

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 5/08

C12N 15/867 A61K 48/00

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99117589.1

[43]公开日 2001年3月14日

[11]公开号 CN 1287166A

[22]申请日 1999.9.8 [21]申请号 99117589.1  
[71]申请人 何清华  
地址 266071 山东省青岛市南京路9号华夏银行  
[72]发明人 何清华

权利要求书3页 说明书17页 附图页数2页

[54]发明名称 人原始间叶干细胞群的分离、体外培养、制备及应用

[57]摘要

本发明公开一种人原始间叶干细胞群(HTMSC)的分离、体外培养、制备及应用方法。采用抗人CD45抗原、抗CD39抗体免疫方法,经磁场分离出人原始间叶干细胞群。在体外含有较低血清浓度的优化培养体系培养,诱导多向分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、腱、骨髓基质细胞、特别是平滑肌细胞、血管内皮细胞等多种间叶组织具有自我更新能力的人原始间叶干细胞群。可迅速扩增。人原始间叶干细胞群及基因修饰后的人原始间叶干细胞群广泛应用于人体临床。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

# 权 利 要 求 书

1、一种人原始间叶干细胞群 (HTMSC) 的分离、体外培养、制备及应用方法, 其特征在于: 以免疫的方法采用磁场去除成熟骨髓细胞, 结合流式细胞仪分离体积大的人原始间叶干细胞群, 经体外含有较低血清浓度的优化培养体系培养, 诱导多向分化, 迅速扩增。人原始间叶干细胞群及基因修饰后的人原始间叶干细胞群广泛应用于人体临床。

2、根据权利要求1所述的人原始间叶干细胞群, 其特征在于: 可分化成成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、腱、骨髓基质细胞、特别是平滑肌细胞、多种血管内皮细胞等多种间叶组织的具有自我更新能力的人原始间叶干细胞群。

3、根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 提取人体骨髓细胞或脐带血细胞离心, 采用包被抗鼠免疫球蛋白M抗体的磁珠与鼠抗人CD45抗原、抗CD39抗体的单克隆抗体结合, 在磁场槽中收集与磁珠分离的骨髓细胞, 经流式细胞仪分析, 去除骨髓成熟细胞, 收集大体积的人原始间叶干细胞群。

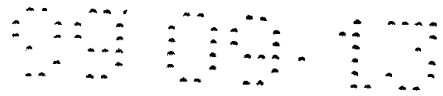
4、根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 对人原始间叶干细胞群采用含有低浓度小牛血清及地塞米松、BB血小板衍化生长因子及内皮生长因子、硒、转铁蛋白、胰岛素、亚油酸、白蛋白、抗坏血酸、抗霉菌素、青霉素、链霉素、二性要素B、F-12营养混合物的较低血清浓度的优化培养体系培养, 可体外大量扩增呈指数增殖, 仍保持人间叶干细胞未分化原始状态。

5、根据权利要求1所述的方法, 其特征在于: 人原始间叶干细胞群在特定培养基中可迅速、均一诱导定向分化为多种间叶细胞:

①经含地塞米松、抗坏血酸、 $\beta$ 磷酸甘油及 $\beta$ 转化生长因子超家族蛋白、生长因子等成分的培养体系培养分化为成骨细胞。

②经含 $\beta$ 转化生长因子或抑制素A、软骨刺激活性因子骨形成蛋白4等成分的培养体系培养分化为软骨细胞。

③经含特异性细胞因子等诱导培养基培养分化为基质细胞。



④经含地塞米松、1甲基3 异丁黄嘌呤、胰岛素及苊甲新培养基诱导培养分化为脂肪细胞。

⑤经含人血管内皮生长因子培养基培养分化为内皮细胞。

⑥经含5-azacytidine培养基诱导分化为肌细胞。

6、根据权利要求1所述的方法，其特征是：以采用逆转录病毒载体，整合基因于人原始间叶干细胞群高效表达，采用内核糖体起始序列起始表达耐药筛选基因以及采用最佳筛选基因荧光蛋白完成原始间叶干细胞基因修饰。

7、根据权利要求1所述的方法，其特征是：以采用PCL-Ampho质粒快速转染系统与逆转录病毒载体共转染293Kj细胞、采用VS V-G质粒富集病毒系统，与病毒载体及PCL质粒共转染以及采用包被转孔培养器流式病毒转染方法，以富集病毒上清与被转染细胞共培养，制备含修饰基因的高滴度病毒上清及基因转染人间叶干细胞。

8、根据权利要求1所述的方法，其特征是：人原始间叶干细胞群及基因修饰后的人原始间叶干细胞群，广泛应用于人体临床：

①基因修饰骨骼愈合。将具有诱导成骨细胞的基因克隆于IRES的上游MSCV-IRES-EGFP载体成为MSCV-X-IRES-EGFP载体，共转染293Kj细胞，经流式细胞仪分析、收集基因修饰的人间叶细胞并与填充物按比例容积混匀，注入骨缺失部分。

②肌营养原蛋白基因修饰改善肌营养退行性变。将含MSCV-肌原蛋白-IRES-tyr22DHFR基因病毒上清转导人原始间叶干细胞群在鱼精蛋白低血清培养基共培养，经甲氢叶酸含胎牛血清培养基筛选后，将表达该载体人间叶细胞注射肌营养不良患处，纠正肌营养不良。

③基因治疗基因缺陷性疾病。采用MSCV病员缺陷的人正常基因-IRES-EGFP转导人原始间叶干细胞群，筛选阳性基因携带细胞，冻存，定量回输血友病A、B系凝血因子VIII、IX缺乏所致出血性疾病、粘多糖贮积病、囊性纤维变性等多种基因缺陷性疾病病员。较低水平表达可纠正基因缺陷、整合基因高水平表达无明显

副作用。

④骨骼微环境重建及造血基因。

(1)采集病员骨髓，体外培养人原始间叶干细胞群，冻存，待病员放疗、化疗、骨髓移植后回输病员，为放疗、化疗病员恢复提供最佳骨髓微环境。

(2)克隆构建表达人白介素3因子的病毒载体，转导MSCV-白介素3-IRES-EGFP基因于人原始间叶干细胞群，回输再障病员，治疗再生障碍性贫血。

(3)将含促红细胞生成素的逆转录病毒转导人原始间叶干细胞群，回输病员，治疗慢性疾病引起的贫血。

⑤增强免疫、肿瘤疫苗。

将含有 $\alpha$ -干扰素基因的MSCV- $\alpha$ -干扰素-IRES-EGFP病毒基因转导人原始间叶干细胞群，回输病员，治疗慢性粒细胞性白血病。采用上述同样方式，可以 $\gamma$ -干扰素治疗慢性粒细胞白血病、毛状细胞白血病等。转导白介素2、 $\gamma$ -干扰素治疗全身转移性肿瘤。

