



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102292434 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 12

(21) 申请号 200980154241. 9

(22) 申请日 2009. 11. 02

(30) 优先权数据

08425708. 8 2008. 11. 04 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 07. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2009/064468 2009. 11. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/052192 EN 2010. 05. 14

(73) 专利权人 弗雷森纽斯医疗护理德国有限责
任公司

地址 德国贝德霍姆堡

(72) 发明人 G·卡姆西 S·布鲁诺
B·布索拉蒂

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 刘辛 郭文洁

(51) Int. Cl.

C12N 5/074 (2006. 01)

C12N 5/071 (2006. 01)

A61P 13/12 (2006. 01)

A61K 35/23 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008045498 A1, 2008. 04. 17,

WO 2007125088 A3, 2008. 01. 10,

KE Schwab, 等. Co-expression of
two perivascular cell markers isolates
mesenchymal stem-like cells from human
endometrium. 《Human Reproduction》. 2007, 第
22 卷(第 11 期), 2903-2911.

Londolfo da Silva Meirelles,
等. Mesenchymal stem cells reside in
virtually all post-natal organs and
tissues. 《Cell Science》. 2006, 第 119 卷(第
11 期), 2204-2213.

Stefania Bruno, 等. Isolation and
Characterization of Resident Mesenchymal
Stem Cells in Human Glomeruli. 《Stem
Cells and Development》. 2009, 第 18 卷(第 6
期), 867-880.

Costanza Sagrinati, 等. Isolation and
Characterization of Multipotent Progenitor
Cells from the Bowman's Capsule of Adult
Human Kidneys. 《Journal of the American
Society of Nephrology》. 2006, 第 17 卷(第 9
期), 2443-2456.

审查员 刘铮

权利要求书2页 说明书16页 附图4页

(54) 发明名称

源自成人肾小球的分离的多潜能间充质干细
胞(hGL-MSC)、其制备方法及其在肾脏再生医学
中的用途

(57) 摘要

本发明涉及源自成人肾脏的分离的多潜能肾
小球间充质干细胞(hGL-MSC), 其特征在于标志
物特征谱 CD133⁻、CD146⁺、CD34⁺ 和 CD105⁺。还公
开了从脱被膜的肾小球制备本发明的 hGL-MSC 的
方法, 以及本发明的 hGL-MSC 用于肾脏的再生性
治疗, 尤其是用于治疗影响肾小球的损伤或疾病
的用途。

1. 源自成人肾脏脱被膜肾小球的分离的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC), 其特征在于细胞标志物表达特征谱 CD133 阴性、CD146 阳性、CD34 阴性、CD105 阳性和 CD24 阳性和 Pax-2 阳性, 其特征还在于分化成至少下列细胞类型的能力: 足细胞、内皮细胞和系膜细胞。

2. 根据权利要求 1 的源自成人肾脏脱被膜肾小球的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC), 其还能够进行成骨、成脂肪和成软骨分化。

3. 根据权利要求 1 的源自成人肾脏脱被膜肾小球的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC), 其对于标志物 α -SMA 和 Oct-4 是阴性的。

4. 根据权利要求 1-3 的任意项的源自成人肾脏脱被膜肾小球的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC), 其对于标志物 CD45 是阴性的。

5. 根据权利要求 1-3 的任意项的源自成人肾脏脱被膜肾小球的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC), 其对于标志物 CD31 是阴性的。

6. 根据权利要求 1-3 的任意项的源自成人肾脏脱被膜肾小球的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC), 其对于下列表面标志物是阳性的: CD29、CD44、CD73、CD90 和 CD166。

7. 根据权利要求 1-3 的任意项的源自成人肾脏脱被膜肾小球的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC), 其对于标志物 Nanog 和 Musashi 是阳性的。

8. 根据权利要求 1-3 的任意项的源自成人肾脏脱被膜肾小球的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC), 其对于波形蛋白和巢蛋白是阳性的, 并且对于细胞角蛋白是阴性的。

9. 根据权利要求 1-3 的任意项的源自成人肾脏脱被膜肾小球的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC), 其组成型表达 I 类 MHC 抗原并且对于 II 类 MHC 抗原是阴性的。

10. 根据权利要求 9 的源自成人肾脏脱被膜肾小球的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC), 其对于共刺激分子 CD80、CD86 和 CD40 是阴性的。

11. 制备根据权利要求 1-10 的任意项的源自成人肾脏脱被膜肾小球的分离的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC) 的方法, 其包括下列步骤:

- 在不存在能够引导干细胞分化的特定生长因子的情况下, 在包含含有血清的动物细胞培养基并且在生理 pH 缓冲的增殖培养基中培养来自成人肾脏的脱被膜的肾小球, 从而获得从培养的脱被膜的肾小球中长出的细胞的混合群体, 所述细胞的混合群体包含纺锤形的 CD133 阴性、CD146 阳性细胞和 CD133 阳性、CD146 阳性细胞; 和

- 从所述混合群体中分离纺锤形的 CD133 阴性、CD146 阳性细胞, 所述纺锤形的 CD133 阴性、CD146 阳性细胞即代表所需的源自成人肾脏脱被膜肾小球的人类多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC)。

12. 权利要求 11 的方法, 其中所述纺锤形 CD133 阴性、CD146 阳性细胞分离自细胞培养物的至少第 3 次传代。

13. 权利要求 11 或 12 的方法, 其中所述 CD133 阴性、CD146 阳性细胞是根据它们的纺锤形状的形态分离的。

14. 权利要求 11 或 12 的方法, 其中所述 CD133 阴性、CD146 阳性细胞是通过细胞分选方法分离的。

15. 用于肾损伤的治疗性处理的根据权利要求 1 的源自成人肾脏脱被膜肾小球的分离的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC)。

16. 用于肾小球损伤的治疗性处理的根据权利要求 15 的源自成人肾脏脱被膜肾小球的分离的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC)。

17. 用于肾损伤的治疗性处理的药物组合物,其包含根据权利要求 1-10 的任意项的分离的人类肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC) 和药学上可接受的载体、稀释剂和 / 或介质。

源自成人肾小球的分离的多潜能间充质干细胞 (hGL-MSC)、其制备方法及其在肾脏再生医学中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及多潜能的人类间充质干细胞,其源自成人肾脏的脱被膜的肾小球并且显示出分化成多种细胞类型尤其是肾小球细胞类型的能力,同时,其特征在于显著的自我更新和克隆生成能力。此外,本发明涉及制备本发明的多潜能人类间充质干细胞的方法和此类干细胞在再生医学尤其是肾损伤和疾病的治疗性处理中的用途。

背景技术

[0002] 已知干细胞移植具有修复和再生受损的或损伤的组织和器官的潜力。因此,近年来已经进行了深入的研究,以便从人类和动物来源鉴定并分离新的多潜能干细胞,并研究干细胞在临床应用尤其是再生医学中的有效性。

[0003] 例如,基于 BrdU 保留,Oliver 等人 [3] 在成年啮齿类动物的肾乳头中鉴定出缓慢循环的干细胞。使用相同的方法,Maeshima 等人 [4] 在成年大鼠的肾小管中鉴定出 BrdU 标记的细胞并显示出此类干细胞生成邻近的肾小管的潜力,以及当被移植进入后肾时收集管细胞或纤维母细胞的潜力。Kitamura 等人建立并表征了来自成年大鼠肾脏的肾单位的 S3 部分的肾祖细胞的独特群体 [37]。这些细胞显示为具有自我更新能力并表达肾胚胎标志物,例如 Pax2、Wtn4 和 Wtn1。基于挤出 Hoechst 染料的能力,在小鼠胚胎和成人肾脏中鉴定出了具有多潜能潜力的所谓的“边缘群体 (side population)” [38]。最近,Gupta 等人证明:在成年大鼠肾脏中存在多潜能肾祖细胞的常驻于肾脏中的群体,其表达胚胎干细胞标志物,例如 Oct-4 和 Pax-2 [5]。然而,鉴于它们的来源是动物,这些多潜能肾脏干细胞不能用于与人类组织或器官的再生相关的临床应用。

[0004] 在参考文献 [39] 中已经公开了从胚胎性人类肾脏中鉴定出的多潜能的 CD133⁺CD24⁺ 干细胞群。然而,这些胚胎干细胞不是解决提供用于再生医学的人类干细胞这一问题的最佳方案,尤其是考虑到与胚胎干细胞系以及从人类胚胎来制备它们相关的伦理学问题。

[0005] 本发明人之前公开:在成人肾脏中存在 CD133⁺ 祖细胞 / 干细胞的常驻群体 [1]。发现这些 CD133⁺ 细胞是在靠近近侧肾小管和肾小球的间质中或肾小管内的稀少细胞,并且显示它们在体外和体内经历肾上皮和内皮分化。最近,Sagrinati 等人从成年肾脏的鲍曼氏囊中分离并表征了多潜能 CD133⁺CD24⁺ 细胞群 [2]。然而,在人类肾脏中鉴定的 CD133⁺ 祖细胞 / 干细胞的特征在于自我更新能力差。此外,没有证明此类干细胞具有分化成存在于肾小球中的多种细胞类型即足细胞、内皮细胞和系膜细胞的能力。

