



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101974485 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 16

(21) 申请号 201010542499. 0

A61P 19/00(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 11. 12

A61P 21/00(2006. 01)

(71) 申请人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区仁  
爱路 199 号

(72) 发明人 张焕相 徐晓静 贺丽虹

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有  
限公司 32103

代理人 陶海锋

(51) Int. Cl.

C12N 5/0775(2010. 01)

A61K 35/12(2006. 01)

A61P 25/00(2006. 01)

A61P 9/00(2006. 01)

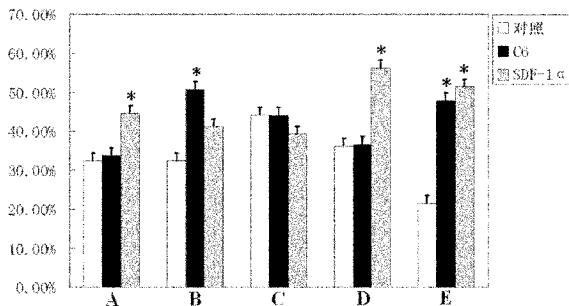
权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 6 页

(54) 发明名称

具有最佳迁移能力的间充质干细胞的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物制品领域,公开了一种具有最佳迁移效率的间充质干细胞的制备方法,包括以下步骤:(1) 分离培养间充质干细胞,诱导分化,在分化的不同时段收集细胞,得到处于不同分化状态的间充质干细胞;(2) 确定迁移区域趋化因子情况,所述趋化因子情况包括趋化因子的种类和浓度,分析计算步骤(1) 所得不同分化状态间充质干细胞对该趋化因子情况作用下的迁移效率,找到迁移效率最佳的间充质干细胞的分化状态,由此即可制备得到对该迁移区域所需的具有最佳迁移效率的间充质干细胞。本发明所述间充质干细胞,可以针对不同情况的病灶区提供最佳迁移效率的间充质干细胞,增加迁移到病灶区的间充质干细胞,改善治疗效果,为干细胞移植治疗提供了最根本的保障。



1. 一种具有最高迁移效率的间充质干细胞的制备方法,包括以下步骤:

(1) 分离、培养、鉴定间充质干细胞,诱导分化,在分化的不同时段收集细胞,得到处于不同分化状态的间充质干细胞;

(2) 确定迁移区域趋化因子情况,所述趋化因子情况包括趋化因子的种类和浓度,分析计算步骤(1)所得不同分化状态间充质干细胞对该趋化因子情况作用下的迁移效率,找到迁移效率最高的间充质干细胞的分化状态,由此即可制备得到该迁移区域所需的具有最高迁移效率的间充质干细胞。

2. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,步骤(2)所述迁移效率,是指细胞迁移起始点到终点的最短距离与细胞迁移总距离的比值,数值越大表明迁移的持续性越高,定向迁移至病灶部位的能力越强。

3. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,步骤(2)具体包括以下步骤:确定迁移区域趋化因子情况,所述趋化因子情况包括趋化因子的种类和浓度,在分化培养基中加入与迁移区域相同种类、相同浓度的趋化因子,诱导细胞迁移;对细胞的定向迁移效率进行分析,找到对迁移区域具有最高迁移效率的间充质干细胞的分化状态,所述分化状态的间充质干细胞即为该迁移区域所需的具有最高迁移效率的间充质干细胞。

4. 根据权利要求1所述制备方法,其特征在于,所述趋化因子为诱导间充质干细胞趋向性迁移的因子,包括所有能够引起不同分化状态的间充质干细胞定向迁移的炎症趋化因子和细胞生长因子。

5. 根据权利要求4所述制备方法,其特征在于,所述趋化因子为:VEGF、HGF、PDGF、SDF、SCF、BDNF、NGF、BFGF、EGF、LIF、TPO、G-CSF、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-7、IL-8、IL-11、IL-12、IL-14、IL-15。

6. 一种治疗神经系统疾病、运动系统疾病、心血管系统疾病的药物,其特征在于,所述药物包括:采用权利要求1的技术方案所得的间充质干细胞。

7. 根据权利要求6所述药物,其特征在于,所述药物还包括趋化因子。

8. 一种治疗神经系统疾病、运动系统疾病、心血管系统疾病的药物载体,所述药物载体包括:采用权利要求1的方案所得的间充质干细胞。

9. 根据权利要求7所述药物载体,其特征在于,还包括趋化因子。

## 具有最佳迁移能力的间充质干细胞的制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物制品领域,具体涉及一种具有最高迁移效率的充质干细胞的制备方法及其所得充质干细胞的应用。

### 背景技术

[0002] 当今世纪是生命科学飞速发展的世纪,干细胞的研究在神经系统疾病(帕金森病、阿尔海默兹病、脊髓损伤、中枢神经系统损伤、脑卒中、恶性胶质瘤等)中有着重要的理论意义和临床应用价值。长期以来神经系统疾病缺乏有效的治疗方法,严重影响着人类的健康和幸福。使用干细胞治疗一些急慢性神经系统疾病为人们带来了新的希望。以中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤为例, CNS 一旦损伤,神经功能的恢复非常困难,主要原因是脑内神经元的再生能力极差。目前研究证明脑内虽然有神经干细胞(neural stem cells, NSC)存在,且能分化成神经元和神经胶质细胞,但是由于神经干细胞存在的部位很局限,数量也非常少,故将其用于神经元损伤修复还是非常困难的。随着干细胞领域的研究不断深入,发现其他部位的干细胞也可以分化成神经细胞。将胚胎神经细胞或脐血干细胞移植到受损伤的鼠脑内,可以适度改善其神经功能,但是由于伦理道德,免疫排斥等因素限制了这些干细胞在临床上的广泛应用。

[0003] 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类非造血干细胞,具有自我复制能力和多向分化潜能。在不同的条件下能诱导分化为多种细胞系,包括软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞及神经细胞等。同时间充质干细胞取材方便、培养方法容易掌握、培养纯度高、具有多向分化潜能的特点使之成为生物学和临床应用的研究热点,目前总政后勤卫生部已经授权骨髓间充质干细胞的体内移植,这对优秀间充质干细胞的需要更为迫切。

[0004] 目前关于间充质干细胞的基础研究主要包括体内和体外两个方面。体外培养研究主要集中在未分化状态的间充质干细胞的鉴定和诱导分化等方面,体内的研究主要是通过不同的注射方式或模式动物来研究未分化状态的间充质干细胞的趋化性迁移,并且两方面的结果均在不同程度上证明了间充质干细胞的在体内外的多潜能分化特性和良好的生物安全性,为间充质干细胞在临床上的应用提供了良好的理论基础。并且随着现代技术的进步,在人体内的体内试验也在不同的病例身上得到实现,并得到良好的治疗效果,更加表明了间充质干细胞在临床上应用的潜在价值。关于间充质干细胞体内移植,前人已有众多研究,即注射时间、输入细胞的数目以及注射位点,都可能影响 MSCs 的移植效率以及趋向靶位点的迁移效率。

[0005] 然而,在临床上的细胞移植往往是将未知状态的间充质干细胞注射入体内,在治疗周期完成后,真正迁移到病灶部位的细胞十分有限,其中真正分化为神经细胞并行使功能的间充质干细胞更为稀少。这使得间充质干细胞在临床应用上遇到了一个瓶颈。

### 发明内容

[0006] 本发明目的是提供一种具有最高迁移效率的间充质干细胞的制备方法,以提高间

充质干细胞的迁移效率,增加迁移到病灶部位的间充质干细胞数量。

[0007] 为达到上述目的,本发明采用的技术方案是:一种具有最高迁移效率的间充质干细胞的制备方法,包括以下步骤:

[1] 分离、培养、鉴定间充质干细胞,诱导分化,在分化的不同时段收集细胞,得到处于不同分化状态的间充质干细胞;

