



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101384708 B

(45) 授权公告日 2013.10.09

(21) 申请号 200780006011.9

(22) 申请日 2007.02.19

(30) 优先权数据

NA2006A000017 2006.02.20 IT

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.08.19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2007/001416 2007.02.19

(87) PCT申请的公布数据

W02007/096115 EN 2007.08.30

(73) 专利权人 特斯拉博有限公司

地址 意大利卡瓦德蒂伦尼

(72) 发明人 G·拉伊诺 G·帕帕乔 A·德罗斯

R·达奎诺 A·格拉齐亚诺

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

(56) 对比文件

W0 03/066840 A2, 2003.08.14, 说明书第 20 页 Examples 部分的第 1 段、第 6 页第 2 段, 权利要求 10.

CN 1587393 A, 2005.03.02, 全文.

Fernando Ulloa-Montoya et al. Culture systems for pluripotent stem cells. 《JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING》. 2005, 第 100 卷 (第 1 期), 全文.

S. Gronthos et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. 《JOURNAL OF DENTAL RESEARCH》. 2002, 第 81 卷 (第 8 期), 531-535.

张双喜. 荧光激活细胞分类仪的原理及应用. 《军事医学科学院院刊》. 1988, 第 12 卷 (第 4 期), 全文.

Gregorio Laino et al. A New Population of Human Adult Dental Pulp Stem Cells: A Useful Source of Living Autologous Fibrous Bone Tissue (LAB). 《JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH》. 2005, 第 20 卷 (第 8 期), 12-27.

审查员 苗荻

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

从成人牙周滤泡组织中收集和分离胚胎样干细胞群的方法

(57) 摘要

分离、增殖和保存属于人牙泡的干细胞群的方法, 所述干细胞被称作 FENC (来自滤泡的胚胎神经嵴干细胞), 该方法包括 :a) 在无菌条件下收集滤泡囊, 进行消化和原代培养生长和增殖 ;b) 任意扩增 ;c) FAC 分选。

1. 分离、增殖和保存属于人牙泡的干细胞群的方法,所述干细胞被称作 FENC(来自滤泡的胚胎神经嵴干细胞),该方法包括:

- a) 在无菌条件下收集滤泡囊,进行消化和原代培养生长和增殖;
- b) 任意扩增;
- c) 使用 SSEA-4、TRA1-60、TRA1-81、CD133、CD90、f1k-1 作为干细胞标记物进行 FAC 分选;
- d) 分析 Nanog、OCT-4 和 Rex-1 转录因子的阳性。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中使用蛋白水解酶和抗体进行所述消化。

3. 根据权利要求 2 的方法,其中通过水溶液进行所述酶消化,所述水溶液含有:PBS 中的 3mg/mL I 型胶原酶、4mg/mL 分散酶、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、500 μ g/mL clarytromycin。

4. 根据权利要求 2 或 3 的方法,其中所述酶消化在 37°C 摇动下进行 1 小时。

5. 根据权利要求 1-3 任何一项的方法,其中通过对干细胞特异的培养基实现原代培养物生长和增殖,所述培养基由 MEGA Cell、加入的 10% w/v FBS、2P- 抗坏血酸 100 μ M、L- 谷氨酰胺 2mM、青霉素 100U/mL、链霉素 100 μ g/mL 组成。

6. 根据权利要求 5 的方法,其中所述原代培养物生长和增殖在 37°C 和 5% CO₂ 的气氛中进行 15-20 天,每 3 天更换所述培养基。

7. 通过权利要求 1-6 任一项的方法可得到的 FENC 用于获得成骨前体、成骨细胞、成肌细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经元、神经胶质细胞的用途。

从成人牙周滤泡组织中收集和分离胚胎样干细胞群的方法

[0001] 概述

[0002] 本发明涉及从具有胚胎样抗原特征的人牙泡中分离新的干细胞亚群的新方法,也涉及其增殖培养的方法。可对所述分离的细胞进行表征并保存在细胞收集物中用于实验和治疗用途。

[0003] 更特别地,本发明描述了:1) 从供者牙周滤泡组织分离干细胞;它们在体外,尤其在能够允许胚胎样分离的培养条件中的生长;它们的建库(banking)以便保持生活力;它们向不同细胞型的分化;分离的干细胞细胞型用于细胞治疗和/或供者本身或HLA相容宿主的组织工程化以再生多种病原学损伤的用途。

