



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1470633 B

(45) 授权公告日 2010.09.29

(21) 申请号 03101037.7

第 28-30 行, 第 5 页第 20-26 行, 权利要求书.

(22) 申请日 2003.01.08

审查员 罗霄

(30) 优先权数据

60/398,883 2002.07.26 US

10/287,362 2002.11.04 US

(73) 专利权人 食品工业发展研究所

地址 中国台湾新竹

(72) 发明人 黄效民

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

公司 72003

代理人 徐金国 高龙鑫

(51) Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 0121767 A2, 2001.03.29, 全文.

W0 0234890 A2, 2002.05.02, 说明书第 3 页

权利要求书 2 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

多能体细胞

(57) 摘要

本发明涉及一种具有正常核型的培养的动物体细胞;当该细胞在体外被诱导时会发育成胚状体,当其被引入严重联合免疫缺陷病的小鼠,则会发育成畸胎瘤。本发明进一步涉及制造该细胞的方法,多能细胞可经如下步骤产生:自动物之组织分离出体细胞;在饥饿状态下培养此分离的细胞;以及在培养的细胞当中鉴定和富集多能细胞,其中当该多能细胞引入严重联合免疫缺陷症(SCID)小鼠,该细胞会发育成畸胎瘤。

1. 一种产生多能动物细胞的方法,该方法包括:
自哺乳动物之组织分离出间叶干细胞;
在缺乏碱性成纤维细胞生长因子的饥饿状态下培养此分离的细胞;以及
在培养的细胞当中鉴定和富集多能细胞;
其中,当该多能细胞引入严重联合免疫缺陷症(SCID)小鼠,该细胞会发育成畸胎瘤,
并且其中所述细胞为阶段特异性胚胎抗原-1 阴性。
2. 如权利要求 1 所述的产生多能动物细胞的方法,其中该哺乳动物为人类。
3. 如权利要求 2 所述的产生多能动物细胞的方法,其中该组织为脐带血、骨髓、羊水、脂肪组织、胎盘或外围血液。
4. 如权利要求 3 所述的产生多能动物细胞的方法,其中该组织为脐带血、骨髓或羊水。
5. 如权利要求 4 所述的产生多能动物细胞的方法,其中培养步骤为:将细胞置放在含有 0.5%到 2%血清的培养基中 5 至 10 天,或置放在含有 10%到 20%血清的培养基中 7 至 21 天而不更换培养基。
6. 如权利要求 5 所述的产生多能动物细胞的方法,其中培养步骤为:将细胞置放在含有 0.5%血清的培养基中 5 至 7 天,或置放在含有 20%血清的培养基中两星期而不更换培养基。
7. 如权利要求 3 所述的产生多能动物细胞的方法,其中培养步骤为:将细胞置放在含有 0.5%到 2%血清的培养基中 5 至 10 天,或置放在含有 10%到 20%血清的培养基中 7 至 21 天而不更换培养基。
8. 如权利要求 7 所述的产生多能动物细胞的方法,其中培养步骤为:将细胞置放在含有 0.5%血清的培养基中 5 至 7 天,或置放在含有 20%血清的培养基中两星期而不更换培养基。
9. 如权利要求 2 所述的产生多能动物细胞的方法,其中培养步骤为:将细胞置放在含有 0.5%到 2%血清的培养基中 5 至 10 天,或置放在含有 10%到 20%血清的培养基中 7 至 21 天而不更换培养基。
10. 如权利要求 1 所述的产生多能动物细胞的方法,其中该组织为脐带血、骨髓、羊水、脂肪组织、胎盘或外围血液。
11. 如权利要求 1 所述的产生多能动物细胞的方法,其中培养步骤为:将细胞置放在含有 0.5%到 2%血清的培养基中 5 至 10 天,或置放在含有 10%到 20%血清的培养基中 7 至 21 天而不更换培养基。
12. 如权利要求 10 所述的产生多能动物细胞的方法,其中该组织为脐带血、骨髓或羊水。
13. 如权利要求 12 所述的产生多能动物细胞的方法,其中培养步骤为:将细胞置放在含有 0.5%到 2%血清的培养基中 5 至 10 天,或置放在含有 10%到 20%血清的培养基中 7 至 21 天而不更换培养基。
14. 如权利要求 10 所述的产生多能动物细胞的方法,其中培养步骤为:将细胞置放在含有 0.5%到 2%血清的培养基中 5 至 10 天,或置放在含有 10%到 20%血清的培养基中 7 至 21 天而不更换培养基。
15. 一种产生多能动物细胞的方法,该方法包含:

自动物之组织分离出间叶干细胞；

在饥饿条件下培养此分离的间叶干细胞；以及

在培养的细胞当中鉴定和富集多能细胞；

其中，当该多能细胞引入严重联合免疫缺陷症（SCID）小鼠，该细胞会发育成畸胎瘤，并且其中所述细胞为阶段特异性胚胎抗原 -1 阴性。

多能体细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及一种培养的动物体细胞,更具体地,本发明是关于一种多能体细胞,该细胞在体外被诱导时会发育成胚状体,当其被引入严重联合免疫缺陷病的小鼠,则会发育成畸胎瘤。

背景技术

[0002] 多能胚胎干细胞(pluripotent embryonic stem, ES)是由早期的哺乳类胚胎衍生而来。它们在体内(in vivo)可分化成所有的细胞系统(cell lineages),并且,当它们在体外被诱导时,也可分化成大部分的细胞形式。由于其多能的特性,一般认为胚胎干细胞对于治疗退化或遗传疾病有很大的希望。道德因素阻碍了人类干细胞在研究与治疗上的使用。非胚胎来源的(non-embryonic origin)多能细胞(例如:体细胞)将避免这一障碍。

[0003] 曾经有报告指出,有一些体细胞可以发育成不相关的组织形式(unrelated tissue types)的细胞,然而,其发育功能是有限的。因此必须使体细胞具有不受限的发育功能。

发明内容

[0004] 本发明的目的在提供一个具有正常核型(karyotype)的培养的动物体细胞,并且当该细胞在体外被诱导时,会发育成一个胚状体(embryoid body),亦即一个可更进一步发育成器官结构的细胞团(cellular mass)。此类结构的例子包括原肠(primordial gut),其结构表现出规则的收缩与舒张。由于该培养细胞的来源为非胚胎的或非生殖细胞系(non-germ-line)的,所以称之为体细胞(somatic)。

[0005] 本发明的另一目的在于提供一个具有正常核型的培养的动物体细胞,并且当该细胞被引入严重联合免疫缺陷病的(severely combined immunodeficient, SCID)小鼠时,会发展成畸胎瘤(teratoma)。畸胎瘤是一种包含了所有从三种胚胎初发层衍生的组织的肿瘤,这三种胚胎初发层即外胚层(ectoderm)、中胚层(mesoderm)和内胚层(endoderm)。该组织的例子包括:角膜晶体(corneal lens)和发育中的表皮(developing epidermis)(外胚层);软骨(cartilage)和横纹肌(striated muscle)(中胚层);以及肝和胃肠道(gastrointestinal tracts)(内胚层)。在一实施例中,当此培养的动物体细胞在体外被诱导时,可发育成胚状体(embryoid body)。在另一实施例中,培养的细胞不表达阶段特异性胚胎抗原-1(stage-specific embryonic antigen-1, SSEA-1),亦即 SSEA-1 阴性(SSEA-1 negative)。

[0006] 另一方面,本发明的目的在于提供一种产生多能动物细胞的方法。该方法包括:(1)从动物组织分离出体细胞;(2)在饥饿状态(starving condition)下培养该分离的细胞;和(3)在培养的细胞当中鉴别和富集多能细胞。当此富集的多能细胞被引入 SCID 小鼠,该细胞会发育成畸胎瘤。体细胞可从哺乳类动物分离出来,包括人类。利用此方法可从任何适当的组织分离出体细胞。此类组织的例子包括:脐带血(umbilical cord blood),骨髓(bone marrow),羊水(amniotic fluid),脂肪组织(adipose tissue),胎盘(placenta),和

