



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101735979 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 30

(21) 申请号 200910155910. 6

US 5945337 A, 1999. 08. 31, 全文.

(22) 申请日 2009. 12. 31

CN 1995334 A, 2007. 07. 11, 全文.

(73) 专利权人 浙江中赢控股集团有限公司

审查员 孙彦珂

地址 310052 浙江省杭州市滨江高新技术开  
发区楚天路 88 号

(72) 发明人 徐以兵 吴忠福 董升炬

(74) 专利代理机构 浙江英普律师事务所 33238

代理人 陈小良

(51) Int. Cl.

C12N 5/07(2010. 01)

(56) 对比文件

US 5599703 A, 1997. 02. 04, 摘要、权利要求  
1 - 9, 说明书第 7 - 8 栏、实施例 1 - 2.

WO 03060138 A1, 2003. 07. 24, 摘要、权利要  
求 1 - 15.

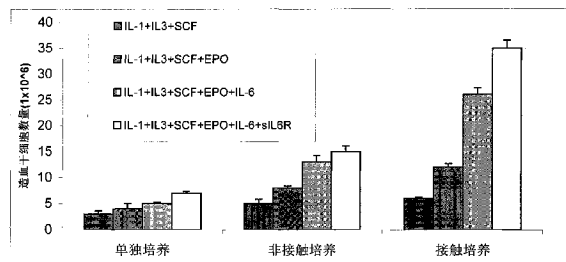
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

体外扩增造血干细胞和前体细胞的方法

(57) 摘要

本发明公布了一种干细胞体外扩增的方法, 具体是指一种将从人外周血或骨髓中分离的造血干细胞和前体细胞与内皮细胞共同培养来扩增造血干细胞和前体细胞。本发明通过分离 CD34 阳性骨髓干细胞和前体细胞; 将干细胞和前体细胞与内皮细胞直接接触培养; 加入至少一种细胞因子扩增干细胞和前体细胞; 通过细胞表面抗原进行识别, 选取的干细胞和前体细胞为 CD34 阳性, CD38 阴性, HLA-DR 阴性, CD15 阴性, Lin 阴性, c-kit 阳性, 纯度不小于 85%。本发明的优点是细胞的扩增效果好, 对患者显著减少骨髓和外周血抽取量, 减少了全身麻醉的必要性, 促进造血功能快速恢复, 减少住院时间。本发明疾病治疗有广泛的应用前景。



1. 体外扩增骨髓 CD34 阳性干细胞和前体细胞的方法,其特征在于:分离 CD34 阳性骨髓干细胞和前体细胞;将干细胞和前体细胞与内皮细胞直接接触培养;加入至少一种细胞因子扩增干细胞和前体细胞;

通过细胞表面抗原进行识别,选取的干细胞和前体细胞为 CD34 阳性, CD38 阴性, HLA-DR 阴性, CD15 阴性, Lin 阴性, c-kit 阳性,纯度不小于 85%;

所述的细胞因子为 IL-1+IL-3+SCF、IL-1+IL-3+SCF+EPO、IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6 或 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R 中的一种。

2. 根据权利要求 1 所述的扩增方法,其特征在于所述的细胞因子为 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R。

3. 根据权利要求 1 所述的扩增方法,其特征在于所述的干细胞和前体细胞与内皮细胞层的体积比为 1 : 1。

4. 根据权利要求 1 所述的扩增方法,其特征在于所述的干细胞和前体细胞的纯度不小于 95%。

5. 根据权利要求 4 所述的扩增方法,其特征在于所述的干细胞和前体细胞的纯度不小于 99%。

## 体外扩增造血干细胞和前体细胞的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种干细胞体外扩增的方法,具体是指一种将从人外周血或骨髓中分离的造血干细胞和前体细胞与内皮细胞共同培养来扩增造血干细胞和前体细胞。

### 技术背景

[0002] 成熟血细胞的形成是一个非常复杂的过程,血细胞成熟的过程主要发生骨髓之中。造血干细胞通过增殖和分化,生成不同类型的成熟的血细胞。造血干细胞和前体细胞具有广泛和长期的自我更新能力,和分化为所有淋巴细胞的能力。CD34 标记的造血细胞表面抗原是造血干细胞和前体细胞的重要标记。骨髓中 1-5% 的细胞表达 CD34 抗原,外周血中 0.1-0.5% 的细胞表达 CD34 抗原。CD34 抗原在人血管内皮细胞中也有表达。这提供了人血管内皮细胞和造血干细胞之间相互作用的物质基础。体外纯化和扩增的 CD34 阳性干细胞和前体细胞可以输回体内执行造血功能。

[0003] 骨髓提供了干细胞分化,血细胞生成和干细胞自我更新的微环境。微环境中有两个主要组成部分,淋巴造血因子和骨髓基质。骨髓基质由成纤维细胞,内皮细胞,脂肪细胞和巨噬细胞/单核细胞组成,这些细胞为干细胞提供了附着滋养层。这些异质细胞层可以为干细胞提供长期有效的增殖和分化所需要的微环境。在骨髓基质中,造血干细胞和前体细胞进行自我更新,增殖和分化。干细胞与滋养细胞的相互作用在这一过程中起重要作用。

