[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
*C12N 5/02 (2006.01)*
*C12N 5/06 (2006.01)*
*C12N 5/08 (2006.01)*

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780049872.5

[43] 公开日 2010 年 2 月 17 日

[11] 公开号 CN 101652470A

[22] 申请日 2007.11.20
[21] 申请号 200780049872.5
[30] 优先权
[32] 2006.11.21 [33] US [31] 60/860,637
[86] 国际申请 PCT/US2007/024258 2007.11.20
[87] 国际公布 WO2008/063640 英 2008.5.29
[85] 进入国家阶段日期 2009.7.14
[71] 申请人 罗杰·威廉斯医院
地址 美国罗德岛州
[72] 发明人 罗履广
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 梁 谋 黄可峻

权利要求书 4 页 说明书 27 页 附图 19 页

[54] 发明名称

# 骨髓细胞用于长期培养胰腺胰岛细胞的用途

[57] 摘要

业已表明，骨髓细胞可用于在一定时间内持久维持共培养的胰岛 β 细胞的存活力、结构和/或功能。 还发现骨髓细胞在降低炎性细胞因子释放和减少凋亡的同时促进 β 细胞生长。 而且，已表明与骨髓细胞共培养的胰岛细胞保持胰岛素响应功能，并在糖尿病小鼠模型的胰岛细胞移植中起作用，以恢复正常的胰岛素分泌。 脐血细胞和分离的外周 CD34 + 血细胞不能支持 β 胰岛细胞生长或提高存活。

1. 一种培养胰岛β细胞的方法，所述方法包括在体外将胰岛β细胞和骨髓细胞一起培养。

2. 权利要求 1 的方法，其中持续培养所述胰岛β细胞一定时间。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述持续期为至少约 30 天。

4. 权利要求 2 的方法，其中所述持续期为至少约 60 天。

5. 权利要求 2 的方法，其中所述持续期为至少约 90 天。

6. 权利要求 2 的方法，其中所述持续期为至少约 120 天。

7. 权利要求 1-6 中任一项的方法，其中与没有骨髓细胞的情况下培养的胰岛β细胞相比，将胰岛β细胞与骨髓细胞一起培养提高胰岛β细胞存活力，改善胰岛β细胞功能，和/或改善胰岛β细胞形态。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述细胞功能通过基础胰岛素分泌测定来测定。

9. 权利要求 7 的方法，其中所述细胞功能通过葡萄糖诱导的胰岛素分泌测定来测定。

10. 权利要求 7 的方法，其中在一定时间内持续增加胰岛β细胞存活力、改善胰岛β细胞功能和/或改善胰岛β细胞形态。

11. 权利要求 1-10 中任一项的方法，其中与没有骨髓细胞的情况下培养的胰岛β细胞相比，所述方法减少与骨髓细胞共培养的胰岛β细胞的凋亡。

12. 权利要求 1-10 中任一项的方法，其中与没有骨髓细胞的情况下培养的胰岛β细胞相比，所述方法降低与骨髓细胞共培养的胰岛β细胞的细胞因子释放。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述细胞因子为 IL-1β。

14. 权利要求 1-10 中任一项的方法，其中所述方法增加至少一种内分泌细胞特异性基因的表达。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述内分泌细胞特异性基因选自

GCG (胰高血糖素，α-细胞基因)、INS (胰岛素，β-细胞基因)和 SST (促生长素抑制素，γ-细胞基因)；β细胞胰腺和十二指肠同源框 1 的转录因子(PDX1 或 IPF1)、神经元素 3 (NGN3)、成对盒基因 6 (PAX6)、胰岛-1 (ISL1)、v-maf 肌肉腱膜纤维肉瘤癌基因同源物 A (MAFa)和 Mist 1。

16. 一种体外扩增胰岛β细胞的方法，所述方法包括将胰岛β细胞和骨髓细胞一起培养。

17. 一种提高胰岛β细胞存活力、改善胰岛β细胞功能和/或改善β细胞形态的方法，所述方法包括在体外将胰岛β细胞和骨髓细胞一起培养。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述细胞功能通过基础胰岛素分泌测定来测定。

19. 权利要求 17 的方法，其中所述细胞功能通过葡萄糖诱导的胰岛素分泌测定来测定。

20. 权利要求 17-19 中任一项的方法，其中与没有骨髓细胞的情况下培养的胰岛β细胞相比，所述方法降低与骨髓细胞一起培养的胰岛β细胞的凋亡。

21. 权利要求 17-20 中任一项的方法，其中与没有骨髓细胞的情况下培养的胰岛β细胞相比，所述方法降低与骨髓细胞一起培养的胰岛β细胞的细胞因子释放。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述细胞因子为 IL-1β。

23. 权利要求 17-22 中任一项的方法，其中所述方法增加至少一种内分泌细胞特异性基因的表达。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述内分泌细胞特异性基因选自 GCG (胰高血糖素，α-细胞基因)、INS (胰岛素，β-细胞基因)和 SST (促生长素抑制素，γ-细胞基因)；β细胞胰腺和十二指肠同源框 1 的转录因子(PDX1 或 IPF1)、神经元素 3 (NGN3)、成对盒基因 6 (PAX6)、胰岛-1 (ISL1)、v-maf 肌肉腱膜纤维肉瘤癌基因同源物 A (MAFa)和 Mist

1。

25. 一种治疗需要移植胰岛β细胞的患者的方法，所述方法包括:

在体外将胰岛β细胞和骨髓细胞一起培养；和

将所述胰岛细胞和骨髓细胞植入需要移植胰岛β细胞的个体中。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述患者罹患 I 型或 II 型糖尿病。

27. 权利要求 1、16、17 或 24 中任一项的方法，所述方法进一步包括获得胰岛β细胞或骨髓细胞。

28. 权利要求 25-27 中任一项的方法，其中所述骨髓细胞为同种异体的骨髓细胞。

29. 权利要求 25-28 中任一项的方法，所述方法进一步包括鉴定需要移植胰岛β细胞的患者。

30. 权利要求 25-29 中任一项的方法，所述方法进一步包括在胰岛细胞移植后监测所述患者。

31. 一种在其需要的患者中治疗糖尿病的方法，所述方法包括:

在体外将胰岛β细胞和骨髓细胞一起培养；和

将培养的胰岛β细胞植入患者中；

由此治疗所述患者的糖尿病。

32. 权利要求 22 的方法，其中所述患者罹患 I 型或 II 型糖尿病。

33. 权利要求 22 或 23 的方法，所述方法进一步包括获得胰岛β细胞或骨髓细胞。

34. 权利要求 22-24 中任一项的方法，其中所述骨髓细胞为同种异体的骨髓细胞。

35. 权利要求 31-34 中任一项的方法，所述方法进一步包括鉴定患有糖尿病的患者。

36. 权利要求 31-35 中任一项的方法，所述方法进一步包括在胰岛细胞移植后监测所述患者。

37. 一种将胰岛β细胞植入患者的方法，所述方法包括:

在体外将胰岛β细胞和骨髓细胞一起培养；和

将培养的胰岛β细胞植入患者中。

38. 权利要求 31 或 37 的方法，所述方法进一步包括获得胰岛β细胞或骨髓细胞。

39. 权利要求 37 或 38 的方法，其中所述骨髓细胞为同种异体的骨髓细胞。

40. 权利要求 37-39 中任一项的方法，所述方法进一步包括鉴定需要移植胰岛β细胞的患者。

41. 权利要求 37-40 中任一项的方法，所述方法进一步包括在移植胰岛细胞后监测所述患者。

42. 一种药盒，其包括骨髓细胞和按照权利要求 1-41 中任一项的方法使用的说明书。

# 骨髓细胞用于长期培养胰腺胰岛细胞的用途

## 相关申请的参考

本申请要求保护 2006 年 11 月 21 日申请的美国临时专利申请序号 60/860,637 的优先权，该临时专利申请整体在此引入作为参考。

## 关于联邦支持研究的声明

本发明经国立卫生研究所(NIH)资助号 P20RR018757 得到美国政府支持。因此，美国政府拥有本发明的一定权益。

## 发明领域

本发明一般来说涉及胰岛细胞培养领域。更具体地说，本发明涉及骨髓细胞用于在移植前长期培养并可能扩增胰岛细胞的用途。本发明还包括在骨髓细胞存在下培养的胰岛细胞在患者中体内替代人胰岛功能的用途。

## 发明背景

糖尿病是一个重大且病例不断增长的全球性健康问题[1]。基于标准胰岛素的治疗方案尽管管理血糖水平，但不是治愈性的，患者仍遭受该病的许多长期并发症[2,3]。胰腺移植可治愈该病，但受限于组织可获得性和对免疫抑制疗法的响应[4]。为了保持胰岛细胞的存活力，需要由供体相对快速地收集胰腺。标准移植免疫抑制方案对胰腺移植物并非总是有效。而且，免疫抑制疗法可导致对肾脏的进一步伤害，这常常使需要胰腺移植的患者的功能受损。或者，胰岛β细胞移植可能有效，且几乎不需要猛烈的免疫抑制方案；然而，胰岛细胞的可用性不如胰腺[5]。一次成功的胰岛细胞移植经常需要由 2 个或 3 个供体收集细胞，这进一步限制了可通过该方法治疗的个体的数目。分离用

于移植的胰岛β细胞也是重要的。

在胰岛的分离、储存和运输过程中经历的事件与导致胰岛功能丧失并限制胰岛移植对糖尿病患者的治疗潜力的细胞死亡相关。采用β细胞胰岛移植方案的关键问题涉及在体外或体内难以保持存活的胰岛以及不能通过体外培养扩增胰岛组织。研究已表明，在由供体收获胰腺后尽快进行的由胰腺收获之间没有培养细胞时，胰岛细胞移植是最成功的。不出意料的是，在进行大部分移植的中心的移植也是最成功的。由于这种强有力的培养环境的缺乏，所以用于胰岛细胞移植的供体必须在组织收获时邻近较大的移植中心，受体必须生活在较大的移植中心附近，经常长时间等待一个以上的供体。

**发明概述**

本发明包括持续维持培养中的胰岛β细胞存活力、结构和/或功能的方法。所述方法包括将胰岛β细胞与骨髓细胞一起培养。发现骨髓细胞在降低炎性细胞因子释放和凋亡的同时，促进胰岛β细胞的生长和存活力，并改善β胰岛细胞的功能和形态。已表明胰岛细胞保持胰岛β细胞功能，这通过基础和诱导的胰岛素释放证实。脐血细胞和分离的外周 CD34+血细胞不能支持β胰岛细胞生长或增加存活。

本发明包括将胰岛β细胞与多种骨髓细胞一起培养以扩增培养的胰岛β细胞的方法，其包括降低共培养的凋亡的方法。发现骨髓细胞至少部分通过减少凋亡促进胰岛β细胞生长，也通过增加胰岛β细胞数促进胰岛β细胞生长。扩增胰岛细胞的能力是降低单个受体需要多个供体所必需的，从而潜在地允许广泛应用胰岛β细胞移植。

本发明包括将胰岛β细胞与多种骨髓细胞一起培养以促进培养中的胰岛聚集的方法。骨髓细胞刺激胰岛聚集的过程。

本发明进一步包括降低培养胰岛β细胞的细胞因子和其它炎性调节物的释放的方法。所述方法包括将胰岛β细胞与骨髓细胞一起培养。与没有骨髓细胞时培养的胰岛β细胞相比，胰岛β细胞与骨髓细胞的共

培养降低炎性细胞因子如白介素(IL)-1β的释放。这可能导致患者响应于胰岛β细胞移植的炎性反应下降。

本发明包括将胰岛β细胞与多种骨髓细胞一起培养以增加内分泌细胞特异性基因(包括胰腺特异性转录因子)的基因表达的方法。所述因子包括内分泌细胞特异性基因 GCG (胰高血糖素，α-细胞基因)、INS (胰岛素，β-细胞基因)和 SST (促生长素抑制素，γ-细胞基因)；以及β细胞胰腺和十二指肠同源框 1 转录因子(PDX1 或 IPF1)、神经元素 3 (NGN3)、成对盒基因 6 (PAX6)、胰岛-1 (ISL1)、v-maf 肌肉腱膜纤维肉瘤癌基因同源物 A (MAFa)和 Mist 1。所述方法包括将胰岛β细胞与骨髓细胞一起培养。所述方法进一步包括增加 NGN3 的表达，以增加β细胞再生。所述方法进一步包括通过增加 PDX1、IPF1、NGN3、PAX6、ISL1 和 MAFa 中至少一种的表达促进β细胞的长期存活。所述方法还包括通过增加 Mist1 的表达促进新胰腺组织组织化的方法。

本发明包括治疗需要胰岛细胞移植的个体的方法，其包括：获得胰岛β细胞，在骨髓细胞存在下培养胰岛细胞，并将合并的胰岛β细胞和骨髓细胞植入需要治疗的患者中。该方法包括移植骨髓，以通过直接移植在骨髓(优选自体骨髓)存在下培养的胰岛细胞，在需要治疗的患者体内改善和/或替代胰腺细胞功能，改善被降低的或丧失的胰腺细胞功能。需要胰岛β细胞移植的患者可为罹患 I 型或 II 型糖尿病的个体。糖尿病可为由于疾病或由于至少部分胰腺切除(如胰腺癌)而损害胰腺引起的。本发明可进一步包括选择或鉴定需要胰岛细胞移植或者需要改善或替代胰岛细胞功能的患者。本发明还可以包括监测患者的改善的胰腺活性。

本发明进一步包括实施本发明方法的药盒。所述药盒可以包括例如骨髓细胞或如何获得骨髓细胞的说明书，以及如何通过本发明的方法培养胰腺细胞的说明书。药盒可进一步包括在骨髓细胞存在下培养胰岛细胞的试剂，或者测定与骨髓细胞一起培养生长的胰岛细胞的存活力、功能和/或特征的试剂。

**附图简述**

**图 1a-1d**. 有或没有骨髓细胞培养 6 天或 156 天的胰岛细胞的相差显微镜检查(图像放大倍数 20x)。图 1a 显示了单独培养 6 天的胰岛β细胞。图 1b 显示了与骨髓细胞一起培养 6 天的胰岛β细胞。图 1c 显示了单独培养 156 天的胰岛β细胞。图 1d 显示了与骨髓细胞一起培养 156 天的胰岛β细胞。

**图 2a-c**. 使用细胞类型特异性标记进行的胰岛β细胞和骨髓细胞的免疫荧光和免疫组织化学分析。图 2a 显示了采用胰岛素原抗体(由箭头指示)、CD45 (骨髓细胞，由细箭头指示)(下图)的荧光免疫组织化学染色和采用 DAPI 的核染色。图 2b 显示了对胰岛素原(由粗箭头指示)和 CD45 (由细箭头指示)的免疫组织化学染色。(图像放大倍数 x40)。图 2c 为柱形图，显示了与第 28 天的骨髓-胰岛细胞共培养物相比单独的胰岛培养物中的胰岛素原阳性细胞数。(* = $p < 0.01$，n = 6)。

**图 3**. 在培养 153 天时使用细胞类型特异性标记进行的胰岛α和β细胞的免疫荧光分析。图像为相差显微镜检查(左图)和在胰岛表面(中图)和中间(右图)的共聚焦显微镜检查。α细胞用胰高血糖素抗体染色(由亮箭头指示)，β细胞用胰岛素原抗体染色(由暗箭头指示)。

**图 4a-b**. 有或没有骨髓细胞一起生长的胰岛β细胞的功能分析。图 4a 为经过一系列时间点的基础胰岛素分泌图。图 4b 为经过一系列时间点一直到第 204 天响应于高葡萄糖的胰岛素释放图。(* = $p < 0.01$，n = 6)。

