

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380109455.7

[51] Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)

A61K 35/30 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年3月8日

[11] 公开号 CN 1745168A

[22] 申请日 2003.12.2

[21] 申请号 200380109455.7

[30] 优先权

[32] 2002.12.2 [33] US [31] 60/430,431

[86] 国际申请 PCT/JP2003/015401 2003.12.2

[87] 国际公布 WO2004/050865 英 2004.6.17

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.2

[71] 申请人 安增子摩祺株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 石泽锭二 吉村绅一 北岛英臣
篠田淳 郭泰彦 岩间亨 森下竜一
国贞隆弘 坂井升

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 5 页

[54] 发明名称

利用肝细胞生长因子培养神经干细胞的方法

[57] 摘要

一种包含肝细胞生长因子(HGF)的培养基显示诱导神经球形成。此外,向含有FGF-2、EGF、或两者皆有的培养基加入HGF增加新形成的神经球的大小和数目。因此,本发明涉及包括用于培养神经干细胞的HGF的生长培养基和利用该培养基培养细胞的方法。

1. 一种包括肝细胞生长因子(HGF)的用于培养神经干细胞的培养基。
2. 权利要求1的培养基, 进一步包括除HGF之外的另一种生长因子。
- 5 3. 权利要求2的培养基, 其中该生长因子选自成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2)或表皮生长因子(EGF)。
4. 一种用于培养神经干细胞的方法, 其包括在权利要求1至3中任何一项的生长培养基中培养神经干细胞或包括至少一种神经干细胞的细胞群的步骤。
- 10 5. 一种用于使神经干细胞增殖的方法, 其包括在容许神经干细胞增殖的条件下, 在权利要求1至3中任何一项的生长培养基中培养神经干细胞或包括至少一种神经干细胞的细胞群的步骤。
6. 一种用于使神经干细胞分化的方法, 其包括在容许神经干细胞分化成为包含神经元和胶质细胞的细胞群的条件下, 在权利要求1至3中任何一项的生长培养基中培养神经干细胞或包括至少一种神经干细胞的细胞群的步骤。
- 15 7. 权利要求4至6中任何一项的方法, 其中该神经干细胞来源于选自脑干、小脑、大脑皮层、中脑、脊髓或室的哺乳动物神经组织。
8. 权利要求4至7中任何一项的方法, 其中该神经干细胞是经遗传改变的。
- 20 9. 一种利用在权利要求1至3中任何一项的培养基中所培养的神经干细胞或包括至少一种神经干细胞的细胞群治疗神经疾病的方法。
10. 权利要求9的方法, 其中该细胞群是在神经干细胞中富集的。
11. 权利要求9的方法, 其中该细胞群是在神经元中富集的。
- 25 12. 权利要求9至11中任何一项的方法, 其中待治疗的神经疾病选自癫痫症、头部损伤、中风、肌萎缩性侧索硬化、帕金森氏症、阿尔茨海默氏症、或Huntington's症。
13. 权利要求9至12中任何一项的方法, 其中通过移植至少一种细胞群来治疗神经疾病。

30

利用肝细胞生长因子培养神经干细胞的方法

5 技术领域

本发明涉及利用肝细胞生长因子(HGF)来培养神经干细胞(NSCs)。具体地,本发明涉及包括HGF的生长培养基。本发明进一步涉及利用培养基培养细胞的方法和利用通过这种方法培养的细胞来治疗神经疾病(neurological disorders)。

10

背景技术

迄今为止,中枢神经系统(CNS)的疾病主要是通过施用药物化合物来治疗的。令人遗憾的是,这种治疗有问题,例如转运药物化合物穿越血脑屏障的能力是有限的,以及由于化合物的长期给药带来了抗药性。

15

因此,神经病学上的组织移植是用于治疗CNS紊乱的有前途的技术。神经移植避免了对恒定的药物给药以及复杂的药物递送系统的需要。然而,缺点是神经移植需要利用在宿主中不产生免疫反应而且能够与周围的细胞形成正常的神经元联系的细胞。迄今为止,在最初的研究中这种细胞只限于胎儿细胞(例如,Perlow等人, Science 204 : 643647 (1979); Freed等人, N. Engl. J. Med. 327 : 1549-1555 (1992); Spencer等人, N. Engl. J. Med. 327 : 1541-1548 (1992); Widner等人, N. Engl. J. Med. 327 : 1556-1563 (1992))。对胎儿组织的利用涉及伦理和政治的问题。此外,超过一种的细胞类型组成了胎儿的CNS组织,并且该组织可能已经感染了细菌或病毒。因此,移植这种组织可能涉及一些风险。此外,需要来自6至8个胎儿的组织来治疗一个患有N-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(NPTP)-诱导的帕金森症的患者

20

25

(Widner等人, N. Engl. J. Med. 327 : 1556-1563 (1992))。因此,很难提供移植所需要的长期供应的胎儿组织。

为了克服这些缺点,研究人员建议可诱导增殖多潜能的神经干细胞(NSCs),而提供用于神经移植的无限数目神经细胞的可靠来源,其通过使用包括补充有表皮生长因子(EGF)或转化生长因子 α (TGF α)的培养基的组合

30

物而能够分化成为神经元、星形细胞和少突胶质细胞(美国专利号 5,851,832)。

神经干细胞(NSCs)具有自我更新和体外产生各种类型神经元、星形细胞和少突胶质细胞的能力,因此可在整个成年期的哺乳动物中枢神经系统 (CNS)的发育和作用中扮演重要的角色(Reynolds和Weiss, *Science* 255 : 1707-1710 (1992); Temple和Devis, *Development* 120:999-1008 (1994); Reynolds和Weiss, *Dev. Biol.* 175 : 1-13 (1996); Palmer等人, *Mol. Cell. Neurosci.* 8 : 389-404 (1997))。NSCs增殖和分化的调控是发展用于治疗神经元损伤和神经变性疾病的移植策略及其它治疗方法中的重要障碍(Svendsen 等人, *Prog. Brain Res.* 128 : 13-24 (1997); Armstrong等人, *Cell Transplant* 9 : 55-64 (2000))。

当在补充有神经生长因子、缺乏血清的培养基中以悬浮培养NSCs时,已知细胞形成称为神经球(neurosphere)的球形细胞簇。形成神经球的细胞是未分化的,并且一个神经球是一个NSC的后代。在包含一种或多种神经生长因子(例如,EGF、bFGF或其组合)的培养基中神经球的细胞持续增殖。在分化条件下,细胞具有分化成为神经细胞,例如神经元和胶质细胞(星形细胞和少突胶质细胞)的能力。

基于NSC神经形成和胶质形成的体外研究表明这些过程是有限制的逐步发生的,并且取决于环境的信号(Ahmed等人, *J. Neurosci.* 15 : 5765-5778 (1995); Tropepe等人, *J. Neurosci.* 17 : 7850-7859 (1997); Arsenijevic和Weiss, *J. Neurosci.* 18 : 2118-2128 (1998); Qian等人, *Neuron* 28 : 69-80 (2000))。许多生长因子支持NSCs的增殖和来自其祖代的分化。例如,已知表皮生长因子(EGF)和成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2)在NSCs的增殖和维持中发挥重要作用。

最近,已经报道其它的因子,例如睫状向神经营养因子(ciliary neurotrophic factor)(CNTF)和胰岛素样生长因子-1(IGF-1)在NSC增殖和维持的调控中起关键作用(Arsenijevic等人, *J. Neurosci.* 21 : 7194-7202 (2001); Shimazaki等人, *J. Neurosci.* 21 : 7642-7653 (2001))。也已知FGF-2和血小板衍生的生长因子(PDGF)增强神经元的分化(Johe等人, *Genes Dev.* 10 : 3129-3140 (1996); Erlandsson等人, *J. Neurosci.* 21 : 3483-3491 (2001); Yoshimura等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 : 5874-5876 (2001))。另一方面,已经显示CNTF