[0006] Schwab 等人, Human Reproduction(Oxford), vol. 22, no. 11, 2007 年 11 月, 第 2903-2911 页公开了子宫内膜的 CD146+PDGF-R β +CD34⁺ 间充质干细胞,其显示出 MSC 的经典分化能力,即分化为成脂肪、成骨、成软骨和成肌谱系。该论文没有提及进一步的分化能力。然而,这些细胞的子宫内膜来源强烈说明,它们不具有产生肾小球细胞类型例如足细胞、系膜细胞和内皮细胞的能力。

[0007] WO 2008/045498 公开了源自肾脏的 CD34+CD133-CD105- 细胞群,其能够分化成脂肪细胞和成骨细胞。然而,没有公开其分化成肾小球细胞类型。

[0008] 间充质干细胞 (MSC) 的特征在于它们分化成间充质来源的不同细胞系的能力 [7]。间充质干细胞的主要贮库是骨髓 (BM) [8]。然而,最近在鼠模型中获得的数据证明了 MSC 区室的更广泛的分布。事实上,已经在几乎所有的鼠成年组织 (脾、肌肉、肾、肺、肝、脑、胸腺) 以及血管壁中检测到了 MSC [6]。在人类中,已经从循环的血液以及从数种组织例如滑膜、脂肪组织、骨小梁、牙髓、真皮和肺中分离了 MSC [9-16]。然而,目前为止尚未研究过人类肾小球中 MSC 的存在。

发明内容

[0009] 鉴于以上所述,需要源自成人肾脏的间充质干细胞,其能够分化为存在于肾小球中的多种细胞类型并且能够自我更新,从而成功应用于肾的再生医学,尤其是作为药物用于影响人类肾脏的损伤和 / 或疾病、更具体而言是影响肾小球的损伤和 / 或疾病的治疗性处理。

[0010] 通过分离的多潜能人类间充质干细胞实现了这些和其它目标,所述细胞是由本发明确在成人肾脏的脱被膜的肾小球中鉴定并分离的。

[0011] 因此,本发明的第一个方面是源自成人肾脏的分离的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC),其特征在于其为 CD133 (阴性)、CD146 (阳性)、CD34 (阴性) 和 CD105 (阳性)。

[0012] 有利地,源自成人肾脏的分离的多潜能肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC) 能够分化成肾小球细胞类型,即足细胞、系膜细胞和内皮细胞。

[0013] 在本发明的优选的实施方式中, hGL-MSC 的特征还在于,其是 CD24 (阳性) 和 Pax-2 (阳性)。

[0014] 在本发明的优选的实施方式中, hGL-MSC 的特征还在于,其是 α -SMA (阴性) 和 Oct-4 (阴性)。

[0015] 本发明的另一个方面是制备本发明的 hGL-MSC 的方法,其包括以下步骤:

[0016] - 在不存在特定生长因子的情况下,在包含含有血清的动物细胞培养基并且在生理 pH 缓冲的增殖培养基中培养来自成人肾脏的脱被膜的肾小球,从而获得从培养的脱被膜的肾小球中长出的细胞的混合群体,所述细胞的混合群体包含纺锤形的 CD133 (阴性)、CD146 (阳性) 细胞和 CD133 (阳性)、CD146 (阳性) 细胞;和

[0017] - 从所述混合群体中分离纺锤形的 CD133 (阴性)、CD146 (阳性) 细胞,所述纺锤形的 CD133 (阴性)、CD146 (阳性) 细胞即代表本发明的 hGL-MSC。

[0018] 根据优选的实施方式,所述增殖培养基在 6.8 至 7.4、更优选 7.2 至 7.4 的 pH 范围内缓冲。可以使用能够将 pH 维持在生理范围内的任意缓冲剂,例如 Hepes、PBS 等。

[0019] 在另一个优选的实施方式中,所述代表本发明的 hGL-MSC 的纺锤形的 CD133 (阴性)、CD146 (阳性) 细胞分离自细胞培养物的至少第 3 次传代,或分离自细胞培养物的后续传代,例如,第 4 次传代、第 5 次传代、第 6 次传代等。该实施方式是基于以下事实:纺锤形的 CD133 (阴性)、CD146 (阳性) 细胞是在上述培养条件下,细胞培养物第 3 次传代后发现存活的混合群体中的唯一细胞类型。

[0020] 在本发明的实施方式中,所述纺锤形的 CD133 (阴性)、CD146 (阳性) 细胞是通过

例如 FACS 的细胞分选方法从混合群体中分离的。或者,可以基于它们的纺锤形状的形态进行分离。

[0021] 有利地,本发明的 hGL-MSC 的特征在于显著的自我更新和克隆生成能力,以及分化成多种肾小球细胞类型的能力,所述肾小球细胞类型包括但不限于内皮细胞、系膜细胞和足细胞。这些特征使本发明的 hGL-MSC 特别适合用于肾再生。

[0022] 因此,本发明的另一个方面是本发明的分离的人类肾小球间充质干细胞(hGL-MSC)作为药物用于肾脏损伤或疾病、尤其是影响肾小球的损伤或疾病的治疗性处理的用途。

[0023] 本发明的另一个方面是包含本发明的分离的人类肾小球间充质干细胞(hGL-MSC)和药学上可接受的载体、稀释剂和/或介质的药物组合物。包含本发明的人类肾小球间充质干细胞(hGL-MSC)的药物组合物特别适合用于治疗肾脏损伤或疾病、尤其是影响肾小球的损伤或疾病。

附图说明

[0024] 本发明的其它优点和特征将通过以下详细描述并参考附图而变得明显,其中:

[0025] 图 1 显示了从肾小球中长出的细胞的形态和生长速率。显示了培养 24 小时(A)、7 天(B)、2 周(C)和 3 周(D)后以胶原酶 I 处理而除掉鲍曼氏囊,培养物中的成人肾小球的代表性显微图像(放大 200 倍)。显示了 5 种不同制备物(称作 R136、R140、R141、R147 和 R148)的生长曲线。

[0026] 图 2 涉及本发明的 hGL-MSC 的表征。A) 代表性的 FACS 分析,其显示:hGL-MSC 对于 MSC 的特征性表面标志物(CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD166)是阳性的,对于 CD133 和特异性造血标志物(CD45 和 CD34)是阴性的,并且对于内皮标志物(CD31)是阴性的。虚线是同种型对照。B) 以针对波形蛋白、巢蛋白、Nanog 和 Musashi 的抗体染色的 hGL-MSC 的代表性的免疫荧光显微图像(放大 600 倍)。产生的所有的 hGL-MSC 系都显示出相同的表型。

[0027] 图 3 显示了 hGL-MSC 的免疫调节性质及其克隆效率。A) 代表性的 FACS 分析,其显示 hGL-MSC 对于 II 类抗原和粘附分子 CD154 以及共刺激分子 CD80、CD86 和 CD40(黑线)是阴性的。虚线是同种型对照。B) 加入骨髓间充质干细胞(BM-MSC)或本发明的人类肾小球间充质干细胞(hGL-MSC)抑制了 PHA 诱导的 PBMC 增殖。在存在 $2.5 \mu\text{g}/\text{m}$ PHA 的情况下,在含有或不含 $5 \times 10^3/\text{ml}$ BM-MSC 或 hGL-MSC 的情况下,培养 PBMC($5 \times 10^4/\text{ml}$) 48 小时。数据表示为平均值 $\pm$ 一式三份的 4 次独立实验的 SD。 $*p < 0.05$ (Student t 检验)。C) 克隆生成效率表示为在每次培养传代中获得的克隆的百分率(%)。

[0028] 图 4 是代表性的共聚焦显微图像,其显示了:A) CD146 和 CD24 在肾小球中的共表达(箭头);B) CD133 在鲍曼氏囊的壁细胞中的表达(箭头)以及在近侧肾小管的上皮细胞中的表达(星号);C) 在肾小球 CD146(阳性)和 CD24(阳性)细胞中不存在 CD133 的表达(箭头)。原始放大 630 倍。

具体实施方式

[0029] 本发明人进行的研究旨在探究在成人脱被膜的肾小球中是否存在间充质干细胞,

以及此类干细胞是否是常驻群体。此外,本发明人评估了源自肾小球的 MSC 的分化潜力,尤其是分化为肾小球细胞类型例如足细胞、内皮细胞和系膜细胞的潜力。

[0030] 如在说明书的实验部分更详细地公开的那样,本发明的间充质干细胞 (hGL-MSC) 获自通过手术方式切除的人类肾脏的皮层的正常部分。分离皮层并通过分级的连续网孔之后,收集肾小球悬浮液,洗涤并通过机械和酶处理除掉鲍曼氏囊。将脱被膜的肾小球 (图 1A) 在含有血清的缓冲的增殖培养基中在非分化条件下培养,也就是说,在不存在能够引导干细胞分化的特定生长因子的条件下培养。

[0031] 在 7 天内,观察到肾小球中长出粘附细胞 (图 1B)。到第 12-14 天时达到汇合时,通过胰蛋白酶-EDTA 处理剥离细胞单层。通过低速离心除掉肾小球残留物,将细胞在相同的增殖培养基中增殖。在最初的培养阶段,细胞培养物中具有形态上的异质性 (图 1C),但是在大约 3 周 (即大约第 4 次传代) 后,培养物变成单一形态的具有纺锤形的细胞 (图 1D)。图 1E 显示了 5 种不同的细胞制备物的生长曲线。在前 5 次传代过程中,生长速率低,但是随着连续的亚培养而增加,直至第 20 次传代 (培养大约 100 天),此时细胞不能再增殖。传代之间的间隔是大约 3 至 7 天,直至第 4 次传代,在第 4 次传代之后,传代之间的间隔设定为大约 7 天。

