

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200310122982.3

[45] 授权公告日 2006 年 11 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1286970C

[22] 申请日 2003.12.30

[21] 申请号 200310122982.3

[71] 专利权人 上海伯瑞生物技术发展有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技
园区李时珍路 288 号

共同专利权人 华东理工大学

[72] 发明人 谭文松 蔡海波 顾小华

审查员 林峻凯

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 罗大忱

权利要求书 1 页 说明书 10 页

[54] 发明名称

由脐血 CD34⁺ 细胞体外诱导生成巨核细胞的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种由脐血 CD34⁺ 细胞体外诱导生成巨核细胞的方法。包括先在含有胎牛血清及人干细胞因子(SCF)、人血小板生成素(TPO)和/或flt-3 配体的培养基中体外扩增脐血 CD34⁺ 细胞;然后再采用含有人血小板生成素(TPO)、人白细胞介素-3(IL-3)和/或人粒-巨系集落刺激因子(GM-CSF)的无血清培养基诱导巨核细胞的生成。采用本发明的方法从脐血 CD34⁺ 细胞诱导巨核细胞,与其他方法相比,细胞扩增倍数高,且培养物中巨核细胞的比例相似,细胞表型相同,因此,用这种方法诱导巨核细胞可显著提高诱导效率。

1. 从脐血 CD34⁺细胞体外诱导生成巨核细胞的方法，其特征在于，包括先在含有胎牛血清及人干细胞因子、人血小板生成素和 flt-3 配体的培养基中体外扩增脐血 CD34⁺细胞；然后再采用含有人血小板生成素、人白细胞介素-3 和人粒-巨系集落刺激因子的无血清培养基诱导巨核细胞的生成。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，将分离的来自于脐带血的单个核细胞悬浮在培养基中，加入磁珠偶联的小鼠抗人的 CD34 抗体，反应，然后收集 CD34⁺细胞，再在含有胎牛血清及人干细胞因子、人血小板生成素和 flt-3 配体的培养基中体外扩增脐血 CD34⁺细胞。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，含有胎牛血清及人干细胞因子、人血小板生成素和 flt-3 配体的培养基采用含 10-20%的胎牛血清的 IMDM 培养基；无血清培养基采用西格玛公司的 stemline™ 造血干细胞扩增培养基或 Quality Biological Inc.含有 L-谷氨酰胺的无血清培养基 QBSF^R-60 或 CellGenix Technologie Transfer GmbH 的用于造血干细胞和祖细胞培养的无血清培养基 CellGro^RSCGM 中的任一种。

4. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，单个核细胞在 IMDM 培养基中的浓度为 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 细胞/300 微升，磁珠偶联的小鼠抗人的 CD34 抗体的加入量为 20~100 微升。

5. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于，将分离得到的 CD34⁺细胞在含有胎牛血清及人干细胞因子、人血小板生成素和 flt-3 配体的培养基中，37°C，5%CO₂，100%湿度下培养 4~7 天。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，在无血清培养基中培养 7-10 天。

7. 根据权利要求 1~6 任一项所述的方法，其特征在于，含有胎牛血清及人干细胞因子、人血小板生成素和 flt-3 配体的培养基中，所采用的细胞因子组合中各种细胞因子的浓度范围为：人干细胞生长因子：5-100ng/mL；人血小板生成素：5-100 ng/mL；flt-3 配体：5-100 ng/mL。

由脐血 CD34⁺细胞体外诱导生成巨核细胞的方法

技术领域

本发明涉及一种体外诱导生成巨核细胞的方法，具体地说涉及由脐血 CD34⁺细胞在体外诱导生成巨核细胞的方法。

背景技术

巨核造血是由多潜能造血干细胞启动，通过形成成熟的巨核细胞，最终形成血小板的复杂的生物学过程。

巨核细胞的生成，一般分为三个发育阶段：祖细胞、未成熟巨核细胞（巨核前母细胞）和成熟巨核细胞。一些有丝分裂信号，如细胞因子、胞外基质可促使巨核祖细胞增殖。巨核前母细胞是一种瞬态细胞，好比是架在祖细胞、成熟细胞和分裂后细胞之间的桥梁。

