



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104694471 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 10

(21) 申请号 201510131696. 6

(22) 申请日 2015. 03. 25

(71) 申请人 奥思达干细胞有限公司

地址 214125 江苏省无锡市滨湖区震泽路
899 号 6 号楼

(72) 发明人 周萱

(51) Int. Cl.

C12N 5/078(2010. 01)

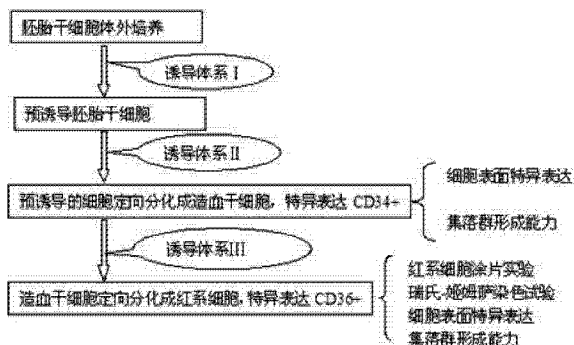
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法

(57) 摘要

本发明首次公开了一种体外诱导胚胎干细胞向红系细胞分化的有效方法,采用含有地塞米松的诱导体系对胚胎干细胞进行预诱导,进而采用含有无血清培养添加剂 N2 或 B27、前列腺素 E2 和 L- 谷氨酰胺的无血清培养基体系诱导培养,然后采用含有干细胞因子 (SCF)、白介素 3、促红细胞生成素的无血清培养基体系诱导分化成红系细胞。具体有以下步骤组成:胚胎干细胞体外常规培养;胚胎干细胞的预诱导;预诱导的细胞定向分化成造血干细胞;造血干细胞定向分化成红系细胞。本发明是一种取材方便、易于体外扩增、免疫源性低的体外诱导胚胎干细胞向红系细胞分化的方法,使人胚胎干细胞向成熟红细胞分化能够更安全、高效,具有良好的技术应用前景。



1. 一种体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法,其特征在于,采用含有地塞米松的诱导体系对胚胎干细胞进行预诱导,进而采用含有无血清培养添加剂 N2 或 B27、前列腺素 E2 和 L-谷氨酰胺的无血清培养基体系诱导培养,然后采用含有干细胞因子(SCF)、白介素 3、促红细胞生成素的无血清培养基体系诱导分化成红系细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的一种体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法,其特征在于,所述的方法分化形成的红系细胞表面标记物 CD36 阳性表达率为 90% 以上。

3. 根据权利要求 1 所述的一种体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法,其特征在于,所述的方法分化形成的红系细胞是一种用于失血、缺血、体液丧失,需要及时补充人体所必需的胶体溶液的来源,是由人胚胎干细胞在体外定向分化形成,并可通过静脉输注的方法替代血液制品。

4. 根据权利要求 1 所述的一种体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法,其特征在于,由下述步骤组成:

(1) 胚胎干细胞体外常规培养;

(2) 胚胎干细胞的预诱导:采用由添加了 0.1mM 地塞米松的含双抗的 DMEM/F-12 完全培养基制备而成的诱导体系 I 培养;

(3) 预诱导的细胞定向分化成造血干细胞:采用包括体积比例浓度为 2% 的 N2 或 B27、含双抗的无血清 StemSpan™ ACF 培养基,并添加了 20ng/ml 前列腺素 E2、2mM 的 L-谷氨酰胺制备而成诱导体系 II 培养;

(4) 造血干细胞定向分化成红系细胞:采用包括体积比例浓度为 2% 的 N2 或 B27、含双抗的无血清 StemSpan™ ACF 培养基,并添加了 0.1mM 干细胞因子(SCF)、0.15mM 白介素 3、0.05mM 促红细胞生成素制备而成的诱导体系 III 培养。

5. 根据权利要求 4 所述的一种体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法,其特征在于,所述的步骤(1)具体包括以下步骤:常规培养胚胎干细胞进行传代和扩增,此阶段培养基为:85%DMEM 培养基为基础培养基,添加 15% Knockout Serum Replacement,1mmol/L 必需氨基酸,100IU/mL 青霉素,50 μg/mL 链霉素和 4ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子;细胞培养在 37℃,5% 的二氧化碳条件下孵化,每周传代一次。

6. 根据权利要求 4 所述的一种体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法,其特征在于,所述的步骤(2)具体包括以下步骤:为了诱导人胚胎干细胞向造血细胞的分化,在培养 6~7 天对胚胎干细胞进行诱导;用 1mg/mL IV 型胶原酶在 37℃ 下消化 3~5min 吹打成小细胞团,然后使用超低黏附 6 孔培养板悬浮 7 天,第 1~5 天采用含 100IU/mL 青霉素,50 μg/mL 链霉素的 DMEM/F-12 完全培养液培养,每 2 天换液一次,在培养的第 5 天采用添加预诱导因子 0.1mM 地塞米松的诱导体系 I 培养 2~3 天,置于 37℃,5% 二氧化碳培养箱中培养。