**图 5a-f**. 培养胰岛的生长。图 5a 为测定的示意图。图 5b 显示了在不存在(上图)或存在(下图)骨髓细胞的情况下于格栅上生长的胰岛。图 5c 为定量培养胰岛生长的柱形图。(* = $p < 0.05$，n = 6)。图 5d 显示了在新生(左图)或重建(右图，超过 13 个月)过程中与骨髓细胞一起在栅格上生长的胰岛(放大倍数 5x)。图 5e 为在图 5d 的右图中显示的胰岛由培养的第 322 天至第 406 天的胰岛素释放图。图 5f 为在第 360 天、

第 369 天和第 399 天响应于高葡萄糖刺激的胰岛素分泌图。仅胰岛的培养物于相同的时间点没有检测到胰岛素分泌。

**图 6**. 使用细胞类型特异性标记于第 153 天进行的有或没有骨髓细胞的胰岛β细胞培养物的形态和免疫荧光分析。左图图像为有(上图)或没有(下图)骨髓细胞一起培养的胰岛β细胞的相差显微镜检查。右图图像为采用 Ki67 和胰岛素原(由箭头指示)的抗体的荧光免疫组织化学。(图像放大倍数 x20)。

**图 7a-e**. 使用细胞类型特异性标记于第 190 天进行的与骨髓细胞一起的胰岛β细胞培养物的形态、免疫荧光和功能性分析。图 7a 为由与骨髓细胞培养 190 天的胰岛产生的组织的图像，条棒代表 1 cm。所述组织为约 1.8 cm 长，具有清晰的 3 维结构。图 7b 和 c 为与图 7a 中所示相仿的冷冻组织的 5 μm 横断切片。图 7b 显示了采用苏木精和曙红的组织化学染色，以揭示组织结构。箭头指示在切片中出现的被多孔支架样组织环绕的胰岛样结构。图 7c，采用抗人胰岛素原抗体的免疫荧光染色(由 b 箭头指示)、采用抗人胰高血糖素抗体的细胞(由箭头 a 指示)和核染色 DAPI。图 7d 为柱形图，其显示了没有(I)或有(B+I)骨髓细胞的培养胰岛β细胞于第 190 天的基线胰岛素释放。图 7e 显示没有(I)或有(B+I)骨髓细胞的培养胰岛β细胞于第 190 天响应于葡萄糖刺激的胰岛素释放的柱形图。($p < 0.05$，相对于只有胰岛的培养物。图像放大倍数 20x)。

**图 8**. 在共培养的前 48 小时过程中使用活细胞膜染料进行的胰岛β细胞和骨髓细胞的免疫荧光分析。将用 PKI-26GL 标记的人骨髓细胞与用 PK-2GL 染色的胰岛共培养，并用对核染色特异性的抗胰岛素原抗体和 DAPI 进行免疫组织化学染色，以研究培养中骨髓细胞和胰岛β细胞之间的相互作用。图 8a 显示了 7 小时后的细胞。图 8b 显示了 24 小时后的细胞。图 8c 显示了 48 小时后的细胞。图 8d 显示了 96 小时后的细胞。(图像放大倍数 x20，箭头指示骨髓和与β细胞一起的骨髓共定位)。

**图 9a-j**. 在将骨髓细胞和胰岛β细胞引入共培养后以 20 分钟间隔记录时间间隔显微镜检查的图像。分别用 PKH26 和 PKH 2 单独地标记骨髓细胞和胰岛细胞，然后一起培养。图像 a-j 为 96 小时培养当中的一幕。粗箭头指示骨髓，细箭头指示胰岛中的骨髓释放物质。(图像放大倍数 x20)。

**图 10a-f**. 记录在栅格上彼此迁移(图 10a-d)并最终融合(图 10e)的 3 个胰岛细胞的时间间隔显微镜检查的图像。图 10f 得自其中标记骨髓细胞的单独实验，该实验显示了骨髓细胞迁移入一体化的胰岛中。

**图 11**. 使用细胞类型特异性标记于不同时间点进行的胰岛β细胞与骨髓细胞共培养物的培养基中的 IL-1β水平。图 11a 图示了培养物中的 IL-1β释放。图 11b 图示了在高葡萄糖(20 mM)刺激后在培养物中的 IL-1β释放。($n = 6$，$* = p < 0.001$)。

**图 12**. 使用细胞类型特异性标记于特定时间点进行的与骨髓细胞一起的胰岛β细胞共培养物的凋亡的免疫荧光分析。图 12a 显示了依据(TUNEL)测定评价在没有(I)或有(B+I)骨髓细胞的培养物中的胰岛β细胞凋亡的免疫荧光分析。用胰岛素原抗体于 7 小时(7H)、48 小时(48H)和 3 周(3W)培养期进行荧光免疫组织化学染色指示胰岛β细胞。图 11b 为在所示时间以百分率定量凋亡细胞对总β细胞的图示。($n = 24$，$* = p < 0.01$)。

**图 13**. 支持培养中的胰岛β细胞功能的非骨髓细胞类型的分析。图 13 为单独地或与脐血细胞、外周血细胞或外周血 CD34+细胞共培养的胰岛β细胞在 31 天时间段内的胰岛素释放图。

**图 14**. 在糖尿病小鼠模型体内评价共培养的胰岛β细胞和骨髓细胞。图 14 为在用单独培养的胰岛β细胞或与骨髓细胞共培养的胰岛β细胞移植的小鼠的血糖水平图。

**图 15a-f**. 骨髓促进胰岛β细胞迁移的体外证实。胰岛聚集形成的时间间隔显微镜检查图像。图 15a-e，放大倍数 5x。在图 15f 中的胰岛表面上的暗色指示骨髓细胞迁移入胰岛中。(放大倍数 20x)。

**图 16a-c**. 图 16a 为在没有或有骨髓细胞一起培养的胰岛β细胞中的 GCG 和 INS 表达水平变化倍数图。图 16b 为在没有或有骨髓细胞一起培养的胰岛β细胞中的 SST 和 NGN3 表达水平变化倍数图。图 16c 在没有或有骨髓细胞一起生长的胰岛β细胞中的 IPF1、ISL1、PAX6、MIST1 和 MAFA 表达水平变化倍数图。

**定义**

“持续期”或“持续时间段”被理解为这样的时间段：其足以保存胰岛β细胞，使得胰岛β细胞的胰岛素释放功能保留，优选伴有胰岛组织生长。在某些实施方案中，所述持续期为至少约 30 天，优选至少约 60 天，更优选至少约 90 天，再更优选至少约 120 天。

“胰岛β细胞功能”可通过众多测定中的任一种定义，所述测定包括但不限于形态测定、免疫组织化学测定和功能测定。在优选的实施方案中，胰岛β细胞功能通过静息细胞中或响应于葡萄糖的胰岛素释放测定的活性定义。在更优选的实施方案中，胰岛β细胞被定义为具有在约 20-100 个胰岛中在 30 分钟内(响应于采用 20 μM 葡萄糖的处理)释放至少约 150 单位的胰岛素(IEQ)的功能。确切测定胰岛细胞功能的方法不是本发明的限制因素。

“增加的胰岛β细胞存活力”被理解为在单个时间点或随时间变化观察到的较低的细胞死亡率，优选与其中胰岛β细胞在没有骨髓细胞的情况下培养的对照培养物相比。依据本领域技术人员已知的方法(例如锥虫蓝染色排除)测定活细胞数，以鉴定活细胞，并使用血细胞计数器进行细胞计数，以确定在特定面积或容量中的活细胞数。也可以使用众多市售可得的凋亡测定或通过本领域技术人员已知的方法测定细胞存活力。与对照样品相比样品中的凋亡细胞百分率较低表明胰岛β细胞存活力增加。凋亡测定可与免疫组织化学染色组合，以证实胰岛β细胞的一致性。测定胰岛β细胞存活力的具体方法不是本发明的限制因素。

本文所理解的“胰岛”为在胰腺中存在的细胞聚簇，其分泌胰岛素和其它激素，并形成器官的内分泌部分，有时被称为郎格罕氏岛。胰岛占胰腺质量的约 1-2%。在健康成人胰腺中有约 100 万个胰岛，其在整个器官中均匀分布，它们的合并重量为 1-1.5 克。每个胰岛均含有约 1000 个细胞，直径为 50-500 μm。产胰岛素的β细胞占胰岛细胞的约 65-80%，释放胰高血糖素的α细胞占胰岛细胞的约 15-20%。胰岛细胞还包括产促生长素抑制素的δ细胞(约 3-10%)和含胰腺多肽的 PP 细胞(1%)。

“获得细胞”在本文被理解为制备、购买或以其它方式获得细胞。

在“胰岛β细胞扩增”中的术语“扩增”被理解为随着时间推移增加培养物的存活的和/或功能性的胰岛β细胞的数量。扩增可通过促进既有的胰岛β细胞中的细胞分裂或骨髓细胞转变为胰岛细胞或这二者而发生。

术语“(在)培养物中”或“培养”或“(在)培养中”可被理解为包括在适宜的温度、$CO_2$ 和营养物条件下细胞在例如有盖培养皿中的生长。细胞例如可在诸如来自动物、植物或海藻的天然或人工蛋白基质存在下培养。在适宜的上下文中，培养例如可被理解为细胞在非天然条件下的生长。例如，细胞可在植入诸如小鼠的动物中的培养生长，包括在动物的特定器官中的培养生长，或在转移入动物之前在离体器官培养中培养生长。

在“保留/保持胰岛β细胞功能”中的术语“保留”或“保持”被理解为包括与没有骨髓细胞时培养的胰岛β细胞相比胰岛β细胞存活力增加，和/或胰岛β细胞功能改善，和/或胰岛β细胞形态改善。

术语“患者”是指活体生物。在某些实施方案中，活体生物为动物。在某些优选的实施方案中，患者为哺乳动物。在某些实施方案中，患者为驯养的哺乳动物。在某些实施方案中，患者为人。患者包括人、猴、狗、猫、小鼠、大鼠、牛、马、山羊和绵羊。所述患者可被诊断为患有糖尿病。在其它实施方案中，所述患者已被诊断为具有一些其

它胰腺疾病。

术语“选择患者”或“鉴定患者”被理解为基于具体特征选择混合的个体群体中的一个或多个成员，所述具体特征包括但不限于体症、依据诊断方法确定的临床特征。

术语“监测患者”被理解为在植入胰岛细胞之后，优选在植入胰岛细胞之前和之后观察患者的改变的胰岛细胞功能，优选改善的胰岛细胞功能。

本文提供的范围被理解为所述范围内所有值的简略表达。例如，1-50 秒的时间被理解为包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49 或 50 秒。

除非另有说明或由上下文显而易见，否则本文使用的术语“或”被理解为是包括端点的。

除非另有说明或由上下文显而易见，否则本文使用的术语“一个”、“一种”、“所述”和“该”被理解为是单数或复数。

**发明详述和优选的实施方案**

在本研究中，研究同种异体骨髓在体外支持供体人胰岛的内分泌功能的能力。已表明人胰岛β细胞和同种异体骨髓的共培养增加胰岛存活和功能，最后形成的新胰腺内分泌组织能够维持微环境，以保持胰岛结构和β细胞功能。

已表明骨髓细胞能够在降低胰岛细胞的炎性细胞因子如 IL-1β释放的同时刺激胰腺内分泌组织生长。与骨髓细胞共培养还减少胰岛细胞凋亡。最终表明骨髓细胞在长期培养(超过 13 个月)下将人胰岛细胞重建成功能性胰腺内分泌胰岛组织。这些作用被发现是骨髓特异性的。脐血细胞和/或分离的外周血 $CD34^+$细胞对于在体外维持胰岛功能或存活无益。这表明，骨髓在支持人内分泌胰腺组织方面提供了独特

的优势，该优势可显著改善实现胰岛素非依赖性的成功率。

本发明包括胰岛β细胞与骨髓细胞的共培养物。然而，在优选的实施方案中，比率为约 25-100 个胰岛对约 1-5×$10^6$个骨髓细胞。要理解的是，胰岛对骨髓细胞的其它比率是可能的，培养物可以包括其它的细胞类型，例如骨髓基质细胞、间充质细胞和胰腺α细胞。

尽管不希望受到作用机制的束缚，但数据提示，骨髓细胞通过降低胰岛细胞的细胞因子释放(包括 IL-1β)增加胰岛细胞的形态、存活力和/或功能。这已被提出导致炎性因子释放下降和凋亡或细胞死亡下降。还表明共培养增加胰腺特异性基因和与再生相关的生长因子的表达。本文公开的数据提示，尽管某些骨髓细胞呈现β细胞的表型，但可能是已证实的存活和生长作用的较小组分。更有可能的是本发明的共培养方法的已证实的抗凋亡作用基于旁分泌作用，其中一种旁分泌作用可为抑制炎性细胞因子白介素-1β [25,28-30]。由骨髓旁分泌生长因子刺激的胰岛细胞增殖和生长有可能是促成重构胰岛组织的主要因素[20,31-33]。

本发明不限于胰岛β细胞与完整骨髓的共培养。通过梯度、细胞表面标记和其它方法进行细胞分拣的方法是本领域技术人员众所周知的。预期一个或多个亚群骨髓细胞可在一定持续培养期内有效提升培养胰岛β细胞存活力、形态和功能。所述方法同样不受细胞源限制。要理解的是，同种异体胰岛β细胞和骨髓细胞的共培养方法可用于任何哺乳动物胰岛β细胞和骨髓细胞的培养。术语“哺乳动物”在本文用于指温血动物，例如啮齿动物、兔或灵长类动物患者，尤其是人类患者。特定的目标啮齿动物和灵长类动物包括代表公认的人类疾病模型的那些动物，包括猪、黑猩猩、绵羊、山羊、马、小鼠、大鼠、兔和猴。特定的目标人患者包括患有、怀疑患有或有风险患有胰腺细胞功能下降或丧失的那些患者。而且，包括在得自裸小鼠或没有免疫系统的其它哺乳动物的骨髓中培养人胰岛细胞的方法在本发明的范围内。

本文公开的数据表明，同种异体人骨髓与β-细胞胰岛的共培养允许随着胰岛组织生长在体外保持胰岛数和胰岛素释放功能达某一持续期(包括 13 个月以上)。在先前的研究中，培养的人胰岛一般在 3-4 周后失去功能和存活力[27]。在这些研究中，胰岛中的细胞包括α和β细胞，其保持了基线胰岛素生产和对葡萄糖挑战的响应。这些观察结果提示使用与同种异体骨髓细胞的共培养物进行胰岛细胞移植的直接策略。然而，本发明的方法不限于在胰岛细胞培养生长后使用所述胰岛细胞。

本发明由以下的实施例进一步阐述。提供这些实施例是为了帮助理解本发明，不能被视为限制本发明。在整个申请中提及的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及图都整体在此引入作为参考。

## 实施例

### 实施例 1-细胞染色方法

使用荧光和化学染料进行细胞染色和免疫荧光的方法是本领域技术人员众所周知的。众多的实例包括这样的染色方法。提供示例性的细胞染色方法。用 3%多聚甲醛固定在腔室载玻片上生长的细胞，接着使细胞接触 10%正常山羊血清。在不洗涤的情况下印迹载玻片，施加原初抗体混合物，然后在湿润的腔室中于 4°C 温育载玻片过夜。洗涤载玻片 3 次，之后于室温接触第二抗体 45 分钟。在洗涤后，施加稀释的第二抗体，温育载玻片 15 分钟。随后用 PBS 彻底洗涤载玻片，以上过程任选地用第二种荧光颜色(例如 DAPI)和/或第三抗原检测抗体重复。在结束该过程时，用荧光封片介质和盖玻片覆盖载玻片。然后使用共聚焦荧光显微镜观测样品并拍照[22]。