巨核造血是一个独特的造血过程，从造血祖细胞池发育巨核细胞既需要细胞的有丝分裂又需要核内的有丝分裂-核复制。成熟的巨核细胞停止增殖，细胞不再分裂，但在其成熟的过程中核内的有丝分裂依旧进行，DNA含量继续增加，形成各种倍体的巨核细胞，最后释放出血小板。

巨核细胞和血小板作为人体血细胞的重要组分，在临床上具有重要应用价值。首先在临床上对血小板的输注需求很大，对各种原因引起的血小板缺乏症而言，输注血小板是常用的治疗方案。此外目前放疗化疗依然是癌症治疗的主要手段，但是很多患者在接受放、化疗后常常容易发生血小板缺乏症，这是癌症治疗中的主要风险之一；另外一些恶性疾病常需要通过造血干/祖细胞移植来恢复患者的造血功能，而造血干/祖细胞移植是否成功取决于中性粒细胞和血小板的恢复时间，有研究证明造血干/祖细胞移植后能快速重建中性粒细胞造血，但要使血小板恢复到相应的水平还需要很

长的时间，因此，目前临床上对这类病人一般仍需要输入相当数量的血小板，可见血小板对于肿瘤放化疗后的支持性治疗也具有重要意义。但目前血小板输入有产生同种抗体并有并发血小板输入抗性的风险，几年前克隆出来的血小板生成素TPO虽然能够调控体内的巨核造血过程，如 de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD 等人 1994 年在 Nature 所报道 (Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-MPL ligand. Nature 1994; 369:533.)，但是到目前为止，临床试验表明TPO 的应用不能令人满意地缩短放化疗后引起的血小板缺乏期。

临床研究发现，在常规的干细胞移植后，再输注体外扩增的同源自体的巨核细胞可加速病人血小板的恢复。但是骨髓、动员的外周血和脐血中，巨核细胞的数量很少，而按照巨核细胞临床输注的要求，输入的巨核细胞数要达到 $1 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ cells/kg，一个病人按照 50kg 计，需要输注的总细胞数要达到 $5 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ ，所以必须通过体外扩增技术，提供大量的巨核细胞，才能满足临床应用的要求。而且给病人输入巨核祖细胞之后，输入的细胞在体内能进一步增殖，从而增加体内血小板数量，缓解血小板的缺乏。

目前已有将体外扩增的巨核细胞用于临床实验，如意大利的骨髓移植中心，从动员的外周血出发，通过体外诱导巨核细胞的生成，使巨核细胞扩增 50 余倍后，将其应用到接受了自体外周血祖细胞移植的乳腺癌病人体内，则病人不再需要输入同种异型血小板，而对照组的病人都需要血小板输入支持。而且接受体外培养的细胞的病人并没有出现不良反应和细菌感染的现象，临床初步实验表明，体外扩增的巨核祖细胞可安全地应用到临床方面。近十年来临床上对血小板输入的需求大约增加了 3 倍，采用替代的细胞类产品可有效补充目前血小板供应的不足，因而体外诱导巨核细胞的扩增研究有重要的实际应用价值。

一些实验室已经研究开发了体外培养系统，从骨髓，动员外周血和脐血中生产巨核祖细胞输血产品。目前人们还主要致力于寻找细胞因子的最佳组合，合适的培养基和合适的培养系统（塑料容器，特氟隆表面容器或自动细胞灌流生物反应器）。1996年，据 Schattner M, Lefebvre P, Mingolelli SS, et al., Thrombopoietin-stimulated ex vivo expansion of human bone marrow megakaryocytes[J]. *Stem Cells*. 1996, 14(2):207-214. 文献报导，Schattner 等人采用含有 TPO、SCF、IL-3 及 1%HAS、2.5%HS 的 IMDM 培养 BM CD34⁺ 或 MNC，获得了较大数量的巨核细胞；1997年，根据 Bertolini F, Battaglia M, Pedrazzoli P, et al. Megakaryocytic progenitors can be generated ex vivo and safely administered to autologous peripheral progenitor cell transplant recipients[J]. *Blood*, 1997, 89:2679~2685 的文献报导，Bertolini 等人采用无血清培养系统，在 MGDF、SCF、IL-3、IL-6、IL-11、MIP-1a、FL 多种细胞因子的作用下，培养来自于动员的外周血中的 CD34⁺ 细胞，体外扩增第 7 天所获得的 MK 细胞已用于临床输血，移植到病人体内加速了血小板恢复。

