



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106167789 B

(45)授权公告日 2020.08.04

(21)申请号 201610339108.2

(22)申请日 2016.05.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106167789 A

(43)申请公布日 2016.11.30

(66)本国优先权数据
201510264541.X 2015.05.21 CN

(73)专利权人 中国科学院上海营养与健康研究所
地址 200031 上海市徐汇区岳阳路319号

(72)发明人 时玉舫 杜黎明 林良宇 王莹

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 陈静

(51)Int.Cl.

C12N 5/0775(2010.01)

A61K 35/28(2015.01)

A61K 38/18(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

(56)对比文件

WO 2006121445 A2,2006.11.16

WO 9325227 A1,1993.12.23

Shun-Pei Hung.effects of hypoxia on human mesenchymal stem cells.《ORS 2012 Annual Meeting》.2012,

审查员 罗洋

权利要求书1页 说明书13页

序列表3页 附图6页

(54)发明名称

低氧处理的间充质干细胞及其应用

(57)摘要

本发明涉及低氧处理的间充质干细胞及其应用。本发明首次揭示了低氧处理间充质干细胞后,能够显著地促进间充质干细胞对于炎症性疾病的缓解或治疗作用。本发明还揭示了低氧处理间充质干细胞能够产生胰岛素样生长因子-2,该因子在低氧处理的间充质干细胞治疗炎症性疾病中起到的核心作用。

1. 低氧处理的间充质干细胞或其细胞培养物或其培养上清在制备预防、缓解或治疗炎症性疾病的药物中的用途;其中,所述的低氧处理是指在10%的氧气条件下培养间充质干细胞;所述的炎症性疾病为炎症性肠病。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的药物还用于升高患病组织中调节性T细胞比例。

3. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的药物还用于降低患病组织中Th1和Th17细胞比例。

4. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的药物还用于:抑制血清中IFN- γ 、IL-17因子。

5. 一种提高间充质干细胞的细胞培养物或其培养上清的预防、缓解或治疗炎症性疾病功能的体外细胞培养方法,其特征在于,该方法包括:对间充质干细胞进行低氧处理;其中,所述的低氧处理是指在10%的氧气条件下培养间充质干细胞;所述的炎症性疾病是炎症性肠病。

6. 一种胰岛素样生长因子-2在制备预防、缓解或治疗炎症性疾病的药物中的用途;所述胰岛素样生长因子-2是由SEQ ID NO: 8的第25~91位氨基酸序列组成的活性片段;所述的炎症性疾病包括:多发性硬化或炎症性肠病。

7. 如权利要求6所述的用途,其特征在于,所述的药物还用于:

调节免疫反应;

升高患病组织中调节性T细胞比例;

降低患病组织中Th1和Th17细胞比例;或

减少炎症组织中炎症细胞的浸润。

低氧处理的间充质干细胞及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,更具体地,本发明涉及低氧处理的间充质干细胞及其应用。

背景技术

[0002] 间充质干细胞(mesenchymal stem/stromal cells, MSCs)具有自我更新和多向分化能力,也可称为组织干细胞。在机体内几乎所有的组织中, MSCs都能自我更新并且分化为特定的组织细胞进而修复组织损伤。

[0003] 目前,体外分离培养的MSCs已经被用于治疗多种免疫相关的动物疾病模型或者临床疾病,其有效性和安全性得到了证实,但是,不同的研究对于其发挥治疗作用的机制有不同的阐述。有文章报道, MSCs可以分泌肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、转化生长因子(TGF- β)等一系列生长因子,而这些因子在MSCs治疗疾病过程中的作用仍需要进一步的探讨。

[0004] 虽然间充质干细胞被认为具有广泛的应用前景,但是考虑到体内疾病微环境的复杂性和不断涌现的MSCs治疗无效和失败案例,仍然需要更深层的探究疾病微环境和MSCs的相互作用及调控机制,以更好的让MSCs介导的干细胞治疗真正的从实验室走向临床。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供低氧处理的间充质干细胞及其应用。

[0006] 在本发明的第一方面,提供低氧处理的间充质干细胞或细胞培养物或培养上清在制备预防、缓解或治疗炎症性疾病的药物中的用途。

[0007] 在一个优选例中,所述的炎症性疾病包括:多发性硬化,或炎症性肠病(IBD)。

[0008] 在另一优选例中,所述的低氧是按照体积1~15%,较佳地1~13%,更佳地5~10%的氧气。

[0009] 在另一优选例中,所述的低氧处理的间充质干细胞或细胞培养物或培养上清是指:在按照体积比1~15%,较佳地1~13%,更佳地5~10%氧气的条件下持续培养获得的间充质干细胞或细胞培养物或培养上清。较佳地,培养2代以上,更佳地培养3代以上,如3~20代,3~10代,3~5代等。

[0010] 在另一优选例中,所述的药物还用于:

[0011] 升高患病组织中调节性T细胞(Treg细胞)比例;

[0012] 降低患病组织中Th1和Th17细胞比例;或

[0013] 抑制血清中IFN- γ , IL-17因子。

[0014] 在本发明的另一方面,提供一种低氧处理的间充质干细胞或细胞培养物或培养上清,其是通过以下方法获得的:在按照体积比1~15%,较佳地1~13%,更佳地5~10%氧气的条件下持续培养间充质干细胞。较佳地,持续培养1代以上,更佳地培养3代以上,如3~20代,3~10代,3~5代等。

[0015] 在另一优选例中,按照体积比1~15%,较佳地1~13%,更佳地5~10%氧气的条件是指:在氧浓度低的空气中培养;也即其培养环境中除了氧气含量降低且氮气含量上升以外,其它空气中应有物质的含量与常规常氧培养箱中空气含量一致。

[0016] 在本发明的另一方面,提供一种用于预防、缓解或治疗炎症性疾病的药物组合物,其包括有效量的所述的低氧处理的间充质干细胞或细胞培养物或培养上清;以及药学上可接受的载体。

[0017] 在本发明的另一方面,提供一种制备低氧处理的间充质干细胞或细胞培养物或培养上清的方法,所述方法包括:在按照体积比1~15%,较佳地1~13%,更佳地5~10%氧气的条件下持续培养间充质干细胞。

[0018] 在本发明的另一方面,提供一种提高间充质干细胞或细胞培养物或培养上清的预防、缓解或治疗炎症性疾病功能的方法,该方法包括:对间充质干细胞进行低氧处理。

[0019] 在本发明的另一方面,提供一种促进间充质干细胞分泌胰岛素样生长因子-2的方法,该方法包括:对间充质干细胞进行低氧处理。较佳地,所述的低氧是按照体积1~15%,较佳地1~13%,更佳地5~10%的氧气。

[0020] 在本发明的另一方面,提供一种胰岛素样生长因子-2 (IGF-2) 的用途,用于制备预防、缓解或治疗炎症性疾病的药物。较佳地,所述的炎症性疾病包括:多发性硬化,或炎症性肠炎 (IBD)。

[0021] 在一个优选例中,所述的胰岛素样生长因子-2包括:具有或含有胰岛素样生长因子-2第25~91位氨基酸序列的活性片段。

[0022] 在一个优选例中,所述的药物还用于:

[0023] 调节免疫反应;

[0024] 升高患病组织中调节性T细胞比例;

[0025] 降低患病组织中Th1和Th17细胞比例;或

[0026] 减少炎症组织中炎症细胞的浸润。

[0027] 在本发明的另一方面,提供一种用于预防、缓解或治疗炎症性疾病的药物组合物,所述的药物组合物中包括:有效量的胰岛素样生长因子-2,以及药学上可接受的载体。所述的胰岛素样生长因子-2包括:具有或含有胰岛素样生长因子-2第25~91位氨基酸序列的活性片段。

[0028] 在本发明的另一方面,提供一种药用于预防、缓解或治疗炎症性疾病的药盒,其特征在于,所述的药盒中包括:所述的低氧处理的间充质干细胞或细胞培养物或培养上清;或所述的药物组合物。

[0029] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

[0030] 图1、低氧预处理增强了间充质干细胞对实验性自身反应性脑脊髓炎 (EAE) 中的治疗效果。

[0031] (A) 应用常氧处理间充质干细胞 (normoxia-mesenchymal stem cells, N-MSCs) 或低氧处理间充质干细胞 (hypoxia-mesenchymal stem cells, H-MSCs) 治疗实验性自身反应