## 人原始间叶干细胞群的分离、体外培养、制备及应用

本发明涉及具有多向分化潜能，可分化成成骨、软骨、脂肪、平滑肌、腱、内皮细胞等多种间叶组织的具有自我更新能力的人原始间叶干细胞群 (Human Totipotent Mesenchymal Stem Cells 简写为 HTMSC)。涉及一种人原始间叶干细胞群的分离及体外培养、制备方法。特别涉及采用人原始间叶干细胞群以及基因修饰后的人原始间叶干细胞群的应用，包括骨骼修复、改善肌萎缩、基因缺陷性疾病 (血友病 A、B、粘多糖贮积病等)、放疗、化疗后及再障病员的骨髓微循环的重建、促进造血、增强免疫、疫苗、抗肿瘤。

人体干细胞系具有自我更新多向分化的原始细胞，包括 (1) 从胚胎或胎肝组织分离的胚胎干组织，可分化成人体各种组织；(2) 从成人骨髓分离出的造血干组织，可形成淋巴、粒系、红系各种造血细胞及脑细胞；(3) 从胎脑分离的神经原干细胞，可分化为神经原以及神经胶质；(4) 从成人骨髓分离的间叶干细胞 (Mesenchymal Stem Cells) 可分化成骨骼、软骨、肌肉、腱等。近年来，干细胞特有生物学特征及潜在生物学应用价值成为生物学领域最热点课题，SCIENCE (1998 年 11 月) 报道了体外分离的原始胚胎干细胞可维持其未分化状态 4 月余，并可分化成各种人体组织细胞。SCIENCE (1999 年 3 月) 再次报道了胚胎干细胞有其局限性：(1) 体外极难于模拟微环境使胚胎干细胞定向分化成所需组织；(2) 胚胎干细胞具有相当大的肿瘤发生潜在性。因此，越来越多科学实验表明，间叶干细胞具有比以往认为更多更实际的生物学应用价值。

以往研究表明：人间叶干细胞系具有自我更新多向分化增殖能力的原始骨髓细胞。体内外在较合适的环境可分化成成骨细胞 [Haynes Worth, S.E. et al, Bone, 1992; 13: 69-80]、软骨细胞

[Johnstone, B. et al, Ortho. Res. Soc., 1996; 21: 65]、脂肪细胞 [Pittenger, M. F. et al, Mol. Biol. Cell., 1996; 7: 305]、平滑肌细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞及多种血管内皮细胞。早期间叶干细胞可体内外长期生长。

目前国际上分离人间叶干细胞多采用已知的间叶干细胞表面标志, Simmon 等采用 STRO-1 单抗识别成纤维集落形成细胞 (CFU-F), 命名为基质干细胞。STRO-1 阳性的基质细胞可分化为网织细胞、脂肪细胞及骨骼细胞。该细胞具有 CD10、CD13、CDW90、CD106 表面标志, 该方法分离的间叶干细胞局限于仅富集了 STRO-1 阳性的人间叶干细胞, STRO-1 阳性率仅占间叶干细胞 5-10%, 绝大多数尤其是原始间叶干细胞可能丢失于分离过程。Caplan 等克隆了 SB1 至 SB5 系列单克隆抗体可识别间叶祖细胞分化成不同时期的成骨细胞, 而且克隆了 SH2、SH3 及 SH4 抗体以识别间叶祖细胞, 该细胞可分化成骨骼、软骨、脂肪等。该着重于骨骼发生以及应用研究。

以往人间叶干细胞研究分离方法的缺陷为: 分离的间叶干细胞不能经体外培养分化为间叶组织中的内皮细胞、平滑肌细胞。换言之, 分离的细胞可能不含有较原始的干细胞, 具有平滑肌细胞、内皮细胞分化能力的原始人间叶干细胞。本方法研制的干细胞, 即具有平滑肌细胞与内皮细胞分化潜能的人原始间叶干细胞, 往往已成为骨细胞特异转录因子阳性间叶干细胞, CBFA1 阳性, 可分化成成骨细胞祖细胞、软骨细胞祖细胞、脂肪细胞祖细胞、成纤维细胞祖细胞、基质细胞祖细胞。参见图 1。

体内研究已表明: 间叶干细胞不仅可自我更新骨髓微环境, 提供人骨髓造血微环境, 包括有助于造血干、祖细胞分化、增殖和表达、分泌粘附因子及造血因子, 而且可分化成各种间叶组织。显示

了间叶干细胞具有多种生物学应用价值。因此，体外建立一种分离及培养人原始间叶干细胞群制备系统至关重要。

本发明的目的之一为国际上首次从骨髓中分离出具有内皮细胞及平滑肌细胞分化能力的人原始间叶干细胞群；本发明的另一目的是以优化的培养体系体外长期培养人原始间叶干细胞群，最大限度维持间叶干细胞原始状态，而且在特定培养基可诱导定向分化为多种间叶细胞；本发明的再一目的是人原始间叶干细胞群的多种应用以及基因修饰后的人原始间叶干细胞群的应用，（如治疗基因缺陷性疾病、化疗、放疗后及再障病员骨髓微环境重建、骨骼修复、改善肌萎缩，以及促进造血、增强免疫、疫苗、抗肿瘤等多向用途）。因为原始间叶干细胞具有更多细胞分化潜能。

本发明的目的是通过下述方法实现的：

#### 一、人原始间叶干细胞群的分离

##### 1、单个核细胞的分离：

采集人体骨髓细胞或脐带血细胞，经密度梯度离心 1 6 0 0 转/分骨髓细胞 2 0 分钟，获得单个核骨髓细胞，经含 1 % 牛血清白蛋白磷酸缓冲液清洗细胞 2 遍后，悬浮细胞于磷酸缓冲液。