和骨形态发生蛋白(BMP)在培养物中增强星形细胞分化(Johe等人, Genes Dev. 10 : 3129-3140 (1996); Bonni等人, Science 278: 477-483 (1997); Shimazaki等人, J. Neurosci. 21 : 7642-7653 (2001)), 同时已经显示三碘甲状腺原氨酸(T3)促进少突胶质细胞分化(Johe等人, Genes Dev. 10 : 3129-3140 5 (1996))。

已经将FGF-2、CNTF、白血病抑制因子(LIF)、脑来源的神经营养性因子(BDNF)和PDGF分类为在神经系统的发育、维持、活性依赖性调节和调控中发挥重要作用的神经营养性因子。

最初鉴定肝细胞生长因子(HGF)是肝细胞的有效促细胞分裂原,并且后来在1989被纯化和分子克隆出来(Nakamura等人, Nature 342 : 440-443 10 (1989))。HGF不但对肝细胞而且对各种类型的细胞具有多种效应。

近来 HGF 的广泛分析已经显示 HGF 是在正常发育和病理状况中诱导多种应答的多效因子。(Matsumoto 和 Nakamura, Biochem. Biophys. Res. Commun. 239 : 639-644 (1997))。也表明 HGF 在神经元诱导的早期阶段发挥 15 作用。HGF 是通过结合 c-Met 酪氨酸激酶受体而起作用的多肽生长因子。已经发现 HGF 和 c-Met 存在于发育和成熟的 CNS 中(Jung 等人, J. Cell. Biol. 126 : 485-494 (1994); Honda 等人, Mol. Brain Res. 32 : 197-210 (1995); Hamanoue 等人, J. Neurosci. Res. 43 : 554-564 (1996); Achim 等人, Dev. Brain Res. 102 : 299-303 (1997))。HGF 和 c-Met 在成体中持续表达(Jung 等人, J. 20 Cell. Biol. 126 : 485-494 (1994); Achim 等人, Dev. Brain Res. 102 : 299-303 (1997); Streit 等人, Development 124 : 1191-1202 (1997) Maina 和 Klein, Nat. Neurosci. 2 : 213-217 (1999))。因此, HGF 是诱导神经细胞的有丝分裂发生、迁移性、形态发生和抗凋亡活性的多效细胞因子(Honda 等人, Mol. Brain Res. 32 : 197-210(1995); Hamanoue 等人, J. Neurosci. 43 : 554-564 (1996); Ebens 25 等人, Neuron 17 : 1157-1172 (1996); Novak 等人, J. Neurosci. 20 : 326-337 (2000))。此外, 最近已经显示 HGF 在神经系统的不同部分中表达并且具有神经营养的能力。然而, HGF 对 NSCs 的增殖或分化的效应是未知的。

发明公开

30 本发明人研究了HGF对分离自E14小鼠纹状体(striatal)细胞的NSCs增殖和分化的体外效应。单独包含HGF的培养基能够诱导从纹状体细胞形成

神经球。向含有FGF-2、EGF、或两者皆有的培养基加入HGF显示增加新形成的神经球的大小和数目。可通过将HGF加入含1%胎牛血清的分化培养基获得更多的神经元。相比之下，机械分离NSCs的重复传代培养后显示神经球的数目减少。这表明HGF形成的神经球主要是由定型至神经元或神经胶质系的祖细胞组成的。这些结果依次表明HGF促进来源于小鼠胚胎的NSCs的增殖和神经元分化。

因此本发明提供如下：

- (1) 一种用于培养神经干细胞(NSCs)的生长培养基(medium)，其包括肝细胞生长因子(HGF)；
- 10 (2)(1)的生长培养基，其进一步包括除HGF之外的另一种生长因子；
- (3)(2)的生长培养基，其中该生长因子选自成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2)和/或表皮生长因子(EGF)；
- (4)(1)或(2)的生长培养基，其中该培养基用于体外增殖哺乳动物的 NSCs；
- 15 (5)(1)或(2)的生长培养基，其中该培养基用于体外分化哺乳动物的 NSC；
- (6)一种用于培养NSCs的方法，其中NSC或包括至少一种NSC的细胞群是在(1)至(5)中任何一项的生长培养基中培养的；
- (7)一种用于增殖NSCs的方法，其中NSC或包括至少一种NSC的细胞群是在容许NSC增殖的条件下，在(1)至(5)中任何一项的生长培养基中培养的；
- 20 (8)一种用于分化NSCs的方法，其中NSC或包括至少一种NSC的细胞群是在容许NSC分化成为包含神经元和胶质细胞的细胞群的情况下，在(1)至(5)中任何一项的生长培养基中培养的；
- 25 (9)(6)至(8)中任何一项的方法，其中NSC来源于选自脑干、小脑、大脑皮层(cerebral cortex)、中脑、脊髓或室性的(ventricular)哺乳动物神经组织；
- (10)(6)至(9)中任何一项的方法，其中NSC是遗传改变的；
- (11)通过在(1)至(6)中任何一项的培养基中培养NSC或包括至少一种 NSC的细胞群所获得的细胞群用于治疗神经紊乱的用途；
- 30 (12)(11)的用途，其中该细胞群是在NSCs中富集的；
- (13)(11)的用途，其中该细胞群是在神经元中富集的；以及

(14)(11)至(13)中任何一项的用途, 其中神经紊乱选自癫痫症、头部损伤、中风、肌萎缩性侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、阿尔茨海默氏症(Alzheimer's disease)、和Huntington's 症。

- 5 (15)(11)至(14)中任何一项的用途, 其中通过移植细胞群的至少一种细胞来治疗该神经紊乱。

附图简述

图1a-1b显示HGF对形成分离自小鼠E14纹状体细胞的神经球的影响。

- 10 图1a描绘了在存在多种生长因子时, 初级球体生长7天的照片。比例尺度: 50 μ M。图1b描绘了显示E14纹状体细胞中神经球数目的图表。在存在FGF-2 (■)、EGF(▲)、FGF-2 加EGF(x)或什么都没有(◆), 以及各种浓度的HGF的情况下, 在24-孔平板中以每孔75,000个细胞培养7天。显示了5个不同实验的平均值。

- 15 图2a-2c描绘了显示免疫染色c-Met受体(a, b)和nestin c的结果的照片。图2a显示在存在FGF-2和EGF时培养的神经球中细胞上c-Met受体的表达(绿色)。细胞核用Hoechst对比染色(蓝色)。比例尺度: 20 μ M。图2b显示单个分离的细胞中c-Met受体的免疫染色。比例尺度: 10 μ M。图2c显示在存在HGF下神经球的细胞中nestin(红色)的表达。比例尺度: 50 μ M。

- 20 图3a显示在存在各种生长因子时所培养的神经球中BrdU阳性细胞的百分比。将BrdU(10 μ M)加入次级神经球, 并培养神经球12hr。然后机械分离该神经球, 接种在24孔平板上并且固定12hr以上。显示了5个不同实验的平均值。*:p<0.05对FGF, **:p<0.01 FGF+EGF。图3b显示有或没有HGF的神经球中TUNEL阳性细胞的数目。机械分离次级神经球, 在1%多聚甲醛中固定并用TUNEL试剂盒染色。显示了5个不同实验的平均值。*:p<0.05对FGF, **:p<0.05FGF+EGF。

- 30 图4描绘了显示HGF对表型百分比的影响的照片。显示了来自在存在HGF、FGF-2 加EGF, 和FGF-2 加EGF加HGF时, 所培养的神经球中细胞的双标记免疫细胞化学。将细胞接种在1%FBS或1%FBS加HGF中。显示了MAP-2 阳性神经元(红色)、GFAP阳性星形细胞(绿色)和Hoechst标记的核(蓝色)。比例尺度: 50 μ M。

