



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102686723 B

(45)授权公告日 2016.11.23

(21)申请号 201080055957.6

(22)申请日 2010.12.07

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102686723 A

(43)申请公布日 2012.09.19

(30)优先权数据
09425504.9 2009.12.09 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2012.06.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2010/069049 2010.12.07

(87)PCT国际申请的公布数据
W02011/070001 EN 2011.06.16

(73)专利权人 弗雷森纽斯医疗护理德国有限责
任公司
地址 德国贝德霍姆堡

(72)发明人 玛利亚·比阿特丽斯·赫雷拉 桑
切斯
瓦伦丁娜·丰萨托 奇罗·泰塔
乔瓦尼·卡穆西

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51)Int.Cl.

C12N 5/074(2006.01)

(56)对比文件

WO 2009105044 A1,2009.08.27,说明书第
13-14,45-46页.

WO 2008020815 A1,2008.02.21,说明书第
8-9,11,36,38-39页,实施例7,8,12.

WO 2008020815 A1,2008.02.21,说明书第
8-9,11,36,38-39页,实施例7,8,12.

CN 101228266 A,2008.07.23,说明书第6
页.

CN 102119031 A,2011.07.06,说明书第2-
3页,实施例1,4,5.

WO 2005068612 A2,2005.07.28,说明书第
6-9.

Katerina Pardali, Aristidis
Moustakas.Actions of TGF-β as tumor
suppressor and pro-metastatic factor in
human cancer.《Biochimica et Biophysica
Acta》.2006,第1775卷21-62.

审查员 毛颖

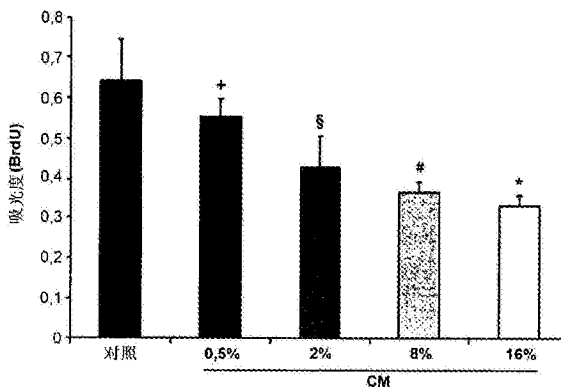
权利要求书1页 说明书23页 附图6页

(54)发明名称

用于治疗处理肿瘤疾病的成体干细胞衍生
的条件培养基和/或成体干细胞

(57)摘要

本发明是在肿瘤治疗处理领域内。已发现条
件培养基发挥显著的抗肿瘤作用,该条件培养基
通过在液体细胞培养基内培养能够分化成多种
分化细胞类型的成体干细胞和/或从中可获得该
条件培养基的成体干细胞而获得。在这种治疗应
用中优选的成体干细胞衍生的条件培养基为衍
生自人类肝脏干细胞(HLSC-CM)的无细胞条件培
养基。



1. 一种无细胞的条件培养基在制备用于通过诱导肿瘤细胞凋亡治疗处理肿瘤疾病的药物中的应用,所述条件培养基含有多种细胞分泌蛋白质并且其通过在液体细胞培养基中培养来源于成体肝脏组织的非卵圆人类肝脏多能祖细胞(HLSC)而获得,其中所述非卵圆人类肝脏多能祖细胞(HLSC)表达标记白蛋白和 α -胎蛋白,并且所述肿瘤疾病选自包括以下的组中:肝肿瘤、上皮性肿瘤、乳腺肿瘤,以及所述条件培养基是不含胎牛血清的条件培养基。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中所述条件培养基通过包括以下步骤的方法获得:

(i) 将能够分化成多种分化细胞类型的来源于成体肝脏组织的非卵圆人类肝脏多能祖细胞(HLSC)在液体细胞培养基中培养预定的时间段;和

(ii) 从所述液体细胞培养基中去除所述细胞组分,从而获得包含多种细胞分泌蛋白质的无细胞的条件培养基。

3. 根据权利要求2所述的应用,其中,通过离心或过滤将所述细胞组分从所述液体细胞培养基中去除。

4. 根据权利要求3所述的应用,其中,所述液体细胞培养基另外在20,000g到300,000g的离心力下经受超速离心。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的应用,其中,所述方法进一步包括以下步骤:

(iii) 从所述无细胞的条件培养基中去除标称分子量低于3kDa的物质组分。

6. 根据权利要求5所述的应用,其中,标称分子量低于3kDa的所述物质组分利用超滤从所述无细胞的条件培养基中去除。

7. 根据权利要求5所述的应用,其中,所述方法进一步包括用RNA酶处理步骤(ii)或步骤(iii)中获得的所述无细胞的条件培养基。

8. 根据权利要求3所述的应用,其中,所述液体细胞培养基另外在80,000g到200,000g的离心力下经受超速离心。

9. 根据权利要求1至4中任一项所述的应用,其中,所述药物用于局部或全身给予。

10. 根据权利要求9所述的应用,其中,所述药物用于通过注射给予。

用于治疗处理肿瘤疾病的成体干细胞衍生的条件培养基和/ 或成体干细胞

[0001] 本发明涉及肿瘤疾病的治疗处理领域。

[0002] 转移性癌症细胞与干细胞共有许多特征如它们自我更新和产生多种后代(progency)的能力。此外,干细胞和癌细胞的表型受微环境的影响很大。同时,胚胎微环境已显示了抑制多种癌细胞株(癌细胞系)的致肿瘤性。结果表明,在原肠胚形成之前,将转移性黑素瘤细胞暴露在胚胎斑马鱼的微环境中,导致它们重新编程趋向非致瘤表型(Cucina A,等人(2006).Zebrafish embryo proteins induce apoptosis in human colon cancer cells(斑马鱼胚胎蛋白质诱导人类结肠癌细胞凋亡)(Caco2)。Apoptosis11:1615-1628; Lee LM,等人(2005).The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos:Assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation(人类恶性黑素瘤细胞移植到斑马鱼胚胎中的命运:缺乏肿瘤形成的情况下迁移和细胞分裂的评估)。DevDyn 233:1560-1570)。此外,所述移植到发育中鸡胚的转移性黑素瘤细胞能跟踪神经嵴迁移路径,导致致肿瘤性的丧失和神经嵴样表型的获取。最近研究表明,人类胚胎干细胞(hESC)微环境,具体地将在转移性黑素瘤和乳腺癌细胞内胚胎形态Nodal的表达失效,使它们重新编程至低侵略性表型(Postovit LM等人(2008).Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells(人类胚胎干细胞微环境抑制所述侵略性癌细胞的致瘤表型)。PNAS105:4329-4334)。Postovit LM等人揭示了hESC-分泌型Lefty,一种Nodal信号的抑制剂,作为这些现象的重要媒介物(mediator)。这些研究表明胚胎干细胞的微环境提供了一种以前未开发的用于在侵略性肿瘤细胞中调节异常表达的胚胎因子的治疗物质(therapeutic entity)。

[0003] 在Giuffrida D等人,Human embryonic stem cells secrete soluble factors that inhibit cancer cell growth(人类胚胎干细胞分泌抑制癌细胞生长的可溶性因子)。Cell Prolif.2009年9月1日中,结果表明对人类上皮癌细胞株增殖的抑制通过hESC产生的可溶因子进行介导。作者发现,在G(1)阶段癌细胞的比例通过hESC CM处理增加,伴随在S和G(2)/M阶段细胞的减少,表明这些因子通过细胞周期抑制使癌细胞的进程减慢。

[0004] 然而,通过胚胎干细胞已达到了这样的结果,这些胚胎干细胞很难获得并且引起伦理和方法学问题,原因是需要破坏胚胎以获得胚胎干细胞。此外,胚胎干细胞在体内移植时经受不受控制的增殖。

[0005] 本发明人在作为W0 2006/126219公布的国际专利申请中披露了人类成体非卵圆肝脏干/祖细胞(HLSC),其表达间充质和胚胎干细胞标记且具有多能分化能力和再生性能。

[0006] 虽然在W02006126219中HLSC被定义为“多能祖细胞”,但应理解是,“祖细胞”和“干细胞”的表达均是指能够自我更新并分化成专化(即分化)细胞类型的细胞。

[0007] 此外,在本发明背景中的术语“多能(multipotent)”和“多能性(pluripotent)”被认为可互换,因为它们都是指干/祖细胞分化成多种专化(分化)细胞类型的能力。在此背景下,术语“多种”是指至少两种,优选地至少三种,专化(specialized)(分化)细胞类型。

[0008] 在本发明背景下,表达“成体干细胞”意思是从成体组织中分离的干细胞,与从胚胎内部细胞群分离的“胚胎干细胞”相对。成体干细胞也被称为“体干细胞(somatic stem cells)”。

[0009] WO 2006/126236中披露的人类非卵圆肝脏多能祖/干细胞显示经历分化成多种组织细胞类型(即,成熟肝脏细胞、上皮细胞、产胰岛素细胞(胰岛素分泌细胞,insulin-producing cell)和骨原细胞)并发挥器官再生作用。这种细胞衍生于非卵圆人类肝脏多能祖细胞株,其表达肝细胞标记。这种细胞通过包括以下步骤的方法分离:

[0010] (i)在细胞培养基中培养成体肝脏衍生的人类成熟肝细胞直至成熟肝细胞死亡并选择具有上皮样形态的存活细胞群。

[0011] (ii)通过以下扩散(扩增,expand)具有上皮样形态的存活细胞群:在含血清、含葡萄糖的培养基中培养,补充有hEGF(人类上皮生长因子)和bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)且含哺乳动物细胞生长所必需的一般无机盐、氨基酸和维生素,

[0012] 且特别地其中所述成熟肝细胞在含血清培养基中在防冷冻剂存在下冷冻,然后根据步骤(i)在培育之前解冻(冻融)。

[0013] WO 2006/126236中披露的人类非卵圆肝脏干/祖细胞的特征及其制备方法全部引入本文以供参考。

[0014] 本领域也已知间充质干细胞(MSC)制剂在一些组织上发挥再生作用。例如,熟知骨髓衍生的MSC通过分泌大量营养分子,包括可溶细胞外基质糖蛋白,细胞因子和生长因子,自然地支持造血功能。

[0015] 然而,当被给予时,一些干细胞制剂具有引起免疫反应的主要缺点。一些干细胞制剂甚至可能导致癌症。

[0016] 本发明人已经发现条件培养基(conditioned medium,CM)出乎意料地显示一种有效的抗肿瘤活性,该条件培养基来源于在液体细胞培养基中培养未充分分化的能够产生多种分化的细胞类型的成体干细胞(adult stem cell),这正如说明书的以下实验部分中描述的体外和体内实验所证实的。

