得了一个又一个的巨大突破。目前使用病毒介导转录因子在体细胞中过表达的方式，已在三个胚层的多种细胞类型中成功的实现了命运转换。在外胚层中已经将成纤维细胞转换为多种类型的神经元、神经干细胞等；在中胚层已经获得了心肌细胞、心肌祖细胞、造血干/祖细胞等；在内胚层获取了胰岛细胞、肝细胞、肝干细胞等。在这一领域尤其是肝系细胞的谱系重编程领域，中国科学家取得了一系列突破。2011 年国内惠利建实验室在国际上首次使用肝细胞特异性的转录因子组合成功的将小鼠成纤维细胞转换为肝细胞 [Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature.* 2011;475:386-9.]. 2013 年胡以平实验室使用转录因子组合又获得了具有自我更新和向肝细胞、胆管细胞进行分化的小鼠肝干细胞 [Yu B, He ZY, You P, Han QW, Xiang D, Chen F, et al. Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell.* 2013;13:328-40.]. 2015 年惠利建和邓宏魁实验室分别独立的使用不同的转录因子组合成功的将人的成纤维细胞转变成功能性肝细胞，为肝病治疗、药物筛选提供了良好的种子来源 [Du Y, Wang J, Jia J, Song N, Xiang C, Xu J, et al. Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell Stem Cell.*

2014;14:394-403. Huang P, Zhang L, Gao Y, He Z, Yao D, Wu Z, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell*. 2014;14:370-84.]. 尽管这些年来利用谱系重编程已获取了人或鼠的多种细胞类型, 而且已经弥补了 iPSCs 应用上的多个缺陷, 然而目前绝大多数谱系重编程的研究都是依赖于慢病毒或逆转录病毒介导的转录因子过表达的方式, 这些病毒载体进入目的细胞后存在与宿主基因组整合, 由此可能导致宿主基因组不稳定, 为将来的临床应用带来安全性隐患, 此外转录因子的操作过程复杂、效率较低下, 不同实验室操作规程不一, 难以大规模的扩展应用。因此诸多的研究目前致力于寻找更为安全的、高效的方式来替代转录因子。

与转录因子相比, 小分子化合物具有明显的多方面的优势, 小分子化合物可以自由通透细胞、易于合成、经济高效、无免疫源性、作用于蛋白水平不与基因组整合、可以标准化和规模化生产。通过改变小分子的浓度和作用时间较容易实现蛋白调控的强度和时空控制。近年来众多的研究都在致力于筛选小分子用于提高 iPSCs 的生成效率, 缩短 iPSCs 的生成时间, 减少转录因子的使用, 最终目的都是为了完全使用小分子来替代经典的 Yamanaka 四因子, 从而避免病毒在宿主细胞中整合 [Li W, Li K, Wei W, Ding S. Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics. *Cell Stem Cell*. 2013;13:270-83.]. 2013 年国内邓宏魁实验室, 在这方面取得了突破性的进展, 其团队通过多次的筛选, 找到了合适的小分子化合物组合能够在不依赖任何外源转录因子的情况下实现小鼠成纤维细胞向 iPSCs 的重编程, 尽管效率只有 0.2% 并且过程复杂, 但这项突破为基于小分子的重编程和谱系重编程带来了理论及现实的依据 [Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science*. 2013;341:651-4.]. 在研究小分子化合物介导 iPSCs 产生的同时, 筛选合适的小分子用于调控谱系重编程甚至完全替代谱系特异性转录因子, 从而产生安全高效可控的目的细胞的研究也在国内外如火如荼的开展 [Li K, Zhu S, Russ HA, Xu S, Xu T, Zhang Y, et al. Small molecules facilitate the reprogramming of mouse fibroblasts into pancreatic lineages. *Cell Stem Cell*. 2014;14:228-36. Zhu S, Rezvani M, Harbell J, Mattis AN, Wolfe AR, Benet LZ, et al. Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature*. 2014;508:93-7. Zhu S, Russ HA, Wang X, Zhang M, Ma T, Xu T, et al. Human pancreatic beta-like cells converted from fibroblasts. *Nat Commun*. 2016;7:10080.]. 在这一领域, 中国科学家同样取得了令人瞩目的成就, 裴刚实验室近期筛选到合适的小分子组合将阿尔茨

海默病病人来源的成纤维细胞重编程为成熟的功能性神经元 [Hu W, Qiu B, Guan W, Wang Q, Wang M, Li W, et al. Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell*. 2015;17:204-12.], 而邓宏魁实验室则成功的使用小分子组合将小鼠的成纤维细胞转换为神经元 [Li X, Zuo X, Jing J, Ma Y, Wang J, Liu D, et al. Small-Molecule-Driven Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Neurons. *Cell Stem Cell*. 2015;17:195-203.], LeiZhang 等完全使用小分子将人星形胶质细胞谱系重编程为功能性神经元 [Zhang L, Yin JC, Yeh H, Ma NX, Lee G, Chen XA, et al. Small Molecules Efficiently Reprogram Human Astroglial Cells into Functional Neurons. *Cell Stem Cell*. 2015;17:735-47.]. 这些突破性的进展为完全使用小分子将成体细胞转换为其他类型的功能性细胞或干细胞奠定了坚实的理论基础, 也带来巨大希望。《体细胞重编程技术在肝脏再生中的应用基础研究》[张文成, 2012 年博士论文] 讨论了利用小分子化合物谱系重编程消化道细胞获得诱导内胚层多能干细胞 (iEMSC), 实验中使用 SB431542、VPA、Y27632 小分子化合物以及成分未公开的 1#-6# 小分子组合进行了诱导重编程效率的比较。

内胚层干/祖细胞是肝脏、胰腺、胃、肠等内脏器官发育的源泉, 获得内胚层干/祖细胞, 并进行大量的扩增, 然后再对其进行诱导分化, 获得大量的功能性肝细胞、胰腺细胞或肠上皮细胞将对多种类型的内胚层器官疾病的治疗具有巨大的意义。众所周知, 我国是肝病大国, 目前有 9700 万的乙肝病毒携带者, 1000 万的丙肝病毒携带者, 近年来酒精性脂肪性肝病和非酒精性脂肪性肝病在我国的发展趋势也明显升高, 其它包括药物性肝损伤、免疫性肝病等都严重影响我国的国民身体健康 [Wang FS, Fan JG, Zhang Z, Gao B, Wang HY. The global burden of liver disease: the major impact of China. *Hepatology*. 2014;60:2099-108.]. 各种肝病如果缺乏及时有效的治疗都将逐渐进展到以肝硬化, 肝衰竭和肝癌为代表的终末期肝病 (ESLD) 的阶段。我国庞大的肝病基础人群造成了每年数十万人罹患 ESLD。而对于 ESLD 而言, 目前的治疗手段非常有限, 人工肝的治疗还未成熟难以大规模开展, 内科治疗只能采取保守姑息的方式, 对于 ESLD 目前公认的最有效的治疗方式是原位肝移植, 但又严重受限于肝源的匮乏。据估计我国每年死于 ESLD 的人群超过 30 万例, 给万千家庭带来巨大痛苦, 给社会带来沉重的医疗负担。而功能性肝细胞移植被认为是肝移植的良好替代治疗方式, 但同样也受限于来源的匮乏。此外, 无论是我国还是世界上其他国家, 都拥有庞大的糖尿病人群, 而且还呈现逐年增加的趋势。国际糖尿病联盟

(International Diabetes Federation) 的分析显示在不远的将来糖尿病将影响世

界上超过 30 亿的人口。然而目前糖尿病的治疗方法同样有限而且效果不一，尤其是 I 型糖尿病 (T1DM) 只能通过终生注射外源性的胰岛素进行治疗，长期注射胰岛素费用昂贵，还会产生胰岛素抵抗，降低治疗效果以及带来感染、低血糖、过敏反应等一系列慢性并发症的风险。而 T1DM 被认为可通过外源性移植胰岛 β 细胞来治愈并且目前的研究已取得令人瞩目的进展 [Bellin MD, Barton FB, Heitman A, Alejandro R, Hering BJ. Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes. *American Journal of Transplantation*. 2012;12:1576-83.]，但外源性胰岛或 β 细胞的缺乏严重阻碍了这种治疗方式的应用。如果能够获得内胚层干/祖细胞，并进行大量的扩增然后再对其进行诱导分化进而获得大量的功能性肝细胞、胰腺 β 细胞或肠上皮细胞将会对肝病的细胞治疗，糖尿病的细胞治疗甚至肠道疾病的治疗带来巨大的希望。

多项研究已经报道从多能性干细胞 ESCs 或 iPSCs 来获得内胚层干/祖细胞并将其向肝脏和胰腺进行诱导分化 [Sneddon JB, Borowiak M, Melton DA. Self-renewal of embryonic-stem-cell-derived progenitors by organ-matched mesenchyme. *Nature*. 2012;491:765-8. Cheng X, Ying L, Lu L, Galvao AM, Mills JA, Lin HC, et al. Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012;10:371-84.]，然而由于其来源于多能性干细胞，同样难以回避前述的多能性干细胞应用面临的问题。目前国际上多项研究都在致力于使用小分子将人的成体细胞重编程为内胚层祖细胞或者其来源的肝脏细胞和胰腺细胞。2014 年丁盛实验室使用 Yamanaka 四因子 OSKM 在人成纤维细胞中短暂过表达并且结合小分子使细胞首先进入一个不同于 ESCs 或 iPSCs 多能性状态的一个可塑中间态，然后再给予内胚层的诱导条件将成纤维细胞重编程到内胚层祖细胞阶段 (EPs)，接着使用肝细胞的序贯诱导方法最终获得了类肝细胞样的细胞 [Zhu S, Rezvani M, Harbell J, Mattis AN, Wolfe AR, Benet LZ, et al. Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature*. 2014;508:93-7.]。近期使用类似的方案，他们将人成纤维细胞重编程到内胚层祖细胞阶段后，进而向胰腺进行诱导分化，从而获取了功能性的 β 细胞 [Zhu S, Russ HA, Wang X, Zhang M, Ma T, Xu T, et al. Human pancreatic beta-like cells converted from fibroblasts. *Nat Commun*. 2016;7:10080.]。尽管这一方式不经过多能性状态，因此避免了多能性干细胞的成畸胎瘤性，但其依然需要 OSKM 四因子的始发驱动，因此还是一个部分依赖于转录因子的策略，还未做到完全依赖小分子的作用。分析目前整个重编程领域还未实现仅使用小分子来介导谱系重编程获得上皮源性的内胚层谱系细胞类型包括内

胚层祖细胞、肝细胞或胰腺细胞的原因，我们认为存在以下几个关键的科学问题：

1、起始细胞的问题：首先，无论是经典重编程 iPSCs 还是谱系重编程，绝大多数都是以成纤维细胞为起始细胞，尽管成纤维细胞在获取上比其它成体细胞相对容易，通过皮肤活检即可获得，因此也是临床应用的一大优势，然而对于期望获得的目的细胞如内胚层祖细胞、肝细胞或胰腺细胞而言，以成纤维细胞为起始存在表观遗传的障碍。成纤维细胞来源于中胚层，而目的细胞内胚层祖细胞则属于内胚层，由中胚层向内胚层的跨胚层转换是一个巨大障碍，尤其是对于作用较为温和的小分子而言显得更为困难。其次，成纤维细胞在组织学分类上属于间质类细胞，而内胚层祖细胞则属于上皮类细胞，由成纤维细胞向内胚层祖细胞的转换需要经历间质上皮转换 (MET) 的过程，而 MET 已经被证实是 iPSCs 产生过程中需要突破的首个重要障碍 [Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2010;7:51-63.]，同样 MET 也是谱系重编程的重要障碍。

2、小分子的选择问题：小分子的选择与起始细胞的特性密切相关，不同的起始细胞决定了在向内胚层祖细胞的转换过程所需要的小分子组合也不尽相同。由于目前还没有完全使用小分子获取内胚层的任何一种细胞类型的报道来作为参考，因此在小分子的选择上要经过详尽的调研和筛选。

3、滋养层细胞的使用问题：滋养层细胞可以分泌多种细胞因子，可溶性细胞外基质或 MicroRNA 等，并且和培养的细胞密切接触，给细胞的生长和存活提供合适的细胞外微环境。滋养层细胞对于干/祖细胞的培养和重编程来说通常是必须的，而目前无论是重编程还是谱系重编程最常用的滋养层细胞都是小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs)、人包皮成纤维细胞 (HFFs) 或间充质干细胞 (MSCs) 等，这些细胞仅能提供基础的干细胞生长环境并不具有谱系特异的支持和诱导作用。

发明内容

本发明的目的是提供可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合、及能将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的重编程试剂盒和重编程方法。

本发明中，“干/祖细胞”的概念为“干细胞”或“祖细胞”，所指为同一种细胞，因业内命名不统一，统称为“干/祖细胞”。

本发明所提供的可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合，所述小分子化合物选自 TGF- β 信号通路、表观修饰剂、钙离子通道激动剂和代谢通路调节剂等功能群；代表性的含有 8 个小分子化合物的组合 (8M)，包括 FBP、

Bay K 8644 (Bay)、Bix01294 (Bix)、SB431542 (SB) 或 A83-01 (A83)、VPA、RG108 (RG)、PD0325901 和 PS48 中的全部或多个包括 SB 或 A83 在内的化合物的组合。

其中, 包括 8 个小分子化合物的组合 (简称 8M) 为: SB43154: VPA: PD0325901: RG108: Bix01294: Bay K 8644: PS48: FBP 按摩尔比为 50: 12500: 12.5: 1:12.5: 50:125: 87500 的组合; 或 A83: VPA: PD0325901: RG108: Bix01294: Bay K 8644: PS48: FBP 按摩尔比为 12.5: 12500: 12.5: 1:12.5: 50:125: 87500 的组合; 按以上配比的 8M 组合在使用中需满足 RG 使用浓度为 0.01~1 μM , 优选 0.04 μM 。

优选的可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合为包括 4 个小分子化合物的组合, 为 Bix01294 (Bix)、Bay K 8644 (Bay)、RG108 (RG) 和 SB431542 (SB), 简称 BBRS 组合, 或 A83-01 (A83)、Bay K 8644 (Bay)、RG108 (RG) 和 SB431542 (SB), 简称 BBRA 组合。

所述小分子化合物组合中各化合物使用浓度分别为: SB43152 为 (1~10 μM), A83 为 (0.4~1 μM), RG108 为 (0.01~1 μM), Bix01294 为 (0.1~2 μM), Bay K 8644 为 (1~4 μM)。

其中 BBRS 组合为各化合物按 SB: RG: Bix: Bay 摩尔比 50:1:12.5:50 的组合, BBRA 组合为各化合物按 A83: RG: Bix: Bay 摩尔比 12.5:1:12.5:50 的组合; 优选各化合物使用浓度 SB43152 为 2 μM , A83 为 0.5 μM , RG108 为 0.04M, Bix01294 为 0.5 μM , Bay K 8644 为 2 μM 。

本发明中, 所述小分子化合物组合在以胃肌成纤维细胞或小肠肌成纤维细胞为滋养层细胞的支持下能将消化道来源的上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞。

本发明所提供的可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的重编程试剂盒, 包括上述可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合, 以及化合物的使用说明书。各化合物分别包装, 或按 8M 组合或 BBRS 组合或 BBRA 组合将各化合物混合后包装, 说明书记载各化合物的使用浓度范围或具体浓度。

所述重编程试剂盒还包括滋养层细胞及其使用说明, 所述滋养层细胞为消化道来源的基质细胞, 如胃肌成纤维细胞或小肠肌成纤维细胞。

所述重编程试剂盒还包括基础培养基 Advanced DMEM/F12, 细胞培养基添加成分谷氨酰胺 (Glutamax) 和抗生素 (SP), 及其使用说明, 其中相对 Advanced DMEM/F12 基础培养基, 谷氨酰胺的使用浓度为 2mM (1 \times), 抗生素为青-链霉素, 相对 Advanced DMEM/F12 基础培养基的使用浓度为 100U/mL 青霉素+0.1mg/mL 链霉素, 各物质分别包装或按所列使用浓度与基础培养基混合后包装。

本发明还提供一种可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的重编程

培养基。该重编程培养基由所述小分子化合物组合与基础培养基和细胞培养基础添加成分共混而成。

优化的重编程培养基的配方为：Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax)，青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素)，2 μ M 的 SB43154，0.5mM 的 VPA，0.5 μ M 的 PD0325901，0.04 μ M 的 RG108，0.5 μ M 的 Bix01294，2 μ M 的 Bay K8644，5 μ M 的 PS48，3.5mM 的 FBP。所列浓度均为使用浓度，即各组分在 Advanced DMEM/F12 (溶剂) 中的浓度。

更优选的重编程培养基配方为：Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax)，青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素)，1~10 μ M 的 SB43152，0.01~1 μ M 的 RG108，0.1~2 μ M 的 Bix01294，1~4 μ M 的 Bay K 8644；这里最优选 Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax)，青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素)，2 μ M 的 SB43152，0.04 μ M 的 RG108，0.5M 的 Bix01294，2 μ M 的 Bay K 8644。

另一更优选的重编程培养基配方为：Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax)，青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素)，0.4~1 μ M 的 A83-01，0.01~1 μ M 的 RG108，0.1~2 μ M 的 Bix01294，1~4 μ M 的 Bay K 8644；这里最优选 Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax)，青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素)，0.5 μ M 的 A83-01，0.04 μ M 的 RG108，0.5M 的 Bix01294，2 μ M 的 Bay K 8644。

本发明还提供上述小分子化合物组合或剂盒或重编程培养基的应用，该应用是使用上述小分子化合物组合或试剂盒或重编程培养基在消化道来源的基质细胞做滋养层的基础下将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞。

本发明所提供的将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的重编程方法，包括以下步骤：

- 1) 将原代分离的消化道来源上皮细胞作为起始细胞，扩增培养所述消化道来源上皮细胞；
- 2) 用丝裂霉素-C 处理滋养层细胞后清洗，并用酶消化细胞后备用；
- 3) 将步骤 2) 准备的滋养层细胞添加于步骤 1) 扩增培养的消化道来源上皮细胞中，继续共培养过夜；
- 4) 第 2 天更换为重编程培养基，每 2-3 天换一次培养基，培养 7-15 天，得到诱导内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs) 克隆。

在上述方法中，所述步骤 1) 中的起始细胞为消化道来源上皮细胞，包括胃、十

二指肠上皮细胞。从临床获取的难易程度考虑，胃上皮细胞更易获取，因此优选为胃上皮细胞(hGECs)，尤其优选为 NCAM(神经细胞黏附分子)阳性的胃上皮细胞(hGECs)。步骤 1) 优选以 NCAM 阳性的胃上皮细胞为起始细胞，用 Kubota (库部塔) 培养基在 37 摄氏度，5% CO₂ 培养箱条件下培养 5 天。

所述步骤 2) 中的滋养层细胞为消化道来源的基质细胞，包括胃肌成纤维细胞或小肠肌成纤维细胞，优选人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs)。步骤 2) 优选用丝裂霉素-C 处理人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs) 2-3 小时，用 PBS 清洗细胞，用 TrypLE 酶消化细胞。

步骤 3) 优选按 $1\sim3\times 10^5$ 每平方厘米的密度将步骤 2) 准备的滋养层细胞添加于步骤 1) 培养到 5 天的消化道来源上皮细胞中，在 37°C、5% CO₂ 培养箱中过夜 (12-16 小时)。

步骤 4) 中所述重编程培养基为小分子化合物组合与基础培养基和细胞培养基础添加成分的混合物，其具体组成如前所述。

具体的，将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的方法，包括以下步骤：

- 1) 将原代分离的消化道来源上皮细胞作为起始细胞，用无血清 Kubota' s medium (库部塔培养基) 在 37 摄氏度，5% CO₂ 培养箱条件下培养 5 天；
- 2) 用丝裂霉素-C 处理滋养层细胞 2-3 小时，用 PBS 清洗细胞，用 TrypLE 酶消化细胞；
- 3) 按 $1\sim3\times 10^5$ 每平方厘米的密度将步骤 2) 准备的滋养层细胞添加于步骤 1) 培养了 4-5 天的起始上皮细胞中，在 37°C、5% CO₂ 条件下共培养过夜 (12-16 小时)；
- 4) 第 2 天起，更换为重编程培养基，每 2-3 天换液一次，培养 7-15 天后，获得诱导内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs, human induced endodermal progenitor cells) 克隆。

用上述重编程方法获得的内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs) 也属于本发明。

本发明还提供了一种对内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs) 进行传代的方法，包括以下步骤：

- 1) 传代前准备：在孔板中接种经丝裂霉素-C (10 μ g/mL) 处理的成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs) 或提前约 3 个小时将 Fibronectin (FN, 纤连蛋白)、Cell-TAK (CT, 细胞组织粘附剂) 胶铺于孔板中，室温晾干；
- 2) 配制传代培养基：Advanced DMEM/DF12 +AWF (A83-01 0.5 μ M+Wnt3a 50ng/mL+bFGF 10ng/mL) 或 Advanced DMEM/DF12 +A (A83-01, 0.5 μ M)；

3) 手动挑取内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs) 克隆, 并将其划成小块, 比例约 1:3-, 将其置于 FN+AWF、CT+AWF 或 Feeder [滋养层细胞, 经丝裂霉素-C ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) 处理的成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs)]+A 培养基中在 37°C 、5% CO_2 培养箱中进行传代培养得到传代内胚层干/祖细胞。

以上获得的内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs) 或传代内胚层干/祖细胞在向肝脏细胞、胰腺 β 细胞和肠细胞诱导分化中的应用也属于本发明。

本发明提供了可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合、重编程试剂盒、重编程培养基以及将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的方法。本发明将人胃上皮细胞 (hGECs) 作为起始细胞, 从人胃组织肌层分离培养获取成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs) 来作为滋养层, 用小分子化合物组合在滋养层细胞的支持下将人胃上皮细胞谱系重编程为内胚层干/祖细胞, 并可进一步进行传代培养和扩增。利用本发明获得的内胚层干/祖细胞或其传代细胞并结合使用相应的诱导分化体系, 可获取成熟的肝脏细胞、胰腺 β 细胞和肠细胞, 期望给肝病、糖尿病以及肠道疾病的细胞治疗提供理想的种子来源, 应用前景广阔。

下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

图 1 为确定了起始细胞、初始小分子以及滋养层细胞后的本发明的技术路线图;

图 2 为相差显微镜下培养 4-5 天的胃上皮细胞 (hGECs) 和十二指肠上皮细胞 (hDECs) 形态图 (标尺: $100\mu\text{m}$);

图 3 为相差显微镜下传代培养的胃肌成纤维细胞形态图 (标尺: $100\mu\text{m}$);

图 4 为胃上皮细胞中胃特异性及内胚层祖细胞特异性蛋白表达图;

图 5 为人胃上皮细胞 (hGECs) 向内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 重编程的动态过程细胞形态图 (标尺: $100\mu\text{m}$);

图 6 为人十二指肠上皮细胞 (hDECs) 及其来源的内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 形态图 (标尺: $100\mu\text{m}$);

图 7 为分别以人胃上皮细胞 (hGECs) (A) 或胃肠道肌成纤维细胞 (GSEMFs) (B) 为起始细胞的重编程过程细胞形态图 (标尺: $100\mu\text{m}$);

图 8 为克隆形态全景扫描图, 显示第 7 天 (A) 和第 15 天 (B) 的不同克隆 (用虚线勾画大致轮廓), C、D、E、F 为代表性克隆的具体形态;

图 9 为克隆面积计算中不同大小克隆所占格子示意图 (标尺: $250 \mu\text{m}$);

图 10 为小分子化合物 (8M) 与各种滋养层细胞、细胞外基质或条件培养基支持下的克隆形成效率柱状图 (不同的支持条件下重编程的效率);

- 图 11 为 MSC、MEFs 和 aGSEMF-CM 支持作用下的细胞形态图（标尺：100 μ m）；
- 图 12 为 8 个小分子化合物（8M）逐一减去的克隆形成效率柱状图；
- 图 13 为 Bix01294（Bix）、Bay K 8644（Bay）、RG108（RG）和 SB431542（SB）4 个小分子化合物逐一减去的克隆形成效率柱状图；
- 图 14 为 Bix01294（Bix）、Bay K 8644（Bay）、RG108（RG）和 SB431542（SB）4 个小分子逐一减去的克隆形态图（标尺：100 μ m）；
- 图 15A 为以 SB431542 为基础并和其它三种小分子化合物组合下的克隆形成效率柱状图；
- 图 15B 为以 A83-01 为基础并和其它三种小分子化合物组合下的克隆形成效率柱状图；
- 图 16 为以 SB431542 为基础并和其它三种小分子化合物组合下的克隆形态图；
- 图 17 为小分子化合物优化过程的流程图；
- 图 18 为用荧光原位杂交（FISH）进行起始细胞的初步定位染色图（A: 男性来源的 hGECs 重编程后的 FISH 染色情况；B: 女性来源的 hGECs 重编程后的 FISH 染色情况）；
- 图 19 为胃窦部组织 CD56（NCAM）免疫荧光染色图（标尺：50 μ m）；
- 图 20 为起始细胞人胃上皮细胞（hGECs）的 NCAM 流式分选及相应亚群的重编程情况示意图（线条勾画的是不同克隆的大致轮廓）；
- 图 21 为诱导内胚层祖细胞（hiEndoPCs）中内胚层祖细胞特异性蛋白的流式水平检测图；
- 图 22 为诱导内胚层祖细胞（hiEndoPCs）中胃特异性及内胚层祖细胞特异性蛋白表达检测染色图；
- 图 23 为诱导内胚层祖细胞（hiEndoPCs）中内胚层祖细胞标志基因表达分析结果柱状图，（A）和内胚层祖细胞特异性基因的表达分析结果（B）；
- 图 24 为 DNA 甲基化芯片显示重编程前后全基因组 DNA 表观遗传的改变图（A: hGECs 与 hiEndoPCs 的聚类分析；B: hiEndoPCs 比 hGECs 低甲基化基因的 GO 分析）；
- 图 25 A 为火山图，显示 hiEndoPCs 与 hGECs 相比，启动子区域甲基化水平发生改变的基因数量；B 为 hiEndoPCs 与 hGECs 在 FOXA2 和 GATA4 基因启动子区域的甲基化水平比较图；
- 图 26 为 RNA 深度测序相关性分析图，显示 hiEndoPCs 与 ESC 来源的 DE、PGT、PFG 的关系；
- 图 27 为 PCA 分析图，显示 hGECs、hDECs、hGECs 来源的 hiEndoPCs、hDECs 来

源的 hiEndoPCs、ESCs 来源的 DE、GSEMFs 在全基因表达谱上的位置关系；

图 28 为 hGECs 与 hiEndoPCs 微观形态图，（标尺：2 μ m(A-D)，100nm(E)）；

图 29 为 hiEndoPCs 在重编程过程中的动力学特征图，A 为 hiEndoPCs 重编程过程中的时期划分轴向图，B 为不同时期的增殖速率曲线图，C 为 Phase II 和 Phase III 期的细胞形态的动态变化图；

图 30 为传代后的 hiEndoPCs 在不同支持环境下的细胞形态图（标尺：100 μ m）；

图 31 为 hiEndoPCs 在传代过程中的细胞形态图（标尺：200 μ m）；

图 32 为 hiEndoPCs 传代次数及每代的细胞数量柱状图；

图 33 为 hiEndoPCs 向胰腺诱导分化结果，A 为 hiEndoPC-Pans 的三维形态学图；B 为 hiEndoPC-Pans DTZ 染色图；C 和 D 为 hiEndoPC-Pans 胰腺特异性蛋白表达图（标尺：50 μ m）；E 为 hiEndoPC-Pans 的胰腺特异性基因表达图；F 为 hiEndoPC-Pans 的胰岛素释放反应图；

图 34 为 hiEndoPCs 向肠道诱导分化结果，A 为 hiEndoPC-Ints 的形态学图；B 为 hiEndoPC-Ints 肠特异性的基因表达图；C 为 hiEndoPC-Ints 的肠特异性蛋白染色图（标尺：50 μ m）；

图 35 为 hiEndoPCs 向肝脏的诱导分化结果，A 为 hiEndoPC-Heps 的肝特异性基因表达图；B 为 hiEndoPC-Heps 的 AFP 和 CK18 染色图（标尺：50 μ m）；C 为 hiEndoPC-Heps 的 ALB 和 AFP 流式水平检测图；

图 36 为 hiEndoPCs 向甲状腺（A）和肺（B）诱导分化的基因表达水平检测柱状图。

具体实施方式

在确定了起始细胞、初始小分子以及滋养层细胞后，本发明的技术路线（如图 1 所示）为：获取人胃上皮细胞（hGECs）作为起始细胞，从人胃组织肌层分离培养获取消化道肌成纤维细胞（aGSEMFs）来作为滋养层，筛选合适的小分子组合并在滋养层细胞的支持下将人胃上皮细胞谱系重编程为内胚层干/祖细胞。

首先，分离培养人胃来源的上皮细胞（hGECs）作为谱系重编程的起始细胞，通过初步筛选，确定八个小分子化合物组合：

SB431542+VPA+PD0325901+RG108+Bix01294+BayK8644+PS48+FBP，并在人胃来源的肌成纤维细胞(GSEMFs)作为滋养层的条件下可以将人胃上皮细胞（hGECs）重编程为内胚层祖细胞（hiEndoPCs）样的克隆。以能够出现内胚层祖细胞样克隆为标准，然后对重编程的体系一小分子化合物和滋养层细胞进行了优化，最终确定