图5描绘了显示当存在HGF(a)、FGF-2和EGF(b)、FGF-2、EGF和HGF(c)时,培养的神神经球中免疫阳性细胞百分比的图表。该神经球在1%PBS或1%PBS加HGF(20ng/ml)中分化7天。显示了5个不同实验的平均值。*: $p < 0.01$ 对1%FBS神经元, **: $p < 0.01$ 对(b)。

5

实现本发明的最佳方式

除非另外具体地标明,如在此所使用的单词"一个"(a or an)、"一种"(a or an)和"这个"(the)是指"至少一个"。

利用FGF-2和/或EGF作为促细胞分裂原建立的用于神经干细胞(NSCs)表达的体外培养系统提供了用于研究NSC发育中细胞机理的有用模型(Reynolds和Weiss, Science 255 : 1707-1710 (1992); Temple和Davis, Development 120 : 999-1008 (1994); Reynolds和Weiss, Dev. Biol. 175 : 1-13 (1996); Weiss等人, J. Neurosci. 16:7599-7609 (1996); McKay, Science 276 : 66-71 (1997); Palmer等人, Mol. Cell. Neurosci. 8 : 389-404 (1997))。阐明NSC增殖和分化的机制对于针对神经元损伤和神经变性疾病的治疗方法的新前途是很重要的。近来研究已经显示环境信号,例如细胞因子和生长因子影响NSCs的增殖或分化(Ahmed等人, J. Neurosci. 15 : 5765-5778 (1995); Tropepe等人, J. Neurosci. 17 : 7850-7859 (1997); Tropepe等人, Dev. Biol. 208 : 166-188 (1999); Arsenijevic和Weiss, J. Neurosci. 18 : 2118-2128 (1998); Qian等人, Neuron 28 : 69-80 (2000)。本研究旨在确定肝细胞生长因子(HGF)对NSCs的体外影响。

在目前的研究中,在分离自E14小鼠胚胎的神神经球中观察到细胞上的c-Met受体的免疫反应性。这表明HGF的受体存在于神神经球中的细胞上。没有FGF-2或EGF时,在仅仅包含HGF的培养基中观察到神神经球的形成,尽管在培养基中包含FGF-2、EGF、或两者皆有时,产生尺寸更大并且其中具有更多数目细胞的神神经球。随HGF形成的神神经球包含对nestin免疫阳性,并且是多潜能的细胞(即,能够分化成为神经元、星形细胞和少突胶质细胞)。然而,机械分离该神神经球的重复传代培养后降低了形成神神经球的能力。可通过假定HGF不仅促进干细胞分裂而且促进最终分化成为各种程度的神经元和神经胶质的祖细胞的生产来解释该现象。实际上,已经报道说神神经球包含干细胞以及已经定型为神经元和神经胶质的神经元和神经胶质祖细胞

胞(Reynolds和Weiss, *Dev. Biol.* 175 : 1-13 (1996); Svendsen和Caldwell, *Prog. Brain Res.* 127 : 13-24 (2000))。

NSC的增殖性分裂被划分为产生NSCs的对称分裂和产生祖细胞的不对称分裂。也已知神经元祖细胞主要是在初期产生的(神经原发生阶段(neurogenic phase))而神经胶质祖细胞是在后期阶段产生的(神经胶质发生阶段)(gliogenic phase)(Morrison等人, *Cell* 88 : 287-298 (1997); Qian等人, *Neuron* 28 : 69-80 (2000))。在存在HGF时,形成的神经球很可能主要包含定型为神经元或神经胶质的祖细胞。这些祖细胞不能和NSCs加以区分因为它们对nestin也是免疫阳性的。换句话说,HGF促进不对称分裂而非对称分裂。
10 这个假设解释了包含HGF的培养基中分离的细胞自我更新能力的降低。

根据本研究,向含有FGF-2、EGF、或其组合的培养基加入HGF增加神经球的数目和大小。虽然不希望受到理论的束缚,可通过假设(1)HGF促进NSCs的增殖;(2)HGF抑制NSCs的凋亡或坏死;和/或(3)HGF使NSCs保持未分化状态来解释这个现象。

15 支持假设(1)的是,向包含FGF-2、EGF、或两者皆有的培养基加入HGF显示BrdU阳性细胞数目的增加。此外,在包含HGF的生长培养基中培养后获得更多的神经元。这些结果表明HGF可能促进产生神经元祖细胞的不对称分裂。关于假设(2),已经报道说在CNS发育期间发生显著数量的细胞死亡(Oppenheimer, *Annu. Rev. Neurosci.* 14 : 453-501 (1991))。有趣地是,大多数
20 TUNEL阳性细胞位于存在NSCs的脑的室周区带(PVZ)(Thomaidou等人, *J. Neurosci.* 17 : 1075-1085 (1997); Blaschke等人, *Development* 122 : 1165-1174 (1996))。也已知在生长和分化状态期间神经球的中心发生细胞死亡。看来凋亡似乎与该细胞死亡紧密相关。根据本研究,表明在生长培养基中培养
25 的神经球中存在许多TUNEL阳性细胞。除上述NSCs的增殖影响之外,HGF的抗凋亡效应可能导致神经球数目和大小的增加。关于假设(3),已经报道说通过由CNTF活化的gb130(Shimazaki等人, (2001)或由Notch信号表达Hes1或Hes5而发生信号转导(Artavanis-Tsakonas等人, *Science* 284 : 770-776 (1999); Nakamura等人, *J. Neurosci.* 20 : 283-293 (2000); Ohtsuka等人, *J. Biol. Chem.* 276 : 30467-30474 (2001))。

根据本发明,发现HGF促进NSCs的增殖和神经元分化。因此,本发明提供用于培养NSCs的补充有HGF的生长培养基。该生长培养基可用于体外增殖或分化哺乳动物NSCs。

HGF 是分子量为 82,000 至 85,000, 由 α 和 β 链组成的杂二聚体。人 HGF 的核苷酸序列和氨基酸序列是本领域已知的(Nakamura 等人, Nature 342:440-443 (1989))。任何 HGF, 包括类似物、同系物和突变体, 可用于本发明的生长培养基, 只要其保持诱导 NSCs 增殖和/或分化的能力。因此, 除上述人 HGF 外, 来源于除了人以外的哺乳动物的 HGF 同系物可用于本发明。此外, 因为已知由相似序列的基因编码的蛋白质具有相似的活性, 由在严谨条件下与人 HGF 基因杂交的基因或多核苷酸编码的蛋白质也可用于本发明, 只要这种蛋白质能够诱导 NSCs 的增殖和/或分化。此外, 用于本发明的 HGF 可以是天然存在的 HGF 突变体或从修饰, 例如通过缺失、取代、添加和/或插入一个或多个氨基酸残基而产生的 HGF 突变体。HGF 的片段也可用于本发明, 只要它们诱导 NSCs 的增殖和/或分化。

可根据常规方法例如, 利用抗HGF抗体或根据其活性从天然源分离 HGF及其类似物、同系物和突变体。备选地, 可表达为重组蛋白质, 然后根据需要进行纯化。对于重组表达, 可根据已知的技术, 例如定点诱变、聚合酶链式反应(PCR)(参见, 例如, edit. Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology, publish. John Wiley & Sons, 第6.1-6.4节(1987))和杂交(参见例如, edit. Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology, publish. John Wiley & Sons, 第6.3-6.4节(1987))来获得编码HGF的基因。

向本发明的培养基加入HGF, 终浓度为大约1ng/ml至大约1mg/ml, 优选大约1ng/ml至大约100ng/ml, 更优选大约1ng/ml至大约20ng/ml。然而, HGF的最佳浓度根据加入的其它生长因子而不同。一般地, 优选加入的生长因子总浓度为大约1ng/ml至大约1mg/ml, 以及通常浓度为大约1ng/ml至大约100ng/ml是足够的。为了确定HGF和其它特定生长因子的最佳浓度, 本领域的技术人员可容易地进行简单的滴定实验。这是常规实验。

根据本发明的生长培养基可包括培养NSCs所需要的其它因子。即, 任何已知的培养基可用于本发明, 只要它支持NSCs的生长。合适的培养基实例包括但不限于, DMEM、F-12、HEM, RPIM等。两种或多种的这些培养