但是，上述文献采用的起始细胞是外周血或骨髓中 CD34⁺ 细胞，体外诱导巨核细胞产生的起始细胞可以是来源于骨髓、动员外周血和脐血中的造血干/祖细胞。与成人外周血和骨髓相比，脐血来源丰富，富含 CD34⁺ 细胞，具有高增生及长期骨髓造血重建的能力；而且脐血造血干/祖细胞的免疫原性尚未发育成熟，可以减少 GVHD 的发生几率和降低异源病毒感染的危险性。临床资料证实，HLA 完全或部分匹配的脐血移植均可以重建遗传性和恶性疾病患者的骨髓造血功能。相比骨髓和动员外周血，脐

血中所含的 CD34⁺细胞，是适宜于体外诱导巨核细胞生成的起始细胞

(Helen Tao, Leonie Gaudry, Alison Rice, *et al.* Cord blood is better than bone marrow for generating megakaryocytic progenitor cells [J]. *Experimental Hematology*, 1999, 27:293-301.) 这些方法都是直接从新鲜分离出的脐血 CD34⁺细胞出发来诱导巨核细胞的生成，由于脐带血中 CD34⁺细胞的含量有限，绝对数量少，作为诱导巨核细胞的起始细胞，其数量的多少直接影响巨核细胞的诱导效率，导致诱导出的巨核细胞的数量有限，无法满足临床的要求，因此迫切需要找到一种方法提高巨核细胞的体外扩增细胞效果。

发明内容

本发明需要解决的技术问题是公开一种从脐带血 CD34⁺细胞体外诱导生成巨核细胞的方法，以克服现有技术存在的上述缺陷，满足临床医疗的需要。

本发明的技术构思是这样的：

单份脐血中 CD34⁺绝对量少，不利于体外大量诱导巨核细胞的生成，为此发明人设计了一种分段式培养策略，先在体外扩增 CD34⁺细胞，再使其诱导分化成巨核细胞。采用该方法可提高由 CD34⁺细胞出发诱导生成巨核细胞的效率。

本发明的方法包括先在含有胎牛血清及人干细胞因子 (SCF)、人血小板生成素 (TPO) 和/或 flt-3 配体的培养基中体外扩增脐血 CD34⁺细胞；然后再采用含有人血小板生成素 (TPO)、人白细胞介素-3 (IL-3) 和/或人粒-巨系集落刺激因子 (GM-CSF) 的无血清培养基中诱导巨核细胞的生成。

按照本发明优选的技术方案：

(1) 将分离的来自于脐带血的单个核细胞悬浮在培养基中，加入磁珠偶联的小鼠抗人的 CD34 抗体，4℃反应 20~40 分钟，然后收集 CD34⁺

细胞，再重悬于培养基中；

所说的分离的来自于脐带血的单个核细胞指的是脐带血经淋巴细胞分离液(Ficoll)密度梯度离心后收集的单个核细胞；

所说的培养基可采用常规的 IMDM 培养基，优选采用 Lam AC, Li K, Zhang XB, Li CK, et al. Preclinical ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice[J]. Transfusion. 2001,41(12):1567-76.文献提到的 IMDM 培养基；无血清培养基为 Qiu L, Meagher R, Welhausen S, et al. Ex vivo expansion of CD34⁺ umbilical cord blood cells in a defined serum-free medium (QBSF-60) with early effect cytokines[J]. J Hematother Stem Cell Res.1999,8(6):609-18.文献提到的 Quality Biological Inc.的 QBSF^R-60(含 L-谷氨酰胺的无血清培养基或 Lazzari L, Lucchi S, Porretti L, et al. Comparison of different serum-free media for ex vivo expansion of HPCs from cord blood using thrombopoietin, Flt-3 ligand, IL-6, and IL-11[J].Transfusion.2001,41:718-719 文献提到 CellGenix Technologie Transfer GmbH 的用于造血干/祖细胞培养的无血清培养基 CellGro^RSCGM 或西格玛公司的 stemlineTM造血干细胞扩增培养基中的任一种。

