

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01823767.3

[45] 授权公告日 2006 年 11 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1284851C

[22] 申请日 2001.11.6 [21] 申请号 01823767.3
[86] 国际申请 PCT/CN2001/001536 2001.11.6
[87] 国际公布 WO2003/040358 中 2003.5.15
[85] 进入国家阶段日期 2004.4.30
[71] 专利权人 上海第二医科大学
地址 200025 中国上海市重庆南路 280 号
共同专利权人 盛慧珍
[72] 发明人 盛慧珍 陈莹 王凯 刘爱莲
审查员 王大鹏

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生

权利要求书 1 页 说明书 30 页 附图 15 页

[54] 发明名称

体细胞起源的胚胎干细胞及其分化细胞

[57] 摘要

本发明公开了通过核移植获得体细胞起源的胚胎干细胞(由体细胞核编码), 胚胎干细胞样细胞, 或其它类型干细胞的方法, 以及从这些干细胞诱导出各种分化细胞类型的方法。

1. 一种核移植的方法，它包括将人成纤维细胞或细胞核植入处于分裂中期 II 期的家兔去核卵母细胞，得到核移植单元；其中，所得的核移植单元通过室温培养或使用活化剂而活化，所述活化剂选自甘露醇电融合液、蔗糖电融合液、山梨醇电融合液或磷酸盐缓冲液；而且，活化的核移植单元进一步在(a) RD 培养液、M199 培养液或 DEME 培养液微滴中培养，或者在(b) RD 培养液、M199 培养液或 DEME 培养液与粒细胞、输卵管细胞、子宫细胞和 STO 细胞结合构成的共培养体系中培养。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中所述活化剂为蔗糖电融合液。
3. 根据权利要求 1 的方法，其中活化的核移植单元在 RD 培养液中培养。

体细胞起源的胚胎干细胞及其分化细胞

发明领域

本发明涉及采用哺乳类动物或人的细胞核或细胞移植入人或动物的去核卵母细胞形成的体细胞胚胎（由体细胞核编码）以制备体细胞起源的胚胎干细胞（Somatic cell derived Embryonic stem cells, S-ES 细胞），胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞。本发明特别涉及通过将人细胞核或细胞移植入一种动物卵母细胞，优选地为一种兔科动物卵母细胞，最优选地为新西兰大白兔去核卵母细胞以制备人类 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞。

本发明还涉及所得 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞可被诱导成各种分化细胞，这些干细胞及其衍生细胞也可用作细胞载体，将人工导入的各种生物活性分子或经修饰的 DNA，RNA，蛋白质等导入人体内。上述细胞（经修饰改造后的或未经修饰改造的）可用于制备各种特化细胞类型及各种组织及器官，以用于治疗 and 诊断。上述细胞（其遗传物质已经改造的或未经改造的）本身可以作为核移植中的核供体。

发明背景

核移植技术是将核供体细胞或细胞核移入去核的卵母细胞中，所形成的核移植单元可以发育成体细胞胚胎，也可以进一步发育成正常个体。50 年代末首先在两栖动物上取得成功。Briggs 和 King 采用黑斑蛙肠上皮细胞核注入卵中得到了核移植蛙。到 80 年代后核移植技术应用到哺乳动物上来。将各种胚胎细胞如胚胎卵裂球、内细胞团细胞、晚期胚胎细胞用于核移植，并取得

了一定的成功 (Collas, et al. Mol. Reprod. Dev., 1994, 38: 264-267; Keefer, et al. Biology of Reproduction, 1994, 50: 935-939; Sims, et al. PNAS, 1993, 90: 6143-6147)。

1997年英国的 Wilmut Ian, et al. (Nature 1997, 385: 810--813) 采用 6 岁成年绵羊乳腺细胞核制备了第一只成体细胞核移植羊。1998 年美国成功完成了小鼠体细胞的连续核移植 (T. wakayama, et al. Nature 394: 369--372)。同一年小鼠胚胎干细胞核移植也取得成功 (Teruhiko, et al. PNAS. 1998, 96: 14984--14989)。成体细胞核移植的成功不仅是技术上的进步, 更是观念上的革命。事实说明, 只要在合适的条件下, 高度特化的成体细胞核与胚胎细胞核一样也能重新编程 (reprogram), 形成新个体。

1999 年 Tanja Dominko, et al. (Biology of Reproduction, 60 (6), 1496) 将牛、羊、猪、猴和大鼠的体细胞核注入牛去核卵母细胞, 形成体细胞胚胎, 各种体细胞胚胎均有一定水平的发育。该实验从理论上说明一种动物的细胞核可以在另一种动物的卵母细胞的细胞质中活化, 与其构成一体, 在其支持和营养下发育成体细胞胚胎。同一种卵母细胞质可以支持多种动物的细胞核的发育, 这说明了多种动物卵母细胞质成分间的保守性。

与核移植技术蓬勃发展的同时, 近年来胚胎干细胞 (ES 细胞) 培养技术的进展也为世人所瞩目。自从 1981 年小鼠 ES 细胞建立以来, 建立 ES 细胞的基本操作和 ES 细胞的基本性质和应用已为广大的研究人员所公知 (Evans, et al. Nature, 1981, 29: 154-156; Martin, et al. PNAS, 1981, 78: 7634-07638)。ES 细胞培养在成纤维细胞饲养层 (Evans, et al.) 和抑制分化

的条件下 (Smith, et al. *Developmental Biology*, 1987, 121: 1-9), 可以保持未分化状态无限增殖。

ES 细胞具有发育全能性, 可以分化成构成机体的任何一种细胞 (包括生殖细胞)。ES 细胞在特定的诱导条件下可以优势地向某一系、类或一种细胞分化。现已成功的从 ES 细胞定向分化成了多种细胞, 例如造血细胞 (Ronald, et al. *PNAS*, 1995, 92: 7530-7534), 神经细胞 (J Dinsmore, et al. *Theriogenology*, 1998, 49: 145-151), 肌肉细胞 (Benjamin E, et al. *Nature Biotechnology*, 2000, 18 April: 399-403), 脂肪细胞 (Dani C Smith, et al. *J cell Sci.*, 1997, Jun, 110: 1279-1285), 内皮细胞 (Daniel Vittet, et al. *Blood*, 1996, 88(9): 3424-3442) 等。由于 ES 细胞分化成的细胞具有与体内的相应细胞一样的生理功能, 因而可以用于治疗疾病 (细胞, 组织或器官移植)。

鉴于小鼠 ES 细胞表现出的巨大潜力, 人们尝试着培养大型哺乳类动物的 ES 细胞, 因为大动物 ES 细胞的建立不仅在科学研究上有意义, 而且可以应用在生产实践上。例如, 人 ES 细胞可以分化成各种定向干细胞用以治疗疾病。ES 细胞可以在体外稳定的生长、繁殖, 这为基因改造提供了窗口。人们可以通过 ES 细胞或其衍生细胞改造大型哺乳类动物的基因组, 以产生经济效益。

目前, 已经报导了从大型哺乳类胚胎分离胚胎干细胞或胚胎干细胞样细胞。例如, Notarianni, et al. *J. Reprod. Fert.*, 1991, Suppl. 43: 255-260 报导猪和绵羊囊胚内细胞团 (ICM) 的原代培养细胞具有和 ES 细胞相似的形态和生长特性。1997 Chen

RL, et al. (Biology of Reproduction, Oct; 57(4): 756-764) 和 1999 年和 Wianny F, et al. (Theriogenology, Jul 15; 52(2): 195-212) 分别报导了从猪囊胚提取内细胞团培养得到了猪 ES 细胞。

Van Stekelenburg-Hamers, et al. (Mol. Reprod. Dev., 40: 444-454, 1995) 报导来源于牛囊胚内细胞团的胚胎干细胞样细胞的分离方法和特征。

1995 年 James A. Thomson, et al. (PNAS, 92(17), Aug 15: 7844-8) 报导成功地分离了灵长类猕猴的 ES 细胞。

1998 年 James A. Thomson, et al. (Science, 282(6), Nov: 1145-1147) 成功地建立人 ES 细胞系。人 ES 细胞系的建立是干细胞研究中的一个重要突破。人 ES 细胞系不仅为研究人类自身奥秘提供了重要工具, 而且在医疗健康领域有着广阔的应用前景。(1) 人 ES 细胞可以在体外大量增殖并可被定向诱导成病人所需的特化细胞, (例如) 输入病人体内起到治疗疾病的目的, 促进细胞或器官移植疗法的研究。现已确定可以通过细胞移植治疗很多人类疾病。(2) 促进新药筛选和药物的安全性检测。

尽管如此, 由人 ES 细胞分化来的细胞用于不同 MHC 背景的个体移植时会引起免疫排斥反应。病人必须服用有毒的免疫抑制剂。目前, 还没有一种方法能直接用病人的体细胞培养出与病人遗传基因一致的 ES 细胞。

2000 年 Megan J. Munsie, et al. (Current Biology 10: 989-992) 报导了用小鼠成体细胞核移植形成的囊胚分离培养小鼠 ES 细胞的方法。2001 年 Teruhiko Wakayama, et

al. (Science, 292 (5517): 740-743) 从小鼠体细胞核移植形成的囊胚中分离培养得到小鼠 ES 细胞, 该 ES 细胞可在体外被诱导成各种特化细胞。Teruhiko Wakayama, et al. 的实验证明可以从核移植形成的体细胞胚胎分离获得 ES 细胞。这些体细胞起源的胚胎干细胞 (S-ES 细胞) 和从受精卵衍生得到的 ES 细胞 (普通 ES 细胞) 一样, 具有发育全能性, 可以在体外被诱导成成体小鼠具有的所有特化细胞。

上述各位科学家的成功正在开启一条新途径——治疗性克隆, 即取病人的体细胞, 通过核移植后发育成体细胞胚胎, 并产生 S-ES 细胞。该 S-ES 细胞在体外诱导分化成病人所需的细胞, 这样获得的细胞和组织将与病人核基因型完全一致, 在细胞或组织移植治疗中属自体移植, 不会被病人的免疫系统所排斥。治疗性克隆将解决细胞或组织移植引起的免疫排斥问题。

1998 年美国马萨诸塞州 J. Robe, et al. 申请的专利 (专利号 WO 98/07841) 中, 用人的淋巴细胞和口腔上皮细胞与牛的卵母细胞进行异种核移植, 获得了 30 个 2 细胞期的胚胎, 6 个 4 到 16 细胞期的胚胎和一个 16 到 400 细胞期的胚胎。他们用这个 16 到 400 细胞期的胚胎衍生出细胞集落。但该专利未提供任何证据证明这些胚胎来源于人的体细胞, 由人的遗传物质编码; 也未能提供任何证据证明这些细胞集落来源于人的体细胞, 由人的遗传物质编码。这些集落也可能起源于牛卵母细胞的遗传物质。此外, 该专利也没有提供材料证明这些细胞集落是 ES 细胞; 没有提供材料证明这些细胞集落是否可在体外长期扩增; 是否表达了灵长类 ES 细胞所特有的生长特性和分子标记 (包括 SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-80、碱性磷酸酶等); 也没有提供材料证明这

