



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 107921062 B

(45) 授权公告日 2021.03.02

(21) 申请号 201680029765.5

(22) 申请日 2016.04.08

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107921062 A

(43) 申请公布日 2018.04.17

(66) 本国优先权数据
PCT/CN2015/077136 2015.04.22 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.11.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2016/078873 2016.04.08

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/169416 EN 2016.10.27

(73) 专利权人 成都因诺生物医药科技有限公司
地址 610041 四川省成都市天府大道南段
846号

(72) 发明人 康裕建

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 潘颖 赵青朵

(51) Int.Cl.
A61K 35/28 (2015.01)
A61K 33/34 (2006.01)
A61K 33/24 (2019.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101926821 A, 2010.12.29
Lily zhen等.Recovery of Mesenchymal
stem cells homing to rabbit myocardial
ischemic infarct area by cu-microbubble
treatment.《The FASEB JOURNAL》.2015,第29卷
(第1期),摘要.

审查员 李双双

权利要求书1页 说明书67页 附图34页

(54) 发明名称
组织修复和再生方法

(57) 摘要

本申请涉及将微量元素局部递送至组织损伤部位,其触发机体的固有组织修复机制。将铜局部递送至损伤部位诱导干细胞向损伤部位迁移(即,归巢),触发干细胞在损伤部位分化,诱导损伤部位发生组织再生,诱导触发组织再生的信号传导分子,逆转损伤部位的损伤,和/或在损伤部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境。在另一个方面,公开了将微量元素(例如,铜)直接递送至损伤部位及相关方法。

1. 铜在制备在具有缺血性脑组织损伤的个体中诱导组织修复事件的药物中的应用,所述组织修复事件为向损伤部位递送有效量的铜。

2. 根据权利要求1所述的应用,在具有缺血性脑组织损伤的个体中诱导组织修复的方法包括:

- a) 向损伤部位递送有效量的铜;和
- b) 向所述个体施用有效量的干细胞。

3. 根据权利要求1所述的应用,在具有缺血性脑组织损伤的个体中诱导组织修复的方法包括向所述损伤部位递送有效量的铜和有效量的干细胞诱导剂。

4. 根据权利要求1所述的应用,所述个体具有有缺陷的组织修复系统。

5. 根据权利要求4所述的应用,所述组织修复系统有缺陷的个体是具有慢性组织损伤的个体。

6. 根据权利要求4所述的应用,所述组织修复系统有缺陷的个体是至少60岁的个体。

7. 根据权利要求4所述的应用,所述组织修复系统有缺陷的个体是干细胞缺陷的个体。

8. 根据权利要求1所述的应用,所述铜通过微泡递送。

9. 根据权利要求8所述的应用,静脉内施用包含铜的微泡,并且所述铜通过所述微泡在所述损伤部位定点爆裂而释放。

10. 根据权利要求9所述的应用,所述微泡的定点爆裂通过超声实现。

11. 根据权利要求1所述的应用,所述铜通过将铜直接施用于所述损伤部位递送。

12. 根据权利要求11所述的应用,所述铜通过注射递送并且在注射之后在注射部位保持浓缩。

13. 根据权利要求12所述的应用,所述注射通过导管进行。

14. 根据权利要求11所述的应用,所述铜通过包含所述铜的植入物递送。

15. 根据权利要求14所述的应用,所述植入物包被有所述铜。

16. 根据权利要求14或15所述的应用,所述植入物选自支架、板和膜。

组织修复和再生方法

技术领域

[0001] 本发明涉及通过递送微量元素(例如铜)来进行组织修复和再生的方法。

背景技术

[0002] 再生医学是一种重要的治疗方法,其涉及产生活的功能性组织以修复或替代由于老化、疾病、损伤或先天性缺陷而引起的组织或器官功能丧失的过程。生物系统装配有自修复机制,其通过组织损伤信号系统来体现以确保当机体内的器官发生损伤时进行补救。当组织受到损伤时,存在不同种类的信号,例如趋化因子和细胞因子信号,其立即从损伤部位发起使损伤与机体的固有修复机制联系起来。这种联系由一系列的转导系统例如血管运输系统介导。一旦修复机制感应到损伤信号,涉及干细胞、细胞因子、生长因子和/或趋化因子的修复材料被动员,然后导航至损伤部位。因此,维持良好的血管和/或淋巴运输系统不仅确保损伤部位与修复机制之间的联系,而且还充当用于将修复材料递送至损伤部位的必需通道。组织损伤的程度和释放到循环中的归巢因子(homing factor)的量用作运输修复材料的导航子(navigator)。在归巢至损伤部位之后,干细胞或祖细胞将分化为“靶细胞”。被修复机制激活的多种调节子、细胞因子、生长因子和趋化因子产生有利于细胞分化、组织再生和再生组织与现有组织整合的友好环境。因此,将这一系列的信号转导和自修复或自我更新机制称为“组织损伤信号系统”。参见,例如,Kang等,2013,Regen Med Res,1,7。该系统需要连接良好的网络并且对信号产生、信号转导、信号接收、修复材料募集、损伤定向性运输、归巢、分化和再生过程中任一者的损害将会导致受损器官的自修复被抑制。参见,例如Kang等,2013,Regen Med Res,1,7。一些器官(例如肝、骨、骨骼肌和胰腺)在受到损伤时表现出强自我再生能力。然而,在老化期间并且在慢性损伤状况下,自修复能力由于组织损伤信号系统发生功能障碍而减弱。

[0003] 心肌梗死(Myocardial infarction,MI)是一种缺血性心脏疾病(ischemic heart disease,IHD),其由由于血液供应不足而引起心肌氧供应和需求之间失衡引起。MI的主要原因是冠状动脉中的动脉粥样硬化、血栓形成或栓子,其导致罪犯血管(culprit vessel)所供应的区域中几乎不能灌注。如果向心脏的血流持续受损,则堵塞冠状动脉领域中的心脏细胞死亡,心脏功能受损并且在其位置形成胶原瘢痕,这使患者处于潜在威胁生命的心律失常之中并且可导致形成心室壁瘤,而心室壁瘤的破裂可伴随着灾难性后果。

[0004] 在心脏收缩期间,心泵消耗有氧代谢产生的大量能量以维持循环并且向心脏组织供应足够的血液是维持心脏功能所必需的。参见,例如,Essop,2007,J Physiol,584,715-726;Dyson等,2007,Am J Physiol Heart Circ Physiol,293,H526-533。心肌缺血是心脏功能障碍的主要原因。局部冠状动脉破坏对心肌的不利影响不仅在于向堵塞冠状动脉的领域发起缺血损伤,而且还在于阻断材料向缺血区归巢以进行由人体的固有组织修复机制驱动的自恢复的途径。用于促进恢复血液供应的解决方案是心肌再生的关键。

[0005] 在缺血状况下,降低血液供应的初始和主要分子应答是积累缺氧可诱导因子(hypoxia inducible factor)。缺氧可诱导因子(HIF-1、HIF-2和HIF-3)在针对缺氧的转录

应答中发挥关键作用。HIF是异二聚体,其包含一个独特的氧依赖性 α 亚基和一个常见的组成型表达性 β 亚基。在人和哺乳动物中存在三种HIF α 。缺氧信号在维持氧稳态和细胞存活中发挥必要的作用。缺氧可诱导转录因子HIF-1和HIF-2是针对缺氧的细胞应答的中心介质,其通过调节控制代谢适应、氧递送和存活的基因的表达来响应于氧缺乏。

[0006] HIF-1转录因子包括HIF-1 α 和HIF-1 β 或ARNT(芳基羟核转位因子)构成。参见,例如,Wang等,1995,PNAS,92,5510-5514。HIF-1 α 的积累是活化HIF-1的限速步骤;因此,HIF-1 α 的主要调节在翻译后水平。参见,例如Wang等,1993,PNAS,90,4304-4308;Huang等,1998,PNAS,95,7987-7992。由于HIF-1 α 通过泛素-蛋白酶体途径的降解,在常氧条件下在大多数细胞类型中不能检测到其表达水平。在这一过程中,HIF-1 α 中的两个保守脯氨酸残基(Pro402和Pro564)之一或两者被含脯氨酰羟化酶结构域之蛋白质(prolyl hydroxylase domain-containing protein,PHD)的成员识别,所述成员催化脯氨酸羟基化的反应。参见,例如,Huang等,1998,PNAS,95,7987-7992;Jaakkola等,2001,Science,292,468-472;Ivan等,2001,Science,292,464-468。羟基化的HIF-1 α 被von Hippel-Lindau蛋白(pVHL)识别,其是在细胞溶质中靶向HIF-1 α 亚基被蛋白酶体降解的泛素连接酶复合物的组分。参见,例如,Maxwell等,1999,Nature,399,271-275;Masson等,2001,EMBO J,20,5197-5206;Ohh等,2000,Nat Cell Biol,2,423-427;Tanimoto等,2000,EMBO J,19,4298-4309。在缺氧状况下,HIF-1 α 从降解途径逃脱、积累并转位到细胞核中,在此其与HIF-1 β 二聚并与辅因子相互作用以组装HIF-1转录复合物,从而导致参与针对损伤之应答的多个基因上调。参见,例如,Shohet等,2007,J Mol Med(Berl),85,1309-1315;Kim等,2006,Cell Metab,3,177-185。其中,受HIF调节的基因是参与血管发生的那些,例如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、干细胞因子(stem cell factor,SCF)、基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1,SDF-1)、血管内皮生长因子1(vascular endothelial growth factor receptor 1,VEGFR-1)、胎盘生长因子(placental growth factor,PLGF)、血管生成素1(angiopoietin 1,ANGPT1)和血管生成素2(angiopoietin 2,ANGPT2)以及血小板衍生生长因子B(platelet-derived growth factor B,PDGFB)。参见,例如,Rey等,2010,Cardiovasc Res,86,236-242。在急性缺血状况下,HIF-1诱导的血管生成显著增强。HIF-1的活化在血管发生中起关键作用并且与针对缺氧状况的缺血组织适应协调。参见,例如,Lee等,2000,N Engl J Med,342,626-633。

[0007] 然而,在慢性缺血状况下,受损的心肌通常以毛细血管密度降低和血管发生抑制而非增强为特征。即使在从患有慢性缺血性心肌病之患者取样的缺血心肌中HIF-1 α 水平持续增加,在急性缺血损害下由积累的HIF-1 α 活化的防御行为也不起作用。然而,后续基因(例如VEGF)的表达降低。参见,例如,Lee等,2000,N Engl J Med,342,626-33;Moslehi等,2010,Circulation,122,1004-1016。

[0008] 本文中引用的所有公开、专利和专利申请的公开内容均在此通过引用以其整体并入本文。

发明内容

[0009] 在一个方面,本申请提供了在具有组织损伤的个体中诱导至少两个组织修复事件的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,至少一个组织修复

事件包括诱导骨髓间充质干细胞向损伤部位迁移。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括诱导干细胞在所述损伤部位分化。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括诱导损伤部位组织再生。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括诱导触发组织再生的信号分子。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括逆转损伤部位的损害。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括在损伤部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括恢复和/或增强损伤信号。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括信号转导和/或接收损伤信号。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括恢复和/或增强修复材料的损伤定向性运输和/或归巢。在一些方面,所述修复材料包括细胞(例如干细胞)、细胞因子、生长因子和/或趋化因子。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括恢复和/或增强损伤部位的干细胞或祖细胞分化和组织再生。在一些实施方案中,所述个体是人。在一些实施方案中,所述个体具有有缺陷的组织修复系统。

[0010] 在另一个方面,提供了在具有组织损伤之个体的组织中诱导干细胞(例如间充质干细胞,例如骨髓间充质干细胞)向损伤部位迁移的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述个体是人。在一些实施方案中,所述个体具有有缺陷的组织修复系统。

[0011] 在另一个方面,提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复的方法,其包括:a)向损伤部位递送有效量的微量元素;和b)向所述个体施用有效量的干细胞(例如间充质干细胞,例如骨髓间充质干细胞)。在一些实施方案中,所述个体是人。在一些实施方案中,所述个体具有有缺陷的组织修复系统。

[0012] 在另一个方面,提供了在组织修复系统有缺陷的个体中诱导组织修复的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述个体是人。

[0013] 在根据上述任一种方法的一些实施方案中,其中所述个体具有慢性组织损伤。在一些实施方案中,所述个体至少60岁。在一些实施方案中,所述个体是骨髓间充质干细胞有缺陷的。

[0014] 在根据上述任一种方法的一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例 CuSO_4 或 CuCl_2)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0015] 在根据上述任一种方法的一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂(bursting)而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。

[0016] 在根据上述任一种方法的一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0017] 在一个方面,本申请提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素。在另一个方面,提供了在具有组织损伤的个体中诱导血管朝向损伤部位生长的方法,其包括向所述损伤部位直接递送有效量的微量元素。

[0018] 在根据上述任一种方法的一些实施方案中,所述微量元素通过注射递送并且在注射后在注射部位保持浓缩(例如通过导管注射)。在一些实施方案中,所述微量元素通过包含所述微量元素的植入物(例如,包被有所微量元素的植入物,例如选自支架、板和膜的植入物)递送。

[0019] 在根据上述任一种方法的一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用有效量的干细胞。在一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用有效量的干细胞诱导剂。

[0020] 在根据上述任一种方法的一些实施方案中,所述个体具有有缺陷的组织修复系统。在一些实施方案中,组织修复系统有缺陷的个体是具有慢性组织损伤或急性组织损伤的个体。在一些实施方案中,组织修复系统有缺陷的个体是至少60岁的个体。在一些实施方案中,组织修复系统有缺陷的个体是有干细胞缺陷的个体。

[0021] 在根据上述任一种方法的一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜。在根据上述任一种方法的一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0022] 还提供了可用于本文中所述的方法的药盒和制品。

[0023] 附图简述

[0024] 图1A至1D示出了在新西兰兔模型中对慢性心肌梗死进行Cu-MB治疗的结果;图1A示出了减小的心脏梗死区;图1B示出了减小的心脏梗死区;图1C示出了提高的左心室射血分数;图1D示出了梗死区中的提高的毛细血管密度;

[0025] 图2示出了在急性心肌梗死状况下大多数梗死区中的BMSC归巢;

[0026] 图3示出了在梗死区中但不在非梗死区中的BMSC归巢;

[0027] 图4示出了急性心肌梗死区中的强BMSC归巢信号;

[0028] 图5示出了在慢性心肌梗死状况下未检测到BMSC归巢信号;

[0029] 图6示出了在无心肌梗死的情况下,单独的Cu-MB治疗不能动员BMSC归巢;

[0030] 图7示出了在对慢性心肌梗死进行Cu-MB治疗之后重现BMSC归巢信号;

[0031] 图8示出了对慢性心肌梗死进行Cu-MB治疗之后重现BMSC归巢;

[0032] 图9示出了对急性心肌梗死、慢性心肌梗死和Cu-MB治疗的慢性心肌梗死组的归巢信号的量化;

[0033] 图10示出了在急性心肌梗死后一个月内用AMD3100进行治疗之后,BMSC归巢信号显著降低;

[0034] 图11示出了在急性心肌梗死中没有经AMD3100治疗的BMSC的BMSC归巢信号;

[0035] 图12示出了急性心肌梗死之归巢信号和急性心肌梗死中经AMD3100治疗的BMSC的归巢信号的量化;

[0036] 图13示出了在经Cu-MB治疗的慢性心肌梗死组中用AMD3100治疗BMSC之后没有BMSC归巢信号;

[0037] 图14示出了在急性心肌梗死中用AMD3100治疗BMSC之后没有BMSC归巢信号,并且在经Cu-MB治疗的慢性心肌梗死组中用AMD3100治疗BMSC之后没有BMSC归巢信号;

[0038] 图15示出了慢性心肌梗死、Cu-MB治疗的慢性心肌梗死和AMD3100治疗的Cu-MB治疗慢性心肌梗死组的BMSC归巢信号的量化;

- [0039] 图16A示出了在用Cu-MB治疗之后恒河猴的通过心回波描记术检测到的左心室射血分数变化；
- [0040] 图16B示出了在用Cu-MB治疗之后恒河猴的MRI检测到的左心室射血分数变化；
- [0041] 图17示出了在用Cu-MB治疗之后恒河猴的通过心回波描记术检测到的左心室收缩期末容积变化；
- [0042] 图18A示出了在Cu-MB治疗之后恒河猴的通过侵入性心脏血液动力学测量检测到的最大dP/dt；最大dP/dt增加反映心脏收缩功能得到增强；
- [0043] 图18B示出了在Cu-MB治疗之后恒河猴的通过侵入性心脏血液动力学测量检测到的最小dP/dt；最小dP/dt的绝对值增加反映心脏舒张功能得到增强；
- [0044] 图19示出了在Cu-MB治疗之后恒河猴的通过侵入性心脏血液动力学测量检测到的左心室发展压(left ventricular development pressure, LVDP)；LVDP增加反映心脏收缩功能得到增强；
- [0045] 图20示出了在用Cu-MB治疗之后恒河猴的MRI检测到的梗死尺寸变化；
- [0046] 图21示出了梗死区的边缘中CD31标记的毛细血管密度；
- [0047] 图22示出了恒河猴的梗死区中CD31标记的毛细血管密度；
- [0048] 图23示出了在用铜-白蛋白超声造影微泡靶向治疗进行恒河猴治疗之后梗死区中增殖细胞的Ki67标记；
- [0049] 图24示出了梗死区中HIF-1 α 蛋白水平的增加,其中免疫组织化学染色显示心肌细胞的细胞质和细胞核以及内皮细胞的细胞质中的HIF-1 α 表达；
- [0050] 图25示出了显示不同组的不同心脏区中HIF-1 α 蛋白的表达的Western印迹；
- [0051] 图26示出了显示不同组的梗死区中HIF-1 α 蛋白的表达的Western印迹；
- [0052] 图27示出了显示不同组的不同心脏区中心脏VEGF的mRNA水平变化的RT-PCR结果；
- [0053] 图28示出了显示不同组的梗死区中心脏VEGF的mRNA水平变化的RT-PCR结果；
- [0054] 图29示出了显示不同组的不同心脏区中心脏VEGFR1的mRNA水平变化的RT-PCR结果；
- [0055] 图30示出了显示不同组的梗死区中心脏VEGFR1的mRNA水平变化的RT-PCR结果；
- [0056] 图31示出了显示不同组的不同心脏区中心脏HIF-1 α 的mRNA水平变化的RT-PCR结果；
- [0057] 图32示出了显示不同组的梗死区中心脏HIF-1 α 的mRNA水平变化的RT-PCR结果；
- [0058] 图33示出了不同治疗组的远端非梗死区和梗死区中的铜含量；
- [0059] 图34示出了铜损失诱导HIF-1活性抑制的机制；
- [0060] 图35示出了对铜纳米材料治疗14天后的脑缺血大鼠的神经功能评分的定量分析；
- [0061] 图36示出了指示脑梗死的尺寸变化(图36A)和不同组的脑梗死尺寸比较(图36B)的TTC染色；
- [0062] 图37示出了对全脑和脑萎缩的总体观察(图37A)以及对在治疗后第14天之不同组的脑缺血大鼠中脑萎缩的比较(图37B)；
- [0063] 图38示出了对脑中的正常区、梗死中心和梗死区边缘的苏木精和伊红染色；
- [0064] 图39示出了血管生成检测区,方框表示缺血的边缘区；
- [0065] 图40示出了显示缺血边缘区中的CD31标记细胞的免疫组织化学分析；

[0066] 图41示出了对恒河猴脑梗死的神经功能损伤评分的定量分析,其显示相比较于未治疗组之铜化合物治疗组中在治疗后7天内的神经功能改善;

[0067] 图42示出了对、不同浓度的硫化铜对经在具有1%FBS之EBM-2中培养的分离大鼠主动脉环的血管生成的作用;

[0068] 图43示出了铜螯合剂TEPA对铜促进血管生成的影响;

[0069] 图44示出了在分离的大鼠主动脉环中的VEGF蛋白水平的Western印迹分析;图44A示出了不同浓度的铜对VEGF蛋白水平的影响;图44B示出了TEPA对VEGF蛋白水平的影响;

[0070] 图45示出了抗VEGF抗体对血管生成的铜促进的影响;

[0071] 图46示出了抗VEGF抗体对分离的大鼠主动脉环中的VEGF蛋白水平的影响;

[0072] 图47示出了在注射铜微泡之后血液铜浓度的显著增加;

[0073] 图48示出了与在不进行超声下用铜微泡治疗的组相比,在超声介导的铜微泡治疗组中心脏铜浓度与血液铜浓度的比率的显著增加。

具体实施方式

[0074] 先前表明,HIF-1转录活性需要微量元素铜的参与。参见,例如,Jiang等,2007,J Exp Med,04,657-666;Feng等,2009,Mol Pharmacol,75,174-182;Qiu等,J Pharmacol 2012,Exp Ther,342,561-567。铜从细胞损失降低HIF-1 α 与靶基因的HRE序列以及与P300 (HIF-1转录复合物的组分)结合,并抑制VEGF以及由HIF-1调节的其他基因的表达,但是不影响HIF-1 α 的产生和稳定。重要的是,在死于慢性心脏病的人的心脏中,铜浓度较低。已知,离开心肌的铜转移由缺血延长触发。参见,例如,Chevion等,PNAS,90,1102-1106。铜的损失与心脏功能障碍的程度密切相关。

[0075] 因此,认为心肌铜的显著流出是抑制累积的HIF-1 α 转录活性并伴随心肌缺血延长的主要原因。因此,即使在HIF-1蛋白水平升高的状况下,由于心肌铜损失而不会发生HIF-1控制基因的上调。因此,预期将铜有效地递送至损伤部位将恢复HIF-1转录活性,并且确实逆转心肌缺血性梗死。微量元素(例如铜)当递送至组织的损伤部位以激活HIF-1转录活性时将特别有效地诱导组织修复和自再生。

[0076] 因此,在一个方面,本申请提供了在具有组织损伤的个体中诱导至少两个组织修复事件的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。这基于发明人的以下洞察:向组织损伤部位递送微量元素(例如铜)触发机体的固有组织修复机制,其由导致组织修复的一系列事件构成。认为,将铜通过微泡局部递送至损伤部位将诱导骨髓间充质干细胞(BMSC)向损伤部位迁移(即,归巢),即使在个体中的组织已另外丧失自发募集BMSC细胞的固有能力之后也如此。将铜局部递送至损伤部位还将触发一系列导致组织修复的其他事件,包括例如诱导干细胞在损伤部位分化、诱导触发组织再生的信号分子、诱导损伤部位发生组织再生、逆转损伤部位的损伤(damage)和在损伤部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境。认为,铜及其他微量元素在组织修复中具有控制作用,并且本公开内容为有效治疗涉及组织损伤的疾病创造了新的治疗机会。

[0077] 在另一个方面,本发明提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复的方法,其包括向损伤部位中直接递送有效量的微量元素。这基于本发明人的以下洞察:微量元素(例如铜)当直接递送至组织损伤部位时在诱导组织修复方面特别有效。例如,认为损伤部位存

在的微量元素可吸引血管朝损伤部位生长,由此有利于损伤部位的血液微血管环境再生并因此有利于组织再生。还认为,铜(或其他微量元素)对组织修复和血管形成的作用依赖于局部损伤部位的铜(或其他微量元素)的具体浓度。向损伤部位直接递送铜(或其他微量元素)可更好地控制局部损伤部位的所需的铜浓度,从而允许更精确的介入和治疗。

[0078] 因此,在一些实施方案中,本申请提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。

[0079] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体的组织中诱导干细胞(例如间充质干细胞(MSC),例如骨髓间充质干细胞(BMSC))向损伤部位迁移的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。

[0080] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素和有效量的干细胞(例如, MSC, 例如BMSC)或干细胞(例如MSC, 例如BMSC)诱导剂。

[0081] 在一些实施方案中,提供了在组织修复系统有缺陷的个体中诱导组织修复的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。

[0082] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复的方法,其包括向损伤部位中直接递送有效量的微量元素。

[0083] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导血管朝向损伤部位生长的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素。

[0084] 还提供了可用于本文中所述的方法的药盒和制品。

[0085] 应理解,本文中所述的本发明方面和实施方案包括“由这些方面和实施方案组成”和/或“基本由这些方面和实施方案组成”。

[0086] 提及“约/大约”时,本文中的数值或参数包括(并且描述了)针对该数值或参数本身的变化。例如,提及“约/大约X”的描述包括对“X”的描述。

[0087] 本文中使用的术语“约X至Y”与“约X至约Y”具有相同的含义。

[0088] 除非另外明确指出,否则本文以及所附权利要求书中使用的没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。

[0089] 对本领域技术人员而言显而易见的是,所评估、选定用于接受治疗和/或接受治疗的个体为需要这样的活性的个体。

[0090] 诱导一个或更多个组织修复事件的方法

[0091] 在一个方面,本申请提供了在具有组织损伤的个体中诱导至少一个(包括例如至少任意2、3、4、5、6个或更多个)组织修复事件的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如 CuSO_4 或 CuCl_2)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0092] 本文中所述的“个体”指哺乳动物,例如小鼠、大鼠、兔、猫、狗、猪、母牛、公牛、绵羊、山羊、马、猴及其他非人灵长类动物和人、脊椎动物(例如鱼)和禽(例如鸡)。哺乳动物可包括农场动物、运动动物、啮齿类动物和宠物。在一些实施方案中,所述个体是人。

[0093] 在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括诱导干细胞向损伤部位迁移,所述干细胞包括但不限于间充质干细胞(MSC)、骨髓间充质干细胞(BMSC)、多能干细胞、诱导性多潜能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)或多种组织衍生干细胞。在一些方面,所述组织衍生干细胞是脂肪组织衍生干细胞、心脏组织衍生干细胞或脐带组织衍生干细胞。在另一些实施方案中,本文中公开的干细胞是成体干细胞。在一些具体方面,所述成体干细胞是造血干细胞,乳腺干细胞,肠干细胞,胎盘、脂肪组织、肺、骨髓、血液、脐带的沃顿胶质(Wharton's jelly)或牙(例如牙髓和牙周韧带的血管周围生态位(perivascular niche))中的间充质干细胞,内皮干细胞,神经干细胞,嗅成体干细胞,神经嵴干细胞,或种系干细胞(例如,睾丸中的干细胞)。

[0094] 在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括诱导干细胞在损伤部位分化。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括诱导损伤部位发生组织再生。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括诱导触发组织再生的信号分子。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括逆转损伤部位的损害。在一些实施方案中,至少一个组织修复事件包括在损伤部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境。在一些实施方案中,所述微量元素是铜。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0095] 本文中所述的具有组织损伤的个体包括但不限于具有以下中的一项或更多项的个体:心肌损伤、脑损伤、脊髓损伤、肌损伤、骨骼损伤、急性肾小管坏死、肠损伤、肺损伤、肝损伤、肾损伤、骨损伤、皮肤损伤、疝修复、血管吻合、粥样硬化斑块、血管瘤和钝伤后或穿透性创伤性损伤。

[0096] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体的组织中诱导干细胞向损伤部位迁移(即,归巢)的方法,其包括向所述损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0097] 在一些实施方案中,所述干细胞是间充质干细胞(MSC)、骨髓间充质干细胞(BMSC)、多能干细胞、诱导性多潜能干细胞(iPS)或组织衍生干细胞。在一些方面,所述组织衍生干细胞是脂肪组织衍生干细胞、心脏组织衍生干细胞或脐带组织衍生干细胞。在另一些实施方案中,本文中公开的干细胞是成体干细胞。在一些具体方面,所述成体干细胞是造血干细胞,乳腺干细胞,肠干细胞,胎盘、脂肪组织、肺、骨髓、血液、脐带的沃顿胶质或牙(例

如牙髓和牙周韧带的血管周围生态位)中的间充质干细胞,内皮干细胞,神经干细胞,嗅成体干细胞,神经嵴干细胞,或种系干细胞(例如,睾丸中的干细胞)。

[0098] 在一些实施方案中,所述干细胞在体内从具有组织损伤之个体的一个器官或组织隔室向其另一器官或组织隔室的损伤部位迁移。例如,MSC可从骨髓(bone marrow,BM)、脐带血(umbilical cord blood,UCB)、脐带间质(沃顿胶质)、胎盘和脂肪组织(adipose tissue,AT)迁移。在另一些实施方案中,可从器官或组织隔室分离MSC,将其在体外富集和/或处理,然后用于在体内向组织或器官损伤部位迁移。

[0099] 在另一些实施方案中,本文中使用的细胞迁移测定包括体内生物标志物、生物发光、荧光、正电子发射断层显象(positron emission tomography,PET)/CT和核磁共振成像(magnetic resonance imaging,MRI)。可用其他方法例如对组织切片进行IHC来验证和证实所述体内方法。

[0100] 用于测定干细胞迁移的体内非侵入性成像技术包括对装入MSC中的金色右旋糖酐包被颗粒进行成像,其可使用X-射线、拉曼光谱、计算机化断层显象(computed tomography,CT)或超声(US)方式来可视化。在一些实施方案中,可向干细胞(例如MSC)中装入具有能够通过X-射线、CT、US、PET或MRI来实现细胞可视化的特性的生物相容性纳米颗粒构建体、示踪物或超顺磁性颗粒。在一些实施方案中,可使用例如盲肠结扎和穿刺(cecal ligation and puncture,CLP)的技术来测定干细胞的迁移。例如,对GFP嵌合小鼠进行CLP允许在腹部脓毒症的环境下观察BMSC的表现。可使用FACS、流式细胞术和免疫组织化学来追踪BMSC到外周血、肺、肝、皮肤伤口和主要损伤部位中的迁移。BMSC表现可与损伤时间以及细胞因子和趋化因子的局部(使用RT-PCR)和全身水平相关。追踪干细胞的迁移可有助于解释BMSC在组织损伤后对本地和远端器官和组织修复以及再生的贡献。

[0101] 在一些实施方案中,可利用向个体施用经标记的细胞来监测干细胞的迁移。使用例如同位素标记和染色的方法来标记干细胞。在一些实施方案中,标记方法包括:向雌性动物注射雄性动物的干细胞,因此Y染色体可以是追踪物;将A物种的干细胞注射于B物种,因此A物种的特定基因可以是细胞追踪物;用pKH26、BrdU或其他染料标记干细胞,因此可通过染料或针对追踪物的特定酶促反应追踪干细胞。

[0102] 最常见的体内追踪方法是同位素标记。可通过标记细胞的同位素来追踪干细胞。但是,值得注意的是,必须考虑安全性和放射半衰期。其他的干细胞体内追踪方法包括:通过细胞染料例如DID进行细胞染色;通过双光子激发荧光显微术对体表细胞进行实况成像(live imaging);通过双光子激发荧光显微术对转基因动物的特定体表细胞进行实况成像;用SPIO标记细胞并通过MRI追踪追踪物,等。可通过多种荧光染料标记干细胞,然后将其注射到动物中。当达到检查点时,可将靶器官冷冻切片并通过共焦激光扫描显微术直接观察。这种追踪方法不需要太多的标记细胞(10^6 个细胞/兔),因此在器官和细胞的天然状态下可使用自体细胞作为追踪物。

[0103] 干细胞的标记可通过例如一种单独的追踪物如pKH26来实现。pKH26是一种脂溶性染料,通过其的标记不会渗透细胞膜,因此适合活细胞追踪。在此提及的追踪方法为通过2或3种染料进行多次标记。一种选择的标记方法是通过细胞核追踪物(DAPI,Hoechst)加膜追踪物来进行。细胞核追踪物确定细胞的核,并同时附和膜追踪物pKH26。另一种方法是通过2种膜追踪物(例如Dio(3)&pKH26)进行多次标记。这些追踪物通过类似的机制标记细胞,

但是具有不同的激发和发射波长。因此,归巢信号包括2种不同的荧光信号,其中两者同时证明归巢BMSC。在这种追踪方法中,仅认为不同波长的重叠信号(例如红色和绿色信号)为归巢信号。

[0104] 很多种动物组织是自发荧光的,并且天然组织中的最常见自发荧光是绿色荧光。心脏相对而言较不发荧光,但是其荧光足以在观察中制造干扰。切片的切割边缘往往是荧光最强的。为了解决干扰,可只识别绿色和红色重叠信号作为追踪信号。红色荧光更适合用针对其特性的IOD值进行统计学分析(除红色荧光信号中的明显不精确之外)。

[0105] 在一些实施方案中,提供了诱导干细胞在损伤部位分化和/或诱导损伤部位发生组织再生的方法,其包括向所述损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。在某些方面,所述干细胞能够分化为间充质细胞类型,包括成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、内皮细胞、上皮细胞、肠上皮细胞、骨细胞、神经细胞、肝细胞、肾原细胞、肌细胞(骨骼肌和平滑肌细胞)和心肌细胞。在另一些方面,所述干细胞能够分化为非中胚层来源的细胞,包括β细胞、肝细胞和神经元。

[0106] 可使用本领域中已知的测定来阐明干细胞分化的过程和分化干细胞的表型(例如MSC,例如BMSC),所述测定包括针对成骨细胞的碱性磷酸酶和茜素红S染色,针对脂肪细胞的油红O染色,以及针对软骨发生的爱茜蓝染色。还可通过基因表达谱绘制来测定干细胞(例如MSC)向多种细胞类型的分化。例如,转录谱绘制已鉴定出参与成骨分化(FHL2、ITGA5、Fgf18)、软骨发生(FOXO1A)和腱发生(tenogenesis)(Smad8)的特定基因。在一些实施方案中,MSC可通过大规模扩增产生高细胞数目。在一些实施方案中,提供了在个体中诱导损伤部位发生组织再生的方法,其包括向所述损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。在一些实施方案中,所述方法诱导损伤部位的细胞增殖。在一些实施方案中,所述方法诱导损伤部位的血管生成。在一些实施方案中,所述方法诱导损伤部位的血管成熟。在一些实施方案中,所述方法产生上述两种或更多种效应。

[0107] 可在例如其中一部分组织受损或被去除的生物体中测定本文中公开的组织再生。然后,将微量元素与或不与本文中所述的干细胞一起施用于该生物体,并确定组织再生的速率。将该组织再生速率与当向生物体施用对照或不进行治疗时所观察到的速率进行比较。可在组织再生测定期间确定的其他参数包括但不限于例如疼痛或疼痛标志的症状或结果,炎症的体征或症状,最终再生程度,和再生质量。在另一些实施方案中,本文中的组织再生测定包括评估一个或更多个功能参数,例如一种或更多种心脏功能性标志物、一种或更多种肾功能性标志物以及一种或更多种肝功能性标志物。

[0108] 在一些实施方案中,可在分析心脏再生和修复中使用以下一个或更多个参数来评价本文中所述的方法:(1) 重构组织的量或心肌质量和冠状动脉血管;(2) 恢复肌细胞和血管的数量和大小;(3) 新形成的肌细胞和血管与周围心肌的整合;和(4) 再生心肌结构的来源。在一个方面,可进行核磁共振成像(MRI)来研究瘢痕面积、整体左心室功能、区域性功能(室壁运动和增厚)和区域性心室灌注。在另一个方面,使用MRI来检测和/或确定改善心室功能的新血管、组织或细胞的存在。在又一个方面,可进行组织病理学来确定瘢痕面积以及c-kit阳性心脏干细胞的鉴别和量化。组织病理学还提供了关于新血管和心肌细胞的分布、大小和密度的数据。组织病理学允许在组织和细胞水平记录修复过程。例如,进行测试以评价梗死部分内的微血管密度(vWF阳性血管/mm²)、BrdU阳性细胞和c-kit阳性细胞。使用冯·维勒布兰德因子(von Willebrand factor, vWF)来量化微血管密度允许确定梗死区中生成的新血管的量。BrdU阳性细胞代表包括心脏细胞在内的细胞的增殖。c-kit阳性细胞测试显示所选定梗死部分内干细胞的量。

[0109] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤之个体的组织中诱导触发组织再生的信号分子的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0110] 本文中所述的合适信号分子包括但不限于HIF-1、VEGF、SDF-1、CXCR4、CXCL12(也称为SDF-1 α)、MMP、HGF/c-met、TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α 、CCR1、CCR4、CCR7、CCR10、CCR9、CXCR5、CXCR6、CD44、CD54、CD56、CD106、E-钙粘附蛋白、P-选择素、整合素(例如整合素- β 1和CD49a、b、c、e、f(整合素 α 1、2、3、4、6)以及整合素配体(例如VCAM和ICAM))。

[0111] SDF-1/CXCR4轴是干细胞归巢最重要的机制之一。属于CXC-趋化因子家族的SDF-1(基质细胞衍生因子1或CXCL12)是一种小分子分泌性蛋白质。SDF-1的表达由HIF-1(缺氧可诱导因子-1)调节。HIF-1由HIF-1 α 和HIF-1 β /ARNT(芳基羟核转位因子,ARNT)构成。HIF-1 β 在细胞质中稳定,因此HIF-1 α 的表达和积累决定HIF-1的活性。在常氧下,HIF-1 α 蛋白被合成并通过泛素-蛋白酶体系统迅速降解。脯氨酰羟化酶(PHD)使HIF-1 α 羟基化,而经羟基化

的HIF-1 α 被von Hippel-Lindau肿瘤抑制蛋白(pVHL)识别,所述蛋白质构成靶向HIF-1 α 蛋白降解的泛素-蛋白连接酶。当受到损伤时,受伤区域缺氧,这抑制PHD的活性,使得HIF-1 α 能够积累并转位到细胞核中,在此其与HIF-1 β 二聚形成HIF-1,与其他因子组合并引发靶基因转录。受损的组织表达高水平的SDF-1并将其释放到循环中,从而建立从受损区域到循环远端的浓度梯度。所述梯度由此将CXCR4表达的干细胞(包括BMSC)吸引至受损组织。

[0112] 当心脏处于慢性缺氧下时,冠状动脉的血液不能满足心肌的需求。因此,慢性缺血将诱导心肌纤维化,微动脉减少,对血泵造成损害并最终诱导缺血性心肌梗死。在慢性缺血下时,HIF-1的活性受到限制,从而导致由HIF-1调节的血管生成因子的表达被抑制。因此,不能重建血液供应并且将发生梗死。

[0113] 通常来说,受损组织中的HIF-1活性暂时受到限制。动物实验和临床试验两者均已证明:在心脏缺血下,在受到损伤之后受损组织中的HIF-1 α 立即积累,但是此后逐渐减少。在短暂提高之后,HIF-1的活性甚至比含量降低的更快,从而导致HIF-1调节的因子(例如VEGF和SDF-1)的表达下降。由于HIF-1的调节,SDF-1的表达在心肌梗死后的第一或第二天达到峰值。然后,其逐渐降低,并在约一个月内下降至基线。由于SDF-1是干细胞归巢动员物之一,因此SDF-1的降低导致干细胞归巢减弱并且甚至消失。

[0114] 重要的是,与在长时间缺血状况下相比,如在急性缺血状况下激活的由HIF-1 α 诱导的防御行为具有不同的工作机制。在慢性缺血状况下,缺血心肌中的HIF蛋白水平增加,而由HIF调节的基因(例如VEGF)受到抑制,其导致血运重建降低并且再生受损。铜缺乏降低HIF-1 α 与靶基因的HRE序列以及与P300(HIF-1转录复合物的组分)结合。此外,在长时间缺血之后,铜立即从心肌显著地转移至血液。冠状动脉血流中的这种铜转移灵敏地发生在长时间心脏缺血而非短期心脏缺血之后。心肌铜的损失与心脏功能的丧失程度相关。因此,即使在HIF蛋白水平升高的状况下,由于心肌铜损失而仍不会发生HIF控制基因的上调。微量元素(例如铜)可导致HIF-1的活化,其包括HIF-1 α 合成、稳定、从细胞溶质转位到细胞核、与靶基因的HRE序列结合以及HIF-1转录复合物形成。本文中所述的方法可用于诱导一种或更多种信号分子,例如HIF-1 α 。

[0115] 在一些实施方案中,提供了在个体的组织中逆转损伤部位的损伤的方法,其包括向所述损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0116] 组织损伤的逆转可通过任何合适的方法进行测定,所述方法例如检测正常组织稳态和/或持续组织损伤的细胞标志物(例如,通过免疫组织化学或者测量DNA和转录本水平),测量损伤面积或损伤体积,或者评估任何临床上相关的指示物。例如,可通过量化细胞数目(例如肌细胞、成纤维细胞的数目)或瘢痕形成的量,或者用针对心脏功能输出或结构

方面的功能性测定来测量梗死组织的心脏组织损伤的逆转,所述心脏功能输出或结构方面包括LVEDP、LVDP、max dp/dt、min dp/dt、LV重量(LV Weight)、室体积(Chamber Volume)和舒张期室壁应力(Diastolic Wall Stress)。一般来说,如果在任何这样的临床评估或其任意组合中本文中公开的方法均产生显著变化(例如,至少2倍),则认为其逆转受损组织中的损伤。在一些实施方案中,所述方法逆转组织中损伤部位的纤维化。纤维化是纤维组织的异常累积,其可作为受损组织中伤口愈合过程的一部分发生。这样的组织损伤可由物理损伤、炎症、感染、暴露于毒素以及其他原因引起。肝纤维化例如作为针对慢性肝损伤的伤口愈合应答的一部分发生。纤维化作为以下并发症发生:血色素沉着症、威尔逊病(Wilson's disease)、醇中毒、血吸虫病、病毒性肝炎、胆管梗阻、暴露于毒素和代谢紊乱。认为瘢痕组织的这种形成表示机体试图包裹受损组织。肝纤维化以细胞外基质累积为特征,从定性方面来讲,这可与正常肝中有所区别。如果不进行检查,肝纤维化将发展至肝硬化(通过存在经包裹的小结限定)、肝衰竭和死亡。如Li and Friedman(Gastroenterol.Hepatol.14:618-633,1999)所总结的,用于肝纤维化的实际和建议治疗策略包括去除潜在原因(例如,毒素或感染原)、抑制炎症(使用例如皮质类固醇、IL-1受体拮抗剂或其他药剂)、使用例如 γ 干扰素或抗氧化剂来下调星状细胞活化、促进基质降解,或者促进星状细胞凋亡。

[0117] 高血压、高血压性心脏病、动脉粥样硬化和心肌梗死的结果是在心脏和血管中积累纤维化组织。高血压或血压过高可由多种因素引起并且常常导致发生高血压性心脏病(Hypertensive Heart Disease, HHD)并发展至心脏停搏和心肌梗死。类似地,动脉粥样硬化以及其他缺血性心脏病常常也导致心脏停搏。这些心血管疾病全部表现出细胞外基质累积或纤维化沉积,其导致血管变硬以及心脏组织自身变硬。纤维化物质的这种沉积是针对由高血压和/或硬化状态引起的损伤的应答,并且这一应答的效应还对血管和心脏变硬以及心室扩大产生负面影响。在一些情况下,心血管疾病中的心脏纤维化增多干扰或改变通过心脏的组织支架传递至心肌的信号,进一步导致有效心脏功能被破坏并促进心脏停搏和心肌梗死。

