



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103191445 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 10

(21) 申请号 201310138167. X

(22) 申请日 2013. 04. 19

(71) 申请人 吉林大学

地址 130012 吉林省长春市前进大街 2699
号

(72) 发明人 刘晋宇 吴春铃 赵桂芳 刘菲琳

(74) 专利代理机构 上海序伦律师事务所 31276
代理人 包文超

(51) Int. Cl.

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C12N 15/867(2006. 01)

A61K 31/436(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

间充质干细胞的用途及其制取方法

(57) 摘要

一种间充质干细胞,作为基因治疗的靶细胞,用于转基因药物的表达、储存和释放的载体。本发明利用病毒载体将把外源性的启动子和目标基因导入间充质干细胞,并使目标基因整合到宿主细胞的基因组中,从而能够稳定内源性表达目标基因而不丢失,以用于基因治疗。本发明通过转胰岛素基因治疗的实验充分验证了间充质干细胞可作为表达、储存和释放目标药物的储库使用,具有高效、安全和可靠等特点。

1. 一种间充质干细胞,作为载体用于制备转基因药物。
2. 一种间充质干细胞,作为胰岛素储库用于制备糖尿病转基因药物。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的间充质干细胞,其特征在于所述的间充质干细胞选自于毛囊间充质干细胞、脐带间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、骨髓间充质干细胞、牙齿间充质干细胞、胚胎干细胞来源的间充质干细胞和诱导多能干细胞来源的间充质干细胞之一或几种。
4. 根据权利要求 2 所述的间充质干细胞,其特征在于所述的间充质干细胞含有编码胰岛素的基因。
5. 根据权利要求 2 所述的间充质干细胞,其特征在于所述的间充质干细胞含有自发聚合蛋白及其编码基因。
6. 根据权利要求 2 所述的间充质干细胞,其特征在于所述的转基因药物还包括雷帕霉素。
7. 一种制取权利要求 2 所述的间充质干细胞的方法,其步骤包括:
 - ①间充质干细胞的分离和培养;
 - ②将前胰岛素融合蛋白慢病毒载体导入包装细胞,所述包装细胞将所述的慢病毒载体包装成完整的慢病毒颗粒,并将其分泌到培养液上清中;
 - ③收集步骤②培养上清中的慢病毒颗粒,转染步骤①获得的间充质干细胞,即得用于转胰岛素基因药物的表达、储存和释放的储库的间充质干细胞。
8. 根据权利要求 7 所述的间充质干细胞的方法,其特征在于各种所述的培养液为含 10v/v% 胎牛血清、100 单位 / 毫升青链霉素和 10 纳克 / 毫升的碱性成纤维细胞生长因子的 DMEM/F12 培养基。
9. 根据权利要求 7 所述的间充质干细胞的方法,其特征在于所述步骤②中,所述的前胰岛素融合蛋白慢病毒载体采用人免疫缺陷病毒 HIV-1 系统进行构建,所述的包装细胞选用 293T 细胞。
10. 根据权利要求 7 所述的间充质干细胞的方法,其特征在于所述步骤③中,被转染的是原代至第 10 代的间充质干细胞。

间充质干细胞的用途及其制取方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种转基因表达、储存和释放载体,尤其涉及一种用于转基因药物的表达、储存和释放的间充质干细胞及其制取方法,以其作为载体用于制备转基因药物。

背景技术

[0002] 目前,糖尿病的治疗方式和药物多种多样。在此诸多方法中,胰岛细胞移植是治疗糖尿病的首选方案,但胰岛移植不仅操作过程复杂,而且胰岛来源有限,远远满足不了为数众多的糖尿病患者的需求。

[0003] 近年来,干细胞疗法逐渐成为研究的热点,试图通过干细胞移植来修复病变的胰岛组织,使其重现分泌胰岛素的功能,或将干细胞直接诱导分化或基因转染为产生胰岛素的细胞(CN101300343A, CN102391982A, CN101240262A, CN102618491A, CN101432425A),然后移植到生物体,通过所产生的胰岛素来控制血糖水平,达到治疗糖尿病的目的。

[0004] 田军等人采用了胰岛素基因转染上皮细胞的技术,成功控制了糖尿病鼠的血糖水平(Molecular Therapy, 2008, 16, 1146 - 1153)。但是,之后进行的跟踪实验证明,使用该技术的受试动物成活率较低,难以实际应用。