[2] 确定迁移区域趋化因子情况,所述趋化因子情况包括趋化因子的种类和浓度,分析计算步骤[1]所得不同分化状态间充质干细胞对该趋化因子情况作用下的迁移效率,找到迁移效率最高的间充质干细胞的分化状态,由此即可制备得到该迁移区域所需的具有最高迁移效率的间充质干细胞。

[0008] 上述技术方案中,步骤[1]所述间充质干细胞的体外培养,分化以及鉴定的方法为本领域技术人员公知的现有技术。

[0009] 上述技术方案中,步骤[2]中,所述迁移区域为目的病灶区域,迁移区域趋化因子情况一般指病灶区域的趋化因子的种类和浓度;优选的技术方案中,可以向病灶区域补充趋化因子,更好地诱导移植的神经干细胞趋向性迁移到病灶部位,提高治疗效果,所述补充趋化因子的方法为本领域技术人员惯用手段。其中,测定目标病灶区的趋化因子的种类和浓度为本领域技术人员公知的现有技术,例如:临床上测定病人体内诱导干细胞迁移的细胞因子的含量的方法为:采集病人血液样品,经夹心酶联免疫吸附试验(Sandwich ELISA)法测定即可(参见:Atsushi Morita 等.Evaluation of human thymus and activation-regulated chemokine concentrations in blood using a new sandwich ELISA based on monoclonal antibodies. *Clinica Chimica Acta* 322 (2002) 67-75; SVMaru 等. *神经免疫学杂志 (Journal of Neuroimmunology)* 199 (2008) 35-45)。

[0010] 上述技术方案中,步骤[2]所述迁移效率,是指细胞迁移起始点到终点的最短距离与细胞迁移总距离的比值,数值越大表明迁移的持续性越高,定向迁移至病灶部位的能力越强;测定间充质干细胞的迁移效率的方法可选自但不限于:运用 Dunn chamber 测定干细胞的迁移效率(参见:Zhang 等. *细胞生物学杂志 (The Journal of Cell Biology)* 163 (2003) 1375-1384)。

[0011] 上述技术方案中,步骤[2]具体包括以下步骤:确定迁移区域趋化因子情况,所述趋化因子情况包括趋化因子的种类和浓度,在分化培养基中加入与迁移区域相同种类、相同浓度的趋化因子,诱导细胞迁移;对细胞的定向迁移效率进行分析,找到对迁移区域具有最高迁移效率的间充质干细胞的分化状态,所述分化状态的间充质干细胞即为该迁移区域所需的具有最高迁移效率的间充质干细胞。

[0012] 上述技术方案中,所述的间充质干细胞来源于来源包括人、动物(包括猿、猴、猪、大鼠、小鼠、兔、犬等)的骨髓、脐带血或其它部位、经过基因工程修饰或其他经过人工改造的间充质干细胞;在完全培养液中培养 3-6 d 开始诱导分化。

[0013] 优选的技术方案中,制备处于不同的分化状态的间充质干细胞的方法为:选取生长状况良好的间充质干细胞,按  $5 \times 10^4$  /ml 接种于含包被 PLL 盖玻片的 35 mm 培养皿中;用间充质干细胞生长培养基(L-DMEM+10% CS)培养(设为 A 点);接种 24 h 后观察细胞生长状况,待细胞 60% 铺满盖玻片时,弃生长培养基,加入含 10 ng/ml bFGF 的预诱导培养基;预

诱导 24 h 后 ( 设为 B 点 ), 换为无血清的诱导培养基 ( 含 2% DMSO 和 200  $\mu\text{mol/L}$  BHA ); 诱导 5 h 时 ( 设为 C 点 ), 换成维持培养基 ; 维持 18 h 时设为 D 点, 继续维持至 48 h ( 设为 E 点 ); 收集 A、B、C、D、E 各点的细胞即得到为不同分化状态的间充质干细胞。

[0014] 上述技术方案中, 所述间充质干细胞迁移效率的分析方法为 : 运用邓恩室 (Dunn chamber), 结合活细胞工作站 (Leica AF6000, Germany) 对单个细胞的迁移行为进行追踪, 使用 Image J 软件分析间充质干细胞迁移的具体轨迹, 计算干细胞的迁移效率, 即从细胞迁移起始点到终点的最短距离与细胞迁移总距离的比值。

[0015] 上述技术方案中, 所述趋化因子为诱导间充质干细胞趋向性迁移的因子, 包括所有能够引起不同分化状态的间充质干细胞定向迁移的炎症趋化因子和细胞生长因子, 如 VEGF、HGF、PDGF、SDF、SCF、BDNF、NGF、BFGF、EGF、LIF、TPO、G-CSF、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-7、IL-8、IL-11、IL-12、IL-14、IL-15 等。

[0016] 所述具有最高迁移效率的间充质干细胞可以结合组织工程材料再应用于临床移植。通过体外培养、诱导得到不同分化状态的间充质干细胞, 结合或不结合趋化因子, 应用于组织工程材料上再移植 ; 或将间充质干细胞与组织工程材料共培养, 结合或不结合趋化因子, 以取得最佳迁移状态的间充质干细胞, 再用于移植。采用上述技术方案所得的具有最佳迁移效率的间充质干细胞的临床适用范围包括各种神经系统疾病 ( 帕金森病、阿尔海默兹病、中枢神经系统损伤、外周神经系统损伤、脑卒中、恶性胶质瘤、脑出血后遗症、老年性痴呆)、运动系统疾病 ( 运动神经元病、共济失调)、心血管系统 ( 缺血性心脏病)、视神经发育不全、视神经萎缩、股骨头坏死、糖尿病、足下肢血管病等。可以通过注射或其它途径应用于临床移植治疗, 注射方式包括 : 肌肉注射、血液 ( 静脉、动脉) 注射、局部定点注射、脑脊液注射、立体定位注射法 ( 病灶近端、远端)、腰穿细胞悬液注射法、静脉内细胞悬液输入法等。

[0017] 采用上述方法制备得到的间充质干细胞治疗上述疾病的原理为 : 由于神经系统疾病一旦患上, 神经功能的恢复非常困难, 主要原因是神经元的再生能力极差。目前研究证明脑内虽然有神经干细胞存在, 且能分化成神经元和神经胶质细胞, 但是由于神经干细胞存在的部位很局限, 数量也非常少, 故将其用于神经元损伤修复还是非常困难。随着干细胞领域的研究不断深入, 发现其他部位的干细胞也可以分化成神经细胞。而间充质干细胞就是一粒优秀的后备种子, 将具有最佳迁移效率的间充质干细胞移植到体内, 迅速发挥干细胞的潜能, 必将达到理想的治疗效果。

[0018] 神经胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤, 具有扩散和浸润的特性, 即使经过外科手术切除, 并辅以放疗或化疗, 也难以彻底治愈。因此, 需要新的治疗方法来追踪逃离常规治疗的散在瘤细胞。间充质干细胞是具有多向分化潜能的成体干细胞, 而且能够趋向胶质瘤及多种趋化因子迁移, 从而成为治疗胶质瘤的理想载体细胞。

[0019] 因此, 本发明同时要求保护一种治疗神经系统疾病、运动系统疾病、心血管系统疾病的药物, 所述药物包括 : 采用上述技术方案所得的间充质干细胞 ; 优选的技术方案中, 还包括趋化因子。

[0020] 本发明同时要求保护一种治疗神经系统疾病、运动系统疾病、心血管系统疾病的药物载体, 所述药物载体包括 : 采用上述技术方案所得的间充质干细胞 ; 优选的技术方案中, 还包括趋化因子。

[0021] 所述趋化因子为诱导神经干细胞趋向性迁移的因子, 选自 : 所有能够引起不同分

化状态的间充质干细胞定向迁移的炎症趋化因子或细胞生长因子中的一种或两种以上的混合物。

[0022] 上述技术方案中,所述趋化因子包括:VEGF、HGF、PDGF、SDF、SCF、BDNF、NGF、BFGF、EGF、LIF、TPO、G-CSF、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-7、IL-8、IL-11、IL-12、IL-14、IL-15。

