



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102732483 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 17

(21) 申请号 201110257057. 6

(22) 申请日 2011. 09. 01

(66) 本国优先权数据

201110081226. 5 2011. 03. 31 CN

(71) 申请人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路 5 号

申请人 北京瑞普晨创科技有限公司

(72) 发明人 邓宏魁 王承艳 汤旭明 苗振川

孙晓萌 吕娅歆 尹明

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限

公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 5/0789 (2010. 01)

权利要求书 3 页 说明书 8 页 附图 4 页

(54) 发明名称

造血祖细胞的制备方法及其专用培养基

(57) 摘要

本发明公开了一种造血祖细胞的制备方法及其专用培养基。本发明提供了由人胚胎干细胞或诱导的多潜能干细胞分化制备造血祖细胞的培养基,由细胞培养液 I、细胞培养液 II、细胞培养液 III 和细胞培养液 IV 组成。本发明的实验证明,建立了一个成分明确的,新的逐级诱导人胚胎干细胞分化产生造血祖细胞的体系,这不仅为进一步研究造血干/祖细胞分化产生提供了良好的研究平台,同时由于此分化体系是在无血清,无鼠源的基质细胞等,为获得造血祖细胞应用于临床血液疾病的治疗提供了分化方法。

1. 由人胚胎干细胞或诱导的多潜能干细胞分化制备如下权利要求 9 或 10 中任一所述造血祖细胞的培养基,由细胞培养液 I、细胞培养液 II、细胞培养液 III 和细胞培养液 IV 组成,

所述细胞培养液 I 按照如下方法制备:将 Activin A、骨形成蛋白-4、碱性成纤维生长因子和培养哺乳动物细胞的基础培养基混合,得到培养液,所述 Activin A 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml-25ng/ml,所述骨形成蛋白-4 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml-50ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 I 中的浓度为 10ng/ml-100ng/ml;

所述细胞培养液 II 按照如下方法制备:将成血管生长因子、碱性成纤维生长因子、B27 添加剂和培养哺乳动物细胞的基础培养基混合,得到培养液,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 10ng/ml-100ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 10ng/ml-100ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 II 中的浓度为 0.8% -1.2% (体积百分含量);

所述细胞培养液 III 按照如下方法制备:将成血管生长因子、碱性成纤维生长因子、B27 添加剂、TGF $\beta$  信号抑制剂和培养哺乳动物细胞的基础培养基混合,得到培养液,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 10ng/ml-100ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 10ng/ml-100ng/ml,所述 TGF $\beta$  信号抑制剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 2-ng/ml 20uM,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 0.8% -1.2% (体积百分含量);

所述细胞培养液 IV 按照如下方法制备:将干细胞因子、血小板生成素、Flt3-ligand、白介素-3、B27 添加剂和培养哺乳动物细胞的基础培养基混合,得到培养液,所述干细胞因子在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-200ng/ml,所述血小板生成素在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-200ng/ml,所述 Flt3-ligand 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-200ng/ml,所述白介素-3 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-200ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 0.8% -1.2% (体积百分含量)。

2. 根据权利要求 1 所述的培养基,其特征在于:

所述细胞培养液 I 中,所述 Activin A 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml-10ng/ml,所述骨形成蛋白-4 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml-25ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 I 中的浓度为 25ng/ml-50ng/ml;

所述细胞培养液 II 中,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 25ng/ml-50ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 25ng/ml-50ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 II 中的浓度为 1% (体积百分含量);

所述细胞培养液 III 中,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 25ng/ml-50ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 25ng/ml-50ng/ml,所述 TGF $\beta$  信号抑制剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 10uM-20uM,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 1% (体积百分含量);

所述细胞培养液 IV 中,所述干细胞因子在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-100ng/ml,所述血小板生成素在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-100ng/ml,所述 Flt3-ligand 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-100ng/ml,所述白介素-3 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为

50ng/ml-100ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 1% (体积百分含量)。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的培养基,其特征在于:

所述细胞培养液 I 中,所述 Activin A 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml、10ng/ml 或 25ng/ml,所述骨形成蛋白 -4 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml、25ng/ml 或 50ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 I 中的浓度为 10、25ng/ml、50ng/ml 或 100ng/ml ;

所述细胞培养液 II 中,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml 或 100ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml 或 100ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 II 中的浓度为 1% (体积百分含量);

所述细胞培养液 III 中,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml 或 100ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml 或 100ng/ml,所述 TGF  $\beta$  信号抑制剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 2uM、10uM 或 20uM,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 1% (体积百分含量);

所述细胞培养液 IV 中,所述干细胞因子在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml、100ng/ml 或 200ng/ml,所述血小板生成素在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml、100ng/ml 或 200ng/ml,所述 Flt3-ligand 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml、100ng/ml 或 200ng/ml,所述白介素 -3 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml、100ng/ml 或 200ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 1% (体积百分含量)。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的培养基,其特征在于:

所述细胞培养液 I、细胞培养液 II 和细胞培养液 III 中的培养哺乳动物细胞的基础培养基为 RPMI 1640 ;

所述细胞培养液 IV 中的培养哺乳动物细胞的基础培养基为 IMDM ;

所述 TGF  $\beta$  信号抑制剂为 SB 431542。

5. 一种用权利要求 1-4 中任一所述培养基制备所述造血祖细胞的方法,包括如下步骤:

1) 将离体的人胚胎干细胞或诱导的多潜能干细胞在权利要求 1-4 中任一所述培养基中的细胞培养液 I 上培养;

2) 步骤 1) 获得的细胞在权利要求 1-4 中任一所述培养基中的细胞培养液 II 上培养;

3) 步骤 2) 获得的细胞在权利要求 1-4 中任一所述培养基中的细胞培养液 III 上培养;

4) 步骤 3) 获得的细胞在权利要求 1-4 中任一所述培养基中的细胞培养液 IV 上培养;

得到造血祖细胞。

6. 根据权利要求 5 所述的制备方法,其特征在于:

步骤 1) 中,所述培养时间为 1.5 天 -2.5 天,所述培养时间具体为 2 天;