基可组合用于如下所述的实施例infra。用于实施例的包括HGF的DMEM和F-12组合是本发明特别优选的培养基实例。

如果需要,可向培养基添加补充例如氨基酸(例如,谷氨酰胺等)、维生素、矿物、蛋白质(例如转运蛋白(transferring)等)和抗生素(例如青霉素、链霉素、庆大霉素等)。用于增殖NSC的生长培养基优选是无血清培养基,因为血清趋向于诱导NSCs分化。备选地,用于分化NSC的培养基可任选地包含血清。示范性的血清包括来源于牛、鸡、马等的血清。加入血清的浓度范围是大约0.01至大约10%,优选大约0.1至大约5%,更优选大约0.5至大约3%,以及最优选大约1.0至大约1.5%。

此外,本发明的生长培养基可包括除HGF外的其它生长因子。可与HGF组合使用的生长因子包括容许NSCs增殖的生长因子。实例包括但不限于成纤维细胞生长因子-2 (FGF-2; 也称为碱性的成纤维细胞生长因子(bFGF))、表皮生长因子EGF、双调蛋白、酸性的成纤维细胞生长因子(aFGF或FGF-1)、转化生长因子 α (TGF α)等。除上述诱导NSCs增殖的生长因子外,影响NSC增殖和分化的其它生长因子也可加入本发明的培养基。例如,已知胰岛素样生长因子(IGF-1), 坏死生长因子(NGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、促甲状腺素释放激素(TRH)、转化生长因子 β (TGF β)等影响细胞的增殖和分化,如果需要可以进行添加。此外,也已知FGF-1、FGF-2、睫状向神经营养性因子(CNTF)、NGF、脑衍生的神经营养性因子(BDNF)、向神经素2、向神经素4、白细胞间介素、白血病抑制因子(LIF)、环腺苷单磷酸、福斯高林、破伤风毒素、高水平的钾、双调蛋白、TGF- α 、IGF-1、地塞米松, 异丁基3-甲基黄嘌呤、生长激素抑制因子、生长激素、视黄酸和PDGF影响NSCs的分化,并且因此可加入培养基而用于分化。

这些生长因子可单独或与其它生长因子组合加入本发明的培养基。如本实施例中所证明的,优选的生长因子包括FGF-2和/或EGF。类似于HGF,这些附加的生长因子可包括其类似物、同系物、突变体和片段,只要其具有增强通过加入HGF诱导NSC增殖和/或分化的能力。

本发明进一步提供用于培养NSCs的方法。发现向生长培养基加入HGF诱导NSC的增殖。因此,本发明进一步提供用于增殖NSCs的方法。根据该方法,在本发明包括HGF的生长培养基中培养NSC或包括至少一种NSC的细胞群。此外,本发明人发现当在神经球分化期间向培养基加入HGF时,获

得多于星形细胞的神经元。因此，本发明提供用于分化NSCs的方法。根据该方法，在本发明包括HGF的生长培养基中培养NSC或包括至少一种NSC的细胞群。

5 神经干细胞(NSC)是能够自我维持的未分化神经细胞。可以从胚胎的、分娩后的、幼年和成年的神经元组织获得 NSCs。可从具有神经元组织的任何动物获得神经元组织。优选从哺乳动物，更优选啮齿动物和灵长类，以及甚至更优选小鼠、大鼠和人获得神经元组织。用于获得神经元组织的合适区域包括脑干、小脑、大脑皮层、中脑、脊髓和室性组织，以及周围神经系统的区域，例如颈动脉体和肾上腺髓质。优选的区域包括但不限于，
10 基底神经节，例如由尾状物和壳核组成的纹状体中的区域，以及苍白球、核上颞基片、黑质密部(substantia nigra pars compacta)以及底丘脑核(subthalamic nucleus)的细胞。特别优选的神经组织是从神经室性组织，包括室管膜下层获得的。人 NSCs 可来源于随意性流产或分娩后的胎儿组织、幼体或成体的器官供体。可通过活组织检查获得，或获得自经受神经外科手术，例如癫痫症外科手术、暂时性叶切除术和海马结构切除术
15 (hippocampalectomies)的患者。

可用于本发明方法的细胞或细胞群可利用任何本领域已知的方法从上述的组织分离获得。从相关的细胞外基质分离细胞的方法包括酶处理，例如用胰蛋白酶或胶原酶处理，以及物理方法，例如利用钝器的方法。

20 如果需要，可遗传改变神经干细胞。短语"遗传改变"是指通过导入至少一种外源核酸构建体稳定或瞬时改变细胞的基因型。优选的核酸构建体包括包含编码表达调控序列下游的目标蛋白质的DNA的载体。这种载体包括病毒载体、质粒等。来源于转基因动物的NSCs也包括在本发明遗传改变的NSCs内。

25 NSC基因型的改变能够有效检测细胞。例如，当将连接在调控序列下游的可检测的报告基因(例如， β -半乳糖苷酶基因、绿色荧光蛋白基因等)导入NSCs实现在神经元、星形细胞或少突胶质细胞中的特异表达时，可以根据报告基因检测NSCs的分化。

30 备选地，可使用编码生物活性物质的基因进行转染以提供对治疗CNS紊乱有用的细胞。生物活性物质的实例包括但不限于，BDNF、CNTF、EGF、FGF-1、FGF-2、IGFs、白细胞间介素、神经营养因子、例如NT-3、NT-4/NT-5

等, NGF、PDGF、TGF- α 、TGF- β s、其受体、神经递质受体, 例如乙酰胆碱(ACh)、多巴胺、内啡肽、脑啡肽、肾上腺素、 γ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸、甘氨酸、组胺、L-3,4-二羟苯丙氨酸(L-DOPA)、N-甲基D-天冬氨酸、去甲肾上腺素、5-羟色胺、P物质和速激肽; 神经递质合成基因, 例如胆碱O-乙酰基转移酶(ChAT)、多巴脱羧酶(DDC)、多巴胺- β -羟化酶(DBH)、谷氨酸脱羧酶(GAD)、组氨酸脱羧酶、苯乙醇胺N-甲基转移酶(PNMT)、酪氨酸羟化酶(TH)和色氨酸羟化酶; 和编码神经肽的基因, 例如铃蟾素、降钙素基因相关的肽、缩胆囊肽(CCK)、脑啡肽、胰高血糖素、神经肽-Y、抑生长素、P-物质、加压素和血管活性肠肽(VIP)。

10 可在悬浮液中或在固定的基底上培养神经细胞。对于NSCs的增殖, 由于基底趋向诱导NSCs分化, 因此悬浮培养是优选的。

根据本方法, 细胞或细胞悬液可接种在任何能支持细胞的容器中。这种容器包括培养皿、培养瓶、培养平板、滚瓶等。容器包括本发明的包含HGF的生长培养基。可单独或以不同组合, 一起或按时间顺序加入影响增殖和/或分化的其它生长因子和分子。

15 应使用接近于生理条件的条件来用于本发明的培养。因此, 最佳的培养温度范围是大约30°C至大约40°C, 更优选大约32°C至大约38°C, 以及更优选大约35°C至大约37°C, 同样地, 培养基的pH优选是大约pH6至大约8之间, 以及更优选大约pH7.0至大约7.8。然而, 本发明的培养条件不局限于这些实例, 本领域的技术人员可考虑到各种参数, 例如所使用的培养基的种类、细胞起源等而成功地确定适当的条件。

可根据需要持续培养足够的时间。

25 根据美国专利5,851,832, 大约4至5天后, 增殖的神经球高出离开培养皿底面, 并且趋向于形成游离浮动簇特性的神经球。因此, 对于NSCs的增殖, 优选持续培养长于4天的时间。应每2至7天, 优选2至4天更换培养基。具体地, 大约3至10天后(更特别地大约6至7天后)体外温和地离心培养物, 然后再悬浮在适当的完全培养基中。