[0004] 医学界和生物学界对在体外建立培养体系培养,扩增和分化造血干细胞和前体细胞表现出了很大的兴趣和热情。扩增和分化造血干细胞和前体细胞可用于人类疾病的治疗,例如骨髓移植。大多数骨髓移植用来帮助病人在放射治疗和化疗之后恢复造血功能。因此骨髓移植是一个治疗晚期恶性肿瘤治疗(包括血液和非血液),骨髓的内在缺陷,以及骨髓外伤(例如,辐射或毒素)重要的辅助手段。骨髓移植与基因治疗技术的结合已经对许多疾病的治疗带来革命性的影响。

[0005] 干细胞体外培养可分为两类,液体培养和基质共培养系统。在进行液体培养时,干细胞和前体细胞生长在含有生长因子和细胞因子的液体介质中。虽然液体培养易于维护,在技术上非常适合用于大规模扩增干细胞进行干细胞治疗,但这种方法生产的干细胞和前体细胞满足不了长期移植的需要。因为这样培养出的干细胞迅速分化成为成熟细胞,不再具备全能性。这可能是由于液体培养的条件下干细胞和前体细胞得不到生长和增殖分化所必需的微环境。为了解决这一问题,本发明采用基质共培养系统。该基质中包含有内皮细胞,干细胞和前体细胞,脂肪细胞,成纤维细胞和巨噬细胞,生长因子和/或细胞因子。

[0006] 第一代的基质共培养系统(Dexter et al., Ann. Rev. Cell Bio. 3 :423, 1987) 中基质细胞的异质性使得这一培养体系中的微环境的影响很难分析。这个复杂的微环境也极大地妨碍了对造血干细胞发育阶段影响元素的界定。尽管第一代的基质共培养系统能够长期持续生产干细胞,但这些干细胞目前难以用于的治疗目的。首先,该系统中的细胞微环境非常复杂,难以进行大幅改善。二,该系统中需要建立的基质往往需要几个星期,阻碍了大规模治疗的应用。最后,该系统生产的干细胞数量很少,不能满足治疗的需要。

[0007] 为了克服第一代基质共培养系统的复杂性, Schwartz, Roller 和 Koller 等人设计了灌注生物反应器系统, 该系统可以保证干细胞和前体细胞生长在一个可以控制的微环境中。然而, 这些灌注生物反应器系统只是对液体培养体系做了简单的修正, 还是无法大规模扩增干细胞和前体细胞。这也限制了干细胞和前体细胞在骨髓移植和基因治疗中的应用。因此, 有必要发明一个体外培养系统满足临床对造血干细胞和前体细胞的需求。

### 发明内容

[0008] 本发明提供一个体外培养和扩增造血干细胞和前体细胞的方法, 为治疗疾病提供了足够数量的造血干细胞和前体细胞。这种独特的培养系统使得本行业内具有基本技能的人士能够在模拟体内的环境中培养和扩增造血干细胞和前体细胞。本发明提供的在体外环境中培养和扩增造血干细胞和前体细胞的技术, 可以用来迅速生产造血干细胞和前体细胞满足骨髓移植及基因疗的临床应用中使用。此外, 在用细胞因子共同培养的培养条件下, 可以分化造血干细胞和前体细胞为特定的血液细胞。本发明具有的对造血干细胞和前体细胞的分化能力为干细胞的移植和在基因治疗方面的使用提供了强有力的物质基础。本发明的干细胞用于治疗的疾病包括但不限于阿尔茨海默氏症, 帕金森氏症, 老年痴呆症, 多发性硬化症, 与年龄有关的中枢神经系统 (CNS), 包括时间, 日期, 位置或身份混乱, 和 / 或最近的记忆丧失, 获得性免疫缺陷综合症 (艾滋病) 的相关性痴呆, 脑损伤, 囊肿, 自体免疫疾病, 细菌感染, 脓肿, 病毒感染, 脑肿瘤, 癫痫, 神经创伤, 手术切口, 糖尿病溃疡, 血友病溃疡, 静脉曲张溃疡, 固体血管源性肿瘤, 白血病, 血管瘤, 听神经瘤, 神经纤维瘤, 沙眼, 化脓性肉芽肿, 类风湿性关节炎, 牛皮癣, 糖尿病性视网膜病变, 早产儿视网膜黄斑变性, 角膜移植排斥反应, 新生血管性青光眼, 晶状体后纤维组织增生, 虹彩, 毛细血管, 韦伯综合症, 心肌血管盲目性新生, 新生血管和毛细血管扩张, 血友病, 血管纤维瘤, 肉芽, 上皮细胞新生, 克罗恩病, 化学, 热, 感染或自身免疫引起的肠道损伤, 化学品, 热, 感染或自身免疫引起的皮肤损伤, 系统性红斑狼疮, 艾滋病, 关节炎, 胰岛素依赖型糖尿病, 器官特异性自身免疫性疾病, 风湿性关节炎, 肠炎病, 桥本甲状腺炎, 甲亢病, 接触性皮炎, 牛皮癣, 排斥反应, 移植抗宿主疾病, 结节病, 胃肠道过敏, 嗜酸细胞增多, 结膜炎, 肾小球肾炎, 驱虫感染, 瘤型麻风病, 糖尿病, 高雪氏病, 尼曼匹克症, 寄生感染, 癌症的免疫系统紊乱, 化工 (包括毒品和酒精), 物理, 感染, 或自身免疫引起的肝, 肝癌, 肝损害, 癌症。本发明的干细胞, 干细胞前体细胞, 干细胞分化的功能细胞联合使用, 可用于治疗上述疾病或改善与上述疾病有关的症状。