[0004] 发明背景

[0005] 目前从人组织中分离干细胞的可能性是有争议的并被广泛讨论。干细胞的定义本身是能够自我更新并向其来源生物的所有不同细胞型分化的细胞。该定义不符合迄今为止在人出生后可收集的成体干细胞的抗原和功能特征。“自我更新”的一方面,实际上,迄今已分离到的成体干细胞没有显示出无限制的增殖能力,并且另一方面,分化能力几乎不能超越多能性(分化为来自相同胚层的所有细胞型的能力)或多潜能性(也能分化为来自不同胚层的细胞型的能力),而不能实现全能性(分化为所有细胞型的能力);后者是受精卵和胚泡细胞拥有的能力,导致人类发育的第一步。另一方面,对从人胚胎收集的细胞进行操作用于治疗和研究应用的可能性经常与技术、伦理和法律难题相抵触。由于这些原因,在成人未分化细胞型中分离的可能性不仅代表细胞分化的有趣的实验模型,并且对于癌相关组织,还代表治疗基于组织退化的疾病的重要治疗工具,所述疾病由数量和质量缺陷引起。

[0006] 所述干细胞是细胞型,其特征在於:

[0007] 0) 无限制的自我更新;

[0008] 0) 向多种细胞型的分化能力。

[0009] 对于由包括滤泡细胞型的 WO 03/066840 代表的现有技术,本发明显示出以下不同:

[0010] 0) 细胞的抗原模式和选择方法。WO 03/066840 没有公开任何选择,然而本发明的方法通过胚胎干细胞的细胞荧光测定法利用抗原检测如 SSEA-4、TRA 1-60、TRA 1-81、CD133、CD90、f1k-1 进行选择。以这种方式可以获得胚胎细胞的均一群。

[0011] 0) 培养方法、细胞增殖和分化;实际上 WO 03/066840 描述了收集细胞群的技术,所述细胞群含有仅仅一小部分的成体干细胞,然而本发明的选择方法允许制备均一的胚胎样干细胞群。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明描述了用特异性抗体适当染色后通过 FAC 分选 (FACsorting) 选择从滤泡囊 (follicular sack) 分离新的非造血间充质干细胞亚群的方法,下文中将所述非造血间充质干细胞亚群指作 FENC(来自滤泡的胚胎神经嵴干细胞)。

[0014] 本发明也提供 FENC 的培养和增殖方法。通过本发明的方法可得到的细胞能够分化为来自三种胚层的所有组织,因此使 FENC 成为全能的/多能的细胞群。可以 FENC 保存,

保持它们的生活力,使得可以建立细胞库来保存从成人患者收集的胚胎干细胞。本发明也提供通过 FENC 进行的细胞和 / 或基因组治疗及从 FENC 分化获得的细胞和组织的临床治疗应用的方法。

[0015] 发明详述

[0016] 本发明涉及分离从成人收集的胚胎干细胞的新细胞型的方法,尤其是分离这些细胞的方法,包括从滤泡囊中收集其的方法。

[0017] 牙泡,作为出牙前在它的形成过程中包被牙齿的组织复合物,由于以下两个原因而代表未分化细胞的优先来源:

[0018] 1) 每一颗牙齿,恒齿和乳齿,代表出生时的不完全器官。它在它的发育位点产生了未分化细胞,其在增殖后将变成牙发生细胞。神经嵴的胚胎起源说明了它们的未成熟性。也在牙形成结束时,这些未分化细胞在滤泡内保持 *in loco* 直至出牙,因为它们将变成出牙后发育的牙周组织和牙根尖的未来细胞。目前肯定的是牙周膜 (Gronthos, Lancet 2004) 和牙髓内 (Gronthos, PNAS 2000 ; Miura, PNAS 2003 ; Laino, JBMR 2005) 存在成体干细胞。

[0019] 2) 所述牙泡是具有方便的外科通路及具有未分化干细胞和收集的组织的体积间高比例的生物学生态位。因为拔出智齿非常常见并且需要收集滤泡囊,用于干细胞收集的组织损失是最小的。干细胞,具有从这些生物样品获得的胚胎特征,可以保存用于研究和自体治疗应用。