[0023] 本发明的思路是:发明人创造性的研究发现,不同分化状态的间充质干细胞的趋向性迁移能力不同。未分化的间充质干细胞往往具有较强的向损伤部位迁移的能力,但是这种细胞的定向分化能力差,可以不定向分化,消减了临床治疗的效果。成熟的神经样细胞迁移能力很弱,但它们却可以为组织损伤提供替代的功能细胞。很显然,只有在这两者中找到最适合的平衡点才能更好的使用细胞移植治疗神经系统疾病。另外,不同分化状态的间充质干细胞对各种趋化因子的应答强弱不同,表现为趋向性迁移能力,尤其是迁移效率的差异。所谓迁移效率,是指细胞迁移起始点到终点的最短距离与细胞迁移总距离的比值,数值越大表明迁移的持续性越高,定向迁移至病灶部位的能力越强。因此,如果利用具有最高迁移效率的间充质干细胞进行临床移植,那么定向迁移到病灶部位的间充质干细胞数无疑会大大增加,从而提高治疗效果。鉴于临床上脊髓损伤、中枢神经系统损伤、脑卒中、恶性胶质瘤等疾病的复杂性、多样性及病灶部位所分泌细胞因子的种类和含量的多样性,用于移植的间充质干细胞的分化状态也应是不同的,但所要达到的临床效果都是相同的,那就是所移植的间充质干细胞群体具有最佳的迁移效率,能够高效地迁移到病灶部位,提高治疗效果。

[0024] 因此,本发明根据目标病灶部位的趋化因子的具体情况,包括趋化因子的浓度和种类,测定该情况下不同分化程度的间充质干细胞的迁移效率,选出迁移效率最佳的分化状态的间充质干细胞。

[0025] 由于上述技术方案运用,本发明与现有技术相比具有下列优点:

利用本发明建立的方法制备得到的间充质干细胞,处于特定的分化状态且具有最佳的趋化性迁移效率(针对目的病灶区的趋化因子的情况、种类、浓度),解决了困扰间充质干细胞临床应用的主要问题,可以针对不同情况的病灶区提供最佳迁移效率的间充质干细胞,增加迁移到病灶区的间充质干细胞,改善治疗情况,为干细胞移植治疗提供了最根本的保障。

## 附图说明

[0026] 附图 1 为实施例一中免疫荧光检测 BMSCs 的表面抗原的图;其中, A:CD29; B:CD71; C:CD90; D:CD106;比例尺(Scale bar)=50  $\mu\text{m}$ ;

附图 2 为实施例一中 BMSCs 分化的示意图;

附图 3 为实施例一中倒置相差显微镜观察 BMSCs 在向神经样细胞分化过程中的形态变化;其中, A: 接种 24 h; B: 预诱导 24 h; C: 诱导 5 h; D: 维持 18 h; E: 维持 48 h;比例尺(Scale bar)=50  $\mu\text{m}$ ;

图 4 为实施例一中免疫荧光染色检测 BMSCs 在诱导分化过程中 CD29 的表达情况;A: 接种 24 h; B: 预诱导 24 h; C: 诱导 5 h; D: 维持 18 h; E: 维持 48 h;比例尺(Scale bar)=50  $\mu\text{m}$ ;

附图 5 为实施例一中免疫荧光染色检测 BMSCs 在诱导分化过程中 Nestin 的表达情况;

A: 接种 24 h; B: 预诱导 24 h; C: 诱导 5 h; D: 维持 18 h; E: 维持 48 h; 比例尺 (Scale bar) = 50  $\mu\text{m}$ ;

附图 6 为实施例一中免疫荧光染色检测 BMSCs 在诱导分化过程中  $\beta$ -III-Tubulin 的表达情况; A: 接种 24 h; B: 预诱导 24 h; C: 诱导 5 h; D: 维持 18 h; E: 维持 48 h; 比例尺 (Scale bar) = 50  $\mu\text{m}$ ;

附图 7 为实施例一中免疫荧光染色检测 BMSCs 在诱导分化过程中 NSE 的表达情况; A: 接种 24 h; B: 预诱导 24 h; C: 诱导 5 h; D: 维持 18 h; E: 维持 48 h; 比例尺 (Scale bar) = 50  $\mu\text{m}$ ;

附图 8 为实施例一中 Dunn chamber 示意图; 其中, (A) Dunn chamber 示意图, outer well 是外槽, inner well 是内槽, bridge 是桥, filling slit 是加外槽液体的缝隙, coverslip 是盖玻片; (B) Dunn chamber 桥上细胞的相差照片, 白色箭头所指方向为外槽方向; 比例尺 (Scale bar) = 50  $\mu\text{m}$ ;

附图 9 为实施例一中细胞的迁移效率示意图;

附图 10 为实施例二中分化细胞的迁移效率; (A) 接种 24 h; (B) 预诱导 24 h; (C) 诱导 5 h; (D) 维持 18 h; (E) 维持 48 h; (\*  $P < 0.05$ );

附图 11 为实施例三中不同浓度 PDGF 对间充质干细胞迁移效率的影响; 其中, 控制组 (Control): 内外槽均加无血清的 L-DMEM; PDGF: 内槽加 L-DMEM, 而外槽加含不同浓度 PDGF 的培养基; \* $p < 0.05$  是和其它组相比;

附图 12 为实施例三中 PDGF 对成神经分化不同阶段间充质干细胞迁移效率的影响; 其中, 控制组 (Control): 内外槽均加无血清的 L-DMEM; PDGF: 内槽加 L-DMEM, 而外槽加含 50 ng/mL PDGF 的培养基; \* $p < 0.05$  是和控制组 (Control) 相比 (A: 未诱导 BMSCs; B: 预诱导 24 小时; C: 诱导 5 小时; D: 维持 18 小时; E: 维持 48 小时);

附图 13 为实施例四中 HGF 诱导 BMSCs 定向迁移; 其中, (A) 迁移速率; (C) 迁移效率; (\* $p < 0.05$ );

附图 14 为实施例四中成神经分化 BMSCs 趋向 HGF 的迁移效率, 其中, A: 未分化; B: 预诱导 24 h; C: 诱导 5 h; D: 维持 18 h; E: 维持 48 h; (\* $p < 0.05$ );

附图 15 为实施例五中 SCF 对成神经分化不同阶段 BMSCs 迁移效率的影响, 其中, 控制组 (Control): 内外槽均加无血清的 L-DMEM; SCF: 内槽加 L-DMEM, 而外槽加含 50 ng/mL SCF 的 L-DMEM。\* $p < 0.05$ ; A: 未诱导的 BMSCs; B: 预诱导 24 h; C: 诱导 5 h; D: 维持 18 h; E: 维持 48 h。

## 具体实施方式

[0027] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述:

实施例一:

### 1. 间充质干细胞的分离、培养与鉴定

#### 1.1 间充质干细胞的分离、培养:

取体重为 150 g 左右的 SD 大鼠, 用颈椎脱臼法处死。用 75% 的酒精浸泡消毒 5 min 后, 分离后肢皮下组织, 取出股骨、胫骨, 用 75% 酒精消毒后, 移入超净台。剪断股骨、胫骨骨干两端, 用 2 ml 注射器吸取 L-DMEM 反复冲洗骨髓腔, 缓慢吹打制成均匀的细胞悬液。将细胞

悬液加于 Percoll™ 分离液液面上, 20℃, 3000 r/min, 离心 30 min。去上清, 吸取白膜层, PBS 洗 2 遍, 20℃, 1800 r/min, 离心 10 min。用含 10%FCS 的 L-DMEM 悬浮细胞, 计数, 将细胞密度调至  $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ , 接种于 75 ml 培养瓶中。置于 CO<sub>2</sub> 37℃、饱和湿度、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。每隔 3 d 换液一次。