些细胞集落具分化潜能。因此该专利申请人不能证明该细胞集落起源于人的体细胞，更不能证明它们是人的体细胞起源的 ES 细胞。

所以，到目前为止，还没有见到通过用人体细胞核移植得到人 S-ES 细胞的报道，更未见到应用该细胞系分化出人特化细胞的报道。

发明简述

本发明人通过研究后发现，可以通过将人细胞（例如人的体细胞）或其细胞核移植入人或动物去核卵母细胞获得核转移单元。从核转移单元发育成的体细胞胚胎中可以分离获得人的体细胞起源的胚胎干细胞，即 S-ES 细胞。S-ES 细胞具有和从受精卵获得的普通人 ES 细胞几乎一样的生长特性和分化潜能。这一结果首先证明人类体细胞核在植入去核卵母细胞后可以被重新启动，并发育成人的体细胞胚胎。也证明了从人体细胞胚胎可以分离获得人胚胎干细胞系。

这一结果还证明了种间核移植的可行性，即：将动物或人细胞（例如，人体细胞）或细胞核移植入兔科动物，如家兔的去核卵母细胞。所制备的核转移单元，在合适的培养条件下可以发育成核供体编码的体细胞胚胎。

因此，本发明目的在于提供一种方法从人体细胞获取 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞。该方法通过核移植技术重新启动人体细胞，使其发育为体细胞起源的胚胎，并从体细胞起源的胚胎分离培养出人 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞。

本发明目的特别在于提供制备 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞

或其他类型干细胞的新方法，包括将哺乳类动物或人细胞或细胞核移植入同种或不同种的去核卵母细胞。

本发明的另一目的在于提供制备人 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞的新方法，包括将人细胞（例如，成人的体细胞）或细胞核移植入人去核卵母细胞。

本发明的另一目的在于提供利用异种核移植技术制备体细胞胚胎的改进方法。

本发明的另一目的在于通过将人细胞或细胞核移植入不同种的去核卵母细胞制备人 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞。

本发明的另一个特别目的在于提供制备人 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞的新方法，包括将人细胞或细胞核移植入去核动物卵母细胞，优选为兔科动物去核卵母细胞。

本发明特别旨在通过核移植方法从体细胞获得 S-ES 细胞系。这样获得的 S-ES 细胞系与从受精卵发育的囊胚获得的胚胎干细胞系一样可以在体外无限扩增，表达灵长类细胞所特有的标志，并有潜能分化为内胚层、中胚层、外胚层的各种细胞类型。

本发明目的特别在于通过核移植方法从体细胞获得与核供体免疫原性基本一样的 S-ES 细胞系。这种 S-ES 细胞及其衍生细胞、组织和器官由细胞核供者（例如病人）的 DNA 编码，因而具有与细胞/细胞核供者一致的免疫原性。将这样的 S-ES 细胞或其衍生细胞、组织和器官移植回细胞核供者（例如病人），将不会引起免疫排斥反应。

本发明的另一目的在于通过特定的诱导条件下（包括体内诱导环境和体外诱导系统），使人 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或

其他类型干细胞定向分化成特化类型的细胞：包括神经细胞、肌肉细胞、脂肪细胞和成纤维细胞等。

本发明的另一个特别的目的在于使用这种人 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞和其衍生细胞用于治疗或诊断。

本发明的另一个特别的目的在于使用按照本发明制备的人 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞和其衍生细胞制备分化的细胞、组织或器官。

本发明的另一个目的在于提供移植治疗的改进方法，包括从按照本发明制备的 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞和以及这些干细胞所衍生的细胞、组织或器官的使用。该治疗包括（以举例的方式）疾病和损伤治疗，包括帕金森病、亨廷顿舞蹈病、阿尔海默病、ALS、脊髓缺陷或损伤、多发性硬化、肌萎缩、糖尿病，肝病、心脏病、软骨置换、灼伤、血管疾病、泌尿道疾病以及免疫缺陷、骨髓移植、癌症和其它疾病的治疗。

本发明的另一个特别目的在于使用按照本发明制备的人 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞以及这些干细胞所衍生的细胞可用作细胞载体，将人工导入的各种生物活性分子或经修饰的 DNA，RNA，蛋白质等导入人体内。上述细胞（经修饰改造后的或未经修饰改造的）可用于制备各种特化细胞类型及各种组织及器官，以用于治疗 and 诊断。

本发明的另一个目的在于使用按照本发明制备的经过基因改造或修饰的 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞以及这些干细胞所衍生的细胞用于各种疾病的治疗，特别用于治疗 and/或防止上述疾病和损伤。

本发明的另一个目的在于使用按照本发明制备的 S-ES 细胞, 胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞以及这些干细胞所衍生的细胞, 或者经过基因改造或修饰的上述细胞作为核移植中的核供体。

本发明的另一个特别目的在于体外使用按照本发明制备的 S-ES 细胞, 胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞以及这些干细胞所衍生的细胞, 例如, 用于细胞分化研究和检测目的 (例如药物筛选, 毒性分析等)。

对于本发明上述以及其它目的之优点和特征将在下文描述, 本发明的特征通过参考下面对本发明优选实施例和所附权利要求的详细叙述而更易于理解。

附图说明

图 1 来源于 42 岁成人包皮的成纤维细胞

图 2 家兔卵母细胞

图 3 用透明带下注射方法获得的体细胞胚胎 (4 细胞阶段)

图 4 用透明带下注射方法获得的体细胞胚胎 (桑葚胚)

图 5 用透明带下注射方法获得的体细胞胚胎 (囊胚)

图 6 用透明带下注射方法获得的体细胞胚胎 (孵化囊胚)

图 7 用胞质内注射方法获得的体细胞胚胎 (4 细胞阶段)

图 8 用胞质内注射方法获得的体细胞胚胎 (桑葚胚)

图 9 用胞质内注射方法获得的体细胞胚胎 (囊胚)

图 10 用胞质内注射方法获得的体细胞胚胎 (孵化囊胚)

图 11 兔卵母细胞可以有效地启动人体细胞, 并支持体细胞胚胎的早期发育

图 12 起源于人类体细胞的胚胎干细胞 (Somatic cell derived

embryonic stem cells, S-ES 细胞) 克隆

图 13 体细胞胚胎分离得到的人胚胎干细胞免疫组织化学和碱性磷酸酶活性鉴定照片

图 14 体细胞胚胎分离得到的人胚胎干细胞长成的胚胎体 (S-EB)

图 15 体细胞胚胎分离得到的人胚胎干细胞分化的肌肉细胞

图 16 体细胞胚胎分离得到的人胚胎干细胞分化的神经细胞。

图 17 体细胞胚胎分离得到的人胚胎干细胞分化的成纤维细胞样细胞

图 18 体细胞胚胎分离得到的人胚胎干细胞分化的脂肪细胞。

图 19 从人 S-ES 细胞分化所获得的混合细胞群表达外胚层、中胚层、内胚层细胞特有标志

图 20 S-ES 细胞第 26 代染色体核型的照片。

发明详述

本发明中，核转移或核移植 (Nuclear Transfer) 可替换使用。

本发明中，核移植胚胎或体细胞胚胎或重组胚胎可替换使用。

本发明中，核移植胚胎干细胞 (NT-ES 细胞) 或体细胞起源的胚胎干细胞 (S-ES 细胞) 可替换使用。

“核移植”是将核供体的细胞核或细胞移入去核的卵母细胞中，所形成的体细胞胚胎可以进一步发育成正常个体。核移植所用的核供体可以是人的，也可以是其他动物的，例如，灵长类动物、有蹄类、两栖动物、啮齿动物等；核移植所用的卵母细胞可以是

人的，也可以是其他动物的，例如，灵长类动物、有蹄类、两栖动物、啮齿动物等。

“同种核移植”是指将一种动物的细胞或细胞核移入同一种动物去核的卵母细胞中，所形成的体细胞胚胎可以发育成囊胚或进一步发育成正常个体。

“异种核移植”是指将一种动物的细胞或细胞核移入另一种动物去核的卵母细胞中，所形成的核移植单元可以发育成体细胞胚胎或进一步发育成正常个体。

“核移植单元”是指由一个细胞（核供体细胞）和另一个细胞（去核卵母细胞）结合所形成的胚胎。细胞核供体细胞和去核卵母细胞可以是同种，也可以是异种。

“体细胞胚胎”指从由核转移单元发育来的各阶段胚胎（体细胞核编码），包括 2 细胞、4 细胞、8 细胞、桑葚胚、囊胚和孵化囊胚等不同阶段。

“体细胞”是指个体内除生殖细胞以外的所有其他类型细胞。

对于哺乳类动物，生命是从受精卵开始的，在正常发育过程中，受精卵依次发育成为 2、4、8 细胞胚胎、桑葚胚和囊胚。囊胚中有一团细胞叫做内细胞团，内细胞团是胚胎的原基，将发育成整个胚胎。内细胞团的细胞可以分化成成体的任何一种细胞（包括生殖细胞），所以他们是具发育全能性的细胞。囊胚的内细胞团可在体外合适的条件下无限生长形成细胞系，该细胞系叫做胚胎干细胞系。通常的胚胎干细胞系是从受精卵所得囊胚中分离获得的。

“人胚胎干细胞（人 ES 细胞）”是一种全能（pluripotent）干细胞，来源于囊胚的内细胞团细胞，在体外具有永生性，可被

诱导分化为个体的所有组织类型（包括生殖细胞）。在长期培养中，细胞可保持正常染色体核型。细胞表面表达特异分子标记：SSEA-1 阴性，SSEA-3 阳性，SSEA-4 阳性，TRA-1-60 阳性，TRA-1-81 阳性，这些细胞呈碱性磷酸酶阳性。

“体细胞起源的胚胎干细胞（S-ES 细胞）”是指通过核移植技术从人或动物的体细胞获得的胚胎（例如从囊胚）中分离出的 ES 细胞，具有从受精卵获得的 ES 细胞的几乎全部性质和特征：在体外可无限扩增，可被诱导分化为所有三胚层细胞类型；在长期培养中，细胞可保持正常染色体核型。细胞表面表达特异分子标记：SSEA-1 阴性，SSEA-3 阳性，SSEA-4 阳性，TRA-1-60 阳性，TRA-1-81 阳性，这些细胞呈碱性磷酸酶阳性。

“胚胎干细胞样细胞”是指具有上述人胚胎干细胞的部分特征和性质，从体细胞胚胎衍生而来的细胞群。

“其他类型干细胞”是指来源于体细胞胚胎，除了人胚胎干细胞或胚胎干细胞样细胞以外所有的其他干细胞类型，例如。滋养层细胞等。

“特化细胞”是指由 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞在体内或体外各种条件下经人工或自发诱导后衍生的各种细胞类型。