30 也可通过本领域已知的任何方法进行NSCs的分化。例如, 美国专利5,851,832教导, 释放环己六醇三磷酸盐和胞内的Ca²⁺; 释放二酰基甘油并且活化蛋白激酶及其它细胞激酶; 用佛波酯、诱导分化的生长因子、胶原、纤维结合素、层粘连蛋白、MATRIGEL™(Collaborative Research)等进行治疗;

并且将细胞接种到涂有离子电荷的表面，例如聚-L-赖氨酸、聚-L-omithine 等的固定基底上。

在分化条件下培养 2 至 3 天后，NSCs 趋向于分化。可根据常规方法分析 NSCs 的分化。例如，已经表征 nestin 作为在许多类型未分化的 CNS 细胞中
5 发现的中间纤维蛋白质(Lehndahl 等人, Cell 60 : 585-595 (1990))。因此，优选地可利用抗 nestin 的抗体免疫细胞化学地检测 NSCs。备选地，用于神经元或胶质细胞的标记物也是本领域已知的。用于神经元的标记物包括微管缔合的蛋白质 2 (MAP-2)、神经元特异的烯醇酶(NSE)、神经丝(NF)等。用于胶质细胞的标记物包括神经胶质纤丝酸性蛋白(GFAP)(星形细胞的鉴定物)、
10 (GalC)(少突胶质细胞的髓磷脂糖脂鉴定物)、髓磷脂碱性蛋白(MBP)(少突胶质细胞的鉴定物)、O₄(少突胶质细胞的鉴定物)等。用于神经元和胶质细胞的各种其它标记物是本领域已知的，并且其中的任何标记物都可成功地用于确定本发明中 NSCs 的分化。分别用于检测 NSCs、神经元和胶质细胞的许多抗体是可商业购买的，并且可使用其中的任何抗体。除免疫细胞化学外，
15 也可利用特异于各个细胞标记物的 cDNA 和 RNA 探针检测标记物。

如果需要，通过本发明的培养或增殖方法获得的 NSCs 可通过本领域已知的任何方法冷冻保藏。

公认将组织移植到 CNS 中是对于由于损伤造成的神经变性紊乱和 CNS 损伤的潜在治疗(Lindvall, TINS 14 (8) : 376-383 (1991))。认为将新细胞移植
20 到神经系统的损伤区域有修复损伤的脑回路并提供神经递质的潜能，由此可恢复神经学功能。因此，通过本发明的培养方法获得的细胞群可用于治疗神经系统紊乱。本发明提供通过在包括 HGF 的培养基中培养 NSC 或包括至少一种 NSC 的细胞群而获得的细胞群体用于治疗神经系统紊乱的用途。根据本方法获得的细胞是特别优选的，因为它们不是永生的并且不是致瘤的起
25 点。此外，如果自体组织不具有缺陷，可从供体组织获得根据本方法培养的细胞以避免免疫反应的发生。

可通过本发明的细胞或细胞群治疗的神经系统紊乱包括：神经变性疾病，急性的脑损伤和 CNS 机能障碍。在一些疾病中观察到 CNS 特定位点中神经细胞的退化，包括阿尔茨海默氏症、肌萎缩性侧索硬化、Huntington's 疾
30 病、多发性硬化和帕金森氏症。在阿尔茨海默氏症中观察到前脑和大脑皮层的细胞变性，以及基底神经节，特别是 Meynert 的核上颞基片中的定位退

化。已知Huntington's遗传性舞蹈病与纹状体中神经元的退化相关；帕金森氏症与基底脊层区域中多巴胺神经元的退化相关。作为神经退化，例如肌萎缩性侧索硬化和大脑性麻痹(cerebral palsy)的结果或作为CNS trauma，例如中风和癫痫症的结果，可能发生其它形式的神经学损伤。

5 实际上，已经建议将神经元的移植用于Huntington's疾病患者(Science 287 : 5457 (2000))；同样，有报道说产生多巴胺的神经元对于帕金森氏症是有效的(Nature 418 : 50-56 (2002))。此外，胶质细胞的移植导致脊髓修复(Honmou等人, J. Neurosci. 16 (10) : 3199-3208 (1996)；Nishio等人, Physiological Sci. (2001))。

10 与移植成熟的神经元或胶质细胞相反，移植未分化的NSCs导致体内分化，预期其提供CNS回路中的神经元功能或不成熟的星形细胞。已知与成熟星形细胞相比，不成熟的星形细胞具有更大的迁移能力(Lindsay等人, Neurosci. 12 : 513-530 (1984)；Duffy等人, Exp. Cell. Res. 139 : 145-157 (1982)；WO91/06631)，因此使少突胶质细胞生长和远离移植位点处分裂的时机最佳化。

15 提供下列实施例说明本发明，并且帮助普通技术人员实现和利用本发明。无论如何该实施例不是旨在另外限制本发明的范围的。

除非另外限定，在此所使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员所理解的通常含义。尽管与在此所描述的实施例相似或
20 等效的方法和材料可被用于实现或测试本发明，如下描述合适的方法和材料。将在此引用的任何专利、专利申请和出版物引入作为参考。

[实施例]

材料和方法

25 (1)原代培养和神经球传代

在包含青霉素(50U/ml)和链霉素(50U/ml)(两者都来自ICN Pharmaceuticals)的PBS缓冲液中，从14日龄的小鼠胚胎(C57 BL/6，插入天数=1.0)移出纹状体细胞。用火磨光(fire-polished)的吸液管在由DMEM和F-12养分(1:1；Invitrogen)组成的无血清培养基中机械分离组织。使细胞在Falcon
30 培养瓶(Falcon)，六孔碟(Falcon)或24孔碟(Falcon)中以150,000个细胞/ml的浓度生长在生长培养基中。生长培养基包含DMEM和F-12养分(1:1；

Invitrogen)、葡萄糖(0.6%)、谷氨酰胺(2 mM)、B27添加物(2%; Invitrogen)和EGF, 以及浓度分别为20ng/ml的FGF-2和/或HGF(R&D Systems)。每4天用包含相同浓度生长因子的新鲜培养基替换一半的培养基。7天后, 通过离心(2,300×g)收集初级神经球, 重悬浮在新鲜的培养基中, 以及如上所述用火磨光的吸液管分离。

为了评估HGF对原代培养物中神经球大小和数目的影响, 在包含FGF-2 (20ng/ml)和/或EGF (20ng/ml)、补充有各种浓度HGF的生长培养基中培养E14纹状体细胞7天。计算初级神经球的数目, 在相差显微镜(IMT-2, Olympus, 日本)下测量初级神经球的大小。

10 (2)神经球的分化

在缺乏生长因子的生长培养基中漂洗在单独存在HGF、FGF-2+EGF或FGF-2+EGF+HGF时培养的次级神经球, 并且用火磨光的吸液管分离。将分离细胞(1×10^5 个细胞)接种到在24孔平板(Falcon)中涂有聚-D-赖氨酸的盖玻片上。为了确定HGF对NSCs分化的影响, 每个孔包含1%胎牛血清(FBS)和20ng/ml HGF或只有1%FBS。7天后用含有4%多聚甲醛的含4%蔗糖的PBS固定细胞。

15 (3)抗体

初级抗体(最后稀释; 来源): 针对nestin的小鼠单克隆抗体(1:500; Chemicon)、针对微管缔合蛋白质2 (MAP-2)的小鼠单克隆抗体(1:500; Sigma-Aldrich)、针对神经胶质纤丝酸性蛋白(GFAP)的兔多克隆抗体(1:500; DAKO)、针对O₄的小鼠IgM单克隆抗体(1:20; Chemicon)、针对c-Met的兔多克隆抗体(1:100; Santa Cruz)和针对5-溴脱氧尿核苷的小鼠单克隆抗体(BrdU)(1:2; Becton Dickinson Immunocytometry Systems)。