[0032] 从脱被膜的肾小球中长出的纺锤形的细胞是本发明的人类肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC)。因此,可以基于它们的形态学特征从细胞培养物中分离这些干细胞,优选从细胞培养物的至少第 3 次传代或细胞培养物的后续传代,例如,第 4 次传代、第 5 次传代、第 6 次传代分离。

[0033] 本发明人还观察到,从脱被膜的肾小球中长出的细胞是混合的群体,其在早期细胞传代 (1-3) 时包含 $31 \pm 11\%$ CD133 (阳性) 和 $74 \pm 26\%$ CD133 (阴性) 细胞 ($n = 15$ 个制备物),如通过流式细胞术所检测。两种细胞群体都表达 CD146。

[0034] 因此,作为形态学方法的替代,可以通过细胞分选方法,例如荧光激活的细胞分选 (FACS) 来分离本发明的人类肾小球间充质干细胞 (hGL-MSC)。优选地,通过 FACS 从第 2 次、第 3 次或第 4 次传代分离 CD133 (阳性)、CD146 (阳性) 细胞和 CD133 (阴性)、CD146 (阴性) 细胞;然而,也可以从任意细胞传代甚至在亚传代之前分离它们。

[0035] 表征并克隆 FACS 分选的群体。

[0036] 发现 $CD133^+CD146^+$ 细胞共表达标志物 CD31 和 vWF,这表明其为内皮细胞表型。这种 $CD133^+$ 群体不共表达巢蛋白 (数据未显示),也不共表达 MSC 标志物,例如波形蛋白、CD73、CD29 或 CD166 (数据未显示)。当从经消化的脱被膜的肾小球的细胞悬浮液中通过免疫磁性分选 $CD133^+$ 细胞群体时,观察到相同的表型 (数据未显示)。当在存在增殖培养基的条件下在第 4 次传代后表征从肾小球中长出的细胞时,无法再检测到 $CD133^+$ 细胞。

[0037] 分选的 $CD133^-CD146^+$ 细胞对于 MSC 的特征性表面标志物 (包括 CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 和 CD166) [25] 是阳性的,并且对于 CD133 和特定的造血标志物 (CD45 和 CD34) 以及对于内皮标志物 (CD31) 是阴性的 (图 2A)。通过免疫荧光发现,这些细胞表达 MSC 特异性标志物波形蛋白和神经及肝脏常驻干细胞标志物巢蛋白 [26, 27, 28], 显示出细胞质丝状模式 (图 2B)。该细胞群体不表达上皮标志物细胞角蛋白和 E- 钙粘附蛋白。它也不表达通常由特化的肾小球细胞表达的其它标志物,例如 α SMA (但是系膜细胞表达 α SMA) 或 nephrin (但是足细胞表达 nephrin) (数据未显示)。这些特征表明不存在污染性的肾小球

细胞。

[0038] 还评估了标志物 Nanog、Oct-4 和 Musashi 的表达。这些分子是已知的参与胚胎和成体干细胞的自我更新和多能性的转录因子 [29-33]。本发明的干细胞群显示出 Nanog 和 Musashi 二者的细胞核-细胞质表达 (图 2B), 而它不表达 Oct-4 (未显示)。

[0039] 还显示 hGL-MSC 组成型表达 I 类 MHC 抗原 (图 2A), 但是它们对于 II 类抗原、对于粘附分子 CD154 以及对于共刺激分子 CD80、CD86 和 CD40 是阴性的 (图 3A), 如对于 BM-MSC 所描述的那样 [34]。此外, 类似于 BM-MSC (已知其抑制 PHA 诱导的 PBMC 增殖), hGL-MSC 使 PHA 诱导的 PBMC 增殖显著减少 (图 3B)。然而, 不同于 BM-MSC 的是, hGL-MSC 是 CD24 (阴性) 和 Pax-2 (阳性) 的。此外发现, 本发明的 hGL-MSC 对于 α -SMA 和 Oct-4 都是阴性的, 这不同于分离自小鼠肾脏的肾干细胞。

[0040] 为了证明从肾小球获得的 hGL-MSC 群体的自我更新能力, 本发明人在分选的 CD133⁺CD146⁺ 和 CD133⁻CD146⁺ 细胞上进行了克隆生成测定。将单细胞悬浮液接种于 96 孔板中, 分选在增殖培养基中的培养物的第 3 次传代时从肾小球中长出的细胞。CD133⁻CD146⁺ 细胞的克隆生成效率是 $25.3 \pm 5.1\%$, 而 CD133⁺CD146⁺ 细胞不是克隆生成性的 (图 3C)。从 CD133⁻CD146⁺ 细胞的原代克隆产生的单细胞悬浮液的接种提供了次级克隆, 从次级克隆产生的单细胞的接种产生三级克隆 (图 3C)。这些数据表明: 肾小球的 CD133⁻CD146⁺ 细胞是克隆生成性的并且在体外显示出自我更新能力, 而 CD133⁺CD146⁺ 细胞在这些培养条件下不能产生克隆。通过流式细胞术和免疫组化方法分析了 CD133⁻CD146⁺ 克隆, 其显示出与源自未克隆的群体的 hGL-MSC 相同的间充质表型 (数据未显示)。当在存在增殖培养基的条件下在第 4 次传代后表征从肾小球长出的未分选的细胞时, 它们都显示出间充质表型, 这表明所用的培养条件对于 hGL-MSC 的增殖是选择性的。

[0041] 本发明人还进行了旨在研究本发明的 GL-MSC 是否是常驻于肾的群体而非定位于肾小球的源自 BM 的 MSC 群体的实验。为此目的, 首先检测了由常驻干细胞和源自 BM 的干细胞差别化表达的标志物的存在。hGL-MSC 表达 CD24, 但是 CD24 在源自 BM 的 MSC 中是阴性的并且被认为是常驻于肾的干细胞的标志物 [2, 35]。器官特异性胚胎 Pax-2 蛋白和基因的表达也说明 hGL-MSC 的起源是肾。BM-MSC 不表达 Pax-2。Pax-2 是由后肾间充质的干细胞表达的转录因子 [36], 是由分离自成年大鼠和人类肾脏的干细胞表达的转录因子 [1, 5]。此外, 本发明人从由男性供体移植进入女性接受者的移植的肾脏的肾小球分离了 hGL-MSC。源自移植的肾脏的 hGL-MSC 显示出与源自正常肾脏的 hGL-MSC 相同的表型 (数据未显示)。为了测定 hGL-MSC 是源自接受者骨髓还是源自移植的肾脏, 在第 2 次和第 6 次传代时分析了 hGL-MSC 中的 Y 染色体的存在情况。在第 2 次传代 (478 个细胞核; 23 个中期) 和第 6 次传代 (436 个细胞核; 25 个中期) 时分析了总共 914 个细胞核和 48 个中期。双色 X (绿色) / Y (红色) 着丝粒探针的杂交模式的 FISH 分析显示: 90% 的细胞核具有男性红色 / 绿色模式, 10% 的细胞核仅具有 1 个绿色斑点。具有 1 个绿色斑点的细胞核可能源自丢失了 Y 染色体的男性细胞核, Y 染色体的丢失是培养中经常发生的事件。没有观察到女性细胞核 (2 个绿色斑点)。hGL-MSC 的所有 48 个中期中检测到的核型都是男性的。以用于 FISH 负染的 DAPI 观察到的中期染色体显示为正常的。这些数据说明: hGL-MSC 不是来源于接受者的骨髓。相反, 它们是供体肾脏的肾小球中的常驻群体。

[0042] 由于间充质干细胞的最主要的特征之一是它们的分化成多种间充质谱系的能力,

本发明人测评了本发明的 hGL-MSC 分化成特定的结缔组织细胞的能力。在确定的培养条件下,显示了在第 2 个或第 3 个传代分选的 CD133⁺CD146⁺ 群体不能分化为成脂肪、成骨和成软骨谱系(数据未显示)。相反,显示了获自 15 位患者的最初的 CD133⁻CD146⁺hGL-MSC 系(在第 4-10 次传代)和随后获得的 4 个克隆具有多谱系分化能力。

[0043] 在成骨培养基中培养 14 天后, hGL-MSC 有效地进行成骨分化, 如钙沉淀物的 Alizarin Red 染色所显示。

[0044] 当在脂肪细胞培养基中培养 21 天时, hGL-MSC 产生含有脂滴的细胞。在未分化的对照中, 未观察到矿化或脂滴的迹象。

[0045] 使用软骨细胞选择性培养基 [7] 获得了 hGL-MSC 向软骨细胞的分化。在处理的第 28 天收获的分化的沉淀物被 Safranin O 和 Alcian 蓝染色, 这是软骨细胞分化的典型特征 [7]。

[0046] 综上所述, 这些结果证明了本发明的 hGL-MSC 的多谱系分化能力。值得注意的是, 以最初分离的 15 个 hGL-MSC 系和随后获自最初的细胞系的 4 个克隆获得了非常相似的结果。