##### 2、人原始间叶干细胞群的初筛：

采用包被抗鼠免疫球蛋白 M 抗体的磁珠与鼠抗人 CD45 抗原及抗 CD39 的单克隆抗体结合后，再与骨髓单个核细胞室温作用半小时，将与饱和浓度特异性抗体反应的骨髓细胞放置于磁场槽中，经磷酸缓冲液冲洗并收集与磁珠分离的骨髓细胞。

含人原始间叶干细胞群的骨髓细胞进一步与抗人 CD45、CD39 及 CD14 标记有荧光素抗体反应，经过流式细胞仪分析，分离去除 CD45、CD14 及 CD39 阳性的骨髓细胞。该过程去除了骨髓成熟的淋巴细胞、

巨核、单核及红细胞母细胞等。收集含人原始间叶干细胞群的成熟细胞表型阴性的细胞，该细胞群可分为大与小体积细胞，小体积细胞约占 2%，而大体积细胞为人原始间叶干细胞群，约占骨髓细胞 0.03-0.06%。

特点：该分离人原始间叶干细胞制备方法所获得人原始间叶干细胞群，不同于以往人间叶干细胞分离方法。以往使用特异识别人间叶干细胞的单克隆抗体如 SH2、SH3、STRO-1 等，仅限于分离 SH2、SH3、STRO-1 阳性的人间叶干细胞。该间叶干细胞可分化成成骨细胞、脂肪细胞、基质细胞、软骨细胞等，但尚无平滑肌细胞及内皮细胞分化潜能报道。本分离方法不同于以往分离方法，不局限于收集 SH2、SH3 或 STRO-1 阳性的干细胞。本发明分离富集不仅具有以往间叶干细胞分化潜能，而且可分化成为平滑肌细胞、血管内皮细胞的原始间叶干细胞。参见图 2：人原始间叶干细胞群的分离、培养增殖及多向分化。其中 1 为采集人骨髓细胞，2 为密度梯度离心获得单个核细胞层，3 为磁场槽，4 为免疫吸附在磁场分离出含有人间叶细胞骨髓细胞，5 为小体积具有间叶细胞表型细胞，6 为大体积人原始间叶干细胞群，表型为 CD13、CD44、CDW90、1B10、激活白细胞粘附分子阳性；CD50、CD39、DR、CD45、CD68 阴性，7 为流式细胞仪：用于分析、分离免疫荧光标记的间叶细胞。

## 二、人原始间叶干细胞群的体外培养及多向分化、增殖

### 1. 人原始间叶干细胞群的体外培养

将获得的人原始间叶干细胞群放置于经 Fibronectin (FN) 包被的培养板培养。比较研究了三种不同的培养条件，包括：①无血清②含低小牛血清③含 12%小牛血清、12%马血清的培养体系。结果表明：①无血清仅含有血小板衍化生长因子、内皮生长因子，地塞米



松、硒、转铁蛋白、胰岛素、亚油酸、牛白蛋白、抗坏血酸、抗菌素 DMEM 及 MCDB 培养基和②含 12%小牛血清、马血清，氢化考的松及  $\beta$  巯基乙醇的培养条件，不利于人原始间叶干细胞群体无分化的细胞生长。在含有低小牛血清、地塞米松、BB 血小板衍化生长因子及内皮生长因子，硒、转铁蛋白、胰岛素、亚油酸、白蛋白、抗坏血酸、10 毫升/升抗霉菌素、/1 万单位青霉素、/1 万微克链霉素、25 微克二性要素 B、F-12 营养混合物的 DMEM 培养基培养，人原始间叶干细胞群体外长期生长且维持未分化状态呈人原始间叶干细胞表型。细胞呈纺锤体形，每 4 天换培养液去除悬浮细胞，以含 1 毫摩尔 EDTA 的 0.25%胰酶消化细胞进行细胞传代。人原始间叶干细胞群细胞免疫表型为 CD13、CD44、CD49b、CDW90、1B10、激活白细胞粘附分子阳性，CD50、CD39、DR 阴性。

以往研究表明，SH2、SH3 或 STRO-1 阳性间叶干细胞约占 1/1-10 万个单个核骨髓细胞，本发明采用有限稀释方法确定了人原始间叶干细胞群约 1/1-5 百万单个核骨髓细胞。以往培养条件采用 10%血清的培养条件培养间叶干细胞。本发明采用较低血清浓度接近人生理条件的培养条件，以维持最佳细胞未分化原始状态的体外生长。

## 2、人原始间叶干细胞群的多向分化。

经 4 代培养后，人原始间叶干细胞群可多向分化成骨骼细胞、软骨细胞、脂肪细胞、基质细胞、肌细胞及内皮细胞等，其中平滑肌细胞与内皮细胞分化潜能为以往间叶干细胞未见报道的。

①分化成骨细胞：经含地塞米松、抗坏血酸、 $\beta$  磷酸甘油及  $\beta$  转化生长因子超家族蛋白（如骨形成蛋白 2、3），生长因子如纤维生长因子，前列腺素等的培养体系培养 7 天后，细胞内硷性磷酸酶达峰值。14 天后，Von Kossa 染色及荧光钙骨矿化测定人间叶干细

胞分化成成骨细胞。成骨细胞分泌及形成骨样细胞间叶物质。

②分化软骨细胞：经含 $\beta$ 转化生长因子或抑制素 A、软骨刺激活性因子骨形成蛋白 4 等培养 2-3 天，组织学鉴定：甲苯胺蓝染色阳性为软骨细胞。免疫组化分析，软骨细胞标志 CSPG-M 阳性。

③分化内皮细胞：经含人血管内皮生长因子培养 2 周后，细胞表型为 CD36、CD34 及 Von Willerband 因子阳性为内皮细胞。

④分化肌细胞：经含 5-azacytidine 诱导 1 天后，2 周后细胞免疫组化测定，肌原蛋白阳性为肌细胞。在早期分化过程中，多种转录因子如 MyoD、Myf5、Myf6 及 Myogenin 分别表达阳性。

⑤基质细胞：在特异性细胞因子如白介素 1 $\alpha$  或白介素 2 等诱导培养基培养人原始间叶干细胞群，30%细胞密度传代培养，经 3 天诱导分化，收集过滤上清，测定已分化为基质细胞的新分泌的细胞因子，包括白介素 3、6、G-CSF、GM-CSF、白血病抑制因子、干细胞生长因子、 $\beta$ 2 转代生长因子。经诱导的基质细胞分泌相当高水平的上述细胞因子，而未分化细胞仅白介素 6 表达水平较高。