7. 根据权利要求 4 所述的一种体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法,其特征在于,所述的步骤(3)具体包括以下步骤:将所述步骤(2)预诱导培养的细胞移至 0.1% 明胶包被的 96 孔组织培养板;采用诱导体系 II,可避免因添加血清而可能带来的异源污染,置 37℃,5% 二氧化碳培养箱中培养 6~8 天,每 2 天补液一次;每 7 天换液一次,贴壁培养后,每天在光学显微镜下观察培养皿中细胞生长情况,培养 20 天后获得由胚胎干细胞定向分化成的造血干细胞。

8. 根据权利要求 4 所述的一种体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法,其特征在于,所述的步骤(4)具体包括以下步骤:

第一步,将所述步骤(3)制备的干细胞进行经流式检测,CD34 阳性细胞比例为 90% 以上,满足下一步对其进行扩增培养的要求;

第二步,通过免疫磁珠法成功分离出 CD34 阳性细胞接种于培养皿中进行培养,加入 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液 1.0ml,浸入覆盖瓶底,倒置显微镜下观察见细胞呈圆形漂起时,加入 1.0ml 胎牛血清中止消化;

第三步,加入 10ml PBS 反复吹打冲洗,在室温下 900 转/分离心 10 分钟;弃去上清液后,加入 10ml 无血清诱导体系 III 重悬细胞,重新接种在培养皿中;

第四步,将上述培养皿置 37°C,5% 二氧化碳培养箱中培养 6~8 天,每 3 天补液一次;每 7 天换液一次,培养 20 天后获得由造血干细定向分化而来的红系细胞,收集红系细胞并进行流式检测,结果显示 CD36 阳性表达率为 90% 以上。

体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明属于再生医学和生物技术领域,涉及红系细胞的制备方法,尤其是一种体外诱导胚胎干细胞向红系细胞分化的方法。

背景技术

[0002] 随着我国医疗技术的快速发展和人们生活要求的日益增高,成分输血在临床医疗实践中不断深入,其中红系细胞(也称血细胞)的用量最大。红系细胞输注已是现代医疗技术中至关重要的细胞治疗手段,目的主要是改善患者的缺氧状态,广泛应用于术后及外伤、慢性贫血及其他多种疾病的治疗。但目前临床上仍然依赖志愿者无偿献血这一途径为主要血液来源,血液供应非常紧张,血液供应不足的报道经常见于报纸、电视和网络等各种媒体。目前随着检测技术的不断改进,输血引起的传染病发生率已经非常低,但是仍时有发生。这些问题对临床输血应用的安全性和广泛性带来了严峻的挑战,因此寻找更为安全和经济的血液来源一直是输血医学研究的重要方向,人们将目光投向了体外生产红系细胞,红系细胞的体外制备可按需要生产特定血型,并可最大限度地避免输血相关传染疾病的发生等。

[0003] 目前已开发了多种红系细胞代用品,主要包括血红蛋白氧载体和氟碳类化合物两大类。然而血红蛋白氧载体稳定性差、纯化困难、工艺复杂而且成本高,氟碳类化合物携氧能力弱,代谢慢,并且有很大的毒副作用,因此这两类红系细胞替代品尚不能大规模的应用,需要继续寻找新的血液红系细胞替代来源。近年来干细胞及其应用已成为世界生命科学研究的热点之一,以干细胞为技术平台的相关研究在细胞治疗、胚胎发育、新基因的功能研究、基因治疗、药物筛选和新药药理研究等领域都显现出诱人的应用前景。

[0004] 干细胞在体外具有自我更新和多向分化能力,其独有的特性:1)高度的自我更新能力,在体外具有接近无限的增殖能力;2)发育分化的全能性;3)遗传的可操作性,使得其作为体外诱导分化的种子细胞具有明显的优势。以人胚胎干细胞体外定向分化为基础的细胞治疗可能为很多疾病的治疗带来希望,其中将人胚胎干细胞在体外大规模诱导分化为成熟红细胞可作为新的血液替代来源有可能为解决目前临床输血治疗面临的问题带来希望,将具有广泛的应用前景和重大的社会效益。

[0005] 目前,体外诱导人胚胎干细胞分化为成熟红系细胞并最终应用于临床还有很多关键的技术问题需要解决,包括如何安全低成本的由人胚胎干细胞向造血干细胞分化,如何高效率诱导造血干细胞向红系细胞分化,如何保证诱导分化成熟的红系细胞是否能够在体内发挥功能,诱导获得红细胞的安全性和免疫排斥等问题。在以上问题中,本发明首次建立以胚胎干细胞为启动细胞定向诱导生成红系细胞的体外制备方法,拟通过解决其中两个关键性技术问题,即在体外实现安全低成本的由人胚胎干细胞向造血干细胞分化和体外无血清培养体系下高效率的由造血干细胞定向分化为红系细胞。希望通过解决以上两个关键技术问题使人胚胎干细胞向成熟红细胞分化能够更安全、高效,为最终为由胚胎干细胞获得满足临床输血需要的红系细胞进行技术储备。