本发明提供制备体细胞起源的胚胎干细胞（S-ES 细胞），胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞的方法，它包括下列步骤：

- (i) 将一种核供体动物的体细胞或体细胞核置入相同或不同于核供体动物的去核卵母细胞，获得核移植单元；
- (ii) 活化所获得的核移植单元；
- (iii) 培养活化的核移植单元，以获得体细胞胚胎；

(iv) 从超过二细胞发育期的体细胞胚胎中获得由植入核编码的胚胎干细胞, 胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞。

本发明还提供了将这种体细胞起源的胚胎干细胞诱导生成为多种特化细胞的方法。包括下列步骤:

- (1) 制备由置入核编码的胚胎干细胞, 胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞;
- (2) 在适宜诱导的条件下诱导上述细胞, 向特化细胞分化。

我们在异种核移植中采用合适的小型动物做卵母细胞供体, 如家兔。家兔成本很低, 可以笼养、喂标准的颗粒饲料、易于管理和疾病控制, 在严格的饲养条件下, 可以育成 SPF (无特定病原体动物) 级兔。兔的自然发情周期为 7-9 天, 4 天内完成人工激素排卵, 从每 1 只人工激素排卵的家兔中通常可以得到 30 个左右卵母细胞。

本发明发现人体细胞, 特别是人成纤维细胞与免去核卵母细胞形成的核移植单元可以发育成为体细胞胚胎。

基于人体细胞核可被兔卵母细胞有效地重编程的事实, 可以预期人体细胞可移植入其它物种的卵母细胞, 并发育成为体细胞胚胎。例如, 来源于其它灵长类动物、两栖动物、啮齿动物等的卵母细胞。而且, 使用类似的方法, 也可以将人细胞或细胞核转移到人卵母细胞中, 并发育成体细胞胚胎, 例如囊胚。

因此, 在最广泛的实施例中, 本发明涉及通过注射或融合, 将人或动物体细胞核或细胞移植入与核供体同种或不同种动物的去核卵母细胞, 产生可以用于获得胚胎干细胞, 胚胎干细胞样细

胞或其他类型干细胞的核移植单元。例如，本发明可以涉及通过注射或融合将人体细胞核或细胞移植入其它物种，例如另一种啮齿动物的去核卵母细胞中，形成核移植单元。该核移植单元经培养后可以发育成体细胞胚胎。从体细胞胚胎可以分离获得胚胎干细胞，胚胎干细胞样细胞或其他类型干细胞用于治疗性克隆。

本发明中发现可以将人细胞（例如人的体细胞）的细胞核移植入去核动物卵母细胞获得核移植单元，这种核移植单元培养后产生了人体细胞胚胎，例如桑椹胚、囊胚，从这种体细胞胚胎中培养分离到人 S-ES 细胞系。这一结果证明了核移植得到的囊胚和从受精卵衍生的胚胎一样都能分离获得胚胎干细胞系。

样品采用人成纤维细胞移入去核的卵母细胞所形成的体细胞囊胚，将这类体细胞囊胚培养在灭活的小鼠成纤维细胞饲养层上。经长期培养（30 代以上）获得人 S-ES 细胞系。该人 S-ES 不仅具有分化成所有三个胚层（外、中、内胚层）的能力，能形成胚胎体结构，而且可被定向诱导成多种特化细胞，例如肌肉细胞、脂肪细胞、神经细胞、成纤维细胞等。

这些发现对解决移植医学中的免疫排斥问题具有重要意义。众所周知，当一些器官，细胞或组织因疾病等原因丧失功能后，可以用移植新器官，细胞或组织的方法来替代性恢复原器官，细胞或组织的功能。例如，肾脏丧失功能可用肾移植来解决；在肿瘤治疗等情况下可输入他人的血液干细胞来替代自身被耗竭的血液干细胞。但同种异体移植中由于 MHC 基因不匹配，普遍存在免疫排斥。植入的器官，细胞或组织会被病人的免疫系统摧毁。这是移植医学几十年来持续存在的难题。最近科学界提出了“治疗性克隆”的设想，为了解决免疫排斥问题，可以取病人的体细胞，

通过核移植重编程后发育成体细胞胚胎，再从体细胞胚胎中获取胚胎干细胞并诱导分化成病人所需的器官，组织或细胞，植回病人。这样获得的细胞与病人基因型完全一致，在细胞或组织移植治疗中属自体移植，不会被病人的免疫系统所排斥。

我们在本发明中有一系列发现：（1）用核移植方法可以从人类体细胞获得的人体细胞胚胎并获得 S-ES 细胞系。（2）该 S-ES 细胞系与从受精卵发育而成的囊胚所获得的人普通 ES 细胞系一样，具有在体外长期增殖的潜力。（3）该 S-ES 细胞系与人普通 ES 细胞系一样具有潜在的发育全能性，可以发育成为人的所有三胚层，包括外、中、内胚层及其特化细胞。这些发现为“治疗性克隆”路线提供了一系列实验依据。移植医学中普遍存在的免疫排斥现象有可能用该路线获得解决。

本发明还发现：人的体细胞可以被异种卵母细胞，特别是被兔子的卵母细胞有效地重编程。

本发明所用的囊胚是由人细胞，特别人的成纤维细胞或细胞核转移到去核兔卵母细胞形成核移植单元并培养成囊胚。因此，在最广泛的实施例中，本发明涉及通过核移植技术，将动物或人细胞核或细胞移植入与供体核不同种动物的去核卵母细胞，产生体细胞胚胎，应用该胚胎培养 S-ES 细胞。

人体细胞核移植

核转移技术或核移植技术在文献中已有描述，本发明背景引用的一些参考文献也有描述。特别参见，Wilmot Ian, et al. Nature, 1997, 385: 810—813; Campbell, et al. Biology of Reproduction, 1995, 43 : 181 ; Collas, et al. Mol. Reprod. Dev., 1994, 38: 264-267; Keefer, et al. Biology of

Reproduction, 1994, 50 : 935-939 ; Sims, et al. PNAS , 1993, 90: 6143-6147; 专利号 WO 94/26884; WO 94/24274; 和 WO 90/03432, 此处全文引入作为参考文献。

核供体细胞

在本发明中, 用作核供体的细胞是来源于人的体细胞、优选为成纤维细胞。

通过公知的方法可以获得人的体细胞。可用于本发明的人细胞包括(通过举例的方式): 上皮细胞、神经细胞、表皮细胞、角质化细胞、造血细胞、黑素细胞、软骨细胞、淋巴细胞(B和T淋巴细胞)、有核红细胞、巨噬细胞、单核细胞、成纤维细胞、心肌细胞和其它肌细胞等。而且用于核转移的人细胞可以从不同器官获得, 例如, 皮肤、肺、胰、肝、胃、肠、心脏、生殖器官、膀胱、肾、尿道和其它泌尿器官等。它们仅是适合供体细胞的例子。合适的供体细胞, 即本发明中有用的细胞(包括所有体细胞)可以从躯体的任何组织和器官获得。

卵母细胞

用于核转移的卵母细胞可以获自动物包括哺乳动物和两栖动物。卵母细胞的合适哺乳动物细胞源包括绵羊、牛、猪、马、兔、豚鼠、小鼠、仓鼠、大鼠、灵长类动物等。在本发明的优选实施例中, 卵母细胞获自兔科动物, 最优选为家兔。

现已发现当自然发情的母兔发情至第14到24小时, 可以从其生殖道收集成熟的分裂中期II期的卵母细胞, 而经人工激素处理的母兔在注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)或类似激素后的14-24小时, 最优选是15-18小时也可收集到成熟的分裂中期II期的卵母细胞。

分离卵母细胞的方法为本领域公知的技术。该方法基本上是从哺乳动物或两栖动物（例如兔）的卵巢或生殖道分离卵母细胞。

曾报导核转移过程中卵母细胞的成熟程度是核移植方法是否成功的关键（参见，例如，Prather et al, Differentiation, 1991, 48: 1-8）。通常，成功的哺乳类动物克隆使用分裂中期 II 期的卵母细胞作为卵母细胞，因为认为处于该期的卵母细胞可以有效地将导入的体细胞重新启动，并发育成体细胞胚胎。

去核

现已发现从新西兰大白兔获得成熟的卵母细胞应在注射人绒毛膜促性腺激素（HCG）后第 15-23 小时去核。去核之前卵母细胞最好在细胞丘除去之前移至含透明质酸酶的 M2 培养液（Sigma）中。这可以通过极细内径吸管反复吹吸或简单地旋涡震荡实现。然后筛选分离到含极体的卵母细胞。由存在极体确定卵母细胞处于细胞分裂中期 II 期，该卵母细胞用于核转移，去核。

对于从卵巢采取的未成熟卵母细胞通常需要体外成熟。这一过程通常使卵母细胞到达分裂中期 II 期。

对新西兰大白兔而言，去核优选地不超过 HCG 注射后的第 20 小时，更优选地在注射 HCG 后 16-18 小时。

去核可以通过显微操作用微吸管除去极体和周围的胞浆实现。然后筛选已被成功去核的卵母细胞。这种筛选可以通过用每毫升含 1 微克 Hoechst 33342（Sigma）染料染色，然后紫外线下迅速观察卵母细胞来完成。

核移植单元制备

可以按照本领域已知方法制备核移植单元。例如，透明带下注射和细胞质内注射。

透明带下注射：去核后将单个体细胞转移到去核卵母细胞的卵周隙。优选地，人或动物细胞和家兔的卵母细胞构成的核移植单元在 HCG 注射后 16-20 小时后在 0.5mm 的小室中使用 90-120V 的电脉冲约 60 微秒 1-2 次或多次在电融合液（如甘露醇融合液，蔗糖融合液等）中进行电融合。融合后，产生的核移植单元置于合适培养基中例如 RD {DMEM (Gibco): RPMI-1640 (Gibco)}; M199 (Gibco)、DMEM (Gibco) 等培养。

电融合方法融合细胞：用足以使得细胞质膜短暂崩解的电脉冲实现电融合。因为膜迅速重新形成，细胞质膜的崩解非常短暂。实质上，如果诱导两个邻近膜崩解并重新形成互相掺合的脂质双分子层，两个细胞之间的小通道（孔）将打开。由于该小通道的热力学不稳定性，它将扩大直到两个细胞融合成一个。参见 Prather, et al. 的美国专利 4997384（此处全文引入作为参考）进一步讨论了该方法。可以使用很多电融合介质，包括例如，蔗糖、甘露醇、山梨醇和磷酸盐缓冲液。也可以使用仙台病毒作为融合剂实现融合。

所获得的核移植单元必须首先进行活化。本发明所使用的活化方法包括，例如，在亚生理温度培养核移植单元，实际上使用冷或者低温刺激核移植单元。通过室温培养核移植单元可最为方便地操作，其相对于胚正常的生理温度条件而言属于低温。