Bix01294+BayK8644+RG108+SB431542（BBRS）为最优的小分子化合物组合，而且确定

了能够实现重编程的必需小分子化合物是 SB431542。由于滋养层细胞—人胃肌成纤维细胞(GSEMFs)的获取最为便利,因此确立了重编程最优的体系是 BBRs+GSEMFs,在这样的体系中重编程的效率为 4%-6%;此外,本发明还证实了内胚层祖细胞(hiEndoPCs)来源于 NCAM 阳性的 hGECs,实现了起始细胞的精确定位。

其次,还对诱导的内胚层祖细胞(hiEndoPCs)从内胚层特征性的基因、蛋白表达水平、表观遗传水平、全基因组表达水平、细胞微观形态水平及细胞增殖能力、内胚层分化潜能对诱导内胚层祖细胞(hiEndoPCs)做了全方位鉴定。首先检测了常见的内胚层祖细胞特征性的转录因子 FOXA2、SOX9、HNF1B、PDX1、GATA4,其它干/祖细胞特征性蛋白包括 CXCR4、EPCAM、LGR5、CK19 以及胃上皮特异性的标志 MMC6、GASTRIN 等在 hiEndoPCs 中的表达情况,发现与 hGECs 相比内胚层标志性的基因在 hiEndoPCs 中明显上调,而胃特异性的基因则不表达,初步证实了 hGECs 向内胚层祖细胞重编程成功。表观遗传分析也显示重编程后细胞发生了显著改变,具备了内胚层祖细胞的分子特征。对 hiEndoPCs 的发育阶段进行精确定位,深度测序的结果显示 hiEndoPCs 处于 hESCs 来源的原始消化管(PGT)和前肠后段(PFG)这两个内胚层发育阶段之间,且更接近 PFG。此外,hiEndoPCs 具有干细胞微观水平的特征并能进行 4-6 次的传代扩增。尽管与 ESCs 或 iPSCs 相比,hiEndoPCs 的扩增潜能有限,然而以 10^6 起始细胞为起点经过重编程和 4-6 代的扩增可以获得约 10^9 的细胞,这样的数量足以进行细胞治疗且在有限的传代次数内细胞的基因组相对稳定,更加安全,也更加有利于未来的细胞治疗。由于发育过程中内胚层祖细胞具有向胰腺、肝脏、肠、肺和甲状腺等内胚层器官进行分化的潜能,因此使用相应的诱导分化条件发现 hiEndoPCs 同样具有形成功能性胰腺 β 细胞、肝细胞、肠道细胞、肺细胞和甲状腺细胞的能力。

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法,具体步骤可参见:《Molecular Cloning: A Laboratory Manual》(Sambrook, J., Russell, David W., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, 2001, NY, Cold Spring Harbor)。

所述百分比浓度如无特别说明均为质量/质量(W/W, 单位 g/100g)百分比浓度、质量/体积(W/V, 单位 g/100mL)百分比浓度或体积/体积(V/V, 单位 mL/100mL)百分比浓度。

实施例中描述到的各种生物材料的取得途径仅是提供一种实验获取的途径以达到具体公开的目的,不应成为对本发明生物材料来源的限制。事实上,所用到的生物材料的来源是广泛的,任何不违反法律和道德伦理能够获取的生物材料都可以按照实施例中的提示替换使用。

实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施，给出了详细的实施方式和具体的操作过程，实施例将有助于理解本发明，但是本发明的保护范围不限于下述的实施例。

实施例 1、小分子化合物诱导人胃上皮细胞向内胚层祖细胞转换的体系建立

本发明重编程的目的细胞是内胚层祖细胞，考虑到肝脏、胰腺、胆道、胃、肠等从发育的角度来看都来源于内胚层，与内胚层祖细胞发育同源，表观遗传相似，重编程障碍相对较小，确定其是良好的起始细胞类型。其次，临床上胃大部切除术或胃癌切除术等消化道手术后，不可避免的会有部分正常的胃或十二指肠组织被遗弃，而且胃溃疡或十二指肠溃疡愈后胃镜活检随诊，也可获得的正常的胃或十二指肠的组织，因此起始细胞的来源也是可行的。本发明建立胃上皮细胞和滋养层细胞的培养体系，然后使用选择的四大类共八个小分子并且以消化道肌成纤维细胞做滋养层来进行向内胚层祖细胞的重编程。在这样的条件下成功的在胃上皮或十二指肠上皮细胞中产生了内胚层干/祖细胞样的克隆。重编程成功后，进一步对这个体系进行了优化，找到了最优的重编程小分子组合和最少的小分子组合。最后对起始细胞进行了分群，明确了能够重编程成功的起始细胞亚群。

本发明将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的总体思路和策略如下：

1、在起始细胞的选择上，肝脏、胰腺、胃肠等内脏器官都来源于内胚层祖细胞，它们在发育上同源，因此与其它胚层来源的细胞相比，它们之间具有更近的亲缘关系，更多的表观遗传相似性。此外，它们都是上皮组织类型细胞，在转换的过程中不需要经历 MET 的障碍，因此在理论上它们之间的细胞类型转换也就相对容易。此外，胃肠道组织细胞更新速度较快，大量细胞处于活跃增殖状态，增殖快速的细胞或祖细胞更易被重编程。胃肠道（GI-tract）是连接内脏各个器官的通道，各种消化道手术都会有大量切除的正常组织被遗弃，同时胃十二指肠组织通过活检也可获得。因此以 GI-tract 来源的人胃上皮细胞（hGECs）为起始细胞向内胚层祖细胞进行重编程，在与以成纤维细胞为起始相比，具有表观同源性的优势，上皮源性的优势，增殖祖细胞的优势和也具有临床操作的可行性。

2、在小分子的选择上，确定了四大类功能明确的，能够正向调控重编程的小分子群，分别是：

（1）信号通路抑制剂：TGF- β 信号通路抑制剂 SB431542（SB）或 A83-01（A83），SB 或 A83 可以替代 Sox2，与 Oct4、Klf4、c-Myc 组合就可产生 iPSCs，另一个是 MAPK/ERK 信号通路抑制剂 PD0325901（PD），PD 与 SB（或 A83）组合可将重编程效率提高 100

多倍，而且大大缩短重编程时间；

(2) 表观修饰剂：组蛋白去乙酰化酶抑制剂 VPA，VPA 甚至可以取代 Klf4、c-Myc 两个转录因子，与 Oct4、Sox2 组合可以促进 iPSCs 的生成，组蛋白甲基转移酶抑制剂 Bix01294 (BIX)、DNA 甲基转移酶抑制剂 RG108 (RG) 都可明显提高重编程效率；

(3) 钙离子通道激动剂 Bay K 8644 (Bay)，Bay 与 Bix 的组合则可取代 Sox2 与 c-Myc；

(4) 代谢通路调节剂：磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 激动剂 PS48、磷酸果糖激酶激动剂 FBP，有利于成熟细胞氧化磷酸化的能量代谢向干细胞无氧糖酵解的途径转换，从而提高重编程效率。

3、在滋养层细胞的选择上，为了促进内胚层祖细胞的产生和维持，选择了与内胚层器官紧密相关的消化道肌成纤维细胞作为滋养层细胞，这些细胞在发育的早期会通过旁分泌的作用影响内胚层器官的发生和支持内胚层祖细胞的扩增。

一、胃上皮细胞的分离培养及表型鉴定

材料与amp;方法

以下所列材料与amp;方法源自实验的原始记录。在本发明实际应用中，可以使用商业来源的材料和符合工业应用的方法实施，不受所列实验的限制。

(一) 实验材料

(1) 实验组织

手术或者活检来源的胃、十二指肠组织由中国人民解放军总医院和 307 医院普外科提供，流产胎儿组织由解放军总医院提供，所有提供组织的患者均已知情并签署知情同意书，组织标本使用经解放军总医院和 307 医院伦理委员会同意。

(2) 实验器材

激光共聚焦显微镜 (Zeiss)、恒温水浴锅 (长风)、低温离心机 (Eppendorf)、倒置相差显微镜 (Leica)、手术器械 (手术刀柄、刀片、眼科直镊、弯镊、剪刀)、激光共聚焦小皿 (NEST)。

(3) 主要试剂及配制

1、Kubota Medium (KM) 培养基的配制：一袋 RPMI 1640 (Gibco) 粉末溶解于 1L 去离子水中，加入 $1\times$ 青-链霉素， 10^{-9} M Zinc Sulfate heptahydrate (七水硫酸锌, Sigma)，0.54g Nicotinamide (烟酰胺, Sigma)，5mg Insulin (胰岛素, Sigma)， 10^{-6} M hydrocortisone (氢化可的松, Sigma)，2g NaHCO_3 (Sigma)， 5×10^{-5} M beta-mercaptoethanol (β 巯基乙醇, Sigma)，30nM Selenium (硒, Sigma)，游离脂肪酸 (Sigma)， $10\mu\text{g/mL}$ High density lipoprotein (高密度脂蛋白, Sigma)，

1g Bovine Serum Albumin (牛血清白蛋白, 购自 Gibco), 5mg Transferrin (转铁蛋白, Sigma), 2mM Glutamax (谷氨酰胺, 购自 Gibco)。

2、无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 的配制: 使用 1L 去离子水溶解 0.24g KH_2PO_4 , 8.0g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na_2HPO_4 , 可根据配制的体积等比例添加试剂。配制完成后 0.45 μM 滤膜过滤后高压蒸汽灭菌或直接 0.22 滤膜过滤后使用。

3、主要抗体:

表 1 用于人胃上皮细胞 (hGECs) 免疫荧光检测的第一抗体

一抗	公司	货号	一抗种属	稀释比
CXCR4 (C-X-C 基序趋化因子受体 4)	Abcam	ab77909	兔	200
EPCAM(上皮细胞粘附分子)	Neomarker	MS-181	小鼠免疫球蛋白 1	200
FOXA2(叉头编码框蛋白 A2)	R&D	AF2400	山羊免疫球蛋白	100
SOX9(性别决定区域 Y 基因 9)	Abcam	ab76997	小鼠免疫球蛋白 2a	50
CK19(细胞角蛋白 19)	Abcam	ab7754	小鼠免疫球蛋白 2a	200
LGR5(富含重复亮氨酸 G 蛋白偶联受体 5)	Sigma	HPA012530	兔	350
GASTRIN(胃泌素, GAST)	Santa Cruz	sc-7783	山羊	50
MUC6(黏膜蛋白-6)	Abcam	ab49462	小鼠免疫球蛋白 1	50

表 2 用于人胃上皮细胞 (hGECs) 免疫荧光检测的第二抗体

二抗	公司	货号	稀释比
Alexa Fluor® 568 山羊抗鼠免疫球蛋白 1 (γ 1)	Invitrogen	A21124	400
Alexa Fluor® 488 山羊抗鼠免疫球蛋白 2a (γ 2a)	Invitrogen	A21131	400
Alexa Fluor® 568 山羊抗鼠免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A11031	400
Alexa Fluor® 488 驴抗鼠免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A-21202	400
Alexa Fluor® 568 驴抗山羊免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A11057	400
Alexa Fluor® 488 驴抗兔免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A21206	400
Alexa Fluor® 568 山羊抗鼠免疫球蛋白 2a (γ 2a)	Invitrogen	A21134	400

4、0.075mg/mL IV型胶原酶的配制: 200mL Advanced RPMI 1640 培养基 (购自 Gibco) 中加入 20mg IV型胶原酶 (Sigma) 和 6mg DNase A。

5、其它试剂和材料: TrypLE 消化酶 (购自 Invitrogen)、4% (V/V) 多聚甲醛 (购自 Sigma)、DNase A (Invitrogen)、0.2% (V/V) Triton X-100 (聚乙二醇辛基苯基醚, 购自 Sigma)、胎牛血清 (FBS, Gibco)、枸橼酸钠缓冲液 (购自 Sigma)、DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吡啶, Sigma)、免疫组织化学试剂盒 (Vector lab)。

(二) 实验方法及结果

(1) 获取胃上皮细胞

胃上皮细胞可直接购买获得; 也可用以下操作分离培养获得胃窦、幽门部或十二指肠粘膜上皮细胞:

1)、提前将配制好的IV型胶原酶放置于室温或 37℃平衡,将 PBS 置于冰上预冷,准备 1000×青-链霉素,75% (V/V) 酒精消毒手术器械。

2)、从医院获取新鲜的胃手术后胃窦、幽门或十二指肠组织标本,尽量半个小时内用冰盒运输到实验室。

3)、在预冷的 PBS 中加入 5×的青-链霉素并用其清洗获取的组织标本 4-5 次,充分洗去残余血污。

4)、钝性分离清洗后的胃组织粘膜层与肌层,同样用含 5×青-链霉素的冷 PBS 分别清洗粘膜层和肌层,而后进行不同的处理。

5)、使用剪刀和手术刀结合将粘膜层剪碎或剁碎,加入适量的IV型胶原酶 (0.075mg/mL) 37℃水浴消化,每 2-3 分钟振荡一次,8-10 分钟沉降一次分离物,每次冰上沉降 2-3 分钟,然后滴管小心收集上清,余下部分继续加适量的酶消化。

6)、重复步骤 5,直至无明显的大块组织即终止。

7)、在收集的上清中加入预冷 PBS,4℃、1200rpm (转/每分钟) 离心 5 分钟,洗涤 3-4 遍,充分去除细胞中残留的消化酶。

8)、用含有 8% (V/V) 胎牛血清 (FBS) 和 1×青-链霉素的 KM 培养基以合适密度接种细胞,贴壁过夜,次日换为无血清的 KM 培养基进行培养。

9)、在培养的过程中每 2-3 天换液,大概培养 4-5 天即可开始重编程。

结果:将从临床获取的胃或十二指肠组织进行分离可得到粘膜层和肌层,粘膜层用于分离胃或十二指肠上皮细胞,肌层则用于分离滋养层细胞—肌成纤维细胞。按照实验步骤中胃或十二指肠上皮的组织分离方法,通常得到的是接近隐窝部的细胞。使用无血清的上皮细胞筛选培养基库部塔 (Kubota' s medium) 培养,人胃上皮细胞 (hGECs) 和十二指肠上皮细胞 (hDECs) 在培养中都呈现典型的舞蹈样的上皮形态 (如图 2 所示)。经过观察,大约第 4-5 天细胞的数量达到最多,此后细胞进入逐渐凋亡的状态。因此,通常以培养到 4-5 天后的细胞,来作为向内胚层祖细胞重编程的起始细胞。而且经过对几十例胃和十二指肠不同部位细胞分离培养的观察和分析来看,发现胃窦、幽门或十二指肠来源的组织无论是在细胞贴附还是生长方面都最好,胃体部或胃底、贲门部组织则几乎不能贴附或很难培养。又由于十二指肠组织来源相对较少,因此在后续的实验 中除非特别提及,都以胃窦部或胃幽门部组织作为来源,分离获取胃上皮细胞来作为重编程的起始细胞。

(2) 肌成纤维细胞的获得

肌成纤维细胞可直接购买获得;也可用以下贴壁法分离和培养胃肠道肌成纤维细胞:

1)、对前述获得的胃或十二指肠肌层使用手术刀片充分剁碎为小组织块，越小越好，加入少量的含 15% (V/V) 胎牛血清 (FBS) 的高糖培养基或 KM 培养基润湿组织碎块，使用 1 毫升小滴管将组织碎块均匀涂抹于 10cm 培养皿中，倒置于 37°C 培养箱 30 分钟。其余基质细胞分离培养方法如上述。

2)、贴附 30 分钟后，沿培养皿边缘加入基质细胞生长培养基，将细胞置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

3)、经过 5-7 天培养可见有梭形细胞从组织块周围爬出，2 周后大量细胞爬出并生长，此时进行细胞传代、冻存。这样即可获得胎儿胃的肌成纤维细胞 (fGSEMFs)、成人胃的肌成纤维细胞 (aGSEMFs)、胎儿肠肌成纤维细胞 (fISEMFs)、胎儿横膈基质细胞 (fDCs)。冻存后的细胞可为以后重编程提供滋养层细胞。

结果：将得到的胃或十二指肠肌层机械法剁碎成小块使用组织贴壁法分离培养肌成纤维细胞 (GSEMFs)。组织贴附约 4-7 天，可以看到有梭状的细胞从组织块中爬出，10-14 天可以进行传代，传代培养的肌成纤维细胞呈典型的长梭样的成纤维细胞形态 (如图 3 所示)。

(3) 胃上皮细胞的免疫荧光检测

对人胃上皮细胞 (hGECs) 特性进行免疫荧光鉴定，包括以下操作 (一抗、二抗分别如表 1 和表 2 所示)：

- 1)、4% (V/V) 多聚甲醛固定细胞 10-15min, PBS 清洗 2 遍。
- 2)、0.2% (V/V) Triton X-100 破膜 10 分钟, PBS 清洗一遍。
- 3)、二抗种属来源的血清封闭 1 小时, PBS 清洗一遍。
- 4)、相应一抗孵育 4°C 过夜, PBS 清洗 2-3 遍。
- 5)、相应二抗室温避光孵育 1 小时, PBS 清洗 2-3 遍。
- 6)、DAPI 室温避光孵育 15 分钟。
- 7)、激光共聚焦荧光显微镜下观察并摄像。

结果：如图 4 所示，免疫荧光染色发现人胃上皮细胞 (hGECs) 低表达内胚层祖细胞标志 CK19、FOXA2、CXCR4、SOX9、LGR5、EPCAM 等，而高表达胃特征性标志 MUC6 和 GAST。

第一部分“胃上皮细胞的分离培养及表型鉴定”成功建立了胃窦或幽门部胃上皮细胞和肌成纤维细胞的分离培养体系，体外培养的人胃上皮细胞 (hGECs) 呈典型的上皮样形态。由于隐窝部细胞通常较为原始 (与胃成熟细胞类型相比)，可以进行一定程度的增殖。人胃上皮细胞 (hGECs) 高表达胃特异性标志，低表达内胚层早期祖细胞标志，与我们先前的推测一致，因其部分表达内胚层祖细胞的某些标志，在向内

胚层祖细胞的重编程过程中重编程障碍会相对较小，因此是向内胚层祖细胞进行转换的良好起始细胞来源。但是人胃上皮细胞（hGECs）的胃上皮特征性的标记在重编程的过程中则必须要丢失。解决了起始细胞的来源和培养问题，而且也初步明确了其特性，下一步将以其为起始细胞进行向内胚层祖细胞的重编程。

二、小分子化合物和滋养层细胞诱导胃上皮细胞向内胚层祖细胞转换

材料与方法

（一）实验材料

（1）实验细胞

人胃上皮细胞（hGECs）和成人胃肌成纤维细胞（aGSEMFs）在步骤一中制备并保存。

（2）实验器材

倒置相差显微镜（Leica）、显微镜格子线、低温离心机（Eppendorf）、12孔板。

（3）主要试剂及配制

1、基础试剂

Advanced DMEM/F-12 培养基、Advanced RPMI 1640 培养基、NEAA（非必需氨基酸）、TrypLE 消化酶、谷氨酰胺（Glutamax）、Dispase（离散酶）均购自Gibco公司，青-链霉素和丝裂霉素-C（Sigma）。

2、小分子化合物

表3 8个小分子化合物（8M）

小分子名称	使用浓度	厂家
FBP（二磷酸果糖）	3.5mM	Sigma
Bay K 8644（氟硝尼啶）	2 μ M	Stemgent
Bix01294	0.5 μ M	Stemgent
SB431542	2 μ M	Stemgent
Valproic Acid（VPA，丙戊酸）	0.5mM	Stemgent
RG108	0.04 μ M	Stemgent
PD0325901	0.5 μ M	Stemgent
PS48	5 μ M	Stemgent

“使用浓度”是指各化合物以Advanced DMEM/F-12培养基为溶剂的浓度。

3、8M重编程培养基配制

配方：Advanced DMEM/F12 +2mM谷氨酰胺（Glutamax）+青-链霉素（100U/mL青霉素+0.1mg/mL链霉素）+SB43154（2 μ M）+VPA（0.5mM）+PD0325901（0.5 μ M）+RG108（0.04 μ M）+Bix01294（0.5 μ M）+Bay K 8644（2 μ M）+PS48（5 μ M）+FBP（3.5mM）。

该配方中各组分浓度均为其以 Advanced DMEM/F-12 培养基为溶剂的浓度。

(二) 实验方法及结果

(1) 小分子化合物介导人胃上皮细胞 (hGECs) 或十二指肠上皮细胞 (hDECs) 向诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 转换

具体方法包括以下步骤:

1、起始细胞的扩增: 原代分离的人胃上皮细胞 (hGECs) 或十二指肠上皮细胞 (hDECs) 作为起始细胞, 用 Kubota 培养基 (参照文献进行配制, 文献来源 Kubota, H., and Reid, L.M. (2000). Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 12132 - 12137) 在 37°C、5% CO₂ 培养箱条件下培养 4-5 天, 将起始细胞进行扩增。

2、滋养层细胞的准备: 用丝裂霉素-C (10 μg/mL, 目的是使滋养层细胞失去有丝分裂的能力) 处理滋养层细胞的成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs, 该细胞由胃组织基质层分离获得, 培养扩增后大量冻存, 需要时提前复苏备用) 2-3 小时, PBS 洗 3-4 遍, TrypLE 酶消化细胞, 而后洗涤细胞;

3、当待人胃上皮细胞 (hGECs) 或十二指肠上皮细胞 (hDECs) 培养至第 5-6 天时, 将已处理的胃肌成纤维细胞以适宜密度 (密度一般为 1~3×10⁵ 每平方厘米) 添加于培养中的人胃上皮细胞 (hGECs) 或十二指肠上皮细胞 (hDECs) 中, 在 37°C、5% CO₂ 培养箱中过夜 (12-16 小时);

4、重编程培养: 在添加了胃肌成纤维细胞的第二天更换为 8M 重编程培养基, 每 2-3 天换一次培养基, 连续观察, 一般培养 1 周或 2 周以上 (7-15 天), 得到诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs)。

结果:

(1.1) 人胃上皮细胞 (hGECs) 向诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 的转换

利用 8 个小分子化合物 (8M, 如表 3 所示), 在 8M 重编程培养基和分离培养的胃肠道肌成纤维细胞 (GSEMFs) 作为滋养层细胞的培养条件下, 人胃上皮细胞 (hGECs) 的形态不断发生明显变化, 由开始的形态较大的舞蹈样或多角样上皮, 在第 7 天开始出现边界较清晰的小的细胞克隆, 在第 15 天左右, 人胃上皮细胞 (hGECs) 已经被重编程为边界清晰, 细胞小而紧密, 形态较为均一, 核质比较大的典型内胚层干/祖细胞样克隆 (G-hiEndoPCs), 如图 5 所示 (图 5 中下排图片为上排图片方框中的放大部分)。

(1.2) 人十二指肠上皮细胞 (hDECs) 向内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 的转换

同样，以人十二指肠上皮细胞（hDECs）为起始，在 8M 重编程培养基和分离培养的胃肠道肌成纤维细胞（GSEMFs）作为滋养层细胞的作用下，经过 15 天的诱导也可形成典型的内胚层干/祖细胞克隆（D-hiEndoPCs）（如图 6 所示，左幅为十二指肠上皮细胞（hDECs），右幅为十二指肠上皮细胞重编程产生的内胚层干/祖细胞（D-hiEndoPCs），形态与 G-hiEndoPCs（图 5）几乎类似。由于十二指肠组织来源有限，通常以人胃上皮细胞（hGECs）作为重编程的起始细胞。

（1.3）仅以人胃上皮细胞（hGECs）或胃肠道肌成纤维细胞（GSEMFs）为起始细胞向内胚层祖细胞（hiEndoPCs）的转换

不使用小分子化合物，不能形成内胚层干/祖细胞样克隆，但是分别仅以人胃上皮细胞（hGECs）或胃肠道肌成纤维细胞（GSEMFs）为起始细胞，在 8M 重编程培养基中培养 15 天也均不能形成内胚层干/祖细胞样克隆（如图 7 所示），说明小分子化合物（8M）、人胃上皮细胞（hGECs）和胃肠道肌成纤维细胞（GSEMFs）的组合是内胚层祖细胞（hiEndoPCs）形成不可或缺的因素。

（2）克隆形成效率的计算

具体方法包括以下步骤：

- 1、计算克隆的总数。
- 2、使用显微镜格子线计算不同克隆的面积大小：每个显微镜微格的面积为 0.0625mm^2 ，用克隆所占的格子数乘以 0.0625mm^2 则是每个克隆的面积。
- 3、综合克隆的数目和克隆的面积大小来评价重编程的效率。

结果：在前述的观察中已经发现在重编程第 7 天时已经有小的细胞克隆开始出现，孔板全景扫描显示这样的小克隆界限清晰，数量非常多（图 8 之 A），在形态上已经接近经典的内胚层干/祖细胞克隆形态（图 8 之 C 和 D）。由于在重编程第 15 天产生的克隆形态最典型（图 8 之 E 和 F），通常在这个时间点计算克隆形成效率，但第 7 天至 15 天克隆的生长速度较快，许多克隆在计算的时间节点融合在一起形成大的克隆（图 8 之 B），因此克隆的数目在计算时较少，但是总的面积在增大，为了更加客观的反应重编程效果，本实验综合克隆的总数目以及不同面积下的克隆数目和克隆面积来作为重编程效率计算方法。使用显微镜格子线计算不同克隆的面积大小：每个显微镜微格的面积为 0.0625mm^2 ，用克隆所占的格子数乘以 0.0625mm^2 则是每个克隆的面积，不同大小的克隆面积计算方法如图 9 所示，计算结果参见表 4。

表 4：不同大小的克隆面积计算结果

	方格数	面积
a	12	0.750

b	0.1	0.006
c	6	0.375

第二部分在初步选择的八个小分子（8M）和成人胃肌成纤维细胞（aGSEMFs）作为滋养层的条件下成功的将人胃上皮细胞（hGECs）重编程到内胚层干/祖细胞（hiEndoPCs）的阶段，由于在重编程的过程中发生的最初的明显改变是细胞形态，因此将干/祖细胞克隆的出现作为重编程成功的初始判断。使用相同的方法同样可以将人十二指肠上皮细胞（hDECs）重编程为内胚层干/祖细胞（hiEndoPCs）。在重编程过程中，小分子化合物和滋养层细胞是必需的要素。尽管初步实现了我们的设想，但仍然需要找到最佳的重编程方案，尽可能的提高重编程效率，减少小分子化合物数目，而且找到关键的小分子将会对解析重编程的机制有着十分重要的提示作用。

三、小分子化合物和滋养层细胞重编程体系的优化

材料与amp;方法

（一）实验材料

（1）实验细胞

人胃上皮细胞（hGECs）、胎儿胃肌成纤维细胞（fGSEMFs）、成人胃的肌成纤维细胞（aGSEMFs）、胎儿肠肌成纤维细胞（fISEMFs）、胎儿横隔基质细胞（fDCs）在步骤一中制备；间充质干细胞（MSCs）、小鼠胚胎成纤维细胞（MEFs）、成人皮肤成纤维细胞（HFFs）来源于包皮组织，由本实验室分离培养并保存。

（2）实验器材

倒置相差显微镜（Leica）、显微镜格子线、12孔板。

（3）主要试剂

1、基础试剂：Advanced DMEM/F-12 培养基、Advanced RPMI 1640 培养基、NEAA（非必须氨基酸）、谷氨酰胺（Glutamax）均购自Gibco公司；青-链霉素、丝裂霉素-C购自Sigma公司；TrypLE、Dispase 消化酶购自Invitrogen公司；Matrigel 胶购自BD公司；Gelatin购自Sigma公司。

2、小分子化合物组合（8M）：种类和使用浓度与第二部分相同（见表3）。

（二）实验方法及结果

（1）胎儿肠肌成纤维细胞（fISEMFs）或成人胃的肌成纤维细胞（aGSEMFs）条件培养基制备：用浓度10 μg/mL的丝裂霉素C处理fISEMFs细胞或aGSEMFs细胞2-3小时，PBS洗3-4遍，然后加上Advanced（先进）DMEM/F-12培养基培养，每天收集培养基，0.22 μM滤器过滤，保存于-80℃。

(2) 不同的滋养层细胞支持人胃上皮细胞 (hGECs) 重编程为内胚层祖细胞 (hiEndoPCs)

具体方法包括以下步骤:

- 1)、起始细胞人胃上皮细胞 (hGECs) 的处理与步骤二中的方法相同。
- 2)、各种滋养层细胞的准备与第二部分中的方法相同。
- 3)、重编程方法与第二部分中的方法相同。
- 4)、在重编程第 15 天计算小分子化合物 (8M) 与各种滋养层细胞、细胞外基质或条件培养基下支持下的克隆形成效率, 进而找到合适的滋养层细胞。