[0005] 虽然目前将胚胎干细胞分化为产生胰岛素的细胞已获得了初步的成功,但利用胚胎干细胞移植治疗糖尿病面临着细胞来源有限、应用有悖伦理和移植后诱发肿瘤形成风险和免疫排斥等诸多实际问题。利用骨髓、脐带和脂肪等来源的成体干细胞移植,来修复病变的胰岛细胞,以期重现其产生胰岛素的能力,目前仍正在试验研究中,具体疗效还有待于进一步的判定。

[0006] 利用分子生物学方法将目的基因导入患者体内,使之表达目的基因产物,从而使疾病得到治疗,这种方法称为基因疗法(Gene therapy)。基因疗法是治疗某些代谢疾病和遗传疾病的一种重要手段。其中载体和受体细胞(靶细胞)是决定基因治疗效果的关键因素。用于基因治疗的载体有多种,其中病毒载体因其介导基因转染率高,靶向性好,已成为基因治疗中应用广泛基因运载工具。

[0007] 靶细胞的选择也是基因治疗的重要环节,如:血管内皮细胞、骨髓基质细胞、角阡细胞和胶质细胞。由于伦理等问题,目前应用与基因治疗的细胞仅限于人的体细胞,现在经常使用的体细胞包括:骨髓细胞、成纤维细胞、肝细胞、内皮细胞、淋巴细胞和生殖细胞等(<http://fzswx.fmmu.edu.cn/fzswx/knowledge/knowledge01.asp?zsdBianhao=110203>)。由于获取这些细胞可能受年龄和性别的限制,或可能对机体造成损害,或其免疫原性等原因,其应用受到限制。因此,寻找合适的、适用性强的、能够用于基因治疗的靶细胞仍需要不断探索和研究。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的在于提供一种间充质干细胞,作为基因治疗的靶细胞,用于转基因药物的表达、储存和释放的载体,以提高生物体的成活率。

[0009] 本发明的又一个目的在于提供一种间充质干细胞,作为糖尿病基因治疗的靶细胞,用于转胰岛素基因药物的表达、储存和释放的储库,既能控制血糖水平,亦显著提高生物体的成活率。

[0010] 本发明的再一个目的在于提供一种用于转胰岛素基因药物的表达、储存和释放的储库的间充质干细胞的制取方法。

[0011] 本发明所称的“间充质干细胞”是指一种源于发育早期的中胚层和外胚层,具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞,这种干细胞能够发育成硬骨、软骨、脂肪和其他类型的细胞。本发明中,其包括但不限于毛囊间充质干细胞、脐带间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、骨髓间充质干细胞、牙齿间充质干细胞、胚胎干细胞来源的间充质干细胞和诱导多能干细胞来源的间充质干细胞。这些间充质干细胞可直接来源于自体,也可来源于异体,以及通过体外大规模扩增的方式培养获得。

[0012] 毛囊是皮肤的附属器之一,起源于表皮和间充质间相互作用。毛囊中除了含有角朊干细胞和黑色素干细胞外,还含有间充质干细胞。这些毛囊来源的间充质样干细胞不仅能够自我更新,还能够分化为骨、软骨、脂肪、血管平滑肌细胞和神经细胞等。研究表明毛囊干细胞移植后能够参与血管新生、皮肤重建和神经修复。毛囊来源丰富,取材方便。获取毛囊几乎不受年龄和性别的限制,也基本不会对机体造成任何损害。另外毛囊的免疫原性低。研究表明同种异体移植的毛囊可在人体内长期存活,且未见致瘤性。因此,本发明优先选择从毛囊中分离获得的毛囊间充质干细胞作为基因治疗的靶细胞,以从根本上解决利用胚胎干细胞或其它成体干细胞开展上述研究时所面临着的细胞来源有限、获取不便、有悖伦理和诱发肿瘤形成等实际问题,不仅拓宽干细胞的研究领域,又具有实际应用潜能。

[0013] 本发明所称的“糖尿病”包括医学上所定义的 I 型糖尿病和 II 型糖尿病。

[0014] 本发明所称的“生物体”指人、野生动物和家畜(Livestock)。野生动物为自然状态下未经人工驯化的动物。家畜是为了提供食物来源而人工饲养的动物,如:狗、鼠、仓鼠、猪、兔、奶牛、水牛、公牛、绵羊、山羊、鹅和鸡等。给予治疗的“生物体”优先选择哺乳动物,尤其是人。