[0047] 还评估了 hGL-MSC 在合适的培养条件下分化为特定的肾小球细胞群体例如内皮细胞、足细胞和系膜细胞的能力。为了获得内皮的分化, 将 hGL-MSC 在 EBM 中在存在 VEGF 的情况下培养 3 周。流式细胞术分析显示出特定的内皮标志物例如 CD105、KDR、CD34 和 CD31 的表达。此外, 当在 Matrigel 中培养时, 内皮分化的 hGL-MSC 和非分化的细胞形成特征性的毛细管样结构(数据未显示)。在存在 PDGFbb 和 TGFβ1 的情况下, hGL-MSC 获得了系膜样表型。特别地, 它们获得了 α-SMA 和血管紧张素 2 受体 1(AT1) 的表达。当在存在 20 μM/L ATRA 的情况下培养 3 周时, hGL-MSC 获得了特定的上皮标志物的表达, 所述上皮标志物是足细胞表达的标志物例如细胞角蛋白、podocin、nephrin 和突触极蛋白。通过实时 PCR 确认了 nephrin 的表达, 其显示在分化成足细胞后的 hGL-MSC 中存在 nephrin 转录物, 但在维持在阻止分化的增殖培养基中的 hGL-MSC 中不存在。测试的 3 个克隆的细胞系获得了相似的结果。

[0048] 在所有的实验条件下, 分化的细胞丧失了干细胞性质相关的标志物, 例如 Nanog、Musashi、波形蛋白、巢蛋白、CD90、CD146、CD73, 系膜和内皮分化的细胞除外, 它们保持了通常由成熟细胞表达的 CD90 和 CD146(数据未显示)。所有的 hGL-MSC 细胞系和克隆都显示出相同的分化能力。源自 BM 的 MSC 在相同培养条件下能够分化成内皮细胞和肌肉样细胞, 但是不分化成足细胞样细胞(数据未显示)。

[0049] 总之, 本发明人研究了预先脱被膜的人类肾小球中干细胞的存在, 脱被膜是为了避免与鲍曼氏囊相关的干细胞的存在。发现在早期传代时从脱被膜的肾小球长出的细胞由 2 个不同群体组成: CD133⁺CD146⁺ 群体和 CD133⁻CD146⁺ 群体。CD133⁺ 细胞很可能是内皮定向的细胞群体, 因为它们共表达内皮标志物。此外, CD133⁺CD146⁺ 细胞在第 3 次传代后不存活。另外, 当分选 CD133⁺CD146⁺ 群体时, 其不能够自我更新并且不是克隆生成性的。

[0050] 相反, 发现从脱被膜的人类肾小球分离和克隆的 CD133⁻CD146⁺ 群体是能够产生长期培养物的间充质干细胞的多潜能群体。有趣的是, 它们是从肾小球中长出的在第 4 次细胞传代培养后唯一存活的细胞。这些细胞被称作 hGL-MSC。hGL-MSC 与源自 BM 的 MSC 以及源自其它成体组织的 MSC[9-16, 26-28] 共有下列特征: 表达 CD29、CD44、CD166、CD73、CD90、

CD105、CD146、波形蛋白和巢蛋白；无 CD34 和 CD45；进行中胚层分化的能力（骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞）。此外，hGL-MSC 表达参与细胞维持的 Nanog 和 Musashi 胚胎标志物。类似于源自 BM 的 MSC，hGL-MSC 能够抑制 PHA 诱导的 PBMC 的增殖。来自成年小鼠的非肾小管 Sca-1⁺lin⁻ 多潜能干细胞 / 祖细胞 [40] 和源自心脏、脾和外周脂肪的人类 MSC [41] 显示出类似的免疫调节效应。

[0051] 成体器官中的 MSC 的起源是有争议的。在本研究中，本发明人发现：分离的 hGL-MSC 具有常驻于肾的干细胞的表型特征。事实上，与 BM-MSC 不同的是，hGL-MSC 表达 CD24，CD24 被认为是常驻于肾的祖细胞的标志物 [2, 35]，还表达 Pax-2 胚胎器官特异性转录因子 [1, 5, 36]。以前已经证明，Pax-2 的表达是常驻于肾的干细胞群体的标志物 [1, 5, 36]。此外，具有供体的性别特征的 hGL-MSC 在肾同种移植物中的存在提供了证据证明了局部常驻于成人肾小球中的 MSC 群体的存在。该结果与之前来自于肺移植研究的关于在人类肺中提供的常驻于组织的 MSC 的证据是一致的 [16]。

[0052] hGL-MSC 在合适的培养条件下分化成内皮细胞和分化成特定的肾小球谱系例如足细胞和系膜样细胞的能力显示出它的肾定向。事实上，当在存在 ATRA 和 IV 型胶原的情况下培养时，hGL-MSC 能够分化成表达特异于足细胞的裂孔隔膜的标志物例如 nephrin、突触极蛋白和 podocin 的上皮细胞。这与 BM-MSC 不同。

[0053] 通过在存在 TGF β 1 和 PDGF-bb（已经报道 TGF β 1 和 PDGF-bb 诱导源自 BM 的多潜能成年祖细胞中的平滑肌细胞分化 [20]）的混合物的情况下培养细胞，获得了 hGL-MSC 向肾小球系膜细胞的分化。此外，hGL-MSC 显示出免疫调节性质，因为它们抑制 PHA 刺激的 PBMC 的增殖，类似于 BM-MSC [23-25]。hGL-MSC 的免疫调节活性与炎性肾小球疾病相关。

[0054] 总之，本研究的结果证明在成人脱被膜的肾小球中存在常驻的多潜能干细胞的群体，其表达间充质表型，具有促成不同的肾小球特异性细胞类型的转变的潜力。

[0055] 在以下的实验部分更详细地描述了从成人肾小球中分离本发明的人类肾小球间充质干细胞以及它们的特征性特征，其仅是通过解释的方式提供，不是意在限制如随附的权利要求定义的本发明的范围。

[0056] 实验部分

[0057] 材料和方法

[0058] 源自人类肾小球和骨髓的间充质干细胞的分离和培养

[0059] 来自肾小球的人类间充质干细胞 (hGL-MSC) 获自通过手术切除的肾脏 (15 例不同的制备物) 的皮质的正常部分。分离皮质并通过分级的连续网孔 (60 和 120 孔) 之后，收集肾小球悬浮液，以 Hans Balanced Salt Solution (GIBCO, Grand Island, NY) 洗涤并通过机械方式和酶学方式除掉鲍曼氏囊，所述机械方式为使用 10ml 的吸液管进行数轮的吸液 / 排液，所述酶学方式为以胶原酶 I (Sigma, St. Louis, MO) 消化 2 分钟。将脱被膜的肾小球转移至纤连蛋白包被的 T25 培养瓶 (Falcon, BD Bioscience, Two Oak Park, Bedford, MA) 中。

[0060] 比较了数种培养基。在存在 1X ITS (Sigma) 和 Hepes (游离的酸, 10mM) (Sigma) 的情况下，含有 10% FCS (Euroclone, Wetherby, UK) 的 RPMI (Sigma) (增殖培养基) 允许 hGL-MSC 的最佳扩增，因此其被用于以下的实验。

[0061] 按照以前的描述从 BM 中分离人类 MSC 并进行培养 [7]。

[0062] 生长动力学

[0063] 按照之前的描述生成描述培养物动力学的生长曲线 [6]。为了简化起见,将原代 hGL-MS 培养物占据的生长面积 (对应于 25cm^2) 假设为 1。当发生第 2 次传代时,将第 1 次传代时的分传比 (1 : 3) 乘以该数值,也就是说,在第 1 次传代结束时,累积生长面积是 3 (即,原代培养物的占据的生长的 3 倍)。在第 2 次传代结束时,第 2 次传代时的分传比 (1 : 3) 乘以第 1 次传代时的累积生长面积 ($3 \times 3 = 9$)。对于每次传代都重复该程序,从而提供与细胞数目成正比的理论生长曲线。在 5 例不同的肾小球制备物中评测生长情况。

[0064] 源自肾小球的间充质干细胞的表征

[0065] 按照之前的描述进行细胞荧光测定分析 [1],使用下列抗体,其全部是藻红蛋白 (PE) 或荧光素异硫氰酸盐 (FITC) 缀合的:抗 -CD105、抗 -CD29、抗 -CD31、抗 -CD146、抗 -CD44、抗 -CD24、抗 -CD90 (Dakocytomation, Copenhagen, Denmark); 抗 -CD73、抗 -CD34、抗 -CD45、抗 -CD80、抗 -CD86、抗 -CD166、抗 -HLA-I (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Jose, CA); 抗 -CD133 (Miltenyi Biotec, Auburn); KDR (R&D Systems, Abington, U.K.); 抗 -HLA-II (Chemicon International Temecula, CA), 抗 -CD40 (Immunotech, Beckman Coulter), 抗 -CD154 (Serotec, Raleigh, NC USA) 单克隆抗体。小鼠 IgG 同种型对照来自 Dakocytomation。所有的温育在含有 0.1% 牛血清白蛋白和 0.1% 叠氮化钠的 $100\mu\text{l}$ 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中在 4°C 进行。对于每个样品,在 FACSCalibur 细胞仪 (BD Biosciences Pharmingen) 上分析 10,000 个细胞。基于阴性对照构建闸门,在所进行的所有分析中都包括补偿对照。使用 Cell Quest 软件 (BD Biosciences Pharmingen) 对来自每次实验的设闸门的群体产生群体百分率和数目。

