



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105246494 B

(45)授权公告日 2020.02.07

(21)申请号 201480029794.2

(22)申请日 2014.04.16

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105246494 A

(43)申请公布日 2016.01.13

(30)优先权数据

10-2013-0043706 2013.04.19 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.11.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2014/003324 2014.04.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/171746 KO 2014.10.23

(73)专利权人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔

(72)发明人 洪性会 黄仁植 崔京雅

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 陈桢

(51)Int.Cl.

G12N 5/0797(2010.01)

A61K 35/30(2015.01)

A61P 17/14(2006.01)

审查员 韩福平

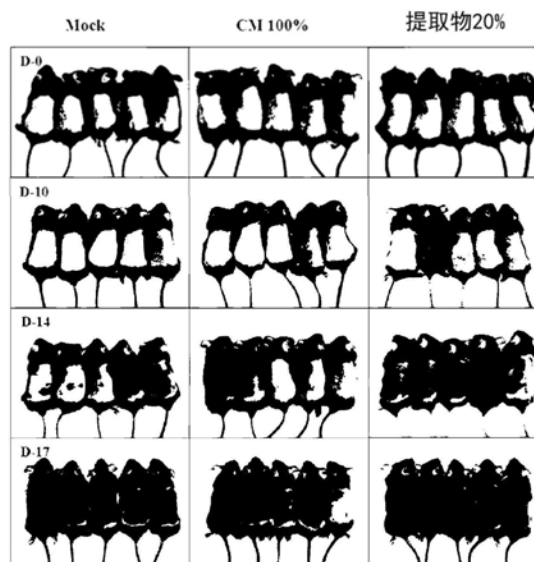
权利要求书1页 说明书9页 附图17页

(54)发明名称

刺激毛发生长或防止毛发脱落的包括神经干细胞的提取物的组合物及其制造方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物及其制备方法,所述组合物中包含从人脑的脑室区分离的神经干细胞(NSC)的条件培养基或提取物。根据本发明的神经干细胞的条件培养基或提取物含有各种生长因子和细胞因子,并因此对毛发生长的刺激有优异效果。因此,可用于毛发生长刺激和毛发脱落防止。



1. 组合物在制备用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的药物中的用途, 其中所述组合物含有15-25% (v/v) 的量的神经干细胞的提取物,

其中所述神经干细胞的提取物是通过包含以下步骤的方法获得的:

(a) 将分离自人脑的脑室区的神经干细胞在含有N-2补充剂、肝素、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、表皮生长因子 (EGF) 和白血病抑制因子 (LIF) 的人神经球培养基中培养10-14天;

(b) 将培养的神经干细胞永生化所获得的神经干细胞, 在含有DMEM (Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基)、FBS (胎牛血清) 和青霉素/链霉素的非诱导培养基中培养; 和

(c) 从用于培养所述神经干细胞的培养基中分离神经干细胞的提取物。

2. 如权利要求1所述的用途, 其中神经干细胞的提取物刺激在毛乳头细胞中的生长因子、瘦素和Shh (Sonic hedgehog) 的表达。

3. 如权利要求2所述的用途, 其中生长因子包括选自血管内皮生长因子 (VEGF)、胰岛素样生长因子 (IGF)、肝细胞生长因子 (HGF) 和角质细胞生长因子 (KGF) 组成组中的一种或多种。

4. 如权利要求1所述的用途, 其中神经干细胞的提取物抑制在毛乳头细胞中的TGF- β 1或IL-6的表达。

5. 如权利要求1所述的用途, 其中神经干细胞的提取物激活毛囊中的干细胞。

6. 如权利要求5所述的用途, 其中干细胞的激活是由BMP2、BMP4或BMP6的表达抑制和Tmeff1或TGF- β 2的表达增加来执行的。

刺激毛发生长或防止毛发脱落的包括神经干细胞的提取物的组合物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物及其制备方法,所述组合物含有神经干细胞的提取物。更具体地,本发明涉及外胚层神经干细胞的条件培养基或外胚层神经干细胞的提取物的新用途,以及一种用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物,其中包含从人脑的脑室区分离的经培养的神经干细胞 (NSC) 的条件培养基或提取物。

背景技术

[0002] 毛发遵循特定的毛发周期。将毛乳头周围的角质细胞分裂和增殖的阶段称为“生长期”。生长期之后是退行期,其中毛发停止其生长并从毛乳头分离。退行期后是休止期,其中角质细胞不生长并且在一段时间后毛发会脱落。毛发周期由重复的生长期、退行期和休止期组成。成人的生长期通常因个体而不同,但已知的是,男性生长期为3-5年而女性为4-6年,并且约15%的毛发处于退行期和休止期。人类毛发遵循独立的毛发周期,并在一侧生长而会在另一侧脱落,使得毛发的总数保持相同数量。此毛发脱落被称为生理性毛发脱落。然而,除了正常的毛发周期的休止期以外,疾病、毛发护理产品(凝胶,蜡等)、压力等可引起毛发脱落,并且在这种情况下,当原因被去除时,毛发再次恢复生长。

[0003] 秃头并不意味着毛发脱落后不再生长。在秃头的情况下,毛发逐渐变得更薄,并转变成毫毛。随着这种现象发展,在发根的毛乳头变小。当毛乳头变小时,毛发的厚度也变薄,并且同时,毛发周期变得更短,新生长的毛发变得更薄。随着秃发持续发展,毛发转变为毫毛,且毛发周期变短,使毛发脱落比生长快。此外,不同于已知是由自身免疫性疾病引起的斑秃,以及由内分泌疾病、营养缺乏、药物、或身体和心理压力,如生育引起的临时性毛发脱落,秃头趋于被继承,并且秃头程度是多样的。此外,已知的是秃头与血液雄性激素(雄激素)相关联。

[0004] 目前,已知的是,当在毛发脱落的初始阶段使用口服药物米诺地尔(Minoxidil)和口服药物保法止(Propecia,非那雄胺成分)时,毛发脱落的进展可以有一定延迟。然而,已经发展到毛发脱落阶段的毛发难以恢复到正常状态,并且在这种情况下,可以考虑毛发移植。在毛发移植中,通过切口法或从耳部以上的侧毛发和背部毛发(非切口法)收集约1000-3000根毛发,它们对激素较不敏感,并且移植所收集的毛发。然而,毛发移植的数量是有限的。

[0005] 已知目前市售产品对防止毛发脱落起作用,但对毛发生长的效果不显著。另外,当停止使用这些产品时,问题再次出现。此外,这些产品是在成本方面有劣势。

[0006] 在最近几年,已经开发出利用干细胞,采用治疗毛发脱落的基因和方法来治疗毛发脱落。在涉及本发明的背景的现有技术文献中,韩国专利号10-0771171(2007年10月29日授权)公开了一种方法,包括分离并增殖毛囊干细胞,并允许细胞分化成毛囊细胞,以及用于治疗秃发的组合物,并且韩国专利特开公开号10-2008-0097593(2008年11月6日公布)公开了通过适当地混合脂肪来源的干细胞与毛囊干细胞来制备的细胞治疗剂。此外,韩国专

利号10-1218101 (2013年1月3日授权) 公开了用于刺激毛发生长以及防止毛发脱落的组合物,它包含羊膜胎儿间充质干细胞的条件培养基作为活性成分。然而,尚未见报道用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物,其含有神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物,并具有优异的效果,。

[0007] 因此,本发明人通过应用人毛乳头细胞(hDPC)的条件培养基或提取物,表征了神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物,并通过使用C57BL/6小鼠发现了条件培养基或提取物在体内对刺激毛发生长或防止毛发脱落的效果,从而完成了本发明。

[0008] [现有技术文献]

[0009] [专利文献]

[0010] 专利文献1:韩国专利号10-0771171 (2007年10月29日)

[0011] 专利文献2:韩国专利公开号10-2008-0097593 (2008年11月6日)

[0012] 专利文献3:韩国专利号10-1218101 (2013年1月3日)

发明内容

[0013] 本发明的一个目的是提供用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物,其含有神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物。

[0014] 本发明的另一个目的是提供一种制备用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物的方法,该方法包括使用神经干细胞。

[0015] 本发明这些和其它的目的、特征和优点将从以下的详细说明、所附的权利要求书和附图中变得更加清楚。

附图说明

[0016] 图1示出为测量根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自的总蛋白质含量所执行的Brad-ford测定法的结果。

[0017] 图2a和2b示出通过WST-1测定法和相差显微镜,分析用根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自进行处理的毛乳头细胞的活力和形态的结果。

[0018] 图3示出通过WST-1测定法分析用根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自进行处理的毛乳头细胞的增殖的结果。

[0019] 图4a至4e示出qRT-PCR和RT-PCR的结果,表明用根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自进行处理时,在毛乳头细胞中的各种生长因子和细胞因子(Wnt5a、BMP2、TGF- β 2等)的表达水平增加。

[0020] 图5a和5b示出qRT-PCR的结果,表明根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自使诱导毛发周期的生长期的瘦素和细胞因子Shh (Sonic hedgehog)的表达水平增加。

[0021] 图6a和6b示出qRT-PCR的结果,表明根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自使诱导毛发周期的退行期的TGF- β 1 (转化生长因子 β 1) 和IL-6的表达水平被抑制。

[0022] 图7a和7b是照片,示出当将根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自施用至剃毛小鼠一定时间后,刺激剃毛小鼠的毛发生长。

[0023] 图8a至8c示出剃毛小鼠的毛发长度和重量,表明当将根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自施用至剃毛小鼠一定时间后,刺激剃毛小鼠的毛发生长。

[0024] 图9a和9b示出H&E(苏木精和曙红)染色的结果,表明当应用根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物每种时,诱导毛囊的生长。

[0025] 图10a和10b示出免疫组织化学的结果,表明当将根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自施用至剃毛小鼠后,剃毛小鼠的细胞生长增加。