发明内容

[0006] 本发明的目的是,提供一种取材方便、易于体外扩增、免疫源性低的体外诱导胚胎干细胞向红系细胞分化的方法。

[0007] 为了解决上述技术问题,达到上述技术效果,本发明采用以下技术方案实现:

本发明的体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法,采用含有地塞米松的诱导体系对胚胎干细胞进行预诱导,进而采用含有无血清培养添加剂 N2 或 B27、前列腺素 E2 和 L-谷氨酰胺的无血清培养基体系诱导培养,然后采用含有干细胞因子(SCF)、白介素 3、促红细胞生成素的无血清培养基体系诱导分化成红系细胞。

[0008] 本发明方法分化的红系细胞是一种用于失血、缺血、体液丧失,需要及时补充人体所必需的胶体溶液的来源,由人胚胎干细胞在体外定向分化形成,并可通过静脉输注的方法替代血液制品。

[0009] 本发明方法分化形成的红系细胞表面标记物 CD36 阳性表达率为 90% 以上。

[0010] 进一步的,所述的体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的方法,其特征是由下述步骤组成:

(1) 胚胎干细胞体外常规培养;

(2) 胚胎干细胞的预诱导:采用由添加了 0.1mM 地塞米松的含双抗的 DMEM/F-12 完全培养基制备而成的诱导体系 I 培养;

(3) 预诱导的细胞定向分化成造血干细胞:采用包括体积比例浓度为 2% 的 N2 或 B27、含双抗的无血清 StemSpan™ ACF 培养基,并添加了 20ng/ml 前列腺素 E2、2mM 的 L-谷氨酰胺制备而成诱导体系 II 培养;

(4) 造血干细胞定向分化成红系细胞:采用包括体积比例浓度为 2% 的 N2 或 B27、含双抗的无血清 StemSpan™ ACF 培养基,并添加了 0.1mM 干细胞因子(SCF)、0.15mM 白介素 3、0.05mM 促红细胞生成素制备而成的诱导体系 III 培养。

[0011] 进一步的,所述的步骤(1)具体包括以下步骤:常规培养胚胎干细胞进行传代和扩增,此阶段培养基为:85%DMEM 培养基为基础培养基,添加 15% Knockout Serum Replacement,1mmol/L 必需氨基酸,100IU/mL 青霉素,50 μg/mL 链霉素和 4ng/mL 碱性成纤维细胞生长因子。细胞培养在 37℃,5% 的二氧化碳条件下孵化,每周传代一次。

[0012] 进一步的,所述的步骤(2)具体包括以下步骤:为了诱导人胚胎干细胞向造血细胞的分化,在培养 6~7 天对胚胎干细胞进行诱导。用 1mg/mL IV 型胶原酶在 37℃ 下消化 3~5min 吹打成小细胞团,然后使用超低黏附 6 孔培养板悬浮 7 天,第 1~5 天采用含体积比例浓度为 100IU/mL 青霉素,50 μg/mL 链霉素的 DMEM/F-12 完全培养液培养,每 2 天换液一次,在培养的第 5 天采用添加预诱导因子 0.1mM 地塞米松的诱导体系 I 培养 2~3 天,置于 37℃,5% 二氧化碳培养箱中培养。

[0013] 进一步的,所述的步骤(3)具体包括以下步骤:将上述步骤(2)预诱导培养的细胞移至 0.1% 明胶包被的 96 孔组织培养板。采用诱导体系 II,可避免因添加血清而可能带来的异源污染,置 37℃,5% 二氧化碳培养箱中培养 6~8 天,每 2 天补液一次;每 7 天换液一次,贴壁培养后,每天在光学显微镜下观察培养皿中细胞生长情况,培养 20 天后获得由胚胎干细胞定向分化成的造血干细胞。

[0014] 进一步的,所述的步骤(4)具体包括以下步骤:

第一步,将上述步骤(3)制备干细胞进行经流式检测,CD34 阳性细胞比例为 90% 以上,满足下一步对其进行扩增培养的要求;

第二步,通过免疫磁珠法成功分离出 CD34 阳性细胞接种于培养皿中进行培养,加入 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液 1.0ml,浸入覆盖瓶底,倒置显微镜下观察见细胞呈圆形漂起时,加入 1.0ml 胎牛血清中止消化;

第三步,加入 10ml PBS 反复吹打冲洗,在室温下 900 转/分离心 10 分钟;弃去上清液后,加入 10ml 无血清诱导体系 III 重悬细胞,重新接种在培养皿中;