外围血液 (peripheral blood)。

[0007] 为了产生多能细胞,必须在不适合细胞生长的饥饿条件下培养分离的细胞,例如:在含有 0.5%至 2%血清 (serum) 的饥饿培养基 (starving medium) 中培养 5-10 天;或在含有 10%至 20%血清的一般培养基 (regular medium) 中培养 7-21 天,而不更换介质。一般培养基含有促进细胞增生的营养和因子,饥饿培养基则含较少的营养和因子。该营养包括血清和血清替代物 (serum replacements);而因子包括胰岛素 (insulin),表皮生长因子 (epidermal growth factors, EGF),酸性成纤维细胞生长因子 (acidic fibroblast growth factors, aFGF),和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factors, bFGF)。在饥饿状态下培养的细胞当中,我们可以根据其形态学和胚胎干细胞表面标志 (cell-surface markers) (例如:阶段特异性胚胎抗原-1 阴性) 等特性来鉴定出多能细胞并将其富集。

[0008] 令人意外地,本发明的多能体细胞可在饥饿状态下产生。本发明的其它特色与优点将会在以下的实施方式和申请专利范围中呈现。

具体实施方式

[0009] 本发明是关于培养的动物体细胞。这些细胞是多能的,因为当它们在体外被诱导时会发育成胚状体,或者当它们被引入 SCID 小鼠,则会发育成畸胎瘤。该细胞拥有正常细胞所具备的所有染色体 (chromosomes),并且无显著的改变。换句话说,它们具有正常的核型。

[0010] 该细胞具备未分化的胚胎干细胞的表型 (phenotypes) 特征。举例来说,它们在培养基中会自然地形成平坦的球状集群 (flattened spheroid colonies),在未分化的胚胎干细胞的培养物中发现相似的集群。(参见 Thomson J. et al., Science, 282:1145-1147, 1998.)。该细胞也可显示出未分化的胚胎干细胞的抗原特性,例如:未表达阶段特异性胚胎抗原 (SSEA)-1,但表达出 SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, 和 Oct-4。Oct 是转录因子 (transcription factors) 的一员,对于多能细胞的发育有决定性的影响。Oct-4 特异性地表达在哺乳动物的生殖细胞系 (germ line) 细胞和干细胞,并且对于维持细胞的多能性是必要的。(参见 Nichols J. et al., Cell, 95:379-391, 1998)。

[0011] 该细胞也可具有高度的端粒酶 (telomerase) 活性。端粒酶是一种核糖核蛋白 (ribonucleoprotein),在细胞复制期间,会增加端粒重复 (telomere repeats) 至染色体末端,由此维持端粒与染色体的长度。在生殖细胞系细胞、干细胞、和胚胎组织中已经发现端粒酶的高度表达,但在体细胞中则未发现。因此,在每一次细胞分裂之后,体细胞中的端粒 (和染色体) 会变得较短。最后,经过有限的生命周期 (life span),由于失去染色体的去氧核糖核酸 (DNA),体细胞便进入衰老期。由于回复的端粒酶表达延长了体细胞的生命周期,本发明的细胞显现的高度端粒酶活性暗示其生命周期与干细胞相当。

[0012] 本发明的多能细胞可经由下列步骤产生:自动物组织分离出体细胞,在饥饿状态下培养此分离的细胞,以及鉴定和富集培养的细胞。该多能细胞可从间叶 (mesenchymal) 干细胞制得,而此间叶干细胞则是利用下述实施例 2 的方法或本领域常规的方法,从脐带血,骨髓,羊水,脂肪组织,胎盘,或外围血液细胞等部位分离出来。使用的方法可参考以下著作:Erices A. et al., British J. Haematol., 109:235-242, 2000, Pittenger M. et