[0026] 图11示出qRT-PCR的结果,表明当将根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自施用至剃毛小鼠后,在剃毛小鼠组织中的毛乳头细胞标记物碱性磷酸酶(Akp)的表达增加。

[0027] 图12示出qRT-PCR的结果,表明当将根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自施用至剃毛小鼠后,在剃毛小鼠毛囊中的BMP家族(抑制干细胞分化)的表达水平降低。

[0028] 图13示出qRT-PCR的结果,表明当将根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自施用至剃毛小鼠后,Tmeff1(抑制BMP的表达)的表达水平和TGF- β 2(增加Tmeff1的表达)的表达水平都增加。

[0029] 图14示出免疫组织化学的结果,表明当将根据本发明的神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自施用至剃毛小鼠后,在剃毛小鼠毛囊中由BMP降低所引起的干细胞(CD34+)的分化程度。

具体实施方式

[0030] 在一个方面,本发明涉及一种用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物,其含有神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物。

[0031] 在本发明中,用于制备该组合物的神经干细胞的种类不受限制。优选地,神经干细胞是胎儿的成体干细胞。在本发明的一个实例中,将分离自胎儿脑的脑室区的神经干细胞用于制备神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物。

[0032] 如本文所使用的,短语“神经干细胞的条件培养基”是指这样的材料,其包含通过传代培养神经干细胞(一种外胚层干细胞)所得到的条件培养基的组分,以及短语“神经干细胞的提取物”是指这样的材料,其包含通过传代培养神经干细胞(一种外胚层干细胞),收集并离心用于培养神经干细胞的培养物,过滤上清液,用均化器将滤液均质化以获得混合物,并离心该混合物来回收上清液所得到的细胞组分(见实施例1)。

[0033] 在本发明中,神经干细胞的提取物可以是以10-30% (v/v)的量被包含,这是不显示细胞毒性的有效浓度。优选地,它可以是以15-25%的量(v/v)被包含。更优选地,它可以是以20%的量(v/v)被包含。

[0034] 在本发明的一个实例中,为了检查神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物是否具有刺激毛发生长的活性,通过Bradford测定法来评估从神经干细胞的条件培养基(CM)和神经干细胞的提取物(Ext.)中分离的总蛋白质(图1)。

[0035] 用根据本发明的神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物处理毛乳头细胞3天,此后,通过WST-1测定法分析细胞的活力,并用相差显微镜观察细胞形态(图2a和

2b)。

[0036] 另外,用根据本发明的神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物处理毛乳头细胞,然后由WST-1测定法在72小时内以24小时为间隔分析毛乳头细胞的增殖(图3)。

[0037] 结果发现,根据本发明的神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物含有刺激毛发生长的各种细胞生长因子和细胞因子,并且特别是,诱导参与毛发生长的各种生长因子在毛乳头细胞中的分泌来测定毛发生长刺激(图4a至4e)。毛发生长因子包括选自血管内皮生长因子(VEGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、肝细胞生长因子(HGF)和角质细胞生长因子(KGF)的组中的一种或多种。

[0038] 结果发现,根据本发明的神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物含有刺激毛发生长的各种细胞生长因子和细胞因子,并且特别是,刺激细胞因子Shh(Sonic hedgehog)的表达,该细胞因子Shh诱导毛发周期的生长期,这测定了毛发生长刺激(图5a和5b)。

[0039] 结果发现,与对照不同,根据本发明的神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物抑制TGF- β 1(转化生长因子 β 1)的表达,TGF- β 1诱导毛发周期的退行期(图6a和6b)。

[0040] 在本发明的一个实例中,为了检查神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物是否具有刺激毛发生长的活性,用不同浓度的神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物处理剃毛C57BL/6小鼠的背部。结果表明,与对照组(Mock)不同,在用神经干细胞条件培养基(CM)处理的组中和用神经干细胞的提取物(Ext.)处理的组中诱导了毛发生长的增加(图7a和7b)。

[0041] 结果表明,与对照组不同,在用神经干细胞条件培养基处理的组中和用神经干细胞的提取物处理的组中,毛发周期的生长期被诱导,从而在处理组中的毛发长度和重量也得以增加(图8a至8c)。

[0042] 结果发现,在用神经干细胞条件培养基或用神经干细胞的提取物处理的组中,在相同的时间周期被激活的毛囊数目比对照组大(图9a和9b)。

[0043] 分析在对照组和用神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物处理的组中各自的细胞增殖标记物Ki-67。结果表明,在用神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物处理的组中,细胞增殖被激活并且也没发生细胞死亡(图10a和10b)。

[0044] 此外发现,在用神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物处理的组中,毛乳头细胞标记物碱性磷酸酶(Akp)mRNA的表达比在对照组中增加(图11)。

[0045] 分析在对照组和用神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物处理的组中的BMP(骨形态发生蛋白)家族的表达水平,已知该BMP家族通过抑制隆起干细胞的分化来抑制毛发生长。结果是,在用神经干细胞的提取物(Ext.)处理的组中的BMP家族的表达水平比对照组(Mock)和用神经干细胞的条件培养基处理的组(CM)中的BMP家族的表达水平下降(图12)。

[0046] 分析在对照组和用神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物处理的组中的Tmeff1(抑制BMP的表达)和TGF- β 2(增加Tmeff1的表达)的mRNA表达水平。结果表明,在用神经干细胞的提取物(Ext.)处理的组中的Tmeff1和TGF- β 2的表达水平增加(图13a和13b)。

[0047] 分析在对照组和用神经干细胞的条件培养基或神经干细胞的提取物处理的组中,由BMP降低引起的干细胞(CD34+)的分化程度。结果表明,在用神经干细胞的提取物(Ext.)

处理的组中的干细胞被激活(图14)。

[0048] 作为在本发明中用于培养神经干细胞的培养基,可以使用本领域中已知的任何基础培养基而没有限制。用于本发明中的基础培养基可以是合成的基础培养基或市售的基础培养基。市售的基础培养基的实例包括Dulbecco改良的Eagle氏培养基(DMEM)、最低必需培养基(MEM)、Eagle基础培养基(BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、 α -最低必需培养基(α -MEM), Glasgow最低必需培养基(G-MEM)和Isocove氏改良的Dulbecco氏培养基,但不限于此。市售的基础培养基可以是DMEM。

[0049] 基础培养基优选含有0.01-15% (v/v)的FBS。在本发明的一个实例中,神经干细胞是在含10%FBS的DMEM培养基中培养,并且测量了其对于毛发生长刺激的作用。

[0050] 如本文所使用的,“用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物”是含有神经干细胞的培养条件培养基或神经干细胞的提取物的组合物,并且可以是任何制剂。用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物的制剂的实例包括溶液、凝胶、乳膏、乳液、粉剂、皮肤洗剂、粉底和固体肥皂。对于本发明的目的,该组合物可以任何这样的制剂被制备并使用,并且组合物的制剂并不限定于上述实例。根据本发明的用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物,除了上述的活性成分外,可含有通常用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物中的组分,例如常规的添加剂如抗氧化剂、稳定剂、增溶剂、维生素、色素和香料,以及载体。

[0051] 本发明还可以提供用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的药物组合物,其含有神经干细胞的培养条件培养基或神经干细胞的提取物。

[0052] 包含在本发明的药物组合物中的药学上可接受的载体是通常在制剂中使用的。其实例包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、甲基羟基苯甲酸酯、丙基羟基苯甲酸酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油,但不限于此。本发明的药物组合物除上述组分外,还可以包括润滑剂、润湿剂、甜味剂、芳香剂、乳化剂、悬浮液和防腐剂。适合本发明的药物组合物的药学上可接受的载体和制剂在Remington's Pharmaceutical Sciences(第19版,1995年)中有详细描述。

[0053] 本发明的药物组合物的优选剂量可以根据多种因素进行适当选择,包括制剂方法,给药方法,患者的年龄、体重和性别,疾病严重程度,给药途径和时间,排泄速度,以及反应灵敏度。熟练的医生可以很容易地确定并开出对所需治疗有效的剂量。同时,本发明的药物组合物可以以0.01-2,000mg/kg的每日剂量给药,但不限于此。

[0054] 本发明的药物组合物可以口服或肠胃外给药。在肠胃外给药的情况下,本发明的药物组合物可以通过静脉内注射、皮下注射、肌肉内注射、腹腔内注射和真皮内注射给药。本发明的药物组合物的给药途径优选是根据本发明的药物组合物所施用的疾病类型来确定。例如,本发明的药物组合物用于毛发生长的刺激或毛发脱落的防止和治疗,并且因此优选以局部施用于患者皮肤的方式给药。

[0055] 根据本发明的药物组合物可以使用药学中可接受的载体和/或赋形剂,按照本领域技术人员容易进行的方法来制备成单剂量形式或多剂量包装。这里,药物组合物的制剂可以是在油或水性介质中的药物组合物的溶液、悬液或乳液,或者含有该药物组合物的提取物、粉剂、颗粒、片剂或胶囊,并且可以进一步包括分散剂或稳定剂。

[0056] 如本文所用的,短语“刺激毛发生长”或“防止毛发脱落”旨在包括本领域中使用的

术语“毛发生长”或“促进毛发生长”。

[0057] 本发明的组合物不仅可以适用于头皮,而且可以适用于需要毛发生长的任何身体部位。例如,本发明的组合物可施用到因创伤疤痕造成的毛发脱落部位,或者施用到宽阔的前额或M形前额、睫毛或眉毛以提供简单的美容效果,并且可以用于改善无毛症的状况。

[0058] 在另一个方面,本发明涉及一种制备用于刺激毛发生长或防止毛发脱落的组合物的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 培养神经干细胞;和(b) 从用于培养神经干细胞的培养基中分离神经干细胞的提取物。