[0015] 本发明所称的“储库”指包括全部或部分的目标基因序列,能够表达并储存目标多肽或蛋白质,并使这些多肽或蛋白质在使用或未使用激动剂的作用下能主动或被动对外释放的载体。

[0016] 本发明所称的“转胰岛素基因药物的表达、储存和释放的储库”指包括全部或部分的胰岛素基因序列,能够表达并储存胰岛素、前胰岛素(pro-insulin)以及含有胰岛素全部或部分氨基酸序列的多肽或蛋白质,并使这些多肽或蛋白质在使用或未使用激动剂的作用下能主动或被动对外释放的载体。那些与源自生物体的各种天然胰岛素的核苷酸和氨基酸序列具有 50% 以上同源性的,且能执行胰岛素生物学功能的聚核苷酸、多肽和蛋白质均包括在本发明所称的“转胰岛素基因药物”中。

[0017] 一种转胰岛素基因药物的表达、储存和释放的储库,其含有前胰岛素编码基因(hpp14)、自发聚合蛋白(FM)编码基因以及酶切位点(FCS)和标记基因。

[0018] 本发明所称的“激动剂”为能使储库中所储存的多肽或蛋白质脱离储库的化学键(如:易于水解或酶解的化学键)、分子、聚合物或组合物。在具体应用中,该激动剂与所储存的多肽或蛋白质共存于储库中,或单独加入,或以组合物加入,或其它分子共同作用等方

式,使所储存的多肽或蛋白质脱离储库。

[0019] 本发明所称的“培养液”或“培养基”是指以 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、DMM-F12、EGM (Endothelial Growth Medium)、KGM (Keratinocyte Growth Medium)、IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、MEM (Minimum Essential Medium) 和 EBM (Eagle's Basal Medium) 中的一种或多种为基本培养液(基),并含有一种或多种生物因子的混合物。

[0020] 本发明所称的“生物因子”为胰岛素样生长因子(Insulin-like Growth Factor, IGF)、碱性成纤维生长因子(basic Fibroblast Growth Factors, bFGF)、表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)、血管表皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)、血小板源性生长因子(Platelet derived Growth Factor, PDGF)、转化生长因子(TGF- β)、维甲酸、磷酸盐维生素 C、地塞米松、胰岛素、转铁蛋白、动物脑垂体提取物、青-链霉素、两性霉素,以及人和动物的血清。所述生物因子应适量使用,以有利于促使细胞的增值,上述各种细胞因子其适量的范围独立地取自于 0.1-500ng/ml,优先选择 0.5-100ng/ml,进一步选择 1-20ng/ml、21-40ng/ml、41-80ng/ml 和 81-100ng/ml,如:但不限于 1-100 的正整数浓度(ng/ml)取值范围。

[0021] 本发明所称的“人血清”是指来源于脐带血或外周血的血清。

[0022] 本发明所称的“动物血清”是指来源于哺乳动物血清,如:但不限于牛血清、羊血清和猪血清之一或几种。“动物血清”作为生物因子添加时,应适量使用,以有利于促使细胞的增值。其适量的范围为总培养液体积的 0.1-30%,优先选择 1-25%,进一步选择 1-5%、6-10%、11-15% 和 16-20%,如:但不限于,1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19% 和 20%。

[0023] 本发明提供的一种用于转胰岛素基因药物的表达、储存和释放的储库的间充质干细胞的制取方法,包括如下步骤:

[0024] ①间充质干细胞的分离和培养。

[0025] ②将前胰岛素融合蛋白慢病毒载体导入包装细胞,该包装细胞能将慢病毒载体包装成完整的慢病毒颗粒,并将其分泌到培养液上清中。

[0026] ③收集步骤②培养上清中的慢病毒颗粒,转染步骤①获得的间充质干细胞,即得用于转胰岛素基因药物的表达、储存和释放的储库的间充质干细胞。

[0027] 该方法中,用于间充质干细胞培养的培养液,DMEM/F12 为基本培养基并含有一种或多种生物因子的混合物,如:含 10v/v% 胎牛血清,100 单位 / 毫升青链霉素,10 纳克 / 毫升的碱性成纤维细胞生长因子的 DMEM/F12 培养基。