al., Science, 284 :143-147, 1999, Safford K. et al., Biochem. Biophys. Research Comm., 294 :371-379, 2002, 和 Erickson G. et al., Biochem. Biophys. Research Comm., 290 :763-769, 2002。将间叶干细胞培养在含有 10-20% 干细胞筛选的 (ES-screened) 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和碱性成纤维细胞生长因子的甲型修饰的最低基本培养基 (alpha-modified MEM) 中, 或上述的饥饿状态中。在饥饿状态下将间叶干细胞转变成多能细胞不需要细胞融合, 也不需要细胞核转移 (nucleus transferring)。经过饥饿过程之后, 根据细胞的形态学 (例如: 细胞大小和形状), 酶的活性 (enzymatic activity) (例如: 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 和端粒酶), 和表面标志 (例如: SSEA-1 阴性, SSEA-3 阳性, 和 SSEA-4 阳性), 可鉴定出多能体细胞。被鉴定的细胞则可通过本领域任何适当的细胞分离技术富集起来。例如: 当细胞倾向于形成群落, 则可利用微量吸管 (micropipette) 在显微镜下直接取出群落。如果要更快速地取得大量的细胞, 则可利用荧光活化细胞分选系统 (fluorescence-activated cell sorting, FACS), 例如: 利用与不同荧光标记接合的抗阶段特异性胚胎抗原 -3 单克隆抗体, 抗阶段特异性胚胎抗原 -4 单克隆抗体和抗阶段特异性胚胎抗原 -1 单克隆抗体, 就可富集阶段特异性胚胎抗原 -3 阳性, 阶段特异性胚胎抗原 -4 阳性, 和阶段特异性胚胎抗原 -1 阴性细胞。这些细胞将可更进一步地被检视其多能性。

[0013] 我们可利用任何适当的方法来检测该细胞的多能性, 例如: 利用以下实施例 5 所描述的体内畸胎瘤形成测定 (in vivo teratoma-forming assay)。由于畸胎瘤包含所有三种胚胎初发层的衍生物, 所以当一细胞有能力形成畸胎瘤时, 即表示该细胞是多能的。另外, 我们也可使用以下实施例 6 描述的体外胚状体形成测定 (in vitro embryoid body-forming assay)。胚状体的形成即表示该细胞是多能的。

[0014] 本发明的细胞可多方面地被应用。该细胞可用以治疗退化或遗传性疾病, 避免人体胚胎操纵的道德考虑。如此一来, 我们可从一个缺少对于组织或器官发展必要的作用基因 (functional gene) 的病人身上分离出间叶干细胞。产生多能细胞之后, 便可引入编码有该功能性基因的表达核酸载体至该细胞中。此载体可透过不同的技术传入细胞, 包括: 磷酸钙共沉淀法 (calciumphosphate co-precipitation), 二乙氨基乙基 - 葡聚糖 - 介导转染 (DEAE-dextran-mediated transfection), 微脂粒感染 (lipofection), 电穿孔法 (electroporation), 显微微量注射法 (microinjection), 或病毒介导技术 (virus-mediated techniques)。必须选择不影响细胞多能性的方法。有关此类技术的描述可参考以下专利, 例如: 美国专利申请书第 5,591,625 号和美国专利申请书第 20020127715 号。在传送作用基因进入细胞之后, 可利用已知的技术将细胞移植回病人身上。由于该细胞是由病人产生, 因此不会引起免疫排斥 (immune rejection)。在适当的情况下, 该移植的细胞可发育成功能性的组织或器官。为了促进其发育, 可对病人施与因子 (factors) 以诱导细胞的发育。此类因子可以是小分子化合物, 肽 (peptides), 和核酸。其例子包括转化生长因子 β (transforming growth factor β), 促进骨生成的蛋白质 (bone morphogenic proteins), 和神经生长因子 (nerve growth factor), 但不仅限于此。

[0015] 本发明的细胞也可用以研究胚胎发育或分化的机制。我们可将此类细胞视为模式系统 (model system), 而鉴定诱导多能细胞发育成特定组织或器官的状态。此外, 我们可利用先前描述 (例如: Shen M. et al., Development, 124 :429-42, 1997) 的分化的 cDNA 筛选 (differential cDNA screening) 来分离胚胎发育期间扮演重要角色的基因。我们可从被

诱导发育成如上述胚状体的多能细胞中,准备 cDNA 基因库 (cDNA library)。该基因库被覆盖在两组复制过滤板 (replica filters) 之间,一组过滤板 (A 组) 利用未诱导细胞制得的 cDNA 筛选,另一组 (B 组) 利用相当数量的诱导细胞制得的 cDNA 筛选。利用公知技术,用以筛选此基因库的 cDNA 可以被标记和显现。然后可以从该基因库中选择在 B 组表现出较强 (相较于 A 组) 杂交信号的 cDNA 克隆株 (cDNA clones)。这些 cDNA 编码基因在诱导的细胞中过度表达。反之亦然,在未诱导的多能细胞中过度表现的基因可被分离出来。同样地,在上述的饥饿过程之前或之后,也可以分离细胞中过度表达的基因。所有这些分离的基因可被进一步地研究以确定它们在不同步骤中起的作用。