性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)。在EAE诱导后的第9、12、15天给予小鼠尾静脉输注MSCs (2×10^5 /只/次), 每天记录小鼠的临床评分。在EAE疾病总进程的第15天, 处死小鼠并获取脊髓, 以Fast blue染色和苏木素-伊红染色检测对照组 (PBS组)、N-MSCs或H-MSCs治疗组EAE小鼠脊髓部位的免疫细胞浸润和髓鞘脱失情况, 结果表明低氧处理MSCs表现出了更好的疗效, 脊髓部位炎性浸润和髓鞘脱失均明显下降; PBS为对照组, 即EAE小鼠注射PBS, N-MSCs表示常氧处理间充质干细胞治疗EAE组; H-MSCs表示低氧处理间充质干细胞治疗EAE组。*** $p < 0.001$ 。

[0032] (B) 不同处理组脊髓单个核细胞浸润情况。在EAE疾病进程第15天, 处死小鼠并取脊髓样本, 以percoll分离单个核细胞, 分析不同处理组小鼠脊髓部位浸润单个核细胞的数量; PBS为对照组, 即EAE小鼠注射PBS, N-MSCs表示常氧处理间充质干细胞治疗EAE组; H-MSCs表示低氧处理间充质干细胞治疗EAE组。*** $p < 0.001$ 。

[0033] (C) 不同处理组脾脏细胞体外增殖情况。在EAE疾病进程第15天, 分离对照组、N-MSCs或H-MSCs治疗组EAE小鼠的脾脏细胞, 以MOG35-55 ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激72小时, 利用 ^3H 标记的胸腺嘧啶掺入实验检测各个处理组脾脏细胞增殖情况。以MOG35-55活化脾脏细胞 (MOG组) 的增殖数/未经MOG35-55活化脾脏细胞 (Ctrl组) 的增殖数计算各组脾细胞激活指数 (stimulation index, SI), 结果表明H-MSCs治疗后MOG35-55特异性T细胞增殖明显下降; MOG组为EAE诱导组; N-MSCs表示EAE小鼠经常氧处理的间充质干细胞治疗组; H-MSCs表示EAE小鼠经低氧处理的间充质干细胞治疗组。* $p < 0.05$ 。

[0034] (D) 不同处理组小鼠血清以及脾细胞培养上清中IL-17和IFN- γ 的含量。在EAE疾病进程第15天, 分离获得对照组、N-MSCs或H-MSCs治疗组EAE小鼠的血清, 以ELISA方法检测IL-17和IFN- γ 的表达水平。同时, 分离小鼠的脾脏细胞, 以MOG35-55 ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激72小时后, 检测培养上清中IL-17和IFN- γ 的含量, 结果表明, 诱导EAE后小鼠血清及脾脏细胞均表达高水平的IL-17和IFN- γ , N-MSCs的注射可以部分地抑制它们的表达水平, 更重要的是H-MSCs可以完全抑制IL-17和IFN- γ 在血清和脾脏细胞中分泌及表达, Ctrl组为正常小鼠; MOG组为EAE诱导组; N-MSCs表示EAE小鼠经常氧处理的间充质干细胞治疗组; H-MSCs表示EAE小鼠经低氧处理的间充质干细胞治疗组。N.S., 无显著性差异; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

[0035] 图2、低氧间充质干细胞的培养上清可以治疗实验性自身反应性脑脊髓炎。

[0036] (A) 应用常氧处理间充质干细胞 (normoxia-mesenchymal stem cells, N-MSCs) 或低氧处理间充质干细胞 (hypoxia-mesenchymal stem cells, H-MSCs) 的培养上清治疗实验性自身反应性脑脊髓炎 (EAE)。MSCs分别培养于常氧和低氧环境中, 待细胞密度达70%换5%FBS的培养液继续培养48小时后, 收取上清, 进行浓缩保留3KD以上所有蛋白, 浓缩倍数为10倍。EAE治疗时, 从第9天至第13天, 以腹腔注射的方式每天给予每只小鼠注射 $200 \mu\text{l}$ 浓缩上清, 每天记录小鼠的临床评分。在EAE疾病进程第15天, 以Fast blue染色和苏木素-伊红染色检测对照组 (培养基处理组)、N-sup或H-sup治疗组EAE小鼠脊髓部位的免疫细胞浸润和髓鞘脱失情况, 结果发现, H-MSCs培养上清表现出了显著的治疗效果; Ctrl-sup表示5%FBS培养基治疗组, N-sup表示常氧间充质干细胞的上清治疗组; H-sup表示低氧处理的间充质干细胞的上清治疗组。** $p < 0.01$ 。

[0037] (B) 不同处理组脊髓单个核细胞浸润情况。在EAE疾病进程的第15天, 处死小鼠并

取得脊髓组织,利用percoll获取单个核细胞,并检测不同处理组小鼠脊髓部位浸润单个核细胞的数量,结果表明H-sup治疗后脊髓浸润单个核细胞数明显抑制;Ctrl-sup表示5%FBS培养基治疗组,N-sup表示常氧间充质干细胞的上清治疗组;H-sup表示低氧处理的间充质干细胞的上清治疗组。*** $p < 0.001$ 。

[0038] (C) 不同处理组脾细胞体外增殖情况。在EAE疾病进程第15天,分离对照组(培养基处理组)、N-sup或H-sup治疗组EAE小鼠的脾脏细胞,以MOG35-55 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激72小时,利用³H标记的胸腺嘧啶掺入实验检测各个处理组脾脏细胞增殖情况。以MOG35-55活化脾脏细胞(MOG组)的增殖数/未经MOG35-55活化脾脏细胞(Ctrl组)的增殖数计算各组脾细胞激活指数(stimulation index,SI),结果表明H-sup治疗后EAE小鼠MOG35-55特异性T细胞增殖明显下降;MOG组为EAE诱导组;N-sup表示EAE小鼠经常氧间充质干细胞的上清治疗组;H-sup表示EAE小鼠经低氧处理的间充质干细胞的上清治疗组。** $p < 0.01$ 。

[0039] (D) 间充质干细胞在常氧或者低氧下胰岛素样生长因子-2(insulin like growth factor-2, IGF-2)的mRNA和蛋白水平。MSCs分别培养于常氧和低氧环境中,连续培养三代后,铺6孔板,细胞密度为50%,铺板后第二天,更换新鲜培养液,48小时后取细胞和上清检测其中胰岛素样生长因子-2基因水平和蛋白水平的表达情况。低氧处理MSCs无论在蛋白水平还是mRNA上均表达高水平的IGF-2;N-MSCs表示常氧处理间充质干细胞;H-MSCs表示低氧处理间充质干细胞。** $p < 0.01$,*** $p < 0.001$ 。

[0040] 图3、胰岛素样生长因子-2及其所含的Ala25-Glu91片段在治疗实验性自身反应性脑脊髓炎中的作用。

[0041] (A) 胰岛素样生长因子-2的中和抗体可以回复低氧处理间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)细胞培养上清对EAE的治疗效果。应用常氧处理间充质干细胞(normoxia-MSCs, N-MSCs)或低氧处理间充质干细胞(hypoxia-MSCs, H-MSCs)的培养上清治疗EAE时,给予小鼠注射人IGF2(hIGF2)的中和抗体或同型对照抗体以阻断IGF2功能,结果表明,IGF2的中和抗体可以抑制低氧处理MSCs培养上清对EAE的治疗作用。Ctrl表示5%FBS培养基治疗组,Nor-IgG表示常氧培养MSCs的培养上清治疗组,Hyp-IgG表示低氧培养MSCs的培养上清治疗组;anti-hIGF2表示胰岛素样生长因子-2中和抗体,IgG表示胰岛素样生长因子-2中和抗体的对照抗体。* $p < 0.05$ 。

[0042] (B) 胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗实验性自身反应性脑脊髓炎。在EAE诱导第8天起,每天给予EAE小鼠注射人重组IGF2的Ala25-Glu91片段(5ng/只),观察疾病进展情况。结果表明,IGF2的Ala25-Glu91片段注射可以有效抑制EAE的进展。PBS(磷酸盐缓冲液)注射组为对照组,IGF-2为胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗组。* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 。

[0043] (C) 胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段抑制实验性自身反应性脑脊髓炎病灶部位的单个核细胞浸润。以IGF2的Ala25-Glu91片段治疗EAE,在EAE疾病进程第15天,利用percoll分离脊髓的单个核细胞并计数,结果表明IGF2的Ala25-Glu91片段可以有效抑制EAE小鼠脊髓中单个核细胞的浸润;PBS(磷酸盐缓冲液)注射组为对照组,IGF-2为胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗组。*** $p < 0.001$ 。

[0044] (D) 胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段抑制抗原特异性T细胞的增殖。以IGF-2的Ala25-Glu91片段治疗EAE,在EAE疾病进程的第15天,分离小鼠脾脏细胞,以MOG35-