第四步,将上述培养皿置 37°C,5% 二氧化碳培养箱中培养 6~8 天,每 3 天补液一次;每 7 天换液一次,培养 20 天后获得由造血干细胞定向分化而来的红系细胞,收集红系细胞并进行流式检测,结果显示 CD36 阳性表达率为 90% 以上。

[0015] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

本发明诱导方法首次实现体外由胚胎干细胞诱导生成造血干细胞,继而在进行又到生成红系细胞。通过本发明方法制备的造血干细胞和红系细胞特异表达性高,造血干细胞 CD34 阳性表达率由现有技术的 85% 提升到 90%,红系细胞 CD36 阳性表达率由现有技术的 86% 提升到 90% 以上;且首次建立以胚胎干细胞为启动细胞定向诱导生成红系细胞的体外制备方法,具有较强的创造性。

[0016] 本发明方法进一步提供了充足、安全、有效和经济的细胞来源,更有利于扩大血液输注应用;且中间诱导生成的造血干细胞同样具有向红细胞和血小板细胞分化的能力,对于血液疾病如白血病的治疗也提供了一种新的造血干细胞的来源;诱导使用的干细来源于胚胎干细胞,取材方便、易于体外扩增、免疫原性低。由于生理学特点基本一致,所以无论何种来源的人类干细胞,都适用本发明所提供的诱导方法。

附图说明

[0017] 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解,构成本申请的一部分,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

图 1 是体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的技术方案实施流程图;

图 2 是加不同浓度的前列腺素 E2 和 L-谷氨酰胺培养造血红细胞的第 14d 集落形成能力比较,其中:图中相同字母或者不标表示组间差异不显著,不同字母表示组间差异显著或者极显著;

图 3 是造血干细胞特异性的向红系分化图,瑞氏-吉姆萨染色细胞在培养第 1 天(图 A)、6 天(图 B)、10 天(图 C)、12 天(图 D)生长情况;

图 4 是红系祖细胞接种于甲基纤维素半固体培养基培养 7 天 BFU-E 和 CFU-E 集落形成(A,比例尺=100 μm; B,比例尺=50 μm。);

图 5 是瑞氏-姬姆萨染色下中幼红细胞(中空黑色箭头)和晚幼红细胞(实心黑色箭头)形态,原始放大:1000×。

具体实施方式

[0018] 下面将参考附图并结合实施例,来详细说明本发明。

[0019] 参照图 1 体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞的技术方案实施流程图所示,本发明具体实施方式如下:

具体实施例 1:体外诱导胚胎干细胞分化为红系细胞

(1) 胚胎干细胞的常规培养,具体步骤包括:

常规培养胚胎干细胞进行传代和扩增,此阶段培养基为:85%DMEM 培养基为基础培养基,添加 15% Knockout Serum Replacement,1mmol/L 必需氨基酸,100IU/mL 青霉素,50 μ g/mL 链霉素和 4ng/mL bFGF。细胞培养在 37 $^{\circ}$ C,5% 的二氧化碳条件下孵化,每周传代一次。

[0020] (2) 胚胎干细胞的预诱导,具体步骤包括:

为了诱导人胚胎干细胞向造血细胞的分化,在培养 6~7 天对胚胎干细胞进行诱导。用 1mg/mL IV 型胶原酶在 37 $^{\circ}$ C 下消化 3~5min 吹打成小细胞团,然后使用超低黏附 6 孔培养板悬浮 7 天,第 1~5 天采用含 100IU/mL 青霉素,50 μ g/mL 链霉素的 DMEM/F-12 完全培养液培养,每 2 天换液一次,在培养的第 5 天采用添加预诱导因子 0.1mM 地塞米松的诱导体系 I 培养 2~3 天,置于 37 $^{\circ}$ C,5% 二氧化碳培养箱中培养。

[0021] (3) 预诱导的干细胞定向分化成造血干细胞,特异表达 CD34+,具体步骤包括:

将上述步骤(2)预诱导培养的干细胞移至 0.1% 明胶包被的 96 孔组织培养板。采用诱导体系 II,可避免因添加血清而可能带来的异源污染,置 37 $^{\circ}$ C,5% 二氧化碳培养箱中培养 6~8 天,每 2 天补液一次;每 7 天换液一次,贴壁培养后,每天在光学显微镜下观察培养皿中细胞生长情况,培养 20 天后获得由胚胎干细胞定向分化成的造血干细胞。诱导体系 II 由包括体积比例浓度为 2% 的 N2 或 B27、含双抗的无血清 StemSpan[™] ACF 培养基,并添加了 20ng/ml 前列腺素 E₂、2mM 的 L- 谷氨酰胺制备而成。

[0022] (4) 造血干细胞定向分化成红系细胞,特异表达 CD36+,具体步骤包括:

第一步,将上述步骤(3)制备干细胞进行经流式检测,CD34 阳性细胞比例为 90% 以上,满足下一步对其进行扩增培养的要求;