[0118] 根据本公开内容,可使用在组织损伤期间受到差别调节之基因的表达谱来评估本文公开的治疗方法中的组织损伤逆转。例如,基于微阵列的基因表达分析可基于对经导致细胞外胶原累积和增殖发生改变(纤维化的标志)之选定刺激的人细胞(例如成纤维细胞和心肌细胞)的分析。可对所述刺激进行选择以模拟组织特异性纤维化过程中的那些。然后,可使用与纤维化(例如,肝纤维化、肺纤维化、心脏组织纤维化、糖尿病性肾病和肾纤维化)相关的基因表达文件来测定纤维化和对组织的纤维化损伤的逆转。在另一些实施方案中,可使用与纤维化逆转(例如,在已知至少部分地逆转纤维化的治疗下)相关的基因表达文件来测定纤维化和对组织的纤维化损伤的逆转。

[0119] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤之个体的组织中的损伤部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境的方法,其包括向所述损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,

所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0120] 所述微环境是结构和炎性两种细胞、细胞因子、蛋白质和生长因子的复杂网络。在心脏纤维化疾病或病症的情况下,心脏包含驻留结构细胞例如心肌细胞、上皮细胞、成纤维细胞,以及驻留心肌细胞祖细胞和细胞因子分泌细胞。在纤维化发病期间,这些细胞与纤维化因子相互作用。在某些方面,成纤维细胞和成肌纤维细胞在产生纤维化环境中发挥重要作用,因为他们分泌过量的胶原和基质材料,这导致不可逆的瘢痕形成。细胞间粘附分子和细胞外基质配体是纤维化微环境中的重要因子,并且促进纤维化和成纤维细胞分化。在一些实施方案中,在组织微环境中对粘附介导的信号进行测定。例如,细胞分化和迁移响应于来自微环境的机制提示(例如,周围基质的硬度)而发生。在一个方面,对组织的弹性或间充质干细胞的培养基质进行测定和调节以促进干细胞向受损组织归巢、损伤部位的干细胞分化、组织修复和/或组织损伤逆转。在一个实施方案中,软基质导致MSC分化为神经元样细胞,而硬基质导致MSC分化为肌原性细胞。在一个方面,对损伤部位的细胞外基质及其组分进行测定以指示该微环境是否促进干细胞向所述部位迁移、损伤部位的干细胞分化、组织修复和/或组织损伤逆转。

[0121] 在一些实施方案中,对细胞在其自然环境的背景下的变化进行测量以指示本文中公开的治疗方法的效力和/或毒性。在一些方面,对供体组织或器官(例如骨髓)和损伤部位的干细胞微环境进行测定和/或调节以促进干细胞向所述部位迁移、损伤部位的干细胞分化、组织修复和/或组织损伤逆转。局部组织微环境可通过蛋白质染色(IHC和IF)以及用显色和荧光ISH两者进行RNA染色来测定。例如,缺氧微环境可通过缺氧标志物染色、内皮细胞标志物染色、微血管密度分析和邻近分析来指示。还可如Benbrook, 2006, Drug Discovery Today: Disease Models, 3 (2): 143-148中所公开的使用器官培养物或器官型培养物来研究组织微环境。

[0122] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导至少两个(包括例如至少任意3、4、5、6个或更多个)组织修复事件的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素,其中所述至少两个组织修复事件选自诱导干细胞(例如骨髓间充质干细胞)向损伤部位迁移、诱导干细胞在损伤部位分化、诱导损伤部位发生组织再生、诱导触发组织再生的信号分子、逆转损伤部位的损伤和在损伤部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0123] 在一些实施方案中,提供了诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移并诱导干细胞在损伤部位分化的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,提供了诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移并诱导损伤部位发生组织再生的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,提供了诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移,诱导干细胞在损伤部位分化并诱导损伤部位发生组织再生的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0124] 通过直接递送来诱导组织修复和血管生长的方法

[0125] 在一个方面,本申请提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复的方法,其包括向损伤部位中直接递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素是铜。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0126] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复但不增加注射部位的VEGF表达的方法,其包括向损伤部位中直接递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素是铜。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0127] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导血管朝向损伤部位生长的方法,其包括向损伤部位中直接递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素是铜。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0128] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤之个体中诱导血管朝向损伤部位生长但不提高注射部位的VEGF表达的方法,其包括向损伤部位中直接递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述微量元素是铜。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0129] 组织内血管的形成和生长可通过血管生成和/或血管发生进行。在一个方面,血管包括毛细血管样结构,其是全功能的以支持血液的运输。在一些实施方案中,血管生成包括涉及从之前已有的血管生成新血管的过程:出芽式血管生成(sprouting angiogenesis)(通过使已有的血管出芽来形成新血管)或分裂式血管生成(splitting angiogenesis)(套叠)(通过使已有的血管分裂来形成新血管)。在一些实施方案中,血管生成包括涉及通过使内皮干细胞增殖来从头产生新血管的过程,例如在不存在之前已有的血管时形成新血管。

[0130] 在一些实施方案中,血管形成和生长需要来自直接控制该过程的生长因子以及其他蛋白质的信号,所述生长因子和蛋白质例如血管生成素(如Ang-1和Ang-2)、蝶素(Eph)、血管内皮生长因子(如VEGF-A和VEGF-C)、血小板衍生生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因

子(如FGF-1和FGF-2)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(IL)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)(也称为CCL-2)、转化生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α)、转化生长因子- β (如TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3和TGF- β 4)、内皮抑素、血管抑制蛋白、趋化因子、凝血细胞反应素(thrombospondin)、血管抑素(angiostatin)、血管细胞粘附分子(如VCAM-1)、基质金属蛋白酶(如MMP-2和MMP-9)、整合素、钙粘附蛋白、纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂。

[0131] 在一些实施方案中,通过测量内皮细胞增殖来测定血管生长,而内皮细胞增殖是完好动物中生成毛细血管所需要的。在一些实施方案中,可通过直接细胞计数、DNA合成和/或代谢活性来评估将微量元素直接递送到损伤部位中对内皮细胞增殖的作用。例如,可用微量元素治疗之后,从损伤部位分离内皮细胞并测定其增殖。在另一些实施方案中,可通过标记细胞并原位测量细胞计数、DNA合成和/或代谢活性来监测损伤部位的内皮细胞增殖。在另一些实施方案中,可向对象施用经标记的内皮细胞并原位监测经标记的内皮细胞在损伤部位的增殖。在一些实施方案中,用放射性同位素、荧光部分或可通过例如抗体等可被特异性检测到的标记来标记内皮细胞。在一些具体实施方案中,用[3H]胸苷或溴脱氧尿苷(BrdU)标记细胞。

[0132] 在一些实施方案中,通过测量内皮细胞的迁移来测定血管生长,例如在出芽式血管生成期间,内皮细胞降解基底膜并沿由促血管生成生长因子建立的化学梯度迁移。在某些实施方案中,对损伤部位的内皮细胞进行标记并原位监测细胞迁移。在另一些方面,向对象施用经标记的内皮细胞,并原位监测其朝向损伤部位的迁移。在另一些方面,可对损伤部位的内皮细胞进行分离并可通过多种体外测定来测定其迁移特性,所述体外测定包括Boyden室测定、琼脂糖不足测定(under-agarose assay)、伤口愈合测定、Teflon栅栏测定(Teflon fence assay)、噬动轨迹测定(phagokinetic track assay)以及类似测定。

[0133] 在一些实施方案中,通过测量形成具有引导血流的腔的管(即,管发生)的内皮细胞来测定血管生长。在一些实施方案中,通过主动脉环测定来测定血管生长。用于测定血管生长的主动脉环测定公开于Li等,“Copper promotion of angiogenesis in isolated rat aortic ring:role of vascular endothelial growth factor,”*Journal of Nutritional Biochemistry* 25 (2014) 44-49中,其公开内容通过引用以其整体并入本文。来自主动脉环的出芽微血管与驻留巨噬细胞、周细胞和成纤维细胞以模拟完好动物中血管生成的顺序序列紧密相互作用。在一些方面,内皮细胞尚未通过传代进行预先选择,并且因此处于与完好动物的内皮细胞类似的静息状态。结合血管生成功能(例如基质降解、迁移、增殖和管形成)的其他血管生成测定包括胚状体测定、小鼠跖骨测定以及类似测定。

[0134] 在一些实施方案中,使用体内测定来测量将微量元素直接递送到损伤部位之后的血管生长。这些测定包括但不限于角膜血管生成测定、鸡尿囊绒毛膜测定和基质胶栓测定(Matrigel plug assay)。例如,角膜是机体唯一既无血管又透明的组织,使得其理想地用于观察血管生成。在一个方面,可将包含促血管生成分子(例如本文中公开的微量元素)的颗粒或海绵植入到通过外科手术产生的间质口袋(stromal pocket)中。可每日监测新血管从周围角膜缘脉管系统的向内生长,从而允许确定血管生成的速率。在基质胶栓测定中,将包含如本文中公开的微量元素的基质胶植入在对象中的损伤部位处或附近,并稍后去除基质胶栓以使血管可视化。在一些实施方案中,用一种或更多种标记来标记内皮细胞,并例如

使用合适的成像技术体内测定其在损伤部位的增殖、迁移、管发生、血管形成和/或血管生长。

[0135] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体的组织中诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素。

[0136] 在一些实施方案中,提供了诱导干细胞在损伤部位分化和/或诱导损伤部位发生组织再生的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素。

[0137] 在一些实施方案中,提供了在个体中诱导损伤部位发生组织再生的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素。

[0138] 在一些实施方案中,提供了在个体的组织中逆转损伤部位的损伤的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素。

[0139] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤之个体的组织中的损伤部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素。

[0140] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导至少两个(包括例如至少任意3、4、5、6个或更多个)组织修复事件的方法,其包括向损伤部位中直接递送有效量的微量元素,其中所述至少两个组织修复事件选自:诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移、诱导干细胞在损伤部位分化、诱导损伤部位的组织再生、诱导触发组织再生的信号分子、逆转损伤部位的损伤和在损伤部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境。在一些实施方案中,所述微量元素是铜。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0141] 在一些实施方案中,提供了诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移并诱导干细胞在损伤部位分化的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,提供了诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移并诱导损伤部位发生组织再生的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,提供了诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移,诱导干细胞在损伤部位分化并诱导损伤部位发生组织再生的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素。

[0142] 与干细胞或诱导剂的联合治疗

[0143] 在另一个方面,本申请提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复(或改善组织功能)的方法,其包括a)向损伤部位递送有效量的微量元素;和b)向所述个体施用有效量的干细胞(例如间充质干细胞(MSC),例如骨髓间充质干细胞(BMSC))或干细胞诱导剂。在一些实施方案中,所述方法包括向所述个体施用有效量的干细胞(例如MSC,例如BMSC)。在一些实施方案中,所述方法包括向所述个体施用有效量的干细胞诱导剂。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0144] 在一些实施方案中,本文中公开的干细胞是间充质干细胞(MSC)、骨髓间充质干细胞(BMSC)、多能干细胞、诱导性多潜能干细胞(iPS)或组织衍生干细胞。在一些实施方案中,所述组织衍生干细胞是脂肪组织衍生干细胞、心脏组织衍生干细胞或脐带组织衍生干细胞。在一些实施方案中,本文中公开的干细胞是成体干细胞的诱导剂。在一些实施方案中,所述成体干细胞是造血干细胞,乳腺干细胞,肠干细胞,胎盘、脂肪组织、肺、骨髓、血液、脐带的沃顿胶质或牙(例如牙髓和牙周韧带的血管周围生态位)中的间充质干细胞,内皮干细胞,神经干细胞,嗅成体干细胞,神经嵴干细胞,或种系干细胞(例如,睾丸中的干细胞)。

[0145] 在一些实施方案中,本文中公开的干细胞诱导剂是间充质干细胞(MSC)、骨髓间充质干细胞(BMSC)、多能干细胞、诱导性多潜能干细胞(iPS)或组织衍生干细胞的诱导剂,所述组织衍生干细胞例如脂肪组织衍生干细胞、心脏组织衍生干细胞或脐带组织衍生干细胞。在一些实施方案中,所述干细胞诱导剂是成体干细胞的诱导剂,所述成体干细胞例如造血干细胞,乳腺干细胞,肠干细胞,胎盘、脂肪组织、肺、骨髓、血液、脐带的沃顿胶质或牙(例如牙髓和牙周韧带的血管周围生态位)中的间充质干细胞,内皮干细胞,神经干细胞,嗅成体干细胞,神经嵴干细胞,或种系干细胞(例如,睾丸中的干细胞)。

[0146] 在一些实施方案中,本公开内容的间充质干细胞诱导剂是诱导组织中(例如骨髓中)发生间充质干细胞形成的药剂。在某些方面,间充质干细胞的诱导剂诱导从未分化干细胞或多潜能干细胞形成间充质干细胞。在一些方面,所述干细胞是胚胎干细胞或诱导性多潜能干细胞(iPS)。所述干细胞可以是体内、体外或离体的。在另一些方面,所述干细胞是人胚胎干细胞或人诱导性多潜能干细胞。

[0147] 在一些方面,本公开内容的间充质干细胞诱导剂选自BMP蛋白、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)、BMP 4、BMP 2、活化素A、BMP 4拮抗剂、头蛋白(Noggin)、脊索蛋白(Chordin)、Tsg、BMP可溶性受体、BMPRIA、BMPRIB、作用或功能类似于BMP拮抗剂的小分子、Dorsomorphin、视黄酸信号传导途径的抑制剂、泛-视黄酸受体拮抗剂、视黄酸拮抗剂、视黄酸受体拮抗剂、类维生素A X受体拮抗剂(retinoic X receptor antagonist)、Wnt-3a、dickkopf同源物1(dickkopf homolog 1,DKK1)以及作用和功能类似于Wnt-3a的小分子例如Bio或CHIR99021。在一个方面,间充质干细胞诱导剂包含本文中公开的一种或更多种诱导剂。在一个方面,间充质干细胞诱导剂增加血液中的间充质干细胞。

[0148] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复(或改善组织功能)并与干细胞(例如MSC,例如BMSC)一起施用的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素,其中所述干细胞是经施用于所述对象的。在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位分化的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素,其中所述干细胞是经施用于所述对象的。在一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用有效量的干细胞(例如MSC,例如BMSC)诱导剂。在一些实施方案中,所述微量元素是铜。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0149] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复(或改善组织功能)并与干细胞(例如MSC,例如BMSC)的诱导剂一起施用的方法,其包括向损伤部位递送

有效量的微量元素。在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素,其中所述干细胞诱导剂是经施用于所述对象的。在一些实施方案中,所述方法还包括向所述个体施用有效量的干细胞(例如MSC,例如BMSC)。在一些实施方案中,所述微量元素是铜。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0150] 本文中所述的方法一般适合诱导干细胞向损伤部位归巢,其可包括内源性干细胞向损伤部位迁移、外源性干细胞向损伤部位迁移,或两者。

[0151] 在一些实施方案中,对本文中使用的干细胞进行修饰以增强其归巢响应。在一个实施方案中,所述干细胞通过血管和/或通过局部迁移向损伤部位迁移。例如,可对所述干细胞(例如MSC)进行化学、酶促和/或遗传修饰以增强其迁移和归巢响应。在一个方面,通过生物素-链霉亲和素化学修饰将唾液酸路易斯糖(sialyl Lewisx, SLeX)部分(细胞滚动配体)共价偶联至干细胞的表面。在一些实施方案中,SLeX工程化MSC在经P-选择素包被的基底上表现出体外滚动响应。Sarkar等,2008,Bioconjugate Chemistry 19,2105-2109。应理解,可使用其他合适的化学、酶促和/或遗传修饰来增强向受损组织部位的干细胞迁移和归巢。

[0152] 在一些实施方案中,所述干细胞来自在细胞表型方面具有差异的多种不同组织。这些差异可部分地由其所分离自的天然微环境的差异引起。除干细胞来源之外,培养方法也对干细胞特征(包括其归巢潜能)具有很大影响。在某些实施方案中,新鲜分离的干细胞比其经培养的对应用物更好地归巢。在一个方面,识别SDF-1 α 的CXCR4趋化因子受体在BMSC上高度表达,但是在培养之后丧失。在一些实施方案中,将干细胞与细胞因子(例如HGF、SCF、IL-3和IL-6)一起培养和/或在缺氧条件下培养干细胞,从而使得重建CXCR4表达。在另一些实施方案中,使用本文中公开的方法调节基质金属蛋白酶(MMP)信号以调节细胞迁移。MSC中MMP的表达受例如缺氧和培养汇合增加的因素的影响。另外,炎性细胞因子TGF- β 1、IL-1 β 和TNF- α 也通过上调影响MSC归巢的MMP来增强迁移。

[0153] 组织修复可通过例如损伤面积或损伤体积来评估。可使用任何临床上相关的标准来评估患者中受损组织的修复。例如,可通过量化细胞数目(例如肌细胞、成纤维细胞的数目)或瘢痕形成的量,或者用针对心脏功能输出或结构方面的功能性测定来测量梗死组织的修复,所述心脏功能输出和结构方面包括LVEDP、LVDP、max dp/dt、min dp/dt、LV重量、室体积和舒张期室壁应力。一般来说,如果在任何这样的临床评估或其任意组合中本文中公开的方法均产生显著变化(例如,至少2倍),则认为其修复受损组织中的损伤。

[0154] 可进行任何合适的方法来测定组织修复。例如,可进行评估组织愈合、评估经修复组织的功能性和评估组织中的细胞生长的方法。为了确定组织愈合的程度,可进行组织学和细胞染色以检测接种细胞的增殖和/或改善的组织学外观。在一些情况下,可收集组织部分并用固定剂(例如,如中性缓冲福尔马林)处理。可将这些组织部分脱水,包埋在石蜡中并用切片机切片以进行组织学分析。可将切片用苏木精和伊红(H&E)染色,然后固定在玻璃载玻片上以用于对形态和细胞构成进行显微镜评价。在一些情况下,可进行生理学测试以评估在根据本文中提供的方法和材料的治疗之后的组织运动和功能。例如,可进行体外机械测定以测量经修复腱组织或经修复关节的弯曲功(work of flexion, WOF)或弯曲角度。

体内测定包括器官的功能性评价、症状评估或成像技术。

[0155] 在一些实施方案中,在施用本文中公开的治疗方法之前、期间或之后的组织和/或器官功能可通过以下任意一种或更多种方法来评估:通过例如流式细胞术、免疫荧光、ELISA、磷光体标记、杂交、核酸扩增或Western印迹的方法来对指示组织功能得到改善的至少一种生物标志物进行生化分析;细胞功能测定,例如细胞凋亡测定、坏死测定和细胞生存力测定,包括通过免疫荧光或流式细胞术进行膜联蛋白V染色、检测半胱天冬酶活性、缺氧测定、TUNEL测定、细胞DNA分梯(laddering)、响应于H₂O₂的棒状细胞的数目、对基因表达进行qPCR评估和通过H&E染色测量坏死面积;瘢痕形成测定,包括测量受损或梗死区中成纤维细胞的数目、测量胶原沉积和与瘢痕形成相关的其他基质蛋白的水平;干细胞或祖细胞向受损区域中的迁移;以及任何其他临床上相关的器官功能测试。

[0156] 在一些实施方案中,心脏功能可通过以下任意一个或更多个参数来评估:肌细胞机械学和细胞融合,例如肌细胞大小的分布频率、峰值缩短、缩短和重新伸长的速度,以及细胞融合的评估(X染色体的数目);心脏功能的输出或结构方面,包括LVEDP、LVDP、+dp/dT、LV重量、室体积、舒张期室壁应力以及对MI经治疗和MI未经治疗对象的比较;心肌再生,例如再生心肌的构成、对经治疗对象相对于未经治疗对象中梗死区中的BrdU阳性细胞的评估,以及经治疗对象相对于未经治疗对象中梗死区中的肌球蛋白阳性细胞;心脏结构,例如梗死尺寸、纤维化量和心肌细胞肥大。在某些实施方案中,本文中公开的方法还包括测量心脏功能的一个或更多个标志,其中心脏功能的所述标志是相比较于对照的胸心输出量(cardiac output,CO)、心指数(cardiac index,CI)、肺动脉楔压(pulmonary artery wedge pressure,PAWP)、心指数(CI)、分数缩短%(%fractional shortening,FS%)、射血分数(ejection fraction,EF)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF);左室舒张期末内径(left ventricular end diastolic diameter,LVEDD)、左室收缩期末内径(left ventricular end systolic diameter,LVESD)、收缩性(dp/dt)、心房或心室功能的降低、泵送效率的增加、泵送效率损失速率的降低、血液动力学功能损失的降低,或与心肌病相关之并发症的减轻。

[0157] 在一些实施方案中,在施用本文中公开的治疗方法之前、期间或之后的脑功能可如下评估:通过神经学测试,或者在电生理学方面(例如通过降低的信噪比),或者在生化方面(例如通过分析指示中枢或外周神经系统的器官功能、组织功能和/或细胞功能的至少一种生物标志物)。示例性的电生理学技术包括脑电描记术(electroencephalography,EEG)、心电描记术(electrocardiography,EKG)、肌电描记术(electromyography,EMG)、事件相关电位(event-related potential,ERP)、诱发电位(evoked potential,EP)、脑磁描记术(magnetoencephalography,MEG)和神经传导研究(nerve conduction study,NCS)。在另一些实施方案中,可通过以下任意一种或更多种方法或者任意一个或更多个参数来评估脑功能:一般智力功能,例如韦克斯勒简短智力量表(Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence)和韦克斯勒成人智力量表-III(Wechsler Adult Intelligent Scale-III);基本注意,例如来自韦克斯勒记忆量表-III(Wechsler Memory Scale-III)的数字广度、空间广度分测试;复杂注意(工作记忆),例如来自韦克斯勒成人智力量表-III的数字广度、字母数字顺序和算术分测试;执行功能,例如威斯康辛卡片分类测试(Wisconsin Card Sorting Test)、连线测试B(Trail Making Test B)、斯特鲁普测试 Stroop Test)、伦敦塔

测试(Tower of London Test)、赌博测试(Gambling Test)、额叶系统行为量表(Frontal System Behavior Scale)和衣阿华额叶功能量表(Iowa Scale of Frontal Lobe Function);记忆(视觉和言语),例如韦克斯勒记忆量表-III、Rey听觉(Rey Auditory)、言语学习测试(Verbal Learning Test)、加利福尼亚言语(California Verbal)、学习测试-II(Learning Test-II)、修订版简短视觉记忆测试(Brief Visual Memory Test Revised);情感调节,例如明尼苏达多相人格调查表-2(Minnesota Multiphasic Personality Inventory-2)、情感斯特鲁普测试(Affective Stroop Test)、额叶系统行为量表、衣阿华额叶功能量表;情绪刺激的解读,例如DANVA(诊断性非言语行为分析,Diagnostic Analysis of Nonverbal Behavior);处理速度,例如来自韦克斯勒成人智力量表-III、连线测试B和符号数字模式测试(Symbol Digit Modalities Test)的处理速度指数(符号搜索,译码);语言,例如波士顿命名测试(Boston Naming Test);受控口头语联想测试(Controlled Oral Word Association Test);语义词流畅性测试(Semantic Word Fluency Test);和多语言失语症检查(Multilingual Aphasia Examination);视觉结构测试(visuo-constructional test),例如来自韦克斯勒成人智力量表-III的Rey-Osterrieth复杂图形测试(Rey-Osterrieth Complex Figure Test)、区组设计(Block Design)和物体组装分测试(Object Assembly subtest);以及视觉-空间测试,例如来自WAIS-III的矩阵推理(Matrix Reasoning),和线性方向判断测试(Judgment of Line Orientation Test)。

[0158] 在一些实施方案中,对在施用本文中公开的治疗方法之前、期间或之后的骨骼肌健康状况进行测试。在一些实施方案中,骨骼肌健康状况包括肌疼痛、肌损伤、针对运动的代谢变化和细胞骨架重组。骨骼肌功能可以是肌肉强度、肌肉耐力、训练适应、将允许关节运动的正常肌肉状态,或者健康哺乳动物中的骨骼肌的标准生理代谢和功能。可测量骨骼肌的任何功能变量,包括肌肉强度(在特定运动中产生的最大力)、肌肉耐力(在设定频率和力下可进行的最大收缩数)和肌肉功率(力/时间,肌肉产生的最大效果)。尽管并非穷举,但是典型的肌特异性功能包括成肌细胞分化、成肌细胞决定、肌发育、肌收缩、肌节变化、成肌细胞融合、体肌发育和肌发生。

[0159] 在某些实施方案中,对患者的骨骼肌纤维化进行评估。许多方法可用于确定骨骼肌纤维化的状况,包括获得来自该患者之肌肉组织的活检,并用对检测纤维化组织存在灵敏的组织化学或免疫组织化学染料对活检进行评价。组织化学染料的实例包括例如,苏木精和伊红(H&E),三色和ATP酶(例如在pH 4.3、4.65和10.4下)。可用于标记肌纤维以进行免疫组织化学染色的代表性抗体包括例如肌球蛋白、IV型胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白和抗肌萎缩蛋白。或者,可采用确定纤维化渗透患者骨骼肌的程度的功能性方法。所述功能性方法涉及对患者进行成套测试和身体测量中的一项或更多项。这样的测试和测量通常包括神经强度测试、肌肉强度、平衡、步态、姿势、感官协调评价和肺功能测试(例如肺活量和用力呼气容量),其全部可通过本领域中已知的方法来进行。在一些实施方案中,可基于本文所述的一种或更多种信号分子的表达水平来评估组织修复。作为组织修复指示物的合适生物标志物包括但不限于DNA损伤生物标志物、炎性应答生物标志物、组织损伤生物标志物、组织损伤修复生物标志物或血液学替代物标志物,例如p53、p21、GADD45a、ATM、磷酸化H2AX组蛋白、IL-6、CRP、SAA、IL-1、IL-5、IL-10、KC/GRO、IFN、IL-2、IL-4、TNF- α 、IL-12、IL-3、IL-7、

IL-6、唾液 β -淀粉酶、瓜氨酸蛋白(citrullinated protein)、S100B、SP-D、BPI、TSP、CA15-3、CDBB、CKMB、CKMM、FABP2、GFAP、NSE、CD5、CD-16b、CD20、CD177、CD26、CD27、CD40、CD45、Flt-3L、G-CSF、KFG、EPO、TPO、GM-CSF或SDF-1 α 。

[0160] 在一些实施方案中,本文中公开的微量元素是参与组织损伤修复和/或组织再生的一种或更多种因子(例如转录因子)的调节物。铜调节性因子包括但不限于:Cu稳态蛋白,例如Ctr 1、Ctr 3、DMT1、Atox 1、ATP7A/7B、Cox 17、CCS、Sco 1/2、Cox 11、谷氨酸能N-甲基D-天冬氨酸受体(Glutamatergic N-methyl D-aspartate receptor, NMDAR)、淀粉样蛋白前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)、铜代谢基因MURR1结构域(Copper metabolism gene MURR1 domain, COMMD1)、X连锁的细胞凋亡抑制剂(X-linked inhibitor of apoptosis, XIAP)、高半胱氨酸(homocysteine, Hcy)、细胞色素c氧化酶的亚基II(cytochrome c oxidase, COX II)、细胞色素c氧化酶的亚基I(subunit I of cytochrome c oxidase, COX I)、FGF-1、VEGF、血管生成素(例如ANG1或ANG2)、纤连蛋白、胶原酶、MMP-TIMP、弹性蛋白、PDGF和eNOS;细胞内Cu结合蛋白,例如细胞色素C氧化酶(Cytochrome C oxidase, CCO)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、金属硫蛋白(Metallothionein, MT)、谷胱甘肽(Glutathione, GSH)、多巴胺- β -单加氧酶(Dopamine- β -monooxygenase, DBH)、肽基甘氨酸- α -酰胺化单加氧酶(Peptidylglycine- α -amidating monooxygenase, PAM)、酪氨酸酶、苯丙氨酸羟化酶、二胺氧化酶、Hephaestin和软骨基质糖蛋白;细胞外Cu结合蛋白,例如铜兰蛋白(Ceruloplasmin, CP)、赖氨酰氧化酶(Lysyl oxidase, LOX)、白蛋白(Albumin, ALB)、运铜蛋白(Transcuprein)、胺氧化酶、凝血因子V和VIII、铁氧化酶II、细胞外超氧化物歧化酶以及细胞外金属硫蛋白。铜调节性因子在Zheng等, Role of copper in regression of cardiac hypertrophy, Pharmacol. Ther. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.014 (2014)中进行了公开,其通过引用并入本文。在一些具体方面,所述微量元素调节HIF-1、SP1、MT、Atox1、CCS和COMMD1中一种或更多种的转录活性,以及由这些转录因子调节的信号传导网络。

[0161] 在一些方面,在用本文中公开的治疗性或预防性组合物进行治疗之后在个体中分析受本文中公开的微量元素调节的一种或更多种因子的水平和/或活性。在一些具体方面,确定HIF-1、SP1、MT、Atox 1、CCS和COMMD1中一种或更多种的水平和/或活性,然后使其与个体针对该治疗性或预防性组合物的应答相关联。在一些方面,如下检测所述应答:测量正常组织稳态和/或持续组织损伤的细胞标志物(例如,通过免疫组织化学或者测量DNA和转录本水平)、测量损伤面积或损伤体积,或者评估任何临床上相关的指示物。因此,在某些方面,可使用一种或更多种微量元素调节性因子(例如HIF-1、SP1、MT、Atox 1、CCS和COMMD1)的水平和/或活性作为个体针对本文中公开之治疗或预防方案的应答的终点生物标志。

[0162] 在一些实施方案中,受本文中公开之微量元素调节的一种或更多种因子可用于分析和预测针对本文中公开的组合物或治疗或预防方法的应答。例如, HIF-1、SP1、MT、Atox 1、CCS和COMMD1中一种或更多种的水平和/或活性可指示个体将对本文中公开的治疗或预防性组合物作出阳性应答,可向该个体使用所述治疗或预防性组合物的可能性。反之,如果HIF-1、SP1、MT、Atox 1、CCS和COMMD1中一种或更多种的水平和/或活性指示个体可能不对所述治疗或预防性组合物作出应答或者对其作出阴性应答,则可规定替代的治疗过程。阴性应答可定义为不存在有效应答或者存在毒性副作用。可在其中对以下任意群体中的对象

进行基因分型的背景研究中预测针对治疗性或预防性治疗的应答：对治疗方案具有良好应答的群体、对治疗方案无显著应答的群体和对治疗方案具有不良应答（例如表现出一种或更多种副作用）的群体。这些群体作为实例提供，并且可对另一些群体和亚群进行分析。基于这些分析的结果，对对象进行基因分型以预测其是否将对治疗方案具有良好应答、对治疗方案无显著应答或者对治疗方案具有不良应答。因此，在某些方面，HIF-1、SP1、MT、Atox 1、CCS和COMMD1中一种或更多种的水平和/或活性可用作个体针对本文中公开的治疗或预防方案的应答指示。可在施用所述治疗或预防方案之前、期间和/或之后对所述应答指示物进行评估。例如，可在数个剂量的连续施用之间的间隔期间对一种或更多种应答指示物进行评估以评价对象是否可从连续治疗受益或者需要替代治疗。

[0163] 本文中所述的预后测试还适用于临床试验。可使用本文中所述的方法来鉴定一种或更多种应答指示物（例如，HIF-1、SP1、MT、Atox 1、CCS和COMMD1）。此后，可对微量元素组合物之临床试验中的潜在参与物进行筛选以鉴定最可能对所述组合物具有良好应答的那些个体并排除可能经历副作用的那些个体。以此方式，可在对微量元素组合物具有阳性应答的个体中测量治疗的有效量，而不会由于研究中包含可能无阳性应答的个体而降低测量结果并且不会承受不期望安全性问题的风险。

[0164] 在一些实施方案中，将所述干细胞或干细胞诱导剂全身施用。在一些实施方案中，将所述干细胞或干细胞诱导剂局部施用于损伤部位。在一些实施方案中，将所述干细胞或干细胞诱导剂局部施用于除损伤部位之外的部位。

[0165] 在一些实施方案中，将所述干细胞（或干细胞诱导剂）和微量元素同时施用。在一些实施方案中，将本文中公开的干细胞（或干细胞诱导剂）和微量元素以任何合适的顺序依次施用。

[0166] 在一些具体实施方案中，将所述干细胞（例如MSC，例如BMSC）与其他干细胞（例如不是BMSC的干细胞）、成肌细胞、肌细胞、心成肌细胞、心肌细胞，或者成肌细胞、肌细胞、心成肌细胞和/或心肌细胞的祖细胞一起施用。

[0167] 在一些方面，一旦将本文中所述的干细胞（或干细胞诱导剂）和微量元素施用于哺乳动物（例如人），就通过多种已知方法中的任一种来监测所述细胞的存在和/或生物活性。在另一些实施方案中，所述细胞从对象的组织体内迁移而来，则监测和/或调节在到达组织损伤部位途中的细胞的存在和/或生物活性。

[0168] 在一些实施方案中，将所述微量元素直接递送至损伤部位。例如，在一些实施方案中，提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复（或改善组织功能）的方法，其包括a）向损伤部位中直接递送有效量的微量元素；和b）向所述个体施用有效量的干细胞（例如MSC，例如BMSC）或干细胞（例如MSC，例如BMSC）诱导剂。在一些实施方案中，本文中公开的干细胞是间充质干细胞（MSC）、多能干细胞或组织衍生干细胞。在一些方面，所述组织衍生干细胞是脂肪组织衍生干细胞、心脏组织衍生干细胞或脐带组织衍生干细胞。在一些实施方案中，所述干细胞诱导剂是间充质干细胞（MSC）、骨髓间充质干细胞（BMSC）、多能干细胞或组织衍生干细胞的诱导剂，所述组织衍生干细胞包括但不限于脂肪组织衍生干细胞、心脏组织衍生干细胞或脐带组织衍生干细胞。在另一些实施方案中，所述干细胞诱导剂是成体干细胞的诱导剂。在一些具体方面，所述成体干细胞是造血干细胞，乳腺干细胞，肠干细胞，胎盘、脂肪组织、肺、骨髓、血液、脐带的沃顿胶质或牙（例如牙髓和牙周韧带的血管周围生态位）

中的间充质干细胞,内皮干细胞,神经干细胞,嗅成体干细胞,神经嵴干细胞,或种系干细胞(例如,睾丸中的干细胞)。在一些实施方案中,所述方法包括向所述个体施用有效量的干细胞(例如MSC,例如BMSC)。在一些实施方案中,所述方法包括向所述个体施用有效量的间充质干细胞的诱导剂。在一些实施方案中,所述微量元素是铜。在根据上述任一种方法的一些实施方案中,所述组织是心脏、肝或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0169] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导组织修复(或改善组织功能)并与干细胞(例如MSC,例如BMSC)一起施用的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素。在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素,其中所述干细胞(例如MSC,例如BMSC)是经施用于所述对象的。在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤的个体中诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位分化的方法,其包括向损伤部位直接递送有效量的微量元素,其中所述干细胞(例如MSC,例如BMSC)是经施用于所述对象的。在一些实施方案中,所述方法包括向所述个体施用有效量的骨髓间充质干细胞的诱导剂。在一些实施方案中,所述微量元素是铜。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。

[0170] 尽管本文中所述的方法一般性地适用于组织修复的所有方面,但是应理解出于以下任意一项或更多项的目的可使用联合治疗方法:诱导骨髓间充质干细胞向损伤部位迁移、诱导干细胞在损伤部位分化、诱导损伤部位发生组织再生、诱导触发组织再生的信号分子、逆转损伤部位的损伤和在损伤部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境。

[0171] 此外,尽管本文中所述的方法集中于联合治疗,但是应理解有关组织修复的讨论仍同等地适用于本申请的其他部分(例如,紧接下文的部分)。

[0172] 治疗组织修复系统有缺陷的个体的方法

[0173] 在另一个方面,本发明提供了在组织修复系统有缺陷的个体中诱导组织修复(或改善组织功能)的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素。一些实施方案中,所述组织是心脏、肝或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0174] 在一些实施方案中,所述个体为约30、约35、约40、约45、约50、约55、约60、约65、约70、约75、约80、约85或约90岁以上。在另一些实施方案中,所述个体小于约30岁。在一些实施方案中,所述个体为至少约60岁(包括例如至少约任意65岁、70岁、75岁、80岁、85岁、90岁或以上)。在一些实施方案中,所述个体具有慢性组织损伤,即已具有组织损伤至少约任意6、7、8、9、10、11、12、18或24个月。在一些实施方案中,所述个体是有干细胞缺陷的。在一些实施方案中,所述个体具有有缺失的组织修复系统。在一些实施方案中,所述个体具有上述一个或更多个特征。在一些方面,所述个体遭受以下一种或更多种症状或病症:记忆丧失、

行动能力(包括但不限于驱动能力、速度耐力、灵活性和关节运动性)低或降低、感觉减退、肌无力、听力损失和慢性劳损。

[0175] 当生物系统受到损伤时,一套自修复系统被激活。不同的器官拥有不同的自修复能力:肝和肌肉比心脏和神经系统触发更佳的修复;年轻器官比年老器官修复的更好。但是所有的生物组织均具有自修复系统。参见,例如,Kikuchi等,Annu Rev Cell Dev Biol, 2012,28:719-41;Garrett等,J Hand Surg Am,1984,9(5):683-92;Porrello等,Science, 2011,331(6020):1078-80;Lin等,PNAS,2010,107(9):4194-9;Greco等,Cell Stem Cell, 2009,4(2):155-69;Kajstura等,Circulation,2012,126(15):1869-81;Haubner等,2012,4(12):966-77;J Neurol Sci,1988,87(1):67-74;和Friedewald等,Am J Cardiol,2012,110(6):807-16。最关键的要素之一是干细胞归巢。干细胞归巢是在复杂但有组织的环境下内源性或外源性干细胞向靶组织定向迁移并存活下来。归巢对干细胞保护受损组织至关重要。

[0176] 在短时间的心脏缺血下,受损组织启动多种干细胞(包括骨髓间充质干细胞,BMSC)的归巢。干细胞在其归巢之后修复并保护组织。以BMSC为实例,归巢的BMSC可增殖并分化为心肌,或者通过旁分泌修复受损组织。一些例子已表明,阻断干细胞的归巢减弱对心脏预治疗的保护。Cai等,Cardiovasc Res,2008,77(3):463-70。与急性受损组织相比,具有慢性疾病的组织更迫切需要修复能力。然而,其自修复能力降低或者甚至丧失。与心脏缺血类似,慢性缺血也导致心肌梗死。心脏功能和供血两者均不断降低,从而导致疾病恶化并最终导致心力衰竭。疾病的发展伴随着组织结构和生理功能的退化。显而易见,慢性缺血心脏需要结构和功能修复。然而,在延长缺血下,干细胞的自发归巢减弱并且心脏丧失其修复能力。

[0177] 当心脏处于缺血下时,铜从心脏流失。Chevion等,PNAS,1993,90(3):1102-6;Jiang等,J Exp Med,2007,204(3):657-6。在细胞核中,铜抑制FIH-1(抑制HIF-1的因子),因此对HIF-1的转录活性必不可少。当缺乏铜时,HIF-1不能形成功能性转录复合物,从而丧失启动HIF-1调节性基因(例如归巢相关的趋化因子SDF-1)表达的能力。Feng等,Mol Pharmacol,2009,75(1):174-82;Xie等,Curr Med Chem,2009,16(10):1304-14;Ceradini等,Nat Med,2004,10(8):858-64;Ceradini等,Trends Cardiovasc Med,2005,15(2):57-63。在一个方面,本公开内容使干细胞归巢与铜流失相联系,这表明在慢性心脏缺血期间,干细胞归巢减弱是由铜流失引起。在一个方面,铜的补充逆转心力衰竭。Jiang等,J Exp Med,2007,204(3):657-6;Zhou等,J Mol Cell Cardiol,2008,45(1):106-17。在另一个方面,向心脏补充铜使干细胞归巢回缺血心脏,这是因为铜升高HIF-1活性,由此促进SDF-1的表达。

[0178] 为了靶向针对受损组织的铜补充,在一个方面,设计并使用铜-白蛋白-微泡。在用超声定位和照射之后,铜可从微泡释放到心脏的靶区域,从而增加缺血区域中的铜浓度。如本公开内容中所示的,用铜-白蛋白-微泡治疗心脏可缓解由慢性心脏缺血引起的症状(图1):梗死尺寸减小(图1A、图1B),EF(射血分数)增加(图1C),并且血管密度也升高(图1D)。

[0179] 评估组织修复的方法在上述部分中进行了描述,为了简洁起见不再单独重复。

[0180] 上述部分中所述的任意方法或联合治疗方法一般性地适用于组织修复系统有缺陷的个体。例如,在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤且组织修复系统有缺陷的个体

中诱导组织修复的方法,其包括a)向损伤部位直接递送有效量的微量元素和b)向所述个体施用有效量的干细胞(例如MSC,例如BMSC)或干细胞诱导剂。在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤并且组织修复系统有缺陷的个体中诱导干细胞(例如MSC,例如BMSC)向损伤部位迁移的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素,任选地组合施用有效量的干细胞(例如MSC,例如BMSC)或干细胞诱导剂。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0181] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤且有组织修复系统缺陷之个体的组织中诱导干细胞在损伤部位的部位分化、诱导损伤部位或有组织修复系统缺陷的部位发生组织再生的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素,任选地组合施用有效量的干细胞(例如BMSC)或干细胞诱导剂。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0182] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤且有组织修复系统缺陷之个体的组织中诱导损伤部位发生组织再生的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素,任选地组合施用有效量的干细胞(例如BMSC)或干细胞诱导剂。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0183] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤且有组织修复系统缺陷之个体的组织中诱导触发组织再生的信号传导分子的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素,

任选地组合施用有效量的干细胞(例如BMSC)或干细胞诱导剂。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0184] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤且有组织修复系统缺陷之个体的组织中逆转损伤部位的损伤的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素,任选地组合施用有效量的干细胞(例如BMSC)或干细胞诱导剂。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0185] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤且有组织修复系统缺陷之个体的组织中在损伤部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素,任选地组合施用有效量的干细胞(例如BMSC)或干细胞诱导剂。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0186] 在一些实施方案中,提供了在具有组织损伤且有组织修复系统缺陷的个体中诱导至少两个(包括例如至少任意3、4、5、6个或更多个)组织修复事件的方法,其包括向损伤部位递送有效量的微量元素,任选地组合施用有效量的干细胞(例如BMSC)或干细胞诱导剂,其中所述至少两个组织修复事件选自诱导干细胞向损伤部位迁移、诱导干细胞在损伤部位分化、诱导损伤部位发生组织再生、诱导触发组织再生的信号传导分子、逆转损伤部位的损伤和在损伤部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境。在一些实施方案中,所述

组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0187] 预防方法及预防性用途

[0188] 本文中还提供了在个体中预防组织损伤的方法,其包括向所述个体施用有效量的微量元素。在一些实施方案中,所述组织是心脏、肝、脑、肺、肾、皮肤、消化道、生殖器官、骨或骨骼肌。在一些实施方案中,所述组织是心脏。在一些实施方案中,所述微量元素通过微泡递送。在一些实施方案中,包含微量元素的微泡静脉内施用,并且所述微量元素通过微泡在损伤部位定点爆裂而释放。在一些实施方案中,所述微泡的定点爆裂通过超声进行。在一些实施方案中,所述微量元素通过将所述微量元素直接施用于损伤部位递送。在一些实施方案中,所述微量元素和/或其络合物通过静脉内注射施用。在一些实施方案中,所述微量元素选自铜、铁、锌和硒。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如CuSO₄或CuCl₂)。在一些实施方案中,所述微量元素与结合所述微量元素的分子络合。在一些实施方案中,所述微量元素未与结合所述微量元素的任何分子络合。