[0020] 这些细胞来自神经外胚层并且表现出分化为起源于该层的细胞型的能力。

[0021] 本发明第一次提供了具有胚胎特征的均一细胞群从成人中的分离。

[0022] 该策略呈现这些优势:1) 使用局部麻醉的低侵入性手术;2) 位点的低发病率;3) 由于不存在造血部分,高克隆发生的间充质培养;4) 胚胎细胞从成人中的分离。

[0023] FENC 的获得 - 从滤泡囊中获得的干细胞直接来自间充质细胞,所述间充质细胞在器官发生过程中起源于神经嵴。它们的起源说明了它们的可塑性。为了从所述滤泡囊中分离干细胞,滤泡囊必须完整,与口腔没有联系。

[0024] 患者在手术前的本周内必须遵循合适的口腔卫生方案,例如每天用 CHX 0.12 或类似的试剂冲洗口腔至少两次。对于滤泡囊的收集,麻醉后,切开活瓣并打开骨通道 (bone door) 以到达滤泡囊包被的阻生牙。一旦在无菌条件下收集,将样品浸在消化液中于 37°C 下 1 小时。第一小时结束时,将所述消化液过滤来去除细胞团块和 ECM 颗粒。在这之后,终止消化过程并在 Mega Cell 培养基 (SIGMA-Milan, 意大利) 中培养细胞。或者,可以使用胚胎干细胞 (ES) 的培养基。显微镜观察显示从培养的第一天开始,可以获得大量细胞,所述细胞附着到烧瓶底部,其产生克隆。5 天后在 75ml 烧瓶中可以多大 60 个克隆。

[0025] 在第 9-10 天,去除上清液后,在 FAC 分选仪上攻击细胞,收集干细胞标记物呈阳性的细胞克隆。

[0026] 刺激或无刺激下,分离的 FENC 分化成不同的细胞型。向培养基中加入 β FGF 可能获得没有分化的增殖。

[0027] 细胞达到合适的数目后,可以将它们冰冻并于 -80°C 储存在液氮中。

[0028] 总结步骤如下:

[0029] 1) 在无菌条件下收集滤泡囊,消化并培养;

[0030] 2) 如果需要,增殖原代培养物;

[0031] 3)FAC 分选；

[0032] 4) 扩增、冰冻和 / 或细胞分化；

[0033] 5)FAC 分析；

[0034] 6) 保持在未分化状态；

[0035] 7) 从分化细胞的组织工程化。

[0036] 从 FENC 分化获得的所有细胞类型不仅可以用于细胞治疗,还可以用于构建不同的组织。

[0037] 例如,可以使用 FENCA 来获得表达 RUNX-2 的成骨前体,从其得到表达 HLA-1、CD44、RUNX-2 和 CD54 及骨钙蛋白的成骨细胞。

[0038] 称作 LAB(活自体骨)的骨样基质也可从成骨细胞中获得,增殖并冷藏。LAB 由骨组织样品制成,具有大于 1cm 的厚度和大于 1cm³ 的体积。LAB 形成(包含活跃产生骨的成骨细胞)的特征在于:1) 聚簇形成,其在中央区域内分泌无机晶体、胶原纤维和糖蛋白;2) 该结构的 3D 组织,建立了矿化骨基质。

[0039] 使用 α -MEM 培养基在 5% CO₂ 气氛中 37℃ 下通过培育细胞形成所述 LAB,所述 α -MEM 培养基中加入了 20% p/v FBS、100 μ M 2P- 抗坏血酸、2mM L- 谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素。LAB 的形成只有由于缺少营养物时被阻断。

[0040] 使用细胞冷藏的常规技术,可以连续产生所述 LAB 并且可以保存骨样组织,在 4℃ 或在低于 0℃ 的温度维持所述成骨细胞。

[0041] 也可获得含有 LAB 的 3D 基质,其中成骨细胞在 3D 生物相容基质存在下生长,所述基质被细胞建群。所述生物相容基质在体内可以是可再吸收的或者不可再吸收的:合适基质的实例包括乳酸 / 羟基乙酸共聚物 (lactide co-glycolic acid)、合成胶原、HA、生物珊瑚、硫酸钙,然而这些不能被再吸收的基质包括聚甲基丙烯酸酯、PTFe、钛、紧密 HA、双相 HA (50% HA 和 50% β -TCP)、陶瓷。