美国专利 No. 5496720 (Susko-Parrish, et al.) 的目的即为提供合适的卵母细胞活化的方法。

另外，也可以顺次完成活化：

- (i) 增加卵母细胞中二价阳离子的水平，且
- (ii) 降低卵母细胞中细胞蛋白质的磷酸化。

增加细胞内二价阳离子可以通过（例如，添加激酶抑制剂，例如丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂，例如，6-二甲基-氨基-嘌呤、星形孢菌素、2-氨基嘌呤和鞘氨醇。）浓度来实现。

另外，通过向卵母细胞导入磷酸酶例如磷酸酶 2A 和磷酸酶 2B 能抑制细胞蛋白质的磷酸化。

细胞质内注射：还可选用其他方法做核移植，例如，直接将供体细胞核注射到卵母细胞胞质中，而不是电穿孔融合（Collas 和 Barnes, Mol. Reprod. Dev., 1994, 38: 264-267）。该方法成功的使人体细胞核在兔卵母细胞质的环境中启动了人胚胎的发育过程。

核移植单元培养

活化的核移植单元可以培养在合适的体外培养基中培养直到产生体细胞胚胎。例如，活化的核移植单元可以转移到 RD、M199、DMEM 等培养液中进行微滴培养。50 μ l 的微滴培养基中上覆石蜡油，培养环境（举例），38 $^{\circ}$ C，5% CO₂。在本发明的优选实施方案中，对于人体细胞/兔去核卵母细胞形成的核移植单元置于 RD 培养液中培养时囊胚率最高。

根据我们的经验，对于人体细胞/兔去核卵母细胞形成的核移植单元，在核移植单元开始活化后约 6-7 天得到囊胚。获得的体细胞胚胎呈现与核供体物种而不是卵母细胞供体物种的胚胎相似的外观和细胞生长特性。例如，人供体细胞核置入去核兔卵母细胞获得的体细胞胚胎，发育过程类似人的胚胎而不是兔。人细胞核/兔卵母细胞质衍生的体细胞胚胎在培养的第 6-7 天形成囊胚，这和人一样，与兔不同（兔在培养的第 3-4 天形成囊胚）。

本领域有多种已知的可以用于兔胚胎培养和维持的培养基，

例如 DMEM +15%FBS; M199+15%FBS; RD+15%FBS 等。这些培养基可以和多种细胞类型,例如粒细胞、输卵管细胞、子宫细胞和 STO 细胞等,结合构成共培养体系。

S-ES 细胞建系

S-ES 细胞系建系中,培养体系至关重要。培养体系包括培养液和所用的饲养层。培养液是指适用于培养 S-ES 细胞的液体,成份包括 DMEM (Gibco); FBS (Hyclone); non-essential amino acid stock (Gibco); β -mercaptoethanol (Gibco); Knockout medium (Gibco); SR (Gibco); 和多种因子:

第一类因子为糖蛋白 gp-130 的配体,如 LIF (R & D), 它与 gp-130 结合启动信号转导通路。

第二类因子为细胞内源 cAMP 激动剂,如 Forskolin (Sigma), 应用浓度为 10uM。

第三类因子是生长因子,如 bFGF (R & D), 它可抑制 ES 细胞的编程死亡。

饲养层指由 13.5 天的小鼠胚胎制备的成纤维细胞,经 Mitomycin C (Sigma) 灭活后可支持 S-ES 细胞的生长。优选实施例中,饲养细胞包括鼠胚胎成纤维细胞,合适的成纤维细胞饲养层的制备方法在下面实施例中描述。

本发明中的培养体系成功地从人类体细胞胚胎培养出人 S-ES 细胞系。人 S-ES 细胞集落的倍增时间较长。在集落形态和生长特征上与来自鼠的 ES 细胞不同与正常人 ES 细胞相同。

本发明中获得的人 S-ES 细胞经过长期传代后,(现已达到 30 代以上),用碱性磷酸酶检测试剂 (Sigma) 鉴定,其碱性磷酸酶活性仍保持着强阳性,并表达灵长类 ES 细胞共有的特异分子:如

SSEA-1 阴性、SSEA-3 阳性、SSEA-4 阳性、TRA-1-10 阳性和 TRA-1-81 阳性。这说明 ES 细胞保持着未分化状态。

本发明中建立的人 S-ES 细胞集落中细胞排列紧密，细胞核大，胞浆少。该 S-ES 细胞具有与灵长类一样的生长性质：(1) 在体外长期生长保持无分化状态。(2) 在长期培养中，细胞保持正常染色体核型。(3) 能分化成 3 个胚层的特化细胞。

S-ES 细胞的诱导分化

1998 年 James A. Thomson et al, (Science, 282 (6), Nov: 1145-1147) 利用 IVF 剩余的囊胚成功建立人 ES 细胞系。随后又证实了人 ES 细胞及其衍生细胞类型具有能形成胚胎体结构 (Embryoid body, EB), 分化成所有三个胚层 (外、中、内胚层) 的能力。

2001 年 Teruhiko Wakayama et al. (Science, 292 (5517): 740-743) 从小鼠成体细胞核移植形成的囊胚中分离培养得到小鼠 ES 细胞，这种体细胞起源的 ES 细胞可在体外被诱导成各种特化细胞。他的实验证明经核移植形成的囊胚也和正常的囊胚一样，可以用于分离 ES。小鼠体细胞起源的 ES 也具有发育全能性，可以发育成一个完整的成体以及成体所包含的所有细胞类型。

本发明提供了通过核移植技术从人类体细胞制备了 S-ES 细胞系的方法。我们的研究表明了人 S-ES 细胞和从受精卵衍生的 ES 细胞一样具有能形成胚胎体结构，分化成所有三个胚层 (外胚层 neurofilament, NSE; 中胚层 myoD, myoglobin, desmin, vWF; 内胚层 α -anti- trypsin, α -Fetoprotein 分子标记阳性) 的能力。

本发明还提供了诱导人 S-ES 细胞分化的各种条件：包括体外诱导，体内诱导。体外诱导又分为 A. 自发诱导：S-ES 或 S-ES 样细胞团在一定培养条件下自发诱导； B. 生物化学法诱导：如将 S-ES 或 S-ES 样细胞团放入含视黄酸或 β -巯基乙醇或 DMSO 或 H_2O_2 等的培养液中作第一阶段诱导后，再换成各种促进细胞分化的特殊培养液。

体内诱导：将人 S-ES 细胞直接将人 S-ES 细胞经过体外诱导后注入动物或人的各特定部位进行诱导分化。

S-ES 细胞的应用前景

在本发明中产生的体细胞起源的胚胎可建立人 S-ES 细胞，胚胎干细胞样细胞或的其他类型干细胞，这些细胞可应用在很多疾病的治疗中。

原则上，从 S-ES 细胞可以获得成体的任何细胞类型。各种人类干细胞有极广阔的临床用途。例如，人造血干细胞可以用于需要骨髓移植的治疗中。人神经干细胞可以用于脊髓损伤、帕金森氏病的治疗等。

可以采用细胞治疗的其它疾病和病理症状包括（以举例的方式），多发性硬化、肌萎缩、糖尿病、肝病、心脏病、软骨置换、灼伤、足溃疡、胃肠道疾病、血管疾病、肾病、泌尿道疾病以及衰老相关的疾病和症状等。

按照本发明制备的人 S-ES 细胞或衍生细胞也可以用作细胞载体将各种外源性具生物功能的物质导入体内。用转基因、同源基因重组、转座子质粒转染、病毒感染等方法将 DNA、RNA、蛋白质或其他具生物功能的物质导入 S-ES 细胞或衍生细胞，然后将它们或它们衍生的细胞转入体内，使导入的 DNA、RNA、蛋白

质等物质在体内发挥作用。

用上述方法可以替换病人的缺陷基因，例如（但不限于下列举例）：有缺陷的免疫系统基因、囊性纤维化基因，或导入能够表达有治疗效应的蛋白质的基因，例如生长因子、淋巴因子、细胞因子、酶等。例如编码脑生长因子的基因可以被导入人 ES 细胞或其衍生的其他类型细胞，将经基因改造后分化的或未分化的细胞移植给帕金森病病人以治疗该病。

用上述方法还可以向 S-ES 细胞引入一些有益的基因。然后使 S-ES 细胞分化成病人需要的细胞类型，例如，造血细胞、神经细胞、胰细胞、软骨细胞等。再将这些细胞或其衍生细胞用于治疗。

可被导入人 S-ES 细胞的基因包括（以举例的方式），表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、源于胶质的神经营养生长因子、胰岛素样生长因子（I 和 II）、神经营养蛋白-3、神经营养蛋白-4/5、睫状神经营养因子、AFT-1、各种细胞因子基因（白介素、干扰素、集落刺激因子、肿瘤坏死因子（ α 和 β ）等）、各种酶的基因等。

人 S-ES 细胞也可以用作调控基因和用于对早期发育调节的基因研究，找出细胞分化过程中重要的细胞因子。很多严重的疾病和先天性畸形都是由于异常的细胞分化、分裂引起的。因此，深入了解正常细胞的分化、分裂、诱导过程使我们有可能认识到那些疾病的细胞病理过程。

利用 S-ES 细胞的分化细胞组织和器官也可用于药物研究。胚胎干细胞的研究将极大的改变我们生产药物和对其安全性检验的方法。有了胚胎干细胞可以分化产生出众多种类的细胞用于药

物研究、药物筛选、药物鉴定等。将来药物研究中只有那些通过体外细胞实验的实验药物才能进入实验动物或人的临床实验。

在实践应用上，异种核移植技术可以挽救濒危灭绝的物种例如，但不仅限于大熊猫。这些动物由于雌性数量稀少，不可能获得大量的卵母细胞，采用它们的体细胞做供核细胞，移入其他种的卵母细胞中。在体外培养成囊胚，再移入代孕妈妈子宫中生下子代。

提供下列实施例以更清楚地描述本发明。

实施例 1

体细胞胚胎的制备

核供体细胞的制备

在征得包皮环切术的病人同意后，取手术切下的无菌包皮组织，剪成碎块，用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗，1000rpm 离心 5 分钟后，弃上清，组织碎块用 0.05%Trypsin/0.02%EDTA (Gibco) 在 37℃条件下消化 30 分钟，取细胞悬浮液 1000rpm 离心 5 分钟后，弃上清，细胞沉淀用含 90% DMEM(Gibco); 10% FBS(Hyclone); 50IU/ml penicillin-streptomycin (Gibco) 的培养液重悬种于培养皿内，37℃，5% CO₂ 培养。每 3 天换液，细胞长满后传代，传到第 7—20 代范围内用作细胞核供体细胞(图 1)。

卵母细胞的制备

新西兰大白兔 5-6 月龄，体重 5-6 斤，雌性，PMSG (上海第一生化制药公司) 100 IU/只肌肉注射，72 小时后耳缘静脉注射 HCG (天津市华孚高新生物技术公司) 100IU/只，HCG 注射