第二步,通过免疫磁珠法成功分离出 CD34 阳性细胞接种于培养皿中进行培养,加入 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液 1.0ml,浸入覆盖瓶底,倒置显微镜下观察见细胞呈圆形漂起时,加入 1.0ml 胎牛血清中止消化;

第三步,加入 10ml PBS 反复吹打冲洗,在室温下 900 转/分离心 10 分钟;弃去上清液后,加入 10ml 无血清诱导体系 III 重悬细胞,重新接种在培养皿中;

第四步,将上述培养皿置 37 $^{\circ}$ C,5% 二氧化碳培养箱中培养 6~8 天,每 3 天补液一次;每 7 天换液一次,培养 20 天后获得由造血干细胞定向分化而来的红系细胞,收集红系细胞并进行流式检测,结果显示 CD36 阳性表达率为 93%。

[0023] 诱导体系 III 由采用包括体积比例浓度为 2% 的 N2 或 B27、含 100IU/mL 青霉素,50 μ g/mL 链霉素的无血清 StemSpan[™] ACF 培养基,并添加了 0.1mM 干细胞因子(SCF)、0.15mM 白介素 3、0.05mM 促红细胞生成素制备而成。

[0024] 具体实施例 2:造血干细胞各项指标的测定

(1) 细胞表面特异表达:造血干细胞特异性标志检测

CD34 抗原是细胞表面分子量为 115kD 的糖蛋白,编码 CD34 的基因位于第 1 号染色体的长臂,含有 8 个外显子。CD34 抗原是仅存于造血干/祖细胞的表面的分化群抗原。CD34 在造血干细胞上强阳性表达,到分化较晚期的祖细胞则是弱阳性。成熟血细胞不表达 CD34

抗原。因此, CD34 可作为检测造血干细胞的基本标志。

[0025] 取来自实施例 1 步骤(3)培养出细胞生长良好的细胞进行检测:收集, 1500rpm 离心 10min, 弃上清, 加 PBS 溶液重悬, 吸取 100 μ L 细胞悬液(约 3×10^5 个细胞)加入 EP 管内, 按量分别加入检测抗体;避光孵育 30min, 每样品管加入 2ml PBS 洗一次, 1500rpm 离心 5min;弃上清, 每样品管加 300 μ LPBS 溶液重悬, 进行流式检测。经流式细胞仪检测结果如下:阴性对照:0.07%;阳性标记物表达:CD34 为 90.35%;阴性标记物表达:CD38 为 1.81%、CD44 为 0.01%。

[0026] (2) 诱导细胞的集落形成能力检测

收集实施例 1 步骤(3)中定向诱导 20 ~ 22d 的细胞, 重悬于 300 μ l PBS 液中, 加入非特异阻断性抗体 FcR 封闭剂 100 μ l, 混合均匀, 再加入磁珠偶联的 CD34 单克隆抗体 100 μ l, 混合均匀, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后用 PBS 液洗涤 2 次, 1800r/min, 离心 5min, 然后再用 PBS 液重悬后备用。将分离柱置于磁场中, 用 PBS 液冲洗分离柱, 将标记的细胞悬液缓慢加入分离柱, 待其自然流出后再用 500 μ l PBS 液洗涤不结合的细胞。最后将分离柱撤出磁场, 加 PBS 液 1ml 加压洗脱分离柱吸附的细胞, 收集分离的细胞即为 CD34+ 细胞。

[0027] 将实施例 1 步骤(3)定向培养并由磁珠偶联分离出的细胞接种于 20ml 半固体培养基中, 半固体培养基组成成分详见如下:0.9% 甲基纤维素、25%IMDM、5%PFHM- II、15% 胎牛血清、1%BSA、1mM 双抗、2mM L- 谷氨酰胺、200 μ g/ml 转铁蛋白、2 mM 丙酮酸钠、MTG(原液 1:100 稀释), 添加不同浓度的前列腺素 E2(PGE2) 和 L- 谷氨酰胺检测其集落形成能力, 分别是 A 组为对照组不添加 PGE2 和 L- 谷氨酰胺;B 组添加 10ng/ml 的 PGE2 和 1mM 的 L- 谷氨酰胺;C 组添加 20ng/ml 的 PGE2 和 2mM 的 L- 谷氨酰胺;D 组添加 30ng/ml 的 PGE2 和 3mM 的 L- 谷氨酰胺;E 组添加 40ng/ml 的 PGE2 和 4mM 的 L- 谷氨酰胺。

[0028] 结果详见附图说明中图 2 所示, 培养 6d 后即可于半固体培养基中观察到造血集落的形成, 随着培养时间的延长集落的数量逐渐增多, 并于培养的第 14d 达到峰值, 此时在倒置显微镜下对各组细胞所生成的造血集落进行统计计数。100ng/ml 的 PGE2 可抑制集落的生长, 20ng/ml 的 PGE2 对集落生长有明显的促进作用, 诱导产生的细胞形成集落的能力最强, 产生的造血克隆最多。