[0059] 组合物的制备可以由本领域中通常使用的任何方法进行,并且分离神经干细胞的提取物的方法不限于本发明的方法而可以通过本领域中通常使用的任何方法来执行。例如,神经干细胞的提取物可以通过用胰蛋白酶-EDTA处理经培养的神经干细胞,传代培养处理后的神经干细胞,收集并离心用于培养神经干细胞的培养基,离心上清液,用均化器来均质化细胞沉淀,离心均质化的材料,然后离心上清液。作为神经干细胞提取物的上清液中包含细胞的组分。在分离神经干细胞的提取物的步骤中,本领域的技术人员根据常规的提取制备方法可容易地控制神经干细胞的提取物的浓度。

[0060] 在步骤(a)中使用的神经干细胞优选是通过将从脑的脑室区分离神经干细胞永生化所获得的细胞,但不限于此。在步骤a)中,神经干细胞是在含有0.01-15% (培养基v/v) FBS的培养基中培养,但不限于此。在本发明的一个实例中,使从胎儿脑的脑室区分离的神经干细胞(NSC)永生化,得到用于本发明的细胞。如本文所使用的,“永生化”或“永生化的”意指在细胞培养条件下动物细胞获得半永久的增殖活性,以便持续增殖而没有细胞死亡。可以使用本领域中已知的技术来进行细胞的永生化。将永生化的细胞在含有DMEM (Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基),10%FBS (胎牛血清)和1%青霉素链霉素的非诱导培养基中培养并除去未贴壁的细胞。在传代培养按如上所述来培养的神经干细胞(NSC)的过程中,收集条件培养基。将收集的培养基离心,并且过滤上清液。同时,通过均质化用胰蛋白酶-EDTA处理的经培养的细胞得到神经干细胞的提取物。

[0061] 如上所述,根据本发明的外胚层神经干细胞的条件培养基或外胚层神经干细胞的提取物可以有利地用作开发能够刺激毛发生长或者防止或治疗毛发脱落的药物(或准药品)的原料。

[0062] 实施例

[0063] 下文中,参照实施例对本发明进行更详细的说明。本领域的普通技术人员显而易见的是,这些实施例是说明性的目的,并且不应被解释为限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围将由所附的权利要求书及其等同物来限定。

[0064] 实施例1:神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物的生产

[0065] 将从胎儿脑的脑室区分离的神经干细胞(NSC)永生化,得到细胞。具体而言,将14周龄胎儿神经细胞组织,在37℃用含有0.1%胶原酶和0.1%透明质酸酶的溶液处理1小时,并用0.05%胰蛋白酶-EDTA处理2-3分钟,以分离单个细胞。然后,通过FACS用标记物(CD45-/CD133+/CD34-)分离细胞。将分离的细胞在含有N-2补充剂,0.2mg/ml肝素,20ng/ml的bFGF(碱性成纤维细胞生长因子),20ng/ml的EGF(表皮生长因子)和10ng/ml的LIF(白血病抑制因子)的人类神经球培养基中培养。

[0066] 在10-14天后,将形成的神经球用胶原酶处理以分离单个细胞,并使用逆转录病毒

载体将v-myc基因转染到细胞中。然后,将通过筛选过程得到的细胞在含有DMEM(Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基),10%FBS(胎牛血清)和1%青霉素/链霉素的非诱导培养基中培养(Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express forebrain genes., Flax JD et al., Nature Biotechnology, vol.16, 1998; Neuroprotective effect of neural stem cell-conditioned media in in vivo model of Huntington's disease., Lim H-C et al., Neuroscience Letters 435, pp175-180, 2008)。

[0067] 将细胞以 5×10^5 个细胞的密度接种到150mm培养皿中,并向细胞中加入15ml培养基。然后,将细胞在37℃,5%CO₂培养箱中培养,并且当细胞达到80%汇合时,收集培养基。这里,培养基是含有DMEM(Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基)、10%FBS(胎牛血清)和1%青霉素/链霉素的非诱导培养基。培养后,除去未贴壁细胞。在传代培养按上述培养的神经干细胞(NSC)的过程中,收集培养基。将收集的培养基离心,过滤上清液,由此得到神经干细胞的条件培养基。同时,为获得神经干细胞的提取物,将用胰蛋白酶-EDTA处理的经培养的细胞用PBS洗涤两次,加入到100ml三蒸水中,用均化器以6000RPM均质化5分钟,然后以1500rpm离心5分钟,并收集上清液。

[0068] 实施例2:神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物的总蛋白浓度

[0069] 将样品以对应于10-100μg蛋白量的量加入到96孔板中,并且将总体积调整到100μl。作为空白,向96孔板中加入100μl蒸馏水。接着,向96孔板中加入染料考马斯蓝,并用酶标仪测量在595nm处的吸光度。

[0070] 结果如图1所示,神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物具有高蛋白质浓度。

[0071] 实施例3:神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物的细胞活力和增殖的测量

[0072] 将 1×10^3 细胞接种到96孔板的每个孔中。第二天,将细胞用100μl的神经干细胞的条件培养基(0-100%)和神经干细胞的提取物各自处理。在24小时的间隔,将10μl的用于测定法(WST-1)的物质加入到每个孔中,随后在培养箱中孵育。接着,用酶标仪测量在440nm的吸光度。

[0073] 结果如图2a和图3所示,神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物表现出高细胞活力和增殖。

[0074] 实施例4:通过定量RT-PCR对毛发生长因子和细胞因子的表达水平的测量

[0075] 在此实施例中,将毛乳头细胞以每孔 1.5×10^4 个细胞的密度接种到24孔板中。第二天,用100μl的神经干细胞的条件培养基(0-100%)和神经干细胞的提取物各自处理细胞。在处理72小时后,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤,并使用Trizol试剂从细胞中分离总RNA,使用逆转录酶合成cDNA。对cDNA进行定量RT-PCR。

[0076] 结果如图3a至图6b所示,在用神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物各自处理的组中,参与毛发生长的VEGF、IGF、HGF和KGF生长因子以及诱导毛发周期的生长期的Shh以高水平表达,并且诱导毛发周期的退行期的TGF-β1以低水平表达。

[0077] 实施例5:神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物对C57BL/6J皮肤组织的毛发生长刺激的作用的检查

[0078] 将5周龄的C57BL/6J小鼠在 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 驯化7天,然后将小鼠背部剃毛并用1ml的本发明的神经干细胞的条件培养基(100%,v/v)或神经干细胞的提取物(20%,v/v)处理,每天一次。作为对照,使用完全培养基(DMEM+10%FBS)。用培养基或提取物处理后,以一定间隔观察背部的毛发。16天后,检查培养基或提取物对小鼠毛发生长刺激的作用。

[0079] 结果如图7a和7b所示,神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物(20%,v/v)与对照相比显示出刺激毛发生长的作用。

[0080] 实施例6:神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物对C57BL/6J皮肤组织的毛发生长刺激的作用的分析

[0081] 1:毛发长度和重量的分析

[0082] 将5周龄的C57BL/6J小鼠在 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 驯化7天,然后将小鼠背部剃毛并用1ml的本发明的神经干细胞的条件培养基(100%,v/v)或神经干细胞的提取物(20%,v/v)处理,每天一次。作为对照,使用完全培养基(DMEM+10%FBS)。用培养基或提取物处理后,以一定间隔观察在背部的毛发。16天后,处死小鼠,并且测量小鼠毛发长度和重量,以确认刺激毛发生长的作用。

[0083] 结果如图8a至8c所示,就毛发生长的时间以及毛发长度和重量而言,神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物(20%,v/v)对毛发生长刺激起作用。特别是,神经干细胞的提取物有更好的作用。

[0084] 2:组织的H&E染色

[0085] 将5周龄的C57BL/6J小鼠在 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 驯化7天,然后将小鼠背部剃毛并用1ml的本发明的神经干细胞的条件培养基(100%,v/v)或神经干细胞的提取物(20%,v/v)处理,每天一次。作为对照,使用完全培养基(DMEM+10%FBS)。用培养基或提取物处理后,以一定间隔观察在背部的毛发。16天后,处死小鼠,并计数毛囊,以确认刺激毛发生长的作用。

[0086] 结果如图9a至9b所示,就毛发生长的时间和毛囊计数而言,神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物(20%,v/v)对毛发生长刺激起作用。特别是,神经干细胞的提取物有更好的作用。

[0087] 3:细胞生长标记物的分析

[0088] 将5周龄的C57BL/6J小鼠在 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 驯化7天,然后将小鼠背部剃毛并用1ml的本发明的神经干细胞的条件培养基(100%,v/v)或神经干细胞的提取物(20%,v/v)处理,每天一次。作为对照,使用完全培养基(DMEM+10%FBS)。用培养基或提取物处理后,以一定间隔观察在背部的毛发。16天后,处死小鼠,并将皮肤组织固定在4%甲醛中,石蜡包埋,并切片成 $3\mu\text{m}$ 的厚度。将切片附着于载玻片,脱蜡并再水化。然后,将切片进行抗原修复(柠檬酸盐缓冲液,pH 6.0),用0.1%的Triton X-100处理,用正常的驴血清封闭,然后用1:250稀释的初级抗体处理24小时。然后,将切片用二级抗体处理1小时,并用DAPI染色5分钟。接着,使用防荧光淬灭封片剂将切片固定到载玻片,然后用共焦显微镜观察。

[0089] 结果如图10a和10b所示,观察到在神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物(20%,v/v)中,细胞生长标记物Ki-67增加。

[0090] 4:在组织中的基因表达的分析

[0091] 将5周龄的C57BL/6J小鼠在 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 驯化7天,然后将小鼠背部剃毛并用1ml的本发明的神经干细胞的条件培养基(100%,v/v)或神经干细胞的提取物(20%,v/v)处理,每天