[0028] 该方法步骤②中,前胰岛素融合蛋白慢病毒载体采用 1 型人免疫缺陷病毒(HIV-1)系统进行构建,包装细胞选用 293T 包装细胞。具体方法如:将 pSRV-rev 质粒、pMDL-g/p 质粒、pMD2G/VSVG 质粒和含有前胰岛素的融合蛋白质粒转染到 293T 细胞,获得慢病毒颗粒。

[0029] 慢病毒融合蛋白质粒含有前胰岛素编码基因(hpp14)、自发聚合蛋白(FM)编码基因以及酶切位点(FCS)和标记基因。

[0030] 该方法步骤③中,被转染的是原代至第 10 代的间充质干细胞。

[0031] 制得的用于转胰岛素基因药物的表达、储存和释放的储库的间充质干细胞,以皮

下埋植或静脉注射的方式给予链脲霉素(Streptozocin, STZ)处理的受试生物体,在注射或口服施以激动剂雷帕霉素(Rapamycin)后,可见受试生物体的血糖水平得到控制并显著下降,存活率 100%。

[0032] 本发明技术方案实现的有益效果:

[0033] 本发明实现了以间充质干细胞为作为基因治疗的靶细胞,显著提高受试动物的存活率。本发明还通过载有目标药物(如:胰岛素)的蛋白质(如:自发聚合蛋白)在激动剂的配合下,获得了用于转基因药物的表达、储存和缓/控释放的载体。

[0034] 本发明在转胰岛素基因治疗的实验中充分验证了间充质干细胞可作为表达、储存和释放目标药物的储库使用,具有高效、安全和可靠等特点。从而可以充分利用间充质细胞,尤其是毛囊间充质干细胞所具有的来源广、取材方便、易于体外培养和扩增、极低的免疫原性不会引起排斥反应以及不涉及胚胎干细胞移植所面临的伦理问题等特点,以转基因载体方式实现各种疾病的缓/控释给药和转基因治疗。

附图说明

[0035] 图 1 为单根毛囊分离得到的毛囊间充质干细胞,形似长梭型;

[0036] 图 2 为扩增获得的毛囊间充质干细胞,经体外诱导分化为脂肪细胞。脂肪细胞内的脂滴被油红 O 染成红色,如图中箭头所示;

[0037] 图 3 为扩增获得的毛囊间充质干细胞,经体外诱导分化为成骨细胞,被茜素红染成红色,如图中箭头所示;

[0038] 图 4 为采用本发明提供的扩增方法获得的脐带间充质干细胞,经体外诱导分化为脂肪细胞。脂肪细胞内的脂滴被油红 O 染成红色,如图中箭头所示;

[0039] 图 5 为采用本发明提供的扩增方法获得的脐带间充质干细胞,经体外诱导分化成骨细胞,被茜素红染成红色,如图中箭头所示;

[0040] 图 6 为采用本发明提供的扩增方法获得的脐带间充质干细胞,经体外诱导分化为软骨细胞,包埋在自身分泌的细胞外基质中(被阿立新兰染成蓝色),如图中箭头所示;

[0041] 图 7 为含有前胰岛素基因的毛囊间充质干细胞表达绿色荧光蛋白,如图中箭头所示;

[0042] 图 8 为转基因毛囊间充质干细胞体外胰岛素释放实验。向转基因毛囊间充质干细胞的培养液中加入 Rapamycin 至终浓度为 $5\mu\text{mol/L}$ 。加入 Rapamycin 后不同时间(1-10 小时)检测培养液上清中胰岛素的含量,如该图所示,加入 rapamycin 后 4 小时,胰岛素释放量最大;

[0043] 图 9 为转基因毛囊间充质干细胞体外胰岛素释放实验,向转基因毛囊间充质干细胞的培养液中加 Rapamycin 至终浓度为 $1-10\mu\text{M}$ 。加入 Rapamycin 后 4 小时,检测培养液上清中胰岛素的含量,如图所示, Rapamycin 浓度为 $5\mu\text{M}$ 时,胰岛素释放量最大;

[0044] 图 10 为小动物成像系统示踪移植后小鼠背部皮下的转基因毛囊干细胞,位置如图中箭头所示;