后第 14-16 小时，取其输卵管，用 M2 培养液 (Sigma) 液体冲出带颗粒细胞的卵母细胞，放在 300IU/ml 的透明质酸酶 (Sigma) 中，在解剖镜下观察，待颗粒细胞散开后，立即用细玻璃针吸出卵母细胞 (图 2)，在 M2 培养液中洗 3 遍。

核转移程序

透明带下注射: 去颗粒细胞的卵母细胞放在含 7.5 μ g/ml CB (Sigma) 的 M2 培养液中，室温浸泡 10 分钟后用有斜角的去核针去核。去核后将单个供体人成纤维细胞放入去核的兔卵母细胞的卵周隙中形成核移植单元，核移植单元在含 0.3M Glucose (Sigma); 0.1mM MgCl₂ (Sigma); 0.05mM CaCl₂ (Sigma) 的电融合缓冲液中平衡 15 分钟后施以电刺激 (HV 120V, 60 μ s, 1 次)。随后，核移植单元在含 42.5% DMEM (Gibco); 42.5% RPMI-1640 (Gibco); 15% FBS (Hyclone) 的 RD 培养液中培养，培养 6-7 天，即可获得体细胞囊胚 (图 3-6)。

细胞质内注射: 去颗粒细胞的卵母细胞放在含 7.5 μ g/ml CB (Sigma) 的 M2 培养液中，室温浸泡 10 分钟后用有斜角的去核针去核。去核后将单个供体人成纤维细胞放入去核的兔卵母细胞的细胞质内。随后，核移植单元在含 42.5% DMEM (Gibco); 42.5% RPMI-1640 (Gibco); 15% FBS (Hyclone) 的 RD 培养液中培养，培养 6-7 天，即可获得体细胞囊胚 (图 7-10)。

实施例 2

S-ES 细胞培养和鉴定

人 S-ES 细胞系的建立

由上述方法获得的体细胞起源的囊胚,用直径 3mm 的玻璃管拉成直径略小于囊胚透明带的玻璃细针,上下轻轻吹吸囊胚,使其脱掉透明带,分散成多个小细胞团块,移入饲养层上,用含 79%DMEM (Gibco); 20% FBS (Hyclone); 1% non-essential amino acid stock (Gibco); 0.1Mm β -mercaptoethanol (Gibco); 10ng/ml LIF (R & D); 10ng/ml bFGF (R & D); 10uM Forskolin (Sigma) 的 ES 细胞培养液 37°C, 5% CO₂ 条件下培养。每 2 天换一半液体。

培养第 2—4 天后,观察到细胞团贴壁生长。7—20 天可见集落生成(图 12)。用机械和酶消化方法将集落打散,传代到含新鲜饲养层的培养板上。传代几次后冻存 S-ES 细胞,传代 20 代以上进行 S-ES 细胞的形态和生化特征的鉴定。

成纤维细胞饲养层的制备

胚胎成纤维细胞的原代培养物来源于 14—16 天龄的鼠胎。无菌除去头、肝、心脏和食道后切碎鼠胚胎,在 0.05%trypsin/0.02%EDTA (Gibco)中 37°C消化 30 分钟。取细胞悬浮液离心 1000rpm 5 分钟,细胞沉淀用含 90% DMEM(Gibco);10% FBS (Hyclone);50 IU penicillin-streptomycin (Gibco) 的培养液重悬;接种在组织培养皿中,在 37°C, 5% CO₂ 条件下培养。传代 3 次后用 10mM Mitomycin C (Sigma) 处理 3—4 小时后,传代于 96 孔和 4 孔板上。成纤维饲养层细胞在潮湿并含 5% CO₂ 的大气中 37°C 生长和维持。这些具有均一的饲养细胞单层的培养板用于培养 S-ES 细胞系。

S-ES 细胞的鉴定

灵长类 ES 细胞具有碱性磷酸酶活性、并表达一系列特征性表面抗原，可用碱性磷酸酶检测法；SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-10、TRA-1-81 抗体的免疫组织化学方法检测。

碱性磷酸酶检测：将生长在 4 孔板上的 ES 细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 5 分钟，后用 PBS 冲洗 3 次，加入碱性磷酸酶底物 (Sigma)，黑暗中放置 15 分钟。ES 集落为阳性，而小鼠饲养层细胞为阴性 (图 13)。

免疫组织化学检测：将 S-ES 细胞生长在塑料盖玻片上，用 4% 多聚甲醛室温固定 5 分钟，后用 PBS 冲洗 3 次，后分别加入 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-10、TRA-1-81 (购自 the developmental studies hybridoma bank Iowa City, Iowa) 抗体 1: 5 到 1: 25 的稀释液，在室温下放置 1 小时，用 PBS 洗两次加入 FITC 标记的第二抗体室温 30 分钟，后用 PBS (Gibco) 清洗 2 次，用激光共聚焦显微镜观察。

下图为人 S-ES 细胞 5 种抗体检测结果，4 种为阳性。

抗体	SSEA-1	SSEA-3	SSEA-4	TRA-1-10	TRA-1-81
结果	-	+	+	+	+

染色体检测：10ug/ml 秋水仙素加入细胞中，在 37℃ 作用 4 小时，1000rpm 离心 8 分钟，去除上清；用 37℃ 预热的 0.05M KCL 重悬细胞沉淀，并在 37℃ 中孵育 30 分钟，1000rpm 离心 8 分钟，去除上清；用固定液 (甲醇: 冰醋酸 = 3: 1) 重悬细胞沉淀，在室温中放置 15 分钟，1000rpm 离心 8 分钟，去除上清；再用

固定液重悬细胞沉淀，在室温中放置 15 分钟，1000rpm 离心 8 分钟。取细胞沉淀滴在玻片上，Giemsa 染色观看核型。其结果如图 20 照片所示。

实施例 3

早期肌肉细胞群的诱导

将 S-EB 或 S-EB 样细胞团放入含 DMEM (Gibco) ; 0.5uM Retinoic acid (Sigma) ; 10% FBS (Hyclone) 的 RA 培养液中培养 5 天，然后换成含 79% DMEM (Gibco) ; 10% FBS (Hyclone) ; 10% Horse Serum (Sigma) ; 1% chick embryo extract (Gibco) 的肌肉培养液再培养 7 到 10 天后，即可获得肌肉样细胞。细胞平行排列，有的细胞内有多个细胞核 (图 15)。

实施例 4

神经细胞的诱导

将 S-EB 或 S-EB 样细胞团放入含 DMEM (Gibco) ; 0.5uM Retinoic acid (Sigma) ; 10% FBS (Hyclone) 的 RA 培养液中培养 5 天，然后换成含 DMEM-F12 (Gibco) ; 1% ITS (Gibco) 的神经培养液再培养 7 到 10 天后，即可获得神经样细胞。胞体内伸出放射状粗细微丝 (图 16)。

实施例 5

成纤维细胞样细胞的诱导

将 S-EB 或 S-EB 样细胞团放入含 90% DMEM (Gibco) ; 0.5uM Retinoic acid (Sigma) ; 10% FBS (Hyclone) 的 RA 培养液、

或含 DMEM-F12 (Gibco) ;1%ITS (Gibco) 的神经培养液、或含 79% DMEM (Gibco); 10%FBS (Hyclone) ;10% Horse Serum (sigma) ;1% chick embryo extract (Gibco) 的肌肉培养液中培养均可使部分 S-EB 或 S-EB 样细胞团分化为成纤维细胞样细胞。细胞扁平形状多样, 核大核仁清晰, 胞质丰富 (图 17)。

实施例 6

脂肪细胞的诱导

将 S-EB 或 S-EB 样细胞团放入含 90% DMEM (Gibco) ;0.5 μ M Retinoic acid (Sigma) ;10%FBS (Hyclone) 的 RA 培养液中培养数天后即可获得胞内含脂肪滴的细胞 (图 18)。经脂肪特异染料油红 (Oil Red O) 染色, 证实为脂肪细胞。

实施例 7

S-EB 形成

将 S-ES 细胞放入含 79%DMEM (Gibco) ; 20% FBS (Hyclone) ; 1% non-essential amino acid stock (Gibco) ; 0.1mM β -mercaptoethanol (Gibco) ;10ng/ml LIF (R & D) ; 10ng/ml bFGF (R & D) ; 10 μ M Forskolin(Sigma) 的 ES 细胞培养液中 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养 7-14 天以上, 一部分 S-ES 细胞自发形成胚胎体 (见图 14)。

实施例 8

三胚层鉴定

取 S-EB 或 S-EB 样细胞团作免疫组化鉴定。

外胚层标记抗体: Nestin (Chemicon) 阳性

中胚层标记: Myoglobin (Dako) 阳性, KDR (Sigma) 阳性

内胚层标记: α -fetoprotein (BioGenex) 阳性, α -anti-trypsin (Dako) 阳性

经鉴定 S-EB 或 S-EB 样细胞团中所分化出的混合细胞群中含有来自外、中、内三个胚层来源的细胞 (图 19)。

虽然以上通过具体的实施方案对本发明进行了具体描述, 但本领域技术人员可以理解, 在不背离本发明的原则和精神的情况下可以对本发明作出各种改变和改进。因此, 所有这些改变和改进都应包括在本说明书和所附的权利要求书的范围之内。