⑥脂肪细胞分化：在含地塞米松、1 甲基 3 异丁黄嘌呤、胰岛素及苄甲新，小牛血清培养基诱导培养间叶干细胞群 2-3 天，然后经含胰岛素及原小牛血清及营养成分培养基 1 天后，第 2 天后开始形成脂质空洞。

特点：体外诱导分化人原始间叶干细胞群系迅速、均一干细胞分化发展过程，该细胞工程具有广泛应用价值。a、纯化的人原始间叶干细胞群不含有不利于多向分化的细胞生物因子；b、体外可以控制细胞分化期，尤其为骨骼不同发育时期；c、体外可模拟所需分化细胞亚型，如肌肉形成快或慢肌细胞；d、体外分化均一、迅速，人原始间叶干细胞群同时暴露于较适剂量诱导生物活性因子以定向分

化，而体内往往为部分微环境逐渐诱导分化，历时长，具有多态分化性。

人原始间叶干细胞群较以往间叶干细胞具有更多的分化潜能，包括平滑肌细胞及内皮细胞，加之均一迅速体外分化优势，为其实现广泛应用奠定了坚实基础。

### 3、人原始间叶干细胞群的体外生长

人原始间叶干细胞群增殖迅速，第 1 周可增殖 1 千倍，第 4 周可增殖 3 万倍，第 8 周可增殖约 1 千万倍。人原始间叶干细胞群体外观察 2 月余仍保持未分化状态呈指数增殖。参见图 2。其中 8. 为细胞培养皿：用于 FN 包被培养人原始间叶干细胞群，每 4 天换液，以去除悬浮细胞，9. 为人原始间叶干细胞群显微镜下呈纺锤体形，具有间叶干细胞表型，10. 为人原始间叶干细胞群第一周可扩增 1 千倍，第八周可达 1 千万倍，11. 为诱导分化为成骨细胞，12. 为诱导分化为软骨细胞，13. 为诱导分化为内皮细胞，14. 为诱导分化为肌细胞，15. 为诱导分化为其他组织细胞。

### 三、基因修饰人原始间叶干细胞群的应用设计

采用逆转录病毒载体如 MSCV-IRES-EGFP：特点为：1，具有较强启动子起始外源基因，尤其在造血干细胞高效表达。2，克服了第一代逆转录病毒载体所致功能基因 Silencing 缺点。3，该载体保留了分泌高滴度病毒上清的优势。

采用内核糖体起始序列（IRES）起始表达功能基因及筛选基因，可使单启动子同时翻译 IRES 引导的上、下游基因，以获得相同水平双蛋白表达，克服了以往载体内源启动子自相抑制蛋白表达作用。

采用最佳筛选基因绿荧光蛋白（GFP），经 64、65 位点突变的增强绿荧光蛋白（EGFP），特点为：无需反应底物，荧光强度增至 100

倍，可获得含修饰基因表达的荧光阳性细胞，24 小时可经流式细胞仪快捷分离、应用研究。

修饰基因可为多向分化诱导基因（骨形成蛋白基因、 $\beta$  转化生长因子等）、基因缺陷疾病缺失基因（凝血因子 VIII、IX 血友病基因、粘多糖病基因 IDS 等），促造血、增强免疫的细胞因子、抗肿瘤基因。如图 3 所示，将修饰基因克隆，酶切后连接于上游 BglIII 或 XhoI、下游 EcoRI 酶切位点。参见图 3：逆转录病毒载体设计，共转染及富集高滴度病毒上清转导人原始间叶干细胞群。其中 X. 代表任一基因将转导人原始间叶干细胞群，B. 为 BglIII 或 Xho I 酶切位点，E. 为 EcoR I 酶切位点，1. 为 MSCV 逆转录病毒启动子，2. 为 IRES 内核糖体起始序列，3. 为 EGFP 增强绿荧光蛋白，4. 为 CMV 启动子。

#### 四. 制备含修饰基因的高滴度病毒上清及基因转染人原始间叶干细胞群

1. 采用 PCL-Ampho 质粒快速转染系统，与逆转录病毒载体共转染 293Kj 细胞。将 PCL 及病毒载体 20 微克质粒 DNA 加入 725 微升 (0.25M) 氯化钙与 (PH7.0) 725 微升 2 倍 HBS 缓冲液混匀，再与 2 百万个 293Kj 细胞共培养 (37 $\cdot$ c) 6 小时。取出转染液加入 15% 甘油缓冲液 5 毫升，休克细胞 1 分钟，加入 5 毫升培养液培养细胞，第二及第三天收集含修饰基因的病毒上清液。

2. 采用 VSV-G 质粒富集病毒系统，与病毒载体及 PCL 质粒共转染后，收集的病毒上清经 Beckman L3-50 超离心 50000g (4 $\cdot$ c) 90 分钟，然后以 0.1% Hanks 液 4 $\cdot$ c 溶解病毒沉淀 12 小时。经该系统病毒可浓缩 200-2000 倍，病毒上清滴度可达  $2 \times 10^9$  (集落形成单位/毫升)。

#### 3. 基因转染

采用胶原包被转孔膜培养板、流式病毒转染方法。将胶原包被的  $0.4\ \mu\text{m}$  孔转孔器放置于细胞培养板，病毒上清持续穿流转膜，以富集病毒上清，与被转染细胞共培养 24 小时 2 次，中间相隔 12 小时，细胞培养及基因转染全过程在低血清培养基进行。该病毒转染可获得人间叶干细胞基因转染阳性率高达 20-50%。参见图 3。其中 5. 为 VSV-G 用以富集病毒上清，6. 为 CMV LN 增强子启动子，7. 为 gag 基因，8. 为 pol 基因，9. 为 Amphi 基因，10. 为 293kj 细胞，11. 为 L3-50 超离心机，12. 为富集的病毒，13. 为转孔细胞培养板，14. 为人原始间叶干细胞群与病毒共培养、转染细胞，15. 为基因修饰的人原始间叶干细胞群回输病员，以满足多种临床用途。

## 五. 人原始间叶干细胞群的应用

### 1. 基因修饰后的人原始间叶干细胞群应用于骨骼愈合

骨骼生长发育中经过三个主要过程：细胞趋化、有丝分裂及分化成骨细胞。创伤后等可诱发后天性骨骼再建，骨形成蛋白可诱导成骨祖细胞，已定向成骨祖细胞无需外源信号可形成前成骨细胞、成骨细胞及骨细胞。