[0009] 本发明提供了一个细胞培养系统, 该系统可以筛选出最佳培养条件, 生长因子的组合, 细胞滋养程序以用来最大限度的实现造血干细胞和前体细胞的增殖并形成细胞克隆。本发明提供了一个细胞培养系统, 该系统可以有选择的扩增造血干细胞和前体细胞。通过采用放射疗法和 / 或化学疗法对骨髓中造血干细胞抑制的实验动物模型来发展出利用各种干细胞和前体细胞扩增产生的细胞实现造血重建的技术。举例来说, 通过检测外周血干细胞的活性, 可以测试出骨髓干细胞再生的能力。此外, 在体内检测造血干细胞和前体细胞在严重联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠中的扩增来确定这些细胞的活性。

[0010] 本发明提供了一个细胞培养系统, 该系统可以有选择的扩增白血病患者放疗 / 化疗前造血干细胞和前体细胞用于治疗后自体骨髓移植。该系统扩增的细胞转导或转染后还可以用于基因疗法。

[0011] 本发明提供了一个细胞培养系统,该系统可以有选择的扩增干细胞和前体细胞用于骨髓移植。这种大规模的扩增干细胞的技术不仅可以减少发病率,死亡率,住院和门诊费用,而且还可以发展出更积极的治疗方案和压缩治疗日程,增加癌症患者的存活率。

[0012] 本发明提供了一个细胞培养系统,该系统可以用来寻找到干细胞和前体细胞扩增的分子机制和细胞交互作用。该系统还可以用来优化扩增干细胞的基质细胞和/或细胞因子。该系统还可以用来分析影响干细胞扩增和分化有关的基因和/或其他影响因子。

[0013] 为了达成上述目标,在本发明的描述中包含有扩增造血干细胞和前体细胞的方法。该方法包括从人骨髓细胞,外周血中分离出造血干细胞,将分离出干细胞与血管内皮细胞在多个细胞因子的存在的情况下扩增干细胞和前体细胞。

[0014] 本发明包含有移植扩增后干细胞和前体细胞给病人的方法。该方法包括从人骨髓细胞,外周血中分离出干细胞,将分离出干细胞与血管内皮细胞在多个细胞因子存在的情况下扩增干细胞。扩增后的干细胞回输给病人。

[0015] 本发明涉及到在体外培养扩增来源于骨髓和血液的造血干细胞。本发明使用不同的细胞因子处理内皮细胞用于骨髓和血液的干细胞和前体细胞的扩增。

[0016] 全能干细胞可以通过其功能和表现型得以识别。从功能上看,这些干细胞具有自我更新和分化成所有的淋巴造血细胞系的能力。因此,将全能造血干细胞放在适当的微环境中后,可以完全和持久地制造血液和淋巴细胞。干细胞和前体细胞也可以通过细胞表面抗原来识别。干细胞的特点是为 CD34 阳性,CD38 阴性,HLA-DR 阴性,CD15 阴性,Lin 阴性,c-kit 阳性。人干细胞优选 CD34 阳性,CD38 阴性的细胞。

[0017] 本发明采用的干细胞可以从骨髓,外周血中分离,也可以来自于单核细胞转化的全能细胞。分离的方法为本行业内具备普通技能的人士所熟悉的方法。干细胞也可以来自于不同物种,例如,人类,非人类灵长类动物或小白鼠。干细胞和前体细胞应当相当的纯度,至少 85%,优选 95%,最好 99%。

[0018] 在本发明的培养体系中,纯化的干细胞和前体细胞与内皮细胞直接接触培养。内皮细胞优选人内皮细胞。包括但不限于其他物种的内皮细胞。CD34 阳性干细胞和前体细胞与内皮细胞接触培养可以最大限度的扩增干细胞。CD34 阳性干细胞和前体细胞可以接种到一个长满 70-100%内皮细胞的培养皿中。共同培养 7 天后,CD34 阳性干细胞和前体细胞数量显著增加。而单独培养的 CD34 阳性干细胞和前体细胞数量则没有变化。

[0019] 采用内皮细胞作为滋养细胞有许多优势。内皮细胞是单纯一种细胞,而骨髓基质细胞层含有内皮细胞,成纤维细胞,脂肪细胞,巨噬细胞和破骨细胞。这些不同类型的细胞共同存在于骨髓基质层中用作滋养细胞。分析内皮细胞滋养层比分析基质层要容易很多。内皮细胞成长迅速,48 小时扩增一倍,可传 54 代,可以很容易的在低血清培养条件培养。而基质层细胞传代能力则十分有限。此外,放射性照射和福尔马林固定的内皮细胞层也可以用来滋养 CD34 阳性干细胞和前体细胞扩增。

[0020] 与基质细胞共培养系统相比,内皮细胞培养系统能够显著的扩增/CD34 阳性干细胞和前体细胞扩展。例如,培养 7 天,CD34 阳性干细胞和前体细胞扩增了大约 10 倍,培养 14 天,CD34 阳性干细胞和前体细胞扩增了大约 95 倍。相比之下,基质细胞共培养系统培养 7 天通常只能扩增 1 到 3 倍,14 天后 CD34 阳性干细胞和前体细胞的比例迅速减少。