图 1

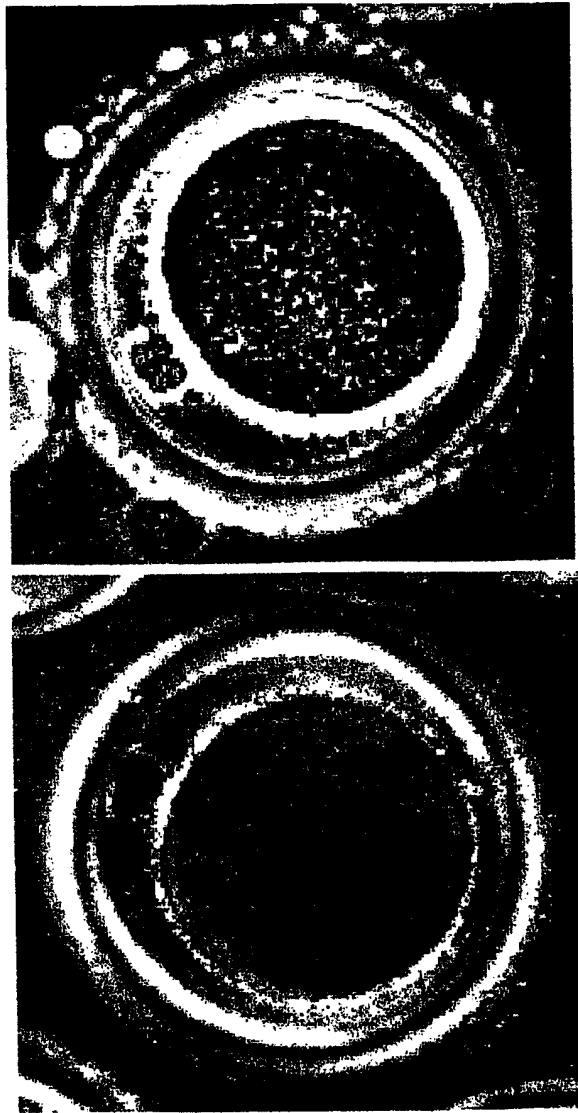


图 2

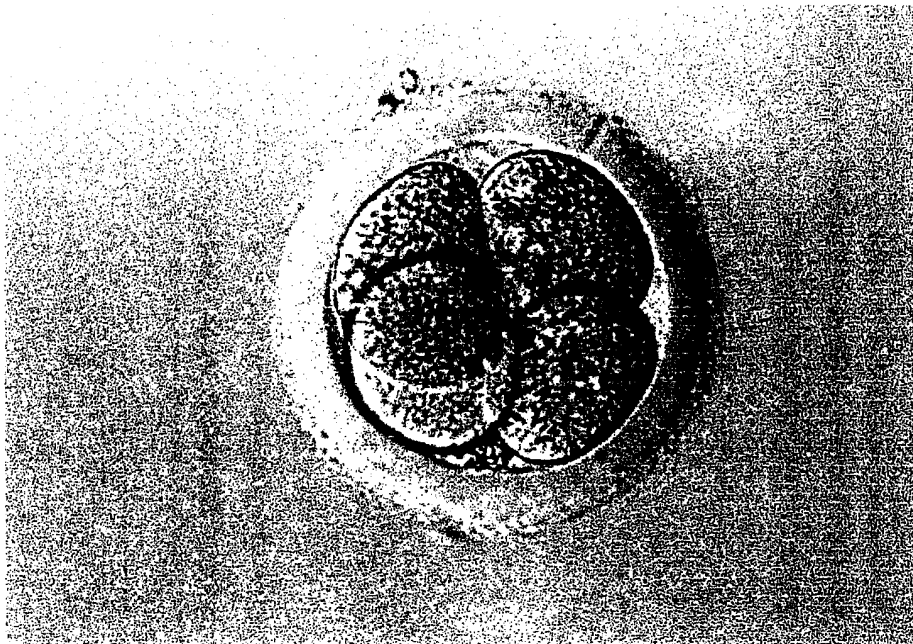


图 3

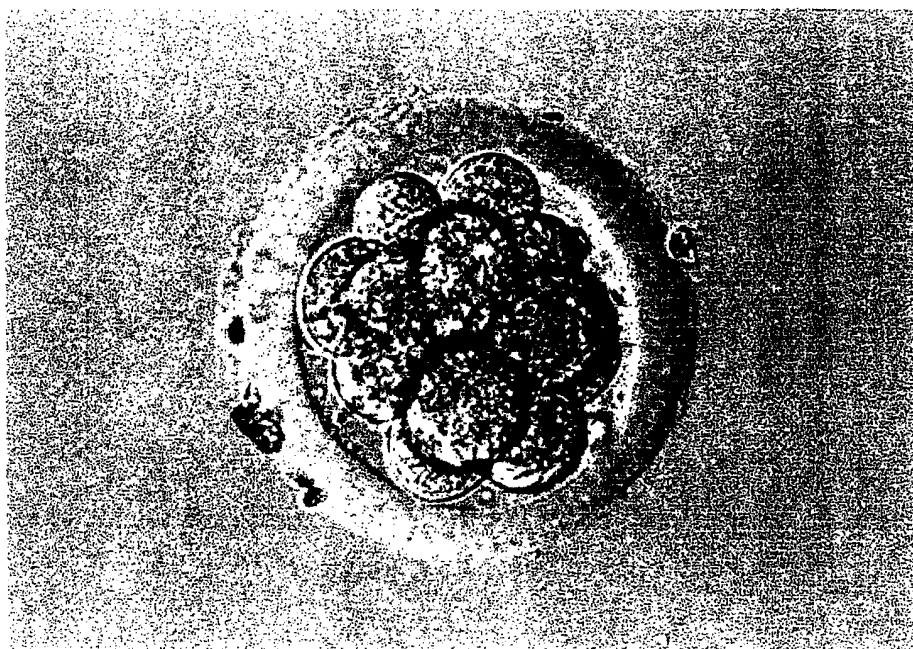


图 4

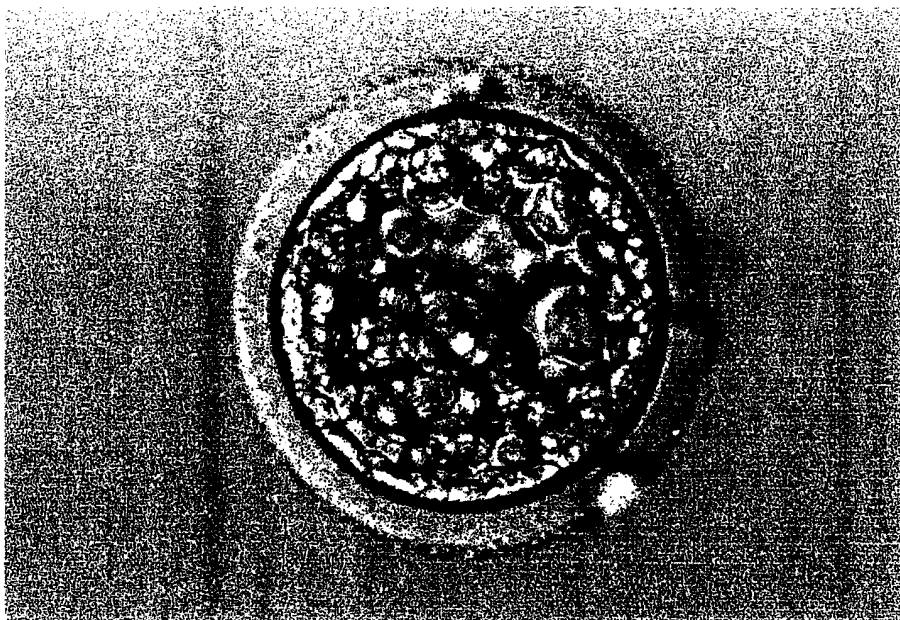


图 5

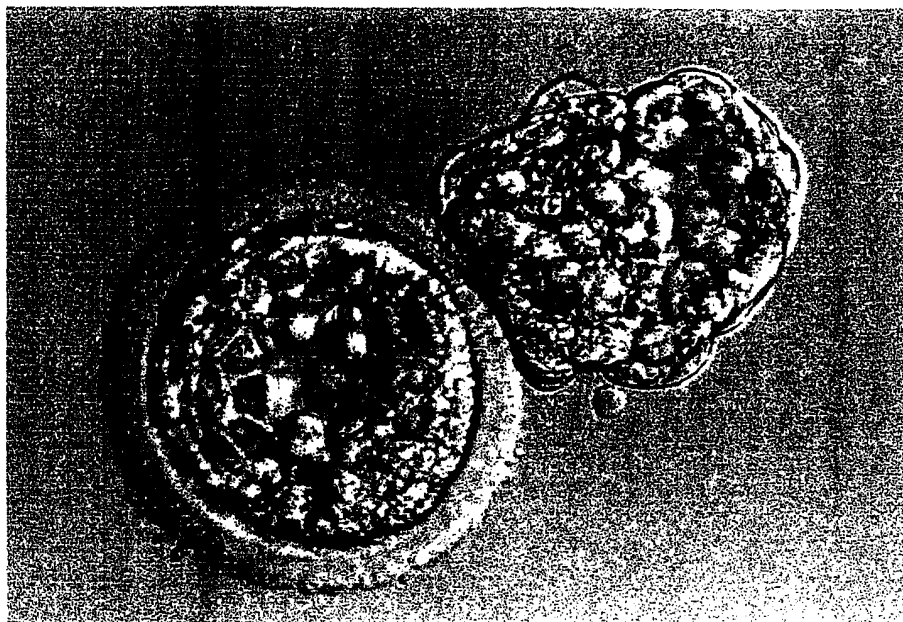


图 6

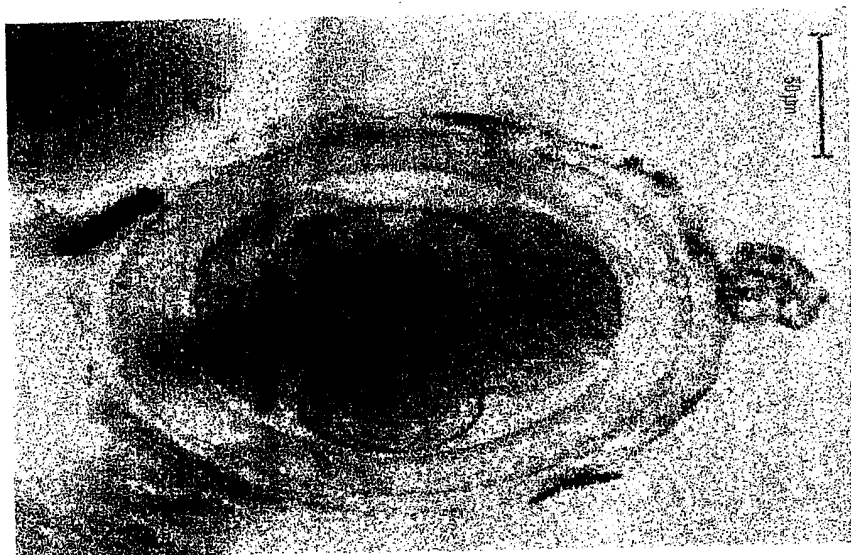


图 7

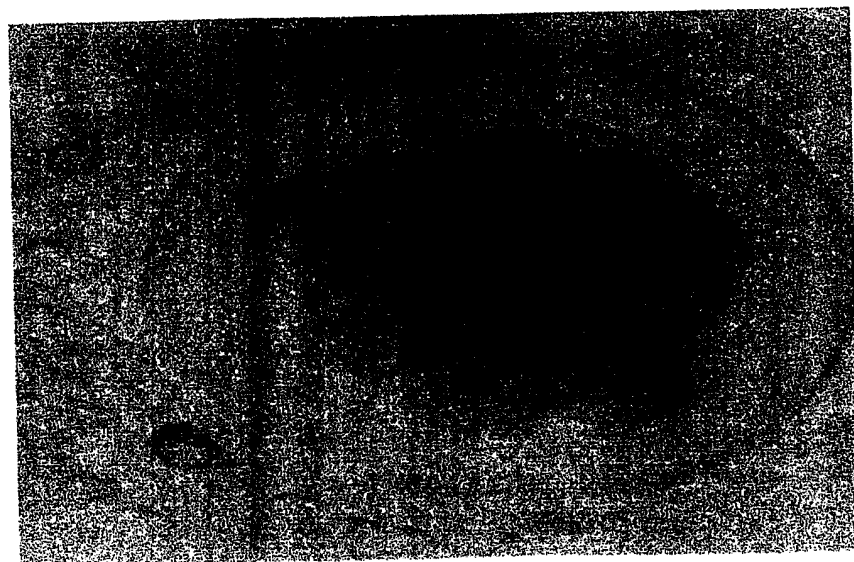


图 8

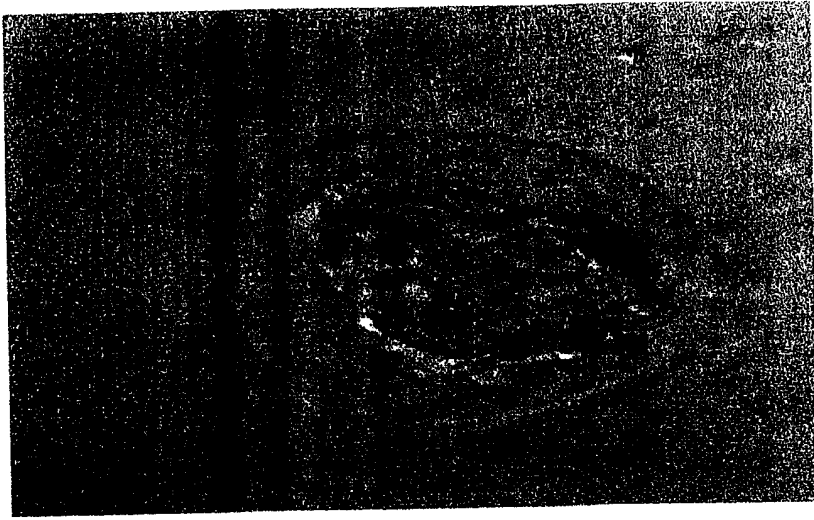


图 9

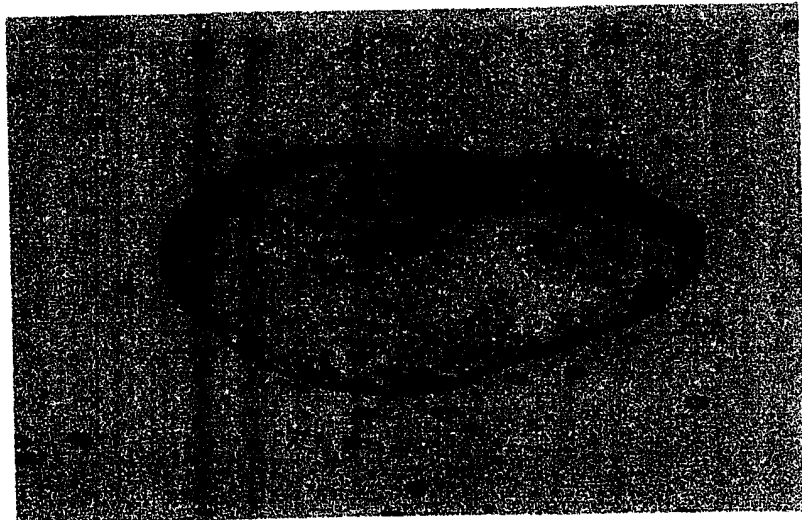


图 10

	重组胚 (个)	融合胚 (个)	2-4细胞 (个)	囊胚 (个)	%
5岁	246	240	52	28	11.67
42岁	167	134	50	13	9.70
52岁	372	178	58	18	10.10
60岁	239	133	71	18	13.50