基因修饰后的人原始间叶干细胞群应用于骨骼愈合：病理性骨不联合、骨延期愈合、粉碎性骨折或全关节的修复等病员，尤其有效应用于因自体骨移植或可提供骨不足造成骨缺失的愈合。

富集人原始间叶干细胞，选择诱导成骨细胞生成培养基培养，并将具有诱导成骨细胞的基因（骨形成蛋白 2 或 4 或胰岛素生成因子等）克隆于 IRES 的上游 MSCV-IRES-EGFP 载体成为 MSCV-X-IRES-EGFP 载体，共转染 293Kj 细胞，收集病毒上清转导人原始间叶干细胞群，流式细胞仪分析收集基因修饰的间叶细胞（最终将分化成成骨细胞）。以  $5 \times 10^6$  细胞/每毫升与填充物以 3 比 1 容积混匀，注入

骨缺失部位。填充物为均一，滞留间叶细胞群、允许血管内生长的物质（如羟磷灰石及磷酸三钙等）。

### 2. 肌营养原蛋白基因修饰改善肌营养退行性变

肌营养不良系进行性近端肌萎缩，可波及心脏等。特征为血肌酸激酶增加，肌纤维蛋白降解，分子水平为平滑肌缺乏肌营养原蛋白，如波及胃肠可导致胃酸排空延迟、急性胃扩张、假性肠阻塞。

以往动物实验表明：肌原蛋白基因表达 50 倍可纠正肌营养不良功能。将含有肌原蛋白基因克隆于 IRES 上游，将突变 tyr22DHFR 基因替代 EGFP 基因，构建成 MSCV-肌原蛋白-IRES-tyr22DHFR 基因修饰载体，该载体特点为：tyr22DHFR 基因为甲氢叶酸（MTX）耐药基因（Zhao, RCH., et al, Blood, 1997; 12: 4687），可加压诱导引起该肌原蛋白-IRES-tyr22DHFR 基因拷贝数增加，以获得基因高表达纠正肌营养不良。

人原始间叶干细胞群在较佳的诱导肌细胞生成培养基培养，将含 MSCV-肌原蛋白-IRES-tyr22DHFR 基因病毒上清转导间叶细胞，即病毒拷贝与人间叶细胞 20 比 1，在含有 8 微克鱼精蛋白低血清培养基共培养 24 小时二次，中间相隔 12 小时。经甲氢叶酸（0.25 微摩尔）含胎牛血清培养基筛选 2 周，将表达该载体的人间叶细胞注射肌营养不良患处，含肌原蛋白修饰的肌细胞将与病理性肌纤维融合，最终纠正肌营养不良。

### 3. 基因治疗基因缺陷性疾病

①血友病 A、B 系凝血因子 VIII、IX 缺乏所致的出血性疾病。重型血友病凝血因子低于正常水平 1%。目前血浆或重组因子替代治疗为主要治疗手段。该常规治疗的不足为：药物昂贵及凝血因子体内半衰期短。

②粘多糖贮积病为致命溶酶体贮积失调，由于缺乏 IDS 所致严重骨、神经症状。唯一治疗系对症治疗及骨髓移植，但疗效不显。

③囊性纤维变性：系囊性纤维化转膜调控蛋白缺陷所致。

④多种基因缺陷性疾病均需要建立长期稳定体细胞基因表达分泌系统。人原始间叶干细胞群具备体外大量扩增，且具有体内外长期分化、增殖特性，联合逆转录病毒可稳定整合体细胞基因组染色体 DNA，克服逆转录病毒不易转导非增殖性靶细胞弱点。

该发明采用 MSCV 逆转录病毒具有较强的启始基因功效，可 10 倍高效表达于造血干细胞，并克服基因 silencing 不足。奠定了该系统实施基因治疗的有效性和可行性。

该基因治疗特点为：较低水平表达可纠正基因缺陷，即使整合基因高水平表达也无明显副作用。

采用 MSCV 病员缺陷的正常基因-IRES-EGFP 转导人原始间叶干细胞群，筛选阳性基因携带细胞，冻存细胞，定量回输病员，评估基因表达水平，观察治疗效果。

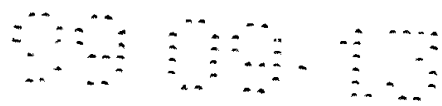
#### 4. 骨髓微环境重建及促进造血基因应用

①病员经大量放疗、化疗后，起支持骨髓造血干细胞的大量骨髓基质细胞受损伤，不能分泌必需造血因子和表达重要粘附因子以维持正常骨髓微环境。

骨髓微环境的重建是扶持造血干细胞骨髓重新生长、分化至关重要的因素，也是骨髓移植后病员度过早期危险期的关键。

大量放疗、化疗前，采集病员骨髓，体外培养人原始间叶干细胞群，冻存，待骨髓移植后回输病员，为病员恢复提供最佳的骨髓微环境。

②再障病员造血微环境受不同程度的破坏，治疗可采集人原始



间叶干细胞群。克隆构建表达人白介素 3 因子的病毒载体, 转导 MSCV-白介素 3-IRES-EGFP 基因于人原始间叶干细胞群, 回输再障病员, 白介素 3 在骨髓内表达具有治疗再生障碍性贫血的作用。

③贫血, 尤其慢性病(如炎症性疾病、风湿性关节炎、严重感染、肿瘤等)导致的贫血。将含促红细胞生成素的逆转录病毒转导人原始间叶干细胞群, 回输慢性疾病引起贫血的病员。

#### 5. 增强免疫、肿瘤疫苗等用途

肿瘤疫苗的基因治疗涉及细胞及分子水平的免疫系统的调控, 组织细胞增殖、分化、存亡的调节。多数肿瘤经转导细胞因子如 GM-CSF、白介素 2、4、6、干扰素等因子可诱导体内特异性肿瘤抗原, 以增强体内识别与特异性杀伤: 如黑色素细胞瘤特异性肿瘤抗原 Magel, Mart1, gp100, 酪氨酸酶的诱导表达。

该基因治疗可用于免疫功能低下或免疫识别障碍所导致的肿瘤。 $\gamma$ -干扰素已广泛地应用于毛状细胞白血病、慢性粒细胞白血病(慢粒)、Kaposi 肉瘤、恶性黑色素瘤等。