[0021] 本发明的 CD34 阳性干细胞和前体细胞加入细胞因子与内皮细胞共同培养。为了

促进扩增的最大化,加入的细胞因子应该与 CD34 阳性干细胞和前体细胞的物种相匹配。本发明采用单个合适的细胞因子,但不仅仅限于单个合适的细胞因子。

[0022] 本发明也采用下列合适的细胞因子组合:IL-1+IL-3+SCF, IL-1+IL-3+SCF+EPO, IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6 或 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R。优选 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R ;GM-CSF ;GM-CSF+SCF ; 和 GM-CSF+IL-3+SCF ; GM-CSF+IL-3+SCF+IL-6 ;GM-CSF+IL-3+SCF+IL-6+sIL6R ;GM-CSF+IL-3+SCF+IL-6+sIL6R。确定细胞因子的用量是本行业内具有基本技能的人士所熟知的常规方法。IL-1, 0.1-20.0ng/ml ; , IL-3, 1.0-200.0ng/ml ;SCF, 5.0-500.0ng/ml ;IL-6, 1.0-100.0ng/ml ; sIL-6R, 2.5-250ng/ml。

[0023] 纯化的 CD34 阳性干细胞和前体细胞与 IL-1+IL-3+SCF, IL-1+IL-3+SCF+EPO, IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6 或 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R 共同培养 7 天,虽然非贴壁细胞和 CFC 分别增加了 10.2 和 2.9 倍,但是 CD34 阳性干细胞和前体细胞的数量没有增加。这些发现表明,细胞因子单独作用不能够扩增 CD34 阳性干细胞和前体细胞。细胞的扩增可能是 CD34 阳性干细胞和前体细胞与内皮细胞的相互作用,其他可溶性生长因子,膜结合生长因子,细胞粘附分子或细胞因子活化内皮细胞而产生的基质蛋白共同作用的结果。此外,内皮细胞衍生的细胞外基质结合这些生长因子也可以激活干细胞的扩增。

[0024] 本发明中 CD34 阳性干细胞和前体细胞扩增的机理并不清楚,正在研究之中。有可能是因为细胞因子激活的内皮细胞产生了一种新的造血生长因子(多个生长因子),用来支持 CD34 阳性干细胞和前体细胞的扩增。

[0025] 纯化的 CD34 阳性干细胞和前体细胞具备长期和多向造血重建能力。在进行骨髓移植时,CD34 阳性干细胞中的前体细胞是必须的,例如 CFU-GM 前体细胞。本发明提供了一个能够大规模扩增 CD34 阳性干细胞中的前体细胞的方法,利用该方法扩增的细胞中含有大量 CD34 阳性干细胞中的前体细胞,如 CFU-GM。具体来说,培养后 14 天后,2 百万个 CD34 阳性干细胞和前体细胞可以产生 1 千 5 百万个 CFU-GM。这可以满足自体骨髓移植的需要。15 毫升的骨髓和 150 毫升的外周血中可以得到所需要的 CD34 阳性干细胞和前体细胞。本发明显著减少骨髓和外周血抽取量,减少了全身麻醉的必要性,促进造血功能快速恢复,减少住院时间。

[0026] 本发明可以用于帮助病人短期内产生造血细胞。分离,扩增和分化 CD34 阳性细胞的方法如前文所述。将分化的细胞回输给病人前,不需要进一步纯化 CD34 阳性干细胞。将分化的细胞回输给病人的方法是本行业内具备普通技能的人士所熟知的方法。

[0027] 本发明中增殖的 CD34 阳性干细胞和前体细胞在回输给病人以前也可以通过基因插入的方法进行基因操作来达到基因治疗的目的。本发明的技术还可以与“净化骨髓”技术相结合,增殖的 CD34 阳性干细胞和前体细胞在回输给病人前删除掉病人不要的细胞。在合适的培养条件可以产生专门的血液的细胞类型回输给患者。自体输血可以广泛的用在癌症患者,或者传染病病原体污染的患者。

[0028] 本发明还提供了下面的范例用来描述 CD34 阳性干细胞和前体细胞目前已知最好的应用方式。但这些具体的例子不是为了限制本发明的应用范围。

[0029] 有益效果:细胞的扩增效果好,对患者显著减少骨髓和外周血抽取量,减少了全身麻醉的必要性,促进造血功能快速恢复,减少住院时间。

[0030] 说明书附图

[0031] 图 1 造血干细胞生长图 ;显示接触生长收获的干细胞比非接触培养和液体培养收获的干细胞显著增长 ;其中 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R 的细胞因子组合作用增长最有效 ;其次分别为 :IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6, IL-1+IL-3+SCF+EPO 和 IL-1+IL-3+SCF。

[0032] 图 2 造血干细胞生长图 ;显示不同细胞因子组合作用下接触生长收获的干细胞与生长时间的关系 ;细胞处理 25 天后增长达到峰值, IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R 的作用增长最有效, 其次分别为 :IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6, IL-1+IL-3+SCF+EPO 和 IL-1+IL-3+SCF。

[0033] 图 3 造血干细胞生长分化图 ;显示不同培养条件下造血干细胞分化为 CD38+ 细胞的程度不同。接触培养分化的程度最低, 液体培养分化为 CD38+ 细胞的程度最高。

[0034] 图 4CFC 形成图 ;显示接触生长培养的干细胞形成 CFC 数量比非接触培养和液体培养培养的干细胞显著增多。其中 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R 的细胞因子组合作用最有效 ;其次分别为 :IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6, IL-1+IL-3+SCF+EPO 和 IL-1+IL-3+SCF。

[0035] 图 5 干细胞移植后小鼠骨髓生成 CFU 数量变化图 ;显示移植了接触生长培养的干细胞后, 小鼠骨髓生成 CFU 的数量在 21 天时达到峰值, 随后保持稳定 ;对照组中的 CFU 的数量在第 5 天达到最低后, 不再变化。