一次。作为对照,使用完全培养基(DMEM+10%FBS)。用培养基或提取物处理后,以一定间隔观察在背部的毛发。16天后,处死小鼠,并用Trizol试剂处理皮肤组织以分离总RNA,然后使用逆转录酶合成cDNA。将cDNA进行定量RT-PCR。

[0092] 结果如图11和图14所示,观察到,在神经干细胞的条件培养基和神经干细胞的提取物(20%)中,毛乳头细胞标记物碱性磷酸酶增加,并且抑制干细胞分化的BMP的表达因在毛囊中的Tmeff1和TGF- β 2增加而减少,从而激活干细胞(CD34+)。

[0093] 工业实用性

[0094] 如上所述,本发明的外胚层神经干细胞的条件培养基和外胚层神经干细胞的提取物含有各种生长因子和细胞因子,并因此具有刺激毛发生长的优异作用。尤其是,根据本发明的组合物调控与毛发生长有关的各种生长因子和Shh(Sonic hedgehog)的表达,并因此展现出从根本上刺激毛发生长的作用。

[0095] 此外,本发明的外胚层神经干细胞的条件培养基和外胚层神经干细胞的提取物,或从中分离的特定因子,都可以用作与毛发生长刺激有关的准药物的原料。因此,本发明在毛发生长刺激、毛发脱落防止以及秃发治疗相关的领域中是非常有用的。

[0096] 尽管本发明已参照具体特征作了详细描述,但对本领域技术人员显而易见的是该描述仅仅用于优选实施方式,并不限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围将由所附的权利要求书及其等同物来限定。