采用人原始间叶干细胞群, 具有正常造血、免疫潜能早期骨髓细胞, 经细胞因子修饰后, 具有增强免疫、肿瘤疫苗及抗肿瘤作用。

①慢性粒细胞性白血病, 为造血干细胞恶性肿瘤, 大量中、晚幼粒细胞在外周血恶性增殖。 $\alpha$ -干扰素为有效治疗慢粒化疗之一, 将含有 $\alpha$ -干扰素基因的 MSCV- $\alpha$ -干扰素 IRES-EGFP 病毒基因转导人原始间叶干细胞群, 回输病员, 可持续骨髓内 $\alpha$ -干扰素治疗慢粒病员。

②采用同样方案: 可以 $\gamma$ -干扰素治疗慢性粒细胞白血病、毛状细胞白血病等。

③转导白介素 2、 $\gamma$ -干扰素可治疗全身转移性肿瘤。



## 六、人原始间叶干细胞群分离、体外培养、制备及应用的例作

### 1、获得病员骨髓原始间叶干细胞群

#### ①分离单个核骨髓细胞

采集病员的骨髓细胞，经密度梯度离心 1 6 0 0 转/分骨髓细胞 2 0 分钟，获得单个核骨髓细胞，经含 1 % 牛血清白蛋白磷酸缓冲液清洗细胞 2 遍后，悬浮细胞于磷酸缓冲液。

#### ②富集病员原始间叶干细胞群

采用包被抗鼠免疫球蛋白 M 抗体的磁珠与鼠抗人 CD45 抗原及抗 CD39 的单克隆抗体结合后，再与骨髓单个核细胞室温作用半小时，将与饱和浓度特异性抗体反应的骨髓细胞放置于磁场槽中，经磷酸缓冲液冲洗并收集与磁珠分离的骨髓细胞。将含病员原始间叶干细胞群的骨髓细胞进一步与抗人 CD45、CD39 及 CD14 标记有荧光素抗体反应，经过流式细胞仪分析，分离去除 CD45、CD14 及 CD39 阳性的骨髓细胞。该过程去除了骨髓成熟的淋巴细胞、巨核、单核及红细胞母细胞等。收集病员原始间叶干细胞群。

### 2、体外病员原始间叶干细胞群的培养

将获得病员原始间叶干细胞群放置于经 FN 包被的培养板培养。在含有低小牛血清、地塞米松、BB 血小板衍化生长因子及内皮生长因子，硒、转铁蛋白、胰岛素、亚油酸、白蛋白、抗坏血酸、10 毫升/升抗霉菌素、/1 万单位青霉素、/1 万微克链霉素、25 微克二性要素 B、F-12 营养混合物的 DMEM 培养基培养，病员原始间叶干细胞群体外长期生长且维持未分化状态。

### 3、克隆构建 MSCV-IFN- $\alpha$ -IRES-EGFP 逆转录病毒载体

将病员  $\alpha$  干扰素基因下游端酶切后，以 Klenow 酶反应 4 c，20 分钟补平，DNA 经纯化后，以 XhoI 酶切  $\alpha$  干扰素基因上游，获得 677bp



(XhoI --平端)  $\alpha$  干扰素基因。同样, MSCV 载体以 EcoRI 酶切后 Klenow 酶补平, 再经 XhoI 酶切产生相匹配的连接位点, 将  $\alpha$  干扰素基因克隆至 XhoI --平端的 MSCV 逆转录病毒载体, DNA 序列分析证实获得 MSCV-IFN- $\alpha$ -IRES-EGFP 载体, 参见图 4。

#### 4、获得高滴度含 $\alpha$ 干扰素的病毒上清

体外大量扩增 MSCV-IFN- $\alpha$ -IRES-EGFP, MSCV 及 PCL 质粒 DNA, 将 20 微克上述 DNA 混匀于 725 微升 0.25 摩尔的氯化钙, 再与 725 微升 HBS 缓冲液 (8.2 克氯化钠, 5.9 克 HEPES, 0.21 克磷酸氢二钠, 加水至 500 毫升) 振匀形成匀细的 DNA 沉淀物。

以  $2 \times 10^6$  细胞 / 每 10 毫升 DMEM 培养基培养 293Kj 细胞于明胶包被的 10 厘米直径培养皿, 次日待细胞密度为 40%, 将上述 DNA 沉淀物加入 293Kj 细胞共培养 37 $\cdot$ c, 6 小时, 去掉细胞培养上清, 加入 5 毫升含 15% 甘油磷酸缓冲液室温作用细胞 1 分钟, 以磷酸缓冲液洗 293Kj 细胞后, 加入 5 毫升 DMEM 培养基放置于 37 $\cdot$ c 5% 的二氧化碳孵育箱培养细胞, 第 1、2 天后收集病毒上清。

#### 5、 $\alpha$ 干扰素转导慢粒细胞系 K562 抑制其细胞生长

将被转导的 K562 细胞放置于转孔培养板上腔, 然后加入含高滴度  $\alpha$  干扰素病毒上清或阴性对照 MSCV 病毒上清, 与 K562 细胞共同培养 24 小时 2 次, 中间相隔 12 小时以细胞培养基培养。第 2 天后, 采用流式细胞仪分离、同时表达绿荧光蛋白和  $\alpha$  干扰素的 K562 细胞及仅绿荧光蛋白表达的 MSCV 对照组 K562 细胞, 观察  $\alpha$  干扰素对 K562 细胞的生长影响。

##### ① PCR 检测 $\alpha$ 干扰素转导的 K562 细胞 $\alpha$ 干扰素基因

设计  $\alpha$  干扰素上游引物, 5'-CAG TTC CAG AAG GCT CAA GC-3' 及下游引物 5'-ACC TCC TGC ATC ATA CAG GC-3' 和内源性对照



基因  $\beta$ -Actin 上、下游引物，抽取及纯化  $\alpha$  干扰素或 MSCV 转导的 K562 细胞 DNA，体外在 95 $^{\circ}$ C，1 分钟；58 $^{\circ}$ C，1 分钟；72 $^{\circ}$ C，1 分钟；30 循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 分钟，以扩增  $\alpha$  干扰素基因。  $\alpha$  干扰素转导 K562 细胞可扩增 173bp 长度  $\alpha$  干扰素基因，而 MSCV 对照组为阴性。证实  $\alpha$  干扰素基因已携带于 K562 细胞 DNA 中。