[0066] 在未分化的或分化的 hGL-MS 上进行间接免疫荧光分析,所述 hGL-MS 培养于腔室玻片 (Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA) 上,以含有 2% 蔗糖的 4% 多聚甲醛固定,如果需要,以 Hepes-Triton X 100 缓冲液 (Sigma) 进行通透化处理。使用下列单克隆抗体:抗 -波形蛋白 (Sigma)、抗 -细胞角蛋白 (Biomed, Foster City CA)、抗 -E-钙粘附蛋白 (Dakocytomation), α -平滑肌肌动蛋白 (α SMA) (Dakocytomation)、抗 -突触极蛋白 (Progen Biotechnik, Heidelberg)。使用了抗 -von Willebrand 因子 (vWF) (Dakocytomation)、抗 -巢蛋白 (Chemicon International)、抗 -Pax-2 (Covance, Princeton, NJ)、抗 -Nanog、抗 -Oct-4、抗 -Musashi (AbCam, Cambridge, Science Park Cambridge UK)、抗 -podocin、抗 -血管紧张素 II 受体 1 (AT1) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 兔多克隆抗体和猪多克隆抗 -Nephrin (Progen Biotechnik)。视需要使用下列对照:不加初级抗体;或将初级抗体替换为非免疫兔、大鼠或小鼠 IgG。Alexa Fluor 488 抗 -兔子或抗 -猪 IgG 和 Texas Red 抗 -小鼠 IgG (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) 用作次级抗体。使用 Zeiss LSM 5 Paseal Model Confocal Microscope (Carl Zeiss International, Germany) 进行共聚焦显微镜分析。加入 Hoechst 33258 染料 (Sigma) 进行细胞核染色。

[0067] 标志物表达特征谱的总结

[0068] 下面的表 1 提供了本发明的人类肾小球间充质干细胞 (hGL-MS) 的标志物表达特征谱的总结

[0069] 表 1

[0070]

标志物	hGL-MSC
-----	---------

[0071]

CD133	阴性
CD146	100%
CD90	100%
CD44	100%
CD29	100%
CD73	100%
CD105	100%
CD106	-
CD166	100%
CD45	阴性
CD34	阴性
CD31	阴性
CD24	100%
SCA-1	-
α -SMA	阴性
波形蛋白	100%
细胞角蛋白	阴性
巢蛋白	100%
Nanog	100%
Musashi	100%
Oct-4	阴性
Pax-2	100%

MHC-1	100%
MHC-2	阴性
CD80	阴性
CD86	阴性
CD40	阴性

[0072] Fish 研究

[0073] 从由男性供体移植到女性接受者的移植的肾脏的肾小球中分离 hGL-MSc。该患者是 45 岁的女性,接受男性移植物的移植。移植物是在通过活组织检查诊断局灶性肾小球硬化症后 9 个月由于对治疗有抗性的严重的肾症状的复发而移植的。

[0074] 亚汇合时的培养物 (70%) 与终浓度为 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 的 Velbe 一起过夜温育 (16-18h)。使细胞沉淀下来并将沉淀物重悬于低渗溶液 ($0.2\text{g KCl}+0.2\text{g}$ 柠檬酸钠 / 100ml)。在 37°C 温育 20 分钟后,将细胞在 3 : 1 的甲醇 - 乙酸中固定并在 -20°C 贮存 18 小时。通过将大约 $50 \mu\text{l}$ 悬浮液滴至洁净的载玻片上来制备中期染色体,使其在空气中干燥,然后使用相差显微镜观察。

[0075] 使用商售的 X (绿色) 和 Y (红色) 染色体着丝粒探针和 Y 经典卫星 III 不同颜色的探针 (Aquarius Cytocell, Cambridge, UK) 进行 FISH 研究。根据生产商的说明书制备探针并将其变性。将制备的探针施加至含有变性的中期和细胞核的载玻片上 (在 70°C 在 70% 甲酰胺 / $2\times$ SSC 中持续 1.45 分钟),并盖上盖玻片。在 37°C 进行过夜杂交。然后在 72°C 在 $0.4\times$ SSC 中洗涤载玻片 1 次,洗涤 2 分钟,然后在室温在 $4\times$ SSC+Tween 20 (Sigma) 中第二次洗涤,洗涤 5-10 分钟。以 DAPI 负染染色体和细胞核,并在抗 - 褪色溶液中封片。通过直接的显微镜观察 (Nikon epifluorescent microscope) 来分析样品,以鉴定男性 (XY) / 女性 (XX) 细胞核和中期。使用 Cytovision Cytogenetics Image Analysis System 获得数码图像。

[0076] 免疫磁性分离、细胞分选和细胞克隆

[0077] 从新鲜的脱被膜的肾小球或从第 2 次或第 3 次传代时的细胞培养物中通过免疫磁性方式分离细胞。分离并通过分级的连续网孔后,以胶原酶 I (Sigma) 消化脱被膜的肾小球的悬浮液 8 分钟,使用 MACS 系统 (Miltenyi Biotech),通过磁性细胞分选法分离 CD133^+ 细胞。

[0078] 通过细胞分选法 (MoFlo™, Dakocytomation) 分离来自于在增殖培养基中培养的第二次和第三次传代的从肾小球中长出的群体的 $\text{CD133}^+\text{CD146}^+$ 和 $\text{CD133}^-\text{CD146}^+$ 细胞,通过细胞分选,通过将单细胞悬浮液接种于 96 孔板中来表征、培养和克隆这两个群体。分析了得到的克隆的数目、形态和动力学,选择其中一些进行亚克隆和分化测定。

[0079] 体外分化

[0080] 按照之前的描述 [7] 测定 hGL-MSc 的成脂肪、成骨和成软骨分化能力。

[0081] 简而言之,将 hGL-MSc 在成脂肪培养基 (Lonza, Basel Switzerland) 中培养 3 周。为了评估分化情况,在室温以 4% 的多聚甲醛将细胞固定 20 分钟,并在室温以甲醇 (Sigma)

中的 0.5% 的油红 O(Sigma) 染色 20 分钟。

[0082] 通过在成骨培养基 (Lonza) 中培养 hGL-MSC 来测定成骨分化情况。每周更换 2 次培养基,持续 3 周。为了评估分化情况,在室温以 4% 的多聚甲醛将细胞固定 20 分钟,并以 pH 4.1 的 Alizarin Red(Lonza) 染色 20 分钟。

[0083] 对于成软骨分化,将 2.5×10^5 个 hGL-MSC 在 15-ml 锥形聚丙烯管 (Falcon BD Bioscience) 中以 150g 离心 5 分钟,以 DMEM 洗涤 2 次。将细胞沉淀物在补充了 10ng/ml 转化生长因子 β 3(Lonza) 的成软骨培养基 (Lonza) 中培养。每 3 天更换培养基,持续 28 天。将细胞沉淀物固定于 4% 的多聚甲醛中过夜,以 0.1% 的番红 O(Sigma) 就葡萄糖胺聚糖对石蜡包埋的切片进行染色,以 1% 的阿尔新蓝就硫酸化蛋白聚糖进行染色。

[0084] 按照之前的描述 [17],通过在含有血管内皮生长因子 (VEGF, 10ng/ml, Sigma) 的内皮基础培养基 (EBM) (Lonza) 中培养 hGL-MSC 3 周来获得内皮细胞分化。

[0085] 通过在含有全反式维甲酸 (ATRA, Sigma, $20 \mu\text{mol/L}$) 的增殖培养基中培养 hGL-MSC 3 周来获得足细胞分化 [18]。在包被了 IV 型胶原 (Sigma) 的腔室玻片中进行分化 [19]。

[0086] 通过在含有 10% FCS、TGF- β 1 (2.5ng/ml, Sigma) [20] 和 PDGFbb (5ng/ml Sigma) [21] 的高葡萄糖的 DMEM 中培养 hGL-MSC 6 天来获得系膜分化。在包被了纤连蛋白的腔室玻片中进行分化。

[0087] 实时 PCR

[0088] 按照之前的描述 [22] 进行定量逆转录 PCR。使用 High Capacity cDNA 逆转录试剂盒 (Applied Biosystems, Foster City, CA 94404, USA), 从总 RNA 中产生 cDNA 的第一条链。简而言之,在每个 cDNA 合成中,使用 1 或 $2 \mu\text{g}$ mRNA, $2 \mu\text{l}$ RT 缓冲液, $0.8 \mu\text{l}$ dNTP 混合物, $2 \mu\text{l}$ RT 随机引物, $1 \mu\text{l}$ MultiScribe 逆转录酶和 $4.2 \mu\text{l}$ 无核酸酶的水。逆转录之后,将 cDNA 储存于 -20°C 。使用 48-孔的 StepOne™ 实时系统 (Applied Biosystems), 使用 SYBR-green 实时检测 PCR 产物,以此通过实时 PCR 来进行相对定量。为了进行实时 PCR,使用下列序列特异性寡核苷酸引物,它们均购自 MWG-Biotech AG, Ebersberg, Germany: (i) 在参考文献 [22] 中公开的人类 nephrin 正向和反向引物; (ii) 在参考文献 [1] 中公开的人类 PAX2 正向和反向引物; 和 (iii) 在参考文献 [1] 中公开的人类 β -肌动蛋白正向和反向引物。Power SYBR® Green PCR Master Mix 购自 Applied Biosystems。热循环条件如下: 在 95°C 将 AmpliTaq Gold® DNA 聚合酶 LD 活化 10 分钟,然后是“ 95°C , 15 秒”和“ 60°C (对于 nephrin、pax2 和对于 β -肌动蛋白), 1 分钟”的 45 个扩增循环。为了检测扩增的对数期,在每个循环中检测荧光水平 (产物的定量)。记录荧光达到阈值时的循环数,在一式三份中取平均值,并就 β -肌动蛋白的阈值的平均循环数进行标准化。计算所有的样品的相对于对照的表达倍数的变化。