55 (20 μ g/ml) 刺激,利用³H标记的胸腺嘧啶掺入实验检测脾脏细胞增殖情况。以MOG35-55活化脾脏细胞(MOG组)的增殖数/未经MOG35-55活化脾脏细胞(Ctrl组)的增殖数计算各组脾脏细胞激活指数(stimulation index,SI),结果表明IGF-2的Ala25-Glu91片段可以有效抑制EAE小鼠中MOG特异性T细胞的增殖;PBS(磷酸盐缓冲液)注射组为对照组,IGF-2为胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗组。*** $p < 0.001$ 。

[0045] (E) 胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段上调调节性T细胞。以IGF-2的Ala25-Glu91片段治疗EAE,在EAE疾病进程的第15天,分离小鼠脊髓中的单个核细胞,利用流式细胞分析技术检测CD4⁺Foxp3⁺T细胞的表达情况。结果发现,在脊髓单个核细胞的CD4⁺的细胞中,Foxp3⁺的细胞比例在使用IGF-2的Ala25-Glu91片段治疗后显著上升;PBS(磷酸盐缓冲液)注射组为对照组,IGF-2为胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗组。*** $p < 0.001$ 。

[0046] (F) 胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗后小鼠脊髓中Th1和Th17细胞比例显著下降。以IGF-2的Ala25-Glu91片段治疗EAE,在EAE疾病进程的第15天,分离小鼠脊髓中的单个核细胞,利用流式细胞分析技术检测CD4⁺IL-17⁺以及CD4⁺IFN- γ ⁺细胞的表达情况。结果发现,IGF-2的Ala25-Glu91片段治疗显著抑制脊髓CD4⁺细胞中IFN- γ ⁺细胞和IL-17⁺细胞的比例;PBS(磷酸盐缓冲液)注射组为对照组,IGF-2为胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗组。* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 。

[0047] 图4、低氧预处理的间充质干细胞在炎症性肠炎中具有更好的治疗效果。

[0048] (A) 炎症性肠炎小鼠在接受不同治疗时的存活曲线。配制3%DSS(dextran sodium sulfate,DSS)水溶液诱导小鼠的炎症性肠炎模型,在疾病模型诱导开始的第1,3,5天,通过腹腔给小鼠注射常氧处理间充质干细胞(normoxia-mesenchymal stem cells,N-MSCs)或低氧处理间充质干细胞(hypoxia-mesenchymal stem cells,H-MSCs)(1 $\times 10^6$ /只/次),观察小鼠的存活情况。结果显示,低氧处理MSCs对炎症性肠炎的治疗效果明显好于常氧细胞治疗组和PBS处理的对照组。N-MSCs表示炎症性肠炎小鼠经常氧处理间充质干细胞治疗组;H-MSCs表示炎症性肠炎小鼠经低氧处理间充质干细胞治疗组。

[0049] (B) 炎症性肠炎小鼠在接受不同治疗的体重变化。在炎症性肠炎诱导的第1,3,5天,通过腹腔给小鼠注射常氧处理间充质干细胞(normoxia-mesenchymal stem cells,N-MSCs)或低氧处理间充质干细胞(hypoxia-mesenchymal stem cells,H-MSCs)(1 $\times 10^6$ /只/次)。每天称取小鼠的体重,以第一天各组小鼠的平均体重为基线,计算其体重变化情况。结果显示,低氧处理MSCs在治疗肠炎小鼠中的效果明显好于常氧细胞治疗组和PBS处理的对照组。N-MSCs表示炎症性肠炎小鼠经常氧处理间充质干细胞治疗组;H-MSCs表示炎症性肠炎小鼠经低氧处理间充质干细胞治疗组。* $p < 0.05$ 。

[0050] (C) 炎症性肠炎小鼠在接受不同治疗时的临床评分。在肠炎诱导过程的第1,3,5天,通过腹腔给小鼠注射常氧处理间充质干细胞(normoxia-mesenchymal stem cells,N-MSCs)或低氧处理间充质干细胞(hypoxia-mesenchymal stem cells,H-MSCs)(1 $\times 10^6$ /只/次)。每天称取小鼠的体重,并记录小鼠稀便和血便的情况,并给予相应的临床评分,计算体重时,以第1天各自组小鼠的平均体重为基线。结果显示,H-MSCs在治疗肠炎小鼠中的效果明显好于N-MSCs组和PBS处理的对照组。N-MSCs表示炎症性肠炎小鼠经常氧处理间充质干细胞治疗组;H-MSCs表示炎症性肠炎小鼠经低氧处理间充质干细胞治疗组。* $p < 0.05$ 。

[0051] (D) 炎症性肠炎小鼠在接受不同治疗时的结肠长度。在肠炎诱导过程的第1,3,5天,通过腹腔给小鼠注射常氧处理间充质干细胞(normoxia-mesenchymal stem cells,N-MSCs)或低氧处理间充质干细胞(hypoxia-mesenchymal stem cells,H-MSCs)(1×10^6 /只/次)。在疾病进程的第8天,处死小鼠并取得结肠组织,量取结肠组织的长度。结果显示,H-MSCs在治疗肠炎小鼠中的效果明显好于N-MSCs组和PBS处理的对照组,Ctrl组为正常小鼠。N-MSCs表示炎症性肠炎小鼠经常氧处理间充质干细胞治疗组;H-MSCs表示炎症性肠炎小鼠经低氧处理间充质干细胞治疗组。 $*p < 0.05$ 。

[0052] 图5、胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段在治疗炎症性肠炎中的作用。

[0053] (A) 配制含有3%葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate,DSS)的水溶液诱导炎症性肠炎,从第1天起每天腹腔注射胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段(50ng/只)治疗炎症性肠炎,每天称取小鼠体重。以各自组小鼠第一天的平均体重为基数,结果表明使用IGF-2的Ala25-Glu91片段治疗后小鼠体重降低得到缓解;PBS(磷酸盐缓冲液)组为对照组,IGF-2为胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗组。 $***p < 0.001$ 。

[0054] (B) 使用胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗后第8天,处死小鼠并取得其结肠,量取结肠长度,结果表明,使用IGF-2的Ala25-Glu91片段治疗后,肠炎小鼠结肠长度的缩减得到缓解;利用percoll分离结肠组织中的单个核细胞并进行计数,结果显示使用IGF-2的Ala25-Glu91片段治疗后,肠炎小鼠结肠中的单个核细胞浸润数下降;PBS(磷酸盐缓冲液)组为对照组,IGF-2为胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗组。 $***p < 0.001$ 。

[0055] (C) 胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗后第8天,处死小鼠并取得其肠系膜淋巴结和结肠组织,对于结肠组织,利用percoll分离其中的单个核细胞,并利用流式细胞术分析其中Treg,Th1和Th17的细胞比例。结果表明,使用IGF-2的Ala25-Glu91片段治疗后,小鼠结肠(LP)和肠系膜淋巴结(MLN)中,在CD4⁺的细胞中,Treg(Foxp3⁺)细胞比例显著上升,Th1(IFN- γ ⁺)和Th17(IL-17⁺)细胞比例显著下降。PBS(磷酸盐缓冲液)组为对照组,IGF-2为胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗组。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 。

[0056] 图6、干扰胰岛素样生长因子-2在MSCs中的表达对EAE的影响。利用sh-RNA770、sh-RNA1526干扰胰岛素样生长因子-2(insulin like growth factor-2,IGF-2)在MSCs中的表达水平,MSCs经常氧培养或低氧培养3代以上后,在EAE诱导第8天给予小鼠尾静脉注射(2×10^5 /只)。与对照组sh-RNA处理MSCs相比较,干扰IGF-2在MSCs上的表达可以破坏低氧处理MSCs对EAE的治疗作用。 $*p < 0.05$ 。

具体实施方式

[0057] 本发明人经过深入的研究,首次揭示了低氧处理间充质干细胞后,能够显著地促进间充质干细胞对于炎症性疾病的缓解或治疗作用。本发明还揭示了低氧处理间充质干细胞能够产生胰岛素样生长因子-2,该因子在低氧处理的间充质干细胞治疗炎症性疾病中起到的核心作用。

[0058] 低氧处理的间充质干细胞及其用途及药物组合物

[0059] 本发明人选用了实验性自身反应性脑脊髓炎(EAE)这一动物模型(为多发性硬化的动物模型),在细胞治疗过程中,常氧下培养的间充质干细胞(人脐带来源)表现出了一定

的治疗效果,而经过低氧预处理之后,间充质干细胞的疗效得到了进一步的增强。

[0060] 基于本发明人的新发现,本发明提供了一种MSCs,其是低氧处理的MSCs,其制备方法简单,无需转基因操作,不涉及外源基因的插入,给药时不会存在安全性问题。