[0045] 图 11 为各组试验动物的血糖变化曲线图;

[0046] 图 12 为各组试验动物在 90 天试验期间的存活率变化图。

具体实施方式

[0047] 以下详细描述本发明的技术方案。本发明实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制, 尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明, 本领域的普通技术人员应当理解, 可以对发明的技术方案进行修改或者等同替换, 而不脱离本发明技术方案的精神和范围, 其均应涵盖在本发明的权利要求范围内。

[0048] 本发明所用的试剂若未明确指明, 则均购自于西格玛—奥德里奇(Sigma—Aldrich)或Invitrogen™。

[0049] 实施例 1 用于转基因间充质干细胞的制备

[0050] (1) 毛囊间充质干细胞的分离、培养和鉴定:

[0051] 以拔取或外科手术等方式获取人毛囊或人毛囊组织块, 通过蛋白酶消化毛囊或毛囊组织块的培养法而获得的人毛囊干细胞, 具体为:

[0052] 磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗取材于人的毛囊或者毛囊组织块, 再使用 0.25w/v% 胰蛋白酶-0.02v/v%EDTA 溶液 37℃消化 3-10 分钟后, 胎牛血清终止, 接种至含有 10v/v% 胎牛血清和 bFGF (10ng/ml) DMEM-F12 培养基的孔板中, 于 37℃、5%CO₂ 环境下培养。

[0053] 利用 0.25% 胰蛋白酶 /EDTA 消化分散接近长满单层的人毛囊间充质干细胞(参见图 1), 加入等体积的含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基终止消化后, 离心收获细胞(室温下 1500rpm, 5 分钟)。用 PBS 漂洗细胞一次后, 将细胞以 1×10^6 细胞 /100 μ l 的密度悬浮于含有 1w/v% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 中, 参照抗体产品说明书, 每 1×10^6 细胞悬液中分别加入大约 1 μ l 如下抗人抗体(CD90、CD105、CD73、CD44、CD31、CD34 和 CD45), 置于冰上孵育 30 分钟。孵育结束后, 离心弃掉孵育液, 用 PBS 洗细胞 3 次, 每次 5 分钟。重新将细胞分别悬浮于 100 μ l 含 1%BSA 的 PBS 中, 避光加入 0.5 μ l 荧光素标记的种属与一抗相匹配的二抗, 置于冰上避光孵育 30 分钟。孵育结束后, 离心吸掉二抗, 经 PBS 洗过后, 直接上样于流式细胞仪, 检测上述细胞表面标记(CDs)在人毛囊间充质样干细胞的表达。

[0054] 将毛囊间充质干细胞以 4×10^4 /mL 密度种植于 6 孔培养板内, 以成脂肪诱导培养基培养(1 μ M 地塞米松, 10 μ M 重组人胰岛素, 0.5mM IBMX, 200 μ M 吡哆美辛)。培养至第 15d 时, 进行油红 O 染色, 检测细胞内脂滴的形成, 从而确认成脂实验的结果(参见图 2)。

[0055] 将细胞以 4×10^4 /mL 的密度种植于 6 孔培养板内, 培养在成骨诱导培养基中(100nM 地塞米松、5mM β -甘油磷酸钠和 50mg/ml 维生素 C)。培养至第 4 周, 进行茜素红染色, 检测钙盐的沉积, 以确认骨发生(参见图 3)。

[0056] 或采用 PCT/CN2011/001185 所公开的方法对所获得的毛囊间充质干细胞分离、培养或扩增。

[0057] (2) 脐带间充质干细胞的培养与扩增

[0058] 磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗脐带组织去除血液, 分离动静脉获得华通胶组织, 充分剪碎后, 再使用 I 型胶原酶 37℃消化 6-12h。消化结束后, 用磷酸缓冲盐溶液(PBS)稀释、经 70 μ m 滤网过滤后, 离心收集细胞。将细胞悬浮在含有 10v/v% 胎牛血清和 bFGF (10ng/ml) DMEM-F12 培养基中, 接种培养板(皿、瓶)中, 于 37℃、5%CO₂ 环境下培养。

[0059] 将经培养板(皿、瓶)培养的细胞以 1×10^6 至 1×10^7 细胞 / 克微载体的密度接种在微载体上, 并一起转移到细胞培养旋转瓶中。根据细胞培养旋转瓶的容积, 添加培养液至容积的 1/3。