[0189] 本文中还提供了通过向需要预防组织损伤的部位直接注射微量元素来在个体中预防组织损伤的方法。

[0190] 本文中使用的“预防”包括在对象中提供针对疾病发生或复发的预防,所述对象可易患该疾病但尚未诊断为患有该疾病。在一些实施方案中,所提供的细胞和组合物用于延迟疾病的发生或者减慢疾病的进展,所述疾病例如组织损伤。

[0191] 对于疾病的预防或治疗,合适的施用剂量或途径取决于待治疗的疾病类型,疾病的严重程度和过程,是否是出于预防或治疗目的来施用所述细胞,先前治疗,对象的临床病史,以及针对所述组合物和/或细胞的应答,和主治医师的判断。在一些实施方案中,将微量元素组合物和细胞适当地一次或者经一系列治疗施用于对象。

[0192] 在一些方面,组织损伤由以下引起:潜在的有丝分裂细胞消耗(例如,干细胞消耗),血管损伤引起的缺氧以及其他影响,正常宿主修复应答,包括立即早期基因(例如Jun和EGR1)的诱导、促炎性细胞因子(例如白介素和TNF)的诱导、炎性细胞因子(例如TGFβ、PDGF、BFGF)的诱导和次级细胞因子级联的诱导,炎性应答效应,和/或多种细胞类型(例如炎性细胞、间质功能性细胞和成纤维细胞)之间的相互作用。在另一些方面,针对正常组织的损伤的发生是因为暴露于细胞毒性剂,例如辐射和化学治疗剂。辐射可以是偶然、环境、职业性、诊断性和治疗性地暴露于辐射。组织损伤还是癌症治疗例如放射治疗、化学治疗以及组合的放射治疗和化学治疗的常见副作用。在一些方面,本公开内容提供了用于治疗 and 预防组织损伤的组合物和方法。在一些实施方案中,在将或可能将在对象中引起组织损伤的治疗之前、期间和/或之后施用本文中公开的微量元素组合物和/或细胞,并且所述施用

预防或降低与该治疗(例如癌症放射治疗和化学治疗)相关的组织损伤。

[0193] 在一些方面,本文中公开的组合物或方法通过诱导干细胞向组织损伤部位迁移(例如,归巢)来预防组织损伤或者减小组织损伤的面积、体积或持续时间,即使在个体中的组织已另外丧失自发募集干细胞的固有能力和/或如此。在另一些方面,施用本公开内容的组合物和/或细胞触发导致针对组织损伤之抗性增强的一系列其他事件,包括例如诱导干细胞在组织部位分化、诱导组织部位发生组织再生、诱导触发组织再生的信号分子、造成额外的损伤之前逆转初始损伤部位的损伤和/或在组织部位重建神经原纤维细胞和神经分泌细胞的微环境。

[0194] 例如,心肌缺血或梗死可导致功能性心脏组织不可逆地损失并伴随着可能的泵功能衰退和死亡。冠状血管堵塞导致依赖性毛细血管系统的供血中断。在没有营养和氧的情况下,心肌细胞死亡并且经历坏死。周围组织炎症的发生伴随着炎性细胞的侵入和细胞碎片的吞噬。发生纤维化疤痕形成,并且心脏这一部分对收缩力之前的贡献丧失。如果不进行介入,心肌补偿组织损伤的唯一方式是剩余的心肌细胞肥大(细胞蛋白和收缩成分在细胞内累积)。内分泌物、代谢物(醇)或感染原(病毒性心肌炎)和癌症治疗剂也导致细胞死亡,并因此降低心肌功能。在一些方面,本文中公开的组合物或方法预防心脏组织损伤或者减小心脏组织损伤的面积、体积或持续时间。在一个方面,本文中公开的微量元素组合物诱导间充质干细胞(例如,BMSC)向心脏组织迁移(例如,归巢)和/或保留于心脏组织。在一个方面,在心肌缺血或梗死的情况下,心肌可通过干细胞分化为心肌细胞来补充组织损失,从而避免或减轻心脏肥大和进一步的心脏组织损伤。

[0195] 微量元素的递送

[0196] 本文中使用的“微量元素”指以少量存在于植物、动物和/或地球中的化学元素,其可被生物体(包括植物和动物)利用并且对其生理必不可少或有益。“微量金属”、“微量元素”和“微量化合物”可互换使用。尽管在很多情况下,目标微量元素将作为络离子存在,但是根据本公开内容其包括由将微量元素导入细胞、组织或生物体产生的多种离子。根据本公开内容,这些术语分别包括由将其用于细胞、组织或生物体中而产生的反应产物。合适的微量元素包括但不限于B、Sc、Ti、V、Cr、Mn、Mg、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、Ge、As、Se、Br、Al、Si、P、Y、Zr、Nb、Mo、Tc、Ru、Rh、Rb、Ce、Ag、Pd、Ag、Cd、In、Sn、Sb、F、Te、Au、Pt、Bi、Ir、Os、Re、W、Ta和Hf。在一些实施方案中,所述微量元素选自Al、Cd、Rb、Zr、Co、Sn、Cr、Ni、F、Mn、Mg、Mo、Ge、V、Br、I、Ba、Ag、Ti、Se、Cu和Zn。在一些实施方案中,所述微量元素是铜(例如以CuSO₄或CuCl₂的形式)。在一些实施方案中,所述微量元素呈盐形式。在另一些实施方案中,所述微量元素与蛋白质、肽、氨基酸或者单糖、二糖或多糖形成化合物或络合物。在一些实施方案中,所述微量元素与一种或更多种聚合物形成化合物或络合物。在另一些实施方案中,所述微量元素呈有机金属化合物,例如小分子有机金属化合物。在一个实施方案中,本文中公开的微量元素调节HIF-1的转录活性。在一个方面,微量元素(例如铜)是HIF-1转录活性的诱导剂。本文中公开的HIF-1转录活性的诱导剂可包含一种或更多种金属元素(包括微量元素)。

[0197] 在一些实施方案中,所述微量元素可通过微泡递送。美国专利5,580,575中已针对充气脂质体对还用作药物载体之超声造影剂的使用进行了描述。将一定量的含药物脂质体施用到患者的循环系统中并使用超声能在诊断水平进行监测,直至在目标部位中检测到脂质体的存在。然后,出于治疗目的向该部位施加足以使脂质体破裂以局部释放药物的超声

能。美国专利5,558,082中将超声能描述为通过转换器施加,所述转换器从位于中心的治疗性转换器元件到诊断性转换器元件同时施加诊断性和治疗性超声波。

[0198] 使用充气微胶囊(或如本文中使用的微泡)来控制药物向机体部位的递送在美国专利5,190,766中也进行了描述,其中在需释放药物的部位中测量药物载体中声共振频率,然后用合适的声波照射该部位以控制药物释放。单独的超声转换器被描述为用于成像和触发靶部位中的药物释放。CN 102302507 B公开了用于定向控制释放微量元素的组合物以及制备方法和应用,其包括含有微泡的组合物。

[0199] 本文中使用的示例性微泡包括,例如稳定化微泡、经超声处理的白蛋白、充气微球体、充气脂质体和产气乳剂。关于其制备,已开发了多种方法。这些方法通常涉及喷雾干燥、乳化或界面聚合技术。通常来说,结果是具有多种直径且壁厚固定或任意可变的微球群。通过一种或更多种方法产生的超声造影剂例如可包含微球,其中每个微球不管其直接均具有相同厚度的壳壁。或者,不同的制备方法可产生壁厚甚至在具有相同直径的那些微球之间变化的微球群。微球可通过以下任意制药方法来制备:超声声振动、冷冻干燥、喷雾干燥法、“活性”/受控自由基聚合、沉淀聚合、混悬聚合、乳剂聚合、籽晶聚合、分散聚合和沉淀聚合非均相聚合体系、离子交联、离子乳化凝胶、离子沉淀和化学交联、乳剂化学交联、双重乳化-共-交联、热交联、凝聚、乳化-溶剂蒸发,或其任意组合。在一些实施方案中,本文中公开的微球是治疗剂的载体并且内部装有药物。然后,将所述微球静脉内注射并允许全身循环。向期望递送药物的部位施加足够能量的超声信号以使含药物的微泡破裂。声波束破坏微泡并由此释放其有效载荷。

[0200] 在一些实施方案中,本文中公开的微泡具有受控的脆性,即仅可在暴露于等于或大于预定强度的声能时破裂。即,低于这一声强阈值时,基本所有的微泡均保持完整,而高于该声强阈值时,微泡破裂。尽管处于未破裂状态时,但是在较大的血池中通过超声仍可看到气泡剂,使得在增加声强以启动物质破裂和伴随递送药物之前声谱仪操作员可定位目标部位并将扫描仪转换器聚焦于目标部位。因此,所述气泡剂可通过控制声波信号的强度来打开和关闭。

[0201] 在一个实施方案中,可通过乳剂溶剂蒸发方法来产生微泡。首选,制备两种溶液。一种是包含合适表面活性剂材料的水溶液,所述表面活性剂材料可以是两亲性生物聚合物,例如明胶、胶原、白蛋白或球蛋白。还可额外地包含黏度增强剂。这成为乳剂系统的外部连续相。第二溶液由将形成壁的聚合物溶解于两种水不混溶性有机液体的混合物制备。一种有机液体是用于聚合物的相对易挥发性溶剂,另一种是用于该聚合物的相对不易挥发性非溶剂。相对不易挥发性非溶剂典型地是C6-C20烃,例如癸烷、十一烷、环己烷、环辛烷等。相对易挥发性溶剂典型地是C5-C7酯,例如乙酸异丙酯。可使用其他的聚合物溶剂例如二氯甲烷,只要其与伴随的非溶剂不混溶即可。典型地,将约3份浓度为约0.5%至10%聚合物的有机聚合物溶液添加至1份浓度为约1%至20%生物材料的生物材料水溶液。可根据其限定聚合物之机械性能的弹性模量和伸长来选择形成壁的聚合物。可用于制备载药微泡超声造影剂的优选聚合物将是生物可降解聚合物,例如聚乙烯醇(PVA)、聚己内酯、聚乳酸、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物、丙交酯和内酯(例如 ϵ -己内酯、 δ -戊内酯)的共聚物、聚酰胺、聚羟基丁酸酯、聚二氧六环酮、聚- β -氨基酮、聚酐、聚原酸酯和聚氨基酸(例如聚谷氨酸和聚天冬氨酸)或其酯,以及其任意合适组合。在搅拌下,将聚合物溶液(内部有机相)添加至水溶液(外

相)以形成乳剂。可使用多种装置来产生乳剂,例如胶体研磨机、转子/定子均浆器、高压均浆器和超声均浆器。进行乳化步骤直至内相液滴呈期望的尺寸谱。该液滴尺寸将决定微泡的尺寸。

[0202] 可通过很多技术将微量元素(例如铜)掺入微泡剂中。在一种方法中,例如,在制备微泡期间,将药物溶解于或者以其他方式掺入有机聚合物溶液中。或者,可通过用包含药物的溶液重构成品的一系列二次步骤来将药物掺入微泡中:制备混悬的微泡以充满含药物的溶液,并通常通过冻干干燥所得物。最终,通过化学方式使药物附着在微泡的表面。优选的掺入方法产生这样的载药微泡,其在声波作用下破裂之后将允许活性剂即时脱溶到血液或其他体液(如有需要的话)中。还可使用将药物掺入微泡的壁结构中或者提供表面附着的那些方法。在此情况下,设想壁的机械性能将使得微泡破裂会产生超小的壁碎片,这些壁碎片随后将药物运送至局部部位。有关超声触发使用中空微泡的药物递送的更多公开内容可见于美国专利6,896,659中。

[0203] 在一些实施方案中,通过基于肽的纳米颗粒来递送微量元素,包括铜。在一些实施方案中,本文中公开的基于肽的纳米颗粒包含自组装的肽(例如,芳族二肽)。所述肽组装成纳米颗粒,例如水凝胶纳米颗粒,其在治疗和诊断应用方面可有效地用作例如用于递送生物活性剂的载体。在一些方面,可通过根据本公开内容之基于肽的纳米颗粒来递送亲水性和疏水性生物活性物质、小药物分子、成像剂(例如磁性或金纳米颗粒)以及高分子量生物分子(例如肽、蛋白质siRNA和DNA)。在一些方面,用生物或合成分子对所述纳米颗粒进行修饰以提高稳定性、效率和/或生物利用率。在某些实施方案中,所述纳米颗粒的平均直径为100nm至1000nm,或10nm至500nm。在一些实施方案中,所述纳米颗粒包含改善靶向和延长体内稳定性的超微结构和/或其他官能团。基于肽的纳米颗粒的更多公开内容可见于WO 2014132262 A1。

[0204] 包含微量元素的载剂(例如纳米颗粒)可靶向(例如,特定化学相互作用,例如抗原-抗体结合,等)或被递送至损伤部位。在一些方面,可通过非靶向递送来完成组织治疗,例如通过在纳米颗粒材料中沐浴组织、使用移液管或微量移液管来将纳米颗粒施用于组织、将纳米颗粒材料注射到组织中、将纳米颗粒材料涂抹在组织上,或者将纳米颗粒与其他成分(例如一种或更多种聚合物和/或一种或更多种蛋白质或其组合)组合。实例包括但不限于白蛋白、纤维蛋白原、胶原、弹性蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、壳聚糖、碱性成纤维细胞生长因子或血管内皮细胞生长因子、血小板衍生生长因子、表皮生长因子或胰岛素样生长因子。在另一些方面,与纳米颗粒结合使用的一种或更多种其它化学实体或部分包含微量元素。这些物类可具有补充或附加的治疗或诊断效用。所述纳米颗粒可与这些其它组分化学结合或者可作为与其的简单混合物递送。例如,所述纳米颗粒可与抗体结合。所述修复方法可仅包含一种纳米颗粒或者可包含一种以上的纳米颗粒。所述纳米颗粒可包含一种或更多种微量元素。

[0205] 在一个方面,被动靶向或递送可通过物理效应来实现,所述物理效应通过纳米颗粒(或微球体)来诱导向损伤部位的释放或递送。例如,可通过将微量元素和磁性物质两者包装成白蛋白壳微球体来合成磁性白蛋白微球体。在注射到体内之后,磁性白蛋白微球体可通过外部磁场力引导至损伤部位。可实现微量元素的靶向持续释放以提高治疗效果并避免毒性副作用。在另一个方面,积极靶向或递送可通过合成具有自动识别靶器官或组织细

胞的能力的载剂来实现。例如,抗原-抗体相互作用介导白蛋白微球体自动识别。这样的微球体表面可装有具有与某些细胞结合以用于靶向递送微量元素的特异性抗体或多肽。除微球体之外,还可使用脂质体和纳米颗粒介导的被动靶向递送,以及受体或多肽结构诱导的积极靶向递送运输微量元素以达到有效浓度。在一些实施方案中,通过将微量元素直接施用于损伤部位来递送所述微量元素。其他合适的方法包括体外、离体或体内施用方法。在一些方面,本文中公开的微量元素组合物经口施用于组织损伤部位。在一些实施方案中,微量元素或包含微量元素的化合物(例如铜离子、酮原子或螯合铜)通过消化道吸收。在一个方面,所吸收的微量元素靶向(通过主动靶向或被动靶向)损伤部位并在损伤部位局部释放以提供用于组织修复的微量元素的有效局部浓度。在一些实施方案中,经口递送的微量元素与蛋白质、肽、氨基酸或者单糖、二糖或多糖形成化合物或络合物。在一些实施方案中,所述微量元素与一种或更多种聚合物形成化合物或络合物。在另一些实施方案中,所述微量元素呈有机金属化合物,例如小分子有机金属化合物。

[0206] 在一些实施方案中,通过使用经包被的植入物、支架或板或者经微量元素浸透的植入物来将微量元素递送至损伤部位。在一个实施方案中,通过从附着有微量元素的血管内支架缓慢释放微量元素来将微量元素递送至损伤部位。在另一些实施方案中,通过积极靶向脂质体或受体-供体复合物来将微量元素递送至损伤部位。在一些方面,使用物理疗法、超声、离子电渗疗法、超声穿透增强、电穿孔和/或海绵应用来将微量元素递送至损伤部位。所述组合物和/或细胞向损伤部位的施用可以是表面的(例如,通过皮肤)、可以是针对受损组织之位于体表内部的一些位置,或两者。例如,可通过离子电渗疗法经血管、内皮细胞层或其他内部组织来将微量元素递送至损伤部位以提供用于进行组织修复的微量元素的有效局部浓度。

[0207] 在一个方面,本文中公开了用于将本文中公开的微量元素组合物和/或细胞递送至损伤部位的施用器。所述施用器可以是用于递送本文中公开的各种组合物的任意合适装置。所述施用器可配置成通过喷射、滴落、涂抹、推进、喷雾、雾化或注射来使体表与组合物接触,或者可配置成通过此类方法的任意组合来施用组合物和/或细胞。所述组合物和/或细胞向损伤部位的施用可以是表面的、可以针对受损组织之位于体表内部的一些位置,或两者,并且所述施用器可相应地进行配置。在一些实施方案中,施用器配置成将液体的组合物递送到损伤部位上。用于滴落、喷雾、雾化或流喷射(stream-spraying)(例如以平流或圆流)液体的喷嘴在本领域中是公知的。所述施用器可配置成将组合物“涂抹”到体表上,例如,如刷子、棉卷(roller)或棉卷球。用于将组合物注射在损伤部位的施用器包括针,例如纳米或微米注射用针。所述施用器可配置成通过离子电渗疗法、超声穿透增强、电穿孔、海绵应用或通过任何其他合适的方法来施用组合物。优选地,所述施用器配置成使得组合物向损伤部位位置的递送在空间上是精确的,在治疗上可接受的误差幅度内。

[0208] 在一些方面,本文中公开的微量元素组合物经口施用于组织损伤部位。在一些实施方案中,微量元素或包含微量元素的化合物(例如铜离子、酮原子或螯合铜)通过消化道吸收。在一个方面,所吸收的微量元素靶向(通过主动靶向或被动靶向)损伤部位以提供用于进行组织修复的微量元素的有效局部浓度。在一些实施方案中,经口递送的微量元素与蛋白质、肽、氨基酸或者单糖、二糖或多糖形成化合物或络合物。在一些实施方案中,所述微量元素与一种或更多种聚合物形成化合物或络合物。在另一些实施方案中,所述微量元素

呈有机金属化合物,例如小分子有机金属化合物。

[0209] 当用于体内治疗时,将所述微量元素组合物和/或细胞以有效量(即具有期望治疗效果和/或预防效果的量)施用于对象。所述剂量和给药方案将取决于对象中的损伤程度、使用的具体微量元素组合物和/或细胞的特征(例如其治疗指数)、对象以及对象的病史。

[0210] 有效量可通过内科医师和临床医师熟悉的方法在临床前试验和临床试验期间确定。可通过用于全身或局部施用药物化合物的多种公知方法来向有此需要的哺乳动物施用可用于所述方法的微量元素组合物和/或细胞的有效量。

[0211] 将微量元素直接递送到损伤部位中

[0212] 在一个方面,如下将微量元素直接递送到损伤部位中:通过直接注射到受损组织中,或者通过将经包被的植入物放置成与损伤部位物理接触。这允许微量元素长时间保留在递送部位,从而在损伤部位产生具有最高浓度的微量元素梯度。这样的微量元素梯度使得血管朝向损伤部位生长,从而有利于在损伤部位重新生成血液微血管环境并由此有利于组织再生。在一个实施方案中,本文中公开的微量元素调节HIF-1的转录活性。在一个方面,微量元素(例如铜)是HIF-1转录活性的诱导剂。本文中公开的HIF-1转录活性的诱导剂可包含一种或更多种金属元素(包括微量元素)。

[0213] 在一些实施方案中,将微量元素直接递送到受损组织中避免或降低于全身施用相关的不利副作用。在某些方面,在损伤部位直接递送避免与药物或药剂相关的全身毒性和/或避免诱导全身炎性应答,例如细胞因子风暴。

[0214] 在一些实施方案中,使用经包被的植入物、支架或板或者经微量元素浸透的植入物来将微量元素递送至损伤部位。在一些方面,直接递送至损伤部位包括局部递送至血管或组织内的治疗部位。合适的递送系统包括但不限于具有近端和远端气囊的双气囊递送系统,所述气囊同时膨胀以在动脉腔内分离治疗空间。在此情况下,导管在两个气囊之间延伸以局部递送治疗剂。其他基于气囊的局部递送系统包括多孔气囊系统、经水凝胶包被的气囊和具有内部金属支架的多孔气囊。其他系统包括局部放置的装有药物的经包被金属支架和填充有药物的聚合物支架。Wilensky等,Methods and Devices for Local Drug Delivery in Coronary and Peripheral Arteries,Trend Cardiovasc Med,第3卷(1993)。

[0215] 在一个方面,在损伤部位持续递送微量元素在延长时间内向受损组织提供相对少量的所施用药剂。在一个实施方案中,在较小且毒性较低的剂量下,延长治疗实现通过用高剂量药剂进行急性治疗不能获得的结果。在一个方面,在损伤部位持续递送微量元素释放药剂超过约12个小时、约1天、约2天、约1周、约2周、与1个月、约2个月、约6个月、约9个月、约1年、约1年半或约2年。

[0216] 在一些实施方案中,本文中公开的持续递送组合物包括包含微量元素、药剂和聚合物的长效可注射剂(例如,基于油的注射剂、可注射的混悬剂、可注射的微球体和可注射的原位系统),所述聚合物用于储库型注射剂、市售可得的储库型注射剂和可注射的持续释放递送系统。在某些实施方案中,本文中公开的持续递送组合物包含通过聚合物基质的扩散和/或降解可从其释放药剂的聚合物基质。因此,所述药剂的释放模式主要由聚合物基质以及装载量百分比和制备方法决定。在一些实施方案中,持续释放制剂使用生物可降解的聚合物。在此情况下,持续释放制剂不需要通过外科手术将制剂从对象去除。典型地,这样

的制剂可并被患者机体缓慢降解并吸收,并最终与其他可溶性代谢废产物一起处理掉。

[0217] 在一个方面,聚合物可注射储库系统用于在损伤部位递送包含微量元素的原位形成植入物。原位形成植入系统通常由生物可降解产物制成,所述系统可通过注射器注入体内并且一旦注射就凝结形成固体的生物可降解植入物。在一些实施方案中,所述植入物由热塑性浆料(thermoplastic paste)、原位交联聚合物、原位聚合物沉淀、热诱导性胶凝或原位固化有机凝胶形成。热塑性浆料的储库形成机制是在以熔融形式注射到体内后冷却至体温之后形成半固体。交联聚合物网络可以以多种方式原位实现,形成固体聚合物系统或凝胶。用于原位交联系统的方法包括通常由热和光子吸收启动的自由基反应,或小阳离子与聚合物阴离子之间的离子相互作用。原位形成物可通过引起聚合物从溶液中沉淀来产生。在添加有药物的生物相容性有机溶剂中增溶水不溶性且生物可降解的聚合物,所述溶剂在混合之后形成溶液或混悬液。当将该制剂注射到体内时,水混溶性有机溶剂分散并且水渗透到有机相中。这导致相分离并且形成储库的聚合物沉淀在注射部位。热诱导性胶凝系统表现出热可逆的溶胶/凝胶转变并且以较低的临界溶解温度为特征。其在室温下为液体并且在处于或高于较低的临界溶解温度下产生凝胶。原位固化有机凝胶包含水不溶性的两亲性脂质,其在水中溶胀并形成多种类型的溶致液晶。

[0218] 在一些实施方案中,本文中公开的持续释放组合物包含用于受控递送微量元素的生物可降解聚合物。合适的生物可降解聚合物典型地包括聚丙交酯(PLA)、聚乙交酯(PGA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)、聚(ϵ -己内酯)(PCL)、聚葡萄糖酸酯、聚酐、聚原酸酯、聚(二氧化环己酮)和聚烷基氰基丙烯酸酯。在一些实施方案中,所述持续释放组合物包含可注射的生物可降解微球体,例如PLGA微球体、PCL微球体、聚酐微球体、聚原酸酯微球体和聚烷基氰基丙烯酸酯微球体。

[0219] 在一些实施方案,直接递送通过向损伤部位注射包含铜(或其他微量元素)的纳米颗粒材料来实现。在一些方面,本文中公开的纳米颗粒材料包含尺寸为约1至约5,000纳米的颗粒。在一些方面,所述纳米颗粒的尺寸可广泛变化,其中最大尺寸(例如,球体的直径、板的宽度、棒的长度等)可从1到1,000nm任意变化,并且最小尺寸(例如,棒的直径、板的厚度等)可从0.1到100nm任意变化。

[0220] 所述纳米颗粒可具有任意形状或形态。例如,其可以是金属胶体,例如金胶体或银胶体。所述纳米颗粒可以是纳米球体和纳米管结构两者获得的富勒烯。在一些实施方案中,所述纳米颗粒可具有芯/壳结构,例如纳米壳。在一些实施方案中,所述纳米颗粒可以是球体,平或弯曲片材,和可以是任意截面的线性或弯曲细长颗粒,包括圆形、环形、多边形、不规则形等(例如,细长圆柱体、管、具有多边形截面的柱形、带状颗粒等)以及其他规则或不规则几何形状。

[0221] 包含微量元素的纳米颗粒材料可靶向(例如,特异性化学相互作用,例如抗原-抗体结合等)或被直接递送至损伤部位。在一些方面,组织表面的治疗可通过非靶向递送来实现,例如通过在纳米颗粒材料中沐浴组织、使用移液管或微量移液管来将纳米颗粒施用于组织、将纳米颗粒材料注射到组织中、将纳米颗粒材料涂抹在组织上,或者将纳米颗粒与其他成分(例如一种或更多种聚合物和/或一种或更多种蛋白质或其组合)组合。实例包括但不限于白蛋白、纤维蛋白原、胶原、弹性蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、壳聚糖、碱性成纤维细胞生长因子或血管内皮细胞生长因子、血小板衍生生长因子、表皮生长因子或胰岛素样生

长因子。在另一些方面,与包含微量元素的纳米颗粒结合使用的一种或更多种其它化学实体或部分包含微量元素。这些物类可具有补充或附加的治疗或诊断效用。所述纳米颗粒可与这些其它组分化学结合或者可作为与其的简单混合物递送。例如,所述纳米颗粒可与抗体结合。修复方法可涉及仅一个类型的纳米颗粒,或者可涉及一种以上类型的纳米颗粒。所述纳米颗粒可包含一种或更多种微量元素。

[0222] 形成纳米颗粒的聚合物包括天然或合成的、生物可降解或生物不可降解的、均聚或共聚的、热塑性或非热塑性的聚合物等。用于形成纳米颗粒的合适聚合物可选自例如以下：聚羧酸聚合物和共聚物，包括聚丙烯酸；乙缩醛聚合物和共聚物；丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯聚合物以及共聚物（例如，甲基丙烯酸正丁酯）；纤维素聚合物和共聚物，包括乙酸钠纤维素、硝酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、胶膜、人造纤维、三醋酸人造纤维和纤维素醚，例如羧甲基纤维素和羟甲基纤维素；聚甲醛聚合物和共聚物；聚酰亚胺聚合物和共聚物，例如聚醚嵌段酰亚胺、聚酰胺酰亚胺、聚酯酰亚胺和聚醚酰亚胺；聚砜聚合物和共聚物，包括聚芳砜和聚醚砜；聚酰胺聚合物和共聚物，包括聚己内酰胺和聚丙烯酰胺；树脂，包括醇酸树脂、酚醛树脂、脲醛树脂、三聚氰胺树脂、环氧树脂（epoxy resin）、烯丙基树脂和环氧树脂（epoxide resin）；聚碳酸酯；聚丙烯腈；聚乙烯吡咯烷酮（交联以及其他形式的）；乙烯基单体的聚合物和共聚物，包括聚乙烯醇、聚卤乙烯（例如聚氯乙烯）、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物（EVA）、聚偏二氯乙烯、聚乙烯醚（例如聚乙烯甲醚）、聚苯乙烯、苯乙烯-马来酸酐共聚物、苯乙烯-丁二烯共聚物、苯乙烯-乙烯-丁烯共聚物（例如，聚苯乙烯-聚乙烯/丁烯-聚苯乙烯（SEBS）共聚物、苯乙烯-异戊二烯共聚物（例如，聚苯乙烯-聚异戊二烯-聚苯乙烯）、丙烯腈-苯乙烯共聚物、丙烯腈-丁烯-苯乙烯共聚物、苯乙烯-丁烯共聚物和苯乙烯-异丁烯共聚物（例如，聚异丁烯-聚苯乙烯嵌段共聚物，例如SIBS）、聚乙烯基酮、聚乙烯吡啶和聚乙烯酯，例如聚乙酸乙烯酯；聚苯并咪唑；离子聚合物；聚环氧烷聚合物和共聚物，包括聚环氧乙烷（PEO）；糖胺聚糖；聚酯，包括聚对苯二甲酸乙二醇酯和脂肪族聚酯，例如丙交酯、 ϵ -己内酯、乙交酯（包括乙醇酸）、羟基丁酸酯、羟基戊酸酯、对-二氧环己酮、碳酸三亚甲基酯（及其烷基衍生物）的聚合物和共聚物；聚醚聚合物和共聚物，包括聚芳基醚（聚亚苯基醚）、聚醚酮、聚醚醚酮；聚苯硫醚；聚异氰酸酯；聚烯烃聚合物和共聚物；聚烯烃弹性体（例如，山都平（santoprene））、乙烯丙烯二烯单体（EPDM）橡胶、氟化聚合物和共聚物，包括聚四氟乙烯（PTFE）、聚（四氟乙烯-共-六氟丙烯）（FEP）、改性乙烯四氟乙烯共聚物（ETFE）和聚偏二氟乙烯（PVDF）；硅酮聚合物和共聚物；聚氨酯；对亚二甲苯基聚合物；聚亚氨基碳酸酯；共聚（醚-酯），例如聚环氧乙烷-聚乳酸共聚物；聚磷腈；聚草酸亚烷基酯；聚氧杂酰胺和聚氧杂酯（含有胺和/或酰氨基的那些）；聚原酸酯；生物聚合物，例如多肽、蛋白质、多糖和脂肪酸（及其酯），包括纤维蛋白、纤维蛋白原、胶原、弹性蛋白、壳聚糖、明胶、淀粉、糖胺聚糖（例如透明质酸）；以及上述物质的共混合物和进一步共聚物。

[0223] 在另一些实施方案中,所述纳米颗粒可由例如选自以下一种或更多种金属形成:基本纯的金属,例如银、金、铂、钯、铟、钼、铈、钛、钨,和钨;以及金属合金,例如钴-铬合金、镍-钛合金管材、铁-铬系合金、钴-铬-铁合金和镍-铬合金,等。在另一些方面,所述纳米颗粒可由如本文中公开的微量元素形成,并且可用于将相同或不同的微量元素直接递送至损伤部位。

[0224] 在一些实施方案中,所述纳米颗粒可由例如选自以下的一种或更多种合适的非金

属无机材料形成：磷酸钙陶瓷(例如，羟磷灰石)；磷酸钙玻璃，有时称为玻璃陶瓷(例如，生物玻璃)；金属氧化物，包括非过渡金属氧化物(例如，来自元素周期表13、14和15族之金属的氧化物，包括例如氧化铝)和过渡金属氧化物(例如，来自元素周期表3、4、5、6、7、8、9、10、11和12族之金属的氧化物，包括例如钛、锆、钪、钽、钼、钨、铌、铍等的氧化物)；基于碳的材料，例如纯碳和掺杂碳(例如，富勒烯，碳纳米纤维，单壁、所谓的“少壁”和多壁碳管纳米管)、金刚砂和氮化碳；二氧化硅；合成或天然硅酸盐(包括硅酸铝)、单体硅酸盐(例如多面体低聚倍半硅氧烷(POSS)，包括多种官能化POSS和聚合POSS)和页硅酸盐，包括黏土和云母(其可任选地是夹层和/或剥层的(exfoliated))，例如蒙脱石、锂蒙脱石、水滑石、蛭石和锂皂石(laponite)。

[0225] 在一些实施方案中，本文中公开的纳米颗粒材料包含一种或更多种聚合物、一种或更多种金属或合金和/或一种或更多种合适的非金属无机材料。

[0226] 在一些具体实施方案中，多种类型的含铜化合物均可用于直接局部递送至损伤部位。合适含铜离子溶液的实例是氯化铜(I)、氯化铜(II)、乙酸铜和硫酸铜溶液。在另一些实施方案中，使用合适的含锌溶液，例如氯化锌、乙酸锌和硫酸锌的溶液。在另一些实施方案中，铜或锌与蛋白质、肽、氨基酸、单糖、二糖或多糖、一种或更多种聚合物、或小分子形成化合物或络合物，并且所述化合物或络合物用于直接定位递送在损伤部位。在一些实施方案中，使用含微量元素的有机金属化合物来直接定位递送在损伤部位。

[0227] 在一些实施方案中，用于直接定位递送至损伤部位的铜组合物中铜离子的浓度为约5 μ M至约10 μ M、约10 μ M至约20 μ M、约20 μ M至约40 μ M、约40 μ M至约60 μ M、约60 μ M至约80 μ M、约80 μ M至约100 μ M、约100 μ M至约200 μ M、约200 μ M至约400 μ M、约400 μ M至约600 μ M、约600 μ M至约800 μ M、约800 μ M至约1mM、约1mM至约5mM、约5mM至约10mM、约10mM至约20mM、约20mM至约40mM，或约40mM至约60mM。合适的锌离子浓度将与上述铜组合物的浓度具有相同的数量级。微量元素的浓度可通过外科医师和临床医师熟悉的方法在临床前试验和临床试验期间确定。

[0228] 在另一个实施方案中，例如通过直接经皮穿刺、通过介入式导管或通过脊柱内注射来将微量元素注射至损伤部位。在一些实施方案中，通过使用经包被的植入物、支架或板或者经微量元素浸透的植入物来将微量元素直接递送至损伤部位。在一个实施方案中，通过从附着有微量元素的血管内支架缓慢释放微量元素来将微量元素直接递送至损伤部位。在一个方面，本文中公开了用于将本文中公开的微量元素组合物和/或细胞递送至损伤部位的施用器。

[0229] 组织损伤及相关疾病

[0230] 本文中所述的“组织损伤”指组织(包括例如心血管、肝、脑、骨骼肌等)的损伤。在一些实施方案中，所述组织损伤是心血管缺血。在一些实施方案中，所述组织损伤是肝纤维化。在一些实施方案中，所述组织损伤是脑卒中。在一些实施方案中，所述组织损伤是下肢缺血。在一些实施方案中，所述组织损伤与以下相关：糖尿病、糖尿病性足部溃疡、坏死性小肠结肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病(Crohn's disease)、炎性肠病、再狭窄(血管成形术后或支架植入后)、切口致伤、切口受伤、外科手术、意外创伤、褥疮、淤积性溃疡、腱断裂、声襞声创伤(vocal fold phonotrauma)、中耳炎或胰腺炎。

[0231] 在一些实施方案中，所述组织损伤与糖尿病相关。在一些方面，所述组织损伤与糖

尿病足相关。糖尿病足典型地由糖尿病的血管和神经并发症两者与持续性机会感染和伤口愈合缺陷的组合引起。在一个方面,所述组织损伤是糖尿病性足部溃疡。在另一些方面,所述组织损伤是糖尿病性皮肤溃疡。

[0232] 因此,本文中所述的方法一般性地适用于涉及组织损伤的很多疾病。这些疾病包括但不限于:心肌梗死,心肌病,动脉瘤,咽峡炎,主动脉瓣狭窄、主动脉炎,心律失常,动脉硬化,动脉炎,非对称性间隔肥厚(asymmetric septal hypertrophy,ASH),动脉粥样硬化,心房纤维性颤动和心房扑动,细菌性心内膜炎,巴洛综合征(Barlow's Syndrome)(二尖瓣脱垂),心动过缓,伯格病(Buerger's Disease)(血栓闭塞性脉管炎),心肥大,心炎,颈动脉疾病,主动脉缩窄,先天性心脏缺损,充血性心力衰竭、冠状动脉疾病,艾森门格综合征(Eisenmenger's Syndrome),栓塞,心内膜炎,红斑性肢痛病,纤维性颤动,纤维肌性发育异常,心传导阻滞,心脏杂音,高血压,低血压,特发性婴儿动脉钙化,川崎病(Kawasaki Disease)(皮肤粘膜淋巴结综合征皮、肤粘膜淋巴结病、婴儿型多动脉炎)、代谢综合征,微血管性心绞痛,心肌炎,阵发性房性心动过速(paroxysmal atrial tachycardia,PAT),结节性动脉周围炎(多动脉炎、结节性多动脉炎),心包炎,周围性血管疾病,严重肢体缺血,静脉炎,肺动脉瓣狭窄(肺动脉狭窄),雷诺病(Raynaud's Disease),肾动脉狭窄,肾血管性高血压,风湿性心脏病,糖尿病性血管病,间隔缺损,无症状性缺血,综合征X,心动过速,高安动脉炎(Takayasu's Arteritis),法洛四联症(Tetralogy of Fallot),大血管错位,三尖瓣闭锁,动脉干,瓣膜性心脏病,静脉曲张性溃疡,静脉曲张,血管炎,室间隔缺损,沃-帕-怀综合征(Wolff-Parkinson-White Syndrome),心内膜垫缺损,急性风湿热,急性风湿性心包炎,急性风湿性心内膜炎,急性风湿性心肌炎,慢性风湿性心脏病,二尖瓣疾病,二尖瓣狭窄,风湿性二尖瓣关闭不全,主动脉瓣疾病,其他心内膜结构的疾病,缺血性心脏病(急性和亚急性),心绞痛,急性肺源性心脏病,肺栓塞,慢性肺源性心脏病,脊柱后侧凸性心脏病,心肌炎,心内膜炎,心内膜心肌纤维化,心内膜弹力纤维增生症,房室传导阻滞,心脏节律障碍,心肌变性,脑血管疾病,动脉、细动脉和毛细血管的疾病,或静脉和淋巴管的疾病;获得性脑损伤、创伤性脑损伤、卒中(包括缺血性卒中、脑内出血性卒中、蛛网膜下腔出血性卒中)、缺氧性损伤、代谢紊乱、脑炎以及由感染引起的脑损伤。在某些实施方案中,涉及组织损伤的疾病包括系统性肉样瘤病、皮肤疾病或病症、洛夫格雷恩综合征(Löfgren's syndrome)、肺疾病或病症、心脏疾病或病症、眼部疾病或病症、肝疾病或病症、肌骨骼疾病或病症以及肾疾病或病症。因此,本申请还包括使用本文中所述的方法来治疗任意所述疾病。

[0233] 药盒、组合物和制品

[0234] 在另一个实施方案中,本文中提供了药盒,其包含本文中公开的至少一种干细胞和/或微量元素,及其治疗性细胞组合物,和施用器以及使用说明,所述治疗性细胞组合物可例如通过与可药用载体混合来以可药用形式制备。所述药盒可包含与其余药盒内容物分离的容器。在某些实施方案中,所述组合物和药盒可包含如本文中公开的BMSC、微量元素、干细胞诱导剂和另外的治疗剂中的一种或更多种。

[0235] 在某些实施方案中,所述药盒包含有利于将BMSC、微量元素、干细胞诱导剂和/或另外的治疗剂递送至个体的一种或更多种组件。例如,在某些实施方案中,所述药盒包含有利于将BMSC和/或微量元素和/或干细胞诱导剂病灶内递送至个体的组件。在这样的实施方

案中,所述药盒可包含例如适于将细胞递送至个体的注射器和针等。在这样的实施方案中,所述干细胞或微量元素或干细胞诱导剂可包含在药盒中的袋或一个或更多个小瓶中。在某些其他实施方案中,所述药盒包含将干细胞或微量元素或干细胞诱导剂静脉内或动脉内递送至个体的组件。在这样的实施方案中,所述干细胞或微量元素或干细胞诱导剂可包含例如在瓶或袋(例如,血袋或能够容纳多至约1.5L含细胞溶液的类似袋)内,并且所述药盒可另外包含适于将干细胞或微量元素或干细胞诱导剂递送至个体管和针。

[0236] 另外地,所述药盒可包含在个体中减轻疼痛或炎症的一种或更多种化合物(例如,止痛化合物、类固醇或非类固醇抗炎化合物等)。所述药盒还可包含抗菌或抗病毒化合物(例如,一种或更多种抗生素)、在个体中减轻焦虑的化合物、在个体中降低免疫应答的化合物(例如,环孢素A)和/或抗组织胺药(苯海拉明、氯雷他定、地氯雷他定、喹硫平、非索非那定、西替利嗪、异丙嗪、氯苯那敏(chlorepheniramine)、左西替利嗪、西咪替丁、法莫替丁、雷尼替丁、尼扎替丁、罗沙替丁、拉呋替丁等)。

[0237] 另外,所述药盒可包含一次性用品,例如无菌擦拭物、一次性纸商品、手套等,其有利于个体为递送作准备或者在个体中降低由于施用所述干细胞和/或微量元素和/或干细胞诱导剂而引起的感染可能性。

[0238] 以下非限制性实施例对本发明的组合物和方法进行进一步举例说明。本领域技术人员将认识到若干实施方案在本发明的精神和范围内是可能的。现在将通过参考以下非限制性实施例对本发明进行更详细地描述。以下实施例进一步举例说明本发明,但是当然不应解释为以任何方式限制其范围。

[0239] 实施例

[0240] 实施例1:超声介导的Cu-白蛋白微泡改善BMSC向慢性缺血心脏归巢的用途

[0241] 为了定向补充铜,该实验使用Cu-白蛋白-微泡。在用超声定位并照射之后,铜从所述泡释放至心脏靶部位,从而提高缺血区域中的铜浓度。预实验显示,向心脏的定向铜补充缓解慢性心脏缺血的症状。此外,体外BMSC培养方法已充分建立并且BMSC由于其是典型的归巢干细胞而成为合适的追踪细胞。新西兰白兔是心脏研究领域中的优选模型动物之一。而且,他们对于追踪归巢自体BMSC而言是理想的。将BMSC培养并标记,然后注射到心肌梗死的兔中。在Cu-白蛋白-微泡的治疗之下,通过标记荧光观察到BMSC向慢性缺血心脏重新归巢。另外,该实验中使用SDF-1/CXCR4轴的特异性阻断剂AMD3100来研究在心脏缺血和微泡治疗期间BMSC归巢的机制,从而阐述心肌梗死的发病机理并为心肌梗死的新治疗提供理论基础。