步骤 2) 中,所述培养时间为 1.5 天 -2.5 天,所述培养时间具体为 2 天;

步骤 3) 中,所述培养时间为 1.5 天 -2.5 天,所述培养时间具体为 2 天;

步骤 4) 中,所述培养时间为 6 天 -12 天,所述培养时间具体为 6 天、10 天或 12 天。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的方法,其特征在于:

所述人胚胎干细胞为可从商业途径获得的人胚胎干细胞系。

8. 根据权利要求 5-7 中任一所述的方法,其特征在于:所述可从商业途径获得的人胚胎干细胞系为下述任一种细胞系:BG01, BG02, BG03, BG04, SA01, SA02, SA03, ES01, ES02, ES03, ES04, ES05, ES06, TE03, TE32, TE33, TE04, TE06, TE62, TE07, TE72, UC01, UC06, WA01, WA07, WA09, WA13 和 WA14;所述编号为 NIH 的编号。

9. 造血祖细胞,是由人胚胎干细胞或诱导的多潜能干细胞分化获得 CD45<sup>+</sup> 造血祖细胞。

10. 根据权利要求 9 所述的造血祖细胞,其特征在于:所述人胚胎干细胞为可从商业途径获得的人胚胎干细胞系;

所述可从商业途径获得的人胚胎干细胞系为下述任一种细胞系:BG01, BG02, BG03, BG04, SA01, SA02, SA03, ES01, ES02, ES03, ES04, ES05, ES06, TE03, TE32, TE33, TE04, TE06, TE62, TE07, TE72, UC01, UC06, WA01, WA07, WA09, WA13 和 WA14;所述编号为 NIH 的编号。

## 造血祖细胞的制备方法及其专用培养基

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种造血祖细胞的制备方法及其专用培养基。

### 背景技术

[0002] 人多能干细胞(人胚胎干细胞和人诱导多能干细胞)具有在体外无限增殖的能力,并能分化产生各种细胞类型比如血液细胞,这将为治疗血液疾病提供了新的细胞来源。已有的研究报道了人多能干细胞在体外分化产生造血祖细胞的方法,他们主要采用与基质细胞共培养,拟胚体(embryonic body)分化的方式,这些分化方法有诸多的缺点,比如分化方向不定向,分化效率较低,并且分化条件中含有血清和鼠源基质细胞等,这将严重限制此类分化方法产生的造血细胞应用于血液疾病的治疗。

### 发明内容

[0003] 本发明的一个目的是提供一种由人胚胎干细胞或诱导的多潜能干细胞分化制备如下造血祖细胞的培养基。

[0004] 本发明提供的培养基,由细胞培养液 I、细胞培养液 II、细胞培养液 III 和细胞培养液 IV 组成,

[0005] 所述细胞培养液 I 按照如下方法制备:将 Activin A、骨形成蛋白-4、碱性成纤维生长因子和培养哺乳动物细胞的基础培养基混合,得到培养液,所述 Activin A 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml-25ng/ml,所述骨形成蛋白-4 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml-50ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 I 中的浓度为 10ng/ml-100ng/ml;

[0006] 所述细胞培养液 II 按照如下方法制备:将成血管生长因子、碱性成纤维生长因子、B27 添加剂和培养哺乳动物细胞的基础培养基混合,得到培养液,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 10ng/ml-100ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 10ng/ml-100ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 II 中的浓度为 0.8% -1.2% (体积百分含量);

[0007] 所述细胞培养液 III 按照如下方法制备:将成血管生长因子、碱性成纤维生长因子、B27 添加剂、TGF  $\beta$  信号抑制剂和培养哺乳动物细胞的基础培养基混合,得到培养液,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 10ng/ml-100ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 10ng/ml-100ng/ml,所述 TGF  $\beta$  信号抑制剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 2uM-20uM,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 0.8% -1.2% (体积百分含量);

[0008] 所述细胞培养液 IV 按照如下方法制备:将干细胞因子、血小板生成素、Flt3-ligand、白介素-3、B27 添加剂和培养哺乳动物细胞的基础培养基混合,得到培养液,所述干细胞因子在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-200ng/ml,所述血小板生

成素在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-200ng/ml,所述 Flt3-ligand 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-200ng/ml,所述白介素 -3 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-200ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 0.8% -1.2% (体积百分含量)。

[0009] 所述细胞培养液 I 中,所述 Activin A 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml-10ng/ml,所述骨形成蛋白 -4 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml-25ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 I 中的浓度为 25ng/ml-50ng/ml ;

[0010] 所述细胞培养液 II 中,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 25ng/ml-50ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 25ng/ml-50ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 II 中的浓度为 1% (体积百分含量) ;

[0011] 所述细胞培养液 III 中,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 25ng/ml-50ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 25ng/ml-50ng/ml,所述 TGF  $\beta$  信号抑制剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 10uM-20uM,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 1% (体积百分含量) ;

[0012] 所述细胞培养液 IV 中,所述干细胞因子在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-100ng/ml,所述血小板生成素在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-100ng/ml,所述 Flt3-ligand 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-100ng/ml,所述白介素 -3 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml-100ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 1% (体积百分含量)。

[0013] 所述细胞培养液 I 中,所述 Activin A 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml、10ng/ml 或 25ng/ml,所述骨形成蛋白 -4 在所述细胞培养液 I 中的浓度为 1ng/ml、25 或 50ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 I 中的浓度为 10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml 或 100ng/ml ;

[0014] 所述细胞培养液 II 中,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml 或 100ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 II 中的浓度为 10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml 或 100ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 II 中的浓度为 1% (体积百分含量) ;

[0015] 所述细胞培养液 III 中,所述成血管生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml 或 100ng/ml,所述碱性成纤维生长因子在所述细胞培养液 III 中的浓度为 10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml 或 100ng/ml,所述 TGF  $\beta$  信号抑制剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 2uM、10uM 或 20uM,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 1% (体积百分含量) ;