[0017] 本发明的用于抗肿瘤治疗应用的所述条件培养基(CM)包括多种分子和生物分子,尤其是蛋白质,更尤其是培养期间由所述干细胞分泌的细胞因子。

[0018] 因此,本发明的第一个方面是一种条件培养基,该条件培养基包括多种细胞分泌蛋白质(cell-secreted protein)并可通过在液体细胞培养基中培养能分化成多种分化细胞类型的成体干细胞来获得,其用于肿瘤疾病的治疗处理。

[0019] 在一个优选的实施方式中,所述条件培养基是无细胞的。在另一个实施方式中,所述条件培养基包含由成体干细胞(所述条件培养基从中获得)组成的细胞组分(细胞碎片,cell fraction)。可替换地,如上面限定的所述成体干细胞本身用于肿瘤疾病的治疗处理。

[0020] 本发明的另一个方面是所述条件培养基的应用,该条件培养基包括多种细胞分泌的蛋白质并可通过在液体细胞培养基中培养能分化成多种分化细胞类型的成体干细胞来获得,该应用是用于制备治疗处理肿瘤疾病的药物。所述无细胞的或含所述细胞组分的条件培养基适用于肿瘤疾病的治疗处理。然而,优选所述无细胞的条件培养基。

[0021] 根据本发明的优选实施方式,适用于治疗处理肿瘤疾病的所述无细胞的条件培养基,例如,可通过包括以下步骤的方法获得:

[0022] (i)将能够分化成多种分化细胞类型的成体干细胞在液体细胞培养基中培养预定的时间段,和;

[0023] (ii)从所述液体细胞培养基中去除细胞组分,从而获得包含多种细胞分泌的蛋白质的无细胞条件培养基。

[0024] 本专利说明书的实验部分披露了一种适于获得用于肿瘤疾病治疗的所述条件培养基的液体细胞培养基。

[0025] 但是,应当理解,根据本发明所述适于培养哺乳动物干细胞或祖细胞,优选人类干细胞或祖细胞的任何液体细胞培养基可用于获得所述细胞培养基。作为非限制性实例可提及下列可替换的培养基:Dulbecco改良的Eagle培养基;营养混合物F-12(DMEM/F-12),洛斯基维公园纪念研究所培养基(RPMI-1640),最低必需培养基(MEM) α 培养基(α -MEM),培养基199和Iscove改良的Dulbecco培养基(IMDM)。

[0026] 选择和使用合适的培养基,例如,可取决于用于生成所述培养基的干细胞的特定类型,这完全在本领域技术人员的能力和知识范围内。

[0027] 在一个优选的实施方式中,将所述细胞组分培养预定的时间段,然后通过离心或过滤将其从所述液体细胞培养基中去除。例如,合适的预定时间段包含6到48小时之间,优选地在12到24小时之间。任何适合成体动物或人类干/祖细胞培养的培养基,优选地哺乳动物细胞,在非分化条件下,适用于用作所述液体细胞培养基。

[0028] 去除所述细胞组分后,由此获得的所述无细胞条件培养基可选地经进一步纯化步骤,例如超速离心法。超速离心法可在约20,000到300,000g下方便地进行,优选地约80,000到200,000g,在温度低于室温,例如约4°C,下进行约1小时。

[0029] 进一步可选的纯化步骤是去除标称分子量(nominal molecular weight, NMW)低于约3KDa的物质组分,例如通过超滤来实现,和/或用RNA酶(核糖核酸酶, RNase)处理以降解除任何可能包含在所述条件培养基内的游离RNA。

[0030] 任何能够分化成多种分化细胞类型并能从成体组织中分离的干细胞/祖细胞,与胚胎干细胞相反,适用于生成对本发明治疗应用有用的所述条件培养基。在一个优选的实施方式中,所述成体干细胞选自由以下组成的组中:肝脏干细胞、肾脏干细胞、脂肪干细胞、间充质干细胞、血管周多能祖细胞(perivascular multipotent progenitor cell)、骨髓干细胞、上皮干细胞、造血干细胞、来自脱落乳牙的干细胞和脐带干细胞。所述成体干细胞可以是动物干细胞或人类干细胞。当对人类患者给予(实施)治疗处理时,优选人类干细胞。

[0031] 在一个优选的实施方式中,所述成体干细胞为非卵圆肝脏干细胞,优选WO 2006/126236中披露的所述非卵圆人类肝脏多能祖细胞(HLSC)。

[0032] 然而,对肿瘤疾病的治疗处理有效的条件培养基,也可从其它干细胞中获得,例如前面段落提及的那些。

[0033] 本专利说明书实验部分提供的“比较例”表明HSLC-CM和MSC-CM都可有效地增加HepG2细胞的凋亡,尽管HSLC-CM比MSC-CM更有效。所述比较例也说明两个条件培养基(HSLC-CM和MSC-CM)比只使用TGF- β 更有效。

[0034] 在下文中,衍生于非卵圆肝脏干细胞(non-oval liver stem cell)的所述条件培养基,优选WO2006/126236中披露的所述非卵圆人类肝脏多能祖细胞(non-oval human liver pluripotent progenitor cell),被称为“HLSC-CM”。HLSC-CM优选无细胞的。

[0035] 在一个优选的实施方式中,HLSC具有W02006/126236第7页,表1中总结的特性,(其中所述细胞被命名为“HuHEP”),其例示了通过FACS和免疫荧光分析对它们的表征。本文下面报道了这些分析的结果。

	标记	FACS 分析 (阳性细胞%: 平均值 \pm SD)
	CD34	-
	CD45	-
[0036]	CD14	-
	CD73	+
	CD29	+
	CD44	+
	CD117 (c-Kit)	-
	CD90 (Thy-1)	+
	CD146	-
	CD133	-
	CD105 (内皮因子 (endoglin))	+
	标记	免疫荧光分析 (阳性细胞%: 平均值 \pm SD)
[0037]	α -胎蛋白 (AFP)	+
	CK18	+
	CK19	-
	白蛋白(ALB)	+
	HLA-A,B,C	+

[0038] 从W02006/126236中公开的所述非卵圆人类肝脏多能祖细胞中获得的HLSC-CM的组成已被表征并在国际专利申请PCT/EP2009/057232中公开。引入这些特征以供参考。

[0039] 通过举例的方式,通过培养W0 2006/126236中公开的所述HLSC,要么在技术人员熟知的GMP条件下,要么在技术人员熟知的BAL(生物人工肝脏(BioArtificial Liver))系统内获得所述无细胞的HLSC-CM。

[0040] 用于生长肝脏多能祖/干细胞并收集其无细胞的条件培养基(CM)的GMP条件的实例如下。

[0041] 肝脏多能祖细胞/干细胞利用W02006/126236中公开的方法分离,其中的扩散步骤通过培养所述祖干细胞而进行,其中存在下列物质:胎牛血清(FCS)优选地浓度约10%,hEGF(人类上皮生长因子)和bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)。FCS,bFGF和hEGF优选地为GMP级,例如由Invitrogen生产的那些。

[0042] 对于在GMP条件下收集所述条件培养基,从培养(物)中去除FCS,因为这是一种异

质蛋白,不适用于注入人体内。为此,清洗细胞并在收集的培养基中培养24小时,该培养基由例如补充有GMP级人白蛋白的 α -MEM组成。白蛋白优选浓度约0.05%。可替换地,只用 α -MEM或用补充有2%FCS的 α -MEM。然后通过离心或过滤收集所述无细胞的条件培养基。

[0043] 根据本发明的一个实施方式,所述肿瘤疾病是一种实体肿瘤(实体瘤)。优选地,所述肿瘤疾病选自包括以下的组:肝肿瘤、上皮性肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤、前列腺肿瘤、胃肿瘤和结肠肿瘤。更优选地,所述肿瘤疾病为肝癌(肝细胞瘤,hepatoma)、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)或乳腺癌。

[0044] 所述无细胞的条件培养基要么原样(as such)使用要么以浓缩的形式使用。例如,浓缩形式是至少浓缩约5倍,优选至少约10倍,更优选至少约20倍,甚至更优选约25倍。所述无细胞条件培养基局部地或全身地给予。既适合局部又适合全身给予的药物剂型是注射剂型。通过举例的方式,当所述肿瘤为实体肿瘤时,无细胞CM可通过局部肿瘤内(i.t.)注射给予,或在转移情况下通过静脉注射给予。

[0045] 从下面仅以例示方式给出的实验部分,本发明的其他对象和优势将显得更清楚。在所述实验部分中,参考以下附图:

[0046] 图1为体外增殖分析结果图,通过用不同剂量的25 \times 浓缩HLSC-CM孵育HepG2细胞48小时进行。利用BrdU掺入法(BrdU incorporation assay),在孵育48小时后评估HepG2增殖。在只有DMEM中或在补充有0.5;2;8或16%的25 \times 浓缩CM的DMEM中培养HepG2。48小时后,利用BrdU掺入法量化HepG2细胞的增殖。一式四份地进行实验。所示数据为八次实验的平均值 \pm 标准偏差。 $P < 0.05$ 。

[0047] 图2为体外增殖分析结果图,通过用不同剂量的25 \times 浓缩HLSC-CM孵育HepG2细胞4天进行。利用BrdU掺入法,在孵育4天后评估HepG2增殖。在只有DMEM中或在补充有1;8或16%的25 \times 浓缩HLSC-CM的DMEM中培养HepG2 4天。一式四份地进行实验。所示数据为八次实验的平均值 \pm 标准偏差。 $P < 0.05$ 。

[0048] 图3为体外增殖分析结果图,通过用25 \times 浓缩HLSC-CM的两种不同制剂孵育HepG2, MCF-7和卡波西细胞(KS)进行。用衍生于HLSC6b和HLSC2的16%的25 \times 浓缩CM孵育48小时后,利用BrdU掺入法评估HepG2, MCF-7和卡波西细胞(KS)增殖。一式四份地进行实验。所示数据为四次实验的平均值 \pm 标准偏差。 $P < 0.05$ 。

[0049] 图4为体外细胞凋亡分析结果图,通过用25 \times 浓缩的HLSC-CM孵育HepG2细胞进行。用不同剂量的CM(0.5;1;2;6;和16%的25 \times 浓缩CM)孵育24小时后,利用TUNEL法评估HepG2的凋亡,其以凋亡细胞的百分比计。长春新碱和多柔比星用作细胞凋亡诱导的阳性对照;在阴性对照中只用载体处理HepG2。结果表示为3次不同实验的平均值 \pm SD。

[0050] 图5为体外细胞凋亡分析结果图,通过用25 \times 浓缩HLSC-CM孵育HepG2, MCF-7和KS细胞进行。用衍生于两种不同细胞制剂(HLSC-6B和HLSC-2)的16%的25 \times 浓缩CM孵育72小时后,通过TUNEL法评估HepG2, MCF-7和KS的凋亡,其以凋亡细胞的百分比计。长春新碱用作细胞凋亡诱导的阳性对照;在阴性对照中,只用载体处理所述细胞。结果表示为3次不同实验的平均值 \pm SD。 $P < 0.05$ 。

