

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680047535.8

[51] Int. Cl.

A61L 27/60 (2006.01)  
A61K 31/775 (2006.01)  
A61K 9/70 (2006.01)  
A61P 17/02 (2006.01)  
C12M 3/04 (2006.01)  
C12N 5/08 (2006.01)

[43] 公开日 2008年12月24日

[11] 公开号 CN 101330935A

[22] 申请日 2006.10.11

[21] 申请号 200680047535.8

[30] 优先权

[32] 2005.10.21 [33] US [31] 60/729,172

[86] 国际申请 PCT/SG2006/000301 2006.10.11

[87] 国际公布 WO2007/046775 英 2007.4.26

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.17

[71] 申请人 细胞研究私人有限公司

地址 新加坡新加坡

[72] 发明人 T-T·潘

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 10 页 说明书 73 页 附图 111 页

## [54] 发明名称

自脐带羊膜分离和培养干/祖细胞及其分化的细胞的应用

## [57] 摘要

本发明涉及皮肤等价物和生产该皮肤等价物的方法，其中皮肤等价物包含支架和自脐带羊膜分离的干/祖细胞。这些干/祖细胞可以是间充质(UCMC)和/或上皮(UCEC)干细胞，其还可以进一步分化为成纤维细胞和角质形成细胞。进一步描述的是自脐带羊膜分离干/祖细胞的方法，其中方法包含在体外将羊膜与脐带的其它成分分开，在允许细胞增殖的条件下培养羊膜组织，并且自组织培养物中分离干/祖细胞。本发明还涉及这些皮肤等价物的治疗性用途。本发明的另一个方面涉及使用自脐带羊膜获得的干/祖细胞产生黏蛋白-生产细胞，和该黏蛋白-生产细胞的治疗性用途。在另一个方面，本发明涉及使用自脐带羊膜获得的干/祖细胞产生胰岛素-生产细胞及其治疗性用途。发明还指使用UCMC

治疗骨或软骨病的方法。此外，发明指使用 UCMC 和/或 UCEC 产生多巴胺和酪氨酸羟化酶以及 HLA-G 和肝细胞的方法。本发明还指使用 UCMC 诱导衰老的角质形成细胞增殖的方法。

1、皮肤等价物，其包含：

支架，其包含自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞。

2、根据权利要求1的皮肤等价物，其中所述自干/祖细胞衍生的细胞是间充质干细胞(UCMC)或上皮干细胞(UCEC)。

3、根据权利要求1或2的皮肤等价物，其中所述细胞是自体的细胞。

4、根据权利要求1或2的皮肤等价物，其中所述细胞是异种细胞。

5、根据权利要求1或2的皮肤等价物，其中所述细胞是同种异体的细胞。

6、根据权利要求1至5中任一项的皮肤等价物，其中所述细胞是哺乳动物来源的。

7、根据权利要求6的皮肤等价物，其中所述细胞是人来源的。

8、根据权利要求1至7中任一项的皮肤等价物，其中所述支架还包含至少一个细胞系，其能够分化成血管或腺体。

9、根据权利要求8的皮肤等价物，其中所述支架包含血管内皮细胞或真皮微血管内皮细胞(DMEC)。

10、根据权利要求9的皮肤等价物，其中所述血管内皮细胞是自脐带衍生的。

11、根据权利要求10的皮肤等价物，其中所述脐带血管内皮细胞是人来源的。

12、根据权利要求1至7中任一项的皮肤等价物，其中所述支架还包含衰老的角质形成细胞的细胞。

13、根据上述权利要求中的任一项的皮肤等价物，其中支架包含生物可降解的材料。

14、根据权利要求1至12中任一项的皮肤等价物，其中支架包含材料，所述材料选自琼脂糖、聚己内酯、铌包被碳、壳聚糖、胶原、透明质酸、磷酸钙、淀粉、羟磷灰石、纤维蛋白、藻酸盐、聚乙醇酸、碳纳米纤维、

多孔性聚碳酸酯、聚四氟乙烯、聚丙烯交酯及其混合物。

15、根据权利要求14的皮肤等价物，其中支架材料是多孔性聚碳酸酯。

16、根据上述权利要求中的任一项的皮肤等价物，其中所述支架包含至少一种胞外基质组分。

17、根据权利要求16的皮肤等价物，其中所述胞外基质组分选自胶原、弹性蛋白、胞间粘附分子、层粘连蛋白、肝素、纤连蛋白、蛋白聚糖、生腱蛋白、肌原纤蛋白及其混合物。

18、根据权利要求17的皮肤等价物，其中所述胞外基质组分是I型胶原。

19、根据上述权利要求中的任一项的皮肤等价物，其中所述细胞能够增殖并进一步分化为成纤维细胞和角质形成细胞。

20、生产皮肤等价物的方法，其包括：

- 提供支架，
- 将自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞放置在所述支架内或支架上，和

- 在第一培养基中孵育所述支架，其允许所述细胞增殖和进一步分化。

21、根据权利要求20的方法，其中所述自干/祖细胞衍生的细胞是间充质干细胞(UCMC)。

22、根据权利要求20的方法，其中所述自干/祖细胞衍生的细胞是上皮干细胞(UCEC)。

23、根据权利要求20至22中任一项的方法，其还包括：

- 在将所述细胞放置到支架内或支架上之前，将胞外基质放置在所述支架内或支架上。

24、根据权利要求21或23的方法，其中方法包括：

- 提供支架，
- 将UCMC放置在所述支架内或支架上，
- 在适于成纤维细胞培养的第一培养基中孵育所述支架，其允许所述UCMC增殖和进一步分化，

- 将UCEC放置在所述支架内或支架上, 和
- 在第二培养基中孵育所述支架, 所述第二培养基允许所述UCEC增殖和进一步分化。

25、根据权利要求 20 至 24 中任一项的方法, 其中所述细胞是自体的细胞。

26、根据权利要求 20 至 24 中任一项的方法, 其中所述细胞是异体的细胞。

27、根据权利要求 20 至 24 中任一项的方法, 其中所述细胞是同种异体的细胞。

28、根据权利要求 24 至 27 中任一项的方法, 其中所述细胞来自哺乳动物。

29、根据权利要求 28 的方法, 其中所述细胞是来自人。

30、根据权利要求 24 至 29 中任一项的方法, 其中所述支架还包含至少一个细胞系, 其能够分化为血管或腺体。

31、根据权利要求 30 的方法, 其中所述支架包含血管内皮细胞或真皮微血管内皮细胞(DMEC)。

32、根据权利要求 31 的方法, 其中所述血管内皮细胞是自脐带衍生的。

33、根据权利要求 32 的方法, 其中所述脐带血管内皮细胞是人来源的。

34、根据权利要求 21 的方法, 其中当所述支架包含 UCMC 时, 所述第一培养基包含适于成纤维细胞培养的培养基, 从而增殖和分化所述 UCMC 为成纤维细胞。

35、根据权利要求 24 或 34 的方法, 其中所述第一培养基包含成纤维细胞生长培养基与胎血清, 例如胎小牛血清(FCS)或胎牛血清(FBS), 从而增殖和分化所述 UCMC 为成纤维细胞。

36、根据权利要求 35 的方法, 其中所述成纤维细胞生长培养基选自 KGM<sup>®</sup>-角质形成细胞培养基(康伯司公司(Cambrex))、MEGM-乳房上皮细胞培养基(康伯司公司(Cambrex))、EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics))、Green's 培养基、CMRL1066(米德技术公司

(Mediatech. Inc))、M171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics))、L-15 培养基、Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(DMEM)、DMEM-F12 和 RPMI 培养基。

37、根据权利要求 34 至 36 中任一项的方法，其中所述第一培养基包含约 90 至约 95%(v/v)成纤维细胞生长培养基和约 5 至约 10%胎牛或胎小牛血清(FCS)。

38、根据权利要求 37 的方法，其中所述第一培养基包含约 90 至约 95%(v/v)CMRL1066(米德技术公司(Mediatech. Inc))和约 5 至约 10%胎小牛血清(FCS)。

39、根据权利要求 22 的方法，其中当所述支架包含 UCEC 时，所述第一培养基包含适于角质形成细胞培养的培养基，从而增殖和分化所述 UCEC 为角质形成细胞。

40、根据权利要求 39 的方法，其中所述第一培养基包含角质形成细胞生长培养基、生长因子、胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸。

41、根据权利要求 40 的方法，其中所述生长因子选自表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子-1、血小板衍生生长因子-BB(PDGFB)、转化生长因子- $\beta$ 、角质形成细胞生长因子(KGF)、TGF- $\alpha$  和双调蛋白。

42、根据权利要求 40 或 41 的方法，其中所述角质形成细胞生长培养基选自 KGM<sup>®</sup>-角质形成细胞培养基(康伯司公司(Cambrex))、MEGM-乳房上皮细胞培养基(康伯司公司(Cambrex))、EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics))、Green's 培养基、CMRL1066(米德技术公司(Mediatech. Inc))、M171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics))、L-15 培养基、Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(DMEM)、DMEM-F12 和 RPMI 培养基。

43、根据权利要求 39 至 42 中任一项的方法，其中所述第一培养基包含角质形成细胞生长培养基、表皮生长因子(EGF)、胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸。

44、根据权利要求 43 的方法，其中所述第一培养基包含 EpiLife<sup>®</sup>培养

基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics))、表皮生长因子(EGF)、胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸。

45、根据权利要求 44 的方法，其中所述第一培养基包含约 98.8 至约 99.4%(v/v) EpiLife®培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics))、约 0.2 至约 0.4%(v/v)胰岛素、约 0.2 至约 0.4%(v/v)转铁蛋白、约 0.2 至约 0.4%(v/v)亚硒酸和约 10ng/ml 表皮生长因子(EGF)。

46、根据权利要求 24 的方法，其中如权利要求 38 至 44 中任一项所要求的所述第二培养基包含适于角质形成细胞培养的培养基。

47、根据权利要求 20 至 46 中任一项的方法，其中支架包含生物可降解的材料。

48、根据权利要求 20 至 46 中任一项的方法，其中支架包含材料，所述材料选自琼脂糖、聚己内酯、铈包被碳、壳聚糖、胶原、透明质酸、磷酸钙、淀粉、羟磷灰石、纤维蛋白、藻酸盐、聚乙醇酸、碳纳米纤维、多孔性聚碳酸酯、聚四氟乙烯、聚丙烯及其混合物。

49、根据权利要求 48 的方法，其中支架材料是多孔性聚碳酸酯。

50、根据权利要求 20 至 49 中任一项的方法，其中胞外基质组分与所述细胞一起放置在所述支架内或所述支架上。

51、根据权利要求 23 或 50 的方法，其中所述胞外基质组分选自胶原、弹性蛋白、胞间粘附分子、层粘连蛋白、肝素、纤连蛋白、蛋白聚糖、生腱蛋白、肌原纤维蛋白及其混合物。

52、根据权利要求 51 的方法，其中所述胞外基质组分是 I 型胶原。

53、治疗皮肤疾病的方法，其包括将权利要求 1 至 19 中任一项定义的皮肤等价物应用在具有所述皮肤疾病的皮肤区域。

54、根据权利要求 53 的方法，其中所述皮肤疾病是烧伤的皮肤、辐射创伤、糖尿病创伤或溃疡。

55、根据权利要求 1 至 19 之一的皮肤等价物或根据权利要求 20 至 54 之一的方法获得的皮肤等价物用于药物组合物的制备的用途。

56、根据权利要求 55 的药物组合物，其用于治疗烧伤皮肤、溃疡、辐

射创伤或糖尿病创伤。

57、包含根据权利要求 1 至 19 之一的皮肤等价物或根据权利要求 20 至 54 之一的方法获得的皮肤等价物的细胞库。

58、产生黏蛋白-生产细胞的方法，其包括：

- 将脐带羊膜上皮干细胞(UCEC)或脐带羊膜间充质干细胞(UCMC)放置在容器中，和

- 在适合黏蛋白-生产细胞培养的培养基中孵育所述细胞。

59、根据权利要求 58 的方法，其中所述培养基包含用于黏蛋白-生产细胞培养的生长培养基、胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸和生长因子。

60、根据权利要求 59 的方法，其中所述生长因子选自表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子-1、血小板衍生生长因子-BB(PDGFB)、转化生长因子- $\beta$ 、角质形成细胞生长因子(KGF)、TGF- $\alpha$  和双调蛋白。

61、根据权利要求 59 或 60 的方法，其中所述用于黏蛋白-生产细胞培养的生长培养基选自 KGM<sup>®</sup>-角质形成细胞培养基(康伯司公司(Cambrex))、MEGM-乳房上皮细胞培养基(康伯司公司(Cambrex))、EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics))、Green's 培养基、CMRL1066(米德技术公司(Mediatech. Inc))、M171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics))、L-15 培养基、Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(DMEM)、DMEM-F12 和 RPMI 培养基。

62、根据权利要求 58 至 61 中任一项的方法，其中所述适合黏蛋白-生产细胞培养的培养基包含用于黏蛋白-生产细胞培养的生长培养基、表皮生长因子(EGF)、胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸。

63、根据权利要求 62 的方法，其中所述适合黏蛋白-生产细胞培养的培养基包含约 98.8 至约 99.4%(v/v) 的用于黏蛋白-生产细胞培养的生长培养基、约 0.2 至约 0.4%(v/v)胰岛素、约 0.2 至约 0.4%(v/v)转铁蛋白、约 0.2 至约 0.4%(v/v)亚硒酸和约 10ng/ml 表皮生长因子(EGF)。

64、根据权利要求 63 的方法，其中所述适合黏蛋白-生产细胞培养的培养基包含约 98.8 至约 99.4%(v/v) CMRL1066(米德技术公司(Mediatech.

Inc))、约 0.2 至约 0.4%(v/v)胰岛素、约 0.2 至约 0.4%(v/v)转铁蛋白、约 0.2 至约 0.4%(v/v)亚硒酸和约 10ng/ml 表皮生长因子(EGF)。

65、根据权利要求 63 的方法，其中所述适合黏蛋白-生产细胞培养的培养基包含约 98.8 至约 99.4%(v/v) M171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics))、约 0.2 至约 0.4%(v/v)胰岛素、约 0.2 至约 0.4%(v/v)转铁蛋白、约 0.2 至约 0.4%(v/v)亚硒酸和约 10ng/ml 表皮生长因子(EGF)。

66、治疗被烟影响的细胞的方法，其包括使包含被烟影响的细胞的组织与按照权利要求 58 至 65 中任一项定义的所产生的黏蛋白生产细胞接触。

67、根据权利要求 66 的方法，其中被影响的细胞是呼吸道或眼表面的细胞。

68、治疗滑膜细胞肉瘤、烟吸入损伤或眼表面损伤的方法，其使用通过权利要求 58 至 65 的任一项的方法获得的黏蛋白-生产细胞。

69、通过权利要求 58 至 65 的任一项的方法获得的黏蛋白-生产细胞的用途，其用于食道和气道组织工程，用于化妆品应用或作为基因/蛋白质递送系统。

70、产生胰岛素-生产细胞的方法，其包括：

- 培养自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞，和
- 在合适的培养基中增殖和分化所述细胞成 $\beta$ -胰岛细胞。

71、根据权利要求 70 的方法，其还包括

- 分离通过所述 $\beta$ -胰岛细胞生产的胰岛素。

72、根据权利要求 70 或 71 的方法，其中所述自干/祖细胞衍生的细胞是间充质干细胞(UCMC)或上皮干细胞(UCEC)。

73、根据权利要求 70 至 72 的任一项的方法，其中所述合适的培养基包含烟酰胺。

74、根据权利要求 73 的方法，其中所述培养基还包含用于 $\beta$ -胰岛细胞培养的生长培养基。

75、根据权利要求 74 的方法，其中所述培养基还包含生长因子或小牛或牛来源的胎血清。



76、根据权利要求 74 或 75 的方法，其中所述培养基还包含胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸。

77、根据权利要求 75 或 76 的方法，其中所述生长因子选自表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子-1、血小板衍生生长因子-BB(PDGFB)、转化生长因子- $\beta$ 、角质形成细胞生长因子(KGF)、TGF- $\alpha$  和双调蛋白。

78、根据权利要求 74 至 77 的任一项的方法，其中所述用于  $\beta$ -胰岛细胞培养的生长培养基选自 KGM<sup>®</sup>-角质形成细胞培养基(康伯司公司(Cambrex))、MEGM-乳房上皮细胞培养基(康伯司公司(Cambrex))、EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics))、Green's 培养基、CMRL1066(米德技术公司(Mediatech. Inc))、M171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics))、L-15 培养基、Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(DMEM)、DMEM-F12 和 RPMI 培养基。

79、通过权利要求 70 至 78 的任一项定义的方法获得的胰岛素生产细胞。

80、治疗与胰岛素水平失衡相关的疾病的方法，其包括向哺乳动物施用通过权利要求 70 至 78 的任一项定义的方法获得的胰岛素生产细胞。

81、权利要求 80 的方法，其中疾病是胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)。

82、根据权利要求 71 至 78 的任一项的方法生产的胰岛素的用途，其用于治疗胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)。

83、治疗骨疾病的方法，其包括施用自脐带羊膜分离的间充质干细胞(UCMC)产生的成骨细胞。

84、治疗软骨疾病的方法，其包括施用自脐带羊膜分离的间充质干细胞生产的软骨细胞。

85、产生多巴胺和酪氨酸羟化酶生产细胞的方法，其包括

- 培养自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞，和
- 在合适的培养基中增殖和分化所述细胞成多巴胺和酪氨酸羟化酶生产细胞。

86、根据权利要求 85 的方法，其还包括

● 分离通过所述多巴胺和酪氨酸羟化酶生产细胞生产的多巴胺和酪氨酸羟化酶。

87、根据权利要求 85 或 86 的方法，其中所述自干/祖细胞衍生的细胞是间充质干细胞(UCMC)。

88、产生人白细胞抗原 G(HLA-G)生产细胞的方法，其包括

- 培养自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞，和
- 在合适的培养基中增殖和分化所述细胞成HLA-G生产细胞。

89、根据权利要求 88 的方法，其还包括

- 分离所述HLA-G生产细胞产生的HLA-G。

90、根据权利要求 88 或 89 的方法，其中所述自干/祖细胞衍生的细胞是间充质干细胞(UCMC)或上皮干细胞(UCEC)。

91、诱导衰老的角质形成细胞增殖的方法，其包括

- 在合适的生长培养基中培养衰老的角质形成细胞，和
- 将脐带羊膜的间充质干细胞(UCMC)添加到所述衰老的角质形成细胞中，以诱导所述衰老的角质形成细胞增殖。

92、根据权利要求 90 的方法，其中所述方法还包括

- 分离所述增殖的衰老的角质形成细胞，和
- 将所述增殖的衰老的角质形成细胞应用到支架内或支架上。

93、根据权利要求 91 或 92 的任一项的方法，其中所述衰老的角质形成细胞是自 35 岁或以上、40 岁或以上、50 岁或以上、60 岁或以上或者 70 岁或以上的患者中分离的。

94、产生肝细胞的方法，其包括

- 培养自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞，和
- 在合适的培养基中增殖和分化所述细胞成肝细胞。

95、根据权利要求 94 的方法，其中所述自干/祖细胞衍生的细胞是上皮干细胞(UCEC)。

96、根据权利要求 94 或 95 的方法，其中所述合适的培养基包含制瘤素-M。

97、根据权利要求 96 的方法，其中所述培养基还包含用于肝细胞培养的生长培养基。

## 自脐带羊膜分离和培养干/祖细胞及其分化的细胞的应用

### 相关申请的交叉文献

本发明要求享有于2005年10月21日提交的美国临时申请号60/729,172的优先权，其内容出于所有目的以其全文引用到本文中作为参考。

### 发明的领域

本发明涉及皮肤等价物和生产该皮肤等价物的方法，其中皮肤等价物包含支架和自脐带羊膜分离的干/祖细胞。这些干/祖细胞可以是间充质(UCMC)和/或上皮(UCEC)干细胞，其还可以进一步分化为成纤维细胞和角质形成细胞。进一步描述的是自脐带羊膜分离干/祖细胞的方法，其中方法包含在体外将羊膜与脐带的其它成分分开，在允许细胞增殖的条件下培养羊膜组织，并且自组织培养物中分离干/祖细胞。本发明还涉及这些皮肤等价物的治疗性用途。本发明的另一个方面涉及使用自脐带羊膜获得的干/祖细胞产生黏蛋白-生产细胞，和该黏蛋白-生产细胞的治疗性用途。在另一个方面，本发明涉及使用自脐带羊膜分离的干/祖细胞产生胰岛素-生产细胞及其治疗性用途。本发明还涉及使用UCMC治疗骨或软骨疾病的方法。此外，本发明涉及使用UCMC和/或UCEC产生多巴胺和酪氨酸羟化酶以及HLA-G和肝细胞的方法。本发明还涉及使用UCMC诱导衰老的角质形成细胞增殖的方法。

### 发明背景

干细胞是具有无限自我更新和分化为多种细胞类型或组织类型的能力的细胞群体。胚胎干细胞(受精后从大约3至5天)无限增殖并且可以天然地分化为全部组织类型：因此称它们为全能干细胞(pluripotent stem cell)(见综述例如Smith, A.G.(2001)Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 17, 435-462)。然而，成体干细胞具有更多组织特异性并且可能具有较差的繁殖能力：因此称它

们为多能干细胞(multipotent stem cell)(见综述例如Paul, G.等(2002)Drug Discov. Today 7, 295-302)。胚胎干细胞和成体干细胞的“可塑性”依赖于它们转分化为与其起源不同且可能跨越胚胎生殖层的组织的能力。

干细胞自我更新的能力对它们作为原始未分化细胞贮存库的功能是关键性的。相反,由于端粒缩短,大部分体细胞具有有限的自我更新能力(见综述例如Dice, J. F.(1993)Physiol. Rev. 73, 149-159)。因此,基于干细胞的治疗具有用于治疗人和动物多种疾病的潜力。

干细胞以及干/祖细胞可衍生自不同来源。胚胎干细胞和成体干细胞的“多谱系”潜能已经得到广泛表征。尽管胚胎干细胞的潜能巨大,但是它们的用途引起许多伦理问题。因此,建议将衍生自骨髓基质、脂肪组织、真皮和脐带血的非胚胎干细胞作为替代来源。这些细胞尤其可以在体外分化为软骨细胞、脂肪细胞、成骨细胞、成肌细胞、心肌细胞、星形胶质细胞和肌腱细胞并在体内(in vivo)发生分化,使这些通常称作间充质干细胞的干细胞成为用于中胚层缺损修复和疾病治疗的有前景的候选对象。

然而在临床使用中,收获此类间充质干细胞引起一些问题。因为需要外科方法以便得到细胞,故细胞的收集对病人造成精神和身体负担(例如,骨髓的收集是用活组织检查针实施的,需要局部甚至全身麻醉的侵入性技术)。此外,在许多情况下,提取的干细胞数目相当少。更重要的是,这些细胞不衍生或分化为上皮细胞。这促进了搜寻其它可能来源的干细胞。

已经鉴别脐带血可作为造血干/祖细胞的丰富来源。然而,对间充质干/祖细胞的存在与否仍有争论。在一个方面,此类细胞不能自足月脐带血中分离或成功培养(Mareschi, K.等(2001)Haematologica 86, 1099-1100)。与此同时,由Campagnoli, C.等(Blood(2001)98, 2396-2402)以及Erices, A.等(Br. J. Haematol.(2000)109, 235-242)得到的结果提示,间充质干细胞存在于一些胎儿器官内,并且在早产胎儿的血液中与造血前体同时循环。因此,国际专利申请WO 03/070922公开了自脐带血分离并培养扩增间充质干/祖细胞的方法和使此类细胞分化成为多种间充质组织的方法。据报道,分离效率约为60%(Bieback, K.等(2004)Stem Cells 22, 625-634)。在同一研究中,已

经确定，从收集脐带血至分离细胞的时间段以及所用血液样品的体积均为实现此产率的重要参数。然而，这些干/祖细胞是否确实源自脐带组织仍存在争论。

近来，已经自脐带组织，即从脐带基质沃顿胶中成功分离间充质干/祖细胞(Mitchell, K.E.等(2003)Stem cells 21, 50-60; 美国专利5,919,702; 美国专利申请2004/0136967)。已显示这些细胞具有分别分化为例如神经元表型和软骨组织的能力。此外，还已经自脐带中存在的三根血管(两根动脉、一根静脉)之一的脐带静脉内皮层和内皮下层分离了间充质干/祖细胞(Romanov, Y.A.等(2003)Stem cells 21, 105-110; Covas, D.T.等(2003)Braz. J. Med. Biol. Res. 36, 1179-1183)。

然而，迄今所用的这些方法均未获得上皮干/祖细胞的分离或培养，所述上皮干/祖细胞是作为上皮细胞治疗的来源，例如皮肤整形、肝脏修复、膀胱组织工程和其它工程化的表面组织。皮肤整形是特别关键且迫切需要的医学治疗，例如从美国可获得的数目来看，其仍需要大量开发。仅在美国，每年就有100,000医院治疗的烧伤和600,000例手术皮肤切除。衰老相关的不愈合性真皮创伤的问题更多，在美国有1100万至1200万受治疗的患者。对于这些病症，欧洲表现出大致相等的患者数。

皮肤具有三层，表皮、真皮和脂肪层，其都执行特定的任务。表皮主要由上皮来源的角质形成细胞产生，而真皮是由间充质来源的成纤维细胞聚集而成。表皮是皮肤的薄的、坚韧的表层。表皮的外部分，角质层，是防水的，并且当未损伤时，可防止大部分细菌、病毒和其它外来物质进入机体。表皮还保护内部器官、肌肉、神经和血管免受外伤。表皮还含有胰岛细胞，其是皮肤免疫系统的一部分。皮肤的下一层——真皮，是纤维和弹性组织的厚层(大部分由聚合物胶原和肌原纤蛋白构成)，产生皮肤的弹性和强度。真皮含有神经末梢、腺体、毛囊和血管。

由于机械力如擦伤、与皮肤癌切除相关的手术创伤、或由于烧伤或其他创伤如慢性静脉溃疡造成的皮肤损失等造成的表皮、真皮或两层(全层创伤)的损伤，通常要求皮肤替换。根据损伤的程度，由于皮肤的广泛缺失，

用取自机体未受影响的部分的患者自身皮肤(自体移植物)替换,有时是不够的。因此,存在通过自体细胞或同种异体细胞的帮助,研发受损皮肤的替代物的需要。

例如,美国专利号6,479,875描述了皮肤替代物,其由支架组成,所述支架整合了由间充质干细胞组成的真皮-形成细胞。然而,这些从骨髓分离的间充质干细胞是稀少的,为了获得足够的间充质干细胞,通常必须从患者获得10-20cc抽吸物。

因此,仍需要用于分离和培养上皮干/祖细胞的方法和可靠来源,其可用于进一步研发适当的皮肤替代物。此外,仍需要伦理上可接受,且不对患者造成生物学负担的,用于分离上皮和间充质干/祖细胞的快速和有效的方法,以便为再生医学和组织工程的多种应用提供足量此类细胞。

### 发明概述

本发明提供包含支架的皮肤等价物,所述支架包括自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞。

在本发明的一个实施方案中,自干/祖细胞衍生的细胞是间充质干细胞(UCMC: 换言之意指脐带内衬(羊膜)间充质干细胞;也称为CLMC)或上皮干细胞(UCEC: 换言之意指脐带内衬(羊膜)上皮干细胞;也称为CLEC)。

用于本发明的皮肤等价物的细胞可以是自体、异种或同种异体的细胞。

此外,用于本发明的皮肤等价物的细胞可以是哺乳动物来源。在本发明的一个实施方案中,细胞是人类来源。

在另一个实施方案中,皮肤等价物的骨架还可以包括其它细胞系,例如但不限于,血管内皮细胞或真皮微血管内皮细胞。在一个实施方案中,这些血管内皮细胞衍生自脐带。根据供体,内皮细胞可以是哺乳动物或人类来源的。

在本发明的一个实施方案中,皮肤等价物包含支架,其包含生物可降解性材料。在另一个实施方案中,该支架包括或由以下材料组成,但不限于这些材料,例如琼脂糖、聚己内酯、铈包被碳、壳聚糖、胶原、透明质

酸、磷酸钙、淀粉、羟磷灰石、纤维蛋白、藻酸盐、聚乙醇酸、碳纳米纤维(carbon nano fibres)、多孔性聚碳酸酯、聚四氟乙烯、聚丙交酯(poly lactide)及其混合物。在本发明的一个实例中, 支架材料是聚碳酸酯。

本发明还提供支架, 该支架可以包括至少一种胞外基质作为自脐带的羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞的支持物。胞外基质组分可以包括但不限于一种或多种材料, 例如胶原、弹性蛋白、胞间粘附分子、层粘连蛋白、肝素、纤连蛋白、蛋白聚糖、生腱蛋白、肌原纤蛋白及其混合物。在一个实施例中, 胞外基质组分是胶原。在另一个实施方案中, 胞外基质是由干/祖细胞自身通过分泌各自的胞外基质组分例如胶原提供的。

在本发明的另一个实施方案中, 在本发明的皮肤等价物中包含的UCMC和/或UCEC能够增殖并分别进一步分化成成纤维细胞和角质形成细胞。

本发明还提供生产皮肤等价物的方法, 其包含:

- 提供支架,
- 将自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞放置在所述支架内或支架上, 和
- 在第一培养基中孵育所述支架, 其允许所述细胞增殖和进一步分化。

在一个实施方案中, 自干/祖细胞衍生的所述细胞是间充质干细胞(UCMC)或上皮干细胞(UCEC)。

在本发明的另一个实施方案中, 当所述支架包含UCMC和UCEC时, 所述第一培养基分别包含适于成纤维细胞或角质形成细胞培养的培养基。

本发明还提供治疗皮肤疾病的方法, 包括用本发明的皮肤等价物接触所述皮肤疾病。本发明还提供本发明的皮肤等价物或通过本发明的方法获得的皮肤等价物用于药物组合物的生产的应用, 以及药物组合物用于治疗烧伤的皮肤和溃疡的应用, 只举出一些示例性的皮肤疾病的实例。

本发明还提供包含本发明的皮肤等价物或通过本发明的方法获得的皮肤等价物的细胞库。

本发明还提供用于产生黏蛋白-生产细胞的方法, 包括:



● 将脐带羊膜内衬膜上皮或间充质干细胞(分别是UCEC和UCMC)放置在容器中, 和

● 在适合培养分泌细胞的培养基中孵育所述UCEC或UCMC。此类黏蛋白-生产细胞可用于治疗例如被烟影响的眼睛表面或呼吸道的细胞。

在另一个实施方案中, 本发明还提供了产生胰岛素-生产细胞的方法, 包含

● 培养自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞, 和

● 在合适的培养基中增殖和分化所述细胞成 $\beta$ -胰岛细胞。

在另一个实施方案中, 本发明提供了通过上述本发明的方法获得的胰岛素-生产细胞, 以及治疗与胰岛素水平失衡相关的疾病, 包括向哺乳动物施用通过上述的本发明的方法获得的胰岛素生产细胞。

在本发明的另一个实施方案中, 提供治疗骨疾病的方法, 包括向患者施用由间充质干细胞产生的成骨细胞, 所述间充质干细胞分离自脐带羊膜(UCMC)。还提供治疗软骨疾病的方法, 包括向患者施用软骨细胞, 其是由自脐带羊膜分离的间充质干细胞(UCMC)生产的。

本发明的另一个实施方案提供产生多巴胺和酪氨酸羟化酶生产细胞的方法, 包括

● 培养自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞, 优选的UCMC, 和

● 在合适的培养基中增殖和分化所述细胞成多巴胺和酪氨酸羟化酶生产细胞。

此外, 本发明涉及使用UCMC和UCEC分别生产人类白细胞抗原G(HLA-G)或肝样细胞的方法。

在本发明的另一个实施方案中, 涉及诱导衰老的角质形成细胞增殖的方法, 包括

● 在合适的生长培养基中培养衰老的角质形成细胞, 并且向衰老的角质形成细胞中添加脐带羊膜的间充质干细胞(UCMC), 从而诱导衰老角质形成细胞的增殖。

## 附图简介

当同时考虑非限制性实例和附图时，参考详细的描述将更好地理解本发明；在附图中：

图1描绘了通过直接的组织外植体方法，在组织培养第2天(图1A)和第5天(图1B、C)的来自脐带羊膜的上皮细胞生长晕(40×放大)。在将羊膜放置于表面之前，用或不用1型胶原/4型胶原混合物(1:2；贝克顿迪肯森公司(Becton Dickinson), New Jersey, USA)包被细胞培养塑料表面。羊膜标本浸泡在5 ml EpiLife培养基或培养基171(两者均来自卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)中。每2或3天更换培养基，在光学显微镜下监控外植体的细胞生长晕。如上所述在不同的时间间隔拍摄显微照片。观察到的多角细胞形态是典型的上皮细胞。

图2描述脐带片段的酶促消化，在第2天(图A、C)和第5天(图B、D)产生类似的上皮细胞(40×放大)。将脐带羊膜分成0.5 cm×0.5 cm的小片，在0.1%(w/v)1型胶原酶溶液(F.霍夫曼-拉罗切公司(F. Hoffmann-Laroche Ltd.), Basel, Switzerland)中37℃消化8小时。样品每30分钟涡旋混合3分钟。在4000rpm离心30分钟收集细胞。将细胞沉淀重悬于补加50μg/ml 胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、50μg/ml 血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)、5μg/ml 转化生长因子-β(TGF-β1)和5μg/ml胰岛素(均自R&D系统公司(R&D Systems), Minneapolis, USA获得)的EpiLife培养基或培养基171(两者均来自Cascade Biologies)中，计数并按 $1 \times 10^6$ 个细胞/皿的密度，接种到用1型胶原/4型胶原混合物(1:2；贝克顿迪肯森公司(Becton Dickinson), New Jersey, USA)预包被的10 cm 组织培养皿。24小时后，用温暖的磷酸缓冲的盐溶液(PBS)洗涤附着的细胞，并用EpiLife培养基或培养基171替换培养基(两者均来自卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)。每2或3天更换一次培养基，并在光学显微镜下监控细胞生长晕。如上所述在不同的时间间隔拍摄显微照片。细胞再次显示出典型的上皮细胞多角形态。

图3描述自脐带羊膜外植的生长出来的间充质细胞。使用补加10%胎小牛血清(FCS)的DMEM作为培养基，在置于组织培养皿后早至48小时观察

到细胞生长晕(40×放大)(图3A、C)。将外植体浸没在5 ml补加10%胎牛血清(美国Hyclone公司(Hyclone), Utah, USA)的DMEM(英杰生命技术公司(Invitrogen Corporation), California, USA)中(DMEM/10% FBS)。培养基每2天或3天更换一次。在光学显微镜下监控细胞生长晕。在不同的时间间隔拍摄显微照片。细胞具有纺锤形形态,和在体外容易并快速的迁移和伸展的特征,非常类似成纤维细胞(图3B、D)。

图4(40×放大)描述通过胶原酶促消化,自脐带羊膜分离的间充质细胞。图4A显示在第2天自脐带羊膜分离的间充质细胞。在第5天观察到细胞增殖(图4B)。将脐带羊膜分成0.5 cm×0.5 cm的小片,并且在0.1%(w/v)1型胶原酶溶液(F.霍夫曼-拉罗切公司(F. Hoffmann-Laroche Ltd.,) Basel, Switzerland)中37℃消化6小时。将样品每15分钟涡旋混合2分钟。通过4000rpm离心30分钟收集细胞。将细胞沉淀重悬于DMEM/10% FBS中,计数并按 $1 \times 10^6$ 个细胞/皿的密度接种在10 cm组织培养皿中。培养基每2天或3天更换一次。在光学显微镜下监控细胞生长晕。在不同的时间间隔拍摄显微照片。细胞再次显示出作为成纤维细胞的间充质细胞典型的纺锤形形态。

图5(40×放大)描述在无血清培养条件(DMEM)和血清培养条件(DMEM/10%FCS)下根据本发明方法分离的脐带羊膜间充质细胞(UCMC,图5E、F、G、H)、正常真皮成纤维细胞(NF109细胞,图5A、B)和脂肪来源的间充质细胞(ADMC,图5C、D)的形态。图5显示相比血清丰富条件(DMEM/10% FCS),在血清饥饿条件(仅有DMEM)下培养的NF和ADMC的细胞形态改变,其表现为更扁平的细胞和较不致密的细胞质,其中细胞更圆并具有致密的细胞质(图5A、B、C、D)。在相同条件的无血清和血清丰富培养基下培养的两组UCMC组中,未观察到形态学的改变(图5E、F、G、H),表明后面这些间充质细胞在行为和生理学上的差异。

图6(40×放大)描述了根据本发明分离的UCMC,其是在无3T3饲养层时,在DMEM/10%FCS中培养的第3天和第7天的UCMC。所见细胞为正在生长的细胞,并且正在形成集落(垂直生长)而未表现放射状扩展。这再一次表明,这些间充质细胞与其更分化的相应细胞相比在行为上的差异。

图7(40×放大)描述了在3T3 饲养层上培养第3和第7天的脐带上皮细胞(UCEC)的集落形成。这种外观与正常的皮肤衍生的上皮角质形成细胞干细胞的外观相似。在后者中, 3T3饲养层维持细胞的干细胞性(stemness)。

图8(40×放大)描述了在3T3 饲养层上培养的第3和第7天, 根据本发明分离的脐带间充质细胞(UCMC)明显的集落形成(图8-1)。3T3 饲养层通常抑制分化的间充质细胞的生长, 如人真皮成纤维细胞。这再一次表明这些间充质细胞与其更分化的相应细胞相比在行为上的差异。图8-2显示了脐带羊膜细胞的集落形成效率测定。

图9-1至图9-28显示Western印迹分析, 通过此分析比较了数种胚胎干细胞标志物在根据本发明分离的UCEC和UCMC中的表达和在真皮成纤维细胞(NF)、骨髓间充质细胞(BMSC)和脂肪来源的间充质细胞(ADMC)中的表达。图9-29和9-30显示了与骨髓、脂肪衍生的干细胞、真皮成纤维细胞和上皮角质形成细胞相比, Western印迹分析检测的白血病抑制因子的分泌(图9-29)和ELISA测定检测的高分泌的激活蛋白A和促滤泡素抑制素(图9-30)分别在脐带羊膜和上皮干细胞培养物的上清液中。固定培养皿中的集落, 并用抗Oct-4抗体(图9.1b)染色, 证实转录因子的表达(图9.1.b)。

图10显示在脐带上皮干细胞中表达的上皮细胞标志物的间接免疫荧光分析, 例如总的细胞角蛋白(CK)、CK17、CK6、CK10、CK19、CK18、CK16、CK15(图10-1); 半桥粒成分-整合素 $\alpha$ 6、整合素 $\beta$ 4; 桥粒成分(图10-2); 基底膜成分-层粘连蛋白1、层粘连蛋白5、IV型胶原、VII型胶原(图10-3)和其它重要胞外基质成分如整合素 $\beta$ 1和纤连蛋白(图10-4)。

图11显示与人骨髓间充质干细胞相比由脐带间充质干细胞(UCMC)分泌的细胞因子和生长因子的细胞因子阵列分析。

图12显示与人表皮角质形成细胞相比由脐带上皮干细胞(UCEC)分泌的细胞因子和生长因子的细胞因子阵列分析。

图13 显示在补加10% 胎小牛血清(FCS)的DMEM(图13-1)、在无血清培养基 PTT-1(图13- 2)、在无血清培养基PTT-2(图13-3、图13-4)和在无血清培养基 PTT-3(图13-5)中培养的UCMC细胞。图13 还显示在无血清培养

基PTT-3中脂肪来源基质细胞(图13-6)和骨髓来源基质细胞(图13-7)的生长。

图14显示了通过DNA微阵列分析的脐带上皮干细胞和间充质干细胞的全面基因表达。UCEC表达总共28055个基因并且UCMC表达总共34407个基因。在两种细胞类型中表达27308个重叠的基因。表达的747个基因对UCEC是独特的,并且表达的7099个基因对UCMC是独特的。在本图中列出所选择的的目的基因。两种类型的干细胞均表达140个与胚胎干细胞和胚胎发育有关的基因。

图15显示使用脐带内衬膜组织的重复外植体扩充脐带上皮干细胞和间充质干细胞的示意图。

图16描述脐带的横截面,显示脐带羊膜内衬膜(LM)、包含的沃顿胶(WJ)以及沃顿胶内支撑的两根脐动脉(UA)和一根脐静脉(UV)。

图17描述自脐带羊膜分离的上皮细胞(UCEC)直接分化为皮肤上皮角质形成细胞(图17A),和自脐带羊膜分离的间充质细胞(UCMC)在体外分化成成骨细胞(图17B)和脂肪细胞(图17C)。

图18描述了自脐带羊膜内衬膜分离的上皮细胞(UCEC)体外分化为皮肤上皮角质形成细胞(图18a;在细胞培养7天后拍摄的照片),和自脐带羊膜内衬膜分离的间充质细胞(UCMC)在体外分化成成纤维细胞(图18b;在细胞培养7天后拍摄的照片)。

图19(200×放大)描述了通过本发明的方法获得的全面发育的皮肤等价物。上皮层由角质形成细胞构成,所述角质形成细胞是通过UCEC在本发明方法具体限定的培养基中孵育和分化产生的。真皮层是通过UCMC在本发明方法具体限定的培养基中孵育和分化产生的角质形成细胞构成的,也生长在胞外胶原基质中,并且包括在本发明的皮肤等价物之内。

图20a(1200×放大)描述了根据实施例12描述的方法产生的皮肤等价物(CSE-1)的角质形成细胞表面外观。图20b(2000×放大)描述了UCMC衍生的成纤维细胞在胶原支架(格子)中的外观,所述细胞是根据实施例12描述的方法获得的。

图21a(2000×放大)描述了根据实施例13描述的方法产生的皮肤等价物(CSE-2)的角质形成细胞表面外观。图21b(3000×放大)描述了UCMC衍生的成纤维细胞在胶原格子中的外观,所述细胞是根据实施例13描述的方法获得的。

图22描述了本发明的黏蛋白-生产细胞。图22a显示了在PTT-6中培养3、7和10天后黏蛋白-生产细胞的发育。图22b显示了通过在SDS-PAGE中其分子量来检测的在PTT-6中培养的UCEC(指UCEC-17的沉淀1、2、3、6(P1、P2等))产生的黏蛋白。其它细节参见实施例16。

图23描述了孵育在PTT-10和烟酰胺中的UCEC。如从照片中可见,与烟酰胺孵育的UCEC分化成 $\beta$ -胰岛细胞(图23b),而在只有PTT-10中生长的UCEC则没有(图23a)。

图24描述了为了软骨发育,UCMC软骨形成分化为软骨细胞。基于用修饰的PTT-5诱导,从UCMC发育的软骨细胞已经用阿辛蓝(Alcian Blue)染色。在图24B中观察到软骨细胞的阳性染色。未分化的UCMC细胞观察到阴性染色(图24A)。

图25显示了在多个UCEC样品中的胰岛素表达,所述UCEC处于实施例15中描述的ES Cult培养基(干细胞技术公司(Stem Cell Technologies Inc.), Vancouver, Canada)或BBRC06培养基的诱导下。该实验显示,UCEC具有分化成胰岛素-生产细胞的潜能,其可用于治疗糖尿病。

图26A和图26B展示了酪氨酸羟化酶(TH)和多巴胺通过分化的UCMC细胞的分泌和表达,更详细的描述在实施例18中。多巴胺用于治疗帕金森综合征患者。图26C显示阴性对照。

图27A和图27B展示了实施例19中描述的HLA-G通过分化的UCMC和UCEC细胞的分泌和表达。

图28A、28B和28C显示UCMC诱导衰老的皮肤角质形成细胞(asK)和真皮成纤维细胞的增殖的实验的结果。该实验使用自50或60岁患者获得的皮肤细胞。该实验展示了UCMC的增殖效果,其因此也可用于创伤愈合、组织修复、再生、复壮(rejuvenation)、化妆品和皮肤护理应用。

图29A显示了UCMC和UCEC在胶原格子中的器官型共培养。在这些间充质组织等价物(MTE)构建体中观察到了上皮。图29B显示培养的皮肤等价物的皮肤类似结构。UCMC细胞增殖的胶原格子支持人角质形成细胞干细胞的完全分化。这些附图显示UCMC和UCEC可用于构建体外器官样组织，用于组织修复和再生和药物发现。

图30A和30B展示了UCMC细胞能够生长在TissueFleece<sup>®</sup>E(奥地利百特公司(Baxter AG), Austria)和BoneSave<sup>®</sup>(美国史赛克公司(Stryker Inc.), MI, USA)的胶原和骨支架之内和之上。附图显示被染色的、生长在实施例2描述的支架上的活UCMC。

图31指实施例22描述的实验，展示了植入小鼠的UCMC聚集(populated)的胶原支架的生血管性质。图31B和C显示21天后观察的宏观和微观的维管形成。图31A显示植入前在生长培养基中的UCMC聚集的支架。

图32A至C展示UCMC用于治疗全层烧伤(3度)的临床应用。图32A显示在53岁老年女性患者的全层烧伤上的创面床准备。将UCMC细胞接种到Biobrane创伤敷料(陶氏伊可药物公司(Dow Hickam Pharmaceuticals), Texas, USA)上。按实施例23中的描述将UCMC-Biobrane构建体转移到创伤上(图32B)。在没有皮肤移植的第7天观察到完全愈合，并在随访3个月内稳定(图32C)。

图33展示了UCMC用于治疗实施例24中描述的2岁男性患者的部分皮肤层创伤(2度)的临床应用。在第3天观察到创伤的完全愈合。

图34展示了UCMC用于治疗2岁男性患者的全层烧伤(3度)的临床应用。将UCMC与SoloSite<sup>®</sup>胶(施乐辉公司(Smith&Nephew), Hull, UK)混合，按实施例23中描述的糊在创伤上。用该方法在第5天观察到创伤的完全愈合。

图35展示了UCMC用于治疗患有血管瘤的1岁儿童的非愈合性辐射创伤的临床应用。用常规的创伤治疗，原始创伤在90天的时期没有愈合。UCMC在Tegaderm<sup>®</sup>创伤敷料上培养并如实施例25中描述的转移到创伤上。经过为期20天的UCMC细胞疗法，辐射创伤完全愈合了。

图36和图37A和B展示了UCMC用于治疗非愈合性糖尿病创伤(图36)、非愈合性糖尿病食品创伤(图37B)和失败的皮瓣供区创伤(图37A)的临床应用。后两者经过超过6年的常规治疗不能愈合。按实施例26中的描述培养UCMC并与SoloSite<sup>®</sup>胶(施乐辉公司(Smith&Nephew), Hull, UK)混合。

图38显示在BBRC06H培养基(BBRC06H培养基是BBRC06的修饰版,如实施例15中描述的,不添加烟酰胺并添加50 $\mu$ g/ml的制瘤素-M)的诱导下UCEC的清蛋白表达。该实验显示UCEC具有分化为肝细胞的潜力,其可用于治疗肝脏疾病或用于测试新药细胞毒性的体外模型。

### 详细说明

本发明基于令人惊讶的发现,即可以使用脐带羊膜作为来源形成皮肤等价物,从所述来源中可以在体外条件下成功的分离和扩增干/祖细胞,例如间充质干/祖细胞和上皮干/祖细胞。使用这些细胞,发明提供皮肤等价物,其包含或基本由支架组成,所述支架包括来自自脐带羊膜衍生的干/祖细胞的细胞。更惊讶的发现这些干/祖细胞表现胚胎干细胞样特征。最近,羊膜(也被称为羊膜内衬膜),即包裹胎盘并发育哺乳动物胚胎的最内层膜囊,已经作为眼表面重构的天然底物和扩增角膜缘上皮干细胞的生物底物使用(参考例如 Anderson, D.F.等(2001)Br. J. Ophthalmol. 85, 567-575 Grüterich, M.等(2003)Surv. Ophthalmol. 48, 631-646)。然而,迄今还没有描述用于自羊膜分离干/祖细胞的方法,至少对于人类,也没有报道将覆盖脐带的羊膜作为干细胞来源,所述干细胞用于生产本发明的皮肤等价物。

支架被用作本发明的皮肤等价物的基底。组织工程领域已经广泛的使用支架构建可移植修复机体中的缺陷部位的新组织,或在生物人工装置中作为细胞容器。支架形成三维基质,作为细胞增殖和最终组织形成的模板。在支架中培养细胞通常涉及在整个支架种植细胞,并允许细胞在支架内增殖预定量的时间。



因此, 本发明提供皮肤等价物和获得它的方法, 其中在一个实施方案中, 支架包括或由生物可降解的材料制成。支架使用生物可降解的材料是有利的, 例如, 对于组织工程, 其中含有细胞的支架被用于修复活组织如皮肤中的缺陷部位。本发明中使用的支架的一个有效方面是它们对于细胞培养基的透入性, 这对于将营养物和代谢物运到和运离在所述支架中包括的细胞是必须的。在本发明中, 支架还包括或由以下材料制成, 例如琼脂糖、聚己内酯(Endres.M等人, *Tissue Engineering*, 2003, 第9卷第4期, 第689-702页)、氦包被碳、壳聚糖、羟磷灰石-磷酸三钙(Harris,C.T.和Cooper,L.F., *Comparison of matrices for hMSC delivery*, 2004, 第747-755页)、胶原、透明质酸、磷酸钙、淀粉、羟磷灰石、纤维蛋白、藻酸盐、聚乙醇酸、碳纳米纤维、聚四氟乙烯、聚乳酸(Moran,J等人, *Tissue Engineering*, 2003, 第9卷第1期, 第63-70页)及其混合物。本发明中还可以使用在美国专利6,231,879中描述的泡沫支架, 其基于热塑弹性体, 例如聚酰胺、聚酯、聚乙烯、聚偏氟乙烯、聚氨基甲酸乙酯(polyethyurethane)或聚硅氧烷。在一个实施方案中, 使用多孔性聚碳酸酯作为支架材料。

其中包裹了细胞种的支架可以具有任何规则或不规则的(外部)形状。如果支架是例如用于皮肤组织工程, 则支架的形状将适合支架将用于的缺陷部位的形状。在本发明中使用的支架一般是约 $1\mu\text{m}$ 至约 $5\mu\text{m}$ 厚, 在一些实施方案中可以具有表面积约 $0.5\text{cm}^2$ 至约 $20\text{cm}^2$ 。

为了获得用于本发明的皮肤等价物的细胞, 在本文中描述了用于自脐带羊膜分离干/祖细胞的方法。方法包括:

- (a)在体外将羊膜与脐带的其它成分分离;
- (b)在允许细胞增殖的条件下培养在步骤(a)中获得的羊膜组织; 和
- (c)分离干/祖细胞。

为了自脐带分离细胞, 通常在(对于人类的情况, 婴儿)出生后立即收集脐带或其一部分, 并且为了运输到实验室, 在适合操作哺乳动物组织的培养基中转移。此类培养基的实例包括但不限于Leibovitz培养基, 其可自供应商如西格玛-阿尔德里克公司(Sigma Aldrich), Saint Louis, Missouri

USA或美国Hyclone公司(Hyclone), Logan, Utah, USA商购。然后, 通常在无菌条件下处理脐带。脐带的处理通常包括, 通过用合适的缓冲液如磷酸缓冲的盐溶液洗涤, 去除残留在表面或在脐带血管内的血液。然后, 通常将脐带分成更小的片, 如通过切割, 并在分离羊膜和其它成分前再次洗涤。在这一点上, 注意不是必须在出生后立即处理哺乳动物供体的脐带, 而是可能收集脐带并任选的在无菌条件下洗涤并分成更小片后, 通过深低温-保藏保存脐带或其部分, 并将如此获得的样品储存在例如液氮中, 用于以后从脐带分离细胞。

术语“深低温-保藏”在本文中使用的的是其常规含义, 描述这样的处理, 其中通过冷却到低的零下温度, 例如(通常)-80℃或-196℃(液氮的沸点), 保存细胞或整个组织。可以根据本领域技术人员已知的进行深低温-保藏, 并可以包括使用冷冻-保护剂例如二甲亚砜(DMSO)或甘油, 其减慢脐带细胞内冰晶的形成。

在本文中使用的术语“干/祖细胞”指从脐带衍生的任何细胞, 其具有无限自我更新和分化成多种细胞或组织类型(例如内皮细胞、上皮细胞、成纤维细胞、肌细胞或神经元)的能力。并不是需要皮肤等价物的每个受试者都可以提供脐带作为自体干/祖细胞的来源(即, 从与稍后使用本发明的皮肤等价物的个体相同的个体的脐带羊膜获得的细胞)。因此, 本文也包括异种的(即, 在本发明的情况下, 从人类以外的物种的脐带羊膜分离干/祖细胞)或同种异体的(即, 在本发明的情况下, 从他人的脐带羊膜分离干/祖细胞)干/祖细胞的用途。此外, 用于皮肤等价物的细胞, 和根据本发明的其生产方法, 可以来自任何哺乳动物物种, 例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、山羊、狗、猫、绵羊、猴子或人, 在一个实施方案中人来源的细胞是优选的。

术语“胚胎干细胞样特性”指脐带衍生的细胞的能力, 即它们可以——与胚胎干细胞几乎或完全一样的——自发分化为所有的组织类型, 意味着它们是全能干细胞。

本文中使用的术语“羊膜”指包裹发育中的哺乳动物胚胎的最内层膜囊。在妊娠期间, 胎儿由称作羊水的液体包围并缓冲。这种液体连同胚胎

和胎盘被包裹在称作羊膜的囊中，该囊还覆盖脐带。由于如下原因羊水至关重要。羊水缓冲并保护胚胎，允许胚胎自由移动。羊水还允许脐带漂浮，防止其受到挤压并防止切断来源于胎盘血管内循环血液的氧气和营养素对胚胎的供应。羊膜包含维持稳态环境的羊水，保护胚胎环境不受外部环境的影响。这种屏障还保护胚胎不受可能沿阴道上行并可能引起感染的生物(如细菌或病毒)的影响。

用于组织培养的培养基和试剂在本领域内众所周知(参考例如, Pollard, J.W.和Walker, J.M.(1997)Basic Cell Culture Protocols, 第二版, Humana Press, Totowa, NJ; Freshney, R.I.(2000)Culture of Animal Cells, 第四版, Wiley-Liss, Hoboken, NJ)。用于培育/转运脐带组织样品的合适培养基实例包括但不限于Dulbecco's改良Eagle培养基(DMEM)、RPMI培养基、CMRL 1066、Hanks'平衡盐溶液(HBSS)、磷酸缓冲的盐溶液(PBS)和L-15 培养基。用于培养本发明的干/祖细胞的适宜培养基实例包括但不限于Dulbecco's改良Eagle培养基(DMEM)、DMEM-F12、RPMI培养基、CMRL 1066、EpiLife<sup>®</sup> 培养基和培养基171。培养基可以补加胎小牛血清(FCS)或胎牛血清(FBS)以及抗生素、生长因子、氨基酸、抑制物等，这些完全为技术人员的常识范围内。

分离干/祖细胞的方法，还包括：

(a")在培养前，通过酶促消化和/或直接的组织外植体技术，自羊膜组织中分离这些干/祖细胞。本文中使用的术语“酶促消化技术”意指加入酶以将细胞从主要组织块(这里指脐带羊膜)释放出。随后收集分离的细胞。本文中使用的术语“直接的组织外植体技术”意指首先将组织置于无酶培养基内。随后，在精心条件下细胞自行从主要组织块分离，随后收获细胞用于收集。

通过酶处理或直接的组织外植体法分离特定组织或器官的细胞的方法是本领域普遍已知的(参考例如Pollard, J.W.和Walker, J.M.(1997)Basic Cell Culture Protocols, 第二版, Humana Press, Totowa, NJ; Freshney, R.I.(2000)Culture of Animal Cells, 第四版, Wiley-Liss, Hoboken, NJ)。可以

将催化组织解离的任意酶用于实施该方法。在一个实例中，为此目的使用胶原酶。使用作为粗制品或纯化形式的酶。所述酶可以自任意原核生物或真核生物(最优选溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*))纯化或通过基因技术重组产生。可以应用任意类型胶原酶，即I型、II型、III型、IV型或其任意组合。在一些实例中，优选使用I型胶原酶。

在一个实例中，本发明提供用于分离具有胚胎干细胞样特性的干/祖细胞的方法。这些细胞在形态上最终可分化为，但不限于，上皮干细胞或间充质干细胞。

因此，在另一个实施方案中，本发明提供皮肤等价物，其中自干/祖细胞衍生的细胞是间充质干细胞(UCMC)或上皮干细胞(UCEC)。这些细胞(UCMC和UCEC)是以分离上皮和/或间充质干/祖细胞的方法获得的，其中与上述公开一致，这些细胞可以具有胚胎干细胞样特性。

上皮干/祖细胞(UCEC)包括显示上皮细胞样形态(即多角形状)的任意细胞，其可以分化为任意类型上皮细胞例如(但不限于)皮肤上皮细胞、毛囊细胞、角膜上皮细胞、结膜上皮细胞、视网膜上皮细胞、肝上皮细胞、肾上皮细胞、胰腺上皮细胞、食管上皮细胞、小肠上皮细胞、大肠上皮细胞、肺和呼吸道上皮细胞、膀胱上皮细胞或子宫上皮细胞。