结果: 在前述的实验中使用 8 个小分子化合物 (8M) 和成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs) 实现了人胃上皮细胞 (hGECs) 向内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 的转换。接下来确定更佳的滋养层细胞或实现无滋养层细胞的重编程。使用了多种消化道来源的基质细胞包括胎儿胃肌成纤维细胞 (fGSEMFs)、胎儿肠肌成纤维细胞 (fISEMFs)、胎儿横膈基质细胞 (fDCs) 以及其它常用的滋养层细胞如间充质干细胞 (MSCs)、小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs)、成人皮肤成纤维细胞 (HFFs) 等, 还测试了多种细胞外基质如 Matrigel 胶、明胶等, 以及胎儿肠肌成纤维细胞 (fISEMFs) 来源的和成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs) 来源的条件培养基, 分别来进行重编程的比较。在 8M 重编程培养基条件下, 发现 fISEMFs、fGSEMFs、aGSEMFs 等消化道基质细胞和横膈基质细胞都可以成功的支持 hGECs 产生 hiEndoPCs, 其中又以胎儿肠肌成纤维细胞 (fISEMFs) 的重编程效率最高, 其它的支持介质如 MEFs、HFFs、MSCs、Matrigel、明胶以及条件培养基等则很少或几乎不能支持重编程 (如图 10 所示)。以 MSCs 或 MEFs 为支持细胞会产生少量的不典型的上皮样细胞克隆。在成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs) 来源的条件培养基 (aGSEMFs-CM) 中随着培养时间的延长, 细胞在不断凋亡 (如图 11 所示, 图中右上角或左上角图片为小方框中的放大图)。由于胎儿组织来源有限, 而临床上成人的胃手术标本最容易获取, 可以得到足量的成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs), 而且 aGSEMFs 也可以维持较高的重编程效率, 因此 aGSEMFs 是一类良好的重编程滋养层细胞, 后续的实验中将以其为滋养层细胞来支持重编程。

(3) 小分子组合的优化—重编程必要小分子的筛选

1)、以第二部分筛选的滋养层细胞为支持细胞, 在前述的 8 个小分子化合物 (8M) 培养条件的基础上逐个递减小分子, 首先筛选到不可或缺的小分子。

2)、再以第 1) 步筛选的小分子化合物组合为基础, 依次逐个递减最终找到最佳 (重编程效率最高) 的小分子化合物组合和最少 (保证克隆能够形成) 的小分子化合物组合。

(4) 统计学分析

所有数据均来自于 3 次及以上独立重复试验，除特殊说明外，数据均描述为平均值±标准差。两组数据间统计学分析用 SPSS 软件进行学生双尾 t 检验， $P < 0.05$ 时两组之间的差异被认为具有统计学意义。

结果：在步骤（2）中确定了最合理的滋养层细胞—成人胃肌成纤维细胞（aGSEMFs），以其作为支持细胞，来进行小分子组合的优化。以 8 个小分子化合物的组合（8M）为基础然后逐个递减小分子，当减去 PD0325901、PS48、FBP 后克隆的形成效率有所提高，说明这些小分子化合物在重编程中起到一定的抑制作用，应该舍去；当减去 VPA 后，克隆形成的效率没有明显变化，表明 VPA 可有可无，基于简单化原则，应该去掉；但当减去 Bix01294、Bay K 8644、RG108 时克隆的形成效率明显减少，尤其是当 SB431542 减去后克隆不能产成（如图 12 所示），表明这四个小分子是必要的。

在前述必须的 4 个小分子化合物 Bix01294、Bay K 8644、RG108、SB431542（简称 BBRS 组合）的组合上，诱导内胚层祖细胞（hiEndoPCs）同样可以产生而且效率比 8 个小分子化合物（8M）条件下更高。然后再以 Bix01294、Bay K 8644、RG108、SB431542（BBRS 组合）为基础再进行优化，当去除 Bix01294（Bix）、Bay K 8644（Bay）、RG108（RG）任何一个小分子，克隆的形成效率都会明显下降（如图 13 所示），但克隆的形态与 BBRS 组没有明显差异，当减去 SB431542（SB）后则没有克隆形成（如图 14 所示）。因此确定了重编程最佳的组合是 Bix01294、Bay K 8644、RG108、SB431542（BBRS），在 BBRS 组合条件下重编程的效率约为 4%–6%（如图 13 所示）。

由于 SB431542 的作用最为关键，因此以 SB431542 为基础，再与另外三个小分子（Bix01294（Bix）、Bay K 8644（Bay）、RG108（RG））的任意一个进行组合，发现 SB431542 是能够保证克隆形成的最少小分子组合，尽管效率不及最优组合 BBRS（如图 15A 所示），但形态都无明显差异（如图 16 所示）。SB431542 不可或缺的作用对重编程过程中小分子化合物的作用机制有重要的提示作用。

(5) 重编程必要小分子化合物的优化

在证实了重编程体系中 SB431542（SB）是最少的能够保证重编程成功的小分子化合物后，由于 SB431542 是 TGF- β 信号通路抑制剂，发明人尝试使用另一种 TGF- β 信号通路抑制剂 A83-01（A83）替代 SB 重复小分子化合物组合的优化实验，结果 A83（使用浓度 0.5 μ M）无论是单独作用还是与其他小分子组合（简称 BBRA 组合）都可以产生和 SB 类似甚至更好的重编程作用。结果见图 15B，其中 BBR 分别代表另外三个小分子 Bix01294（B）、Bay K 8644（B）、RG108（R）。

第三部分通过对滋养层细胞的筛选，确定了多种消化道肌成纤维细胞都可以支持人胃上皮细胞（hGECs）向内胚层祖细胞（hiEndoPCs）的转换，尤其是胎儿来源的基质细胞支持作用更强，提示与消化道相关的滋养层细胞对于内胚层祖细胞重编程的独特支持作用。考虑到细胞来源的充足情况，确定了成人胃肌成纤维细胞（aGSEMFs）为滋养层细胞。在 aGSEMFs 为支持细胞的基础上，通过 3 轮小分子的优化过程筛选到了最佳的重编程小分子组合 Bix01294、Bay K 8644、RG108、SB431542（BBRS）或 Bix01294、Bay K 8644、RG108、A83-01（BBRA）以及必要小分子 SB431542 或 A83-01（A83），其筛选过程如图 17 所示。后面实施例 3 中，发明人将以 BBRS+aGSEMFs 为例作为重编程条件，对人胃上皮细胞（hGECs）向内胚层祖细胞（hiEndoPCs）重编程做详细描述。

四、重编程起始细胞的精确定位

材料与方法

（一）实验材料

（1）实验细胞、组织

人胃上皮细胞（hGECs）、成人胃的肌成纤维细胞（aGSEMFs）、成人胃窦部组织（解放军总医院提供）。

（2）实验器材

流式细胞分析仪（BD），激光共聚焦显微镜（Zeiss），倒置相差显微镜（Leica）。

（3）主要试剂

基础试剂：Advanced DMEM/F-12 培养基、NEAA（非必须氨基酸）、谷氨酰胺（Glutamax）均购自 Gibco 公司；青-链霉素、Accutase、丝裂霉素-C 均购自 Sigma 公司；TrypLE 消化酶购自 Invitrogen 公司。

小分子化合物：SB431542、Bix01294、RG108、Bay K 8644 均购自 Stemgent 公司。

抗体：CD56-PE（eBioscience）、兔抗人 CD56（NCAM）（Abcam）、鼠抗人 IgG1 MUC5AC（Abcam）；Alexa Fluor® 647 Goat Anti-Mouse IgG2b（ γ 2b）、Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Mouse IgG1（ γ 1）均购自 Invitrogen 公司。

（二）实验方法及结果

（1）荧光原位杂交（FISH）一起始细胞的初步定位

具体方法包括以下步骤：

1）、将男性来源的胃上皮细胞接种到女性来源的滋养层细胞上进行重编程或者反之。

2)、重编程成功后对原孔的细胞用甲醇和冰醋酸的混合物(3:1)固定 20 分钟,送公司进行 X 和 Y 染色体的原位杂交。

3)、处理完后的细胞在共聚焦显微镜下观察性别染色体分别在 hiEndoPCs 和滋养层细胞上的染色情况。

结果:由于在重编程体系中涉及到两种细胞类型,起始细胞—人胃上皮细胞(hGECs)和滋养层细胞—成人胃肌成纤维细胞(aGSEMFs),前述已经证实它们单独都不能被重编程为诱导内胚层祖细胞(hiEndoPCs),只有两者组合并在 BBRS 重编程培养基的培养下经重编程才能成功。为了进一步证实 hiEndoPCs 确实来源于胃上皮细胞而不是滋养层细胞,进行了性别错配结合荧光原位杂交(FISH)的实验:使用男性来源的 hGECs 作为起始细胞,以女性来源的胃肠道肌成纤维细胞(aGSEMFs)为滋养层细胞进行重编程,荧光原位杂交(FISH)的结果显示,重编程得到的 hiEndoPCs X 和 Y 染色体都是阳性,表明是确实是男性来源,而滋养层细胞则仅是 X 染色体阳性表明是女性来源(图 18 A);而当以女性来源的 hGECs 作为起始细胞,以男性来源的胃肠道肌成纤维细胞(aGSEMFs)为滋养层细胞进行重编程,荧光原位杂交(FISH)的结果则显示 hiEndoPCs 仅 X 染色阳性,表明是女性来源,而滋养层细胞 X、Y 染色体均阳性表明是男性来源(图 18 B)。本实验充分证明了 hiEndoPCs 起源于胃上皮细胞而非滋养层细胞。

(2) 起始细胞人胃上皮细胞(hGECs)表面标志的确定—CD56 标记的流式分选、接种和重编程

具体方法包括以下步骤:

1)、用 Accutase(细胞消化液)将人胃上皮细胞(hGECs)消化成单细胞,1000rpm 离心 5min,弃上清。

2)、用 PBS 洗 1 遍。

3)、用 PBS 重悬并加入适量 CD56-PE,对照组加 PE(PE,一种荧光标记染料)同型对照抗体。

4)、置于 4℃ 摇床 45min。

5)、用 PBS 洗 3 遍。

6)、用适量 PBS 重悬。

7)、用流式细胞仪进行分析并筛选,分别保留 CD56 阳性细胞和阴性细胞(全程注意无菌)。

8)、将 CD56 阳性和阴性的细胞以同样的数量接种于提前用丝裂霉素 C 处理好的成人胃肌成纤维细胞(aGSEMFs)上,细胞贴附过夜(12-16 小时)后更换为 BBRS 重

编程培养基，进行重编程。

对胃窦部组织 CD56 (NCAM, 神经细胞粘附分子, 是表达于细胞膜上的一种表面蛋白) 免疫荧光染色, 细胞免疫荧光染色方法同第一部分。

结果: 通过 FISH 实验明确证实了起始细胞来源于胃上皮细胞而非滋养层细胞。由于胃上皮细胞属于原代细胞, 细胞类型较为混杂, 为了进一步明确起始细胞中哪一类亚群发生了向 hiEndoPCs 的转换, 需要对起始细胞进行细分。首先需要明确 hGECs 的表面标记, 由于分离的 hGECs 主要来源于胃窦部的隐窝, 有研究报道 NCAM 是表达于多种内胚层来源组织的一种表面标志尤其是表达于较原始的细胞上, 因此对胃窦部组织进行 NCAM 原位染色, 发现 NCAM (CD56) 主要在深部胃组织 (即隐窝部分) 中有强弱不同程度的表达 (如图 19 左幅红色荧光所示), 浅部胃组织几乎不表达, 浅部组织主要表达 MUC5AC (如图 19 中间幅绿色荧光所示, 图 19 右幅为显示 NCAM 染色和 MUC5AC 染色的合成图), 因此认为 NCAM 是可以用于起始细胞分群的可靠标志。

以 NCAM 作为分选标记对培养的 hGECs 进行流式分类, 分为 NCAM 阳性和 NCAM 阴性的两群细胞。然后以 NCAM 阳性和阴性的细胞为起始细胞分别进行重编程。结果显示 NCAM 阳性的起始细胞能够重编程成功, 而阴性的细胞几乎不能 (如图 20 所示)。

第四部分通过性别错配实验证实起始细胞来源于胃上皮细胞而非滋养层细胞。通过对起始细胞进行细分类, 进一步证实了是 NCAM 阳性而非 NCAM 阴性的胃上皮细胞在重编程的过程中发生了细胞类型转换, 从而实现了起始细胞的精确定位。

实施例 2、诱导内胚层祖细胞的表型鉴定及分化潜能

内胚层祖细胞被认为是肝、胰、肠, 胃、肺、甲状腺等内脏器官发育的起始, 而且具有增殖能力, 因此是获取功能性肝细胞、胰腺细胞、肠细胞、肺和甲状腺细胞的良好种子细胞。之前有多项以胚胎干细胞 (Embryonic stem cells) (ESCs) 或诱导多能性干细胞 (induced Pluripotent Stem Cells) (iPSCs) 为起始获取内胚层祖细胞的研究, 为本实施例中鉴定重编程获得的内胚层祖细胞奠定了良好的基础。在实施例 1 中我们使用 BBR5 和成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs) 的组合成功的在人胃上皮细胞 (hGECs) 中产生了内胚层干/祖细胞样的克隆 (hiEndoPCs)。然而这只是初步的形态改变, 还要证实其内胚层祖细胞属性, 使用 PCR 和免疫蛋白染色的方法鉴定诱导内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs) 特征性基因表达, 基因芯片检测其全基因组表达, 甲基化芯片进行表观遗传分析, 还测试了其增殖特性, 使用电镜观察其微观特性, 采用不同的诱导分化体系对其向肝脏、胰腺、肠道、肺和甲状腺分化的潜能进行了鉴定, 来证实通过谱系重编程确实获得了内胚层祖细胞样的细胞 (hiEndoPCs) 并且挖掘

hiEndoPCs 细胞的特有属性。

一、诱导内胚层祖细胞标志性基因的表达

材料与amp;方法

(一) 实验材料

(1) 实验细胞

成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs)、人胃上皮细胞 (hGECs)、诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs)、H9 人胚胎干细胞 (ESCs) 购自 Wicell 公司。

(2) 实验器材

实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad)、普通 PCR 仪 (Eppendorf)、倒置相差显微镜 (Leica)、实时定量 96 孔板及封闭膜 (Bio-Rad)、12 孔板、激光共聚焦荧光显微镜 (Zeiss)、细胞免疫共聚焦小皿 (NEST)。

(3) 主要试剂

抗体同实施例 1 第一部分、免疫组化试剂盒 (Vector Lab)、RA 和 LDN193189 均购自 Sigma 公司; A83-01 购自 Stemgent 公司; b-FGF、Wnt3a、ActivinA、FGF10 购自 R&D 公司。

(4) 引物序列

表 5 引物序列

基因名称	引物序列 (F:5' → 3')	引物序列 (R:5' → 3')
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TTGATTTTGGAGGGATCTCG
FOXA2	GCGACCCCAAGACCTACAG	GGTTCTGCCGGTAGAAGGG
GATA4	CCCAGACGTTCTCAGTCAGTG	GCTGTTCCAAGAGTCCTGCT
ONECUT2	CGATCTTTGCGCAGAGGGTGCTGT	TTTGCACGCTGCCAGGCGTAAG
HNF1B	TGTACGCACACAAGCAGGAA	GTTGGTGAGTGTACTGATGCTG
HOXA3	AGCAGCTCCAGCTCAGGCGAAA	TGGCGCTCAGTGAGGTTTCAG
NANOG	ACAACCTGGCCGAAGAATAGCA	GGAGGAAGCTGACAACAATGAAA
SOX9	AGCGAACGCACATCAAGAC	GCTGTAGTGTGGGAGGTTGAA
OCT4	CTTGAATCCCGAATGGAAAAGGG	GTGTATATCCCAGGGTGATCCTC
SOX2	TACAGCATGTCCTACTCGCAG	GAGGAAGAGGTAACCACAGGG
C-MYC	TCGGAAGGACTATCCTGCTG	GTGTGTTCCGCTCTTGACATT
PDX1	TTAGGATGTGGACGTAATT	GGTCAAGTTCAACATGACAG
GAST	ATGCAGCGACTATGTGTGTATG	GCCCCTGTACCTAAGGGTG
GIF	ACTCATGGAGAACTCGGTGAC	GGGCCTTCAAGTTGTAGGCTC
PGC	AGTCTATCCGTGAGACCATGAA	GCGGTACTTCCAAGCAGGA

(二) 实验方法及结果

(1) 诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 的特征性蛋白表达分析
蛋白免疫荧光染色方法同实施例 1。

(2) 诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 中特异性基因的表达分析

提取重编程克隆的 RNA、反转录及实时荧光定量 PCR，具体方法包括以下步骤：

1)、手动挑取重编程产生的细胞克隆，尽量避免滋养层细胞的混入，然后用 RNA 提取试剂盒(购自 QIAGEN)将挑取的细胞按说明书的要求加入适量裂解液 Buffer RLT，充分裂解细胞，并继续按下述步骤来提取 RNA：

2)、加入等体积的 70% (V/V) 乙醇到裂解液里，用移液枪吹打混匀。

3)、将混匀液包括沉淀加入到 spincolumn (离心柱，购自 QIAGEN) 并置于 2mL 收集管中，12000rpm 离心 30s，弃掉滤液。

4)、加入 700 μ L 的 Buffer RW1 (RNA 提取试剂盒提供，购自 QIAGEN) 到 spincolumn 中，12000rpm 离心 30s，弃掉滤液。

5)、加入 500 μ L Buffer RPE (RNA 提取试剂盒提供，购自 QIAGEN) 到 spincolumn 中，12000rpm 离心 30s，弃掉滤液。

6)、加入 500 μ L Buffer RPE 到 spincolumn 中，12000rpm 离心 2min，弃掉滤液，然后再空离 1min。

7)、将 spincolumn 移至新的 1.5mL 收集管中，加入 30 μ L RNeasy-free water (无核糖核酸酶水) 到 spincolumn 膜的中央，12000rpm 离心 1min，弃去 spin column，收集管内即为提取的 RNA 溶液。

8)、使用分光光度计测定洗脱的 RNA 样品浓度。

9)、按 1 μ g 的 RNA 总量吸取相应体积的 RNA，并加入 RNA-free water (无核糖核酸酶水) 至 16 μ L，65 $^{\circ}$ C 加热 5min，然后快速将离心管转移到冰上冰浴 2 分钟。

10)、冰浴结束后加入 4 μ L RNA 反转录试剂盒中的 5 \times RT 反转录试剂，使用普通 PCR 仪反转录程序为：37 $^{\circ}$ C 15 分钟，50 $^{\circ}$ C 5 分钟，98 $^{\circ}$ C 5 分钟，4 $^{\circ}$ C 终止。

11)、按需求吸取反转录获取的 cDNA、三蒸水、SYBR，提前于 96 孔板中加入检测引物，体系 (具体为：cDNA 加水总共 9 μ L，SYBR 10 μ L，引物 1 μ L) 配制完成后，封闭膜封闭孔板，放入实时荧光定量 PCR 仪中，程序：95 $^{\circ}$ C 3 分钟，95 $^{\circ}$ C 10 秒，60 $^{\circ}$ C 35 秒，65 $^{\circ}$ C 5 秒，95 $^{\circ}$ C 5 秒，总共循环 45 次。

(3) 胚胎干细胞 (ESCs) 向定性内胚层 (DE) 定向诱导分化

提前将生长状态良好的人胚胎干细胞 H9 以适宜密度接种接种于 Matrigel 胶包被的孔板里，次日更换培养基为 DE 诱导培养基：Advanced RPMI 1640+1% (W/V) B27 (无血清神经细胞添加剂) +ActivinA(激活素 A, 100ng/mL)+CHIR99021 (3 μ M, 购

自 Stemgent) 作用 1 天, 第 2 天和第 3 天更换培养基为: Advanced RPMI 1640+1% B27+ActivinA (100ng/mL)。

(4) 胚胎干细胞 (ESCs) 向原始消化管 (PGT) 定向诱导分化

向定性内胚层 (DE) 诱导后将培养基更换为 PGT 诱导培养基: Advanced (中文名称: 先进) RPMI 1640+2% (V/V) FBS+ 50ng/mL FGF10(成纤维生长因子 10)+ cyclopamine (环巴胺, 0.25 μ M), 作用 3 天即可得到 PGT。

(5) 胚胎干细胞 (ESCs) 向前肠后段 (PFG) 定向诱导分化

向定性内胚层 (DE) 诱导后将培养基更换为 PFG 诱导培养基: Advanced RPMI 1640+RA(维甲酸, 2 μ M)+ LDN193189 (0.25 μ M, 购自 Sigma), 作用 3 天即可得到 PFG。

(三) 统计学分析

所有数据均来自于三次及以上独立重复试验, 除特殊说明外, 数据均描述为平均值 \pm 标准差。两组数据间统计学分析用 SPSS 软件进行学生双尾 t 检验, $P < 0.05$ 时两组数据之间的差异被认为具有统计学意义。

结果:

(1) 诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 的特征性蛋白表达分析

对重编程后的克隆进行内胚层特异性蛋白的流式分析发现, hiEndoPCs 均一性高表达 FOXA2 (叉头编码框蛋白 A2)、SOX9 (性别决定区域 Y 基因 9)、SOX17 (性别决定区域 Y 基因 17)、LGR5 (富含重复亮氨酸 G 蛋白偶联受体 5)、EPCAM (上皮细胞粘附分子), 如图 21 所示 (Isotype 为同种型)。对 hiEndoPCs 进行免疫荧光染色发现, 如图 22 所示, hiEndoPCs 不再表达胃特异性的标志 MUC6 (黏膜蛋白-6) 和 GAST (胃泌激素), 失去了胃的属性, 而开始明显表达内胚层干/祖细胞特异性的转录因子 FOXA2 (红色荧光, 表达量 $96 \pm 2.6\%$)、SOX9 (红色荧光, 表达量 $97 \pm 1.18\%$) 和其它内胚层干/祖细胞相关的标志如 CXCR4 (绿色荧光, 表达量 $98 \pm 0.56\%$)、EPCAM (红色荧光, 表达量 $97 \pm 2.7\%$)、LGR5 (绿色荧光, 表达量 $92 \pm 4.3\%$)、CK19 (绿色荧光, 表达量 $91 \pm 4.2\%$)。流式水平的检测与免疫蛋白染色相一致, 更加印证了 hiEndoPCs 的内胚层祖细胞特征。

(2) 诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 中特异性基因的表达分析

转录水平的结果也显示与起始细胞人胃上皮细胞 (hGECs) 相比, 内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 中内胚层早期发育相关的基因 FOXA2 (叉头编码框蛋白 A2)、SOX9 (性别决定区域 Y 基因 9)、GATA4 (GATA 结合蛋白 4)、HNF1B (肝细胞核因子同源框蛋白 B)、PDX1 (胰十二指肠同源异型盒基因 1)、ONECUT2 (一切除域蛋白家族 2)、HOXA3 (同源框蛋白 A3) 明显上调, 甚至与胚胎干细胞 (ESCs) 来源的内胚层早期发

育阶段-定性内胚层 (DE)、原始消化管 (PGT)、前肠后段 (PFG) 中早期内胚层基因的表达可比, 尤其与 PFG 的表达模式最为相似 (图 23 的 A 幅, 图 23 A 中柱群从左至右依序为 hECs、DE、PGT、PFG、hiEndoPCs,P1、hiEndoPCs,P4 和 hGECs)。而且 hiEndoPCs 不再表达胃特异性标志 MUC6、PGC、GIF 和 GAST (图 23 的 B 幅, 图 23 B 中柱群从左至右依序为 hGECs、hiEndoPCs 和人胃组织)。

小结: 起始细胞人胃上皮细胞 (hGECs) 重编程后得到的诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 失去了胃特征性的标志如 MUC6、GIF、PGC、GAST 等, 而开始高表达内胚层早期祖细胞标志性基因如转录因子 FOXA2、SOX9、HNF1B、GATA4、PDX1、HOXA3 和其它内胚层祖细胞的标志如 CXCR4、CK19、LGR5、EPCAM。转录水平和蛋白表达水平都显示了 hiEndoPCs 的内胚层祖细胞特征。然而, 想要全面明确 hiEndoPCs 分子特性、发育阶段特征和时空定位, 还需对其进行全基因表达或表观遗传表达谱的分析。

二、诱导内胚层祖细胞表观遗传分析和发育阶段定位

材料与amp;方法

(一) 实验材料

(1) 实验细胞

成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs)、人胃上皮细胞 (hGECs)、十二指肠上皮细胞 (hDECs)、诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs)、定性内胚层 (DE)、原始消化管 (PGT)、前肠后段 (PFG)。

(2) 实验器材

普通 PCR 仪 (Eppendorf)。

(3) 主要试剂

Illumina TotalPrep kit (伊鲁米娜完全预备试剂盒, Ambion)、Sentrrix Chip Array (圣翠科斯芯片阵列, Human HT-12)、QIAamp DNA Micro Kit (微量 DNA 提取试剂盒, Qiagen)、EZ DNA Methylation-Gold kit (脱氧核糖核酸甲基化金试剂盒, Zymo Research)。

(二) 实验方法及结果

(1) hGECs、hiEndoPCs、PGT、PFG 的 RNA 提取、反转录方法同本实施例步骤一。

(2) 深度测序处理及分析 (中科院北京基因组所协作完成)

提取的 hGECs、hiEndoPCs、PGT、PFG RNA 先扩增, 按照 Illumina TotalPrep 试剂盒提供的步骤从总 RNA 中产生生物酰化的 cRNA, 然后使用 Sentrrix Chip Array 对 cRNA 进行杂交, 杂交后的处理按照 Illumina 公司提供的方法, 使用 Illumina BeadStudio 软件对数据进行处理, 原始数据上传至 Gene Expression Omnibus

database (accession number GSE69706)。

(3) DNA 甲基化处理及分析 (中科院北京基因组所协作完成)

首先进行 DNA 文库构建、上机测序和数据分析, 收集来自两个不同标本的 hGECs 和相应的两个 hiEndoPCs 单克隆, 用 QIAamp DNA Micro Kit 提取基因组 DNA, 用 EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research, 货号 D5005) 进行亚硫酸转化, 然后用高通量测序平台 HiSeq 2500 (Illumina) 进行测序。原始数据提交至 Gene Expression Omnibus database (accession number: GSE69706)。

结果:

(1) 诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 的全基因组 DNA 表观遗传分析

步骤一对 hiEndoPCs 的鉴定局限在内胚层干/祖细胞的某些特征性的标记上, 为了证实 hiEndoPCs 与 hGECs 确实是两类不同的细胞, 我们又使用全基因组 DNA 甲基化芯片检测来对 hiEndoPCs 与 hGECs 从表观遗传修饰角度进行分析。聚类分析结果显示 hiEndoPCs 与 hGECs 拥有不同的表观模式 (图 24 的 A 幅), 明确证实了重编程后细胞发生了重大改变。Gene Ontology (GO) 分析显示, 与 hGECs 相比, hiEndoPCs 中低甲基化状态的基因, 也就是处于活跃状态的基因分类主要与胚胎发育或干细胞发育相关 (图 24 的 B 幅)。这正与 hiEndoPCs 的内胚层早期属性和干/祖细胞属性相一致。

(2) 诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 中的特征性基因的启动子区表观修饰

甲基化分析显示, 与 hGECs 相比, 在 hiEndoPCs 中启动子区域甲基化发生上调和下调的基因分别有 519 和 857 个 (图 25 之 A), 其中内胚层特异性的转录因子 FOXA2 (叉头编码框蛋白 A2) 和 GATA4 (GATA 结合蛋白 4) 的启动子区域甲基化水平在 hiEndoPCs 中明显降低 (图 25 之 B), 说明 FOXA2 和 GATA4 的基因表达处于转录激活状态, 这与 hiEndoPCs 中 FOXA2 和 GATA4 基因高表达相一致。

(3) 诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 的发育阶段定位

在从多个水平证实了 hiEndoPCs 的内胚层干/祖细胞的特征后, 还需要对 hiEndoPCs 所处的发育阶段进行定位以进一步明确其特征。由于 hiEndoPCs 自然状态下的阳性对照难以得到, 因此以较为公认的胚胎干细胞 (ESCs) 来源的按照发育过程诱导的定性内胚层 (DE)、原始消化管 (PGT)、前肠后段 (PFG) 等早期内胚层阶段作为阳性对照来与重编程获得的 hiEndoPCs 进行全基因组表达谱的比较, RNA 深度测序显示 hiEndoPCs 处于 PGT 与 PFG 之间且更接近于 PFG (图 26)。此外, PCA 主成分分析显示胃上皮细胞来源的 hiEndoPCs 与十二指肠上皮细胞来源的 hiEndoPCs 在全基因组表达谱上非常相似 (PCA 主成分分析是指将多个变量通过线性变换以选出较少个数重要变量的一种多元统计分析方法), 这与前面发现的它们在细胞形态上极其类似相

一致，并且都与它们的起始细胞不同，也与 ESCs 来源的定性内胚层（DE）、滋养层细胞（GSEMFs）明显不同（图 27）。

小结：全基因组 DNA 甲基化水平分析进一步证实了 hGECs 与 hiEndoPCs 明显的不同，重编程后 hiEndoPCs 获得了内胚层干/祖细胞的分子特征，因此 hGECs 向 hiEndoPCs 的转换确实是重编程的过程。而且 RNA 深度测序明确了 hiEndoPCs 在发育阶段上处于 PGT 和 PFG 之间更接近于 PFG，因此实现了 hiEndoPCs 的时空定位。