次级抗体: 结合荧光素(FITC)的山羊抗小鼠IgG(1:200; Biosource International)、结合若丹明(TRITC)的山羊抗小鼠IgG(1:200; Molecular Probes)和针对小鼠IgM的结合荧光素的亲和纯化山羊抗体(1:200; ICN Pharmaceuticals)、结合FITC的山羊抗兔IgG(1:200; MBL, 日本)和结合AMCA的山羊抗兔IgG(1:200; Chemicon)。

30 (4)免疫细胞化学

将细胞在含4%多聚甲醛的含4%蔗糖的PBS中固定30分钟。对于c-Met免疫荧光染色, 将细胞在75%冷的甲醇中固定, 在PBS中洗涤, 在封闭溶液

中孵育(含2%脱脂乳、1%常规山羊血清、0.2%BSA和0.2% Triton X-100的PBS) 2小时。对于三重标记免疫染色,在含2%脱脂乳和0.2% Triton X-100的PBS中稀释初级抗体(抗MAP-2和抗GFAP)。使盖玻片上的细胞在37°C孵育2hr,加入次级抗体并在37°C再孵育2hr。随后使细胞与针对O₄的小鼠IgM单克隆抗体在37°C孵育1hr,然后与小鼠IgM的结合荧光素的亲和纯化山羊抗体在37°C孵育1hr。最后,用PBS洗涤盖玻片两次,然后加入Hoechst(10mM)并在室温下孵育5分钟,在PBS中洗涤两次。在用Vectoshield (Vector Laboratories)固定到载玻片上之前用急流水洗涤。

(5) BrdU标记和检测

10 通过向存在不同生长因子时生长5天的次级神经球培养物加入10 μ M BrdU(Sigma-Aldrich)来确定BrdU的结合。加入BrdU 12小时后,收集细胞,用培养基洗涤,机械分离,重悬浮在分化培养基中(生长培养基加1%FBS),并接种到在24孔平板(Falcon)中的涂有聚-D-赖氨酸的盖玻片上。12hr后使细胞在冷的75%甲醇中固定20分钟,在2M HCl中变性30分钟,然后15 用PBS洗涤两次。然后,用抗BrdU在37°C孵育细胞30分钟,再用PBS洗涤两次。使细胞与结合FITC的山羊抗小鼠IgG在37°C孵育30分钟。最后,用PBS洗涤细胞两次,并加入0.04mg/ml碘化丙啶(propidium iodide)(Molecular Probes)。然后在室温下孵育细胞5分钟,再用PBS洗涤两次。

(6) TUNEL分析

20 为了评估生长条件下凋亡细胞的数目,将次级神经球固定在1%多聚甲醛中。另一方面,为了评估分化条件中凋亡细胞的数目,将细胞接种到含有分化培养基的24孔平板(Falcon)中涂有聚-D-赖氨酸的盖玻片上6天,然后在1%多聚甲醛中固定。利用TUNEL试剂盒(ApopTag Fluorescein试剂盒, INTERGEN)染色细胞。

(7) 细胞计数和统计分析

25 在荧光显微镜下用高分辨率的数码相机(DMRA, Q-Fish系统, Leica, 德国)检测荧光并摄影。以随机模式计数每盖玻片10个视野(每视野50-100个细胞)中细胞的免疫反应性和数目。使用不成对t检验评估实验之间的差异。所有的结果表示为平均值 \pm SEM。

30 结果

(1) HGF浓度对来源于小鼠胚胎脑的NSCs的神经球形成和增殖的影响

缺乏生长因子时,原代E14纹状体细胞低密度培养7天后没有观察到神经球(图1a和1b)。低到5ng/ml的HGF中,观察到显著数目的神经球(63.8±44.8个细胞/孔)。神经球的数目以剂量依赖性的方式增加直到20ng/ml HGF,在50ng/ml达到平台期(图1a和1b)。由HGF形成的神经球的数目小于通过加入任何浓度的FGF-2、EGF、或其组合所获得的神经球数目(图1b)。向FGF-2、EGF或其组合加入20ng/ml HGF,显著增加了神经球的数目(没有HGF: FGF-2(341.3±89.6个细胞/孔)、EGF(146.3±28.7个细胞/孔)、FGF-2+EGF(507±95.7个细胞/孔);有HGF: FGF-2(745.9±115.1个细胞/孔)、EGF(511.9±43.5)、FGF-2+EGF(1218.8±143.6个细胞/孔))(图1a和1b)。

为了确定HGF对NSCs增殖的影响,利用相差显微镜术测量神经球的大小。缺乏HGF时,没有观察到神经球。存在20ng/ml HGF时,观察到神经球,但其尺寸小于加入通过其它生长因子而产生的尺寸。当向包含FGF-2、EGF或其组合的培养基加入HGF时,神经球的大小显著增加(表1)。这些结果表明HGF对NSCs的增殖影响与存在其它生长因子可能是协同的。

15

表1.

HGF对初级神经球的大小和数目的影响

	None		FGF-2		EGF		FGF-2 + EGF	
	HGF +	HGF -	HGF +	HGF -	HGF +	HGF -	HGF +	
200µm≤	50.1±8.1	128.0±12.1	413.3±42.3*	90.9±8.2	435.4±82.2*	221.7±44.2	809.2±55.3*	
100-200µm	180.4±50.1	768.3±90.1	1395.0±111.2*	590.9±54.2	1306.2±151.2*	886.8±77.1	1402.5±101.3*	
≤100µm	670.2±88.2	853.7±52.4	1291.7±85.4*	818.2±99.5	1088.5±123.2*	1241.5±99.2	1618.3±98.3*	
Total no.	900.7±20.1	1750.0±55.1	3100.0±66.2*	1500.0±65.1	2830.0±86.4*	2350.0±54.2	3830.0±75.3*	

在存在明确的生长因子时,将E14纹状体细胞以每孔 3×10^5 个细胞接种在6孔板中。7天后从5个不同的实验中所获得的计数确定初级神经球的大小和数目。*: p<0.05对HGF(—)。

20

(2)通过用HGF培养所获得的神经球中细胞的特性

为了确定高血糖受体, c-Met的表达,对神经球中的细胞和从具有HGF的分离物中分离的细胞进行免疫染色。证实神经球中的细胞和从神经球分离的细胞中的大多数表达c-Met(图2a和2b)。也可通过Western印迹分析确证

使用HGF或FGF-2和EGF而分离的神经球上c-Met蛋白质的表达(数据未显示)。在使用另外的生长因子而分离的细胞中c-Met也是免疫阳性的(数据未显示)。来自使用20ng/ml HGF而分离的神经球的细胞对干细胞标记物nestin也是免疫阳性的(图2c)。

5 (3)HGF对BrdU掺入神经祖代的影响

为了确定HGF对NSCs增殖影响的机制,将神经球与10 μ M的BrdU共孵育12hr并固定。BrdU是掺入分裂细胞DNA的胸腺嘧啶脱氧核苷类似物。向包含FGF-2、EGF或其组合的培养基加入HGF,显著增加了BrdU阳性细胞的百分比(图3a)。很可能HGF通过在NSCs培养期间抑制细胞死亡而促进NSCs的存活。为了检测HGF对NSCs存活的影响,对在有和没有HGF的培养基中培养的神经球进行TUNEL染色。HGF的加入降低了神经球中TUNEL阳性细胞的数目(图3b)。