间充质干/祖细胞(UCMC)包括显示间充质细胞样形态(即纺锤样形状)的任意细胞，其可以分化为任意类型的间充质细胞例如(但不限于)皮肤成纤维细胞、软骨细胞、成骨细胞、肌腱细胞、韧带成纤维细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、脂肪细胞、衍生自内分泌腺的细胞以及神经外胚层细胞的全部变体和衍生细胞。

分离干/祖细胞的方法还可以包含：

(d)在允许细胞发生克隆扩充的条件下培养干/祖细胞。

术语“克隆扩充”(有时也称作“有丝分裂性克隆扩充”)涉及细胞分化程序中早期发生的过程，通过该过程使干/祖细胞变成特定谱系并且随后发生终末分化。本领域众所周知诱导祖细胞克隆扩充的条件在不同细胞类型间变化明显。不限于特定的方法，诱导克隆扩充通常通过在已经优化用于细

胞增殖的生长培养基中培育干/祖细胞而实现。此类培养基可从众多供应商处得到。此类培养基的非限制性实例是KGM<sup>®</sup>-角质形成细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA), MEGM-乳房上皮细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.) Oregon, USA)、Green's培养基、CMRL 1066(米德技术公司(Mediatech, Inc.), Virginia, USA)或培养基171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)。通常, 这些培养基需要补加诱导细胞增殖的试剂如生长因子。此类试剂可以混合于单一溶液中, 如人角质形成细胞生长补充试剂盒(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies.), Oregon, USA)(仅举例), 或者可以单独地补加。此类试剂包括但不限于生长因子(例如表皮生长因子、胰岛素样生长因子-1、血小板衍生生长因子-BB、转化生长因子- $\beta$ 、角质形成细胞生长因子(KGF; 也称为HBGF-7或FGF-7)、TGF- $\alpha$ 、双调蛋白)、激素(如牛垂体提取物)、氢化可的松、转铁蛋白和其它任何合适组合等以诱导特定细胞类型的克隆扩充。术语“克隆扩充”还包括体内细胞培养, 例如通过将细胞注射至哺乳动物如人、小鼠、大鼠、猴、猿中。

本发明提供皮肤等价物, 其模拟了皮肤的天然组成, 具有表皮层和真皮层或具有这两层皮肤层中的任一层。出于该目的, 本发明的细胞例如UCMC和UCEC可分别分化成成纤维细胞和角质形成细胞。因此, 本发明在一个实施方案中提供了生产皮肤等价物的方法, 包括:

- 提供支架,
- 将自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞放置在所述支架内或支架上, 和
- 在第一培养基中孵育所述支架, 其允许所述细胞增殖和进一步分化。

如上所述, 由于本发明的自脐带羊膜分离的干/祖细胞具有分化成UCMC和UCEC的潜能, 在一些实施方案中, 在生产皮肤等价物的方法中, 优选的使用自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的UCMC和UCEC。

在本发明的一个实施方案中，按实施例20中描述获得的UCMC提取物可用于诱导从细胞系的细胞生长，所述细胞系由于它们的实足年龄，在普通生长条件下完全不增殖或不太增殖。例如在本文中描述的UCMC提取物可用于诱导从60岁患者获得的衰老角质形成细胞(asK)的生长。通过使用UCMC提取物可以诱导生长的其它细胞系是真皮成纤维细胞(NF)，如实施例20中描述的。

因此，本发明涉及诱导衰老角质形成细胞增殖的方法，包括在合适的生长培养基中培养衰老的角质形成细胞，并向衰老的角质形成细胞添加脐带羊膜的间充质干细胞(UCMC)，以诱导衰老的角质形成细胞增殖。方法还包括增殖的衰老角质形成细胞的分离，和将它们应用于支架内或支架上。在一个实施方案中，可以自30岁或以上、35岁或以上、40岁或以上、50岁或以上、60岁或以上、70岁或以上甚至80岁以上的受试者中分离衰老的角质形成细胞。然而，还可以从比30岁更年轻的受试者中分离衰老的角质形成细胞。

根据影响皮肤的创伤或疾病的严重程度，可能只置换一层就足够，即只提供表皮层，或者只提供真皮层，在所述真皮层上放置已经培养好的或已经从其他来源获得的形成表皮的角质形成细胞。为了获得表皮层，UCEC可以分化为角质形成细胞，为了获得真皮层，UCMC可以分化成成纤维细胞。

因此，在本发明的方法中，当所述支架包含UCEC时，第一培养基包括适于角质形成细胞培养的培养基，从而增殖和分化所述UCEC成角质形成细胞。

在该情况下，该第一培养基包括角质形成细胞生长培养基、生长因子、胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸。

生长因子可以是，例如表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子-1、血小板衍生生长因子-BB(PDGFb)、转化生长因子- $\beta$ 、角质形成细胞生长因子(KGF)、TGF- $\alpha$ 或双调蛋白。

角质形成细胞生长培养基可以是例如KGM<sup>®</sup>-角质形成细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、MEGM-乳房上皮细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)、Green's培养基、CMRL1066(米德技术公司(Mediatech, Inc), Virginia, USA)、M171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)、L-15培养基、Dulbecco's改良Eagle培养基(DMEM)、DMEM-F12和RPMI培养基。

在一个实施方案中,当所述支架包含UCEC时,为了增殖和分化所述UCEC为角质形成细胞,适于角质形成细胞培养的第一培养基包括角质形成细胞生长培养基、表皮生长因子(EGF)、胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸。在另一个实施方案中,该第一培养基包括EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸。在另一个实施方案中,该第一培养基包含约98.8至约99.4%(v/v) EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)、约0.2至约0.4%(v/v)胰岛素、约0.2至约0.4%(v/v)转铁蛋白、约0.2至约0.4%(v/v)亚硒酸和10ng/ml表皮生长因子(EGF)。可以在图18a中看到通过使用本发明的方法获得的角质形成细胞的实例。

在本发明方法的另一个实施方案中,当所述支架包含UCMC时,为了增殖和分化所述UCMC为成纤维细胞,所述第一培养基包括适于成纤维细胞培养的培养基。在此情况下,第一培养基同时包括成纤维细胞生长培养基与胎小牛血清(FCS)或胎牛血清(FBS),从而增殖和分化所述UCMC为成纤维细胞。成纤维细胞生长培养基可以是KGM<sup>®</sup>-角质形成细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、MEGM-乳房上皮细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)、Green's培养基、CMRL1066(Mediatech公司, Virginia, USA)、M171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)、L-15

培养基、Dulbecco's改良Eagle培养基(DMEM)、DMEM-F12和RPMI培养基。在一个实施方案中,当所述支架包含UCMC时,为了增殖和分化所述UCMC为成纤维细胞,用于成纤维细胞培养的第一培养基包括约90至约95%(v/v)成纤维细胞生长培养基和约5至约10%胎牛或胎小牛血清(FCS)。在另一个实施方案中,第一培养基包含约90至约95%(v/v)CMRL1066(米德技术公司(Mediatech. Inc), Virginia, USA)和约5至约10%胎小牛血清(FCS)。可以在图18b中看到通过使用本发明的方法获得的成纤维细胞的实例。

一旦UCMC或UCEC分别完全分化成成纤维细胞和角质形成细胞,则可以用于哺乳动物或人类机体的受影响的部分。但是,有时不仅真皮层或表皮层要求置换,而是两层皮肤层都要求置换。这可以是以下情况,例如当皮肤的表皮层和真皮层由于烧伤(全层创伤)破坏时。出于该目的及其它目的,本发明提供方法,其包括

- 提供支架,
- 将UCMC放置在所述支架内或支架上,
- 在适于成纤维细胞培养的第一培养基中孵育所述支架,其允许所述UCMC增殖和进一步分化,
- 将UCEC放置在所述支架内或支架上,和
- 在第二培养基中孵育所述支架,其允许所述UCEC增殖和进一步分化成角质形成细胞。

使用适于成纤维细胞培养的第一培养基(其包括上述对用于UCMC分化成成纤维细胞的第一培养基相同的组分),使本领域技术人员能够在支架内或在支架上生长包含成纤维细胞的真皮层。之后,可以在已包括该真皮层支架内或支架上应用UCEC。使用第二培养基(其包括上述对用于UCEC分化成角质形成细胞的第一培养基相同的组分),这能够在第一真皮层上生长表皮皮肤层。因此,本发明的皮肤等价物能够提供真实的、形态发生的、多层皮肤等价物,其包括UCMC-衍生的成纤维细胞和UCEC-衍生的角质



形成细胞。在附图19中可以看到这些皮肤等价物提供全层真皮再生，产生加快愈合并减少伤痕。

从分化为成纤维细胞的UCMC发育功能性的真皮层需要约4至7天的时间，而一旦发育出真皮层并且UCEC掺入到支架内，还需要另外8至10天直到从UCEC衍生的角质形成细胞形成表皮层。对于根据本领域现状生产的自体培养的的皮肤等价物，根据活组织检查的尺寸，需要至少21至35天，然而使用本发明的方法，只需要12至18天。除了其它理由，这还是由于以下事实，即使用本发明的方法可以加速过程，因为本发明的细胞库或现有的细胞培养已经提供了用于本发明皮肤等价物的细胞(异种或同种异体)。用于UCMC和UCEC的初始浓度在示例性实施方案中是在约 $1 \times 10^5$ 至约 $1 \times 10^6$ 细胞/ml范围内。在一个实施方案中，用于接种UCMC到支架中的浓度是约 $5 \times 10^5$  UCMC/ml，用于接种UCEC的是 $1 \times 10^6$  UCEC/ml。

如在背景部分描述的，天然皮肤的真皮不仅含有成纤维细胞还含有神经末梢、腺体、毛囊和血管。为了进一步改善皮肤等价物的功能，本发明方法的一个实施方案因此还包括将一个或多个细胞系的细胞放置在支架内或支架上，该细胞系能够分化为血管或腺体。一些腺体对热反应产生汗(汗腺)，而其它腺体产生油(皮脂腺)从而保持皮肤湿润柔软。该油还作为抵抗外来物质的屏障。真皮的血管为皮肤提供营养物，并帮助调节机体温度。由于这些额外的细胞完成皮肤内的重要功能，本发明的一个实施方案还提供了方法，仅举出几例，其中支架还包括血管内皮细胞或真皮微血管内皮细胞。在一个实施方案中，血管内皮细胞来自哺乳动物的脐带，在一个实施方案中，来自人类的脐带。可用于本发明方法的不同细胞系的非限制性实例是，例如，仅举出几例，人类脐血管内皮细胞(HUVEC)或真皮微血管内皮细胞(DMEC，又称为DMVEC)。

此外，研究已经显示，细胞胞外基质(ECM)对细胞的功能影响很大。作为支架，胞外基质形成三维模式，其支持细胞生长并改善它们的功能。与上述支架不同，胞外基质由细胞自身生产的天然材料构成，然而，上述支架还可以包括或由人工材料组成，例如但不限于多孔性聚碳酸酯。因此，

由于基质对细胞生长的重要性，再造ECM结构(其更好的模拟体内围绕细胞的该基质，特别是模拟体内组织的基质)是组织工程的主要目标。Wei Tan, M.S.和T.A.Desai已经展示了(Tissue Engineering, 2003, 第9卷第2期, 第255-267页)天然的胶原、胶原与壳聚糖的混合物或胶原、壳聚糖和纤连蛋白的混合物可用于产生用于在其中嵌入人类肺成纤维细胞和人类脐静脉内皮细胞的基质。

因此，本发明还提供方法，其中在所述支架内或支架上放置至少一种胞外基质组分。该胞外基质组分应该模拟通过细胞自身常规产生的ECM基质。因此，ECM组分由还可以在自然中发现的、由细胞自身产生的材料组成。优选的，将该至少一种胞外基质组分与自上述干/祖细胞衍生的细胞一起放置在支架内或支架上。如果用于本发明皮肤等价物的和生产它们的方法的细胞能够自身产生ECM组分，则不需要人工掺入胞外基质组分。在一个实施方案中，用抗坏血酸刺激后，UCMC自我沉积胶原作为ECM材料。如果除了本发明使用的细胞外还添加ECM组分，胞外基质组分可以选自材料例如胶原、弹性蛋白、胞间粘附分子、层粘连蛋白、肝素、纤连蛋白、蛋白聚糖、生腱蛋白、肌原纤蛋白及其混合物。如果使用胶原，在一些实施方案中目前优选的只使用I型胶原或联合使用I型和III型胶原。在本发明的一个实施方案中，使用I型胶原。

还描述了方法，其进一步包括在它们用于本发明的皮肤等价物之前，保藏分离的干/祖细胞或分化的干/祖细胞(例如，UCMC和UCEC)。

用于保存和贮藏真核细胞尤其是哺乳动物细胞的方法和方案在本领域内众所周知(参考例如Pollard, J.W.和Walker, J.M.(1997)Basic Cell Culture Protocols, 第二版, Humana Press, Totowa, NJ; Freshney, R.I.(2000)Culture of Animal Cells, 第四版, Wiley-Liss, Hoboken, NJ)。用于维持分离的干/祖细胞例如上皮干/祖细胞或间充质干/祖细胞生物学活性的任意方法可以与本发明共同使用。在一个实例中，干/祖细胞通过使用深低温保藏法维持和贮藏。

因此,还描述了通过以上方法自脐带羊膜衍生的祖/干细胞,以及分化自祖/干细胞的细胞。此外,也描述了细胞库,其包含一种或多种已经如上所述分离的祖/干细胞或由其组成。例如,这种祖/干细胞的细胞库可以是对个体自体性的或是汇集性的(例如,后者用于随后的同种异体移植),并且随后可以通过进一步分化应用于例如再生医学、组织修复和再生。

与以上一致,通过上述方法从脐带羊膜分离的干/祖细胞也可以包含在药物组合物中。药物组合物还可以包括自干/祖细胞分化的细胞。药物组合物可以是任何类型,通常包含干/祖细胞,其分化的细胞或其细胞分泌物或细胞提取物,同时具有合适的可药用载体和赋形剂。在细胞分泌的情况下,可以以上清液的形式使用需要的化合物,其中所述化合物被分泌到所述上清液中。在另一个实例中,可以处理上清液,例如在被包括到药物组合物中之前纯化或浓缩。在一些实例中,药物组合物适于全身应用或局部应用。

适于局部应用的药物组合物可以是液体或黏稠形式。其实例包括软膏剂、乳膏剂和洗剂等。适于全身使用的药物组合物的实例是液体组合物,其中干/祖细胞或细胞提取物溶解于例如可注射或输注用缓冲液中。这类药物组合物的制备是本领域技术人员知识范围,并描述在例如Gennaro, A.L.和Gennaro, A.R. (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA中。

因此,描述了治疗患有疾病的受试者的方法。该方法包含向受试者施用有效量的如上所述分离的干/祖细胞或自此细胞衍生的细胞提取物。

原则上,可以用细胞或细胞提取物治疗任何适于通过干细胞/祖细胞方法治疗的病症或疾病。还可以将细胞分化为需要的细胞类型,例如但不限于,皮肤细胞、骨或软骨细胞、肝细胞、抗原-生产细胞、激素生产细胞例如 $\beta$ 胰岛胰岛素生产细胞,并治疗性的使用分化的细胞。

因此,本发明还涉及产生胰岛素-生产细胞的方法,包含

- 培养自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞,和
- 在合适的培养基中增殖和分化所述细胞成 $\beta$ -胰岛细胞。

在一个实施方案中，自干/祖细胞衍生的细胞是间充质干细胞(UCMC)或上皮干细胞(UCEC)，通过在细胞培养基中包括烟酰胺，其可以进一步分化为分泌胰岛素的 $\beta$ -胰岛细胞。

除了烟酰胺，培养基还可以包括用于 $\beta$ -胰岛细胞培养的生长培养基。培养基还可以包括生长因子或胎血清。胎血清可以是例如小牛或牛来源的。在一个实施方案中，培养基还可以包括胰岛素，转铁蛋白和亚硒酸。生长因子可以是例如但不限于表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子-1、血小板衍生生长因子-BB(PDGFB)、转化生长因子- $\beta$ 、角质形成细胞生长因子(KGF)、TGF- $\alpha$ 或双调蛋白。用于 $\beta$ -胰岛细胞培养的生长培养基可以是例如但不限于KGM<sup>®</sup>-角质形成细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、MEGM-乳房上皮细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics Inc.), Oregon, USA)、Green's培养基、CMRL1066(米德技术公司(Mediatech. Inc), Virginia, USA)、M171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics Inc.), Oregon, USA)、L-15培养基、Dulbecco's改良Eagle培养基(DMEM)、DMEM-F12和RPMI培养基。

在本发明的一个实施方案中，使用在实施例15中描述的培养基分化UCMC或UCEC成 $\beta$ -胰岛细胞。

在另一个实施方案中，方法包括分离 $\beta$ -胰岛细胞生产的胰岛素，其可以然后用于治疗例如胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)，如在哺乳动物中。哺乳动物可以是例如人类、猫、狗、羊、马或猪。可以根据例如但不限于Jones P.M.和Saermark, T等人(Anal Biochem. 1987 Oct; 166(1):142-9)描述的方法进行胰岛素的分离。

因此，本发明还涉及根据本发明产生胰岛素生产细胞的方法获得的胰岛素-生产细胞。本发明还涉及治疗与胰岛素水平失衡相关的疾病的方法，包括向哺乳动物施用通过本发明方法获得的胰岛素-生产细胞。哺乳动物可以例如是人、猫、狗、羊、马或猪。此类疾病的实例是胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)。

在本发明的另一个实施方案中，提供产生多巴胺和酪氨酸羟化酶生产细胞的方法，包括培养自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞，优选的UCMC，和在合适的培养基中将所述细胞增殖和分化成多巴胺和酪氨酸羟化酶(TH)生产细胞。多巴胺作为神经递质发挥作用，激活多巴胺受体。多巴胺还是下丘脑释放的神经激素。它作为激素的主要功能是抑制垂体前叶释放催乳素。多巴胺可以作为药物提供，作用于交感神经系统，产生例如心率加快和血压升高的效果。酪氨酸羟化酶是在机体用于肾上腺素合成过程中负责催化氨基酸——L-酪氨酸转化为多巴胺前体——二羟基苯丙氨酸(DOPA)的酶。因此，在另一个实施方案中，方法还包括分离自UCMC衍生的多巴胺和酪氨酸羟化酶生产细胞产生的多巴胺和/或酪氨酸羟化酶。

本发明还提供产生人白细胞抗原G(HLA-G)的方法。人白细胞抗原(HLA)-G是主要组织相容性复合体I类抗原，其被称为非经典的，因为其在胎盘中展示了组织限制性的分布、减少的胞质域、有限的多态性和一些同种型。认为HLA-G在妊娠期间起到了重要作用，通过保护半同种异体的胎儿不被母体免疫细胞识别和破坏。多种免疫介导的疾病和病症中涉及HLA-G，如器官-、细胞移植和自身免疫病。此类自身免疫病的实例是多发性硬化、风湿性关节炎、I型糖尿病、牛皮癣、甲状腺疾病、系统性红斑狼疮、硬皮病或乳糜泻。因此，本发明提供产生人白细胞抗原G(HLA-G)生产细胞的方法，包括培养自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞，和在合适的培养基中增殖和分化所述细胞成HLA-G生产细胞。可以自UCMC或UCEC产生HLA-G生产细胞。用本发明的方法，第一次显示幼稚UCEC(naïve UCEC)表达和生产HLA-G。令人惊讶的，对于该方法，特定的诱导UCEC生产HLA-G不是必须的(参见实施例19)。

其它可以用本文中描述的干/祖细胞治疗的疾病，选自肿瘤病、加速型皮肤衰老和皮肤疾病、组织障碍、内脏内分泌缺陷(visceral endocrine deficiency)和神经障碍。

待治疗的组织障碍可以是先天性或获得性组织缺陷。可以用干/祖细胞或自其衍生的细胞治疗的内脏内分泌缺陷的实例包括但不限于, 睾酮缺陷、贫血、低血糖症、高血糖症、胰腺缺陷、肾上腺缺陷和甲状腺缺陷。

可以治疗的神经障碍的实例包括但不限于, 阿兹海默氏病、帕金森病、Jacob Kreutzfeld's病、Lou Gehrig's症、亨廷顿病和神经肿瘤病症。

本发明还涉及自脐带羊膜分离的间充质干细胞(UCMC)的用途, 其用于生产成骨细胞(参见实施例10)(用于骨损伤的治疗), 或生产软骨细胞(参见实施例17)(用于软骨损伤的治疗)。

此外, 本发明还提供产生肝细胞的方法, 包括培养自脐带羊膜分离的干/祖细胞衍生的细胞, 优选的UCEC, 和在合适的培养基中增殖和分化所述细胞成肝细胞。合适的培养基包含制瘤素-M, 其用于诱导分化为肝细胞。制瘤素-M(OSM)是多向性细胞嘧啶(pleiotropic cytokine), 属于细胞因子的白介素-6组。在这些细胞因子中, 它与白血病抑制因子在结构和功能上都最相似。然而, 它尚且未被准确定义且被证明在肝脏发育、血生成、炎症中以及可能在CNS发育中是重要的。

与上述讨论一致, 本发明还涉及治疗创伤或皮肤疾病的方法, 包括对创伤或皮肤疾病应用本发明的皮肤等价物。因此, 通过本发明的方法获得的本发明的皮肤等价物可用于药物组合物的生产。本发明还涉及因此获得的治疗烧伤皮肤、溃疡、辐射和糖尿病创伤的药物组合物。本发明还涉及包含本发明的皮肤等价物的细胞库。

皮肤病的实例是部分皮肤的创伤或破损部分, 例如, 阳光灼伤的皮肤。在本文中, 皮肤的衰老也被认为是皮肤病。干/祖细胞或其细胞提取物的局部或类似的递送, 例如, 作为洗剂或乳膏剂或任何其它合适载体中的组分, 可以因此用于修复阳光损伤的皮肤, 此外还可以减慢皮肤衰老的过程(抗衰老性质), 这是通过补充从而强化缺乏的生长因子和相关的肽元素(缺少它们将加快皮肤衰老)。因此可以使用本发明的皮肤等价物。干/祖细胞还可以迁移到机体的受损区域例如表面创伤, 形成局部修复过程必须的细胞元

素(参见The Journal of Immunology, 2001, 166:7556-7562;或International Journal of Biochemical and Cell Biology 2004; 36:598-606)。

肿瘤疾病可以是癌,特别由于最近研究已证实干细胞可以选择性地靶向肿瘤组织(Journal of the National Cancer Institute 2004; 96(21): 1593-1603),允许将抗癌剂如干扰素定向递送至致瘤灶。癌可以是任何类型的癌,包括能够形成实体瘤的那些癌,范围从皮肤癌至内脏癌。待治疗的癌的实例包括鳞状细胞癌、乳腺导管和小叶癌、肝细胞癌、鼻咽癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、结肠癌、乳癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌或此类癌的任意组合,包括其散布(转移)形式。在治疗肿瘤疾病时,本文中所描述的脐带羊膜衍生的干细胞和/或它们的细胞提取物既可以作为直接治疗和/或作为携带载体全身性施用。在抗肿瘤治疗时,细胞包含抗肿瘤药剂。

在另一药学用途中,干/祖细胞可以用于基因治疗。为此目的,可以将细胞用编码在细胞中待产生的蛋白质的核酸转化。可以使用技术人员众所周知的多种方法中的任意方法将核酸导入本发明的细胞,例如使用病毒载体和/或含脂类的转染组合物如IBAFect(IBA GmbH, Göttingen,德国)、Fugene(F.霍夫曼-拉罗切公司(F. Hoffmann-LaRoche Ltd.), Basel, 瑞士)、Gene Porter(基因疗法系统公司(Gene Therapy Systems))、Lipofectamine(英杰生命技术公司(Invitrogen Corporation), California, USA)、Superfect(快而精公司(Qiagen), Hilden, 德国)、Metafecten(博奥塔克公司(Biontex, Munich, 德国)或者在PCT申请WO 01/015755)中描述的

那些转染组合物。在相关的实施方案中，干/祖细胞和衍生自其的细胞在用编码所选择多肽的核酸转化后，可以用于重组产生该多肽。

如以上提及，干细胞提取物富含与正常组织生理有关的多种生长因子和肽。此类生长因子和/或肽可能在机体暴露的部分中缺乏，如作为所有人的表层保护机体不受外界因素影响以维持内部稳态的皮肤中。因此，干/祖细胞或其细胞提取物适合用于治疗 and/或维持内部稳态。

此外并且与如上公开相一致，可以将干/祖细胞或衍生自其的细胞用于产生任意生物分子。生物分子可以是例如在细胞内天然产生的任意分子或其编码核酸已经通过重组DNA技术导入细胞的分子。可以由细胞产生的分子实例包括但不限于蛋白质如细胞因子、生长因子如胰岛素样生长因子(IGF)、表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )、激活蛋白A、骨形态发生蛋白(BMP)、PDGF或者激素如胰岛素或促红细胞生成素或转运蛋白如转铁蛋白、肽如生长因子或激素(例如黄体激素(LSH)、促卵泡激素(FSH))、有机小分子如类固醇激素、寡糖或多糖例如肝素或硫酸乙酰肝素(对于此方面实施例参考WO 96/23003或WO 96/02259)、蛋白聚糖、糖蛋白如胶原或层粘连蛋白或者脂等。

黏蛋白，其是糖蛋白，是可以在大多数上皮层的粘性分泌物(例如唾液、胃液、乳糜、支气管液)中发现的复杂分子。黏蛋白执行润滑和保护功能(例如，chime的运输、缓冲过量的胃酸、关节滑液的润滑功能)。由于它的复杂结构和它的高摩尔质量(约1百万-5千万道尔顿)，通常难以分离天然形态的黏蛋白分子。

因此，本发明还提供产生黏蛋白-生产细胞的方法，包括：

- 将脐带羊膜上皮干细胞(UCEC)放置在容器(例如，培养瓶、培养皿)中，和
- 在适合分泌细胞培养的培养基中孵育所述UCEC。

这些黏蛋白-生产细胞不仅可以用于从细胞培养基中分离黏蛋白，而且还可以在本发明的方法中使用这些细胞，包括使包含被烟影响的细胞的组



织接触通过本发明方法产生的黏蛋白-生产细胞。这些被影响的细胞可以是呼吸道例如肺，或眼表面的细胞。

此外，通过本发明方法获得的黏蛋白-生产细胞可用于治疗滑膜细胞肉瘤、烟吸入损伤或眼表面损伤。通过本发明方法获得的黏蛋白-生产细胞还可用于食道和气道组织工程，用于化妆品应用或作为基因/蛋白质递送系统。

为了分化本文描述的UCEC成黏蛋白-生产细胞，发明还提供了培养基，其中所述培养基包括用于黏蛋白-生产细胞培养的生长培养基、胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸和生长因子。

生长因子可以是，例如但不限于表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子-1、血小板衍生生长因子-BB(PDGFB)、转化生长因子- $\beta$ 、角质形成细胞生长因子(KGF)、TGF- $\alpha$ 或双调蛋白。

用于黏蛋白-生产细胞培养的生长培养基可以是，例如但不限于KGM<sup>®</sup>-角质形成细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、MEGM-乳房上皮细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics Inc.), Oregon, USA)、Green's培养基、CMRL1066(米德技术公司(Mediatech. Inc), Virginia, USA)、M171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics Inc.), Oregon, USA)、L-15培养基、Dulbecco's改良Eagle培养基(DMEM)、DMEM-F12和RPMI培养基。

在一个实施方案中，适合黏蛋白-生产细胞培养的培养基包括用于黏蛋白-生产细胞培养的生长培养基、表皮生长因子(EGF)、胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸。

在另一个实施方案中，适合黏蛋白-生产细胞培养的培养基包含约98.8至约99.4%(v/v)用于黏蛋白-生产细胞培养的生长培养基、约0.2至约0.4%(v/v)胰岛素、约0.2至约0.4%(v/v)转铁蛋白、约0.2至约0.4%(v/v)亚硒酸和约10ng/ml表皮生长因子(EGF)。

在另一个实施方案中，适合黏蛋白-生产细胞培养的培养基包含约98.8至约99.4%(v/v) CMRL1066(米德技术公司(Mediatech. Inc), Virginia, USA)或M171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics Inc.), Oregon, USA)、约0.2至约0.4%(v/v)胰岛素、约0.2至约0.4%(v/v)转铁蛋白、约0.2至约0.4%(v/v)亚硒酸和约10ng/ml表皮生长因子(EGF)。

可以用黏蛋白凝块测试(参见实施例16)定义通过本发明的方法产生的黏蛋白-生产细胞。该测试还描述在Corfield A.P., Glycoprotein method and protocols: The Mucins, 第29-65页. Humana Press 2000; Gatter R.A.和Schumacher R.H., A practical handbook of joint fluid analysis, 第59-63页, Lea&Febiger, 1991中, 其完整内容引入本文作为参考。该测试是对通过在上述定义的细胞培养基中培养的UCEC生产的黏蛋白的质量和数量的评估。简而言之, 在该细胞培养物的测试培养基中注入7N冰醋酸, 在所述培养基中UCEC细胞已经根据本发明的方法孵育。醋酸导致黏蛋白形成凝块。含有黏蛋白的培养基将表现为具有紧密、粘稠凝块的清澈液体。因此, 在一个实施方案中, 本文中使用的黏蛋白生产细胞指, 当用实施例16中描述的测试和条件检测时产生阳性结果的细胞。

与最近方法一致(见例如Amit, M等, Human Feeder Layers for human embryonic stem Cells, Biol Reprod 2003; 68: 2150-2156), 本文中描述的干/祖细胞可用作培养其它胚胎干细胞, 特别是人胚胎干细胞的饲养层。在这些实施方案之一中, 细胞优选的是人来源, 因为使用人细胞作为饲养层使得动物来源成分, 例如动物病原体或免疫原, 污染细胞培养物的风险最小化。在该方面, 还应当注意, 可以在无血清条件下培养干/祖细胞和从其衍生的细胞, 因此, 使用细胞作为饲养层并且在无血清培养基下培养细胞培养物, 所述培养基例如在本文以下描述的或在Draper等人中(Culture and characterization of human embryonic stem cell lines, Stem Cells Dev 2004, 13:325-336)或在国际专利申请WO 98/30679中描述的。

在此上下文中, 应当说明的是具有最小比例衰老细胞的大量低代次细胞(即大比例的高质量细胞)在移植外科和基于细胞的疗法中是至关重要的

并且需要在细胞扩充期间的可能的最短时间内衍生。例如，来自骨髓和脐带血的间充质干细胞量少并且因此需要较长时间经过众多传代的扩充以达到细胞移植所需要的足够细胞数目。然而，高代次细胞往往质量退化并且可能导致细胞衰老或癌性转化。本文中已经发现，可以使用重复性外植体技术以较少传代次数得到大量的干/祖细胞。因此描述了培养干/祖细胞的方法，其中该方法包括：

自脐带羊膜得到组织外植体；

在合适培养基内和培养条件下将该组织外植体在合适时间阶段内培养，

任选地使组织外植体接触新鲜培养基并且在合适条件下连续培养合适时间阶段(参考图15)。

培养可以按照需要的循环(传代)次数实施并且一旦获得所需要细胞数目即停止。通过从用于细胞生长的容器中移去用过的细胞培养基并且将新鲜培养基加入该容器使组织外植体接触新鲜培养基。除了对替换所用容器中培养基之外，可以通过将组织外植体转移至充满培养基的新容器实现接触新鲜培养基。用于细胞培养和/或增殖的组织外植体可以通过适合方法得到，例如通过如上所述的“直接的组织外植体技术”(在其中首先将组织置于无酶培养基内，随后在精心条件下细胞自行从主要组织块分离并且随后将收获细胞用于收集)。

组织外植体的培养可以在适用于培养哺乳动物细胞的任意培养基内实施。就培养或克隆扩充干/祖细胞和衍生自其的细胞而言，培养基实例包括如上所列常规的和商业可得到的培养基，例如不限于KGM<sup>®</sup>-角质形成细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、MEGM-乳房上皮细胞培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、EpiLife<sup>®</sup>培养基(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)、培养基171(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)、DMEM、DMEM-F12或RPMI培养基。培养通常在正常用于培养衍生该细胞的种属细胞的条件下实施，例如于37℃、

5% CO<sub>2</sub>的空气内。在一个实施方案中，使用无血清、特别是无牛血清培养基实施培养。通常，持续培养(在一代中)至细胞生长所需要的任意合适时间，但是决不限于持续大约1至数天例如大约7天或大约8天。

在本文举例说明的本发明可以在缺乏本文明确公开的任意部分、限制下实施。因此术语“包含”、“包括”、“含有”等应当作广泛性和非限制地理解。此外，将本文中所用术语和表述作为描述性并且非限制性术语使用，并且在使用这类术语和表述时没有排除所展示和描述特性或其部分的等效物的意图，但是确认多种调整仍可能在本发明所要求保护的权利要求的范围内。因此，应当理解的是，虽然本发明通过优选的实施方案和任选的特性具体进行公开，对本公开所体现的本发明的调整和改动对本领域技术人员而言是显而易见的，并且将此类调整和改动视为在本发明范围内。

已经在本文中本发明广泛并一般地进行了描述。处于类属性公开范围内的较窄种属和亚类属组也形成了本发明的部分。这包括本发明的具有自此属中除去任意主题的附带条件或否定性限制的本发明类属性描述，无论所排除的材料在本文中是否特别地引用。

其它实施方案处于如下权利要求和非限制性实施例范围内。此外，本发明的特征和方面以马库什组术语描述时，本领域技术人员将认识到，本发明因此还根据该马库什组的任意个体成员或亚族成员描述。

## 实施例

### 实施例1: 脐带组织收集

婴儿出生后立即收集脐带组织。将标本淋洗干净并且在转运至实验室前立即转移至含有培养物转运培养基(补加50IU/ml青霉素、50µg/ml链霉素、250µg/ml两性霉素、50µg/ml庆大霉素的L-15培养基;所有试剂均购自Invitrogen)的500ml无菌玻璃瓶内。在实验室内，于无菌条件下在层流净化柜中提取干细胞。首先将标本转移至无菌不锈钢托盘。使用补加5 IU/ml肝素(来自西格玛-阿尔德里克公司(Sigma-Aldrich), Missouri, USA)的温暖的磷酸缓冲的盐溶液(PBS)多次注射洗涤除去脐带血管内所有残留血液。在

最后一次洗涤中使用无肝素的普通PBS。随后将脐带组织标本切割为长2 cm的小片并且转移至直径10 cm的细胞培养皿内，在其中用70%乙醇进一步洗涤和消毒，随后使用含有抗生素混合物(50 IU/ml青霉素、50µg/ml链霉素、250µg/ml两性霉素、50µg/ml庆大霉素；均购自英杰生命技术公司(Invitrogen Corporation), California, USA)的PBS多次洗涤直至溶液变清。

### 实施例2:细胞分离/培养

首先截断脐带组织以便将脐带羊膜与沃顿胶(即脐带基质)和其它内部成分分开。随后将分离的羊膜切割成(0.5 cm×0.5 cm)小片用于细胞分离。将脐带羊膜片放置在用于分离上皮干细胞或间充质干细胞的不同细胞培养条件下的组织培养皿上实施外植。

对于间充质细胞分离/培养，将外植体浸没于5 ml补加10%胎牛血清(美国Hyclone公司(Hyclone), Utah, USA)的DMEM(英杰生命技术公司(Invitrogen Corporation), California, USA) (DMEM/10% FBS)内并且在CO<sub>2</sub>细胞培养箱内于37℃培养。培养基每2天或3天更换一次。细胞生长晕在光学显微镜下检查。长出的细胞通过胰蛋白酶消化(0.125%胰蛋白酶/0.05% EDTA)收获用于进一步扩充并且使用培养基DMEM/10% FBS深低温保藏。

对于上皮细胞分离/培养，在将组织样品放置于表面前用1型胶原/4型胶原混合物(1:2)包被细胞培养皿塑料表面。将组织样品浸没于5 ml EpiLife培养基或培养基171内(两者均来自卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.) Oregon, USA)。培养基每2天或3天更换一次。在光学显微镜下检查来自组织培养外植体的细胞生长。长出的细胞通过胰蛋白酶消化(0.125%胰蛋白酶/0.05% EDTA)使用EpiLife培养基或培养基171收获。

对于细胞的酶提取方法，将脐带羊膜分成0.5 cm×0.5 cm的小片并且在0.1%(w/v)I型胶原酶溶液(L. 霍夫曼-拉罗切公司(L. Hoffmann-La Roche Ltd.) Basel, 瑞士)中37℃消化6小时。将样品每15分钟涡旋混合2分钟。4000转/分离心30分钟收集细胞。采用两种不同方法以便分离上皮干细胞或间充质干细胞。

对于上皮干细胞的分离, 将细胞沉淀重悬于补加50 $\mu$ g/ml 胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、50 $\mu$ g/ml血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)、5 $\mu$ g/ml 转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ 1)和5 $\mu$ g/ml胰岛素(均自R&D系统公司(R&D Systems), Minneapolis, USA获得)的EpiLife培养基或培养基171(两者均来自卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)中, 计数并在预先用1型胶原/4型胶原混合物(1:2; 贝克顿迪肯森公司(Becton Dickinson), New Jersey, USA)包被的10 cm 组织培养皿中以 $1 \times 10^6$ 个细胞/皿的密度接种。24小时后, 附着的细胞用温暖的PBS洗涤并且用添加补充物的EpiLife培养基或培养基171替换原培养基。培养基每2天或3天更换一次。细胞生长和扩充的克隆形成在光学显微镜下检查。在大约70%汇合时, 将细胞通过胰蛋白酶消化(0.125%胰蛋白酶/0.05% EDTA)次培养用于进一步扩充和深低温保藏。

对于间充质干细胞的分离, 将细胞沉淀重悬于PTT-4培养基中、计数并在10 cm 组织培养皿中以 $1 \times 10^6$ 个细胞/皿的密度接种。培养基每2天或3天更换一次。细胞生长和扩充在光学显微镜下检查。在大约90%汇合时, 将细胞如上所述次培养。

对于在饲养层上培养上皮干细胞和间充质干细胞, 将脐带内衬膜通过胶原酶处理消化、计数并且接种于经致死性照射或丝裂霉素C处理的3T3成纤维细胞(饲养层)包被的10cm 组织培养皿内的Green's 培养基中。培养基每2天或3天更换一次。集落形成在光学显微镜下检查并照相。

### 实施例3:干/祖细胞鉴定

上皮细胞: 图1 显示自使用组织外植体方法制备的脐带羊膜长出的上皮细胞图象(40 $\times$ 放大)。图象在组织培养第2天(图1A)和第5天(图1B, C)拍摄。细胞形态学分析显示多角形状的上皮样细胞。通过脐带片段的酶消化在第2天(图A、C)和第5天(图B、D)产生相似(图2)上皮细胞(40 $\times$ 放大)。图7显示来自使用Green's 方法在饲养层上培养的脐带羊膜的上皮干细胞集落形成图象(40 $\times$ 放大)。多角形状的上皮样细胞集落从第3至第7天迅速扩大。

间充质细胞：在使用补加10%胎小牛血清(FCS)的CMRL-1066(或PTT-4培养基)作为培养基的组织培养皿中放置后，最早至48小时观察到自脐带羊膜移出的生长出来的间充质细胞生长晕(图3A、C)(40×放大)。细胞的特征在于它们呈纺锤体形态并且在体外既容易又迅速地迁移和扩展，与成纤维细胞非常类似(图3B、D)(40×放大)。在由胶原酶消化分离的细胞组中显示类似的观察结果(图4)。图4A显示在第二天自脐带羊膜分离的间充质细胞。在第5天观察到细胞增殖(图4B)(40×放大)。图6和8显示在无饲养层(图6)和有饲养层条件下(图8-1，使用3T3饲养层)在PTT-4培养基中培养的来自脐带羊膜的间充质干细胞的集落形成图象(40×放大)。伸长形状的成纤维细胞样细胞的集落从第3至第7天迅速扩大。注意到在此方面中，3T3饲养层通常抑制间充质细胞的生长，与人皮肤成纤维细胞一样。再一次地，这表明了本发明的间充质细胞的行为与更多分化的对应体相比的不同。

在其它实验中研究了发明的间充质细胞(UCMC)的克隆形成能力。对于克隆形成效率测定，在无饲养层的100mm组织培养皿或T75瓶中种植100-200个单细胞。细胞在DMEM/10%FCS中维持12天。在倒置光学显微镜下监控单克隆形成(实验一式两份进行，在图8-2中UCMC-16和UCMC-17的实验)。连续拍摄显微照片。在第12天，固定集落并用罗丹明染色。观察到UCMC集落形成单位(图8-2)。观察到的多个大型集落表示CLSC在体外的自我更新(图8-2)。

Western印迹分析(图9)显示根据本发明分离的来自脐带羊膜的间充质干细胞(UCMC)和脐带上皮细胞(UCEC)表达编码胚胎干细胞特异性标志物，转录因子八重体-4(Oct-4)的POU5f1基因(参考 Niwa, H., Miyazaki, J. 和 Smith, A.G.(2000). Nat.Genet. 24, 372-376)(图9-1)。图9.1a和9.1b中显示的其它结果证实Oct-4在UCMC细胞中的表达。简而言之，在获得图9.1a和9.1b中示例结果的实验中，UCMC以50个细胞/培养皿的密度种植在100mm组织培养皿中。然后，将细胞在PTT-4(PTT-4的组成参见实施例12)中维持10天，直到一些克隆可见。然后，固定克隆并用抗Oct-4抗体孵育(ES细胞标志物样品试剂盒(货号SCR002); 凯米肯公司(Chemicon), Temacula, CA)。

一个培养皿(图9-1a中的No.5)作为阴性对照,只用二抗染色。图9.1b显示在上述PTT-4培养基中生长的染色的UCMC细胞的形态。因此,该分析显示了这些干细胞的胚胎样特性。这些间充质和上皮细胞还表达成体干细胞自我更新需要的标志物Bmi-1(参见Park等人, J.Clin.Invest.113, 175-179(2004)(图9-27), 和被认为维持干细胞和胚细胞多能性的白血病抑制因子(LIF)(图9-28), 因此, 其被用于分离和扩增人神经干细胞。这些细胞还高度表达其它生长因子如结缔组织生长因子(CTGF)(图9-6、9-7)、血管内皮生长因子(VEGF)(图9-10、9-11)、胎盘样生长因子PLGF(图9-4、9-5)、STAT3(图9-2、9-3)、干细胞因子(SCF)(图9-16)、肝癌衍生生长因子(HDGF)(图9-14、9-15)、成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)(图9-12、9-13)、血小板衍生生长因子(PDGF)(图9-8、9-9)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)(图9-17)、纤连蛋白(图9-18、9-19)、饰胶蛋白聚糖(图9-20)、黏结蛋白聚糖-1,2,3,4(图9-21至9-26)。在图9中, 将这些基因的表达与人真皮成纤维细胞、骨髓间充质细胞(BMSC)和脂肪衍生的间充质细胞(ADMC)比较。图9-29显示UCEC和UCMC分泌白血病抑制因子(LIF)的Western 印迹数据。图9-30显示, 与骨髓、脂肪衍生的干细胞、人真皮成纤维细胞和表皮角质形成细胞相比, 在脐带间充质干细胞和上皮干细胞培养物的上清液中, 通过ELISA测定(图9-30)检测的高度分泌性激活蛋白A和促滤泡素抑制素(众所周知, 这两种蛋白质均促进组织修复和再生、增强血管发生和维持胚胎干细胞培养, 因此各基因的表达是胚胎样特性和细胞分化能力的标识)。这些结果还表明, 本发明的细胞是这些细胞领域治疗应用的有前景的候选对象, 所述细胞领域如再生医学、衰老医学、组织修复和组织工程。此外, 图9-29和9-30显示细胞向培养基中分泌表达产物的能力。

通过与人骨髓间充质干细胞比较分析分泌的细胞因子和生长因子进一步表征间充质细胞。将脐带上皮干细胞(UCEC)与人表皮角质形成细胞比较分析。如下进行该分析: 简而言之, 将 UCMC、UCEC、真皮成纤维细胞、骨髓间充质细胞、表皮角质形成细胞培养于生长培养基内直至100%汇合(37°C, 5% CO<sub>2</sub>), 随后在饥饿培养基(无血清DMEM)内同步化48小时。次



日, 将培养基再次换成新鲜的无血清DMEM, 随后将细胞再培养48小时。将条件培养基收集、浓缩并使用细胞因子阵列(雷氏生物技术公司(RayBiotech, Inc), GA, USA)分析。

该分析结果表明, UCMC分泌白细胞介素-6(IL-6); (MCP1); 肝细胞生长因子(HGF); 白细胞介素-8(IL8); sTNFR1; GRO; TIMP1; TIMP2; TRAILR3; uPAR; ICAM1; IGFBP3; IGFBP6(图11), 而UCEC分泌IGFBP-4; PARC; EGF; IGFBP-2; IL-6; 血管生成素; GCP-2; IL1 R $\alpha$ ; MCP-1; RANTES; SCF; TNF $\beta$ ; HGF; IL8; sTNFR; GRO; GRO- $\alpha$ ; 双调蛋白; IL-1 R4/ST2; TIMP1; TIMP2; uPAR; VEGF(图12)。

因此, 这表明两种细胞类型均分泌在发育生物学、组织稳态、组织修复和再生以及血管发生中具有重要功能的大量细胞因子和生长因子。这进一步证实本发明细胞在各个治疗性应用中的多功能性。

此外, 使用小鼠畸胎瘤形成测定作为指示进一步检查本发明的细胞的安全性。在这些实验中使用六只SCID小鼠。将超过2百万个UCMC的悬浮液以25G无菌针注射至每只SCID小鼠的大腿肌肉内。饲养动物6个月并且评估肿瘤形成。在这些小鼠中未见肿瘤形成(数据未显示)。这表明本发明的细胞是安全的并且不具有任何形成良性或其它性质肿瘤的能力。

还分析了UCMC表达人白细胞抗原(HLA)分子的能力。当检测主要组织相容性复合体(MHC)I型分子时, 该分析显示HLA-A分子大量存在(任意单位的检测结果: 3201), 意味着细胞是HLA-A阳性的, 而HLA-B分子的表达不显著(任意单位的检测结果: 35), 意味着细胞是HLA-B阴性的。这些细胞还表达HLA-G(参见实施例19)。由于HLA-B主要对移植的排斥反应起作用, 该结果表明, 本发明的细胞不仅适合自体移植, 而且适合同种异体移植。细胞对II型MHC分子HLA-DR52检测阳性, 对II型MHC分子HLA-DRB4检测阴性。还发现存在HLA-DRB1(0301/05/20/22)。

#### 实施例4: 在无血清培养基中培养干/祖细胞

在含有10% FCS的DMEM和在无血清培养基PTT-1、PTT-2和PTT-3中培养UCMC细胞。三种培养基 PTT-1、PTT-2 和PTT-3由本发明人之一

Phan博士制备。简而言之,这3种培养基不含胎牛血清或人血清,但是含有不同的细胞因子和生长因子,如IGF、EGF、TGF- $\beta$ 、激活蛋白A、BMP、PDGF、转铁蛋白和胰岛素。生长因子成分在培养基间是不同的,以便评估不同生长特征。培养如下进行:在基础培养基内添加不同比例的生长因子和细胞因子。将UCMC解冻并在这些培养基内培养10天。在光学显微镜下监控细胞增殖。PTT-2培养基是黑素细胞培养基M154和EpiLife<sup>®</sup>(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics Inc.), Oregon, USA)按3:1比例的混合物。培养基154是无菌的、液体组织培养基,用200 $\mu$ M氯化钙制备,用于普通人上皮角质形成细胞的生长。培养基154是含有必需和非必需氨基酸、维生素、其它有机化合物、微量矿物质和无机盐的基础培养基。它不含抗生素、抗真菌剂、激素、生长因子或蛋白质。它是HEPES和重碳酸盐缓冲的,并在具有5%CO<sub>2</sub>/95%空气的大气的培养箱内使用。

图13 显示在4种不同培养基组内UCMC良好生长(图13-1至图13-5),其中UCMC细胞的形态根据各培养基内存在的细胞因子或生长因子比率或比例的不同而不同。相反,骨髓和脂肪衍生的间充质细胞在这些无血清培养基中生长不良(图13-6和图13-7)。因此,UCMC的良好生长显示了本发明细胞的强壮性和它们的高存活性,表明它们的生长特性优于常规来源的间充质干细胞如骨髓衍生和脂肪衍生的间充质细胞。就此方面而言,值得指出的是,在这些实验中使用了无(牛)血清培养基并且大部分人间充质细胞在无血清培养基中生长不良。由于降低了使用胎牛血清进行细胞培养和扩充的风险,因此在细胞疗法中使用本发明细胞以及所描述的无血清培养基技术明显有利(虽然牛血清的使用已经长时间进行并且通常优化了细胞生长,但因人畜共患病如牛海绵状脑病(疯牛病)的传播对使用它的担心已经增加)。

#### 实施例5:脐带上皮干细胞和间充质干细胞基因表达谱的特征。

使用DNA微阵列分析脐带(羊膜)上皮干细胞和间充质干细胞的基因表达谱。为此目的,将UCMC和UCEC在生长培养基中于37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>下培养直至100%汇合。细胞在基础培养基内同步化48小时,随后用新鲜基础

培养基替换再培养48小时。收获总RNA并传送至Silicon Genetics Microarray Service。使用GeneSpring 7.2进行数据分析。图14汇总了全基因表达。UCEC表达总共28055个基因并且UCMC表达总共34407个基因。两种细胞类型中存在27308个重叠的基因表达。表达的747个基因对UCEC是独特的，并且表达的7099个基因对UCMC是独特的。所选择的目的基因在图14中列出。

两种干细胞类型表达了进一步支持本发明细胞具有胚胎干细胞样特性的140个与胚胎干细胞和胚胎发育有关的基因：Nanog；甲胎蛋白；前B细胞白血病转录因子3；层粘连蛋白 $\alpha$ 5；癌胚抗原样1；含自水解酶域2； $\delta$ 样3(果蝇(*Drosophila*))；Muscleblind样(果蝇)；GNAS复合基因座；癌胚抗原相关性细胞粘附分子3；棕榈酰蛋白硫酯酶2；妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白2；癌胚抗原样1；胚胎外胚层发育；母体胚胎亮氨酸拉链激酶；绒毛膜生长促乳激素2；叉头盒D3；基部边缘蛋白同系物(radical fringe homolog)(果蝇)；驱动蛋白家族成员1B；胚胎骨骼肌肌球蛋白重链多肽3；裂手/足畸形(缺指趾)型3；TEA域家族成员3；层粘连蛋白 $\alpha$ 1；绒毛膜生长促乳激素1；胎盘催乳激素；促肾上腺皮质激素释放激素受体1；促甲状腺素胚胎因子；芳烃受体核易位蛋白2；膜卷曲相关蛋白(Membrane frizzled-related protein)；神经调节蛋白1'XVI型胶原 $\alpha$ 1；神经调节蛋白1；绒毛膜生长促乳激素1(胎盘催乳激素)；CUG三重重复序列RNA结合蛋白1；绒毛膜生长促乳激素1(胎盘催乳激素)Bystin样；MyoD家族抑制物；视黄酸诱导蛋白2；GNAS复合基因座；前B细胞白血病转录因子4；层粘连蛋白 $\alpha$ 2(先天肌肉萎缩分区蛋白)；SMAD，母体抗DPP同系物1(果蝇)；具有与蛋白质pir:D28928(人类)D28928妊娠特异性 $\beta$ -1糖蛋白IB流产性(片段)中等相似度的人类(*H.sapiens*)转录序列；驱动蛋白家族成员1B；RNA结合蛋白Bruno样4(果蝇)；胚胎脑特异性蛋白质；妊娠诱导的生长抑制蛋白；SMAD，母体抗DPP同系物5(果蝇)；绒毛膜生长促乳激素2；腺苷酸环化酶活化性多肽1(垂体)；癌胚抗原相关性细胞粘附分子；层粘连蛋白 $\alpha$ 3；蛋白质O-岩藻糖基转移酶1；Jagged 1(阿拉日耶综合征)；扭曲原肠胚形成同系物1(果蝇)；ELAV(果蝇异常视觉胚胎致死性)样

3(Hu抗原C); 促甲状腺激素胚胎因子; 溶质载体家族43成员3; 倒位蛋白(Inversin); 肾消耗病2(婴儿); 胚胎翻转倒位(inversion of embryonic turning); 人类倒位蛋白(INVS)转录物变体2 mRNA; 人类转录性序列; 同源异型框D8; 胚胎Fyn相关性底物; ELAV(果蝇异常视觉胚胎致死性)-样1(Hu抗原R); 碱性含螺旋-环-螺旋域B族22; 催产素受体; 畸胎样瘤衍生生长因子1; Fms相关酪氨酸激酶1(血管内皮生长因子/血管透性因子受体); 肾上腺髓质素; 核受体共激活因子6-CUG三重重复序列RNA结合蛋白1; 扭曲原肠胚形成同系物1(果蝇); 癌胚抗原相关细胞粘附分子4; 受体型蛋白酪氨酸磷酸酶R; Acrg胚胎致死性(小鼠)最小区域直向同源物; EPH受体A3;  $\delta$ 样1(果蝇); 鼻胚胎LHRH因子; 转录因子CP2样1; 裂手/足畸形(缺指趾)型3; Jagged 2; 人类转录性序列; 神经调节蛋白1; 裂手/足畸形(缺指趾)型1; 溶质载体43家族成员3; 羟酰辅酶A脱氢酶/3-酮脂酰辅酶A硫解酶/烯酰辅酶A水合酶(三功能蛋白) $\alpha$ 亚基; 岩藻糖基转移酶10( $\alpha$ (1,3)岩藻糖基转移酶); Acrg胚胎致死性(小鼠)最小区域直向同源物; 癌胚抗原相关细胞粘附分子7; 核磷蛋白/核磷蛋白2; IgG Fc片段,受体,转运蛋白, $\alpha$ ; 扭曲原肠胚形成同系物1(果蝇); 人类类似于分选液泡蛋白35; 母体胚胎3(LOC146485)mRNA; 含自水解酶域2; 短尾同系物T(小鼠); 解联蛋白和金属蛋白酶域10; 核糖体蛋白L29; 内皮肤转变酶2; ELAV(果蝇异常视觉胚胎致死性)样1(Hu抗原R); 滋养蛋白; 同源异型框 B6; 层粘连蛋白 $\alpha$ 4; 同源异型框 B6; 假定蛋白FLJ13456; 含有亮氨酸丰富重复序列和PYD 5的NACHT; ELAV(果蝇异常视觉胚胎致死性)样1(Hu抗原R); 未分化胚胎细胞转录因子1; 妊娠相关血浆蛋白A, pappalysin 1; 分泌珠蛋白1A家族成员1(子宫珠蛋白); 甲状旁腺素样激素; 癌胚抗原相关细胞粘附分子1(胆汁糖蛋白); 层粘连蛋白 $\alpha$ 1。

两种干细胞类型还表达了数千个与发育生物学、细胞生长和分化、细胞稳态、细胞和组织修复及再生有关的基因。此类生因子及其受体的实例如下: (G-CSF、FGF、IGF、KGF、NGF、VEGF、PIGF、血管生成素、CTGF、PDGF、HGF、EGF、HDGF、TGF- $\beta$ 、激活蛋白和抑制素、促滤

泡素抑制素、BMP、SCF/c-Kit、LIF、WNT、SDF、制癌蛋白M、白细胞介素、趋化因子和其它众多); MMP、TIMP胞外基质(胶原、层粘连蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、生腱蛋白、整合素、黏结蛋白聚糖、饰胶蛋白聚糖、纤连蛋白、蛋白聚糖、SPARC/骨连接蛋白、黏蛋白、导蛋白、磷脂酰肌醇蛋白聚糖、软骨结合蛋白、胞外基质蛋白、乙酰透明质酸、纤蛋白、ADAMTS、双糖链蛋白聚糖、盘基菌蛋白、桥粒成分、ICAM、钙黏着蛋白、联蛋白和众多其它); 细胞角蛋白。

有些组基因仅在UCMC中出现。这些基因与如下相关: 正常生理过程(胰岛素样生长因子1(生长调节素C); 胰岛素样4(胎盘); 松弛素1; 纤维蛋白溶酶原; 胰岛素样生长因子1(生长调节素C); 胰岛素样5; 胰岛素样生长因子1(生长调节素C); 胰岛素样生长因子2(生长调节素A)、体内稳态(放射辐头样1; 血色素沉着病; 趋化因子(C-C基序)配体5; 白细胞介素31受体A; 趋化因子(C-X-C基序)配体12(基质细胞衍生因子1); 核受体3亚家族C组成员2; 血色素沉着病; 趋化因子(C-C基序)配体23; 趋化因子(C-C基序)配体23; 线粒体铁蛋白; 过氧化物酶体增殖活化受体 $\gamma$ 共激活因子1- $\alpha$ ; 表面活性剂肺泡相关性蛋白D; 趋化因子(C-C基序)配体11; 趋化因子(C-C基序)配体3; EgI九同系物2(线虫(*C. elegans*)); 过氧化物酶体增殖活化受体 $\gamma$ 共激活因子1- $\beta$ ; 趋化因子(C-C基序)配体1; 趋化因子(C-X-C基序)配体12(基质细胞衍生因子1);  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  转运ATP酶 $\alpha 2(+)$ 多肽; 趋化因子(C基序)配体2; 血红素结合蛋白; 兰诺定受体3)、形态发生(红细胞 $\alpha$ 血影蛋白1(椭圆红细胞增多症2); 同源异型框 D3; 缺眼同系物1(果蝇); Ras同系物基因家族成员J; 白细胞特异性转录物1; 外胚层发育异常蛋白A2受体; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3; 成对盒基因7; 丝氨酸蛋白酶Corin; Dishevelled, dsh同系物1(果蝇); Ras同系物基因家族成员J; T盒3(尺骨乳房综合征); 软骨素 $\beta 1,4$  N-乙酰半胺转移酶乳糖; 软骨素 $\beta 1,4$  N-乙酰半胺转移酶乳糖; SRY(性别决定区域Y)盒10; 非肌肉肌球蛋白重链多肽9; 黄体生成素/绒毛膜促性腺激素受体; 基部边缘蛋白同系物(果蝇); 分泌的卷曲相关蛋白5; 无翼型MMTV整合位点家族成员11; 缺眼同系物2(果蝇); Muscleblind样(果蝇);