[0051] 图6为HLSC-CM的抗肿瘤活性曲线图,将其i.t.给予至HepG2移植的SCID小鼠内。每周用测径器测量移植物的两个垂直直径来确定肿瘤体积。

[0052] 图7为在小鼠处死时CM-HLSC(n=6)或载体(n=6)i.t.处理之后,通过测量回收的

(recovered)HepG2肿瘤的肿瘤体积获得的数据图。每周用测径器测量移植物的两个垂直直径来确定肿瘤体积。

[0053] 图8为在小鼠处死时CM-HLSC(n=6)或载体(n=6)i.t.处理之后,通过测量回收的HepG2肿瘤的肿瘤重量获得的数据图。

[0054] 图9为通过HLSC-CM处理体内抑制肿瘤生长和诱导肿瘤内细胞凋亡的显微照片(A)。来自CM处理和未处理的小鼠,4周后回收的HepG2肿瘤的代表性显微照片。(B)CM处理或未处理的HepG2肿瘤的苏木精&曙红和PCNA染色(C)。(D)只用载体处理的回收的HepG2肿瘤或用衍生于HLSC的CM处理的HepG2肿瘤的细胞凋亡代表性显微照片。

[0055] 实验部分

[0056] 材料和方法

[0057] 细胞培养

[0058] 人类肝癌细胞株,HepG2,培养在补充有10%胎牛血清,100 μ g/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的DMEM中,并保持在37 $^{\circ}$ C、具有5%CO₂的加湿气氛的孵育器(培养箱,incubator)内。

[0059] 人类肝脏干细胞(HLSC)培养在 α -MEM/EBM(3:1)中,补充有10%胎牛血清,100 μ g/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素。用hEGF(人类上皮生长因子),氢化可的松,GA(庆大霉素),BBE(牛脑提取物)重构(复溶,reconstitute)EBM。

[0060] MCF-7乳腺癌细胞株从美国典型培养物保藏中心(马纳萨斯,维吉尼亚州)获得并且培养在补充有10%FCS,100 μ g/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的DMEM中,保持在37 $^{\circ}$ C具有5%CO₂加湿气氛的孵育器内。

[0061] 卡波西肉瘤细胞(KS细胞)的原代培养物(primary culture)获自在免疫抑制治疗下承受肾脏同种异体移植的患者的皮肤损伤(cutaneous lesion)并且培养在补充有10%FCS,100 μ g/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的RPMI 1640培养基内。

[0062] 来自HLSC细胞的条件培养基(CM)的纯化

[0063] 来自HLSC的无细胞的条件培养基(CM)通过培养24小时后离心收集所述细胞培养基制得。所述实验用2 \times 10⁶个细胞的细胞团(cell mass)进行。超速离心并浓缩所述培养基约25倍,在2700g离心75分钟,利用具有3kDa分子量截留的超滤单元(Amicon Ultra-PL 3)。获得总体积为250 μ l的浓缩条件培养基。用于体外实验的浓缩CM蛋白质浓度为CM=4.8mg/ml。在选择性的实验中,在37 $^{\circ}$ C用1U/ml RNA酶处理所述无细胞的CM1小时。通过加入10U/ml RNA酶抑制剂中止反应。

[0064] 利用基于Raybio生物素标记的抗体阵列的CM组成分析

[0065] 衍生于HLSC-CM的507人目标蛋白质的表达水平被同时检测。在补充有0.2%FCS的 α MEM存在下,如蛋白质阵列协议所述(protein array protocol),培养1 \times 10⁶个细胞48小时后收集CM。分子板(panel of molecules)包括细胞因子,趋化因子,脂肪因子(adipokine),生长因子,血管生成因子,蛋白酶,可溶性受体,可溶性粘附分子,和在细胞培养上清中的其它蛋白质。

[0066] 为制备HLSC-CM,以每皿1 \times 10⁶细胞的密度,将细胞置于(plate)100mm的组织培养皿中。然后用完全培养基培养细胞24-48小时。在此之后,用更低血清(0.2%FCS)替换培养基,然后再次培养细胞48小时。收集CM,并在1000g离心。在生物素标记步骤之前透析(dialyze)所述CM。经一个简单的过程,样品中蛋白质的伯胺(primary amine)被生物素化,

随后透析去除游离生物素。从此,将新的生物素化样品添加到阵列膜上并在室温下孵育。用HRP-抗生蛋白链菌素孵育后,利用化学发光使信号可视化。在这个阵列中,用内部对照以监测包括生物素标记和抗体阵列的全部过程。利用RayBio分析工具分析结果, RayBio分析工具是用于分析基于RayBio生物素标记的抗体阵列而专门设计的程序。关于这种分析的进一步细节可在基于RayBio®生物素标记的人类抗体阵列I用户手册中找到。

[0067] 基于BayBio生物素标记的抗体阵列的全部结果总结在本文下表中。

[0068]

蛋白质	HLSC (光密度分析)	HLSC/MSR 比率
6Ckine	6.11	2.06
活化素 A	6.54	2.16
活化素 B	5.42	2.18
活化素 C	7.27	2.56
活化素 RIA /ALK-2	5.63	2.18
活化素 RIB /ALK-4	5.27	1.95
活化素 RII A/B	5.18	1.76
活化素 RIIA	5.28	1.71
脂联素 / Acrp30	5.57	1.48
AgRP	5.67	1.59
ALCAM	10.30	2.62
血管生成素 (angiogenin)	9.40	2.38
血管生成素 (angiopoietin) -1	6.45	1.45
血管生成素-2	5.92	1.48
血管生成素-4	5.62	1.40
血管生成素样 1	5.76	1.36
血管生成素样 2	6.51	1.51
血管生成素样因子	6.26	1.53
血管生成抑制因子	6.90	1.66
APJ	6.00	1.40
AR (双调蛋白 (amphiregulin))	6.34	1.47
APRIL	7.03	1.47
青蒿素(artemin)	7.30	1.52
Axl	8.83	1.70
B7-1 /CD80	9.33	1.66
BAFF R/TNFRSF 13C	9.12	1.48

[0069]

BCMA/TNFRSF 17	4.68	1.79
BD-1	4.64	1.77
BDNF	4.71	1.68
β -连环蛋白	4.23	1.61
β -抵御素 2	4.31	1.63
β -NGF	4.38	1.66
BIK	4.56	1.73
BLC / BCA-1 /CXCL13	4.36	1.56
BMP-2	4.25	1.50
BMP-3	4.43	1.43
BMP-3b / GDF-10	4.34	1.43
BMP-4	4.60	1.41
BMP-5	4.46	1.40
BMP-6	4.47	1.34
BMP-7	4.44	1.31
BMP-8	4.87	1.31
BMP-15	4.74	1.33
BMPR-IA /ALK-3	5.30	1.49
BMPR-IB /ALK-6	6.35	1.69
BMPR-II	5.76	1.59
BTC	5.71	1.61
心肌营养素-1 /CT-1	5.89	1.61
CCL14 /HCC-1 /HCC-3	5.92	1.50
CCL28 / VIC	6.67	1.57
CCR1	7.76	1.42
CCR2	9.00	1.63
CCR3	8.21	1.49
CCR4	8.04	3.02
CCR5	5.02	1.97
CCR6	5.59	2.08
CCR7	5.52	1.89
CCR8	4.43	1.51
CCR9	4.10	1.48
CD14	4.21	1.55
CD27 / TNFRSF7	3.94	1.50
CD30 / TNFRSF8	3.70	1.38
CD30 配体 / TNFRSF8	4.28	1.40
CD40 / TNFRSF5	4.40	1.56
CD40 配体 / TNFRSF5 /CD154	4.14	1.38
CD 163	3.69	1.33
Cerberus 1	3.86	1.29

[0070]

Chem R23	3.59	1.22
腱蛋白 (chordin) 样 1	3.62	1.14
腱蛋白样 2	3.74	1.16
Csk	5.97	1.51
CLC	4.23	1.20
CNTF	4.73	1.35
CNTF R α	4.51	1.29
凝血因子 III /组织因子	4.70	1.38
CRIM 1	8.98	2.55
Cripto-1	5.26	1.50
CRTH-2	5.11	1.44
Cryptic	5.65	1.59
CTACK/CCL27	6.33	1.66
CTGF/CCN2	6.97	1.77
CTLA-4 /CD152	10.38	2.31
CV-2 / Crossveinless-2	7.80	1.61
CXCL14 /BRAK	6.49	2.03
CXCL16	4.64	1.67
CXCR1 / IL-8 RA	4.56	1.61
CXCR2 /IL-8 RB	4.41	1.55
CXCR3	4.01	1.56
CXCR4 (fusin)	3.85	1.44
CXCR5 /BLR-1	3.84	1.41
CXCR6	3.92	1.40
D6	3.77	1.38
DAN	4.02	1.36
DANCE	3.78	1.38
DcR3 /TNFRSF6B	3.62	1.28
核心蛋白多糖	9.12	2.86
Dkk-1	4.35	1.36
Dkk-3	3.41	1.12
Dkk-4	3.50	1.09
DR3 /TNFRSF25	3.53	1.11
DR6 /TNFRSF21	4.20	1.25
Dtk	9.06	2.17
EDA-A2	237.46	2.94
EDAR	6.79	1.88
EDG-1	4.43	1.25
EGF	4.63	1.30
EGF R/ ErbB1	4.69	1.31
EG-VEGF / PK1	5.03	1.34

[0071]

EMAP-II	6.15	1.75
ENA-78	6.28	1.74
Endocan	8.34	2.14
内皮因子/ CD105	8.97	2.02
内皮他丁 (endostatin)	8.59	1.53
EN-RAGE	5.09	2.04
嗜酸性粒细胞活化趋化因子 (eotaxin) /CCL11	4.52	1.77
嗜酸性粒细胞活化趋化因子-2 / MPIF-2	4.27	1.47
嗜酸性粒细胞活化趋化因子-3 /CCL26	4.24	1.52
外调蛋白 (epiregulin)	3.87	1.43
ErbB2	3.90	1.43
ErbB3	4.17	1.56
ErbB 子 4	3.82	1.34
红细胞生成素	4.16	1.26
E-选择素	3.79	1.33
内皮缩血管肽	14.95	3.86
FADD	3.77	1.29
FAM3B	6.05	1.76
Fas /TNFRSF6	3.73	1.21
Fas 配体	3.61	1.11
碱性成纤维细胞因子	3.67	1.08
FGF-BP	3.78	1.16
FGF R3	4.05	1.19
FGF R4	4.72	1.29
FGF R5	17.21	2.92
FGF-4	4.68	1.30
FGF-5	4.05	1.13
FGF-6	4.27	1.16
FGF-7 /KGF	4.93	1.22
FGF-8	4.89	1.37
FGF-9	5.40	1.49
FGF-10 /KGF-2	5.74	1.56
FGF-11	6.19	1.66
FGF-12	8.68	1.98
FGF-13 1B	7.74	1.60
FGFF-16	5.31	1.77
FGF-17	3.91	1.37
FGF-18	4.00	1.44
FGF-19	3.88	1.37