[0036] 图 6 干细胞移植后小鼠外周血液中淋巴细胞数量变化图 ;显示移植了接触生长培养的干细胞后, 小鼠外周血液中淋巴细胞的数量在 20 天时达到峰值, 随后下降并保持稳定 ;对照组小鼠淋巴细胞的数量在第 5 天达到最低后, 不再变化。

## 具体实施方式

[0037] 下面对本发明的实施作具体说明 :

[0038] 实施例 1 干细胞扩增

[0039] 人骨髓细胞和人外周血细胞来自健康的捐献者。提取 CD34 阳性干细胞和前体细胞的方法是行业内具有基本技能的人士所熟知的方法。首先采用密度梯度离心的方法分离人骨髓细胞和人外周血细胞中淋巴细胞。CD34 阳性骨髓干细胞和前体细胞使用抗体磁珠法进一步纯化。

[0040] 干细胞通过此过程纯化后, 流式细胞仪的监测表明其纯度超过 99%。分离纯化后的 CD34 阳性干细胞和前体细胞可以冷冻后在液氮中长期保存 (100 万 -500 万细胞 / 毫升)。冻存的细胞可以在 37℃ 水浴中迅速解冻, 用培养基冲洗两次, trypan blue 染色表明 99% 细胞依然存活。

[0041] 甲基纤维素克隆形成实验可以用来确定干细胞和前体细胞形成 CFC 的能力。纯化的干细胞和前体细胞加入 IMDM 后在培养皿中培养 14 天。IMDM 中加入 1% 甲基纤维素, 30% 灭活胎牛血清 (FBS), IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R。5% 的二氧化碳, 37℃ 培养。第 14 天, 表达血红蛋白的细胞为 BFU-E ;粒细胞和 / 或巨噬细胞和 / 或巨型真核细胞群落为 CFU-MIX ;只含粒细胞和巨噬细胞的群落为 CFU-GM。HUVEC 细胞加入 IMDM 后培养 7 天。IMDM 中加入 10% 灭活胎牛血清 (FBS), 1% 盘尼西林。

[0042] 本发明比较了接触生长与悬浮单独培养的扩增能力。干细胞分别与 HUVEC 细胞接触共同培养, 非接触共同培养, 和单独培养。培养液中加入 IL-1+IL-3+SCF,

IL-1+IL-3+SCF+EPO, IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6 或 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R. 37°C, 5%二氧化碳的培养箱中生长。

[0043] 7 天后,从内皮细胞单层中轻轻的移走非贴壁细胞,用手动血细胞计数器进行细胞计数。图 1 显示出接触生长所收获的非贴壁细胞比非接触生长所收获的非贴壁细胞显著增加,单独培养的干细胞增长最少。

[0044] 接触生长所收获的非贴壁细胞在 IL-1+IL-3+SCF, IL-1+IL-3+SCF+EPO, IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6 和 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R 的作用下分别增长了 10.9, 18.9 和 39.6 倍。最有效的细胞因子组合为 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R。任何细胞因子组合对内皮细胞的生长和组织形态没有任何影响。如图 2 显示了造血干细胞在不同细胞因子组合作用下,干细胞生长与时间的关系。

[0045] 本发明比较了在各种细胞因子组合和培养条件下扩增的干细胞中 CD34 和 CD38 的表达情况。图 3 显示培养了 7 天后的细胞。在 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R 的作用下,接触培养的 CD34 阳性细胞只有 7%为 CD38 阳性。非接触培养的 CD34 阳性细胞有 61%为 CD38 阳性,而单独培养的干细胞中有超过 82%为 CD38 阳性。

[0046] 本发明还比较了单独培养,非接触培养和接触培养 7 天后扩增的非贴壁细胞中的 CFC。单独培养时 IL-1+IL-3+SCF, IL-1+IL-3+SCF+EPO, IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6 和 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R 细胞因子组合分别激活干细胞 CFC 增长了 1.1, 1.5 和 3.2 倍。非接触培养时 IL-1+IL-3+SCF, IL-1+IL-3+SCF+EPO, IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6 和 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R 细胞因子组合分别激活干细胞 CFC 增长了 3.5, 4.5 和 8.2 倍。接触培养时 IL-1+IL-3+SCF, IL-1+IL-3+SCF+EPO, IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6 和 IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R 细胞因子组合分别激活干细胞 CFC 增长了 7.5, 15.5 和 23.2 倍。

[0047] 实施例 2 小鼠移植

[0048] 雌性小鼠 12-14 周龄 (C57BL/6) 购自美国杰克逊实验室。动物都维持在 12 小时光/暗周期。HUVEC 细胞加入 IMDM 后培养 7 天。IMDM 中加入 10%灭活胎牛血清 (FBS), 1%盘尼西林。

[0049] 骨髓细胞体外扩增

[0050] 小鼠干细胞从股骨骨髓细胞中分离。分离的干细胞接种到长满 HUVEC 的培养皿中。加入 GM-CSF (5ng/ml), IL-3 (5ng/ml) 37°C, 5%的二氧化碳培养 7 天后,从 HUVEC 层中轻轻的移走非贴壁细胞。用含有 1% FBS 和 1%盘尼西林的 PBS 清洗,浓缩。

[0051] 用颈椎脱位的方法处死小鼠,取出股骨和脾脏。股骨中的细胞用 5 毫升含 10%热灭活胎牛血清的 PBS 冲洗。用 25 号针头打散脾脏组织,直到细胞呈现单细胞状态。用手动血细胞计数器进行细胞计数。