[0060] 将细胞培养旋转瓶置于细胞培养箱内培养,培养条件为:37℃、5v/v%CO₂。细胞培养旋转瓶每小时转动 1-5 分钟,转速 10-300 转/分钟。

[0061] 待细胞在微载体上贴附生长接近单层时,使用 0.25w/v% 胰蛋白酶-0.02v/v%EDTA 溶液消化微载体,使细胞从微载体上释放下来。经血清灭活胰蛋白酶和 40 μm 滤网过滤后,收集过滤液,即得到扩增的脐带间充质干细胞。

[0062] 将扩增获得的脐带间充质干细胞通过常规的成脂细胞体外诱导分化处理(TissueEng2001, 7, 211-28),并分别进行油红 O 染色、茜素红染色和甲苯胺蓝染色。实验证明,扩增获得的脐带间充质干细胞已成功分化为成脂细胞(图 4)、成骨细胞(图 5)和成软骨细胞(图 6),与平面培养的细胞具有同样的分化潜能。

[0063] 本实施例中,“微载体”是指由一种或多种生物可降解材料构成,或由非生物降解材料构成,或由生物可降解与非生物降解材料构成的用于细胞培养的介质,其形态如:但不限于,颗粒、薄膜和块状物。本发明微载体优选球形或椭球形颗粒,其平均粒径通常为 10-1000 μm,优选 20-800 μm,更优选 100-300 μm、301-500 μm 和 501-800 μm,如:但不限于,100 μm、150 μm、200 μm、250 μm、300 μm、350 μm、400 μm、450 μm、500 μm、550 μm、600 μm、650 μm、700 μm、750 μm 和 800 μm。

[0064] “生物可降解材料”是指通过生物体自身的生物或生物化学过程,实现降解或分解的高分子材料,如:但不限于胶原蛋白、血液纤溶蛋白、明胶、透明质酸、多聚乳酸、多聚乙醇酸、聚亚胺酯和壳聚糖。

[0065] “非生物降解材料”是指玻璃、硅胶、金属和塑料。

[0066] 实施例 2 含有胰岛素基因的慢病毒转染间充质干细胞

[0067] 293T 细胞(参见细胞生物学杂志 [J], 2009, 31 (1): 130)于转染前一天铺板(4×10⁴ 细胞/cm²)。转染当天将 6 μg pSRV-rev 质粒、10 μg pMDL g/p 质粒、3 μg pMD2G/VSVG 质粒和 20 μg 含有前胰岛素的融合蛋白质粒(质粒均为美国纽约州立大学布法罗分校化学与生物工程系 Andreadis 教授馈赠)混合,加入 120 μl 转染试剂 FuGENE[®] HD (Promega),混合后,逐滴加入到 293T 细胞中。48 小时后收集上清,经 0.45 μm 滤器过滤后,即获得活病毒颗粒。以 Polybrene[®] 为转导剂,用活病毒颗粒去转染人实施例 1 获得的毛囊间充质干细胞或脐带间充质干细胞。转染 3 天后,当有表达绿色荧光蛋白的细胞出现时,利用流式细胞仪分选出这些表达绿色荧光蛋白的细胞,并将其定义为转(胰岛素)基因的毛囊间充质干细胞(参见图 7)或转(胰岛素)基因的脐带间充质干细胞。

[0068] 实施例 3 体外胰岛素释放实验研究

[0069] 将转(胰岛素)基因的毛囊间充质干细胞或脐带间充质干细胞培养长满单层后,向培养液中加入 Rapamycin 至终浓度为 5 μmol/L。加入 Rapamycin 后 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 小时,收集培养液上清。利用超灵敏酶联免疫试剂盒(human C-peptide ELISA kit, Millipore, Billerica, MA)检测上清中 C 肽的含量。结果显示:加入 Rapamycin 后 4 小时,上清中 C 肽的含量最高(参见图 8)。

[0070] 将转(胰岛素)基因的毛囊间充质干细胞或脐带间充质干细胞培养长满单层后,向培养液中加入 Rapamycin 至终浓度为 1,2,3,4,5,6,7,8,9 和 10 μmol/l。加入 Rapamycin 4 小时后,收集培养液上清。利用超灵敏酶联免疫试剂盒(human C-peptide ELISA kit, Millipore, Billerica, MA)检测上清中 C 肽(C-peptide)的含量。结果显示:加