[0042] 根据本发明的另外的实施方案,为了获得平滑肌细胞,使用 Mega Cell 培养基,FENC 也可以分化为成肌细胞,所述 Mega Cell 培养基中含有 FBSp/v 2%、100 μ M 2P- 抗坏血酸、2mM L- 谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素,其中加入了 10ng/ml TGF β 。

[0043] 为了获得横纹肌,使用 C2C12 鼠肌管共培养也可以将 FENC 在体外分化为成肌细胞。使用如以下培养基:含有 4mM L- 谷氨酰胺、1.5g/L 碳酸氢钠、4.5g/L 葡萄糖和 1.0mM 丙酮酸钠,加入了 FBS 10% 的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM, Invitrogen),其中,用 1 : 10 的比例进行共培养 7 天。

[0044] 在加入了 B27 蛋白 (Invitrogen, 米兰) 的 Neurobasal A (Invitrogen, 米兰, 意大利) 中,使用 15-30 天的培养也可以将 FENC 在体外分化为神经元和神经胶质细胞。

[0045] 可以使用神经胶质细胞的抗 GFAP 抗体通过 FAC 分选选择由 FENC 分化获得的来自神经元的神经胶质细胞。

[0046] 通过在 α -MEM 中培养 30 天也可以将 FENC 分化为脂肪细胞,其中向所述 α -MEM 中加入了 20% p/v FBS、100 μ M 2P- 抗坏血酸、2mM L- 谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、10⁻⁸M 地塞米松。

[0047] 为了获得软骨,可以使用 α -MEM 将 FENC 细胞培养 30 天获得 FENC 的软骨细胞分化,其中向所述 α -MEM 中加入了 20% p/v FBS、100 μ M 2P- 抗坏血酸、2mM L- 谷氨酰胺、

100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素,降低 $pO_2 < 40$ mmHg。

[0048] 本发明允许 FENC 在细胞治疗方案中的自体使用。

[0049] 尤其是, FENC 和来自它们的细胞的自体使用可以用于以下应用:

[0050] - 通过来自 FENC 的成骨细胞治疗骨骼器官 (skeletal apparatus) 病理,像骨缺损。

[0051] - 通过来自 FENC 的成肌细胞治疗平滑和横纹肌的肌肉组织退化。

[0052] - 通过来自 FENC 的神经元治疗 CNS 病理学。

[0053] - 通过来自 FENC 的神经胶质细胞治疗髓鞘退化。

[0054] - 当希望形成脂肪组织时,通过来自 FENC 的脂肪细胞用于整形外科。

[0055] - 通过来自 FENC 的软骨细胞用于肿瘤学和整形外科领域。

[0056] 致癌试验 - 为了排除致癌作用,在用慢病毒 III (Invitrogen, 米兰, 意大利) 感染后,通过含有 GFP (绿色荧光蛋白) cDNA 的载体已经将 FENC 和分化细胞由此注射进裸鼠中。移植后,监视所述动物 30 天并将其处死。在移植位点和主要器官上的组织学观察显示没有癌症发生。

[0057] 已经激发细胞主要的癌症标记物并进行细胞周期分析:使用的所有细胞都没有癌症迹象。

[0058] 下面报道了 FENC 应用的某些实施例。

[0059] 实施例 1 细胞的分离和培养

[0060] 从手术前一周开始,每天两次用 CHX 0.12w/v 对每一健康的患者进行口腔清洗处理。对于滤泡囊的收集,局部麻醉后切开活瓣并打开骨通道以到达滤泡囊包被的阻生牙。一旦用格雷西刮治器 (Gracey curette) 或牙槽匙在无菌条件下收集后,将样品浸在消化液中于 37°C 下 1 小时。所述消化液为 PBS (磷酸缓冲溶液 pH 7.4 1M),含有 3mg/mL 的 I 型胶原酶、4mg/mL 分散酶、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和 500 μ g/mL clarytromycin。所述溶液的体积依赖于收集的滤泡囊的体积,且在 8 至 15mL 间变化。所述样品在溶液中于 37°C 保持 1 小时。在第一小时结束时,用 Falcon [®] 过滤器 70 μ m 将消化液过滤来除去 ECM 的碎片、细胞或大的团块。如果仍然存在组织碎片,可将样品再次消化 30 分钟。为了终止消化作用,向消化液加入等于 10 倍消化体积的体积并于 140g 下离心 10 分钟。培养基为 Mega Cell (SIGMA, 米兰, 意大利),其中加入了 10% w/v 胎牛血清 (FBS)、100 μ M 2P- 抗坏血酸、2mM L- 谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素。离心结束时,从管底收集 25ml 悬浮液并在 50ml 烧瓶中于 37°C 和 5% CO₂ 下进行培养,每周两次更换培养基。显微镜观察显示从培养的第一天开始,贴壁细胞产生细胞克隆。