[0072]

FGF-20	3.67	1.33
FGF-21	3.88	1.42
FGF-23	3.90	1.22
卵泡相关基因 (FLRG)	3.84	1.34
Flt-3 配体	3.69	1.32
卵泡抑素 (follistatin)	5.33	1.58
卵泡抑素样 1	5.81	1.15
不规则趋化因子 (fractalkine)	3.94	1.28
卷曲蛋白 (Frizzled) -1	3.88	1.23
卷曲蛋白-3	3.80	1.18
卷曲蛋白-4	3.78	1.21
卷曲蛋白-5	4.52	1.36
卷曲蛋白-6	5.46	1.62
卷曲蛋白-7	4.17	1.23
半乳糖凝集素-3	5.86	1.56
GASP-1 / WFIKKNRP	5.03	1.44
GASP-2 / WFIKKN	4.39	1.20
GCP-2 / CXCL6	4.69	1.26
粒细胞集落刺激因子 (GCSF)	5.57	1.52
粒细胞集落刺激因子受体/ CD 114	4.68	1.26
GDF1	5.00	1.28
GDF3	6.38	1.77
GDF5	6.55	1.74
GDF8	6.08	1.58
GDF9	10.31	2.25
GDF11	8.84	1.70
GDF-15	4.64	1.34
GDNF	3.87	1.27
GFR α -1	3.67	1.25
GFR α -2	3.92	1.21
GFR α -3	4.09	1.39
GFR α -4	4.01	1.45
GITR / TNFRF18	3.80	1.33
GITR 配体 / TNFRSF18	4.04	1.44
胰增血糖素 (glucagon)	3.89	1.31
葡萄糖转运蛋白 (Glut) 1	3.61	1.23
葡萄糖转运蛋白 2	3.73	1.22
葡萄糖转运蛋白 3	3.87	1.25
葡萄糖转运蛋白 5	4.00	1.29

[0073]

磷脂酰肌醇蛋白聚糖 (Glypican) 3	34.34	2.73
磷脂酰肌醇蛋白聚糖 5	5.27	1.48
粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)	4.20	1.24
粒-巨噬细胞集落刺激因子受体 α	4.37	1.28
粒酶 A	4.92	1.41
GREMLIN	8.49	2.19
肿瘤生长相关因子 (GRO)	21.75	3.69
肿瘤生长相关因子-a	4.90	1.32
生长激素(GH)	5.17	1.34
生长激素受体 (GHR)	5.42	1.36
类肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)	5.37	1.46
肝癌(HCC)-4 /CCL16	4.91	1.33
HCR / CRAM-A/B	5.09	1.39
重组人生肝素(Hepassocin)	6.08	1.61
调节蛋白/NDF/GGF/神经调节蛋白	6.08	1.45
肝细胞生长因子(HGF)	15.29	3.38
肝细胞生长因子受体	6.53	1.31
调节蛋白- α	4.47	1.40
调节蛋白- β 1	4.09	1.25
疱疹病毒侵入介体(HVEM)/TNFRSF14	4.06	1.24
I-309	3.67	1.25
细胞间黏附分子(ICAM)-1	3.49	1.25
细胞间黏附分子-2	3.28	1.16
细胞间黏附分子-3 (CD50)	3.77	1.15
细胞间黏附分子-5	3.49	1.24
干扰素(IFN)- α / β 受体 1	3.50	1.19
干扰素- α / β 受体 2	3.52	1.18
干扰素- β	3.66	1.19
干扰素- γ	3.67	1.17
干扰素- γ 受体 1	3.89	1.22
胰岛素样生长因子结合蛋(IGFBP)-1	4.95	1.39
胰岛素样生长因子结合蛋-2	13.69	2.11
胰岛素样生长因子结合蛋-3	6.11	1.66
胰岛素样生长因子结合蛋-4	5.90	1.64
胰岛素样生长因子结合蛋-6	27.78	4.59
胰岛素样生长因子结合蛋-rp1 /胰岛素样生长因子结合蛋-7	333.01	2.75

[0074]

胰岛素样生长因子-I	13.74	3.15
胰岛素样生长因子-I 可溶受体	5.23	1.35
胰岛素样生长因子-II	4.76	1.26
胰岛素样生长因子-II 受体	6.57	1.69
白介素(IL)-1 α	9.12	2.26
白介素-1 β	4.87	1.30
白介素-1 F5 / FIL1 δ	5.25	1.42
白介素-1 F6 / FIL1 ϵ	7.50	1.79
白介素-1 F7 / FIL1 ζ	5.73	1.37
白介素-1 F8 / FIL1 η	5.91	1.25
白介素-1 F9 / 白介素-1 H1	6.37	1.24
白介素-1 F10 / 白介素-1HY2	4.26	1.19
白介素-1 受体 3 / 白介素-1 受体 AcP	4.11	1.25
白介素-1 受体 4 /ST2	4.29	1.33
白介素-1 受体 6 / IL-1 Rrp2	3.69	1.21
白介素-1 受体 8	3.32	1.13
白介素-1 受体 9	3.32	1.07
白介素-1 ra	3.36	1.11
白介素-1 可溶受体 I	3.29	1.09
白介素-1 可溶受体 II	3.25	1.03
白介素-2	3.53	1.12
白介素-2 受体 α	4.82	1.43
白介素-2 受体 β /CD122	3.88	1.15
白介素-2 受体 γ	4.07	1.17
白介素-3	4.34	1.26
白介素-3 受体 α	4.64	1.24
白介素-4	4.72	1.25
白介素-4 受体	5.53	1.11
白介素-5	6.31	1.60
白介素-5 受体 α	16.15	2.21
白介素-6	35.23	1.46
白介素-6 受体	6.41	1.51
白介素-7	6.01	1.51
白介素-7 受体 α	6.10	1.30
白介素-8	38.69	1.37
白介素-9	6.41	1.47

[0075]

白介素-10	5.27	1.39
白介素-10 受体 α	5.42	1.36
白介素-10 受体 β	5.54	1.38
白介素-11	5.71	1.20
白介素-12 p40	6.30	1.17
白介素-12 p70	4.14	1.22
白介素-12 受体 β 1	3.44	1.08
白介素-12 受体 β 2	8.52	1.70
白介素-13	3.81	1.11
白介素-13 受体 α 1	4.12	1.14
白介素-13 受体 α 2	3.59	1.03
白介素-15	4.07	1.19
白介素-15 受体 α	4.37	1.19
白介素-16	4.16	1.17
白介素-17	4.13	1.18
白介素-17B	4.59	1.17
白介素-17B 受体	4.89	1.16
白介素-17C	5.24	1.23
白介素-17D	5.18	1.24
白介素-17E	5.74	1.41
白介素-17F	5.96	1.40
白介素-17 受体	5.29	1.35
白介素-17RC	9.68	2.10
白介素-17RD	6.54	1.60
白介素-18 BP α	7.23	1.50
白介素-18 受体 α / 白介素-1 受体 5	5.76	1.44
白介素-18 受体 β / 腺蛋白溶酶(AcPL)	5.84	1.44
白介素-19	6.69	1.61
白介素-20	6.79	1.58
白介素-20 受体 α	15.60	3.16
白介素-20 受体 β	7.48	1.34
白介素-21	3.14	0.98
白介素-21 受体	3.18	0.95
白介素-22	3.34	0.91
白介素-22 BP	3.22	0.93
白介素-22 受体	3.51	0.97

[0076]

白介素-23	4.14	1.07
白介素-23 R	3.75	1.06
白介素-24	4.14	1.07
白介素-26	4.28	1.17
白介素-27	5.71	1.42
白介素-28A	9.23	2.20
白介素-29	5.31	1.18
白介素-31	4.89	1.23
白介素-31 RA	5.80	1.26
抑制素 A	5.19	1.31
抑制素 B	5.93	1.37
胰岛素	5.29	1.25
胰岛素受体	5.13	1.22
胰岛素降解酶 (Insulysin) / IDE	7.60	1.78
IP-10	5.86	1.36
干扰素诱导 T 细胞 α 趋化剂 (I-TAC)/CXCL11	5.83	1.40
激肽抑素(Kininostatin) /激肽原	7.18	1.75
Kremen-1	6.35	1.54
Kremen-2	13.18	3.01
淋巴细胞特异性蛋白质酪氨酸激酶(Lck)	7.05	1.42
潜在 TGF- β bp1	28.04	4.90
脂多糖结合蛋白(LBP)	4.34	1.23
白细胞衍生趋化因子(LECT2)	3.38	1.00
Lefty - A	3.38	1.01
瘦素受体	3.66	0.98
瘦素 (OB)	3.52	1.03
LFA-1 α	3.75	1.05
白血病抑制因子(LIF)	4.12	1.09
白血病抑制因子受体 α	4.43	1.02
轻链/TNFRSF14	4.34	1.09
脂钙蛋白-1	4.58	1.14
肺耐药蛋白(LRP)-1	9.89	1.81
肺耐药蛋白-6	29.80	2.28
L-选择蛋白(CD62L)	5.94	1.51
荧光素酶	5.29	1.25
淋巴细胞趋化因子 /红绒盖牛肝菌凝集	8.21	1.50

[0077]

素(XCL)1		
淋巴毒素 β /TNFRSF3	5.97	1.39
淋巴毒素 β 受体 /TNFRSF3	5.61	1.30
脑膜瘤相关蛋白(MAC)-1	5.54	1.20
单核细胞趋化蛋白(MCP)-1	22.87	1.84
单核细胞趋化蛋白-2	5.83	1.37
单核细胞趋化蛋白-3	6.96	1.65
单核细胞趋化蛋白-4 /CCL13	6.09	1.48
人巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)	6.90	1.65
人巨噬细胞集落刺激因子受体	7.02	1.62
巨噬细胞衍化趋化因子(MDC)	8.30	1.64
乳脂球表皮生长因子(MFG-E8)	8.93	1.62
膜卷曲基因相关蛋白(MFRP)	3.43	0.98
移动抑制因子(MIF)	3.73	1.02
MIG	3.67	1.03
巨嗜细胞炎性蛋白(MIP)-1a	5.17	1.42
巨嗜细胞炎性蛋白-1b	3.49	0.98
巨嗜细胞炎性蛋白-1d	3.45	0.93
巨嗜细胞炎性蛋白 2	11.45	2.56
巨嗜细胞炎性蛋白-3 α	4.64	1.33
巨嗜细胞炎性蛋白-3 β	3.68	1.03
基质金属蛋白酶(MMP)-1	5.06	1.20
基质金属蛋白酶-2	4.30	1.14
基质金属蛋白酶-3	4.08	0.75
基质金属蛋白酶-7	4.49	0.93
基质金属蛋白酶-8	4.80	1.15
基质金属蛋白酶-9	4.25	0.98
基质金属蛋白酶-10	6.05	1.44
基质金属蛋白酶-11 /基质分解素 (Stromelysin)-3	5.23	1.22
基质金属蛋白酶-12	5.12	1.33
基质金属蛋白酶-13	5.75	1.40
基质金属蛋白酶-14	7.60	1.79
基质金属蛋白酶-15	5.71	1.39
基质金属蛋白酶-16 /金属硫蛋白(MT)3- 基质金属蛋白酶	7.86	1.80
基质金属蛋白酶-19	9.10	1.70