T盒5; Mab-21样1(线虫); 生长停滞特异性 2; Sex comb on midleg同系物1(果蝇); T盒6; 细丝蛋白结合LIM蛋白- 1; 黑素瘤细胞粘附分子; Twist同系物1(尖头多指(趾)并指(趾)3; 塞-乔综合征)(果蝇); 同源异型框 A11; 角膜蛋白聚糖; 成纤维细胞生长因子1(酸性); 羧肽酶M; CDC42效应蛋白(Rho GTP酶结合)4; LIM同源框转录因子1- $\beta$ ; Engrailed 同系物1; 羧肽酶M; 成纤维细胞生长因子8(雄激素诱导); 成纤维细胞生长因子18; 白细胞特异性转录物1; 内皮缩血管肽3; 配对样同源域转录因子1)、胚胎发育(妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白3; ELAV(果蝇异常视觉胚胎致死性)样4(Hu抗原D); G蛋白偶联受体10; 外胚层发育异常蛋白A2受体; ATP结合盒B亚家族(MDR/TAP)成员4; 妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白11; 鼻胚胎LHRH因子; 松弛素1; Notch 同系物4(果蝇); 妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白6; pih-2P; 人类妊娠诱导高血压综合征相关蛋白(PIH2); 120kDa输卵管糖蛋白1(黏蛋白9、输卵管素); 孕激素相关子宫内膜蛋白; 碱性肌球蛋白轻链多肽4; atrial, 胚胎; 促乳素; Notch 同系物4(果蝇); 前B细胞白血病转录因子1; 基部边缘蛋白同系物(果蝇); 促肾上腺皮质激素释放激素; 核受体3亚家族C组成员2; 神经调节蛋白2; Muscleblind样(果蝇); 碱性肌球蛋白轻链多肽4; atrial, 胚胎; 人类cDNA FLJ27401 fis, 克隆WMC03071; 胚胎外精子发生同源框1样; 胰岛素样4(胎盘); 含有2个可变剪接位点C1和C2的3'非翻译区的外显子B2C的人类已加工假孕特异性糖蛋白(PSG12)基因; Fms相关酪氨酸激酶1(血管内皮生长因子/血管通透性因子受体); 前B细胞白血病转录因子1; 妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白3; 癌胚抗原相关细胞粘附分子1(胆汁糖蛋白); 芳基硫酸酯酶C类固醇硫酸酯酶(微粒体)同工酶S; 同源异型框 B6; 蛋白质O-岩藻糖基转移酶1; LIM同源框转录因子1- $\beta$ ; 癌胚抗原相关细胞粘附分子1(胆汁糖蛋白); 促卵泡激素 $\beta$ 多肽; 血管紧张素原(丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制物A进化枝( $\alpha$ -1抗蛋白酶、抗胰蛋白酶)成员8); 癌胚抗原相关细胞粘附分子 6(非特异性交叉反应抗原); 蛋白激酶C,  $\alpha$ 结合蛋白; 胶原凝素亚家族成员10(C型凝集素); 层粘连蛋白 $\alpha$ 1)、细胞外空间(羧酸酯酶1(单核细胞/巨噬细胞丝氨酸酯酶1); 成纤维细胞生长因子5; Progastricsin(胃蛋白

酶原C); 精子相关抗原 11; 前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/ kexin2型; 乙酰透明质酸结合蛋白2; Sema结构域, 免疫球蛋白结构域(Ig), 短碱性结构域分泌型(脑信号蛋白)3F; 白细胞介素2; 胰凝乳蛋白酶样; Norrie病(假神经胶质瘤); 气管支气管/胃黏蛋白5亚型A和C; 羧肽酶B2(血浆羧肽酶U); 基部边缘蛋白同系物(果蝇); 妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白11; 跨膜肽酶A- $\alpha$ (PABA肽水解酶); 速激肽前体1(K物质、P物质、神经激肽1、神经激肽 2、神经调节肽 L、神经激肽  $\alpha$ 、神经肽 K、神经肽 $\gamma$ ); 成纤维细胞生长因子8(雄激素诱导); 成纤维细胞生长因子13; 血红素结合蛋白; 乳癌2, 早期发生; 成纤维细胞生长因子14; (青少年X连锁性)视网膜劈裂症1; 几丁质酶3样1(软骨糖蛋白-39); Dystonin; 分泌珠蛋白1D家族成员2; 成头蛋白; WAP四个二硫键核心结构域 2; CD5 抗原样(清除受体半胱氨酸丰富家族); 瘙痒病响应蛋白1; 半胱氨酸结超家族Gremlin 1同系物(爪蟾(*Xenopus laevis*)); 白细胞介素16(淋巴细胞化学引诱物因子); 趋化因子(C-C基序)配体26; 核结合蛋白1; 成纤维细胞生长因子18; 胰岛素样生长因子结合蛋白1; 表面活性剂肺泡相关性蛋白A1;  $\delta$ 样1同系物(果蝇); 可卡因和苯丙胺调节的转录物; 跨膜肽酶A- $\beta$ ; 白细胞介素17F; 补体因子H; 半胱氨酸丰富分泌性蛋白2; Dystonin; WAP四-二硫键核心结构域 1; 促乳素; 表面活性剂肺泡相关性蛋白B; 成纤维细胞生长因子5; Dickkopf同系物2(爪蟾); 精子相关抗原11; 趋化因子(C-C基序)配体11; 跨膜肽酶A- $\alpha$ (PABA肽水解酶); 几丁质酶3样2; C-fos诱导的生长因子(血管内皮生长因子D); 趋化因子(C-C基序)配体4; 脊髓灰质炎病毒受体; 透明质酸酶1; 120kDa输卵管糖蛋白1(黏蛋白9、输卵管素); 趋化因子(C-X-C基序)配体9; 分泌的卷曲相关蛋白质5; 珐琅蛋白(X连锁性釉质生长不全1); 松弛素1; Sparc/骨连接蛋白、cwcw和kazal样结构域蛋白聚糖(睾丸蛋白聚糖); 趋化因子(C-C基序)配体26; 成纤维细胞生长因子1(酸性); 血管生成素样2; Fms相关酪氨酸激酶1(血管内皮生长因子/血管通透性因子受体); Dystonin; 胰岛素样4(胎盘); 钴胺传递蛋白II; 大红细胞性贫血; 趋化因子(C-C基序)配体1; 胰岛素样生长因子结合蛋白的酸不稳定亚基; 补体因子H; 妊娠特异性 $\beta$ -1-

糖蛋白6; Silver同系物(小鼠); 蛋白聚糖4; 成纤维细胞生长因子16; 细胞因子样蛋白质C17; 颗粒溶素; 血管生成素 2; 嗜铬粒蛋白B(分泌粒蛋白1); Sema结构域, 免疫球蛋白结构域(Ig)和GPI膜锚形体(脑信号蛋白)7A; 多效营养因子(肝素结合生长因子8, 神经突生长促进因子1); 钙离子活化性氯离子通道家族成员3; 分泌珠蛋白1D家族成员1; 纤蛋白1; 180kDa磷脂酶A2受体1)以及细胞外基质(ADAMTS样1; 成骨细胞特异性因子Periostin; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖5; 神经元亮氨酸丰富重复序列3; 转谷胺酰胺酶 2(C多肽、蛋白质-谷胺酰胺- $\gamma$ -谷胺酰转移酶); 具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)2; 微原纤维相关蛋白质4; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3; V型胶原 $\alpha$ 3; 金属蛋白酶2组织抑制物; 角膜蛋白聚糖; 软骨寡聚基质蛋白; 腔蛋白聚糖; 乙酰透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白3; 富酪蛋白Statherin; 具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)3; 胞外基质蛋白Spondin 1; 几丁质酶3样1(软骨糖蛋白-39); IV型胶原 $\alpha$ 3(肺出血-肾炎抗原); 无翼型MMTV 整合位点家族成员7B; VI型胶原 $\alpha$ 2; 脂笼蛋白7; 乙酰透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白4; 具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)5(聚集蛋白聚糖酶-2); 纤连蛋白1; 软骨基质蛋白胞外基质蛋白1; 假定蛋白FLJ13710; 软骨素 $\beta$ 1,4 N-乙酰半胺转移酶乳糖; 基质金属蛋白酶16(膜插入性); 冯·维勒布兰德因子; VI型胶原 $\alpha$ 2; 跨膜丝氨酸蛋白酶6; 基质金属蛋白酶23B; 基质金属蛋白酶14(膜插入性); 神经元亮氨酸丰富重复序列 3; SPARC样1(mast9, hevin); Sparc/骨连接蛋白、cwcvc和kazal样结构域蛋白聚糖(睾丸蛋白聚糖)3; 皮肤桥蛋白; XIV型胶原 $\alpha$ 1(粗纤维调节素); Y连锁的珐琅蛋白; 巢蛋白(内动蛋白); ADAMTS样2; 乙酰透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白2; XV型胶原 $\alpha$ 1; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖6; 基质金属蛋白酶 12(巨噬细胞弹性蛋白酶); 珐琅蛋白(釉X连锁性质生长不全1); 具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)15; 跨膜丝氨酸蛋白酶6; 具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)16; Sparc/骨连接蛋白、cwcvc和kazal样结构域蛋白聚糖(睾丸蛋白聚糖); 具有



血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)20; XI型胶原 $\alpha$ 1; 乙酰透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白1; 软骨素 $\beta$ 1,4 N-乙酰半胺转移酶乳糖; Asporin(LRR族1); I型胶原 $\alpha$ 1(常染色体显性IV型埃-当综合征); 分泌型磷蛋白1(骨桥蛋白, 骨涎蛋白I, 早期T-淋巴细胞活化1); 基质Gla蛋白质; 纤蛋白5; XIV型胶原 $\alpha$ 1(粗纤维调节素); 金属蛋白酶 3组织抑制物(假炎性索斯比眼底营养障碍); XXV型胶原  $\alpha$ 1; 软骨寡聚基质蛋白; VI型胶原 $\alpha$ 1; 软骨粘附素; XV型胶原 $\alpha$ 1; 具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)16; IV型胶原 $\alpha$ 4; 齿质基质酸性磷蛋白; IV型胶原 $\alpha$ 1; 含血小板反应蛋白重复序列1; 基质金属蛋白酶16(膜插入性); I型胶原 $\alpha$ 2; 纤蛋白1; 覆膜蛋白 $\beta$ ; 糖基磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 D1; 结肠直肠癌基因1中上调)、细胞骨架:(细丝蛋白B,  $\beta$ (肌动蛋白结合蛋白278); EF手型蛋白中心粒蛋白1; 含FERM结构域3; Bridging integrator 3; Parvin, $\gamma$ ; Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEF)11; 酪氨酸激酶2; Kelch样蛋白4(果蝇); 红细胞血影蛋白 $\beta$ (包括临床I型球形红细胞增多症); Arg/Abl相互作用蛋白ArgBP2; Advillin; 核膜含血影蛋白重复序列1; 联蛋白(钙黏着蛋白相关蛋白质) $\delta$ 1; 红细胞膜蛋白质带4.1样蛋白5; 联蛋白(钙黏着蛋白结合性蛋白) $\alpha$ 2; 趋化因子(C-C基序)配体3;  $\gamma$ -肌聚糖(35kDa肌营养蛋白结合性糖蛋白); 伴肌动蛋白; 成神经细胞瘤细胞内鉴定的 $\beta$ -胸腺素; 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1; 维-奥综合征蛋白相互作用蛋白; Dystonin; 亨廷顿蛋白相互作用蛋白1; KIAA0316 基因产物; 原肌球调节蛋白4(肌肉); 肝癌中缺失蛋白1; 绒毛蛋白样蛋白; 肌养蛋白结合蛋白,  $\beta$ 1(59kDa肌养蛋白结合蛋白A1的碱性成分1); cGMP依赖性I型蛋白激酶; 人类类似于角蛋白8; 细胞角蛋白8; 细胞骨架II型角蛋白8(LOC345751), mRNA; 内收蛋白1( $\alpha$ ); 神经元内蛋白激酶C和酪蛋白激酶底物3; Dystonin; KeII血型; 细丝蛋白A 相互作用蛋白1; 生长停滞特异性 2;; 染色体1可读框1; Stathmin样蛋白2; 红细胞 $\alpha$ 血影蛋白1(椭圆红细胞增多症2); FKSG44基因; 驱动蛋白家族成员1C; 张力蛋白; Kaptin(肌动蛋白结合蛋白); 神经纤维瘤蛋白2(双侧听神经瘤); 血小板白细胞C激酶底物同系结构域、Sec7结构

域和卷曲螺旋结构域2(cytohesin-2); 肌动蛋白相关蛋白质T1; 维-奥综合征样蛋白; Kelch样蛋白4(果蝇); Fascin同系物1, 肌动蛋白成束蛋白(紫色海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)); 双载蛋白(具有128kDa乳癌自体抗原的僵人综合征); 多囊肾病2样蛋白1; 神经元锚蛋白2; CDC42结合蛋白激酶 $\alpha$ (DMPK样); 假定蛋白FLJ36144; Arg/Abl-相互作用蛋白ArgBP2; 成蛋白样3; 88kDa  $\beta$ 1-联蛋白(钙黏着蛋白相关蛋白); 肌动蛋白抑制蛋白2; 突触足蛋白2样蛋白; 肌养蛋白结合蛋白 $\gamma$ 2; 磷脂酶D2; 吞没和细胞游动性2(线虫ced-12同系物); 68kDa神经丝轻链多肽; Dystonin; 肌动蛋白样7B; 驱动蛋白家族成员1C; PDZ和LIM结构域 3; 内收蛋白2( $\beta$ ); obscurin、细胞骨架钙调蛋白和肌联蛋白相互作用 RhoGEF;  $\beta$ 多肽旁系同源物微管蛋白; 细丝蛋白A 相互作用蛋白1; 踝蛋白1; 人类类似于 [片段1 of 2] Piccolo 蛋白(Aczonin)(LOC375597); CDC42 效应蛋白(Rho GTP酶结合)4; 黏结蛋白聚糖1;  $\alpha$ -细丝蛋白A(肌动蛋白结合蛋白280); 肌动蛋白抑制蛋白2; 含张力蛋白样C1结构域的磷酸酶; 假定蛋白MGC33407; Rho家族GTP酶1; 黄蛋白氧化还原酶MICAL2;  $\text{Ca}^{2+}$ 依赖性分泌作用激活蛋白; Rab亲和蛋白3A样(无C2结构域); 肌球蛋白XVA; cGMP依赖性I型蛋白激酶; 肌球蛋白调节性轻链相互作用蛋白; 驱动蛋白家族成员13B; 肌肉RAS癌基因同系物; 非红细胞性 $\beta$ -血影蛋白1; TAO激酶2;  $\beta$ -细丝蛋白B(肌动蛋白结合蛋白278); 神经纤维瘤蛋白2(双侧听神经瘤); 联蛋白 $\alpha$ 3(钙黏着蛋白相关蛋白质); obscurin, 细胞骨架钙调蛋白和肌联蛋白相互作用 RhoGEF; 肌动蛋白结合蛋白冠蛋白1A; 红细胞膜蛋白带4.1样1; 非红细胞性 $\beta$ -血影蛋白4; Y连锁的 $\beta$ 4-胸腺素; (睾丸)Tektin 2; Ras同系物基因家族成员J; 具有DbI和血小板白细胞C激酶底物同系结构域的丝氨酸/苏氨酸激酶;  $\beta$ -小肌营养蛋白; 肠平滑肌 $\gamma$ 2-肌动蛋白; Tara样蛋白; 胱天蛋白酶8, 凋亡相关半胱氨酸蛋白酶; 含Kelch重复序列和BTB(POZ)结构域10; 跨膜黏蛋白1; 微管相关蛋白tau; 张力蛋白; (丝足内)Ras同系物基因家族成员F; 内收蛋白1( $\alpha$ );  $\alpha$ 4-辅肌动蛋白; 红细胞膜蛋白带4.1(RH连锁的椭圆红细胞增多症1); 双尾D同系物2(果蝇); 朗维耶结锚蛋白3(锚蛋白G); 肌

球蛋白VIIA((严重常染色体隐性)厄舍综合征1B);  $\alpha$ 2联蛋白(钙黏着蛋白相关蛋白); 人类类似于角蛋白8, II型细胞骨架-人(LOC285233); 睾丸肌动蛋白成束蛋白Fascin同系物3; Ras同系物基因家族成员J; 晶蛋白串珠丝状结构蛋白质2; 结蛋白; 肌球蛋白X; 信号诱导增殖相关基因1; 肌切蛋白; Coactosin样1(网柱菌属(Dictyostelium)); 吞没和细胞游动性2(线虫ced-12同系物);  $\beta$ 4-微管蛋白;  $\text{Ca}^{2+}$ 依赖的分泌作用激活蛋白; 含FERM结构域4A; 骨骼肌 $\alpha$ 1-肌动蛋白踝蛋白1; 钙调蛋白结合蛋白1; 细丝蛋白结合LIM蛋白-1; 微管相关蛋白tau; 肌养蛋白结合蛋白 $\alpha$ 1(59kDa酸性成分肌养蛋白结合蛋白A1); 内收蛋白2( $\beta$ ); 细丝蛋白A相互作用蛋白1; PDZ和LIM结构域3; 红细胞膜蛋白带4.1样4B; FYN结合蛋白(FYB-120/130); 桥接整合蛋白3、细胞外:(具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)20; SPARC样1(mast9、hevin); 丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制物进化枝G(C1抑制蛋白)成员1(遗传性血管性水肿); Urocortin; 胰凝乳蛋白酶样; 血小板衍生生长因子 $\beta$ 多肽(猴肉瘤病毒(v-sis)癌基因同系物); 结合BMP的内皮调节物前体蛋白质; 补体因子H; 绒毛膜生长促乳激素样1; (肺泡和活化调节的)趋化因子(C-C基序)配体18; 纤连蛋白1; 妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白3; 具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)3; CocoaCrisp; 胰岛素样4(胎盘); 无翼型MMTV整合位点家族成员11; 软骨寡聚基质蛋白; 跨膜丝氨酸蛋白酶6; C-fos诱导的生长因子(血管内皮生长因子D); (附睾)具有12序列相似性的家族成员B; 亲棘蛋白调节性亚基9B蛋白磷酸酶1; 钴胺传递蛋白II; 大红细胞性贫血; 凝血因子V(前加速因子, 易变因子); 磷脂酶A2, MD组;  $\alpha$ 肿瘤坏死因子诱导的蛋白质6; XV型胶原 $\alpha$ 1; 乙酰透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白3; XIV型胶原 $\alpha$ 1(粗纤维调节素); 白细胞介素19; 蛋白酶抑制物15; 烟碱胆碱能受体 $\beta$ 多肽1(肌肉); 赖氨酰氧化酶样3; 胰岛素样生长因子结合蛋白5; 生长激素1; 酪蛋白 $\beta$ ; NEL样2(鸡); I因子(补体); 趋化因子(C-C基序)配体23;  $\alpha$ 2-干扰素; 基质金属蛋白酶16(膜插入性); 基质金属蛋白酶12(巨噬细胞弹性蛋白酶); 磷脂酰肌醇蛋白聚糖5; 妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白3; 成纤维细胞生

长因子6; 半胱氨酸结超家族Gremlin 1同系物(爪蟾); 蛋白质S( $\alpha$ ); 软骨素 $\beta$ 1,4 N-乙酰半胺转移酶乳糖; 糖基磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 D1; 成纤维细胞生长因子1(酸性); 胞外基质蛋白Spondin 1; 骨形态发生蛋白1; 肺泡表面活性剂相关蛋白B; 牙质基质酸性磷蛋白; 脂蛋白蛋白质Lp(a); 跨膜黏蛋白1; 甘露聚糖结合性凝集素丝氨酸蛋白酶1(Ra反应性因子的C4/C2活化成分);  $\beta$ -跨膜肽酶A; 分泌珠蛋白1D家族成员1; Asporin(LRR类1); 趋化因子(C-C基序)配体25; 细胞因子样蛋白质C17; 胰岛素样5;  $\alpha$ -跨膜肽酶A(PABA 肽水解酶); 瘙痒病反应性蛋白1; 成纤维细胞生长因子18; 趋化因子(C-X-C基序)配体9;  $\beta$ B-抑制素(激活蛋白AB $\beta$ 多肽); (雄激素诱导的)成纤维细胞生长因子8; 颗粒溶素; 可卡因和苯丙胺调节的转录物; I型胶原 $\alpha$ 2; 趋化因子(C-C基序)配体17; 趋化因子(C-C基序)配体23; Sparc/骨连接蛋白、cwcv和kazal样结构域蛋白聚糖(睾丸蛋白聚糖)3;  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)A受体 $\beta$ 3; 皮质稳定素 $\alpha$ 4-防卫素; 神经元亮氨酸丰富重复序列3; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖6; 丝裂原活化的蛋白激酶激酶 2; 凝血因子XI(血浆凝血激酶前质); 趋化因子(C-C基序)配体5; Dystonin; 卷曲相关蛋白; 凝血因子XIII-A1多肽; 胰岛素样生长因子1(生长调节素C); 假定蛋白MGC45438; 精子相关抗原 11; 胰岛素样生长因子1(生长调节素C); 成骨细胞特异性因子Periostin; A-2-巨球蛋白;  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)A受体 $\alpha$ 5; 丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制物分支体A( $\alpha$ -1抗蛋白酶、抗胰蛋白酶)成员3; Silver 同系物(小鼠); 卷曲相关蛋白; 软骨粘附素; 软骨素 $\beta$ 1,4 N-乙酰半胺转移酶乳糖; 5-羟色胺(血清素)受体3, 家族成员C; VI型胶原 $\alpha$ 2; Toll样受体9; Y连锁的珐琅蛋白; 血管内皮生长因子B; 辐条状头样1(Radial spokehead-like 1); Fms相关酪氨酸激酶1(血管内皮生长因子/血管通透性因子受体); 蛋白酶抑制物16; 白细胞介素2; 簇蛋白(补体裂解抑制因子、SP-40,40、硫酸化糖蛋白2、睾酮抑制性前列腺信息2、ApoJ); 促卵泡激素 $\beta$ 多肽; 具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)16; 溶菌酶(肾淀粉样变); 基部边缘蛋白同系物(果蝇); 胰岛素样生长因子结合蛋白5; Taxilin; 载脂蛋白A-V; 血小板衍生生长因子C;

趋化因子(C-C基序)配体3样1; 成纤维细胞生长因子16; VI型胶原 $\alpha$ 2; 丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制物分支体C(抗凝血酶)成员1; 趋化因子(C-C基序)配体11; IV型胶原 $\alpha$ 4; 布鲁顿无丙种球蛋白白血症酪氨酸激酶; 胰岛素样生长因子2(生长调节素A); Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制物结构域1; 纤维蛋白原A  $\alpha$ 多肽; 趋化因子(C-C基序)配体1; 抑制素 $\beta$ E; 性激素结合珠蛋白; IV型胶原 $\alpha$ 1; 卵磷脂胆固醇脂酰基转移酶; 半胱氨酸丰富分泌性蛋白2; 乙酰透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白1; 利尿钠肽前体C; RNA酶A家族核酸酶k6; 成纤维细胞生长因子14; ADAMTS样2; IV型胶原 $\alpha$ 3(古德帕斯丘抗原); 血管生成素2; 载脂蛋白L-3; 趋化因子(C-X-C基序)配体12(基质细胞衍生因子1); 乙酰透明质酸结合蛋白2; 凝血因子VII(血清凝血酶原转变加速因子); XIV型胶原 $\alpha$ 1(粗纤维调节素); 120kDa输卵管糖蛋白1(黏蛋白9、输卵管素); 软骨基质蛋白胞外基质蛋白1; 气管支持管/胃黏蛋白5亚型A和C; 肿瘤坏死因子受体超家族成员11b(护骨蛋白); 转谷氨酰胺酶2(C多肽、蛋白质-谷氨酰胺- $\gamma$ -谷氨酰转移酶); 角膜蛋白聚糖; V型胶原 $\alpha$ 3; WAP四-二硫键核心结构域2; 趋化因子(C-X3-C基序)配体1; 丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制物分支体D(肝素辅因子)成员1; 分泌性蛋白LOC348174; 凝血因子X; 白细胞介素16(淋巴细胞化学引诱物因子); 胰脂酶相关蛋白2; HtrA丝氨酸肽酶3; 甘氨酸受体 $\alpha$ 3; CD5抗原样(清除受体半胱氨酸丰富家族); 假定蛋白MGC39497; 凝血因子VIII, 前凝血剂成分(血友病A); 皮肤桥蛋白; 成头蛋白; 分泌型含LY6/PLAUR结构域1; ADAMTS样1; A-1-B糖蛋白; 染色体20可读框175; 无翼型MMTV整合位点家族成员8B; 纤蛋白1; 纤蛋白5; 组织蛋白酶S; 巢蛋白(内动素); 趋化因子(C-C基序)配体26; 内皮细胞特异性分子1; 几丁质酶3样1(软骨糖蛋白-39);  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)A受体 $\beta$ 1; 分泌珠蛋白1D家族成员2; 甘露聚糖结合性凝集素丝氨酸蛋白酶1(Ra反应性因子的C4/C2活化成分); ADAMTS样1; Sema结构域, 免疫球蛋白结构域(Ig)和GPI膜锚形体,(脑信号蛋白)7A; 具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)15; 2型前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin; 胰岛素样生长

因子1(生长调节素C); 视网膜劈裂症(青少年X连锁性)1; 具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)16; 趋化因子(C基序)配体2; 成纤维细胞生长因子5; 精子相关抗原 11; 微原纤维相关蛋白4; 脊髓灰质炎病毒受体; 胞外信号调节性激酶8; 跨膜丝氨酸蛋白酶6; 蛋白激酶C,  $\alpha$ ; 几丁质酶3样2; 白细胞介素9; 载脂蛋白L-6; 表面活性剂肺泡相关性蛋白A1; VI型胶原 $\alpha$ 1; 载脂蛋白L-6; 假定蛋白FLJ 13710; 羧肽酶B2(血浆羧肽酶U); 杀菌性/通透性提高蛋白样2; 成纤维细胞生长因子5; 分泌型磷蛋白1(骨桥蛋白、骨涎蛋白I、早期T-淋巴细胞活化1); HtrA 丝氨酸蛋白酶 3; 肝癌内缺失1; 内皮细胞特异性分子 1; 冯·维勒布兰德因子; 具有血小板反应蛋白1型基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)5(聚集蛋白聚糖酶-2); Sema结构域, 免疫球蛋白结构域(Ig), 短碱性结构域分泌型(脑信号蛋白)3A; 趋化因子(C-X-C基序)配体12(基质细胞细胞衍生因子1); 富酪蛋白; 胞外信号调节性激酶8; 金属蛋白酶3组织抑制物(假炎症索斯比眼底营养障碍); 血小板因子4(趋化因子(C-X-C基序)配体4); 表面活性剂肺泡相关性蛋白D; 补体因子H;  $\delta$ 样1同系物(果蝇); WAP四-二硫键核心结构域 1; 胰岛素样生长因子结合蛋白, 酸不稳定亚基; 早期发生乳癌2; 前B淋巴细胞基因 1; 促肾上腺皮质激素释放激素; 假定蛋白DKFZp434B044; 促乳素诱导性蛋白; RAS 肽基释放蛋白 4; Progastricsin(胃蛋白酶原C); Sema结构域, 免疫球蛋白结构域(Ig), 短碱性结构域分泌型(脑信号蛋白)3F; 结肠直肠癌基因内上调 1; 蛋白聚糖4; 烟碱胆碱能受体 $\delta$ 多肽; 软骨寡聚基质蛋白; ABO血型(转移酶A、 $\alpha$ 1-3-N-乙酰半胺转移酶乳糖; 转移酶 B、 $\alpha$ 1-3-半乳糖基转移酶); 白细胞介素12A(天然杀伤细胞刺激性因子1、毒性淋巴细胞成熟因子1、p35); 成纤维细胞生长因子7(角质形成细胞生长因子); IRRE样3同胞(果蝇); (神经元)烟碱胆碱能受体 $\alpha$ 多肽2; 血小板、肺和鼻上皮癌相关; XV型胶原 $\alpha$ 1; 多效营养因子(肝素结合性生长因子8、神经突生长促进性因子1); 血管生成素样2; 诺里夫病(假神经胶质瘤); 趋化因子(C-C基序)配体3; 几丁质酶3样1(软骨糖蛋白-39);  $\alpha$ (珠蛋白)间抑制物H3; 珞琅蛋白(釉质生长不全1, X连

锁性);表皮生长因子( $\beta$ -尿抑胃素);成纤维细胞生长因子13;无翼型MMTV整合位点家族成员7B;烟碱胆碱能受体 $\gamma$ 多肽;妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白6;基质金属蛋白酶 14(膜插入性);趋化因子(C-C基序)配体26;  $\alpha$ 6干扰素;速激肽前体1(K物质、P物质、神经激肽1、神经激肽 2、神经调节肽 L、神经激肽 $\alpha$ 、神经肽K、神经肽 $\gamma$ );分泌的卷曲相关蛋白质5;乙酰透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白4;补体成分 4B;基质金属蛋白酶 16(膜插入性);成纤维细胞生长因子7(角质形成细胞生长因子);载脂蛋白C-II;钙活化的氯离子通道家族成员3;四联蛋白(纤维蛋白溶酶原结合蛋白);III型胶原 $\alpha$ 1(常染色体显性IV型埃-当综合征); KIAA0556 蛋白质;趋化因子(C-C基序)配体4; 血红蛋白结合蛋白;  $\alpha$ (珠蛋白)间抑制物 H1; 松弛素 1; 基质Gla蛋白; 具有I型血小板反应蛋白基序的解联蛋白样和金属蛋白酶(reprolysin型)2; 干扰素( $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\omega$ )受体2; 前列腺酸性磷酸酶; 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G蛋白) $\gamma$  8; 基质金属蛋白酶 23B;  $\alpha$ -跨膜肽酶A(PABA肽水解酶); 透明质酸酶 1; 血管紧张素原(丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制物分支体A( $\alpha$ -1 抗蛋白酶、抗胰蛋白酶)成员8); 软骨中间层蛋白核苷酸焦磷酸水解酶; 配体门控型离子通道嘌呤能受体P2X-7; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3; 覆膜蛋白 $\beta$ ;  $\alpha$ 5干扰素; 脂笼蛋白7; 血小板因子4变体1; 核结合蛋白1; XI型胶原 $\alpha$ 1; 肠抑胃肽; 含血小板反应蛋白重复序列1; 5-羟色胺(血清素)受体3家族成员D; XXV型胶原 $\alpha$ 1; 生长分化因子9; 假定蛋白DKFZp434B044; 内皮缩血管肽3; 趋化因子(C基序)配体2; Prokineticin2; 肿瘤坏死因子受体超家族成员11 b(护骨蛋白); 组织抑制物 of 金属蛋白酶 2; Dystonin; 嗜铬粒蛋白B(分泌粒蛋白1); 乙酰透明质酸和蛋白聚糖连接蛋白2; 神经元亮氨酸丰富重复序列 3; 腔蛋白聚糖; 胞外基质蛋白1, 软骨基质蛋白; 磷脂酶 A2 IIA组(血小板、滑液); 羧酸酯酶1(单核细胞/巨噬细胞丝氨酸酯酶1); Sparc/骨连接蛋白、cwcv和kazal样结构域蛋白聚糖(睾丸蛋白聚糖); Dickkopf 同系物2(爪蟾);  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)A受体- $\alpha$ 3; 妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白11; 胰岛素样生长因子结合蛋白1; 防卫素 $\beta$ 106; 白细胞介素17F; 配体门控型离子通道亚基; 180kDa磷脂酶 A2受体1 ; I因子(补体);

Dystonin; LAG1长寿保障同系物1(酿酒酵母(*S. cerevisiae*)); 促乳素; 睾丸表达型序列264; Sema结构域, 免疫球蛋白结构域(Ig), 短碱性结构域分泌型(脑信号蛋白)3D; 分泌的卷曲相关蛋白质2; 分泌的卷曲相关蛋白质4)。

有些组基因仅在UCEC中出现。这些基因与如下有关: 体内稳态(清蛋白; 钙感受受体; Aquaporin 9; 乳运铁蛋白)、形态发生(同源异型框HB9; 上皮V样抗原1)、胚胎发育(松弛素2; 癌胚抗原相关细胞粘附分子8; 吲哚胺-吡咯2,3双加氧酶; EPH受体A3; 促甲状腺激素胚胎因子; 妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白1;  $\alpha$ 3-层粘连蛋白)、细胞外空间(表面活性剂肺泡相关性蛋白A1; 妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白1; 乳运铁蛋白; TGF- $\alpha$ ; 清蛋白; FGF-23; S100钙结合蛋白A9(钙粒蛋白B)、细胞外基质(层粘连蛋白 $\beta$ 4; 层粘连蛋白 $\alpha$ 3; 透明带糖蛋白4)、结构分子活性(染色体21可读框29; 层粘连蛋白 $\alpha$ 3; 微管相关蛋白2; 层粘连蛋白 $\beta$ 4; 角蛋白6B; Ladinin 1; 角蛋白6A; 闭合蛋白; 兜甲蛋白; 红细胞膜蛋白带 4.1(RH连锁椭圆红细胞增多症1); 晶体蛋白 $\beta$ A2; 眼晶状体结构蛋白; 接触蛋白相关蛋白样4; 密蛋白19; 假定蛋白LOC144501; 角蛋白6E; 角蛋白6L; 晶状体固有膜蛋白2, 19kDa)、细胞骨架(微管相关蛋白2; 红细胞膜蛋白带 4.1 样5; 人类毛透明蛋白(THH); 角蛋白6B; 角蛋白6A; 上皮的 V样抗原 1; Hook同系物1(果蝇); 兜甲蛋白; 红细胞膜蛋白带 4.1(RH连锁椭圆红细胞增多症1); 原肌球蛋白调节蛋白1; MAP/微管亲和力调节激酶1; 角蛋白6E; 肌动蛋白结合LIM 蛋白质家族成员2)、细胞粘附分子(2型钙黏着蛋白19; 髓性/淋巴性或混合系白血病; 染色体21可读框29; IRRE样2同胞(Kin); 层粘连蛋白 $\alpha$ 3; 唾酸黏附素; CD84 抗原(白细胞抗原); 可溶性半乳糖苷结合性凝集素(半凝集素2); 上皮V样抗原1; CD96 抗原; 肾小管间质性肾炎抗原; 癌胚抗原相关细胞粘附分子 8; IL-18; 免疫球蛋白超家族成员1; 整合素 $\beta$ 8; 鸟氨酸氨基甲酰基Ornithine carbamoyl转移酶; 整合素 $\beta$ 6; 接触蛋白相关蛋白样4; XVII型胶原 $\alpha$ 1; 钙黏着蛋白样26; 黏蛋白和钙黏着蛋白样)、细胞分化蛋白(受体型蛋白酪氨酸磷酸酶Z多肽1;  $\alpha$ 3-层粘连蛋白; CD84抗原(白细胞抗原); EDRF2; 人类红细胞系分化相关因子2; 肿瘤蛋白p73样; NB4 凋亡/分化



相关蛋白; 人类 PNAS-133; Similar to seven in absentia 2; 白细胞介素24; 角蛋白6B; 角蛋白6A; 脱氢酶/还原酶(SDR家族)成员 9; 间隙连接蛋白β5(连接蛋白31.1); Iroquois 同源框蛋白质4; 腹前同源框2; 趋化因子(C-X-C基序)配体10; 肿瘤坏死因子受体超家族成员17; 电压依赖性钙离子通道β2亚基; 帕金森病(青少年常染色体隐性)2帕金森蛋白; (角质层胰凝乳蛋白酶性)激肽释放酶 7; 神经胶质细胞缺失同系物2; AP-2α; 受体型蛋白酪氨酸磷酸酶Z多肽1; 肌钙蛋白T1; Sciellin; 葡萄糖胺基(N乙酰基)转移酶2,I-分支酶; XVII型胶原α1; 细胞因子信号阻遏物2; Distal-less 同源异型框 1; 合子停滞1; 白细胞介素20; 生长分化因子3; FGF-23; 无翼型MMTV整合位点家族成员8A)、细胞外: (染色体21可读框29; 层粘连蛋白α3; 层粘连蛋白β4; 白细胞介素24; 妊娠特异性 β-1-糖蛋白1; 趋化因子(C-X-C基序)配体11; 表面活性剂肺泡相关性蛋白A1; Prepronociceptin; 5-羟色胺(血清素)受体3B; 癌胚抗原相关细胞粘附分子 8; 趋化因子(C-X-C基序)配体10; IL-18(干扰素γ诱导因子); 乳运蛋白; 清蛋白; Fas配体(TNF超家族成员6); 烟碱胆碱能受体β肽4; Cathelicidin抗菌肽; 呼吸道胰蛋白酶样蛋白酶; S100钙结合蛋白A9(钙粒蛋白B); TGF-α; 激肽释放酶 10; Kunitz型丝氨酸蛋白酶抑制物1; WNT1诱导性信号途径蛋白3; 松弛素 2; κ-干扰素; 防卫素β103A; IL-20; 透明带糖蛋白4; 生长分化因子3; FGF-23; 无翼型MMTV整合位点家族成员8A; 补体因子H相关5)、发育蛋白质(EPH受体A3; NIMA(有丝分裂基因 a中从不存在的)相关激酶2; 锌指蛋白282; TANK-结合激酶1; MRE11减数分裂重组11 同系物A; E2F 转录因子2; 受体型蛋白酪氨酸磷酸酶Z多肽1; 从X染色体表达的人类乳腺mRNA克隆161455; 层粘连蛋白, α3; v-myb成髓细胞瘤病毒癌基因同系物(禽)样1; G-蛋白信号调节物11; 微管相关蛋白2; 跨膜蛋白16A; 腺瘤性结肠息肉2; 同源异型框 HB9; 着丝粒蛋白F, 350/400ka(核分裂激素); CD84 抗原(白细胞抗原); EDRF2; 人类红细胞样分化相关因子2; 肿瘤蛋白p73样; NB4 凋亡/分化相关蛋白; 人类 PNAS-133; 叉头盒P2; 人类胃相关性差异表达蛋白YA61P(YA61); 生腱蛋白N; 染色体6 可读框49; 锌指蛋白462; 锌指

蛋白71(Cos26); SRY(性别决定区域Y)盒7; 启动髓样细胞表面表达受体样4; 白细胞介素24; 妊娠特异性 $\beta$ -1-糖蛋白1; 硫酸软骨素蛋白聚糖5(neuroglycan C); 角蛋白6B; 角蛋白6A; 脱氢酶/还原酶(SDR 家族)成员9; 上皮V样抗原1;  $\beta$ 5-间隙连接蛋白(连接蛋白31.1); G蛋白质偶联受体51; 干扰素调节因子6; 神经营养蛋白5(神经营养蛋白4/5); CD96 抗原; Iroquois 同源框蛋白质4; 白细胞介素1受体样1; G-2和S期表达1; 核受体亚家族2, E组成员3; 腹前同源框2; 锌指蛋白215; 染色体4(独特)234上表达的DNA 片段序列; 癌胚抗原相关细胞粘附分子 8; 趋化因子(C-X-C基序)配体10; IL-18; 吡啶胺-吡咯2,3二加氧酶; 清蛋白; 钙传感受体(低尿钙症高血钙症1, 严重新生儿甲状旁腺功能亢进); Fas配体(TNF超家族成员6); TNFR超家族成员17; 钙离子通道, 电压依赖的,  $\beta$ 2 亚基; 帕金森病(常染色体隐性, 青少年)2, 帕金森蛋白; (角质层胰凝乳蛋白酶性)激肽释放酶7; 神经胶质细胞缺失同系物2; TGF- $\alpha$ ; 促甲状腺激素胚胎因子; AP-2  $\alpha$ (活化增强子结合蛋白2 $\alpha$ ); 激肽释放酶10; G蛋白信号调节物7; 受体型蛋白酪氨酸磷酸酶Z多肽1; Kunitz型丝氨酸蛋白酶抑制物1; WNT1诱导性信号途径蛋白3; Zic家族成员3 heterotaxy1(odd-成对同系物, 果蝇); TTK 蛋白激酶; 骨骼缓慢肌钙蛋白T1; Sciellin; X连锁TGFB诱导因子2样蛋白; 激肽释放酶8(neuropsin/ovasin); 葡萄糖胺基(N乙酰基)转移酶2, I-分支酶; 锚蛋白重复序列结构域 30A; 松弛素 2; XVII型胶原 $\alpha$ 1; 前列腺内差异性表达的基因; 磷酸酶和肌动蛋白调节物3; 细胞因子信号阻遏物2; 核受体4亚家族 A组成员3; 血管紧张素I转化酶(肽酰基-二肽酶A)1; 假定蛋白MGC17986; Distal-less同源异型框 1; LAG1长寿同系物3(酿酒酵母); 合子停滞1;  $\kappa$ -干扰素; IL-20; ICEBERG 胱天蛋白酶-1抑制物; 生长分化因子3; FGF-23; 睾丸表达序列15; 无翼型MMTV 整合位点家族成员8A; SRY(性别决定区域Y)盒7; 肉碱缺乏相关性室内表达1; Prokineticin 1; CAMP响应元件结合蛋白3样3; 胱天蛋白酶征召结构域家族成员15; FLJ23311蛋白质)。

实施例6:脐带内衬上皮干细胞(UCEC)直接分化为皮肤表皮角质形成细胞

为了将脐带上皮干细胞UCEC细胞分化为皮肤表皮角质形成细胞，将UCEC细胞根据用于培养角质形成细胞的标准方案培养。细胞分离技术如上所述。随后将UCEC在无血清角质形成细胞生长培养基KGM<sup>®</sup>、KGM<sup>®</sup>-2(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)、EpiLife(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)或在Green's培养基中在经辐射或丝裂霉素C处理的3T3小鼠胚胎饲养层存在下于37°C、5% CO<sub>2</sub>培养。因此，UCEC细胞形态分化成为类似人表皮角质形成细胞。上皮细胞在光学显微镜下具有相似形态学并且可以使用常规的和商业可得到的培养基容易地转变为成纤维细胞(参考图2)。

免疫荧光分析显示培养的UCEC还表达表皮角质形成细胞分子标志如角蛋白、桥粒、半桥粒和基底膜成分(还参见图10，其显示UCEC通过表达多种的这类上皮细胞标志而大体上是合格的上皮细胞)。因此这些结果表明可以将本发明的脐带上皮祖细胞/干细胞分化为皮肤细胞如表皮角质形成细胞，其可以用于伤口愈合并且具有开发成为培养的皮肤等效物的巨大潜力。

#### 实施例7: 使用脐带内衬膜组织的重复组织外植来扩充脐带上皮干细胞和间充质干细胞

如下使用脐带羊膜组织的重复外植来扩充本发明的脐带上皮干细胞和间充质干细胞。简而言之，在第一天，将组织外植体于37°C、5%CO<sub>2</sub>接种在组织培养皿中的生长培养基内(DMEM/10%FCS、EpiLife<sup>®</sup>、KGM<sup>®</sup>、KGM<sup>®</sup>-2或M171); 培养基每2天或3天更换一次。细胞长出开始并且自外植体连续迁移持续7天。此后，将组织外植体转移至另一个培养皿以允许细胞进一步生长。这个过程持续进行直至外植体尺寸变小，阻止了进一步外植。在本文中，应当指出的是外植体尺寸进行性变小直至它们变得太小不能进一步组织外植，因为在细胞自组织外植体长出并迁出过程期间，细胞产生了消化和降解组织的蛋白酶。图16示意性说明了使用这种方法得到的脐带上皮干细胞和间充质干细胞迅速和强烈的扩充过程。因此，本研究证实可以从此来源得到高产量UCMC和UCEC细胞，这进一步反映了与其它

来源的细胞如骨髓或脂肪衍生的干细胞相比这些细胞的高存活性和促生长特征。此外，作为实体组织，本文中所用的成功的重复外植技术证实可以从完整组织而不仅是某个部分中均一地提取本发明的细胞。这可以得到大量的细胞，其可以经低传代衍生而不使细胞经过引起细胞退化的多次传代。

#### 实施例8: 脐带间充质细胞(UCMC)直接分化为皮肤真皮成纤维细胞

为了将脐带间充质干细胞 UCMC 细胞分化为皮肤真皮成纤维细胞，将其根据用于成纤维细胞的标准方案培养。细胞分离技术如上面实施例 6 中所述。随后将 UCMC 在 DMEM 或商业可得到的成纤维细胞生长培养基 (FGM) 中培养。因此，UCMC 细胞形态分化成为类似人真皮成纤维细胞。间充质细胞在光学显微镜下具有相似形态并且可以使用常规的和商业可得到的培养基轻易地转变成成纤维细胞(参考图 3)。

#### 实施例9: UCEC直接分化为皮肤表皮角质形成细胞

在与实施例 6 相似的方法中，按实施例 2 中描述的分离脐带羊膜表皮干/祖细胞(UCEC)。为了将 UCEC 分化为表皮角质形成细胞，在角质形成细胞培养基(EpiLife<sup>®</sup>或 KGM<sup>®</sup>)中培养细胞直到 100%汇合(图 17-A 显示的在培养 5 天后)，然后更换培养基为 DMEM/10%FCS 持续 3 天形成表皮细胞层。如图 17-A 显示的(其中描述了被称为“UCEC-10”和“UCEC-17”的两个实验的照片)，在 DMEM/10%FCS 中培养后，UCEC 已经分化为表皮角质形成细胞，其形成细胞层(图 17-A 的照片拍摄 10 天后)。因此这些结果为本发明的细胞的全能性提供了进一步的证据。

#### 实施例10: UCMC直接分化为成骨细胞

按实施例 2 中描述的分离脐带羊膜间充质细胞(UCMC)。为了 UCMC 分化为成骨细胞，在 DMEM/10%FCS 中培养细胞直到 100%汇合，然后在无血清的 DMEM 的饥饿培养基中再培养 48 小时。在对细胞进行冯科萨染色(骨细胞染色)前，将 UCMC 置于骨生成诱导培养基中 4 周。骨生成诱导培养基含有 DMEM/10%FCS; 1%抗生素(链霉素和青霉素)/抗真菌剂(两

性霉素); 0.01 $\mu$ M 1,25-二羟维生素 D<sub>3</sub>、50 $\mu$ M 抗坏血酸-2-磷酸盐、10mM  $\beta$ -甘油磷酸盐、1%抗生素(链霉素和青霉素)/抗真菌剂(两性霉素)。

如图 17B 中显示的, 培养在骨生成诱导培养基中的 UCMC 细胞的冯科萨染色表示 UCMC 中骨节的形成, 因此 UCMC 分化为成骨细胞, 而在未处理 UCMC 中没有显示此类分化, 所述未处理 UCMC 是作为阴性对照, 培养在其它条件相同但没有诱导的 DMEM/10%FCS 中的。作为其它的阴性对照, 来自 8 个月大的供者的真皮成纤维细胞和来自 20 岁供者的瘢痕疙瘩成纤维细胞在与诱导的或未诱导的 UCMC 相同条件下培养。两种细胞类型使用冯科萨染色都没有产生阳性结果, 这是本发明的 UCMC 的全能性, 以及因此也分化为例如成骨细胞的进一步的证据。

#### 实施例11: UCMC直接分化为脂肪细胞

按实施例 2 中描述的分离脐带羊膜间充质干/祖细胞(UCMC)。为了 UCMC 分化为脂肪细胞, 在 DMEM/10%FCS 中培养细胞直到 100%汇合, 然后在无血清的 DMEM 的饥饿培养基中再培养 48 小时。在进行油红 O 染色前, 将 UCMC 置于脂肪形成诱导培养基中 4 周。脂肪形成诱导培养基含有 DMEM/10%FCS; 1%抗生素(链霉素和青霉素)/抗真菌剂(两性霉素); 0.5mM 异丁基-甲基黄嘌呤(IBMx)、1 $\mu$ M 地塞米松、10 $\mu$ M 胰岛素和 200 $\mu$ M 吲哚美辛。

如图 17C 中显示的, 培养在脂肪形成诱导培养基中的 UCMC 细胞的油红 O 染色表示 UCMC 中的脂肪积累, 因此 UCMC 分化为脂肪细胞, 而在未处理 UCMC 中没有显示此类分化, 所述未处理 UCMC 是作为阴性对照, 培养在其它条件相同但没有诱导的 DMEM/10%FCS 中的。作为其它的阴性对照, 来自 8 个月大的供者的真皮成纤维细胞和来自 20 岁供者的瘢痕疙瘩成纤维细胞在与诱导的或未诱导的 UCMC 相同条件下培养。两种细胞类型在油红 O 染色中都没有产生阳性结果, 这是本发明的 UCMC 的全能性, 以及也分化为例如脂肪细胞的进一步的证据。

实施例12: 使用UCMC和UCEC与胶原作为胞外基质组分一起生产皮肤等价物的方法

为了生产本发明的示范性皮肤等价物,使用6孔组织培养盘,其含有由3 $\mu$ m多孔聚碳酸酯膜制成的支架(Transwell<sup>®</sup>,康宁公司(Corning Incorporated), Massachusetts, USA)。此类盘可以从维塔利斯公司AG(Vitaris AG), Baar, Switzerland 获得。对于胶原ECM层,使用在0.05%醋酸中的无菌大鼠尾部酸-提取的胶原(1.0-1.7mg/ml)。用于无细胞的ECM培养基和细胞ECM培养基的其它组分是10 $\times$ 极限必需培养基,其具有Earle氏盐(吉布克BRL公司(Gibco-BRL), Maryland, USA)、L-谷氨酰胺(200mM,吉布克BRL公司(Gibco-BRL), Maryland, USA)、碳酸氢钠(71.2mg/ml)、DMEM(吉布克BRL公司(Gibco-BRL), Maryland, USA)、胎牛血清(FBS,吉布克BRL公司(Gibco-BRL), Maryland, USA)。对于不同的细胞培养基PTT-4和PTT-7,使用下列组分:

PTT-4: 90%(v/v)CMRL 1066和10%(v/v)胎小牛血清。

PTT-7: 99.4%(v/v)EpiLife<sup>®</sup>、0.2%(v/v)胰岛素、0.2%(v/v)转铁蛋白、0.2%(v/v)亚硒酸和10ng/ml表皮生长因子(EGF)。

按实施例2和7中描述的分选和培养脐带羊膜间充质干细胞和上皮干细胞(UCMC和UCEC)。图18b显示了在PTT-4中培养UCMC(培养7天后),而图18a显示了在PTT-7中培养UCEC(培养7天后)。

所有上述组分都应该保持在冰上。为了产生不含有细胞的胞外基质(无细胞ECM),按表1中列举的顺序将无细胞ECM培养基组分混合在一起。培养基溶液的颜色应该是淡黄色至浅红色,颜色上的任何过度变化可表示使胶原不成为凝胶的pH。在无细胞ECM培养基混合在一起后,向每个支架添加1ml该培养基,保证混合物包被支架的整个底部。一旦已经倾倒了胶原凝胶,就不应该在培养箱中(37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub>)干扰。

一旦无细胞ECM聚合(在胶原凝胶已经倒入支架后,其通常需要约0.5至约12小时),就可以胰酶消化培养中的UCMC,并将其彻底重悬在PTT-4细胞培养基中,达终浓度为5 $\times$ 10<sup>5</sup>细胞/ml,准备与胶原溶液混合。

对于细胞ECM培养基(参见表1),所有组分都应该保持在冰上。为了产生含有细胞的胞外基质(细胞ECM),按表1中列举的顺序将细胞ECM

培养基组分混合在一起。应该在最后加入溶解在 PTT-4 中的 UCMC，从而确保混合已经通过添加胶原而中和化，从而细胞不会被碱性 pH 破坏。混匀并添加 3ml 到支架中，并且允许其在培养箱中(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)成凝胶。当凝胶是粉红色且凝固(2 至 24 小时后)，将它们用 3 至 4ml 的 PTT-4 覆盖并孵育 4 至 7 天，直到凝胶收缩稳定且完全。PTT-4 培养基允许细胞分化为成纤维细胞(图 18b)。另一个适合分化 UCMC 为成纤维细胞的培养基是在实施例 8 中描述的。在时间间隔期间，基质的体积减少 50 倍。应该每 2 天更换培养基。

胰酶消化准备好的 UCEC，从而可以将 50μl PTT-7 中高至 1×10<sup>6</sup> 个细胞铺板到每个支架中。细胞悬液可以用 200μl 的自动移液器放置到收缩的胶原凝胶的中央突起的平顶样部分。

当 UCEC 在培养箱中贴附到已经形成的成纤维细胞层上时，2 至 3 小时内不要碰触平板。在该孵育期后，将 PTT-7 加入到孔(4ml)中 UCEC(2ml)的顶部上，培养达 7 天。应该每 2 天更换培养基。UCEC 与 PTT-7 的孵育允许细胞分化为角质形成细胞(图 18a)。另一个适合分化 UCEC 为角质形成细胞的培养基是在实施例 6 中描述的培养基。

在这一点上，在孔中，皮肤等价物(CSE-1)生长在气液界面，使用溶解在 PTT-7 培养基(仅 1.5-2ml)中的高钙(0.6mM)，并培养达 10 天。应该每 2 天更换培养基。

现在皮肤等价物(CSE-1)已经做好准备供组织学和电子显微镜分析。应该注意到 CSE-1 的生长随方法中使用的 UCEC 和 UCMC 株的不同而变动。可以从图 19 中的照片可以看到，形成了由成纤维细胞组成的真皮层和由角质形成细胞组成的表皮层。图 20a 中的照片显示了在提升至气-液界面后，CSE-1 的表面外观。图 20b 显示了在 CSE-1 的胶原格子内聚集的 UCMC 的外观。

表 1: ECM 培养基的组分

	6ml 无细胞 ECM 培养	18 ml 细胞 ECM 培养基(3ml/
--	----------------	-----------------------

	基(1ml/支架)	支架)
10×DMEM	0.59ml	1.65ml
L-谷氨酰胺	0.05ml	0.15ml
胎牛血清	0.6ml	1.85ml
碳酸氢钠	0.17ml	0.52ml
胶原	4.6ml	14ml
UCMC	-	在 1.5ml 的 PTT-4 培养基中 5×10 <sup>5</sup> 个细胞

### 实施例13: 使用UCMC和UCEC生产皮肤等价物的方法

一般而言,下列实施例按与实施例 12 相同的方式进行。然而,与实施例 12 相反,没有使用胶原作为 ECM(所述胶原在实施例 12 中,在接种 UCMC 到支架中之前,被掺入到支架内)。在本实施例中,UCMC 细胞自身分泌 I 型胶原,形成三维的细胞层,从而不必要使用额外的胶原层。通过 UCMC 细胞生产胶原是通过在细胞培养基 PTT-4 中添加抗坏血酸实现的。

首先,按实施例 12 中描述的收获 UCMC 细胞,UCEC 按 1×10<sup>5</sup> 个细胞/ml 的浓度接种在支架上,并孵育 3 天(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)。

3 天后,在培养基 PTT-4 中补充 50µg/ml 抗坏血酸。然后再孵育细胞 2 周(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)。在这些条件下,UCMC 将自我沉积 I 型胶原,并形成三维的细胞层,其模拟实施例 12 中单独产生的胞外基质。

为了生产上皮层,进行实施例 12 中已经描述的不同实验。

现在皮肤等价物(CSE-2)已经做好准备供组织学和电子显微镜分析。应该注意到 CSE-2 的生长随方法中使用的 UCEC 和 UCMC 株的不同而变动。可以从图 21a 中的照片显示了在提升至气-液界面后,CSE-2 的表面外观。图 21b 显示了在 CSE-2 的胶原格子内聚集的 UCMC 的形态。

**实施例14: 使用UCMC、HUVEC和UCEC与作为胞外基质组分的胶原一起生产皮肤等价物的方法**



一般而言, 下列实施例使用与实施例 12 所述相同的组分和程序。

按实施例 2 和 7 中描述的分选和培养来自脐带羊膜的间充质和上皮干细胞(UCMC 和 UCEC)。使用胶原酶自脐带血管培养人脐血管内皮细胞(HUVEC)。简而言之, 用 PBS 冲洗脐带血管去除所有血液。夹紧脐带末端: 将 0.5%胶原酶溶液注射到脐带血管中, 并在室温孵育 20 分钟。然后, 去掉夹子, 并用含有 10%胎小牛血清(FCS)的 EGM 培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)冲洗脐带血管, 从而收集 HUVE-细胞悬浮液。离心细胞悬浮液, 收集细胞沉淀, 然后在 EGM 培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)中培养。