#### [0028] 1.2 间充质干细胞的鉴定

##### 1.2.1 多聚赖氨酸 (PLL) 包被盖玻片

22×22 mm 盖玻片酸缸浸泡过夜, 自来水冲洗 10 次, 三蒸水冲洗 3 次, 浸泡于 75% 酒精中备用。

[0029] 包被时取出 75% 酒精中的盖玻片, 在酒精灯上烘干, 放入 35 mm<sup>2</sup> 培养皿中, 吸取 0.5 ml 浓度为 50 μg/ml 的 PLL 滴加在盖玻片上, 37℃ 放置 1 h, 回收多余的 PLL。盖玻片于超净工作台内晾干。使用前用无菌水洗 2-3 次。

##### [0030] 1.2.2 免疫荧光染色

将预先经过灭菌处理并包被 PLL 的盖玻片置于 35 mm<sup>2</sup> 培养皿中, 将第 8 代 BMSCs 用 0.25% 胰酶消化, 按  $1 \times 10^5/\text{ml}$  密度接种, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。待细胞长到 70% 汇合时去除培养基, 用 PBS 清洗, 加入 4% 的 PFA 固定, 4℃ 过夜。PBS 洗 3 次后, 分别滴加用 PBS+NaN<sub>3</sub> (0.02%) + BSA (3%) + TritonX-100 (0.2%) 稀释的单克隆抗体孵育, 室温 90 min。PBS 洗 3 次。细胞核用 Hoechst 33258 染色, 室温放置 5 min 并冲洗。用 50% 甘油缓冲液封片, 荧光显微镜观察拍照, 结果参见图 1。本实验所用抗体稀释比例主要为: FITC 标记的羊抗鼠 CD34 抗体 (1:200); FITC 标记的羊抗鼠 CD45 抗体 (1:200); FITC 标记的羊抗鼠 CD29 抗体 (1:200); FITC 标记的羊抗鼠 CD71 抗体 (1:200); FITC 标记的羊抗鼠 CD90 抗体 (1:200); PE 标记的羊抗鼠 CD106 抗体 (1:200)。结果是: CD29、CD90 和 CD106 均为阳性 (图 1), 不表达 CD34。

#### [0031] 2. 不同分化状态间充质干细胞的准备

##### 2.1 诱导方法

参见图 2, 将骨髓间充质干细胞诱导过程设为 A、B、C、D、E 五个点。选取生长状况良好的第 8 代 BMSCs, 按  $5 \times 10^4/\text{ml}$  接种于含包被 PLL 盖玻片的 35 mm 培养皿中。用 BMSCs 生长培养基 (L-DMEM+10% CS) 培养 (设为 A 点)。接种 24 h 后观察细胞生长状况, 待细胞 60% 铺满盖玻片时, 弃生长培养基, 加入含 10 ng/ml bFGF 的预诱导培养基。预诱导 24 h 后 (设为 B 点), 换为无血清的诱导培养基 (含 2% DMSO 和 200 μmol/L BHA)。诱导 5 h 时 (设为 C 点), 换成维持培养基。维持 18 h 时设为 D 点, 继续维持至 48 h (设为 E 点)。我们在视察显微镜下观察各个分化点间充质干细胞的形态变化, 结果如图 3 所示, 通过免疫荧光技术检测 CD29, Nestin, β-III-Tubulin, NSE 和 GFAP 的表达情况如图 3。免疫荧光检测不同分化状态的间充质干细胞, 得图 4、5、6、7, 其中, 预诱导 24 h 的细胞, Nestin 和 β-III-Tubulin 的表达较对照明显增强, 此时 NSE 的表达没有明显变化, 可能是 bFGF 发挥了作用, 使 BMSCs 朝着神经样细胞分化。诱导 5 h 的细胞表达 Nestin 和 β-III-Tubulin 达到最强, 而 NSE 的表达仍没有显著变化。说明 BMSCs 在分化为神经样细胞之前, 经历了短暂的前体细胞阶段。NSE 是神经元和神经内分泌细胞所特有的一种酸性蛋白酶, 被认为是成熟神经元的标记。当换成维持培养基, 维持 48 h, 此时 NSE 的表达才显著增强, 而 Nestin 和 β-III-Tubulin 表达明显减弱, GFAP 的表达一直是阴性, 提示用此方法诱导的细胞是类



似于神经元的细胞(图 4-7)。收集 A、B、C、D、E 各点的细胞即得到为不同分化状态的间充质干细胞。

### [0032] 3 不同分化状态间充质干细胞迁移效率的分析

运用 Dunn chamber、Boyden chamber 分析不同分化状态的间充质干细胞的趋化性迁移能力。其中 Boyden chamber 反映细胞群体的迁移水平, Dunn chamber 反映个体细胞的趋向性迁移速率与效率。

#### [0033] 3.1 Dunn chamber (图 8):

在 Dunn chamber 的外槽中加入趋化因子,在内槽中加入 L-DMEM 或者相应点的分化培养基。将长有神经干细胞的盖片细胞面朝下盖在桥的正上方,并使盖玻片的一端盖住桥而不盖住外槽,用工业凡士林封住盖片的三面。用吸水纸吸出外槽的液体后加入趋化因子,工业凡士林封口。用 Leica AF6000 活细胞工作站(Germany)对桥上细胞的迁移行为进行跟踪观察,每 5 min 拍摄一次,4 h 为一个拍摄周期。

[0034] 使用 Image J 软件分析间充质干细胞迁移的具体轨迹,计算从细胞迁移起始点到终点的最短距离与细胞迁移总距离的比值,即为细胞的迁移效率(FMI)(如图 9),它反映细胞迁移持续性的高低,数值越大表明迁移的持续性越高。

[0035] 图 9 中, Y 轴正方向代表 Dunn chamber 外槽方向,通过标准化使每个细胞的起始点都位于 X、Y 轴的交叉点(0, 0),虚线表示细胞的迁移路径,  $A_4$  点代表细胞迁移的最终位置, FMI 值即细胞迁移终点在 Y 轴上的截距与细胞迁移总距离的比值。

#### [0036] 4 不同迁移能力神经干细胞的制备

根据 Dunn chamber、Boyden chamber 的分析结果,确定针对某一种细胞因子在某一浓度时具有最高迁移效率的间充质干细胞的分化状态。按前述方法制备该分化状态的间充质干细胞,即可得到针对该因子在该浓度时具有最高迁移效率的间充质干细胞群体。由此,可为临床移植提供特定状态具有最高迁移效率的间充质干细胞种子。

[0037] 实施例二成神经分化的间充质干细胞向 C6 细胞条件培养基和 SDF-1  $\alpha$  的趋化性迁移

神经胶质瘤细胞可以释放多种炎症趋化因子和生长因子,如 SDF-1  $\alpha$ , SCF-1 (干细胞生长因子 stem cell factor-1), MCP-1 (单核细胞趋化蛋白 monocyte chemoattractant protein-1)。这些因子可以诱导间充质干细胞定向迁移至肿瘤细胞所在区域。本实施例分析了不同分化状态的间充质干细胞对 C6 胶质瘤细胞系制备的条件培养基及趋化因子 SDF-1  $\alpha$  趋化性迁移效率。

#### [0038] 1. 研究方法

1.1 不同分化状态间充质干细胞的制备见实施例一的技术方案。

#### [0039] 1.2 C6 细胞条件培养基的收集

C6 细胞在 75  $\text{cm}^2$  培养瓶长到 80% 汇合度,弃培养基, PBS 洗细胞,加入 10 ml L-DMEM, 24 h 后收集这些培养液,离心除去细胞碎片,即为 C6 条件培养基,置  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