[0029] 具体实施例 3:红系细胞的各项指标测定

1、红系细胞涂片试验

(1) 收集实施例 1 步骤(4)不同时间点悬浮培养的细胞, 2000 转 / 分钟, 离心 5 分钟。弃上清, 加入 1ml PBS 清洗细胞两次。将细胞重悬至 100 μ l;

(2) 载玻片经酸液浸泡, 蒸馏水反复漂洗, 以多聚赖氨酸包被。按照操作说明安装于细胞涂片机上, 使用铅笔做好标记;

(3) 加入细胞悬液, 设定细胞离心涂片机转速为 1000 转 / 分钟, 离心 2 分钟。离心完毕, 将中间滤纸层与载玻片延垂直方向分离, 小心取下载玻片, 将载玻片晾干。

[0030] 结果显示, 造血干细胞在红系诱导培养基悬浮生长并迅速扩增, 造血干细胞接种于添加了诱导因子的红系诱导分化培养基中, 细胞呈悬浮生长, 增殖较快, 2 ~ 3 天传代一次, 传代比例为 1:3 ~ 1:6。分离之初细胞形态较为均一, 呈球形, 随着诱导时间的延长, 细胞因增殖程度不同而大小不均。

[0031] 2、红系细胞瑞氏 - 姬姆萨染色试验

(1)将载玻片水平放置,滴加瑞氏-姬姆萨 A 液(约 0.5 ~ 0.8 ml)于载玻片上,并让覆盖整个标本染色,染色 1min;

(2)再将瑞氏-姬姆萨 B 溶液滴加于载玻片上面(滴加之量为 A 液的 2 ~ 3 倍),以吸耳球吹气使 A、B 染液充分混合,染色 3 ~ 10min;

(3)将载玻片置于水龙头下,以小水流自来水冲洗残存的染液 30 秒钟,风干,镜下观察,采集图像。

[0032] 结果如附图说明中图 3 所示,实施例 1 步骤(3)中的造血干细胞,可特异性的向红系分化,通过对培养第 1 天(图 A)、6 天(图 B)、10 天(图 C)、12 天(图 D)的细胞进行瑞氏-姬姆萨染色细胞表明,刚分离进行培养的细胞胞核很大,占据了细胞总体积的 90% 以上,核仁明显,每个细胞核约有 3 ~ 5 个,细胞质比例很小染蓝色,呈现出典型的造血干/祖细胞的特点(图 A)。随着诱导时间的延长,细胞浆所占比例逐渐增加,但细胞核仍占相当大的比例(图 B),在诱导培养至第 10 ~ 12 天(图 C、D)时,细胞呈现出典型的原始红细胞的特点:胞核圆形,居中或稍偏于一旁,约占细胞的 4/5,紫红色,染色质颗粒状,核仁明显。核仁 1-2 个,大小不均。胞浆蓝,无颗粒,可有伪足样突起,近细胞核处可见浅染区。说明,此诱导体系可特异性的诱导造血干细胞向红系祖细胞分化。

[0033] 3、诱导培养的细胞半固体克隆形成试验

将实施例 1 步骤(4)中诱导至第 7 天的红系祖细胞接种于半固体培养基中,20ml 半固体培养基组成成分详见如下:0.9% 甲基纤维素、25%IMDM、5%PFHM- II、15%胎牛血清、1% BSA、1mM 双抗、2 mM L- 谷氨酰胺、200 μ g/ml 转铁蛋白、2mM 丙酮酸钠、MTG(原液 1:100 稀释)。经过 14 天的培养,结果如图 4 所示,可见半固体培养基中出现大量的红色红细胞爆裂型集落生成单位(BFU-E)和红细胞集落生成单位(CFU-E)(附图说明中图 4A、4B),经计数 BFU-E 和 CFU-E 之和占克隆总数的比例大于 97%。说明经过 7 天的诱导绝大多数已经分化为红系细胞。我们对红色克隆的细胞进行染色,结果如附图说明中图 5 所示,可见其内有大量的中幼红细胞(图中中空黑色箭头所示)和晚幼红细胞(图中实心黑色箭头所示)。从细胞染色结果可见,我们所建立的红系诱导体系可特异性的诱导造血干细胞向红系分化。

[0034] 4、流式细胞术检测不同时间红系祖细胞表面标志的变化

分别收集第 5、7、10、14 的细胞,对其表面表达的造血及红系表面标志进行检测。结果显示,经过 5 天的诱导,所有的细胞均不表达 CD34,说明此诱导体系内原有的造血干细胞已发生分化,而 CD117 的表达也维持在较低水平,也从另一个方面验证了培养过程细胞逐渐分化成熟。