[0052] 骨髓和脾脏细生成 CFU-GM 的实验采用前文描述的方法。每毫升 IMEM 培养基中含有 50 万-100 万细胞,培养基中加入 1% 甲基纤维素, 30% FBS, IL-1+IL-3+SCF+EPO+IL-6+sIL6R, 37°C, 5%的二氧化碳培养箱中培养 14 天后计算 CFU-GM 形成数量。

[0053] 用 1.0 照射剂量率/分钟  $\gamma$  射线照射小鼠双边。对照组第二天沿尾静脉注入生理盐水,治疗组第二天或者注入悬浮培养扩增的干细胞,或者注入 HUVEC 共同培养扩增的



干细胞。对照组和注入悬浮培养扩增的干细胞组的小鼠平均存活了 14+/-3 天。注入 HUVEC 共同培养扩增的干细胞的小鼠平均存活了 60+/-11 天。

[0054] 从小鼠眼底取小鼠外周血。白细胞,红细胞和血小板用贝克计数器快速计数。白血细胞 (WBC) 的数量和血小板达到了照射 4 天后到达低谷,在小鼠死亡之前没有恢复正常水平。注入 HUVEC 共同培养扩增的干细胞的小鼠平均存活了 60+/-11 天。

[0055] 骨髓和脾脏中造血细胞的恢复

[0056]  $\gamma$  射线照射小鼠双边后,0,4,8,12,15,19,24,28 和 60 天检测骨髓和脾脏中的 GM-CFC 干细胞。注入 HUVEC 共同培养扩增的干细胞的小鼠,骨髓干细胞质减少到正常骨髓细胞的 10%,照射 4 天后的前体细胞数目降到最低。12 天后逐渐增加。然而移植后 60 后也没有恢复到正常水平。脾脏中造血细胞照射 4 天后的血细胞数目降到最低,2 周后恢复到移植前正常水平。