#### [0040] 1.3 Dunn chamber 研究分化细胞的趋化性迁移

方法如下:分析不同分化状态的单个间充质干细胞对 C6 条件培养基的趋化性迁移行为。BMSCs 成神经诱导,取诱导前及预诱导 24 h、诱导后 5 h、维持 18 h 和 48 h 的细胞, chamber 内外槽加满 L-DMEM,将长有细胞的盖玻片盖在槽的正上方,细胞面朝下,并使盖玻

片一方紧盖住桥,而不盖住外槽;工业凡士林封住盖玻片三方,吸水纸吸出外槽液体,加入 C6 细胞条件培养基或 20 ng/ml SDF-1 $\alpha$  (L-DMEM 稀释),工业凡士林封口;对照组则不需吸出外槽的 L-DMEM,直接用凡士林封住四面。Dunn chamber 的使用方法和实验结果的统计同实施例一。

#### [0041] 2. 研究结果

如图 10 所示,我们可以看出,与对照组相比,C6 细胞条件培养基能提高预诱导 24 h 和维持 48 h 的分化细胞的迁移效率,且存在显著性差( $P<0.05$ ),这表明预诱导 24 h 和维持 48 h 的分化细胞对 C6 胶质瘤细胞条件培养基的趋向性迁移效率最佳;SDF-1 $\alpha$  提高了 BMSCs 维持 18 h 和维持 48 h 的分化细胞的迁移效率,与对照组相比,存在显著性差异( $P<0.05$ ),这表明维持 18 h 和

维持 48 h 的分化细胞对 SDF-1 $\alpha$  的趋向性迁移效率最佳。

#### [0042] 实施例三不同分化状态 BMSCs 趋向 PDGF 迁移

血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 在胶质瘤组织中高表达,且胶质瘤恶性级别越高其表达越强。PDGF 在胶质瘤血管生成中发挥重要的作用,其与位于细胞表面的受体二聚体结合,通过酪氨酸激酶激活的方式对细胞众多生理过程都有重要的调节作用,包括细胞的增殖、存活、迁移以及细胞外基质和组织修复因子的沉积。本实施例分析了不同分化状态的神经干细胞对 C6 胶质瘤细胞系制备的条件培养基及趋化因子 SDF-1 $\alpha$  趋化性迁移效率。

#### [0043] 1. 研究方法

1.1 不同分化状态间充质干细胞的制备见实施例一的技术方案。

#### [0044] 1.2 Dunn chamber:

为了研究分化不同时期的间充质干细胞对 PDGF 的趋化性,首先需要摸索最佳的趋化浓度,为此本实验采用的是 Dunn chamber 趋化性迁移实验,即用不同浓度梯度的 PDGF 作用于未诱导的间充质干细胞。Dunn chamber 类似于细胞计数板,只是在其中心位置有两个同心圆槽,两个槽间留有一个 1mm 宽的桥。加到外槽的趋化剂会沿着桥向内槽扩散,这样就形成了从外槽到内槽逐渐降低的趋化剂浓度梯度。这个装置可以使细胞的迁移具有方向性。在我们的实验中,Dunn chamber 外槽加满含不同浓度梯度 PDGF 的 L-DMEM,而内槽仅为 L-DMEM。这样外槽的 PDGF 就会向内槽扩散,30 min 内就形成了线性的稳定的浓度梯度,这种梯度大约可以维持 10~30 小时。具体方法为:Dunn chamber 内外槽均加满 L-DMEM,将长有间充质干细胞的盖玻片盖在槽的正上方,细胞面朝下,并使盖玻片一方紧盖住桥,而不盖住外槽;工业凡士林封住盖玻片三方,吸水纸吸出外槽液体,加入 5 ng/ml,50 ng/ml 和 100 ng/ml PDGF (L-DMEM 稀释),工业凡士林封口。对照组则不需吸出外槽的 L-DMEM,直接用凡士林封住四面。对处于内外槽间的桥上的细胞用德国 Leica AF6000 荧光显微镜 37 $^{\circ}$ C 活细胞跟踪拍摄 6 h,每次间隔 5 min。结果显示(图 11),PDGF 在 0~50 ng/ml 范围内,间充质干细胞的迁移效率均随着浓度的增加而增加,50 ng/ml 和对照组与 5 ng/ml 相比均有显著性差异,而当浓度达到 100 ng/ml 时则和 50 ng/ml 无显著性差异,因此 50 ng/ml 为最佳的 PDGF 趋化浓度,在下面的实验中将按这一浓度进行。

[0045] 分析不同分化状态的间充质干细胞对 PDGF 的趋化性迁移行为。在间充质干细胞分化的不同时间点(A、B、C、D、E 点),外槽加入 50 ng/ml 的 PDGF,以不添加 PDGF 的分化培

培养基为对照。Dunn chamber 的使用方法和实验结果的统计同发明实施例一。

## [0046] 2. 实验结果

由图 12 中可以看出外槽为含 50 ng/ml PDGF 的培养基时,同时 PDGF 提高了未诱导的 BMSCs、维持 18 h 和维持 48 h 的分化细胞的迁移效率。这说明维持 18 h 和维持 48 h 的分化细胞与未分化的细胞对 PDGF 的趋向性迁移效率相当。在临床应用方面,我们优先考虑使用分化的细胞,这样细胞可以更快地分化成特定细胞以发挥它的作用。

## [0047] 实施例四不同分化状态 BMSCs 趋向 HGF 迁移

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是骨髓微环境的主要因子之一,可以调节造血细胞的分化,并通过激活整合蛋白等细胞黏附分子调节造血细胞的黏附和迁移。HGF 不仅可以促进肿瘤细胞的侵袭,而且已经证明胶质瘤分泌的 HGF 能够趋化 NSCs 迁移。研究表明 BMSCs 表达 HGF 的受体 c-met。有研究发现在大鼠的局部缺血 / 再灌注眼模型中移植 BMSCs,大部分移植细胞沿着内界膜分布,只有少数细胞迁移到了视网膜,推测是细胞处于不同分化状态所致。另外,有研究报道肝癌细胞的迁移能力与其分化状态有一定关系。然而,目前关于 HGF 诱导 BMSCs 迁移的研究还相对较少,成神经分化不同状态 BMSCs 趋向 HGF 迁移的研究更未见报道。本实验旨在研究 HGF 对 BMSCs 以及成神经分化不同状态 BMSCs 定向迁移的影响。

[0048] 1.1 不同分化状态间充质干细胞的制备见实施例一的技术方案。

## [0049] 1.2 Dunn chamber :

为了研究 HGF 是否能诱导 BMSCs 定向迁移,在 Dunn chamber 外槽加入不同浓度(5 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) HGF,内槽只加 L-DMEM。对照组,内外槽均为 L-DMEM。分析方法见实施例三。结果显示,外槽加入不同浓度 HGF, BMSCs 的迁移速率没有变化,与对照相比无差异,都在 18-20  $\mu$ m/h 范围内。迁移效率却随着 HGF 浓度的增加而增高,50 ng/ml 与 100 ng/ml HGF 均显著提高了细胞的迁移效率,但两者之间无差异(图 13),表明 HGF 能够诱导 BMSCs 定向迁移。

[0050] 分析不同分化状态的间充质干细胞对 HGF 的趋化性迁移行为。在间充质干细胞分化的不同时间点(A、B、C、D、E 点),外槽加入 50 ng/ml 的 HGF,内槽为 L-DMEM;对照组,内外槽均加入 L-DMEM。Dunn chamber 的使用方法和实验结果的统计同发明实施例一。

## [0051] 2. 实验结果

实验组外槽加入 50 ng/ml HGF,内槽为 L-DMEM;对照组,内外槽均加入 L-DMEM。结果显示(图 14),外槽加入 50 ng/ml HGF 显著提高了未分化、预诱导 24 h、诱导 5 h 以及维持 48 h 细胞的迁移效率。这说明未分化、预诱导 24 h、诱导 5 h 以及维持 48 h 细胞的迁移效率相当,在临床治疗上,我们优先考虑移植分化成熟的细胞,可以尽快发挥其功能。