三、诱导内胚层祖细胞的微观特征

材料与amp;方法

（一）实验材料

（1）实验细胞

人胃上皮细胞（hGECs）、诱导内胚层祖细胞（hiEndoPCs）。

（2）实验器材

H7650 transmission electron microscope（透射电镜，HITACHI）、H7650 Electron Microscopy（电子显微镜）、AMT XR16M CCD Digital Camera（数码相机电耦合器件，AMT）、AMT Capture Engine Software Version 600.259（捕获工程软件）、可拆卸 96 孔板（Corning）。

（3）主要试剂

Polybed 812 epoxy resin（多床环氧树脂）购自 Polysciences, Inc., Warrington, PA, Reynolds' lead citrate（雷若兹柠檬酸铅，由军事医学科学院国家仪器分析测试中心提供）、aqueous uranyl acetate（含水乙酸双氧铀，由军事医学科学院国家仪器分析测试中心提供）。

（二）实验方法及结果

具体方法包括以下步骤：

- 1、hiEndoPCs 和 hGECs 种植于可拆卸的 96 孔板中。
- 2、PBS 清洗，使用 3% glutaraldehyde（戊二醛）与 0.1M sodium cacodylate（二甲胍酸钠，购自 Sigma）混合、pH 7.4 的固定液过夜（12-16 小时）固定细胞。
- 3、用 sodium cacodylate buffer（二甲胍酸钠，购自 Sigma）清洗 3 次后，再用 1% osmium tetroxide（四氧化锇，购自 Sigma）与 0.1 sodium cacodylate buffer（二甲胍酸钠缓冲液，购自 Sigma）混合再固定 1 小时。
- 4、去离子水清洗后，脱水再埋入 Polybed 812 epoxy resin（多床环氧树脂）中。
- 5、将组织切成 70nm 的切片，用 4% aqueous uranyl acetate（含水乙酸双氧

铀)由军事医学科学院国家仪器分析测试中心提供,染色 15 分钟再用 Reynolds' lead citrate (雷若兹柠檬酸铅, 由军事医学科学院国家仪器分析测试中心提供) 染 7 分钟。

6、染色后的切片用 H7650 透射电镜观察。

7、使用 AMT XR16M CCD 和 AMT 600.259 (捕获工程软件) 进行摄像。

结果: 如图 28 所示 (图中, Microvilli (微绒毛, Mv), Terminal web of actin microfilaments (肌动蛋白微丝, AM), Mitochondria (线粒体, Mi), Vacuoles (液泡, V), Endoplasmic reticulum (内质网, ER), Nucleus (核, N), nucleolus (核仁, Nu)), 在对 hGECs 和 hiEndoPCs 进行电镜水平的观察发现, hGECs 呈现成熟细胞的特征包括细胞相对较大, 细胞间紧密连接, 核质比较小, 有许多的肌动蛋白纤维网 (图 28 之 A 幅), 胞浆内容物丰富, 含有大量的线粒体, 微绒毛和空泡 (图 28 之 B 幅)。而 hiEndoPCs 细胞更小, 连接更为紧密, 核仁明显, 核浆比更大 (图 28 之 C 幅), 胞浆内容物较少, 含线粒体较少, 少量线粒体和内质网分布于核膜的周围 (图 28 之 D 幅), 并且细胞连接处具有不成熟细胞的指状突起连接 (图 28 之 E 幅)。因此微观水平的分析显示, hiEndoPCs 与 hGECs 明显不同, hiEndoPCs 呈现干细胞的微观特征, 而 hGECs 呈现终末分化成熟细胞的特征。

小结: 电镜水平的分析进一步证实了 hiEndoPCs 属于干/祖细胞特征, 而 hGECs 则具有成熟细胞的特征, hGECs 向 hiEndoPCs 转换是成熟细胞向干/祖细胞的转换。

四、诱导内胚层祖细胞的增殖和传代扩增特性

材料与方法

(一) 实验材料

(1) 实验细胞

成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs)、诱导内胚层祖细胞 (hiEndoPCs)。

(2) 实验器材

倒置相差显微镜 (Leica)、MlraVIEW (超视, PerkinElmer)。

(3) 主要试剂

Fibronectin (FN, 纤连蛋白)、Cell-TAK 胶 (CT) 均购自 BD; 无血清细胞快速冻存液 (Bio-Tool); A83-01 (Stemgent); bFGF (碱性成纤维生长因子 b)、Wnt3a 均购自 R&D; 丝裂霉素-C (Sigma); Advanced DMEM/F12、Dispase (离散酶) 均购自 Gibco。

(二) 实验方法及结果

(1) hiEndoPCs 的传代

1、传代前准备：提前以合适密度在孔板中接种丝裂霉素 C 处理的 aGSEMFs 或提前约 3 个小时将 Fibronectin (FN)、Cell-TAK (CT) 胶铺于孔板中，室温晾干。

2、配制传代培养基：Advanced DMEM/DF12 +AWF（配方：A83-01 0.5 μ M+Wnt3a 50ng/mL+bFGF 10ng/mL）或 Advanced DMEM/DF12 +A（A83-01, 0.5 μ M）。

3、传代时手动挑取克隆，并将其划成小块，比例约 1:3-4。将其置于 FN+AWF、CT+AWF 或 Feeder（滋养细胞）+A 培养基中在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中进行传代培养。

(2) hiEndoPCCs 的冻存与复苏

1、冻存：用 5mg/mL 的 Dispase 酶将手动挑取的克隆在 37 $^{\circ}$ C 消化 5 分钟，并吹打成小块，使用培养基将细胞洗涤 2 次，然后用适量的无血清细胞快速冻存液重悬细胞，置于冻存管中，直接放于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

2、复苏：将冻存的细胞 42 $^{\circ}$ C 快速解冻，使用 10 倍体积的培养基洗涤，离心，然后用 Advanced DMEM/DF12 +A（A83-01 0.5 μ M）的培养基重悬并接种于前述准备好的滋养层细胞上进行培养。

结果：

(1) hiEndoPCs 在重编程过程中的增殖特征

在证实了 hiEndoPCs 的内胚层祖细胞的分子特征后，对其增殖特性进行分析。仔细观察 hiEndoPCs 在重编程过程中的动力学特征，将其分为三个阶段：第 0-7 天有些紧密的、边缘锐利的是细胞克隆逐渐出现（Phase I）；在 7-10 天克隆有一个缓慢增殖的过程（Phase II），克隆由小变大；在第 10-15 天是克隆迅速增殖的阶段（Phase III），许多小的克隆迅速汇合成面积较大的克隆，在此阶段细胞的倍增时间大概为 36.1 \pm 4.7 小时（参见图 29）。

(2) hiEndoPCs 的传代培养条件筛选

由于 hiEndoPCs 是内胚层祖细胞，因此其必须具备一定的传代扩增潜能，发明人经过对传代条件的多次筛选，最终确定在以 Fibronectin (FN) 胶或 BD Cell-TAK (CT) 胶作为细胞外基质结合使用 Advanced DMEM/DF12 +AWF（A83-01 0.5 μ M+Wnt3a 50ng/mL+bFGF 10ng/mL）的条件下也即 FN+AWF（图 30 A）或 CT+AWF（图 30 B）等无滋养层细胞的条件下，克隆传代后可以良好生长并维持原始克隆的状态。在以 aGSEMFs 为滋养层，结合 Advanced DMEM/DF12 +A（A83-01 0.5 μ M）也即 Feeder+A（图 30 C）的条件下，也能维持原始的干/祖细胞克隆形态。hiEndoPCs 也可进行冻存，克隆复苏后使用 Feeder+A 的条件，同样可维持原始克隆的形态（图 30 D, Post-Thawed cells, 冻存复苏后）。

(3) hiEndoPCs 的传代扩增特性

hiEndoPCs 在前述的传代培养条件下，大约可扩增 4-6 代，传代过程中细胞形态基本维持不变（图 31，下排图片为上排图片方框的放大）。传到 4 代之后细胞增殖速度减慢，第 6 代细胞数量达到顶峰，说明其增殖潜力有限。以每次大约可获取的 10^6 个人胃上皮细胞（hGECs）为起始，经过重编程和大约 4-6 次的扩增，可以获得约 10^9 数量的干/祖细胞（hiEndoPCs）（图 32）。

小结：使用相应的传代条件可以将 hiEndoPCs 进行 4-6 代的扩增。

五、诱导内胚层祖细胞分化潜能鉴定

材料与方法

（一）实验材料

（1）实验细胞

人胃上皮细胞（hGECs）、诱导内胚层祖细胞（hiEndoPCs）、H9 人胚胎干细胞（ESCs）购自 Wicell 公司。

（2）实验器材

实时荧光定量 PCR 仪（Bio-Rad）、普通 PCR 仪（Eppendorf）、正置荧光显微镜（Leica）、实时定量 96 孔板及封闭膜（Bio-Rad）、12 孔板、激光共聚焦荧光显微镜（Zeiss）、倒置相差显微镜（Leica）、细胞免疫共聚焦小皿（NEST）。

（3）主要试剂

1、主要抗体：

表 6 用于内胚层祖细胞（hiEndoPCs）免疫荧光检测的第一抗体

一抗	公司	货号	一抗种属来源	稀释比
AFP	Sigma	A8452	小鼠免疫球蛋白 2a	200
ALB	Abcam	ab10241	小鼠免疫球蛋白 2b	400
CK18	Santa Cruz	sc-6259	小鼠免疫球蛋白 1	100
Lgr5	Sigma	HPA012530	兔	350
CDX2	R&D	AF3665	山羊免疫球蛋白	100
Muc2	Abcam	ab118964	小鼠免疫球蛋白 1	100
Somatostatin	Millipore	AB5494	兔	100
Insulin	Abcam	ab7842	豚鼠	100
Glucagon	Sigma	G2654	小鼠免疫球蛋白 1	200
Proinsulin	R&D	MAB13361	小鼠免疫球蛋白 2a	200
c-peptide	Millipore	05-1109	小鼠免疫球蛋白 1	100
α -amylase	Sigma	A8273	兔	200
PDX1	Abcam	ab47308	豚鼠	200

NKX6.1	R&D	AF5857	山羊免疫球蛋白	200
Villin	Abcam	ab201989	小鼠免疫球蛋白 1	100
E-Cadherin	BD	610181	小鼠免疫球蛋白 2a	100

表 7 用于内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 免疫荧光检测的第一抗体

一抗	公司	货号	稀释比
Alexa Fluor® 568 山羊抗鼠免疫球蛋白 1 (γ 1)	Invitrogen	A21124	400
Alexa Fluor® 488 山羊抗鼠免疫球蛋白 2a (γ 2a)	Invitrogen	A21131	400
Alexa Fluor® 647 山羊抗鼠免疫球蛋白 2b (γ 2a)	Invitrogen	A21242	400
Alexa Fluor® 647 山羊抗鼠免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A21244	400
Alexa Fluor® 488 山羊抗豚鼠免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A11073	400
Alexa Fluor® 647 山羊抗大鼠免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A21247	400
Alexa Fluor® 568 山羊抗鼠免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A11031	400
Alexa Fluor® 647 驴抗鼠免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A31571	400
Alexa Fluor® 568 驴抗鼠免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A10037	400
Alexa Fluor® 488 驴抗鼠免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A-21202	400
Alexa Fluor® 568 驴抗山羊免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A11057	400
Alexa Fluor® 488 驴抗兔免疫球蛋白 (H+L)	Invitrogen	A21206	400
Alexa Fluor® 4568 山羊抗鼠免疫球蛋白 2a (γ 2a)	Invitrogen	A21134	400

2、主要培养基、添加物及基质胶：Advanced DMEM/DF12、MCDB131（低蛋白、无血清培养基 131）、CMRL 1066、Advanced RPMI 1640、GlutaMax（谷氨酰胺）、NEAA（非必须氨基酸）、N2（无血清神经细胞添加剂 N2）、B27（无血清神经细胞添加剂 B27）均购自 Gibco；ITS-X（胰岛素-转铁蛋白-硒-乙醇胺复合溶液，Life Technologies）；T3、Ascorbic acid（维生素 C，Sigma）；HM（肝细胞培养基，Sciencell）；Lanminin（层黏连蛋白）、Fibronectin（纤连蛋白，FN）、Collagen IV（4 型胶原）购自 BD。

3、细胞因子：b-FGF（碱性成纤维细胞生长因子 b）、Wnt3a、ActivinA（激活素 A）、FGF4（成纤维生长因子 4）、HGF（肝细胞生长因子）、OSM（抑瘤素 M）、FGF10（成纤维生长因子 10）、FGF7（成纤维生长因子 7）、EGF（表皮生长因子）、Noggin（头蛋白）、BMP4（骨形态发生蛋白 4）、IGF（胰岛素样生长因子）、TSH（促甲状腺激素）、Insulin（胰岛素）购自 R&D 公司；NaI（碘化钠，Sigma）。

4、小分子化合物：DEX（地塞米松）、RA（维甲酸）、LDN193189、SANT-1 均购自 Sigma；TPB 购自 EMD MilliPore；ALK5 inhibitor II 购自 Enzo Life Sciences；gamma secretase inhibitor XX（γ-分泌酶抑制剂 XX）购自 EMD MilliPore；R428

购自 SelleckChem; Chir99021 购自 Stemgent。

5、试剂盒: human albumin ELISA 试剂盒 (人白蛋白检测试剂盒, 购自 Bethyl)。

6、其它试剂: 1mg/mL 的 ICG (靛氰绿) 溶液、苏木素、Periodic Acid (过碘酸)、Triton X-100、Schiff's (聚乙二醇辛基苯基醚, Sigma)、枸橼酸钠缓冲液、4% 多聚甲醛。

(4) 引物序列

表 8 引物序列

基因名称	引物序列 (F:5' → 3')	引物序列 (R:5' → 3')
HNF4A	ACGGACAGATGTGTGAGTGG	CAGGAGCTTATAGGGCTCAGA
AFP	CTTGACACAAAAAGCCCACT	GGGATGCCTTCTTGTCTATCTCAT
ALB	TTTATGCCCCGGAACCTCTTT	ACAGGCAGGCAGCTTTATCAG
TF	CCTCCTACCTTGATTGCATCAG	TTTTGACCCATAGAAGCTCTGCC
AAT	ATGCTGCCCAGAAGACAGATA	TTGTTGAAGGTTGGGTGATCC
GGT	GGGGAGATCGAGGGCTATGAG	GATGACGGTCCGCTTGTTC
G6PC	TCAGGGAAAGATAAAGCCGACC	AGGTAGATTCGTGACAGACAGAC
CYP1A2	ATGGCATTGTCCCAGTCTGTT	TGGCTCTGGTGGACTTTTCAG
CYP3A4	AAGTCGCCTCGAAGATACACA	AAGGAGAGAACTGCTCGTG
CYP3A7	AAGGTCGCCTCAAAGAGACA	TGCACTTTCTGCTGGACATC
CEBPA	GCGGGAACGCAACAACATC	GTCCTGGTCAACTCCAGCAC
CEBPB	CTTCAGCCCGTACCTGGAG	GGAGAGGAAGTCGTGGTGC
MGT1A1	TAAGTGGCTACCCAAAAACG	GCTTTGCATTGTCCATCTGA
MGT1A3	TCAGATGGACAATGCAAAGCGC	GGCGCATGATGTTCTCCTTGTA
PDX1	TTAGGATGTGGACGTAATT	GGTCAAGTTC AACATGACAG
NKX6.1	AGGACGACGACTACAATAAGCCTCT	GCGCTGCTGGACTTGTGCTTCT
NEUROG 3	GGAGTCGGCGAAAAGAAGGC	TACAAGCTGTGGTCCGCTATG
INSULIN	GCAGCCTTTGTGAACCAACAC	CCCCGCACACTAGGTAGAGA
SST	GCTGCTGTCTGAACCCAAC	CGTTCTCGGGGTGCCATAG
AMY2A	TTCAGACCTTGGTGGGAAAGA	ACGAACCCCAACATTGTTACAT
GLUCAGON	GACAAGCGCCATTACAGG	TGACGTTTGGCAATGTTATTCT
CDX2	GGCAGCCAAGTGAAAACCAG	GGTGATGTAGCGACTGTAGTAA
MUC2	TGCAGTGTGATGTCTCTGTTGGGT	ATCCATGGGCCAGCAACAATTGAC
VIL1	AGCTCCTCTACAGGCTTGTTCCT	GGACGTGTTCAATGCTAACAGCAACC
CHGA	TGACCTCAACGATGCATTTTC	CTGTCTGGCTCTTCTGCTC
LYSO	CTTGCTCCTTTCTGTTACGG	CCCCTGTAGCCATCCATTCC
AQP5	GCCATCCTTTACTTCTACCTGCTC	GCTCATACTGCTTTGATGATGG
CC-10	TCATGGACACACCCTCCAGTTATGAG	TGAGCTTAATGATGCTTTCTCTGGGC
NKX2.1	CGGCATGAACATGAGCGGCAT	GCCGACAGGTA CTCTGTTGCTTG

SPA	GTGCGAAGTGAAGGACGTTTGTGT	TTTGAGACCATCTCTCCCGTCCC
SPB	TCTGAGTGCCACCTCTGCATGT	TGGAGCATTGCCTGTGGTATGG
SPC	CCTTCTTATCGTGGTGGTGGTGGT	TCTCCGTGTGTTTCTGGCTCATGT
PAX8	ACTACAAACGCCAGAACCCTACCA	TGTCATTGTACAGACGCCCTCA
TG	ACGGTTCCTCGCAGTTCAAT	GCAGCTTGAACATAGGGGT
TSHR	AGCCACTGCTGTGCTTTTAAG	CCAAAACCAATGATCTCATCC

(二) 实验方法及结果

(1) 免疫荧光染色方法与前述相同。

(2) Q-PCR 方法与前述相同。

(3) 向肝细胞的诱导分化

具体方法包括以下步骤：

1、将 Collegen IV/Matrigel/Laminin/KM 按照 1:3:1:5 的比例进行混合，然后使用适量体积的胶混合液均匀涂抹于孔板中，置于室温干燥 3-5 个小时。

2、手动挑取 hiEndoPCs 并划成合适大小的块接种于上述处理的培养板中，使用加入了 8% (V/V) FBS 及 10uM Y27632 的人胃上皮细胞 (hGECs) 重编程培养基 (配方: Advanced (先进) DMEM/F12 +2mM 谷氨酰胺 +青-链霉素+ SB43154 (2μM) +RG108 (0.04μM) +BIX01294 (0.5μM) +Bay K 8644 (2μM)) 培养过夜。

3、待细胞团块充分贴壁后，用分阶段法对 hiEndoPCs 进行诱导分化。第一阶段: KM (配方见实施例第一部分) +25ng/mL BMP4+25ng/mL FGF4+50ng/mL Wnt3a 培养 3 天; 第二阶段: HM (商品化培养基, 购自 ScienCell) +20ng/mL HGF+10ng/mL OSM+1 μ M Dex 培养 10-15 天。

(4) 向胰岛 β 细胞的诱导分化

具体方法包括以下步骤：

1、将 Matrigel/KM 按照 1:1 的比例进行混合，然后使用适量体积的胶混合液均匀涂抹于孔板中，置于室温干燥 3-5 个小时。细胞贴附方法与前述相同。

2、将贴附的细胞按照 4 个阶段向胰腺进行诱导分化

2.1 MCDB 131 medium (购自 Gibco) + 1.5g/L sodium bicarbonate (碳酸氢钠) + 2mM (浓度) 2mM Glutamax (谷氨酰胺) +10mM final glucose concentration (葡萄糖) + 2% BSA (牛血清白蛋白) +0.25mM ascorbic acid (维生素 C) +50ng/mL of FGF7 (成纤维生长因子 7) +0.25μM SANT-1 +1μM retinoic acid (维甲酸) (RA) +100nM LDN193189 +1:200 ITS-X (胰岛素-转铁蛋白-硒-乙醇胺复合溶液) + 200nM TPB, 培养 2 天。

2.2 MCDB 131 medium + 1.5g/L sodium bicarbonate + 2mM Glutamax + 10mM final

glucose concentration+2% BSA + 0.25mM ascorbic acid + 2ng/mL of FGF7 + 0.25 μ M SANT-1 + 0.1 μ M retinoic acid + 200nM LDN193189+1:200 ITS-X + 100nM TPB, 培养 2 天。

2.3 2 天后第二阶段细胞用 5mg/mL dispase (离散酶) 在 37°C 消化 5 分钟, 然后机械性吹成小块并转移到低吸附孔板中更换培养基: MCDB 131 medium+1.5g/L sodium bicarbonate+ 2mM Glutamax+20mM final glucose concentration+ 2% BSA+0.25 μ M SANT-1+0.05 μ M retinoic acid+100nM LDN193189+1:200 ITS-X+1 μ M T3 (胰岛素-转铁蛋白-硒-乙醇胺复合溶液) +10 μ M ALK5 inhibitor II+10 μ M zinc sulfate (硫酸锌) + 10 μ g/mL of heparin (肝素), 培养 3 天。

2.4 CMRL 1066 + 2mM Glutamax+2% BSA+100nM LDN193189+1:200 ITS-X+1 μ M T3+10 μ M ALK5 inhibitor II+10 μ M zinc sulfate+100nM gamma secretase inhibitor XX (γ -分泌酶抑制剂 XX) + 2 μ M R428 培养 7 天或更长。

(5) 向肠细胞的诱导分化

具体方法包括以下步骤:

1、RPMI 1640 medium+ 2mM Glutamax+100U/mL 青霉素+0.1mg/mL 链霉素+500ng/mL FGF4 (成纤维生长因子 4) +500ng/mL Wnt3a (WNT 信号通路蛋白配体 3A) +100ng/mL EGF (表皮生长因子) +3 μ M CHIR99021 (Stemgent), 培养 3 天。

2、手动挑取第一阶段细胞并机械性吹成小块然后埋入 matrigel (人工基底膜) 中, 37°C、7-10 分钟, 待胶凝固后加培养基: Advanced DMEM/F12 + 2mM Glutamax+ 100U/mL 青霉素+0.1mg/mL 链霉素+1% N2 (无血清神经细胞添加剂 N2) +1% B27 (无血清神经细胞添加剂 B27) +100ng/mL EGF (表皮生长因子) + 100ng/mL Noggin (头蛋白), 培养 1 周以上。

(6) 向甲状腺的诱导分化

具体方法包括以下步骤:

1、Advanced DMEM/F12+ L-Glutamax+B27 (1%) +N2 (1%) +Noggin (200ng/mL) +SB431542 (10 μ M) 作用 3 天。

2、Advanced DMEM/F12+ L-Glutamax+B27 (1%) +N2 (1%) +Wnt3a (100ng/mL) +EGF (20ng/mL) +BMP4 (10ng/mL) +FGF10 (10ng/mL) +FGF7 (10ng/mL) +TSH (1 μ g/mL) 作用 3 天。

3、Advanced DMEM/F12+L-Glutamax+B27 (1%) +N2 (1%) +TSH (1 μ g/mL) +IGF (50ng/mL) +insulin (5mg/mL) +NaI (100 μ M) 作用 4 天。

(7) 向肺的诱导分化

具体方法包括以下步骤：

1、Advanced DMEM/F12+L-Glutamax+B27 (1%) +N2 (1%) +Noggin (200ng/mL) +SB431542 (10 μ M) 作用 4 天。

2、Advanced DMEM/F12+L-Glutamax+B27 (1%) +N2 (1%) +Wnt3a (100ng/mL) , EGF (20ng/mL) +BMP4 (10ng/mL) +FGF10 (10ng/mL) +FGF7 (10ng/mL) 培养 3 天。

3、Advanced DMEM/F12+L-Glutamax+B27 (1%) +N2 (1%) +Wnt3a (100ng/mL) +FGF10 (10ng/mL) +FGF7 (10ng/mL) +Dexamethasone (地塞米松) (50nM) 作用 3 天。

(8) C 肽含量的 ELISA 检测

操作流程按照 c-peptide (C 肽) ELISA 试剂盒上的要求进行，具体方法包括以下步骤：

1、制备工作液：提前把试剂盒中的试剂按照说明分别稀释成工作液，室温平衡 20 分钟。

2、制备标准品：在 5 个标准品中每个都加入 1mL 的去离子水，充分混匀后分装成小样，-20℃冰箱保存。

3、将标准品和待检测的细胞上清样品加入已包被 c-peptide 抗体的 96 孔板中，每孔各 25 μ L，每组样品设三个重复。

4、每孔加入缓冲液 50 μ L。

5、将 96 孔板置于微孔摇床上，800rpm 室温孵育 1 小时。

6、弃去 96 孔板中液体，每孔再加入 350 μ L wash buffer (洗涤液)，继而倒掉洗液，滤纸吸干，如此重复 4-5 次。

7、每孔加入 Enzyme conjugate solution (酶结合溶液) 200 μ L。

8、孔板置于微孔摇床上，800rpm 室温孵育 1 小时。

9、弃掉液体，每孔加入 350 μ L wash buffer (洗涤液)，重复步骤 6。

10、每孔加入底物 TMB (四甲基联苯胺) 200 μ L。

11、孔板置于摇床，室温避光孵育 30 分钟。

12、每孔加入 50 μ L stop solution (终止液)，避光，置于摇床震动 5 秒。

13、30 分钟内在酶标仪上 450nm 波长处测定 OD 值，计算结果。

(9) 双硫腙 (DTZ) 染色

具体方法包括以下步骤：

1. 将 DTZ 贮存液 (购自 Sigma) 按 1:20 的比例进行稀释，然后用 0.45 μ m 滤膜过滤后配成工作液。

2. 用 PBS 洗涤待染色的细胞。

3. 将配制好的 DTZ 工作液加入待染色细胞中，37℃ 孵育 10min 后显微镜下观察并摄像。

(10) 统计学分析

所有数据均来自于三次及以上独立重复试验，除特殊说明外，数据均描述为平均值±标准差。两组数据间统计学分析用 SPSS 软件进行学生双尾 t 检验， $P < 0.05$ 时两组之间的差异被认为具有统计学意义。

结果：体内内胚层祖细胞最终发育形成胰腺、肝脏、肠、肺和甲状腺等器官。为了证实 hiEndoPCs 是内胚层祖细胞，本发明对其测试了向多个方向诱导分化的潜能。

(1) 内胚层祖细胞 (hiEndoPCs) 向胰腺的诱导分化

根据经典的胰腺诱导分化方案 [Pagliuca Felicia W, Millman Jeffrey R, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu Jennifer H, et al. Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro. Cell. 2014;159:428-39. Rezanian A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. Nat Biotechnol. 2014;32:1121-33.] 将 hiEndoPCs 向胰腺进行诱导分化。在诱导 2 周后，hiEndoPCs 来源的胰腺细胞 (hiEndoPC-Pans) 呈现体内胰岛三维的出芽生长形态 (图 33 A)。DTZ (双硫脲) 染色显示 hiEndoPC-Pans 呈现红色，表明细胞胞浆中含有锌离子，这是胰岛 β 细胞的特征 (图 33 B)。对 hiEndoPC-Pans 进行胰腺特异性蛋白染色显示胰腺特异性转录因子 PDX1 和 NKX6.1、胰岛 α 细胞标志 GCG、胰岛 β 细胞标志 C-PEP 和 PRO-INS 以及胰岛 δ 细胞的标志 SST 都有明显表达 (图 33 C 和 D)。转录水平的分析显示多种胰腺特征性基因在诱导后表达上调 (图 33 E)，这与免疫染色结果相一致。为了证实 hiEndoPCs-Pans 是否具有胰岛 β 细胞最重要的合成和释放胰岛素的能力，检测了 hiEndoPCs-Pans 在多种刺激条件下的 C 肽释放能力。当使用高糖刺激时，与低糖组相比，C 肽的释放明显增多。当使用其他的胰岛素分泌促进剂 KCL、Tolb μ tamiden 作用时，C 肽的释放也明显增多。而且 hiEndoPCs-Pans 对刺激的胰岛素释放反应可与 ESCs 来源的胰岛细胞相当 (图 33 F)。hiEndoPCs-Pans 的糖刺激反应性对于以后的糖尿病高血糖的治疗具有十分重要的临床应用意义。

(2) hiEndoPCs 向肠道细胞的诱导分化

根据经典的肠细胞诱导方案 [Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, et al. Directed differentiation of human pluripotent

stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*. 2010;470:105-9. Watson CL, Mahe MM, Múnera J, Howell JC, Sundaram N, Poling HM, et al. An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nature Medicine*. 2014;20:1310-4.]对 hiEndoPCs 向肠道分化进行检测。诱导 2 周后发现 hiEndoPCs 来源的肠道类器官 (hiEndoPC-Ints) 呈现体外肠道原代培养的形态特征 (图 34 A)。hiEndoPC-Ints 中肠特异性转录因子 CDX2、小肠细胞标志 VIL1、杯状细胞标志 MUC2、小肠内分泌细胞标志 CHGA、小肠潘氏细胞标志 LYSO 在诱导之后表达明显上调 (图 34 B)。而且在蛋白水平, 肠特征性的标志 VIL1、MUC2、CDX2、LGR5、ECAD 也都有明显的表达 (图 35 C), 证实了 hiEndoPC-Ints 已经初步具备了肠的特征。