[0016] 所述细胞培养液 IV 中,所述干细胞因子在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml、100ng/ml 或 200ng/ml,所述血小板生成素在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml、100ng/ml 或 200ng/ml,所述 Flt3-ligand 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml、100ng/ml 或 200ng/ml,所述白介素 -3 在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 50ng/ml、100ng/ml 或 200ng/ml,所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 IV 中的浓度为 1% (体积百分含量)。

[0017] 所述细胞培养液 I、细胞培养液 II 和细胞培养液 III 中的培养哺乳动物细胞的基础培养基为 RPMI 1640；

[0018] 所述细胞培养液 IV 中的培养哺乳动物细胞的基础培养基为 IMDM；

[0019] 所述 TGF  $\beta$  信号抑制剂为 SB 431542。

[0020] 本发明的另一个目的是提供一种用上述培养基制备所述造血祖细胞的方法。

[0021] 本发明提供的方法,包括如下步骤:

[0022] 1) 将离体的人胚胎干细胞或诱导的多潜能干细胞在所述培养基中的细胞培养液 I 上培养;

[0023] 2) 步骤 1) 获得的细胞在所述培养基中的细胞培养液 II 上培养;

[0024] 3) 步骤 2) 获得的细胞在所述培养基中的细胞培养液 III 上培养;

[0025] 4) 步骤 3) 获得的细胞在所述培养基中的细胞培养液 IV 上培养,得到造血祖细胞。

[0026] 步骤 1) 中,所述培养时间为 1.5 天-2.5 天,所述培养时间具体为 2 天;

[0027] 步骤 2) 中,所述培养时间为 1.5 天-2.5 天,所述培养时间具体为 2 天;

[0028] 步骤 3) 中,所述培养时间为 1.5 天-2.5 天,所述培养时间具体为 2 天;

[0029] 步骤 4) 中,所述培养时间为 6 天-12 天,所述培养时间具体为 6 天、10 天或 12 天。

[0030] 所述人胚胎干细胞为可从商业途径获得的人胚胎干细胞系。

[0031] 所述可从商业途径获得的人胚胎干细胞系为下述任一种细胞系:BG01, BG02, BG03, BG04, SA01, SA02, SA03, ES01, ES02, ES03, ES04, ES05, ES06, TE03, TE32, TE33, TE04, TE06, TE62, TE07, TE72, UC01, UC06, WA01, WA07, WA09, WA13 和 WA14;所述编号为 NIH 的编号。

[0032] 本发明的第三个目的是提供一种造血祖细胞。

[0033] 本发明提供的造血祖细胞,是由人胚胎干细胞或诱导的多潜能干细胞分化获得造血祖细胞。

[0034] 所述人胚胎干细胞为可从商业途径获得的人胚胎干细胞系。

[0035] 所述可从商业途径获得的人胚胎干细胞系为下述任一种细胞系:BG01, BG02, BG03, BG04, SA01, SA02, SA03, ES01, ES02, ES03, ES04, ES05, ES06, TE03, TE32, TE33, TE04, TE06, TE62, TE07, TE72, UC01, UC06, WA01, WA07, WA09, WA13 和 WA14;所述编号为 NIH 的编号。

[0036] 本发明的实验证明,本发明提供了一个成分明确的、新的逐级诱导人胚胎干细胞分化产生造血祖细胞的体系和用于分化的培养基这不仅为进一步研究造血干/祖细胞分化产生提供了良好的研究平台,同时由于此分化体系是在无血清,无鼠源的基质细胞等,为获得造血祖细胞应用于临床血液疾病的治疗提供了分化方法,重要的是,培养基中的 SB 431542 结合 VEGF 和 bFGF,能促进新生造血祖细胞的高效产生,比以前已有的报道提高了两倍以上。因此,建立的分化体系以及专用培养基将为临床上应用干细胞分化的造血祖细胞提供大量细胞来源,具有潜在的,重要的临床应用价值。

#### 附图说明

[0037] 图 1 为人胚胎干细胞向造血细胞分化过程经历生血内皮细胞阶段

[0038] 图 2 为建立逐级诱导分化体系

- [0039] 图 3 为 VEGF 能诱导早期中胚层细胞分化产生生血内皮细胞
- [0040] 图 4 为信号分子诱导生血内皮细胞向新生造血祖细胞的分化
- [0041] 图 5 为第四天添加 SB 431542 促进造血细胞的分化
- [0042] 图 6 为 SB 431542 协同 VEGF 和 bFGF 诱导产生的新生造血祖细胞具有更强的造血集落形成能力
- [0043] 图 7 为 SB431542 降低了分化细胞的凋亡比例
- [0044] 图 8 为人胚胎干细胞向造血祖细胞逐级分化