[0061] 实施例 2 生长和表征

[0062] 在 75 个烧瓶中的上述培养基或胚胎培养基 (ES 培养基, Invitrogen, 米兰, 意大利) 中培养 5 天后,可计数高达 60 个克隆。

[0063] 在第 9-10 天,去除上清液并用无菌 PBS 洗涤后,从烧瓶底部进行细胞脱附。用溶解在无 Mg/Ca 的 PBS 中的 4mL EDTA 0.02% 于 37°C 脱附 10 分钟并进行 FAC 分选,收集干细胞标记物呈阳性的细胞克隆。将细胞沉淀 (140g 下 10 分钟),于 4°C 用 PBS 中的 BSA (牛血清白蛋白) 0.01% 洗涤并在 4°C 温育 30 分钟用于用 10 μ l 贮存液抗体染色。温育后,用 1ml PBS 中的 BSA 0.1% 洗涤细胞一次来去除不反应的或非特异性的抗体,并分析对以下抗体的阳

性:SSEA-4、TRA 1-60、TRA 1-81、CD133、CD90、flk-1 (Santa Cruz, CA, 美国)。70%比例的细胞对 SSEA-4 呈阳性并且 80%对 TRA 1-60 和 TRA 1-81 呈阳性。SSEA-4⁺ 对 TRA 1-60 和 TRA 1-81 都为阳性。SSEA-4、TRA 1-60 和 TRA 1-81 是仅仅存在于未分化细胞或胚胎干细胞(全能 ES)和胚胎生殖细胞(多潜能 EG)上的表面分子。分选后,检测小样品的 3 种转录因子:Nanog、OCT-4 和 Rex-1,其通常仅在胚胎未分化细胞上可检测到。先前抗原的阳性证实了所述细胞(ES)的胚胎性质(Zhang Nature 2003)。OCT-4 阳性在所有分选细胞中为 100%。对于 Nanog 和 Rex1 分析,在获得适当数目的细胞后,分离 RNA 并用 RT-PCR 进行分析。

[0064] 实施例 3 分化类型 a(骨、平滑肌和软骨)

[0065] 如实施例 1 和 2 中报道的分离并表征的 FENC 可以在有刺激或无刺激下分化,或可以在向培养基中加入 8ng/mL β FGF 时增殖而限制分化。

[0066] 对于成骨分化,可以用 α -MEM 培养细胞,所述 α -MEM 中加入了 FBS20% w/v、100 μ M 2P-抗坏血酸、2mM L-谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素。细胞在约 25 天后分化为成骨细胞,建立编织骨(对于抗 I 和 III 型胶原、骨钙蛋白、骨粘连蛋白、BAP 的抗体呈阳性)。

[0067] 对于平滑肌分化,FENC 必须用 2% Mega Cell(SIGMA)(FBS p/v、2P-抗坏血酸 100 μ M、L-谷氨酰胺 2mM、青霉素 100U/mL、链霉素 100 μ g/mL,加入 10ng/ml TGF β) 培养。在这些条件下细胞在约 4-5 天内分化并对 SMA 抗体染色、平滑肌分化标记物呈阳性。

[0068] 对于软骨分化,FENC 在 α -MEM 培养基中培养,所述 α -MEM 培养基中加入了 20% w/v FBS、100 μ M 2P-抗坏血酸、2mM L-谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素,降低 $pO_2 < 40$ mmHg 并在 37°C 用 5% CO_2 培养。由于细胞浓度高(500,000/15mL),软骨构建发生在约 30 天内并可以通过 II 型胶原酶表达的分析来证实。

[0069] 实施例 4 b 型分化(神经元和神经胶质细胞)