### 实施例 2-人骨髓和人胰岛β细胞的共培养

来自正常供体的人胰岛组织得自宾夕法尼亚大学人类胰岛实验

室 ICR 基础科学胰岛分配计划(ICR Basic Science Islet Distribution Program, Human Islet Laboratory, University of Pennsylvania (Philadelphia, PA))的胰岛资源中心(Islet Resource Centers (ICR))、Joslin 糖尿病中心(Joslin Diabetes Center (Boston, MA))和希望之城国家医疗中心(City of Hope National Medical Center (Duarte, CA))。这些细胞的使用得到 Roger Williams 医院(Roger Williams Hospital)的 IRB 和 ICR 委员会的批准。

来自正常供体的人骨髓在签署已被 Roger Williams 医院机构审查委员会(Roger Williams Hospital Institutional Review Committee (IRB))批准的适宜知情同意书后获得。按照生产商的指引通过 Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences; Amersham, UK)分离骨髓单核细胞。然后用 5% FCS/PBS 洗涤细胞 2 次，重悬浮在培养基(参见下文)中。使用锥虫蓝染色评价细胞存活力。

在志愿供体死亡后 48 小时内由胰岛细胞资源中心(ICR)得到人胰岛(纯度 > 90%，存活力 > 95%)。于湿润的 37°C 温育箱、5% $CO_2$ 中在补加 10%热失活胎牛血清(HiFBS)、5.5 mM 葡萄糖、10 mM HEPES 和 1% P/S 的 RPMI 1640 (生产商)中培养 50 胰岛当量(IEQ)/ml 和 $1 \times 10^6$ 个/ml 同种异体全 BM 细胞。

图 1a-d 显示了在没有(a 和 c)或有(b 和 d)骨髓细胞的情况下培养 6 天(a 和 b)或 156 天(c 和 d)的胰岛β细胞。在仅 6 天后就看到形态差异。在没有骨髓细胞的情况下培养的细胞开始形成单层(图 1a)，而在骨髓细胞存在的情况下培养的细胞没有显示出相似的形态损失。骨髓细胞环绕在胰岛细胞周围，以保护胰岛细胞膜，并防止胰岛细胞扩散(图 1b)。形态差异在第 156 天甚至更显著。在没有骨髓细胞的情况下培养的细胞形成单层(图 1c)，而在存在骨髓细胞的情况下培养的细胞形成圆形胰岛(图 1d)。

图 2a-b 显示了在没有(左图)或有(右图)骨髓细胞的情况下培养至第 28 天的胰岛β细胞。用 0.05%胰蛋白酶(Promega, Madison, WI)消化

胰岛 5 分钟。在用 PBS 洗涤 1 次后，制作细胞的 cytospin 切片。在图 2a 的上图中的细胞用 DAPI 染色，以显现核。在下图中的细胞用靶向胰岛素原和骨髓细胞标记 CD 45 的抗体染色，并用在成像时表现为不同颜色的第二抗体显现。

与骨髓共培养物(右图)相比，在单独的胰岛细胞培养物(左图)中的细胞数显著较少。而且，在仅胰岛细胞的培养物中，没有显示出许多细胞表达胰岛素原(即，被 DAPI 染色，但没有被抗 CD45 抗体染色)。

在右图中，由向下粗箭头指示的相对大的细胞聚簇对胰岛素原染色，并带有某些混杂的 CD45 染色，提示在聚簇中存在一些骨髓细胞。向上细箭头指示用 CD45 抗体染色的细胞。在针对 CD45 染色的共培养物中的大部分细胞不对胰岛素原染色，表明它们是骨髓细胞。

为证实免疫荧光分析的观察结果，使用免疫组织化学方法染色细胞。用不同的发色团染色表达胰岛素原的细胞和表达 CD 45 的细胞。此外，在单独的骨髓培养物中的大量胰岛细胞不表达胰岛素原，而在共培养物中的非骨髓细胞几乎全部都表达胰岛素。胰岛素原染色在左图中由箭头指示，右图中更向右的箭头指示。CD45 染色在左图中由图中更向左的箭头指示。此外，在共培养物中观察到细胞更有活力和胰岛素原染色更强。

胰岛素原阳性胰岛的百分率的定量分析示于图 1c。发现相比于单独的胰岛细胞培养物，共培养物中显著更大量(2.7 倍高)的胰岛细胞表达胰岛素原($p < 0.01$，$n = 6$)。

图 3 显示了培养 153 天形成的胰岛。左图是胰岛的相差图像。中图和左图分别是胰岛顶部和中心的共聚焦图像。α细胞用胰高血糖素的抗体染色，并由向着细胞质中心的箭头指示，β细胞用靶向胰岛素原的抗体染色，并由向着细胞质外周的箭头指示。α细胞响应于低血糖释放胰高血糖素。由共聚焦图像清楚可见，β细胞围绕着α细胞。该分析证实，β细胞占细胞群的大部分，α细胞定位在胰岛的中心部分，提示在这些培养物中发生重建[23,24]。

这些结果清楚地证实，骨髓细胞可用于在一定持续时间体外维持胰岛的形态和维持胰岛细胞特异性标记的表达。

**实施例 3-在胰岛素释放测定中评价胰岛功能**

通过在有或没有葡萄糖挑战的情况下检测胰岛素释放从而评价胰岛细胞功能。每周收集 2 次培养基，并储存于-80°C，直至通过 ELISA 测定基础胰岛素释放。

如下每周 1 次进行高葡萄糖挑战测定：收集培养基，用 RPMI 培养基洗涤 1 次培养的细胞。然后用高葡萄糖(20 mM) RPMI 1640 置换培养基达 15 和 30 分钟。最后收集培养基，并储存于-80°C，直至通过 ELISA 进行胰岛素测定。

使用人胰岛素 ELISA 试剂盒(Linco Research, St. Charles, MO)按照生产商的说明检测标本(细胞培养基或组织提取物)中的胰岛素浓度。简而言之，将胰岛素标准品和适宜稀释(1:50-1:500)的样品加至包被胰岛素抗体的 96 孔微量滴定板，并于 4°C 温育 2 小时。在洗涤后，将抗人胰岛素酶缀合物加至每个孔，于室温温育 30 分钟。在洗涤后，加入酶底物溶液，然后于室温在黑暗中温育 45 分钟。通过加入 1 N 硫酸终止反应。用 μQuant™微量读板器(Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT)读取 450 nm 的吸光度，并通过 KC Junior®微量读板器软件(Bio-Tek Instruments, Inc.)计算浓度[20]。

使用基础胰岛素释放测定和响应于高葡萄糖挑战的胰岛素分泌测定来测定细胞的功能完整性。这些测定证实，与骨髓细胞共培养的胰岛在培养中以稳定方式释放胰岛素达 204 天(图 4a)。胰岛素释放水平由开始时的约 8000 μU/ml 至培养 195 天时的约 10,000 μU 几乎是稳定的。随时间推移而增加的人胰岛素释放提示，胰岛细胞随着时间推移而再生和/或扩增。

单独培养的胰岛显示出不稳定的胰岛素释放(图 4a)，开始时为平均约 9,500 μU/ml，由高约 17,500 μU/ml 显著变化，至培养 28 天时快

速下降约 4,900 μU/ml，并至第 5 周丧失功能。结合形态学研究，峰值处于第 15 和 28 天的这些发现可能归因于单独培养的胰岛中的垂死β细胞泄漏胰岛素。以类似的方式，在共培养的前 21 天观察到的相对低的基础胰岛素释放可能归因于在达到功能稳定之前垂死的β细胞极少。

对葡萄糖挑战(20 mM)下的胰岛素分泌进行评价揭示，与骨髓细胞一起培养的胰岛细胞能够在培养中响应于葡萄糖达 204 天，相比之下，单独的胰岛细胞培养物至第 42 天基本上丧失其响应于高葡萄糖挑战的能力，至第 70 天完全丧失(图 4b)。就胰岛素释放和响应于葡萄糖挑战的胰岛素而言，仅胰岛的培养物和胰岛加 BM 之间的差异是统计学显著的($p < 0.01$，$n = 6$)。

**实施例 4-胰岛β细胞与骨髓细胞的共培养促进细胞生长和胰岛团形成**

通过在没有或有骨髓细胞的情况下在栅格上培养胰岛β细胞监测细胞生长和胰岛细胞形成。在栅格上的胰岛细胞示意图如在图 5a 中所示。使用栅格可监测单个胰岛随着时间推移的生长。跟踪胰岛细胞，并以显微照片记录形态变化。使用 NIH 图像分析软件定量胰岛表面积(像素值)。3 个胰岛表面值的平均值被视为 1 个样品，每组收集 6 个样品。

在培养的前 3 周，尽管存在显著的功能差异，但在有和没有骨髓细胞一起培养的胰岛之间几乎没有观察到形态差异(未显示)。然而，在 3 周后，在骨髓细胞存在下培养的胰岛继续扩增，而在没有骨髓细胞的情况下培养的胰岛收缩，并且它们最终消失(图 5c)。使用图像分析软件定量胰岛和细胞大小的变化。结果证实，与胰岛一起的骨髓共培养导致在 17 天的时间段内(由第 54 天至第 71 天)它们的表面扩增达 1.8 倍。这与其中细胞显示出尺寸基本没有增加和没有胰岛形成的仅胰岛的培养物相比是显著差异(图 5c，$p < 0.05$，$n = 6$)。

图 5d 显示了在栅格载玻片上在新生早期(左图)和共培养 13 个月

(右图)中的胰岛细胞生长。在栅格载玻片上容易观察到随着时间推移共培养物中的胰岛大小显著增加。胰岛大小增加可为以骨髓细胞刺激胰岛增殖的结果，所述骨髓细胞通过其显著的 Ki67 表达来鉴定(图 6)。

图 5e 和 f 证实，胰岛细胞在培养 13 个月后保持功能性。如上进行功能测定。观测胰岛素释放的观察期为 406 天(图 5e)。在如所示的第 360 天、第 369 天和第 399 天观测响应于高葡萄糖的胰岛素分泌(图 5f)。这些数据证实，在骨髓存在下生长的胰岛β细胞的功能维持达至少 13 个月。

**实施例 5-胰岛β细胞与骨髓细胞的共培养促进增殖**

图 6 显示了在培养 153 天后有(上图)或没有(下图)骨髓细胞一起培养的胰岛β细胞培养物。左图为相差图像。在右图中，细胞用胰岛素原和细胞增殖标记 Ki67 染色。核用 DAPI 显色。上图表明，依据大的胰岛素原染色细胞聚簇，细胞已发展出胰岛形态，并通过显著的胰岛素原染色证实正在增殖。还观察到许多的 Ki67 染色斑点，包括由箭头指示的细胞。下图显示出相对均一的单层，几乎没有胰岛素原或 Ki67 染色。在胰岛培养物中，基本上仅通过 DAPI 染色显现出细胞。这些图像证实，在骨髓细胞存在下培养的胰岛β细胞在培养中表达胰岛素原、形成胰岛并增殖持续一定时间。相反，在单独的胰岛β细胞培养物中没有观察到特定的胰岛形态。同样，在单独的胰岛β细胞培养物中几乎没有观察到胰岛素原或 Ki67 染色。

**实施例 6-胰岛β细胞与骨髓细胞的共培养促进宏观胰岛形成**

在长期培养胰岛β细胞和骨髓细胞后，形成宏观组织。图 7a 显示了由与骨髓细胞培养 190 天的胰岛细胞产生的组织。条棒代表 1 cm。该组织为约 1.8 cm 长，具有清晰的 3 维结构。由相仿的组织样品制备 5 μm 的冷冻切片，并用苏木精和曙红染色，以揭示组织的形态(图 7b)。组织染色表明，组织具有在切片中出现的、由多孔支架样组织围绕的

胰岛样结构(箭头指示)。发现所述组织的胰岛素含量为 56307 μU/mg 蛋白(ELISA 测定)。通过荧光免疫组织化学表明，该胰岛样组织主要含β细胞和少量α细胞(图 7c)。胰岛β细胞用胰岛素原抗体染色(由箭头 a 指示)，α细胞用胰高血糖素抗体染色(由箭头 b 指示)，核用 DAPI 染色。

使用上述方法分析所述组织的基础胰岛素释放和诱导的响应于高葡萄糖的胰岛素分泌。正如所料，在胰岛β细胞-骨髓共培养物中形成的组织表现出基础胰岛素释放(图 7d)和诱导的响应于高葡萄糖的胰岛素分泌(图 7e)。由相同年龄的仅胰岛β细胞的培养物中的细胞基本上未观察到胰岛素分泌。这些数据表明，胰岛β细胞与骨髓细胞的共培养允许形成更高级的三维结构，其具有胰岛样结构和功能。

**实施例 7-骨髓细胞与胰岛细胞共培养物的相互作用**

使用组织化学和免疫荧光分析进一步证实骨髓细胞保存培养中的胰岛β细胞的能力。PKH 细胞标记试剂盒(Sigma, St. Louis. MO)用于标记骨髓和胰岛β细胞，以监测细胞类型之间的相互作用。PKH 染料可用于活细胞标记，而不影响细胞的形态或功能。染料为连接至长亲脂性尾的荧光标记，该长亲脂性尾整合入膜中，留下发荧光的部分暴露在细胞表面附近。所述染料允许跟踪群体中的两类活细胞。按照生产商的说明，将 4 μM PKH 26 (PKH26GL)和 PKH 2 (PKH2GL)分别与 $1\times10^6$ 个骨髓细胞和 50 个胰岛温育 3 分钟。用 PBS 单独洗涤细胞。通过加入 1 ml 冷的 1% BSA 的 PBS 溶液终止染色。温和沉淀细胞，并在 PBS 中重悬浮 5 次。以除去任何未结合的染料。在完成标记后，在上述条件下共培养骨髓细胞和胰岛。

在培养 7、24、48 和 96 小时后收集细胞。用靶向胰岛素原的抗体染色细胞。观察到在 7 小时时(图 8a)骨髓细胞(粗箭头)紧密靠近胰岛，并在 24 小时时主动迁移入胰岛中(图 8b)。在 48 小时后，骨髓细胞出现粘附至胰岛中的β细胞(图 8c，插图高放大倍数)。高放大倍数的

图像表明骨髓细胞与胰岛β细胞相互作用。而且，如在左上角高放大倍数图像中所示，在培养 96 小时时，骨髓细胞出现将β细胞培育汇合在一起，形成如在显微照片中所见的完整胰岛(图 8d，插图高放大倍数)。人们可在任一侧观察到与胰岛β细胞缔合的骨髓。

还利用实时时间间隔显微镜检查和活体染料分析骨髓细胞与胰岛β细胞的相互作用，以监测 64 小时内培养物中的骨髓细胞和人胰岛，图像每 20 分钟记录 1 次(图 9)。骨髓细胞(粗箭头)逐渐靠近胰岛移动，如在图 9a、b 和 c 中所见。这之后为骨髓细胞进入胰岛聚簇中，如在 d、e 和 f 中所见。骨髓细胞逐渐由胰岛向外移动，如在 g、h、i 和 j 中所见(细箭头)。所述图像清楚表明，BM 细胞与胰岛细胞接触，并将物质释放到胰岛细胞附近。

还观察到与胰岛β细胞共培养的骨髓细胞在更长时间段内迁移，让人们了解到骨髓是如何参与胰岛再生的。在图 10 中，在 3 小时的共培养物(图 10a)中与人胰岛(大聚簇)分离的、用活体染料 PKH-26 标记的人骨髓细胞(用箭头指示)在 30 天培养后迁移入胰岛中(图 10b)，并在 60 天培养物中形成围绕着胰岛的囊样组织(图 10c)。仅胰岛的培养物在 3 小时时没有显示出任何红色(图 10d)，在 30 天时培养物中的胰岛变成单层(图 10e)，并在 60 天时保持如此(图 10f)。(放大倍数 x20)。