[0035] 红系祖细胞的特异性标志 CD36 的表达随着诱导时间的延长而逐渐增加,第 5 天 CD36+ 细胞比例为 55.8%,第 7 天增至 80%,第 10 天之后增至 90% 以上;表明随着培养时间的延长,细胞向红系分化比例增加。晚期红细胞的特异性表面标志血型糖蛋白 A(Glycophorin A, Gly-A)的表达也随培养时间的延长而逐渐增加,由第 5 天的 21.4% 增至第 7 天的 42.4%、逐渐增高,至第 10 天已经增至 75% 左右,说明此培养体系促进红系细胞向成熟分化;转铁蛋白受体 CD71 的表达也经历了类似的表达过程,由第 5 天的 55% 增至第 7 天的接近 90%,第 10 天之后大于 90% 的表达。表明诱导体系内细胞可特异性向红系分化成熟。

[0036] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修

改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

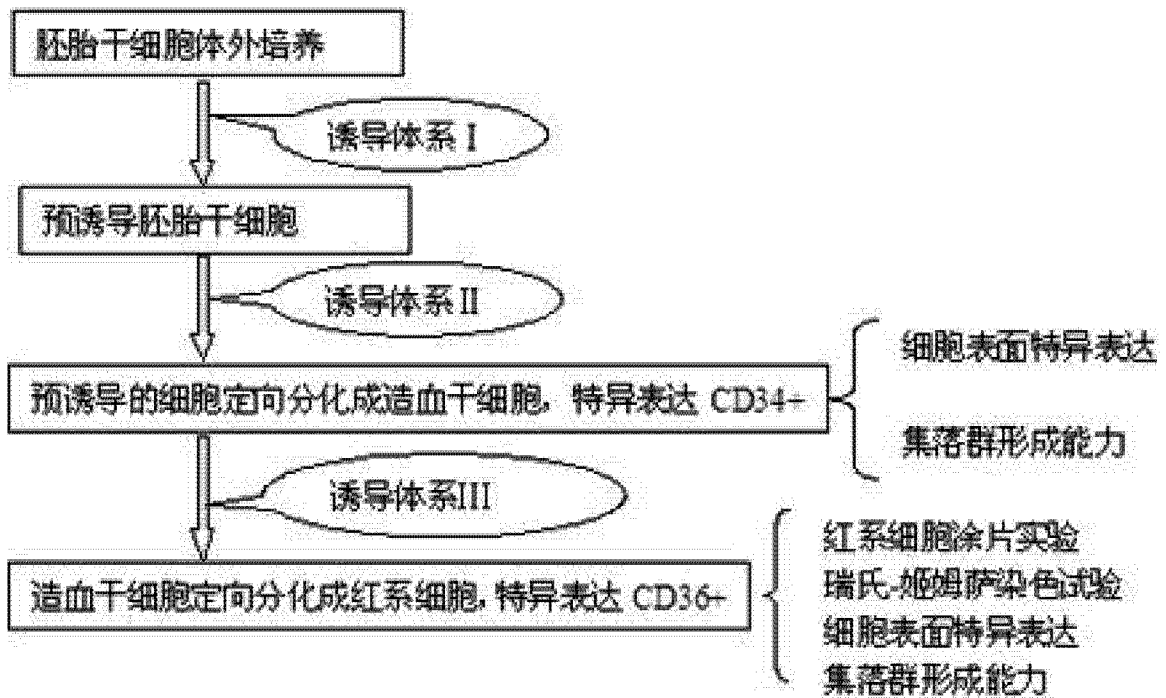


图 1

组别 / 指标	红系集落 CFU-E	粒-巨噬细胞 集落 CFU-GM	巨噬细胞集落 CFU-M	混合集落 CFU-GEMM
对照组 (*10 ⁵ 个)	27.2 ± 4.54 ^a	51.2 ± 3.58 ^a	21.5 ± 4.26 ^a	18.3 ± 4.65 ^a
A 组 (*10 ⁵ 个)	34.6 ± 3.69 ^b	65.3 ± 4.75 ^b	29.3 ± 5.36 ^b	26.2 ± 4.74 ^b
B 组 (*10 ⁵ 个)	58.8 ± 5.36 ^c	78.8 ± 5.24 ^c	38.1 ± 5.29 ^c	32.2 ± 5.29 ^c
C 组 (*10 ⁵ 个)	46.5 ± 3.68 ^{bc}	63.9 ± 4.87 ^b	35.5 ± 3.98 ^{bc}	28.5 ± 4.39 ^{bc}
D 组 (*10 ⁵ 个)	35.4 ± 4.36 ^b	57.6 ± 3.51 ^{ab}	31.7 ± 5.83 ^b	25.6 ± 4.87 ^b