## 具体实施方式

- [0045] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0046] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0047] 实施例 1、人胚胎干细胞向造血祖细胞的定向分化系统条件的摸索
- [0048] 1、分化系统的建立
- [0049] 通过追踪体内造血干细胞发生,证明了生血内皮细胞能直接产生造血干细胞。
- [0050] 根据这个发现,利用人胚胎干细胞体外分化体系,发现在人胚胎干细胞分化的中胚层细胞(KDR+)会进一步分化产生具有内皮细胞性质和产生造血细胞的一群细胞,将这群细胞命名为生血内皮细胞。生血内皮细胞主要富集在 CD31+ 的细胞群中,这群生血内皮细胞能直接产生 CD45+ 的造血细胞,同时表达 CD34+, KDR+, Tie-2, Ac-LDL 和 PDGFa- 等表面标志(图 1 为人胚胎干细胞向造血细胞分化过程经历生血内皮细胞阶段,生血内皮细胞富集在 CD31+ 细胞群中,这些细胞能产生造血 CD45+ 细胞并表现内皮细胞的性质。)
- [0051] 2、追踪分化过程
- [0052] 在鉴定了人胚胎干细胞向造血祖细胞分化过程需要经历生血内皮细胞以及新生造血祖细胞后,追踪了整个分化过程。
- [0053] 结果图 2A 所示,为追踪人胚胎干细胞向造血细胞分化过程,发现 BRACHYURY, KDR, CD31, CD43, CD45 逐步出现,具体如下:
- [0054] 人胚胎干细胞经过 2 天的分化,会产生 BRACHYURY+ 的原条细胞以及 KDR+ 的早期中胚层细胞;经过的分化,从早期中胚层细胞中会逐渐产生生血内皮细胞,生血内皮细胞主要富集在 CD31+ 的细胞中;经过的分化,CD31+ 的生血内皮细胞会逐渐产生 CD43+ 的新生造血祖细胞;经过进一步分化,这些 CD43+ 的新生造血祖细胞能逐渐产生 CD45+ 的造血祖细胞。
- [0055] 根据这个分化过程,建立了一个新的逐级分化的策略(见图 2B,为根据 2A 中的变化,将人胚胎干细胞向造血细胞分化过程分为四个步骤。):第一步:人胚胎干细胞分化产生原条/早期中胚层细胞;第二步:早期中胚层细胞分化产生生血内皮细胞;第三步,生血内皮细胞分化产生新生造血祖细胞;第四步:新生造血祖细胞进一步产生造血祖细胞。这个逐级分化的过程为寻找新的促进造血祖细胞产生的诱导信号提供了良好的研究平台。
- [0056] 3、早期中胚层细胞产生生血内皮细胞的信号
- [0057] 首先研究了调控早期中胚层细胞向生血内皮细胞分化的信号。
- [0058] 将各种调控早期造血发育的信号分化添加到分化第二天的细胞。
- [0059] 结果如图 3 所示,其中,可以看出,经过不同细胞因子的处理后,只有 VEGF 信号分子可以诱导早期中胚层细胞(KDR+)产生出 CD31+ 富含生血内皮的细胞(图 3A)。同时也发



现 bFGF 有显著的协同作用,促进 VEGF 诱导 CD31+ 细胞的产生(图 3B,图 3C)。

[0060] 4、SB 431542 促进生血内皮细胞产生造血祖细胞

[0061] 在确定了诱导生血内皮产生的信号后,进一步研究生血内皮是如何产生新生造血祖细胞的。

[0062] 待人胚胎干细胞分化到第四天时,也就是生血内皮产生之后,将调控造血细胞的信号分子添加到分化培养基中,培养 2 天。

[0063] 结果如图 4 所示,经过两天的继续分化,发现在这些测试的信号分子中,包括 VEGF, bFGF, RA 和 SB 431542 都能促进新生造血祖细胞 CD43+ 的产生。

[0064] 待人胚胎干细胞四天时,将 SB 431542 添加到分化培养基中,培养 2 天。

[0065] 结果如下:

[0066] 进一步,发现 SB 431542 在第四天添加比其他天添加对促进造血基因的表达是最有效的。

[0067] 发现 SB 431542 促进了 CD43+CD235a- 新生造血祖细胞的产生。同时发现经过 SB43152 协同 VEGF 和 bFGF,能提高 CD43+ 细胞的产量超过两倍,而不影响 CD31+ 细胞的产生(图 5 为第四天添加 SB 431542 促进造血细胞的分化)。

[0068] 同时,发现经过 SB 431542 诱导的新生造血祖细胞能进一步产生造血祖细胞并且具备更强的造血集落形成能力(图 6 为 SB 431542 协同 VEGF 和 bFGF 诱导产生的新生造血祖细胞具有更强的造血集落形成能力。)

[0069] 5、SB 431542 是通过抑制凋亡信号促进造血祖细胞的产生

[0070] 进一步研究 SB 431542 是如何促进生血内皮细胞向造血细胞的分化。

[0071] 结果如图 7 所示,发现 SB431542 不影响 CD31+, CD43+ 细胞的增殖,但是能降低分化细胞的凋亡效率。

[0072] 实施例 2、人胚胎干细胞向造血祖细胞的定向分化及鉴定

[0073] 人胚胎干细胞系 H1 购自美国 Wicell 公司。

[0074] (一) 人胚胎干细胞向造血祖细胞的定向分化(细胞培养基 pH 值都在 7.0-7.2 间)

[0075] 1、方法一:

[0076] 在研究生血内皮细胞的产生信号以及调控生血内皮细胞向新生造血祖细胞分化的信号后,根据上述新的逐级分化方法,完成人胚胎干细胞向造血祖细胞的定向分化,具体如下:

[0077] 1) 将生长密度达  $(1 \times 10^4)$  的人胚胎干细胞 H1 接种到 Matrigel(BD, 产品目录号为 356230) 处理过的 12 孔板(BD Falcon) 上,然后加入人胚胎干细胞培养基(含有 4ng/ml bFGF(PeproTech, 产品目录号为 AF-100-18B) 和 20% KnockOut SR(Invitrogen, 产品目录号为 10828-028) 的 DMEM/F12 培养基(Invitrogen, 产品目录号为 11330-032),在 37°C、5%二氧化碳培养条件下培养 1 天;

[0078] 2) 将步骤 1) 得到的细胞换为第一步分化培养液(细胞培养液 I),在温度为 37°C、5%二氧化碳细胞培养条件下培养两天;

[0079] 第一步分化培养液按照如下方法配制得到:将 Activin A(PeproTech, 产品目录号为 120-14)、BMP4(骨形成蛋白-4 购自 R&D, 产品目录号为 314-BP-050)、bFGF(碱性成纤维

生长因子, PeproTech, 产品目录号 AF-100-18B) 和 RPMI 1640 (Invitrogen, 产品目录号为 31800-022) 混合, 得到第一步分化培养液, Activin A 在所述第一步分化培养液中的浓度为 25ng/ml, BMP4 在所述第一步分化培养液中的浓度为 25ng/ml, bFGF 在所述第一步分化培养液中的浓度为 25ng/ml。