[0089] 同种外周血单核细胞-MSC 共培养物

[0090] 在改良的混合的细胞培养物中,在 Histopaque-1077 (Sigma) 上进行来自健康志愿者的外周血单核细胞 (PBMC) 的分离,并将其用作响应细胞,同种 MSC 用作刺激细胞,如参考文献 [23, 24] 中所描述。简而言之,将 hGL-MSC 一式三份以 5×10^3 个细胞 /ml 在 96 孔板上铺板于 $100 \mu\text{l}$ 完全培养基中,并使其向塑料粘附 1 至 2 小时。将 PBMC 以 5×10^4 个细胞 /ml 重悬并加入到含有或不含 GL-MSC 的孔中 (体积为 $100 \mu\text{l}$), 其中含有或不含终浓度为

2.5 μ g/ml 的有丝分裂原植物血凝素 (PHA, Sigma)。GL-MSC 与 PBMC 的比例是 1 : 10。来自 BM 的人类 MSC 用作对照。将培养物维持 16-48 小时,在该培养阶段后,评估淋巴细胞的增殖。

[0091] 通过 DNA 的合成来研究细胞增殖情况,根据生产商的说明书,使用酶联免疫吸附测定试剂盒 (Chemicon International),测定掺入到细胞 DNA 中的 5- 溴 -2' - 脱氧尿苷 (BrdU),以此来检测 DNA 的合成。数据表示为刺激指数 (SI) 值,其按照参考文献 [23] 中的描述来计算。对于描述的每个点,至少进行 3 次实验。

[0092] 统计学分析

[0093] 数据表示为平均值 $\pm$ 来自 3 次或更多次实验的标准偏差。通过双侧 Student t 检验测定统计上的显著性。

[0094] 体内定位研究

[0095] 本发明人还进行了实验以确定本发明的干细胞群在人类肾脏中的体内定位。结果显示于图 4。通过免疫荧光研究共表达 CD24(阳性)的 CD146(阳性)和 CD133(阴性)细胞在肾小球中的存在。如图 4 所示,在肾小球中检测到共表达 CD24(阳性)的 CD146(阳性)细胞(平均值 2.22 ± 0.2 /肾小球, $n = 60$),并且这些细胞是 CD133 阴性的。此外,肾小球簇中的内皮细胞表达 CD146;观察到 CD133(阳性)细胞主要是在鲍曼氏囊中。

[0096] 参考文献

[0097] 1. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, Camussi G. 源自成人肾脏的肾祖细胞的分离 (Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney). Am J Pathol. 2005 ;166 :545-5.

[0098] 2. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. 源自成人肾脏鲍曼氏囊的多潜能祖细胞的分离和表征 (Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman' s capsule of adult human kidneys). J Am Soc Nephrol. 2006 ;17 :2443-56.

[0099] 3. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. 肾乳头是成体肾干细胞的生态位 (The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells). J Clin Invest. 2004 ;114 :795-804.

[0100] 4. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. 参与肾脏再生过程的肾祖细胞样肾小管细胞的鉴定 (Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney). J Am Soc Nephrol. 2003 ;14 :3138-46.

[0101] 5. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, Heremans Y, Lund T, Blackstad M, Jiang Y, Luttun A, Rosenberg ME. 源自肾的干细胞的分离和表征 (Isolation and characterization of kidney-derived stem cells). J Am Soc Nephrol. 2006 ;17 :3028-40.

[0102] 6. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. 间充质干细胞实际上停留在所有出生后器官和组织 (Mesenchymal stem cells reside in virtually all

post-natal organs and tissues). J Cell Sci. 2006 ;119 :2204-13.

[0103] 7. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 成人间充质干细胞的多谱系潜能 (Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells). Science 1999 ;284 :143-7.

[0104] 8. Prockop DJ. 髓性基质细胞作为干细胞用于非造血组织 (Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues). Science. 1997 ;276 :71-4.

[0105] 9. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. 在正常个体血液中的间充质前体细胞 (Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals). Arthritis Res. 2000 ;2 :477-88.

[0106] 10. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. 源自成人滑膜的多潜能间充质干细胞 (Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane). Arthritis Rheum. 2001 ;44 :1928-42.

[0107] 11. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. 源自人类脂肪组织的多谱系细胞 : 基于细胞的治疗的应用 (Multilineage cells from human adipose tissue : implications for cell-based therapies). Tissue Eng. 2001 ;7 :211-28.

[0108] 12. Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. 源自骨小梁的细胞的多谱系间充质分化潜能 (Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells). J. Orthop. Res. 2002 ;20 :1060-9.

[0109] 13. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. 体外和体内的出生后人牙髓干细胞 (Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo). Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 ;97 :13625-30.

[0110] 14. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzocort J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr. 人类储备多潜能间充质干细胞存在于源自胚胎、成人和老年人供体的骨骼肌和真皮的结缔组织 (Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors). Anat Rec. 2001 ;264 :51-62.

[0111] 15. Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, Jodon de Villeroché V, Rossi GA, Brouty-Boyd D. 人支气管纤维原细胞显示间充质干细胞表型和多谱系分化潜能 (Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities). Lab Invest. 2005 ;85 :962-71.

[0112] 16. Lama VN, Smith L, Badri L, Flint A, Andrei AC, Murray S, Wang Z, Liao H, Toews GB, Krebsbach PH, Peters-Golden M, Pinsky DJ, Martinez FJ, Thannickal VJ. 来自移植的同种异体移植物的研究的在成人肺内的常驻于组织的间充质干细胞的证据 (Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts). J Clin Invest. 2007 ;117 :989-96.

[0113] Rafii S, Lyden D, Benezra R. 血管和造血干细胞 : 抗血管发生治疗的新靶标 ?

(Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy ?) Nat Rev Cancer 2002 ;2 :826-35.

[0114] 17. Vaughan MR, Pippin JW, Griffin SV, Krofft R, Fleet M, Haseley L, Shankland SJ. ATRA 在体外和体内诱导足细胞分化并改变 nephrin 和 podocin 表达 (ATRA induces podocyte differentiation and alters nephrin and podocin expression in vitro and in vivo). Kidney Int. 2005 ;68 :133-44.

[0115] 18. Perry J, Tam S, Zheng K, Sado Y, Dobson H, Jefferson B, Jacobs R, Thorner PS. IV 型胶原体外诱导骨髓基质干细胞的足细胞特征 (Type IV collagen induces podocytic features in bone marrow stromal stem cells in vitro). J Am Soc Nephrol. 2006 ;17 :66-76.

[0116] 19. Ross JJ, Hong Z, Willenbring B, Zeng L, Isenberg B, Lee EH, Reyes M, Keirstead SA, Weir EK, Tranquillo RT, Verfaillie CM. 多潜能成体祖细胞向功能性平滑肌细胞的细胞因子诱导的分化 (Cytokine-induced differentiation of multipotent adult progenitor cells into functional smooth muscle cells). J Clin Invest. 2006 ;16 :3139-49.

[0117] 20. Suzuki A, Iwatani H, Ito T, Imai E, Okabe M, Nakamura H, Isaka Y, Yamato M, Hori M. M. 源自血小板的生长因子对于将骨髓细胞转变为肾小球系膜样细胞起关键作用 (Platelet-derived growth factor plays a critical role to convert bone marrow cells into glomerular mesangial-like cells). Kidney Int. 2004 ;65 :15-24.

[0118] 21. Collino F, Bussolati B, Gerbaudo E, Marozio L, Pelissetto S, Benedetto C, Camussi G. 惊厥前血清诱导 nephrin 通过内皮肾小球细胞释放内皮素 -1 从足细胞脱落 (Pre-eclamptic sera induce nephrin shedding from podocytes through endothelin-1 release by endothelial glomerular cells). Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Feb 20 ;[Epub ahead of print]

[0119] 22. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. 人骨髓基质细胞抑制由细胞或非特异性促有丝分裂刺激诱导的 T 淋巴细胞增殖 (Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli). Blood. 2002 ;99 :3838-43.

[0120] 23. Aggarwal S, Pittenger MF. 人类间充质干细胞调节异源免疫细胞应答 (Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell response). Blood 2005 ;105 :1815-22.

[0121] 24. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review : 间充质干细胞 : 它们的表型、分化能力、免疫学特征和归巢潜能 (mesenchymal stem cells : their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing). Stem Cells. 2007 ;25 :2739-49.

[0122] 25. El-Helou V, Dupuis J, Proulx C, Drapeau J, Clement R, Gosselin H, Villeneuve L, Manganas L, Calderone A. 在正常和损伤大鼠心肌中检测到常驻巢蛋白 + 神经样细胞和纤维 (Resident nestin+neural-like cells and fibers are detected in

normal and damaged rat myocardium).Hypertension.2005 ;46 :1219-25.

[0123] 26.Mayer EJ, Carter DA, Ren Y, Hughes EH, Rice CM, Halfpenny CA, Scolding NJ, Dick AD. 源自成人尸检视网膜的神经祖细胞 (Neural progenitor cells from postmortem adult human retina).Br J Ophthalmol.2005 ;89 :102-6.

[0124] 27.Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. 源自成人肝脏的干细胞群的分离与表征 (Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver).Stem Cells.2006 ;24 :2840-50.

[0125] 28.Hatano SY, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T. 与 Nanog 活性相关的细胞的多潜能 (Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity).Mech Dev.2005 ;122 :67-79.