[0242] 方法

[0243] 1. 实验性MI (心肌梗死) 和Cu-白蛋白微泡的治疗

[0244] (1) 将成年雄性新西兰白兔手术前禁食12小时并在外科手术前通过过夜紫外辐射灭菌手术室。(2) 将兔用3ml/kg水合氯醛通过腹膜内施用麻醉并随后以仰卧位放置在手术台上。剃去电极附接位点处覆盖胸部和肢体的毛发。用聚烯吡酮-碘擦洗手术区,连续进行3次。将利多卡因注射到切口位点周围的皮下区域中。(3) 将电极附接至肢体并在外科手术之前和之后的30分钟记录ECG(心电图)。(4) 对兔进行正中胸骨切开术。切下皮肤并解剖s.c.组织和肌肉。此后,收回胸骨并解剖侧板,将胸膜间隙打开,并且如此使心包暴露。(5) 在将心包轻轻切开之后,心脏暴露并将左回旋支(LC)结扎。结扎位点处于LC的75级(LC的心外膜

端限定为零级;LC的起源限定为100级)。进行结扎之前监测心脏状况和呼吸。(6) 监测心室前壁的颜色变化、左心室壁运动的差异和通过电极II、III和aVF记录到的ECG改变(包括ST段),持续2分钟以确保结扎成功。(7) 集中监测心脏状况10分钟,使得当鉴定到节律障碍或异常呼吸时,可释放结扎并且可施用心肺复苏(如有必要的话)。当心脏血液动力学和生命体征变得稳定时,闭合胸部。如果胸膜在外科手术期间受到损伤,则立即闭合胸部并通过抽气来防止气胸。(8) 以无菌方式清洁切口部位,然后允许兔恢复。给予兔400000单位的青霉素,持续3天以避免感染。(9) 将存活的兔分成三组:急性(外科手术 \leq 1个月);慢性(外科手术6个月);慢性&微泡(外科手术并用Cu-白蛋白微泡治疗后6个月)。在实验性MI外科手术之后6个月,通过静脉i.v.施用Cu-白蛋白微泡。通过彩色多普勒诊断超声系统(Color Doppler Diagnostic Ultrasound System)在心脏的左心室处对微泡(5ml/兔/治疗)进行超声辐射(频率:1.3MHz,能量:90%至100%,机械指数:1.1至1.2,辐射时间:20分钟/治疗(5秒辐射-5秒间隔))。对每只兔治疗三次;每次治疗2至3天,并在一周内完成对一只兔全部3次治疗。

[0245] 2. 兔BMSC的分离和培养

[0246] (1) 将成年雄性新西兰白兔手术前禁食12小时并在外科手术前通过过夜紫外辐射灭菌手术室。(2) 将兔通过腹膜内施用3ml/kg水合氯醛麻醉并随后以仰卧位放置在手术台上。剃去吸引部位处覆盖肢体的毛发。用聚烯吡酮-碘擦洗手术区,进行连续3次,之后进行75%醇擦洗以脱碘。使吸引部位暴露,同时通过手术用毛巾覆盖周围的区域。(3) 以无菌方式肝素化骨活检针和注射器。(4) 使用肝素化的针和注射器抽吸供体兔的一个或两个股骨。每次吸引抽取1至2ml骨髓抽吸物。(5) 将抽吸物立即转移到含有4至5ml Dulbecco改良Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, L-DMEM)的15-ml管中。通过轻轻摇动管来使样品与DMEM共混以防止凝固。(6) 将共混物铺层在另一15-ml锥形管中的等体积1.077g/ml Percoll溶液上。在分离之前,应将该溶液保持在室温下,并且应将共混物轻轻地铺层在该溶液上。(7) 然后,将共混物-溶液在室温下以 $400\times g$ 离心15分钟。(8) 收集在梯度界面处的血沉棕黄层(buffy layer)(单核细胞),在以 $300\times g$ 离心下由DMEM清洗两次。在5%CO₂的潮湿气氛下于37℃下,将细胞接种在补充有12%FBS的L-DMEM中。(9) 在接种后3天,进行第一次培养基更换。此后,每2或3天更换培养基。培养基更换可以以半或全培养基更换的方式进行。并且,根据细胞的状况调节培养基中的FBS浓度。用更换培养基来弃掉未贴壁细胞(Non-adherent cell)。在80%至90%汇合时,将MSC用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化并传代。将细胞培养至数目为 8×10^6 至 10×10^6 。

[0247] 3. 兔BMSC的标记

[0248] (1) 当增殖到约 8×10^6 至 10×10^6 时,收获BMSC并使用L-DMEM(无血清)洗涤两次,后者需要在 $400\times g$ 下离心以使细胞成团(pack)。(2) 首先,根据生产商的说明通过pH26标记收集的BMSC。简言之,将DMEM从成团的细胞中最大程度地去除。然后,将细胞悬浮在一份浓度为 1×10^7 细胞/2ml的Dilute-C(等分成2份)中。将染料共混在另一份Dilute-C中,并添加到细胞混悬液(染料浓度:5 μ l/ 1×10^7 细胞)中。在此之后,进行充分共混,并在室温下孵育5分钟,在该过程中轻轻摇动1或2次。然后,向共混物中添加等体积的血清,孵育1分钟以停止标记。然后,在室温下用5ml DMEM(具有血清)以 $400\times g$ 离心10分钟洗涤细胞。此后,将细胞用DMEM洗涤2或3次,并在5%CO₂的潮湿气氛下于37℃下接种在补充有10%FBS的L-DMEM中

过夜。成功标记的细胞为粉色变成红色,如果通过肉眼观察到的话。(3) 然后,通过共焦激光扫描显微术对经pKH26标记的BMSC进行测试,在此之前更换培养基并弃掉死细胞。只有当细胞的标记率高于90%时才认为其是合格的,或者应重复步骤(2)。(4) 在标记过程之前,制备Dio (3) 和Hoechst的工作溶液:将Dio (3) 在蒸馏水中稀释至 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的浓度,过滤以进行灭菌并储存在 -20°C 下;将Hoechst在二甲基亚砷中稀释至 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的浓度并储存在 -20°C 下。(5) 在红色荧光(pKH26)测试之后,将Dio (3) ($10\mu\text{g}/10\text{ml}$) 和Hoechst ($10\mu\text{g}/10\text{ml}$) 添加到合格的经pKH26标记BMSC的培养基中,并将细胞孵育过夜。(6) 认为最终成功的标记为强的红色&绿色和弱蓝色荧光信号。(7) 然后,对经标记的细胞进行成像并分析红色、绿色荧光的标记率。蓝色荧光信号被观察到为细胞核,并且标记率如下计算:在随机的 $200\times$ 视野中,红色或绿色荧光细胞的数目/蓝色荧光细胞的数目。(8) 对于AMD3100治疗组,将无菌的AMD3100(终浓度为 $1\times 10^7\text{ng}/\text{ml}$) 添加到经标记的细胞中并孵育过夜。当孵育完成时,将细胞消化、洗涤,在使用之前悬浮在1至2ml L-DMEM(无血清)中。对于其他组,将成功标记的细胞消化、洗涤,在使用之前悬浮在1至2ml L-DMEM(无血清)中。将制备的BMSC通过耳静脉注射到同一供体兔中。

[0249] 4. 在心肌梗死期间和在Cu-白蛋白-微泡治疗之后对归巢兔BMSC的追踪

[0250] 4.1在急性心肌梗死、慢性心脏缺血和具有Cu-白蛋白-微泡治疗的慢性心脏缺血期间对归巢兔BMSC的追踪

[0251] (1) 急性(MI外科手术后 ≤ 1 个月, $n=3$);慢性(MI外科手术后6个月, $n=3$);慢性&微泡(MI外科手术后6个月并用Cu-白蛋白微泡治疗后, $n=5$)。(2) 在MI外科手术之前1个月(对于急性组)或之后4至5个月(其他组,慢性和慢性&微泡),分离BMSC并培养,并且在使用之前用pKH26、Dio (3) 和Hoechst标记。(3) 在MI外科手术后2周(急性)或6个月(慢性),将制备的BMSC(1×10^6 细胞/兔至 9×10^6 细胞/兔)通过耳静脉注射到供体兔中。在注射细胞后24小时,收获心脏。对于慢性&微泡组,在MI外科手术后6个月进行微泡治疗。在3次治疗之后,将制备的BMSC注射到供体兔中。在注射细胞后24小时,收获心脏。将每个收获的心脏沿长轴从顶点到底部分成具有类似厚度的4份。然后,仍沿长轴从顶点到底部将每份冷冻切片(5切片/份),并使用共焦激光扫描显微术进行观察。使用Nikon DXM1200/NIS-元件来捕获归巢的图像。此后,将切片固定并准备用于病理学分析。(4) 通过Image-Pro Plus 6.0分析图像。计算每张图像的红色荧光的IOD值和荧光面积(乘以像素)。然后,计算每份心脏的IOD值和荧光面积之和。静力学如下处理:IOD(或荧光面积)之和/荧光切片的数目。

[0252] 4.2由Cu-白蛋白-微泡诱导的BMSC归巢的机制

[0253] (1) 将兔分成三组:慢性(MI外科手术后6个月, $n=3$);慢性&微泡(MI外科手术后6个月用Cu-白蛋白微泡治疗, $n=5$);慢性&微泡+AMD3100(MI外科手术后6个月,用Cu-微泡治疗以及用AMD3100治疗的BMSC治疗, $n=3$)。(2) 在MI外科手术前4至5个月分离BMSC并培养,并且在使用之前用pKH26、Dio (3) 和Hoechst标记。(3) 在(慢性&微泡)或无微泡治疗(慢性)下,在MI外科手术后6个月,将制备的BMSC通过耳静脉注射到供体兔中。在注射细胞后24小时,收获心脏。对于慢性&微泡+AMD3100组,在MI外科手术后6个月进行微泡治疗。在3次治疗之后,将经荧光标记并经AMD3100治疗的BMSC注射到供体兔中。在注射细胞后24小时,收获心脏。将收获的心脏冷冻切片。通过共焦激光扫描显微术进行观察并记录切片,成像系统:Nikon DXM1200/NIS-元件。此后,将切片固定并准备用于病理学分析。(4) 通过Image-Pro

Plus 6.0分析图像。计算每张图像的红色荧光的IOD值和荧光面积(乘以像素)。然后,计算每份心脏的IOD值和荧光面积之和。静力学如下处理:IOD(或荧光面积)之和/荧光切片的数目。

[0254] 5.病理学分析

[0255] i.v.注射超剂量的水合氯醛以将兔处死。然后,收获心脏并使用NS(生理盐水)进行洗涤。此后,彻底除去盐水并将心脏冷冻切片。将共焦观察到的切片干燥,固定在4%甲醛溶液中。然后,将切片脱水并用HE染色:(1)用二甲苯使切片脱蜡,用梯度浓度降低的醇洗涤切片并最后用水洗涤:二甲苯(I)5分钟→二甲苯(II)5分钟→100%醇2分钟→95%醇1分钟→80%醇1分钟→75%醇1分钟→蒸馏水2分钟;(2)将切片在苏木精中染色5分钟,之后进行蒸馏水洗涤;(3)蒸馏水洗涤,1%酸性醇30秒;(4)在流动水中浸泡15分钟或者在温水(约50℃)中浸泡5分钟;(5)将切片在醇溶性伊红中染色2分钟;(6)切片的脱水、透明和包封:95%(I)1分钟→95%醇(II)1分钟→100%醇(I)1分钟→100%醇(II)1分钟→二甲苯(I)1分钟→二甲苯(II)1分钟→用中性树脂包封。

[0256] 6.统计学分析

[0257] 使用SPSS14.0(SPSS,Chicago,IL)来分析数据。IOD值和荧光面积以中值表示。组间差异通过等级之和, $\alpha=0.05$ 来测试。标记率以平均值 \pm SD($X\pm SD$)表示。组间差异通过独立样品t-检验来测试。当P值 <0.05 认为具有统计学显著性。

[0258] 结果:

[0259] 在MI外科手术期间,观察到心室前壁的颜色变化、心肌运动(涉及左心室壁、侧壁和顶点)的减慢以及通过电极II、III和aVF记录的升高或降低的ST段。

[0260] 取得骨髓抽吸物并通过密度梯度离心分离。收集血沉棕黄层(单核细胞),培养并传代。用更换培养基来弃掉未贴壁细胞并使贴壁细胞增殖,以此方式BMSC得以富集。在接种后3至5天,贴壁细胞发生克隆生长。在集落中观察到多角细胞和梭形细胞两者。多角细胞在接种后的第一周占优势,然而逐渐被梭形细胞替代。当集落大且密时(通常发生在接种后1至2周内),细胞可进行传代。在传代之后,梭形细胞变为优势细胞。

[0261] 当细胞增殖至约 8×10^6 至 10×10^6 时,进行荧光标记。由于在pKH26标记的过程中需要进行消化和离心,因此pKH26标记通常导致一部细胞发生细胞死亡。因此,在pKH26之后进行Dio(3)和Hoechst标记,使得经pKH26成功标记的活细胞贴壁并存活下来。将Dio(3)和Hoechst添加到合格的pKH26标记BMSC的培养基中并将细胞孵育过夜。只有当标记率大于90%时,才认为细胞得到成功标记并且适于进行追踪实验。

[0262] pKH26和Dio(3)两者均为脂溶性染料,其标记机制为将荧光团插入膜中。这两种染料的标记信号相似。看到经标记的细胞在膜中呈均匀红色或绿色点。观察结果已表明,对于一种细胞而言,一些可标记有较强的pKH26信号,但一些可标记有较强的Dio(3)信号。极少细胞不能被Dio(3)或pKH26标记。

[0263] 根据从BMSC在心肌梗死和Cu-白蛋白-微泡治疗期间的归巢观察到的结果,梗死区异常地在心脏的第1、第2和第3部分内。由于实验性MI通过LC的结扎来实现,因此梗死区涉及顶点和大部分的左心室壁。将收获的心脏沿长轴从顶点到底部分成4份。所有心脏第1和第2部分均包含梗死区(18/18);大多数心脏的第3部分包含梗死区(12/18);少数心脏的第4部分包含小部分的梗死区(3/18)。

[0264] 对于急性心肌梗死,在梗死区内和周围具有丰富且强烈的归巢信号。在MI外科手术的1个月内,认为成功建立的实验性MI兔为急性心肌梗死模型(急性, $n=3$)。在急性梗死期间,动物启动自发的自修复,可观察到强烈的BMSC归巢信号散步在梗死区(图2至4)。在该实验中,观察到重叠的绿色和红色荧光信号为归巢信号,其可在梗死区(而不是非梗死区)内和周围观察到(图2至4)。图2显示:在急性梗死期间,在梗死区的大部分内观察到BMSC的归巢信号。在左心室的处理内在同一视野捕获到A-C。示出了HE结果,从左到右,绿色和红色信号。黄色虚线将区域分成梗死区(向上)和非梗死区(向下)。图像以 $40\times$ 视野,标尺= $500\mu\text{m}$ 捕获。图3显示仅在梗死区中看到归巢信号。A-C、D-F、G-I来自同一心脏,A-C和D-F是梗死区内同一视野(第2部分)的图像,G-I是非梗死区内的图像。D-F是A-C中的蓝线区域。黄色虚线将区域分成梗死区(左侧)和非梗死区(右侧)。G-I是非梗死区内的图像。在梗死区内看到重叠的红色和绿色信号,而在梗死区的边缘或远离梗死的区域内可几乎看不到所述信号。示出了HE结果,从左到右,绿色和红色信号。A-C、G-I以 $40\times$ 视野,标尺= $500\mu\text{m}$ 捕获;D-F以 $100\times$ 视野,标尺= $100\mu\text{m}$ (D-E)或 $200\mu\text{m}$ (F)捕获。图4显示,在急性梗死期间,观察到强烈的BMSC归巢信号。在MI外科手术后1个月内,在梗死区中观察到强归巢信号。从上到下为第1(A-C)、第2(D-F)、第3(G-I)和第4(J-L)部分的图像。在梗死区中看到荧光信号(第1和第2部分,A-F);在非梗死区中未看到信号(第3和第4部分,G-L)。图像以 $100\times$ 视野,标尺= $100\mu\text{m}$ 捕获。

[0265] 来自该实验的结果已证明:当心脏处于慢性缺血时,BMSC的归巢消失,但是Cu-白蛋白-微泡治疗引发BMSC的重新归巢。在MI外科手术后6个月,认为成功建立的实验动物为慢性心脏缺血(慢性, $n=3$)。这些动物的自发自修复以及BMSC归巢严重降低或者甚至消失。在梗死和非梗死区两者内均未发现重叠的绿色和红色信号(BMSC的归巢信号)(图5)。图5显示,BMSC的归巢信号在慢性心脏缺血期间消失。在MI外科手术后6个月,对心脏进行切片和成像。在第1(A-C)、第2(D-F)、第3(G-I)和第4(J-L)部分中未观察到信号。示出了HE结果,从左到右,绿色和红色信号。图像以 $100\times$ 视野,标尺= $100\mu\text{m}$ 捕获。

[0266] 向心脏梗死区的定向铜补充通过超声定位和Cu-白蛋白-微泡的照射来实现。Cu-白蛋白-微泡治疗不启动BMSC向未梗死心脏归巢(图6)。图6显示,在未梗死的情况下,Cu-白蛋白-微泡治疗不启动BMSC归巢。从上到下为来自第1(A-C)、第2(D-F)、第3(G-I)和第4(J-L)部分的图像。在任何区域中均未能发现荧光信号(第1和第2部分,A-F)。示出了HE结果,从左到右,绿色和红色信号。图像以 $100\times$ 视野,标尺= $100\mu\text{m}$ 捕获。用Cu-白蛋白-微泡治疗遭受6个月心脏缺血的兔导致BMSC重新归巢(图7)。在MI外科手术后6个月,Cu-白蛋白-微泡治疗引发BMSC向梗死区重新归巢。从上到下为来自第1(A-C)、第2(D-F)、第3(G-I)和第4(J-L)部分的图像。在梗死区中看到荧光信号(第1、第2和第3部分,A-I);在非梗死区中未看到信号(第4部分,J-L)。示出了HE结果,从左到右,绿色和红色信号。图像以 $100\times$ 视野,标尺= $100\mu\text{m}$ 捕获。尽管丰度、强度和看到区域比急性梗死期间的归巢信号小得多,但是相比较于未接受治疗的慢性梗死动物通过微泡治疗引发的归巢信号明显升高(图8至9)。图8显示Cu-白蛋白-微泡治疗引发BMSC向梗死区重新归巢。在急性梗死期间,在梗死区中观察到丰富的BMSC归巢信号(A-C, a)。在慢性心脏缺血心脏中,归巢信号消失(D-F, d)。在Cu-白蛋白-微泡治疗之后,在梗死心脏区域中消失的归巢信号重新出现(G-I, g)。图像均来自第2部分的切片。示出了HE结果,从左到右,绿色和红色信号。图像以 $100\times$ 视野,标尺= $100\mu\text{m}$ (A-C、D-F、

G-I) 或200 μm (a、d、g) 捕获。图9示出了对急性、慢性和慢性&微泡组的荧光信号的统计学分析。上面是IOD值的分析,下面是荧光面积的分析。组间差异通过等级之和进行测试。短线表示中值,*和#意指 $p \leq 0.05$ 。

[0267] 来自该实验的结果已证明,由Cu-白蛋白-微泡刺激的BMSC的重新归巢依赖于SDF-1/CXCR4轴。SDF-1/CXCR4轴是干细胞归巢的重要机制之一。受损组织表达SDF-1,从而吸引多种干细胞(包括BMSC)归巢。干细胞表面表达的特异性受CXCR4对SDF-1作出应答并引发细胞的归巢。为了特异性地阻断SDF-1/CXCR4,选择AMD3100,即CXCR4的阻断剂来对细胞进行处理。

[0268] 来自该实验的结果已证明,经AMD3100处理的BMSC不能向心肌梗死区归巢。将细胞用pKH26、Dio (3) 和Hoechst标记,与AMD3100一起孵育过夜,然后收获并注射到兔中。当将AMD3100处理的BMSC注射到急性梗死兔中时,未观察到丰富且强烈的归巢信号。与接受未经AMD3100处理之BMSC的急性梗死兔相比,归巢信号的风度和看到区域两者均显著减小(图10至12),表明AMD3100抑制SDF-1/CXCR4依赖性归巢。图10显示经AMD3100处理的BMSC不能向急性心肌梗死区归巢。在MI外科手术后1个月内,经AMD3100处理的BMSC到达梗死区的归巢能力明显降低(第1、第2和第3部分,A-I)。从上到下为来自第1(A-C)、第2(D-F)、第3(G-I)和第4(J-L)部分的图像。各部分中均具有很少的荧光信号。示出了HE结果,从左到右,绿色和红色信号。图像以100 \times 视野,标尺=100 μm 捕获。图11显示,经AMD3100处理的BMSC不能向急性心肌梗死区归巢。从上到下为来自急性(A-C,a)和急性+AMD3100(D-F,d)组的图像(所有均来自第2部分)。示出了HE结果,从左到右,绿色和红色信号。图像以100 \times 视野,标尺=100 μm (A-C、D-F) 或200 μm (a、d) 捕获。图12示出了对急性和急性+AMD3100组的荧光信号的统计学分析。上面是对IOD值得分析,下面是对荧光面积的分析。组间差异通过等级之和进行测试。短线表示中值,*和#意指 $p \leq 0.05$ 。

[0269] 来自该实验的结果已表明,经AMD3100处理的BMSC不能向急性心肌梗死区归巢。在MI外科手术后6个月,Cu-白蛋白-微泡治疗引发BMSC向梗死区重新归巢。然而,当追踪细胞经AMD3100处理的BMSC时,在经Cu-白蛋白-微泡治疗的慢性缺血区域中不能观察到归巢信号。如果用AMD3100处理细胞,在经历心脏缺血6个月并接受Cu-白蛋白-微泡治疗的梗死兔中未能发现由Cu-白蛋白-微泡刺激的归巢信号。从上到下为来自第1(A-C)、第2(D-F)、第3(G-I)和第4(J-L)部分的图像。第1至第3(A-I)部分包含梗死区,但是在各部分中均观察到很少归巢信号。示出了HE结果,从左到右,绿色和红色信号。图像以100 \times 视野,标尺=100 μm 捕获。图14显示,经AMD3100处理的BMSC不能向急性心肌梗死或慢性心脏缺血区域归巢。从上到下为来自急性(A-C,a)、慢性(D-F,d)、慢性&微泡(G-I,g)和慢性&微泡+AMD3100(J-L,j)组的图像(均来自第2部分)。示出了HE结果,从左到右,绿色和红色信号。图像以100 \times 视野,标尺=100 μm (A-C、D-F、G-I、J-L) 或200 μm (a、d、g、j) 捕获。图15示出了对慢性、慢性&微泡和慢性&微泡+AMD3100组的荧光信号的统计学分析。上面是对IOD值得分析,下面是对荧光区的分析。组间差异通过等级之和进行测试。短线表示中值,*和#意指 $p \leq 0.05$ 。

[0270] 作为心肌梗死模型,新西兰白兔成本较低,方便饲养和运输,在MI外科手术期间不必需机械呼吸并且易于进行冠状动脉结扎。在先前的文献中,冠状动脉的结扎主要通过LAD(左前降支)或LC结扎来实现。在该实验中,结果已表明,LAD的结扎不能建立稳定的心肌梗死模型。通过墨汁灌注,观察到兔的LAD特别地短于大鼠和猪的LAD。其到达左心室前壁的至

多1/3,为相当有限的区域-左心室的10%至15%供血。然而,LC相对较长且较大,到达顶点(在一些情况下,围绕顶点并且到达右冠状动脉),为左心室的大部分区域供血。

[0271] 与LAD的结扎相比,LC的结扎提供较成功且稳定的模型。来自心回波描记术和血液动力学测量的结果已表明,具有LAD结扎之兔的心脏功能未明显改变,而LC结扎的兔则显著改变。病理学分析还证明,在LC结扎兔的梗死区明显大于LAD结扎兔的梗死区。此外,LC在心肌表面行进,使得其易于识别和进行手术。

[0272] 超声微泡是一类有利的超声造影剂并且靶向药物载体。微泡在通过超声辐射照射之前保持稳定的转运,所述超声辐射受到人为的控制。因此,微泡上的药物可在靶组织处定向破裂。此外,微泡的破裂和超声辐射有助于药物进入细胞。超声微泡易于操作,对动物几乎不造成损害并且还有希望实现即时且定位的铜补充。因此,在该实验中,选自超声介导的Cu-白蛋白-微泡来向心肌补充铜。

[0273] 干细胞归巢是涉及整个机体的系统性反应。系统性观察比简单的蛋白质测试更有说服力。因此,该实验通过AMD3100处理对Cu-白蛋白-微泡刺激的BMSC归巢的基质进行了研究,显示所刺激的归巢是SDF-1/CXCR4轴依赖性的,这表明所述机制可能为:Cu升高HIF-1活性-HIF-1刺激SDF-1的表达-SDF-1吸引干细胞归巢。

[0274] 心脏缺血导致缺氧,其能够使HIF-1 α 逃脱降解并在细胞溶胶中累积。当转运到细胞核中时,HIF-1 α 与HIF-1 β 二聚以形成HIF-1。然而,在细胞核中,HIF-1 α 在其羧基端中的N803天冬酰胺残基被抑制HIF-1的天冬酰胺酰羟化酶因子(FIH-1)羟基化,导致抑制HIF-1 α 与共活化剂CBP/p300相互作用和形成功能性转录复合物。铜抑制FIH-1的活性,使得促进HIF-1和其他因子的组合以形成功能性转录复合物。当系统中铜不足时,HIF-1不能形成功能性复合物和引发下游基因的表达。然而,使HIF-1 α 累积的心脏缺血引起铜从心脏流失,从而导致HIF-1转录活性被抑制并且HIF-1调节性基因(包括归巢趋化因子(例如,SDF-1))的表达被抑制。因此,随着心脏缺血时间的延长,BMSC的归巢减弱,甚至消失。

[0275] 来自该实验的结果已显示:在急性心肌梗死期间,BMSC未向梗死区归巢。在缺血时间延长至6个月时,BMSC的归巢消失。通过Cu-白蛋白-微泡向心脏定向补充铜,观察到BMSC重新归巢。综上所述,Cu-白蛋白-微泡在慢性心脏缺血期间刺激BMSC的归巢,并且所刺激的归巢过程依赖于HIF-1-SDF-1。

[0276] 实施例2.恒河猴中的缺血性心肌梗死模型的铜超声造影微泡靶向治疗

[0277] 该实验在恒河猴中进行。缺血性心肌梗死模型通过冠状动脉结扎手术来建立。在手术后4周,缺血的心脏组织完全被胶原纤维替代并且变成梗死组织。然后,进行超声引导的铜微泡靶向治疗心肌梗死以进行治疗有效评估。恒河猴具有类似于人的高位心脏,其在胸腔中具有类似的内部结构、电活动、冠状动脉分布、冠状动脉侧支循环、布置和附接。因此,心肌梗死的恒河猴模型将更好地替代人中的心肌梗死状况。

[0278] 1.1在恒河猴中建立缺血性心肌梗死模型

[0279] 在进行外科手术操作之前,使所有的对象接受5mg/kg氯胺酮和0.2mg/kg咪达唑仑的肌内注射以诱导镇静。将电极附接位点处覆盖胸部和肢体的毛发彻底剃去以进行手术和更好的ECG记录。记录标准的双极和单极肢体导联。将显示出异常ECG(例如心动过速(每分钟超过200次搏动)、心律失常和明显偏离基线的ST段)的动物从该实验中排除。

[0280] 不断地监测标准的非侵入性测量(包括心电描记术、袖带血压、脉搏血氧测量和二

氧化碳描记术) (Dash3000, GE, USA.), 并建立静脉导管。首先, 在通过静脉内输注芬太尼 ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$)、咪达唑仑 ($0.2 \text{mg}/\text{kg}$)、异丙酚 ($1 \text{mg}/\text{kg}$) 和维库溴铵 ($0.1 \text{mg}/\text{kg}$) 诱导的麻醉之后, 首先对经受外科手术操作的所有猴逆行插管。用控压式通气进行辅助呼吸以实现 35mmHg 至 40mmHg 的呼气末 CO_2 。将吸气压力设定在 12 至 $20 \text{cm H}_2\text{O}$ 的范围内, 呼吸频率为 $40/\text{分钟}$, 并且吸气/呼气比例为 $1:2$ 。

[0281] 为了在外科手术操作期间维持麻醉状态, 通过盐水将 2mL 芬太尼 (0.1mg) 和 10mL 异丙酚 (100mg) 稀释至 20mL 。通过注射泵以 5 至 $10 \text{mL}/\text{小时}$ 的速度连续输注混合物。根据期间的麻醉状态和手术时间对泵速度进行调整。用留置针将动脉插管穿刺到股动脉中, 并与压力监测管连接以在手术期间进行侵入性血压监测。正常地, 股动脉搏动可触及髂前上棘和耻骨联合之间的中间。以无菌方式分离手术区域。所述分离借助 4 件一次性无菌布单来进行。

[0282] 将手术区域在左侧第四肋间隙线的中间轻轻切开, 并从胸骨柄的左侧向外产生 4 至 5cm 的横切口。推荐单极透热法, 因为其可用于切割组织和凝固两者。将 *s.c.* 组织和肌平面 (muscular plane) 向下解剖至胸膜, 进入胸膜间隙, 然后通过将镊子打开来加宽切口。插入棉签, 清洁胸膜间隙并将肺推离孔, 然后加宽肋间切口以打开胸部并使心包暴露。

[0283] 通过左侧第四肋间的胸廓切口 (4 – 5cm) 使心脏暴露并鉴别顶点和左心耳。将 LAD 的心外膜端限定为零级; 将左心耳下端的 LAD 起源限定为 100 级。在特定位置进行结扎。另外, 如果对角支动脉的分支点在结扎位点之上, 则在一些猴中还将主对角支平行于 LAD 动脉上的结扎位点进行结扎。

[0284] 使动脉堵塞 1 分钟, 之后进行 5 分钟再灌注, 并且在最后的结扎之前将该堵塞-再灌注重复 3 次。在最后的结扎之后, 需要监测左心室壁运动的差异、心室前壁的颜色变化以及心电图和血压的改变以确保结扎成功。在永久性结扎之后, 通过 1.0mL 注射器向左心耳中推注亚甲蓝 (1mL)。亚甲蓝的充盈缺损判断结扎的完成以及缺血区域的预测。

[0285] 在闭合胸部之前, 对心脏状况集中监测 45 分钟。输注多巴酚丁胺 (3 至 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{分钟}^{-1}$) 以支持心脏功能, 并且如有必要的话, 使用除颤器 (HEARTSTART XL, Philips)。需要加以小心以避免在闭合心包期间对心脏造成损害。应向心包腔内输注透明质酸钠以用于进行抗黏附处理。用 4 – 0 聚乙烯缝合线闭合心包和胸膜。用丝线缝合线闭合肋间切口。为了避免气胸, 需要加以小心以避免在肋间闭合期间对肺造成损害。在进行肋间切口闭合的同时使肺再膨胀, 使得可将空气从胸膜腔排出。在将肋间切口闭合之后, 向皮下间隙滴落盐水溶液, 使肺再次膨胀以确保胸部切口紧密闭合。用 $\#2$ – 0 丝线缝合线逐层闭合肌肉和皮肤切口, 并以无菌方式进行清洁。在自主呼吸恢复之后, 收回气管导管。用无菌的纱布和绷带覆盖切口。肌内注射曲马多 ($2 \text{mg}/\text{kg}$) 以使缓和疼痛。隔日更换绷带并在手术后一周移除缝合线。

[0286] 1.2 ECG 监测

[0287] 使用儿科电极以 $25 \text{mm}/\text{s}$ 纸速度 (paper velocity) 和 $10 \text{mm}/\text{mV}$ 振幅在手术前、手术后立即 (整个外科手术操作为约 2 小时)、手术后 4 和 8 周在每只猴的仰卧位记录 12 –导联 ECG (MAC8000, GE, USA.)。即使使用儿科电极, 猴胸壁的宽度仍不足以允许同时进行 6 个心前区导联。因此, 将 6 个心前区导联分成两组: 将 V_1 、 V_3 和 V_5 以一组记录, V_2 、 V_4 和 V_6 以另一组记录。

[0288] 1.3 心回波描记术

[0289] 在标准的心尖 2 –和 4 –腔视图上进行二维心回波测量, 并进行三个连续心动周期。

使帧频保持在70fps至100fps。在手术前、手术后4周和8周在左侧位用10.3MHz转换器(P10-4, Siemens ACUSON Antares System, German)对所有猴进行经胸廓心回波评价。

[0290] 用辛普森单面方法(Simpson's single-plane method)对左心室的射血分数(EF)进行评价。左室舒张期末容积(left-ventricular end-diastolic volume LVEDV)和收缩期末容积(left-ventricular end-systolic volume, LVESV)直接记录,并且 $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100\%$ 。左心室的每搏量(Stroke volume, SV)计算为 $SV = LVEDV - LVESV$ 。

[0291] 1.4心脏磁共振成像(MRI)

[0292] 将所有猴通过肌肉注射10mg/kg氯胺酮和0.2mg/kg咪达唑仑麻醉,插管以辅助呼吸,并使用心脏专用的相控阵线圈和ECG触发在治疗之前和之后以仰卧位在临床3.0-T扫描仪(Siemens)上进行研究。用于序列触发的ECG是MR检查的最重要基石之一。使用屏气、短轴、稳态自由进动序列(完全左心室覆盖;1层/屏气;TR/TE,心跳间隔/最小值;层厚,10mm;视图数/段,8)进行功能性检查(电影MRI)。在造影材料的首次通过期间使用交错切口饱和分段梯度-回波-回波-平面杂合脉冲序列沿心室短轴获得钆喷酸葡胺增强的采集持续50次心跳(用以下进行灌注扫描:5个图像/心跳;反转时间,160毫秒;IV推注,其中剩余0.1mmol/kg以5mL/秒递送),之后对于早期和延迟增强成像,分别在施用第二0.1mmol/kg推注后2分钟和10分钟进行沿左心室短轴的反转-恢复准备梯度回波序列(1层/屏气;对于每个早期相和延迟相,5层)(对于早期和延迟增强成像,到空正常心肌的反转时间分别固定在200和250ms)。如果需要的话,获得另外的视图(四室或长轴)。总研究时间为约30分钟。

[0293] MRI图像分析:对于分析,用公认的软件Syngo Argus将图像显示在计算机监视器上,其常规地显示同一排中同一层中心动周期的不同相的图像,并将不同层的心动周期的相同相的图像进行比对。用心脏MRI中最常用的辛普森法则方法,可对动态系列的电影MRI图像进行分析以提供心室容积的准确评估。从人工追踪以限定每层(其中包括乳头肌)的心肌的心内膜和心外膜边界的轮廓,可通过软件Syngo Argus使用辛普森法则自动地确定心室容积和全局功能参数,包括舒张期末容积和收缩期末容积、射血分数、每搏量。

[0294] 梗死尺寸:使用心脏分析软件分析随机化和匿名化图像。为了评估梗死尺寸,在人工调整下自动地在LGE图像上分隔心内膜和心外膜边界,之后使用内置段部分对梗死组织进行自动描述。当需要时,进行人工校正。表示为左心室质量百分比的梗死尺寸计算为梗死体积/左心室容积(来自电影数据)。如通过造影增强磁共振成像确定的长期梗死尺寸测量是可重现的。

[0295] 1.5铜超声微泡治疗

[0296] 在进行外科手术操作之前,使所有的对象接受5mg/kg氯胺酮和0.2mg/kg咪达唑仑的肌肉注射以诱导镇静。将电极附接位点处覆盖胸部和肢体的毛发彻底剃去以进行微泡治疗和更好的ECG记录。建立静脉导管。进行超声引导心肌梗死治疗。通过经沿腿后面延伸的小隐静脉建立的静脉内通道每3天输注铜微泡。在每个铜微泡治疗期间,将超声探针(Vivid 7, M3S, GE)放置在胸部的心前区使得超声波可定向心脏的梗死区。将机械指数设定为1.2。在每次注射之后,通过超声能触发使通过循环系统到达心室的铜微泡爆裂。有时,超声探针沿心脏顶点和二尖瓣之间的短轴略微前后移动。在每次注射的铜微泡爆裂之后,接着进行下一次输注直至完成每次治疗的剂量(2mL/kg)。以每3天进行治疗。在治疗之前和每只猴接受8次治疗后2周,对心脏功能和结构进行评价以评估治疗效果。

[0297] 1.6侵入性血液动力学测量

[0298] 侵入性压力-容积方法能够实现左心室表现的压力测量,从而提供优于其他可利用的心脏功能测量的优势。与心回波描记术检测组合,对心脏表现进行综合测量。该操作只能在实验的最后收获之前进行。

[0299] 使powelab(16道,ADInstrument Inc.)记录器与3F导管(Millar Instrument Inc,USA)相连。根据生产商的建议对压力进行校准。

[0300] 通过肌肉注射麻醉剂来诱导麻醉。使用与氯胺酮(10mg/kg)与咪达唑仑(0.2mg/kg)的组合以获得持续且稳定的镇静。对猴的颈部进行清洁,并剃去覆盖的毛发。然后,将动物以仰卧位放置在手术台上。用25-号静脉留置针通过小隐静脉建立静脉内通道。用经盐水稀释至20mL的终体积的10mg/kg氯胺酮和20mg/kg异丙酚维持麻醉。通过注射泵以 $1\text{mL}(\text{kg} \cdot \text{小时})^{-1}$ 的速度连续输注混合物。为了在收集血液动力学指数期间获得合理的结果,需要在麻醉维持方面加以小心并适当地使用和仔细优化药物。甚至略不合规的剂量就可对心脏功能产生显著影响。

[0301] 在颈部的左侧部分产生经线为3至4cm的外科手术切口;将s.c.组织和肌平面在面皮(cutaneous facii)和颈皮(cutaneous colli)之间解剖。将气管和胸乳突肌(sternomastoideus)之间的面部平面解剖以触摸颈动脉搏动并定位颈动脉鞘。对右颈动脉进行外科手术解剖和插管提供到达左心室的最直接、即时且可靠的通道,其通过颈动脉的CT扫描和3D重建确定。

[0302] 使用钝器解剖以2cm的长度分离颈总动脉。如有需要,将动脉远端结扎以降低血液损失。用0外科手术丝线缝合线控制近端血管,并用血管夹闭塞近端。将暴露的动脉浸入2%利多卡因中以扩大血管并有利于进入。

[0303] 用小血管开口打开颈动脉血管,并将3F Millar导管置于动脉中,然后移除血管夹。

[0304] 导管沿左颈动脉逐渐行进至左心室。然后,加强近端血管控制。

[0305] 在超声辅助的检测下,将导管轴的位置设定并旋转以实现将尖端沿左心室的轴最佳放置以精确测量和记录。显示图形8和不规则环的左心室腔外部的近端电导电极段指示主动脉测量,并且必须排除通过这些近端段检测到的容积。或者,必须使导管进一步进入左心室中。确保导管的尖端朝向顶点并且电导导管在大致心室腔的中间保持稳定且直线的位置,从而避免壁接触。如有需要的话,对导管的位置进行调整以获得规则的压力-容积环。

[0306] 在稳定一段时间之后,用输注泵以 $10\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{分钟}^{-1}$ 的起始剂量输注多巴酚丁胺,之后以30、50、70 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{分钟}^{-1}$ 的递增剂量输注,每个阶段持续3分钟。通过仪器不断且同时地记录在多巴酚丁胺刺激之下的心脏表现。收集并分析所有猴的 $+dP/dt_{\text{max}}$, $-dP/dt_{\text{min}}$,基本心率(heart rate,HR)下的LVDP,110%、120%、130%、140%的基本心率下的LVDP,所述基本心率定义为在输注多巴酚丁胺之前的心率。

[0307] 1.7组织病理学检测

[0308] 通过静脉内注射氯化钾(10%,10mL)将猴处死并进行完全尸体解剖。将收获的心脏清洗,大体上检查可看见的病变并固定在10%甲醛溶液中。然后,将心脏沿长轴从顶点到底部切成6块。将每块的厚度固定为0.5cm。确保在切割期间每个切片的表面是光滑且均匀的,并通过具有标记的结扎线来标记切片。将薄切片切割并用Masson和H/E染色以用于显微

镜检测。

[0309] 抗体:小鼠抗人HIF-1 α 单克隆抗体:ab16066,Abcam;小鼠抗人VEGFA单克隆抗体:sc-57496,Santa Cruz;兔抗人VEGFR1单克隆抗体:1303-12,Epitomics;小鼠抗人CD31单克隆抗体:Maixin bio-tech company,Fuzhou。HIF-1 α 的抗原恢复是通过pH为9.0之EDTA的高压热诱导性抗原恢复,而VEGF和VEGFR1是通过pH为6.0之柠檬酸盐缓冲溶液的微波热诱导性抗原恢复,并且CD31是通过EDTA的微波热诱导性抗原恢复。HIF-1 α 的工作浓度为1:800,VEGF为1:100,并且VEGFR1为1:100。在免疫组织化学检测过程中,将PBS作为阴性对照替代第一抗体;并且载玻片鉴定确切的蛋白质表达作为阳性对照。通过共聚焦对Ki-67标记进行免疫荧光检测。

[0310] 毛细血管密度:在100倍光学显微镜下确定第一最大毛细血管分布视野,然后在200倍光学显微镜下收集5个随机的视野,并测量毛细血管密度。毛细血管限定为每个腔的直径小于8个红细胞的直径之和。通过两个独立的技术人员进行测量。

[0311] 蛋白质表达半定量分析:使用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件(Media Cybernetics)来对蛋白质半定量表达进行分析。对免疫组织化学载玻片进行观察并在光学显微镜下拍摄照片。通过两个独立的技术人员对不同组的载玻片进行评估,并且两个技术人员之间无显著差异。在400倍光学显微镜下对每个载玻片的梗死边缘区和远端区的5个随机视野拍摄照片。

[0312] 1.8 Western印迹

[0313] 组织制备:从胸部取出心脏。对左心室壁进行仔细检查并分离梗死区、边缘区和远端区。梗死区由于其苍白外观而非梗死区分开来。边缘区定义为从梗死区内部1mm到外部3mm的区域。将样品保存在液氮中以用于进行Western印迹分析。

[0314] Western印迹:将每个组织在液氮中研磨并在冰上于包含1%无EDTA的完全蛋白酶抑制剂混合物(Roche,DE)的RIPA裂解缓冲液(Beyotime,CN)中裂解40分钟,之后获得蛋白质提取物。通过Pierce BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo SCIENTIFIC,23227,USA)确定蛋白质浓度。将自每个组织的等量蛋白质(30 μ g)在5 \times SDS样品缓冲液中增溶并在10%-SDS和8%聚丙烯酰胺凝胶上进行分离。然后,将蛋白质电泳转移至聚偏二氟乙烯膜(Bio-Rad,USA)。将膜在含有5%脱脂奶粉的Tris-缓冲盐水/Tween 20(TBST)(10mM Tris-HCl,pH 8.0、150mM NaCl和0.1%Tween 20)中封闭1小时,并根据供应商的建议与相应的第一抗体一起在封闭缓冲液中于4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,所述抗体例如抗HIF-1 α (Abcam,ab113642,USA)、抗VEGF(Santa Cruz,sc57496,USA)和抗VEGFR-1(Abcam,ab32152,USA)。在用TBST洗涤之后,将膜与合适的第二抗体一起在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。使用化学发光HRP底物(Millipore,USA)来使靶蛋白可视化并使用Quantity One Software通过密度测定术进行分析。