10 (4)HGF对神经祖代分化的影响

为了阐明HGF对NSCs分化的影响,也为了检验使用HGF而形成的神经球是真正的NSCs,研究NSCs分化成为神经元、星形细胞、少突胶质细胞及其它细胞类型的能力。首先,分离在包含20ng/ml HGF的培养基中培养7天的次级神经球,接种到具有1% FBS、有和没有20ng/ml HGF的盖玻片上,然后培养7天。用神经元标记物MAP2(红色)、神经胶质标记物GFAP(绿色)和核标记物Hoechst(蓝色)免疫染色细胞(图4)。对于各种标记物计数免疫阳性细胞的数目并计算完整细胞中其百分比。令人感兴趣的是,当在分化期间向培养基加入HGF,获得的神经元多于星形细胞(没有HGF:神经元(35.8 \pm 11.7%)、星形细胞(43.1 \pm 16.0%);具有HGF:神经元(52.5 \pm 7.9%)、星形细胞(35.2 \pm 8.9%))(图5a)。当使用FGF-2和EGF而分离细胞时,获得相似的百分比(没有HGF:神经元(28.5 \pm 12.7%)、星形细胞(50.8 \pm 11.9%);具有HGF:神经元(53.5 \pm 8.9%)、星形细胞(32.6 \pm 7.9%))(图5b)。当向来自脑的细胞的原代培养培养基加入20ng/ml HGF,在包含1%FBS、没有HGF的培养基中分化后趋向于存在更多的神经元(图5c)。然而,当向包含1%FBS的用于分化的培养基加入HGF时,获得相似的神元百分比(图5c右侧条形)。这些结果表明当HGF加入分化的培养基时,其促进分化成为神经元。

30

工业实用性

显示一种包含肝细胞生长因子(HGF)的培养基能够诱导神经球形成。此外,向含有FGF-2、EGF、或两者皆有的培养基加入HGF显示增加新形成的神经球的大小和数目。因此,本发明提供用于培养神经干细胞(NSCs)的包括HGF的生长培养基和利用该培养基培养细胞的方法。在包括HGF的生长培养基中培养NSC或包含NSC的细胞群提供了在NSCs中富集的细胞群或分化NSCs的细胞群。这种细胞群可用于治疗神经系统紊乱,例如癫痫症、头部损伤、中风、肌萎缩性侧索硬化、帕金森氏症、阿尔茨海默氏病和Huntington's症。

发现HGF促进分离自E14小鼠胚胎的NSCs的增殖和神经元分化。对于HGF对NSCs影响机制的进一步理解可能导致开发新的生物技术或体内治疗以控制和调节中枢神经系统(CNS)的发生和/或修复,其依次可用作针对损伤和紊乱的新的治疗方法。

虽然已经详细地参考其具体的实施方案描述了本发明,但是对于本领域的技术人员来说产生各种变化和改进而不会背离本发明的精神和范围是显而易见的。

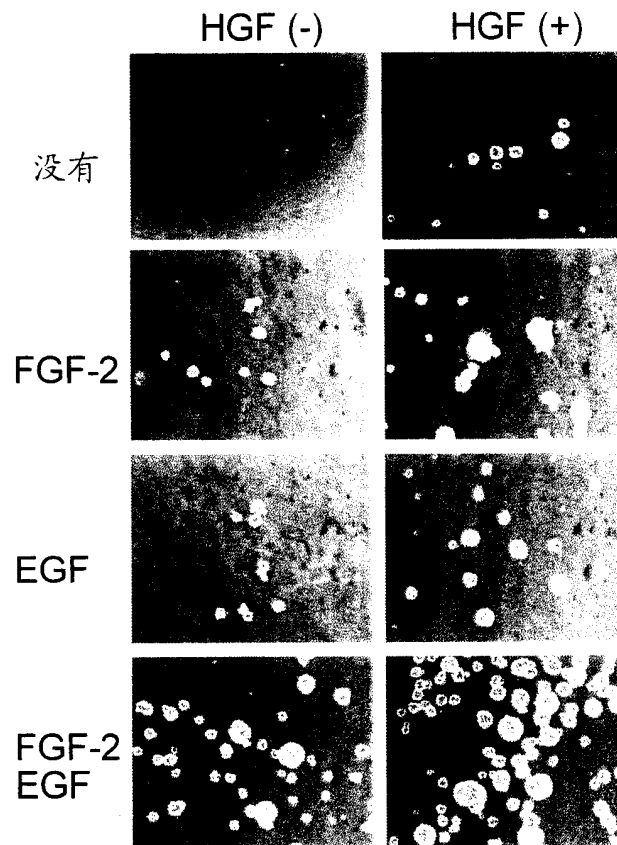


图 1a

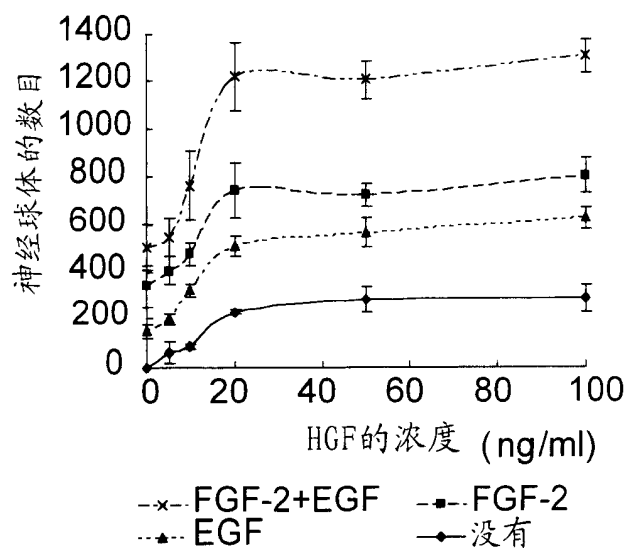
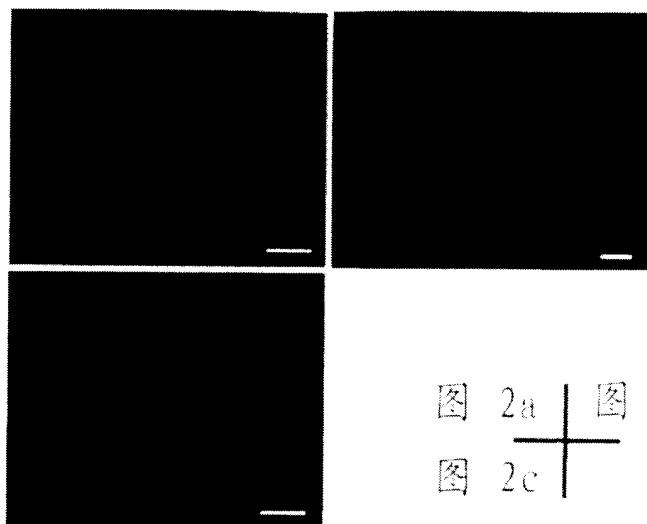