(3) hiEndoPCs 向肝细胞的诱导分化

采用经典的肝向诱导方案 [Gouon-Evans V, Boussemart L, Gadue P, Nierhoff D, Koehler CI, Kubo A, et al. BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nat Biotechnol*. 2006;24:1402-11.] 将 hiEndoPCs 向肝细胞进行诱导分化, 发现 hiEndoPCs 来源的肝细胞 (hiEndoPC-Heps) 开始表达原代肝细胞特征性的多种功能基因包括 HNF4A、CEBPA、CEBPB、TF、AATGGT、G6PC、CYP1A1、CYP3A4、CYP3A7、MGT1A1、MGT1A3 等 (图 35 A)。同时 hiEndoPC-Heps 中 AFP (甲胎蛋白)、CK18 (细胞角质蛋白 18) 的染色阳性 (图 35 B); 在流式水平 ALB (白蛋白) 阳性的细胞比例高达 90% 以上 (图 35 C), 表明 hiEndoPC-Heps 初步具备了肝细胞的特征。

(4) hiEndoPCs 向甲状腺和肺的诱导分化

hiEndoPCs 向甲状腺进行诱导分化 [Longmire TA, Ikonomou L, Hawkins F, Christodoulou C, Cao Y, Jean JC, et al. Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012;10:398-411.] 后, hiEndoPCs 来源的甲状腺细胞 (hiEndoPCs-Thyroid) 中甲状腺和肺共有的特异性转录因子 NKX2.1、甲状腺特异性转录因子 Pax8、甲状腺球蛋白 (Tg)、促甲状腺激素受体 (TSHR) 表达水平比诱导前有非常明显的提升 (图 36 A)。而 hiEndoPCs 来源的肺细胞 (hiEndoPCs-Lung) 中肺特异性转录因子 NKX2.1、肺 Clara 细胞标志 CC-10、一型肺泡细胞的标志水通道蛋白 AQP5、二型肺泡细胞的标志表面活性蛋白 SPA、SPB、SPC 等表达明显上调 (图 36 B)。

采用能够促进向胰腺、肝脏、肠道、甲状腺和肺的诱导分化策略, 对 hiEndoPCs 的内胚层分化潜能做鉴定, 结果表明 hiEndoPCs 向 5 个方向分化后, 相关的基因表达, 蛋白表达明显提高, 部分功能也已显现, 更加明确的证实了 hiEndoPCs 是内胚层祖细

胞，同时提示了 hiEndoPCs 对于糖尿病、肝病和肠道疾病等的细胞治疗可以提供理想的种子细胞。

实施例 3、可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合

小分子组合 4M 中单个小分子浓度改变对诱导内胚层祖细胞产生的影响：前述已说明在四个小分子化合物 BBRS 小分子组合中，在 SB43152 (SB, 2 μ M)，RG108 (RG, 0.04 μ M)，Bix01294 (Bix, 0.5 μ M)，Bay K 8644 (Bay, 2 μ M) 4 个小分子使用浓度下，可以重编程获得内胚层祖细胞 (hiEndoPCs)，效率 4-6%。本实施例用相同的方法对所述 4 个小分子化合物在不同浓度范围 SB43152 (1~10 μ M)，RG108 (0.01~1 μ M)，Bix01294 (0.1~2 μ M)，Bay K 8644 (1~4 μ M) 下对 hiEndoPCs 的产生情况进行了验证 (参见表 9)，同时用 A83-01 (A83, 0.4~1 μ M) 替换 SB 后再与其他三个小分子在不同浓度组合 RG108 (0.01~1 μ M)，Bix01294 (0.1~2 μ M)，Bay K 8644 (1~4 μ M) 下对 hiEndoPCs 的产生情况进行了验证 (表 10)。

表 9：不同使用浓度 BBRS 小分子组合及其重编程获得 hiEndoPCs 效率

实验编号	SB 取值 (μ M)	RG 取值 (μ M)	Bix 取值 (μ M)	Bay 取值 (μ M)	hiEndoPCs 形成效率
组合 1	1	0.01	0.1	1	3.2%
组合 2	1	0.01	0.1	4	3.6%
组合 3	5	0.01	2	1	2.3%
组合 4	5	0.1	2	4	2.9%
组合 5	5	0.1	0.1	1	3.4%
组合 6	5	0.1	0.5	4	3.7%
组合 7	1	0.1	0.5	1	3.5%
组合 8	1	1	0.5	4	3.1%
组合 9	10	0.01	0.5	2.5	4.1%
组合 10	10	0.01	0.1	2.5	4.7%
组合 11	5	0.01	2	2.5	4.3%
组合 12	10	0.01	2	2.5	4.5%
组合 13	10	1	0.1	1	4.2%

组合 14	10	1	0.1	4	4.8%
组合 15	10	1	2	1	3.8%
组合 16	10	1	2	4	3.9%

表 10: 不同使用浓度 BBRA 小分子组合及其重编程获得 hiEndoPCs 效率

	A83 取值 (μM)	RG 取值 (μM)	Bix 取值 (μM)	Bay 取值 (μM)	hiEndoPCs 形成效率
组合 1	0.4	0.01	0.1	1	4.1%
组合 2	0.4	0.01	0.1	4	4.3%
组合 3	0.4	0.01	2	1	4.2%
组合 4	0.4	0.01	2	4	4.6%
组合 5	0.4	1	0.1	1	4.7%
组合 6	0.7	1	0.1	4	5.1
组合 7	0.7	0.1	2	1	5.2%
组合 8	0.7	0.1	2	4	5.5%
组合 9	0.7	0.1	0.5	1	5.3%
组合 10	1	0.1	0.5	4	5.7%
组合 11	1	0.01	0.5	1	5.9%
组合 12	1	0.01	0.5	2.5	6.0%
组合 13	0.7	1	0.1	2.5	5.8%
组合 14	1	1	0.1	2.5	6.1%
组合 15	1	1	2	2.5	5.4%
组合 16	1	1	2	4	5.6%

参照实施例 2 的方法对表 9 和表 10 组合中所获得的内胚层祖细胞做了内胚层相关的基因、蛋白、表观修饰检测及分化功能鉴定, 结果显示: 以上组合获得的诱导内胚层均能高表达内胚层祖细胞特征的标志 FOXA2、SOX9、GATA4、HNF1B、HOXA3、PDX1、CXCR4、EPCAM、CK19 和 LGR5, 不表达胃细胞特征性的标志 MUC6、GAST。其具有内胚层祖细胞特征的表观修饰特点, 在向肝细胞进行诱导分化后能够表达肝细胞特异性的标志 AFP、ALB、HNF4A、CK18、CYP3A4 等; 在向胰腺 β 细胞分化后开始表

达 NKX6.1、PDX1、GCG、SST、INS 等胰腺特异性标记，并且在刺激的条件下能够释放胰岛素；在向肠细胞进行诱导分化后表达 CDX2、MUC2、VIL1、CHGA 和 LYSO 等肠特异性标志；在向肺和甲状腺细胞进行分化后分别表达各自细胞特异性的标志。证实了表 9-表 10 小分子在所列浓度范围内同样可以获得内胚层祖细胞。

实施例 4、制备可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的重编程试剂盒

本发明可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的重编程试剂盒，包括可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合，具体来讲，小分子化合物组合由 8 个 (8M) 小分子化合物组成，分别为：FBP (二磷酸果糖)、Bay K 8644、Bix01294、SB431542 或 A83-01、Valproic Acid (VPA) (丙戊酸)、RG108、PD0325901 和 PS48。

优选的可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合包括以下 4 个小分子化合物，其中 BBRS 组合为 Bix01294 (Bix)、Bay K 8644 (Bay)、RG108 (RG) 和 SB431542 (SB)，BBRA 组合为 Bix01294 (Bix)、Bay K 8644 (Bay)、RG108 (RG) 和 A83-01 (A83)。

试剂盒中，各化合物可分别包装，或按 8M 组合或 BBRS 组合或 BBRA 组合将各化合物混合后包装；化合物分别包装时，试剂盒中的说明书中记载各化合物的使用浓度，具体浓度数值可参见实施例 1 和实施例 3。

试剂盒中还包括基础培养基 Advanced DMEM/F12 和细胞培养基基础添加成分谷氨酰胺 (Glutamax) 和抗生素 SP，及其使用说明，其中相对 Advanced DMEM/F12 基础培养基，谷氨酰胺的使用浓度为 2mM (1×)，抗生素 (如青-链霉素) 使用浓度为 100U/mL 青霉素+0.1mg/mL 链霉素，各成分分别包装或按所列使用浓度混合后包装。

试剂盒还可将所述小分子化合物组合与所述的基础培养基和细胞培养基基础添加成分组合形成重编程培养基，重编程培养基的配方为：Advanced DMEM/F12 +2mM 谷氨酰胺 (Glutamax)+青-链霉素 (100U/mL 青霉素+0.1mg/mL 链霉素)+SB43154 (2 μ M) 或 A83-01 (0.5 μ M)+VPA (0.5mM)+PD0325901 (0.5 μ M)+RG108 (0.04 μ M)+Bix01294 (0.5 μ M)+Bay K 8644 (2 μ M)+PS48 (5 μ M)+FBP (3.5mM)。

优选的重编程培养基配方为：Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax)，青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素)，1~10 μ M 的 SB43152，0.01~1 μ M 的 RG108，0.1~2 μ M 的 Bix01294，1~4 μ M 的 Bay K 8644；更优选 Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax)，青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素)，

2 μ M 的 SB43152, 0.04 μ M 的 RG108, 0.5M 的 Bix01294, 2 μ M 的 Bay K 8644。

另一优选重编程培养基配方为：Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax), 青-链霉素(100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素), 0.4~1 μ M 的 A83-01, 0.01~1 μ M 的 RG108, 0.1~2 μ M 的 Bix01294, 1~4 μ M 的 Bay K 8644; 更优选 Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax), 青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素), 0.5 μ M 的 A83-01, 0.04 μ M 的 RG108, 0.5M 的 Bix01294, 2 μ M 的 Bay K 8644。

试剂盒中, 还可包括滋养层细胞及其使用说明, 所述滋养层细胞为消化道来源的基质细胞, 如胃肌成纤维细胞或小肠肌成纤维细胞。

试剂盒中所有细胞、化合物和试剂均可按前述实施例提示的来源商购获得。

试剂盒中还包括使用说明书, 说明书中记载试剂盒的实际组成及使用方法, 其中包括使用相关试剂将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的重编程方法, 该方法内容参考实施例中的描述。

工业应用性

本发明提供了将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合、重编程方法及应用, 是以人胃上皮细胞 (hGECs) 作为起始细胞, 以人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs) 来作为滋养层, 用选自 FBP、Bay K 8644、Bix01294、SB431542 或 A83-01、VPA、RG108、PD0325901 和 PS48 中的全部或多个包括 SB 或 A83 在内的化合物组合将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞, 该内胚层干/祖细胞可用于向肝脏细胞、胰腺 β 细胞和肠细胞方向诱导分化, 本发明能够在产业上应用。

权利要求

1、可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的小分子化合物组合，所述小分子化合物选自 TGF- β 信号通路、表观修饰剂、钙离子通道激动剂和代谢通路调节剂等功能群；代表性的含有 8 个小分子化合物的组合（8M），包括 FBP、Bay K 8644（Bay）、Bix01294（Bix）、SB431542（SB）或 A83-01（A83）、VPA、RG108（RG）、PD0325901 和 PS48 中的全部或多个包括 SB 或 A83 在内的化合物的组合。

2、根据权利要求 1 所述的小分子化合物组合，其特征在于：包括 8 个小分子化合物的组合为：SB431542：VPA：PD0325901：RG108：Bix01294：Bay K 8644：PS48：FBP 按摩尔比为 50：12500：12.5：1：12.5：50：125：87500 的组合；或 A83：VPA：PD0325901：RG108：Bix01294：Bay K 8644：PS48：FBP 按摩尔比为 12.5：12500：12.5：1：12.5：50：125：87500 的组合。

3、根据权利要求 1 所述的小分子化合物组合，其特征在于：包括 4 个小分子化合物的组合为：Bix01294（Bix）、Bay K 8644（Bay）、RG108（RG）和 SB431542（SB），简称 BBRS 组合，或 A83-01（A83）、Bay K 8644（Bay）、RG108（RG）和 SB431542（SB），简称 BBRA 组合。

4、根据权利要求 3 所述的小分子化合物组合，其特征在于：组合中各化合物使用浓度为：SB431542 为（1~10 μ M），A83 为（0.4~1 μ M），RG108 为（0.01~1 μ M），Bix01294 为（0.1~2 μ M），Bay K 8644 为（1~4 μ M）。

5、根据权利要求 3 或 4 所述的小分子化合物组合，其特征在于：BBRS 组合为各化合物按 SB：RG：Bix：Bay 摩尔比 50：1：12.5：50 的组合，BBRA 组合为各化合物按 A83：RG：Bix：Bay 摩尔比 12.5：1：12.5：50 的组合；优选各化合物使用浓度 SB431542 为 2 μ M，A83 为 0.5 μ M，RG108 为 0.04M，Bix01294 为 0.5 μ M，Bay K 8644 为 2 μ M。

6、一种可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的重编程试剂盒，包括权利要求 1 至 5 任一所述小分子化合物组合以及化合物的使用说明书；各化合物分别包装，或按 8M 组合或 BBRS 组合或 BBRA 组合将各化合物混合后包装，说明书记载各化合物的使用浓度。

7、根据权利要求 6 所述重编程试剂盒，其特征在于，还包括滋养层细胞及其使用说明，所述滋养层细胞为消化道来源的基质细胞，如胃肌成纤维细胞或小肠肌成纤维细胞。

8、根据权利要求 6 或 7 所述重编程试剂盒，其特征在于，还包括基础培养基 Advanced DMEM/F12，细胞培养基添加成分谷氨酰胺（Glutamax）和抗生素（SP），

及其使用说明,其中相对 Advanced DMEM/F12 基础培养基,谷氨酰胺的使用浓度为 2mM (1×), 抗生素为青-链霉素, 相对 Advanced DMEM/F12 基础培养基的使用浓度为 100U/mL 青霉素+0.1mg/mL 链霉素, 各物质分别包装或按所列使用浓度混合后包装。

9、一种可将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的重编程培养基, 由权利要求 1 至 5 任一所述小分子化合物组合与权利要求 8 中提到的基础培养基、细胞培养基添加成分共混而成。

10、根据权利要求 9 所述重编程培养基, 其配方为: Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax), 青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素), 2 μM 的 SB43154 或 0.5 μM 的 A83-01, 0.5mM 的 VPA, 0.5 μM 的 PD0325901, 0.04 μM 的 RG108, 0.5 μM 的 Bix01294, 2 μM 的 Bay K8644, 5 μM 的 PS48, 3.5mM 的 FBP。

11、根据权利要求 9 所述重编程培养基, 其配方为: Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax), 青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素), 1~10 μM 的 SB43152, 0.01~1 μM 的 RG108, 0.1~2 μM 的 Bix01294, 1~4 μM 的 Bay K 8644; 优选 Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax), 青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素), 2 μM 的 SB43152, 0.04 μM 的 RG108, 0.5M 的 Bix01294, 2 μM 的 Bay K 8644。

12、据权利要求 9 所述重编程培养基, 其配方为: Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax), 青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素), 0.4~1 μM 的 A83-01, 0.01~1 μM 的 RG108, 0.1~2 μM 的 Bix01294, 1~4 μM 的 Bay K 8644; 优选 Advanced DMEM/F12 中含 2mM 谷氨酰胺 (Glutamax), 青-链霉素 (100U/mL 青霉素和 0.1mg/mL 链霉素), 0.5 μM 的 A83-01, 0.04 μM 的 RG108, 0.5M 的 Bix01294, 2 μM 的 Bay K 8644。

13、权利要求 1 至 5 任一所述小分子化合物或权利要求 6 或 7 或 8 所述重编程试剂盒或权利要求 9 至 12 任一所述重编程培养基在将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞中的应用; 所述消化道来源上皮细胞包括胃上皮细胞和十二指肠上皮细胞, 优选胃上皮细胞 (hGECs), 最优为 NCAM 阳性的人胃上皮细胞 (hGECs)。

14、将消化道来源上皮细胞重编程为内胚层干/祖细胞的方法, 作为权利要求 13 所述应用中的一种, 包括以下步骤:

- 1) 将原代分离的消化道来源上皮细胞作为起始细胞, 扩增培养所述消化道来源上皮细胞;
- 2) 用丝裂霉素-C 处理滋养层细胞后清洗, 并用酶消化细胞后备用;
- 3) 将步骤 2) 准备的滋养层细胞添加于步骤 1) 扩增培养的消化道来源上皮细胞

中，继续共培养过夜；

4) 第 2 天更换为重编程培养基，每 2-3 天换一次培养基，培养 7-15 天，得到诱导内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs) 克隆。

15、根据权利要求 14 所述方法，其特征在于：所述步骤 1) 中的起始细胞为消化道来源上皮细胞，包括胃上皮细胞和十二指肠上皮细胞，优选为胃上皮细胞 (hGECs)，尤其优选为 NCAM (神经细胞黏附分子) 阳性的胃上皮细胞；

步骤 1) 优选以 NCAM 阳性的胃上皮细胞为起始细胞，用 Kubota (库部塔) 培养基在 37 摄氏度，5% CO₂ 培养箱条件下培养 5 天。

16、根据权利要求 14 或 15 所述方法，其特征在于：所述步骤 2) 中的滋养层细胞为消化道来源的基质细胞，包括胃肌成纤维细胞或小肠肌成纤维细胞，优选人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs)；

步骤 2) 优选用丝裂霉素-C 处理人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs) 2-3 小时，用 PBS 清洗细胞，用 TrypLE 酶消化细胞。

17、根据权利要求 14 或 15 或 16 所述方法，其特征在于：步骤 3) 优选按 1~3 × 10⁵ 每平方厘米的密度将步骤 2) 准备的滋养层细胞添加于步骤 1) 培养到 5 天的消化道来源上皮细胞中，在 37°C、5% CO₂ 培养箱中过夜 (12-16 小时)。

18、用权利要求 14 至 17 任一所述方法获得的内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs)。

19、一种对内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs) 进行传代的方法，包括以下步骤：

1) 传代前准备：在孔板中接种经丝裂霉素-C (10 μg/mL) 处理的成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs) 或提前约 3 个小时将 Fibronectin (FN, 纤连蛋白)、Cell-TAK (CT, 细胞组织粘附剂) 胶铺于孔板中，室温晾干；

2) 配制传代培养基：Advanced DMEM/DF12 +AWF (A83-01 0.5 μM+Wnt3a 50ng/mL+bFGF 10ng/mL) 或 Advanced DMEM/DF12 +A (A83-01 0.5 μM)；

3) 挑取内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs) 克隆，并将其划成小块，比例约 1:3-4，将其置于 FN+AWF、CT+AWF 或 Feeder (滋养层细胞，经丝裂霉素-C (10 μg/mL) 处理的成人胃肌成纤维细胞 (aGSEMFs)) +A 培养基中在 37°C、5% CO₂ 培养箱中进行传代培养，得到传代内胚层干/祖细胞。

20、权利要求 18 所述内胚层干/祖细胞 (hiEndoPCs) 或权利要求 19 得到的传代内胚层干/祖细胞在向肝脏细胞、胰腺 β 细胞和肠细胞诱导分化中的应用。

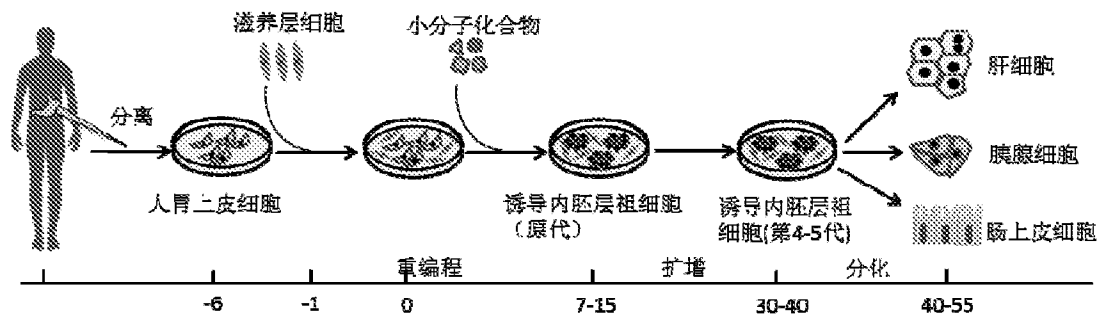
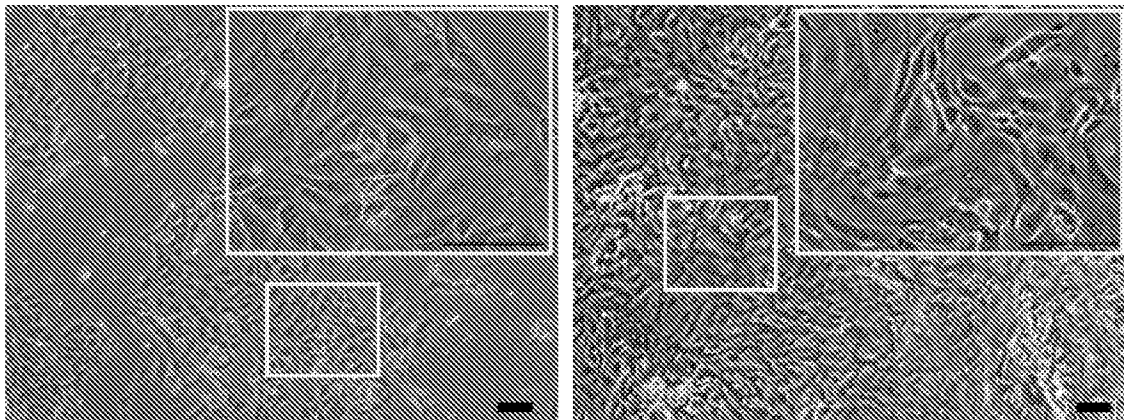


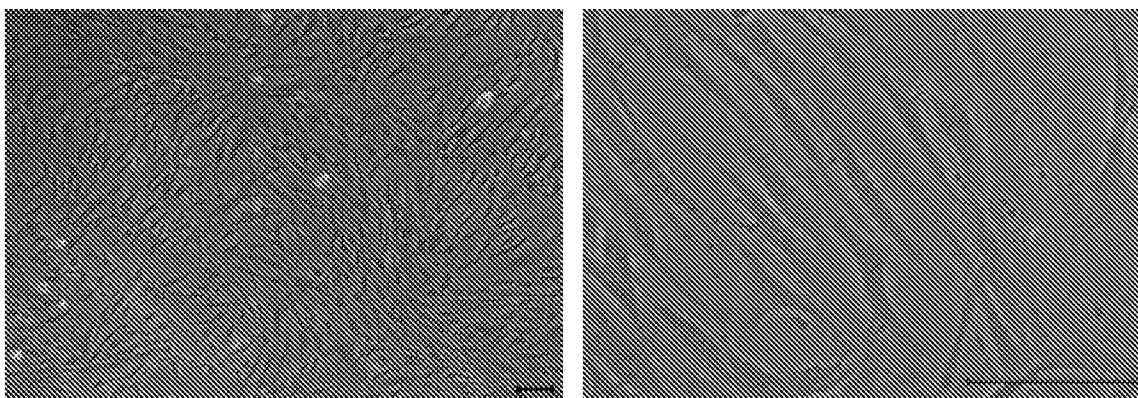
图 1



人胃上皮细胞 (hGECs)

十二指肠上皮细胞 (hDECs)

图 2



肌成纤维细胞 (GSEMFs)