[0315] 1.9 HIF-1靶基因的mRNA水平

[0316] 为了确定缺血心肌中的HIF-1转录活性,通过RT-PCR对HIF-1靶基因VEGF和VEGFR-1(Flt-1)的mRNA水平进行测试。

[0317] 总RNA按照生产商的说明使用Trizol(Invitrogen,15596-026,USA)进行分离。使用PrimeScriptTM RTreagent试剂盒(TaKaRa,RR037A,Japan)根据以下方案对1 μ g总RNA进行逆转录:37 $^{\circ}$ C 15分钟,之后是85 $^{\circ}$ C 5秒和4 $^{\circ}$ C 5分钟。使用SYBR Premix Ex TaqTM II(TaKaRa,RR820A,Japan)进行实时RT-PCR反应。为了扩增VEGF和VEGFR1的cDNA片段,使用

BIO-RAD CFX96实时系统对样品进行处理：在95℃下变性30秒，之后是35个循环，每个循环具有如下温度变化：95℃5秒，60℃30秒。对生长曲线的对数期结果进行分析并使用 $2^{-\Delta CT}$ 方法进行相对量化。在每份样品中，VEGF和VEGFR的基因表达水平相对于肌动蛋白来表示。每份样品进行至少3次重复实验。引物序列示于表1中。

[0318] 表1 引物序列

	靶基因	引物序列
	正向引物	GTCTGCAACATGGAAGGTATTG (SEQ ID NO: 1)
[0319]	反应引物	GCAGGTCATAGGTGGTTTCT (SEQ ID NO: 2)
	正向引物	GAGCTTCCTACAGCACAACA (SEQ ID NO: 3)
	反应引物	CCAGGACTTATACCGGGATTTC (SEQ ID NO: 4)
	正向引物	GGGTCACATCACCTAACATCAC (SEQ ID NO: 5)
	反应引物	CCTTTCTGCTGTCCCAGATTAC (SEQ ID NO: 6)
	正向引物	CCACGAAACTACCTTCAACTCC
[0320]		(SEQ ID NO: 7)
	反应引物	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT (SEQ ID NO: 8)

[0321] 1.10心脏中的Cu浓度

[0322] 将组织样品新鲜冷冻并在冻干之前储存于-80℃。在将组织冻干并用硝酸消化之后，消化物为无色或浅黄色且透明，没有可见的沉淀物或残余物。向每个容器添加超纯水来将HNO₃稀释至2%以用于对铜进行后续分析。使用表2中所示的程序通过石墨炉原子吸收分光光度法(ICE3500,Thermo)测定铜浓度。

[0323] 表2 石墨炉原子吸收分光光度法程序

	时间(秒)	氩气流量(L/分钟)
90	20	0.2
120	20	0.2
850	20	0.2
2100	3	0
2500	3	0.2

[0325] 1.11统计学分析

[0326] 所有的数据均表示为平均值 \pm SD。使用Levene齐性检验和变异系数 (coefficient of variance, CV) 在四组之间比较各个参数的变化。使用SPSS 14.0统计软件包 (SPSS, Chicago, IL), 并且当P值 <0.05 时, 认为具有显著差异。

[0327] 2. 结果

[0328] 2.1心脏功能和心力储备

[0329] 心回波描记术检测显示, 在铜微泡治疗之后, 左心室射血分数显著增加。然而, 在未治疗组和微泡组中, 左心室射血分数随时间降低 (图16A)。并且, 心脏性能的这一恢复通过MRI检查得到确认 (16B)。进一步的研究发现, 左心室射血分数提高是左心室收缩期末容积显著降低的结果 ($p<0.05$)。在铜微泡治疗组中, 左心室每次收缩之后残余血液显著减少, 这意味着左心室的收缩功能显著改善 ($p<0.05$) (图17)。

[0330] 侵入性血液动力学测量在药物应激条件下进行。随着心率响应于多巴酚丁胺剂量的增加而逐步升高, 在100%至140%基础心率的心率升高下对心力储备参数进行评价。随着 dP/dt_{max} 、 dP/dt_{min} 和左心室发育压 (LVPD) 的绝对值增加, 心力储备效能提高。侵入性血液动力学测量显示, 与未治疗组和微泡治疗组相比, 在铜微泡治疗组中 $max dP/dt$ (图18A)、 $min dP/dt$ (Fig.18B) 和LVPD (图19) 显著提高 ($p<0.05$)。

[0331] 2.2梗死尺寸

[0332] 我们评估了治疗方法对心肌的梗死体积的作用, 其通过在开始治疗之前和在治疗后观察两周之后进行磁共振成像 (MRI) 进行测量。比较分析显示, 与治疗前相比, 在铜-白蛋白超声造影微泡 (Cu+MB) 治疗的组中梗死尺寸显著减小 (图20)。然而, 在未治疗组和微泡单独 (MB) 治疗组中, 梗死尺寸未表现出显著变化。结果表明, 铜-白蛋白超声造影微泡 (CAUCM) 治疗在恢复缺血心脏中对减小梗死尺寸具有治疗作用。

[0333] 2.3免疫组织化学

[0334] 毛细血管密度: CD31为内皮细胞的标志物。在边缘区和梗死区中, 免疫组织化学检测显示: 在铜微泡组中存在大量经CD31标记的毛细血管 (图21和图22), 并且远多于未治疗组和微泡组 ($p<0.05$)。毛细血管密度的统计图显示: 在装载有铜的微泡治疗之后, 边缘区和梗死区中经CD31标记毛细血管的密度显著增加。*意指 $p<0.01$ 。局部血流量得到显著提高。

[0335] Ki-67阳性细胞代表通过共焦的细胞增殖活性。数据显示: 在装载有铜的微泡治疗之后, 梗死区中出现很多增殖细胞。通过免疫组织化学在梗死区中检测到HIF-1 α 。数据显示, HIF-1 α 主要位于驻留心肌细胞和内皮细胞的细胞溶胶和核中。在梗死区中, HIF-1 α 的水平明显上调 (图24)。图24显示, HIF-1 α 存在于心肌细胞和内皮细胞的细胞溶胶 (箭头) 和核 (箭头头部) 中。在梗死区中, HIF-1 α 的表达上调。

[0336] 如通过Western印迹方法所显示的, 与其他区域相比, 梗死区中的HIF-1 α 蛋白质水平显著提高。图25示出了各个组的不同部分中的HIF-1 α 蛋白质水平, 并且图26示出了各个组的梗死心肌中的HIF-1 α 蛋白质水平。

[0337] VEGF和VEGFR1是受到HIF-1控制的基因。通过RT-PCR测试VEGF和VEGFR1的mRNA水平以揭示HIF-1的转录活性。如图27和图29中所示, 在未治疗组和MB组中这两种基因的mRNA水平显著降低, 但是在Cu治疗组中其显著提高 (图28和图30)。这表明, 慢性缺氧导致可通过

Cu治疗恢复的抑制HIF-1转录活性。

[0338] 心肌中的Cu浓度通过AAS来确定。如图33中所示,在Cu治疗之后,缺血心肌中的Cu浓度增加。

[0339] 针对缺血损害的心肌应答中的HIF-1 α 累积机制涉及PHD调节。PHD酶活性需要氧、还原铁和2-酮戊二酸。另外,这些酶对氧利用率敏感,所述氧利用率对受很多代谢变化的影响,包括通过电子传递链产生的活性氧物类以及线粒体代谢和功能的破坏。因此,PHD蛋白充当偶联HIF-1转录活性变化的氧感应体。因此,缺血心肌中缺乏氧损害PHD功能,其伴随着HIF-1 α -和HIF-1-响应性基因产物的累积增加。急性心肌缺血导致HIF-1 α 的累积和HIF-1调节性基因的表达增加,其中所述基因为参与血管生成的那些。早期研究已发现:在来自具有急性缺血病理学证明之经历冠状动脉搭桥外科手术的患者的心室活检样本中,HIF-1 α 以及VEGF mRNA和蛋白质增加。在动物模型研究中,还发现系统性缺血导致HIF-1 α 和冠状动脉血栓形成普遍升高。

[0340] 使用经在Langendorff布局中直立行走(orthogradely)灌注之分离的大鼠心脏的早期研究已直接证明在长时间而非短期心脏缺血之后铜在冠状动脉流中立即显著迁移。在分离的大鼠心脏的Langendorff灌注中,在缺血35分钟之后再灌注(0.15mL)的第一冠状动脉流级分(CFF)中铜的水平是缺血前值的8至9倍高。后续CFF的水平降低并且达到缺血前值,表明铜在冠状动脉流重新开始时突出现。在缺血18分钟之后,在第一CFF中的铜水平仅为缺血前值的15%。在第一CFF中铜的缺失与心脏功能的缺失程度密切相关。在缺血18分钟之后,心脏功能为约50%并且认为缺失是可逆的,而在35分钟之后,功能缺失超过80%并且认为是不可逆的。因此,心脏中在长时间缺血之后丧失铜将由缺血毒性直接引起。

[0341] 在心肌缺血中高半胱氨酸水平增加已久为人知,并且被认为是心肌发病机理风险因素。已观察到,在患有心血管疾病的患者中血铜和高半胱氨酸同时升高。可合理地推测铜从心脏流失与高半胱氨酸相关。有数条证据指示铜与高半胱氨酸之间具有相互作用。首先,已观察到,高同型半胱氨酸血症与高浓度的血铜以及血浆铜蓝蛋白相关。第二,已在体外鉴定到铜和高半胱氨酸复合物。第三,在高半胱氨酸暴露的条件下,铜补充恢复铜依赖性酶活性。这些观察结果共同表明铜与高半胱氨酸之间的相互作用可负责心脏铜流失。

[0342] 铜通过涉及抑制脯氨酰羟化酶的机制而能够稳定HIF-1 α 。然而,铜的这种作用与其他过渡金属(例如钴和镍)相同,其不是HIF-1活化所必需的,但当细胞暴露于过量的这些过渡金属时增强HIF-1活性。我们的研究已表明HIF-1转录活性需要铜。培养细胞中的铜整合阻断IGF-1诱导的HIF-1与缺氧响应性元件(HRE)结合和VEGF表达。这种抑制效应可通过在培养物中添加过量铜而缓解。另外,我们已发现,这种铜作用依赖于Cu,Zn-超氧化物歧化酶(CCS)的铜分子伴侣并且CCS基因沉默阻断IGF-1诱导的HIF-1HRE结合和VEGF表达,模拟铜整合的效应。此外,如通过免疫沉淀测定所揭示的,CCS与HIF-1 α 直接相互作用。

[0343] 有多个部位潜在地需要铜来活化HIF-1,包括HIF-1 α 合成、稳定化、从细胞溶胶转位至细胞核、与靶基因的HRE序列结合和HIF-1转录复合物形成。我们已在人肝细胞瘤HepG2细胞中具体确定了铜在调节HIF-1转录活性方面的作用机制。用靶向CCS的铜整合剂四乙撑五胺(TEPA)或siRNA治疗HepG2细胞抑制缺氧诱导的HIF-1活化。添加过量的铜可缓解通过TEPA的抑制,但是不能缓解通过CCS基因沉默的抑制。这种CCS基因沉默结果排除了TEPA对非特异性整合的可能混淆影响。因此,数据表明HIF-1的活化需要铜,但是该活动是CCS依赖

性的。铜缺乏不影响HIF-1 α 的产生或稳定性,但是降低HIF-1 α 与靶基因的HRE序列以及与P300(HIF-1转录复合物的组分)结合。铜可能抑制FIH-1以确保形成HIF-1转录复合物。因此,推断铜通过调节HIF-1 α 与HRE结合和HIF-1转录复合物的形成而是HIF-1活化所需要的。因此,铜不足通过FIH-1来抑制HIF-1转录活性。

[0344] 作为概念的证明,我们已利用铜对肥厚型心肌病小鼠进行膳食补充来进行了研究。通过升高主动脉缩窄使该小鼠经受压力超载,并且在该操作后4周发生心脏肥大。在发生心脏肥大之后开始使用生理学上相关水平的铜进行膳食补充。在进行铜补充后4周,发现预先建立的肥厚型心肌病得到逆转并且该逆转发生在持续存在压力超载的情况下。持续的压力超载导致心脏铜和VEGF水平降低并抑制心肌血管生成。铜补充补偿心脏铜,增加VEGF并促进血管生成。

[0345] HIF-1由组成型表达的HIF-1 β (ARNT)和HIF-1 β (或HIF-2 β)构成,其在好氧条件下经历两步(细胞溶胶和细胞核)的羟基化调节。在细胞溶胶中,HIF-1 β 通过三种使用O₂作为底物的主脯氨酰羟化酶(PHD)而经历HIF-1 β 羟基化。经羟基化的HIF-1 β 与von Hippel-Lindau蛋白(pVHL)结合,其靶向HIF-1 β 以进行泛素化和蛋白酶体降解。在细胞核中,HIF-1 β 与辅因子SRC-1、CBP和p300相互作用,其受天冬酰胺羟化酶或抑制HIF-1的因子(FIH-1)的抑制。FIH-1也是一种O₂依赖性酶。在缺氧条件下,PHD和FIH-1被抑制,从而导致HIF-1 β 逃脱蛋白酶体降解并且有利于HIF-1转录复合物形成,并由此有利于活化转录因子。已表明,Co和Ni抑制PHD,由此模拟缺氧的条件,导致HIF-1 β 活化。过量的Cu也抑制PHD,对HIF-1 β 产生的作用与Co和Ni相同。然而,Cu是HIF-1和HRE之间的相互作用所需要的,并且充当FIH-1的生理抑制剂以确保HIF-1复合物转录复合物的形成。因此,铜缺乏抑制HIF-1活性(图34)。

[0346] 心肌缺血导致HIF-1 α 累积和铜消耗。在此条件下,由于HIF转录复合物形成和HIF与靶基因中的HRE序列相互作用需要铜,因此HIF α 的累积不能转换为HIF转录活性。因此,尽管缺血心肌中发生HIF累积,但是铜缺乏阻断参与血管生成的基因的HIF-调节性表达,从而导致抑制心肌血管生成。这导致心肌梗死并进一步发展为心力衰竭。

[0347] 因此,本研究通过超声触发的铜微泡爆裂来靶向铜递送以增加局部缺血区的铜含量,以治疗心肌梗死。结果显示,在梗死区中HIF的转录活性增加;毛细血管密度也显著增加。另外,心回波描记术检测显示,在铜微泡治疗之后心脏功能得以改善。另外,在铜治疗组中心力储备也相应地得到增强。该实验的结果强烈证明,这种超声诱导的铜微泡爆裂将是递送铜以用于治疗心肌梗死的新策略。

[0348] 实施例3.通过包含铜的生物材料来在大鼠中对缺血脑损伤进行治疗。

[0349] 为了探索用于治疗脑缺血的新方法,该实施例利用铜纳米材料来治疗缺血大鼠模型以测试对血管生成的治疗效果。

[0350] 1.实验方法

[0351] 1.1大鼠缺血模型的建立

[0352] 将健康的雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠(体重270 \pm 15g)在具有恒定温度和湿度以及12小时光照-黑暗周期交替的室中进行饲养。对大鼠进行如下处理:术前禁食12小时并自由供应饮用水。

[0353] 1.2技术路线

[0354] 将大鼠随机分成5组:假手术组、IR组、IR+Cu组、IR+NM组、IR+Cu-NM组。如下分别对

脑缺血大鼠进行注射：在外科手术操作后7天将相同体积的Cu、NM、Cu-NM材料10 μ L注射到立体定位脑室中，并在14天内进行神经功能评分和TTC染色。然后，通过4%多聚甲醛固定脑组织以用于进行免疫组织化学检测。

[0355] 1.3中脑动脉闭塞和再灌注模型(MCAO)的制备步骤

[0356] 通过10%水合氯醛(0.35ml/100g)的腹膜内注射诱导麻醉，无需使用气管插管和呼吸机。当大鼠无肢体运动、呼吸频率为约30至60次，眼睛保持靠近时，认为大鼠得到成功麻醉。如Koizumi和Longa方法(Koizumi等,1986,Longa EZ,1989)(即缝合线闭塞法)进行以下操作以用改进的缝合线来制备中脑动脉闭塞模型。传统方法使用直径为0.20至0.25mm的尖端被火焰加热围绕的4-0尼龙单丝缝合线来进行。由于尖端不够大，因此不能完全阻断血管，从而导致回流。直径为0.32mm并且具有被硅胶覆盖的5mm尖端的改进缝合线在18mm处标记。尖端被硅酮覆盖的缝合线的外部可协调地相对血管的内壁摩擦而不泄露。因此，降低回流率以升高模型的成功率。

[0357] 在麻醉之后，将大鼠放置在手术台上。在外科手术操作期间，用加热垫使直肠温度维持在37℃。剃去颈部的毛发，将手术区用聚烯吡酮-碘消毒并用75%乙醇脱碘，准备无菌的外科手术盖布(drape)。在通过长度为3cm的组织剪刀沿前正中线切下颈部皮肤之后，通过导管夹钝性分离颈肌和甲状腺，直至使颈总动脉(common carotid artery,CCA)暴露，然后沿颈动脉向上分离总动脉以使颈外动脉(the external carotid artery,ECA)、颈内动脉(internal carotid artery,ICA)显现。将ECA的远端结扎，用临时折叠物(temporary folder)阻塞颈动脉血流并在CCA中产生小切口。将缝合线通过该小切口插入到CCA中，然后沿CCA轻轻地缓慢行进，并阻塞直至达到通过临时折叠物引起的梗阻。然后，打开临时折叠物，并立即将缝合线推入颈内动脉中。如果在缝合线行进期间感觉到阻力，则缝合线尖端进入大脑前动脉中，缝合线的侧壁已闭塞大脑中动脉并且应停止缝合以避免缝合线进入翼腭动脉中。翼腭动脉是ICA的外部分支。如果缝合线已插入在翼腭动脉中，则不应使其以10mm的深度行进。在将缝合线取出并适当地调整方向之后，可再次将其插入ICA中。接着如下进行下一步的操作：在33℃的潮湿室中缝合肌肉和皮肤切口、碘消毒、用无菌敷料(sterile dressing)覆盖大鼠以促进麻醉恢复。在MCAO后90分钟，再次进行麻醉，并取出缝合线以进行血液再灌注。当感觉到阻力时，停止拔出缝合线。阻力表明缝合线的尖端已到达颈总动脉的分叉部，然后切断皮肤外部的缝合线。必需维持体温和生理盐水补充。肌内注射400000单位的青霉素以防止感染。

[0358] 1.4术后脑损伤评价

[0359] 神经病学严重程度评分：理想的MCAO大鼠在恢复意识之后表现出不同程度的神经功能障碍。前肢偏瘫为主要症状，头部转向对侧身体，当其爬动时转圈或倾倒，身体弯向一侧并且当还发生模型离开时后肢弯曲。存活率在观察期间计算。

[0360] 在小鼠苏醒后进行神经功能障碍评分。该实验中使用18分评分标准，表3。MNSS评分系统(总共18分)分为：1.运动(6分)：当举起尾部时，观察对侧前肢的弯曲度。2.感觉(2分)：深和浅感觉。3.平衡木测试(6分)：观察在缺血后调整神经缺损程度的平衡状态。4.反射(4分)：包括耳廓、角膜、惊恐、惊厥等的反射。“0”表示正常、“18”意指最严重。轻度损伤：1-6；中度损伤：7-12；严重损伤：13-18。如果在缺血再灌注之后无明显神经功能障碍，则在再灌注24小时后将大鼠从该研究中排除。

[0361] 表3 改良的神经病学严重程度评分

		类别	评分
[0362]	运动测试		
	经尾部举起大鼠 (3)		

	前肢弯曲	1
	后肢弯曲	1
	头部在30秒内相对于垂直轴移动 $>10^{\circ}$	1
	将大鼠放置在地上（正常=0；最大=3）（3）	
	正常行走	0
	不能够直行	1
	向轻瘫侧转圈	2
	向轻瘫侧倾倒	3
	感觉测试（2）	
	放置测试（视觉和触觉测试）	1
	本体感觉测试（深感觉，将鼠爪推向桌子边缘以刺激肢体肌肉）	1
[0363]	平衡木测试（正常=0；最大=6）	
	稳定平衡姿势	0
	紧抓平衡木边缘	1
	紧抱平衡木，一肢体从平衡木落下	2
	紧抱平衡木，两肢体从平衡木落下或者在平衡木上旋转（ >60 秒）	3
	试图在平衡木上平衡但跌落（ >40 秒）	4
	试图在平衡木上平衡但跌落（ >20 秒）	5
	跌落；未尝试在平衡木上平衡或者紧紧抓住平衡木（ <20 秒）	6
	不存在反射和异常运动（4）	
	耳廓反射（接触外耳道时摇头）	1
	角膜反射（用棉织物轻触角膜时眨眼）	1
	惊恐反射（对弹响硬纸板的短暂噪音有运动反应）	1
[0364]	癫痫、肌阵挛、肌张力障碍	1

[0365] 梗死区的测量：使用与线粒体之琥珀酸脱氢酶的TTC (2,3,5-氯化三苯基四氮唑) 反应来检测细胞的活性。TTC染色将缺血的受损脑切片标记为白色。TTC染色 (2%) 在37℃的

条件下避光进行。在不同时间收获脑样品(18份/组)并将其放置在之前储存于-20℃的组织切片模具上。在冷冻10分钟之后,在切片模具中将脑从嗅球到枕叶切成6个切片,其中每个切片厚度为2mm。然后,将切片浸入2% TTC中并放入37℃的培养箱中,持续30分钟,然后在10%多聚甲醛中固定过夜。

[0366] TTC染色显示脑组织切片的哪一部分经历缺氧。为此,在检测脑缺血大小中广泛使用功能脑损伤的TTC标记范围。通过数码相机(Powershot 400数码相机,Canon Corp)收集每个切片图像并使用Image J软件进行处理以计算脑损伤的面积。同时,我们使用修正公式来排除由脑水肿对实际脑损伤体积的影响产生的偏差:修正值(%) = {[对侧半球面积-(受损半球面积-脑损伤面积)]/对侧半球面积} × 100%。

[0367] 脑萎缩指数的确定:进行该研究是为了研究慢性期中脑梗死的变化、脑梗死区在10天内表现出不同程度的萎缩并且在14天内最明显。脑萎缩程度的计算与脑梗死面积的计算类似。脑梗死半球脑萎缩指数(%) = {(半球体积-对侧半球梗死体积)/对侧半球体积} × 100%。

[0368] 1.5铜生物材料的制备

[0369] 该实施例用Cu²⁺结合位点(由组氨酸、精氨酸和甘氨酸构成)来设计短肽材料。所述短肽可与Cu²⁺组合以形成稳定的由纳米纤维纳米生物材料构成的水凝胶样品(Cu-NM,包含80μM CuSO₄)。Cu-NM具有以下功能:在损伤组织的特定位置中缓慢释放Cu²⁺并通过有效地利用铜生物功能来促进缺血受损组织器官再生,与此同时消除铜离子对正常组织和器官的副作用。

[0370] 1.6铜纳米材料通过立体定位技术的脑室内注射

[0371] 大鼠侧脑室位置:冠状平面解剖图谱显示:大鼠的侧脑室位于前囟后0.8mm,中线侧面1.5mm,深度为4至4.5mm。该位置是药物的最佳注射位点。

[0372] 在脑缺血/再灌注后7天,通过腹膜内注射10%水合氯醛(3.5ml/kg)麻醉大鼠。在麻醉之后,将大鼠固定在立体定位设备上并剃去顶区的毛发。在常规灭菌并铺设无菌巾之后,在皮肤上沿中线产生1cm的切口以使前囟暴露。在不损伤脑组织的情况下,在中线侧面1.5mm,颅骨上的前囟后0.8mm钻取微孔。通过注射器抽取10μl Cu-NM材料,将注射器固定并进行调节以调整针尖的位置。然后,将注射器的针尖插入微孔中并在脑组织中进行注射,停止在4.5mm的深度。Cu-NM材料得以注射,在注射完成后5分钟,取出注射器并通过骨蜡密封微孔。缝合皮肤切口。与此同时,在Cu治疗组中注射10μL Cu并在材料组中注射10μL纳米材料,假手术组和对照组中不进行治疗。在治疗后14天,进行神经功能评分和TTC染色以测量脑的梗死体积和萎缩程度。

[0373] 1.7病理学检测

[0374] 在建立脑缺血/再灌注模型后1周内,向脑室中注射Cu、NM、Cu-NM。在治疗后1周内收获脑组织(每组中的5只大鼠)。在麻醉之后,我们用0.9%盐水和4%多聚甲醛灌注心脏,然后迅速移出脑组织,将其固定在4%多聚甲醛中。在视交叉冠状截面的水平选择脑切片,然后如下进行染色。

[0375] HE染色:将样本用10%中性福尔马林固定,脱水,用石蜡处理并进行石蜡包埋。将载玻片和盖玻片用硝酸浸泡过夜,并用自来水和蒸馏水清洗,然后用无水醇擦拭并放置在没有灰尘的地方。在37℃下干燥之后,用聚赖氨酸片剂处理载玻片。包埋用常规石蜡在连

续切片中为4 μ m,然后在60℃炉中进行干燥。常规H&E染色的简明步骤为:(1)使包埋于石蜡中的组织切片(4 μ m)脱去石蜡水合。(2)将组织切片散布在Harris苏木精中5分钟并通过水洗涤1分钟。(3)通过75%盐酸乙醇鉴别组织切片30秒,通过水洗涤1分钟。(4)将组织切片通过氨处理30秒并通过水洗涤1分钟。(5)将组织切片在酸伊红乙醇中染色12分钟。(6)通过急流水洗涤组织切片。(7)使组织切片脱水以使切片变得透明。(8)通过树胶中性固定切片。然后,观察脑梗死区中的病理变化并与对侧脑组织进行比较。

[0376] 免疫组织化学:进行免疫组织化学以检测血管生成。检测区域包括梗死区、梗死区的周围区域和对侧正常脑组织。在用CD31标记血管之后,我们对经铜纳米材料介入之后的脑缺血的血管生成进行了检测。免疫组织化学的简明步骤:(1)将组织切片(4 μ m)包埋于脱去石蜡蜡的石蜡中。(2)用3%H₂O₂(过氧化氢)淬灭内源性过氧化物酶。(3)在室温下通过10%兔血清将其封闭30分钟。(4)在4℃下在山羊:大鼠CD31第一多克隆抗体(1:2000)中孵育过夜。(5)在洗涤之后,将切片在山羊:大鼠CD31第二多克隆抗体(1:2000)中孵育1小时。(6)在复合酶中的辣根过氧化物酶-抗生物素蛋白(1:200)中进行孵育。(7)在二氨基联苯氨(DAB)中进行染色。

[0377] 1.8统计学分析

[0378] 数据通过测量指数的SPSS14.0(SPSS,Chicago,IL)软件进行统计学分析。所有结果为平均值 \pm 标准偏差($X \pm SD$),两个组通过t检验进行比较。多个组通过方差分析(ANOVA)、LSD检验和方差进行比较。假定没有相等的方差,其可通过Games-Howell方法进行修正。 $\alpha=0.05$,针对检验水平; $P<0.05$,针对显著性统计学差异。

[0379] 2.实验结果

[0380] 2.1术后观察、建模的成功率和存活率

[0381] 将缝合线经颈内动脉插入并在90分钟后取出以产生脑缺血/再灌注模型。当大鼠从麻醉状态恢复时,他们表现出以下症状,包括头转向对侧身体、对侧前肢无力、向对侧方向转圈或倾倒、当举起尾部时对侧前肢下垂。在300个MCAO模型中,成功的有210个模型(成功率为70%),不成功的有30个模型(10%)并且60只小鼠死亡(20%),表4。

[0382] 表4.大鼠的建模情况

[0383]	成功	失败	死亡				总计
			SAH	脑水肿	手术	其他	
	210	30	18	24	10	8	300
比率	70%	30%	6%	8%	3%	3%	100%

[0384] 原因分析:22只大鼠未出现肢体功能缺陷,并且8只大鼠表现出轻度瘫痪症状,在24至48小时之后恢复。可能的原因是缝合线深度不够,其导致缝合线侧壁与血管内壁之间出现间隙,并导致血液流入大脑中动脉。第二个原因是在闭合皮肤切口期间取出缝合线,其导致闭塞不够。第三,血管的突变有助于更好地耐受缺血损伤肝,并且神经功能恢复时间较短。TTC染色证明:在MCAO之后,这种大鼠中的基底神经节区中仅出现一些小梗死。在实验期间将不成功的模型排除在外。

[0385] 第四,蛛网膜下出血:由于缝合线过深,缝合线前进的力量过大,血管被缝合线穿刺,这导致蛛网膜下出血。通过实体解剖:18只小鼠(全部死亡小鼠的30%)死于蛛网膜下出血、严重脑梗死:缝合线过深导致严重的脑缺血和梗死。TTC染色显示:24只大鼠(全部死亡大鼠的40%)死于严重的脑水肿,其中整个脑半球水肿。在手术期间气管和迷走神经遭受损伤:迷走神经的损伤导致呼吸道中有大量的分泌物,其导致呼吸缺氧。10只大鼠(全部死亡大鼠的16.7%)死于该原因。

[0386] 无法解释的死亡:大鼠中无法解释的死亡出现在外科手术后的饲养过程中。在死亡之后,我们通过解剖或TTC染色并未发现显著的死因。该组中存在8只大鼠,占全部死亡数的13.3%。

[0387] 2.2神经缺损评分

[0388] 在脑缺血后的14天内,神经功能评分显示假手术组正常,对照组(IR)、IR+Cu、IR+NM、IR+Cu-NM在14天内全部表现出不同程度的神经功能损伤(表5)。但是,IR+Cu-NM组在14天内的神经功能评分显著低于IR组、IR+Cu和IR+NM($P<0.05$);(IR)、IR+Cu、IR+NM组之间没有显著差异(图35)

[0389] 表5 大鼠在术后14天的神经病学评分($\bar{x} \pm s$)

[0390]	组	假手术	IR	IR+Cu	IR+NM	IR+Cu-NM
	NS	0	6.94±0.73	6.56±1.20	6.22±1.17	2.72±0.89 [#]

[0391] [#], $P<0.05$ 相对于IR、IR+Cu、IR+NM

[0392] 2.3脑梗死体积的分析

[0393] 在脑缺血后的14天内,进行TTC染色以测试脑梗死的体积(图36A)。结果显示,假手术组中不存在梗死,但是IR+Cu、IR+NM、IR+Cu-NM全部表现出不同程度的梗死(表6)。IR+Cu-NM组中的脑梗死体积显著小于IR组、IR+Cu和IR+NM组($P<0.05$);(IR)、IR+Cu、IR+NM组之间没有显著差异(图36B)。

[0394] 表6 大鼠脑梗死的体积比较($\bar{x} \pm s$)

	组	假手术	IR	IR+ Cu	IR+NM	IR+ Cu-NM
[0395]	梗死体积 (%)	0	34.14±3.99	30.16±3.96	31.57±3.52	10.81±2.98 [*]

[0396] ^{*}, $P<0.05$ 相对于IR、IR+Cu、IR+NM

[0397] 2.4脑萎缩指数的分析

[0398] 在脑缺血之后,局部脑组织经历液化性坏死和炎性细胞浸润,并且坏死组织逐渐被吸收,最后发生缺血性脑萎缩。结果显示在脑梗死后的14天内脑萎缩明显,经Cu-NM治疗的大鼠中的脑萎缩指数($9.93 \pm 1.89\%$)显著低于IR组(24.22 ± 3.39)、IR+Cu+NM(22.18 ± 2.93)、IR组(22.11 ± 3.52)(表7);并且脑组织中存在较多的毛细血管(图37)。(IR)、IR+Cu、IR+NM组之间没有显著差异。图37A显示,在脑梗死后的14天内脑组织萎缩明显。IR+Cu-NM组中的脑略有萎缩并且出现较多的可见毛细血管。在图37B中:脑萎缩的定量比较显示IR+Cu-NM组显著低于IR组IR+Cu、IR+NM组($P<0.05$)。

[0399] 表7 大鼠脑的萎缩指数($\bar{x} \pm s$)

	组	假手术	IR	IR+ Cu	IR+NM	IR+ Cu-NM
[0400]	萎缩指数 (%)	0	24.22±3.39	22.18±2.93	22.11±3.52	9.93±1.89 [#]

[0401] [#], P<0.05相对于IR、IR+Cu、IR+NM

[0402] 2.5脑部大脑梗死之后的组织病理学形态变化

[0403] 用HE染色对脑组织进行处理并在显微镜下观察:在正常脑组织中神经元数量庞大,细胞核明显;在梗死区内神经元显著减少、细胞排列稀疏且杂乱、存在大范围的细胞坏死、部分细胞自溶、结构模糊、核仁消失、梗死区中的神经元周围具有较多游离的神经纤维泡。

[0404] 2.6血管生成的检测

[0405] 使用血管内皮细胞标志物CD31通过免疫组织化学染色观察血管的数量来检测血管生成。主要对脑缺血的周围区域(缺血边缘区,IBZ)进行观察。图39示出了血管生成检测区,如小方框显示出IBZ。然后,通过血管计数计算每平方mm的血管数。根据结果,在IR+Cu-NM组中脑梗死周围存在大的量的新血管,并且该组中的新血管明显多于其他组(图40)。

[0406] 脑梗死也称为缺血性脑卒中(脑缺血,CI),其由血管狭窄或闭塞导致向脑供血紊乱引起,导致脑组织的相应部分缺血、缺氧和坏死,即软化病,其占总脑卒中的约80%。目前,超早期的溶栓治疗是针对CI以尽快恢复缺血组织的血流的唯一有效治疗。然而,溶栓的治疗时间窗具有严格限制(<3小时)。一些患者的溶栓治疗窗可延长至4.5小时,但是不到5%的溶栓患者可接受安全且有效的治疗。时间窗之后的溶栓治疗将导致缺血/再灌注(IR)的严重缺血/再灌注损伤、增加出血性转化的风险,从而导致疾病甚至更严重。现在,即使已证明多种神经保护性药物在动物模型中有效,但是证实对临床应用几乎没有作用。

[0407] 缺血性脑损伤作为组织损伤信号引发自组织再生和修复机制。但是,在损伤的慢性期中,组织损伤信号的缺乏导致机体的自修复和再生能力显著降低或者丧失,内源性再生被限制从受损脑功能恢复。因此,我们通过外源性介入措施来活化固有的组织再生和修复系统。外源性治疗活化固有的组织再生能力并且促进神经血管生成和再生。神经和血管再生的组合促进神经功能的恢复。

[0408] 血管生成在脑缺血之后的神经功能恢复中发挥重要作用。新生的周围主要位于梗死区,缺血半暗带(缺血半影区,IP)中。受侧支循环的影响,缺血半暗带峡部提供一定程度的补偿性血流。如果没有任何治疗的话,细胞中将发生缺血半暗带的死亡。因此,外源性介入通过刺激毛细血管沿缺血区周围生长并形成侧支循环来促进缺血半暗带中的血管生成以挽救受损的神经细胞。最后,发生缺血区的血管生成,从而导致神经功能得以恢复。

[0409] 铜是调节缺氧诱导因子1(缺氧可诱导因子1,HIF-1)的活性的重要部分。铜可通过转录复合物HIF-1来活化HIF-1并促进VEGF、血管生成素-1以及其他因子的表达以促进血管生成。在缺血的心肌组织中补充铜可有效地恢复微循环的血液供应,最终实现心肌组织的再生和神经功能的恢复。

[0410] 由于过量的铜可导致氧化应激并对机体产生严重的副作用,因此铜可控制的递送系统是铜临床应用的理想工具。理想的铜装载物应富含铜并且在特定的病变部位保留较长

时间。通过铜系统的缓慢释放,固有的组织再生被活化以促进神经功能的改善;并且二价铜应具有良好的生物相容性且不排斥。该实施例将铜离子与纳米材料(纳米生物材料,NM)组合在一起。这种新铜纳米材料(Cu-NM)具有良好的生物相溶性,其可通过将铜离子缓慢释放到缺血区来促进铜的有效吸收从而促进缺血区中的血管生成,并通过改善受损脑组织微循环来增加血液供应从而修复患病组织并恢复受损组织功能。

[0411] 这种治疗通过在缺血/再灌注后的第7天向大鼠脑室中注射铜纳米材料来进行。

[0412] 在14天内,梗死体积和脑萎缩两者均显著降低。神经功能得到明显改善。Cu-NM材料促进脑梗死和周围血管再生,其可有助于神经功能的恢复。在脑缺血损伤后的第1天,脑梗死尺寸和神经功能评分最严重,然后梗死尺寸逐渐减小,大鼠功能障碍也逐渐得到改善。直至到第14天,梗死尺寸几乎没有变化。在持续的缺血/再灌注损伤下,固有修复系统被抑制。然而,这种治疗活化机体的固有修复系统以动员干细胞,干细胞被募集到梗死区并且最终转化为成熟细胞并替代坏死细胞。该实施例提供了由铜补充驱动的组织固有修复功能的强有力证据。

[0413] 铜通过HIF-1调节来控制多种血管生长因子例如VEGF的表达。这些因子负责血管生成。结果显示:在脑梗死区周围,毛细血管密度显著增加。单独的VEGF可促进新血管形成,但是还需要多种因子的参与以使血管成熟。铜不仅诱导新血管形成,而且还促进新血管的成熟。这些多重作用比简单的VEGF更有效。该实施例表明,铜促进梗死周围血管的再生并改善神经功能的恢复。

[0414] 该实施例表明,铜治疗明显减轻脑萎缩。在脑梗死之后,梗死区中发生神经元和神经胶质细胞坏死和萎缩,但是铜治疗可部分地逆转脑萎缩。研究表明,梗死脑能够在脑损伤后再生。在中枢神经系统中,神经细胞的再生发生在两个特定区域中:室管膜下区(脑室下区,SVZ)和颗粒区的海马齿状回(亚粒状区,SGZ)。在生理条件下,神经细胞来源于SVZ区并且沿嘴侧迁移流(嘴侧迁移流,RMS)向嗅球迁移以用于补充神经细胞的凋亡。然而,在脑缺血的情况下,SVZ区的神经再生显著增加;新神经细胞将常规的RMS迁移途径改向损伤区,并增强周围组织的恢复。这些研究表明,中枢神经系统通过神经细胞增殖和细胞向病变区归巢来对损伤作出应答。因此,铜可负责促进神经再生。由于神经再生依赖于血管再生的基础,两种效应均促进神经功能的恢复。铜可促进多种血管生长因子的表达,并且这些因子还对神经再生具有重要作用。体内和体外研究证实,VEGF增加小鼠脑缺血SVZ区中细胞增殖标志物BrdU的表达,这表明VEGF通过数种神经营养因子来发挥神经再生的作用。

[0415] 实施例4. 通过铜材料对恒河猴脑梗死进行治疗

[0416] 该实施例使用9只恒河猴:4只在未治疗组中并且5只在铜治疗组中。

[0417] 1. 恒河猴脑梗死模型的建立

[0418] 在外科手术之前禁食8小时,并使所有的对象接受10mg/kg氯胺酮和0.2mg/kg咪达唑仑的肌肉注射以诱导镇静。在麻醉之后,将动物放在手术台上。将电极附接位点和高频电刀位点的负极板处覆盖脑、肢体的毛发彻底剃去以更好地进行ECG记录和手术。建立静脉通道并在剃去皮肤之后连接监测器。在外科手术期间进行标准的非侵入性测量,包括心率、血压、氧饱、二氧化碳分压和温度。然后,使对象接受维库溴铵的肌肉注射以进行气管插管。借助喉镜,将3.5-4.5气管导管插入气管中。必须确定气管导管的位置,使得其在气管中而非在食管中。调整呼吸机的参数,采用压力控制模式, $P=12$ 至20mmHg、呼吸频率40/分钟、潮气

量10至15ml/kg、二氧化碳分压30至40mmHg。通过吸入异氟醚(0%至1.5%)、经静脉微注射芬太尼(2μg/kg)、维库溴铵(0.05mg/kg)来维持麻醉状态。在满意的情况下,将动物放在手术台上,将头部以向上15°固定在固定器上以使右额颞暴露。通过碘附将手术区灭菌,放置无菌巾。额颞的开颅以右颧弓开始,并在中线处结束。

[0419] 手术操作包括切下皮肤、皮下组织和颞肌,使额颞颅骨暴露。用磨钻对额颞颅骨进行钻孔以产生微孔,并且通过咬骨钳形成3x5cm的骨窗口。将固定在颞肌上的硬脑膜切开以使颞叶暴露。通过棉网(cotton fleexe)覆盖脑组织以降低对其的损伤。谨慎地通过脑压板使额叶和鞍区的底部暴露。当可看到视神经时,应通过剥离器将蛛网膜分离,从而释放脑脊液以降低脑组织的压力。一旦脑组织沉降,就应通过自动牵开器将额叶颞叶推向旁边以使手术空间暴露。当颈内动脉从近端向远端暴露时,在ICA的交叉处看到两个动脉分支,包括大脑中动脉(MCA)和大脑前动脉(ACA)。将MCA从近端向远端分离以暴露其第一段(M1段)。通过6-0缝合线将MCA的发病段结扎,并通过双极将长度为5mm的M1段电凝固。切下电凝固的段以阻断MCA的血液循环。通过常规盐水清洗手术区,缝合硬膜、肌肉和皮肤。在将伤口灭菌之后,用经灭菌的敷料将其覆盖。

[0420] 术后护理包括:在麻醉之后用电热毯维持体温、使呼吸道保持畅通、当吞咽反射恢复时拔出气管导管。将动物放回饲养室,直至其可翻转或起立。使用100mg曲马多通过肌肉注射来缓解疼痛,并使用2mg格拉司琼通过相同的方式来防止恶心和呕吐。不管手术区是否已发生综合征或其他异常,确保在手术后每天观察动物1至2次。

[0421] 2. 恒河猴脑梗死模型的神经功能评分

[0422] 神经功能评分主要采用非人灵长类动物卒中评级量表(非人灵长类动物卒中量表,NHPSS)(表8)和修订的猴脑卒中评级量表(针对猴卒中的改良的神经病学评分量表,mNSS)(表9),以用于在很多方面(例如意识、肌肉和神经反射、平衡)对恒河猴脑神经功能进行综合性评价。神经功能评分越高表示神经功能越差。

[0423] 表8 非人灵长类动物卒中量表,NHPSS

[0424]	1. 意识状态 (0-2)
	0-正常
	1-冷漠性嗜睡
	2-无意识
	2. 防御反应 (0-2)
	0-正常
	1-减弱
	2-无
	3. 抓握反射 (右/左) (0-1X2): 0-存在; 1-不存在
	4. 肢体运动 (上端/下端, 右/左) (0-4x4)
	0-正常