[0078]

基质金属蛋白酶-20	8.06	1.68
基质金属蛋白酶-24 /金属硫蛋白 5-基质金属蛋白酶	6.44	1.48
基质金属蛋白酶-25 /金属硫蛋白 6-基质金属蛋白酶	6.20	1.36
Musk	6.62	1.41
人巨噬细胞刺激蛋白(MSP) α 链	6.85	1.40
人巨噬细胞刺激蛋白 β -链	16.76	2.65
中性粒细胞碱性磷酸酶(NAP)-2	9.61	1.71
神经细胞粘附分子-1 / CD56	5.11	1.24
神经突蛋白	4.04	1.06
神经源分化因子(NeuroD1)	3.86	1.07
神经菌毛素-2	3.58	1.01
神经秩蛋白(Neurturin)	3.58	0.94
神经生长因子受体	3.63	1.03
NOV / CCN3	3.58	1.13
神经调节蛋白 1 同种型 神经胶质生长因子 2	3.60	1.10
神经调节蛋白 1- α /富组氨酸糖蛋白 (HRG)1- α	3.58	1.03
神经调节蛋白 1- β 1 /富组氨酸糖蛋白 1- β 1	4.12	1.20
神经调节蛋白(NRG)2	4.09	1.02
神经调节蛋白 3	4.45	1.11
神经降压素(NT)-3	3.73	0.96
神经降压素-4	4.10	0.85
食欲素 A	4.34	0.65
食欲素 B	4.60	0.55
人抑瘤素 M(OSM)	4.89	0.69
骨活素(Osteoactivin)/非转移性黑色素瘤糖蛋白(GPNMB)	5.20	0.98
骨织素(Osteocrin)	8.16	1.73
骨保护(Osteoprotegerin)/TNFRSF11B	265.56	5.65
OX40 配体 /TNFRSF4	11.27	2.49
PARC /CCL18	5.35	1.26
血小板衍生内皮细胞生长因子 (PD-ECGF)	5.31	1.20
血小板衍生生长因子受体 α	5.73	1.32

[0079]

血小板衍生生长因子受体 β	6.80	1.49
血小板衍生生长因子-AA	7.08	1.54
血小板衍生生长因子-AB	6.91	1.52
血小板衍生生长因子-BB	7.03	1.51
血小板衍生生长因子-C	7.12	1.43
血小板衍生生长因子-D	7.08	1.31
血小板内皮细胞粘附分子(PECAM)-1 /CD31	4.21	1.18
正五聚蛋白/肿瘤抑制基因-14	11.67	2.24
Persephin	4.49	1.20
PF4 /CXCL4	3.88	1.10
胎盘生长因子(PIGF)	3.69	1.10
腭肺鼻上皮癌相关蛋白(PLUNC)	3.72	1.17
Pref-1	3.88	1.20
前驱颗粒蛋白	4.96	1.52
催乳素	4.16	1.26
P 选择蛋白	3.86	1.10
RAGE	3.93	1.06
核因子激活受体(RANK) /TNFRSF11A	4.43	1.17
正常 T 细胞表达分泌的调节活化蛋白 (RANTES)	3.86	1.05
抵抗素样分子家族(RELM) β	3.74	0.98
RELT /TNFRSF19L	4.28	0.93
肿瘤血管内皮调节蛋白(ROBO4)	4.21	1.08
SI00 A8/A9	4.84	1.18
SI00A10	4.89	1.19
淀粉性蛋白(SAA)	5.14	1.23
干细胞因子(SCF)	7.37	1.53
干细胞因子受体 /CD117	5.51	1.32
SDF-1 /CXCL12	5.32	1.18
分泌型卷曲相关蛋白(sFRP)-1	6.65	1.47
分泌型卷曲相关蛋白-3	6.42	1.35
分泌型卷曲相关蛋白-4	69.46	5.43
sgp130	15.48	2.93
单免疫球蛋白白细胞介素 1 受体相关蛋白(SIGIRR)	7.82	1.55
识别唾液酸的免疫球蛋白超家族凝集素 (Siglec)-5/CD170	7.13	1.47

[0080]

识别唾液酸的免疫球蛋白超家族凝集素-9	7.91	1.63
白细胞蛋白酶抑制因子(SLPI)	7.96	1.29
Smad1 (TGF- β 细胞因子超家族的细胞内信号转导分子)	4.78	1.23
Smad 4 (TGF- β 细胞因子超家族的细胞内信号转导分子)	10.65	2.26
Smad 5 (TGF- β 细胞因子超家族的细胞内信号转导分子)	4.59	1.15
Smad 7 (TGF- β 细胞因子超家族的细胞内信号转导分子)	4.59	1.22
Smad 8 (TGF- β 细胞因子超家族的细胞内信号转导分子)	3.92	1.09
感觉运动衍生因子(SMDF)/神经调节蛋白 1 同种型	4.11	1.05
Soggy-1	3.92	1.14
刺猬索尼克(音猬因子 (Shh) 氨基端)	3.77	1.10
半胱氨酸的酸性蛋白 (SPARC)	56.56	3.63
脊骨蛋白	6.40	1.68
穿膜蛋白活化物(TACI)/TNFRSF13B	4.40	1.10
胸腺活化调节因子(Tarc)	3.85	1.07
T 细胞因子受体(TCCR)/水溶木聚糖(WSX)-1	3.80	1.00
胸腺表达化学因子(TECK)/CCL25	3.79	0.98
组织因子途径抑制因子(TFPI)	5.18	1.22
转化生长因子(TGF)- α	4.28	1.09
转化生长因子- β 1	4.64	1.19
转化生长因子 F- β 2	4.85	1.22
转化生长因子- β 3	5.26	1.32
转化生长因子- β 5	5.28	1.29
转化生长因子 F- β 受体 I /ALK-5	6.94	1.51
转化生长因子- β 受体 II	5.43	1.30
转化生长因子- β 受体 IIIb	5.72	1.34
转化生长因子- β 受体 III	6.70	1.53
血小板生成因子(TPO)	7.40	0.94
血小板反应蛋白(TSP)	325.53	3.99
血小板反应蛋白-1	281.16	3.76

[0081]

血小板反应蛋白-2	10.81	1.94
血小板反应蛋白-4	7.96	1.57
胸腺生成素	7.60	1.44
铁蛋白(Tie)-1	4.03	0.88
铁蛋白-2	3.92	0.86
基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)-1	137.73	1.08
基质金属蛋白酶组织抑制剂-2	54.09	7.91
基质金属蛋白酶组织抑制剂-3	7.21	1.73
基质金属蛋白酶组织抑制剂-4	4.31	1.05
肿瘤坏死因子样配体(TL)1A /TNFRSF15	4.70	1.14
肿瘤坏死因子样配体受体 1	4.81	1.21
肿瘤坏死因子样配体受体 2	5.77	1.36
肿瘤坏死因子样配体受体 3	4.47	1.06
肿瘤坏死因子样配体受体 4	4.16	1.01
TMEFF1 / 脑肿瘤抑癌蛋白-1	4.91	1.10
TMEFF2	4.66	1.16
肿瘤坏死因子- α	5.07	1.26
肿瘤坏死因子- β	5.36	1.26
肿瘤坏死因子受体 I /TNFRSF1A	8.08	1.77
肿瘤坏死因子受体 II /TNFRSF1B	5.79	1.19
TRADD	5.70	1.26
相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) /TNFRSF10	5.83	1.26
相关的凋亡诱导配体受体 1 / DR4 /TNFRSF10A	6.28	1.40
相关的凋亡诱导配体受体 2 / DR5 /TNFRSF10B	6.57	1.36
相关的凋亡诱导配体受体 3 /TNFRSF10C	6.98	1.44
相关的凋亡诱导配体受体 4 /TNFRSF10D	8.02	1.38
肿瘤坏死因子相关激活诱导因子	9.17	1.53
髓样细胞表达的激发受体-1	4.77	0.95
TROY /TNFRSF19	5.21	1.04
肿瘤抑制基因(TSG)-6	5.72	1.10
胸腺基质淋巴生成素(TSLP)	4.90	1.03
肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂 (TWEAK)/TNFRSF12	5.00	1.03

[0082]

肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂受体/TNFRSF12	5.14	1.07
泛素蛋白+1	4.92	1.03
尿激酶(uPA)	4.94	0.90
尿激酶型纤溶酶原激活物受体	5.41	1.11
Vasorin	6.12	1.27
血管细胞粘附分子(VCAM)-1 (CD106)	5.02	1.11
血管内皮细胞钙黏蛋白(VE-Cadherin)	5.20	1.18
血管内皮生长因子(VEGF)	10.00	1.61
血管内皮生长因子受体 2 (血管内皮生长因子受体)	5.73	1.25
血管内皮生长因子受体 3	5.48	1.19
血管内皮生长因子-B	5.24	1.15
血管内皮生长因子-C	7.98	1.60
血管内皮生长因子-D	6.11	1.18
血管内皮生长抑制因子(VEGI)/TNFRSF15	6.03	1.20
WIF -1	6.07	1.21
WISP-1 / CCN4	6.68	1.30
X-连锁性外胚层发育不良受体(XEDAR)	7.81	1.46

[0083] HLSC-HepG2共培养实验

[0084] 为了探讨如果HLSC能够逆转癌细胞的侵袭表型,将所述肝细胞株HepG2与HLSC共培养在transwell小室内。实验结束时,评估HepG2的增殖。下层隔间(lower compartment)接种HepG2(2.5×10^4 个细胞)。上层隔间(upper compartment)接种HLSC(1×10^5)。共培养维持4天。4天后,去除培养基,将HepG2固定于10%福尔马林中并用H&E染色。