在进行实验不久前, 在培养箱中(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)在 EGM 培养基(康伯司公司(Cambrex Corporation), New Jersey, USA)或 M131 培养基中培养 HUVEC 细胞。使用因子 VIII 相关抗原或 von Willebrand 因子的免疫组织化学分析验证这些细胞的细胞纯度(数据未显示)。简而言之, 将 HUVEC 接种在盖玻片上直到它们达到 80%汇合。然后, 将它们固定并用抗因子 VIII 的一抗或抗 von Willebrand 因子的抗体孵育, 然后用过氧化物酶缀合的二抗孵育。阳性细胞的数目表达为标记了因子 VIII 或 von Willebrand 因子的细胞的百分比。在显微镜下观察阳性的细胞以检查它们的纯度。

实验使用的所有组分都应该保持在冰上。为了产生不含有细胞的胞外基质(无细胞 ECM), 按表 2 中列举的顺序将无细胞 ECM 培养基组分混合在一起。其它细节参见实验 12 中的描述。

一旦无细胞 ECM 聚合(在胶原凝胶已经倒入支架后, 其通常需要约 0.5 至约 12 小时), 就可以胰酶消化培养中的 UCMC 和 HUVEC, 并将其彻底重悬在 PTT-4(用于 UCMC)和 M131(用于 HUVEC)细胞培养基中, 达终浓度为  $5 \times 10^5$  细胞/ml(UCMC/HUVEC-1:1 混合物), 准备与胶原溶液混合。

对于细胞 ECM 培养基(参见表 2), 所有组分都应该保持在冰上。为了产生含有细胞的胞外基质(细胞 ECM), 按表 2 中列举的顺序将细胞 ECM 培养基组分混合在一起。应该在最后加入 UCMC/HUVEC 混合物, 从而确保混合物已经通过添加胶原而中和化, 从而细胞不会被碱性 pH 破坏。混

匀并添加 3ml 到支架中，并且允许其在培养箱中(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)成凝胶。当凝胶凝固(30 分钟后)，将它们用 3 至 4ml 的 PTT-4/M131(1:1)覆盖并孵育 4 至 7 天，直到凝胶收缩稳定且完全。PTT-4 培养基允许细胞分化为成纤维细胞。在时间间隔期间，基质的体积减少 50 倍。应该每 2 天更换培养基。

准备好时胰酶消化 UCEC，从而可以将 50μl PTT-7 中高至  $1 \times 10^6$  个细胞铺到每个支架中。细胞悬浮液可以用 200μl 自动移液器放置到收缩的胶原凝胶的中央突起的平顶样部分。

当 UCEC 在培养箱中贴附到已经形成的成纤维细胞层上时，2 至 3 小时内不要碰触平板。在该孵育期后，在 UCEC(2ml)的顶部加入 PTT-7 到孔内(4ml)，培养达 7 天。应该每 2 天更换培养基。UCEC 与 PTT-7 的孵育允许细胞分化为角质形成细胞。

在这一点上，在孔中，皮肤等价物(CSE-3)生长在气液界面，使用溶解在 PTT-7 培养基(仅 1.5-2ml)中的高钙(0.6mM)，并培养达 10 天。应该每 2 天更换培养基。

现在皮肤等价物(CSE-3)已经做好准备供组织学、共聚焦、电子显微镜和免疫学分析。应该注意到 CSE-3 的生长随方法中使用的 UCMC、HUVEC 和 UCEC 株的不同而变动。

表 2: ECM 培养基的组分

	6ml 无细胞 ECM 培养基(1ml/支架)	18 ml 细胞 ECM 培养基(3ml/支架)
10×DMEM	0.59ml	1.65ml
L-谷氨酰胺	0.05ml	0.15ml
胎牛血清	0.6ml	1.85ml
碳酸氢钠	0.17ml	0.52ml
胶原	4.6ml	14ml

UCMC	-	在 1.5ml 的 PTT-4/M131 混合物培养基中的 $5 \times 10^5$ 个细胞
------	---	---

### 实施例15: UCEC和UCMC分别分化为 $\beta$ -胰岛样细胞

按实施例 2 中描述的分离来自脐带羊膜的间充质和上皮干细胞 (UCMC 和 UCEC)。

在 PTT-4 培养基(见上文 PTT-4 的组成(90%(v/v) CMRL1066、10%(v/v)FCS))或 PTT-10 培养基中孵育 UCMC。PTT-10 培养基含有 99.4%(v/v) CMRL-1066 和 0.2%(v/v)胰岛素、0.2%(v/v)转铁蛋白和 0.2%(v/v)亚硒酸。

在 PTT-7 培养基(见上文 PTT-7 的组成)或 PTT-5 和 PTT-6 培养基中孵育 UCEC。PTT-5 培养基含有 98.8%(v/v) CMRL-1066、0.4%(v/v)胰岛素、0.4%(v/v)转铁蛋白、0.4%(v/v)亚硒酸和 10ng/ml 表皮生长因子(EGF)。PTT-6 培养基含有 99.4%(v/v) M171、0.2%(v/v)胰岛素、0.2%(v/v)转铁蛋白、0.2%(v/v)亚硒酸和 10ng/ml 表皮生长因子(EGF)。

通过添加 1mM 烟酰胺到培养着细胞的各自的细胞培养基中, 分别诱导 UCEC 和 UCMC 的分化。应该每 2 或 3 天更换细胞培养基。

在显微镜下观察  $\beta$ -胰岛样细胞的外观(图 23; 在有或无诱导物, 即烟酰胺的 PTT-10 中的 UCEC)。收集  $\beta$ -胰岛样细胞用于显微镜分析。为了确定根据本发明的方法获得的细胞是否确实是  $\beta$ -胰岛样细胞, 使用在 Technical Manual of StemCell Technologies Inc., 标题: In-vitro differentiation of murine ES cells into pancreatic islet-like clusters, 或 “Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells”, Science, 2004, 306, 第 2261-2264 页中描述的一种方法。

下文中描述了诱导 UCEC(CLEC)的胰岛素-生产细胞分化诱导的替代方法。用上述培养基之一(PTT-5、PTT-6 或 PTT-7 培养基)孵育 UCEC。为了诱导 UCEC 分化为胰岛素-生产细胞, 将这些细胞暴露在 ESCult 培养

基(购自干细胞技术公司(StemCell Technologies Inc.), Vancouver, Canada)或 BBRC06 培养基中 7 天。

ESCult 培养基(干细胞技术公司(StemCell Technologies Inc.), Vancouver, Canada)含有 100 毫克/ml 烟酰胺, 与 20ml/l B27 和 10ml/l N2 添加物一起添加。

BBRC06 培养基含有无血清 DMEM/F12 培养基, 其具有 17.5mM 葡萄糖, 并存在烟酰胺 10mM、激活蛋白-A 2nM、毒蜥外泌肽-4 10nM、肝细胞生长因子 100pM 和五肽胃泌素 10nM(西格玛-阿尔德里克公司(Sigma-Aldrich), Missouri, USA)以及 B-27 无血清添加物, N-2 添加物(干细胞技术公司(StemCell Technologies Inc.), Vancouver, Canada), 和 1% 青霉素/链霉素 5000U/L(Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006, March 24; 341(4)第 1135-40 页)。

在 ES Cult 培养基或 BBRC06 培养基中孵育 7 天后, 使用来自 QIAGEN<sup>®</sup>(Hilden, 德国)用于 RNA 提取和纯化的 Rneasy<sup>®</sup>提取试剂盒收获总 RNA, 单个样本经过 RT-PCR 测定来检测胰岛素基因表达。作为阳性对照使用胰岛素引物, 其描述在 Timper K., Seboek 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006, March 24; 341(4)第 1135-40 页中。

图 25 显示了该替代诱导方法的结果。图 25 显示在 ES Cult 培养基或 BBRC06 培养基的诱导下, 多个 UCEC 样品中的胰岛素表达。指定为 CLEC25、28 和 30 的样品表示来自不同脐带供体的不同样品。指定为 CLEC30(1)和 CLEC30(2)的样品表示同一个样品的一式两份。因此, 证明了 UCEC 具有分化为可用于治疗糖尿病不的胰岛素-生产细胞的潜力。

#### 实施例16: UCEC分化为黏蛋白-生产细胞

按实施例 2 中描述的分离来自脐带羊膜的上皮干细胞(UCEC)。

分离的 UCEC 生长在 PTT-5 或 PTT-6 细胞培养基中(37°C, 5%CO<sub>2</sub>), 其组成已经描述在实施例 15 中。本发明令人惊讶的发现使用 PTT-5 或 PTT-6 培养 UCEC 使 UCEC 生产黏蛋白(参见图 22a)。在移液和更换培养基的过程中, 观察细胞培养物上清液的粘度。

**黏蛋白凝块测试:** 黏蛋白凝块测试是对 PTT-5 或 PTT-6 中培养的 UCEC 生产的黏蛋白的质量和数量的评估。该测试还一般描述在 Corfield A.P., Glycoprotein method and protocols: The Mucins, 第 29-65 页. Humana Press 2000; Gatter R.A. 和 Schumacher R.H., A practical handbook of joint fluid analysis, 第 59-63 页, Lea&Febiger, 1991 中。在该测试中, 在 UCEC 细胞培养条件培养基中喷入 7N 冰醋酸。醋酸导致黏蛋白形成凝块。含有普通黏蛋白的 UCEC 细胞培养条件培养基表现为具有紧密、粘稠凝块清澈液体。

为了定量 UCEC 生产的黏蛋白的量, 进行 SDS-PAGE 和随后的考马斯染色(参见图 22b)。对于 SDS-PAGE, 使用 100kDa 截留膜 Centrisart® I(赛多利斯公司(Sartorius AG), 德国)浓缩从 UCEC 细胞培养物收集的 2.5ml 细胞培养基。将 100 $\mu$ l 浓缩的上清液上样到 6% SDS-PAGE 中用于电泳。然后用考马斯染色凝胶, 并拍摄照片。

#### 实施例17: UCMC直接分化为软骨细胞(软骨形成系)

与 UCMC 发育为成骨细胞相似(参见实施例 10), 它们也具有发育为组成软骨的软骨细胞的能力。

为了发育为软骨, 按实施例 2 中描述的分离脐带羊膜间充质细胞 (UCMC)。为了 UCMC 分化为成骨细胞, 在 DMEM/10%FCS 中培养细胞直到 100% 汇合。然后将它们暴露在补充了 10ng/ml 转化生长因子- $\beta$ 3(TGF- $\beta$ 3; R&D 系统公司(R&D Systems), Minneapolis, USA)、100nM 地塞米松、50mg/mL 抗坏血酸、100mg/mL 丙酮酸钠、40mg/mL 脯氨酸(西格玛-阿尔德里克公司(Sigam-Aldrich), Missouri, USA)的 PTT-5 培养基中, 持续 4 周。细胞层用阿辛蓝染色(其染色酸性糖胺聚糖和黏多糖)。

与其中没有显示此类分化的对照相比(图 24A), 在图 24B 中观察到用阿辛蓝阳性染色的软骨细胞或软骨形成系。对照由未处理的 UCMC 组成, 其培养在其它条件相同但没有用补充的 PTT-5(上文)诱导的 DMEM/1%FCS 中。结果显示, UCMC 具有形成软骨的软骨细胞的潜力,

用于软骨修复和再生。通过使用支架例如 TissueFleece®(奥地利百特公司(Baxter AG), Austria; 描述在实施例 21 中)或水凝胶可以将细胞用于机体。

#### 实施例18: UCMC直接分化为多巴胺-生产细胞

该实施例描述了 UCMC 分化为多巴胺和酪氨酸羟化酶(TH)-生产细胞。

为了多巴胺和 TH 的发育, 按实施例 2 中描述的分离脐带羊膜间充质细胞(UCMC)。

在 100mm 组织培养皿中以 200000 个细胞的密度培养 UCMC, 并在 PTT-4 培养基中维持 5 天直到 80% 汇合。然后将细胞暴露在 PTT-2 培养基中 48 小时。孵育后, 收集细胞培养物上清液用于分析。PTT-2 培养基是 M154(黑素细胞培养基)和 EpiLife®(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologics Inc.), Oregon, USA)按 3:1 比例的混合物。

对 UCMC 细胞或条件培养基(上清液, 如上文)进行 Western 印迹或免疫组织化学(IHC)分析。图 26A 显示 CLMC(UCMC)细胞分泌 TH 到条件培养基中。当暴露给 PTT-2 培养基时, 在第 4 和 5 道观察到更多的 TH 分泌。图 26B 显示 CLMC(UCMC)细胞的多巴胺分泌。图 26C 显示阴性对照。用多巴胺哄诱(coax)这些 UCMC 细胞。它们保持未分化, 但可以检测到大量的多巴胺。表示: UCMC 具有生产多巴胺和多巴胺前体-TH 的潜力。

#### 实施例19: UCMC和UCEC分化为HLA-G-生产细胞

该实施例描述了 UCMC 和 UCEC 分化为 HLA-G-生产细胞。HLA-G 是 HLA I 类抗原, 主要在胎盘中表达, 推测可能保护胎儿不被它的母亲的免疫系统攻击。HLA-G 是特殊的 HLA, 涉及多种免疫介导的疾病和病症, 如器官-、细胞移植和自身免疫病。此类自身免疫病的实例是多发性硬化、类风湿性关节炎、I 型糖尿病、银屑病、甲状腺疾病、系统性红斑狼疮、硬皮病或乳糜泻。已经报道了与流产和先兆子痫的风险相关的特定变体。HLA 分型对于骨髓移植的供体和受体匹配是关键; 使用匹配好的供体增加了存活并降低了移植物对抗宿主的疾病。HLA 分型对于实体器官移植, 以及其它领域的应用也是重要的。

为了 HLA-G 的发育, 按实施例 2 中描述的分离脐带羊膜上皮细胞和间充质细胞(分别为 UCEC 和 UCMC)。

从 UCMC 和 UCEC 细胞收集总 RNA 和条件培养基, 对其进行 RT-PCR 和 Western 印迹分析。图 27A 显示在 UCMC 和 UCEC 中的 HLA-G mRNA 的表达。使用 JAR 滋养层细胞作为 HLA-G 表达的阳性对照。图 27B 显示 UCEC 分泌 HLA-G 蛋白质到条件培养基中。

该实验第一次显示幼稚 UCEC(naïve UCEC)表达和生产 HLA-G。对于 HLA-G 的生产, UCEC 的特异性诱导不是必须的。HLA-G-生产 UCEC 和 UCMC 细胞具有良好的免疫抑制性质。这些细胞是低免疫原性的, 是同种异体移植的良好候选物。

#### 实施例20: 使用UCMC诱导衰老的皮肤角质形成细胞(asK)的增殖

在下列实施例中, 展示了 UCMC 如何可以诱导衰老的皮肤角质形成细胞(asK)和人真皮成纤维细胞(NF)的增殖。

按实施例 2 中描述的分离脐带羊膜的间充质细胞(UCMC)。在 PTT-4 培养基中培养 UCMC 直到 80% 汇合。然后, 收获细胞并在 1200rpm 离心约 10 分钟。离心后, 向细胞沉淀中按每 8 百万细胞 1ml 低渗水的比例加入低渗水。总细胞裂解物在 4°C 4000rpm 离心 30 分钟。收集“UCMC 提取物”的澄清相并储存在 -30°C。从实足年龄的皮肤(60 岁以上的患者)中分离衰老的皮肤角质形成细胞(asK)。在 24 孔平板中以 4000 细胞/孔的密度种植 asK 细胞, 并维持在生长 EpiLife® 培养基中(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)24 小时。然后将 asK 细胞暴露在基础 EpiLife® 培养基中(卡斯卡德生物公司(Cascade Biologies Inc.), Oregon, USA)持续 48 小时, 然后按不同稀释度在基础 EpiLife® 培养基中添加 2.5%、5%、10% 和 20% 稀释的 UCMC 提取物。在不同的时间间隔实施标准 MTT 测定。图 28A 显示在第 6 和 7 天以 2.5%、5% 和 10% 浓度的 UCMC 提取物诱导的 asK 细胞增殖。图 28A 中展示的“对照”样品柱代表维持在没有添加 UCMC 提取物或生长因子的基础 EpiLife® 培养基中的衰老的皮肤角质形成细胞。术语“asK 10(1) p3”指已经传过 3 代的衰老的皮肤角质形成细胞。图

28A 中展示的“阳性”样品柱代表维持在没有 UCMC 提取物的优化条件的生长培养基(基础 EpiLife<sup>®</sup>培养基+生长因子)中的细胞。相似的,人真皮成纤维细胞的不同的细胞系(分别是 NF125 和 NF119)如上述用“UCMC 提取物”处理。这些实验的结果显示在图 28B 和图 28C 中。

由于“UCMC 提取物”对皮肤角质形成细胞和成纤维细胞具有阳性影响,可以制备提取物用于促进创伤愈合、皮肤修复、再生和复壮(rejuvenation)。

#### 实施例21: 使用不同的支架材料用于UCMC的培养

在第一个实验中,通过在胶原格子中增殖的 UCMC 细胞制备间充质组织等价物(MTE)。为了制备器官型共培养构建体,将 MTE 转移到 Transwell 插入物中(康宁公司(Corning Inc.))。将 CLEC 或人皮肤角质形成细胞按 100,000 个细胞/cm<sup>2</sup> 的密度种植到 MTE 上,并维持在 EpiLife 培养基中。然后将器官型共培养构建体提升到气-液界面,持续 3 周。然后对构建体进行 H&E 染色,用于组织学分析(参见图 29A 和 29B)。

进行的第二个实验证明了 UCMC 接种入商购的生物材料支架例如 TissuFleece<sup>®</sup>(奥地利百特公司(Baxter AG), Austria)、INTEGRA Bilayer Matrix Wound Dressing<sup>™</sup>(纽罗科学公司(Neuro Sciences), New Jersey, USA)、BoneSaxe<sup>®</sup>(美国史赛克公司(Stryker Inc.), MI, USA)或 Synthese(AO) 中的能力。

TissuFleece<sup>®</sup>E(奥地利百特公司(Baxter AG), Austria)的活性成分是由自由干燥的马皮肤胶原组成的支架。1cm<sup>2</sup> 的 TissuFleece<sup>®</sup> 含有 2.8mg 的天然胶原原纤维。一般的,胶原与血液的接触导致血小板聚集,然后大量附着在胶原基质上,碎裂并释放凝固因子,所述凝固因子与血浆因子一起,导致纤维蛋白的形成。此外胶原基质增加凝块。由于它的结构,TissuFleece<sup>®</sup> 胶原网状物能够吸收大量液体。仅通过该机械过程,吸收 UCMC。因此,加速肉芽组织的形成。

INTEGRA Bilayer Matrix Wound Dressing<sup>™</sup>(下文仅称为 Integra<sup>®</sup>) 是包含交联的牛腱胶原和糖胺聚糖的多孔基质以及半渗透性聚硅氧烷(硅



氧烷)层的支架。半渗透性硅氧烷膜控制水蒸气丧失,提供覆盖创伤表面的可变通的附着,为装置添加了增强的撕裂度。胶原-糖胺聚糖生物可降解的基质提供了用于细胞侵入和毛细血管生长的支架。

**BoneSaxe<sup>®</sup>**(美国史赛克公司(Stryker Inc.), MI, USA)是由磷酸钙陶瓷组成的支架。

**ChronOS<sup>®</sup>**(林赛丝公司(Synthes GmbH), Switzerland)是由  $\beta$ -磷酸三钙组成的支架。

为了实验,按实施例 2 中描述的分离脐带羊膜的间充质细胞(UCMC)。在 PTT-4 培养基中培养 UCMC 直到 80%汇合。收获细胞并在 1200rpm 下离心约 5 分钟以获得细胞沉淀。为了在 **TissuFleece<sup>®</sup>**、**Integra<sup>®</sup>**、**BoneSave<sup>®</sup>**(美国史赛克公司(Stryker Inc.), MI, USA)和 **ChronOS<sup>®</sup>**(林赛丝公司(Synthes GmbH), Switzerland)中接种入 UCMC,将细胞沉淀按每 1ml 培养基 8 百万个细胞的比例重悬在 PTT-4 培养基中。然后以 100000 个细胞/cm<sup>2</sup> 的密度将 UCMC 细胞悬浮液种植在 **TissuFleece<sup>®</sup>**或 **Integra<sup>®</sup>**层上。**BoneSave<sup>®</sup>**(美国史赛克公司(Stryker Inc.), MI, USA)或 **ChronOS<sup>®</sup>**(林赛丝公司(Synthes GmbH), Switzerland)的骨移植颗粒浸没在 UCMC 细胞悬浮液中,并混匀。将接种入生物材料的 UCMC 细胞在细胞培养培养箱中于 37°C 在 PTT-4 培养基中维持 48 小时,并在用 FDA 和碘化丙啶染色后对其进行共聚焦显微镜分析。将活的 UCMC 细胞接种入 **TissuFleece<sup>®</sup>**(图 30A)和 **BoneSave<sup>®</sup>**(美国史赛克公司(Stryker Inc.), MI, USA)(图 30B)中,如上述孵育,然后用 FDA 和碘化丙啶(PI)染色,然后进行共聚焦显微镜分析。结果显示在图 30A 和 30B 中。用 PI 染色的细胞呈现红色(在图 30A 和 30B 中用“R”显示),用 FDA 染色的细胞呈现绿色(在图 30A 和 30B 中用“G”显示)。

醋酸荧光素(FDA)(50 $\mu$ g/ml)和 PI(25 $\mu$ g/ml)都用 1 $\times$ PBS 制备。为了细胞的染色,从培养箱中取出它们并用 1 $\times$ PBS 洗涤两次。然后将它们与 FDA(50 $\mu$ g/ml)在 37°C 培养箱中孵育 15 分钟。此后,将细胞用 1 $\times$  PBS 洗涤两次。然后再用 PI(25 $\mu$ g/ml)在室温复染 5 分钟。然后,将细胞用 1 $\times$ PBS

洗涤两次并将样品保存在  $1\times$ PBS 中防止干燥。此后,如上述在共聚焦显微镜下观察细胞。

该实验的结果显示 UCMC 在不同种类的支架上生长。因此,UCMC 可用于改造活的软组织和硬组织,用于修复和再生。

#### 实施例22: 将UCMC-增殖的胶原支架植入免疫活性的小鼠中

该实验证明了 UCMC 的血管生成性质。如之前在实施例 12 中描述的将细胞种植到支架内。图 31A 显示了在体外 UCMC-增殖的胶原格子(支架)的外观。图 31B 显示了在小鼠中的第 21 天植入的无细胞胶原格子对照和 UCMC-增殖的胶原格子。没有观察到免疫排斥的信号。在第 21 天,在植入的 UCMC-增殖的胶原格子中观察到宏观的血管生成。图 31C 显示了 UCMC-增殖的胶原格子的微观的血管生成(由箭头指出)。

该实验清楚的表明了 UCMC 的血管生成性质。因此,这些细胞可用于增强在组织修复和再生中的血管生成,并用于治疗局部缺血性障碍。

#### 实施例23: UCMC用于全层烧伤治疗的临床应用

该实验显示了对遭受全层烧伤的 53 岁女性患者的治疗。一般而言,这类烧伤必需皮肤移植来完全治愈。

为了实验,按实施例 2 中描述的分离脐带羊膜的间充质细胞(UCMC)。

对于该实验,首先将待治疗的患者全身麻醉,然后在将 UCMC 增殖的 Biobrane<sup>®</sup>-L 尼龙膜(陶氏里克曼药物公司(Down Hickam Pharmaceuticals), Texas, USA)应用到患者的创伤之前,使用外科刮器外科手术去除烧伤坏死的组织(参见图 32B)。

在本实验中,将 Biobrane<sup>®</sup>-L 尼龙膜剪切成适合 32mm 组织培养皿的圆片。在 150mm 组织培养皿中培养 UCMC,通过细胞刮收获、离心并按本文前述的计数。在以 100000 个细胞/cm<sup>2</sup> 的密度将 UCMC 接种到膜上之前,用 DMEM 培养基湿润膜片 48 小时(参见图 32B, 第一幅图)。

图 32A 显示在 53 岁女性患者的全层烧伤(3 度)上的创面床准备。将 UCMC 接种到 Biobrane<sup>®</sup>-L 创伤敷料(陶氏里克曼药物公司(Down Hickam Pharmaceuticals), Texas, USA)上。将 UCMC-Biobrane 构建体转移到创

伤上(图 32B)。在第 7 天看到完全愈合(没有皮肤移植物),并在随访 3 个月稳定。该情况显示,UCMC 可以具有干细胞的治愈力,不使用皮肤移植物也治愈此类烧伤,表示该技术在将来可替代自体皮肤移植。

图 34 显示对 2 岁男性患者的全层烧伤的治疗。实验与前述实验相似的进行。将 UCMC 在组织培养皿上培养在 DMEM/10%FCS 中直到汇合。然后刮擦收获细胞并与 SoloSite<sup>®</sup>凝胶(施乐辉公司(Smith&Nephew), Hull, UK)混合,并以 1 百万个细胞/cm<sup>2</sup>的密度糊到创伤上。SoloSite<sup>®</sup>是有防腐剂的水凝胶创伤敷料,其包含水膨胀性的多聚体,其保持凝胶样直到饱和。它可以贡献水分再水合坏死的组织。它吸收渗出物同时保持它在创伤上的结构。不用皮肤移植,在第 5 天观察到使用该方法的完全的愈合。

#### 实施例24: UCMC用于部分皮层创伤治疗的临床应用

该实验表明了 UCMC 用于 2 岁男性患者的部分皮层创伤(2 度)治疗的临床应用。实验按实施例 23 中描述的进行(创伤准备和创伤敷料的准备,等)。在 Tegaderm<sup>®</sup>创伤敷料(3M 健康护理公司(3M Health Care), Minnesota, USA)上培养 UCMC 并将其转移到创伤上。

Tegaderm<sup>®</sup>创伤敷料是快速毛细作用、不膨胀的聚氨基甲酸酯泡沫,具有高透气性的薄膜背衬(film backing),其防止创伤渗出物透出并且是外界污染的屏障,而敷料保持完整不渗漏。创伤敷料由氨基甲酸乙酯薄膜背衬(5-10 wt.-%)、聚氨基甲酸酯泡沫(90-95 wt.-%)和少量墨(0.1-1 wt.-%)组成。

在第 3 天观察到部分皮层创伤的完全愈合(参见图 33)。图 33 中左侧的箭头指示区域 A,即用装有 UCMC 的 Tegaderm<sup>®</sup>创伤敷料治疗的创伤部分。右侧的箭头指示区域 B,即用常规方法治疗的创伤部分。

#### 实施例25: UCMC用于非愈合性辐射创伤治疗的临床应用

该实施例表明 UCMC 用于在 1 岁儿童中治疗非愈合性辐射创伤的临床应用,该儿童患有血管瘤。用常规创伤治疗,最初的创伤在超过 90 天的时期没有愈合。实验按实施例 23 中描述的进行。将 UCMC 按 100000 个

细胞/cm<sup>2</sup>的密度培养在 Tegaderm<sup>®</sup> 创伤敷料上,并每周两次转移到创伤上。如图 35 中可见,经过 20 多天的 UCMC 细胞疗法的时期辐射创伤完全愈合。

#### 实施例26: UCMC用于非愈合性糖尿病创伤和非愈合性糖尿病食物创伤治疗的临床应用

这些实施例表明 UCMC 用于治疗非愈合性糖尿病创伤(图 36)、非愈合性糖尿病食物创伤(图 37B)和失败的皮瓣供体位置创伤(图 37A)的临床应用。后两者在为期 6 年多的常规治疗下愈合失败。

按实施例 23 中描述培养 UCMC,并与 SoloSite<sup>®</sup>凝胶(施乐辉公司 (Smith&Nephew), Hull, UK)混合。UCMC/SoloSite<sup>®</sup>凝胶混合物按 1 百万个细胞/cm<sup>2</sup>的密度糊在创伤上。每周一次进行对创伤的应用。在第 26 天观察到非愈合性糖尿病创伤的完全愈合(图 36),而在非愈合性糖尿病食物创伤(图 37B)和失败的皮瓣供体位置创伤(图 37A)的情况下,可以观察到创伤愈合的过程。

#### 实施例27: UCEC直接分化为肝细胞

按实施例 2 中描述的分离脐带羊膜的上皮干/祖细胞(UCEC)。为了 UCEC 分化为肝细胞,将细胞暴露在含有制瘤素-M(50µg/ml)的 BBRC06H 培养基中(BBRC06H 培养基是按实施例 15 中描述的 BBRC06 的修饰版本,没有添加烟酰胺并添加了 50µg/ml 的制瘤素-M)。

图 38 显示了在用含有制瘤素-M(50µg/ml)的 BBRC06H 培养基诱导后, UCEC 的清蛋白表达。甲胎蛋白是肝干/祖细胞的干细胞标志。当用诱导培养基诱导时, UCEC 分化为生产更多清蛋白的成熟肝细胞。微管蛋白是管家基因,用于显示 Western 印迹测定中的等量上样。该实验显示, UCEC 具有分化为肝细胞的潜力,其可用于肝病治疗或测试新药细胞毒性的体外模型。

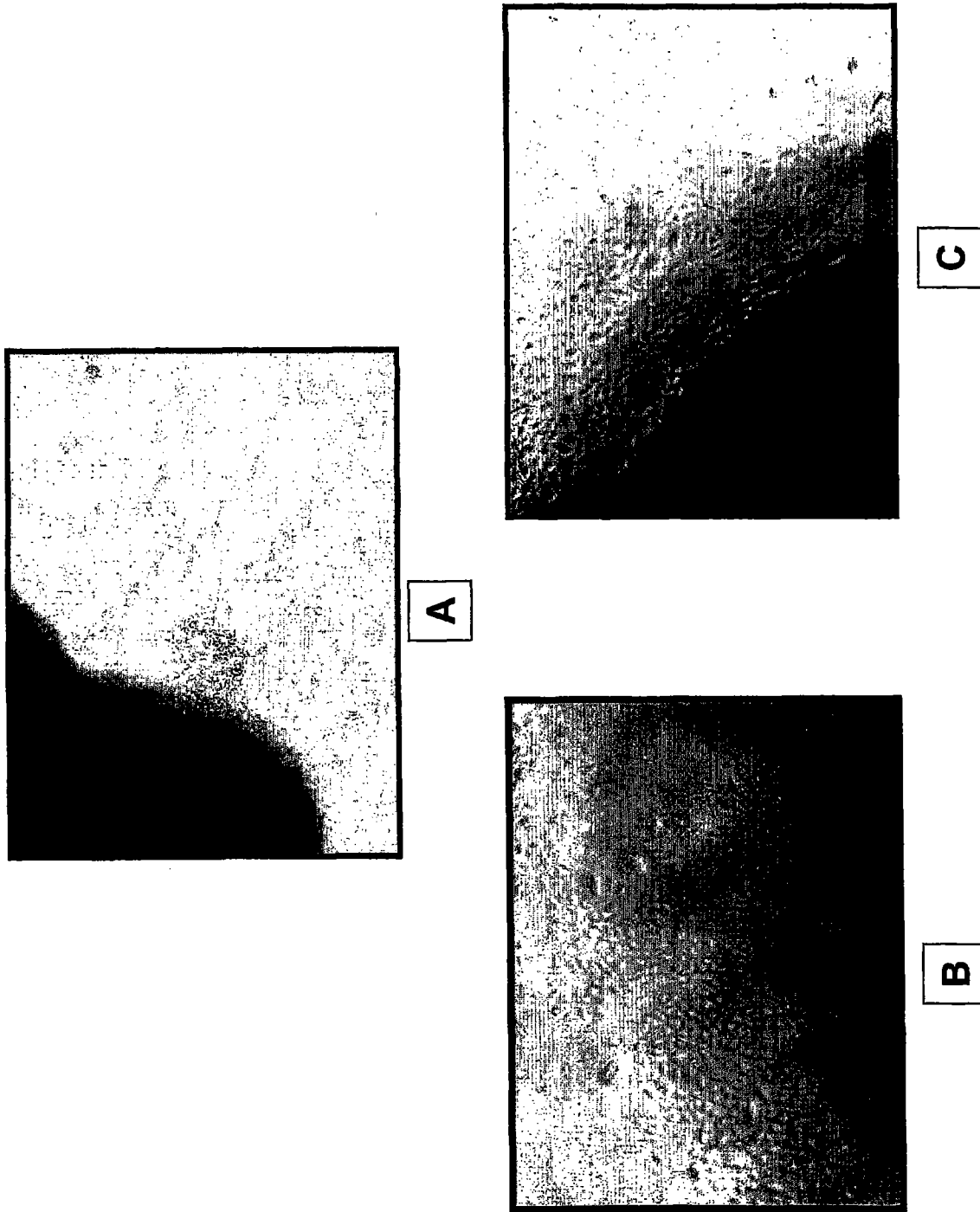


图 1

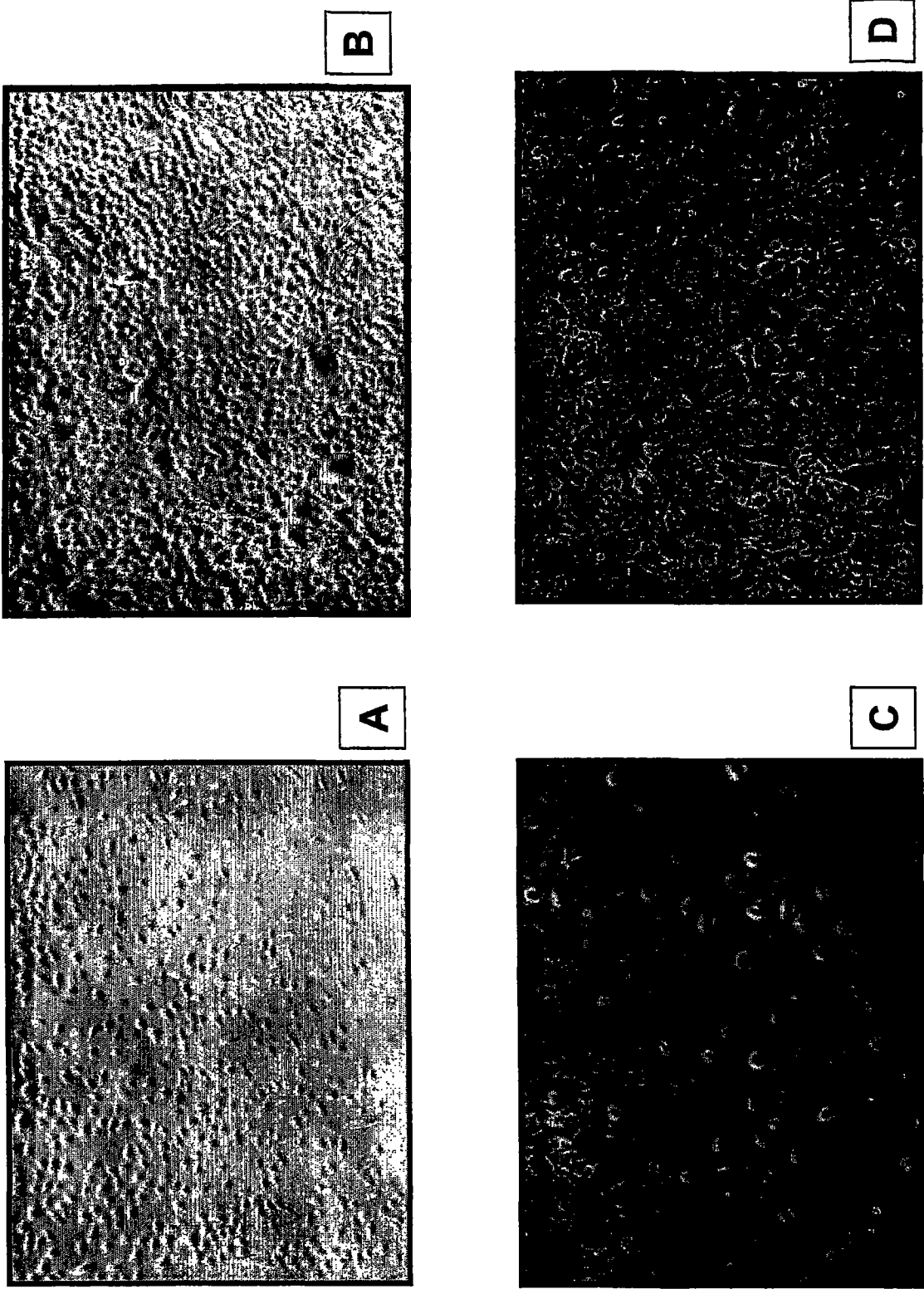


图 2

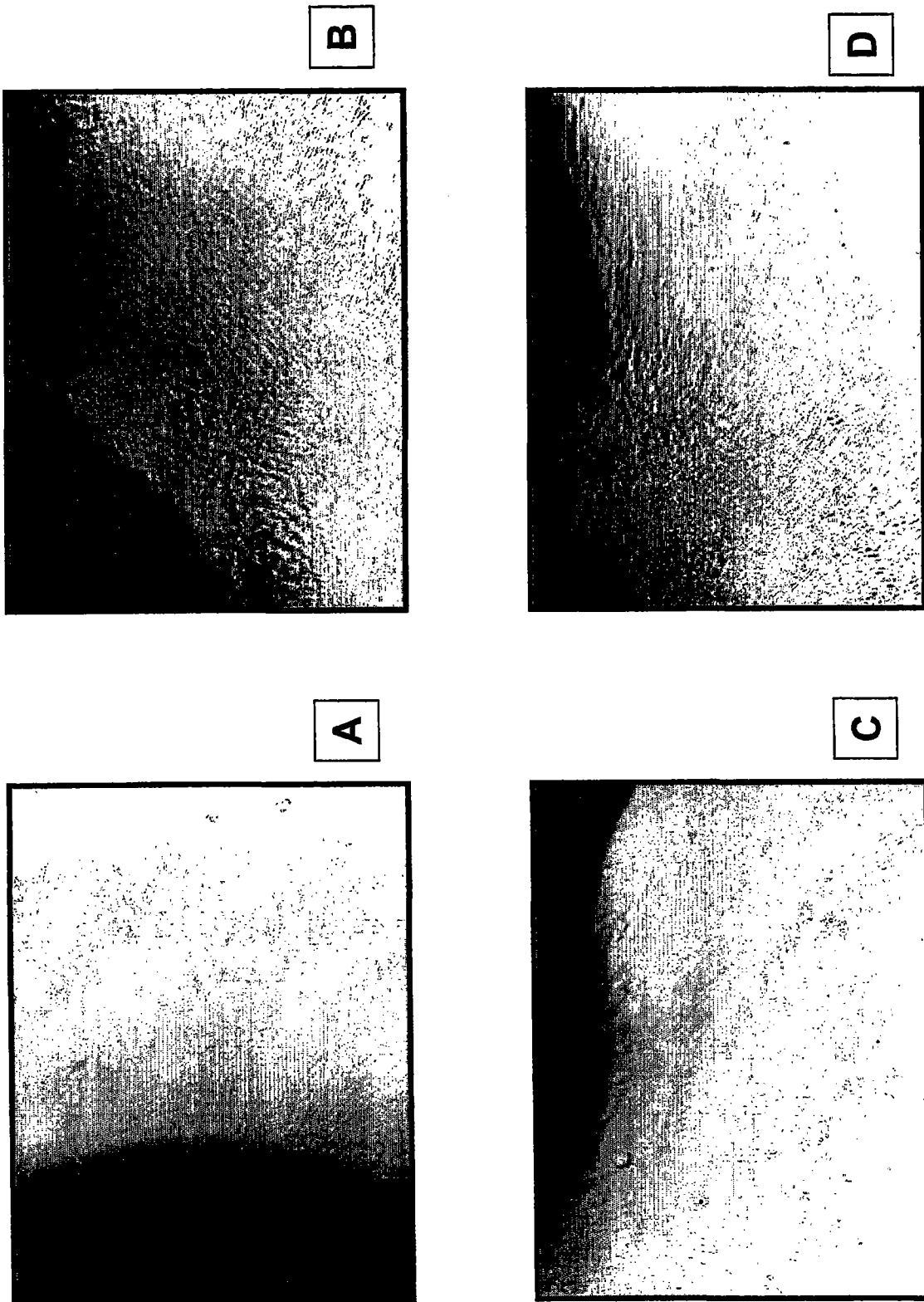
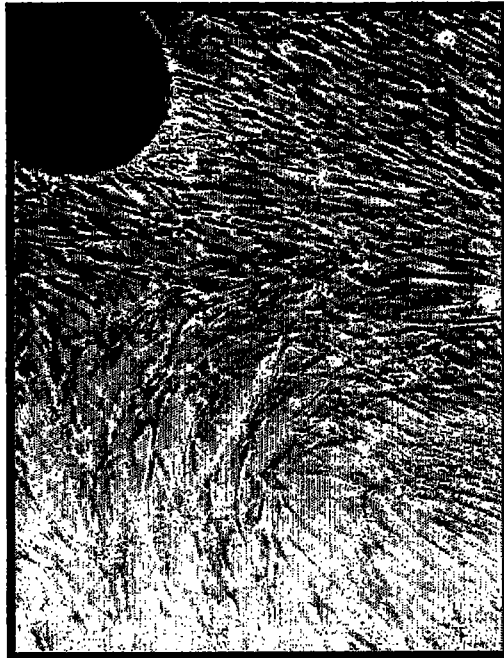


图 3



B



A

图 4



图 5: 正常真皮成纤维细胞 (NF) 和脂肪衍生的间充质细胞 (ADMC) 或脐带间充质干细胞 (UCMC) 在无血清培养基 (DMEM) 和有血清培养基 (DMEM/10%FCS) 中的形态

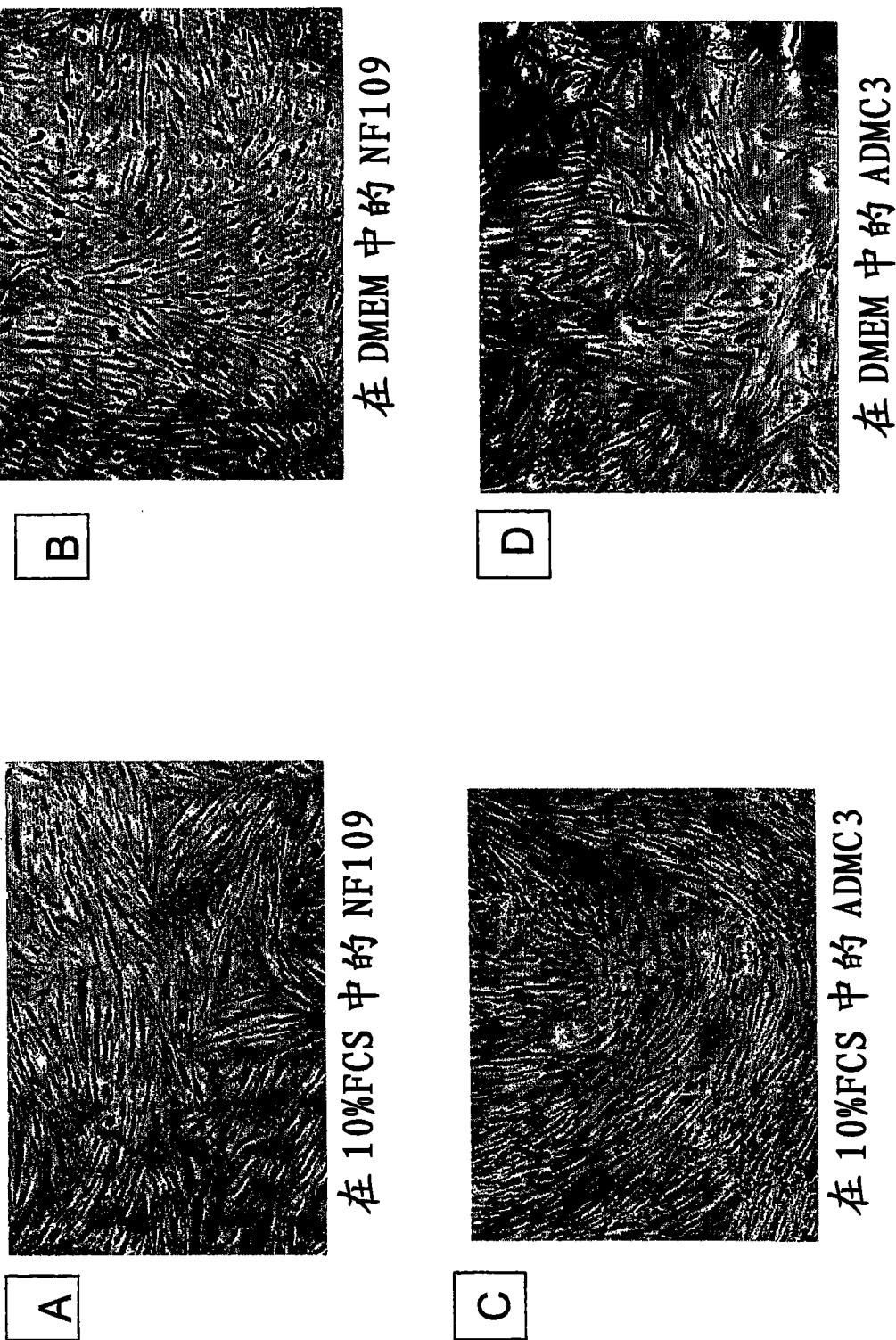
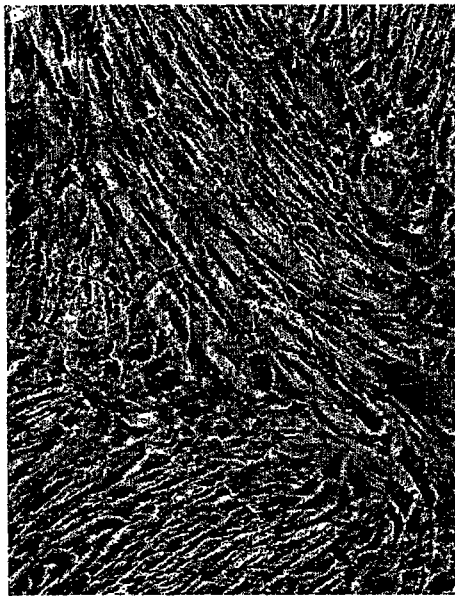


图 5 (续上页)



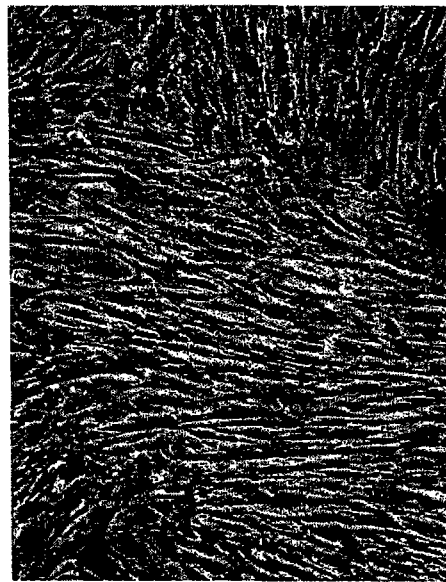
E

在 DMEM/10%FCS 中的 UCMC3



F

在 DMEM 中的 UCMC3



G

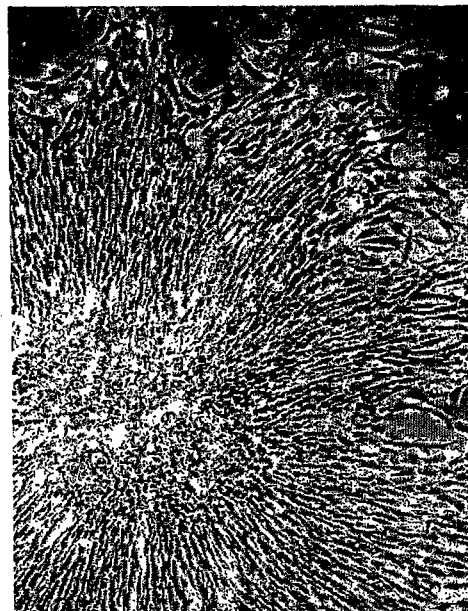
在 DMEM/10%FCS 中的 UCMC4



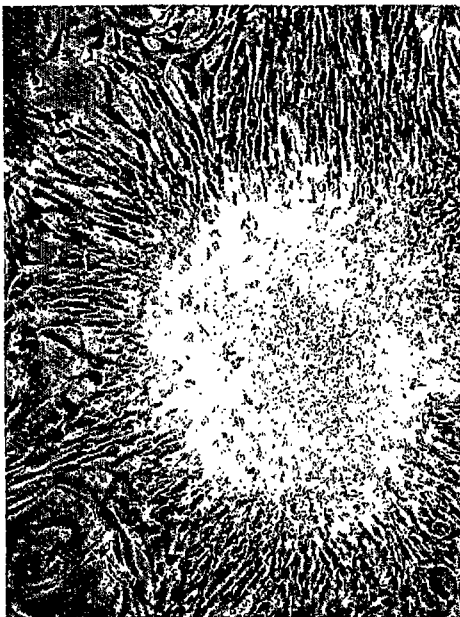
H

在 DMEM 中的 UCMC4

图 6: 在无饲养层条件下于 DMEM/10%FCS 中培养的  
脐带间充质干细胞的集落形成

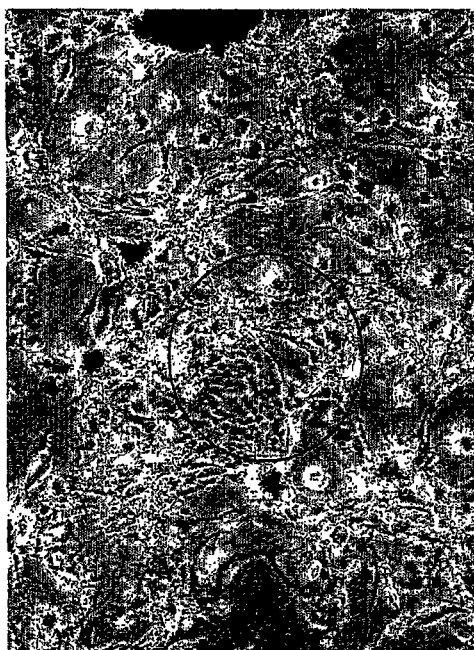


第 3 天

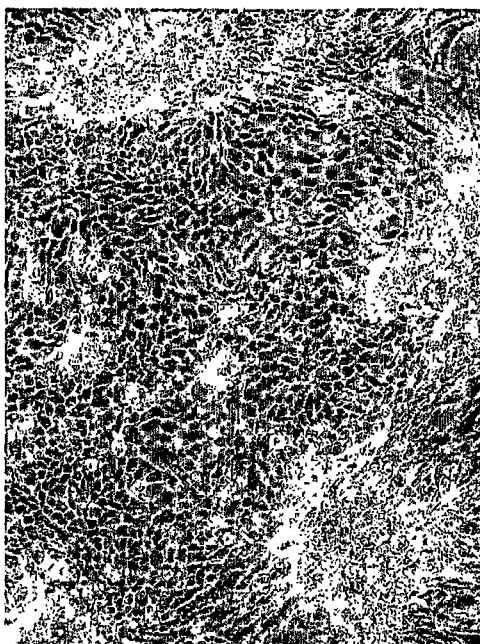


第 7 天

图7: 在有饲养层条件下于Green培养基中培养的  
脐带上皮干细胞的集落形成

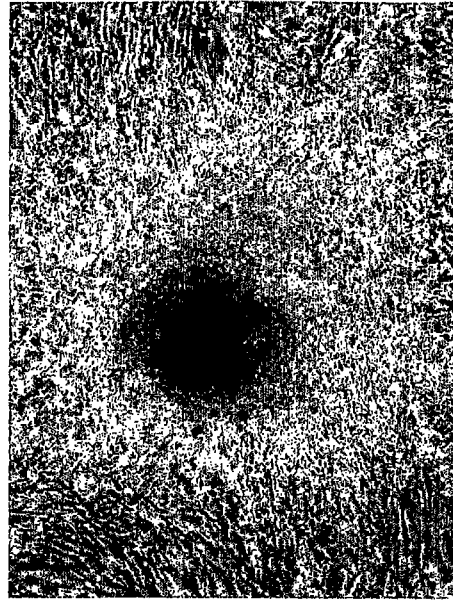


第3天

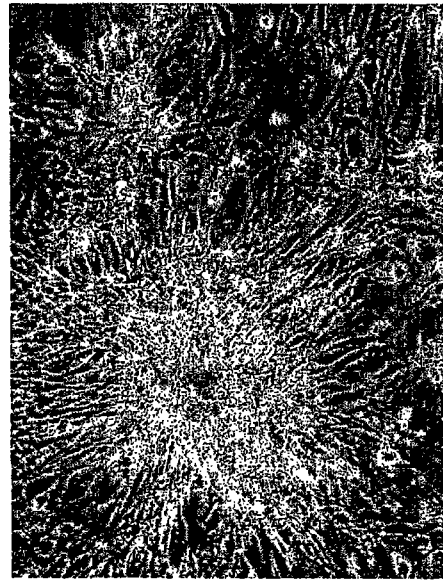
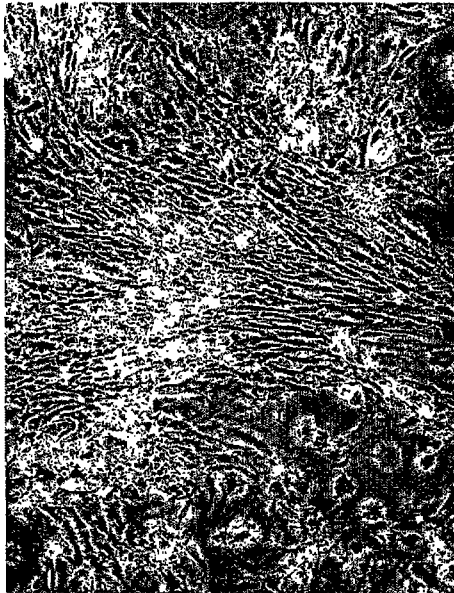