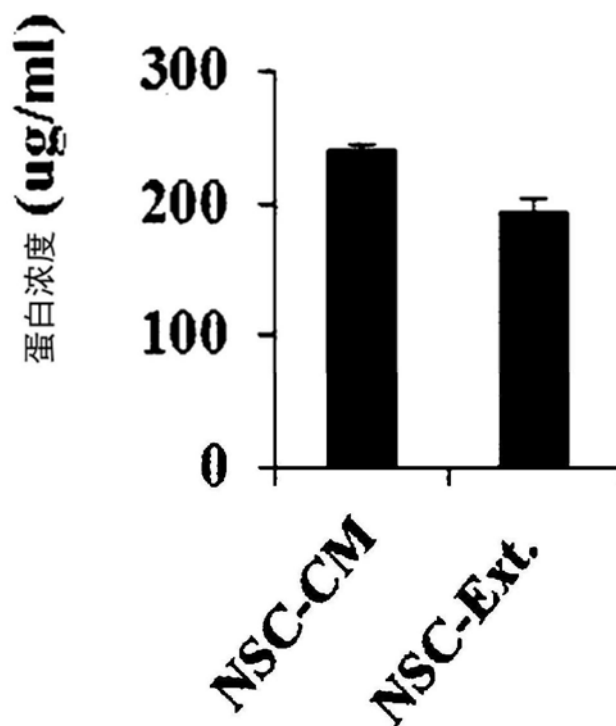


图1

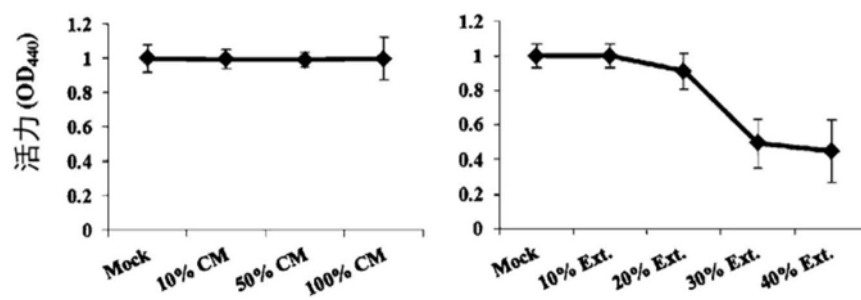


图2a

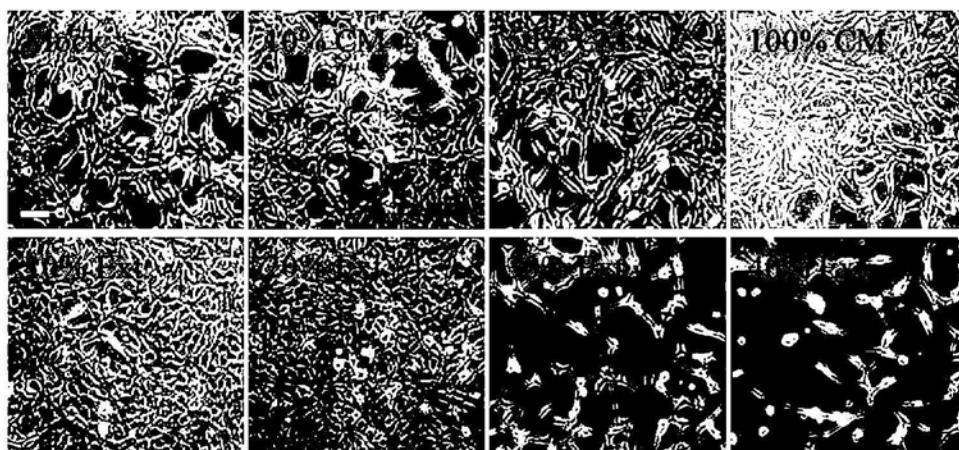


图2b

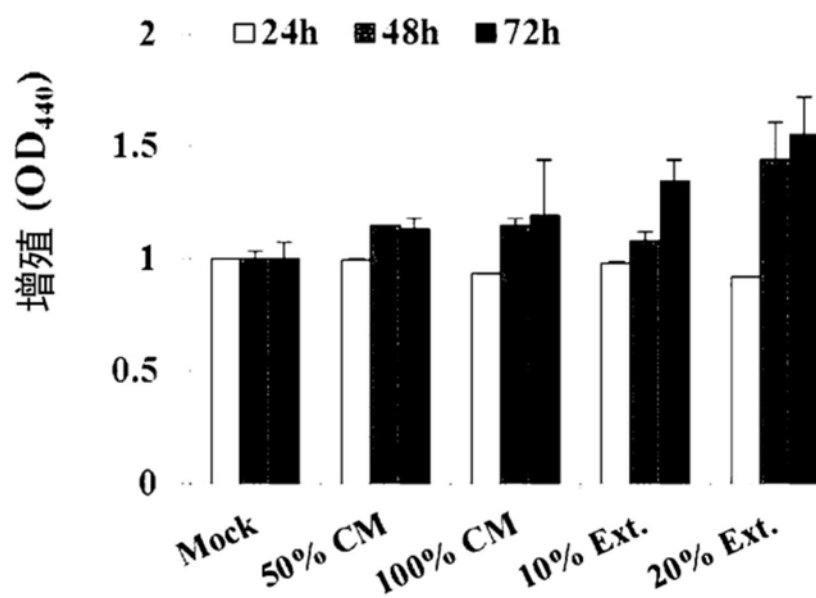


图3

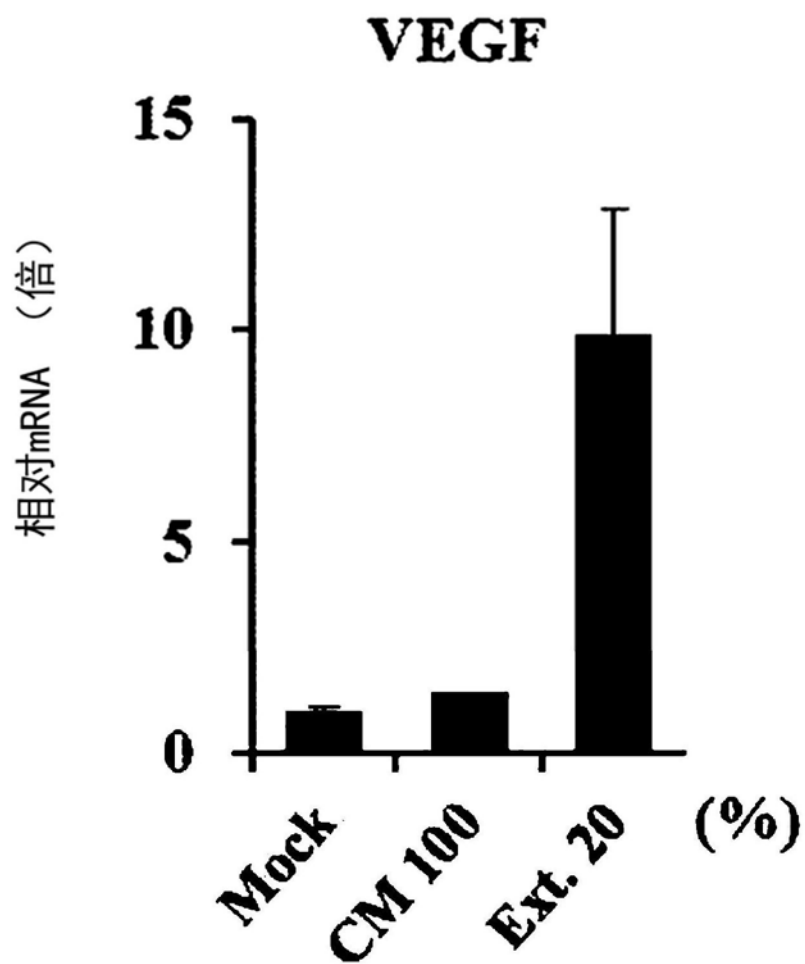


图4a

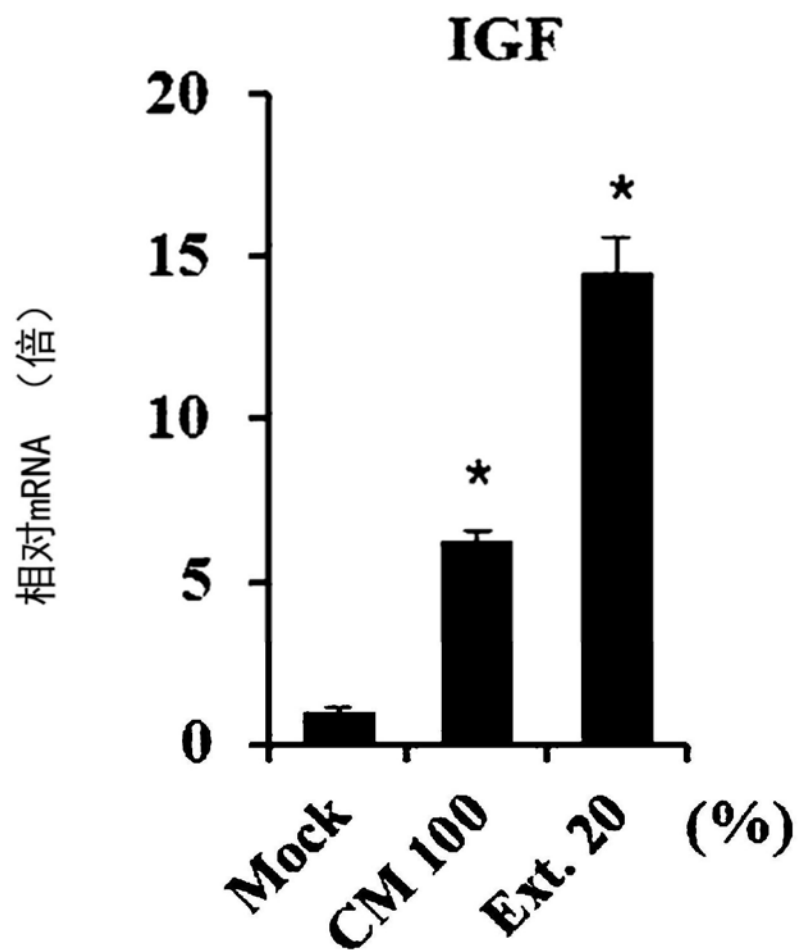


图4b

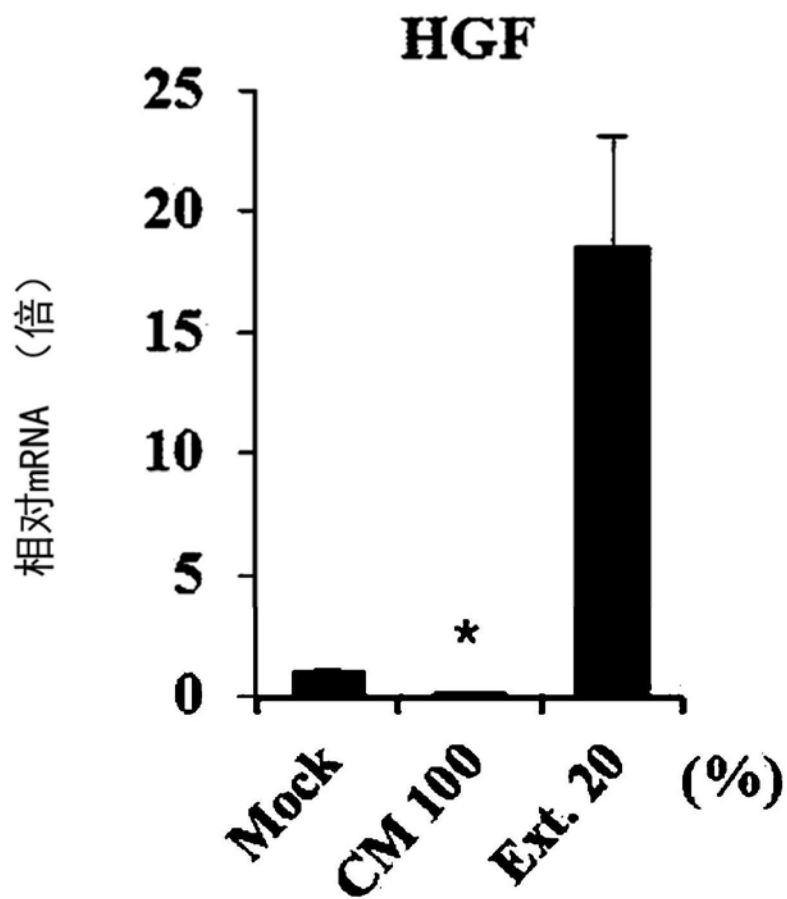