[0061] 作为本发明的优选方式,所述的低氧处理是指一种低氧环境,该环境中氧气为按照体积1~15%;较佳地1~13%;更佳地5~10%。较佳地,也即其培养环境中除了氧气含量降低且氮气含量上升以外,其它空气中应有的元素的含量与常规常氧培养箱中空气含量一致。

[0062] 基于本发明的新发现,还提供了一种低氧处理的MSCs的用途,用于制备预防、缓解或治疗炎症性疾病的药物。所述的炎症性疾病例如包括:实验性自身反应性脑脊髓炎(EAE)或炎症性肠炎(IBD)。其还用于:升高患病组织中调节性T细胞(Treg细胞)比例;降低患病组织中Th1和Th17细胞比例;或抑制血清中IFN- γ , IL-17因子等。

[0063] 本发明还提供了一种组合物(药物),它含有有效量(如0.000001-50wt%;较佳的0.00001-20wt%;更佳的,0.0001-10wt%)的所述的低氧处理的MSCs,以及药学上可接受的载体。

[0064] 如本文所用,术语“含有”表示各种成分可一起应用于本发明的混合物或组合物中。因此,术语“主要由...组成”和“由...组成”包含在术语“含有”中。

[0065] 如本文所用,术语“有效量”或“有效剂量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人/或动物所接受的如本文所用。

[0066] 如本文所用,“药学上可接受的”的成分是适用于人和/或哺乳动物而无过度不良反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即具有合理的效益/风险比的物质。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。

[0067] 通常,可将所述细胞配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地,pH约为6-8。

[0068] 胰岛素样生长因子-2(IGF-2)在间充质干细胞治疗中的作用

[0069] 为了验证间充质干细胞是不是通过其分泌的因子发挥作用,本发明人将间充质干细胞的上清用于实验性自身反应性脑脊髓炎的治疗,结果显示只有低氧细胞的上清可以发挥治疗效果,这就说明低氧预处理的间充质干细胞是通过其分泌的因子发挥了疾病治疗的功能。为了进一步确定是哪种或哪几种因子在低氧预处理的间充质干细胞治疗过程中发挥作用,本发明人检测了常氧和低氧培养下间充质干细胞因子表达的差异,结果显示胰岛素样生长因子-2的表达量在低氧处理后有了明显的提高。

[0070] 胰岛素样生长因子-2是一种主要由肝脏分泌并在血液中大量存在的生长因子,它具有抗凋亡、生长调节、类胰岛素和促有丝分裂等功能。普遍认为胰岛素样生长因子-2在胚胎发育中具有重要的作用,可以促进胚胎发育和器官形成;也有报道称其与记忆和生殖有关,通过对基因缺陷小鼠的研究发现,胰岛素样生长因子-2的信号缺失会造成脑发育不健全。但是,至今尚无将胰岛素样生长因子-2与炎症性疾病的治疗相关联的报道。

[0071] 为了验证胰岛素样生长因子-2在间充质干细胞治疗实验性自身反应性脑脊髓炎过程中是否发挥作用,本发明人使用了中和抗体中和掉低氧上清中的胰岛素样生长因子-2,中和后的上清在治疗疾病时疗效消失了。之后,本发明人尝试直接使用胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗实验性自身反应性脑脊髓炎,实验结果显示,胰岛素样生长因

子-2的Ala25-Glu91片段的使用可以有效的治疗实验性自身反应性脑脊髓炎。在炎症部位,即脊髓中,本发明人发现调节性T细胞(Tregs)的比例有了显著提高,与此同时,Th1和Th17细胞的比例显著下降。

[0072] 可见,相比于常氧培养下的间充质干细胞,低氧预处理可以有效的提高其治疗实验性自身反应性脑脊髓炎的效果,这种治疗效果的提高是依赖于胰岛素样生长因子-2表达的上升实现的,单独使用胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段也可以实现对实验性自身反应性脑脊髓炎的良好治疗效果。

[0073] 因此,本发明还提供了胰岛素样生长因子-2及其Ala25-Glu91片段的用途,用于制备预防、缓解或治疗炎症性疾病的组合物(药物)。

[0074] 所述的胰岛素样生长因子-2包括全长的胰岛素样生长因子-2或其生物活性片段。优选的,所述的胰岛素样生长因子-2全长的氨基酸序列可以与SEQ ID NO:8(NCBI protein database编号P01344.1)所示的序列基本上相同。

[0075] 经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的胰岛素样生长因子-2的氨基酸序列也包括在本发明中。胰岛素样生长因子-2或其生物活性片段包括一部分保守氨基酸的替代序列,所述经氨基酸替换的序列并不影响其活性或保留了其部分的活性。适当替换氨基酸是本领域公知的技术,所述技术可以很容易地被实施并且确保不改变所得分子的生物活性。这些技术使本领域人员认识到,一般来说,在一种多肽的非必要区域改变单个氨基酸基本上不会改变生物活性。见Watson等,Molecular Biology of The Gene,第四版,1987,The Benjamin/Cummings Pub.Co.P224。

[0076] 任何一种胰岛素样生长因子-2及含有其第25-91位氨基酸序列的生物活性片段都可以应用到本发明中。在这里,胰岛素样生长因子-2的生物活性片段的含义是指作为一种多肽,其仍然能保持全长的胰岛素样生长因子-2的全部或部分功能。通常情况下,所述的生物活性片段至少保持50%的全长胰岛素样生长因子-2的活性。在更优选的条件下,所述活性片段能够保持全长胰岛素样生长因子-2的60%、70%、80%、90%、95%、99%、或100%的活性。

[0077] 本发明也可采用经修饰或改良的胰岛素样生长因子-2或以其第25位至91位氨基酸序列为基础的活性片段,比如,可采用为了促进其半衰期、有效性、代谢、和/或蛋白的效力而加以修饰或改良的炎症性疾病。

[0078] 本发明还提供了一种组合物(药物),它含有有效量(如0.000001-50wt%;较佳的0.00001-20wt%;更佳的,0.0001-10wt%)的所述的胰岛素样生长因子-2,以及药学上可接受的载体。

[0079] 在本领域对低氧处理的间充质干细胞在免疫相关疾病治疗时的表现还缺乏认识的情况下,本发明首次揭示低氧处理的间充质干细胞对于炎症性疾病的治疗效果比常氧下培养的间充质干细胞更为理想。并且还发现,单独使用胰岛素样生长因子-2也可以实现对实验性自身反应性脑脊髓炎的良好治疗效果。本发明人相信,上述发现为阐述间充质干细胞治疗自体免疫性脊髓灰质炎等免疫相关疾病的机制提供的新的思路,也为进一步认识胰岛素样生长因子-2在免疫相关疾病治疗中的价值提供了新的信息。

[0080] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条

件如J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,第三版,科学出版社,2002中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0081] 材料和方法

[0082] 除非另外说明,本发明所用的试剂和实验材料均可从市售获得,其中生物材料来源如下:

[0083] 重组人源的IGF-2的Ala25-Glu91片段,IGF-2中和抗体,对照IgG抗体购自R&D Systems。髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG₃₅₋₅₅)购自吉尔生化有限公司(上海,中国)。不完全弗氏佐剂(IFA),结核分支杆菌(TB)购自Sigma-Aldrich(MO,USA)。百日咳毒素(pertussis toxin,PT)购自List Biological Laboratories,USA。葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate,DSS)购自MP Biomedicals。人IGF-2ELISA试剂盒购自(Mediagnost,德国),小鼠IFN γ ,IL-17ELISA鉴定试剂购自R&D Systems。流式细胞术抗体anti-mouse CD4PerCP-Cy5.5,anti-mouse CD4PerCP-Cy5.5,anti-mouse IL-17A PE,anti-mouse IL-17A PE购自Ebioscience。

[0084] C57BL/6小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,饲养于上海交通大学医学院实验动物科学部。

[0085] 1、细胞制备方法

[0086] 人脐带来源间充质干细胞的分离培养:抽离脐带中的血管后,将剩余脐带组织切成碎块并置于培养皿中,让MSCs自然爬出,每两天换液一次。待培养皿中细胞达到一定密度后,进行消化传代,用于后续实验。

[0087] 人间充质干细胞的低氧处理方法:将间充质干细胞置于低氧培养箱中培养,除培养箱的改变外,其余所用试剂均与常氧培养时保持一致。低氧条件:按照体积10%O₂。