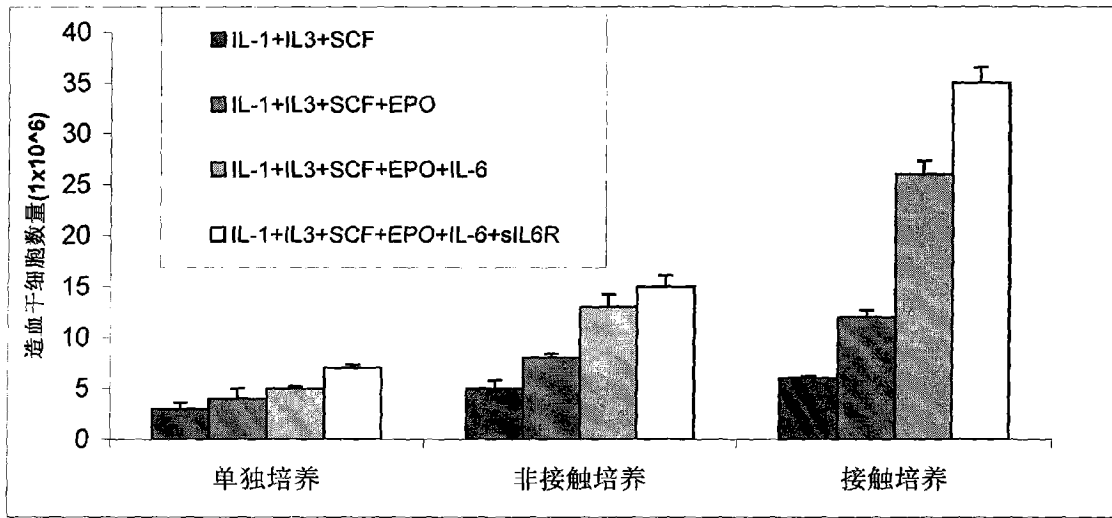


图 1

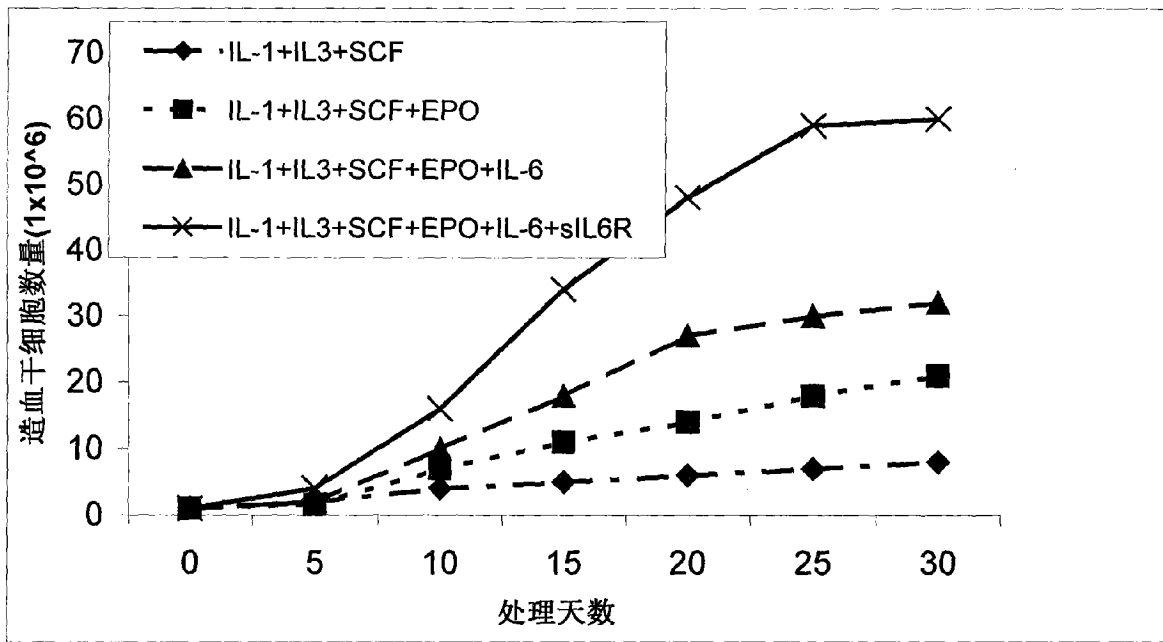


图 2

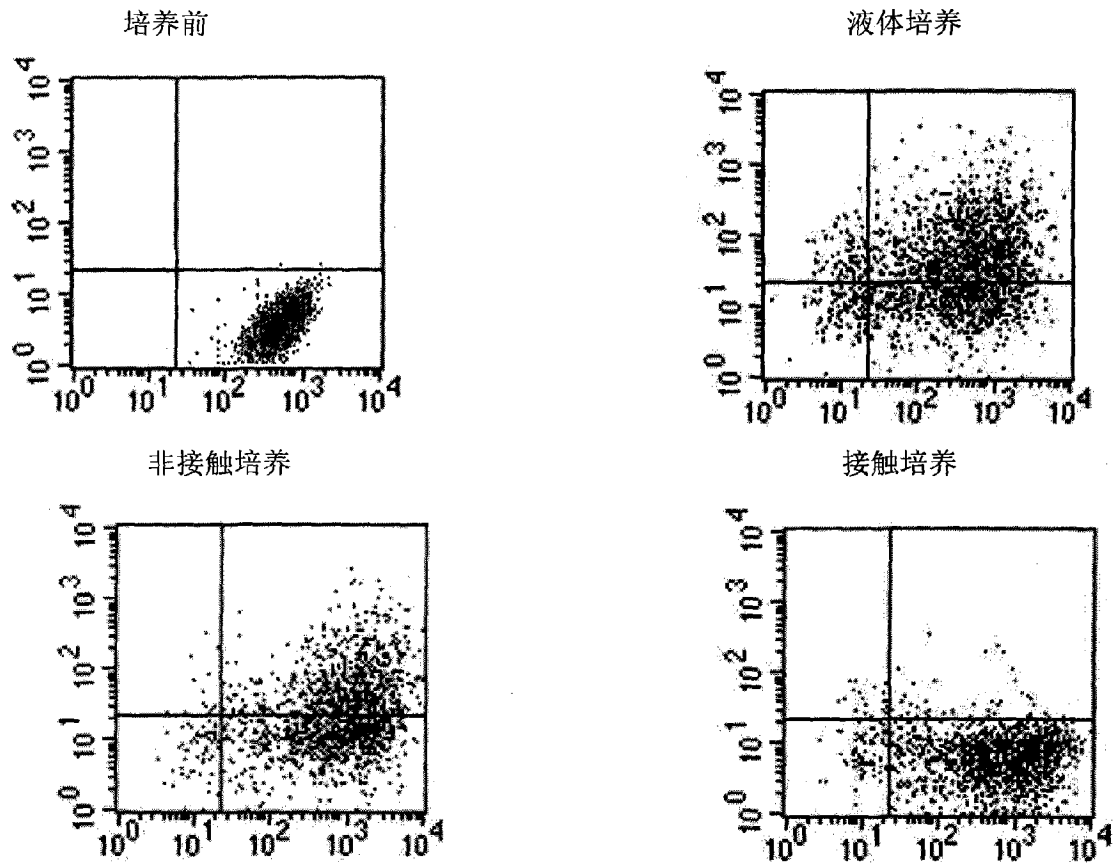


图 3