**实施例 9-胰岛β细胞与骨髓细胞的共培养抑制细胞因子释放**

已知由人胰岛产生并释放的 IL-1β在胰岛存活和功能中起关键作用[25,26]。为评价 IL-1β在胰岛培养物存活中的作用，在有和没有骨髓细胞的情况下检测胰岛β细胞培养物中的IL-1β水平。使用对人IL-1β特异性的 ELISA 试剂盒，在单独培养胰岛时，证实胰岛的 IL-1β释放逐渐增加。细胞因子生产水平由在接种培养物时的检测不到的水平增加至培养 63 天后的 25 倍增加。这与其中 IL-1β水平非常低的、和骨髓细胞一起培养的胰岛相反(图 11a)。进一步评价在高葡萄糖挑战存在时的 IL-1β释放表明，IL-1β释放水平在单独培养的胰岛中增加 1500

倍，而在胰岛与骨髓一起培养时，IL-1β水平保持得非常低(图 11b)。

**实施例 10-胰岛β细胞与骨髓细胞的共培养促进细胞存活**

胰岛β细胞凋亡被视为在体内和体外的β细胞损失的主要原因，分析人胰岛存活和功能的骨髓调节是否与培养的胰岛的凋亡过程相关。使用末端脱氧核糖核苷酸转移酶(TDT)介导的 dUTP-地高辛缺口末端标记(TUNEL)法(Clone ApoAlert™ DNA 片段化测定试剂盒 BD Clontech)按照生产商的说明检测凋亡的细胞核。简而言之，以 3%多聚甲醛固定人胰岛制备物，并在 0.3% $H_2O_2$ 的甲醇溶液中温育 5 分钟，以封闭内源过氧化物酶。将载玻片与 TdT 温育缓冲液于 37°C 温育 2 小时，并用 2 x SSC 终止。还用抗人胰岛素原抗体染色细胞。在没有先前治疗方案的信息的情况下，通过计算凋亡细胞总数除以胰岛素阳性细胞总数来分析凋亡细胞。结果由自每个载玻片随机拣选的 10 个以上胰岛的检测计算，每个样品检测总共 4 个载玻片[21]。

检验凋亡由培养开始起随时间的变化揭示，早在 7 小时时，骨髓细胞就保护胰岛免于凋亡，并且该作用在与没有骨髓的情况下培养的胰岛相比时是显著的(图 12a 和 b)。图 12a 显示了在仅胰岛(I)的培养物中于 7 小时时开始的显著 TUNEL 染色(上行)。骨髓细胞保护胰岛细胞免于凋亡随着培养时程增加变得更明显，例如与 48 小时和 3 周时的细胞相比。尽管可在 8 小时时观察到一些非凋亡细胞，但在 3 周时于仅胰岛的培养物图像中几乎没有鉴定出一个非凋亡细胞。这与其中细胞在所有观测时间点都似乎是基本上非凋亡的胰岛+骨髓(I+B)培养物明显不同(下行)。定量实验结果，培养物中的凋亡细胞百分率示于图 12b，反映出图像中所显示的证实骨髓对胰岛细胞几乎即时的保护作用。

**实施例 11-在脐血细胞或 CD 34+外周血细胞存在下共培养胰岛β细胞**

为评价除 BM 之外的细胞对胰岛功能的作用，将全脐带血细胞、

流动的外周血细胞和流动的外周 CD 34+细胞与胰岛在和上述 BM 培养相同的条件下培养，以确定它们是否可支持胰岛β细胞生长并促进胰岛形成。在所示培养天数后，分析胰岛素释放(图 13)。胰岛胰岛素释放检测的数据表明这些细胞和仅胰岛的培养物之间没有显著差异，这表明 BM 细胞可在胰岛细胞存活方面提供独特的优势。

**实施例 12-使用与骨髓细胞共培养的胰岛细胞在糖尿病小鼠模型中重建胰腺功能**

为评价与骨髓细胞共培养的胰岛细胞可在糖尿病小鼠模型中用于胰岛细胞移植方法，使用在单独地或者与骨髓共培养 3 周的培养物中保持的胰岛细胞进行胰岛细胞移植。以 STZ 200 mg/kg 体重(腹膜内)注射小鼠(8 周龄，雄性 Balb/c SCID 小鼠)，以诱发糖尿病，所述糖尿病定义为所具有的血糖水平在 3 天内始终超过 400 mg/dL。将没有(I3W = 1500 个胰岛(IEQ))或有骨髓(I3W = 1500 个胰岛(IEQ)和 $1\times10^6$ 个骨髓细胞)培养的人胰岛细胞植入左肾包膜下。监测血糖水平(图 14)。

在 4 个月后，移植骨髓共培养的胰岛细胞的动物具有正常的血糖水平，血液具有可检测的人胰岛素水平(157 μU/ml)。移植在单独的培养物中生长的胰岛细胞的动物保持低血糖。这些数据强烈提示，胰岛素响应被在骨髓共培养物中生长的移植胰岛替代，但没有被在仅胰岛的培养物中生长的胰岛替代。

为确保血糖控制被移植的细胞诱导，取出含有移植的细胞的肾脏。作为响应，动物变成高血糖的。这些数据证实了与骨髓细胞共培养的胰岛细胞用于胰岛细胞移植以及治疗和/或改善糖尿病的用途。

**实施例 13-胰岛β细胞与骨髓细胞的共培养有利于胰岛聚集**

骨髓有利于胰岛聚集。先前的数据已表明，在共培养物中形成显著的胰腺组织，该组织可由胰岛聚集物的骨髓刺激产生。得自时间间隔显微镜检查图像(图 15)的数据表明，骨髓刺激胰岛聚集的过程和一

体化胰腺组织的形成。在培养物下使用栅格能够以每周 1 次获取的活体显微镜图像鉴定和监测单个胰岛迁移。

在图 15a 中，3 个胰岛在栅格的中心区域是可见的。在图 15b、c 和 d 中，3 个较大胰岛中的 2 个彼此相对迁移，并在图 15e 中最终合成一体，形成更大的胰岛(放大倍数 = x5)。在用活体染料 PKH-26 (在单独的实验中)标记骨髓后，发现骨髓迁移入一体化的胰岛中，并形成囊化的重建胰岛(图 15f)(放大倍数 = x20)。

**实施例 14-在没有和有骨髓的情况下培养的胰岛细胞中的基因表达的分析**

分析在单独的胰岛(胰岛)或者胰岛和骨髓共培养(胰岛+B)中培养的人胰岛β细胞中的基因表达。使用采用基因特异性引物的 RT-PCR 分析内分泌细胞特异性基因表达和再生转录因子基因的表达水平。培养细胞 209 天，分离总 RNA 并逆转录，使用常规方法通过 PCR 对产生的 cDNA 进行扩增。

内分泌特异性基因 GCG、INS 和 SST 的表达显著增加，共培养物的细胞中的再生相关基因 NGN3 的表达也显著增加，但在仅胰岛的培养物中没有增加(图 16a 和 b)。这些结果提示，骨髓细胞在体外刺激人胰岛细胞再生。同样，在共培养物中还观察到胰腺特异性转录因子 PDX1 或 IPF1、PAX6、ISL1 和 MAFa 的表达增加，但在单独的胰岛培养物中没有观察到(图 16c)。这些转录因子调节培养物中的迁移、分化和增殖，这可导致在共培养物中观察到的长期存活和功能增强。

Mist1 是在内分泌细胞中特异性表达的碱性螺旋-环-螺旋转录因子，是胰腺腺泡细胞的组织化和功能所必需的。研究提示，Mist-1 表达提供了支持胰岛发育和功能的微环境。Mist1 的表达可允许胰岛细胞组织化为更高级的结构。

**统计学评价:**

所有的数据都以平均值±SEM 表示，并通过方差分析(ANOVA)继之以 student-t 检验来分析，除非另有说明。Sigma Plot (SPSS Inc. Chicago, IL)用于画图。所有的数据都代表 3 个的结果。

## 参考文献

1. Yamada, S.和 I. Kojima, *Regenerative medicine of the pancreatic beta cells.* J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2005. **12**(3): 218-26 页。

2. Das, S.R.等人, *Increased cardiovascular risk associated with diabetes in Dallas County.* Am Heart J, 2006. **151**(5): 1087-93 页。

3. Borrero Pachon, M.P., *[Diabetic foot].* Rev Enferm, 2006. **29**(3): 8-14 页。

4. Balamurugan, A.N.等人, *Prospective and challenges of islet transplantation for the therapy of autoimmune diabetes.* Pancreas, 2006. **32**(3): 231-43 页。

5. Shapiro, A.M.等人, *International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation.* N Engl J Med, 2006. **355**(13): 1318-1330 页。

6. Lakey, J.R., M. Mirbolooki,和 A.M. Shapiro, *Current status of clinical islet cell transplantation.* Methods Mol Biol, 2006. **333**: 47-104 页。

7. Kayed, H.等人, *Hedgehog signaling in the normal and diseased pancreas.* Pancreas, 2006. **32**(2): 119-29 页。

8. Lingohr, M.K.等人, *Specific regulation of IRS-2 expression by glucose in rat primary pancreatic islet beta-cells.* J Biol Chem, 2006. **281**(23): 15884-92 页。

9. McCabe, C., A. Samali,和 T. O'Brien, *Cytoprotection of beta cells: rational gene transfer strategies.* Diabetes Metab Res Rev, 2006. **22**(3): 241-52 页。

10. Truong, W.等人, *Coinhibitory T-cell signaling in islet allograft rejection and tolerance.* Cell Transplant, 2006. **15**(2): 105-19 页。

11. Matsuda, T.等人, *Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function.* Am J Transplant, 2005. **5**(3): 484-93 页。

12. Chae, H.Y.等人, *Effective glycemic control achieved by transplanting non-viral cationic liposome-mediated VEGF-transfected islets in streptozotocin-induced diabetic mice.* Exp Mol Med, 2005. **37**(6): 513-23 页。

13. Mattsson, G.等人, *Endothelial cells in endogenous and transplanted pancreatic islets: differences in the expression of angiogenic peptides and receptors.* Pancreatology, 2006. **6**(1-2): 86-95 页。

14. Olsson, R., A. Maxhuni,和 P.O. Carlsson, *Revascularization of transplanted pancreatic islets following culture with stimulators of angiogenesis.* Transplantation, 2006. **82**(3): 340-7 页。

15. Oh, S.H. 等人, *Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes.* Lab Invest, 2004. **84**(5): 607-17 页。

16. Hess, D.等人, *Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration.* Nat Biotechnol, 2003. **21**(7): 763-70 页。

17. Lechner, A.等人, *No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo.* Diabetes, 2004. **53**(3): 616-23 页。

18. Mathews, V.等人, *Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury.* Diabetes, 2004. **53**(1): 91-8 页。

19. Dawn, B.和 R. Bolli, *Adult bone marrow-derived cells: Regenerative potential, plasticity, and tissue commitment.* Basic Res Cardiol, 2005. **100**(6): 494-503 页。

20. Luo, L., N. Yano 和 J.Z. Luo, *The molecular mechanism of EGF receptor activation in pancreatic beta-cells by thyrotropin-releasing*

*hormone.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(5): E889-99 页。

21. Luo, L.G. 等人, *Effect of preproTRH antisense on thyrotropin-releasing hormone synthesis and viability of cultured rat diencephalic neurons.* Endocrine, 2001. **15**(1): 79-85 页。

22. Luo, J.Z.和 L. Luo, *American Ginseng Stimulates Insulin Production and Prevents Apoptosis through Regulation of Uncoupling Protein-2 in Cultured beta Cells.* Evid Based Complement Alternat Med, 2006. **3**(3): 365-72 页。

23. Cabrera, O.等人, *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): 2334-9 页。

24. Brissova, M.等人, *Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy.* J Histochem Cytochem, 2005. **53**(9): 1087-97 页。

25. Welsh, N.等人, *Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets?* Diabetes, 2005. **54**(11): 3238-44 页。

26. Storling, J.等人, *Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt.* Diabetologia, 2005. **48**(10): 2039-50 页。

27. Paraskevas, S.等人, *Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis.* Pancreas, 2000. **20**(3): 270-6 页。

28. Amrani, A.等人, *IL-1alpha, IL-1beta, and IFN-gamma mark beta cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4(+) T lymphocytes.* J Clin Invest, 2000. **105**(4): 459-68 页。

29. Eizirik, D.L.和 M.I. Darville, *beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes.* Diabetes, 2001. **50 增刊 1**: S64-9 页。

30. Gurol, A.O.等人, *Peritransplant and long-term secretion of*

*interleukin-1beta in cyclosporine treated syngeneic rats allografted with islets of langerhans.* Transplant Proc, 2005. **37**(5): 2375-8 页。

31. Raida, M.等人, *Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells.* Int J Mol Med, 2006. **18**(4): 735-9 页。

32. Ruscetti, F.W., S. Akel, 和 S.H. Bartelmez, *Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context.* Oncogene, 2005. **24**(37): 5751-63 页。

33. Ozturk, M.A., G.S. Guven, 和 I.C. Haznedaroglu, *How hematopoietic stem cells know and act in cardiac microenvironment for stem cell plasticity? Impact of local renin-angiotensin systems.* Med Hypotheses, 2004. **63**(5): 866-74 页。

34. Zhang, N.等人, *Blood-borne stem cells differentiate into vascular and cardiac lineages during normal development.* Stem Cells Dev, 2006. **15**(1): 17-28 页。

35. Thatava, T.等人, *Chromatin-remodeling factors allow differentiation of bone marrow cells into insulin-producing cells.* Stem Cells, 2006。

36. Taneera, J.等人, *Failure of transplanted bone marrow cells to adopt a pancreatic beta-cell fate.* Diabetes, 2006. **55**(2): 290-6 页。

37. Kang, E.M.等人, *Hematopoietic stem cell transplantation prevents diabetes in NOD mice but does not contribute to significant islet cell regeneration once disease is established.* Exp Hematol, 2005. **33**(6): 699-705 页。

38. Moriscot, C.等人, *Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro.* Stem Cells, 2005. **23**(4): 594-603 页。

39. Steele, A.和 P. Steele, *Stem cells for repair of the heart.* Curr Opin Pediatr, 2006. **18**(5): 518-523 页。

40. Le Blanc, K.和 O. Ringden, *Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation.* Curr Opin Immunol, 2006. **18**(5): 586-91 页。

41. Fazel, S.等人, *Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines.* J Clin Invest, 2006. **116**(7): 1865-77 页。

42. Dell'Agnola, C.等人, *Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs.* Blood, 2004. **104**(13): 4311-8 页。

43. Chien, K.R., *Lost and found: cardiac stem cell therapy revisited.* J Clin Invest, 2006. **116**(7): 1838-40 页。

44. Wollert, K.C.和 H. Drexler, *Cell-based therapy for heart failure.* Curr Opin Cardiol, 2006. **21**(3): 234-9 页。

45. Tang, Y.L. 等人, *Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium.* Regul Pept, 2004. **117**(1): 3-10 页。

46. Carvalho, K.A.等人, *Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells, skeletal muscle cells and co-culture of both for cell myocardium therapy in Wistar rats.* Transplant Proc, 2006. **38**(6): 1955-6 页。