[0016] 可利用如 Campbell K. et al., Nature, 380 :64-66, 1996. 文章中所描述的方法,将从非人类动物产生的多能细胞发展成动物的器官或克隆株。因此,这些细胞对于宠物或家畜产业有极大的价值,并且可用以保护濒临绝种的动物。

[0017] 本发明已有一些实施例被详加描述,然而,在不违背本发明的精神和范围之下,可对该发明作各种修饰。此外,其它实施例也包含在下列的申请专利范围之内。

[0018] 下列特定的实施例仅用以说明本发明,但并非用以限制本发明的公开内容。若没有更进一步的详述,一般相信本领域的普通技术人员,在以该描述为基础的情况下,能完全利用本发明。所有在此引用的出版品全部并入参考文献。

[0019] 实施例 1

[0020] 利用免疫细胞化学染色 (Immunocytochemistry staining) 检查细胞标志。

[0021] 将细胞表面标志染色之前,必须于 20℃ 使用 4% 聚甲醛 (paraformaldehyde) 将细胞固定 10 分钟。将细胞骨架蛋白 (cytoskeletal proteins) 染色之前,必须于 -20℃ 使用甲醇将细胞固定 2 分钟,并且以 0.1% 非离子性界面活性剂 Triton X-100 将其穿孔化 10 分钟。将其它细胞内分子染色之前,必须于 20℃ 使用 4% 聚甲醛将细胞固定 10 分钟,并且以 0.1% Triton X-100 将其穿孔化。

[0022] 将固定的细胞在一阻断溶液 (blocking solution) 中置放 30 分钟,此阻断溶液与培养初始抗体者相同,其中包含了磷酸盐缓冲液生理食盐水 (phosphate-buffered saline, PBS), 1% 胎牛血清 (BSA), 和 1% 血清 (Sigma, St. Louis, MO)。然后该细胞被连续培养 60 分钟,每一个伴随初始抗体的细胞在阻断溶液,生物素化抗小鼠第二抗体 (biotinylated anti-mouse secondary antibody), 及链霉亲和素偶联的马萝卜过氧化物酶 (streptavidin-conjugated horseradish peroxidase) 中被适当地稀释。在每一个步骤之间都以含有 3% 胎牛血清的磷酸盐缓冲液生理食盐水冲洗 10 分钟。当细胞以二氨基联苯胺呈色剂 (diaminobenzidine chromagen) (Vector Laboratories Inc., CA) 培养时,马萝卜过氧化物酶活性即会显现。经过此显色作用之后,便可在显微镜之下观测该细胞并将其摄影记录。

[0023] 实施例 2

[0024] 自骨髓和脐带血分离出间叶干细胞。

[0025] 人体骨髓自 Bio Whittaker 公司 (Walkersville, MD) 购得,脐带血在供应个体同意下取得。为了分离间叶干细胞,使用 Ficol-paque ($d = 1.077\text{g/ml}$, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 密度梯度法 (详述请参考: Erices A. et al., British J. Haematol., 109 :235-242, 2000 或 Pittenger M. et al., Science, 284 :143-147, 1999) 自

人体骨髓或脐带血中准备单核细胞。

[0026] 将分离的单核细胞引入组织培养皿中,使其浓度约为 1×10^6 个细胞 / 平方厘米,该培养皿中含有一般介质,带有 20% 干细胞筛选用胎牛血清 (EScell-screened FBS) (Hyclone, Logan, UT) 的甲型修饰最低基本培养基 (alpha-modified minimum essential medium, MEM), 4ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子, 100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 硫酸链霉素 (streptomycin) (Invitrogen, Carlsbad, CA)。培养两个星期之后,许多细胞黏附在培养皿上,这些形态上相同的细胞会以两倍的时间 (约 32 至 36 小时) 自我更新。