## [0052] 实施例五不同分化状态 BMSCs 趋向 SCF 迁移

1.1 不同分化状态间充质干细胞的制备见实施例一的技术方案。

## [0053] 1.2 Dunn chamber :

分析不同分化状态的间充质干细胞对 SCF 的趋化性迁移行为。在间充质干细胞分化的不同时间点(A、B、C、D、E 点),外槽加入 50 ng/ml 的 SCF,内槽为 L-DMEM;对照组,内外槽均加入 L-DMEM。Dunn chamber 的使用方法和实验结果的统计同发明实施例一。

## [0054] 2. 实验结果

如图 15 所示,在迁移效率方面未诱导、维持 18 h 和维持 48 h 的细胞 BMSCs, SCF 组明显高于对照组。这说明未诱导、维持 18 h 和维持 48 h 的细胞 BMSCs 的迁移效率相当。我们可以根据疾病所需,移植不同分化状态的细胞。

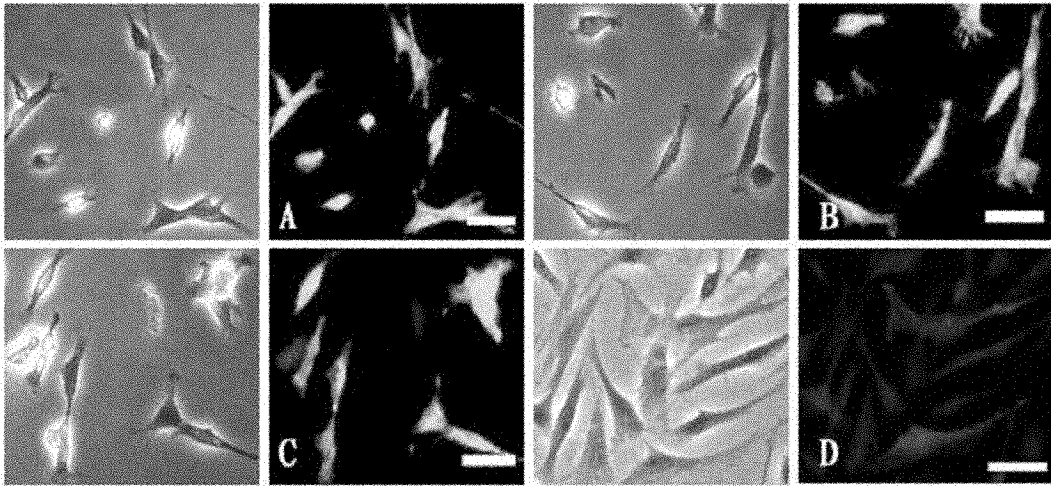


图 1

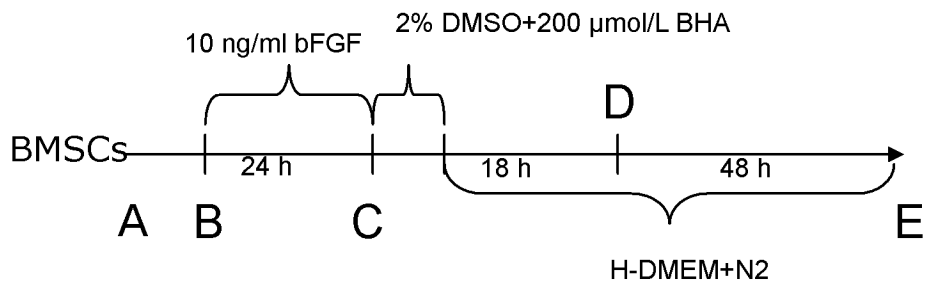


图 2

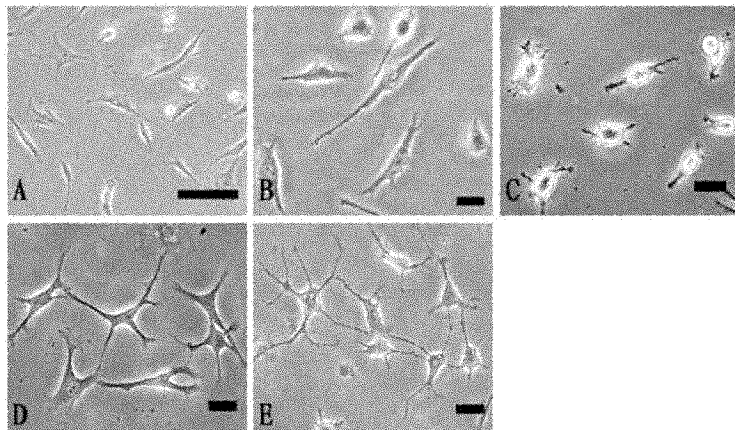


图 3

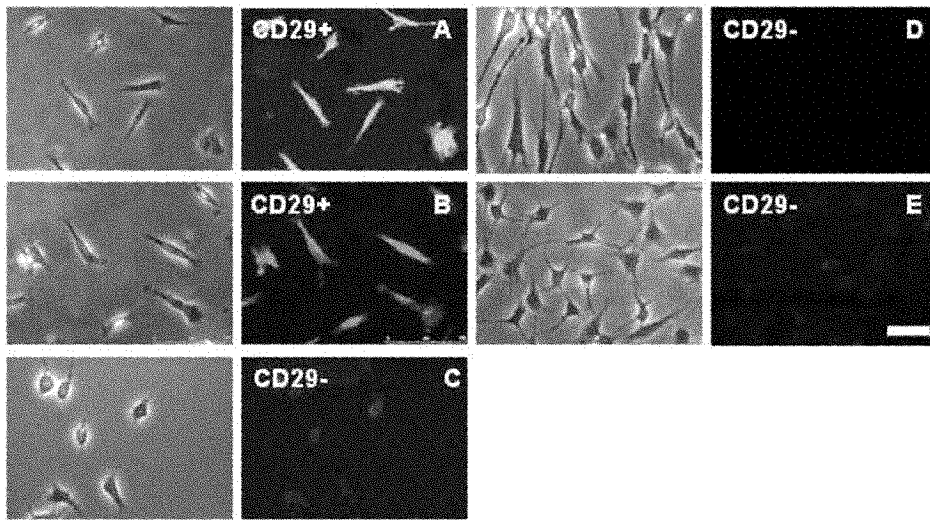


图 4

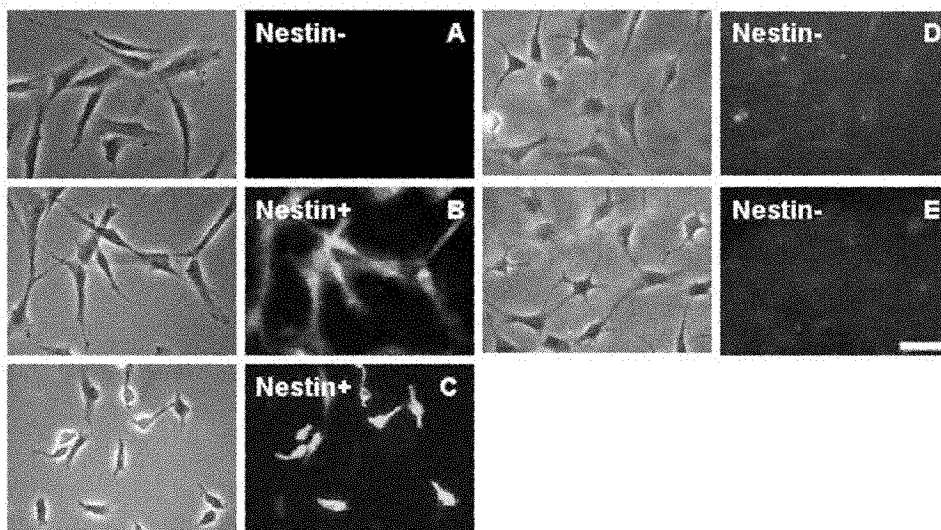


图 5

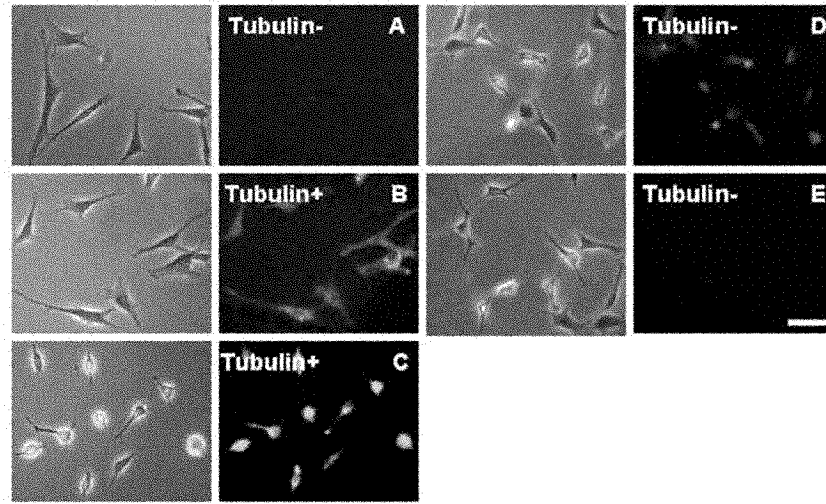


图 6

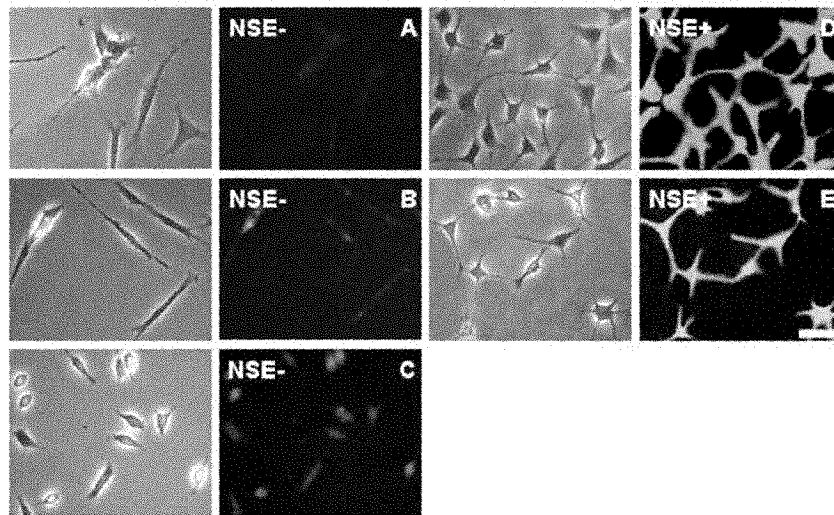
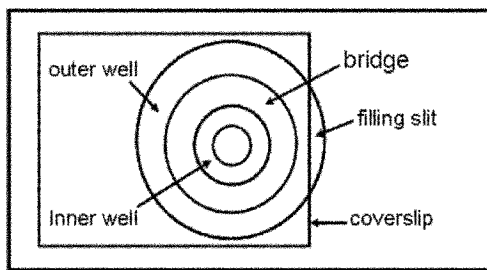
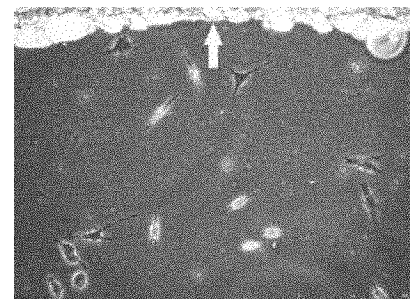