图 1b



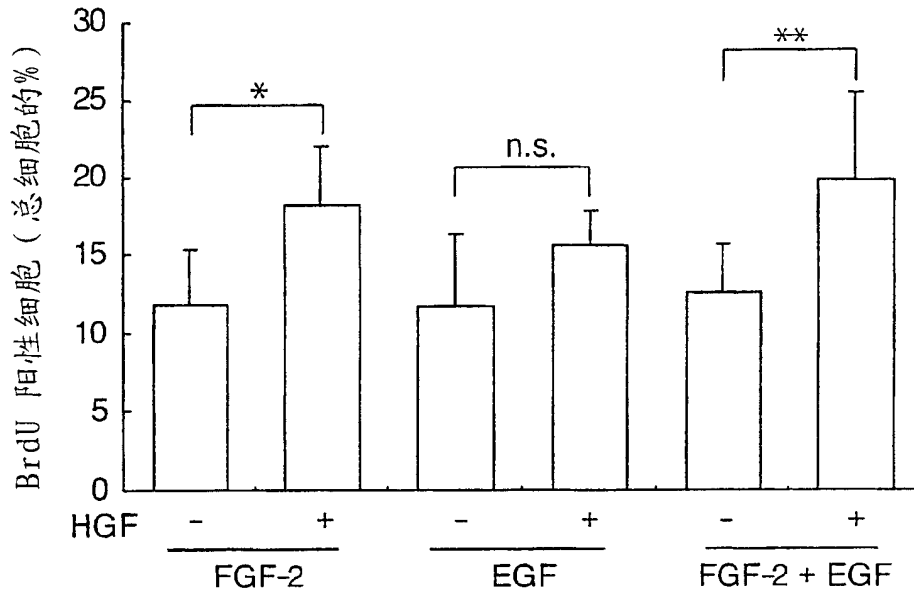


图 3a

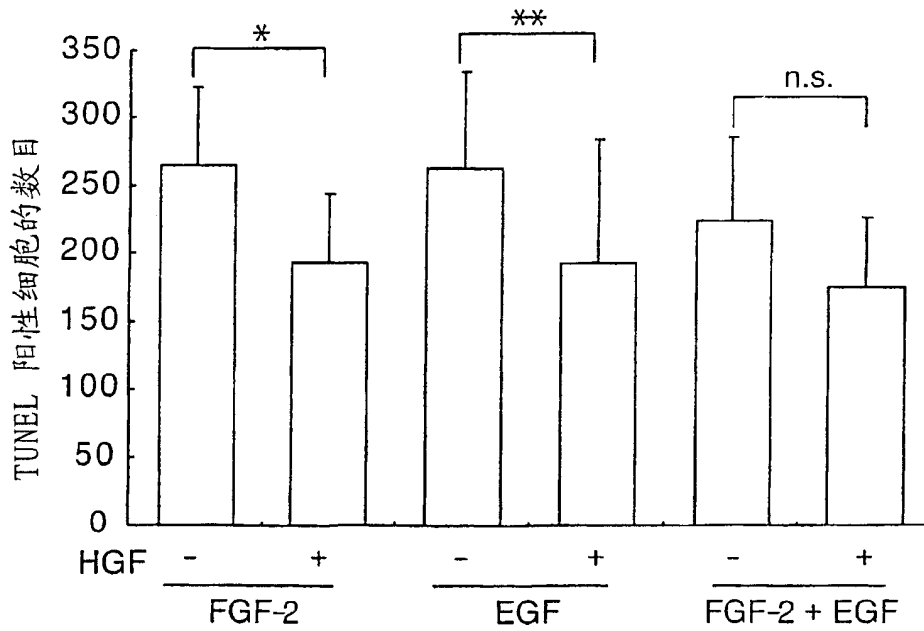
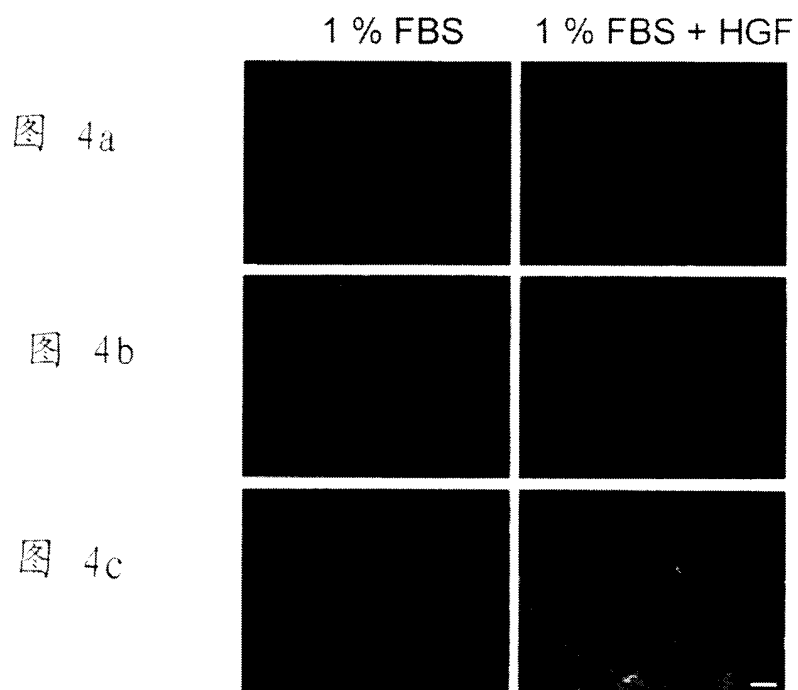


图 3b



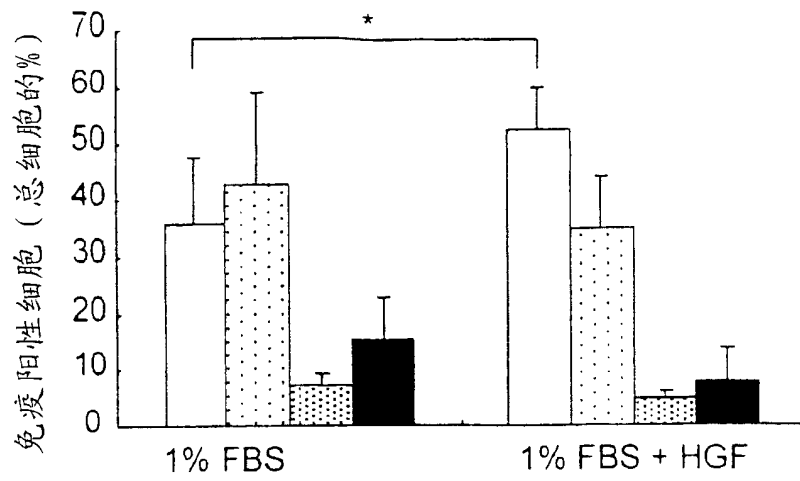


图 5a

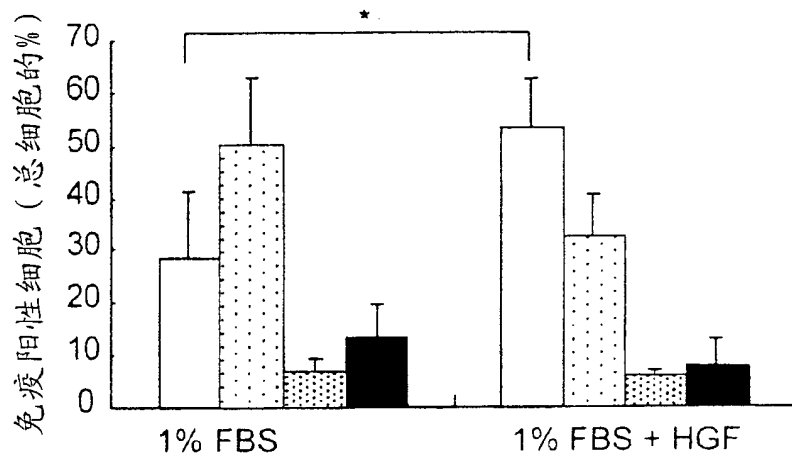
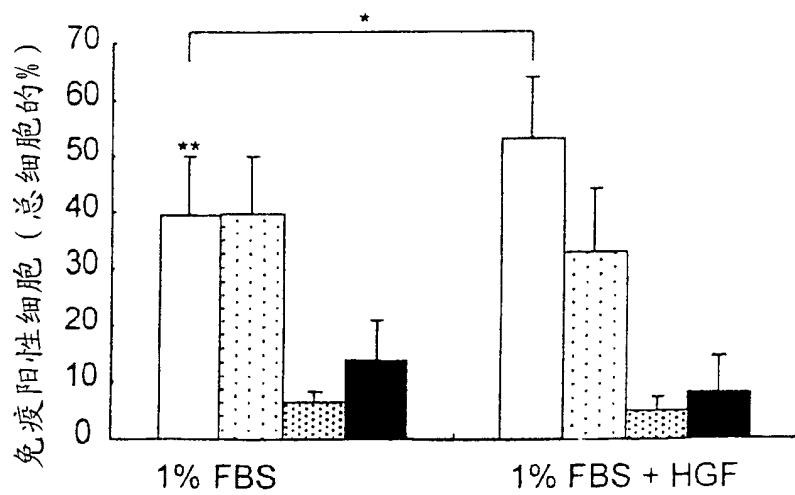


图 5b



 神经元	 星形细胞
 少突胶质细胞	 其它

图 5c