[0027] 这些黏附的细胞再进一步地以上述的免疫细胞化学染色检测其特征。对抗 CD34 和 CD45 (hematopoietic 系 (hematopoietic lineage) 的细胞表面抗原) 的抗体是从 Becton Dickinson 公司 (Mountain View, CA) 购得。染色的结果显示细胞对于 CD34 和 CD45 呈阴性的反应,表示该细胞不属于 hematopoietic 系。此外,根据已知的方法 (详述请参考 Pittenger M. et al., Science, 284:143-147, 1999), 使用适当的培养基,可使细胞被诱导分化为成骨细胞 (osteocytes)、软骨细胞 (chondrocytes) 和脂肪细胞 (adipocytes)。分化的骨细胞利用钙结节染色法 (von Kossa) 分析;分化的软骨细胞利用沙黄 O (Safranin O) 染色;脂肪细胞利用油红 O (Oil Red O) 染色。上述的方法可参考 Colter D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:7841-7845, 2001。这些结果指出分离的细胞是间叶干细胞 (Prockop D. et al., Nature, 276:71-74, 1997。)。但是,由于这些细胞在被引入 SCID 小鼠后,无法发育成畸胎瘤,或者当其被诱导时,无法发育成胚状体,因此其发育潜能是有限的。参见以下的实施例 5 和实施例 6。

[0028] 实施例 3

[0029] 上述分离的间叶干细胞在饥饿状态下培养以产生多能细胞。

[0030] 将间叶干细胞培养在实施例 2 所描述的一般培养基中 3 至 5 个继代 (passages)。然后,将该细胞置于含有 0.5% 胎牛血清但缺乏碱性成纤维细胞生长因子的甲型修饰最低基本培养基 (饥饿培养基) 中 5 至 7 天;或选择将细胞培养在一般培养基中两星期而不更换培养基。在上述的饥饿过程中,以显微镜每日观察细胞,并未发现细胞融合的现象。在饥饿过程末期,培养物中出现球状、平坦的群集。使用微量吸管挑出每一个群集,并且将未分化状态的群集培养于小鼠饲养细胞 (feeder cells) (例如:施予丝裂霉素之小鼠胎儿成纤维细胞 (mitomycin-treated mouse STO cells) (ATCC CRL-1503)) 或小鼠胚胎的纤维母细胞 (fibroblast cells) 上,而其培养基为含有 20% 干细胞筛选的胎牛血清、4ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子和 0.1 毫摩尔二巯基乙醇 (2-mercaptoethanol) 的 IMDM 培养基 (Iscoe's modified Dulbecco's medium)。从每一个群集挑出的细胞可维持在未分化状态,并且持续增生超过四个月 (或超过 15 个继代)。

[0031] 实施例 4

[0032] 检测从群集中取得的细胞的形态学、细胞标志表达、酶活性和细胞核型。

[0033] 在光学显微镜或扫描式电子显微镜 (scanning electron microscope) 下观察细胞。若以扫描式电子显微镜检视,则需施行以下步骤:将细胞培养在再生用聚酯薄膜 (Melinex film) 上,再以 2% 四氧化锇 (Osmium tetroxide (w/v)) 固定,然后在 4℃ 下置放于 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中 16 小时,最后经由分级的乙醇系列 (graded ethanol series) 脱水。在使用液体二氧化碳 (liquid carbon dioxide) 和以铬溅射镀膜 (sputter

coating with chromium) 的临界点干燥法 (critical-point drying) 之后, 以 Leo 982 (LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Germany) 扫描式电子显微镜观察细胞, 其电场发射设定为 2 千伏特 (kV) (见 Bozzola J. et al., 1992.)。扫描式电子显微镜的样品准备方法参照: Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists. pp. 40-62. Jones and Bartlett Publishers, Boston.。如同 Thomson J. et al., Science, 282:1145-1147, 1998 文章中所述, 显微照相的结果显示该细胞的形态与未分化的干细胞相似。

[0034] 同时, 也以上述的免疫细胞化学染色显示该细胞的特征。自爱荷华大学的 Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa city, IA) 取得抗阶段特异性胚胎抗原 -1 (MC-480, 1 : 50), 阶段特异性胚胎抗原 -3 (MC-631, 1 : 50), 和阶段特异性胚胎抗原 -4 (MC-813-70, 1 : 50) 的抗体。自 Santa Cruz Biotechnology 公司 (Santa Cruz, CA) 取得抗肿瘤排斥抗原 -1-60 (anti-TRA-1-60) 和抗肿瘤排斥抗原 -1-81 (anti-TRA-1-81) 抗体。结果显示该细胞对于阶段特异性胚胎抗原 -1 为阴性反应, 而对阶段特异性胚胎抗原 -3、阶段特异性胚胎抗原 -4、抗肿瘤排斥抗原 -1-60 和抗肿瘤排斥抗原 -1-81 为阳性反应。如同 Reubinoff B. et al., Nature Biotechnol., 18:399-404, 2000. 文章中所述, 转录因子 Oct-4 的表现也能通过反转录聚合酶连锁反应 (reverse transcription-PCR) 而检测到。