图 2

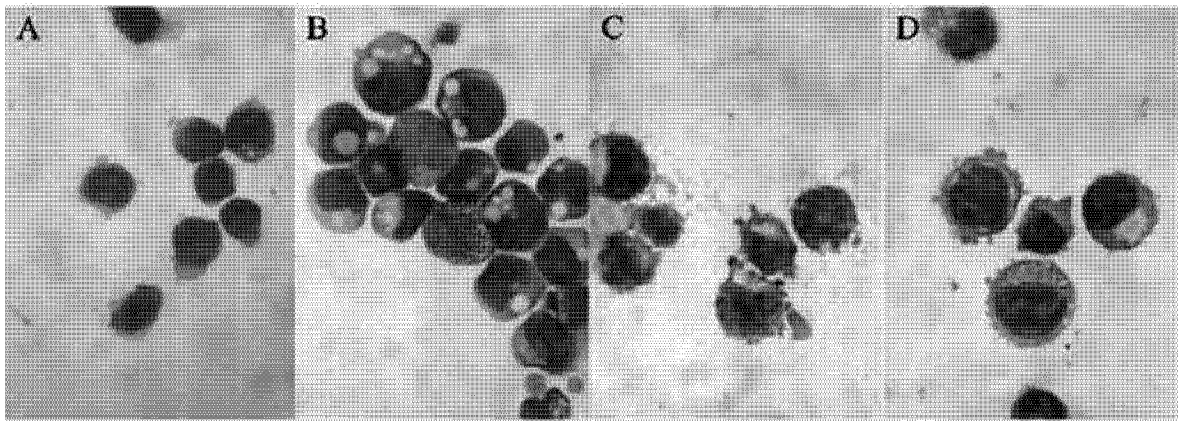


图 3

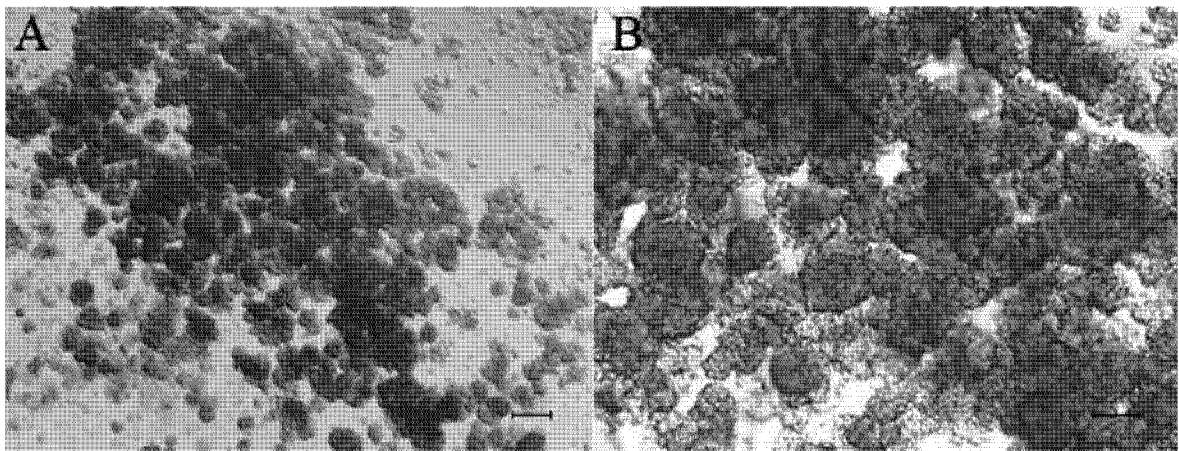


图 4

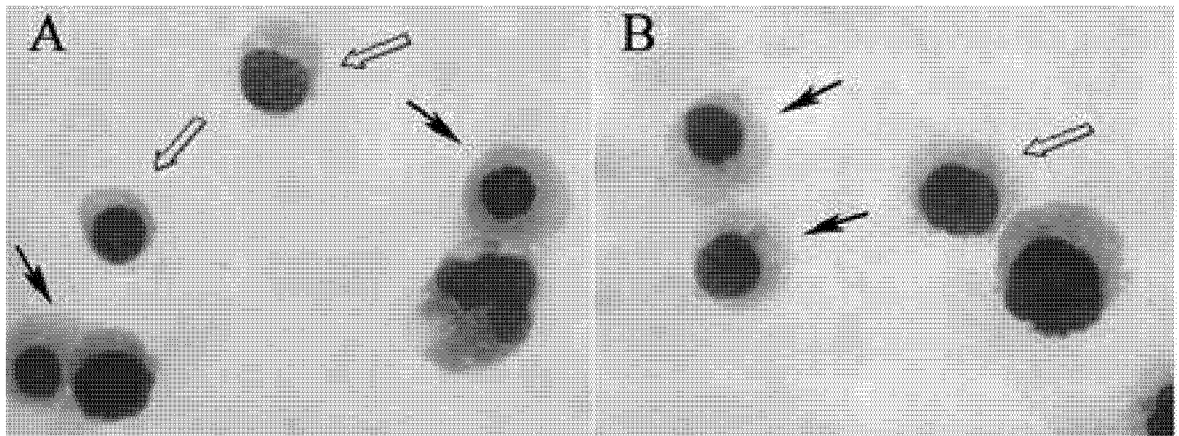


图 5