图 3

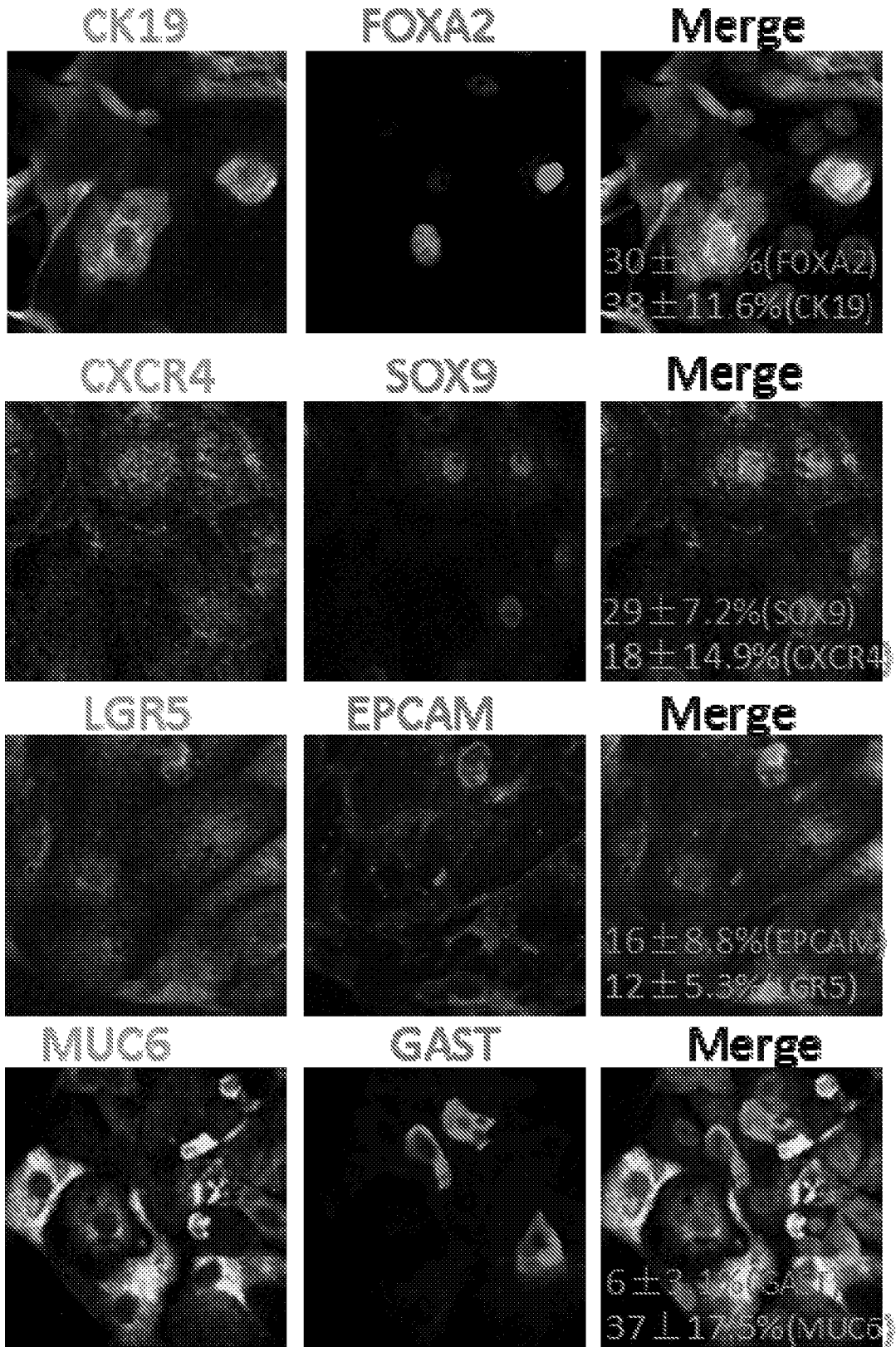


图 4

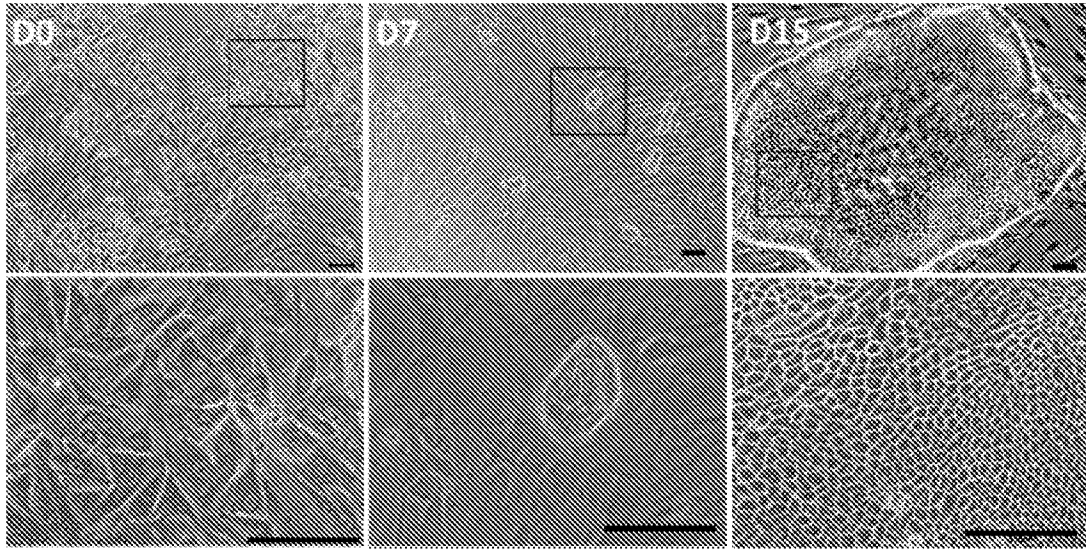


图 5

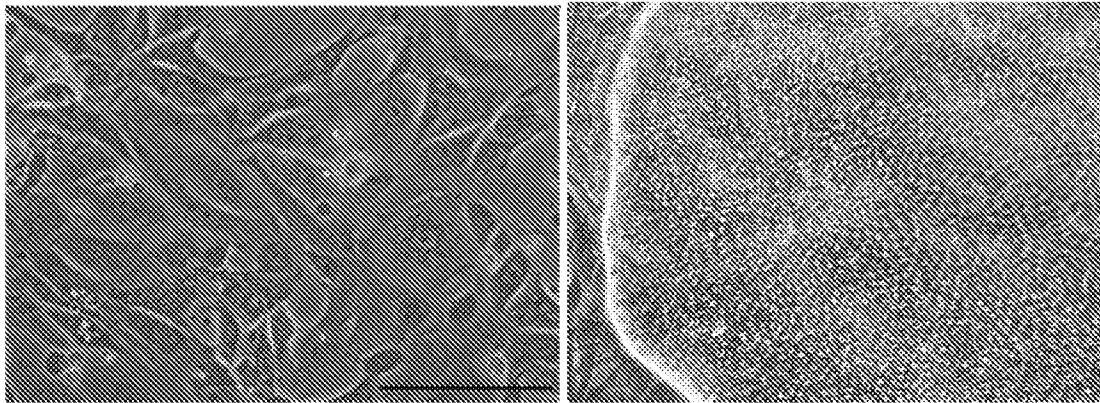


图 6

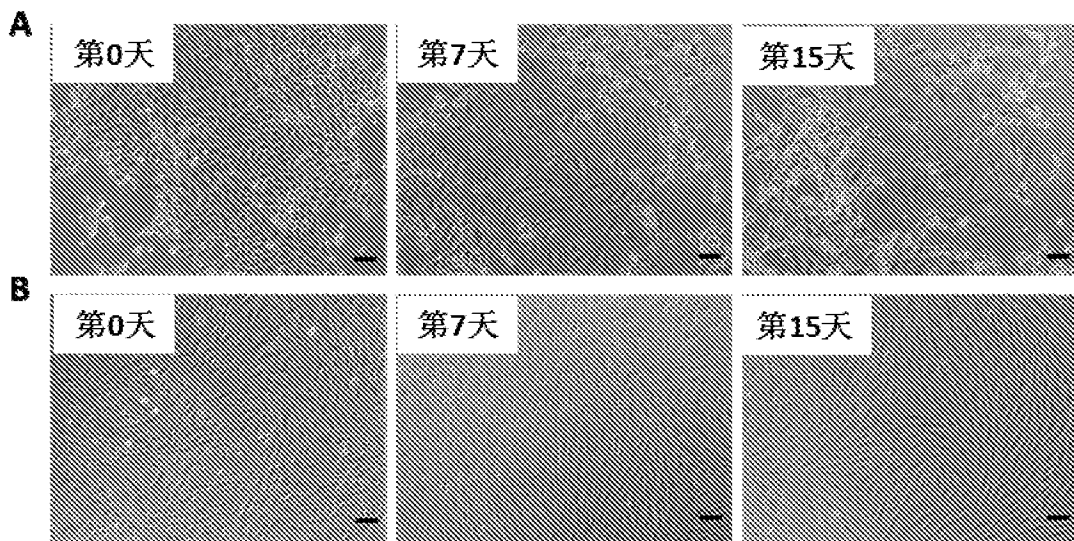


图 7

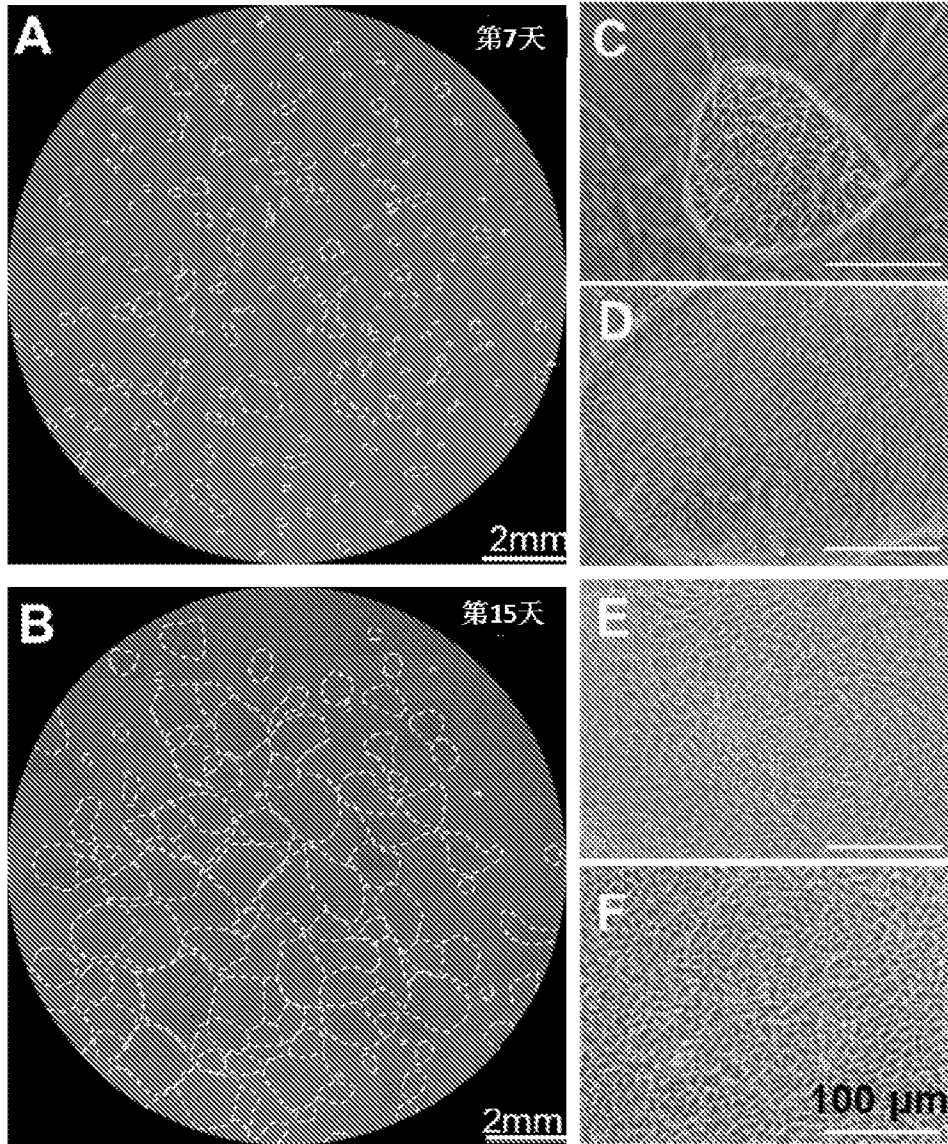


图 8

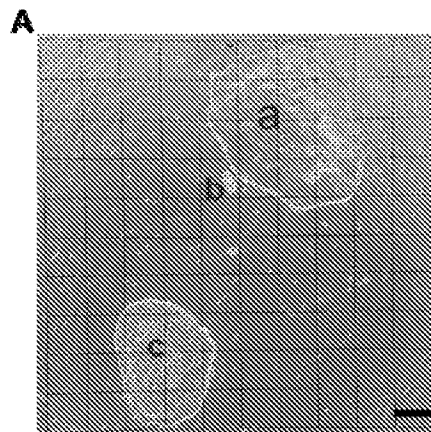


图 9

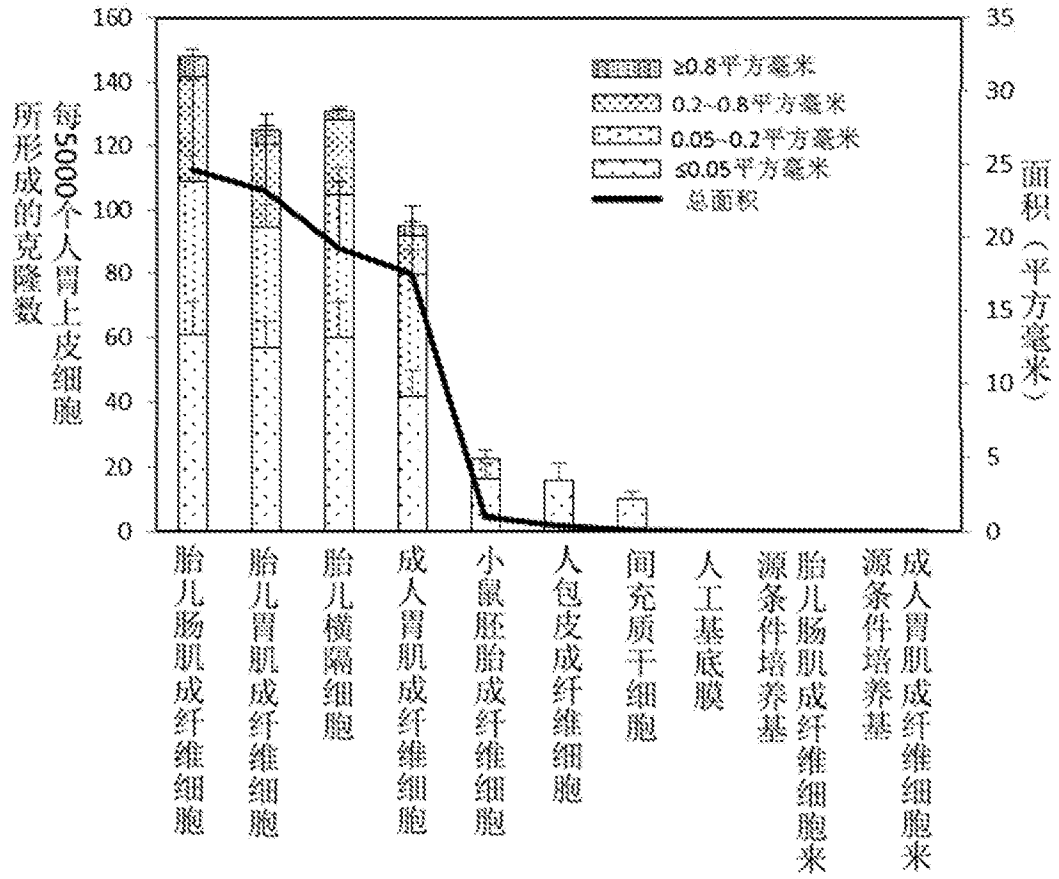


图 10

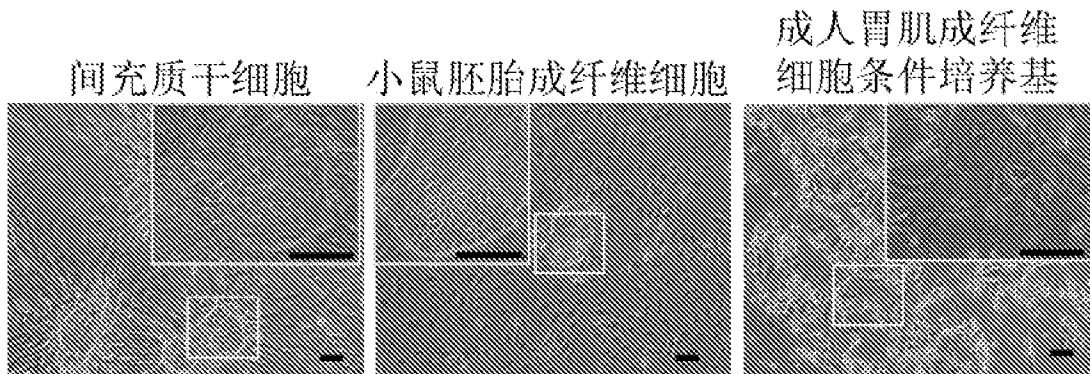


图 11

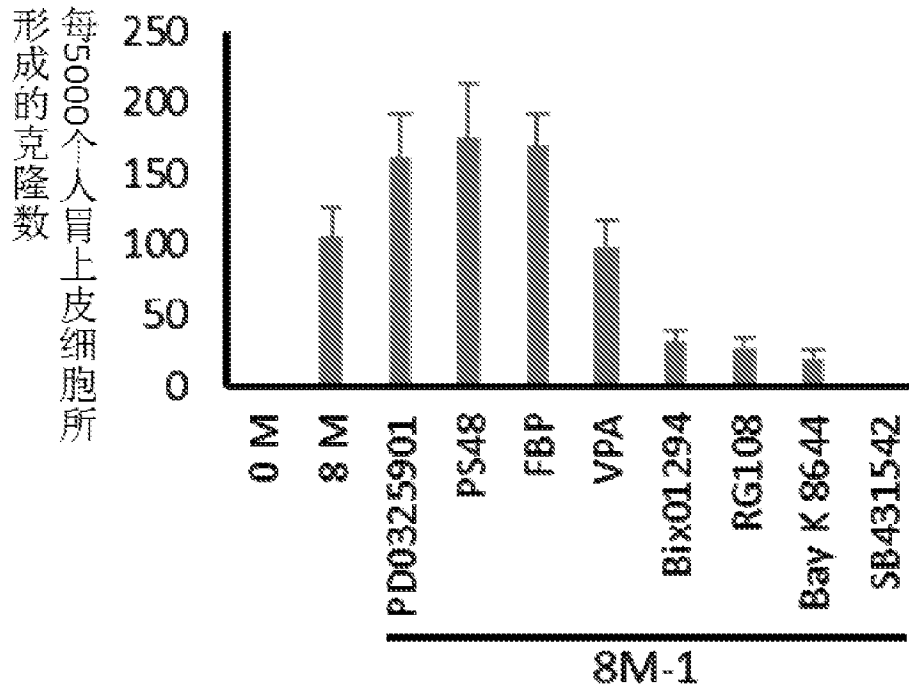


图 12

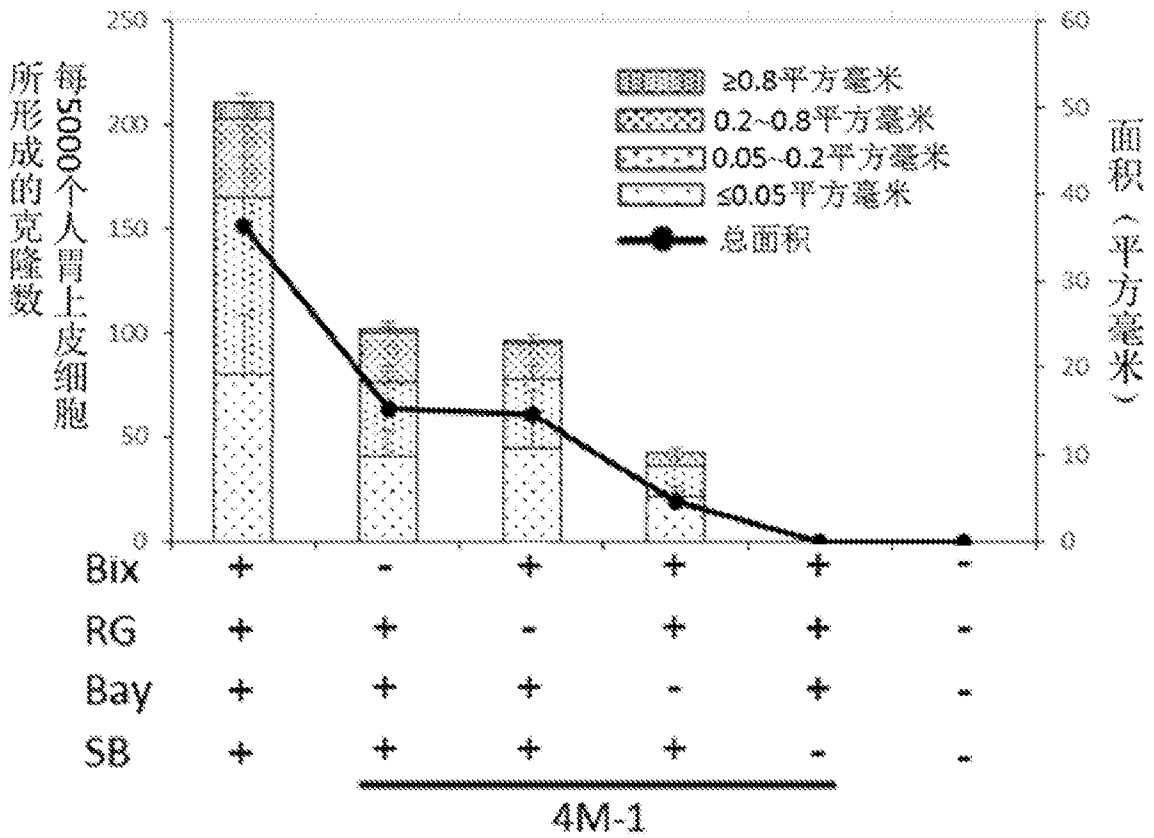


图 13

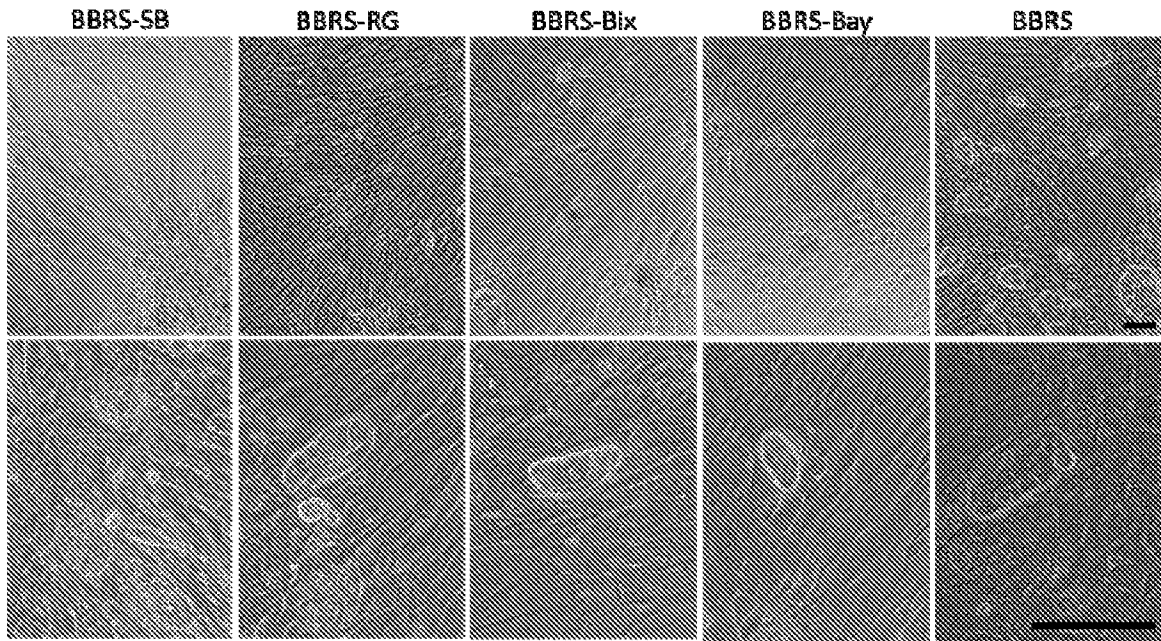


图 14

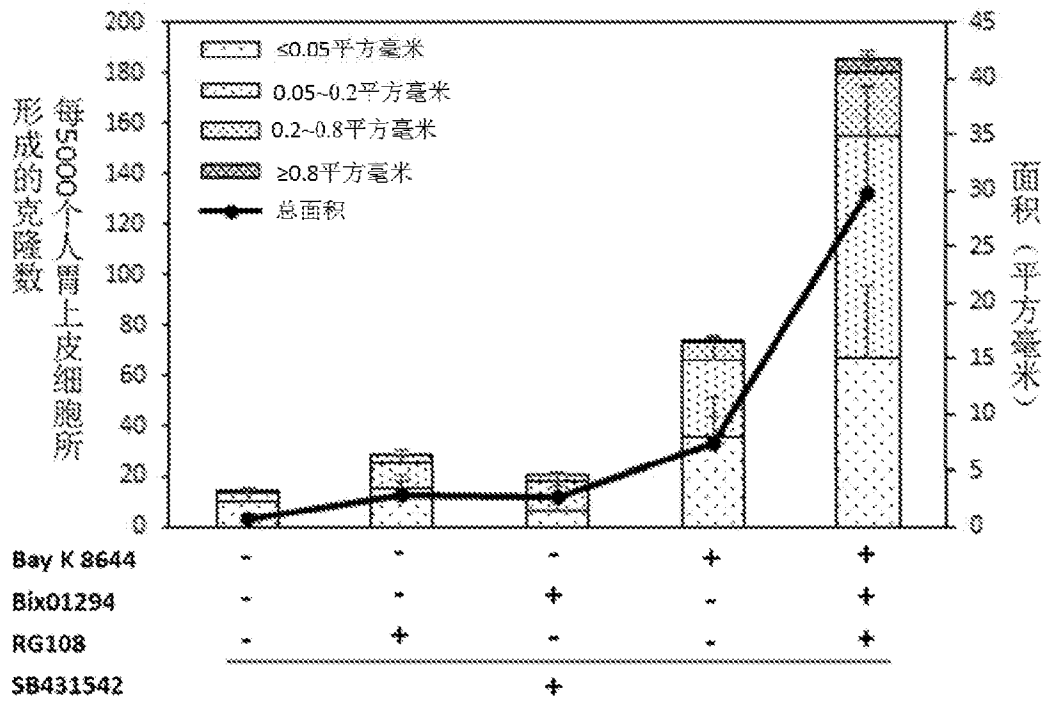


图 15A

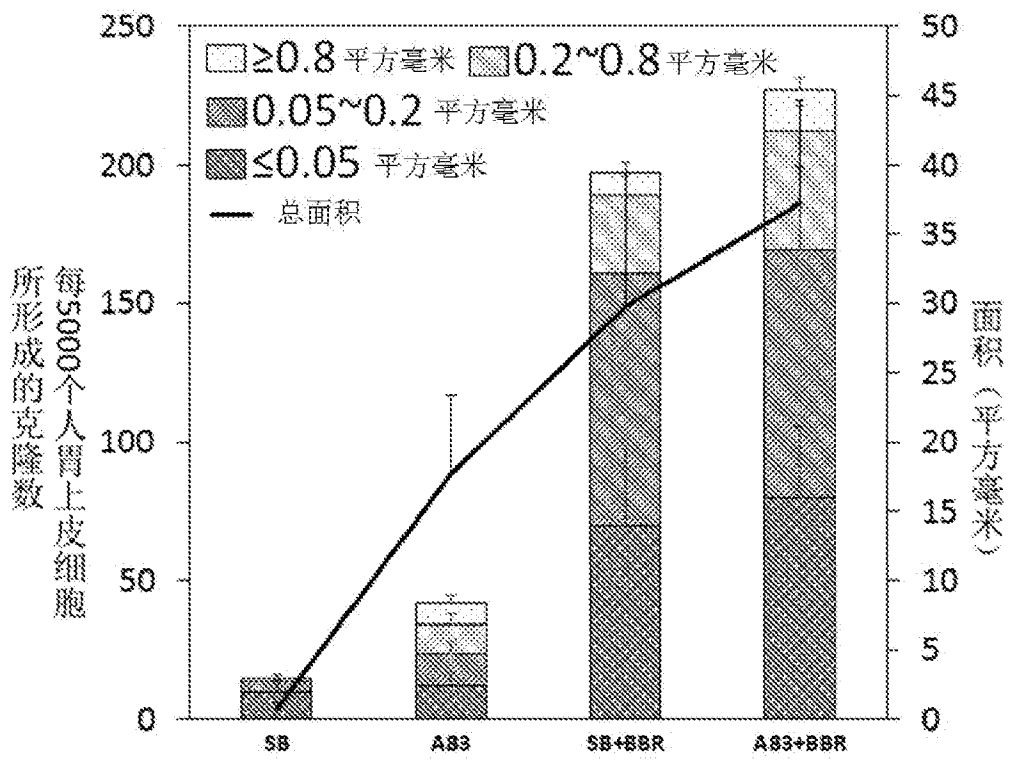


图 15B

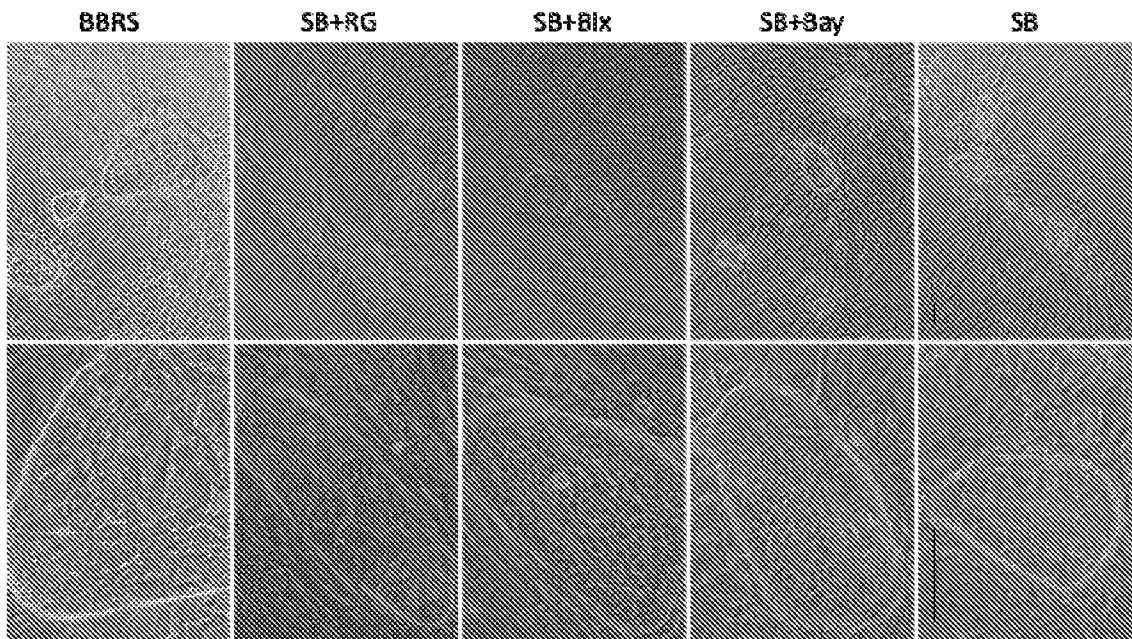


图 16

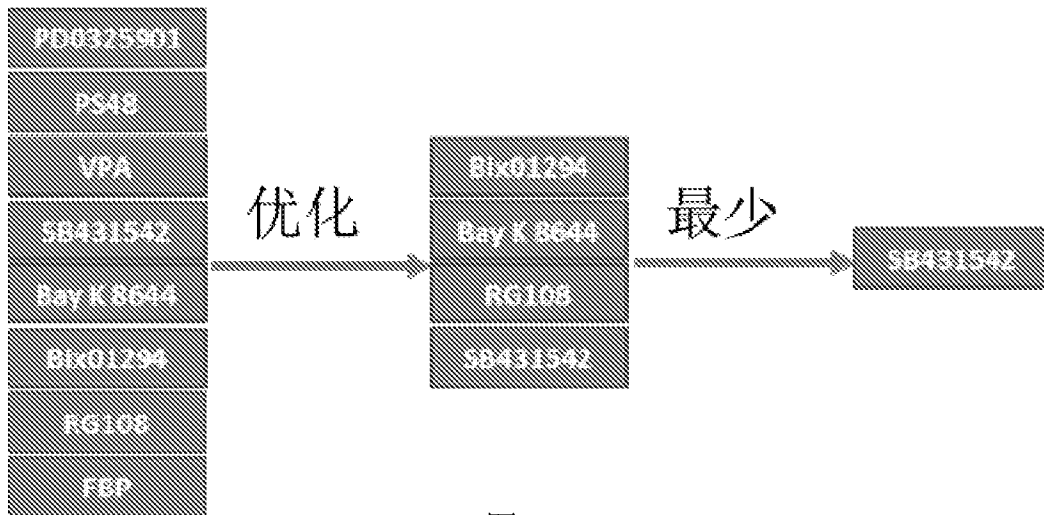


图 17

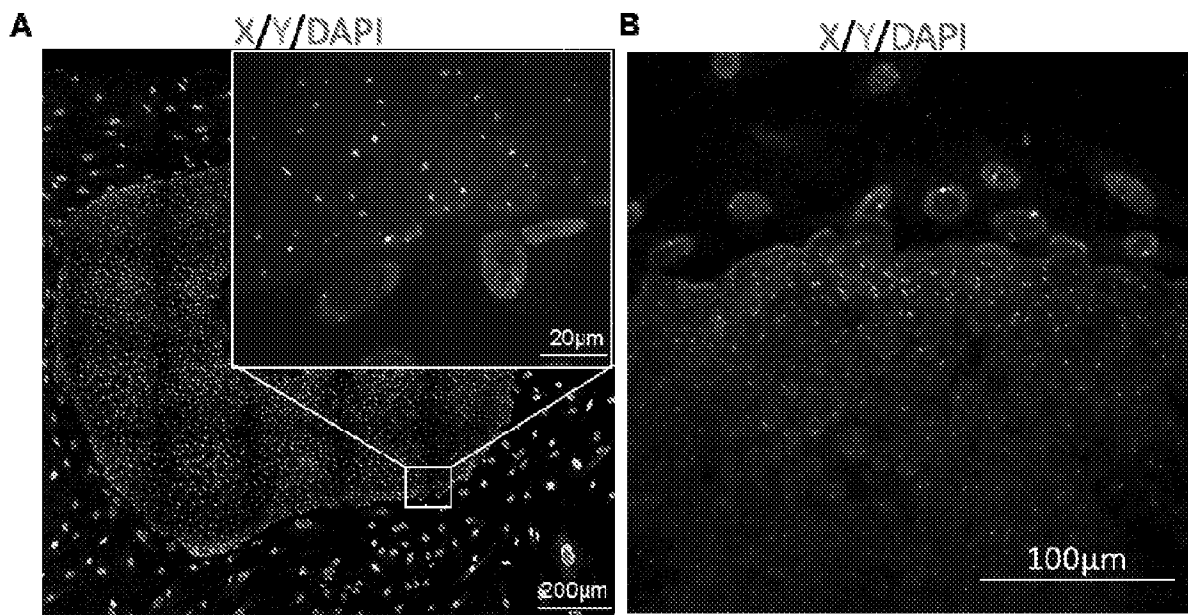
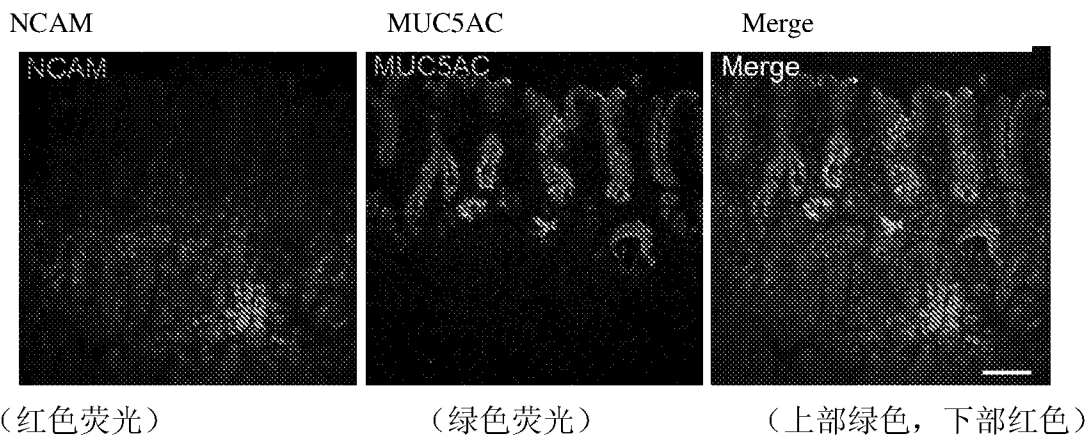