按照本发明优选的技术方案，单个核细胞在 IMDM 培养基中的浓度为 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ cells/300uL，磁珠偶联的小鼠抗人的 CD34 抗体的加入量为 20~100 uL。

所说的收集 CD34⁺细胞指的是，将与磁珠偶联的小鼠抗人的 CD34 抗体反应好的细胞，加入到置于磁场中的分离柱中，用含 EDTA、人血清白蛋白的 PBS 洗涤，细胞悬液慢慢通过，非磁性细胞（非 CD34⁺细胞）被洗脱，用 PBS（含 2mM EDTA）洗三遍。将分离柱撤离磁场，用含 EDTA、人血清白蛋白的 PBS 洗涤，CD34⁺细胞被洗出。

(2) 将分离得到的 CD34⁺细胞接种到含胎牛血清、人干细胞因子

(SCF)、人血小板生成素 (TPO) 和 flt-3 配体的培养基中, 置于 37℃, 5%CO₂, 100%湿度的培养箱中, 培养 4~7 天后收集细胞, 改换用无血清培养基, 并添加促血小板生成素 (TPO)、白细胞介素-3 (IL-3) 和/或粒-巨细胞集落刺激因子 (GM-CSF), 培养 7-10 天。

培养基中, 所采用的细胞因子组合中各种细胞因子的浓度范围为: 人干细胞因子 (SCF): 5~100ng/mL; 人血小板生成素 (TPO): 5~100 ng/mL; flt-3 配体: 5~100 ng/mL。

无血清培养基中各细胞因子的浓度范围为: 人粒-巨系集落刺激因子 (GM-CSF): 0~100 ng/mL; 人血小板生成素 (TPO): 10~100 ng/mL; 人白细胞介素-3 (IL-3): 1~20 ng/mL。

接种浓度为 1×10^4 cells/mL ~ 1×10^5 cells/mL。

所说的培养基可采用常规的 IMDM 培养基, 优选采用 Lam AC, Li K, Zhang XB, Li CK, et al. Preclinical ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice[J]. Transfusion. 2001,41(12):1567-76.文献提到的 IMDM 培养基;

所说的无血清培养基可采用常规的不含血清的培养基, 优选采用 Qiu L, Meagher R, Welhausen S, et al. Ex vivo expansion of CD34⁺ umbilical cord blood cells in a defined serum-free medium (QBSF-60) with early effect cytokines[J]. J Hematother Stem Cell Res.1999,8(6):609-18.文献提到的 Quality Biological Inc.的含有 L-谷氨酰胺的无血清培养基 QBSF^R-60 或 Lazzari L, Lucchi S, Porretti L, et al. Comparison of different serum-free media for ex vivo expansion of HPCs from cord blood using thrombopoietin, Flt-3 ligand, IL-6, and IL-11[J].Transfusion.2001,41:718-719 文献提到 CellGenix Technologie Transfer GmbH 的用于造血干/祖细胞培养的无血清培养基 CellGro^RSCGM 或 stemlineTM造血干细胞扩增培养基中的任一种。