- 1-观察到不对称使用或强度
2-明确的明显乏力
3-最小运动，显著乏力
4-对刺激的响应，不愿使用和不使用
5. 步态 (0-3)
0-正常；1-跛行
2-严重受损；3-不能行走（但是可爬行）
6. 转圈 (0-2)
0-正常表现
1-明显偏好向一侧转
2-不断旋转
7. 运动迟缓 (0-2)
0-无；1-轻度；2-重度
8. 平衡 (0-2)
0-正常
1-轻度受损
2-显著受损，不能站立
- [0425] 9. 忽视（右/左） (0-2x2)
0-无忽视
1-当提供同时刺激时一侧的刺激消退
2-完全忽视所有的刺激、视觉、听觉和触觉
10. 视野缺损/偏盲（右/左） (0-1x2)
0-无
1-在受影响的视野中对视觉刺激无响应。与忽视的区别之处在于不存在眨眼反射（与皮质病变无差别，但是将光损伤或光辐射损伤诊断为与皮质问题相对）
11. 面部虚弱（右/左） (0-2x2)
0-不虚弱
1-轻度
2-显著（如果中心 7th-不断垂涎，挂在嘴角）

[0426] 表9 针对猴卒中的改良的神经病学评分量表, mNSS

	类别	评分
	意识 (0-8)	
	正常、一贯警惕并且积极	0
	有意识并且积极性最低	1
[0427]	有意识并且逃避	2
	有意识但耐受	3
	嗜睡，用刺激能唤醒	4
	昏睡，通过强烈刺激能睁开眼	5
	木僵，通过持续刺激能唤醒	6

	轻度昏迷, 仅具有反射运动	7
	深度昏迷, 不能运动	8
	运动系统 (同侧/对侧) (0-14x2)	
	1. 手 (运动量/移动, 同侧/对侧)	
	正常	0
	不对称使用-有利于相对肢体 (能够用受影响的手抓握笼把)	1
	轻度轻偏瘫 (能够举起受影响的手)	2
	中度轻偏瘫 (明确的明显乏力, 仅能够支持身体)	3
	重度轻偏瘫 (最小运动, 显著乏力)	4
	对刺激的响应: 不愿使用且不运动	5
	2. 腿 (运动量/移动, 同侧/对侧)	
	正常	0
	最轻跛行 (能够用受影响的腿行走和跳动)	1
	轻度轻偏瘫 (能够用受影响的腿站立)	2
	中度轻偏瘫 (举起时膝部弯曲, 对抗重力)	3
	重度轻偏瘫 (可运动, 但不能对抗重力)	4
	完全瘫痪并且不能使用	5
	3. 面部虚弱 (运动量/移动, 同侧/对侧)	
	正常	0
	轻度虚弱	1
	显著虚弱	2
[0428]	4. 抓握反射 (同侧/对侧- 0-1 x2)	
	存在	0
	减弱	1
	不存在	2
	感觉系统 (同侧/对侧) (0-4x2)	
	1. 面部感觉	
	对触碰面部任意区域中作出一致反应	0
	不存在, 对触碰面部任意区域中无反应	1
	2. 耳廓反射	
	响应于外毛/内毛刺激, 耳朵抽动	0
	不存在, 响应于触碰不移动耳朵	1
	3. 疼痛反射	
	强烈、快速、完全脱离捏脚趾	0
	无力、缓慢、不完全或不一致地脱离捏脚趾	1
	不存在, 不脱离捏脚趾	2
	骨骼肌协调 (0-6)	
	正常, 正常行走	0
	协调性最低, 行走时有一定程度的步态损伤	1
	不协调, 但能够爬铁丝网	2
	独立站立, 在几步内倒下	3
	坐, 仅能够转圈	4
	呈侧面或背部斜靠的姿势	5
	不能运动	6

	视野缺损/偏盲 (同侧/对侧) (0-2x2)	
	正常	0
	偏盲 (1/2 视野失明)	1
	全盲	2
[0429]	颊囊障碍 (同侧/对侧) (0-3x2)	
	不存在	0
	存在	
	小 (5cm)	1
	中等 (5-10cm)	2
	大 (>10cm)	3

[0430] 总计:60分

[0431] 3. 神经病学评分结果

[0432] 脑梗死在脑缺血后7天内已形成,通过注射载铜纳米材料治疗,进行术后神经病学评价。发现,铜复合物组中的神经功能障碍显著降低 ($p < 0.05$)。随着时间的推移,神经功能障碍恢复看起来更显著。结果表明,铜复合物在恒河猴脑梗死后可有效地促进神经功能恢复并改善神经功能 (图41,评分越低表示损伤越轻且神经功能越佳)。图41是对恒河猴脑梗死模型中的神经功能障碍程度的评价。与未治疗组相比,结果表明铜复合物的治疗显著改善神经功能。

[0433] 实施例5:铜在分离的大鼠主动脉环中促进血管的生成

[0434] 该实施例证明,VEGF是血管生成所必需的但是铜对血管生成的促进作用不通过增强VEGF的产生来起作用。在器官系统水平的血管生成的铜刺激是VEGF依赖性的,但是培养物中的血管内皮细胞生长的铜刺激是VEGF独立性的。在该实施例中,使用分离的大鼠主动脉环。从Sprague Dawley大鼠 (8至10周) 分离胸主动脉并将其切成厚度为1.0mm的血管环以用于培养。向培养物添加终浓度为5、25、50或100 μ M的硫化铜并维持8天。向一些培养物中添加终浓度为25 μ M的铜螯合剂四乙撑五胺 (TEPA) 以阻断铜的作用。使用抗VEGF抗体来确定VEGF在血管生成的铜促进中的作用。获得的数据显示培养物中的5 μ M铜刺激血管形成;TEPA阻断作用。铜在高于50 μ M的浓度下丧失促血管生成作用。然而,铜在5 μ M下不增强VEGF的产生,但在高于50 μ M的浓度下显著增加VEGF的产生。另一方面,用抗VEGF抗体进行治疗完全阻断5 μ M铜的促血管生成作用。

[0435] 1. 方法

[0436] 1.1分离的大鼠主动脉环和治疗条件

[0437] 从8至10周龄的雄性Sprague Dawley (SD) 大鼠 (292-307g) 取出胸主动脉并立即将其转移至包含冰冷的无血清内皮细胞基础培养基-2 (EBM-2, Lonza Cologne AG) 的培养皿中。用纤细的显微解剖镊子和虹膜切除术剪刀小心地除去主动脉周围的纤维脂肪性组织;特别注意不要损伤主动脉壁。对一毫米长的主动脉环进行切片,并通过用EBM-2进行连续5次洗涤来充分清洗。

[0438] 1.2用于血管生成的测定

[0439] 用100 μ l基质胶 (GFR, BD) 覆盖48孔组织培养级板并使其在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂下胶凝45分钟。将主动脉环放置在经基质胶包被的孔上,用另外的100 μ l基质胶覆盖并使其再在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂下胶凝45分钟。然后,向培养物添加250 μ l含1%胎牛血清 (FBS) 的EBM-2。以5、25、50或100 μ M铜元素的终浓度向培养物添加硫化铜溶液。每2天,移除生长培养基并更换。在第

8天,对主动脉环拍摄照片。

[0440] 1.3图像分析

[0441] 使用Image J软件程序(NIH,Bethesda,MD)计算血管生成出芽的面积。微血管密度平方像素进行报道。

[0442] 1.4 VEGF的Western印迹分析

[0443] 将具有基质胶的大鼠主动脉环在冰上在含有1%无乙二胺四乙酸(EDTA)的完全蛋白酶抑制剂混合物(Roche,Mannhein,DE)的放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液(Beyotime,Jiangsu,CN)中裂解30分钟,之后获得蛋白质提取物。通过使用二喹啉甲酸(BCA)蛋白质测定试剂盒(Thermo,Rockford,USA)预先量化来确保上样量相等的蛋白质。将总裂解物中的适量蛋白质在十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺电泳凝胶中进行解析并转移到聚偏氟乙烯膜(Bio-rad,USA)上。将膜在含有5%脱脂奶粉的Tris-缓冲盐水/Tween 20(TBST)(10mM Tris-HCl,pH 8.0、150mM NaCl和0.1%Tween 20)中封闭1小时,并与经在封闭缓冲液中稀释的第一小鼠抗VEGF抗体(Santa Cruz,CA,USA)和小鼠抗 β 肌动蛋白抗体(ZSGB-BIO,Beijing,CN)一起于4℃下孵育过夜。在用TBST洗涤之后,将膜与经在TBST中稀释的辣根过氧化物酶(HRP)连接的抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)抗体一起在室温下孵育1小时。使用化学发光HRP底物(Millipore,Billerica,USA)来使靶蛋白可视化。

[0444] 1.5 EGF的中和

[0445] 将主动脉环在48孔板中在250 μ l含有终浓度为2ng/ml的抗VEGF抗体(Santa Cruz,CA,USA)的EBM-2(1%FBS)培养基中进行培养。治疗和血管生成测定同上。

[0446] 1.6统计学分析

[0447] 数据获自三个独立的实验并表示为平均值 \pm S.E.M。图42和图44中所示的结果最初通过单向方差分析进行分析,并通过Dunnett T3检验进一步分析以在多个组之间进行比较。将2 \times 2因子设计应用于图43以及图44B和图45中所示的数据。在检测到显著的相互作用之后,进一步确定主要作用的显著性。认为显著性水平为 $P<.05$ 。

[0448] 2.结果

[0449] 2.1铜对分离的大鼠主动脉环的血管生成的作用

[0450] 图42示出了不同浓度的硫化铜对在具有1%FBS之EBM-2中培养的分离主动脉环的血管生成的作用。将硫化铜以0(对照)、5、25、50或100 μ M的铜元素终浓度直接添加至培养物并维持8天。定量数据获自三个独立的实验;每个实验包含针对每个治疗的三份样品,并且数据表示为平均值 \pm S.E.M;*与对照组显著不同($P<.05$) (比例尺=500 μ m)。

[0451] 观察到,5 μ M的铜对血管生成具有最强的促进作用。高于该水平的浓度不仅未表现出促血管生成作用,而且还在高于50 μ M的浓度下显示出显著的抑制效应。

[0452] 在分别添加0、5、25、50或100 μ M铜的培养物中,铜的终浓度(包括培养基、FBS(1%) and 所添加铜的贡献)为26.9、344.4、1614.4、3201.9或6416.9 μ g/L。因此,在不同浓度的添加铜中培养8天之后主动脉环中的铜浓度分别为5.9、26、63、106或162 μ g/g组织,其与培养物中的铜浓度成正比。将铜螯合剂四乙撑五胺(TEPA)作为对照单独添加至培养物或者与最终浓度为25 μ M的铜一起同时添加至培养物,持续8天。通过该治疗,TEPA自身导致血管生成被抑制并且完全抑制5 μ M铜的血管生成促进作用,如图43中所示。将经在具有1%FBS之EBM-2中培养的分离的大鼠主动脉环用5 μ M硫化铜、25 μ M TEPA或两者治疗8天。定量数据获自三个独

立的实验;每个实验包含针对每个治疗的三份样品,并且数据表示为平均值 \pm S.E.M;*与对照组显著不同($P<.05$) (比例尺=500 μ m)。

[0453] 2.2铜对分离的主动脉环中的VEGF产生的作用

[0454] 图44中所示的结果表明,在培养物中为5 μ M时,铜不增加分离的主动脉环中的VEGF产生,但是在导致血管生成抑制之高于50 μ M的浓度下,铜显著增加VEGF的产生。TEPA在25 μ M的终浓度下显著降低经在培养物中用或未用5 μ M铜治疗之分离的大鼠主动脉环中的VEGF水平(图44)。图44示出了对分离的大鼠主动脉环中的VEGF蛋白水平的Western印迹分析。图44A示出了不同浓度的铜对VEGF蛋白水平的影响。该治疗方案与图42中所示的相同。图44B示出了TEPA对VEGF蛋白水平的影响。该治疗方案与图43中所示的相同。所有的定量数据均获自三个独立的实验表示为平均值 \pm S.E.M;*与对照组显著不同($P<.05$)。

[0455] 2.3抗VEGF抗体对血管生成的铜促进的影响

[0456] 图45中所示的结果表明,培养物中终浓度为2-ng/ml的抗VEGF抗体单独时显著抑制血管生成并且其与5 μ M铜的组合完全阻断铜的血管生成促进作用。图45示出了抗VEGF抗体对血管生成的铜促进的影响。将经在具有1%FBS之EBM-2中培养的分的大鼠主动脉环用5 μ M硫化铜、2ng/ml抗VEGF抗体或两者处理8天。定量数据获自三个独立的实验并且表示为平均值 \pm S.E.M;*与对照组显著不同($P<.05$) (比例尺=500 μ m)。

[0457] 然而,单独的抗VEGF抗体或其与5 μ M铜的组合均不影响VEGF的产生(图46)。图46示出了抗VEGF抗体对分离的大鼠主动脉环中的VEGF蛋白水平的影响。应用图45所述的相同处理方案。所有的定量数据均获自三个独立的实验表示为平均值 \pm S.E.M;*与对照组显著不同($P<.05$)。

[0458] 实施例6.对肝损伤的锌补充治疗

[0459] 肝星状细胞在持续的醇、病毒和化学物质刺激之后分泌大量的胶原。肝纤维化和肝损伤的发生是由于细胞外基质过度沉积。由于锌对逆转纤维化具有特定功能,因此该实施例利用靶向锌补充治疗来活化肝组织固有的自修复、动员干细胞(例如,骨髓间充质干细胞)向肝损伤部位归巢、分化为干细胞并使损伤组织再生。靶向锌补充通过超声介导的载锌微泡爆裂来实现以将锌递送至受损肝组织。在靶向锌补充治疗之后,肝纤维化逆转,肝功能得以恢复。

[0460] 进行该实验是为了评价超声介导的载锌微泡爆裂对肝纤维化和脂肪肝疾病的治疗作用。如下诱导肝纤维化的Wister大鼠模型:隔天注射100mg/kg硫代乙酰胺(TAA),直至出现肝纤维化症状。然后,将模型分为两组:治疗组和未治疗组。在治疗组中,以每3天进行超声介导的载锌微泡爆裂治疗。在治疗之后,收集血样以用于进行肝损伤相关标志物、血脂、肝脂质、胶原、抗氧化酶活性和脂质过氧化代谢物检测。根据丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)检测判断肝损伤状况。在肝损伤之后,TNF- α 和IL- β 得以分泌,其进而加速肝损伤。因此,TNF- α 和IL- β 的水平是评估肝损伤程度的指示。另外,还可通过肝组织切片和活检来评价肝纤维化的逆转。

[0461] 进行该实验是为了评价超声介导的载锌微泡爆裂对化学性肝损伤的治疗作用。如下诱导肝损伤的Sprague-Dawley大鼠模型:隔天管饲1mL/kg (40%)四氯化碳(CCL4),直至出现肝损伤状。然后,将模型分为两组:治疗组和未治疗组。在治疗组中,以每3天进行超声介导的载锌微泡爆裂治疗。在治疗之后,收集血样以用于进行肝损伤相关标志物、血脂、肝

脂质、胶原、抗氧化酶活性和脂质过氧化代谢物检测。根据丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 检测判断肝损伤状况。在肝损伤之后, TNF- α 和IL- β 得以分泌, 其进而加速肝损伤。因此, TNF- α 和IL- β 的水平是评估肝损伤程度的指示。另外, 还可通过肝组织切片和活检来评价肝纤维化的逆转。

[0462] 实施例7: 使用超声介导的铜-白蛋白微泡的心脏铜含量的靶向补充

[0463] 1. 方法

[0464] 1.1 铜超声微泡治疗

[0465] 在正常小鼠中进行心肌梗死的超声引导治疗。通过尾静脉输注铜微泡。在每个铜微泡治疗期间, 将超声探针 (Vivid 7, i13L, GE Healthcare Ultrasound) 放置在胸部的心口上, 使得超声波可针对心脏的梗死区。机械指数设置为1.2。在每次注射之后, 通过触发超声能使通过循环系统到达心室的铜微泡爆破。同时, 将超声探针沿心脏的定点和二尖瓣之间的短轴轻轻来回移动。在每次注射的铜微泡爆破之后, 接着进行下一次输注直至完全施用每次治疗的剂量 (0.5mg/kg)。在注射之后, 收集血液样品并收获心脏。

[0466] 1.2 Cu浓度测定

[0467] 将样品新鲜冷冻并在冻干之前储存在-80℃。在冻干和用硝酸消化组织之后, 消化物是无色或浅黄色的, 并且是澄清的, 其中没有可见的沉淀物或残余物。向每个容器中添加超纯水以将HNO₃稀释至2%用于后续分析铜。使用表10中所示的程序通过石墨炉原子吸收分光光度法 (ICE3500, Thermo) 测定铜浓度。

[0468] 表10. 石墨炉原子吸收分光光度法程序

[0469]

温度 (°C)	时间 (秒)	氩气流量 (L/分钟)
90	20	0.2
120	20	0.2
850	20	0.2
2100	3	0
2500	3	0.2

[0470] 2. 结果

[0471] 在注射铜微泡之后, 血液铜浓度显著增加 (图47)。另外, 随着超声探针释放能量, 铜微泡爆破。与没有超声介导的铜微泡的治疗组 (Cu+MB) 相比, 在超声介导的铜微泡治疗组 (Cu+MB超声) 中, 由超声诱导的声孔效应进一步导致在细胞膜和毛细血管中形成瞬时孔, 其极大地有利于铜摄取到心脏组织中 (图48)。