[0088] 构建IGF-2表达水平敲低的细胞:利用慢病毒感染的方法进行稳定敲除,使用的对照序列为:Ctrl-sh-RNA(5'-ttctccgaacgtgtcacgt-3'(SEQ ID NO:1));IGF2的序列分别为:sh-RNA-770(5'-gaagtcgatgctggtgcttct-3'(SEQ ID NO:2));sh-RNA-1526(5'-gctttaaacacccttcacata-3'(SEQ ID NO:3))。慢病毒据带有GFP-标记基因和puromycin筛选抗性基因,感染后细胞呈现绿色荧光。基因敲出实验中,待细胞密度达到60%时加入病毒,24小时后换正常培液,镜下观察并根据荧光比例推测感染效率,稳定24小时后加入puromycin,等待细胞长满后传代用于后续实验。

[0089] 2、实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型的建立及治疗

[0090] (1) 实验前准备过程

[0091] 制备完全弗氏佐剂(CFA):将热灭活的结核分支杆菌加入不完全弗氏佐剂中直至终浓度达到5mg/ml,使用前充分颠倒混匀。

[0092] 抗原的乳化:将两支玻璃针管通过三通管连接,将等体积的抗原溶液(300 μ g MOG于100 μ l PBS中)和100 μ l完全弗氏佐剂加入针管中,排除针管内气泡并来回推动获得乳化液。大约需要推动约500次,推动阻力会逐渐增加,此时各成分可充分混匀成乳化状态。

[0093] 百日咳毒素(PT)溶液配制:将百日咳毒素溶解于PBS至工作浓度1ng/ μ l。

[0094] (2) 实验性自身反应性脑脊髓炎(EAE)模型的建立和治疗

[0095] 第0天,将200 μ l乳化好的抗原皮下注射于C57BL/6小鼠背部进行抗原免疫,胸部对应的背部两侧每侧100 μ l;同时通过尾静脉注射PT,200 μ l/只。

- [0096] 第2天,再次通过尾静脉注射PT,200 μ l/只。
- [0097] 第8天,第11天和第14天,尾静脉注射200 μ l 2×10^5 个常氧培养MSCs;或者同等数目低氧培养MSCs;200 μ l生理盐水尾静脉注射组作为对照。
- [0098] 使用细胞上清治疗时,上清注射时间为第9天至第13天。
- [0099] 使用胰岛素样生长因子2的Ala25-Glu91片段治疗时则从实验诱导后第8天每天注射,剂量为5ng/只,腹腔给药。
- [0100] 低氧处理MSCs制备:在按照体积比10%O₂的条件下持续培养3代以上。10%O₂环境的建立:使用Forma™ Series II 3110 Water-Jacketed CO₂Incubator,通过氮气含量的调节实现低氧环境的建立。
- [0101] (3) EAE临床评分标准
- [0102] 0分:无异常表现;
- [0103] 0.5分:尾尖下垂;
- [0104] 1分:整条尾巴瘫痪;
- [0105] 2分:后肢无力;
- [0106] 3分:一后肢瘫痪;
- [0107] 4分:双后肢瘫痪;
- [0108] 5分:死亡。
- [0109] 3、炎症性肠炎IBD模型的建立和治疗
- [0110] 葡聚糖硫酸钠(DSS)按照质量体积比2.5:100配成溶液,使用22 μ m的筛网过滤以保证无菌,用封口膜封口备用。
- [0111] 选用8-10周的C57BL/6雌鼠,用配好的DSS溶液替换饮用水诱导模型,每天称取小鼠体重并观察粪便情况,DSS溶液每隔1天换液或补加。
- [0112] 常氧或低氧的MSCs分别在第1天,第3天,第5天腹腔注射,每次每只小鼠注射 2×10^6 个细胞。
- [0113] 胰岛素样生长因子-2的Ala25-Glu91片段治疗时则为每只小鼠50ng,每天腹腔注射给药。
- [0114] 4、脾细胞体外增殖实验
- [0115] 处死EAE小鼠后,取出小鼠的脾并获取单细胞悬液,按照每孔 $3-5 \times 10^5$ 个细胞的数量将脾细胞铺在U型底的96孔板中,加MOG₃₅₋₅₅至20 μ g/ml。
- [0116] 37 $^{\circ}$ C温箱中培养72小时后加入³H标记的胸腺嘧啶,6小时之后将孔板经反复冻融后上机通过真空吸附到专用滤膜上,Wallac MicroBeta液闪计数仪上读取cpm值,检测³H的掺入量。
- [0117] 5、实时荧光定量PCR(Real time PCR)检测基因表达
- [0118] 参照TIANGEN细胞RNA抽提试剂盒说明书抽提RNA。参考TIANGEN TIANScript cDNA第一链生成试剂盒说明将RNA反转为cDNA。采用TAKARA荧光定量PCR试剂,参考其说明书进行荧光定量PCR。以 β -actin作为内参,结果分析处理采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法,所有基因表达都换算为 β -actin的倍数。所用引物序列如下:
- [0119] 人IGF-2:
- [0120] 正向引物:5'-CTTGACTTTGAGTCAAATTGG-3' (SEQ ID NO:4);

- [0121] 反向引物:5' -GGTCGTGCCAATTACATTTCA-3' (SEQ ID NO:5);
- [0122] β -actin:
- [0123] 正向引物:5' -TTGCCGACAGGATGCAGAAGGA-3' (SEQ ID NO:6);
- [0124] 反向引物:5' -AGGTGGACAGCGAGGCCAGGAT-3' (SEQ ID NO:7)。
- [0125] 6、细胞内细胞因子或Foxp3的免疫荧光染色
- [0126] (1) 所有细胞(约 $5 \sim 10 \times 10^5$)用PBS洗一遍后,都用抗小鼠CD16/CD32抗体封闭10分钟,冰上,每管30 μ l体系。
- [0127] (2) 先进行细胞表面分子的染色,取细胞 1×10^6 重悬于100 μ l FACS缓冲液中用于染色。加入荧光标记的抗体后,4 $^{\circ}$ C避光孵育30分钟。
- [0128] (3) FACS缓冲液洗一遍后,每管各加入Fixation/Permeabilization buffer 100 μ l,放4 $^{\circ}$ C固定过夜。
- [0129] (4) 400 \times g,离心5min,加入1 \times Permeabilization buffer 200 μ l,混匀。
- [0130] (5) 400 \times g,离心5min,加入相应的细胞因子抗体或者Foxp3抗体(抗体用1 \times Permeabilization buffer稀释),每管50 μ l体系,放冰上避光染色1小时。
- [0131] (6) 直接加入1 \times Permeabilization buffer 200 μ l,混匀,400 \times g,离心5min。
- [0132] (7) 弃上清后,再加入1 \times Permeabilization buffer 200 μ l,混匀,400 \times g离心5min。
- [0133] (8) 弃上清后,再加入FACS buffer 200 μ l,混匀,400 \times g,离心5min。细胞沉淀用FACS buffer 200 μ l重悬,即可用流式细胞仪检测分析。
- [0134] 7、数据处理和统计学分析
- [0135] 所示实验结果中每个处理组都设置有3个或3个以上的重复,通过Graphpad Prism 5软件作图,图中所示数据以平均数 \pm 标准差表示。数据的统计分析采用Student's t检验分析。显著性水准定为 $\alpha=0.05$,*代表 $p<0.05$;**代表 $p<0.01$;***代表 $p<0.001$ 。
- [0136] 实施例1、低氧预处理增强了间充质干细胞对实验性自身反应性脑脊髓炎(EAE)的治疗效果
- [0137] 为了验证低氧预处理是否可以影响间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)对EAE的治疗效果,本发明人将MSCs培养在10%O₂的条件下持续培养3代以上,然后将处理好的细胞用于EAE治疗(疾病诱导后第9天、第12天、第15天注射细胞)。
- [0138] 本发明人发现,低氧处理显著增强MSCs对EAE的治疗效果。脊髓部位病理分析显示,低氧MSCs治疗组小鼠脊髓部位的脱髓鞘和免疫细胞浸润均明显抑制,同时脊髓部位单个核细胞浸润数量也显著减少,如图1A~B。
- [0139] 体外脾细胞增殖实验显示,低氧处理MSCs治疗EAE后,MOG特异T细胞的增殖反应显著下降,如图1C。
- [0140] 对小鼠血清的检测发现,低氧处理MSCs治疗EAE后,小鼠血清中IFN- γ , IL-17等炎症因子被显著抑制,如图1D。
- [0141] 综合而言,MSCs在治疗EAE时有一定的效果,而低氧预处理可以很显著地增强这一效果,各项疾病指标都得到了明显缓解。
- [0142] 实施例2、低氧间充质干细胞的培养上清有效治疗实验性自身反应性脑脊髓炎(EAE)