### ② $\alpha$ 干扰素抑制 K562 细胞生长

观察  $\alpha$  干扰素转导 K562 细胞生长，对照组采用 MSCV 转导 K562 细胞，将慢粒细胞系 K562 细胞以  $1 \times 10^5$  / 每孔放置 12 孔细胞培养板，继续观察细胞增殖。测定 1 至 4 天细胞增殖数，每次取 50 微升细胞悬液与胎蓝染色活性细胞计数。结果表明：对照组与  $\alpha$  干扰素转导的 K562 细胞第 1 天细胞增殖相当为  $12 \times 10^4$  / 每毫升，自第 2 天  $\alpha$  干扰素转导 K562 细胞生长开始受到抑制，第 4 天细胞显著受抑制，对照组细胞数为  $90 \times 10^4$  / 每毫升，而  $\alpha$  干扰素转导 K562 细胞仅  $30 \times 10^4$  / 每毫升。

### 6. $\alpha$ 干扰素转导骨髓 CD34 阳性细胞无抑制集落形成作用

采用同样方法将  $\alpha$  干扰素基因转导 CD34 阳性细胞，经流式细胞仪分离  $\alpha$  干扰素阳性骨髓 CD34 细胞。观察  $\alpha$  干扰素基因对骨髓 CD34 阳性细胞集落形成的影响。对照组为 MSCV 转导的 CD34 阳性细胞，测定造血细胞 CFU-GM 集落生长采用 CD34 阳性的 5000 细胞放置于含 10 毫微克 / 毫克白介素 6、白介素 3、G-CSF 以及 3 单位 / 每毫升促红细胞生成素的半固体琼脂培养体系。经 37 $^{\circ}$ C 含 5% 二氧化碳孵育箱培养 2 周后，在倒置显微镜下观察 GM 集落形成单位及 BFU-E (红系集落形成单位) 并计数。结果表明：对照组与  $\alpha$  干扰素组集落相当，约为 250 单位。提示  $\alpha$  干扰素基因无明显骨髓 CD34 阳性细胞集落形成抑制作用。

## 7、 $\alpha$ 干扰素转导人原始间叶干细胞群

将 $\alpha$ 干扰素病毒上清用以转导人原始间叶干细胞群，获得 38%高效转导人原始间叶干细胞。经流式细胞仪富集 $\alpha$ 干扰素阳性病员原始间叶干细胞群，冻存，分批回输病员，应用于慢粒病员的治疗。

本发明的优点是：

1. 分离人原始间叶干细胞群简捷、可行、重复好。
2. 人原始间叶干细胞群可体外大量扩增，第八周多达 1 千万倍，且仍保持原间叶干细胞分化、增殖潜能及表型。
3. 人原始间叶干细胞群可多向分化成成骨细胞、软骨细胞、肌细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞，以及本发明首次报道可分化的多种血管内皮细胞及平滑肌细胞等。
4. 人原始间叶干细胞群，克服了胚胎干细胞的来源困难，体外无法诱导分化成特异组织等不足，又可提供多种造血干细胞所无法提供的间叶组织细胞。
5. 人原始间叶干细胞群结合逆转录病毒为有效、可行的基因治疗系统。可长期稳定表达经病毒整合人体细胞染色体 DNA 的修饰基因，达到基因治疗目的。人原始间叶干细胞群大量增殖允许逆转录病毒稳定整合人基因组染色体 DNA；转染后，该细胞仍保持间叶干细胞原有分化、增殖潜能，体内外可长期稳定表达修饰的基因。  
克服腺病毒、腺病毒相关病毒 (AAV) 极少地转导基因人基因组 DNA 的不足，以及该病毒产物所致的体内不良免疫反应。克服 Lenti 病毒不善安全等不足。
6. MSCV 逆转录病毒载体具高效表达修饰基因于干细胞，无 silencing；采用 IRES 无内源启动子所致基因表达干扰；选用增强绿荧光蛋白快捷分离含修饰基因的阳性细胞。
7. 采用快速转染富集病毒系统，可三天内获得病毒上清高达  $2 \times 10^9$ 。

8. 采用包被转孔培养器流式病毒转染，可获得基因转染人间叶干细胞率高达 20-50%。

9. 人原始间叶干细胞群可诱导多向分化，应用于骨骼修复、平滑肌基因治疗、造血微环境重建、基因缺陷性疾病基因治疗、抗肿瘤疫苗、增强造血、免疫等多种用途。

说明书附图

图 1:

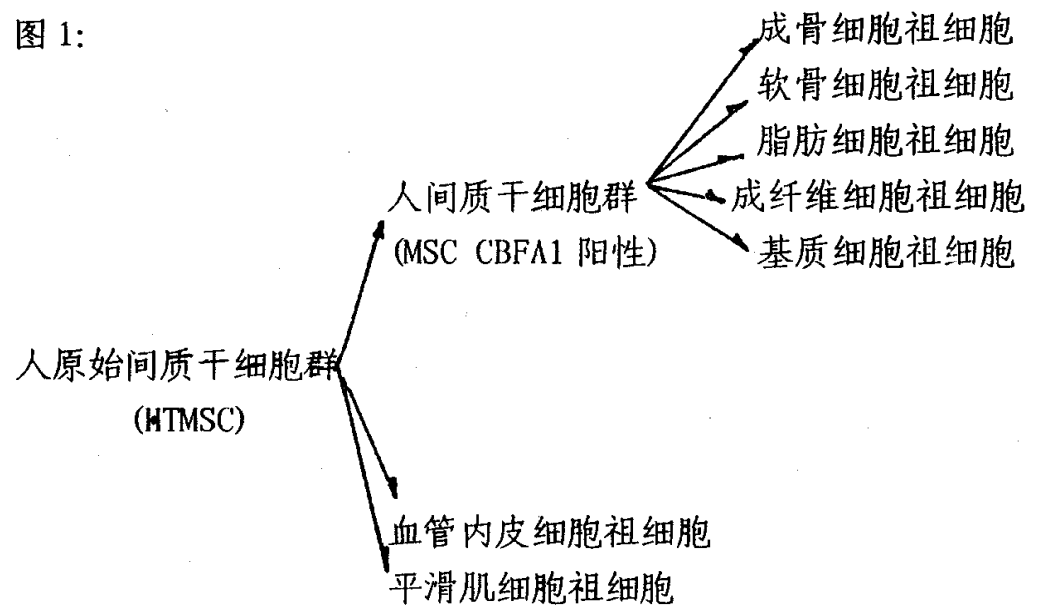


图 2:

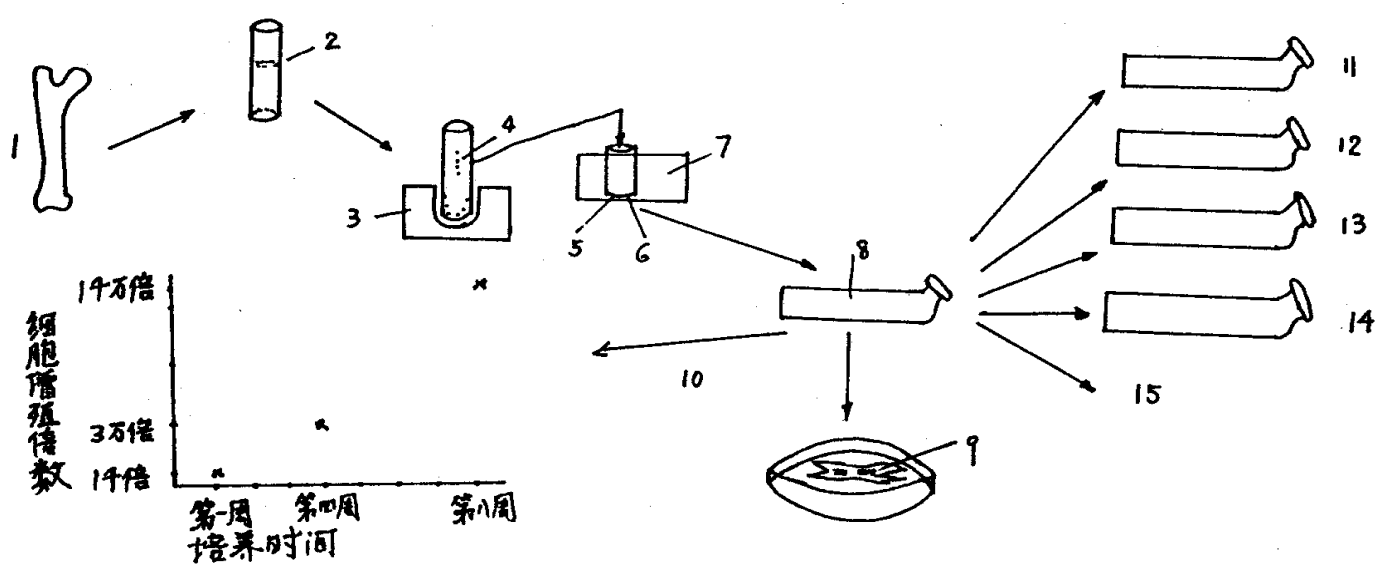


图 3:

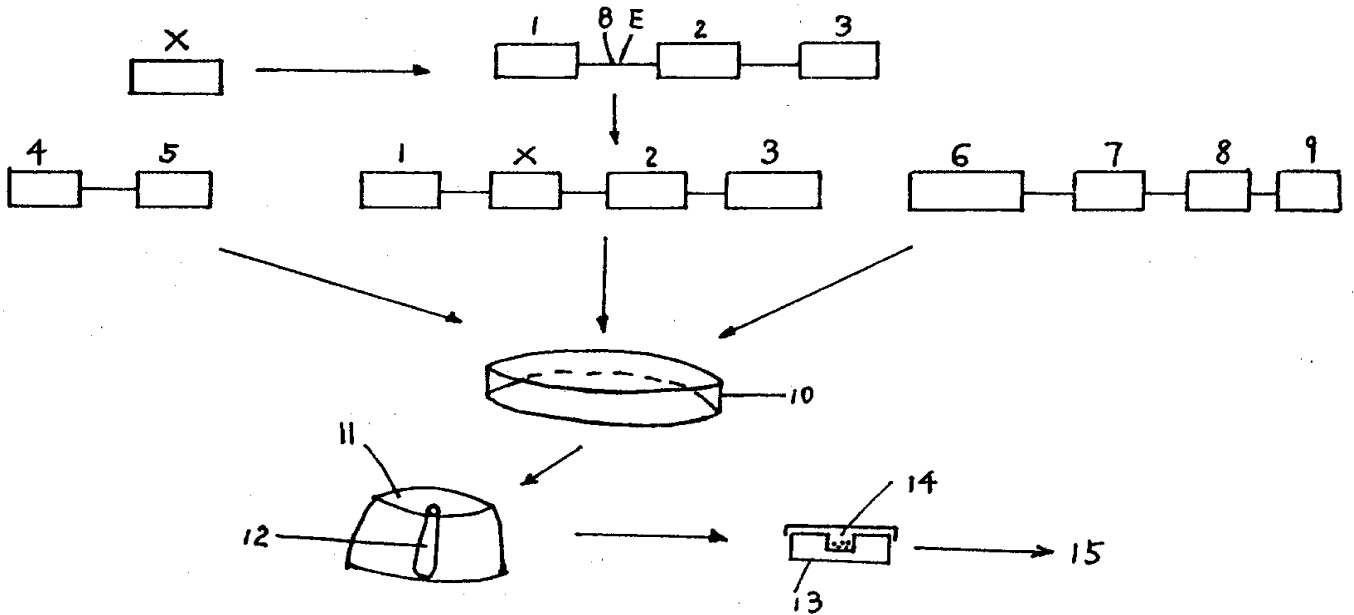
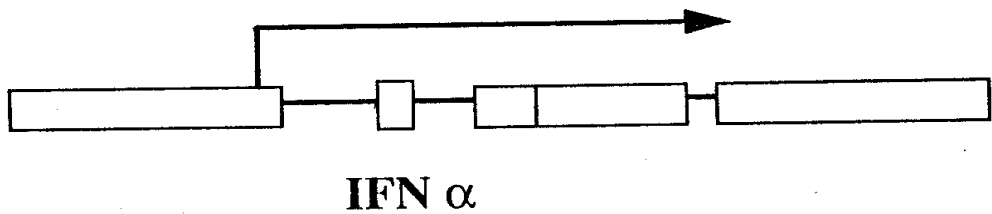


图 4:

**MSCV-IFN  $\alpha$ -IRES-eGFP**



**MSCV**