[0126] 29.Cavaleri F, Scholer HR. Nanog :胚胎干细胞团队中的新成员 (Nanog :a new recruit to the embryonic stem cell orchestra).Cell 2003 ;113 :551-2.

[0127] 30.Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. 在成人干细胞中的 Oct4 表达 :支持致癌作用的干细胞理论的证据 (Oct4 expression in adult human stem cells:evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis).Carcinogenesis.2005 ;26 :495-502.

[0128] 31.Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke R, Sakakibara S, Okano H. 推断的肠干细胞和早期谱系标志物 musashi-1 的鉴定 (Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker ; musashi-1).Differentiation.2003 ;71 :28-41.

[0129] 32.Sugiyama-Nakagiri Y, Akiyama M, Shibata S, Okano H, Shimizu H. RNA- 结合蛋白 Musashi 在毛囊发育和毛发周期进展中的表达 (Expression of RNA-binding protein Musashi in hair follicle development and hair cycle progression).Am J Pathol.2006 ;68 :80-92.

[0130] 33.Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. 分化和未分化的间充质干细胞的 HLA 表达和免疫学特征 (HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells).Exp Hematol.2003 ;31 :890-96.

[0131] 34.Challen GA, Martinez G, Davis MJ, Taylor DF, Crowe M, Teasdale RD, Grimmond SM, Little MH. 肾祖细胞分子表型的鉴定 (Identifying the molecular phenotype of renal progenitor cells).J Am Soc Nephrol.2004 ;15 :2344-57.

[0132] 35.Oliver JA,Barasch J,Yang J,Herzlinger D,Al-Awqati Q. 后肾间充质包含胚胎肾干细胞 (Metanephric mesenchyme contains embryonic renal stem cells).Am J Physiol.2002 ;283 :F799-F809.

[0133] 36.Kitamura S, Yamasaki Y, Kinomura M, Sugaya T, Sugiyama H, Maeshima Y, Makino H. 源自成熟大鼠肾脏的肾单位 S3 部分的肾祖细胞样细胞的建立和表征 (Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney).FASEB J.2005 ;19 :1789-97.

[0134] 37. Challen GA, Bertoncello I, Deane JA, Ricardo SD, Little MH. 肾副群体显示多谱系能力和肾功能容量以及细胞异种性 (Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity). *J Am Soc Nephrol*. 2006 ;17 :1896-1912.

[0135] 38. Lazzeri E, Crescioli C, Ronconi E, Mazzinghi B, Sagrinati C, Netti GS, Angelotti ML, Parente E, Ballerini L, Cosmi L, Maggi L, Gesualdo L, Rotondi M, Annunziato F, Maggi E, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Vannelli GB, Romagnani P. 胚胎肾多潜能祖细胞在急性肾衰中的再生能力 (Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure). *J Am Soc Nephrol*. 2007 ;18 :3128-3138.

[0136] 39. Dekel B, Zangi L, Shezen E, Reich-Zeliger S, Eventov-Friedman S, Katchman H, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Margalit R, Reisner Y. 源自成年小鼠肾脏的非肾小管 sca-1+lin- 多潜能干细胞 / 祖细胞的分离和表征 (Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin-multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney). *J Am Soc Nephrol*. 2006 ;17 :3300-3314.

[0137] 40. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, Ijzermans JN, Weimar W, Baan CC. 源自人类心脏、脾和肾脏外脂肪的间充质干细胞具有免疫调节能力 (Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities). *Stem Cells Dev*. 2007 ;16 :597-604.