培养基的组成对巨核细胞的诱导分化有重要的影响，据文献报道，有多种细胞因子（IL-1、IL-3、IL-6、IL-11、Flt3、FL-Ligand、SCF、GM-CSF、TPO）可在体外或体内调节巨核细胞的增殖和/或成熟。这些细胞因子一起使用时会发生协同效应从而启动细胞的生长，其中 IL-3、GM-CSF 启动巨核细胞扩增与分化，IL-3 能增加液体培养中巨核细胞的绝对值及巨核细胞集落的数目。TPO 对所有水平的巨核造血和血小板的产生都起作用，TPO 在体内体外都有活性，在半固体培养时能刺激造血祖细胞产生巨核集落，在液体培养时产生巨核细胞。SCF 本身对巨核集落的形成无作用，但它能与其它细胞因子(IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF)组合作用，从而增强这些细胞因子刺激巨核细胞形成的能力。而且对造血早期细胞的培养来说，SCF、FL 是必不可少的。在实验中发明人意外地发现 GM-CSF、IL-3、TPO 三种细胞因子组合可有效地从脐血 CD34⁺细胞诱导巨核细胞的生成，可提高培养液中巨核细胞的比例，但是这三种细胞因子组合并不有利于总细胞的扩增，因此巨核细胞的绝对数量受限制。

为此发明人先采用 SCF+FL+TPO 三种细胞因子刺激培养液中 CD34⁺细胞的增殖，一周后再采用 GM-CSF+IL-3+TPO 或 IL-3+TPO 细胞因子组合促使巨核细胞分化的方法，可有效提高脐血 CD34⁺细胞诱导巨核细胞的效率。

此外，胎牛血清对早期脐血 CD34⁺细胞的培养是至关重要的，但是存在于胎牛血清中的某种未知成份抑制巨核细胞的生成，而且从临床应用的角度考虑，发明人采用无血清培养技术来诱导巨核细胞生成，本发明采用先用含胎牛血清培养再更换成无血清培养基的分段式培养法，可在保证总细胞扩增的同时增加巨核细胞的数目。

采用 W. Piacibello, L. Garetto, M. Aglietta Ex vivo expansion of megakaryocytes[J] Transfusion Science, 2000, 22: 107-110、Pantep Angchaisuksiri, Shawn R.Grigus, Patricia L et al. Secretion of a unique peptide

from interleukin-2-stimulated natural killer cells that induces endomitosis in immature human megakaryocytes[J]. Blood, 2002, 99:130 -136.文献报导的方法,对培养后的细胞计数、检测 CFU-MK 的密度、CD41⁺细胞的比例、分析 CD41⁺细胞的多倍体分布,结果表明,细胞可扩增 269.4 倍,培养物中 CD41⁺细胞的比例可达到 46.2%,其中 30%的 CD41⁺细胞为≥8 倍体细胞;10000 个培养的细胞可获得 92 个 CFU-MK。

采用本发明的方法从脐血 CD34⁺细胞诱导巨核细胞,与其他方法相比,培养物中巨核细胞的比例相似,细胞表型相同,但细胞扩增倍数高,因此用这种方法诱导生成巨核细胞可显著提高制备效率。

具体实施方式

实施例 1

脐血经淋巴细胞分离液(Ficoll)密度梯度离心后,收集单个核细胞,并以 IMDM 培养基洗涤两次,将细胞悬浮在 IMDM 的培养基中,浓度为 1×10^8 cells/300uL,加入 50uL 磁珠偶联的小鼠抗人的 CD34 抗体,4°C 反应 30 分钟,用含 2mM EDTA、0.5%人血清白蛋白的 PBS 洗涤,在磁场内将分离柱上的非 CD34⁺细胞洗下,再在脱离磁场的条件下用含 2mM EDTA、0.5%人血清白蛋白的 PBS 将 CD34⁺细胞洗脱,重悬于 IMDM 培养基中。

将分离得到的 CD34⁺细胞以 5×10^4 cells/mL 的接种密度接种到含 10%胎牛血清的 IMDM 培养基中,培养基中添加人干细胞因子(SCF)、人血小板生成素(TPO)、flt-3 配体各 50ng/mL,置于 37°C, 5%CO₂, 100%湿度的培养箱中,培养 7 天后收集细胞,改换用无血清培养基(Sigma)的 stemline™ 造血干细胞扩增培养基并添加促血小板生成素(TPO) 20ng/mL,白细胞介素-3(IL-3) 1ng/mL,粒-巨细胞集落刺激因子(GM-CSF) 25 ng/mL,置于 37°C, 5%CO₂, 100%湿度的培养箱中,培养 7 天。细胞计数、检测 CFU-MK 的密度、CD41⁺细胞的比例、分析 CD41⁺细胞的多倍体分布。细胞可扩增 269.4 倍,培养