图11

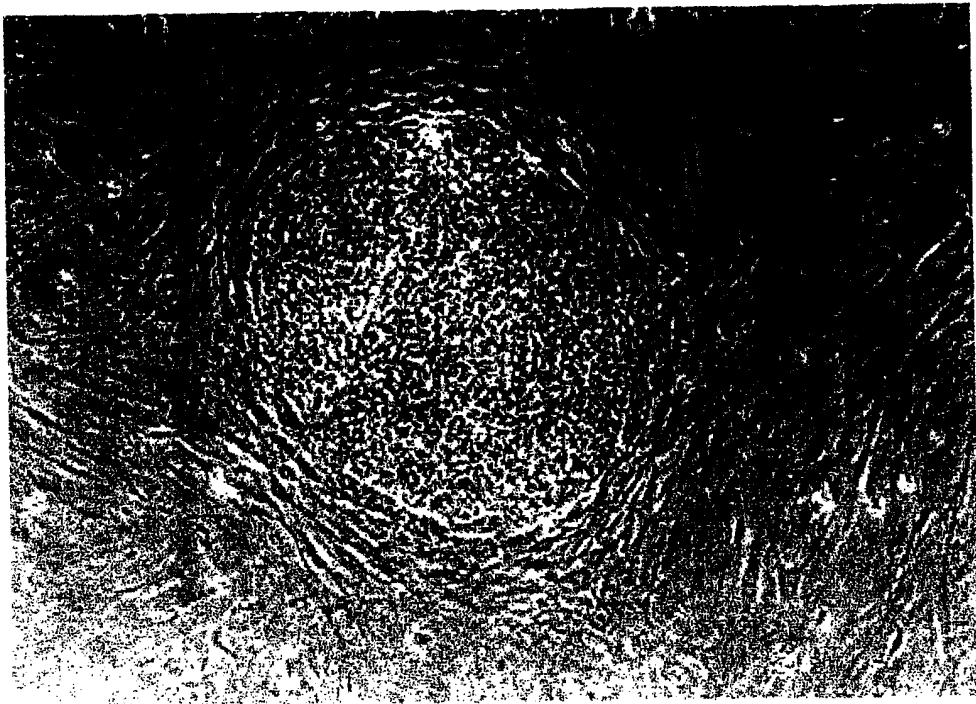


图 12

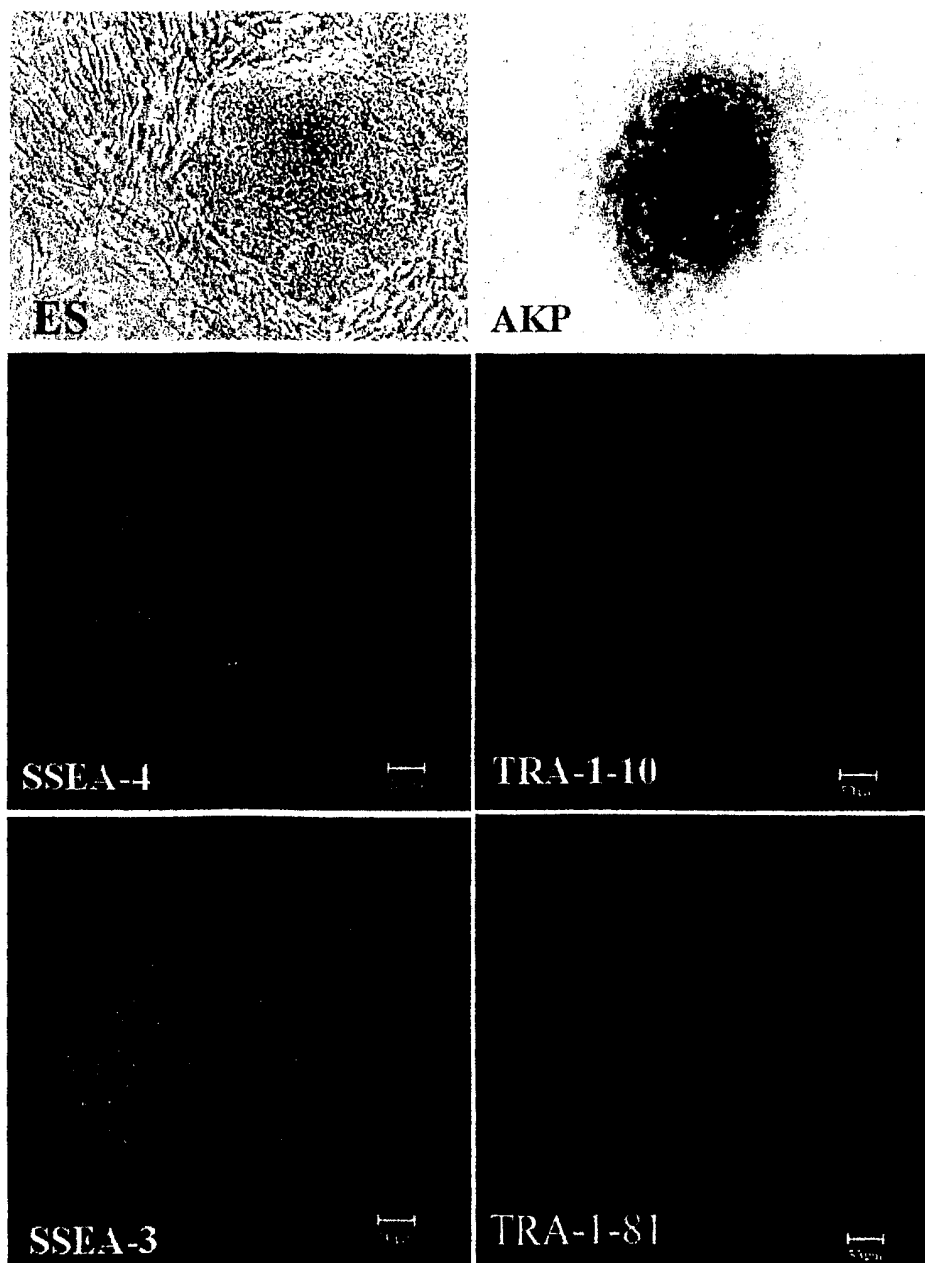


图 13

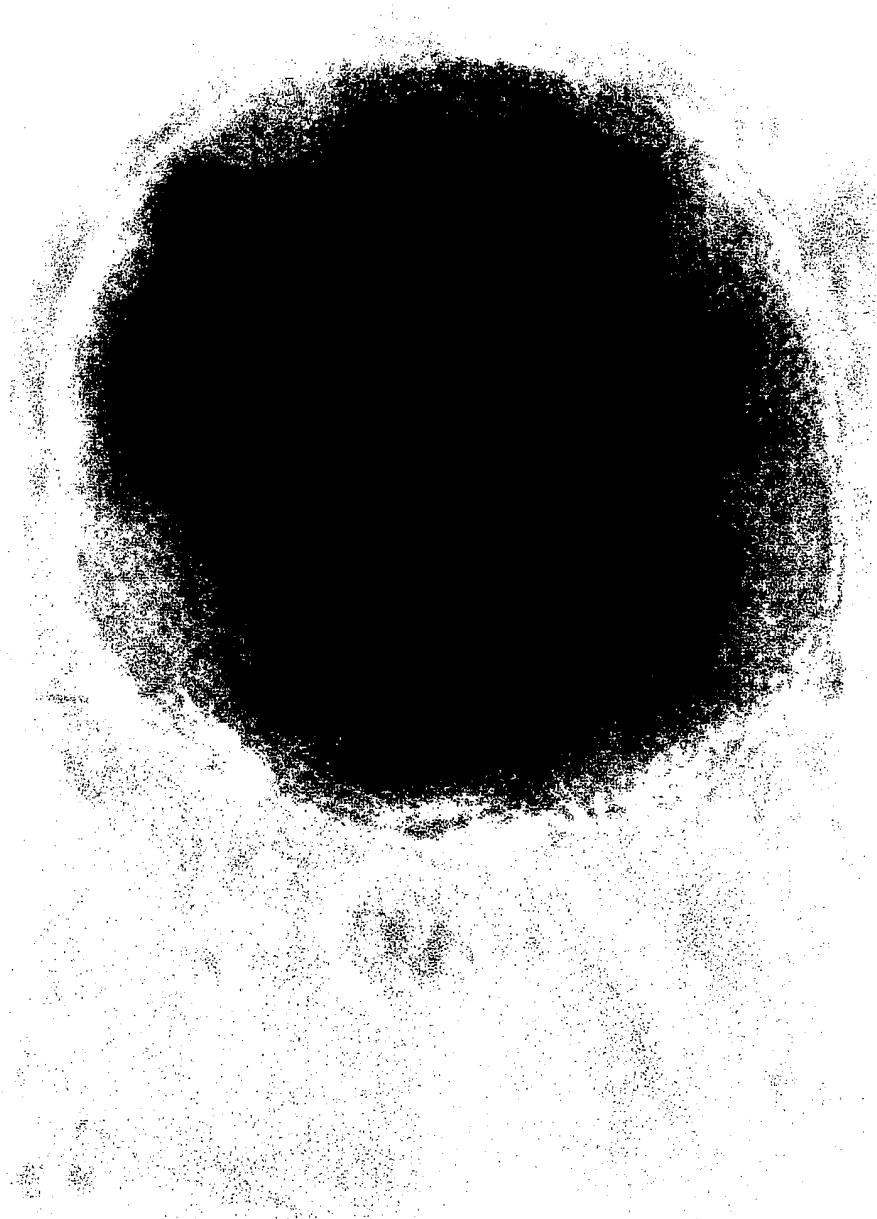


图 14

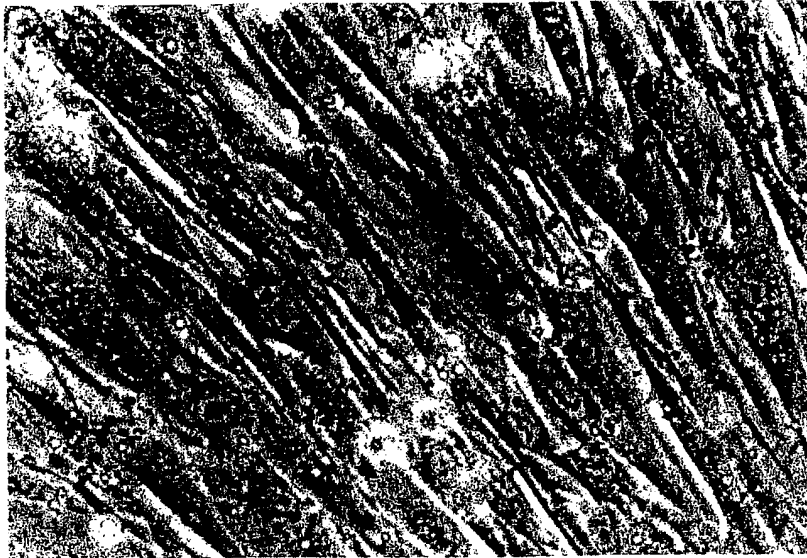