图 18



(红色荧光)

(绿色荧光)

(上部绿色, 下部红色)

图 19

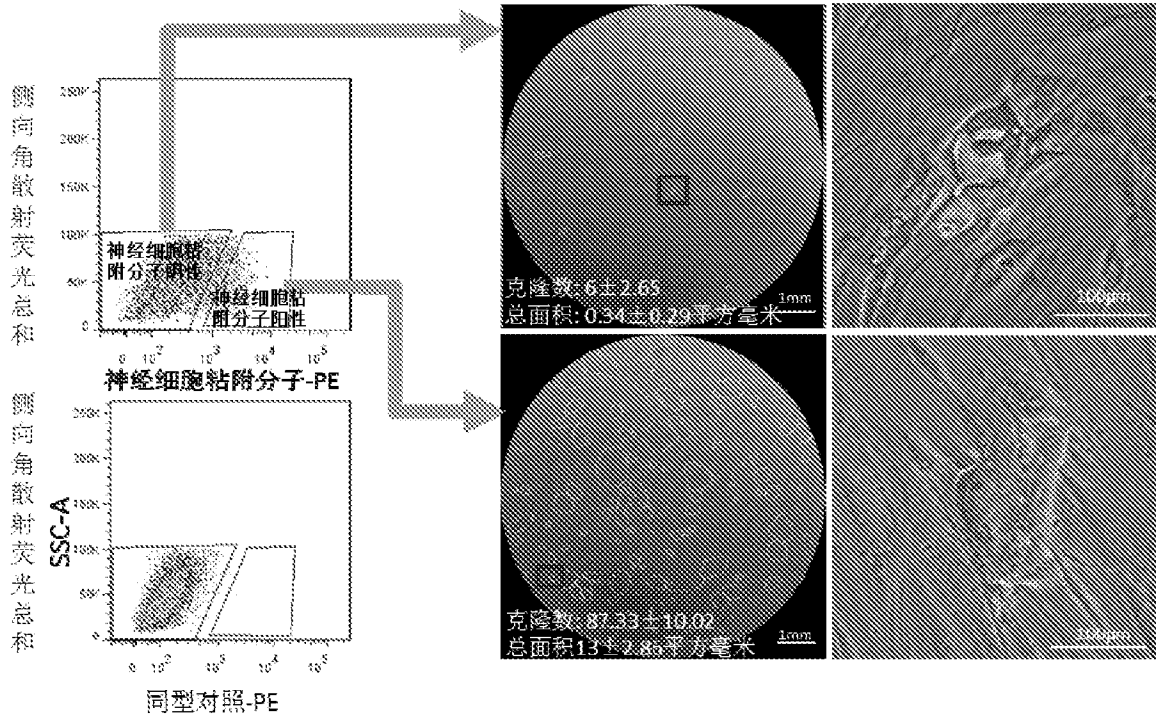


图 20

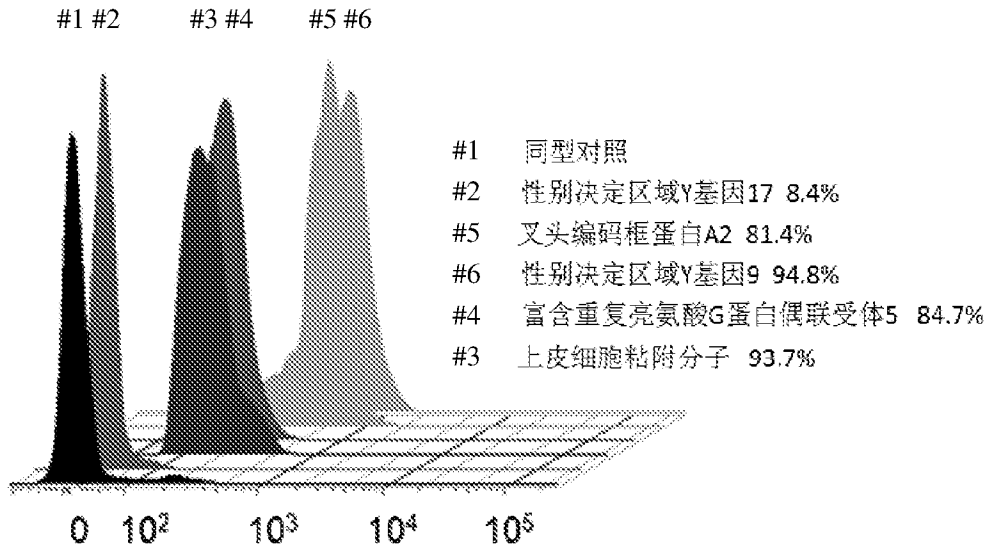


图 21

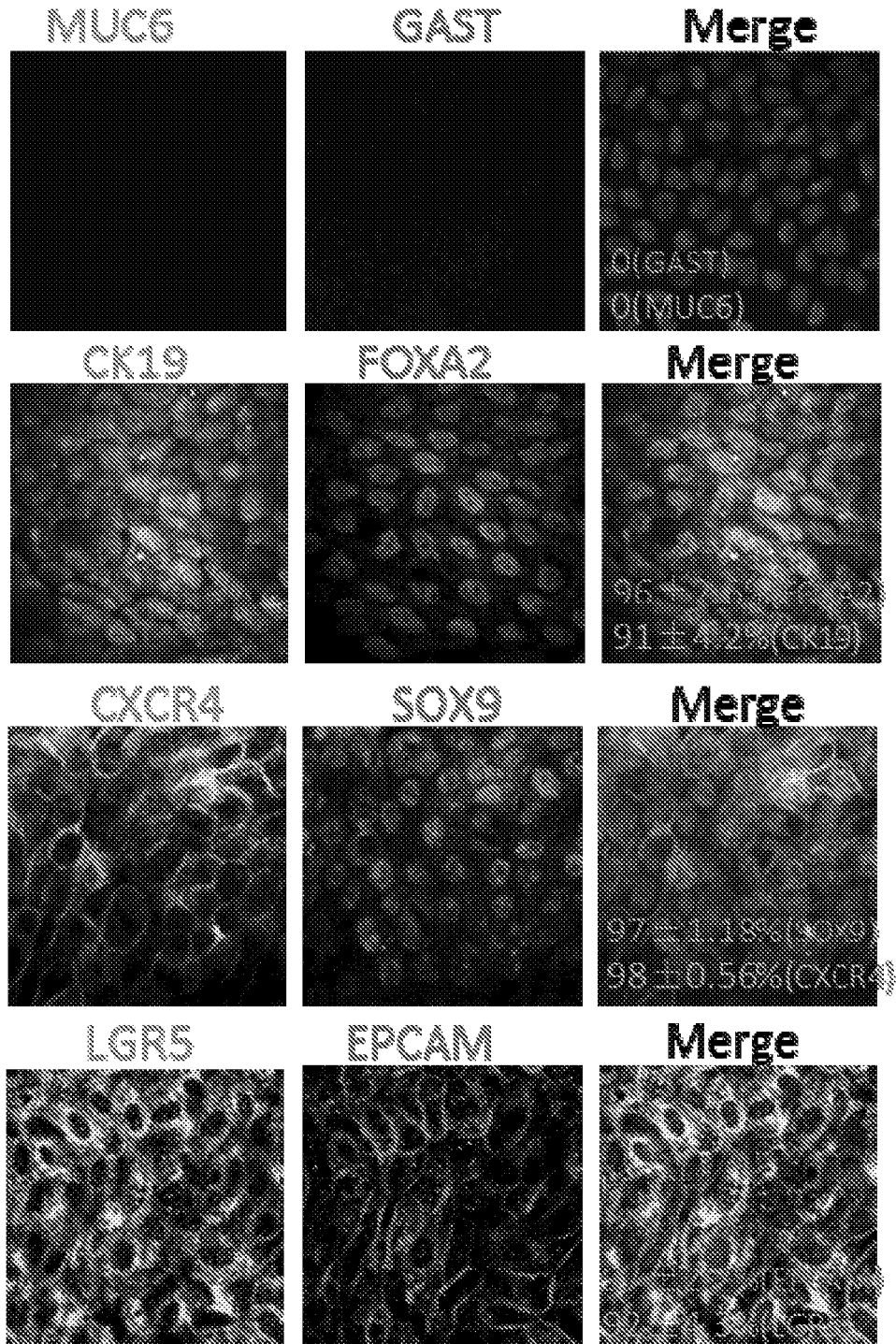


图 22

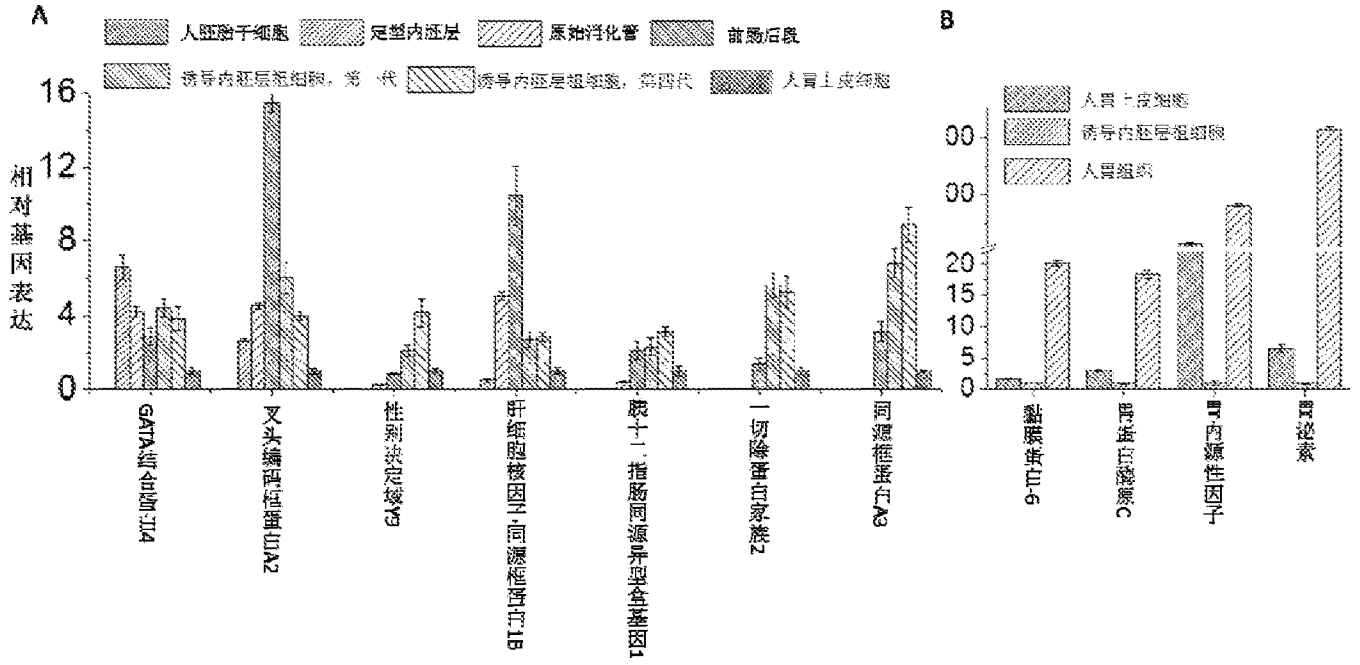


图 23

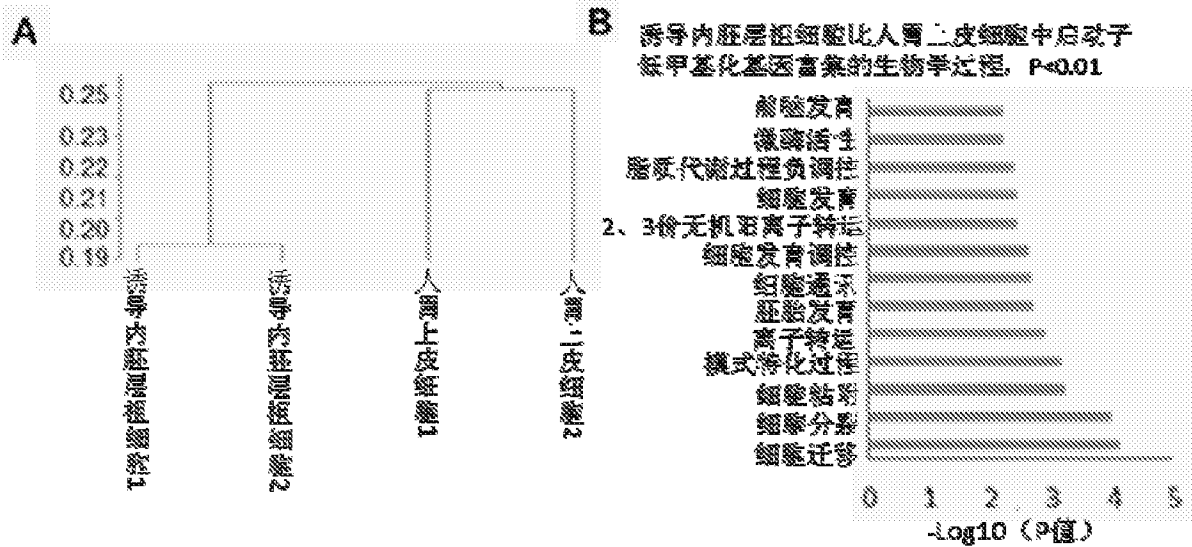


图 24

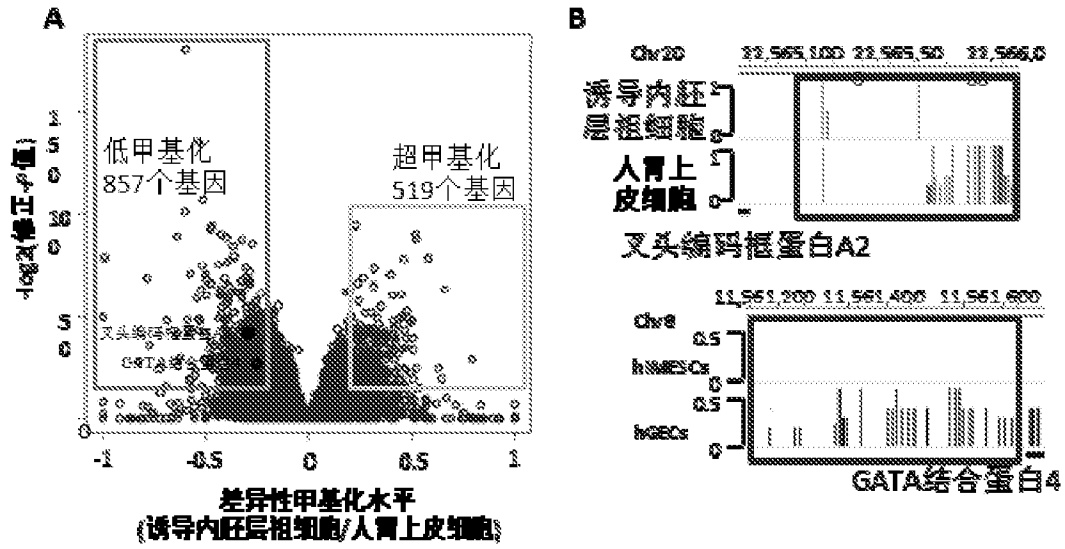


图 25

相关系数

诱导内胚层祖细胞1	1							
诱导内胚层祖细胞2	0.97	1						
诱导内胚层祖细胞3	0.98	0.98	1					
诱导内胚层祖细胞4	0.95	0.95	0.95	1				
诱导内胚层祖细胞5	0.95	0.95	0.95	0.93	1			
定型内胚层	0.89	0.89	0.89	0.87	0.88	1		
原始消化管	0.9	0.9	0.9	0.88	0.88	0.98	1	
前肠后段	0.9	0.91	0.91	0.89	0.89	0.96	0.98	1
	诱导内胚层祖细胞1	诱导内胚层祖细胞2	诱导内胚层祖细胞3	诱导内胚层祖细胞4	诱导内胚层祖细胞5	定型内胚层	原始消化管	前肠后段