[0080] 3) 将步骤 2) 得到的细胞换用第二步分化培养液 (细胞培养液 II), 在温度为 37°C、5%二氧化碳培养条件下培养两天,

[0081] 所述第二步分化培养液按照如下方法配制得到: 将 VEGF (成血管生长因子, PeproTech, 产品目录号为 100-20A)、bFGF (碱性成纤维生长因子, PeproTech, 产品目录号为 AF-100-188)、B27 添加剂 (Invitrogen, 产品目录号为 17504044) 和 RPMI 1640 (Invitrogen, 产品目录号为 31800-022) 混合, 得到第二步分化培养液, VEGF 在第二步分化培养液中的浓度为 50ng/ml, bFGF 在第二步分化培养液中的浓度为 50ng/ml, 所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 II 中的浓度为 1% (体积百分含量)。

[0082] 4) 将步骤 3) 得到的细胞换用第三步分化培养液 (细胞培养液 III), 在温度为 37°C、5%二氧化碳培养条件下培养 2 天;

[0083] 所述第三步分化培养液按照如下方法配制得到: 将 VEGF (成血管生长因子, PeproTech, 产品目录号为 100-20A)、bFGF (碱性成纤维生长因子, PeproTech, 产品目录号为 AF-100-188)、B27 添加剂、SB 431542 (Tocris, 产品目录号为 1614) 和 RPMI 1640 (Invitrogen, 产品目录号为 31800-022) 混合, 得到第三步分化培养液, VEGF 在第三步分化培养液中的浓度为 50ng/ml, bFGF 在第三步分化培养液中的浓度为 50ng/ml, SB 431542 在第三步分化培养液中的浓度为 20 $\mu$ M, B27 添加剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 1% (体积百分含量)。

[0084] 5) 将步骤 4) 得到的细胞换用第四步分化培养液 (细胞培养液 IV), 在温度为 37°C、5%二氧化碳条件下, 培养 12 天; 得到细胞。

[0085] 所述第四步分化培养液按照如下方法配制得到: 将 SCF (干细胞因子, Perotech, 产品目录号为 AF-300-07)、TPO (血小板生成素, Peprotech, 产品目录号为 AF-300-18)、Flt3-Ligand (Perotech, 产品目录号为 AF-300-19)、IL3 (白介素 -3, Peprotech, 产品目录号为 200-13)、B27 添加剂和 IMDM (Invitrogen, 产品目录号为 31800-022) 培养基混合, 得到第四步分化培养液, SCF 在第四步分化培养液中的浓度为 50ng/ml, TPO 在第四步分化培养液中的浓度为 50ng/ml, Flt3-Ligand 在第四步分化培养液中的浓度为 50ng/ml, IL3 在第四步分化培养液中的浓度为 50ng/ml, B27 添加剂在第四步分化培养液中的浓度为 1% (体积百分含量)。

[0086] 2、方法二:

[0087] 1) 与方法一相同;

[0088] 2) 与方法一基本相同, 不同的是将第一步分化培养液替换为细胞培养液 I-1;

[0089] 第一步分化培养液按照如下方法配制得到: 将 Activin A、BMP4、bFGF 和 RPMI 1640 混合, 得到第一步分化培养液, Activin A 在所述第一步分化培养液中的浓度为 1ng/ml, BMP4 在所述第一步分化培养液中的浓度为 25ng/ml, bFGF 在所述第一步分化培养液中的浓度为 10ng/ml。

[0090] 3) 与方法一基本相同, 不同的是将第二步分化培养液替换为细胞培养液 II-1;

[0091] 所述第二步分化培养液按照如下方法配制得到：将 VEGF、bFGF、B27 添加剂和 RPMI1640 混合，得到第二步分化培养液，VEGF 在第二步分化培养液中的浓度为 10ng/ml，bFGF 在第二步分化培养液中的浓度为 10ng/ml，所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 II 中的浓度为 0.8%（体积百分含量）。

[0092] 4) 与方法一基本相同，不同的是将第三步分化培养液替换为细胞培养液 III-1；

[0093] 所述第三步分化培养液按照如下方法配制得到：将 VEGF、bFGF、B27 添加剂、SB431542 和 RPMI 1640 混合，得到第三步分化培养液，VEGF 在第三步分化培养液中的浓度为 10ng/ml，bFGF 在第三步分化培养液中的浓度为 10ng/ml，SB 431542 在第三步分化培养液中的浓度为 2uM，B27 添加剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 0.8%（体积百分含量）。

[0094] 5) 与方法一基本相同，不同的是将第四步分化培养液替换为细胞培养液 IV-1；得到细胞；

[0095] 所述第四步分化培养液按照如下方法配制得到：将 SCF、TPO、Flt3-Ligand、IL3、B27 添加剂和 IMDM 培养基混合，得到第四步分化培养液，SCF 在第四步分化培养液中的浓度为 100ng/ml，TPO 在第四步分化培养液中的浓度为 100ng/ml，Flt3-Ligand 在第四步分化培养液中的浓度为 100ng/ml，IL3 在第四步分化培养液中的浓度为 100ng/ml，B27 添加剂在第四步分化培养液中的浓度为 0.8%（体积百分含量）。

[0096] 3、方法三：

[0097] 1) 与方法一相同；

[0098] 2) 与方法一基本相同，不同的是将第一步分化培养液替换为细胞培养液 I-2；

[0099] 第一步分化培养液按照如下方法配制得到：将 Activin A、BMP4、bFGF 和 RPMI 1640 混合，得到第一步分化培养液，Activin A 在所述第一步分化培养液中的浓度为 10ng/ml，BMP4 在所述第一步分化培养液中的浓度为 50ng/ml，bFGF 在所述第一步分化培养液中的浓度为 100ng/ml。

[0100] 3) 与方法一基本相同，不同的是将第二步分化培养液替换为细胞培养液 II-2；

[0101] 所述第二步分化培养液按照如下方法配制得到：将 VEGF、bFGF、B27 添加剂和 RPMI1640 混合，得到第二步分化培养液，VEGF 在第二步分化培养液中的浓度为 100ng/ml，bFGF 在第二步分化培养液中的浓度为 100ng/ml，所述 B27 添加剂在所述细胞培养液 II 中的浓度为 1.2%（体积百分含量）。