[0085] 细胞增殖

[0086] 以每孔8,000个细胞将HepG2接种96-孔板上,在丧失FCS、不同浓度CM的DMEM (Sigma)中。为了探讨衍生于HLSC的CM是否也在来自不同肿瘤的细胞株上发挥其抗肿瘤活性,利用MCF-7乳腺癌和卡波西肉瘤细胞,与那些在HepG2上观察到的抗肿瘤效果进行比较。培养48小时后,随着5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)掺入细胞DNA,检测DNA合成。然后用0.5M乙醇/HCl固定细胞,并用核酸酶孵育以消化DNA。将所述BrdU掺入DNA中,用抗BrdU过氧化物酶结合的单克隆抗体(mAb)进行检测并用可溶性显色底物可视化。用ELISA读取仪(reader)在405nm测量光密度。

[0087] 细胞凋亡分析

[0088] 以每孔8,000个细胞将HepG2, MCF-7和KS细胞接种于96-孔板上,在补充有10%FCS的低葡萄糖DMEM(Sigma)中,且在多柔比星(100ng/ml, Sigma)或长春新碱(50ng/ml, Sigma)或不同浓度的CM(0.5; 1; 2; 8; 16%的25×浓缩CM)的存在下。利用TUNEL法(ApopTag Oncor, 盖瑟斯堡, 马里兰州, 美国)评估细胞凋亡。

[0089] 体内实验设计

[0090] 雄性4到5周大SCID小鼠购自Charles River实验室。所有小鼠安置在干净设备内并喂养1周以适应新环境。第0天,两次注射 3×10^6 HepG2肿瘤细胞,其再悬浮于无血清DMEM内,其中具有基质胶(Matrigel)基底膜基质,二者以1:1比例给予。将总体积为0.2ml的HepG2注入SCID小鼠的左和右腹股沟区。将小鼠随机分为两处理组:测试组,这组接受20 μ l的25 \times 浓缩CM肿瘤内(i.t.)注射(n=3),和对照组,这组注入20 μ l的磷酸盐缓冲液(PBS)(n=3)。到10天时肿瘤变得明显(可触知)。肿瘤移植10天后,开始CM处理,随后进行三次i.t.注射。总共3次注射20 μ l CM给予每个形成的肿瘤。当肿瘤体积达到约15mm³时开始处理。每天监测动物的活动和身体状况,每次处理进行体重的测定和肿瘤体积的测量。

[0091] 用测径器测量肿瘤。测量植入肿瘤的两个垂直直径(perpendicular diameters)确定肿瘤体积并利用公式 $1/2axb^2$ 进行计算,其中a为长径,b为短径。

[0092] 形态学研究

[0093] 肿瘤固定在10%缓冲的中性福尔马林中,常规处理,埋入石蜡,5 μ m切片,并用H&E染色用于显微镜检查。利用抗-PCNA单克隆抗体进行免疫组织化学来检测增殖。用抗小鼠HRP(辣根过氧化物酶)第二抗体(二抗)(1:300稀释)封闭(block)和标记切片。省略第一抗体(一抗)或用非免疫小鼠IgG(免疫球蛋白)替代用作对照。在石蜡包埋的肿瘤切片中利用TUNEL法评估细胞凋亡。放大630倍,计数十个非连续切片的细胞凋亡-阳性肿瘤细胞。添加Hoechst 33258染料进行核染色。

[0094] 统计分析

[0095] 不同实验程序的所有数据表示为平均值+SD。利用Newmann-Keuls多对比测试(multi-comparison test)(在适合时)通过ANOVA(方差分析)进行统计分析。

[0096] 结果

[0097] HLSC-CM对肿瘤细胞的体外生物效应

[0098] 衍生于HLSC的CM抑制HepG2细胞的体外增殖

[0099] CM的抗肿瘤活性(其衍生于人类HLSC),通过测量它们抑制HepG2细胞株增殖的能力对其进行了体外评估。

[0100] 用不同剂量的CM孵育HepG2 48小时(图1)和4天(图2),与只用载体孵育对照细胞相比显著抑制了增殖。

[0101] 衍生于HLSC的CM抑制MCF-7和KS细胞的体外增殖

[0102] 为了探讨组织居留干细胞(tissue resident stem cells)的抗肿瘤作用是否对起源于相同组织的肿瘤具有特异性,评估了HLSC-CM对来自不相关器官肿瘤的癌细胞的效果,例如乳腺癌和卡波西肉瘤。用衍生于HLSC(HLSC-6B和HLSC-2)的两种不同制剂的16%CM(图3)孵育MCF-7乳腺癌和卡波西肉瘤细胞48小时,与只用载体孵育对照细胞相比显著地抑制了增殖。

[0103] 衍生于HLSC的CM诱导HepG2细胞的体外细胞凋亡

[0104] 用HLSC-CM孵育HepG2 24小时,与只用载体孵育对照细胞相比和与多柔比星或长春新碱制剂(细胞凋亡分子;当作阳性对照)相比显著地促进了细胞凋亡(图4)。

[0105] 衍生于HLSC的CM促进MCF-7和KS细胞体外细胞凋亡

[0106] 用衍生于HLSC-6B的16%CM(图5)孵育MCF-7乳腺癌和卡波西肉瘤细胞48小时与只

用载体孵育对照细胞相比显著地诱导细胞凋亡,具有类似于长春新碱,化疗药剂的效果。

[0107] CM对HEPG2肿瘤生长的体内生物作用

[0108] 结果

[0109] 衍生于SCID小鼠内肝细胞瘤异种移植模型的HLSC的CM抑制肿瘤生长和增殖

[0110] 为确定衍生于HLSC的CM对肿瘤体内生长的作用,用人类肝癌细胞株HepG2对SCID小鼠进行皮下移植。注入HepG2 10天后,当肿瘤的体积约为 15mm^3 时,用CM肿瘤内注射处理小鼠,最大体积为 $20\mu\text{l}$ 。在对照小鼠中,用 $20\mu\text{l}$ PBS注入肿瘤。HepG2注射十天后,所有肿瘤回收并进行分析。在这种异种移植模型中,CM(图6;图9,图A)肿瘤内注射显示对肿瘤生长的抑制作用。此外,组织学分析示出,利用PCNA染色观察到用CM处理的肿瘤内坏死区(图9,图B)和抗增殖作用(图9,图C)。为确定CM在内肿瘤细胞凋亡中的作用,利用TUNEL法分析用CM处理的肿瘤的石蜡切片。与只用载体处理的肿瘤相比(图9,图D),CM处理诱导细胞凋亡图9,图B。在处死的时刻,测量所述肿瘤体积(图7)和肿瘤重量(图8)

[0111] Wnt/ β -连环蛋白信号通路已知参与胚胎发生和癌发生。临床研究已报道Wnt/ β -连环蛋白通路的异常活化经常涉及肝癌形成。已报道Wnt-1配体在各种人类癌症包括HCC中异常表达。

[0112] 不受任何理论的束缚,本发明人假设构成如上所述发明人检测到的干细胞衍生的条件培养基的抗肿瘤作用的基础的一种可能的机制,可能是对Wnt/ β -连环蛋白信号通路的抑制。

[0113] 比较例

[0114] 材料和方法

[0115] HepG2培养在补充有10%胎牛血清, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素和 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉的DMEM中并维持在 37°C 具有5% CO_2 加湿气氛的孵育器(培养箱)内。

[0116] HLSC培养在 α -MEM/EBM(3:1)中,其补充有10%胎牛血清。在收集HLSC CM前一天,只用补充有10%胎牛血清的 α -MEM孵育HLSC,以消除包含在EBM培养基内的生长因子。在完成每个实验前进行这种培养基的改变。

[0117] 细胞凋亡分析

[0118] 以每孔8,000个细胞将HepG2接种于96-孔板上,在具有10%FCS的低葡萄糖DMEM(Sigma)内并且其中存在从HLSC或MSC获得的16%的 $25\times$ 浓缩CM,或存在 $3\text{ng}/\text{ml}$ 的TGF- β 。24小时后利用TUNEL法评估细胞凋亡。

[0119] 利用Newmann-Keuls多对比测试通过ANOVA进行统计分析。

[0120] 结果

[0121] 用HLSC-CM孵育HepG2 24小时,与只用载体孵育对照相比显著地促进细胞凋亡。MSC-CM也促进了HepG2以及TGF- β 的细胞凋亡,但就HLSC-CM而言则显著地减少。

[0122] 所得结果如图10所示。

[0123] 图10为体外细胞凋亡分析结果图,通过用 $25\times$ 浓缩HLSC-CM(16%)或MSC-CM(16%),或用TGF- β ($3\text{ng}/\text{ml}$)孵育HepG224小时后进行。HepG2的细胞凋亡以凋亡细胞百分比评估。结果表示为一式二份进行的实验的平均值 \pm SD。用HLSC-CM(16%),或MSC-CM(16%),或用TGF- β ($3\text{ng}/\text{ml}$)处理的*HepG2对未处理的HepG2, $p<0.05$;用HLSC-CM(16%)处理的 \S HepG2对用MSC-CM(16%),或用TGF- β ($3\text{ng}/\text{ml}$)处理的HepG2, $p<0.05$ 。