图 26

PCA Mapping

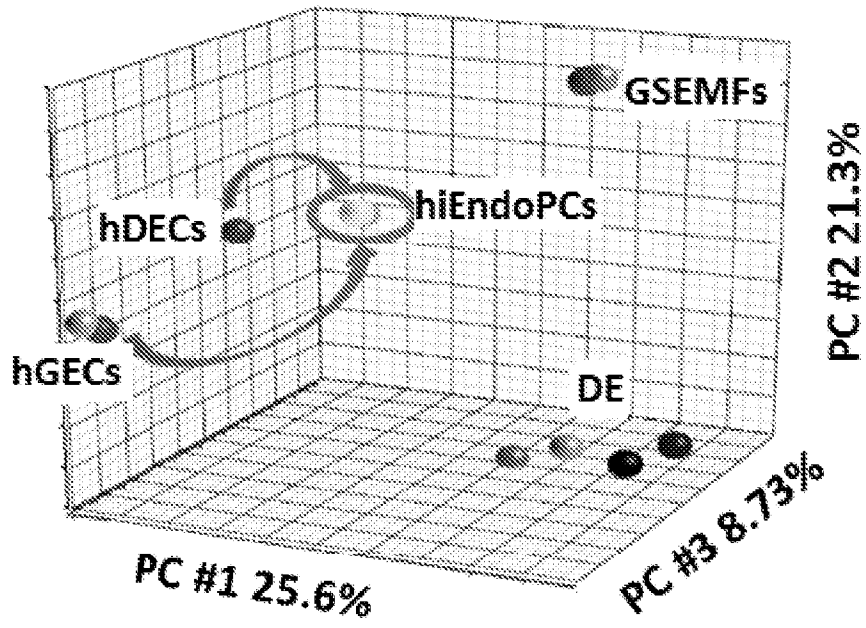


图 27

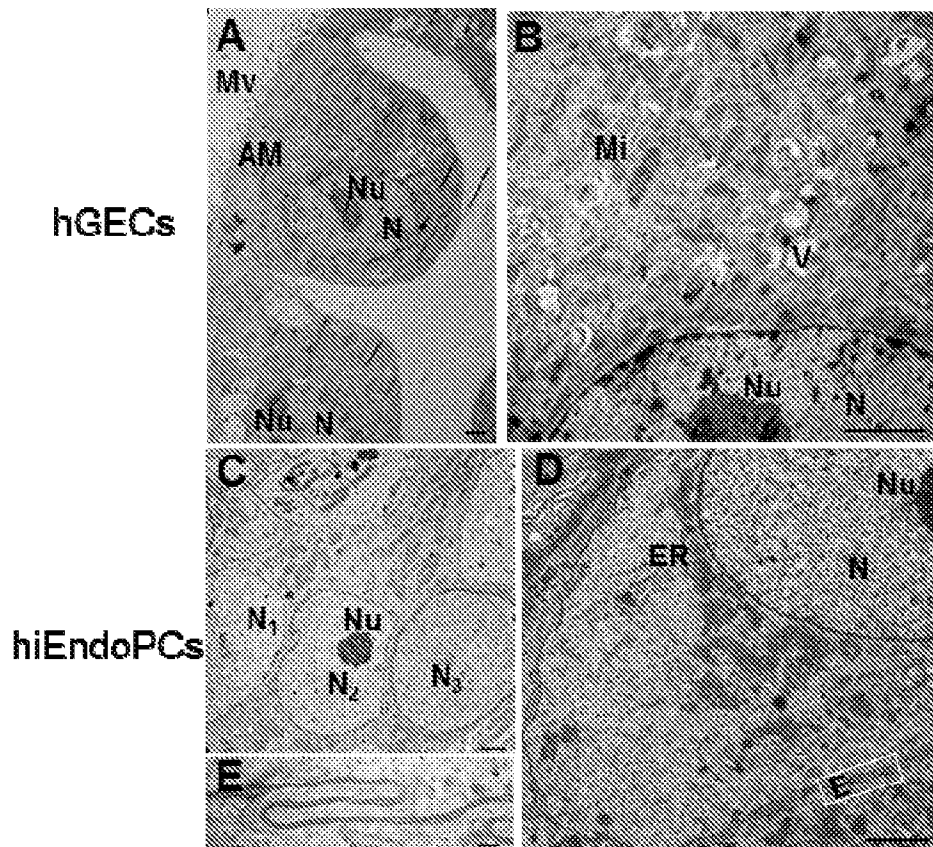


图 28

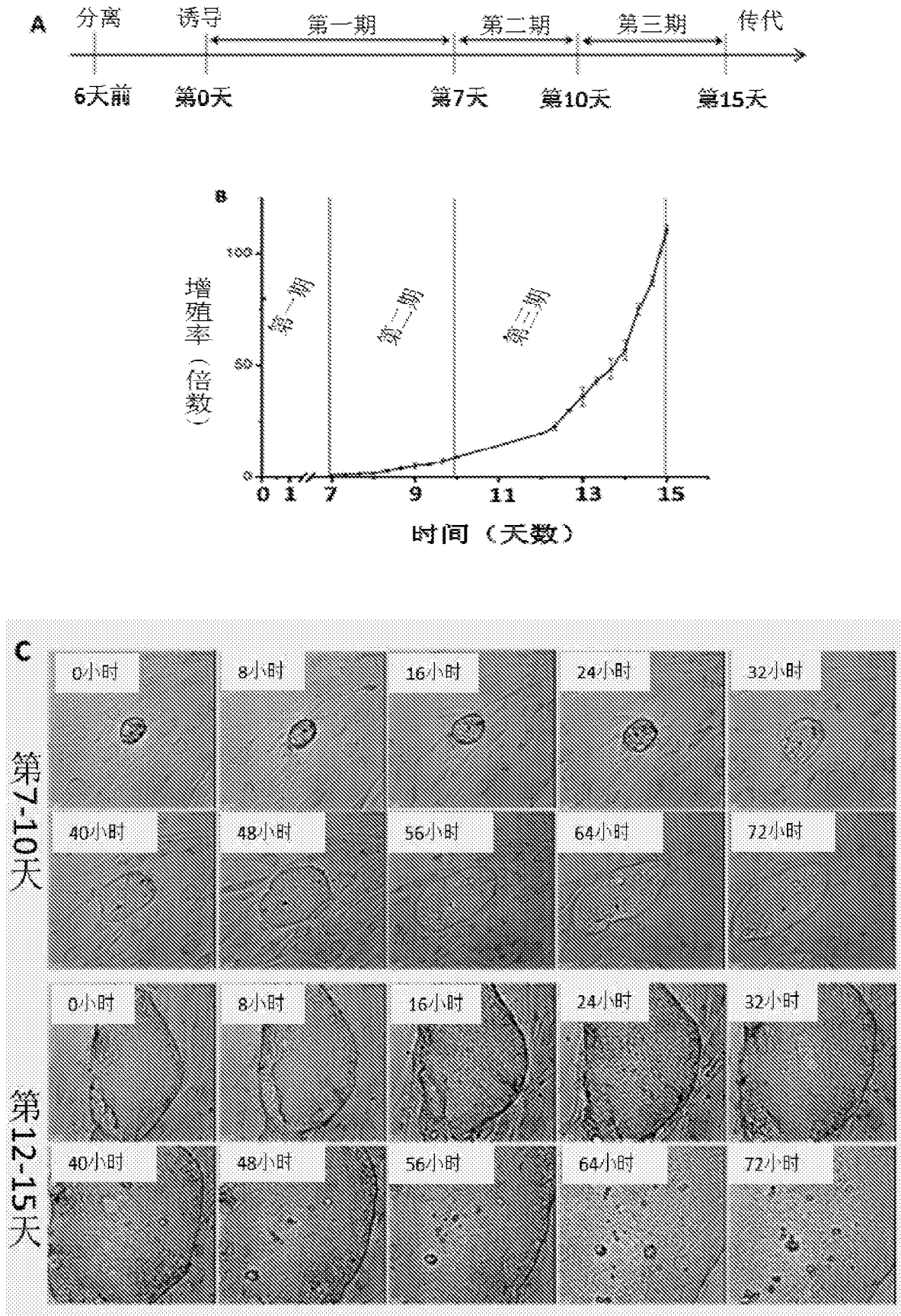


图 29

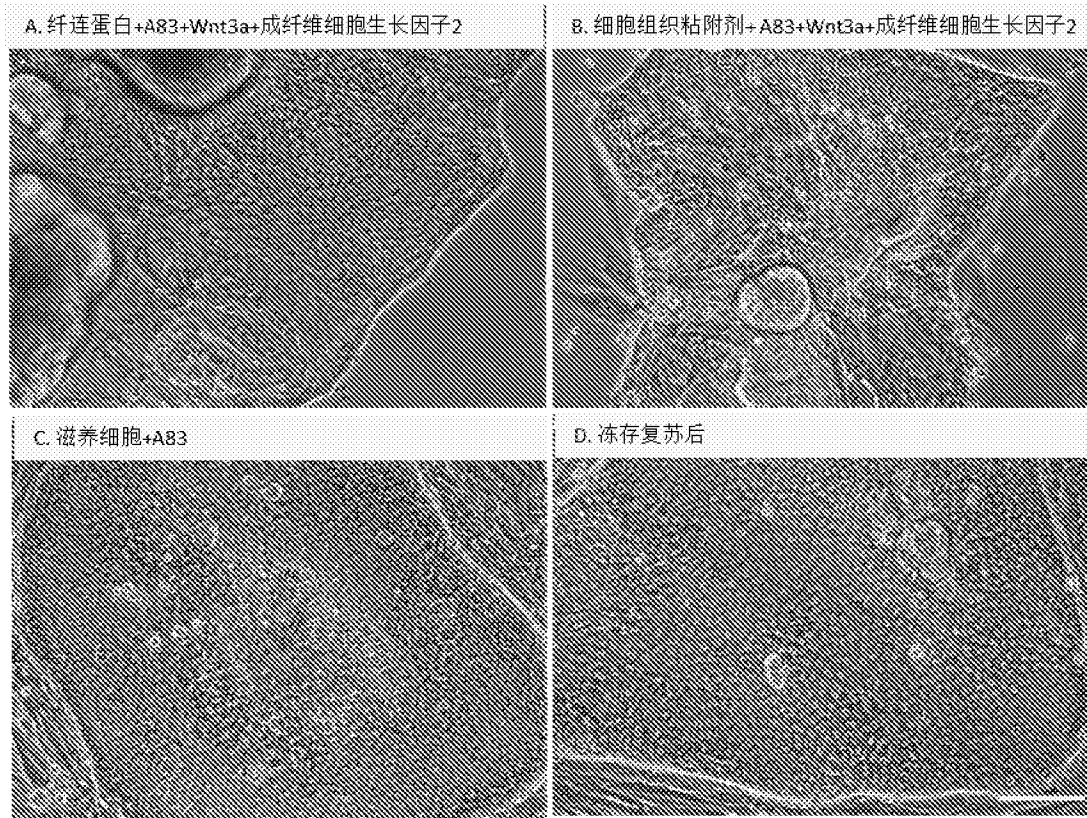


图 30

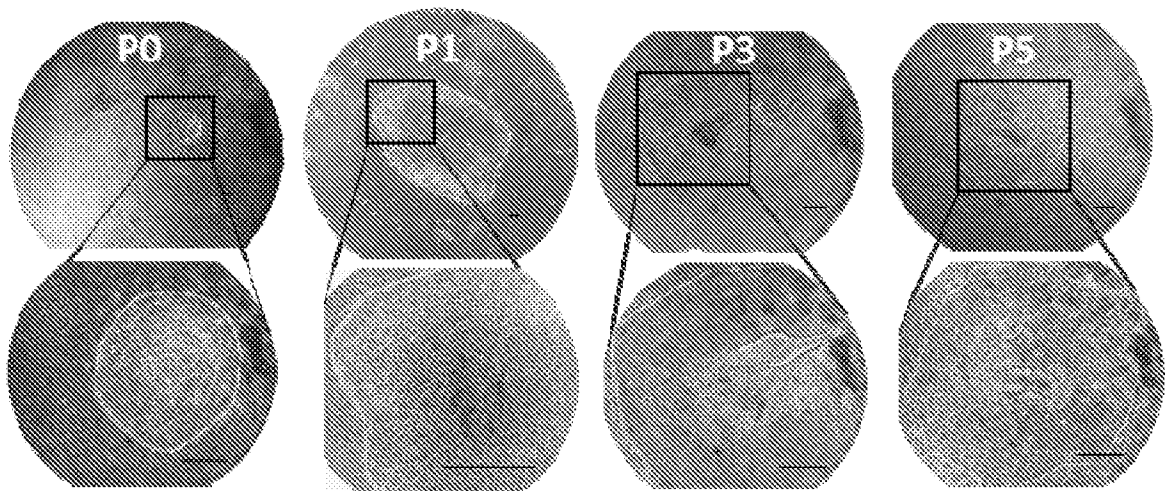


图 31

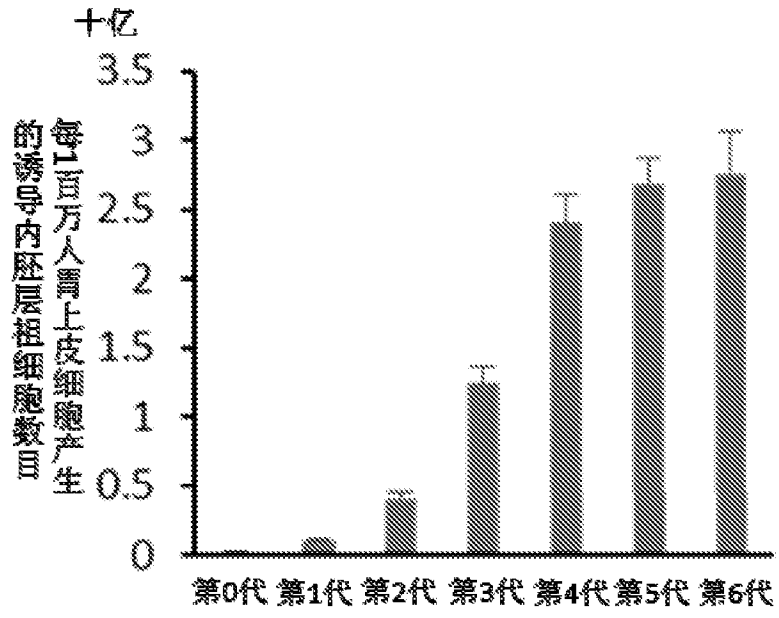


图 32

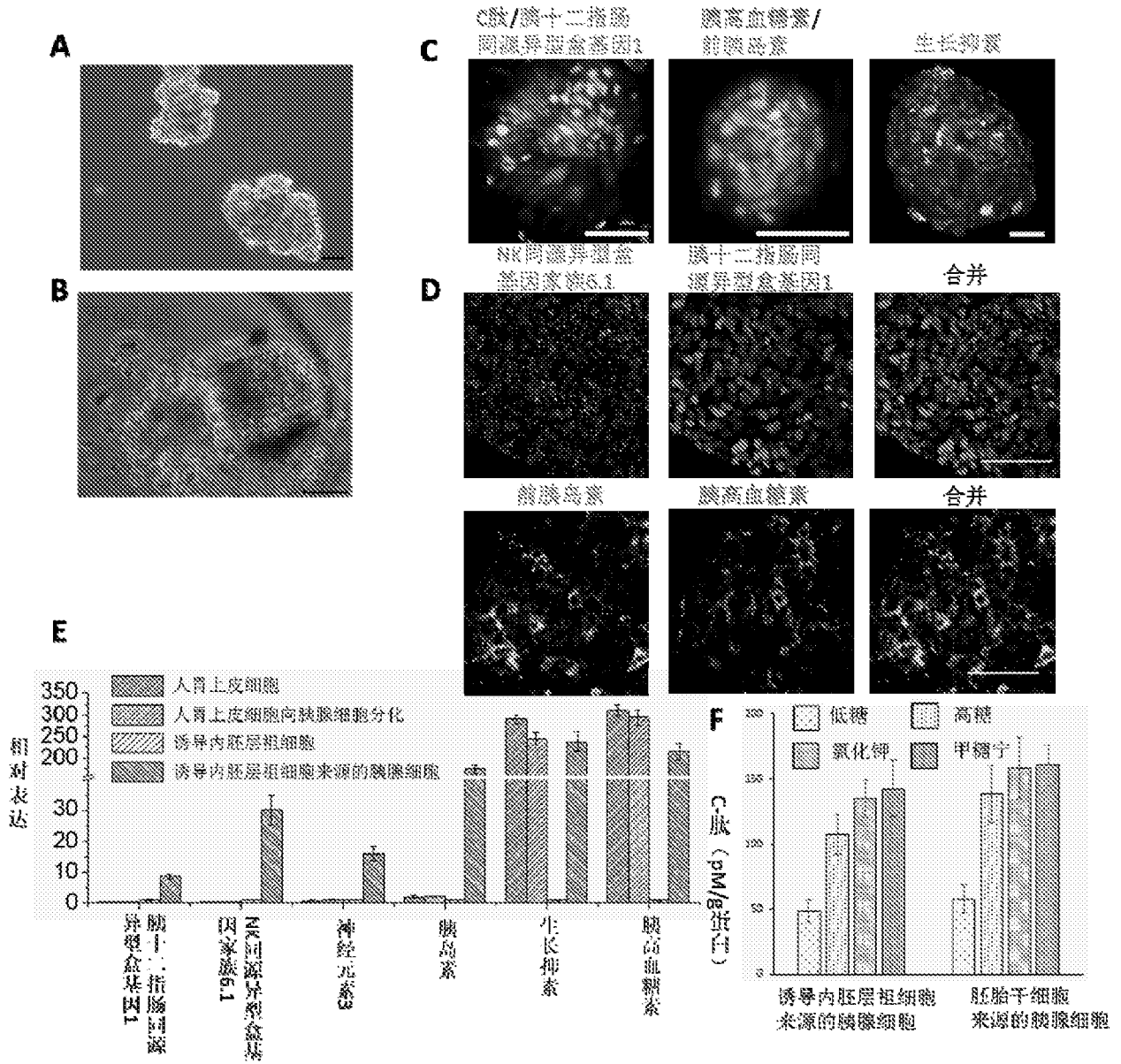


图 33

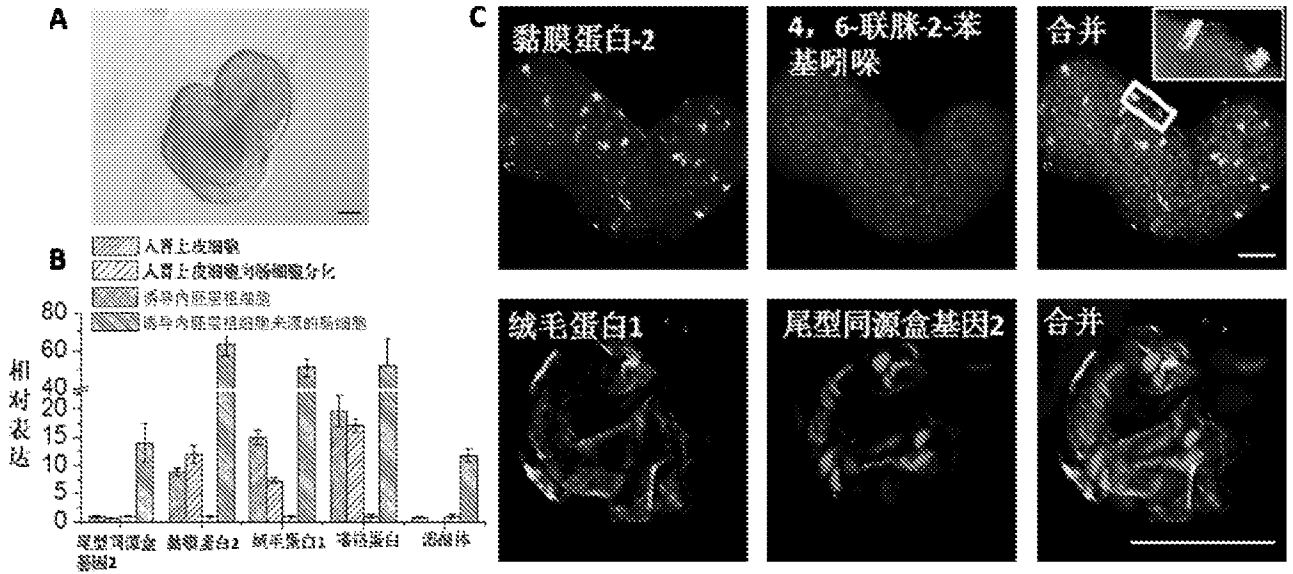


图 34

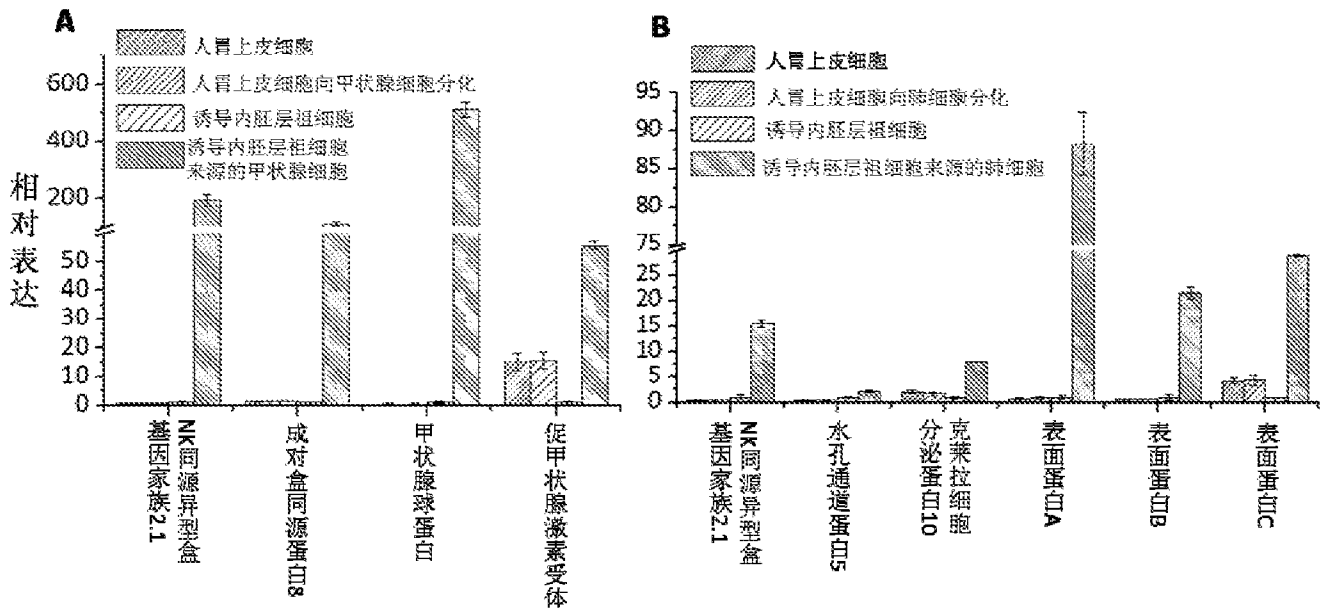


图 36

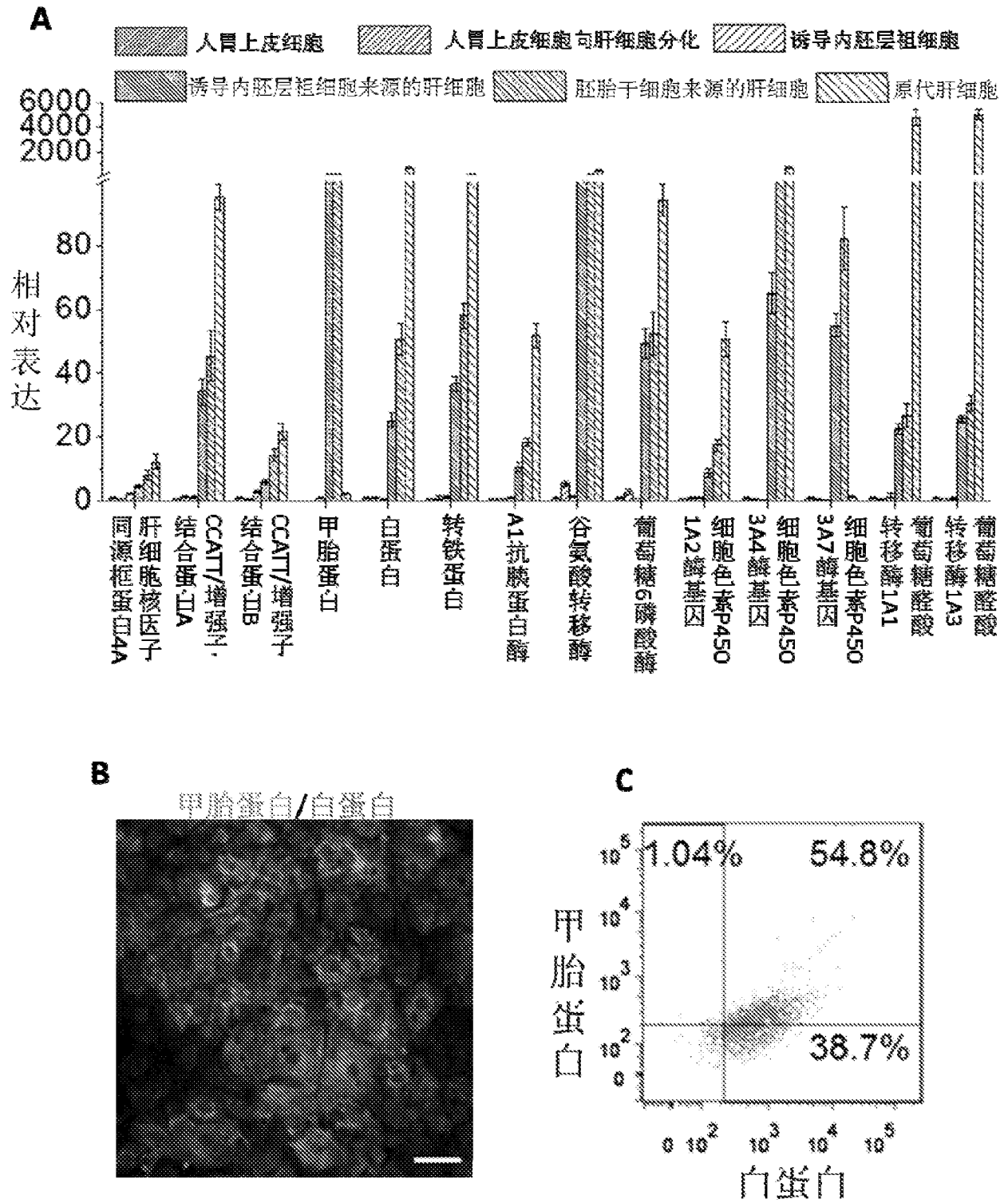


图 35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/086336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0735 (2010.01) i; C12N 5/0797 (2010.01) i; A61K 35/12 (2015.01) i

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 5/-; A61K 35/-

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)
 CNABS, SIPOABS, VEN, DWPI, WOTXT, EPTXT, CNTXT, ISI Web of Knowledge: cell, dedifferentiate, differentiate, epithelial cell, digestive tract, intestines, stomach, pluripotent stem cell, endoderm cell, TGF- β signaling pathway, performance modifier, calcium channel activator, metabolism channel regulator, hepatic cell, FBP, Bay K 8644, Bix01294, SB431542, A83-01, VPA, RG108, PD0325901, PS48, reprogramming, iPS cells, stem cell, small molecules, endodermal progenitors, gastric epithelial cells, signaling pathway inhibitors, epigenetic modulators, Ca²⁺ channel activator, metabolic regulators

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015322405 A1 (FLINDERS UNIVERSITY OF SOUTH AUSTRALIA), 12 November 2015 (12.11.2015), abstract, table 9, and description, paragraph [0277]	1, 6-9
X	CN 104694570 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (TSRI)), 10 June 2015 (10.06.2015), claims 24, 46 and 75-78, and description, page 6, paragraphs [0074]-[0092]	1, 6-9
X	WO 2016022992 A1 (DUKE UNIVERSITY), 11 February 2016 (11.02.2016), abstract, and claim 7	1, 6-9
X	WO 2012006577 A2 (DUKE UNIVERSITY), 12 January 2012 (12.01.2012), abstract, and claim 10	1, 6-9
X	CN 104673741 A (GUANGDONG HOSPITAL OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE), 03 June 2015 (03.06.2015), see claims 1 and 7, and description, paragraphs [0009]-[0014]	1, 6-9
X	CN 102959076 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (TSRI)), 06 March 2013 (06.03.2013), claims 1, 6, 8, 11, 24 and 32	1, 6-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"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 "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 "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 "&" document member of the same patent family
--	--

Date of the actual completion of the international search 31 July 2017 (31.07.2017)	Date of mailing of the international search report 25 August 2017 (25.08.2017)
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 <p style="text-align: center;">LAO, Fang</p> Telephone No.: (86-10) 61648326

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/086336

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WANG, Y.F. et al., "Conversion of Human Gastric Epithelial Cells to Multipotent Endodermal Progenitors Using Defined Small Molecules", CELL STEM CELL, volume 19, 21 July 2016 (21.07.2016), pages 449-461	1-20
X	CN 101445791 A (PEKING UNIVERSITY), 03 June 2009 (03.06.2009), description, page 5, chapter 2 and page 8, chapter 4	19-20
A	CN 104120107 A (PEKING UNIVERSITY), 29 October 2014 (29.10.2014), the whole document	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/086336

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2015322405 A1	12 November 2015	WO 2013086570 A1	20 June 2013
		KR 20140103132 A	25 August 2014
CN 104694570 A	10 June 2015	AU 2012350353 A1	03 July 2014
		HK 1151559 A0	03 February 2012
		CN 102027105 B	11 March 2015
		SG 10201607710 A1	29 November 2016
		AU 2017203760	22 June 2017
		AU 2009225665 B	15 January 2015
		EP 2955222 A1	16 December 2015
		US 9394524 B2	19 July 2016
		US 2016369244 A1	22 December 2016
		MX 2010010165 A	30 November 2010
		RU 2010139426 A	27 April 2012
		AU 2015201026 A1	19 March 2015
		AU 2015201026 B2	16 March 2017
		US 2017081640 A1	23 March 2017
		US 2010233804 A1	16 September 2010
		KR 20100124335 A	26 November 2010
		SG 188904 A1	30 April 2013
		US 2013273536 A1	17 October 2013
		US 9068170 B2	30 June 2015
		JP 2016185172 A	27 October 2016
		CA 2718904 C	03 January 2017
		WO 2009117439 A3	30 December 2009
		JP 5951254 B2	13 July 2016
		HK 1151559 A1	15 July 2016
		WO 2009117439 A2	24 September 2009
		AU 2009225665 A1	11 November 2010
		US 2011110899 A1	12 May 2011
		AU 2009225665 B2	04 December 2014
		EP 2279243 B1	06 January 2016
		US 9534205 B2	03 January 2017
		SG 188904 B	28 September 2016
		EP 2279243 A2	02 February 2011
CA 2718904 A1	24 September 2009		
JP 2011517560 A	16 June 2011		
JP 2015119714 A	02 July 2015		
HK 1209457 A0	01 April 2016		
US 9540615 B2	10 January 2017		
US 2010267141 A1	21 October 2010		
ZA 201006683 A	30 November 2011		
SG 164832 A1	28 October 2010		
IL 208144 A	31 December 2012		
KR 1679082 B	23 November 2016		
EP 2279243 A4	29 June 2011		
CN 102027105 A	20 April 2011		
WO 2016022992 A1	11 February 2016	EP 3177302 A1	11 February 2016
WO 2012006577 A2	12 January 2012	CA 2957532 A1	11 February 2016
		WO 2012006577 A3	05 April 2012
		US 2014011281 A1	09 January 2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/086336

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104673741 A CN 102959076 A	03 June 2015	EP 2591095 B1	27 April 2016
		CA 2804791 A1	12 January 2012
		EP 2591095 A2	15 May 2013
	06 March 2013	None	
		CN 105176930 A	23 December 2015
		AU 2011235212 B	31 July 2014
		AU 2014256410 A1	20 November 2014
		AU 2017201158 A1	16 March 2017
		US 9657274 B2	23 May 2017
		US 9315779 B2	19 April 2016
		AU 2014256410 B2	15 December 2016
		AU 2011235212 A1	01 November 2012
		EP 2553086 A1	06 February 2013
		JP 2016171798 A	29 September 2016
		US 2013323833 A1	05 December 2013
		EP 2553086 B1	19 April 2017
		CA 2800498 A1	06 October 2011
HK 1181812 A0	15 November 2013		
WO 2011123572 A1	06 October 2011		
CN 101445791 A CN 104120107 A	03 June 2009	CN 102959076 B	16 September 2015
		JP 2013523134 A	17 June 2013
	29 October 2014	JP 5909482 B2	26 April 2016
		US 2016257938 A1	08 September 2016
		HK 1214626 A0	29 July 2016
		None	
		None	

A. 主题的分类		
C12N 5/0735(2010.01)i; C12N 5/0797(2010.01)i; A61K 35/12(2015.01)i		
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 5/-; A61K 35/-		
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))		
CNABS, SIPOABS, VEN, DWPI, WOTXT, EPTXT, CNTXT, ISI Web of Knowledge, 重编辑, 细胞, 去分化, 分化, 上皮细胞, 消化道, 肠, 胃, 多能干细胞, 内胚层细胞, TGF- β 信号通路, 表观修饰剂, 钙离子通道激动剂, 代谢通路调节剂, 肝细胞, 小分子, FBP, Bay K 8644, Bix01294, SB431542, A83-01, VPA, RG108, PD0325901, PS48, reprogramming, iPS cells, stem cell, small molecules, endodermal progenitors, gastric epithelial cells, signaling pathway inhibitors, epigenetic modulators, Ca ²⁺ channel activator, metabolic regulators		
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
X	US 2015322405 A1 (FLINDERS UNIVERSITY OF SOUTH AUSTRALIA) 2015年 11月 12日 (2015 - 11 - 12) 摘要, 表9, 说明书第[0277]段	1, 6-9
X	CN 104694570 A (斯克里普斯研究所) 2015年 6月 10日 (2015 - 06 - 10) 权利要求24, 46, 75-78, 说明书第6页第[0074]-[0092]段	1, 6-9
X	WO 2016022992 A1 (DUKE UNIVERSITY) 2016年 2月 11日 (2016 - 02 - 11) 摘要, 权利要求7	1, 6-9
X	WO 2012006577 A2 (DUKE UNIVERSITY) 2012年 1月 12日 (2012 - 01 - 12) 摘要, 权利要求10	1, 6-9
X	CN 104673741 A (广东省中医院) 2015年 6月 3日 (2015 - 06 - 03) 参见权利要求1, 7, 说明书第[0009]-[0014]段	1, 6-9
X	CN 102959076 A (斯克里普斯研究所) 2013年 3月 6日 (2013 - 03 - 06) 权利要求1, 6, 8, 11, 24, 32	1, 6-9
<input checked="" 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	国际检索报告邮寄日期	
2017年 7月 31日	2017年 8月 25日	
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员	
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	芳芳	
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)61648326	

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	WANG, Y. F. 等. "Conversion of Human Gastric Epithelial Cells to Multipotent Endodermal Progenitors using Defined Small Molecules" CELL STEM CELL, 第19卷, 2016年 7月 21日 (2016 - 07 - 21), 第449-461页	1-20
X	CN 101445791 A (北京大学) 2009年 6月 3日 (2009 - 06 - 03) 说明书第5页第②节, 第8页第4节	19-20
A	CN 104120107 A (北京大学) 2014年 10月 29日 (2014 - 10 - 29) 全文	1-20

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/086336

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)
US	2015322405	A1	2015年 11月 12日	WO	2013086570	A1	2013年 6月 20日
				KR	20140103132	A	2014年 8月 25日
				AU	2012350353	A1	2014年 7月 3日
CN	104694570	A	2015年 6月 10日	HK	1151559	A0	2012年 2月 3日
				CN	102027105	B	2015年 3月 11日
				SG	10201607710	A1	2016年 11月 29日
				AU	2017203760		2017年 6月 22日
				AU	2009225665	B	2015年 1月 15日
				EP	2955222	A1	2015年 12月 16日
				US	9394524	B2	2016年 7月 19日
				US	2016369244	A1	2016年 12月 22日
				MX	2010010165	A	2010年 11月 30日
				RU	2010139426	A	2012年 4月 27日
				AU	2015201026	A1	2015年 3月 19日
				AU	2015201026	B2	2017年 3月 16日
				US	2017081640	A1	2017年 3月 23日
				US	2010233804	A1	2010年 9月 16日
				KR	20100124335	A	2010年 11月 26日
				SG	188904	A1	2013年 4月 30日
				US	2013273536	A1	2013年 10月 17日
				US	9068170	B2	2015年 6月 30日
				JP	2016185172	A	2016年 10月 27日
				CA	2718904	C	2017年 1月 3日
				WO	2009117439	A3	2009年 12月 30日
				JP	5951254	B2	2016年 7月 13日
				HK	1151559	A1	2016年 7月 15日
				WO	2009117439	A2	2009年 9月 24日
				AU	2009225665	A1	2010年 11月 11日
				US	2011110899	A1	2011年 5月 12日
				AU	2009225665	B2	2014年 12月 4日
EP	2279243	B1	2016年 1月 6日				
US	9534205	B2	2017年 1月 3日				
SG	188904	B	2016年 9月 28日				
EP	2279243	A2	2011年 2月 2日				
CA	2718904	A1	2009年 9月 24日				
JP	2011517560	A	2011年 6月 16日				
JP	2015119714	A	2015年 7月 2日				
HK	1209457	A0	2016年 4月 1日				
US	9540615	B2	2017年 1月 10日				
US	2010267141	A1	2010年 10月 21日				
ZA	201006683	A	2011年 11月 30日				
SG	164832	A1	2010年 10月 28日				
IL	208144	A	2012年 12月 31日				
KR	1679082	B	2016年 11月 23日				
EP	2279243	A4	2011年 6月 29日				
CN	102027105	A	2011年 4月 20日				
WO	2016022992	A1	2016年 2月 11日	EP	3177302	A1	2016年 2月 11日
				CA	2957532	A1	2016年 2月 11日
WO	2012006577	A2	2012年 1月 12日	WO	2012006577	A3	2012年 4月 5日
				US	2014011281	A1	2014年 1月 9日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/086336

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)
				EP 2591095 B1	2016年 4月 27日
				CA 2804791 A1	2012年 1月 12日
				EP 2591095 A2	2013年 5月 15日
CN	104673741	A	2015年 6月 3日	无	
CN	102959076	A	2013年 3月 6日	CN 105176930 A	2015年 12月 23日
				AU 2011235212 B	2014年 7月 31日
				AU 2014256410 A1	2014年 11月 20日
				AU 2017201158 A1	2017年 3月 16日
				US 9657274 B2	2017年 5月 23日
				US 9315779 B2	2016年 4月 19日
				AU 2014256410 B2	2016年 12月 15日
				AU 2011235212 A1	2012年 11月 1日
				EP 2553086 A1	2013年 2月 6日
				JP 2016171798 A	2016年 9月 29日
				US 2013323833 A1	2013年 12月 5日
				EP 2553086 B1	2017年 4月 19日
				CA 2800498 A1	2011年 10月 6日
				HK 1181812 A0	2013年 11月 15日
				WO 2011123572 A1	2011年 10月 6日
				CN 102959076 B	2015年 9月 16日
				JP 2013523134 A	2013年 6月 17日
				JP 5909482 B2	2016年 4月 26日
				US 2016257938 A1	2016年 9月 8日
				HK 1214626 A0	2016年 7月 29日
CN	101445791	A	2009年 6月 3日	无	
CN	104120107	A	2014年 10月 29日	无	

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)