[0102] 4) 与方法一基本相同，不同的是将第三步分化培养液替换为细胞培养液 III-2；

[0103] 所述第三步分化培养液按照如下方法配制得到：将 VEGF、bFGF、B27 添加剂、SB431542 和 RPMI 1640 混合，得到第三步分化培养液，VEGF 在第三步分化培养液中的浓度为 100ng/ml，bFGF 在第三步分化培养液中的浓度为 100ng/ml，SB 431542 在第三步分化培养液中的浓度为 10uM，B27 添加剂在所述细胞培养液 III 中的浓度为 1.2%（体积百分含量）。

[0104] 5) 与方法一基本相同，不同的是将第四步分化培养液替换为细胞培养液 IV-2；得到细胞；

[0105] 所述第四步分化培养液按照如下方法配制得到：将 SCF、TPO、Flt3-Ligand、IL3、B27 添加剂和 IMDM 培养基混合，得到第四步分化培养液，SCF 在第四步分化培养液中的浓度为 200ng/ml，TPO 在第四步分化培养液中的浓度为 200ng/ml，Flt3-Ligand 在第四步分化培

养液中的浓度为 200ng/ml, IL3 在第四步分化培养液中的浓度为 200ng/ml, B27 添加剂在第四步分化培养液中的浓度为 1.2% (体积百分含量)。

#### [0106] (二) 鉴定

[0107] 采用流式分析的方法, 分别在分化第 2 天、第 5 天、第 6 天、第 12 天以及第 18 天对方法一获得的分化细胞进行了鉴定, 第二天采用的抗体是 PE-BRACHYURY (R&D, 产品目录号为 IC2085P), 第 5 天采用的抗体是 APC-KDR (R&D, 产品目录号为 FAB357A), PE-CD31 (BD, 产品目录号为 555446), 第 6 天采用的抗体是 PE-CD31 (BD, 产品目录号为 555446), FITC-CD43 (Biolegend, 产品目录号为 315204), 第 12 天采用的是 PE-CD31 (BD, 产品目录号为 555446), FITC-CD43 (Biolegend, 产品目录号为 315204), 第 18 天采用的是 PE-CD45 (BD, 产品目录号为 555483), FITC-CD43 (Biolegend, 产品目录号为 315204)。结果如图 8 所示, 其中 A 为建立的新的逐级诱导人胚胎干细胞向造血祖细胞定向分化示意图、B 为人胚胎干细胞向造血祖细胞分化鉴定过程; 从图中看出, 在分化第 2 天产生 93% 的 BRACHYURY+ 细胞, 在分化第 5 天产生 85% KDR+ 细胞, 在分化第 6 天产生 74% CD31+ 的细胞, 而同时有约 40% CD31+CD43+ 的新生造血祖细胞。经过进一步的培养, 大约在分化第 18 天能产生 60% 的 CD45+ 造血祖细胞。这些造血祖细胞能形成造血集落, 为进一步分化产生各造血世系细胞提供了大量的造血祖细胞。

[0108] 采用已经报道的分化体系 EB 分化或者与基质细胞共培养 (Pick M, et al., Stem Cells 2007; Vodyanik MA, et al., Blood 2005) 的方法诱导人胚胎干细胞定向分化产生造血祖细胞, 这些分化方法分化效率较低, 大约只能产生 10-20% 的 CD34+ 细胞和约 25% CD45+ 造血祖细胞。

[0109] 因此, 经过对比, 可以看出, 本发明方法一采用的分化培养基和建立的分化方法, 能够产生大约 90% 的 CD43+ 造血细胞和约 60% 的 CD45+ 造血祖细胞, 这为造血细胞应用于临床提供了一个新的, 有效的方法。