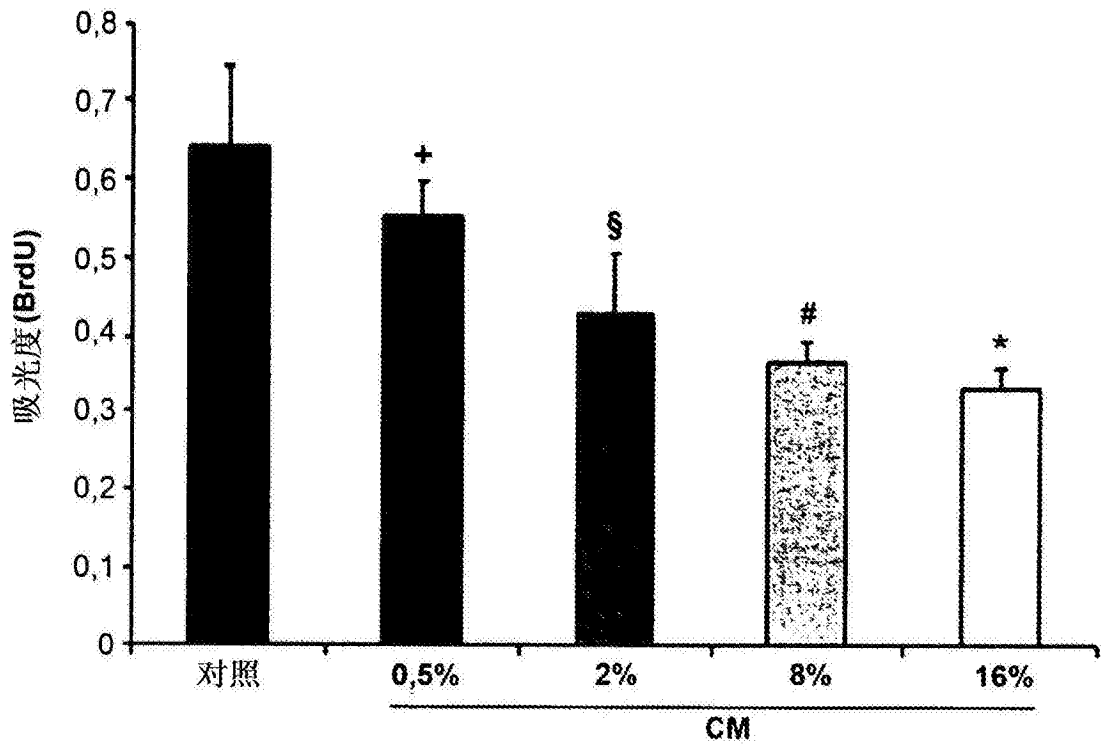


图1

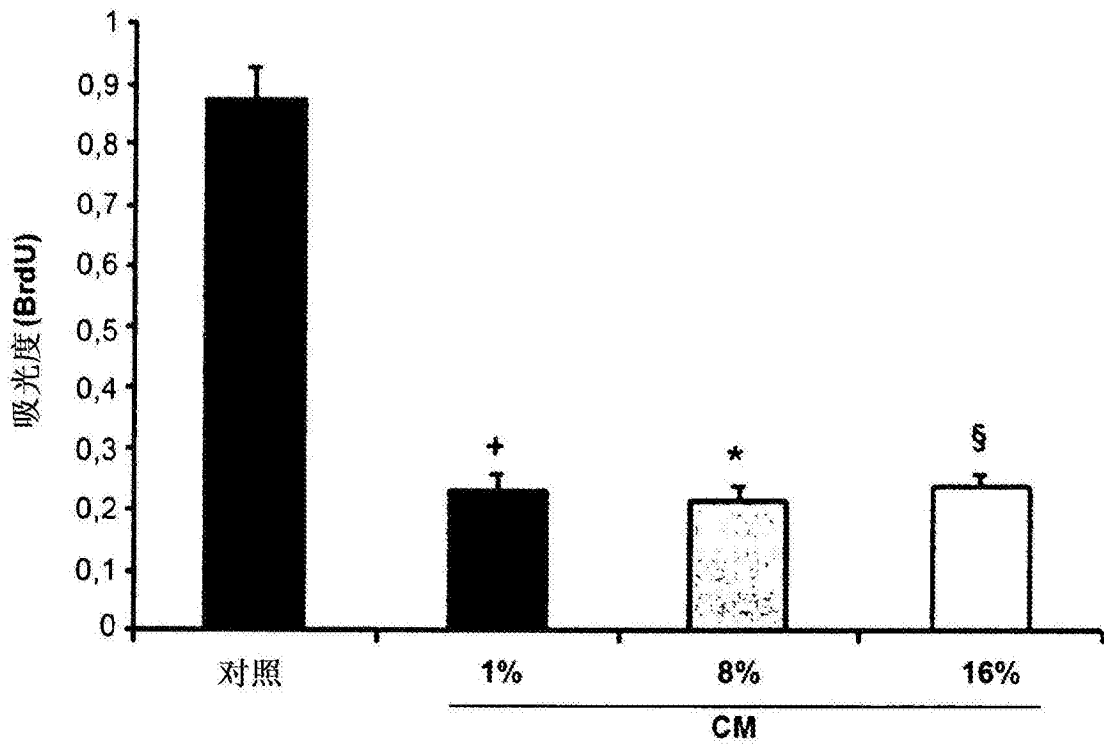


图2

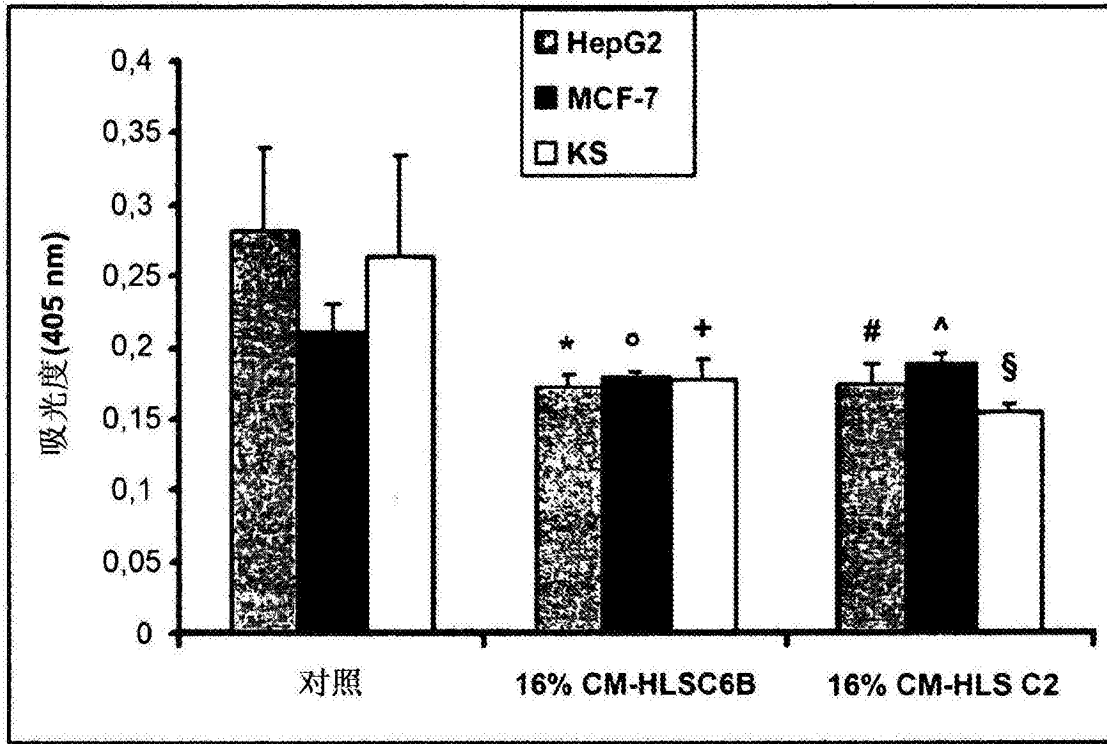


图3

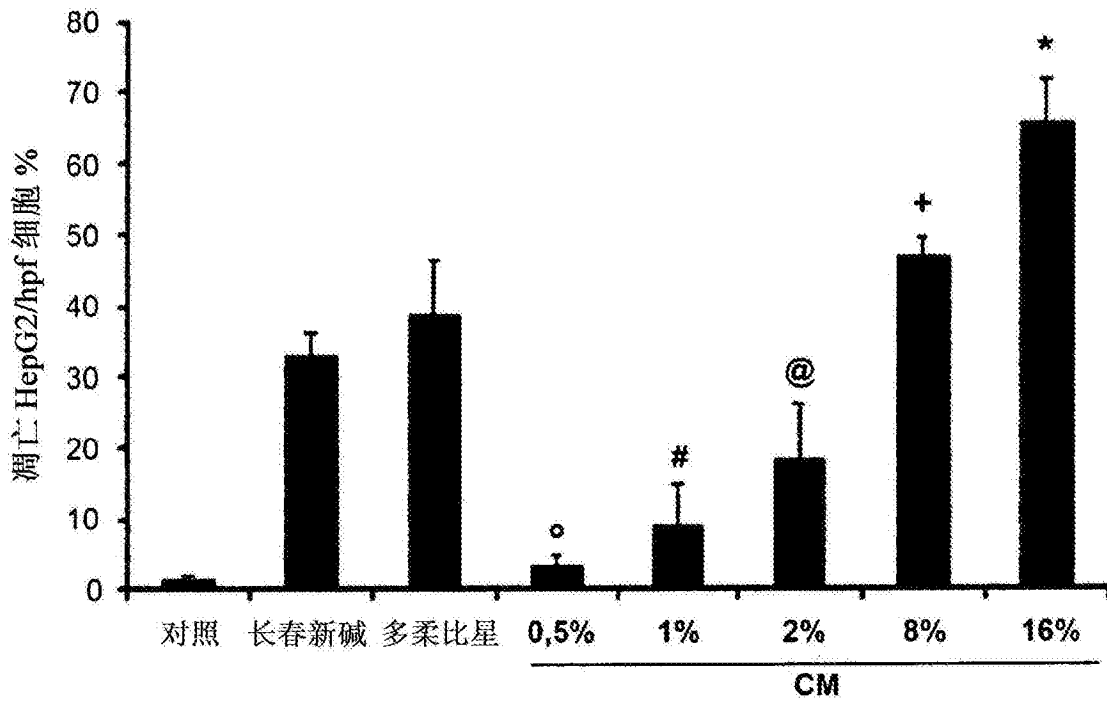


图4

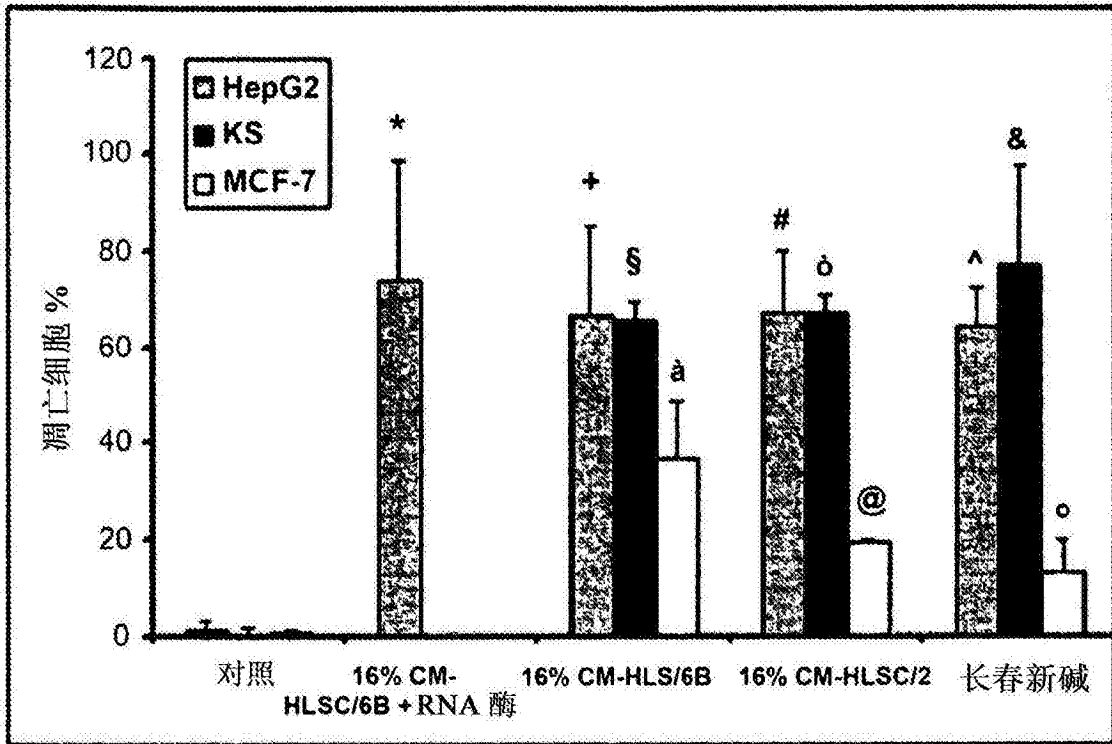


图5