第7天

图 8-1: 在有饲养层条件下于 Green 培养基中培养的  
脐带间充质干细胞的集落形成



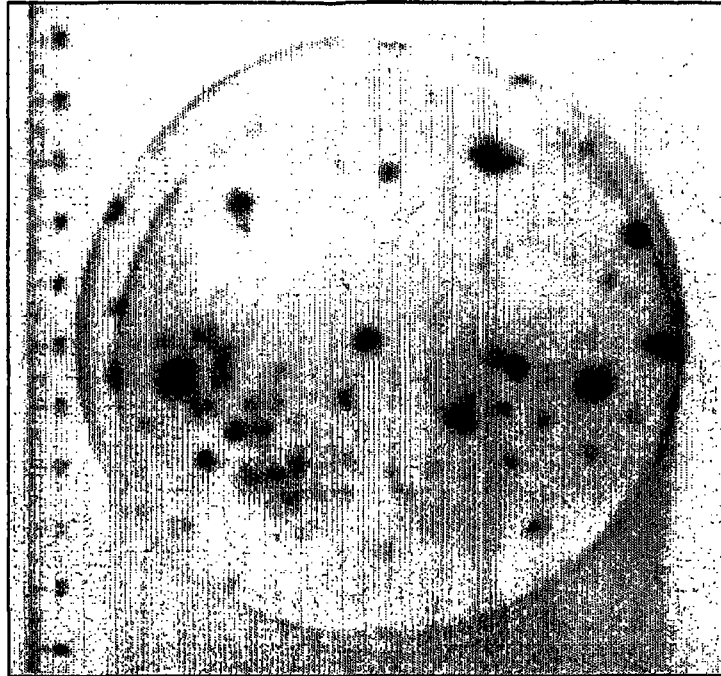
第 7 天



第 3 天

图 8-2: 脐带间充质干细胞的集落形成效率

UCMC-17



UCMC-16

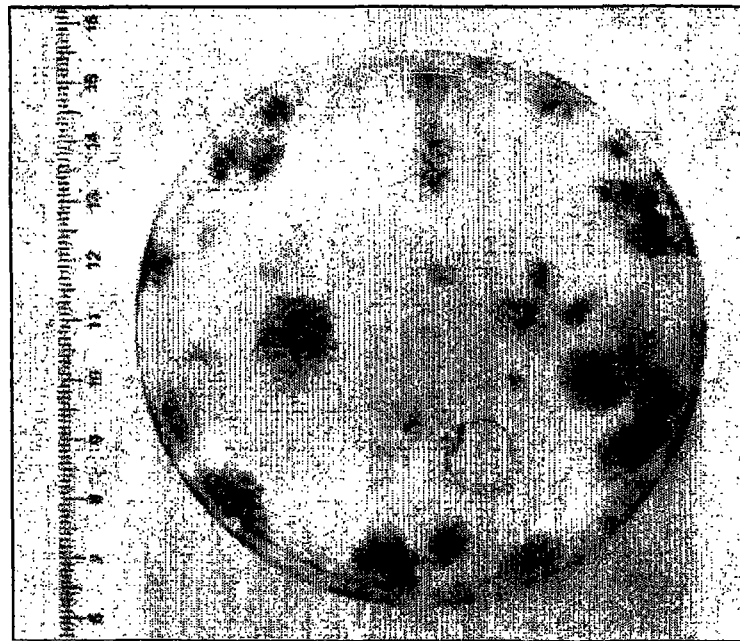


图 9-1: Oct-4 在脐带上皮细胞和间充质细胞中的表达

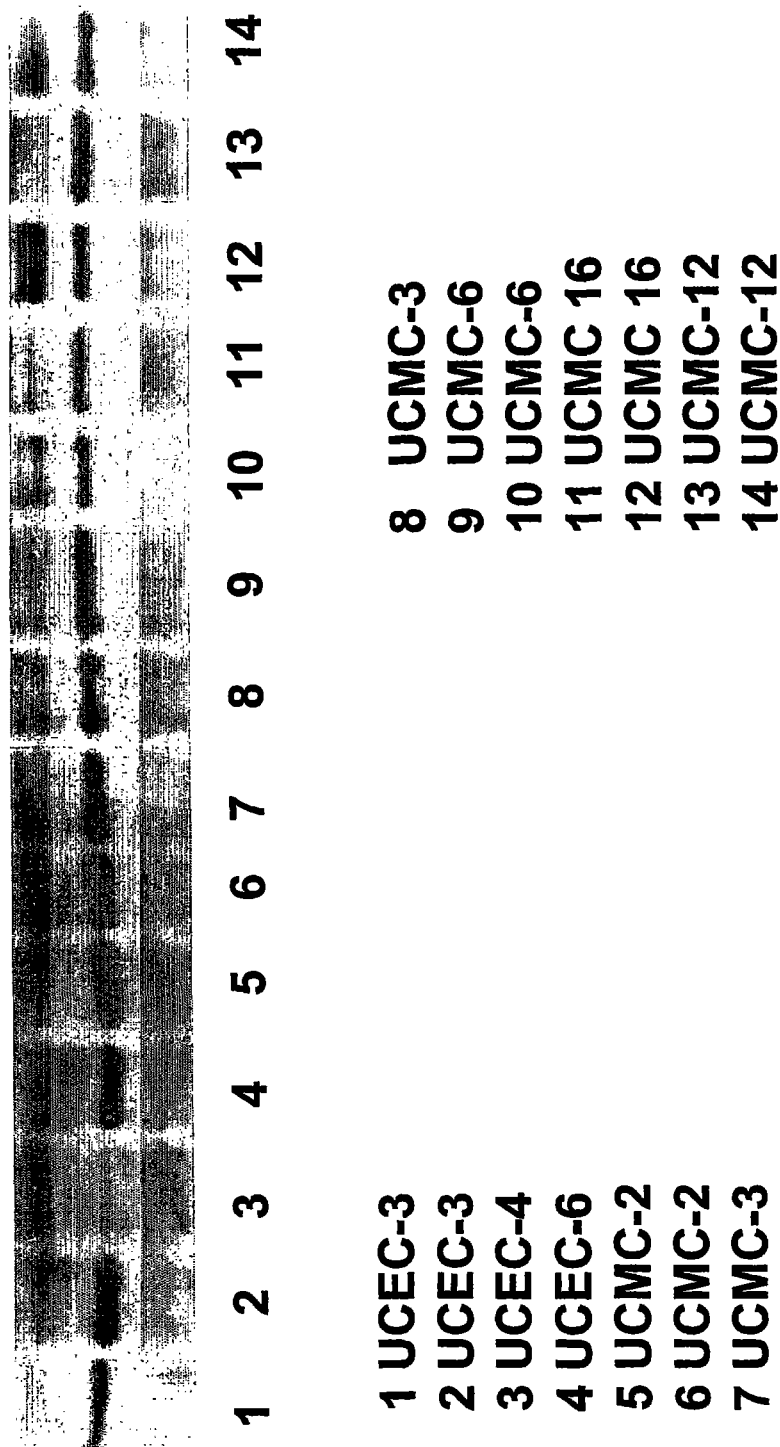


图 9.1a: 在 UCMC 集落中 Oct-4 表达 (#5 皿是阴性染色)

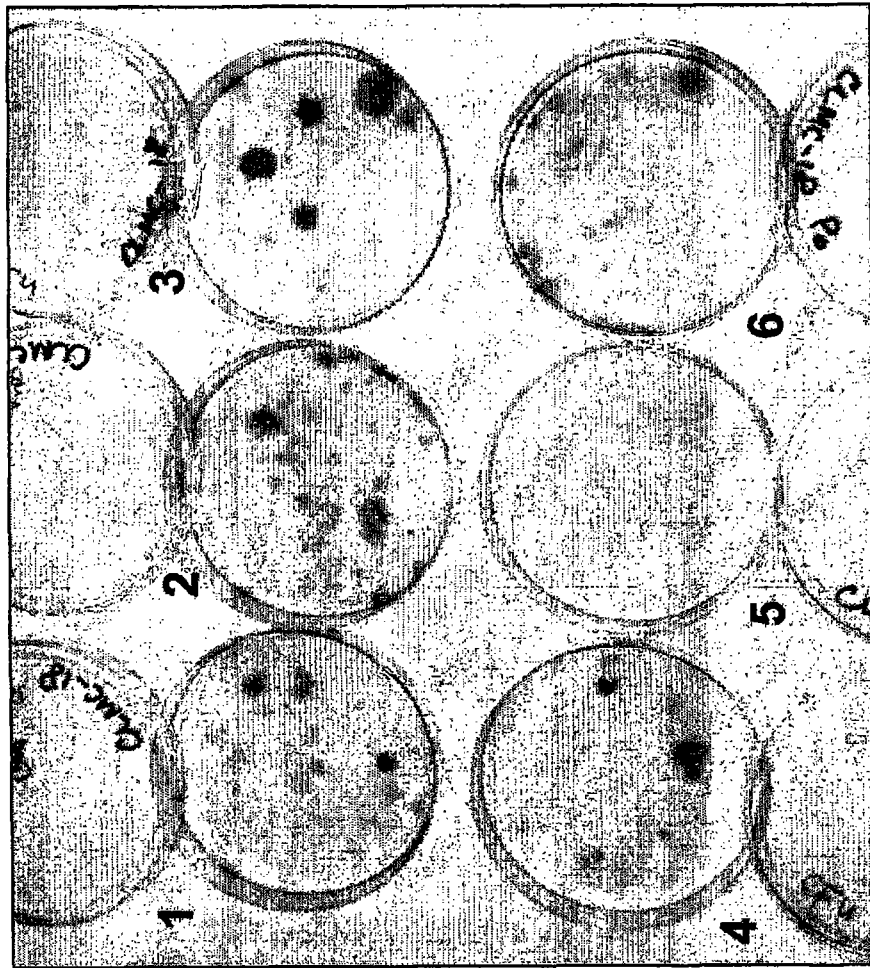
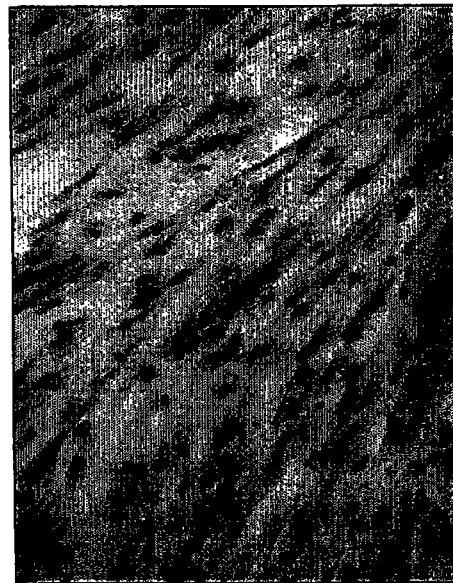




图 9.1b: 在 UCMC 细胞中的 Oct-4 表达



40X 放大



10X 放大

图 9-2: STAT3 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

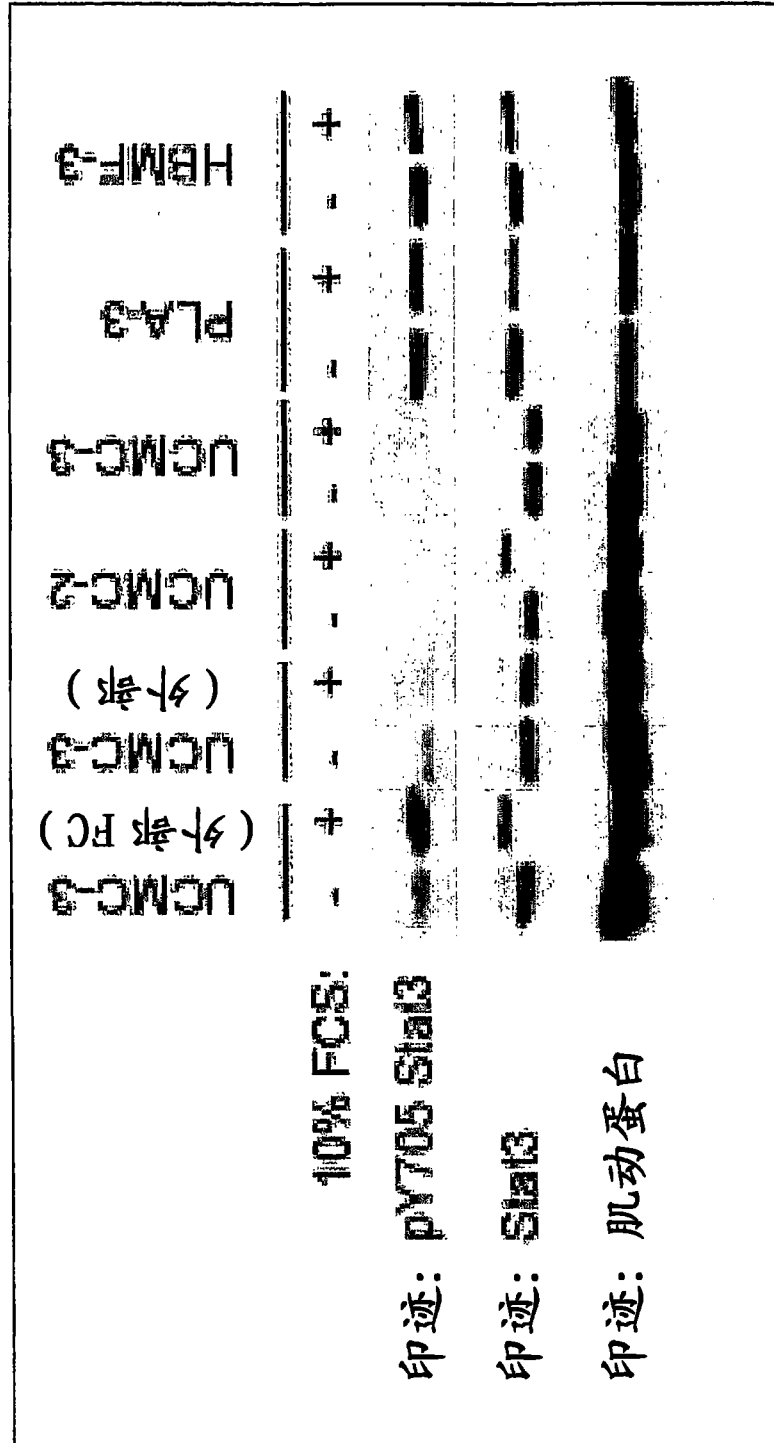


图 9-2: STAT3 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

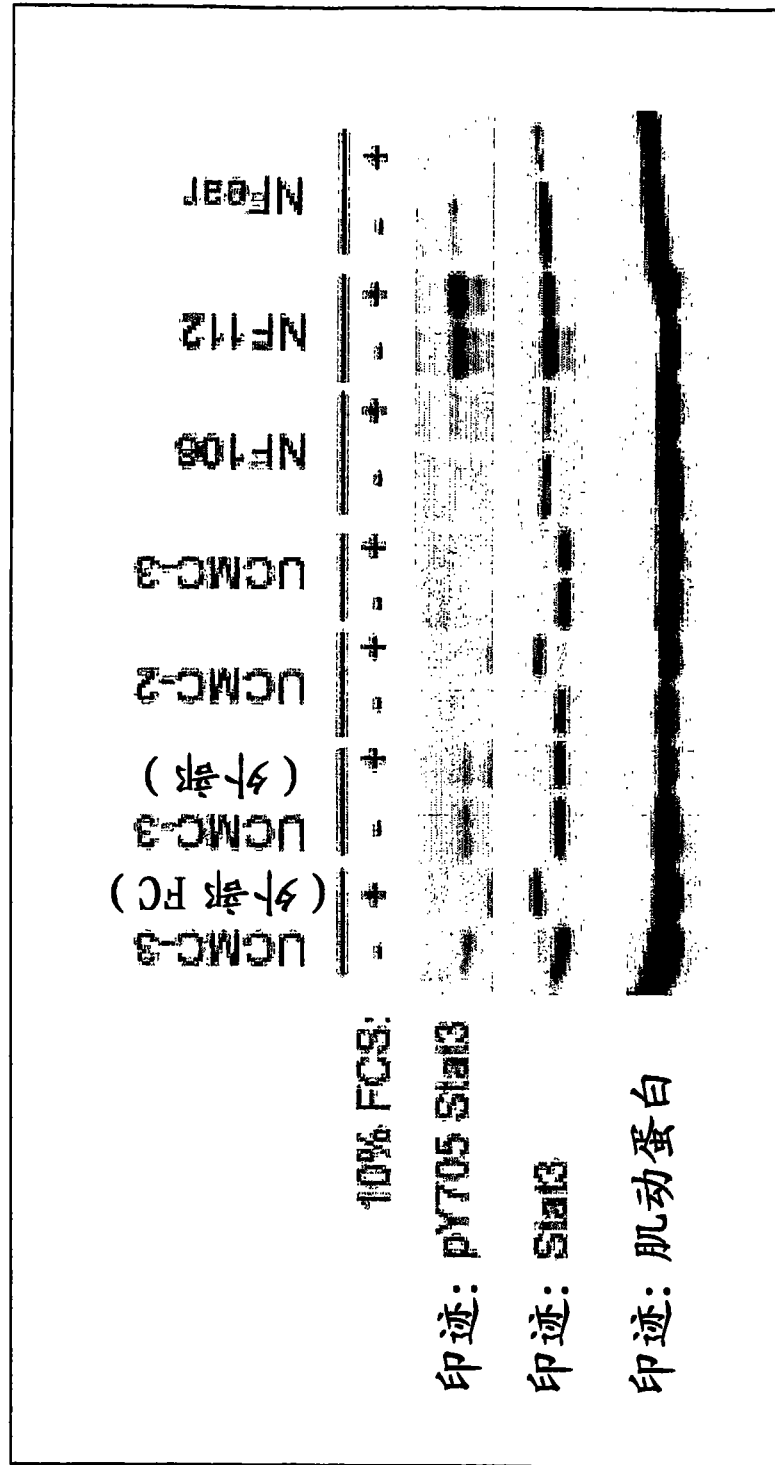
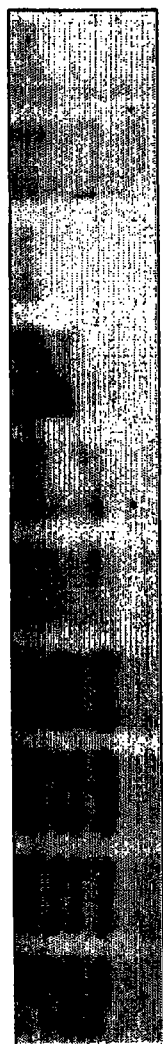


图 9-4: 胎盘生长因子 (PLGF)  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1 UCMC-3  
2 UCMC-3  
3 UCMC-4  
4 UCMC-4

5 hBMSC-1  
6 hBMSC-1  
7 ADMC  
8 ADMC  
9 hBMSC-3  
10 hBMSC-3

图 9-5: 胎盘生长因子 (PLGF)  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

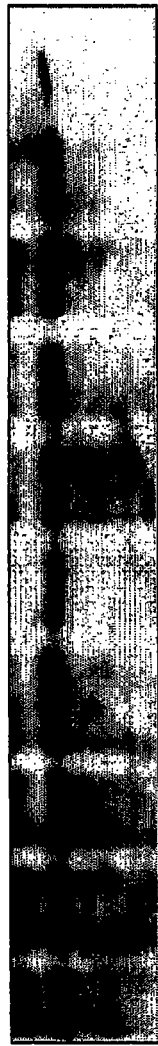


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

1 UCMC-3  
2 UCMC-3  
3 UCMC-2  
4 UCMC-2  
5 UCMC-3  
6 UCMC-3

7 UCMC-4  
8 UCMC-4  
9 NF 111  
10 NF 111  
11 NF 113  
12 NF 113

图 9-6: 结缔组织生长因子 (CTGF)  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1 UCMC-3  
2 UCMC-3  
3 UCMC-4  
4 UCMC-4

5 NF 106  
6 NF 106  
7 NF 112  
8 NF 112  
9 NF 101  
10 NF 101

图 9-7: 结缔组织生长因子 (CTGF)  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

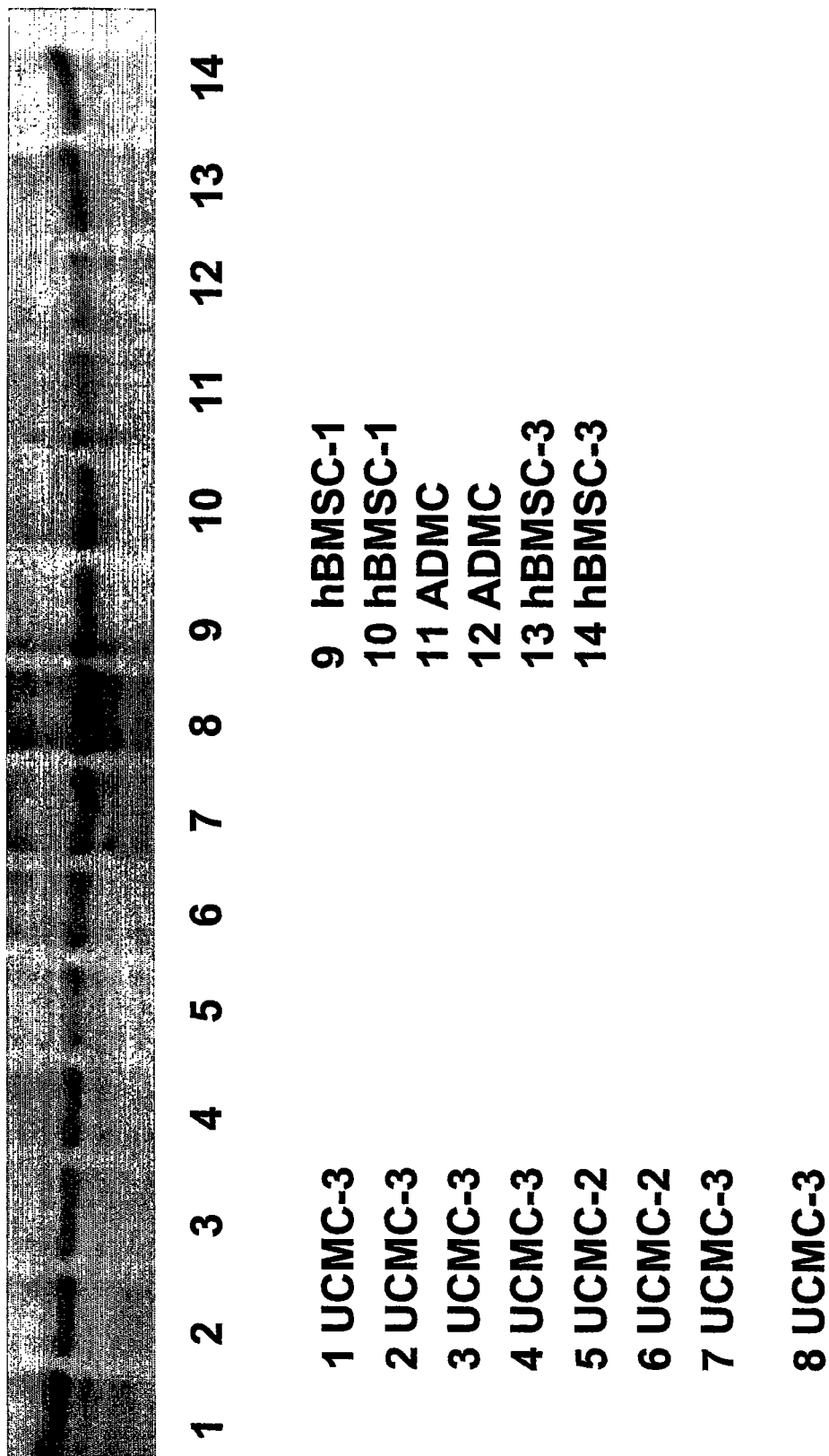


图 9-8: 血小板衍生生长因子 (PDGF) 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

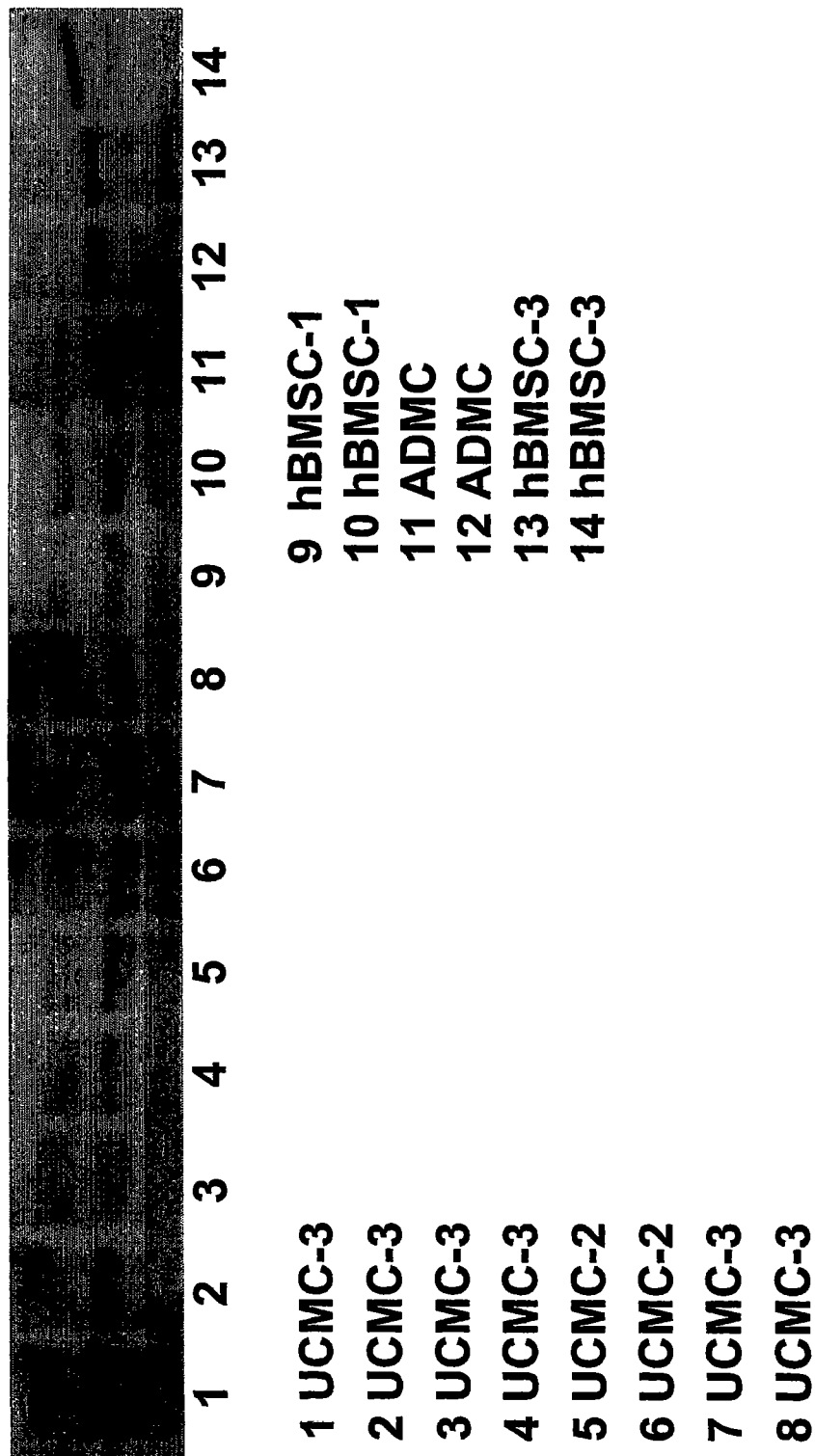




图 9-9: 血小板衍生生长因子 (PDGF) 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

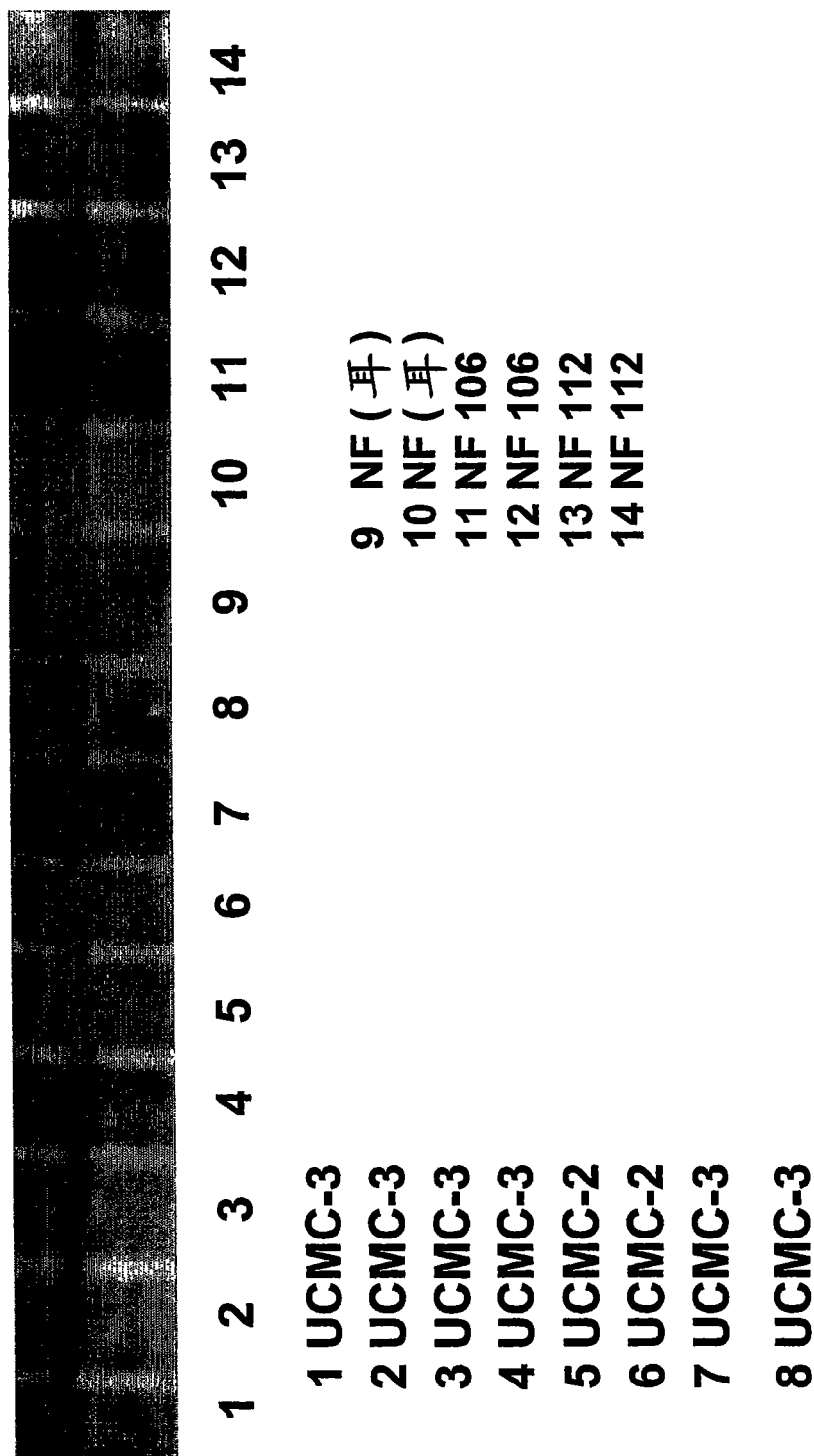


图 9-10: 血管内皮生长因子 (VEGF)  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

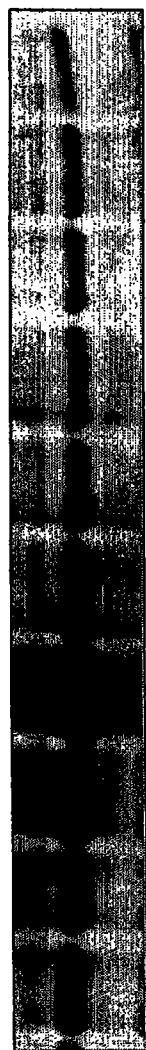


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

1 UCMC-3  
2 UCMC-3  
3 UCMC-2  
4 UCMC-2  
5 UCMC-3  
6 UCMC-3

7 NF (耳)  
8 NF (耳)  
9 NF 106  
10 NF 106  
11 NF 112  
12 NF 112

图 9-11: 血管内皮生长因子 (VEGF) 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1 UCMC-3  
2 UCMC-3  
3 UCMC-4  
4 UCMC-4

5 hBMSC-1  
6 hBMSC-1  
7 ADMC  
8 ADMC  
9 hBMSC-3  
10 hBMSC-3

图 9-12: 成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2)  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

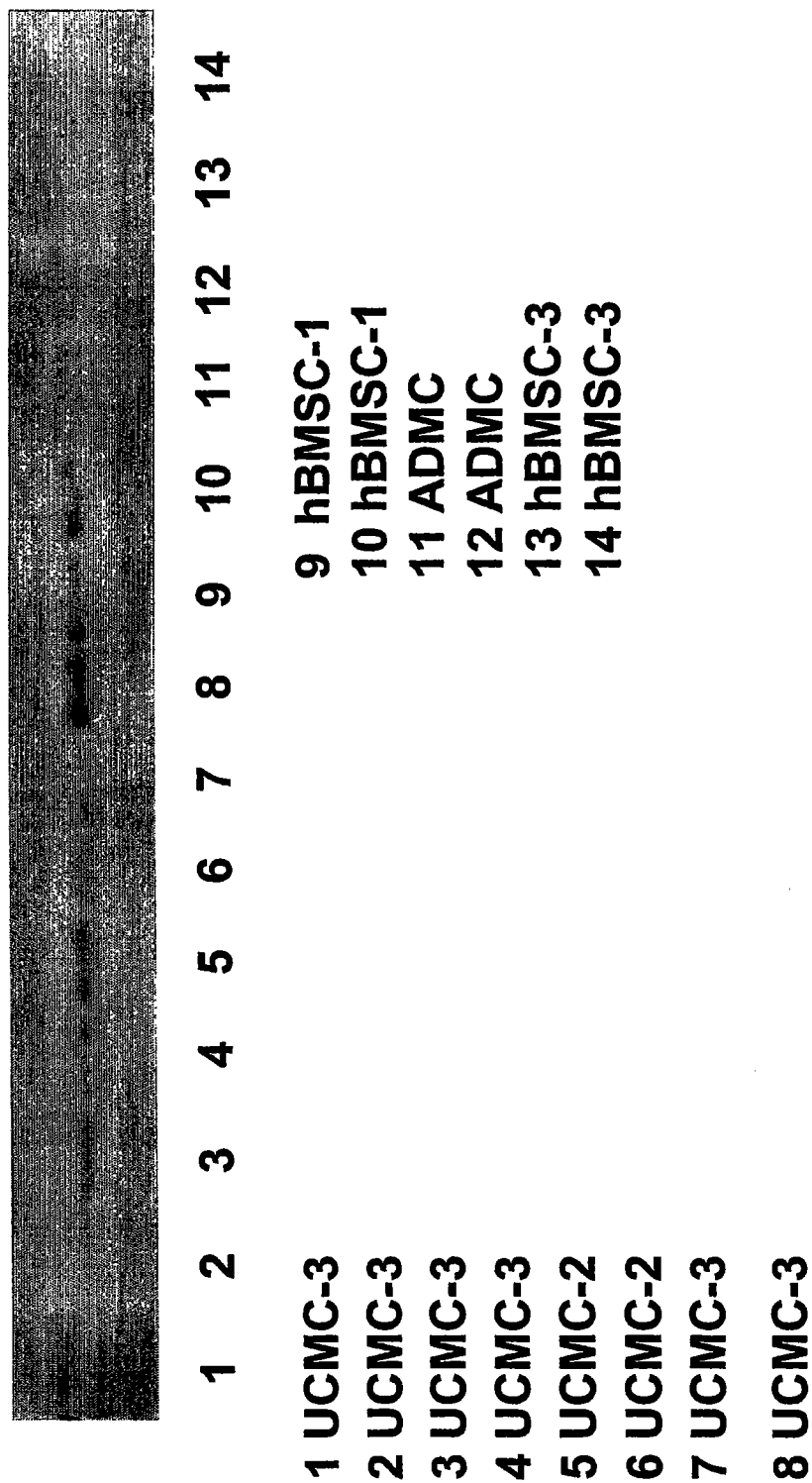
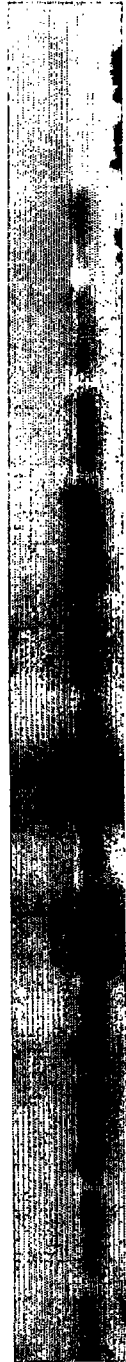


图 9-13: 成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2) 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

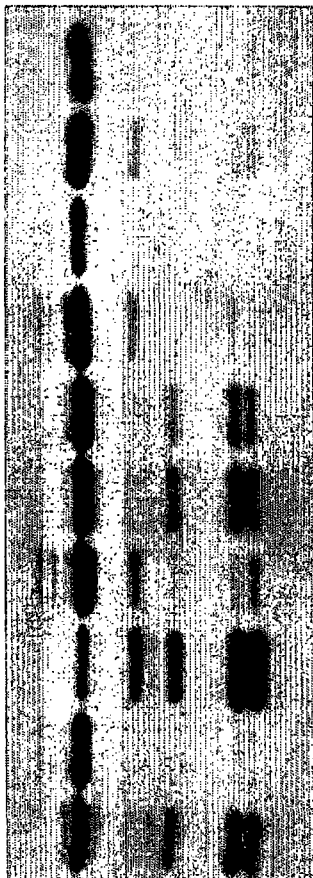


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

1 UCMC-3  
 2 UCMC-3  
 3 UCMC-3  
 4 UCMC-3  
 5 UCMC-2  
 6 UCMC-2  
 7 UCMC-3  
 8 UCMC-3

9 NF (耳(ear))  
 10 NF (耳)  
 11 NF 106  
 12 NF 106  
 13 NF 112  
 14 NF 112

图 9-14: 肝癌衍生生长因子 (HDGF) 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

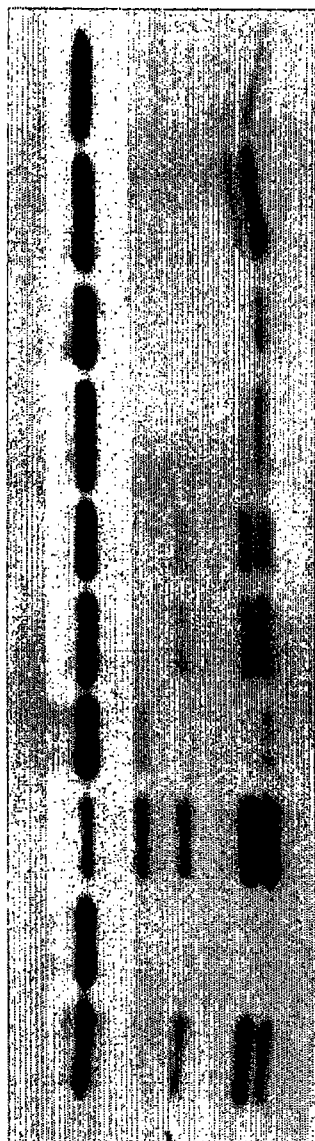


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1: UCMC-3  
2: UCMC-3  
3: UCMC-2  
4: UCMC-2  
5: UCMC-3  
6: UCMC-3

7: ADMC-3  
8: ADMC-3  
9: hBMSC-3  
10: hBMSC-3

图 9-15: 肝癌衍生生长因子 (HDGF)  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

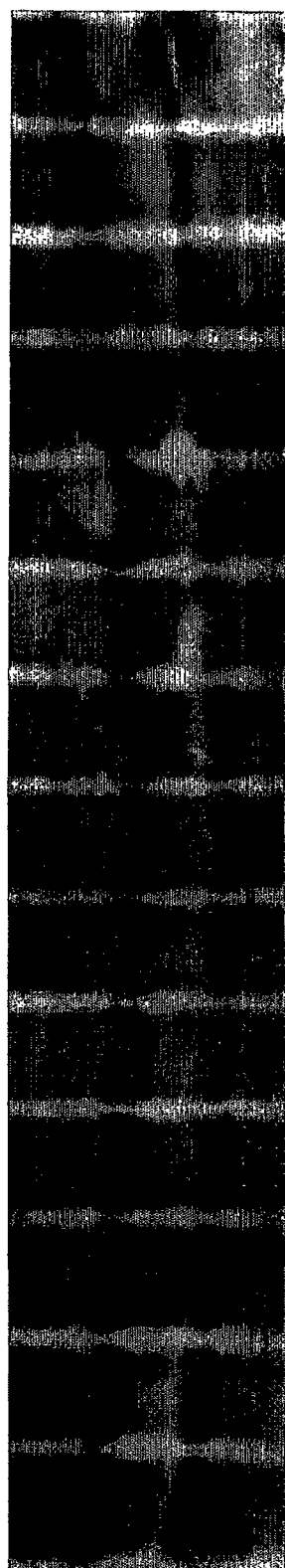


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1: UCMC-3  
2: UCMC-3  
3: UCMC-2  
4: UCMC-2  
5: UCMC-3  
6: UCMC-3

7: NF-111  
8: NF-111  
9: NF-105  
10: NF-105

图 9-16: 干细胞生长因子 (SCF) 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

1 UCMC-3

2 UCMC-3

3 UCMC-3

4 UCMC-3

5 UCMC-2

6 UCMC-2

7 UCMC-3

8 UCMC-3

9 hBMSC-1

10 hBMSC-1

11 ADMC

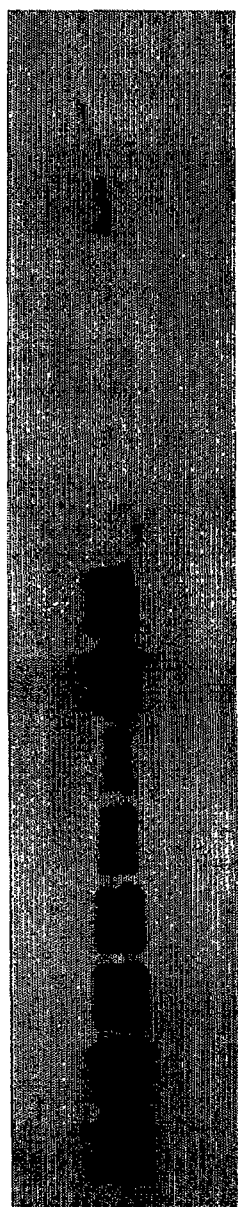
12 ADMC

13 hBMSC-3

14 hBMSC-3



图 9-17:  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

1. UCMC4

2. UCMC4

3. UCMC7

4. UCMC7

5. CBMC4

6. CBMC4

7. CBMC12

8. CBMC12

9. UCEC10

10. NK(ar)

11. NF 混合

12. NF 混合

13. NF6

14. NF6

图 9-18: 纤连蛋白在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

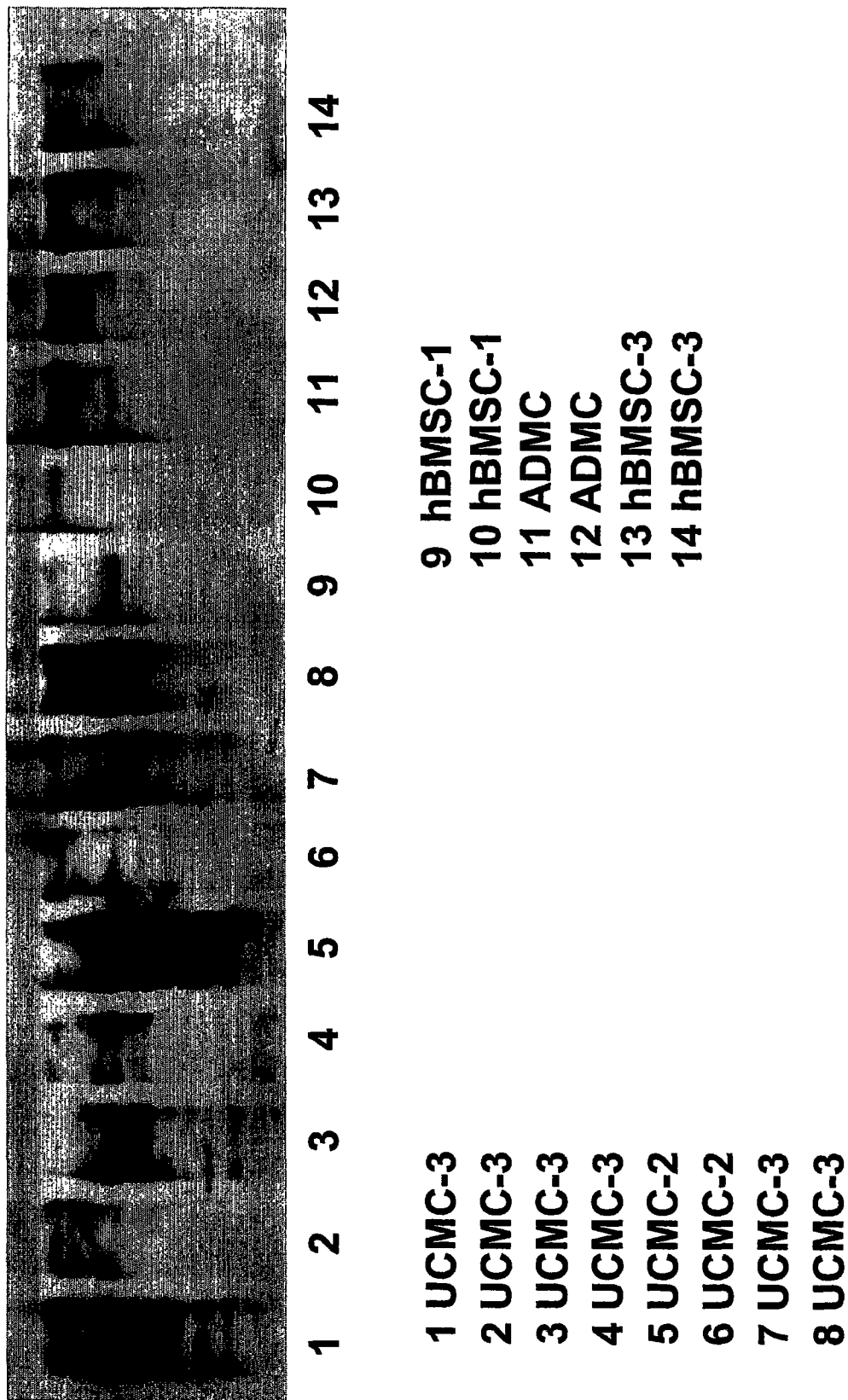
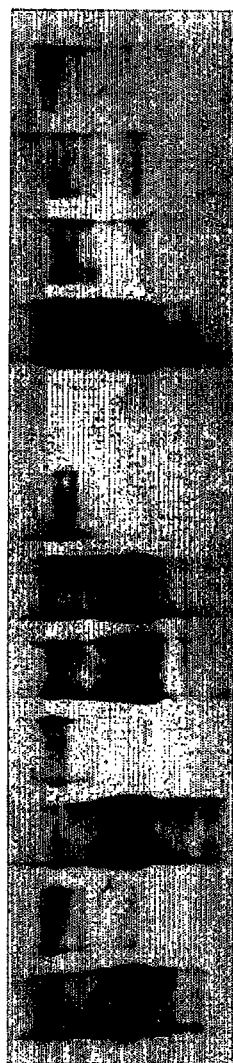


图 9-19: 纤连蛋白  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

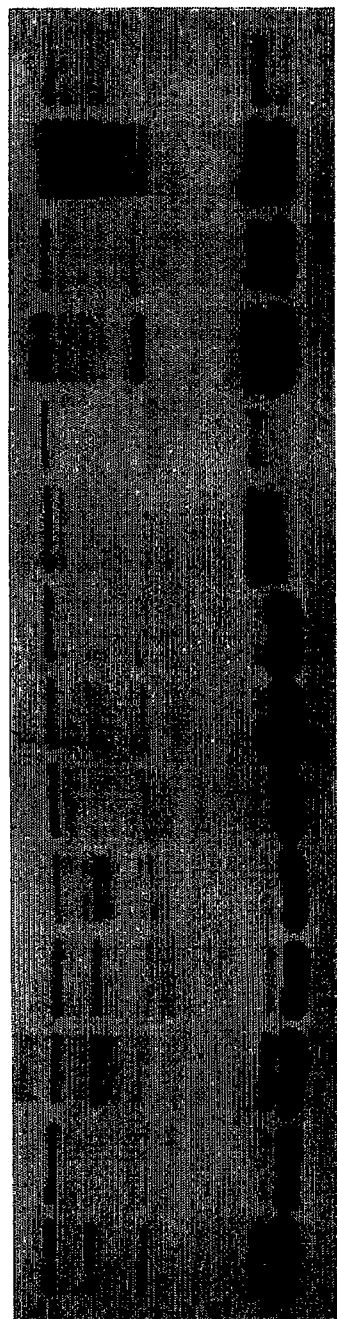


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

1 UCMC-3  
2 UCMC-3  
3 UCMC-2  
4 UCMC-2  
5 UCMC-3  
6 UCMC-3

7 NF (耳)  
8 NF (耳)  
9 NF 106  
10 NF 106  
11 NF 112  
12 NF 112

图 9-20: 饰胶蛋白聚糖在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

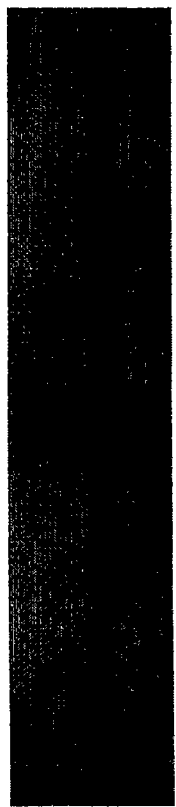


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

1 UCMC-3  
2 UCMC-3  
3 UCMC-3  
4 UCMC-3  
5 UCMC-2  
6 UCMC-2  
7 UCMC-3  
8 UCMC-3

9 NF (耳)  
10 NF (耳)  
11 NF 106  
12 NF 106  
13 NF 112  
14 NF 112

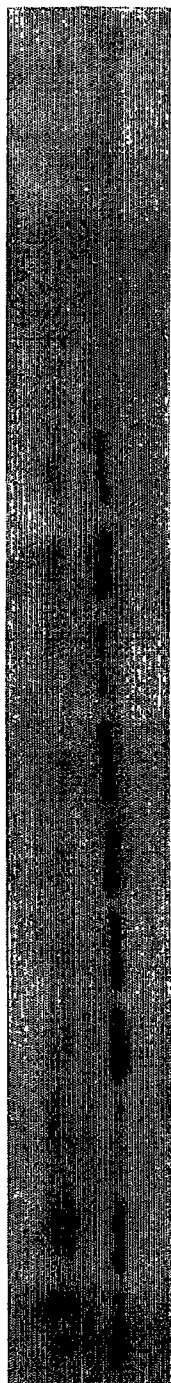
图 9-21: 黏结蛋白聚糖-1  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达



1 2 3 4 5 6

1 UCMC-3  
2 UCMC-3  
3 UCMC-3  
4 UCMC-3  
5 UCMC-2  
6 UCMC-2

图 9-22: 黏结蛋白聚糖-2 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

1 UCMC-1  
2 UCMC-1  
3 UCMC-3  
4 UCMC-3  
5 UCMC-2  
6 UCMC-2  
7 UCMC-4  
8 UCMC-4

9 UCMC-5  
10 UCMC-5  
11 NF 106  
12 NF 106  
13 NF 112  
14 NF 112

图 9-23: 黏结蛋白聚糖-2  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

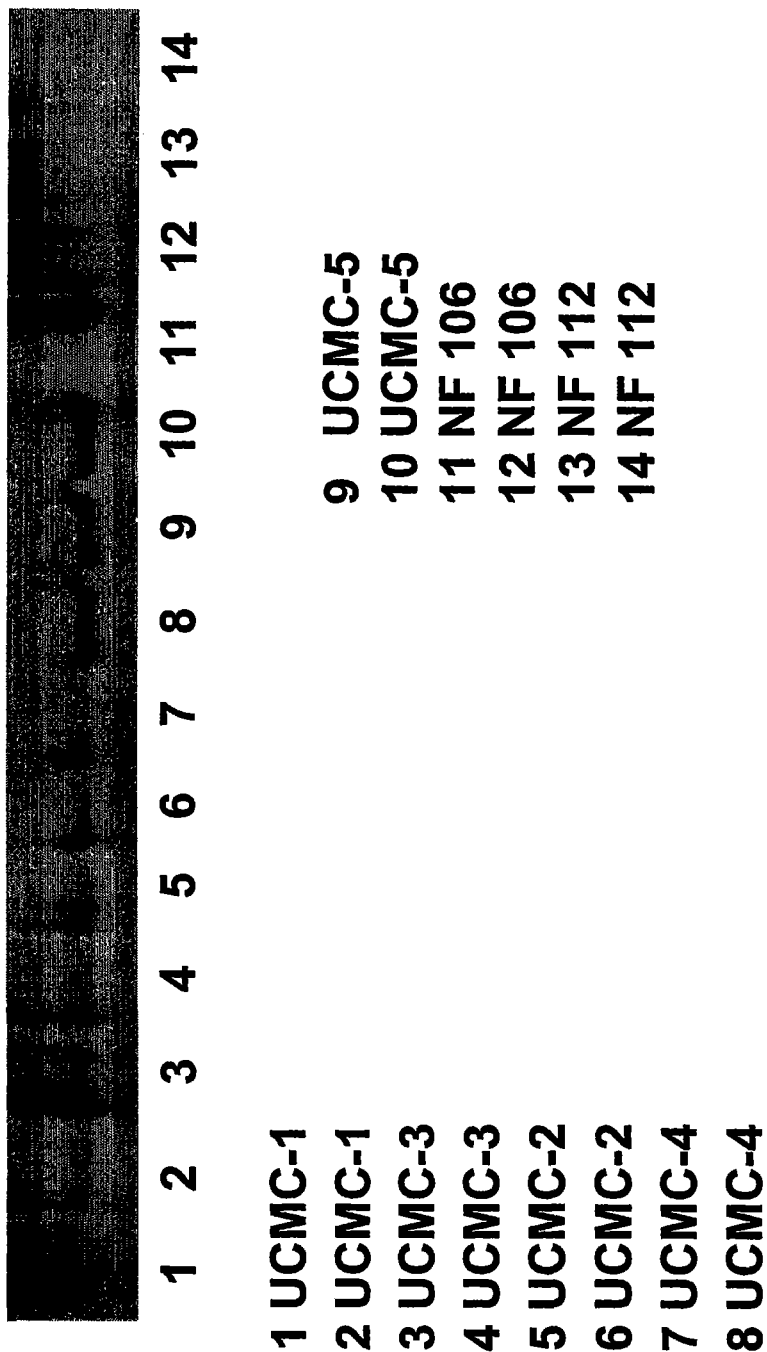
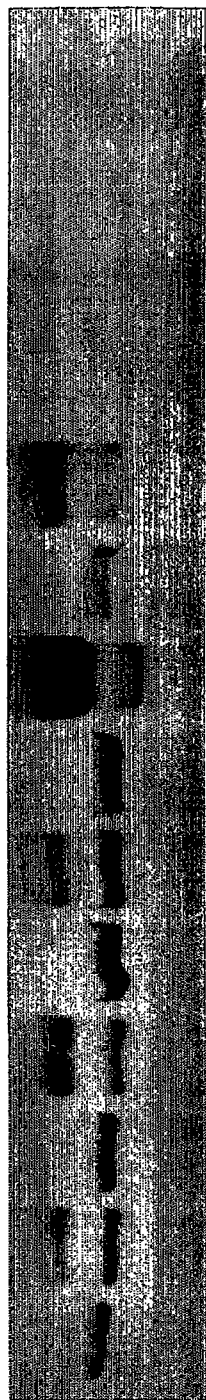


图 9-24: 黏结蛋白聚糖-3 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

1 UCMC-3  
2 UCMC-3  
3 UCMC-3  
4 UCMC-3  
5 UCMC-2  
6 UCMC-2  
7 UCMC-3  
8 UCMC-3

9 hBMSC-1  
10 hBMSC-1  
11 ADCM  
12 ADCM  
13 hBMSC-3  
14 hBMSC-3



图 9-25: 黏结蛋白聚糖-3 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达

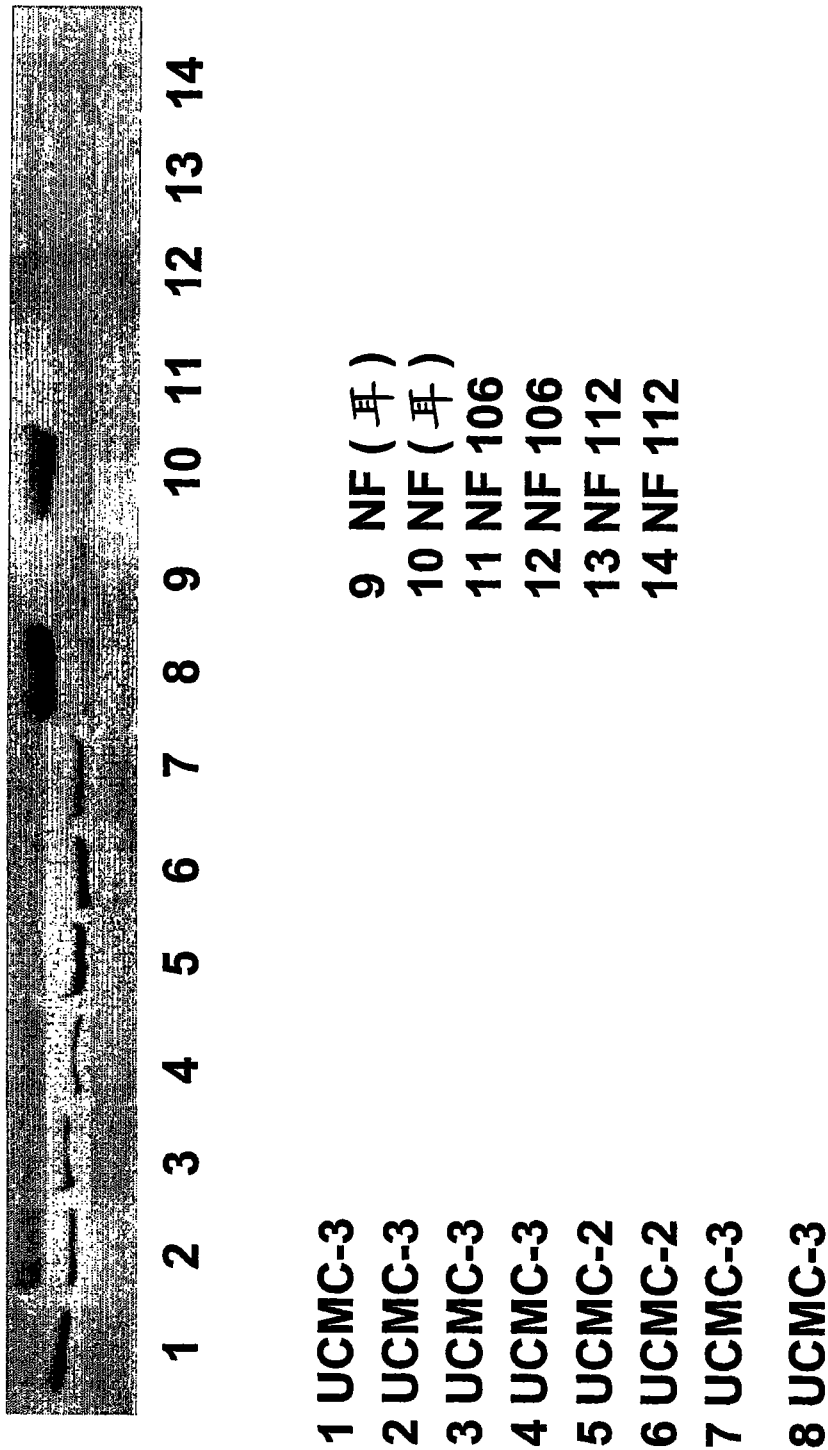


图 9-26: 黏结蛋白聚糖-4  
在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中的表达



1 UCMC-1  
2 UCMC-1  
3 UCMC-3  
4 UCMC-3  
5 UCMC-2  
6 UCMC-2  
7 UCMC-4  
8 UCMC-4

9 UCMC-5  
10 UCMC-5  
11 NF 106  
12 NF 106  
13 NF 112  
14 NF 112

图 9-27: 干细胞标志物 Bmi-1 在脐带间充质干细胞和上皮干细胞中的表达



- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9

- 1. UCMC-3,
- 2. UCMC-16
- 3. UCMC-15
- 4. UCMC-14
- 5. UCMC-17
- 6. UCMC-10

- 7. NF2
- 8. hBMSC-3
- 9. hBMSC-2

图 9-28: 白血病抑制因子 (LIF) 在脐带间充质干细胞和上皮干细胞中的表达



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

- 1. UCMC-14,
- 2. UCMC-14
- 3. UCMC-15
- 4. UCMC-15
- 5. UCEC-10

- 6. NK-耳
- 7. NF-混合
- 8. NF-混合
- 9. NF-6
- 10. NF-6

图 9-29: 由脐带间充质干细胞和上皮干细胞 (细胞培养条件培养基) 的  
白血病抑制因子 (LIF) 的分泌



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

A道: 来自从脐带羊膜  
分离的干细胞的  
条件培养基

1. UCMC-14,
2. UCMC-14
3. UCMC-15
4. UCMC-15
5. UCEC-10
6. UCMC-16
7. UCMC-17
8. UCEC-17
9. UCEC- 12
10. UCMC-12

B道: 真皮成纤维细胞  
不分泌 LIF

图9-30: 与骨髓 (hBMF-3)、脂肪衍生的干细胞 (hMBSC-3)、人真皮成纤维细胞 (NF) 和表皮角质形成细胞 (NK) 相比, 在脐带间充质干细胞 (UCEC) 和上皮干细胞 (UCMC) 中的高分泌性激活蛋白 A 和促滤泡素抑制素