图4c

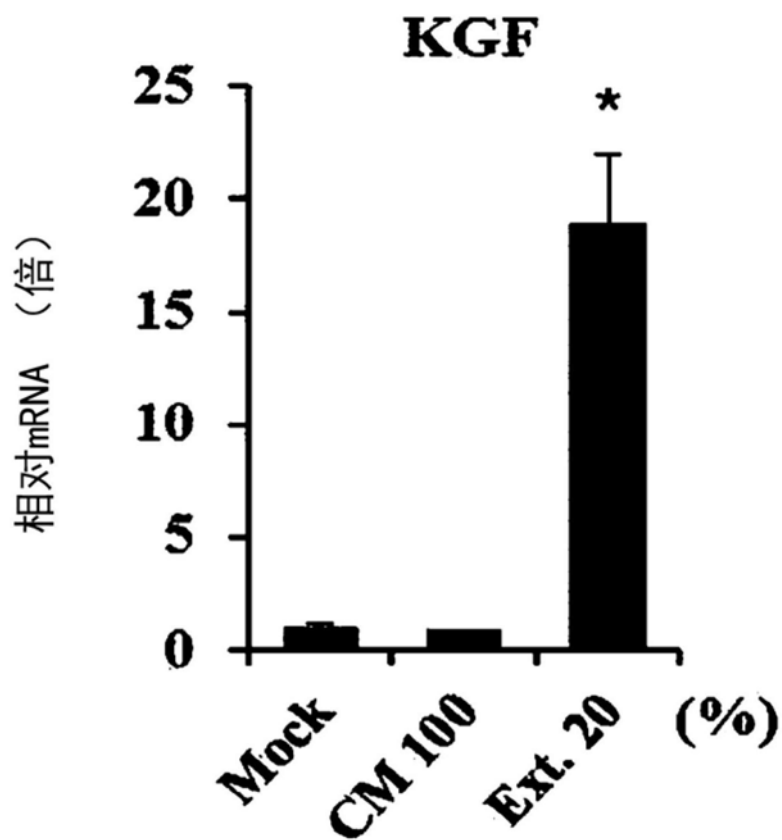


图4d

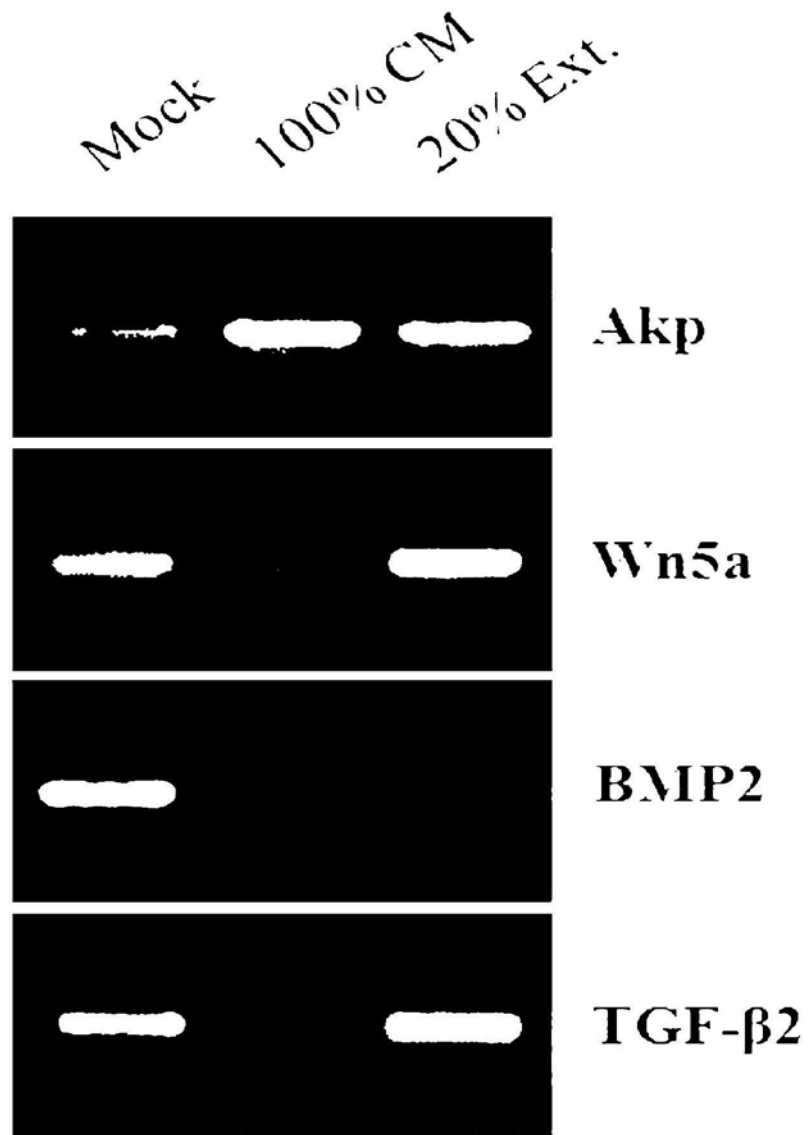


图4e

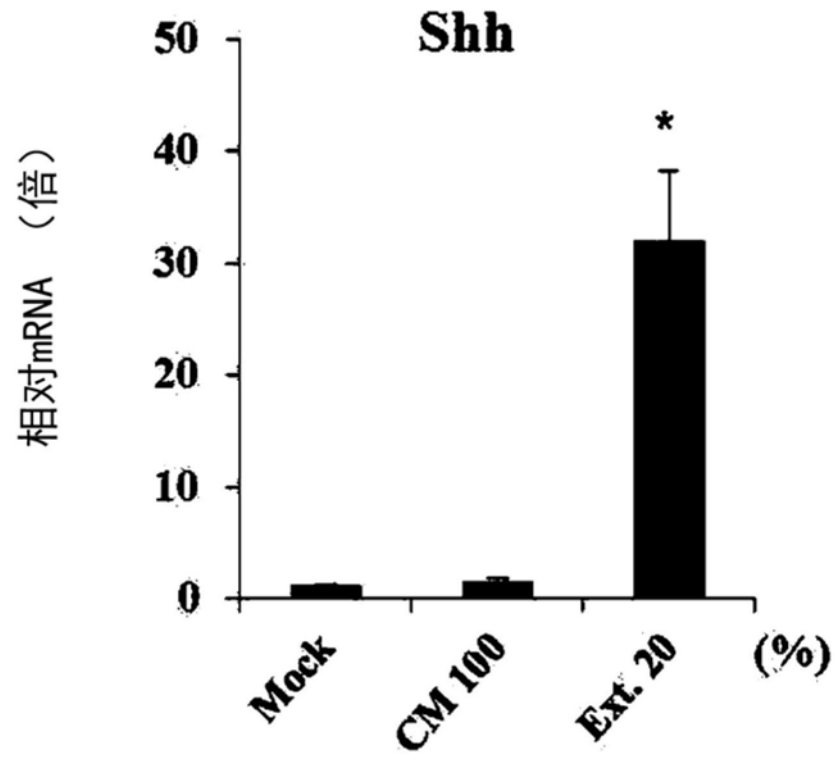


图5a

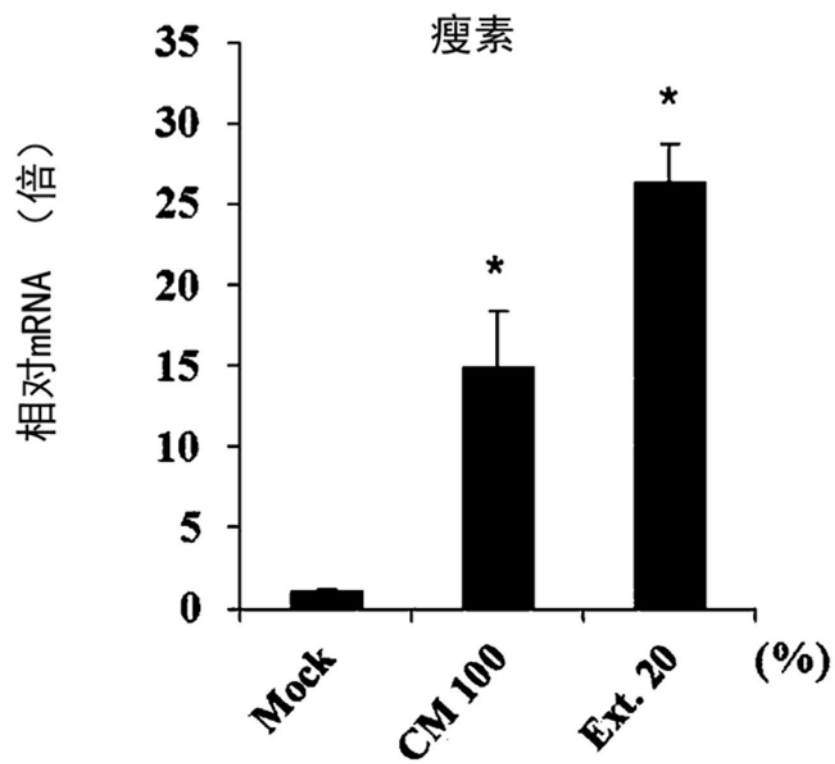


图5b

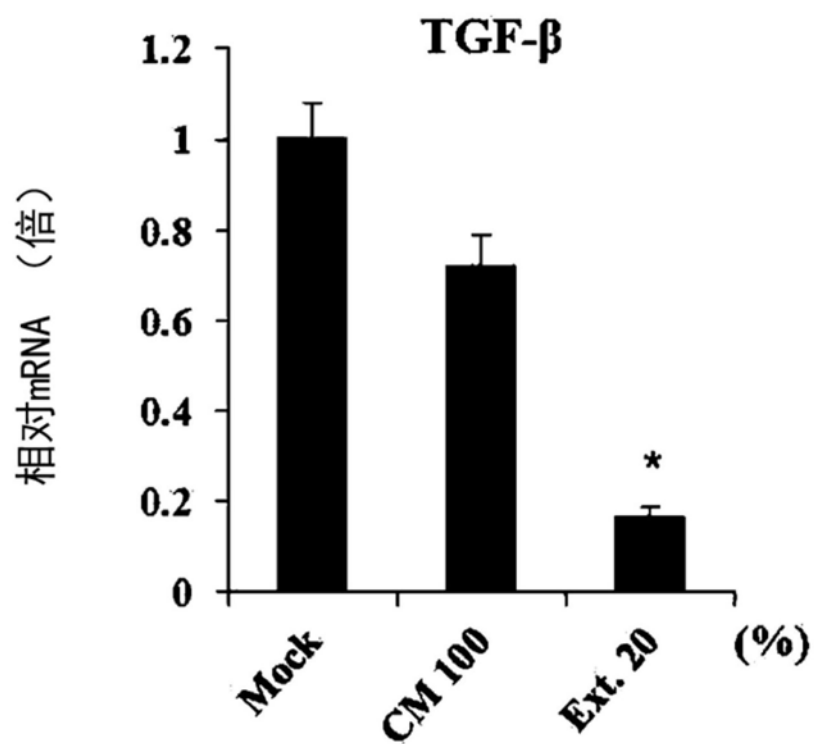


图6a

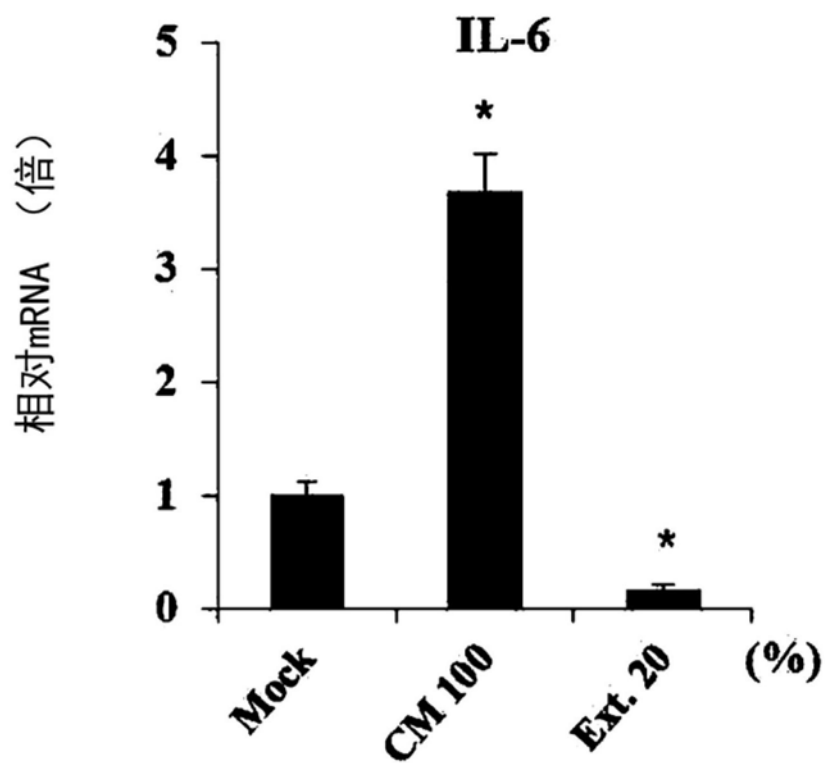


图6b

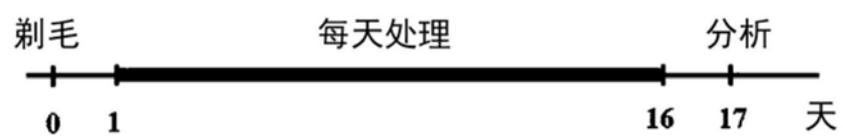