[0110] 采用相同的方法检测上述方法二、三不同分化时间的细胞, 结果与方法一无显著差异。

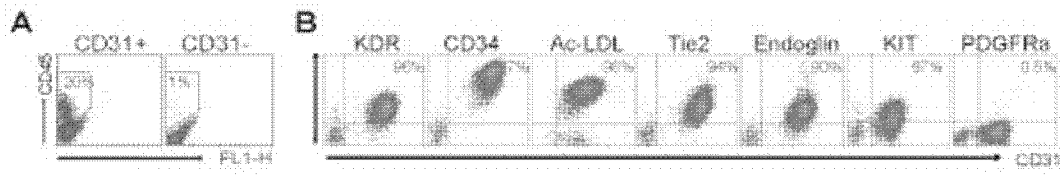


图 1

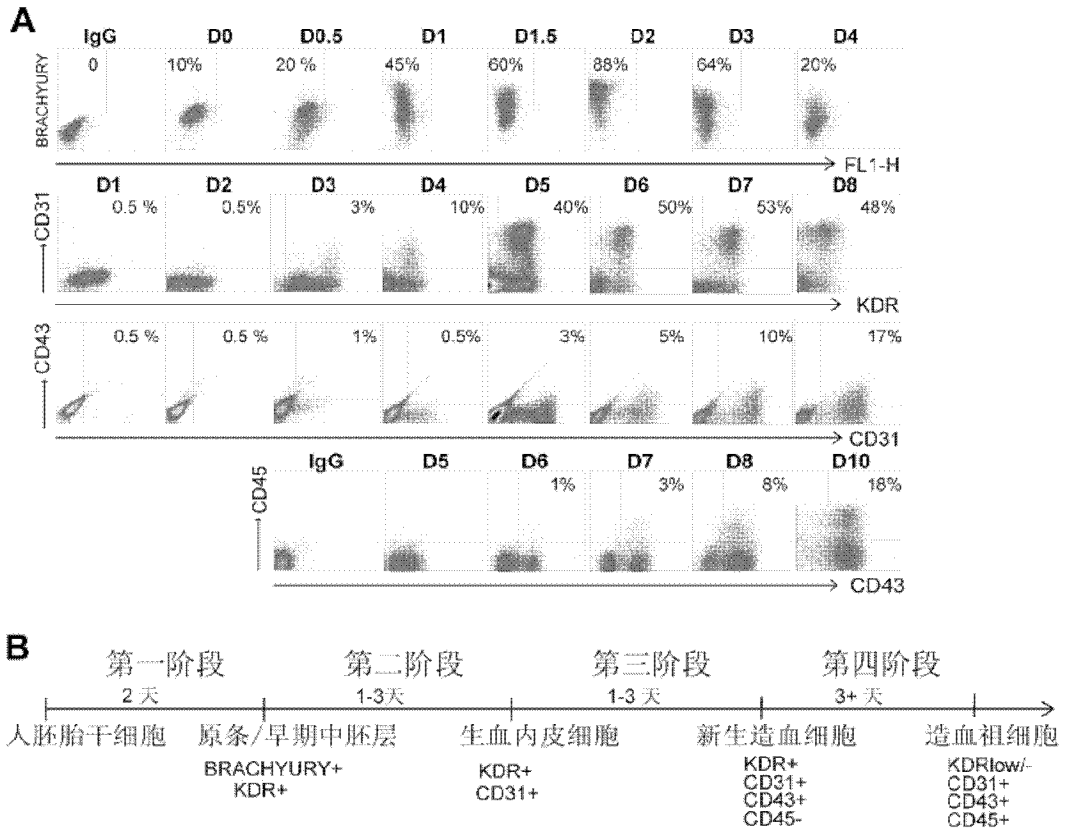


图 2

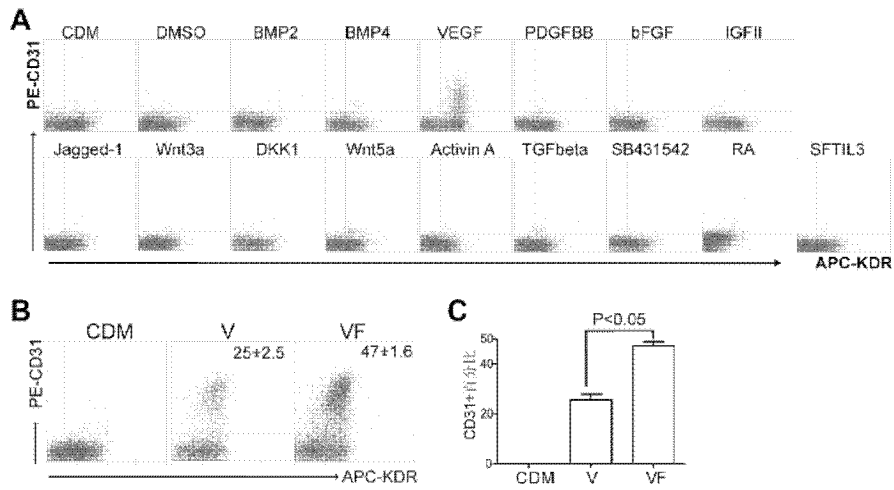


图 3

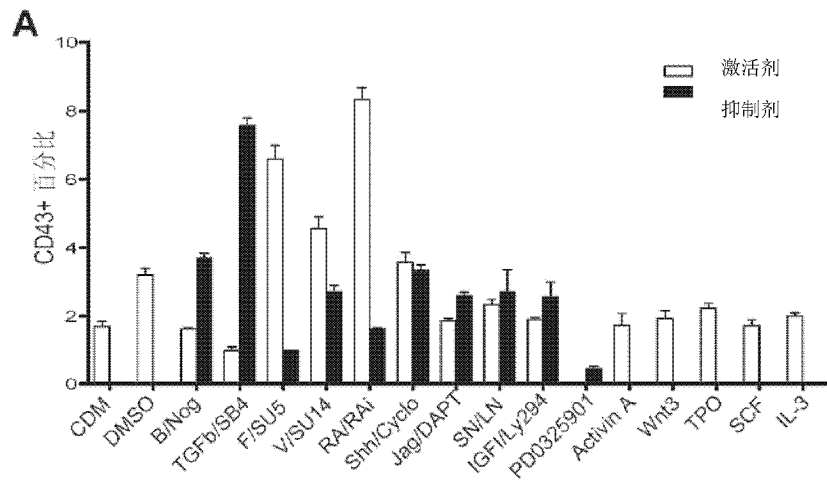