	激活蛋白 A (ng/ml)	促滤泡素抑制素 (ng/ml)
UCMC-3	2.975	13.50
UCMC-2	6.350	14.97
UCMC-3	1.161	8.65
UCMC-16	2.520	6.22
hBMF-3	0.707	8.84
hBMSC-3	0.061	11.24
PLA-3	0.135	10.29
NF-109	< 0.010	21.80
nscF-1	0.032	14.95
NF-112	0.040	11.54
NF	< 0.010	4.71
NF-113	< 0.010	16.54
NF-115	0.196	5.66
NF-6	< 0.010	8.35
UCEC-10	1.017	87.84
UCEC-12	0.722	74.02
UCEC-10	0.536	33.78
UCEC-3	0.691	32.07
UCEC-3	1.032	14.04
UCEC-10	0.505	88.66
UCEC-3	0.221	5.61
NK-103	0.428	69.04

图 10-1: 细胞角蛋白在脐带上皮细胞中的表达

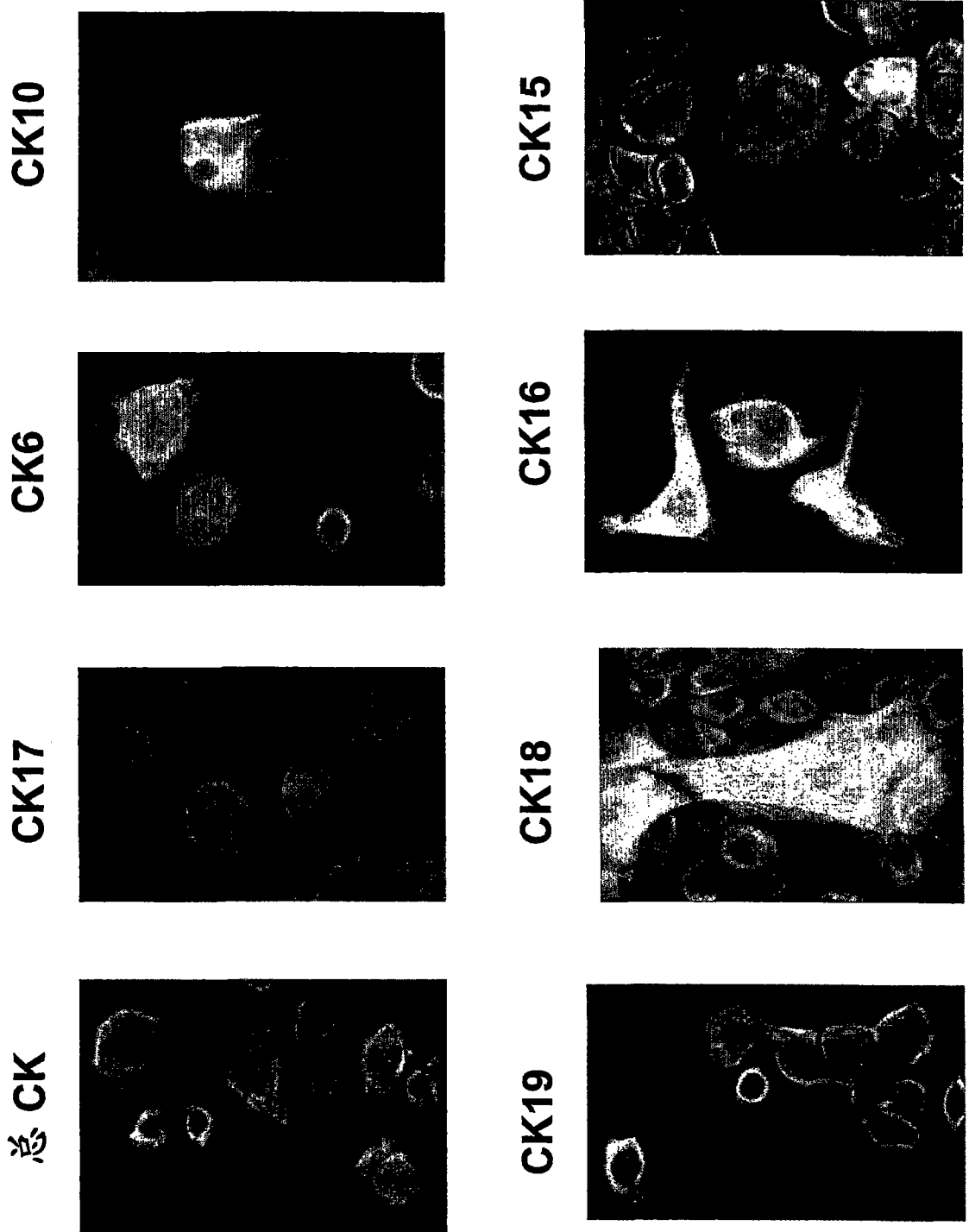
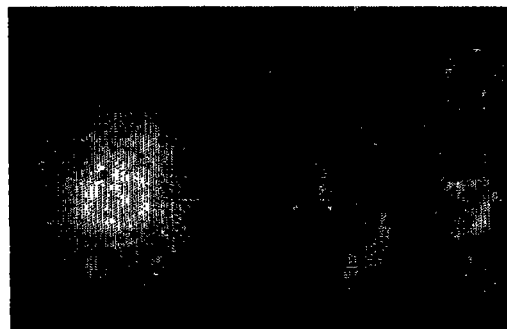
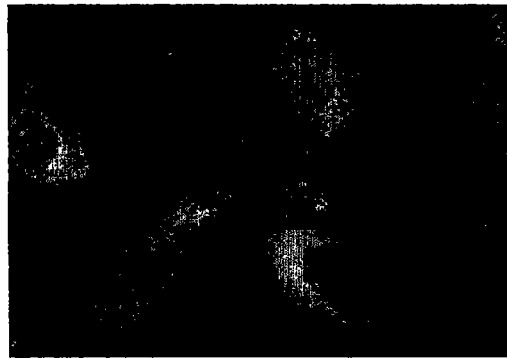


图 10-2: 半桥粒和桥粒在脐带上皮细胞中的表达

整合素  $\alpha 6$



整合素  $\beta 4$



桥粒





图 10-3: 基底膜蛋白质在脐带上皮细胞中的表达

层粒连蛋白 1



层粒连蛋白 5



IV 型胶原



VII 型胶原



图 10-4: 整合素  $\beta 1$  和纤连蛋白在脐带上皮细胞中的表达

整合素  $\beta 1$



纤连蛋白



图 11: 由脐带间充质细胞分泌的细胞因子和生长因子表达谱

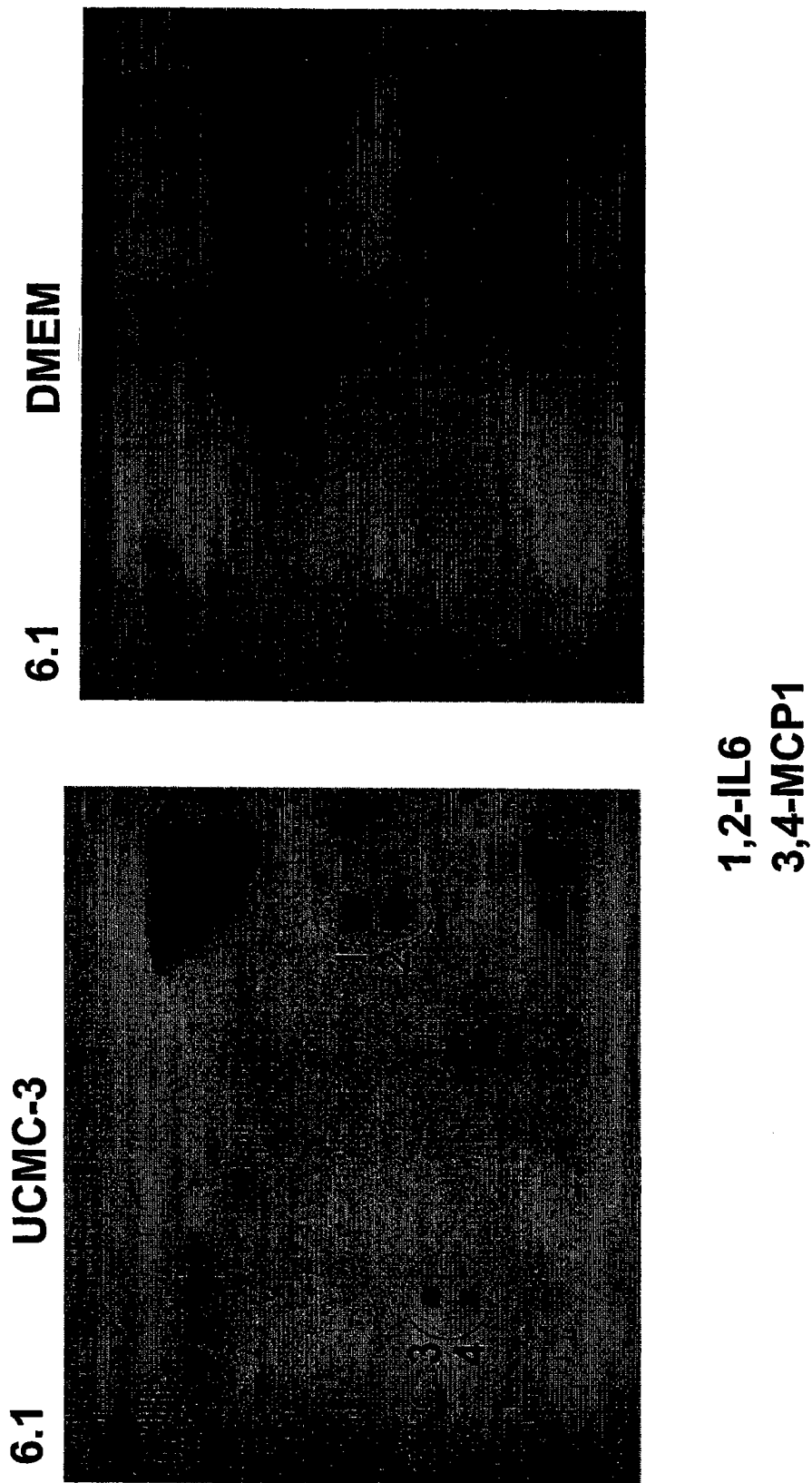
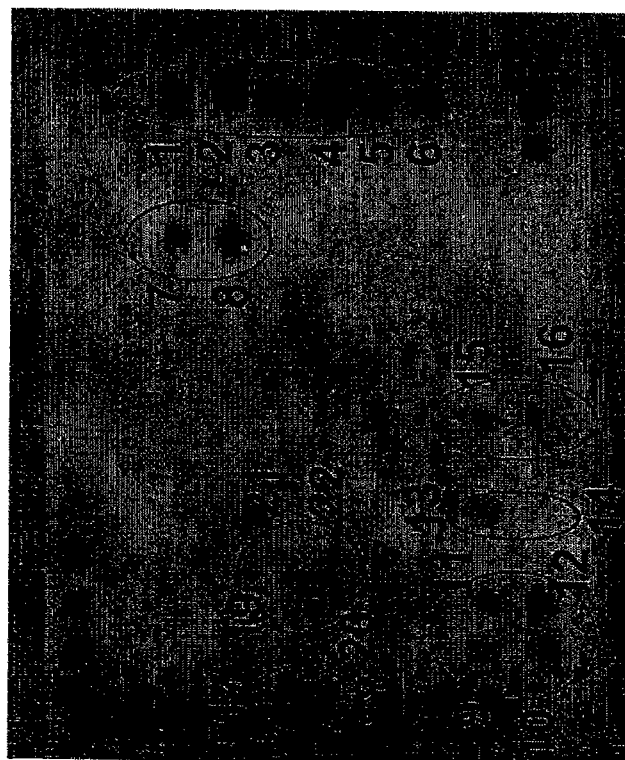


图 11: 由脐带间充质细胞分泌的细胞因子和生长因子表达谱

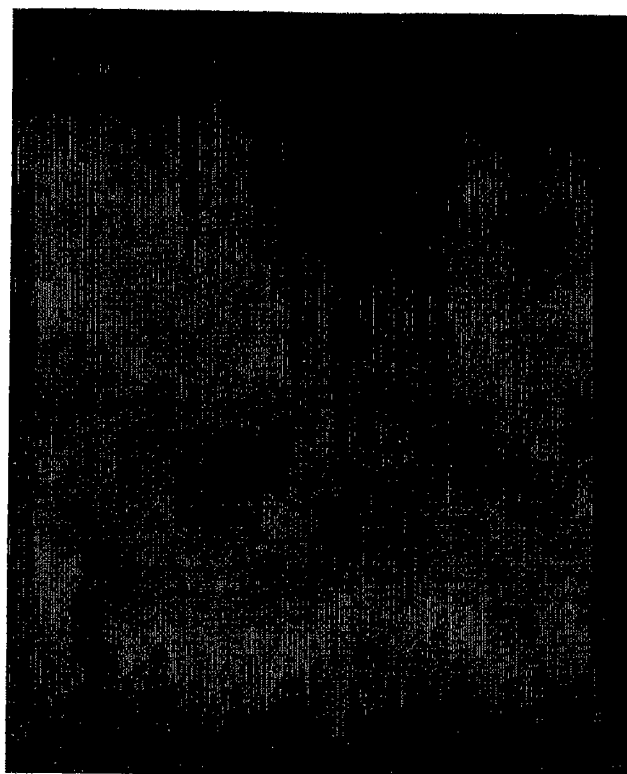
7.1

UCMC-3



7.1

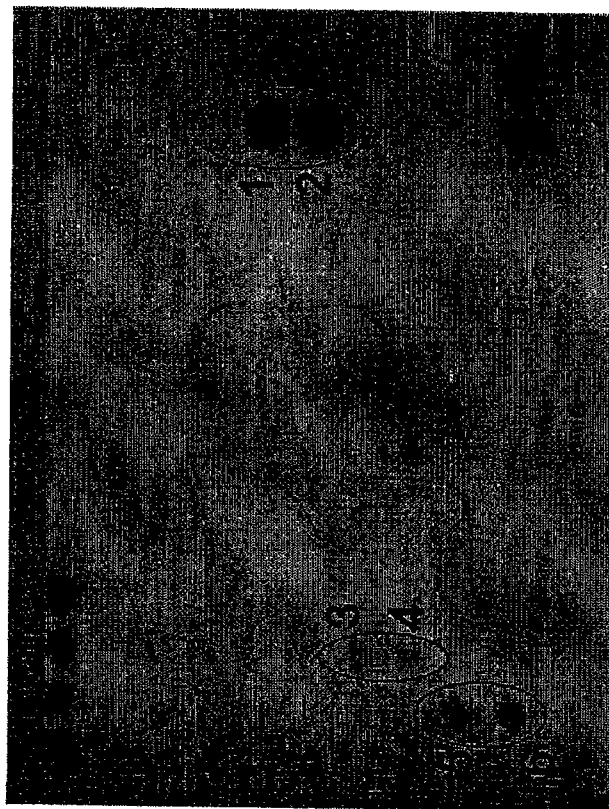
DMEM



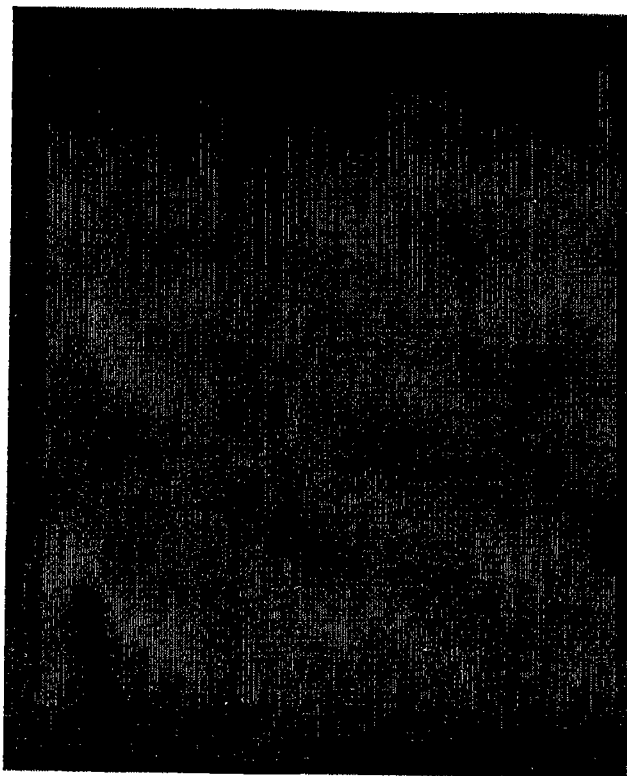
1,2-HGF; 3,4-IL8; 5,6-sTNFR1; 7,8-GRO; 9,10-TIMP1; 11,12-TIMP2  
 13,14-TRAILR3; 15,16-uPAR; 17,18-ICAM1; 19,20-IGFBP3; 21,22-IGFBP6

图 11: 由骨髓间充质细胞分泌的细胞因子和生长因子表达谱

6.1 hBMSC



6.1 DMEM



1,2-IL6; 3,4-MCP1; 5,6-RANTES

图 11: 由骨髓间充质细胞分泌的细胞因子和生长因子表达谱

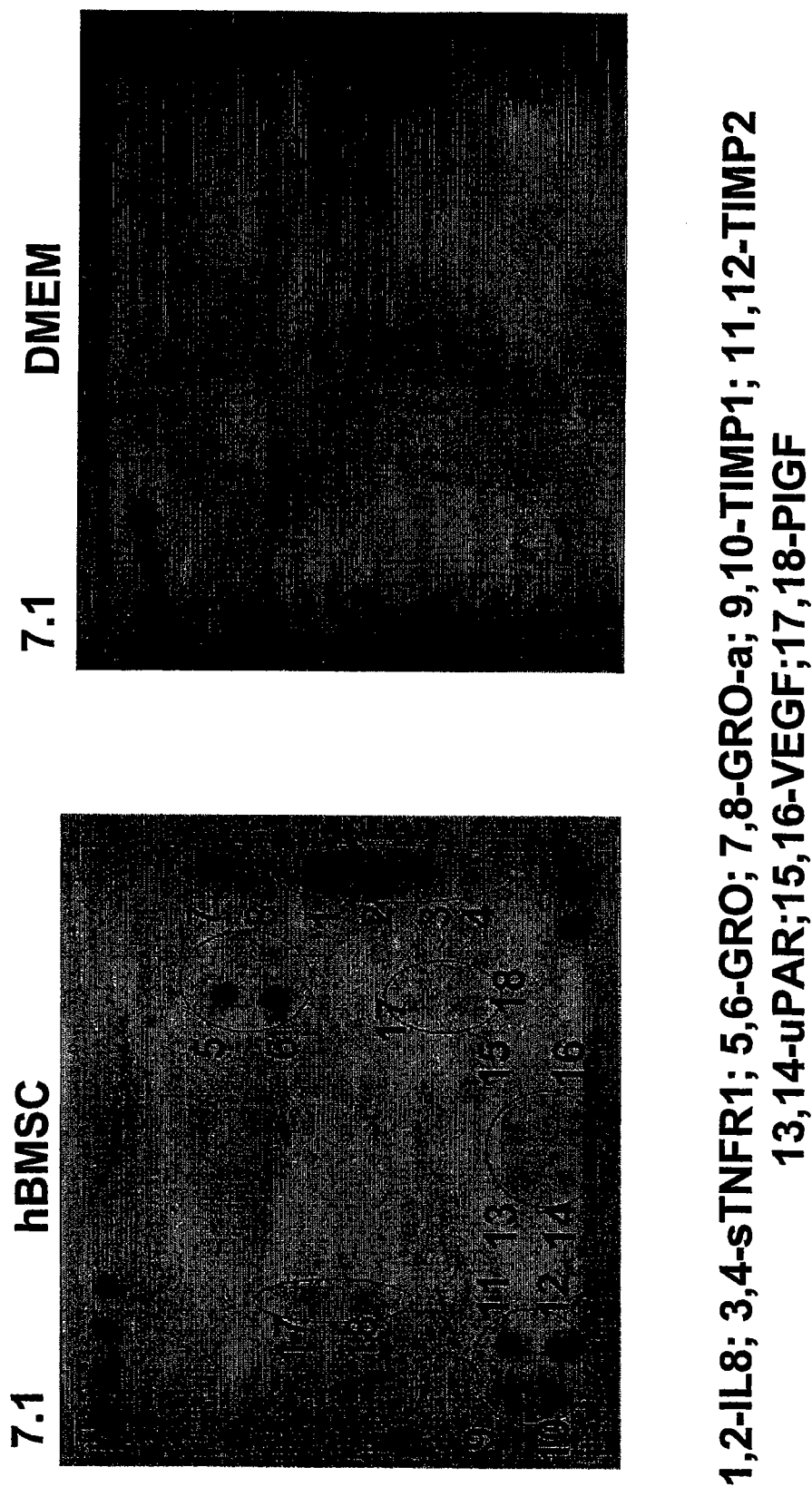


图 12: 由脐带上皮细胞分泌的细胞因子和生长因子表达谱

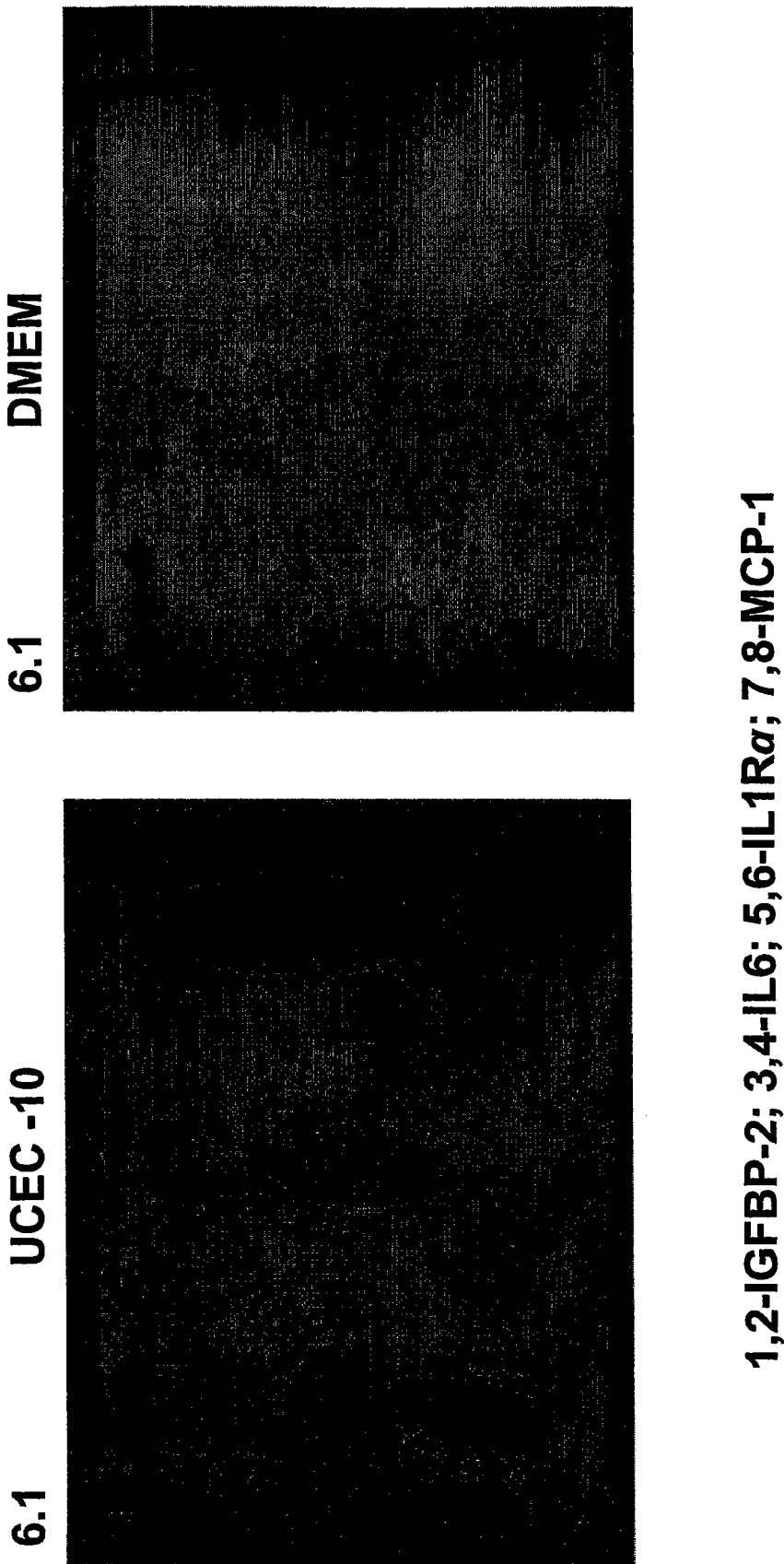
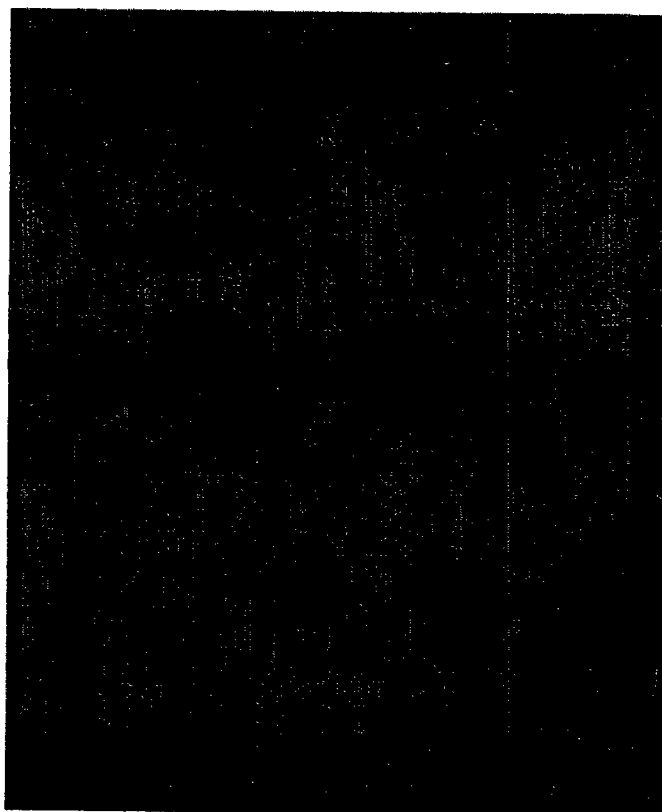


图 12: 由脐带上皮细胞分泌的细胞因子和生长因子表达谱

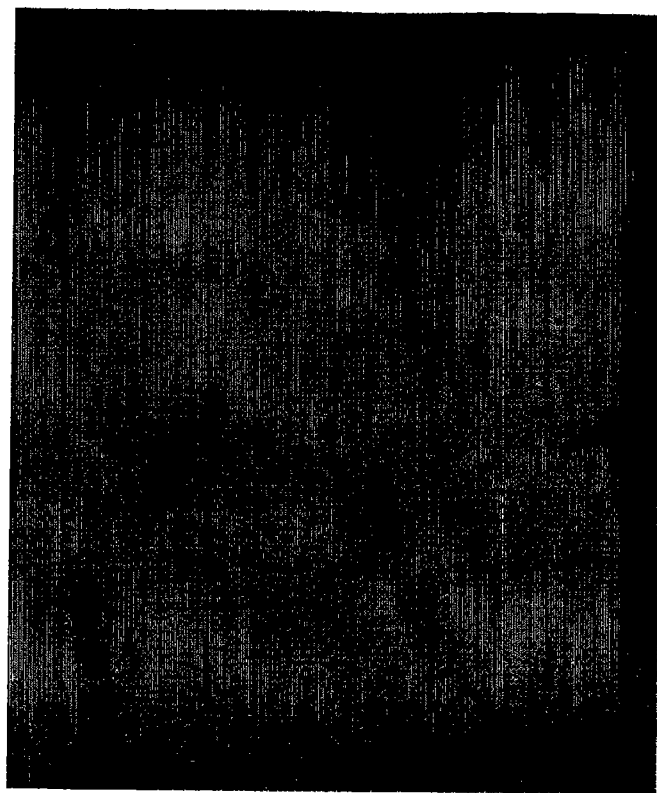
7.1

UCEC -10



7.1

DMEM



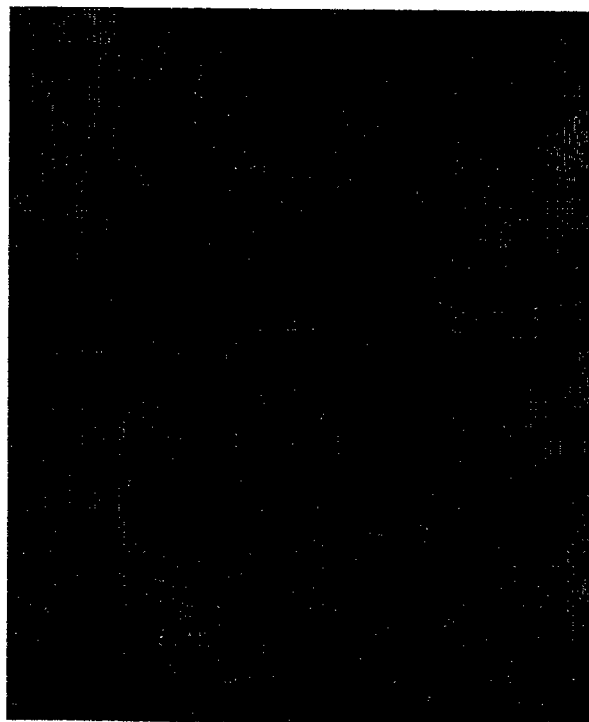
1,2-IL8; 3,4-sTNFR; 5,6-GRO; 7,8-双调蛋白; 9,10-TIMP1;  
11,12-TIMP2; 13,14-uPAR;15,16-VEGF



图 12: 由人表皮角质形成细胞分泌的细胞因子和生长因子表达谱

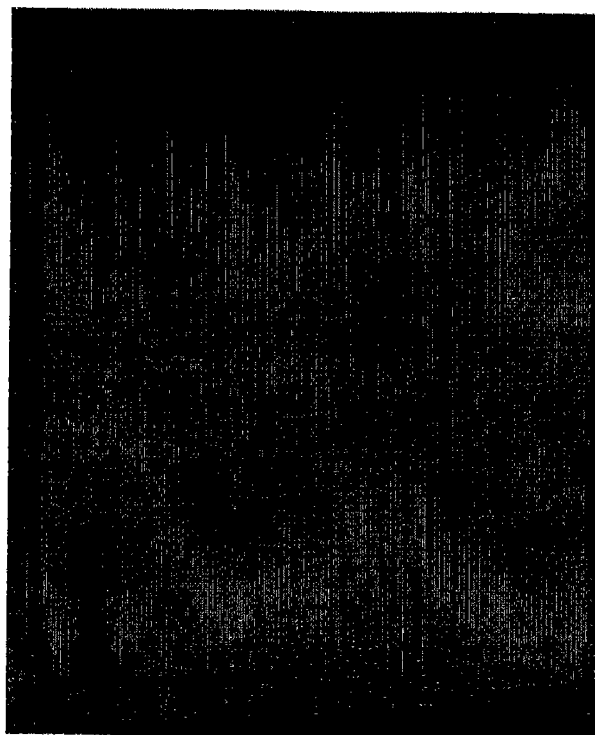
6.1

NK103



6.1

DMEM

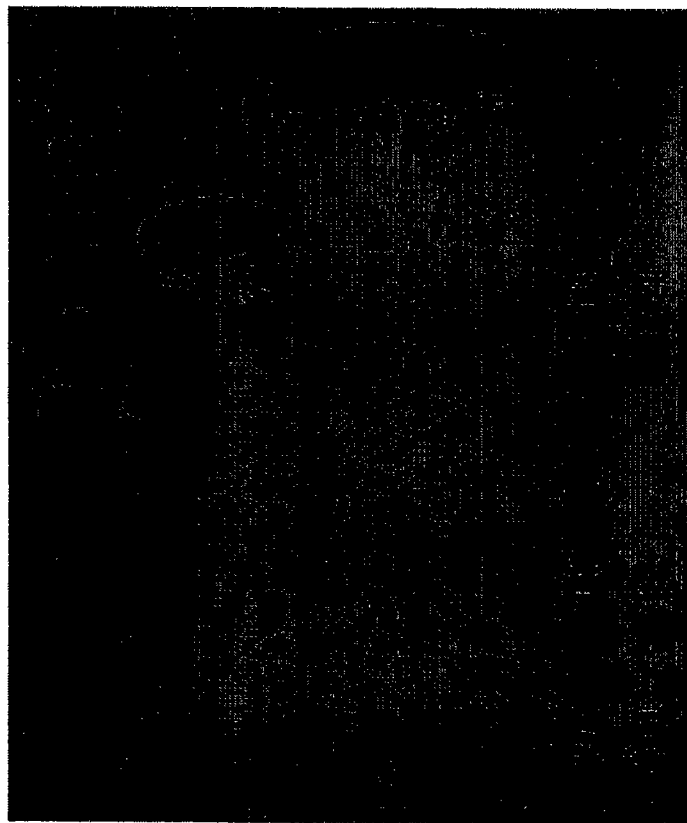


1,2-IL6; 3,4-IL1R $\alpha$ ; 5,6-MCP-1; 7,8-RANTES; 9,10-TNF $\beta$

图 12: 由人表皮角质形成细胞分泌的细胞因子和生长因子表达谱

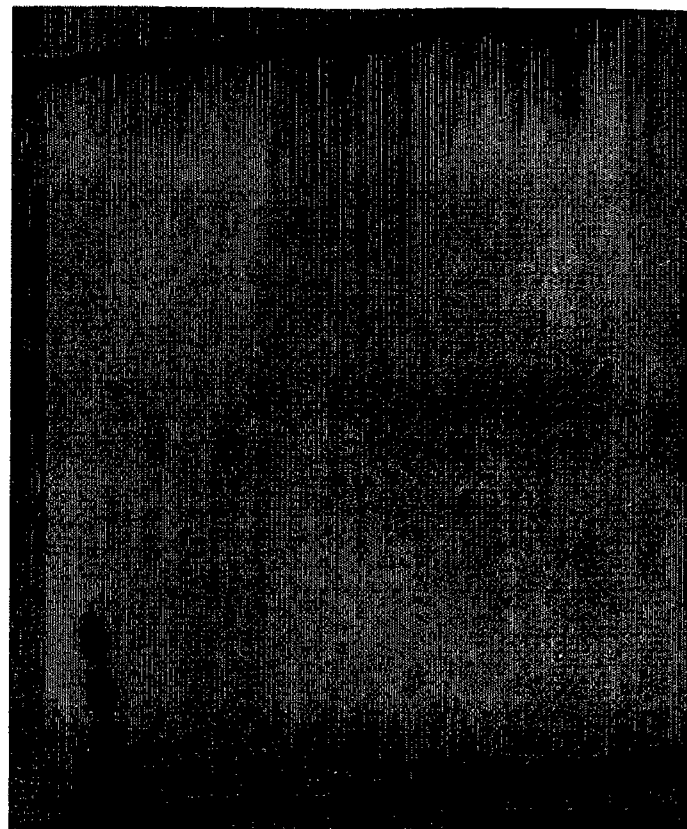
7.1

NK103



7.1

DMEM

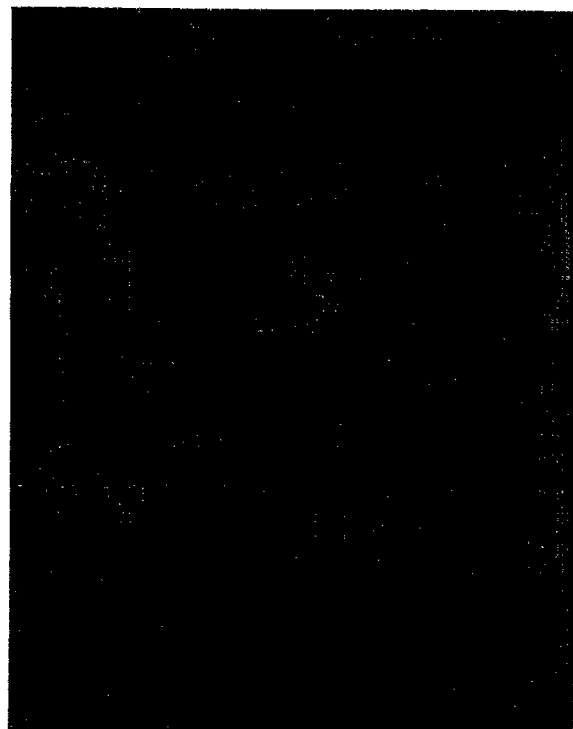


1,2-IL8; 3,4-sTNFR; 5,6-GRO; 7,8-双调蛋白; 9,10-TIMP-1;  
11,12-TIMP2; 13,14-VEGF

图 12: 由脐带上皮细胞分泌的细胞因子和生长因子表达谱

6.1

UCEC-12



1,2-IGFBP-4; 3,4-PARC; 5,6-EGF;  
 7,8-IGFBP-2; 9,10-IL-6; 11,12-血管生成素;  
 13,14-GCP-2; 15,16-IL1R $\alpha$ ; 17,18-MCP-1;  
 19-20-RANTES; 21,22-SCF; 23,24-TNF $\beta$

7.1

UCEC-12



1,2-HGF; 3,4-IL8; 5,6-sTNFR; 7,8-GRO;  
 9,10-GRO $\alpha$ ; 11,12-双调蛋白;  
 13,14-IL-1R4/ST2; 15,16-TIMP1;  
 17,18-TIMP2; 19,20-uPAR; 21,22-VEGF

图 12: 用于细胞因子阵列 (6.1) 的芯片点样

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	PO S	PO S	空	血管生成素	BDN F	BLC	BMP-4	BMP-6	CK b 8-1	CNT F	EGF	嗜酸细胞活化因子
2	NEG	NEG	NE G	NE G	空	血管生成素	BDN F	BLC	BMP-4	BMP-6	CK b 8-1	CNT F	EGF	嗜酸细胞活化因子
3	嗜酸细胞活化因子-2	嗜酸细胞活化因子-3	FGF -6	FGF -7	Fit-3 配体	CXXXC 趋化分子-2	GCP -2	GD NF	GM-CSF	I-309	IFN-g	IGFB P-1	IGFB P-2	IGFB P-4
4	嗜酸细胞活化因子-2	嗜酸细胞活化因子-3	FGF -6	FGF -7	Fit-3 配体	CXXXC 趋化分子-2	GCP -2	GD NF	GM-CSF	I-309	IFN-g	IGFB P-1	IGFB P-2	IGFB P-4
5	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1a	IL-1b	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
6	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1a	IL-1b	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
7	瘦蛋白	LIGH T	MC P-1	MC P-2	MCP-3	MCP-4	M- CSF	MD C	MIG	MIP-1 d	MIP-3a	NAP-2	NT-3	PAR C
8	瘦蛋白	LIGH T	MC P-1	MC P-2	MCP-3	MCP-4	M- CSF	MD C	MIG	MIP-1 d	MIP-3a	NAP-2	NT-3	PAR C
9	PDGF -BB	RANT ES	SCF	SDF -1	TARC	TGF- b1	TGF- b3	TNF -a	TNF- b	空	空	空	空	空
10	PDGF -BB	RANT ES	SCF	SDF -1	TARC	TGF- b1	TGF- b3	TNF -a	TNF- b	空	空	空	空	空

图 12: 用于细胞因子阵列 (7.1) 的芯片点样

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	POS	POS	空	Acrp30	AgR P	血管生成素-2	双调蛋白	Axl	bF GF	b-NGF	BTC	CCL-28
2	NEG	NEG	NEG	NEG	空	Acrp30	AgR P	血管生成素-2	双调蛋白	Axl	bF GF	b-NGF	BTC	CCL-28
3	CTA CK	Dtk	EGF-R	ENA-78	Fas	FGF-4	FGF -9	GCSF	GITR-配体	GITR	GR O	GR O-a	HCC-4	HGF
4	CTA CK	Dtk	EGF-R	ENA-78	Fas	FGF-4	FGF -9	GCSF	GITR-配体	GITR	GR O	GR O-a	HCC-4	HGF
5	ICA M-1	ICAM-3	IGFB P-3	IGFBP-6	IGF-I SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 RI	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 Ra	IL-6 R	IL-8
6	ICA M-1	ICAM-3	IGFB P-3	IGFBP-6	IGF-I SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 RI	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 Ra	IL-6 R	IL-8
7	I- TAC	淋巴细胞趋化蛋白	MIF	MIP-1a	MIP-1 b	MIP-3b	MS P-a	NT-4	护骨蛋白	制癌蛋白 M	PIG F	sgp1 30	sTNF RII	sTNF -RI
8	I- TAC	淋巴细胞趋化蛋白	MIF	MIP-1a	MIP-1 b	MIP-3b	MS P-a	NT-4	护骨蛋白	制癌蛋白 M	PIG F	sgp1 30	sTNF RII	sTNF -RI
9	TEC K	TIMP-1	TIMP -2	血小板生成素	TRAIL R3	TRAIL R4	uPA R	VEGF	VEGF-D	空	空	空	空	空
10	TEC K	TIMP-1	TIMP -2	血小板生成素	TRAIL R3	TRAIL R4	uPA R	VEGF	VEGF-D	空	空	空	空	POS POS

图 13-1: 在 DMEM/10%FCS 中培养第 10 天时的 UCMC-16

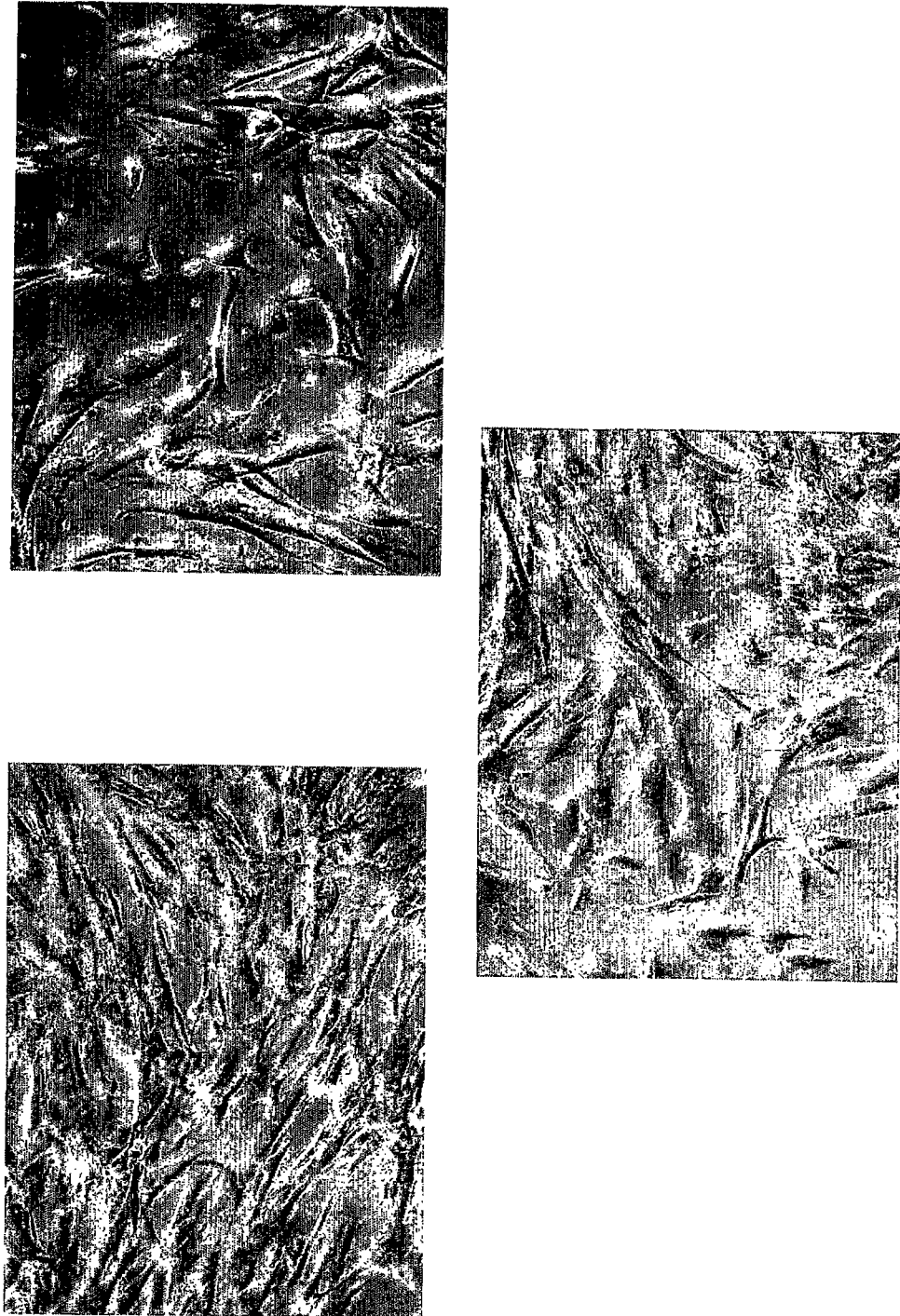


图 13-2: 在 PTT-1 培养基中培养第 4 天时的 UCMC-15

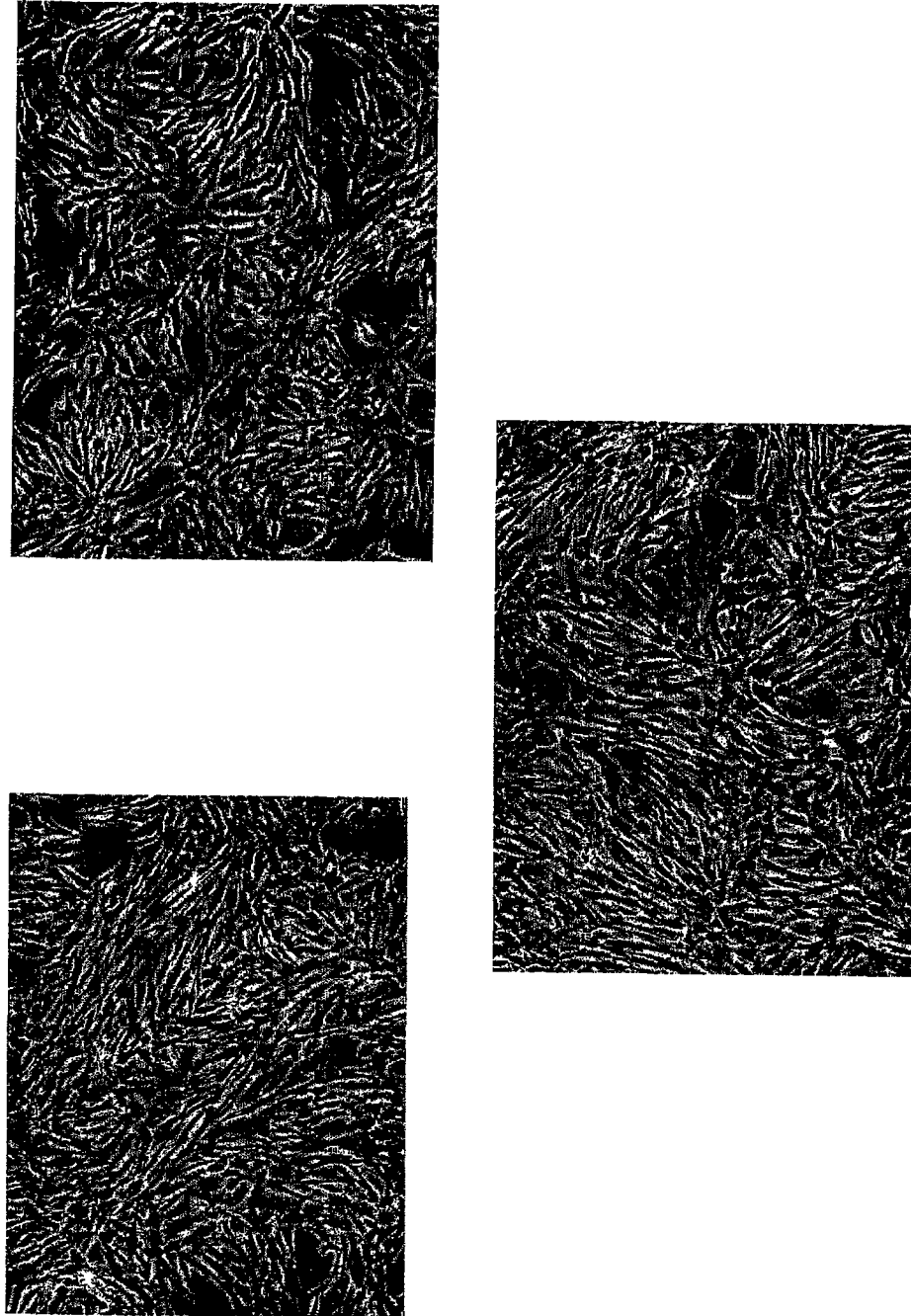


图 13-3: 在 PTT-1 中培养第 10 天时的 UCMC-16

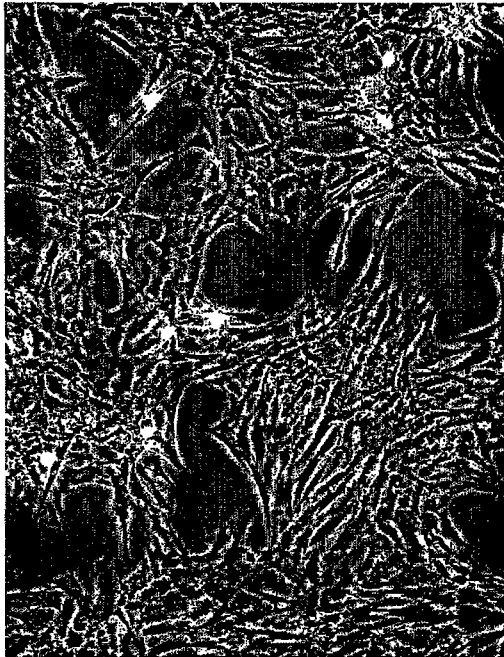
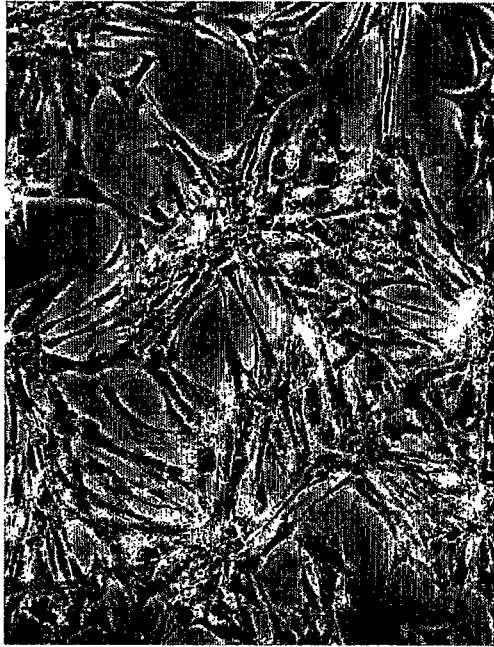