[0143] 为了确认是不是间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 分泌的因子在 EAE 治疗中发挥关键作用, 本发明人直接使用常氧 MSCs 或低氧处理 MSCs 的培养上清用于治疗 EAE (注射时间为模型诱导后第 9 天至第 13 天, 方式为腹腔)。

[0144] 结果显示, 在使用上清进行治疗时, 常氧 MSCs 上清没有表现出治疗效果, 而低氧 MSCs 的上清呈现显著的治疗效果, 如图 2A。

[0145] 与直接使用低氧处理 MSCs 类似, 低氧 MSCs 的上清可以显著抑制小鼠脊髓中的脱髓鞘和免疫细胞浸润, 如图 2A~B, 并且明显抑制脾脏中 MOG 特异性 T 细胞增殖, 如图 2C。

[0146] 这些结果说明, 低氧 MSCs 是通过分泌因子实现对 EAE 的治疗作用。

[0147] 因此, 本发明人使用基因芯片对常氧和低氧培养的 MSCs 的表达谱进行分析, 研究发现, 与常氧 MSCs 相比较, 低氧 MSCs 中胰岛素样生长因子-2 (insulin growth factor-2, IGF-2) 的表达量明显升高, 并利用 Real time-PCR 和 ELISA 对其 mRNA 和蛋白水平进行验证, 如图 2D。

[0148] 实施例 3、胰岛素样生长因子-2 在低氧培养的间充质干细胞治疗实验性自身反应性脑脊髓炎 (EAE) 过程中发挥关键作用

[0149] 为了验证胰岛素样生长因子-2 (Insulin Like growth Factor-2, IGF-2) 在间充质干细胞 (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) 治疗 EAE 过程中的关键作用, 本发明人使用了 IGF-2 的中和抗体 (购自 R&D) 阻断 MSCs 分泌上清中 IGF-2 的功能。在应用低氧处理 MSCs 上清治疗 EAE 时, 给予小鼠腹腔注射中和抗体 5ng/天/只后, 低氧上清的治疗效果消失了, 如图 3A。此外, 本发明人利用 sh-RNA770 (购自吉玛基因)、sh-RNA1526 (购自吉玛基因) 干扰 IGF-2 在 MSCs 中的表达水平, 如图 6, 与对照组 sh-RNA 处理 MSCs 相比较, 干扰 IGF-2 在 MSCs 上的表达可以破坏低氧处理 MSCs 对 EAE 的治疗作用。这就说明, IGF-2 是低氧 MSCs 发挥治疗 EAE 的关键因子。

[0150] 为了进一步确定 IGF-2 的作用, 本发明人直接使用购自 R&D 的 IGF-2 的 Ala25-Glu91 片段治疗 EAE (自模型诱导后第 8 天起每天给药, 5ng/只)。结果发现, IGF-2 的 Ala25-Glu91 片段注射后可以有效抑制 EAE, 主要表现在小鼠临床分数明显改善, 如图 3B; 脊髓中单个核细胞浸润数目明显下降, 如图 3C; MOG 特异性 T 细胞增殖明显下降, 如图 3D。

[0151] 值得注意的是: IGF-2 的 Ala25-Glu91 片段治疗 EAE 后, 小鼠脊髓中 CD4⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞比例明显上升, 如图 3E; 而 Th1 和 Th17 细胞比例显著下降, 如图 3F。这也表明 IGF-2 的 Ala25-Glu91 片段具有显著的免疫调节作用, 从而起到治疗 EAE 的作用。

[0152] 实施例 4、低氧预处理的间充质干细胞和胰岛素样生长因子-2 Ala25-Glu91 片段均可用于炎症性肠炎的治疗

[0153] 类似于治疗实验性自身反应性脑脊髓炎 (EAE) 的过程, 低氧处理的间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 同样在治疗炎症性肠炎 (inflammatory bowel disease, IBD) 的过程中表现出显著的治疗效果。研究发现, 低氧处理 MSCs 可以显著提高 IBD 小鼠存活, 如图 4A; 改善 IBD 诱导过程中小鼠体重的显著下降, 如图 4B; 改善 IBD 小鼠的临床评分, 如图 4C; 通过计算小鼠结肠的长度, 低氧处理 MSCs 可以显著抑制 IBD 小鼠肠道的损伤, 如图 4D;

[0154] 进一步实验表明, 胰岛素样生长因子-2 (insulin like growth factor-2, IGF-2) 的 Ala25-Glu91 片段在治疗 IBD 中的作用, 单纯 IGF-2 的 Ala25-Glu91 片段的使用就可以使小鼠的体重降低得到显著缓解, 如图 5A; 其结肠的长度减低, 以及结肠中炎症细胞的浸润得到

了有效抑制,如图5B。本发明人也分析了其疾病部位的淋巴细胞,包括肠系膜淋巴结和肠浸润细胞的成分,本发明人发现,和治疗EAE一样,IGF-2的Ala25-Glu91片段治疗组小鼠中,CD4⁺Foxp3⁺Tregs比例明显上升,而Th1和Th17细胞比例显著下降,如图5C。这些结果说明,IGF-2的Ala25-Glu91片段可以通过调节免疫发挥治疗特定疾病的作用。

[0155] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

	<110> 中国科学院上海生命科学研究院	
	<120> 低氧处理的间充质干细胞及其应用	
	<130> 152537Z1	
	<160> 8	
	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 多核苷酸	
	<400> 1	
[0001]	ttctccgaac gtgtcacgt	19
	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 多核苷酸	
	<400> 2	
	gaagtcgatg ctggtgcttc t	21
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 多核苷酸	
	<400> 3	
	gctttaaaca ccctteacat a	21

	<210> 4	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 多核苷酸	
	<400> 4	
	cttggacttt gagtcaaatt gg	22
	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 多核苷酸	
	<400> 5	
[0002]	ggtcgtgccca attacatttc a	21
	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 多核苷酸	
	<400> 6	
	ttgccgacag gatgcagaag ga	22
	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 多核苷酸	
	<400> 7	

aggtggacag cgaggccagg at

22

<210> 8

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 8

Met Gly Ile Pro Met Gly Lys Ser Met Leu Val Leu Leu Thr Phe Leu
 1 5 10 15

Ala Phe Ala Ser Cys Cys Ile Ala Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu
 20 25 30

Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg
 35 40 45

Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg
 50 55 60

[0003]

Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu
 65 70 75 80

Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Lys Ser Glu Arg Asp Val Ser Thr
 85 90 95

Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys
 100 105 110

Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln Arg Leu Arg Arg
 115 120 125