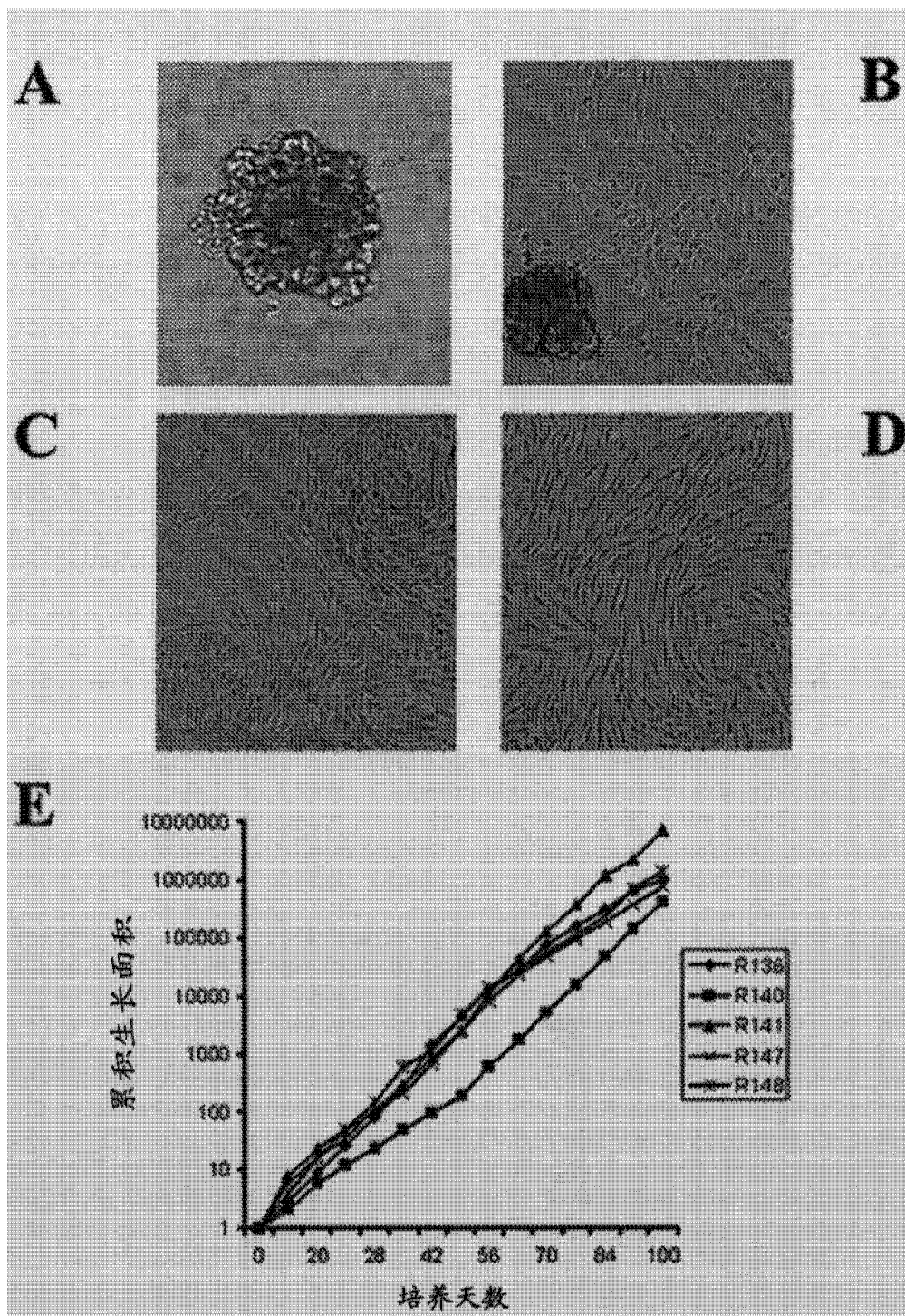


图 1

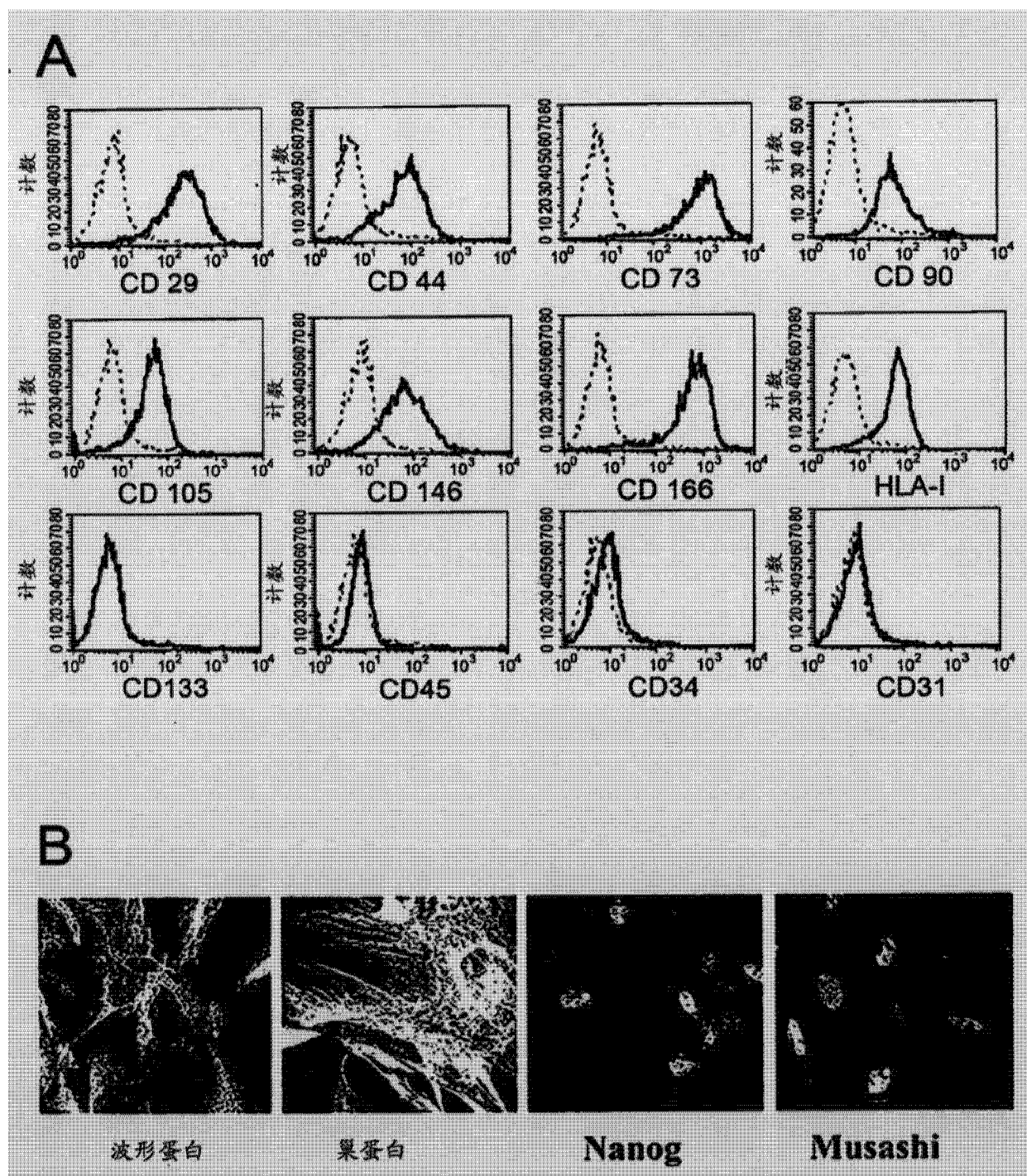


图 2

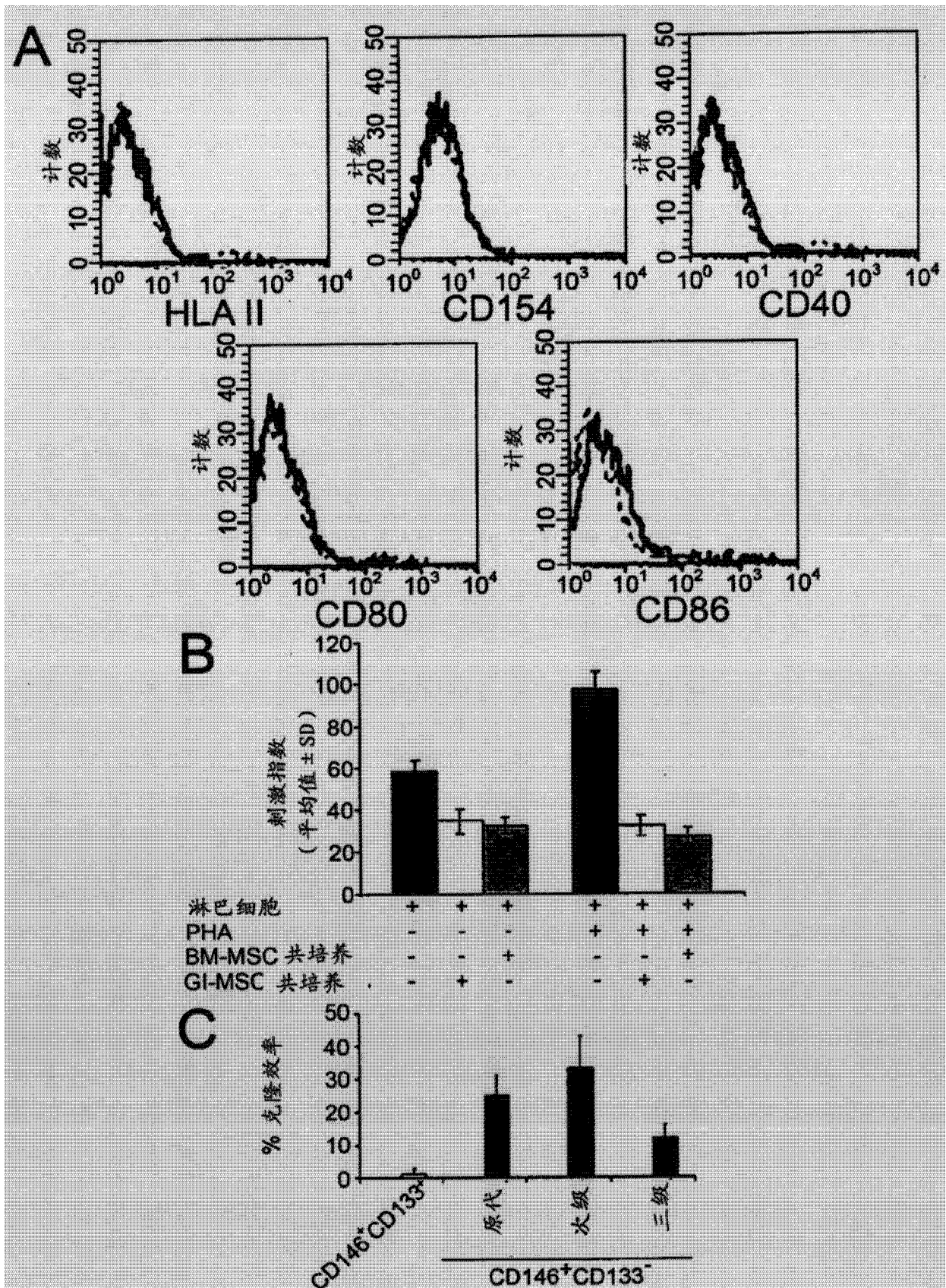


图 3

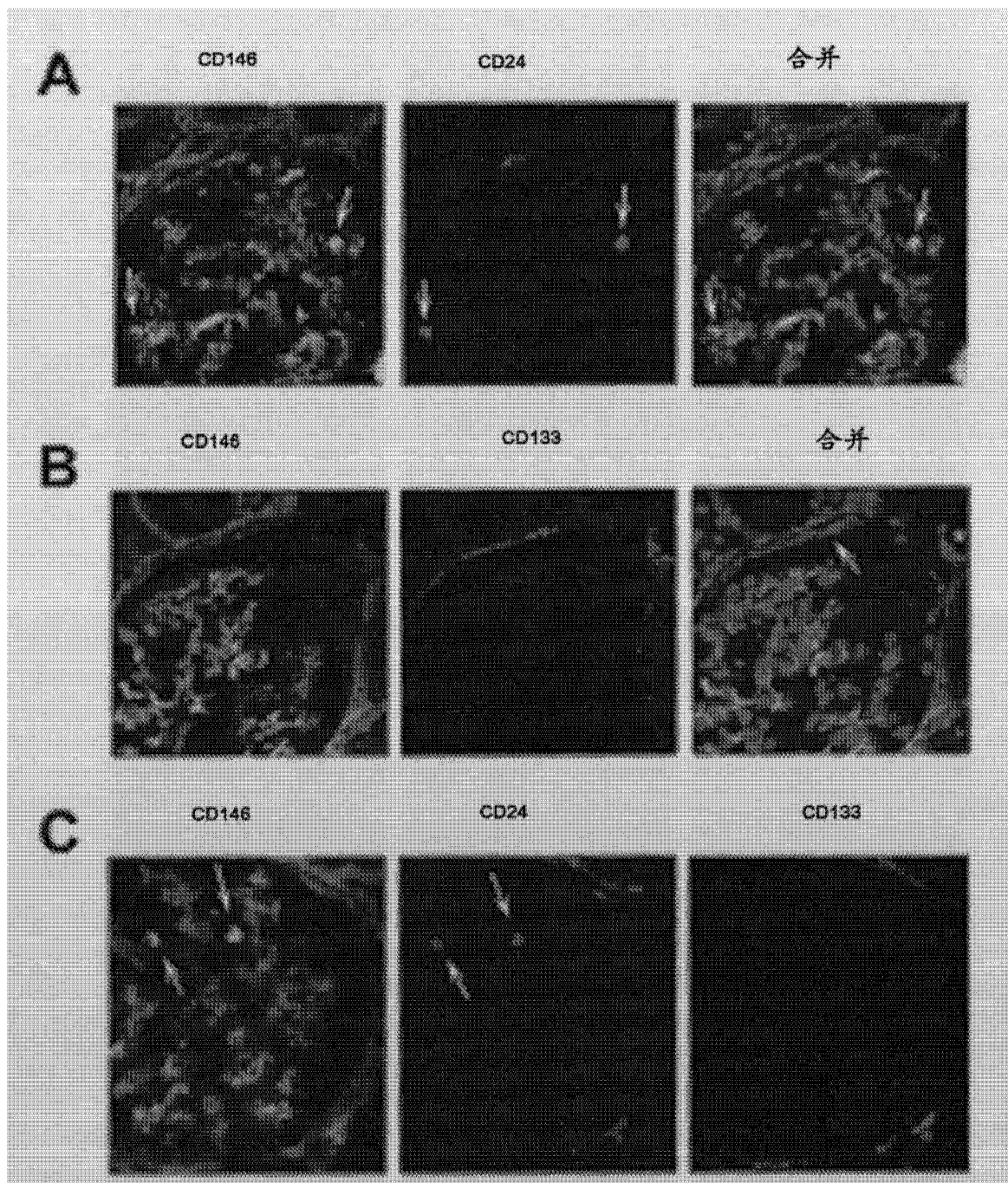


图 4