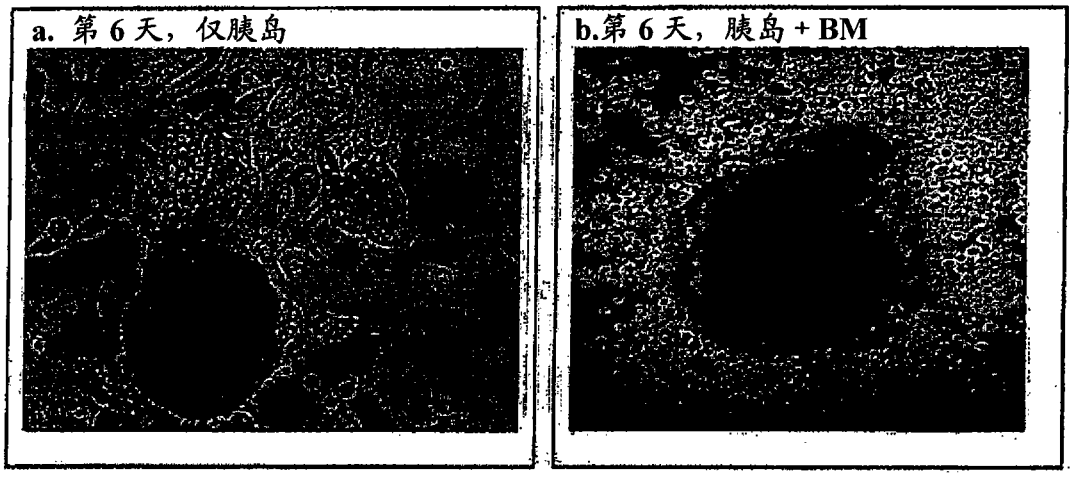
47. Bin, F.等人, *Construction of tissue-engineered homograft bioprosthetic heart valves in vitro.* Asaio J, 2006. **52**(3): 303-9 页。

## 引入作为参考

本文列出的或在它处提到的所有参考文献、专利、专利申请、肽和核酸登录号都引入到本说明书中作为参考。

**等价方案**

仅仅使用常规实验，本领域技术人员就会认识到或能够确定本文描述的本发明的具体实施方案的许多等价方案。这样的等价方案包括在下列权利要求范围之内。




156 天培养后的形态变化

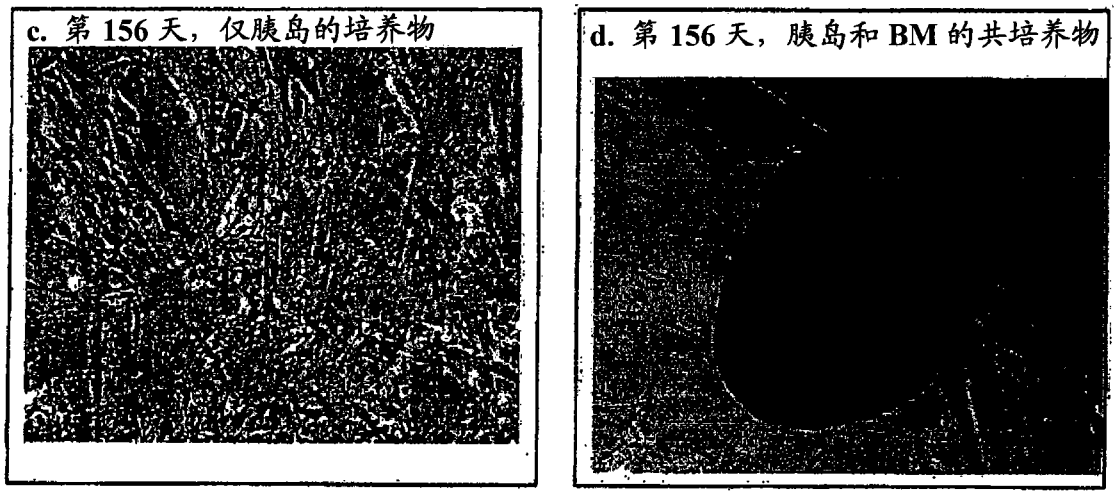
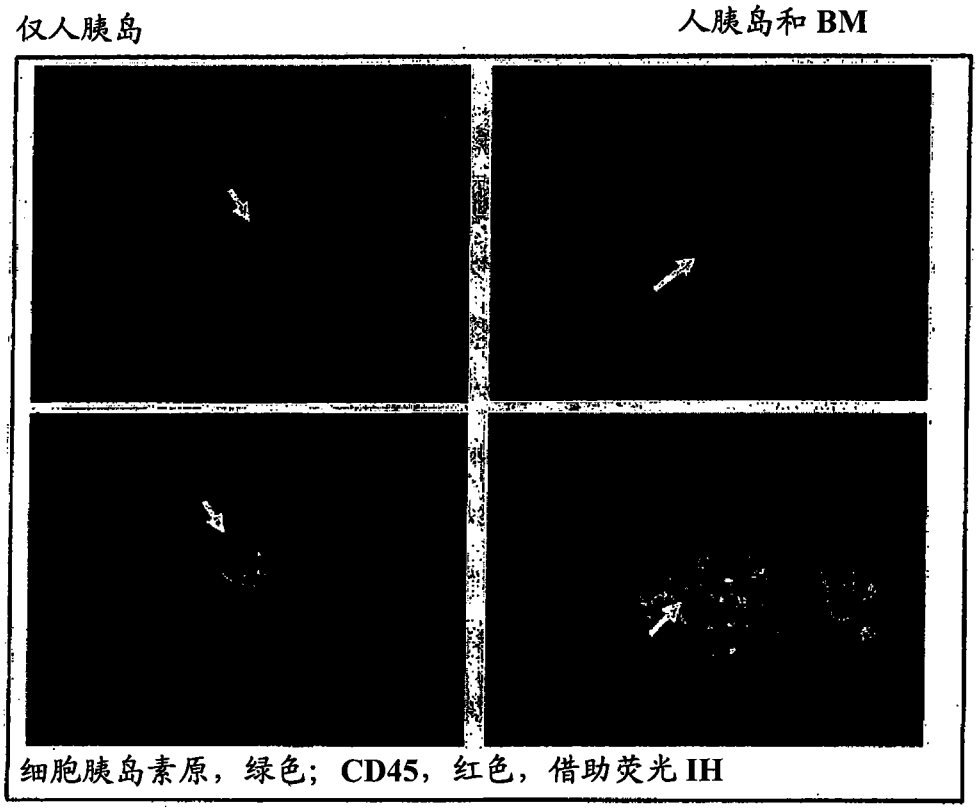
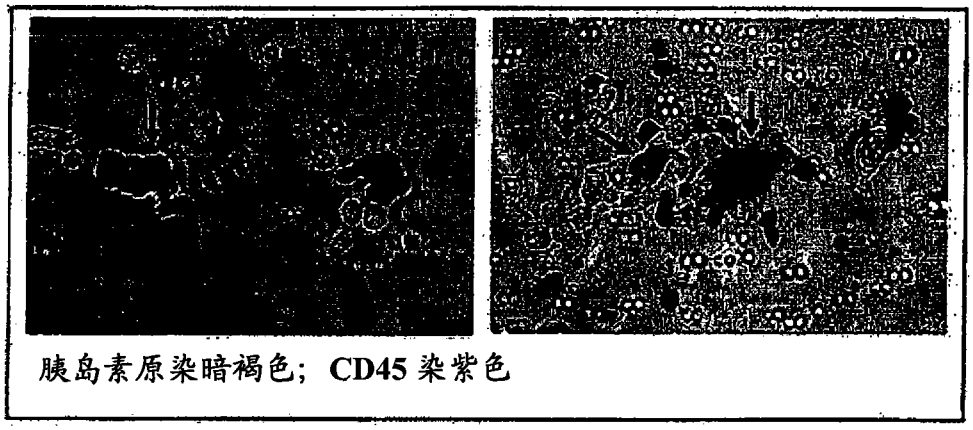



图 1

a.




b.



c.

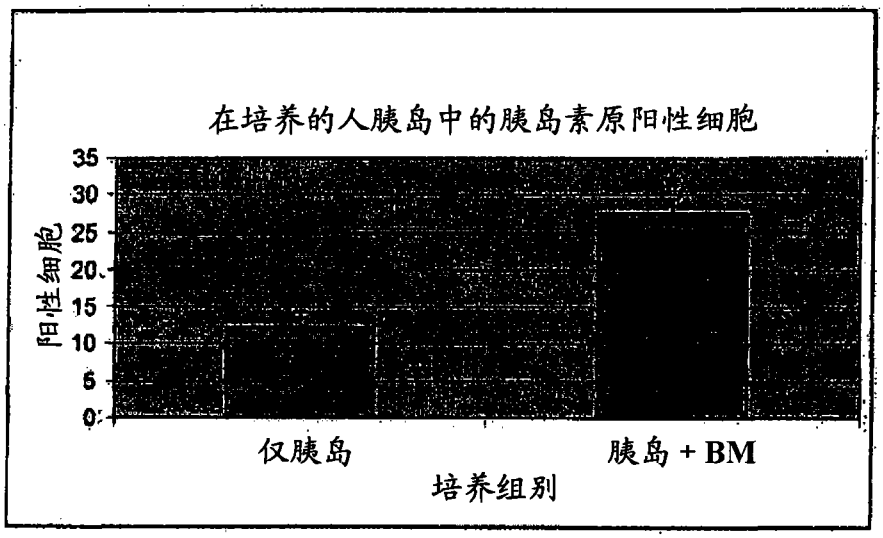



图 2

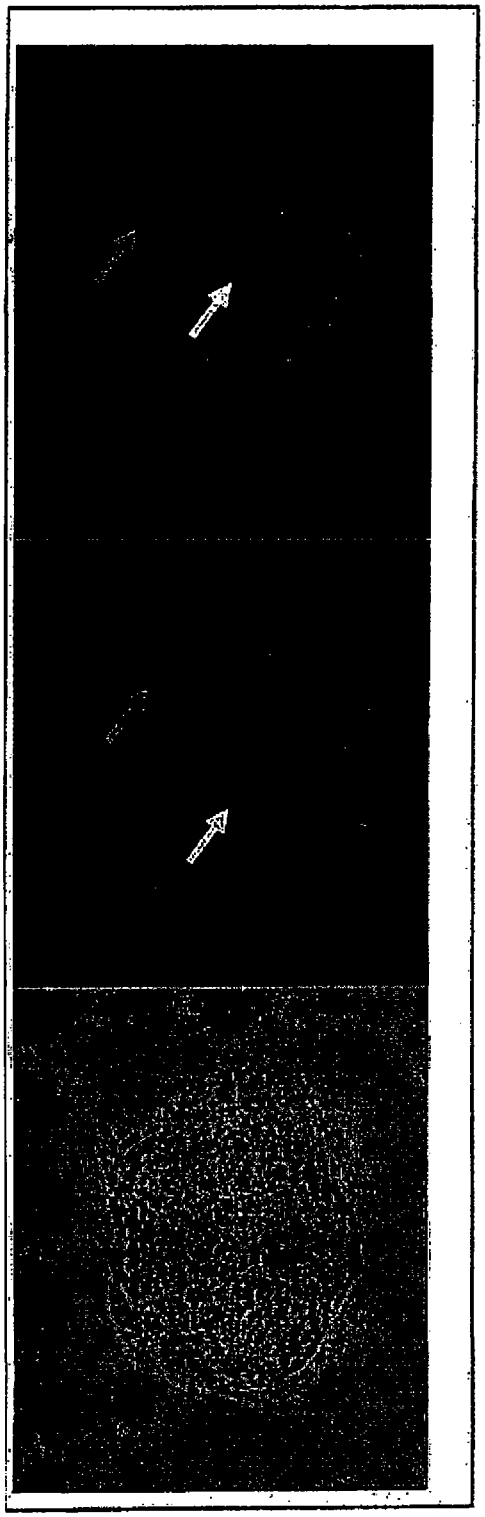


图 3

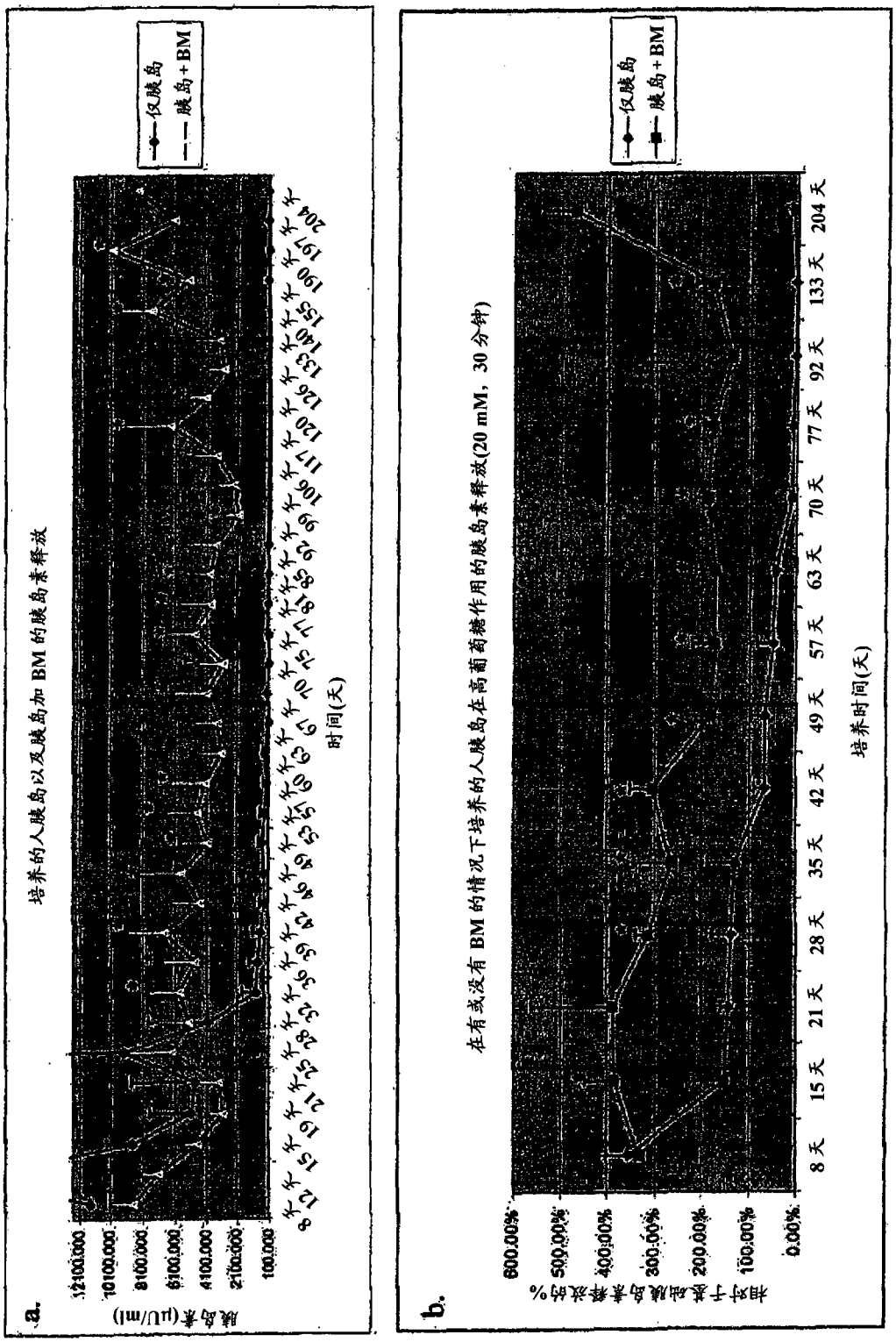

a.
培养的人胰岛以及胰岛加 BM 的胰岛素释放
仅胰岛
胰岛+BM
胰岛素(μU/ml)
12100.000
10100.000
8100.000
6100.000
4100.000
2100.000
100.000
时间(天)
b.
在有或没有 BM 的情况下培养的人胰岛在高葡萄糖作用的胰岛素释放(20 mM，30 分钟)
仅胰岛
胰岛+BM
刺激十体胰岛素释放的%
600.00%
500.00%
400.00%
300.00%
200.00%
100.00%
0.00%
8 天
15 天
21 天
28 天
35 天
42 天
49 天
57 天
63 天
70 天
77 天
92 天
133 天
204 天
培养时间(天)