Gly Leu Pro Ala Leu Leu Arg Ala Arg Arg Gly His Val Leu Ala Lys
 130 135 140

Glu Leu Glu Ala Phe Arg Glu Ala Lys Arg His Arg Pro Leu Ile Ala
 145 150 155 160

Leu Pro Thr Gln Asp Pro Ala His Gly Gly Ala Pro Pro Glu Met Ala
 165 170 175

Ser Asn Arg Lys
 180

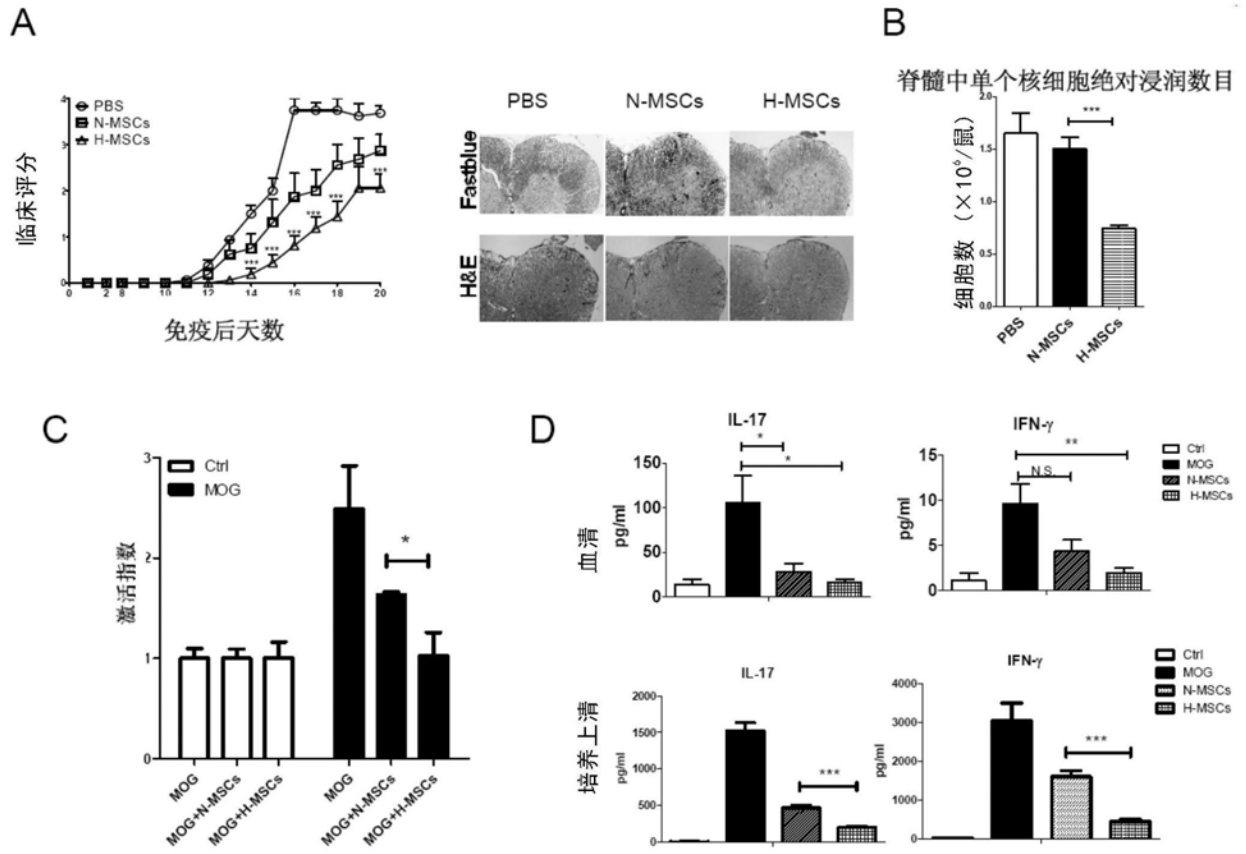


图1

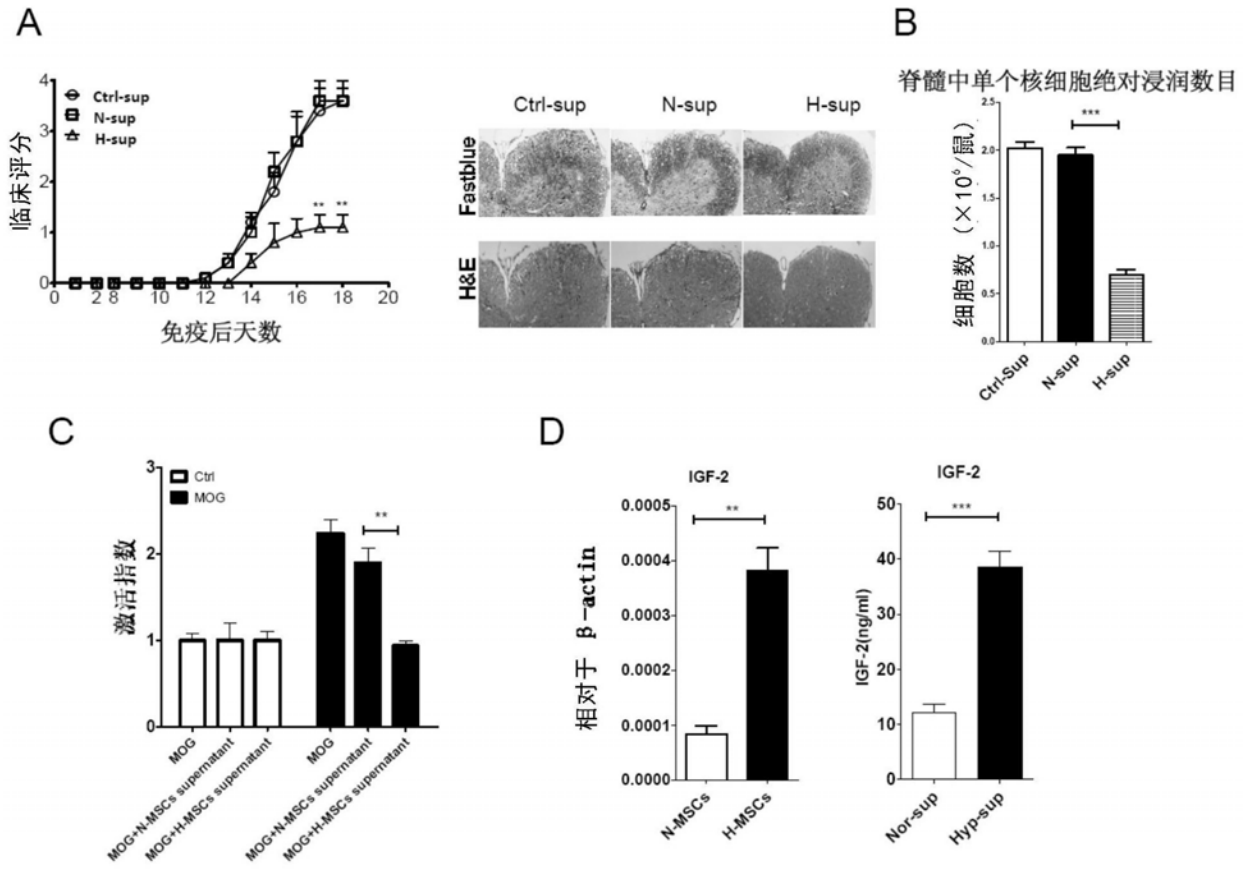


图2

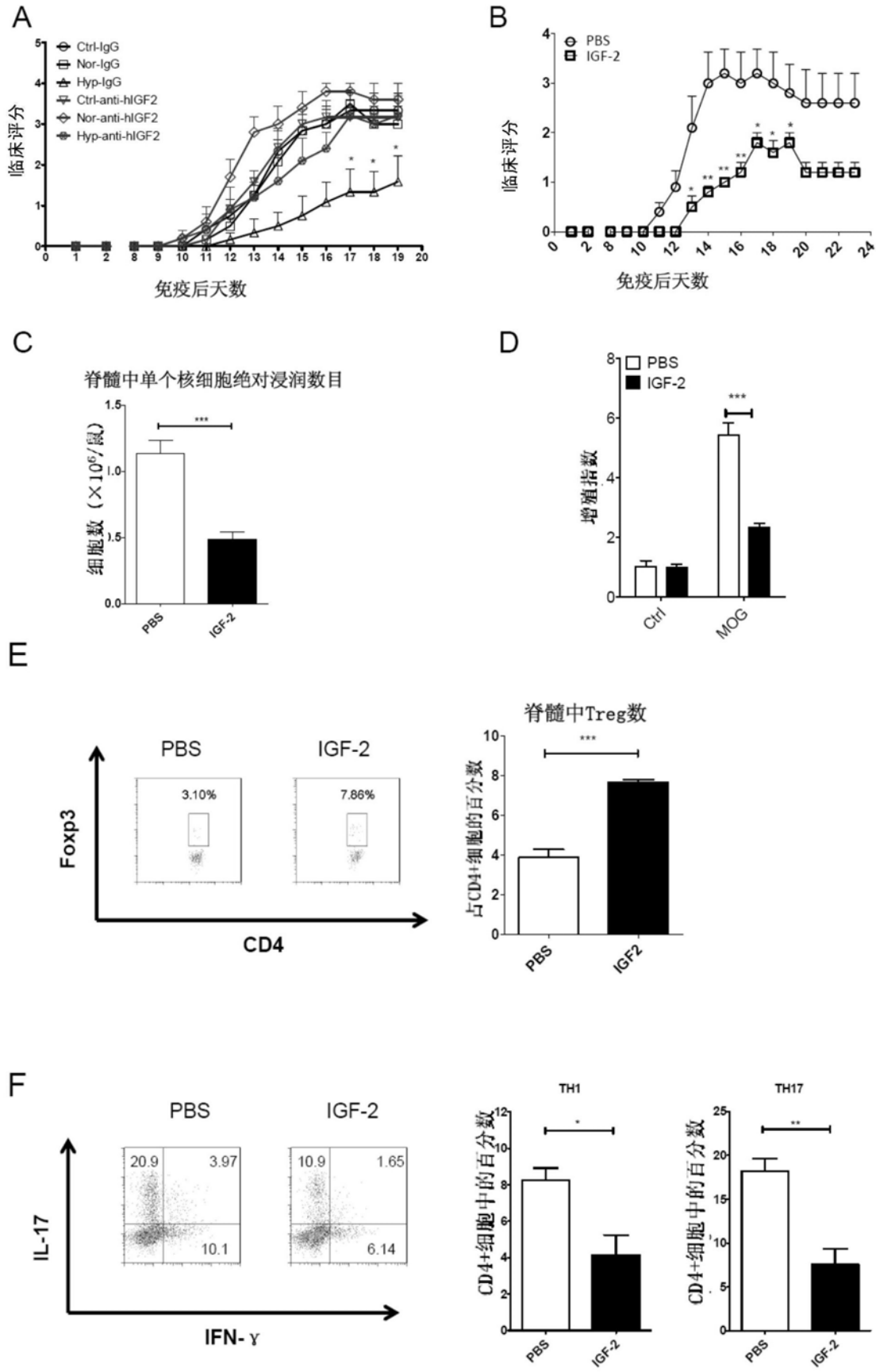


图3

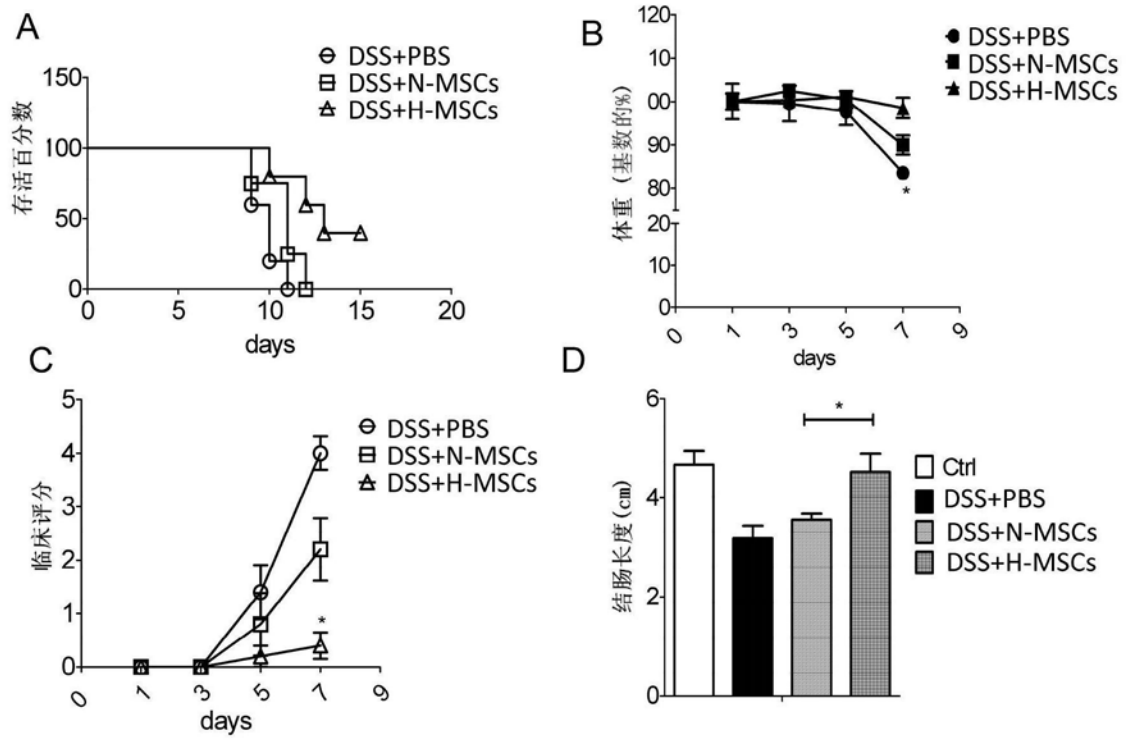


图4

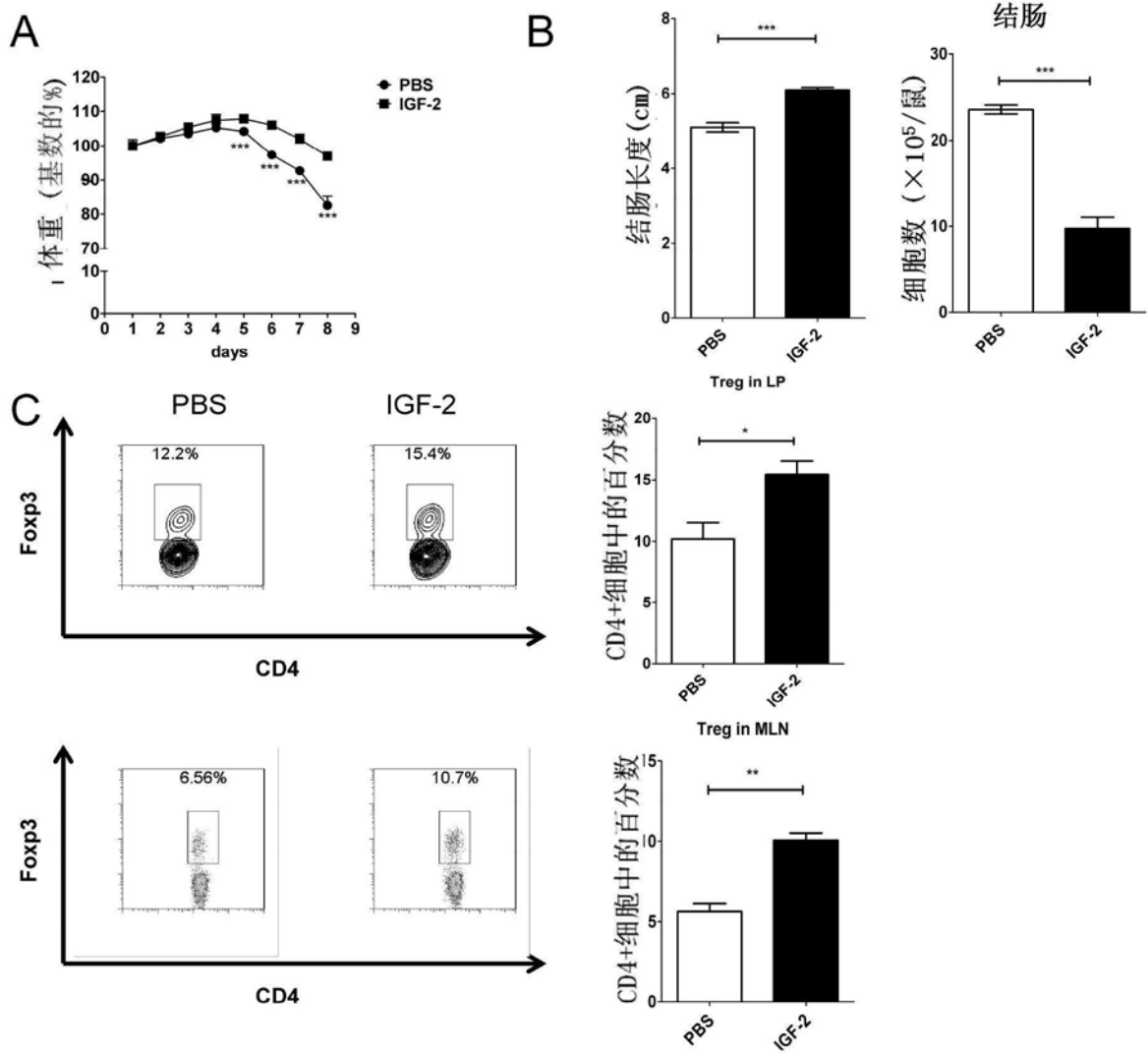


图5

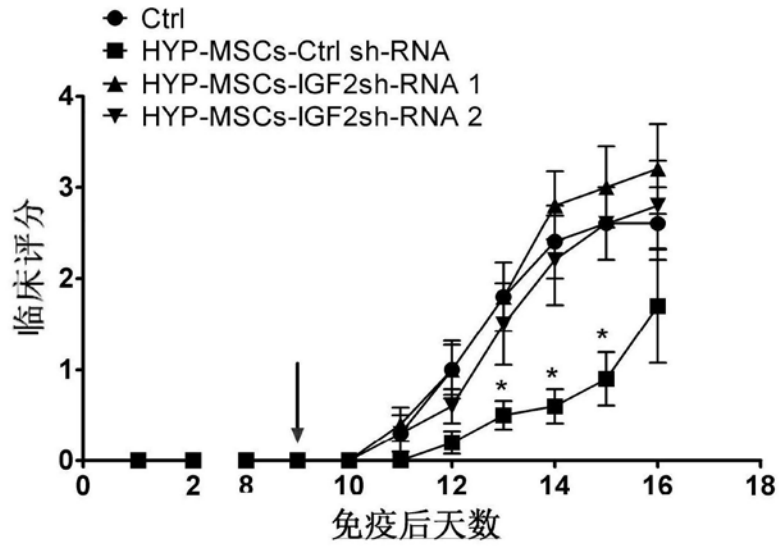


图6