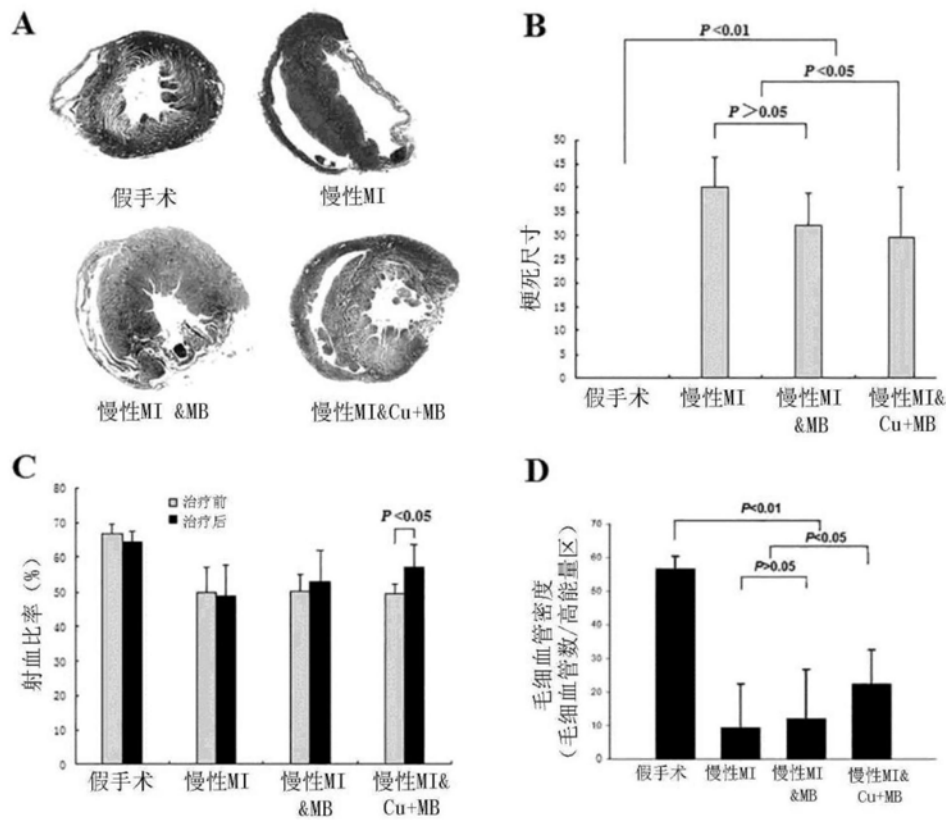


图1

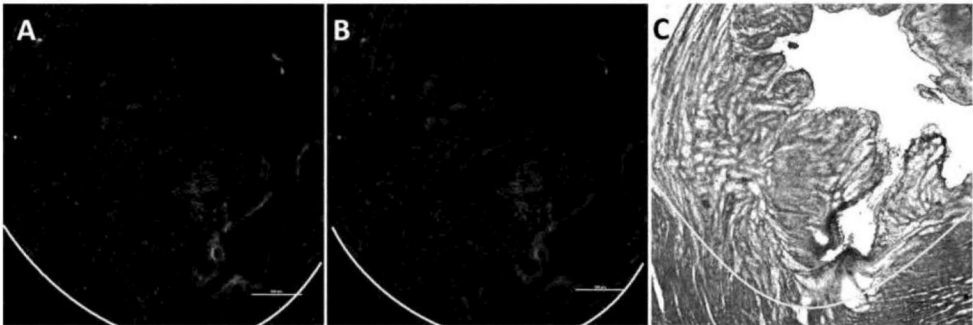


图2

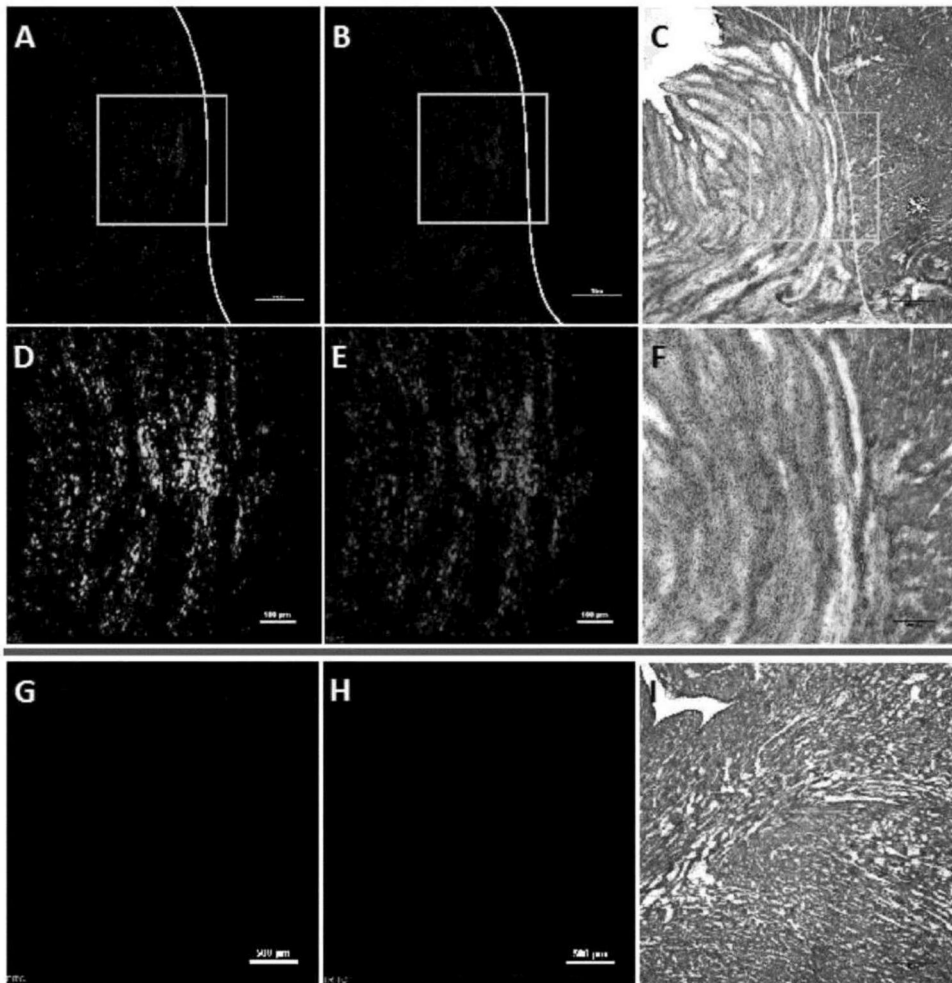


图3

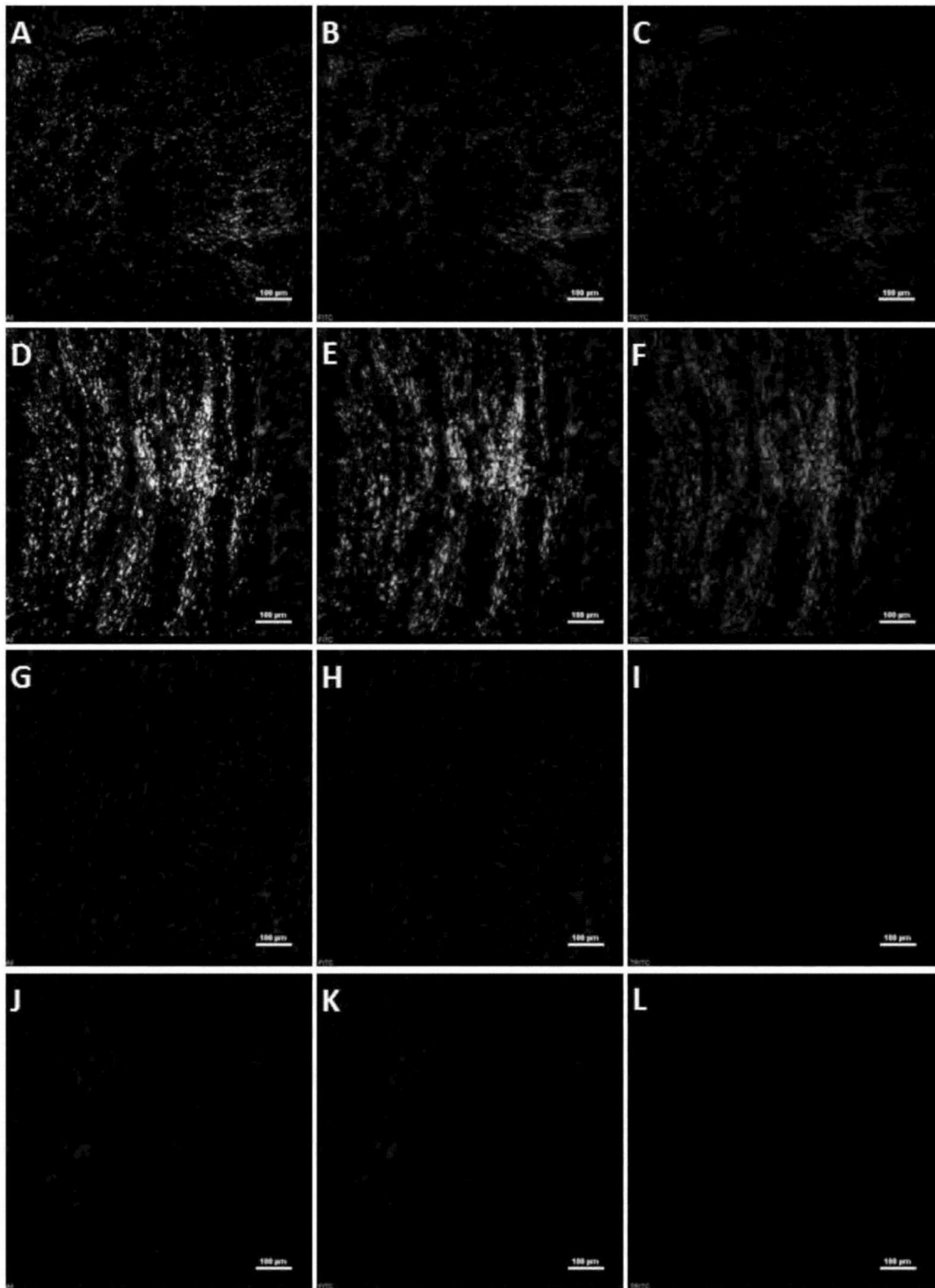


图4

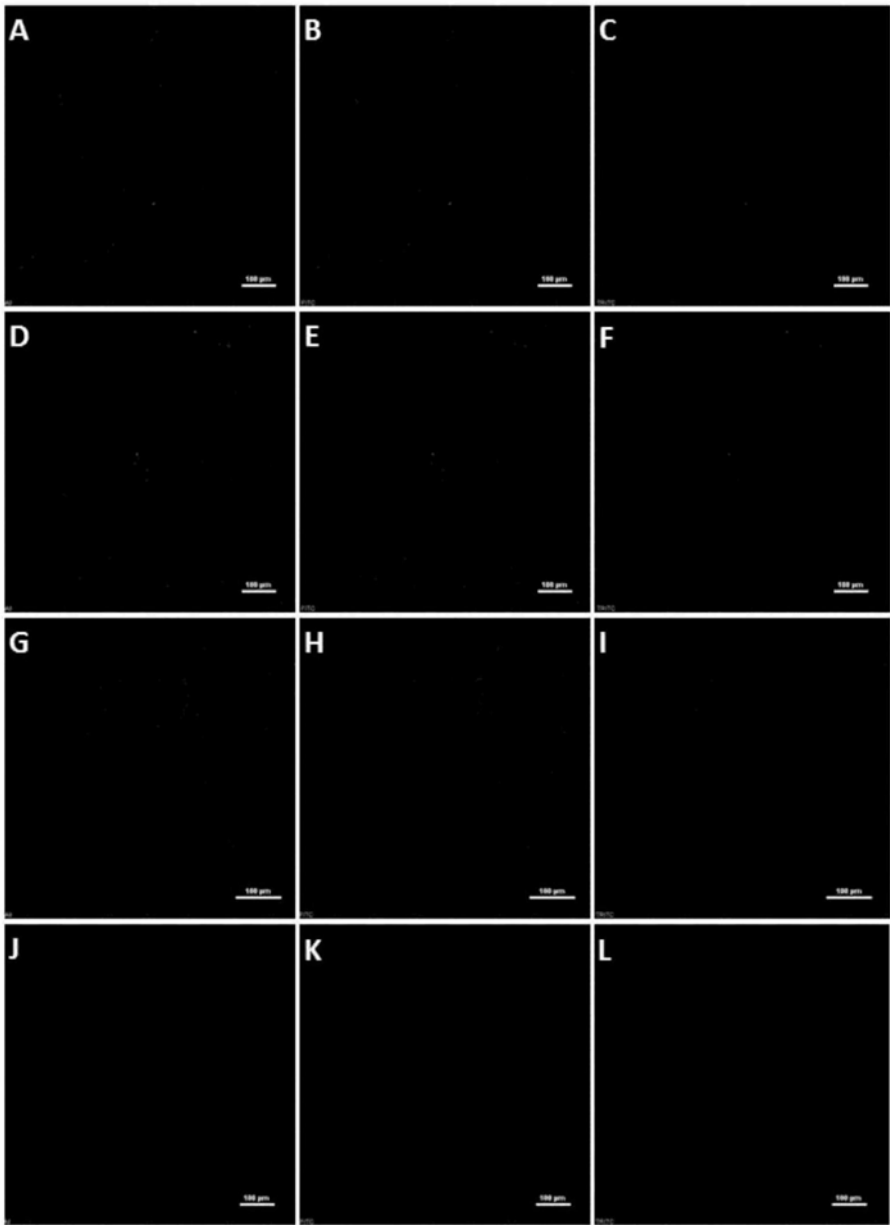


图5

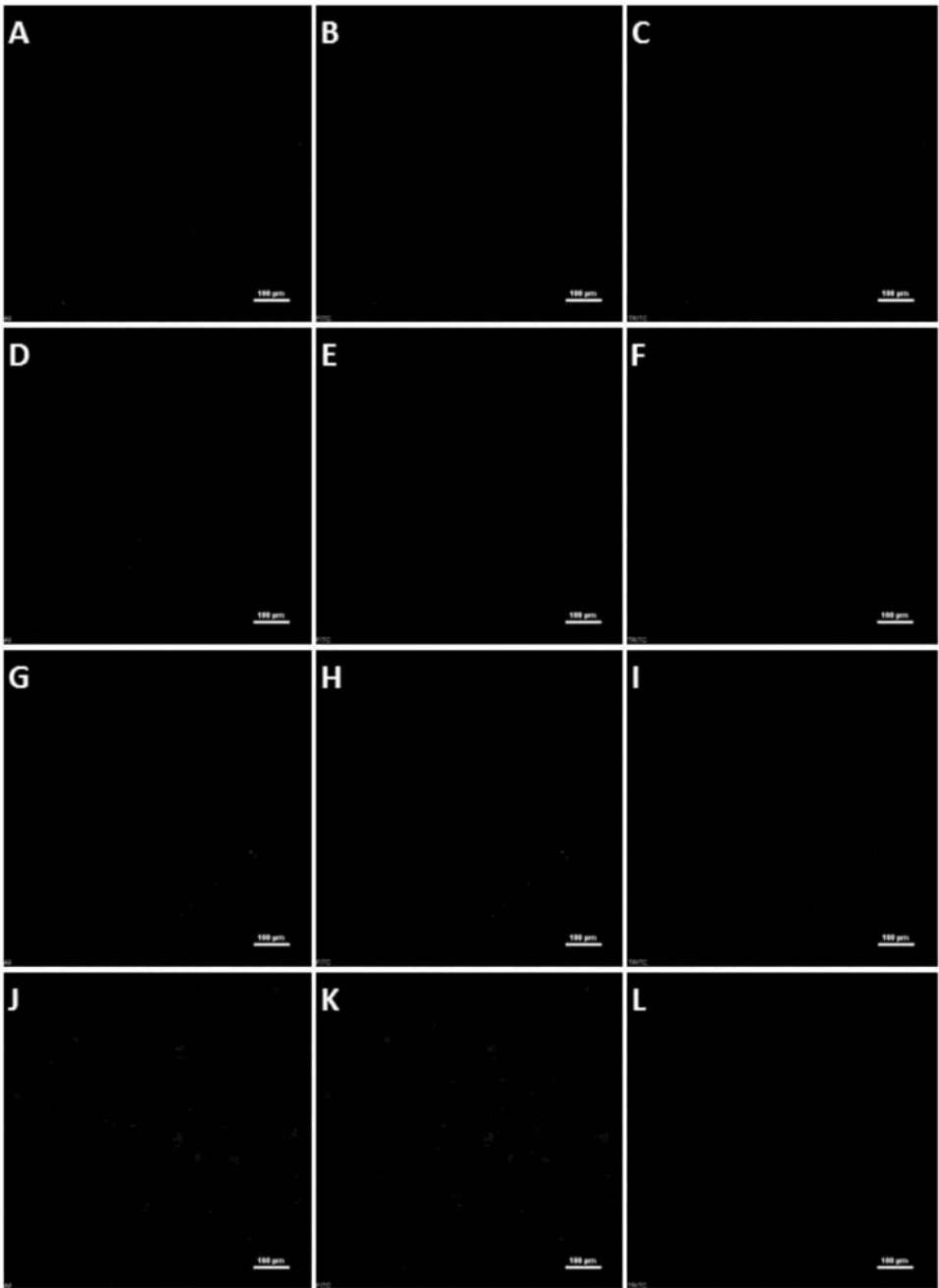


图6

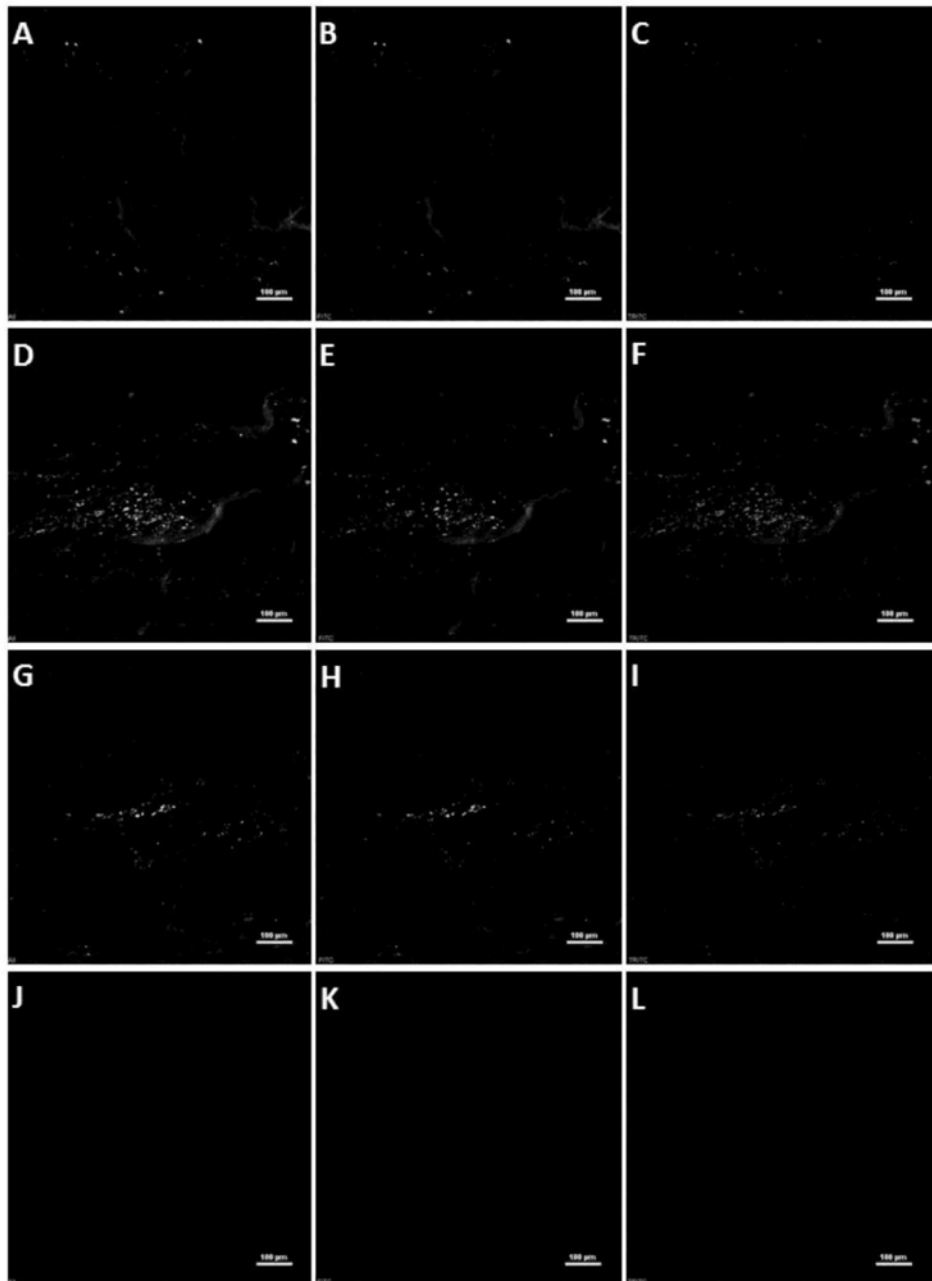


图7

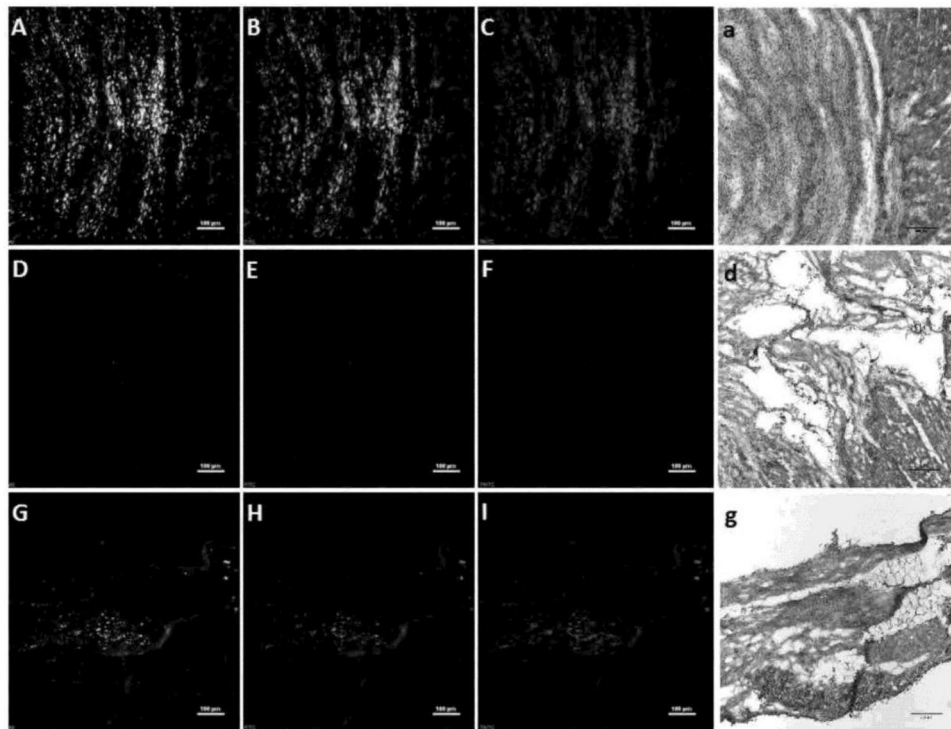


图8

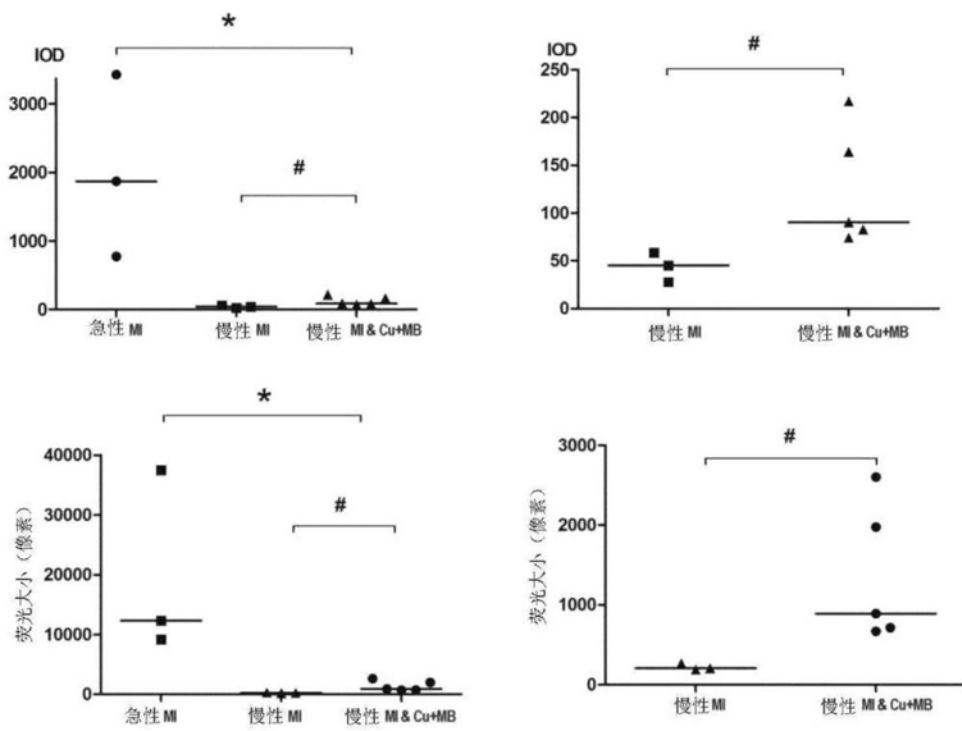


图9

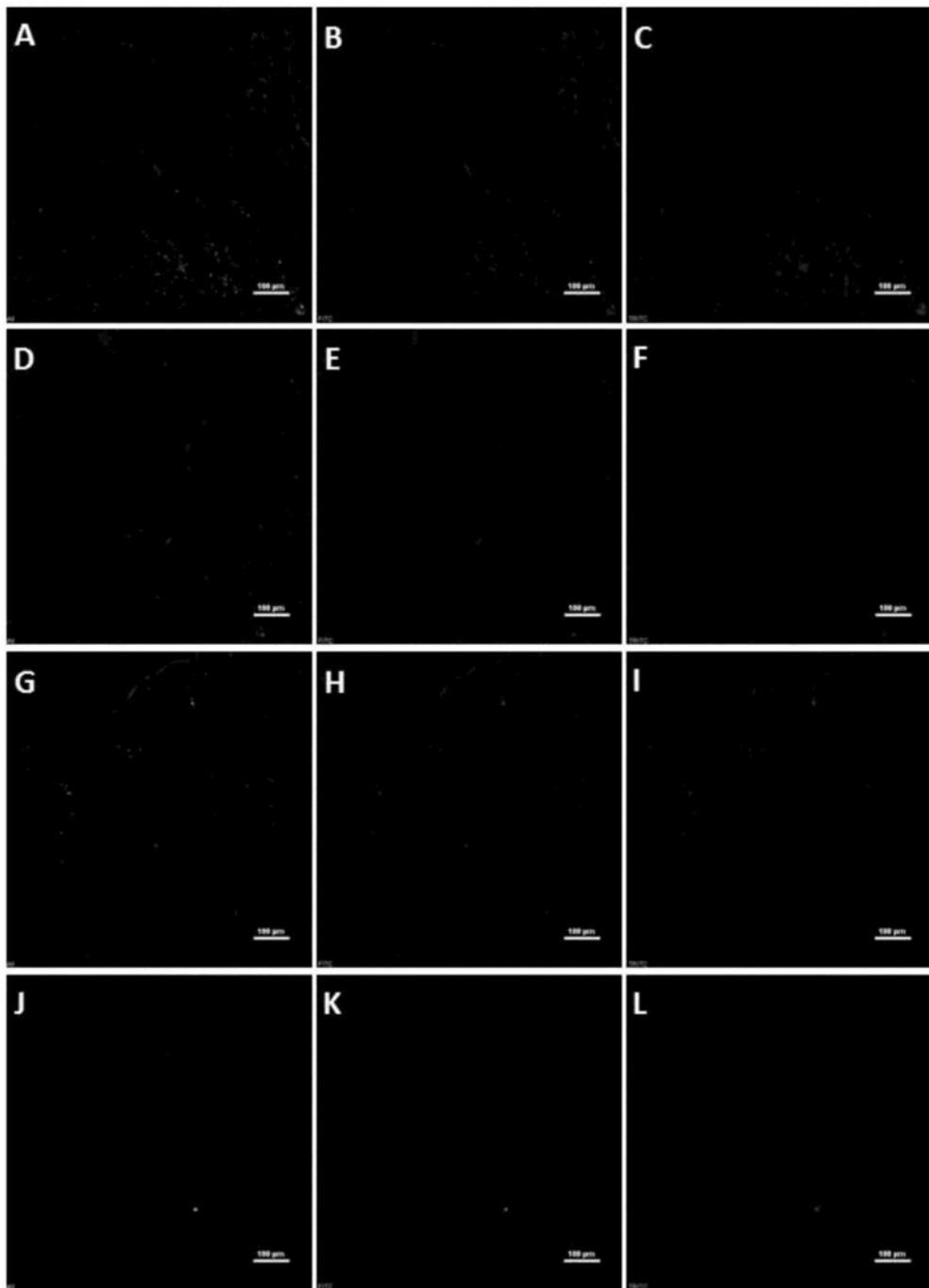


图10

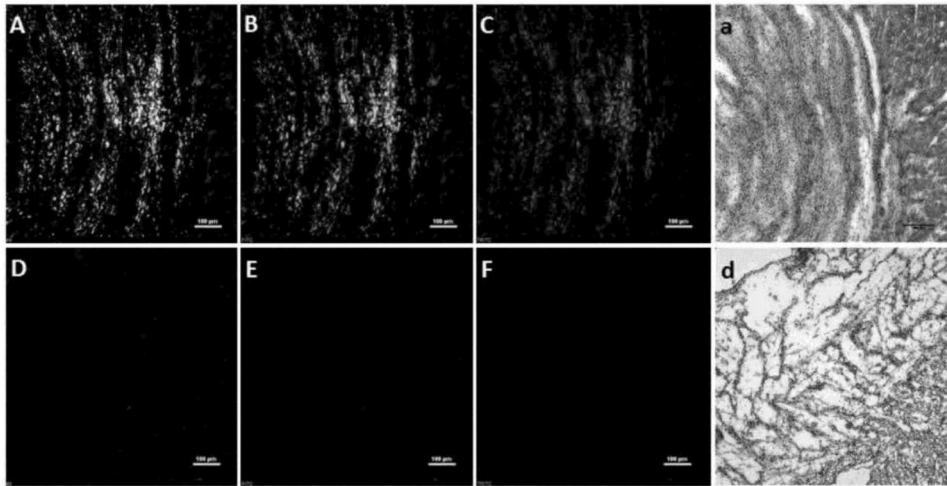


图11

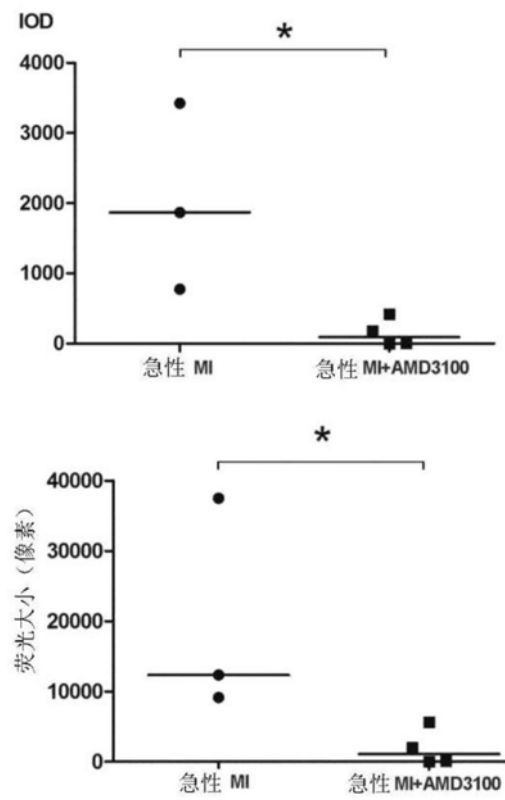


图12

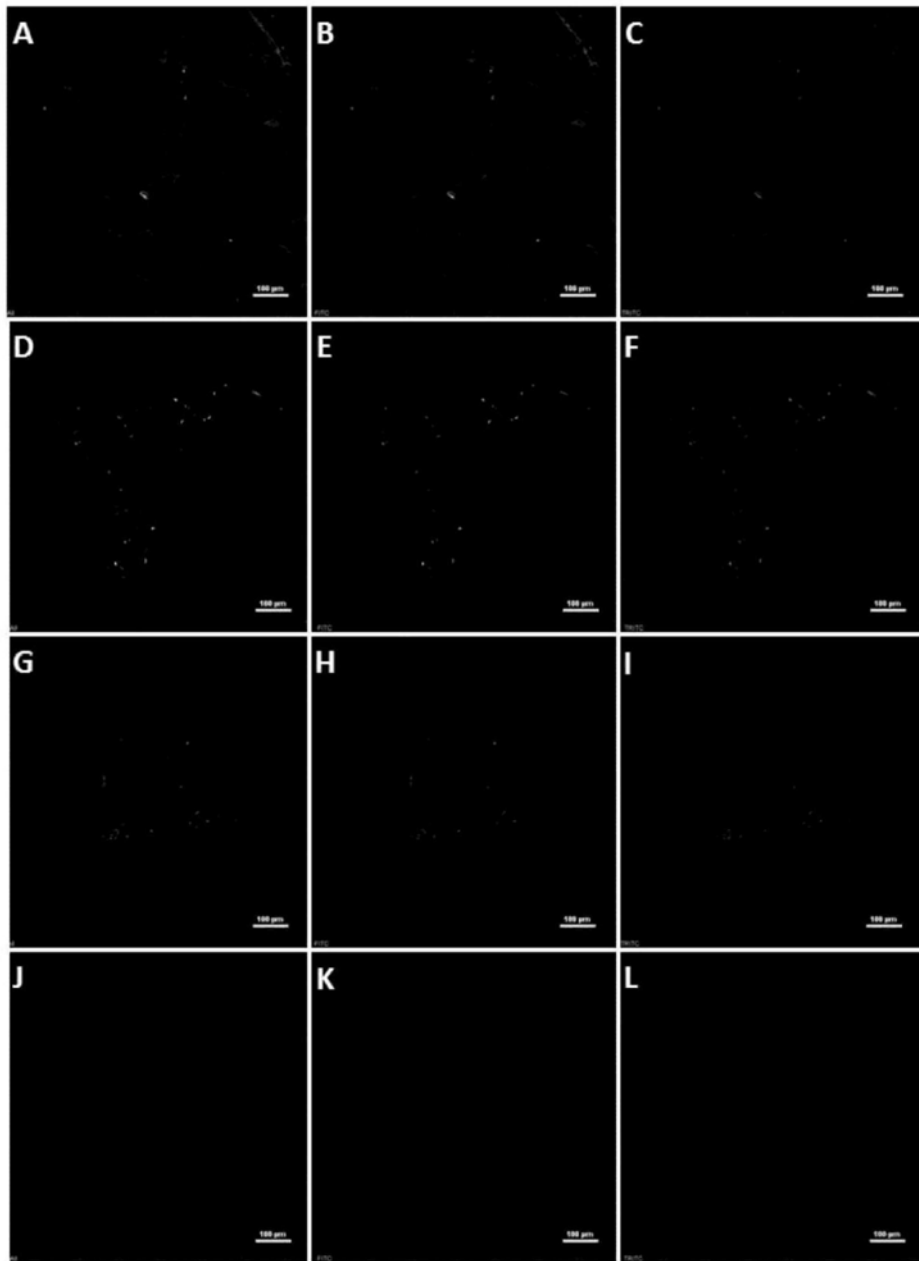


图13

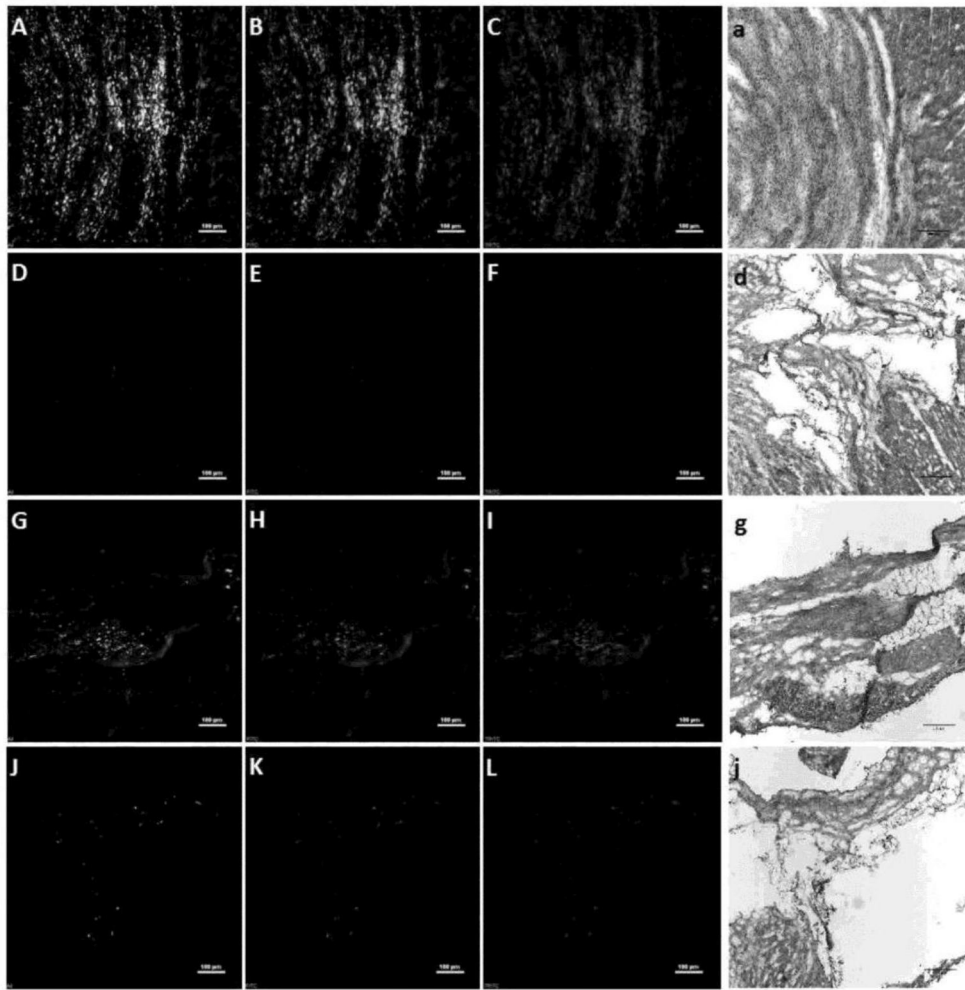


图14

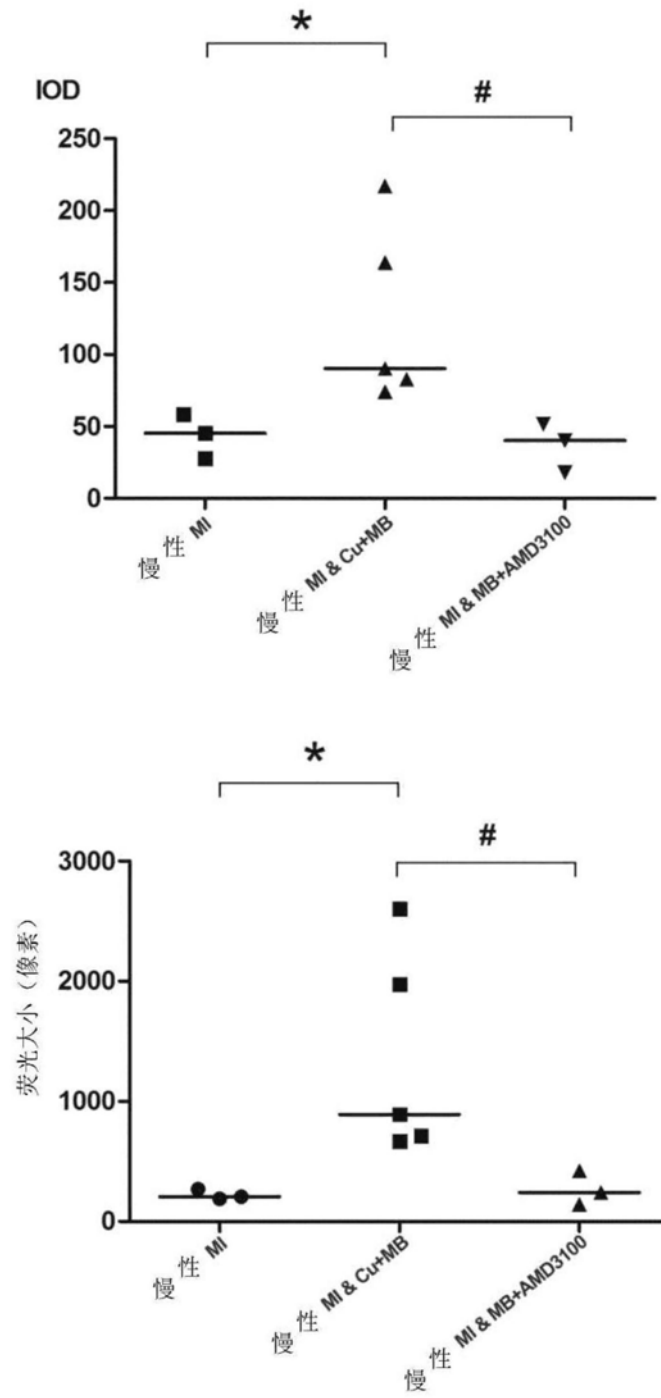


图15

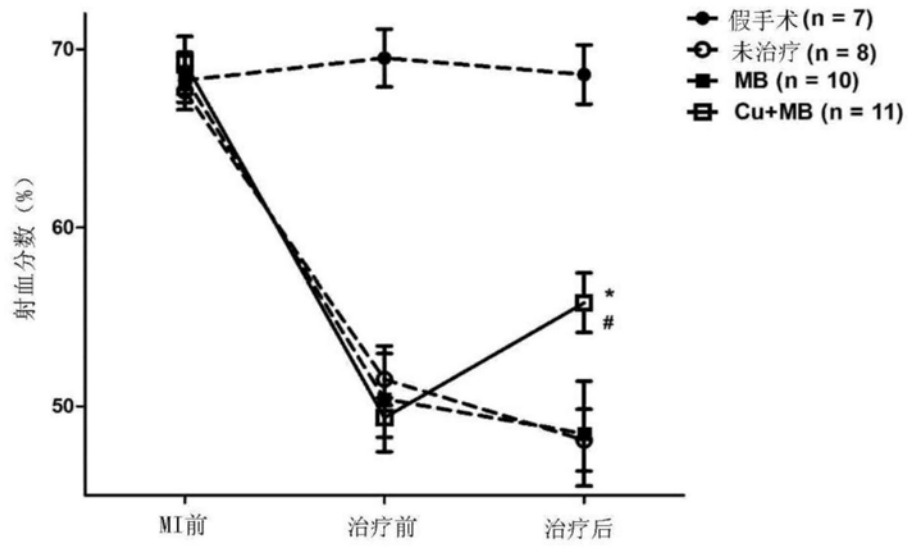


图16A

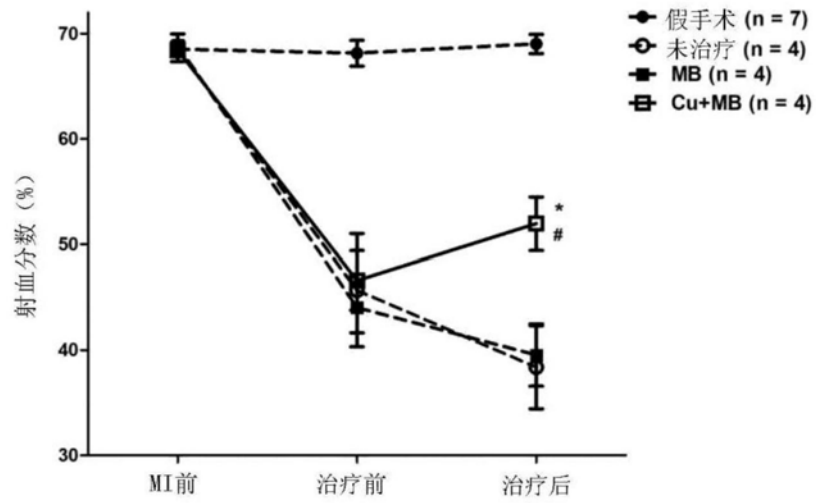


图16B

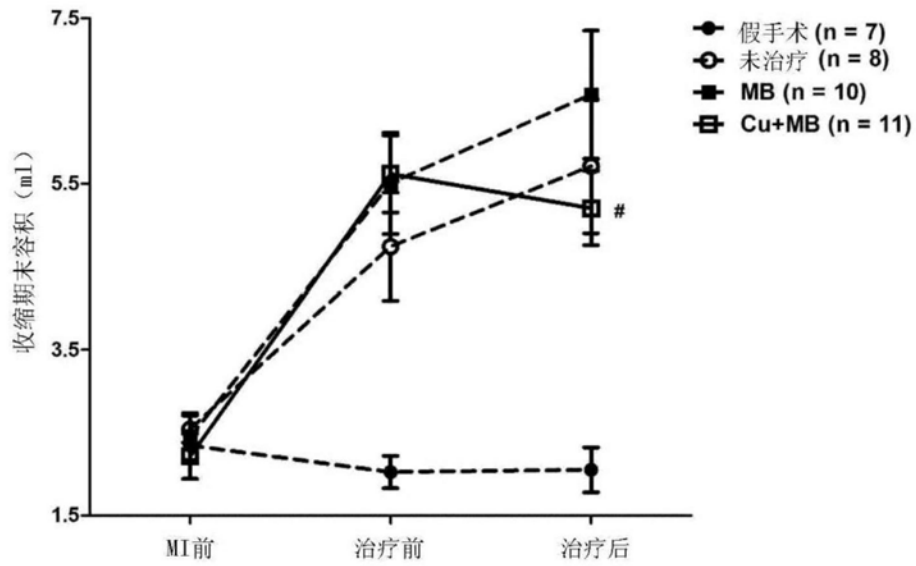


图17

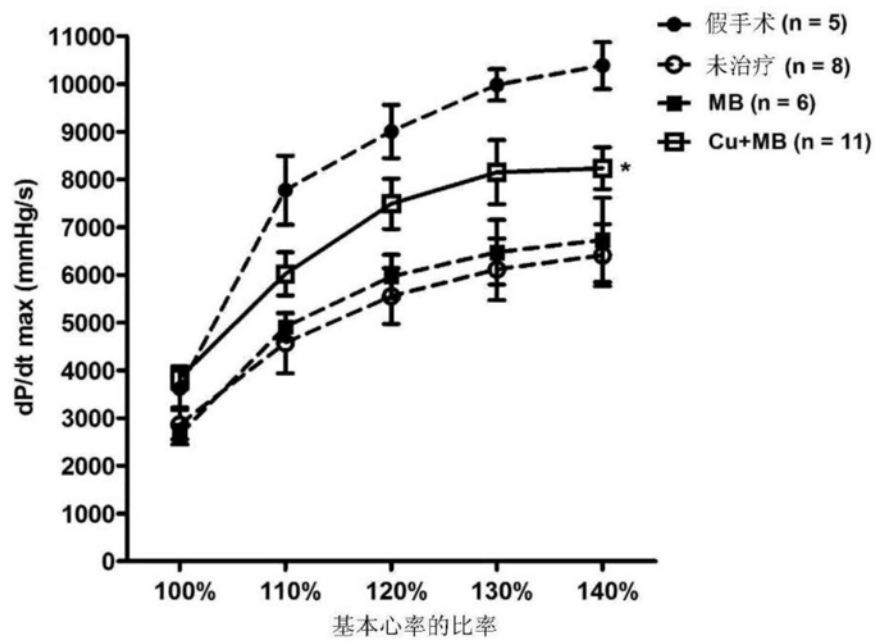


图18A

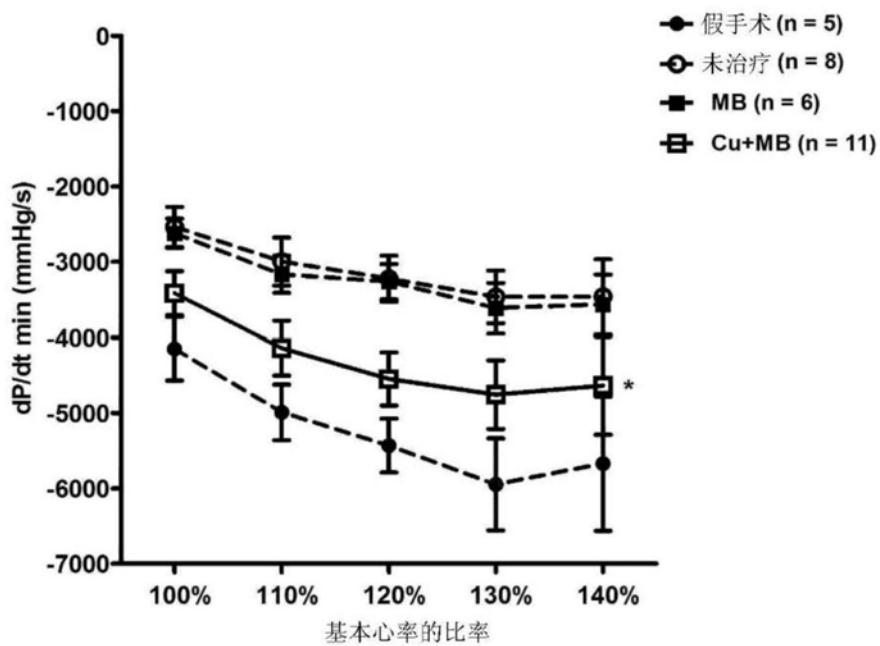


图18B

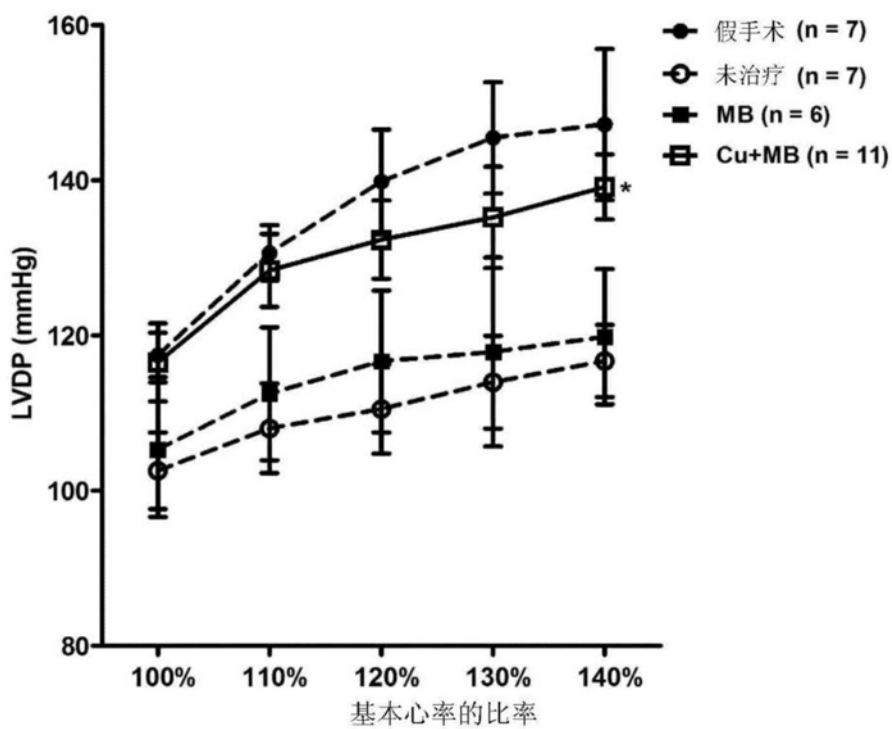


图19

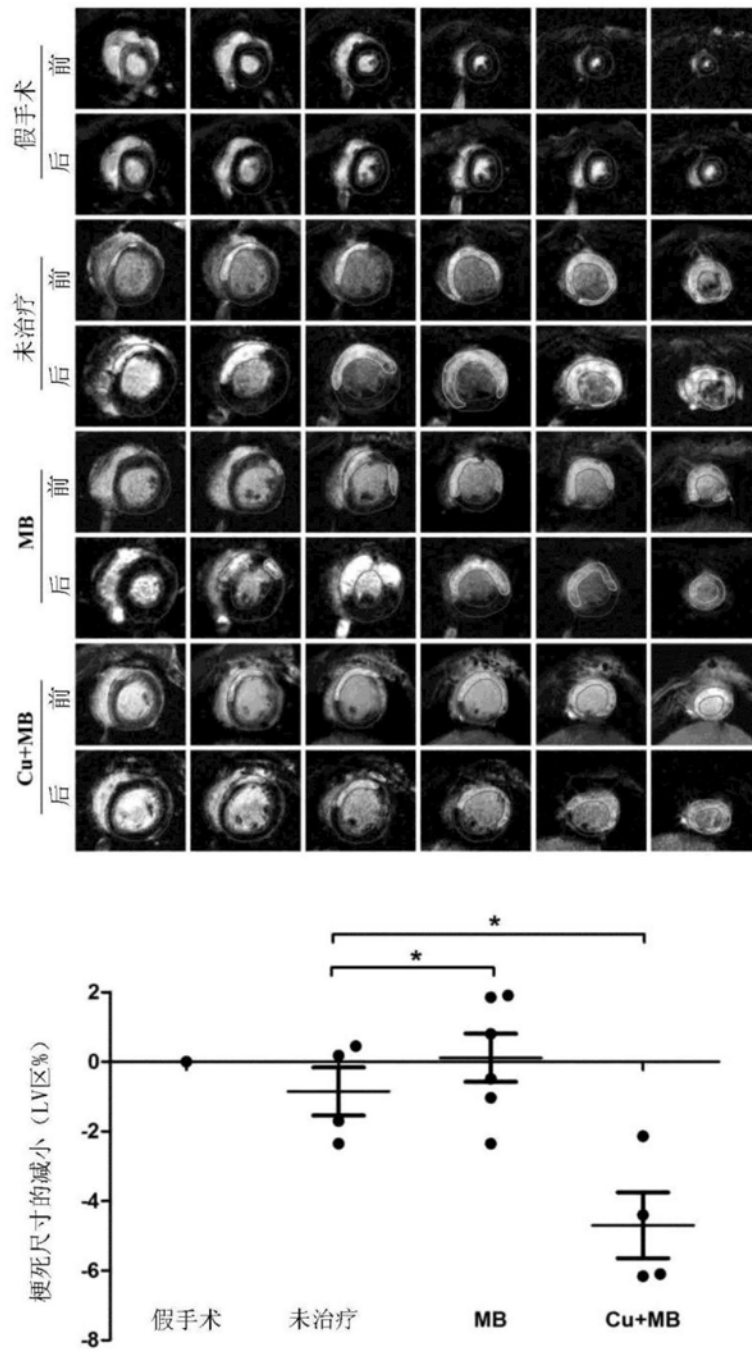


图20

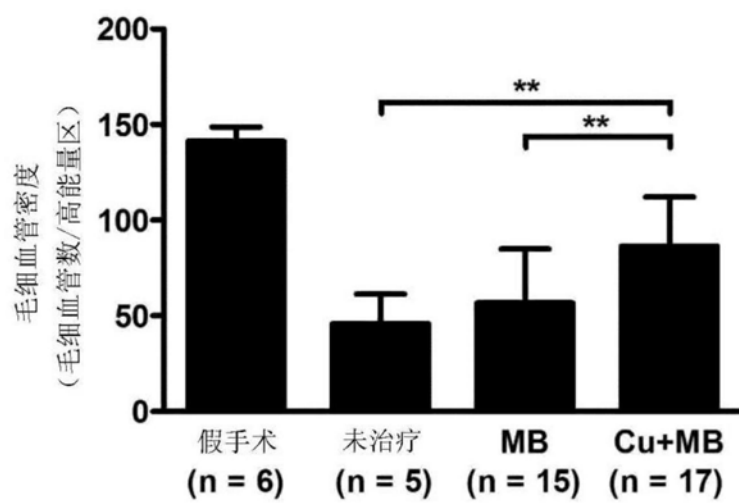
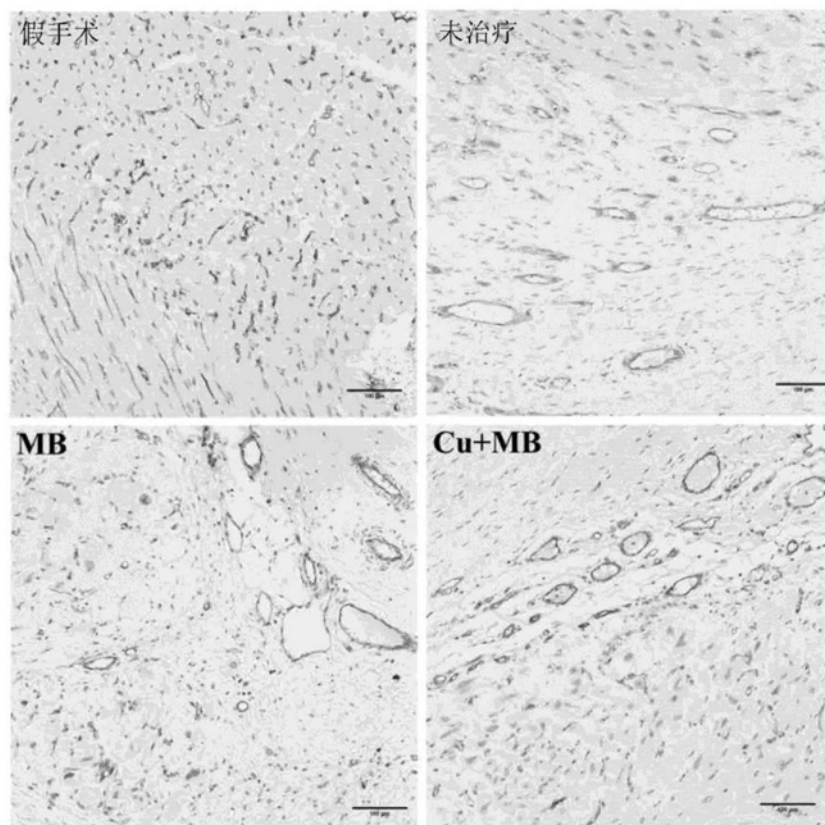


图21

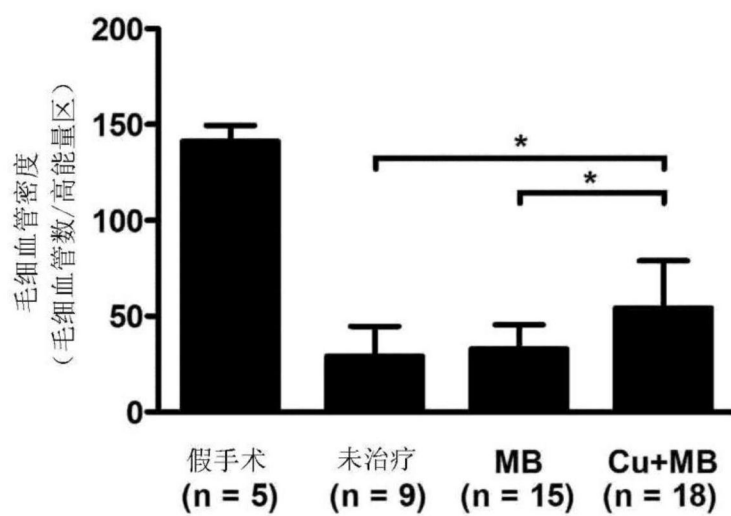
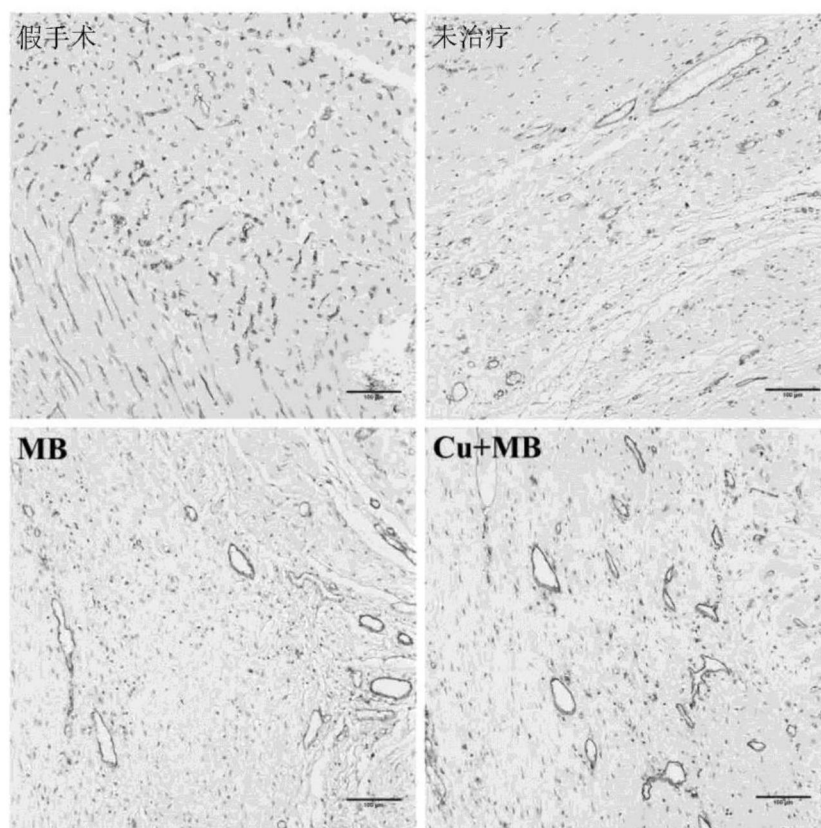