图 13-4: 在 PTT-2 中培养第 10 天时的 UCMC-16

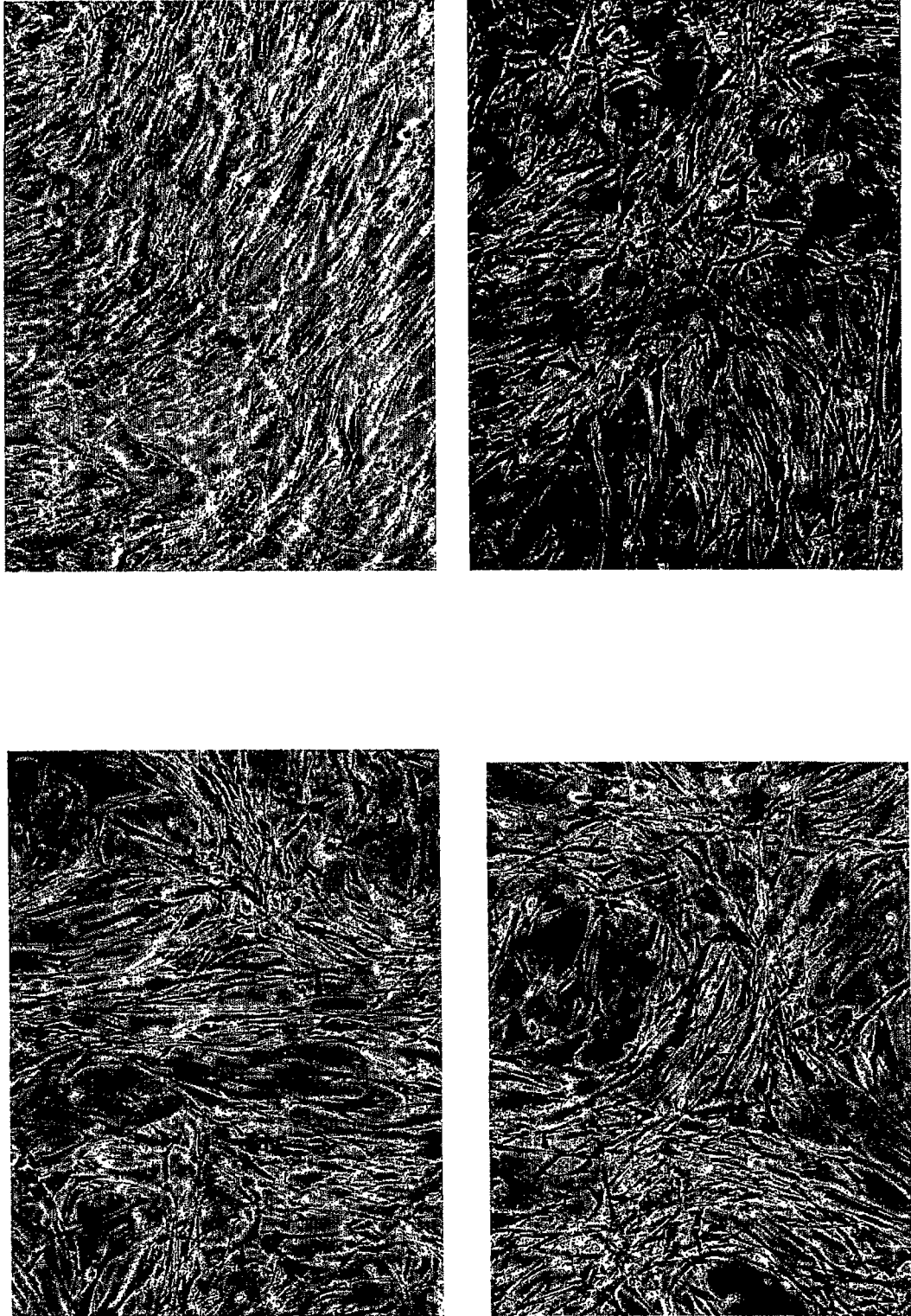


图 13-5: 在 PTT-3 中培养第 10 天时的 UCMC-16

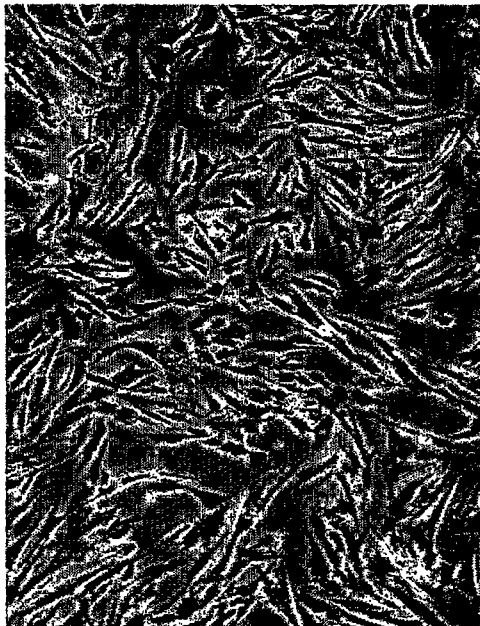


图 13-6: 在 PTT-3 中培养第 10 天时的脂肪衍生基质细胞。  
细胞在无血清培养基中不能良好生长

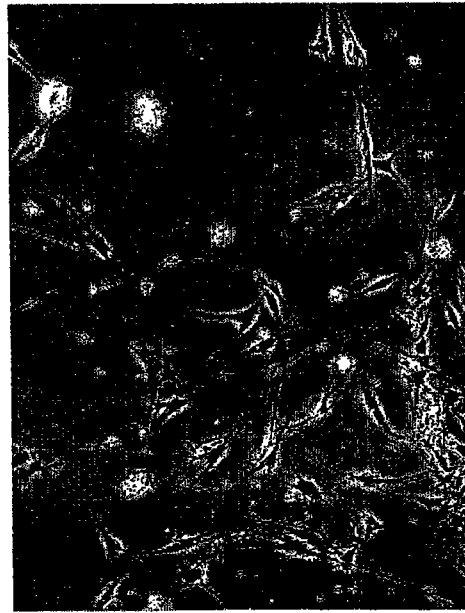
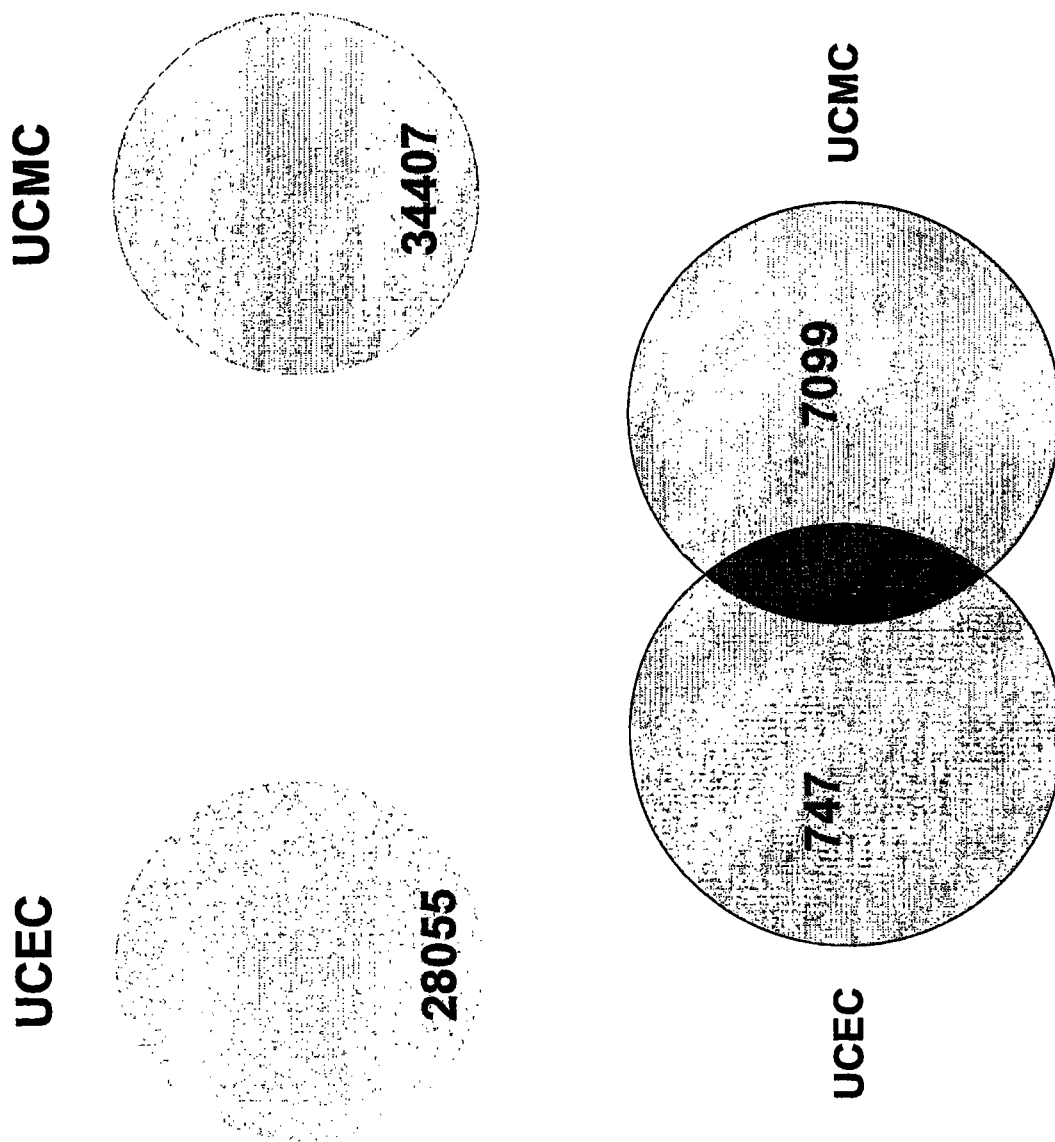


图 13-7: 在 PTT-3 (MeE) 中培养第 10 天时的骨髓衍生基质细胞  
细胞在无血清培养基中不能良好生长



图 14: 脐带上皮干细胞和间充质干细胞中的全面基因表达



在 UCBC 和 UCMC 中









两者中	6 个基因 - 细胞膜
两者中	12 个基因 - 细胞壁
两者中	19 个基因 - 生理过程
两者中	36 个基因 - 生殖
两者中	65 个基因 - 对生物刺激的反应
两者中	78 个基因 - 体内稳态
两者中	83 个基因 - 氧结合
两者中	84 个基因 - 内体
两者中	95 个基因 - 过氧化物酶体
两者中	99 个基因 - 对内源刺激的反应
两者中	120 个基因 - 翻译调节子
两者中	136 个基因 - 神经递质转运体活性
两者中	140 个基因 - 胚胎发育
两者中	146 个基因 - 形态发生
两者中	164 个基因 - 核膜
两者中	176 个基因 - 蛋白质修饰
两者中	181 个基因 - 病毒生命周期
两者中	198 个基因 - 细胞外空间
两者中	205 个基因 - 溶酶体
两者中	210 个基因 - BCM
两者中	215 个基因 - 微管组织中心
两者中	223 个基因 - 脂结合
两者中	283 个基因 - 运动活性
两者中	304 个基因 - 对刺激的反应
两者中	508 个基因 - 高尔基器
两者中	522 个基因 - 磷酸酶活性
两者中	532 个基因 - 细胞粘附分子活性
两者中	554 个基因 - 细胞生长
两者中	554 个基因 - 脂代谢
两者中	565 个基因 - 细胞骨架
两者中	570 个基因 - 对非生物刺激的反应
两者中	575 个基因 - 细胞增殖
两者中	590 个基因 - 细胞识别
两者中	607 个基因 - 核酸酶活性
两者中	630 个基因 - 对外部刺激的反应

图 14: 在脐带上皮  
干细胞和间充质  
干细胞的基因表达  
存在的基因表达

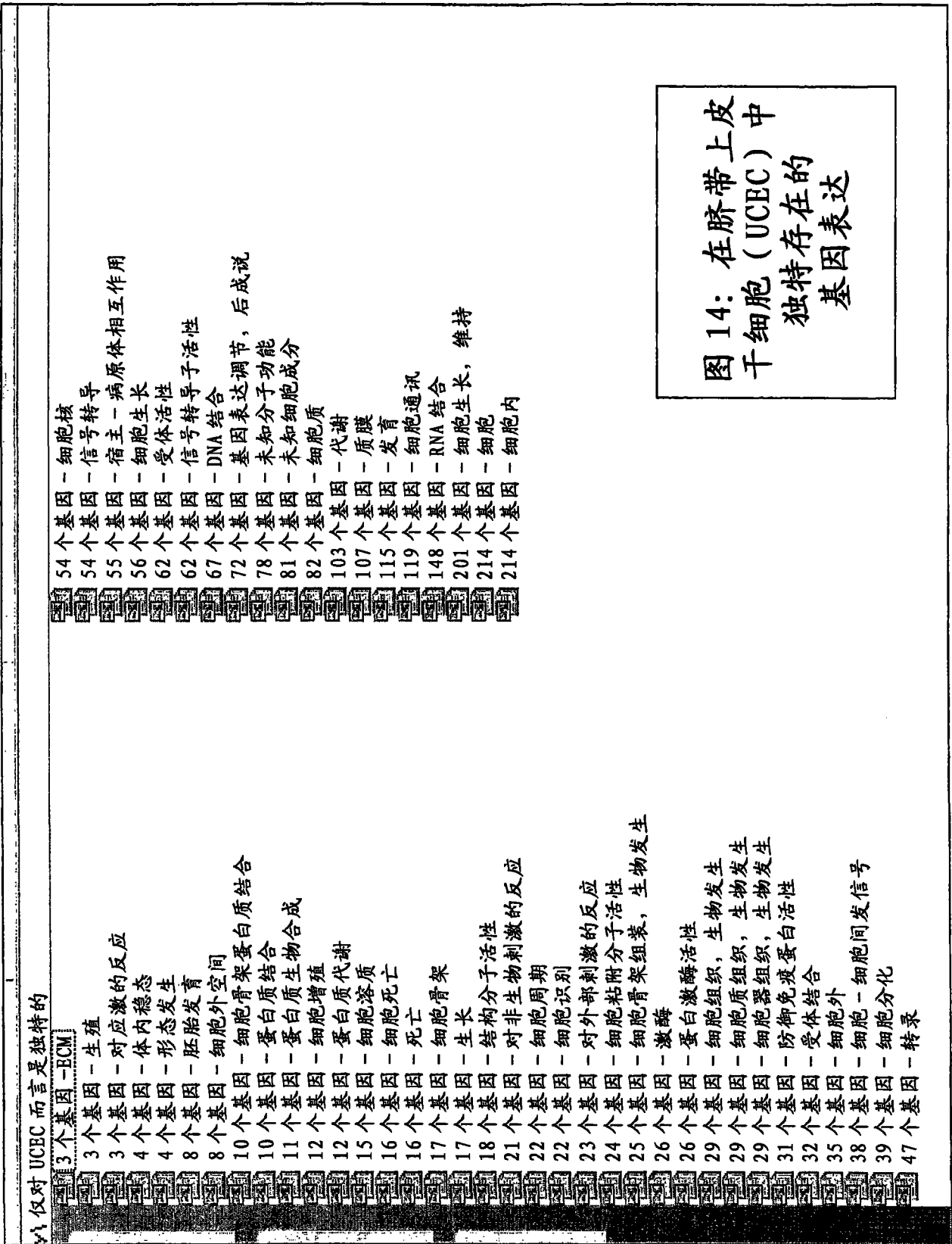
663	中	两	者	中	个	基	因	-	蛋	白	质	结	合
666	中	两	者	中	个	基	因	-	细	胞	死	亡	
747	中	两	者	中	个	基	因	-	结	构	分	子	活
774	中	两	者	中	个	基	因	-	细	胞	外		
808	中	两	者	中	个	基	因	-	细	胞	周	期	
817	中	两	者	中	个	基	因	-	蛋	白	质	生	物
825	中	两	者	中	个	基	因	-	DNA	代	谢	合	成
899	中	两	者	中	个	基	因	-	能	量	途	径	
926	中	两	者	中	个	基	因	-	细	胞	骨	架	组
975	中	两	者	中	个	基	因	-	细	胞	组	织	和
987	中	两	者	中	个	基	因	-	受	体	结	合	生
1048	中	两	者	中	个	基	因	-	蛋	白	质	代	谢
1138	中	两	者	中	个	基	因	-	细	胞	间	发	信
1317	中	两	者	中	个	基	因	-	细	胞	分	化	
1364	中	两	者	中	个	基	因	-	细	胞	溶	质	
1364	中	两	者	中	个	基	因	-	激	酶			
1364	中	两	者	中	个	基	因	-	蛋	白	激	酶	活
1473	中	两	者	中	个	基	因	-	宿	主	-	病	原
1483	中	两	者	中	个	基	因	-	蛋	白	质	相	互
1637	中	两	者	中	个	基	因	-	蛋	白	转	运	作
1667	中	两	者	中	个	基	因	-	离	子	通	道	活
1774	中	两	者	中	个	基	因	-	离	子	转	运	
1774	中	两	者	中	个	基	因	-	细	胞	组	织	生
1968	中	两	者	中	个	基	因	-	细	胞	器	组	织
2067	中	两	者	中	个	基	因	-	核	苷	酸	结	合
2067	中	两	者	中	个	基	因	-	受	体	活	性	
2108	中	两	者	中	个	基	因	-	信	号	转	导	子
2125	中	两	者	中	个	基	因	-	信	号	转	导	活
2503	中	两	者	中	个	基	因	-	细	胞	生	长	
2906	中	两	者	中	个	基	因	-	转	录	调	节	子
2947	中	两	者	中	个	基	因	-	转	录	酶		
3435	中	两	者	中	个	基	因	-	转	录			
3436	中	两	者	中	个	基	因	-	质	膜			
3509	中	两	者	中	个	基	因	-	转	录	因	子	活
3509	中	两	者	中	个	基	因	-	基	因	表	达	调
3634	中	两	者	中	个	基	因	-	基	因	表	达	调
													节
													后
													成
													说

图 14: 在脐带上皮  
干细胞和间充质  
干细胞两者中  
存在的基因表达

图14: 在脐带上皮  
干细胞和间充质  
干细胞两者中  
存在的基因表达

	两者中 3845 个基因 - 未知成分
	两者中 3882 个基因 - 细胞核
	两者中 3950 个基因 - 细胞通讯
	两者中 4531 个基因 - 发育
	两者中 6645 个基因 - 代谢
	两者中 7785 个基因 - 翻译因子活性, 核酸
	两者中 10422 个基因 - 细胞生长或维持
	两者中 10458 个基因 - 细胞





仅在 UCMC 中

4	个基因 - 细胞壁
6	个基因 - 翻译调节子
9	个基因 - 生理过程
12	个基因 - 对外源刺激的反应
21	个基因 - 对生物刺激的反应
23	个基因 - 体内稳态
25	个基因 - 生殖
40	个基因 - 对刺激的反应
45	个基因 - 形态发生
48	个基因 - 胚胎发育
48	个基因 - 神经递质活性
54	个基因 - 运动活性
71	个基因 - 蛋白质生物合成
87	个基因 - 细胞外空间
90	个基因 - EMC
95	个基因 - 能量途径
125	个基因 - 细胞死亡
125	个基因 - 死亡
126	个基因 - 结构分子活性
133	个基因 - 细胞周期
134	个基因 - DNA 代谢
150	个基因 - 细胞增殖
157	个基因 - 细胞骨架
157	个基因 - 对非生物刺激的反应
164	个基因 - 识别
174	个基因 - 细胞骨架蛋白质结合
174	个基因 - 蛋白质结合
174	个基因 - 对外部刺激的反应
184	个基因 - 生长
206	个基因 - 细胞粘附分子活性
221	个基因 - 细胞骨架组装, 生物发生
268	个基因 - 细胞溶质
268	个基因 - 防御免疫蛋白质活性
294	个基因 - 蛋白酶活性
297	个基因 - 受体结合

303	个基因 - 细胞组织, 生物发生
303	个基因 - 细胞器组织, 生物发生
339	个基因 - 细胞分化
340	个基因 - 细胞外
347	个基因 - 细胞 - 细胞间发信号
444	个基因 - 宿主 - 病原体相互作用
539	个基因 - 转录调节子活性
599	个基因 - 细胞生长
602	个基因 - 信号转导
604	个基因 - 转录
681	个基因 - 细胞核
702	个基因 - 受体活性
702	个基因 - 信号转导子活性
712	个基因 - 转录因子活性
747	个基因 - DNA 结合
814	个基因 - 基因表达调节, 后成说
974	个基因 - 未知细胞成分
1026	个基因 - 质膜
1120	个基因 - 发育
1139	个基因 - 细胞通讯
1657	个基因 - 翻译因子活性, 核酸结合
2266	个基因 - 细胞生长和维持
2289	个基因 - 细胞

图 14: 在脐带间充质干细胞 (UCMC) 中独特存在的基因表达

组织转移，任选地，在脐带或分离的羊膜  
深低温保藏和低温存储之后

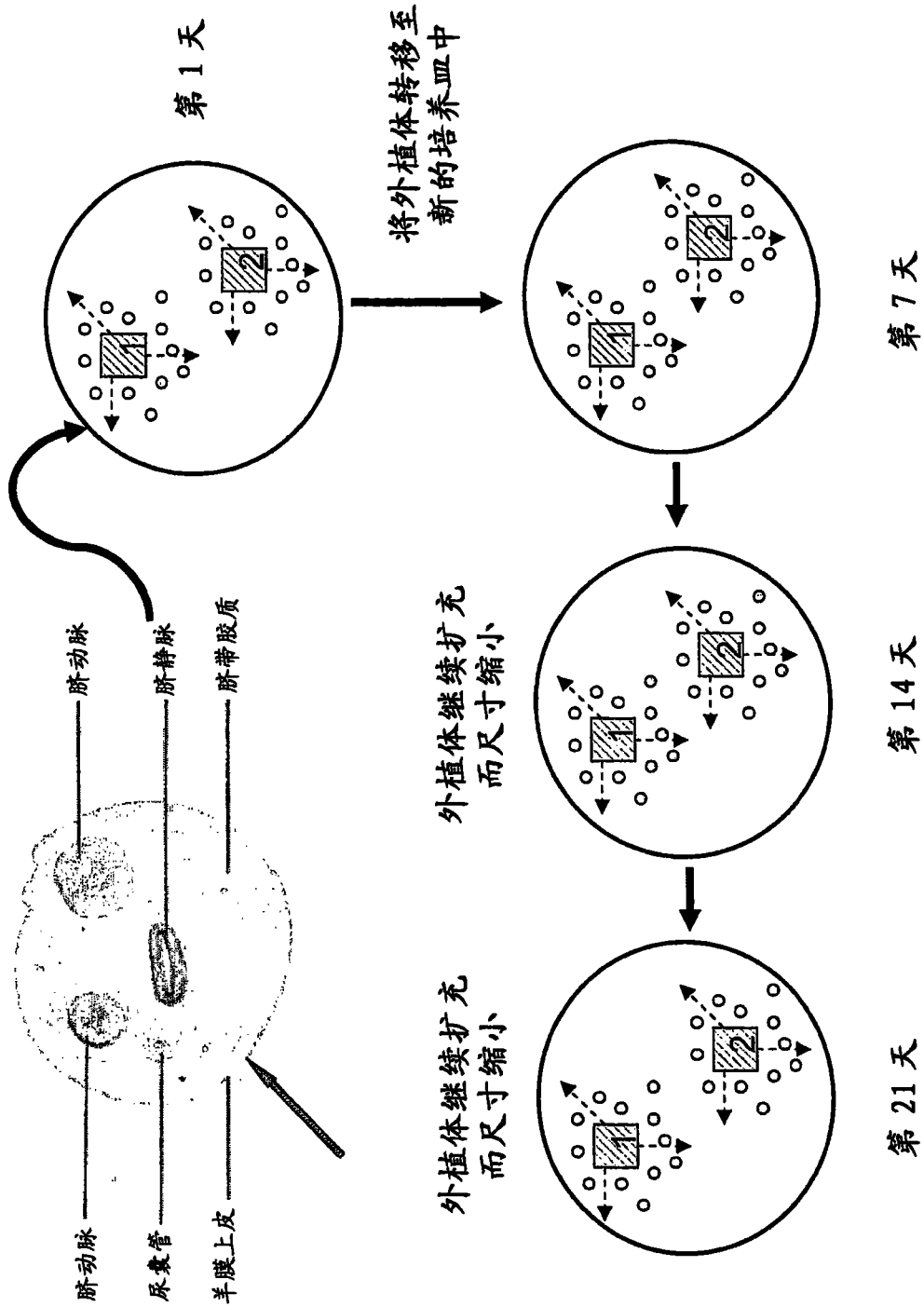


图 15

图 16: 正常脐带的组织学

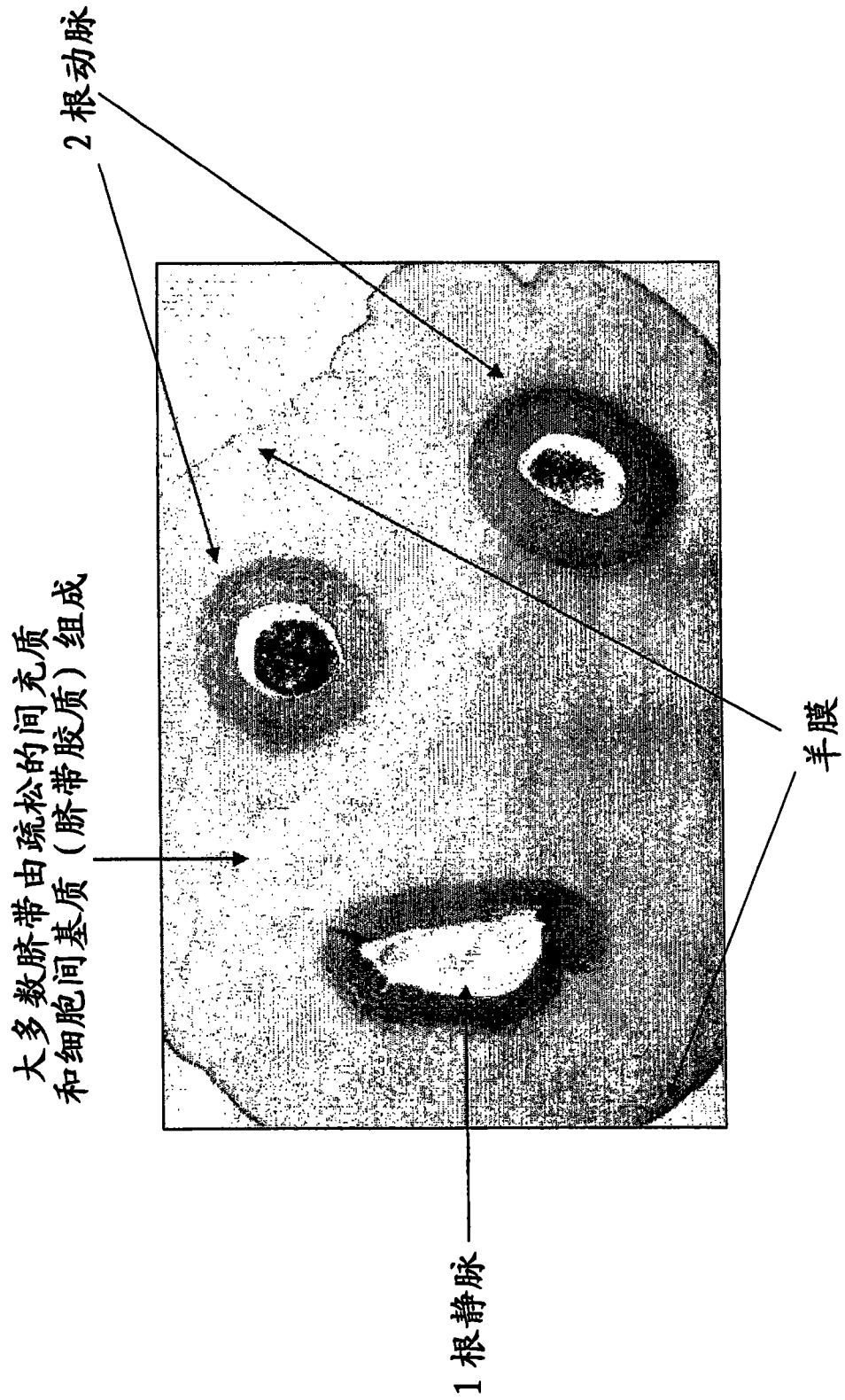


图 17-A: UCEC 体外分化为皮肤表皮。在 EpiLife 或 KGM 培养基中的 UCFC 细胞培养第 10 天形成表皮细胞层。

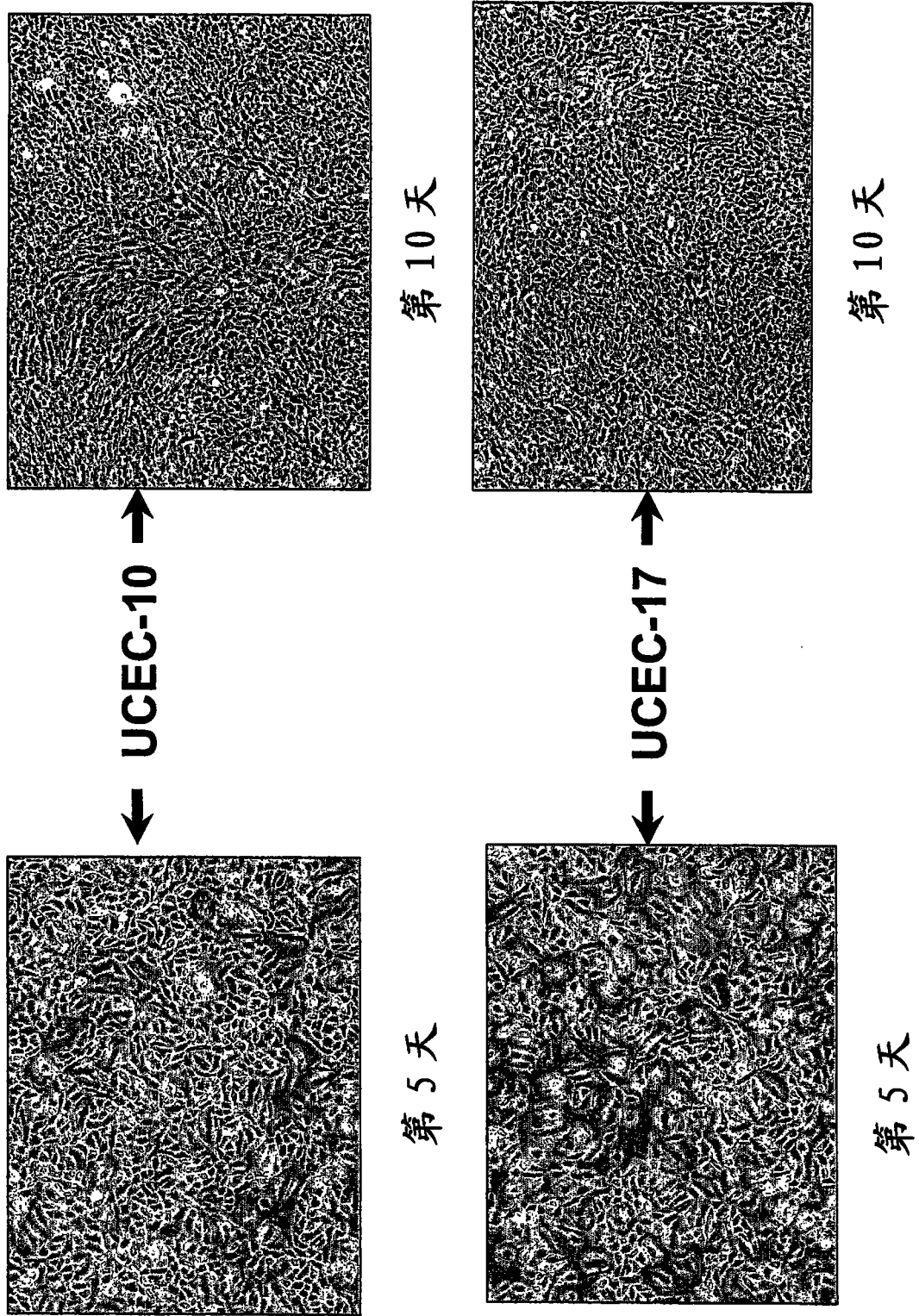


图 17B: UCMC 的体外骨发生诱导。Von Kossa 染色表明在 UCMC 中的骨节形成，而在皮肤真皮成纤维细胞中没有诱导的

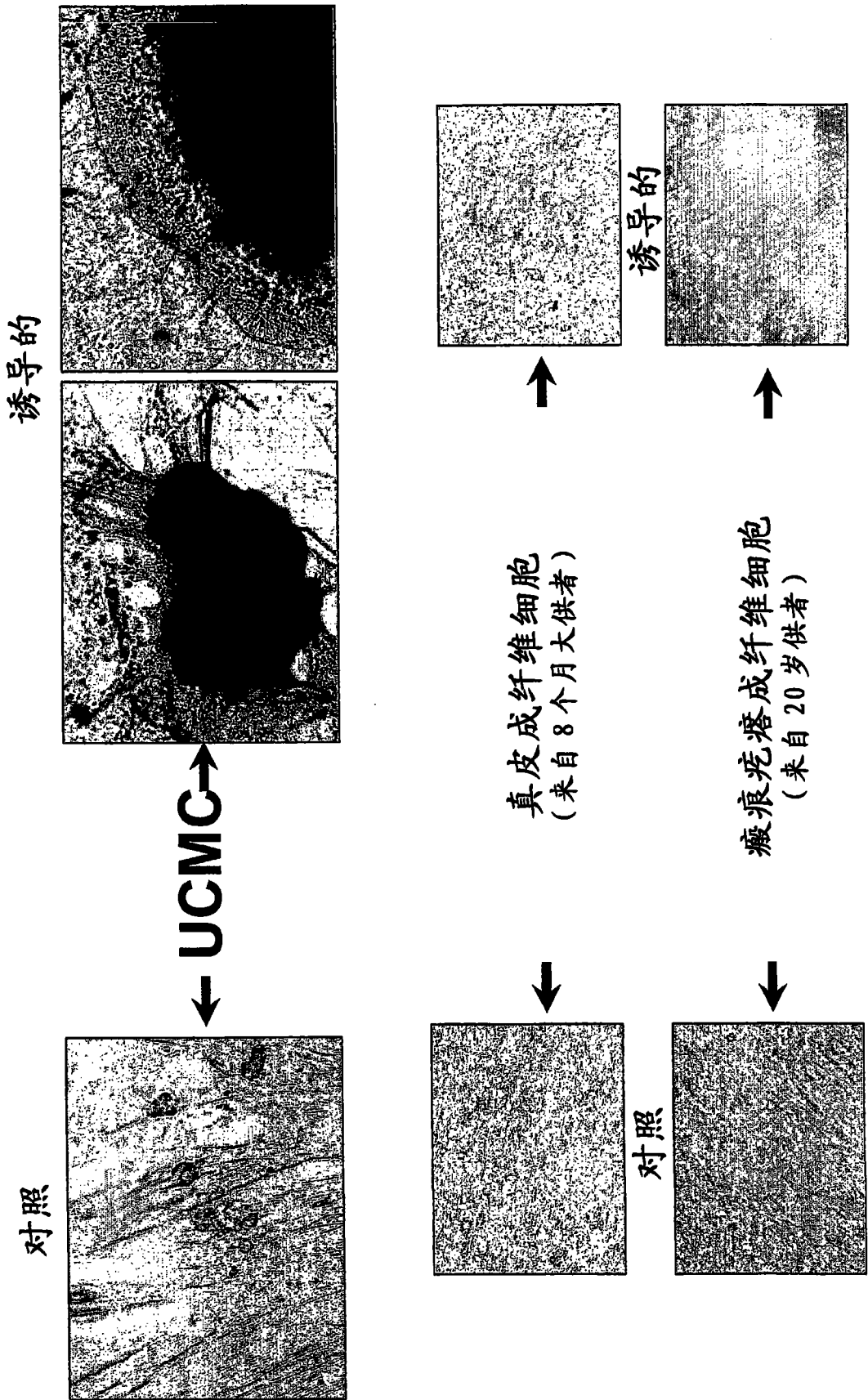


图 17C: UCMC 的体外脂肪形成诱导。油红 O 染色表明在 UCMC 中脂肪聚集，而在皮肤真皮纤维细胞中没有诱导的

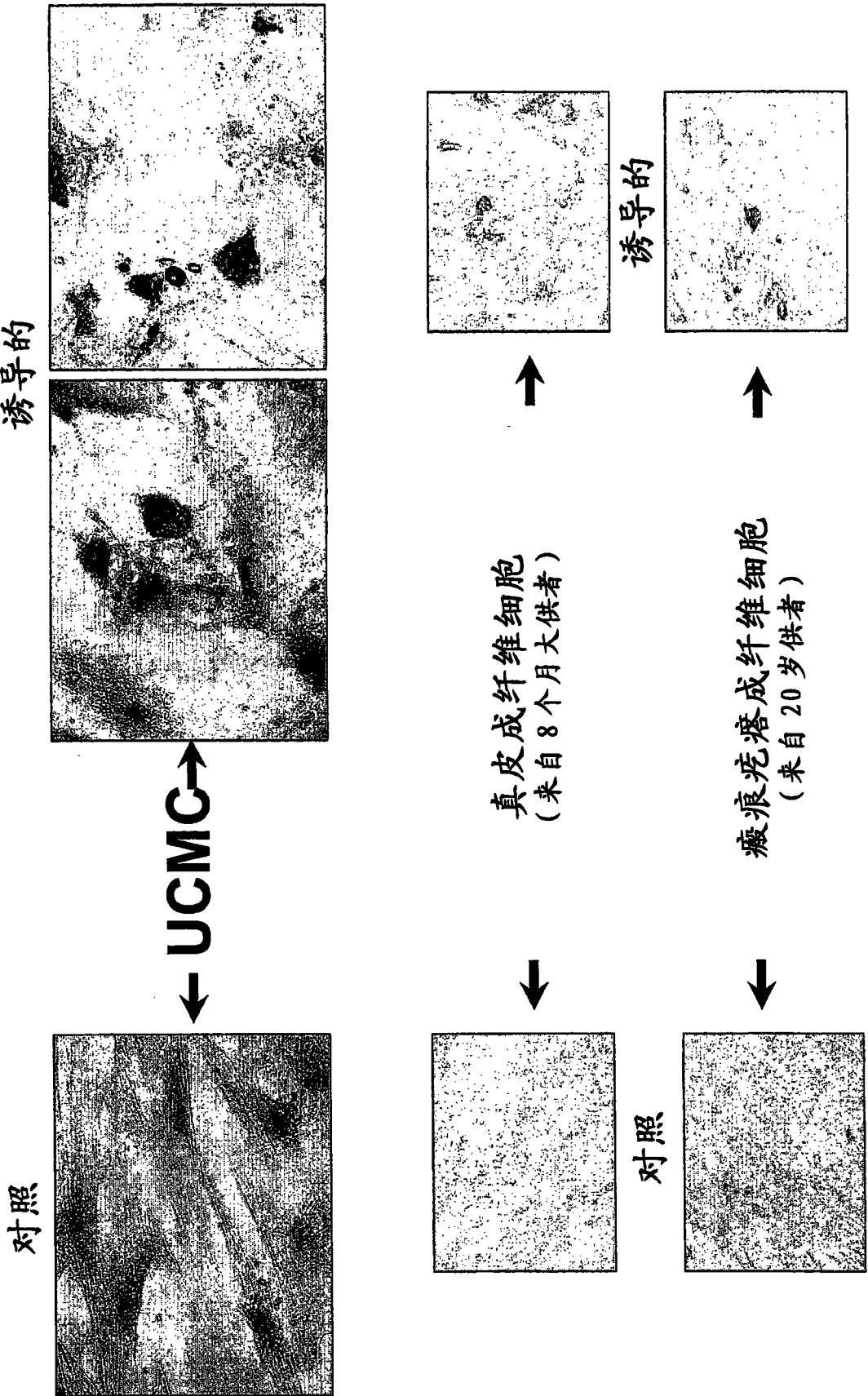


图 18b: UCMC- 衍生的皮肤成纤维细胞



图 18a: UCCEC- 衍生的皮肤角质形成细胞

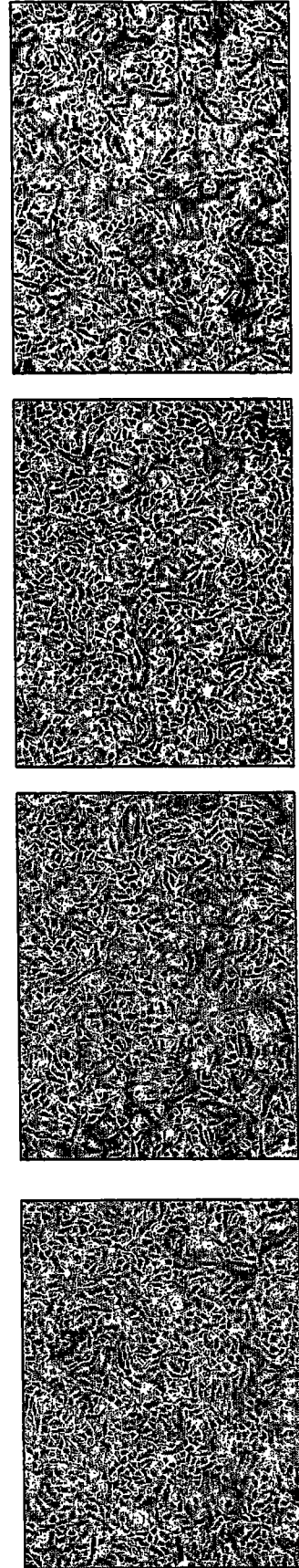




图 19: 使用 UCBC 和 UCMC 培养的皮肤等价物 (CSE-1) (H&E 染色)

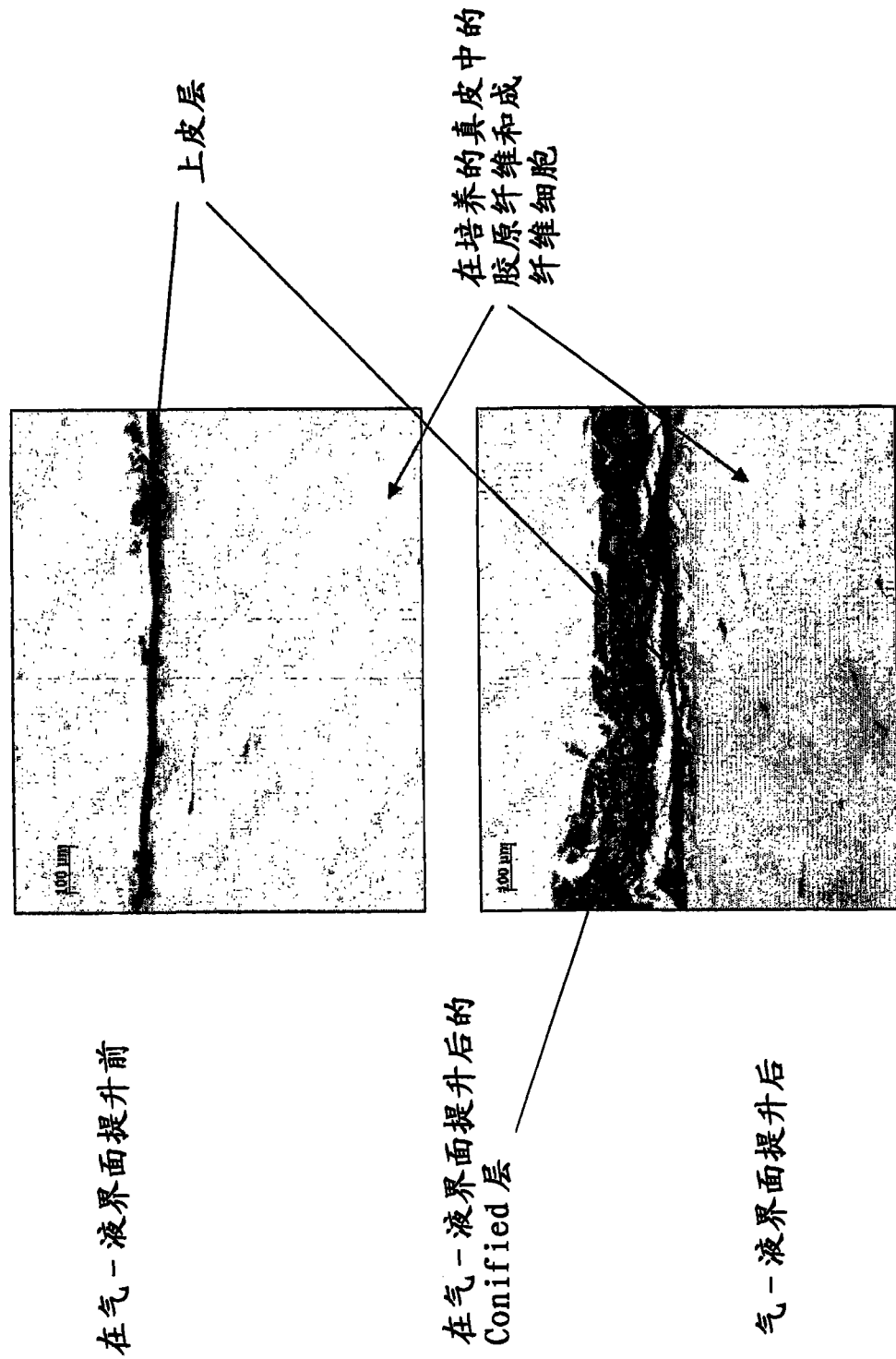


图 20a: 提升到气-液界面后的 CSE-1 表面外观

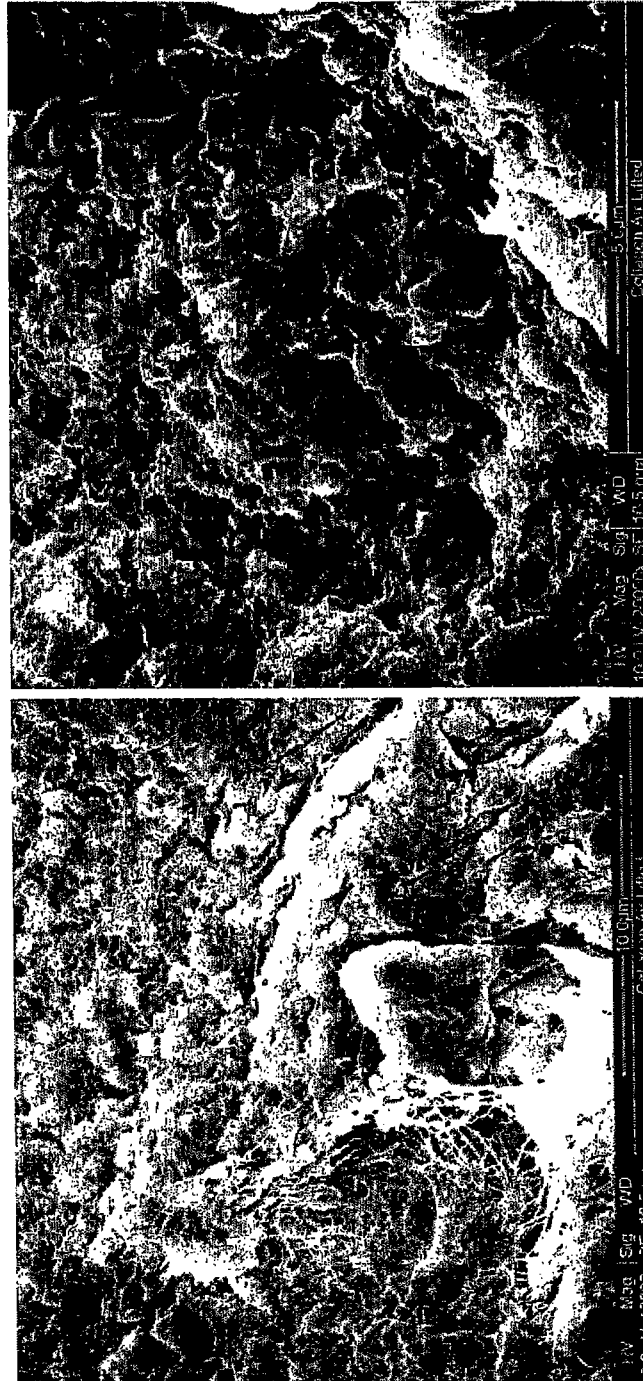


图 20b: 在 CSE-1 胶原格子中聚集的 UCMC 外观

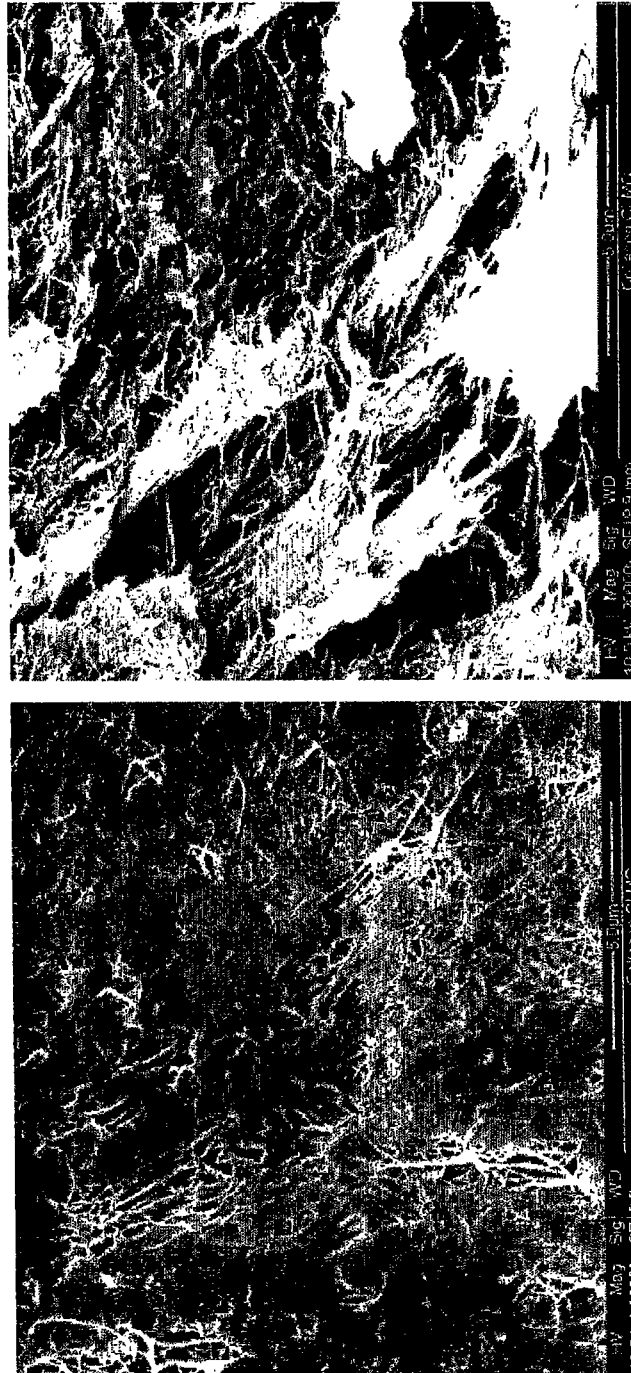


图 21a: 提升到气-液界面后的 CSE-2 的表面外观

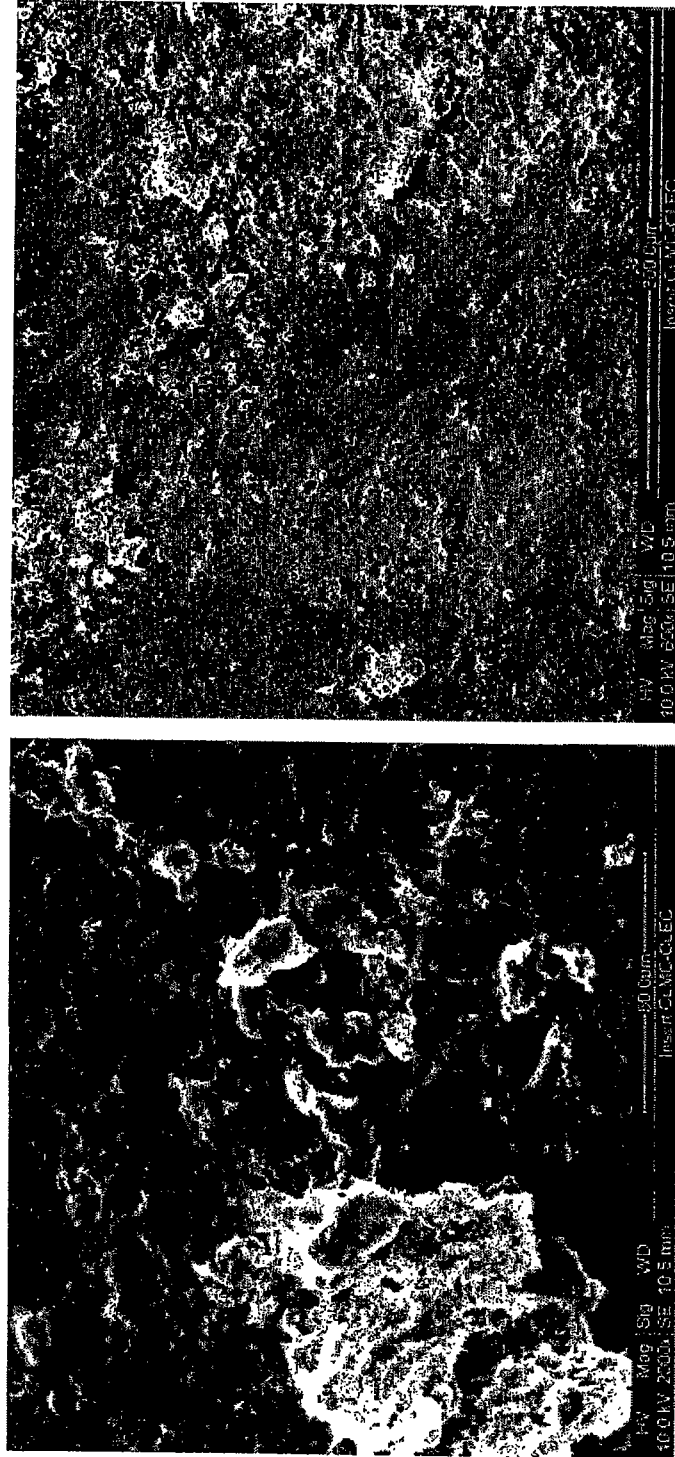


图 21b: 在 CSE-2 中培养的 UCMC 外观

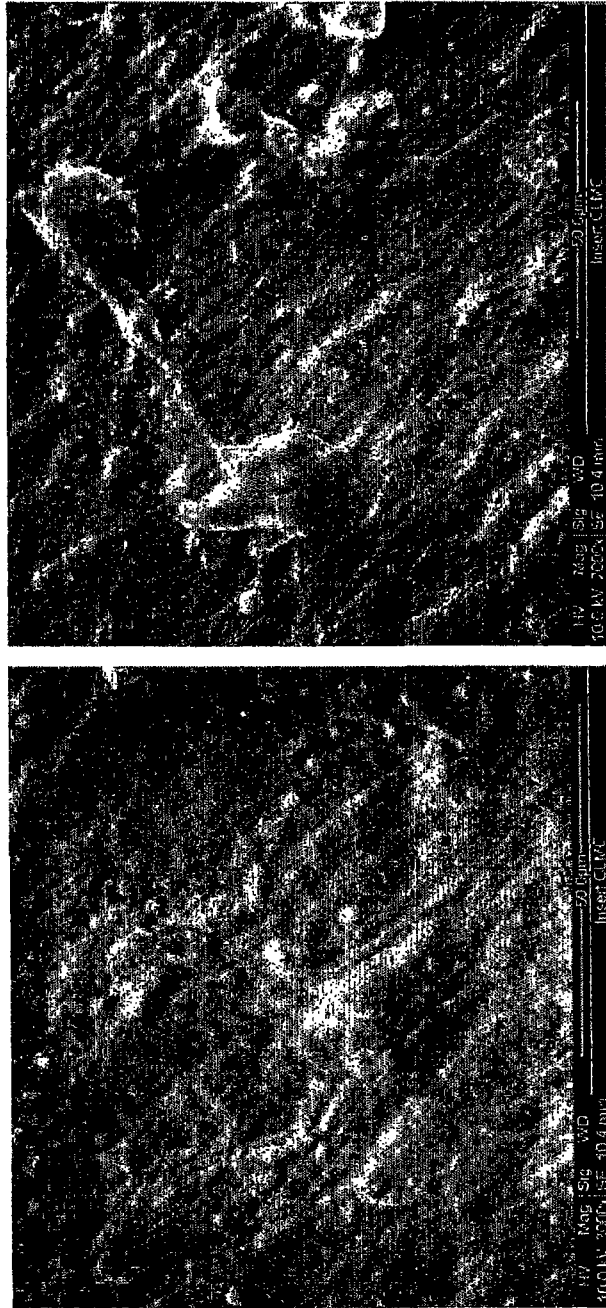


图 22a: UCEC 黏蛋白生产细胞的集落

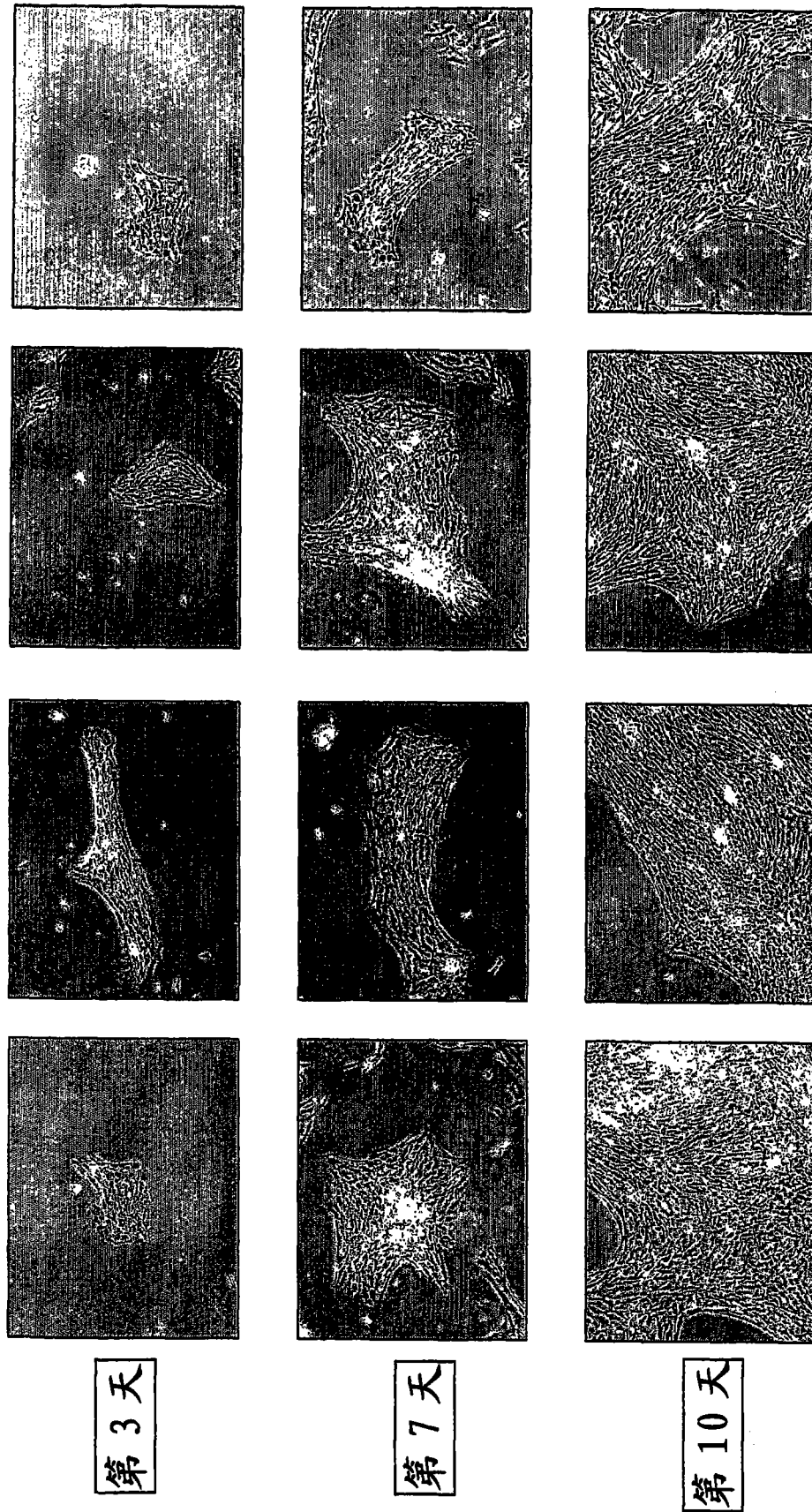


图 22b: UCEC 细胞培养上清液中黏蛋白分泌的考马斯染色

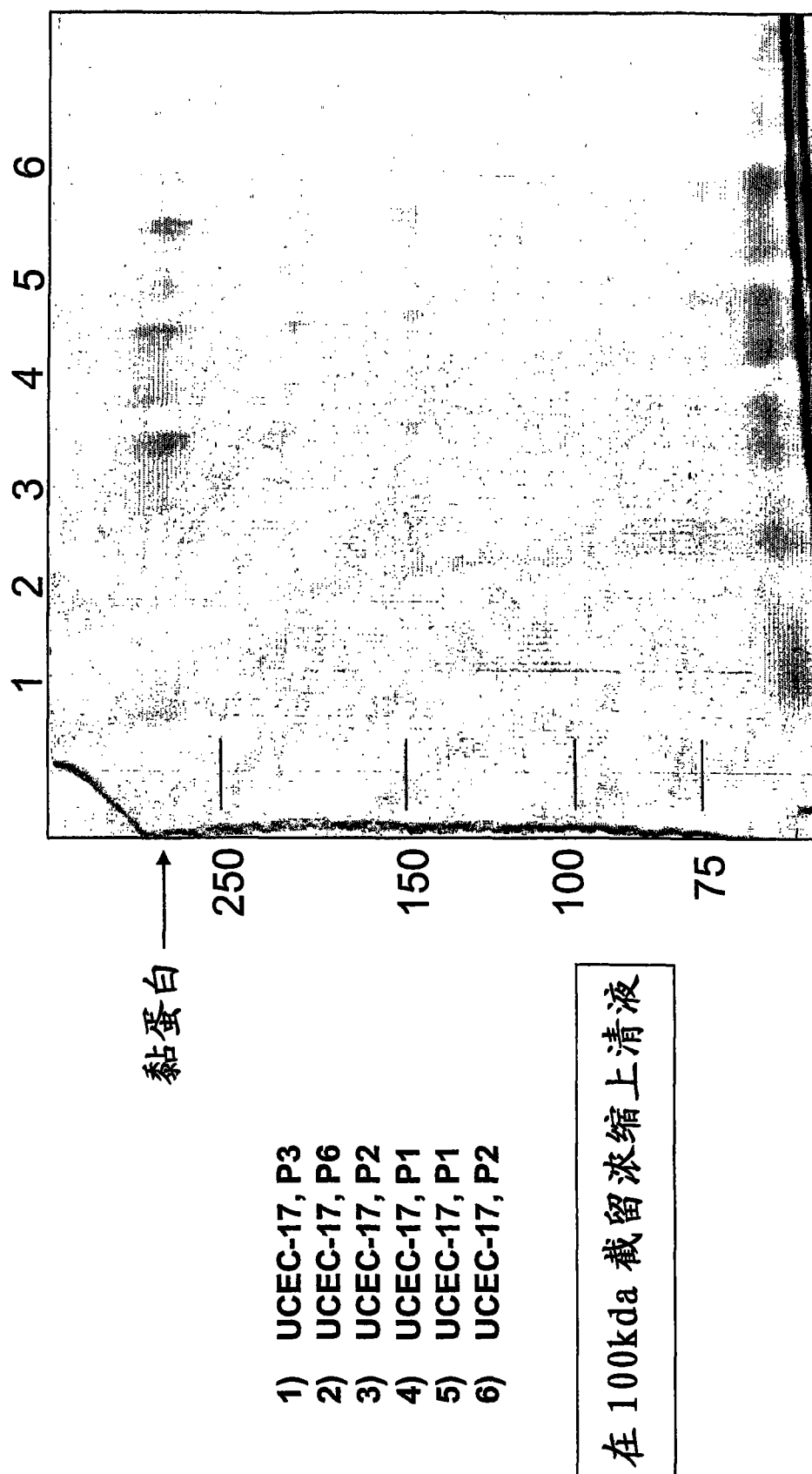
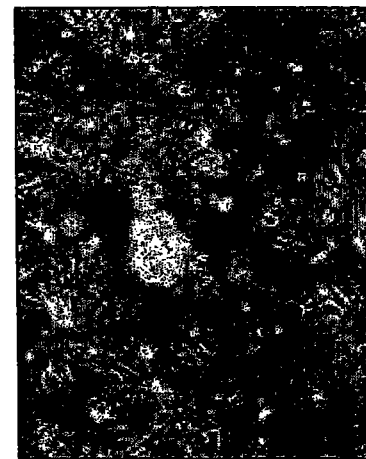