[0070] 滤泡细胞可以自发分化或使用加入了 B27 蛋白(Invitrogen,米兰,意大利)的 Neurobasal A 培养基(Invitrogen,米兰,意大利)分化。培养进行 5-7 天。在两种情况下获得了大量分化的神经元和神经胶质细胞。然后可以使用抗 GFAP 抗体进行细胞荧光测定法来选择并分离两种细胞型。实际上,分化的细胞是:

[0071] - 当对 GFAP 抗体呈阳性时为神经胶质细胞;

[0072] - 当对抗 TuJ1、抗神经丝、抗 Brn3A(转录因子)抗体呈阳性时为神经元;

[0073] - 当对抗外周蛋白和抗 p75 抗体呈阳性时为外周神经元。

[0074] 实施例 5c 型分化(横纹肌,脂肪细胞)

[0075] 可以通过与 C2C12 鼠肌管共培养来完成 FENC 分化成横纹肌细胞。使用已知方法(例如 Laino 等人,2006),在如下制备的培养基中用 1:10 的比例进行共培养一周:Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM, Invitrogen),其中加入了 4mM L-谷氨酰胺、1.5g/L 碳酸氢钠、4.5g/L 葡萄糖、1.0mM 丙酮酸钠和 FBS 10%。共培养后,融合到鼠肌管内的 FENC 的百分比可通过抗人核层粘连蛋白来计算。通常,融合的百分比约为 15-20%。融合的肌管可以用于移植。

[0076] 可以在以下培养基中加入地塞米松 10^{-8} M 30 天获得脂肪细胞分化: α -MEM,其中加入了 20% p/v FBS、100 μ M 2P-抗坏血酸、2mM L-谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL

链霉素。最后,可以观察到大量脂肪细胞,其可以用苏丹黑或用油红 O 新鲜染色。

[0077] 脂肪细胞可以用于整形外科。

[0078] 实施例 6 组织工程化和临床应用

[0079] FENC 一旦分化,也可在 Roller 装置中通过旋转培养用于组织重建。成骨细胞分化细胞例如可以接种在乳酸 / 羟基乙酸共聚物 (lactidecoglycolyc) (85 : 15) 支架上 (其在 15 天内是可再吸收的)。旋转培养 (1/5 秒) 在 5% CO₂ 培养箱中进行 30 天。一旦达到 1cm 的厚度,观察 3D 组织结构并通过组织学、免疫组织化学和 SEM 技术来评估。

[0080] 骨组织可以用于缺损再生。如果可以从患者中获得这些细胞,可以模拟支架并进行 3D 培养。20-30 天后,就可以将复合的支架 - 细胞植入患者的部位。

[0081] 可使用标准的外科技术完成移植。准备移植部位涉及产生明显的血液外渗并减少皮质层。因此可以使支架 - 细胞与宿主的整合变得更容易并且然后可以进行移植。

[0082] 完全整合在 40-60 天内完成。

[0083] 由于该自体技术,可以使用干细胞实现组织修复。

[0084] 术语

[0085] Mega cell = 细胞培养基 (Sigma-Aldrich, 米兰, 意大利)

[0086] ES = 培养基 (Invitrogen, 米兰, 意大利)

[0087] β FGF = β 成纤维细胞生长因子

[0088] α -MEM = α Medium Essential Medium (Invitrogen)

[0089] 抗 GFAP = 针对胶质细胞原纤维酸性蛋白的抗体

[0090] GFAP = 胶质细胞原纤维酸性蛋白

[0091] SMA = 平滑肌动蛋白

[0092] TGF β = 肿瘤生长因子 β

[0093] BAP = 骨碱性磷酸酶

[0094] β FGF = 成纤维细胞生长因子 β

[0095] RT-PCR = 逆转录酶聚合酶链式反应

[0096] Nanog = 早期发育过程中胚胎细胞的转录因子

[0097] Rex1 = 早期发育过程中胚胎细胞的转录因子

[0098] OCT-4 = 八聚体 4

[0099] SSEA-4 = 阶段特异的胚胎抗原

[0100] TRA 1 = 肿瘤排斥抗原 1

[0101] CD = 分化簇

[0102] f1k-1 = 胎儿肝激酶 1

[0103] HA = 羟基磷灰石

[0104] TCP = 磷酸三钙。