图 7

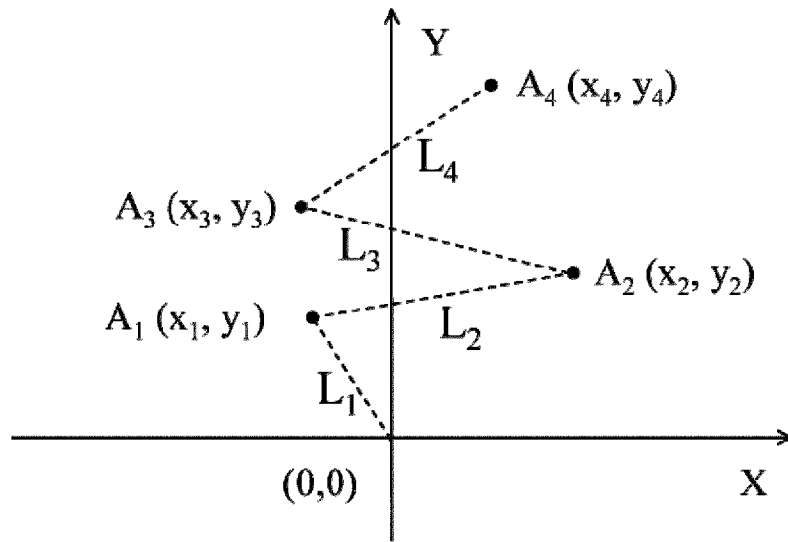


A



B

图 8



$$FMI = y_4 / (L_1 + L_2 + L_3 + L_4)$$

图 9

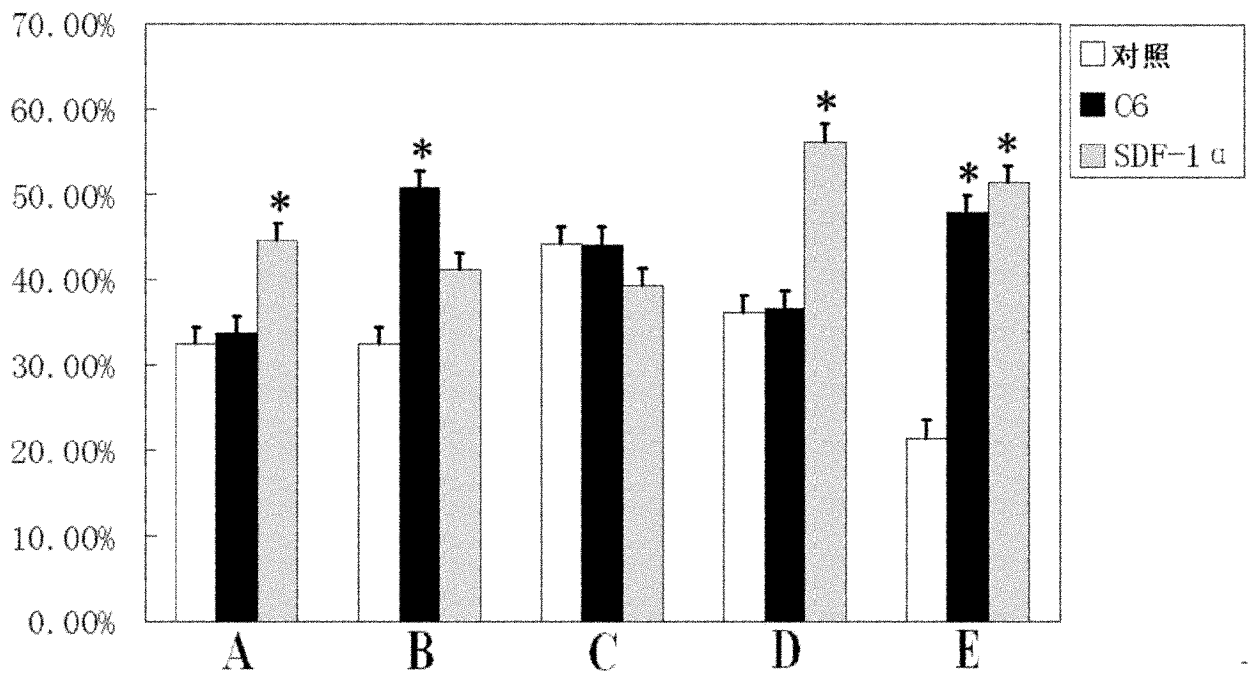


图 10



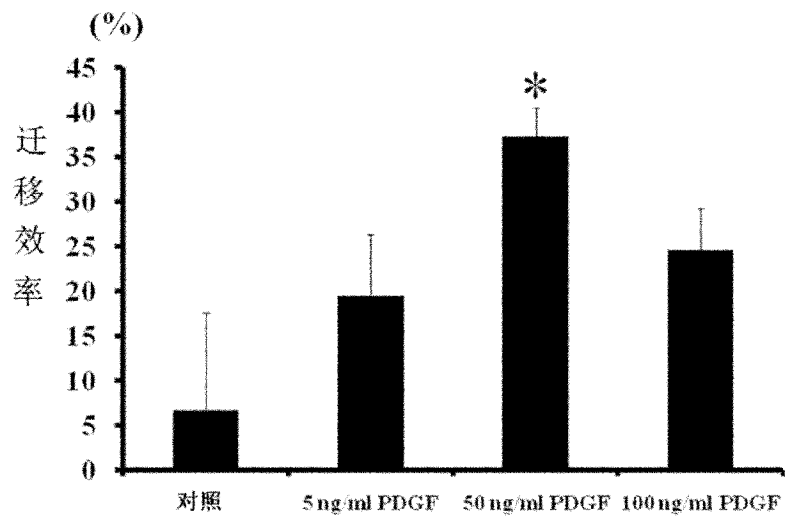