物中 CD41⁺细胞的比例可达到 46.2%，其中 30%的 CD41⁺细胞为≥8 倍体细胞； 10000 个培养的细胞可获得 92 个 CFU-MK。

实施例 2

脐血经淋巴细胞分离液(Ficoll)密度梯度离心后，收集单个核细胞，并以 IMDM 培养基洗涤两次，将细胞悬浮在 IMDM 的培养基中，浓度为 1.5×10^8 cells/300ul，加入 100ul 磁珠偶联的小鼠抗人的 CD34 抗体，4°C 反应 30 分钟，用含 2mM EDTA、0.5%人血清白蛋白的 PBS 洗涤，在磁场内将分离柱上的非 CD34⁺细胞洗下，再在脱离磁场的条件下用含 2mM EDTA、0.5%人血清白蛋白的 PBS 将 CD34⁺细胞洗脱，重悬于 IMDM 培养基中。

将分离得到的 CD34⁺细胞接种到含 10%胎牛血清的 IMDM 培养基中，培养基中添加人干细胞因子（SCF）100ng/mL，人血小板生成素（TPO）50ng/mL、flt-3 配体 25ng/mL，置于 37°C，5%CO₂，100%湿度的培养箱中，培养 4 天后收集细胞，改换用无血清培养基 CellGenix Technologie Transfer GmbH 的用于造血干/祖细胞培养无血清培养基 CellGro^RSCGM 中，并添加促血小板生成素(TPO) 50ng/mL，白细胞介素-3（IL-3）5ng/mL，置于 37°C，5%CO₂，100%湿度的培养箱中，培养 7 天后收集细胞，细胞计数、检测 CFU-MK 的密度、CD41⁺细胞的比例、分析 CD41⁺细胞的多倍体分布。细胞可扩增 219.8 倍，培养物中 CD41⁺细胞的比例可达到 53.9%，其中 15.3%的 CD41⁺细胞为≥8 倍体细胞； 10000 个培养的细胞可获得 153 个 CFU-MK。

实施例 3

脐血经淋巴细胞分离液(Ficoll)密度梯度离心后，收集单个核细胞，并以 IMDM 培养基洗涤两次，将细胞悬浮在 IMDM 的培养基中，浓度为 6×10^7 cells/300ul，加入 20uL 磁珠偶联的小鼠抗人的 CD34 抗体，4°C 反应

40 分钟，用含 2mM EDTA、0.5%人血清白蛋白的 PBS 洗涤，在磁场内将分离柱上的非 CD34⁺细胞洗下，再在脱离磁场的条件下用含 2mM EDTA、0.5%人血清白蛋白的 PBS 将 CD34⁺细胞洗脱，重悬于 IMDM 培养基中。

将分离得到的 CD34⁺细胞接种到含 10%胎牛血清的 IMDM 培养基中，培养基中添加人干细胞因子（SCF）100ng/mL、人血小板生成素（TPO）50ng/mL，置于 37°C，5%CO₂，100%湿度的培养箱中，培养 7 天后收集细胞，改换用无血清培养基并添加促血小板生成素(TPO) 20 ng/mL，白细胞介素-3（IL-3）1ng/mL，粒-巨细胞集落刺激因子（GM-CSF）50ng/mL，培养 10 天后收集细胞。细胞计数、检测 CFU-MK 的密度、CD41⁺细胞的比例、分析 CD41⁺细胞的多倍体分布。细胞可扩增 256.4 倍，培养物中 CD41⁺细胞的比例可达到 39.8%，其中 43.2%的 CD41⁺细胞为≥8 倍体细胞；10000 个培养细胞可获得 167 个 CFU-MK。