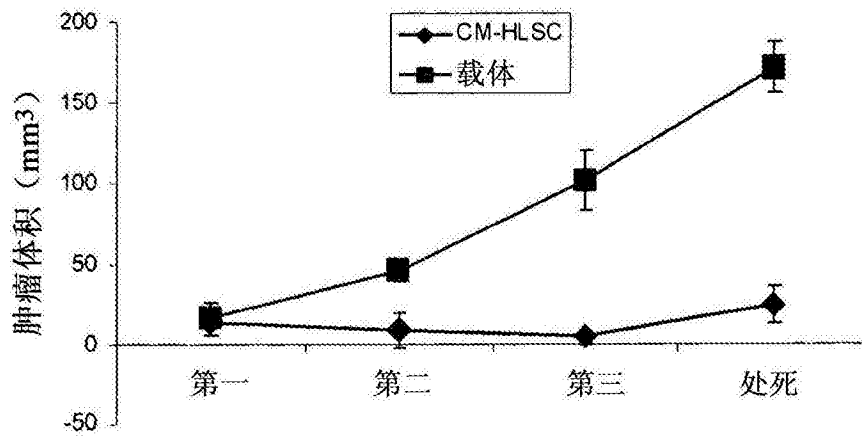


图6

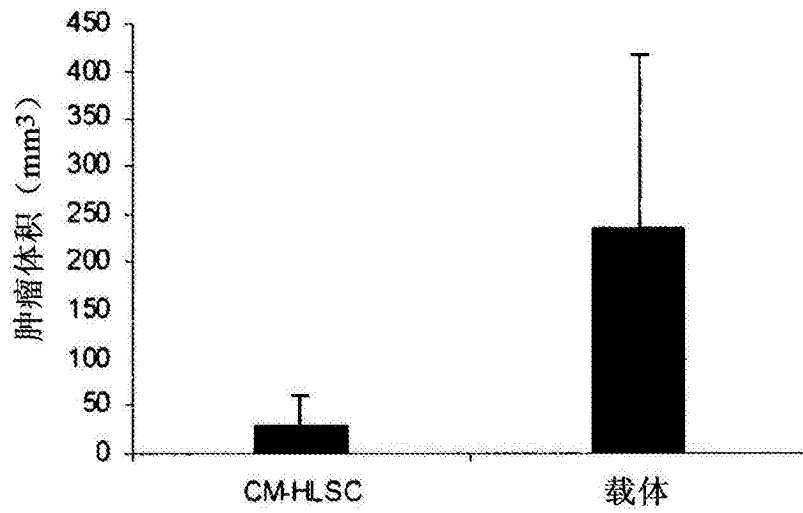


图7

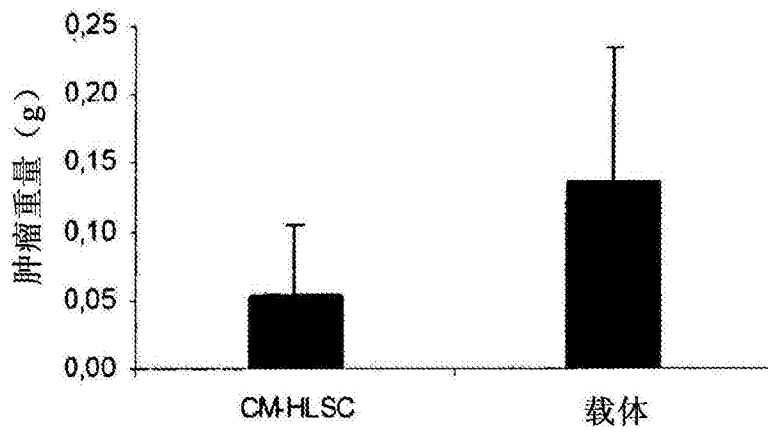


图8

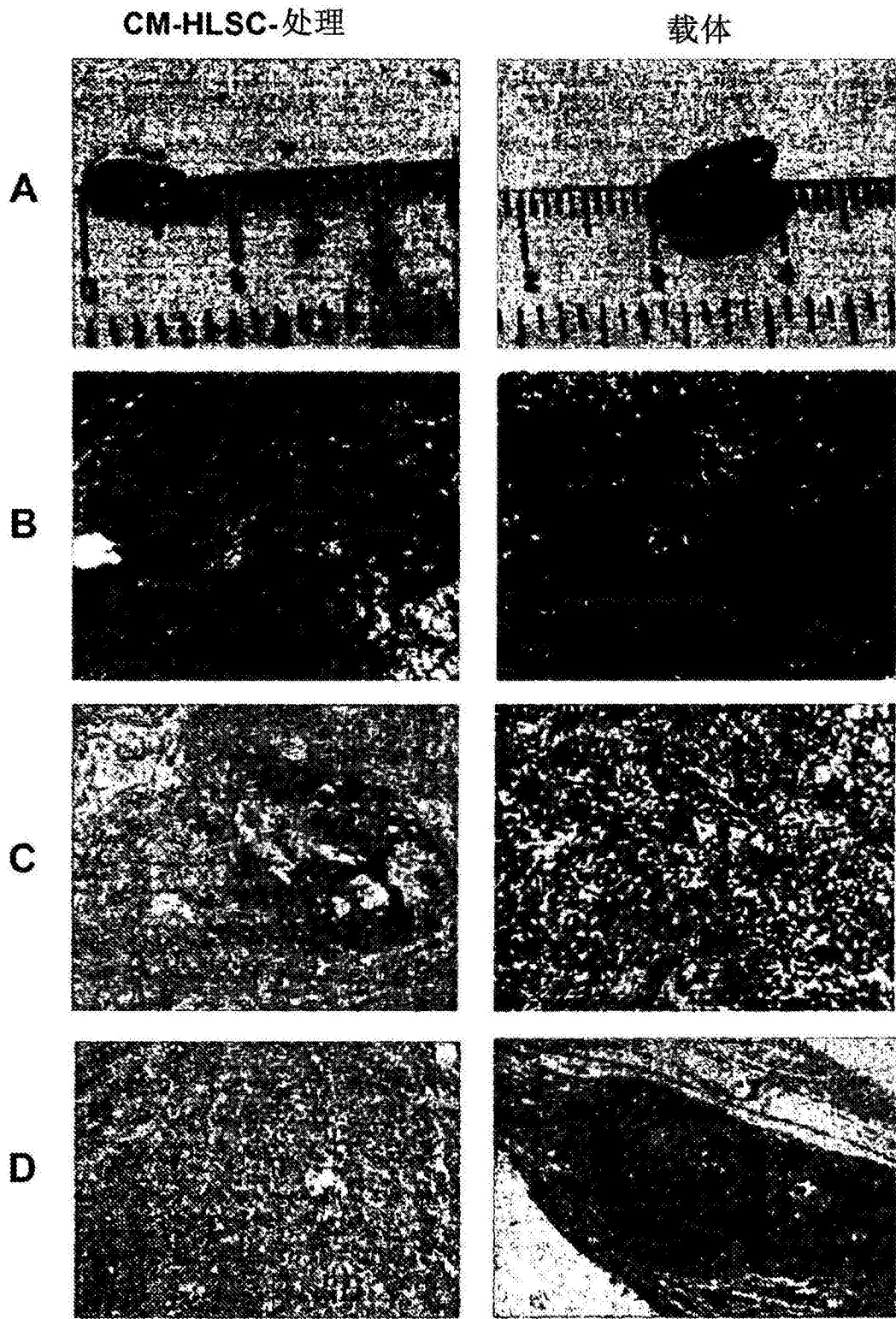


图9

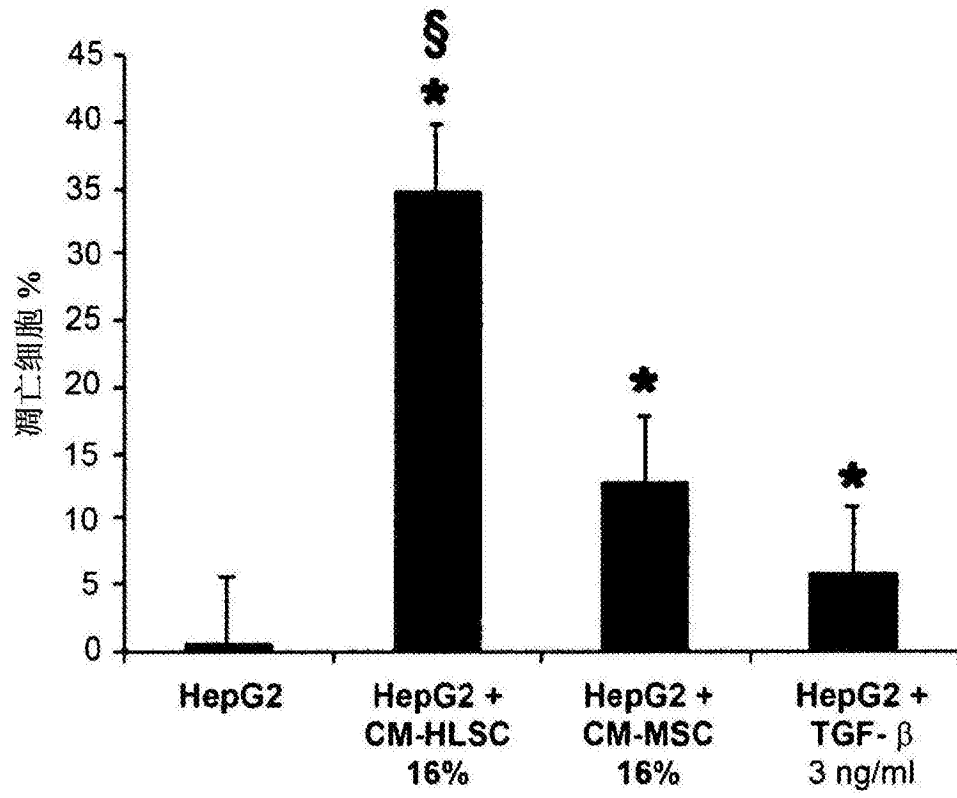


图10