图 4

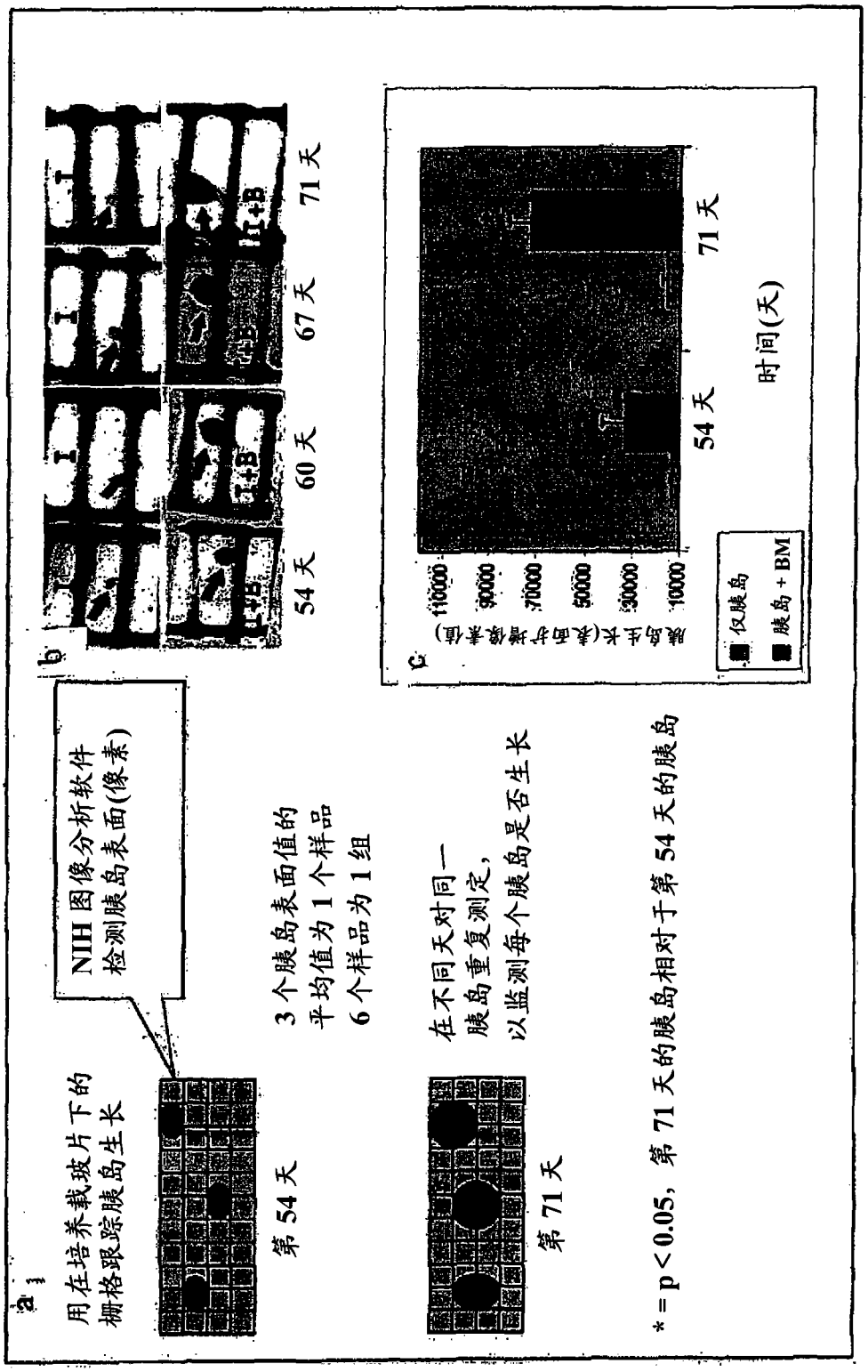

a
用在培养载玻片下的
栅格跟踪胰岛生长
NIH 图像分析软件
检测胰岛表面(像素)
第 54 天
3 个胰岛表面值的
平均值为 1 个样品
6 个样品为 1 组
在不同天对同一
胰岛重复测定，
以监测每个胰岛是否生长
第 71 天
* = p < 0.05，第 71 天的胰岛相对于第 54 天的胰岛
b
I
I+B
54 天
60 天
67 天
71 天
c
54 天
71 天
时间(天)
仅胰岛
胰岛 + BM

图 5


图 5d. 13 个月以上的共培养的胰岛

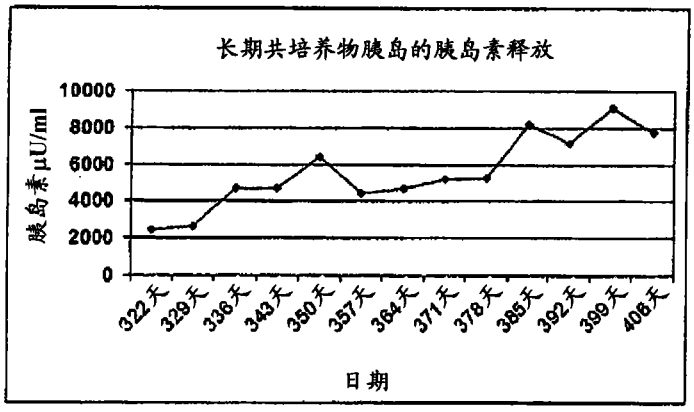

长期共培养物胰岛的胰岛素释放
胰岛素μU/ml
10000
8000
6000
4000
2000
0
322天
329天
336天
343天
350天
357天
364天
371天
378天
385天
392天
399天
406天
日期

图 5e

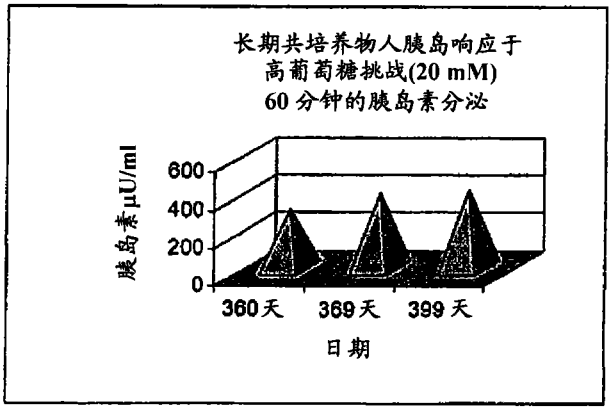

长期共培养物人胰岛响应于
高葡萄糖挑战(20 mM)
60 分钟的胰岛素分泌
胰岛素μU/ml
600
400
200
0
360天
369天
399 天
日期

图 5f

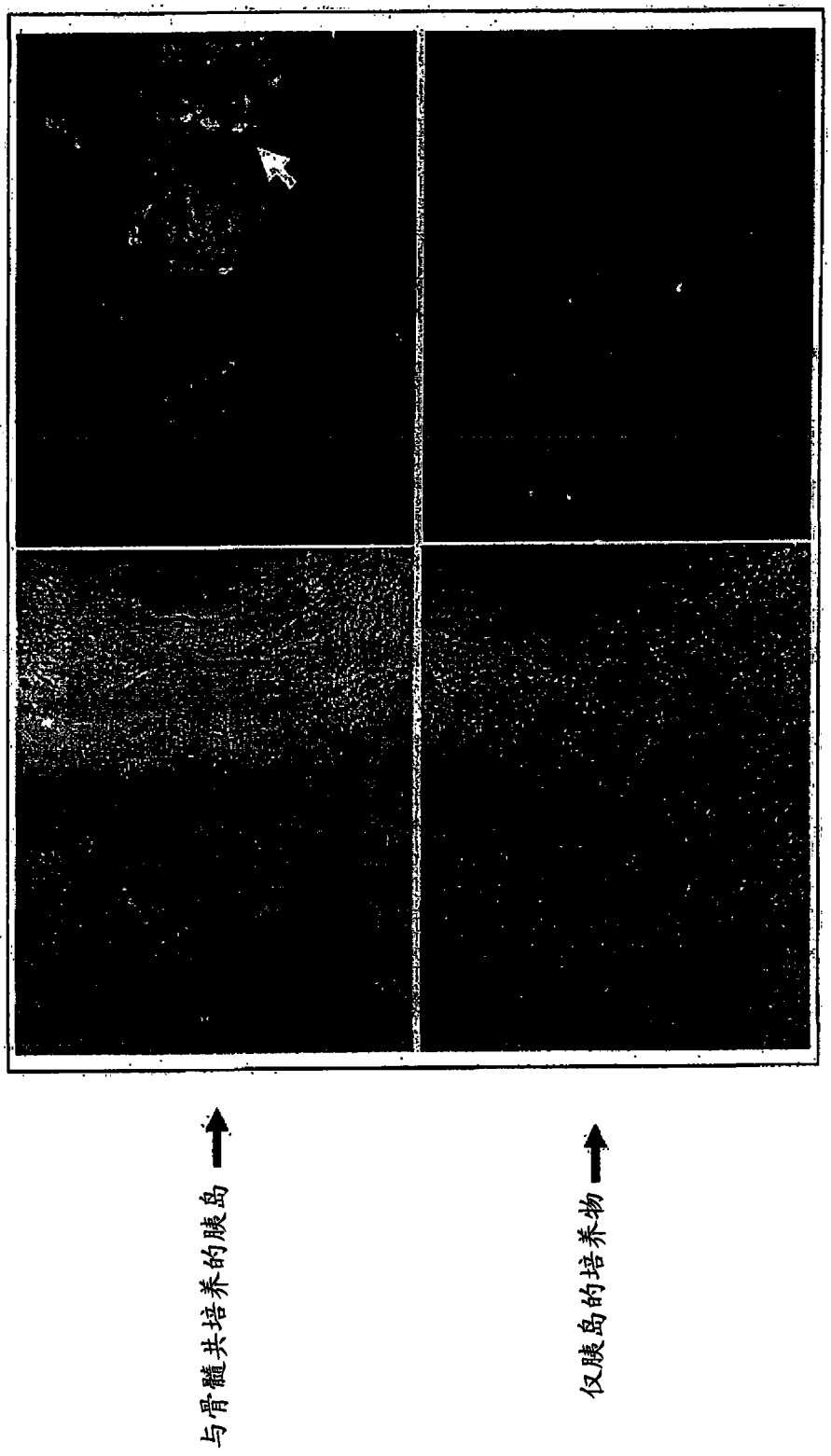



图 6

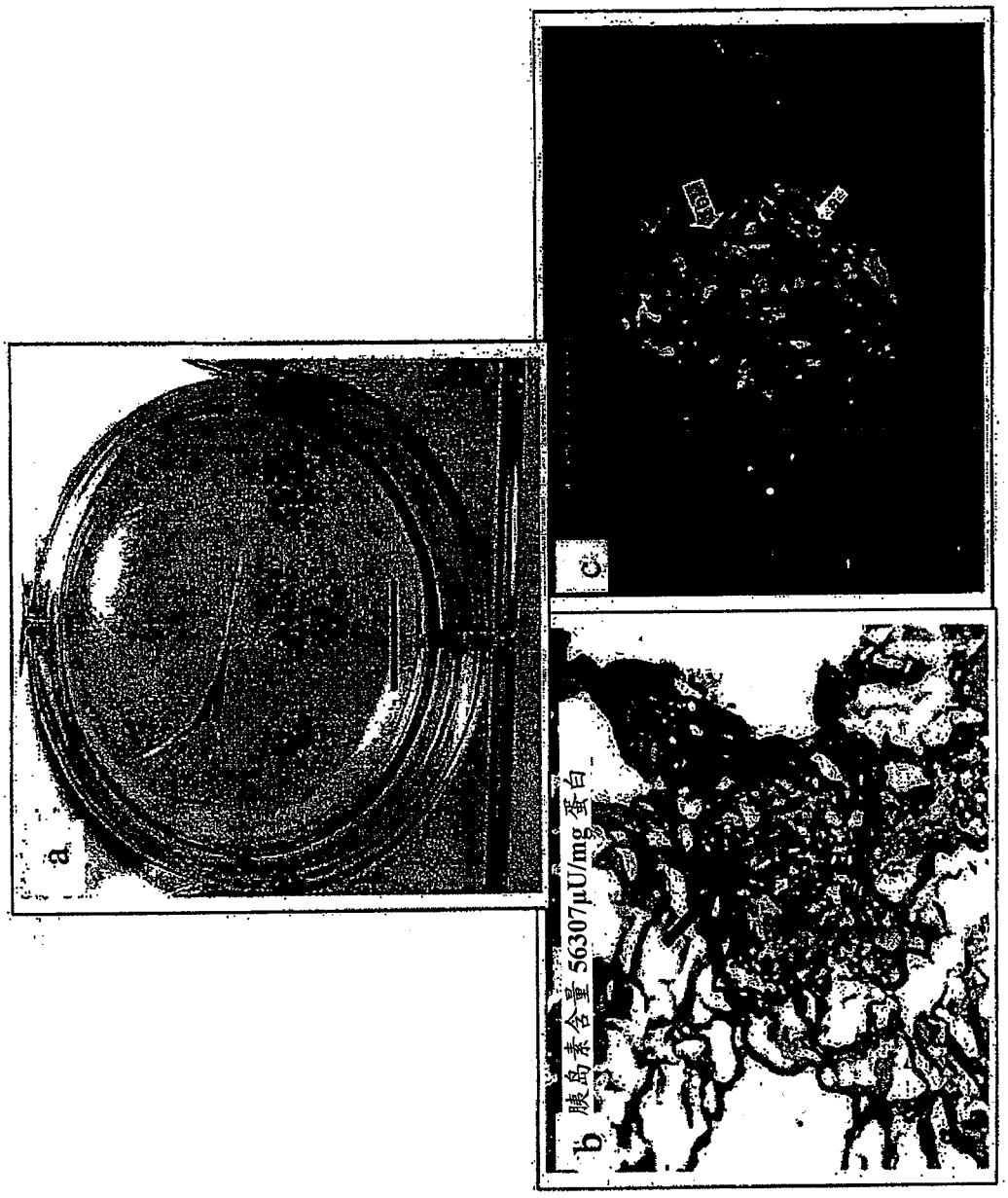
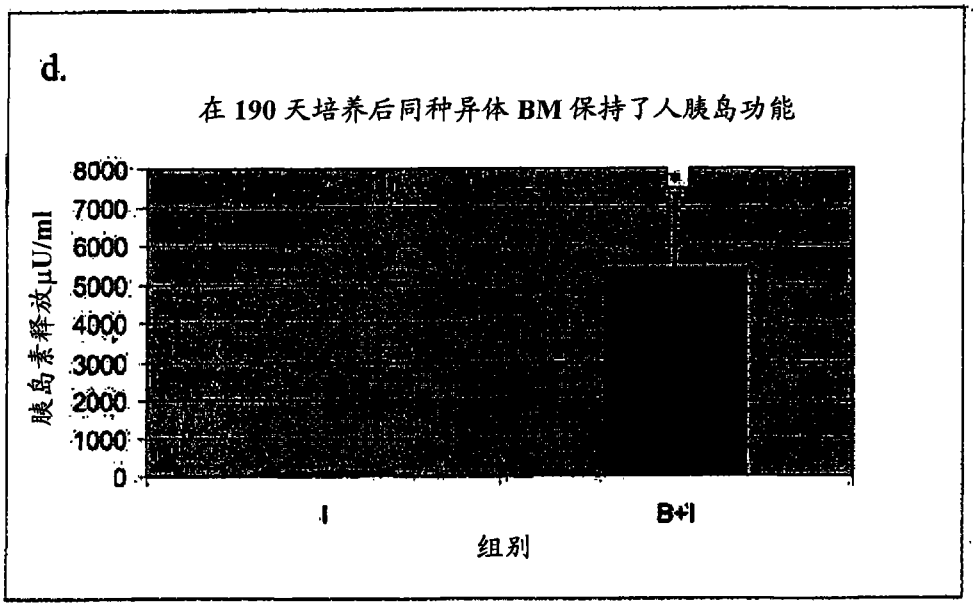