图 15

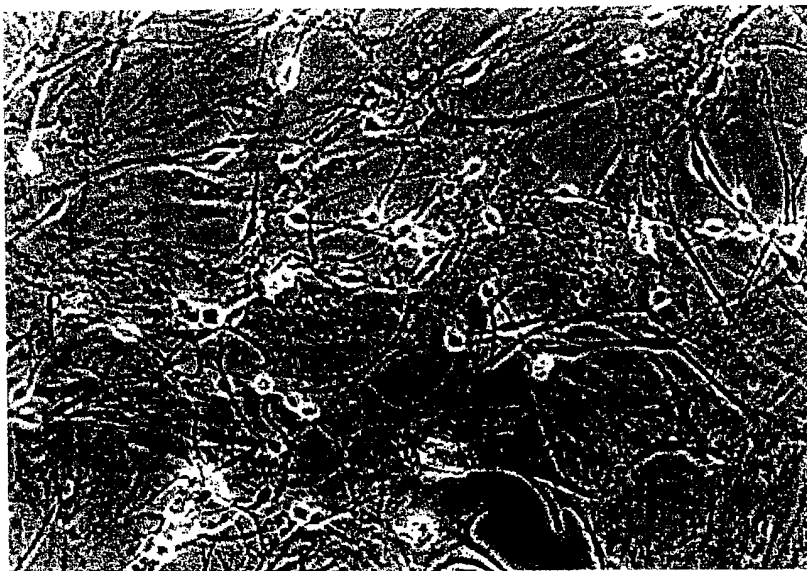


图 16

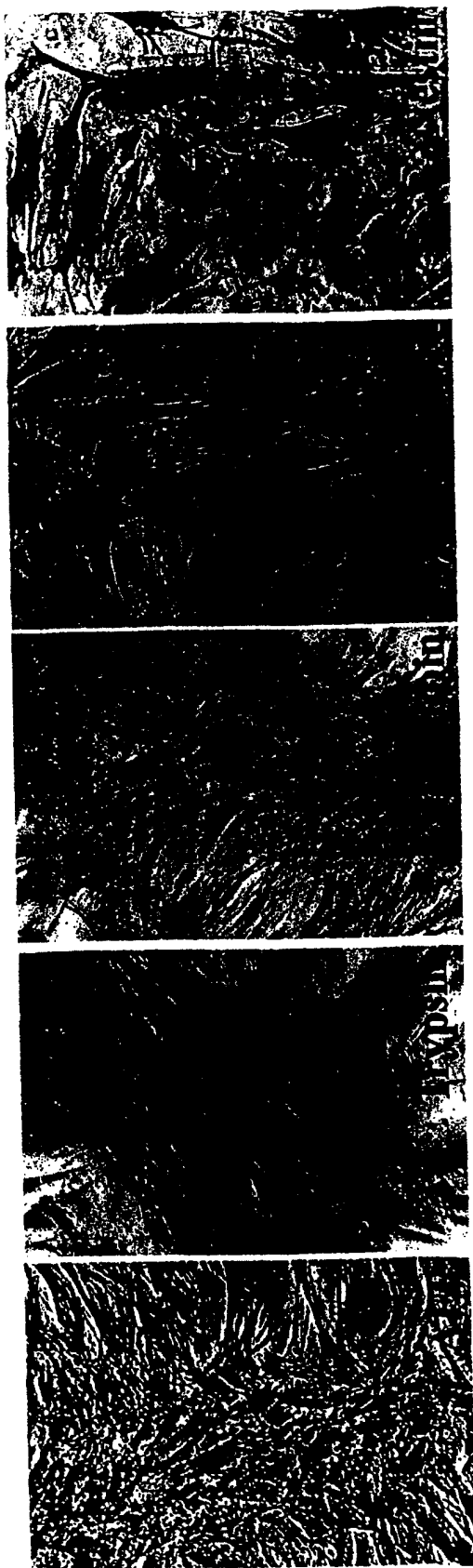


图 17



图 18

图 19



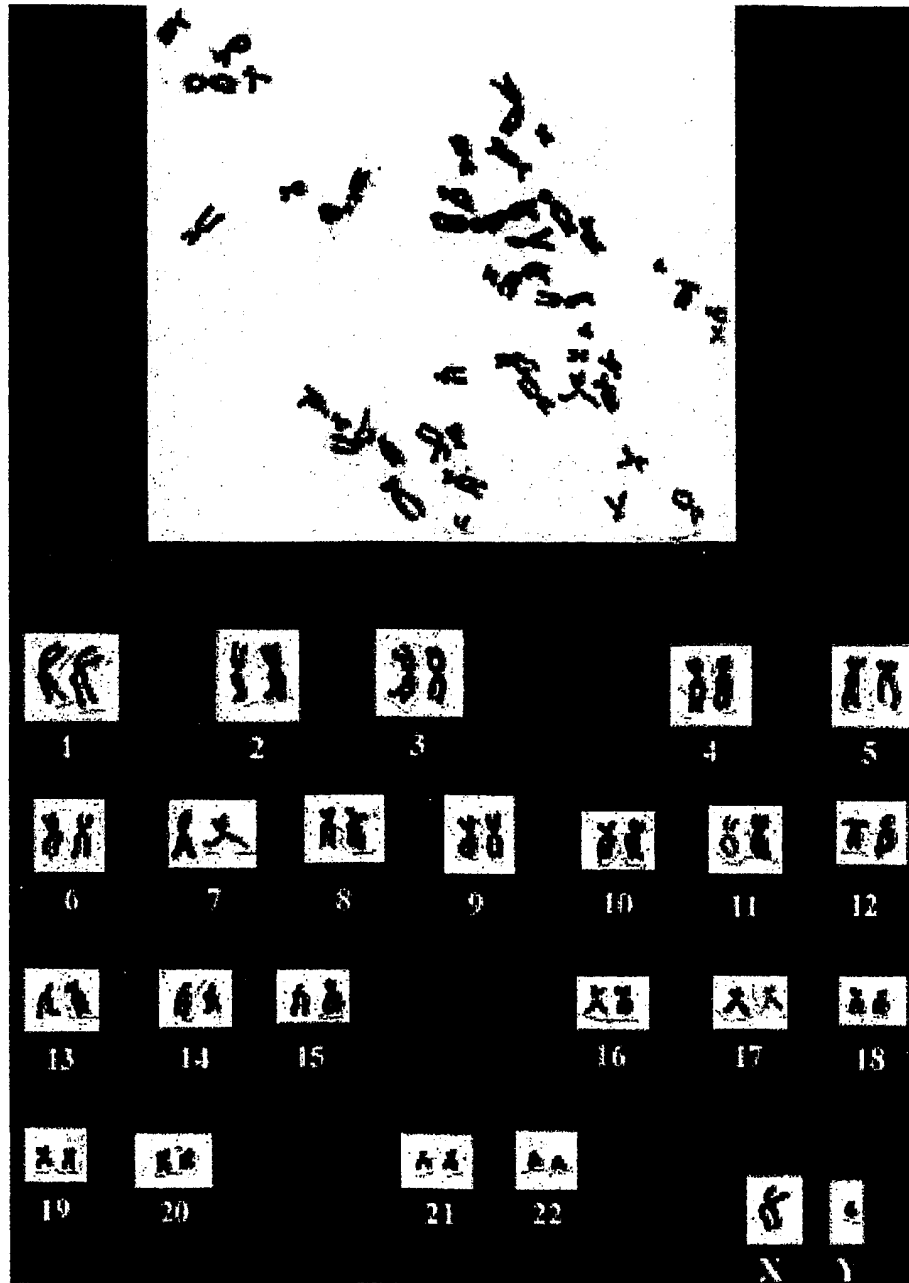


图 20