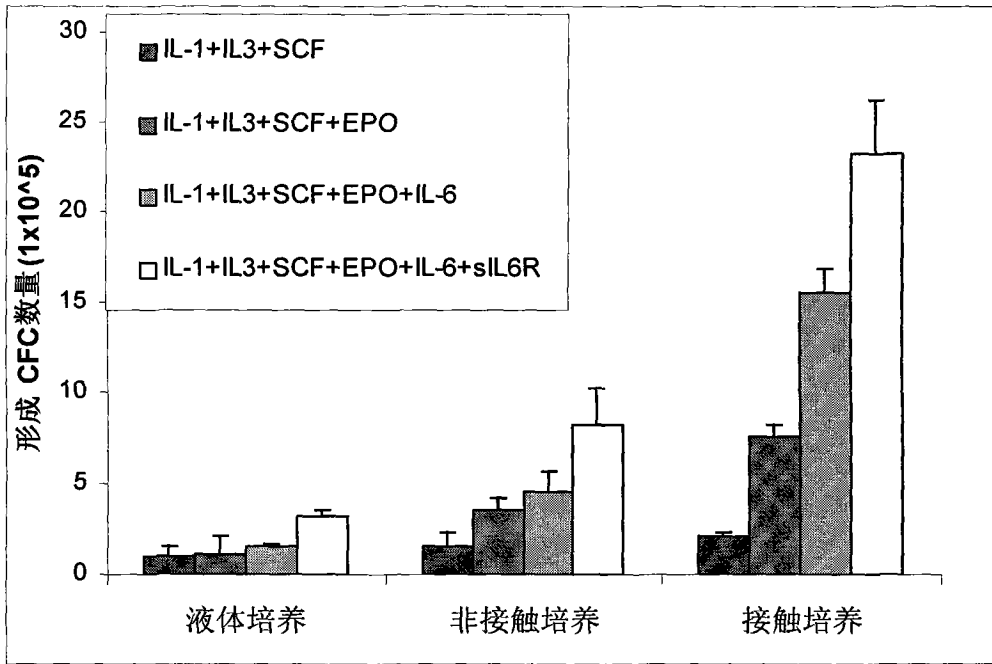


图 4

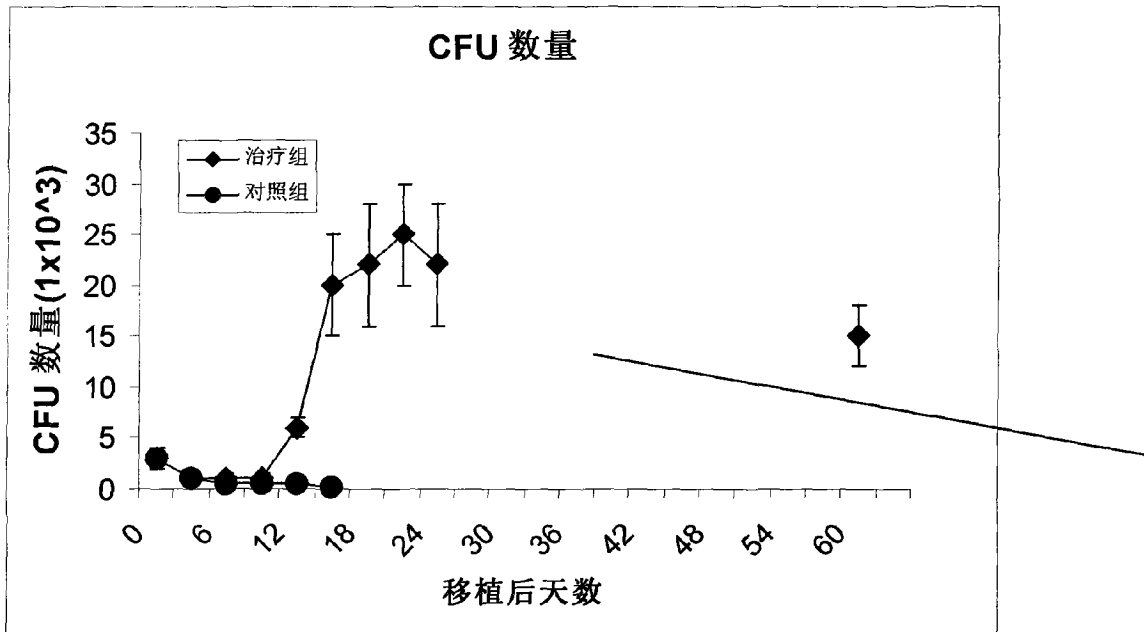


图 5

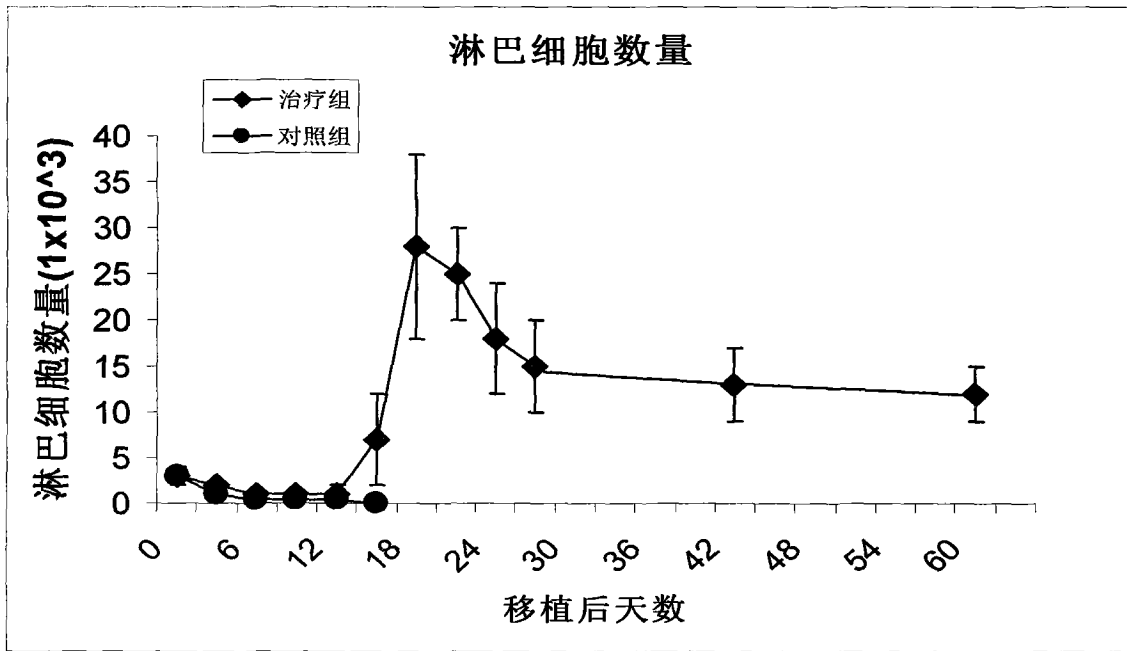


图 6