图7a

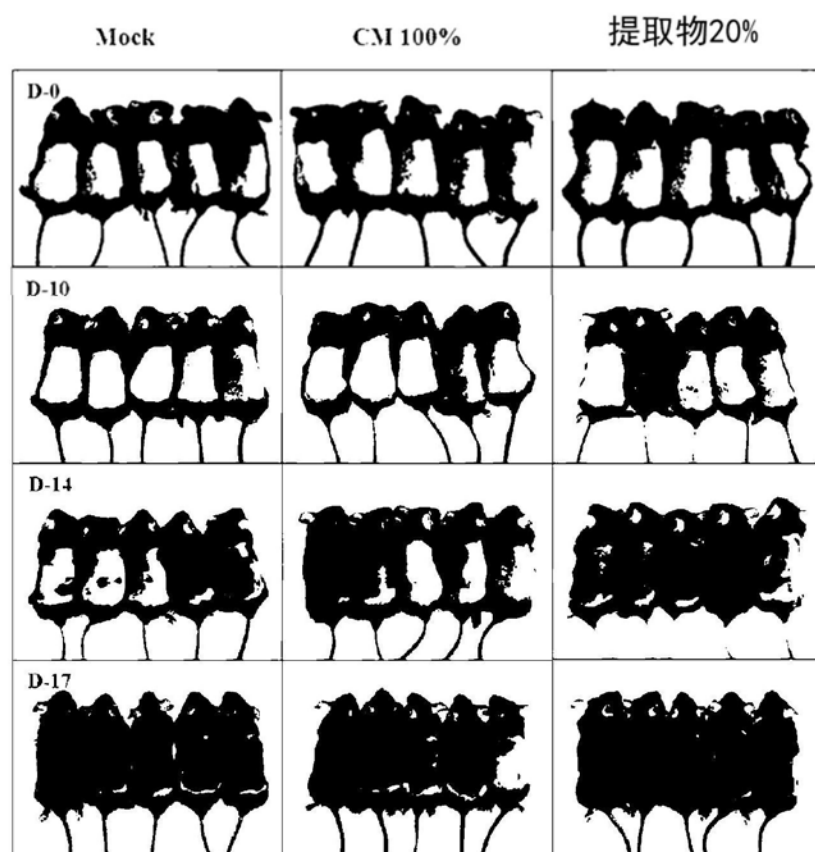


图7b

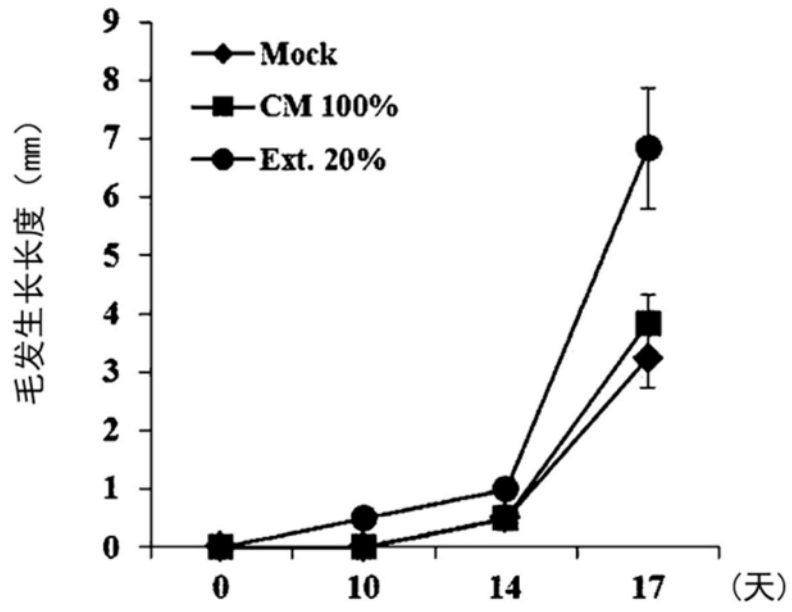


图8a

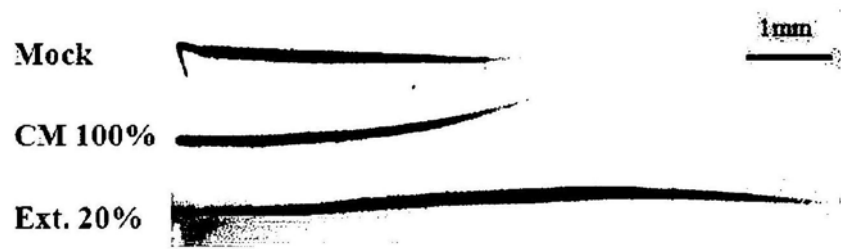


图8b

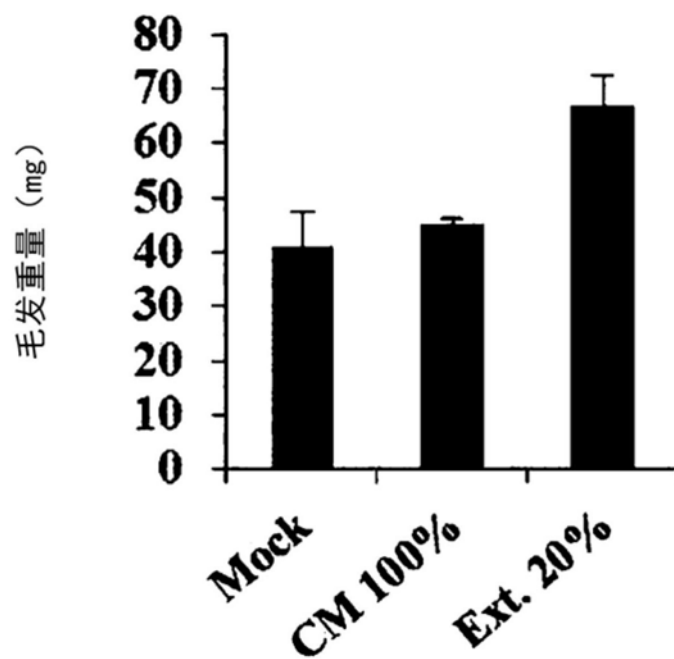


图8c

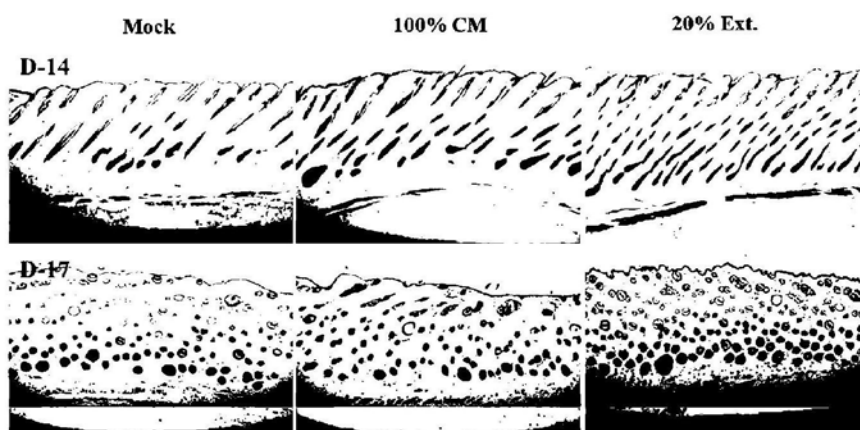


图9a

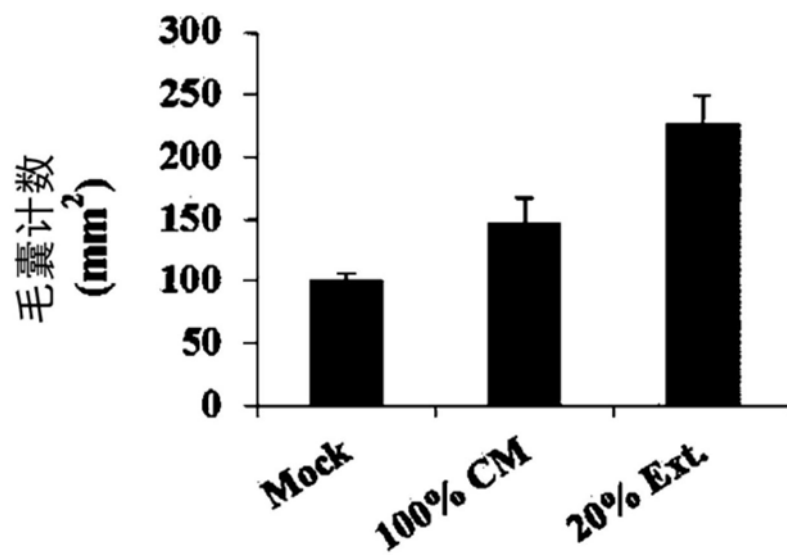


图9b