图 23: 通过补充烟酰胺的 PTT10 诱导的  
UCEC-18 的  $\beta$ -胰岛样结构



只有 PTT10

图 23a



PTT10 + 烟酰胺

图 23b



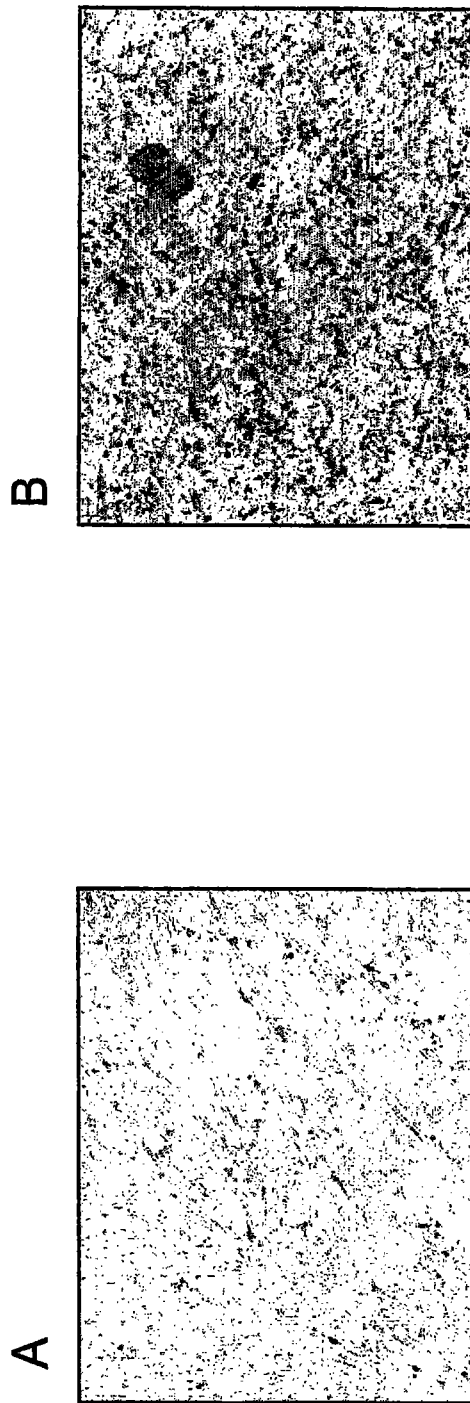


图 24

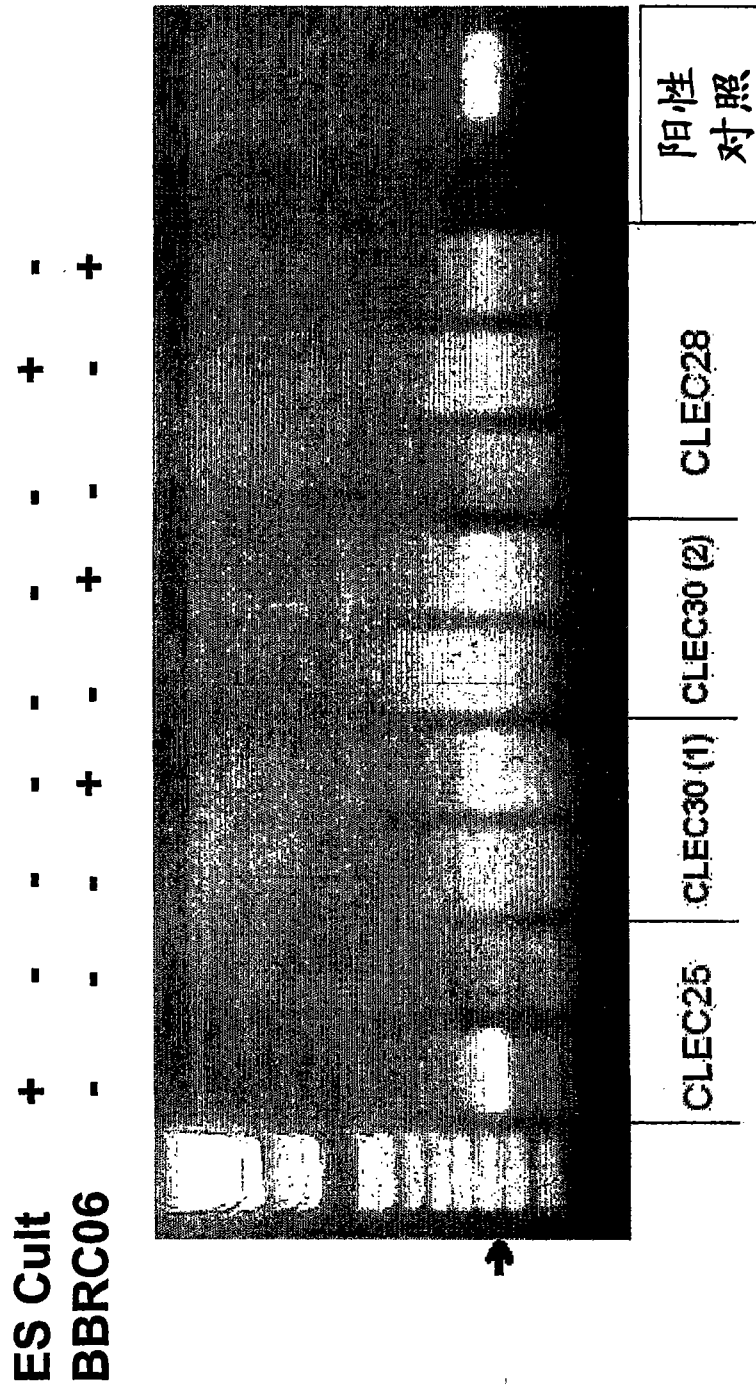
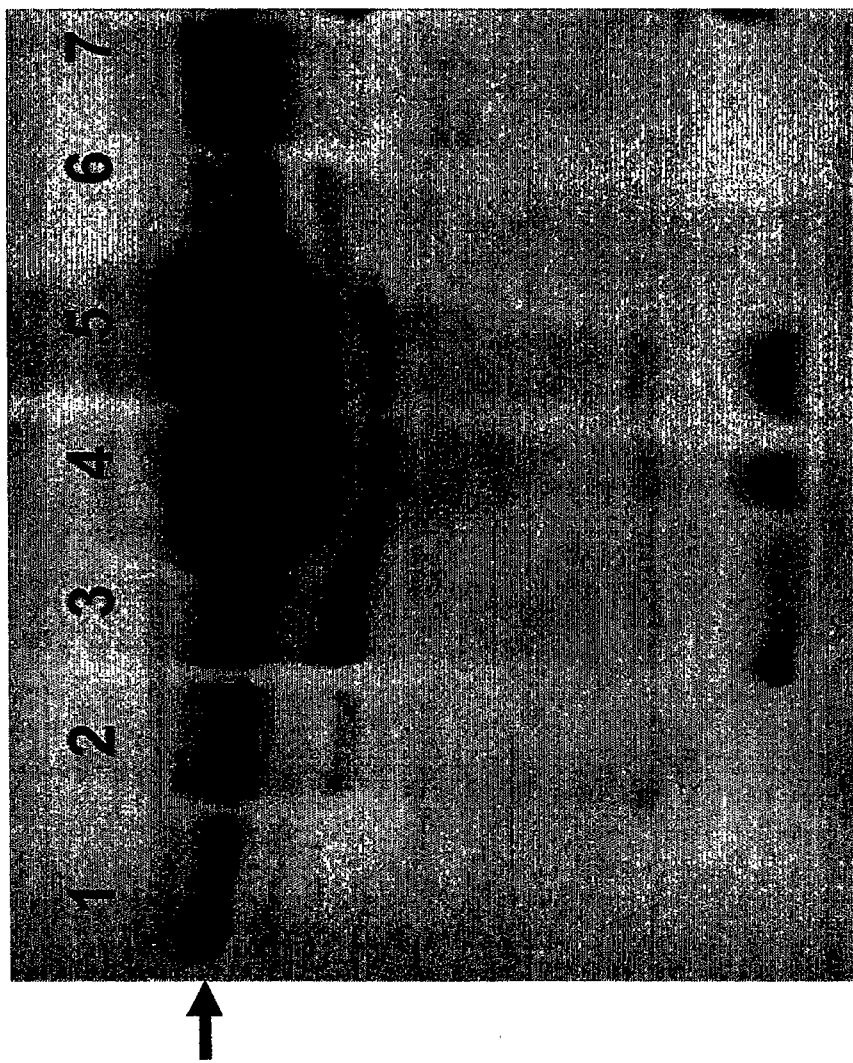


图 25

在 CLMC 条件培养基中酪氨酸羟化酶的分泌



道 1: CLMC-2  
道 2: CLMC-4,  
道 3: CLMC-9  
道 4: CLMC-9  
道 5: CLMC-10  
道 6: CLMC-10  
道 7: CLMC-15

**注意:** 第 4 和 5 道是在 PTT-2 培养基 (或前-神经原培养基) 中培养的 CLMC

图 26 A

CLMC 中的多巴胺表达

CLMC-2



CLMC-4



CLMC-9



CLMC-15

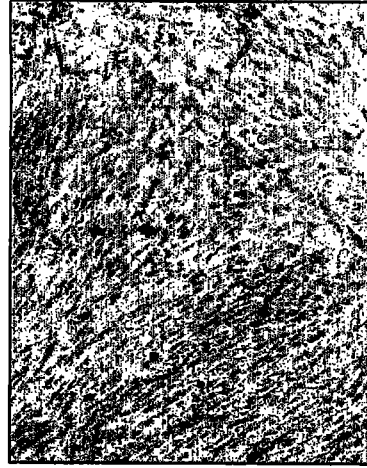
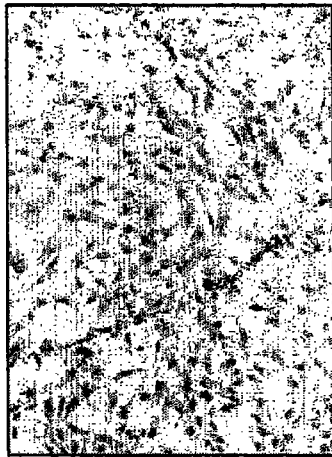


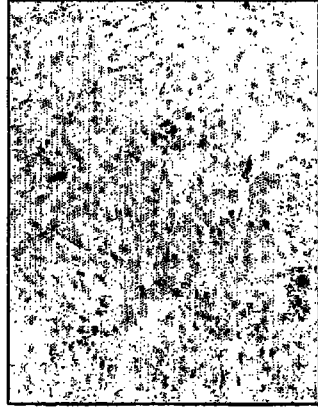
图 26 B

阴性对照染色

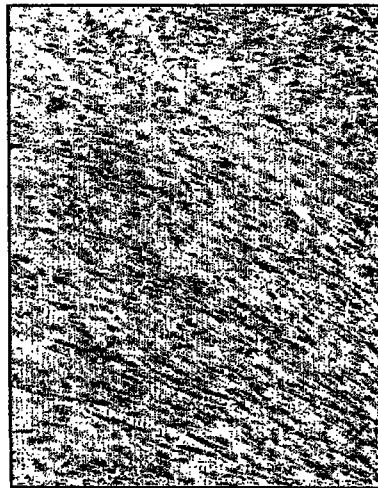
CLMC-2



CLMC-4



CLMC-9



CLMC-15

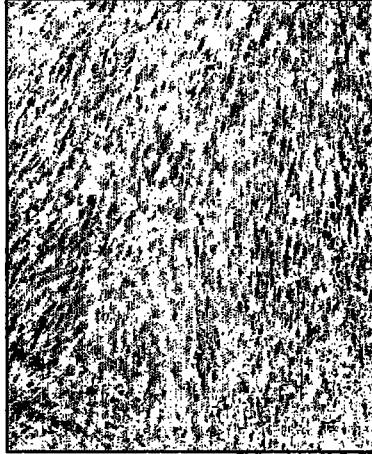


图 26 C

RT-PCR HLA-G

CLMC JAR CLEC

18, 19, 21, 22, 23 - + 18, 19, 19, 22, 22, 23

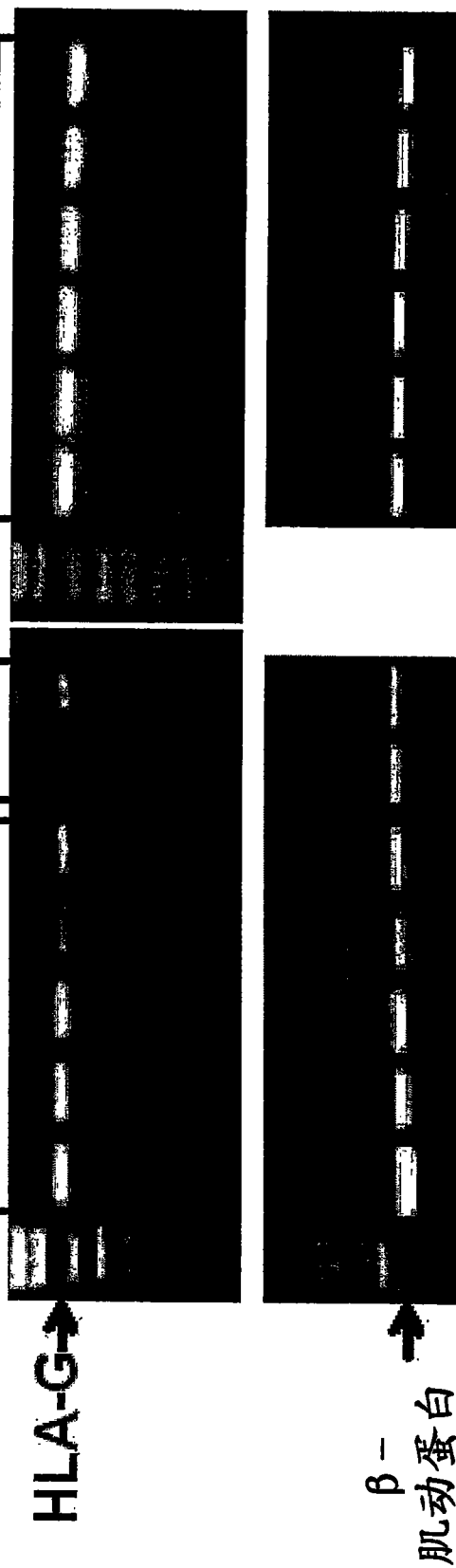


图 27A

用抗-HLA-G的 Western 印迹

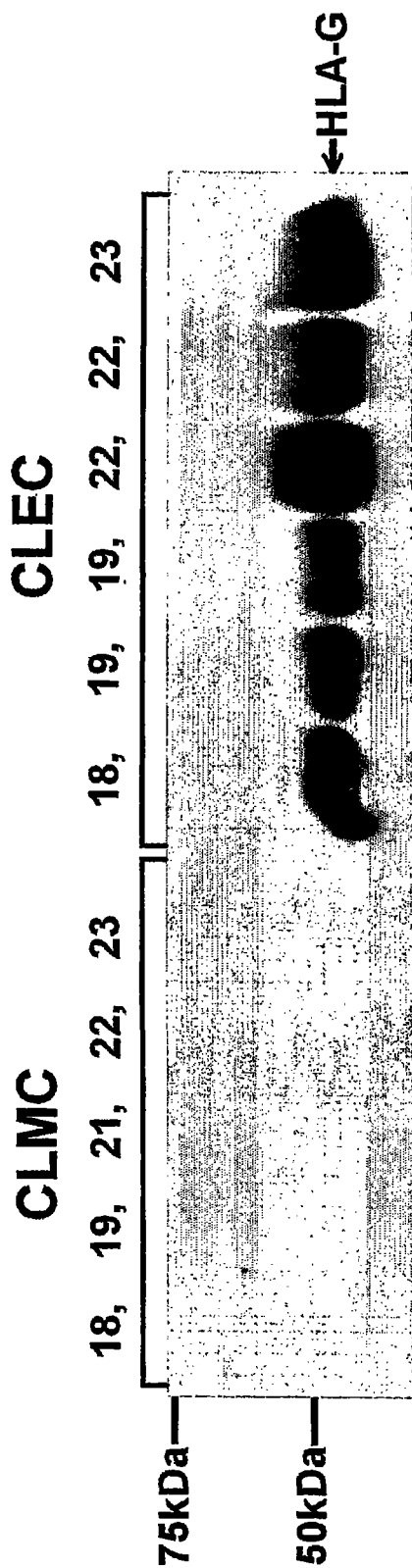


图 27 B

具CLMC细胞提取物的ask10(1)p3

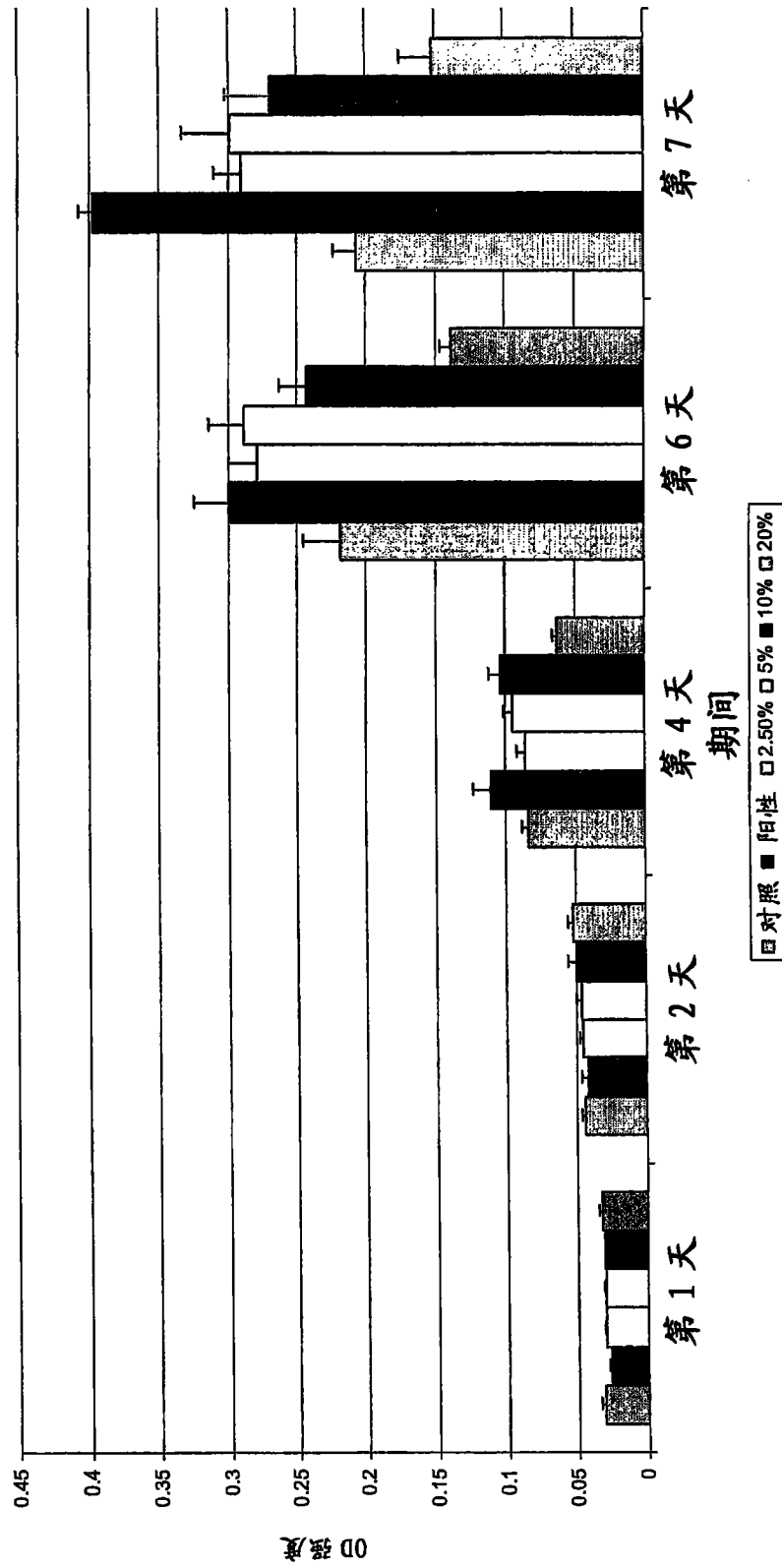


图 28 A



具 UCMC 提取物的 NF 125 P2

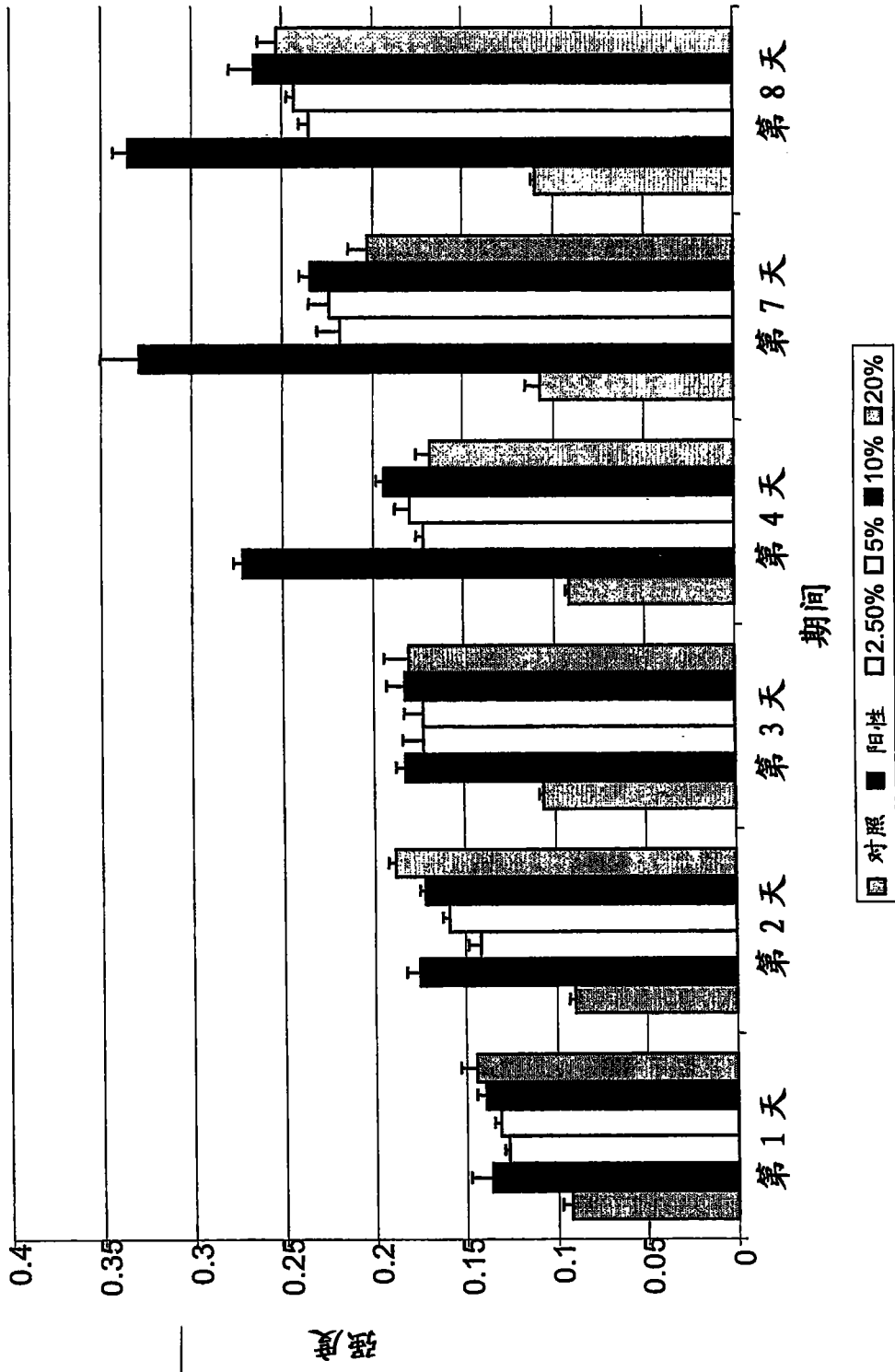


图 28 B

具 UCMC 提取物的 NF 119 P2

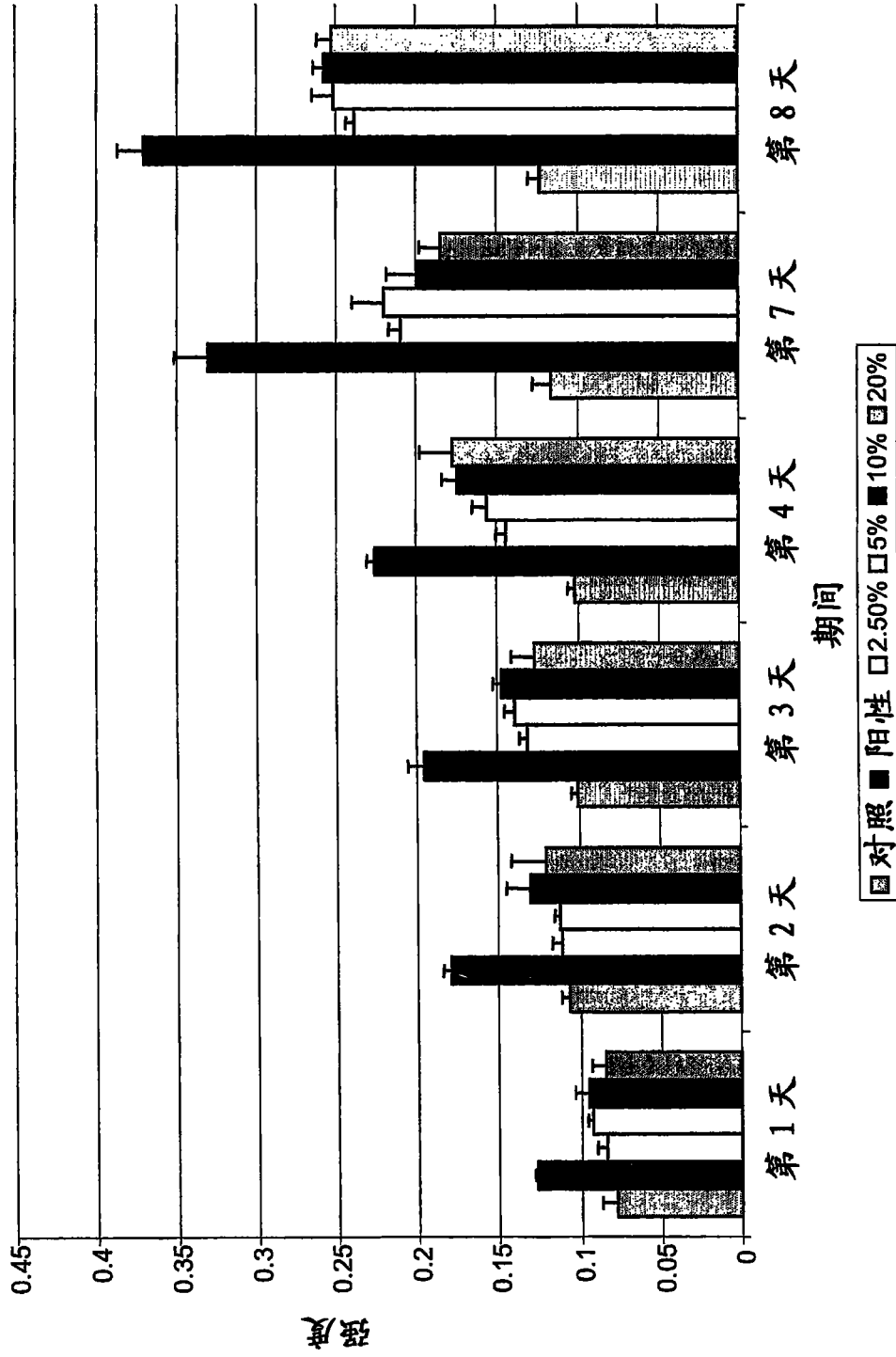


图 28 C



图 29 A





图 29 B



图 30 A: 接种在 TissuFleece 胶原支架中的 CLMC

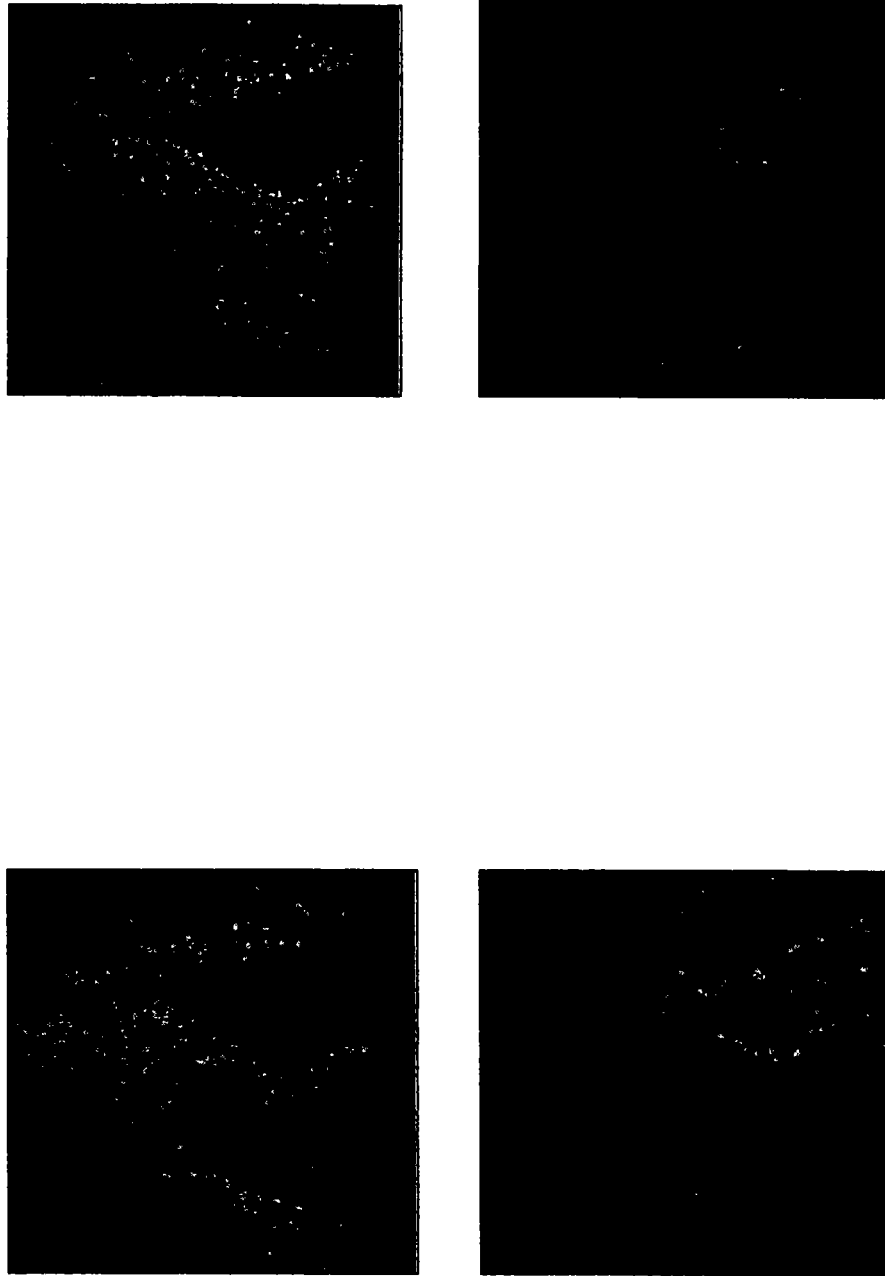
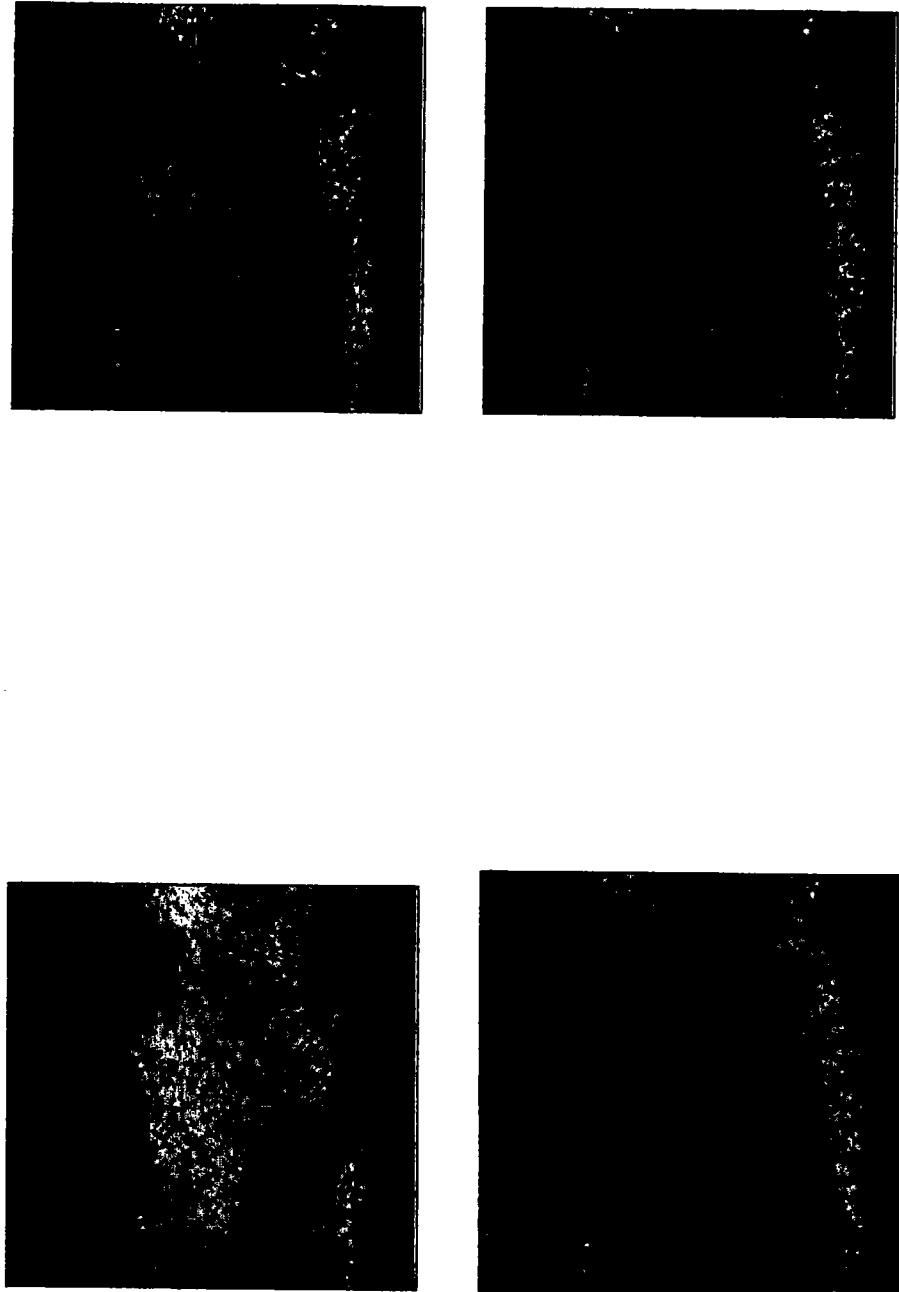


图 30 B: 接种在 BoneSave 支架中的 CLMC



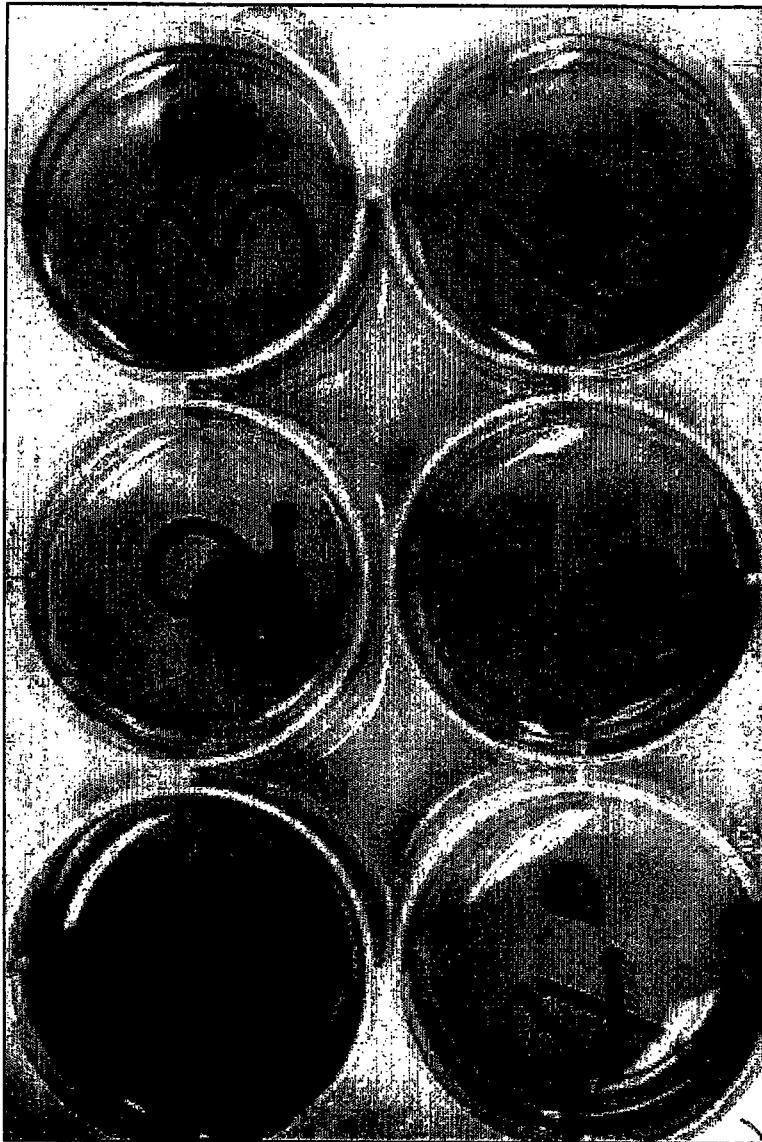


图 31 A



第21天的CLMC-聚集体  
胶原格子



第21天的无细胞胶原格子

图 31 B



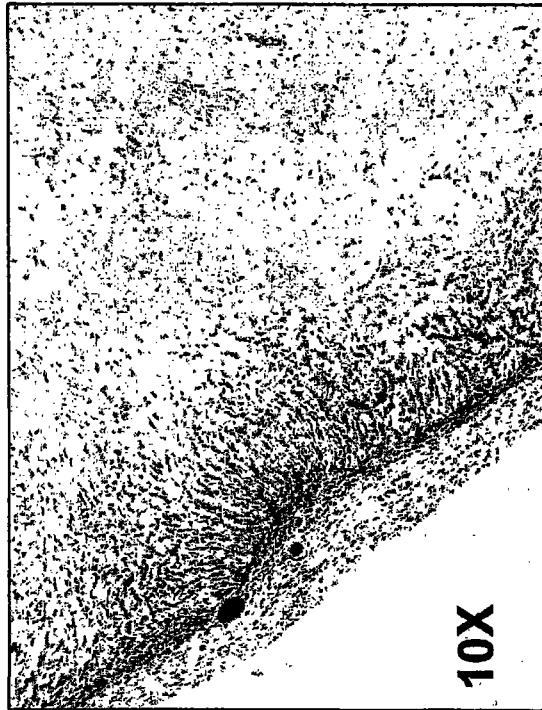
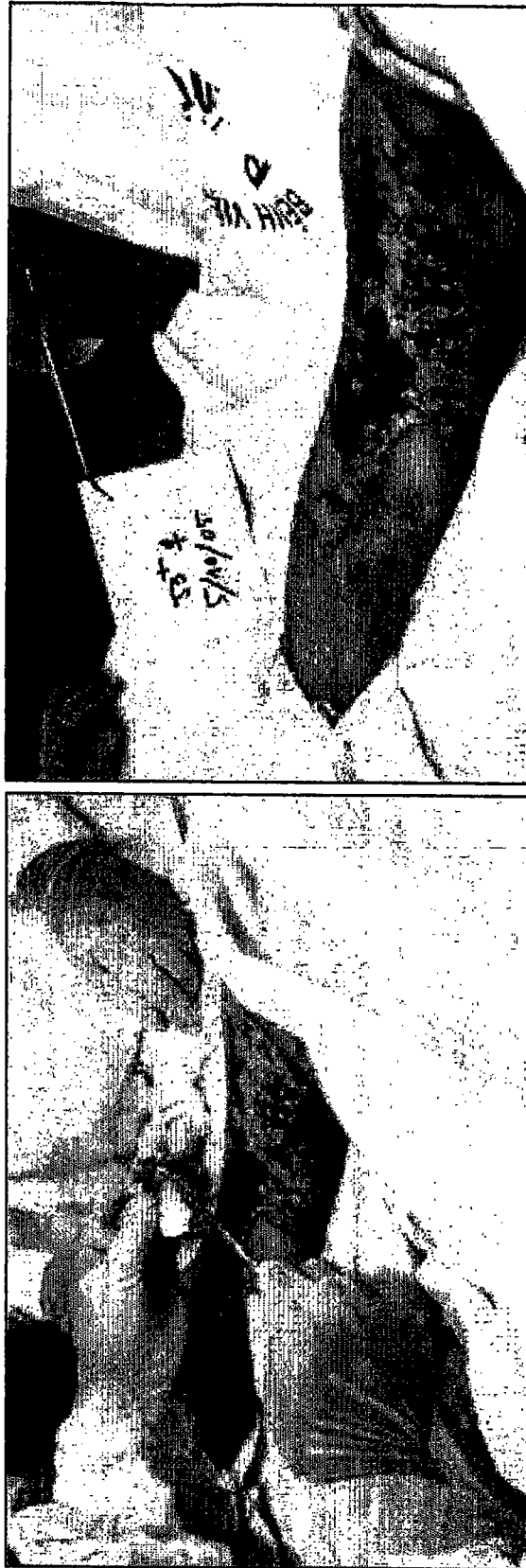


图 31 C

CLMC 移植病例研究 #1  
2005 年 10 月 5 日

53 岁成人, 女性\*  
全层—3 度烧伤



创面床准备

图 32 A

使用 Biobrane™ 将 CLMC 移植到创伤上



图 32 B

2005年10月12日，在第7天完全创伤愈合...无皮肤移植



3个月随访，2006年1月5日，无临床排斥

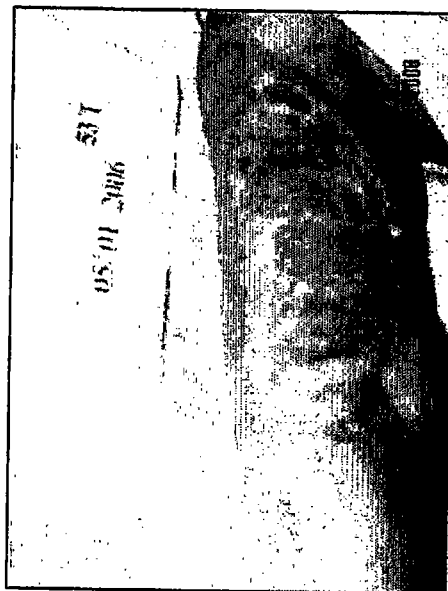
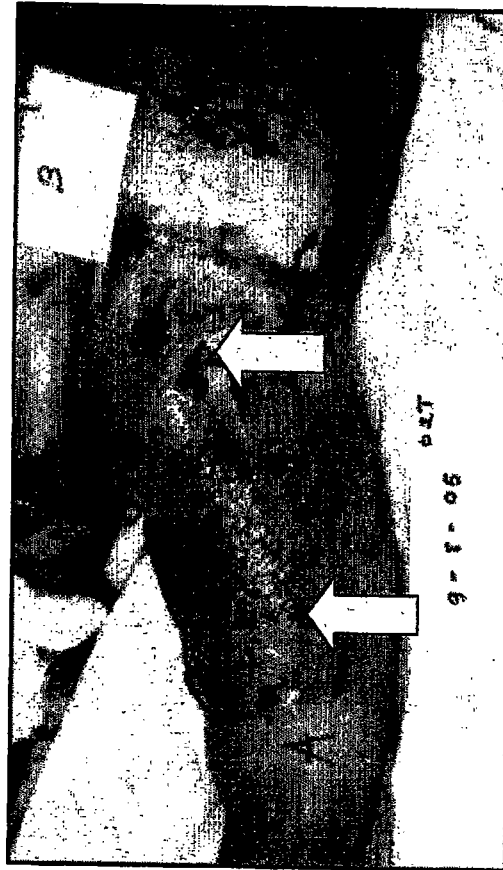


图 32 C

CLMC 移植, 病例研究#2, 2005年8月9日, 2岁儿童, 男性\*  
部分皮层-2度烧伤

2005年8月12日, 第3天完全创伤愈合



区域 A: CLMC 移植



区域 B: 正常敷料对照

图 33

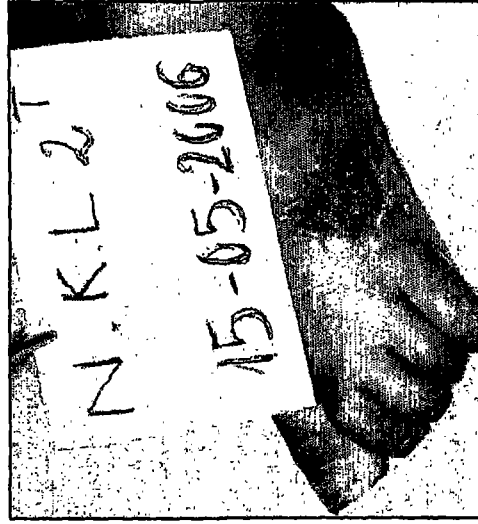


图 34

CLMC 移植病例研究 #3  
左踝血管瘤的放射疗法, 1 岁儿童

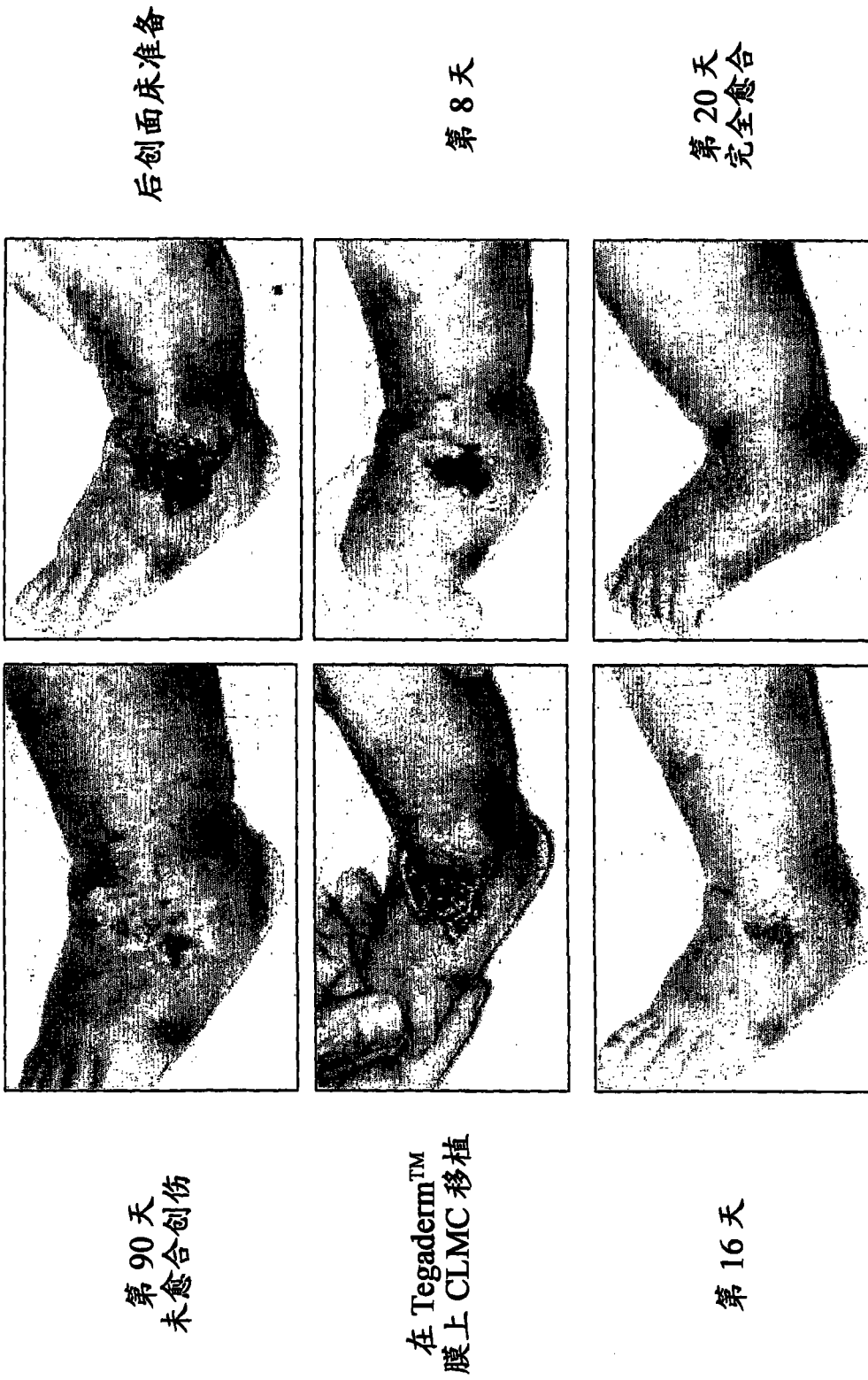


图 35

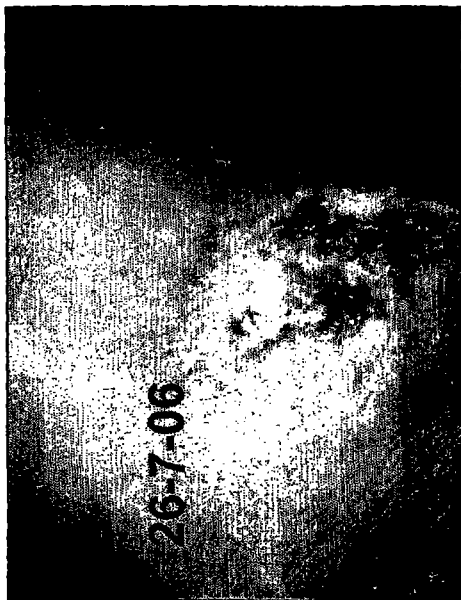
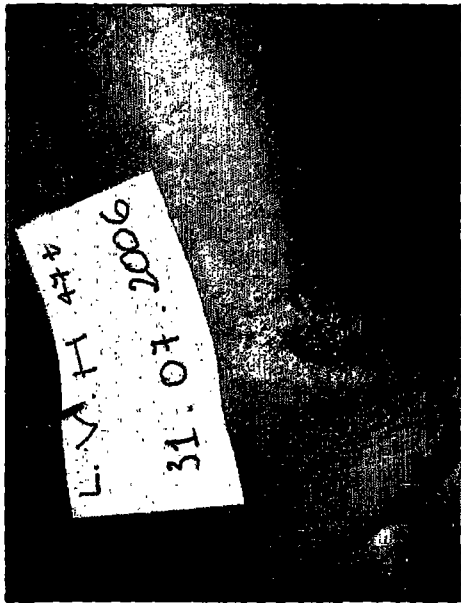


图 36





图 37 A



图 37 B

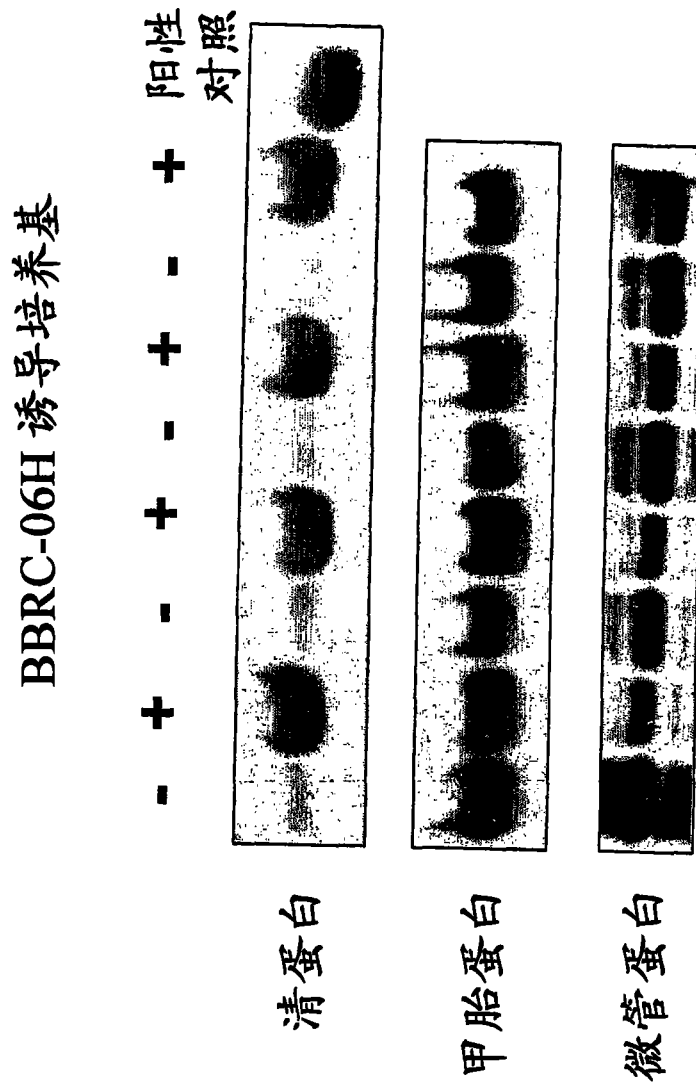


图 38