图 7


d.
在 190 天培养后同种异体 BM 保持了人胰岛功能
胰岛素释放μU/ml
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
I
B+I
组别

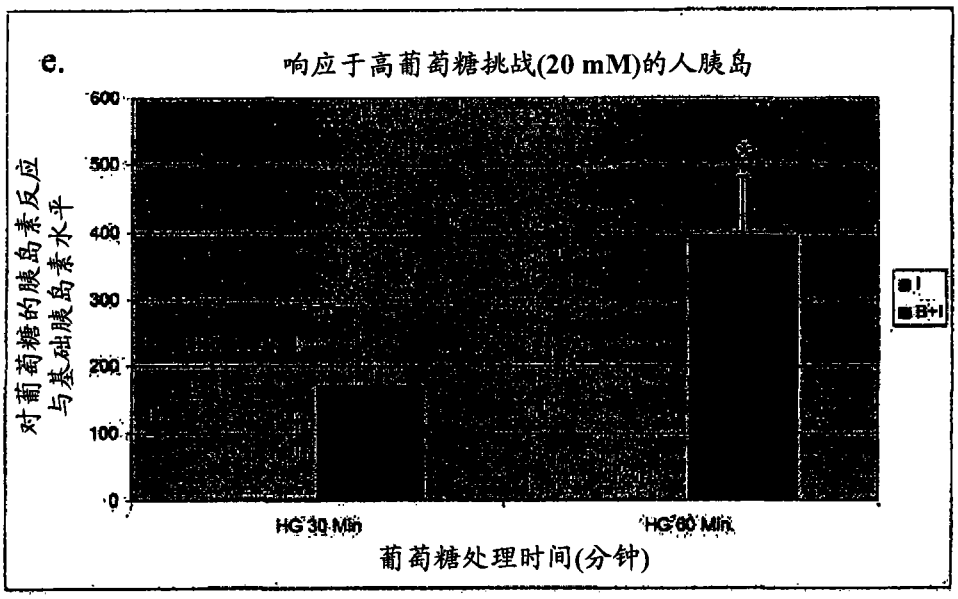

e.
响应于高葡萄糖挑战(20 mM)的人胰岛
对葡萄糖的胰岛素反应
与基础胰岛素水平
600
500
400
300
200
100
0
HG 30 Min
HG 60 Min
葡萄糖处理时间(分钟)
I
B+I

图 7

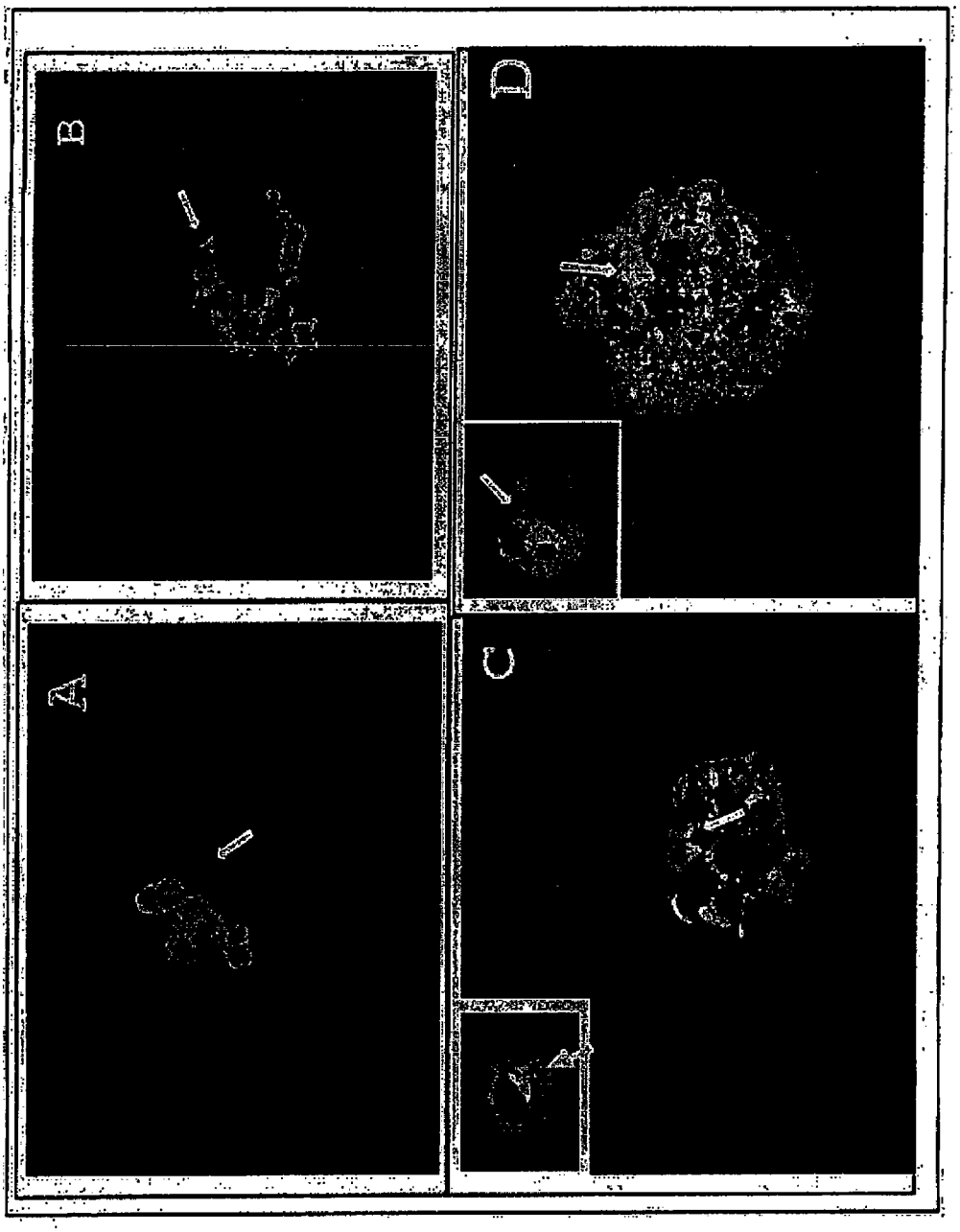



图 8

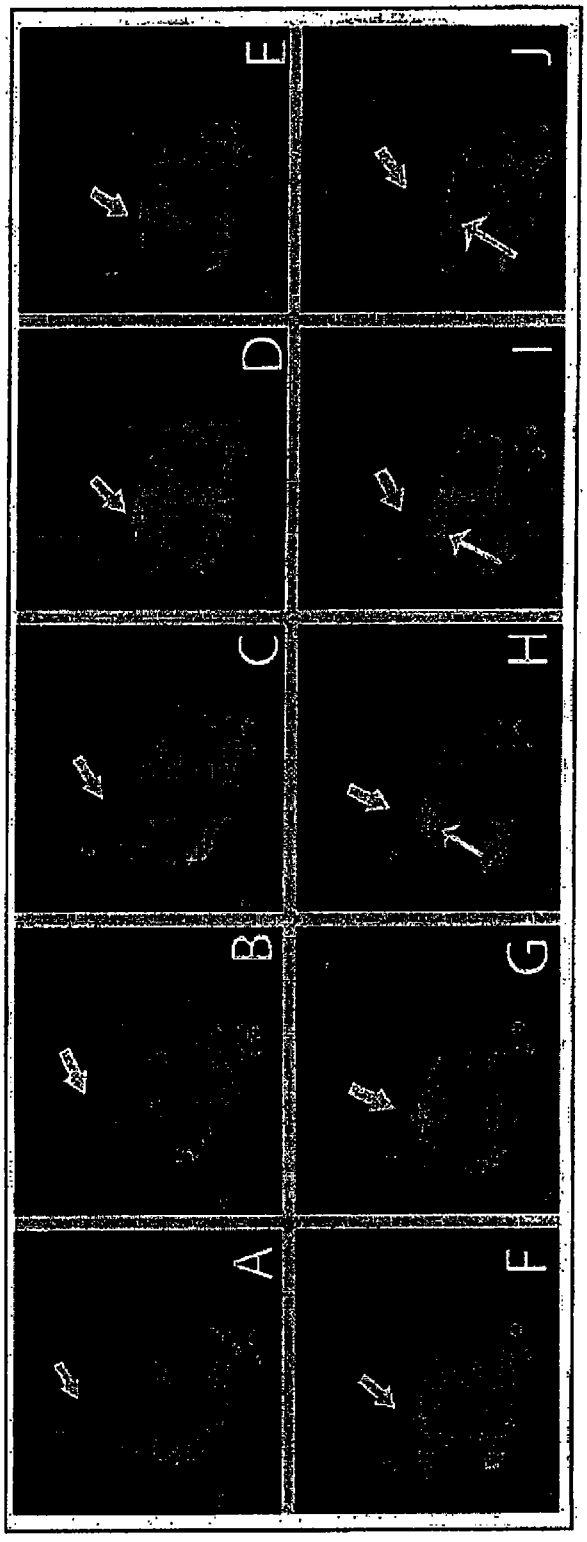



图 9

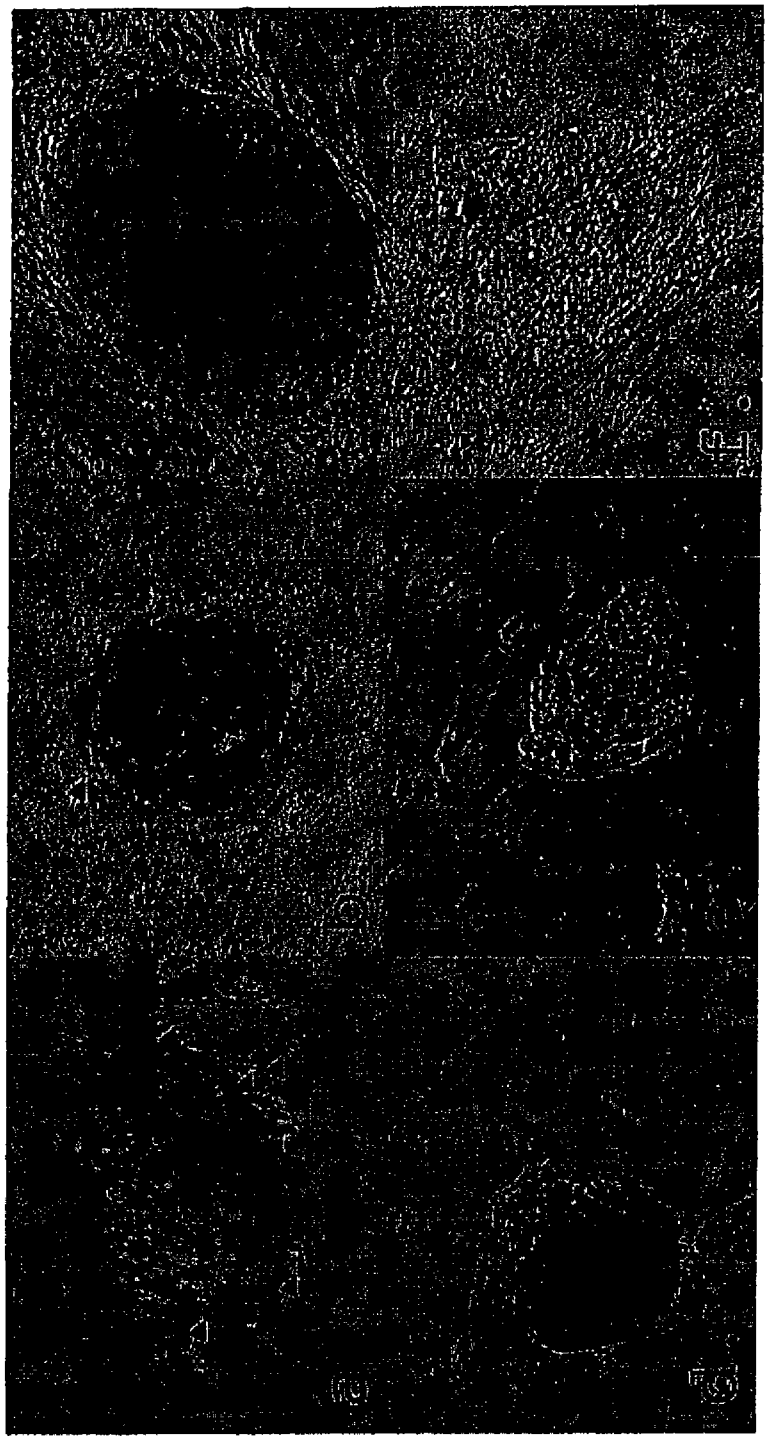
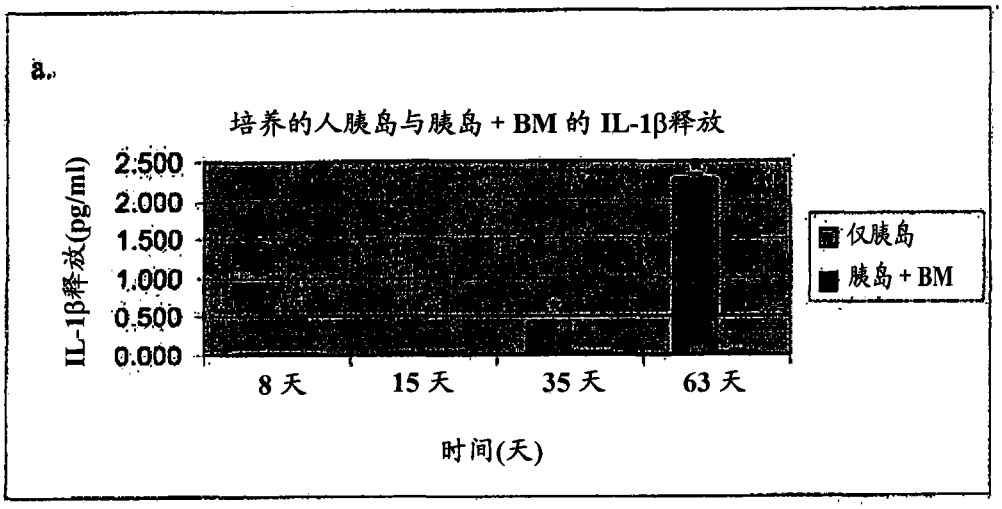


图 10


a.
培养的人胰岛与胰岛 + BM 的 IL-1β释放
IL-1β释放(pg/ml)
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
8 天
15 天
35 天
63 天
时间(天)
仅胰岛
胰岛 + BM