图22

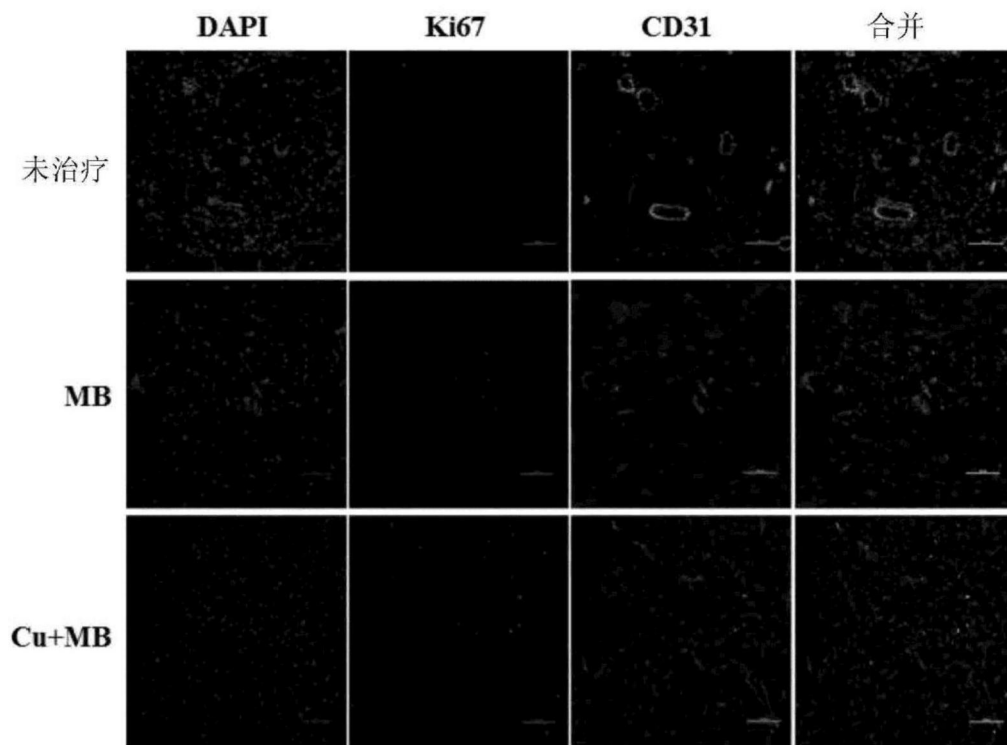


图23

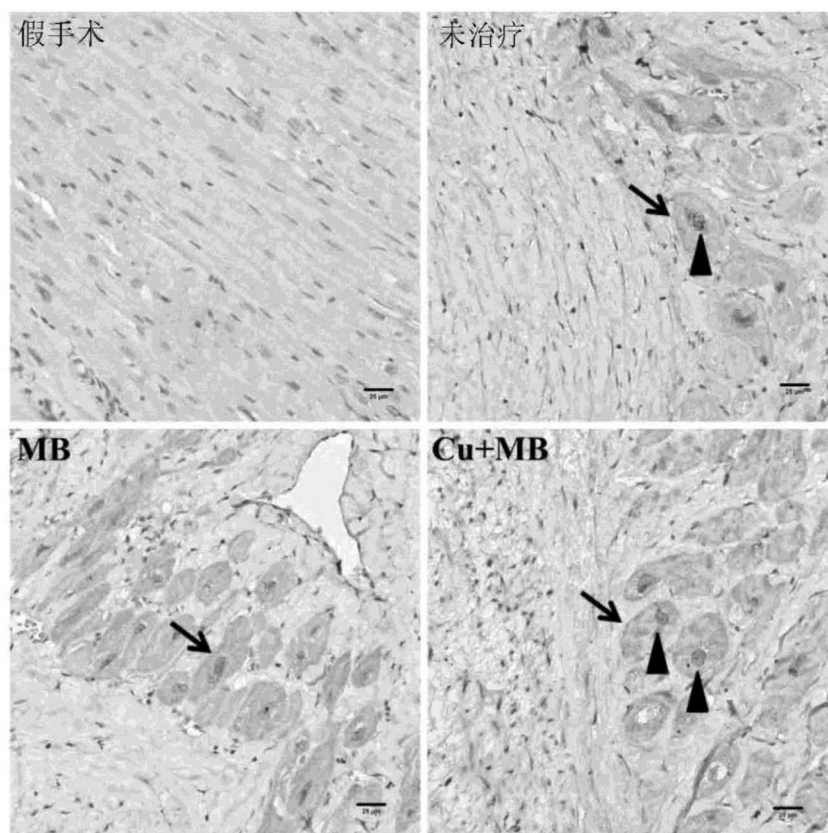


图24

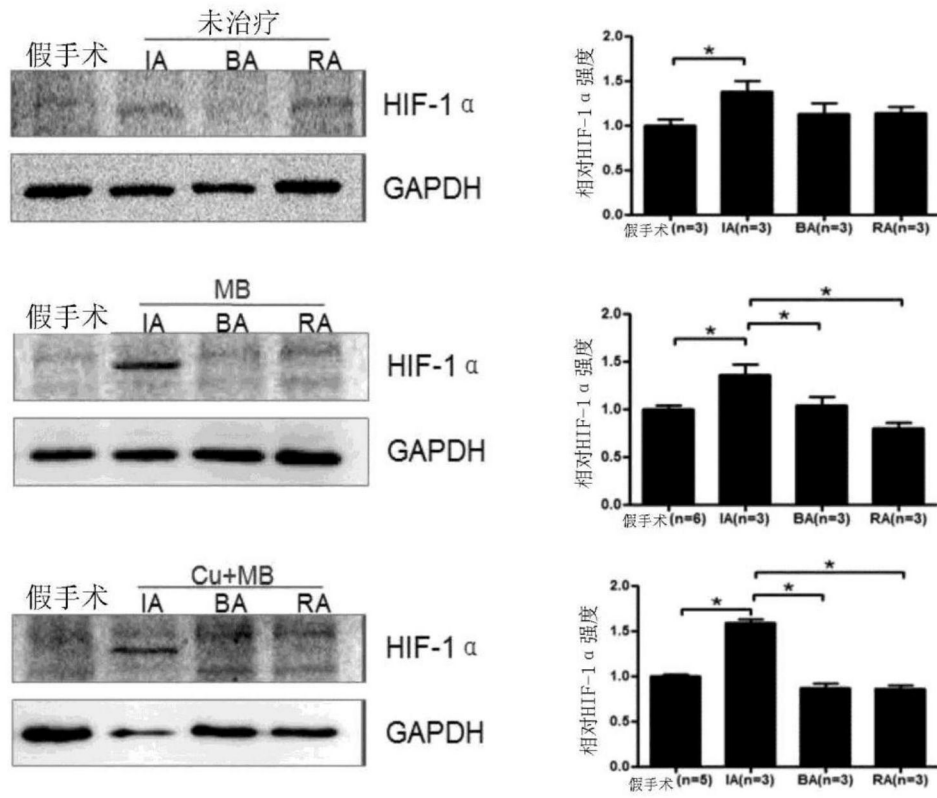


图25

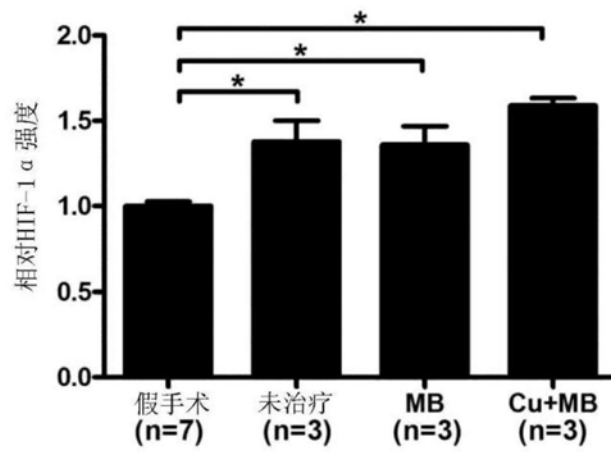


图26

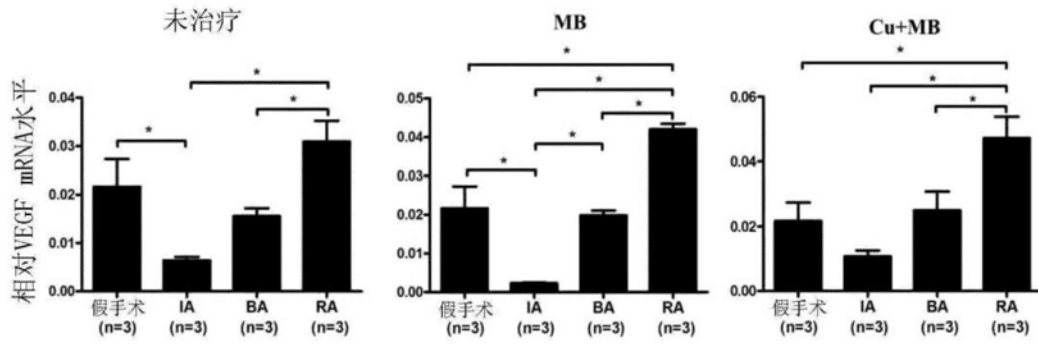


图27

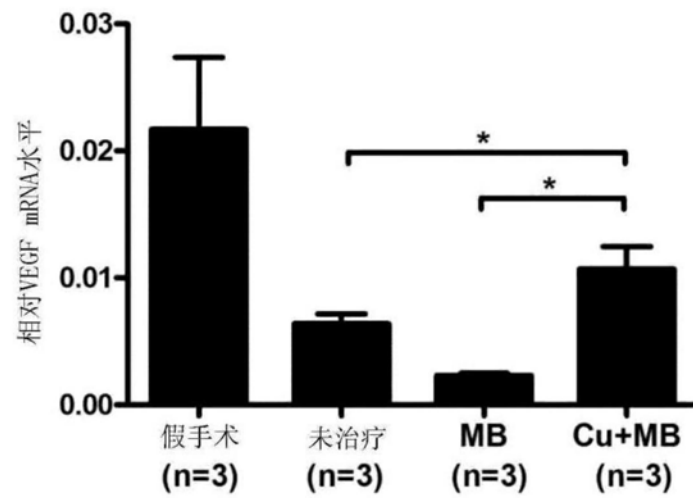


图28

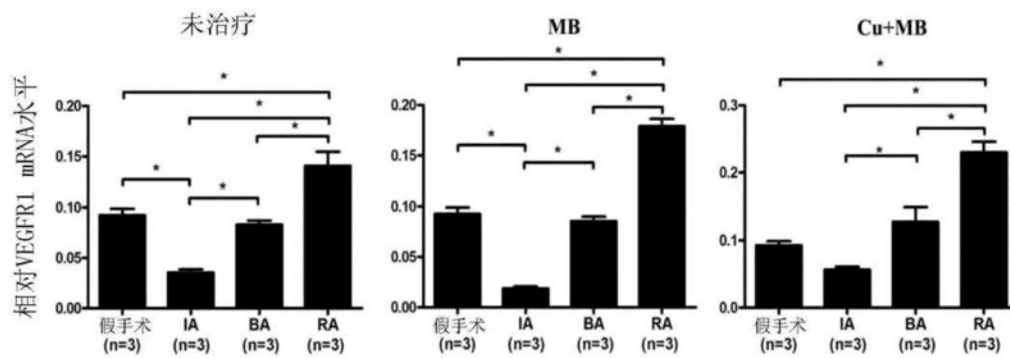


图29

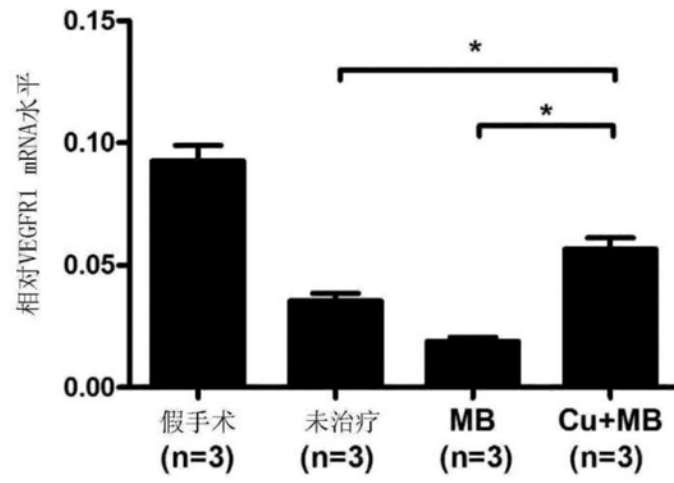


图30

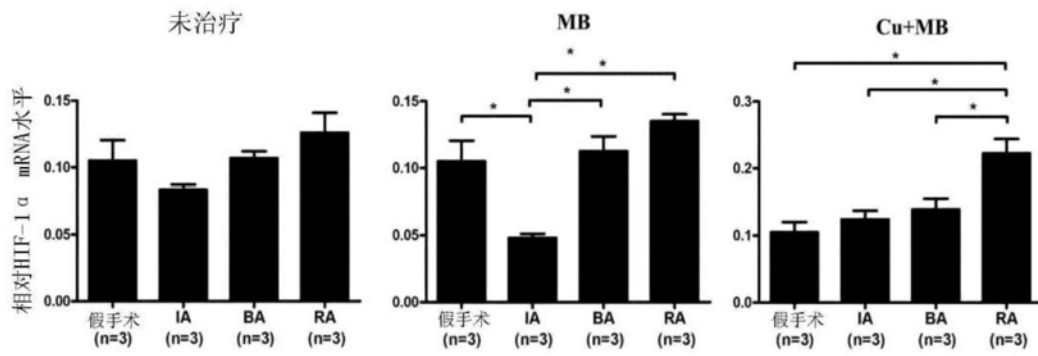


图31

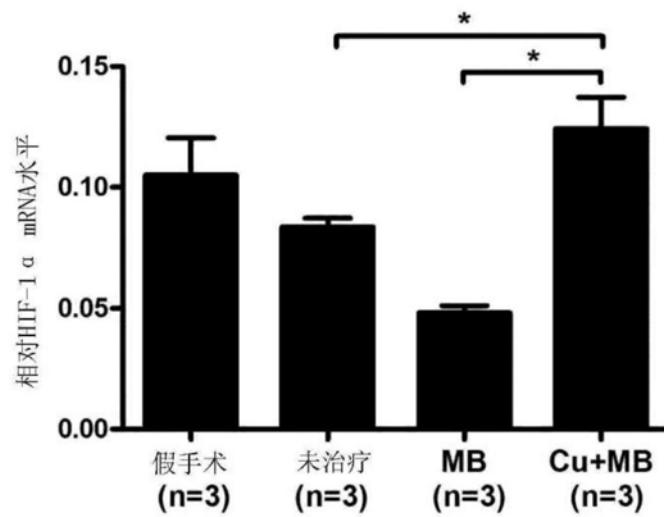


图32

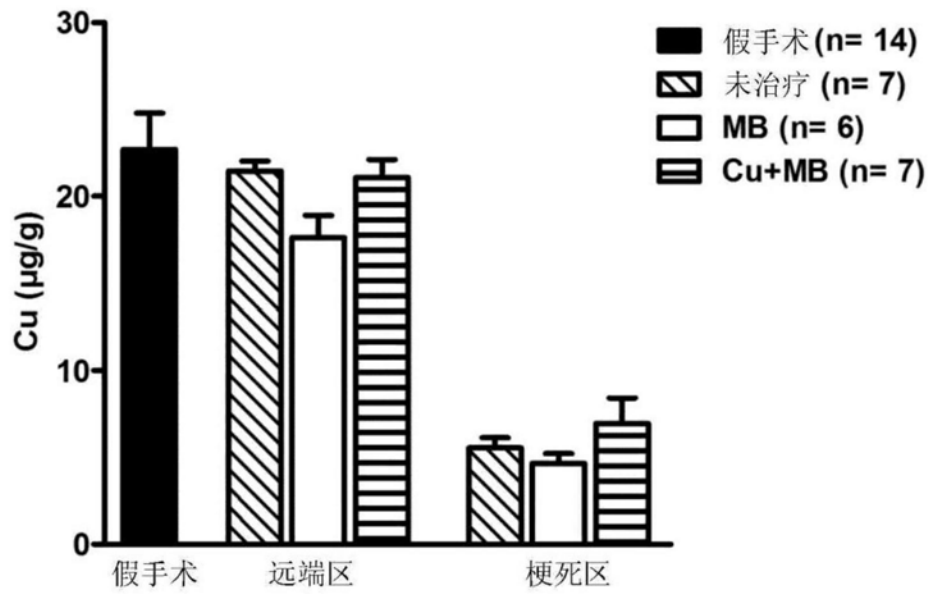


图33

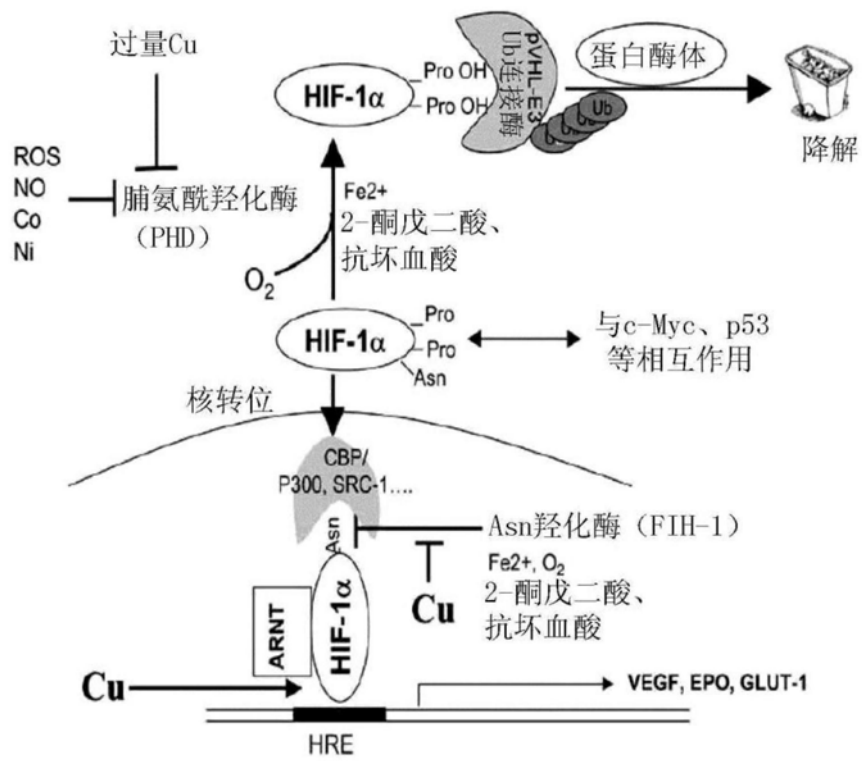


图34

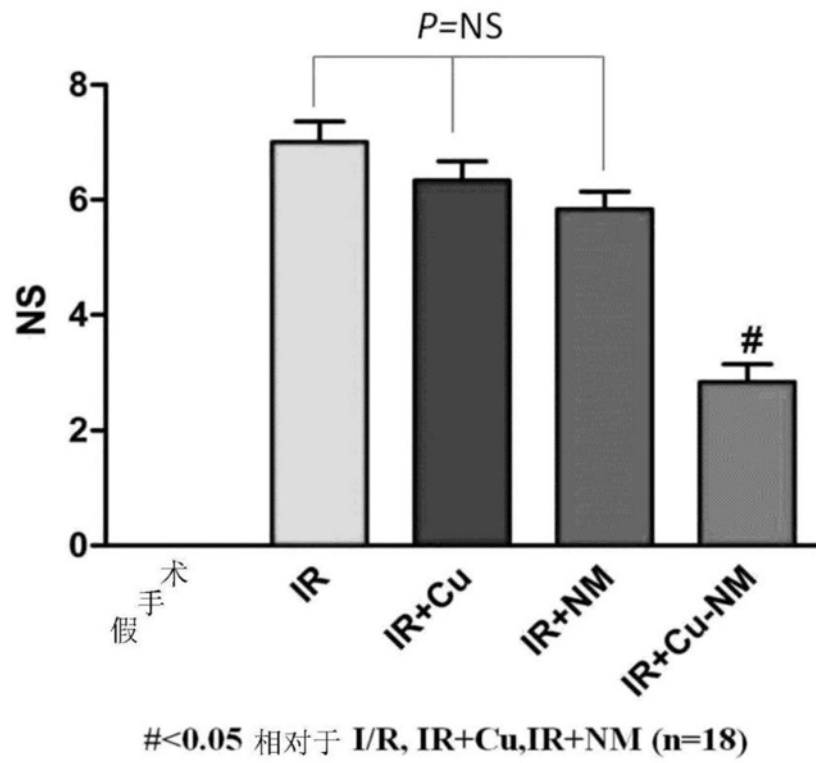


图35

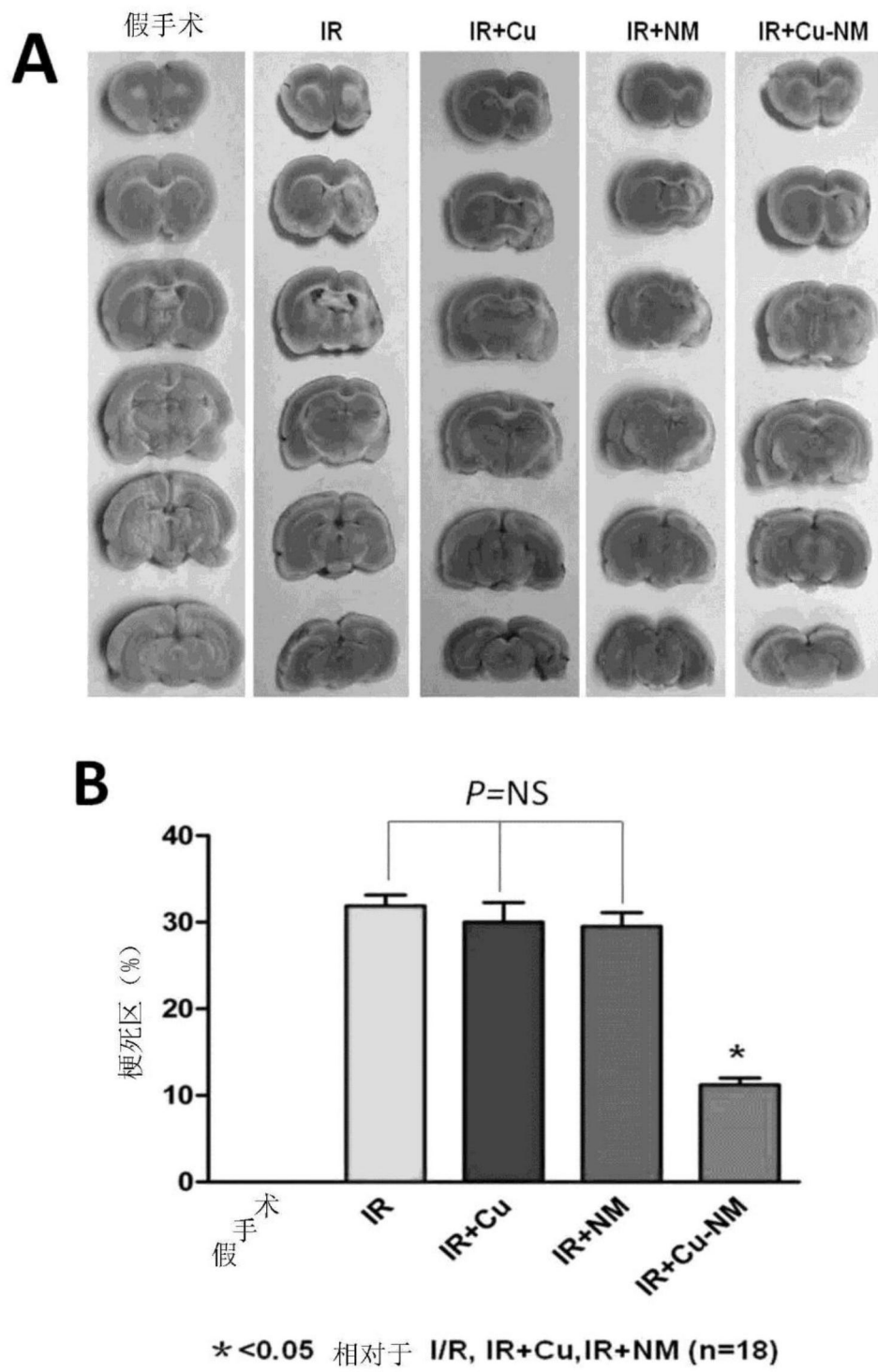


图36

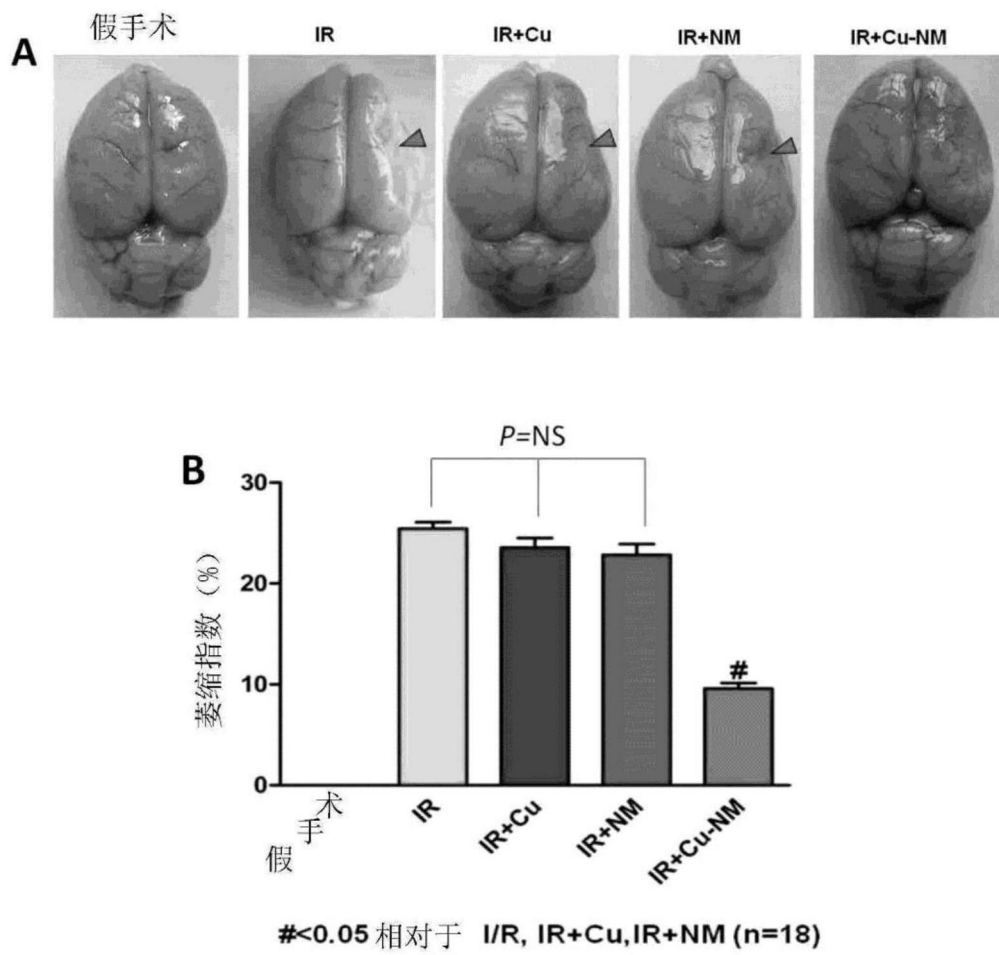


图37

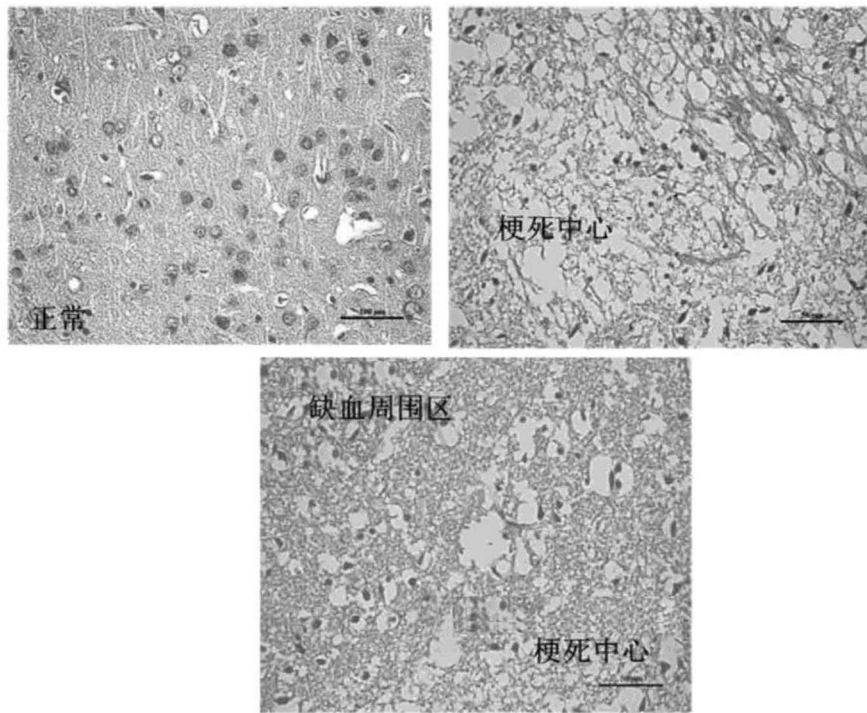


图38

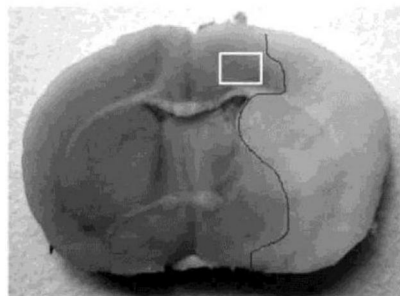


图39

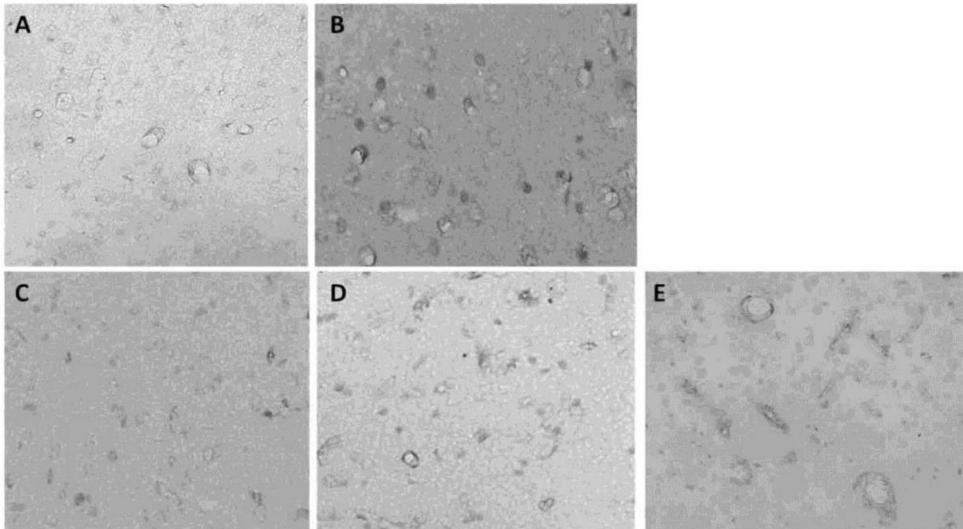


图40

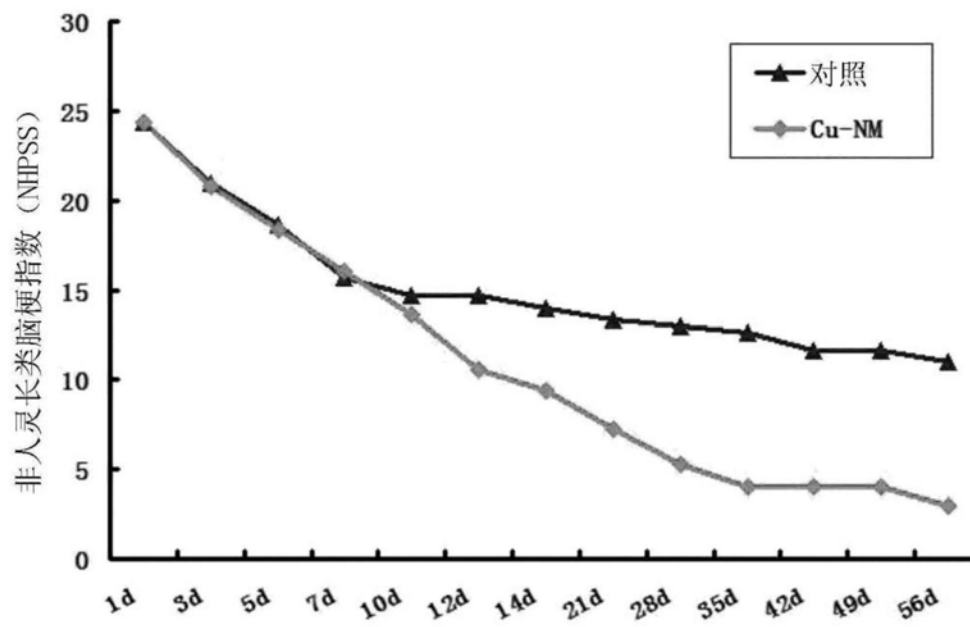


图41

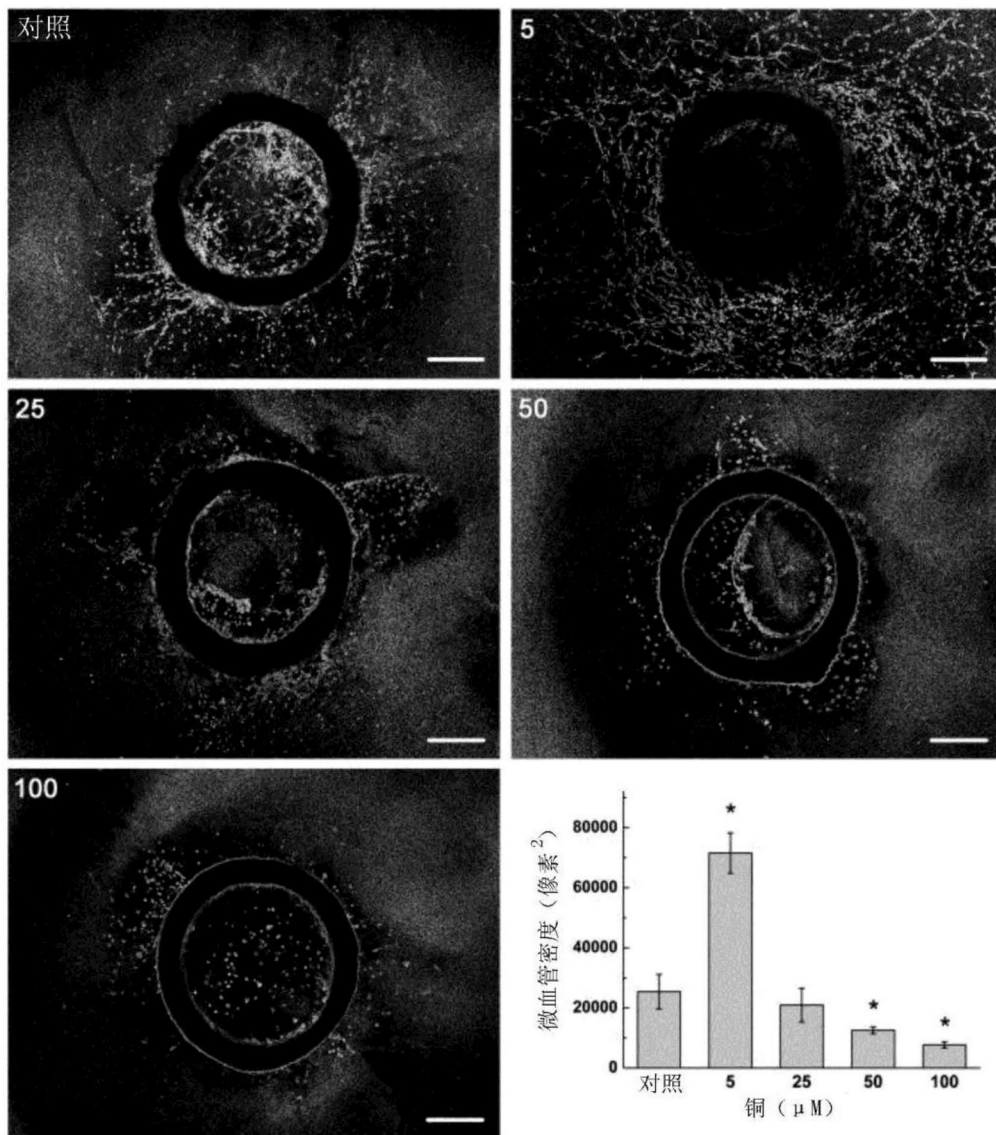


图42

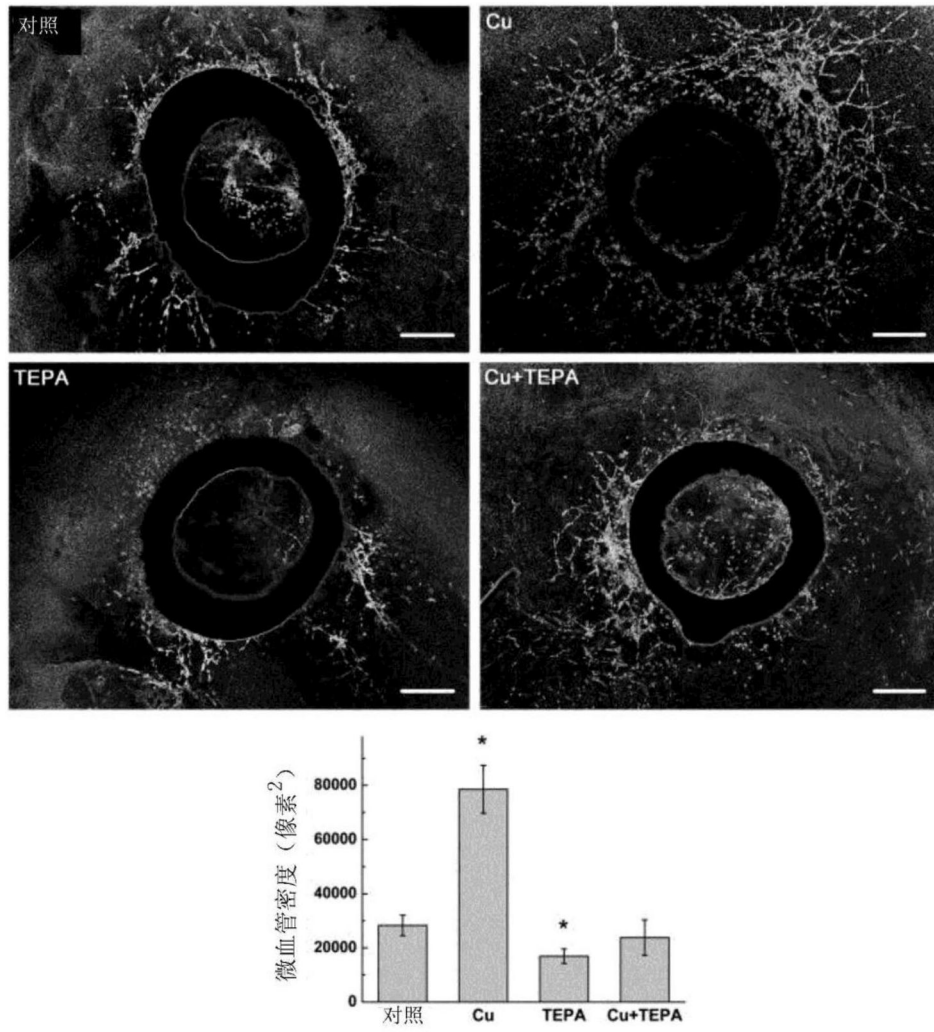


图43

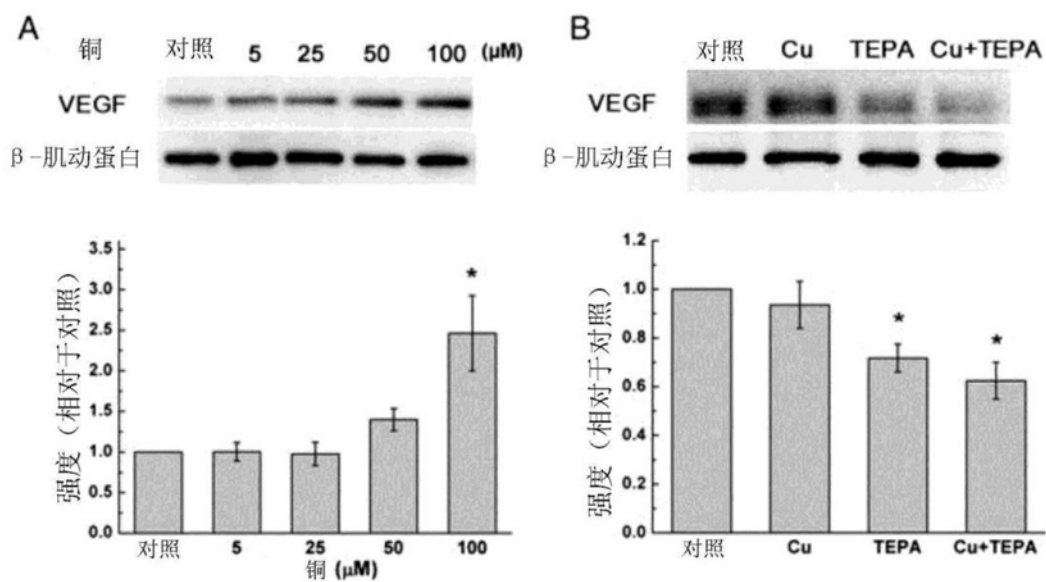


图44

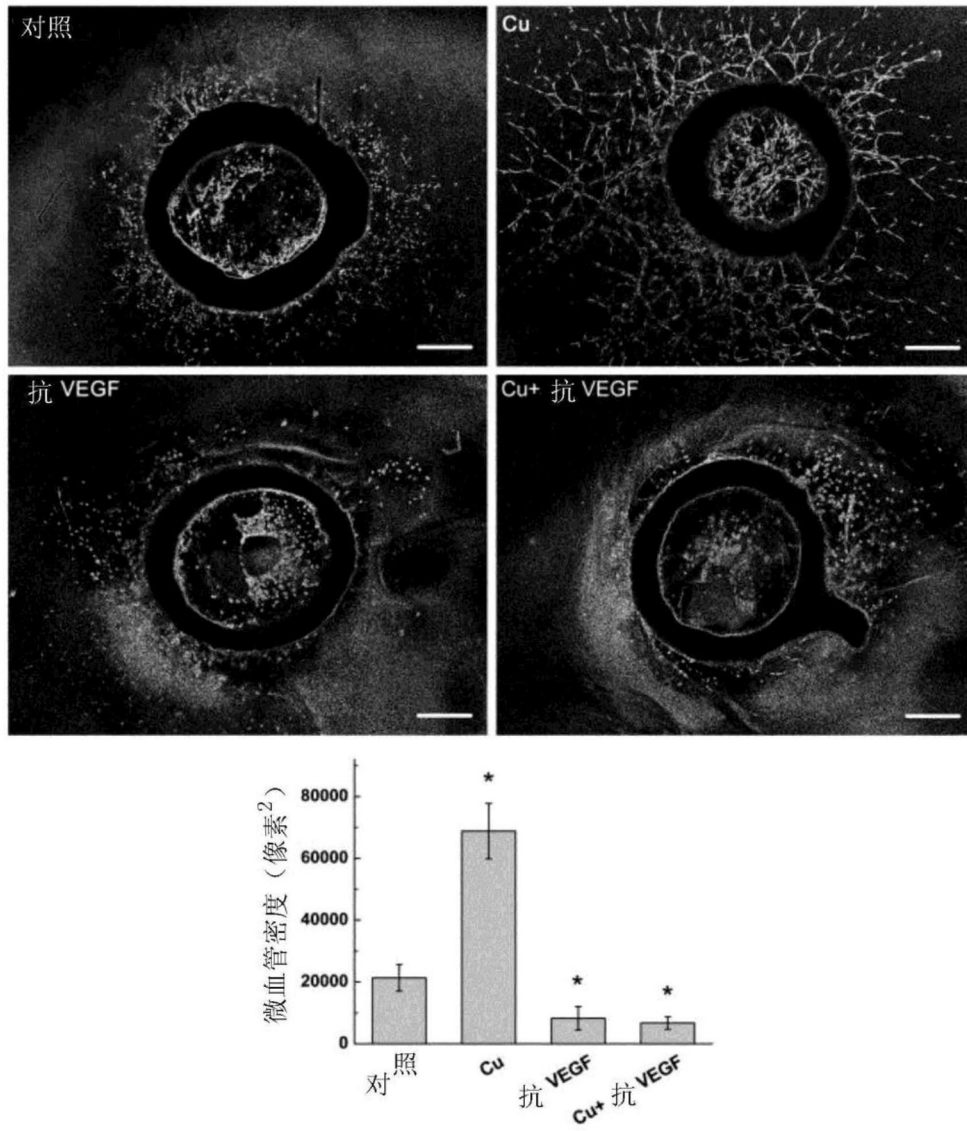


图45

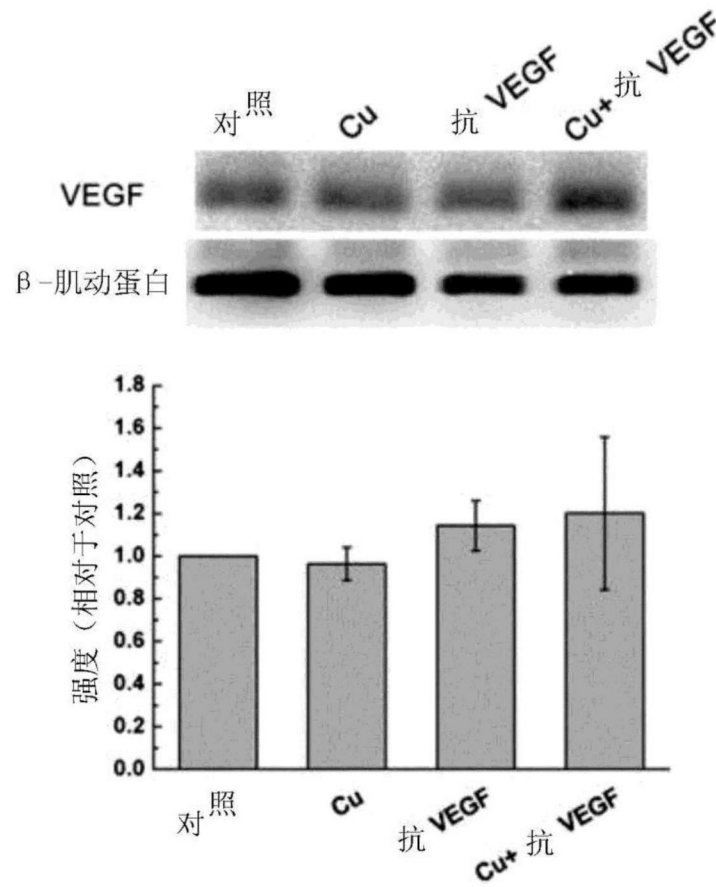


图46

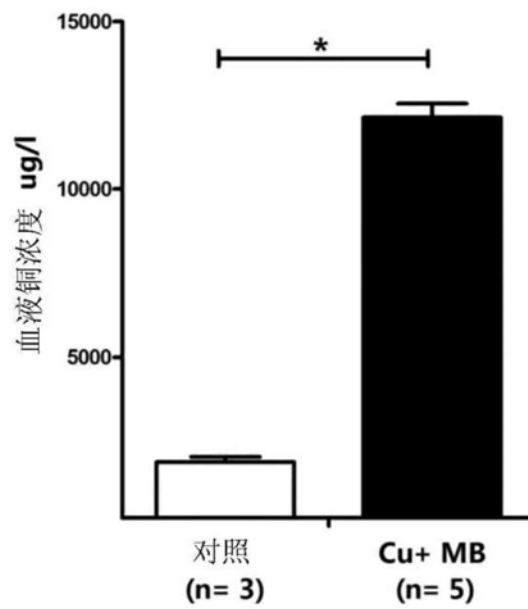


图47

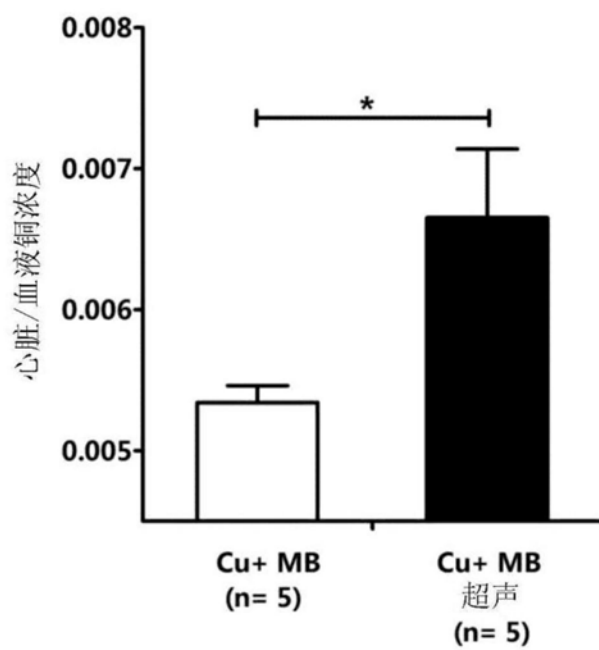


图48