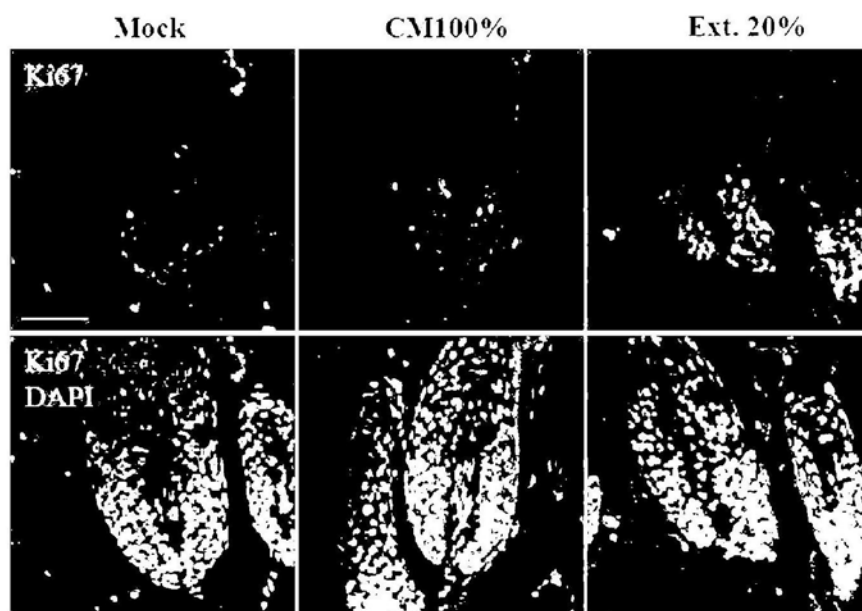


图10a

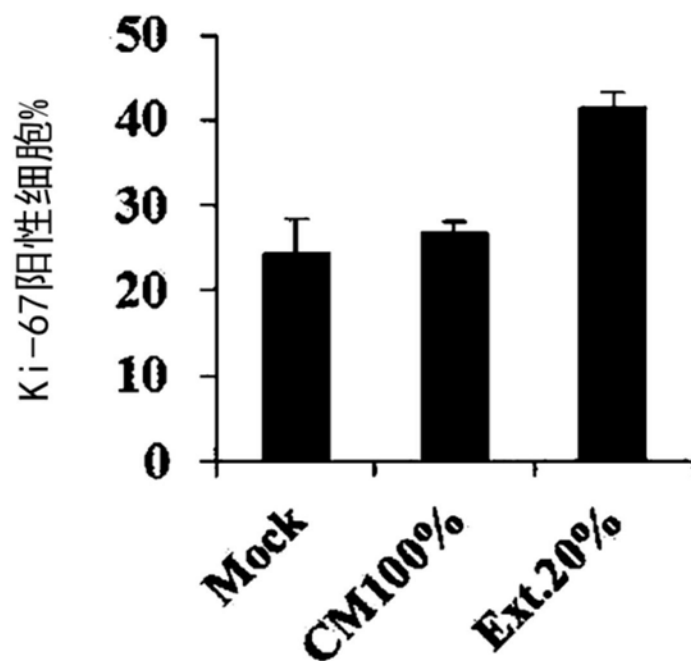


图10b

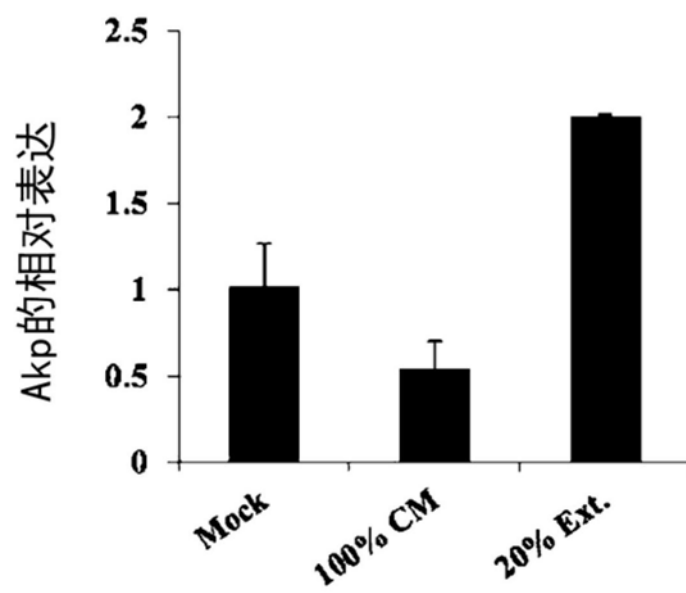


图11

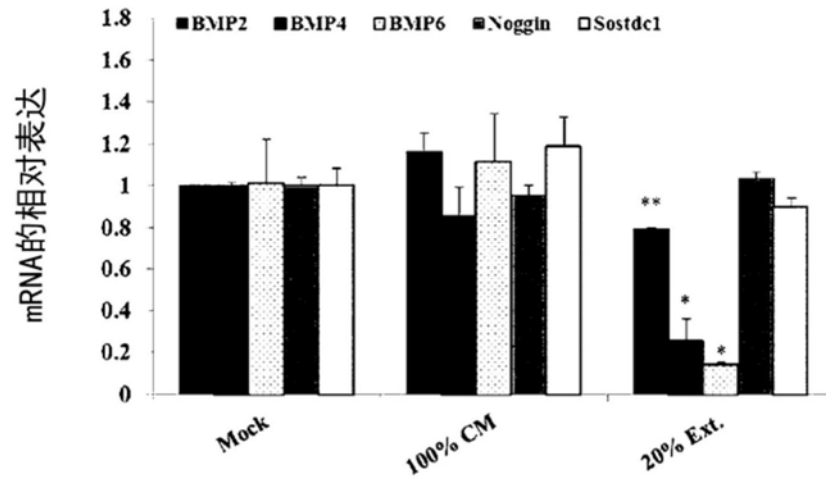


图12

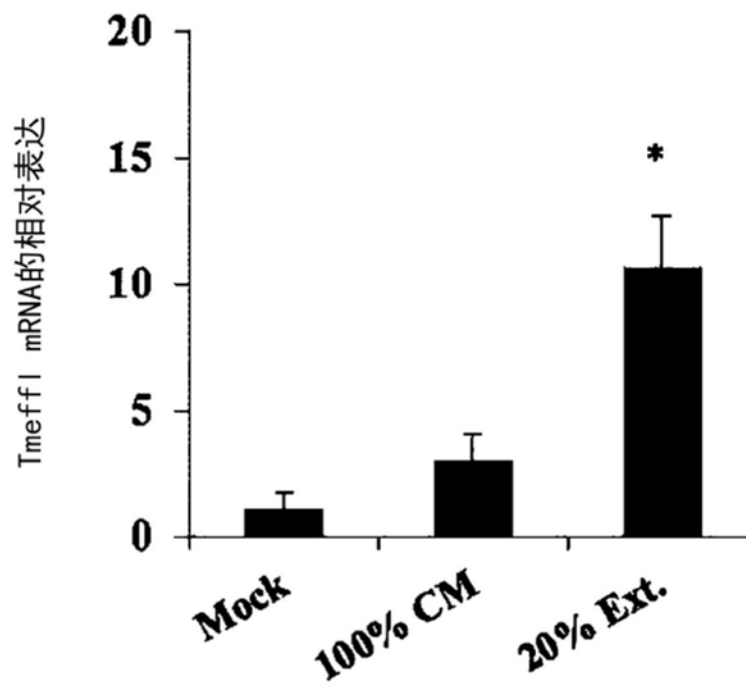


图13a

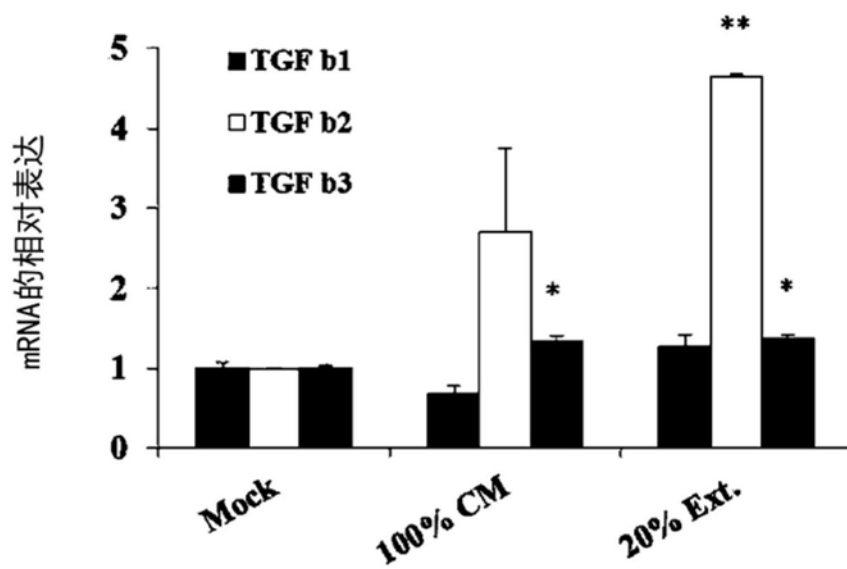


图13b

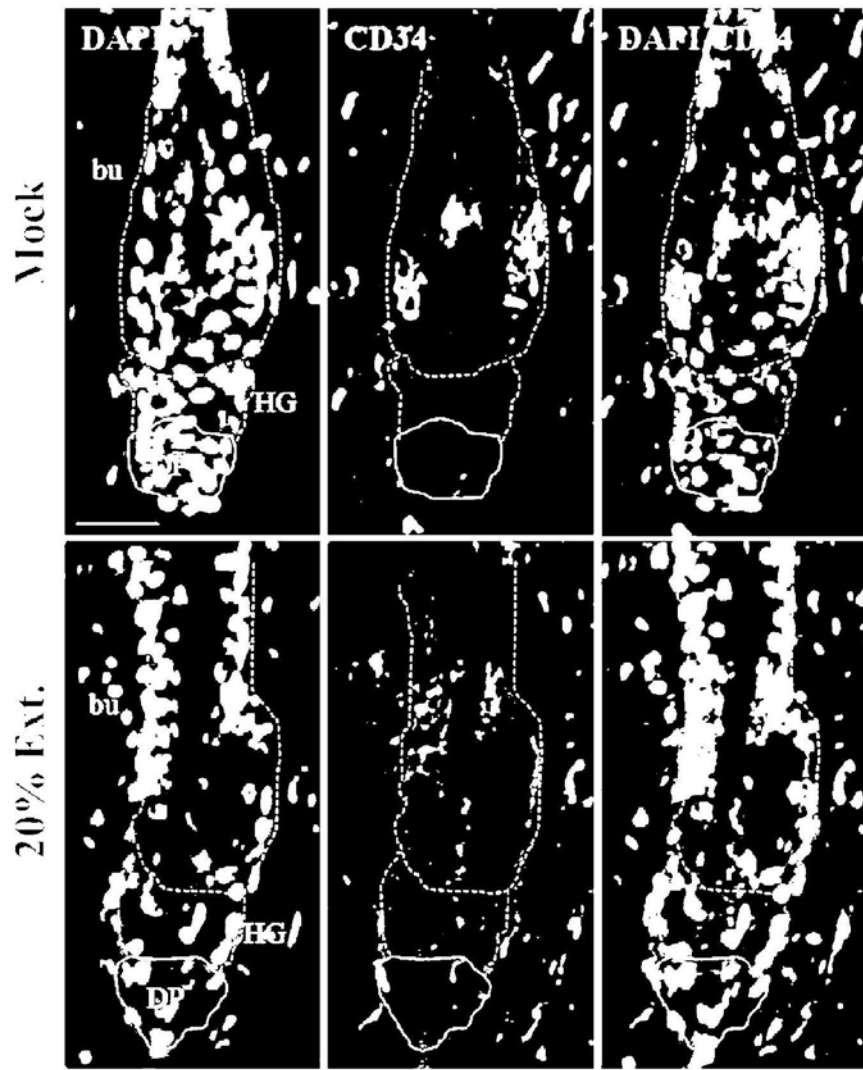


图14