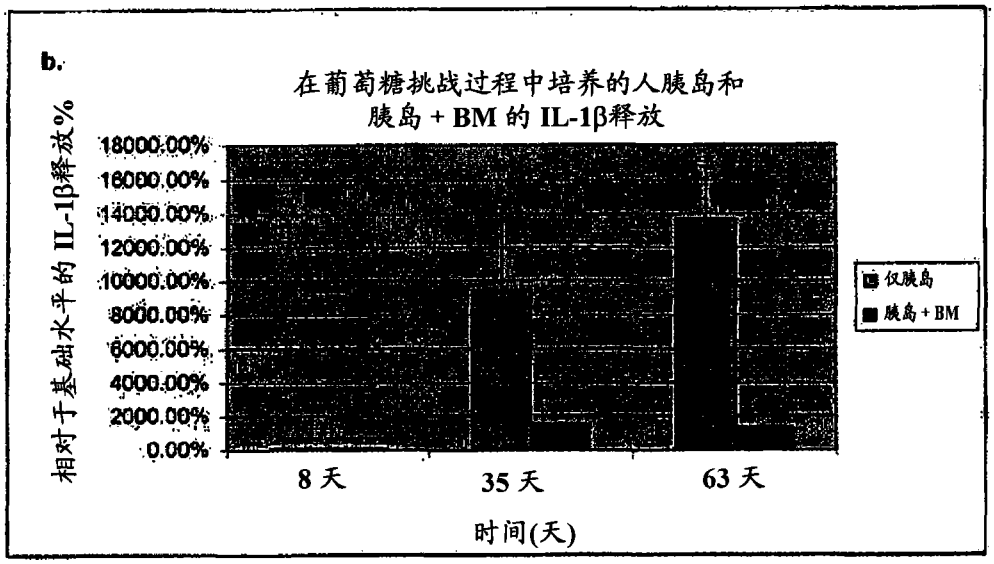
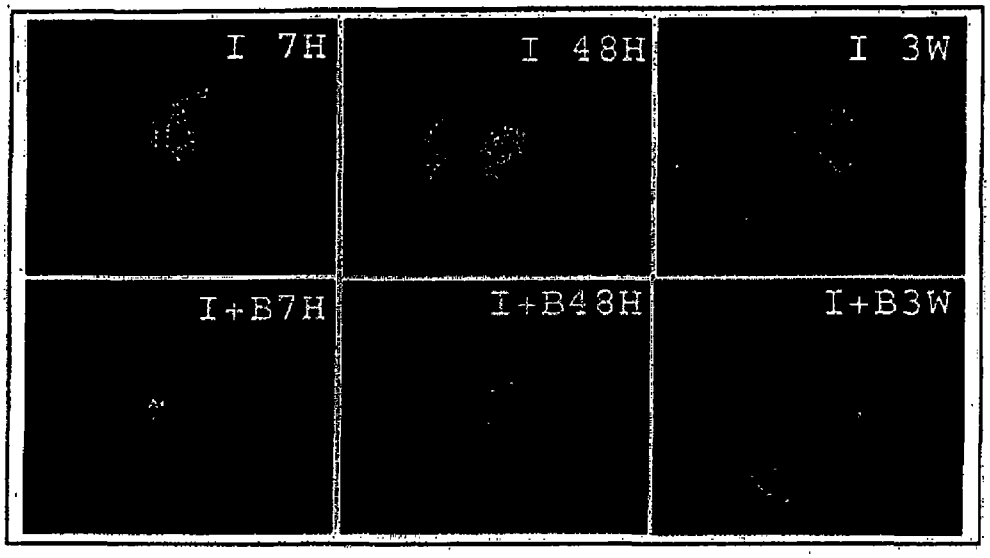

b.
在葡萄糖挑战过程中培养的人胰岛和
胰岛 + BM 的 IL-1β释放
相对于基础水平的 IL-1β释放%
18000.00%
16000.00%
14000.00%
12000.00%
10000.00%
8000.00%
6000.00%
4000.00%
2000.00%
0.00%
8 天
35 天
63 天
时间(天)
仅胰岛
胰岛 + BM

图 11

A.


I 7H
I 48H
I 3W
I+B7H
I+B48H
I+B3W

B.

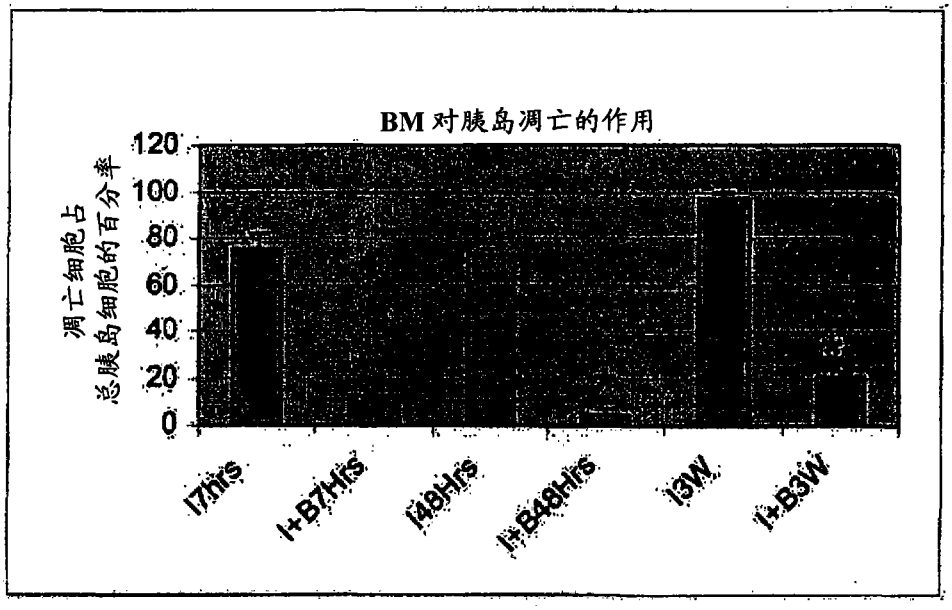

BM 对胰岛凋亡的作用
凋亡细胞占
总胰岛细胞的百分率
120
100
80
60
40
20
0
I7hrs
I+B7Hrs
I48Hrs
I+B48Hrs
I3W
I+B3W

图 12

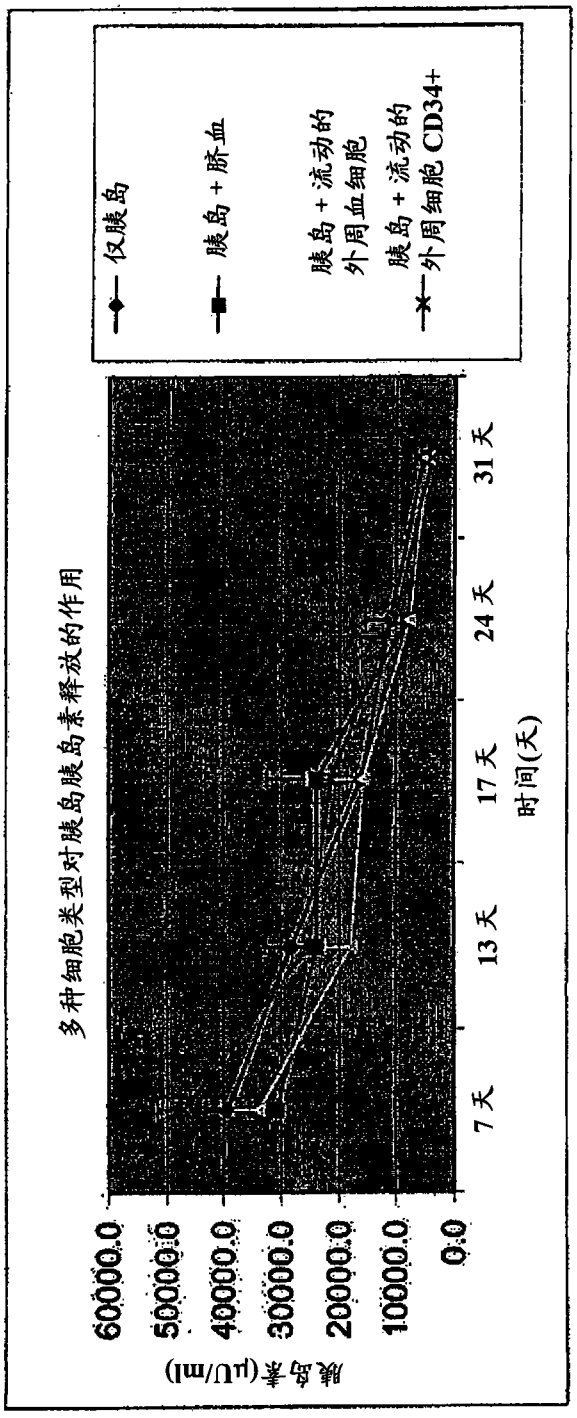

多种细胞类型对胰岛胰岛素释放的作用
仅胰岛
胰岛 + 脐血
胰岛 + 流动的外周血细胞
胰岛 + 流动的外周细胞 CD34+
胰岛素(μU/ml)
60000.0
50000.0
40000.0
30000.0
20000.0
10000.0
0.0
7 天
13 天
17 天
24 天
31 天
时间(天)

图 13

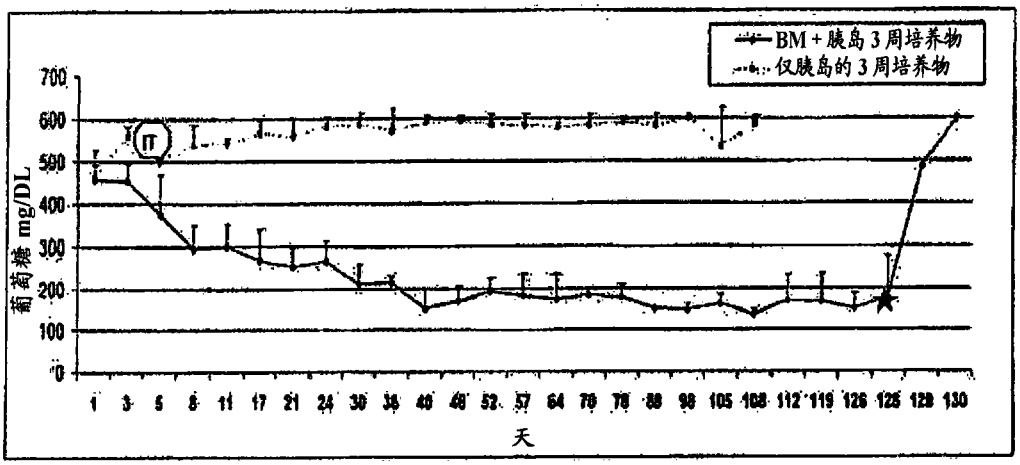

BM + 胰岛 3 周培养物
仅胰岛的 3 周培养物
葡萄糖 mg/DL
700
600
500
400
300
200
100
0
IT
1 3 5 8 11 17 21 24 30 34 40 46 52 57 64 70 78 88 98 105 108 112 119 126 128 130
天

图 14

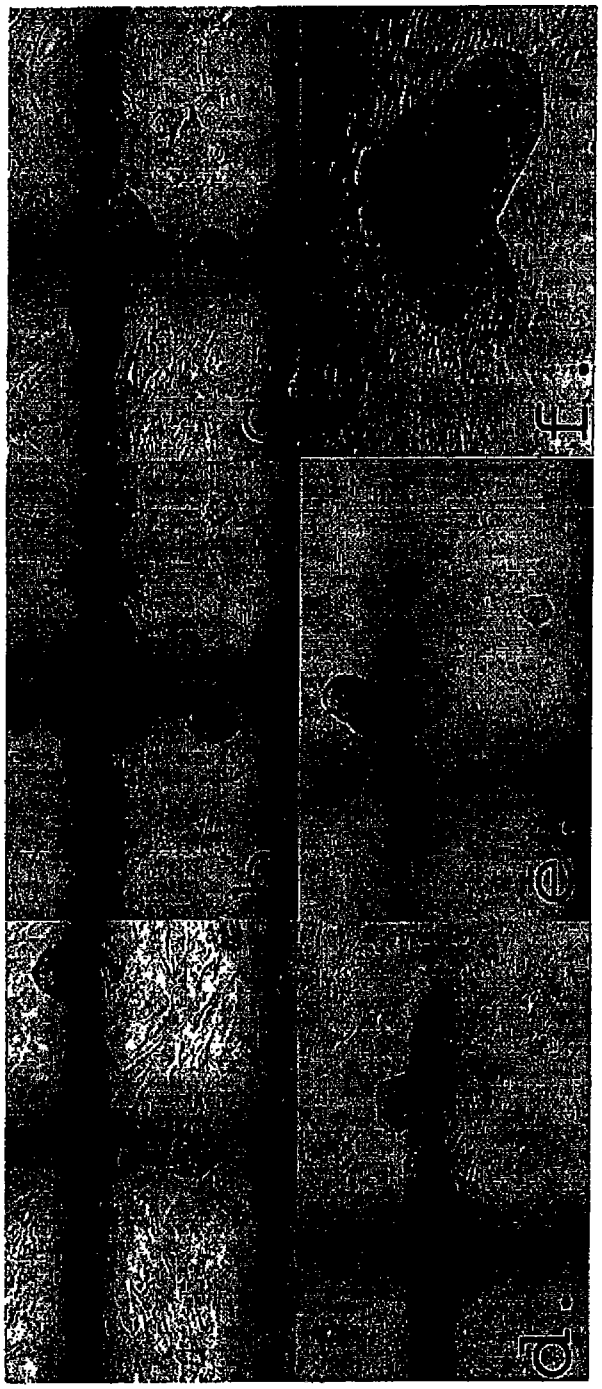



图 15

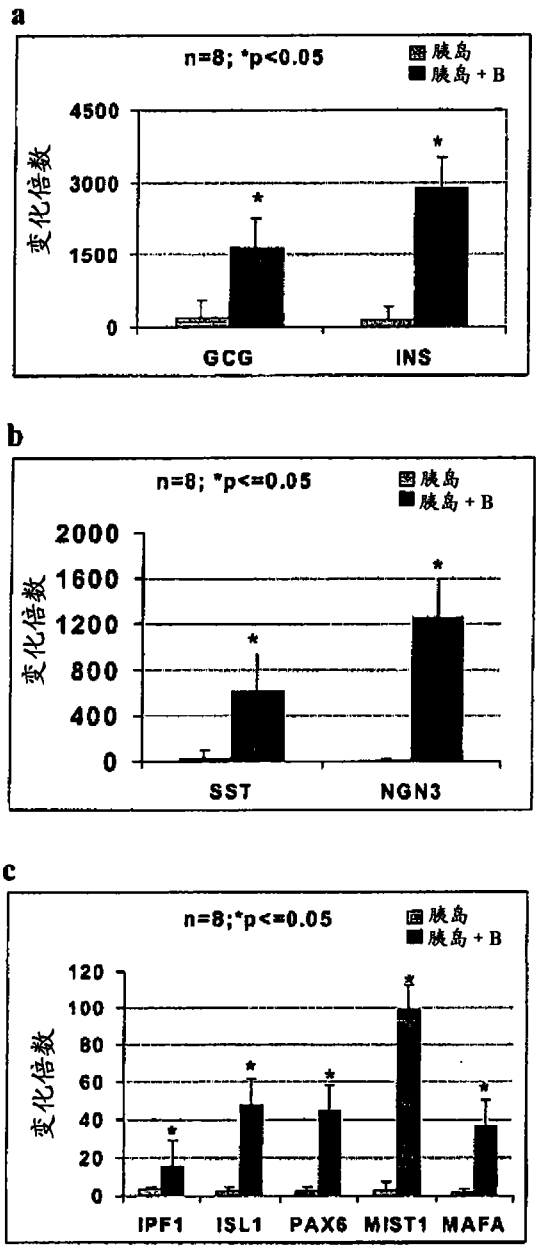

a
n=8; *p<0.05
胰岛
胰岛+B
变化倍数
4500
3000
1500
0
GCG
INS
b
n=8; *p<=0.05
胰岛
胰岛+B
变化倍数
2000
1600
1200
800
400
0
SST
NGN3
c
n=8;*p<=0.05
胰岛
胰岛+B
变化倍数
120
100
80
60
40
20
0
IPF1
ISL1
PAX6
MIST1
MAFA

图 16