图 4

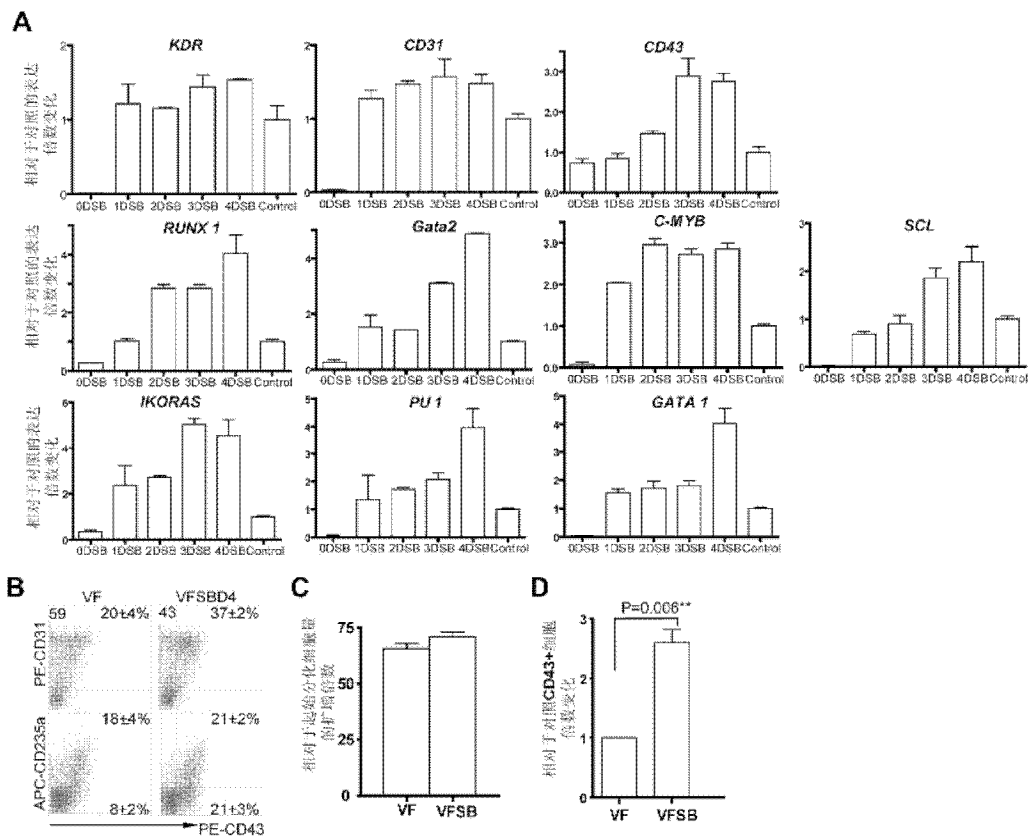


图 5

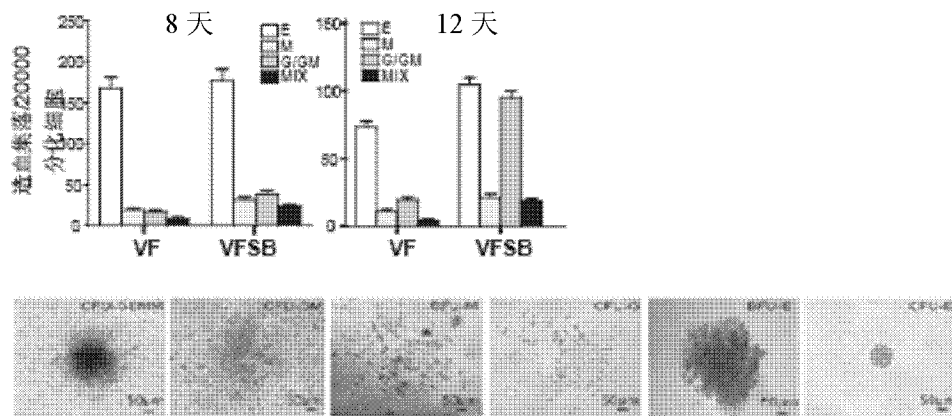


图 6

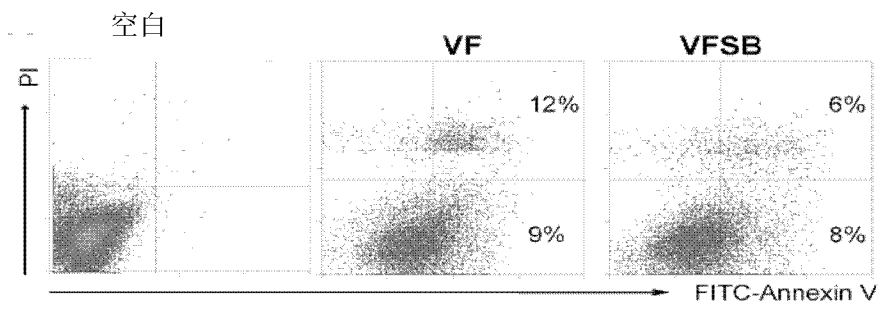


图 7

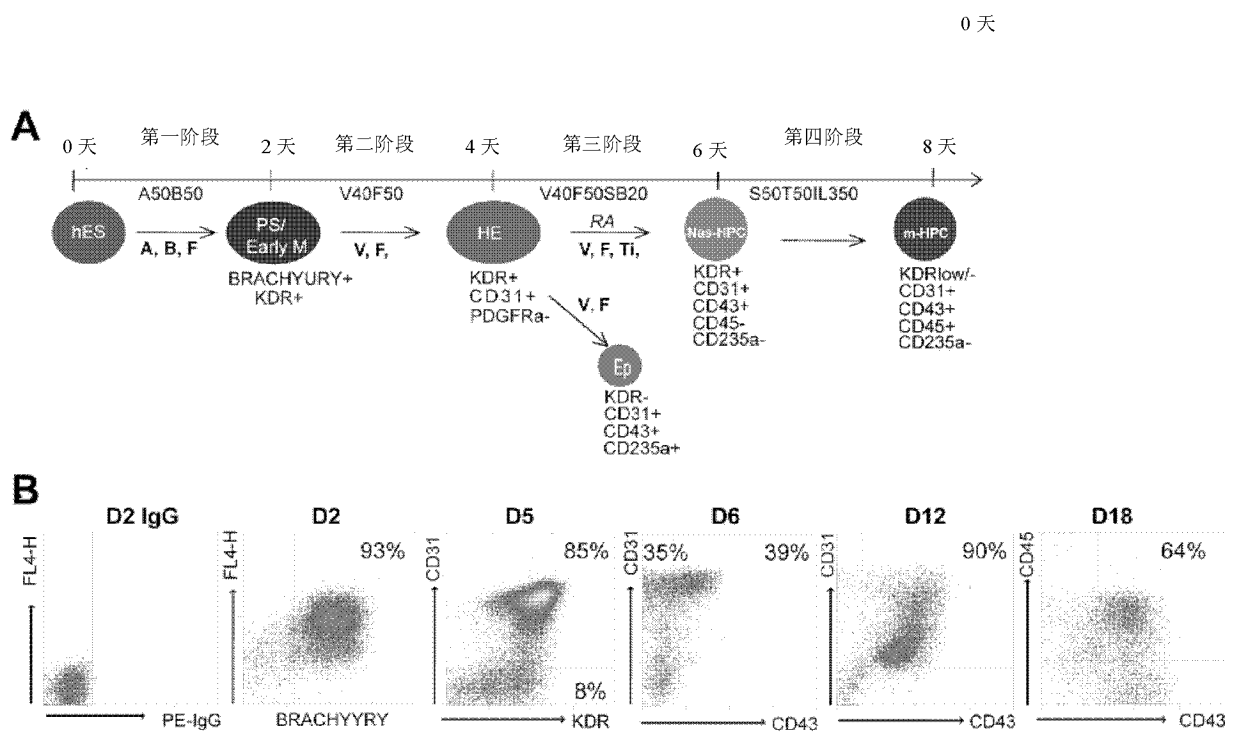


图 8