图 11

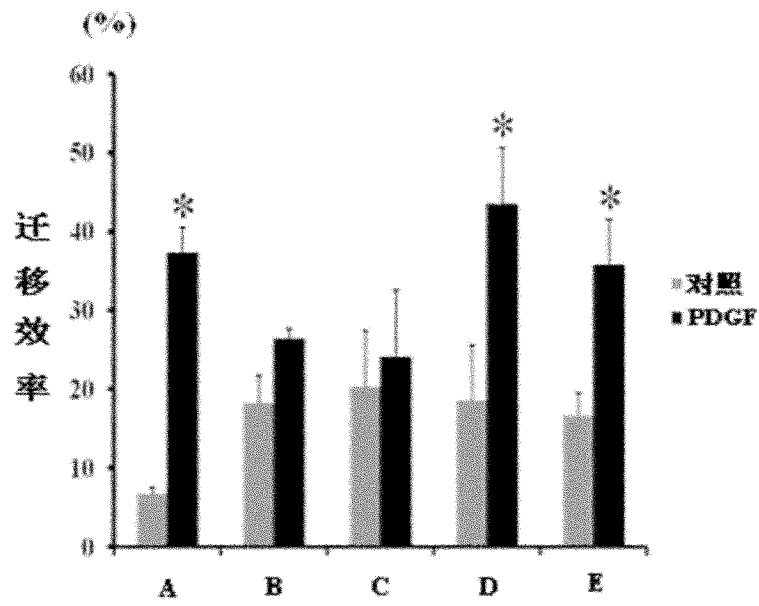


图 12

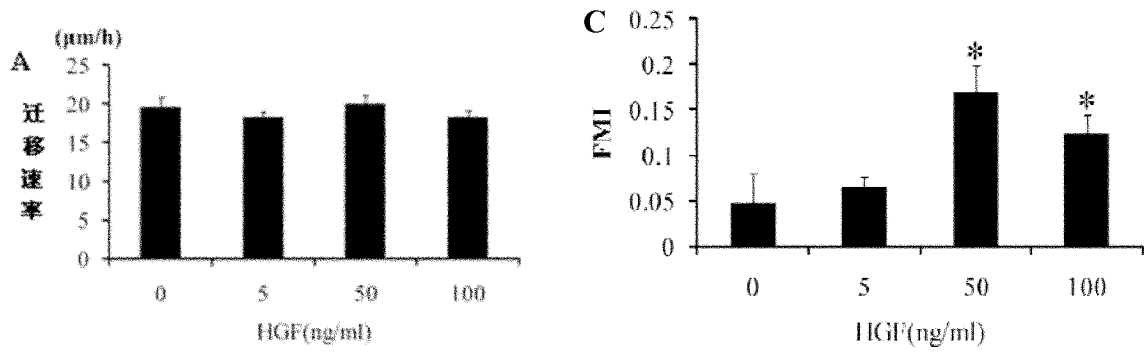


图 13

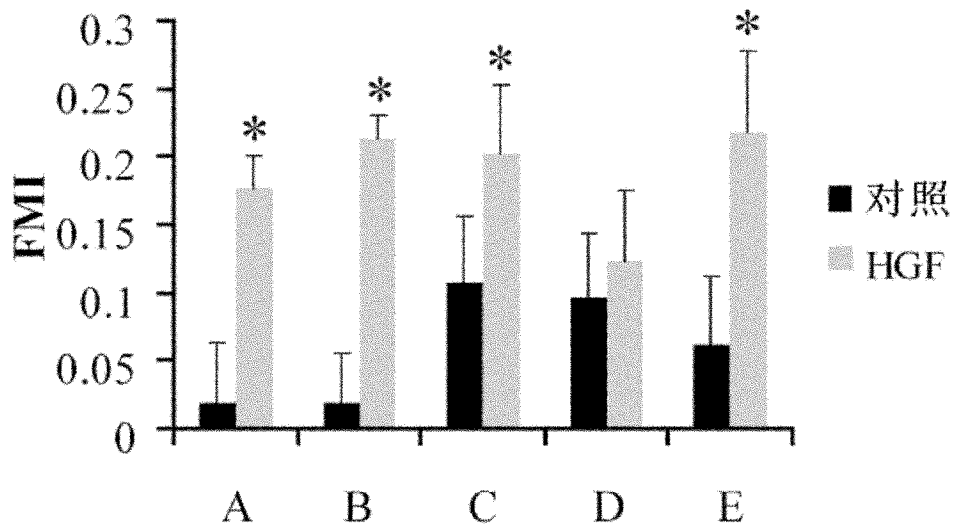


图 14

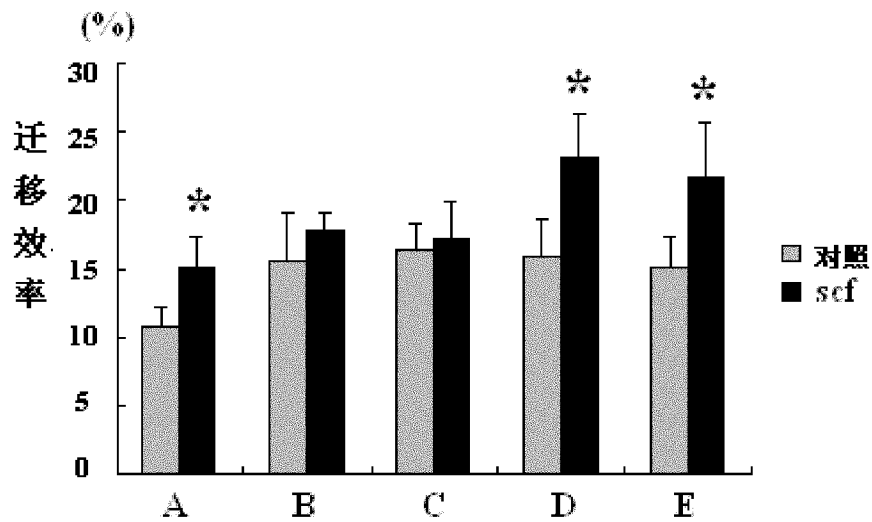


图 15