[0035] 利用 Sigma 86-R 试剂盒 (Sigma 86-R kit) (Sigma, St. Louis, MO) 可检测到细胞的碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 活性, 该细胞表现出高度的碱性磷酸酶活性。同时, 利用 TRAPaze ELSIA 端粒酶检测也可得到该细胞的端粒酶活性 (参考: Kim N. et al., Science, 266:2011-2015, 1994.), 其结果显示该细胞具有高度的端粒酶活性。

[0036] 使用已知的方法 (参考: ISCN 1995: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (F. Mitelman, ed.) Karger, Basel (1995)) 确定该细胞的核型。简而言之, 在取出该细胞之前, 细胞以 1 : 4 稀释度次培养 (subcultured) 12 小时。将该细胞收集在胰蛋白 - 乙二胺四乙酸 (trypsin-EDTA) 中, 并在秋水仙素 (colcemid) 中培养 1.5 小时, 然后以低渗的氯化钾 (KCl) 溶解, 再以酸或醇固定。利用已知的方法 (见 Freshney, R in "Culture of animal cells - A manual of basic technique" 3rd edition. A John Wiley & Sons, Inc. New York (1994), pp 205-209) 可分析细胞的中期 (metaphases)。其结果显示该细胞具有人类所有的 46 个染色体, 与正常的人类染色体相较之下并无显著差异。

[0037] 实施例 5

[0038] 为了测试实施例 3 中细胞的多能性, 需进行畸胎瘤形成测定 (teratoma-forming assay)。

[0039] 将大约 1×10^5 个细胞植入 SCID 小鼠的后腿肌肉组织, 在植入后 6-8 周观察到畸胎瘤。取出畸胎瘤并进行组织检查 (检查方法参照 Thomson J. et al., Science, 282:1145-1147, 1998)。所有检查的肿瘤都包含从三种胚胎初发层衍生的组织, 包括: 发育中的胃肠道 (gastrointestinal tract) (内胚层); 软骨、骨 (bone) 和横纹肌 (中胚层); 和角膜晶体、断裂的角蛋白 (fragmented keratin) 和发育中的表皮 (外胚层)。实施例 2 为对照组, 该组的间叶干细胞未在 SCID 小鼠身上发育成畸胎瘤。

[0040] 实施例 6

[0041] 以胚状体形成测定 (embryoid body-forming assay) 测试实施例 3 细胞的多能性。

[0042] 将该细胞培养在非镀膜的细菌培养皿 (non-coated bacteriologic Petridishes) 中 4 至 6 天, 该细胞数增加并在悬浮液中形成球状体 (胚状体)。将胚状体转移至涂布 0.1% 明胶 (gelatin) 的室载玻片 (chamber-slides)。经过一周的培养, 有许多丛集 (clusters) 自球状体产生。而在超过 12 小时的时间中, 每一丛集都呈现每一循环 5-7 秒规律的收缩与舒张, 而此机械的活动与从干细胞发育而来的似肠道器官 (gut-like organ) (原生肠道) 类似 (参考 Yamada T. et al., Stem Cells, 20:41-49, 2002.)。相对地, 当间叶干细胞在同样的状态下被诱导, 并不会发育成胚状体。

[0043] 【其它实施方式】

[0044] 所有在本专利说明书中所公开的特色可以任何方式结合, 每一个在此专利说明书中所公开的特色可以另一个提供相同、相等或相似目的的特色所取代。因此, 除非特别声明, 否则每一个公开的特色只是一般相等或相似特色的实施例。

[0045] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上, 然其并非用以限定本发明, 任何本领域的技术人员, 在不脱离本发明之精神和范围内, 当可作各种更改与修饰, 因此本发明的保护范围当视申请专利范围所界定者为准。