入 $5\mu\text{mol/L}$ Rapamycin 后 4 小时, 上清中 C 肽的含量最高(参见图 9)。

[0071] 实施例 4 体内转基因干细胞移植实验

[0072] 将转胰岛素基因的毛囊间充质干细胞或脐带间充质干细胞以 0.25w/v% 的胰蛋白酶消化, 用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液吹打为单细胞悬液, 将分散的细胞悬浮于 DMEM 培养基中, 制成浓度为 5×10^7 细胞 /ml 的单细胞悬液, 利用 $100\mu\text{l}$ 的注射器, 在每只 STZ 糖尿病模型裸鼠的皮下注射总量为 5×10^6 的转基因细胞, 之后以成像系统示踪细胞移植后背部皮下细胞(参见图 10)。

[0073] 将 STZ 糖尿病模型裸鼠分成 4 组, 每组 10 只。每只分别皮下注射 5×10^6 细胞 / $100\mu\text{l}$ DMEM 的毛囊干细胞(毛囊干细胞组)、转胰岛素基因毛囊干细胞(转基因毛囊干细胞组)、转绿色荧光蛋白基因毛囊干细胞(绿色荧光蛋白组)和 $100\mu\text{l}$ DMEM 培养基(未处理组)。以不做任何处理的裸鼠(正常组)作为动物实验的对照组。

[0074] 细胞移植后 7 天, 小鼠禁食 4 小时, 腹腔注射 Rapamycin (30mg/kg)。次日尾静脉取血, ELISA 检测空腹血糖水平。以后每 7 天按照上述同样的步骤, 检测空腹小鼠血糖水平。毛囊干细胞组、未处理组和绿色荧光蛋白组小鼠的空腹血糖水平保持在 15mmol/L 以上。而转胰岛素基因毛囊干细胞组小鼠空腹血糖水平逐日下降, 在细胞移植后 90 天接近正常组小鼠空腹血糖水平(参见图 11)。毛囊干细胞组、未处理组和绿色荧光蛋白组小鼠的存活率随着时间的延长急剧降低, 在细胞移植后 50 天全部死亡(存活率 0%)。而转基因毛囊干细胞组小鼠在细胞移植后 90 天仍全部存活(存活率 100%), 与正常组小鼠相一致(参见图 12)。

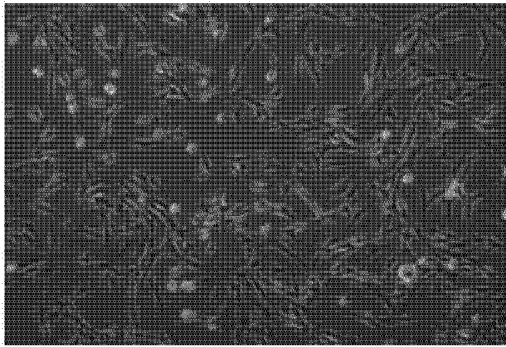


图 1

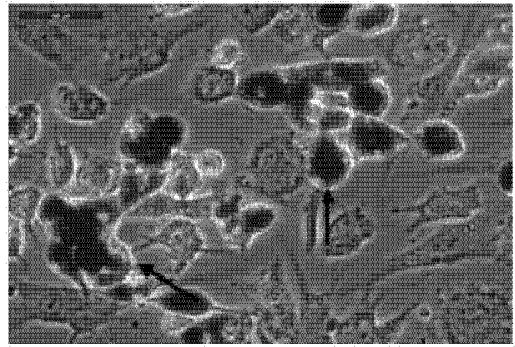


图 2

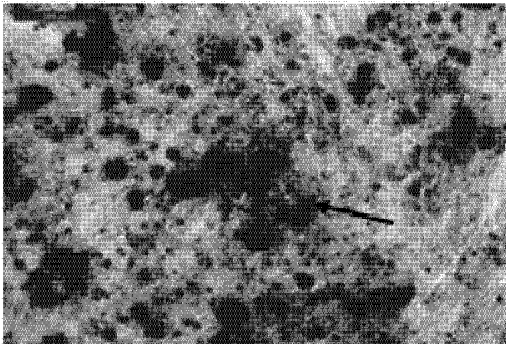


图 3

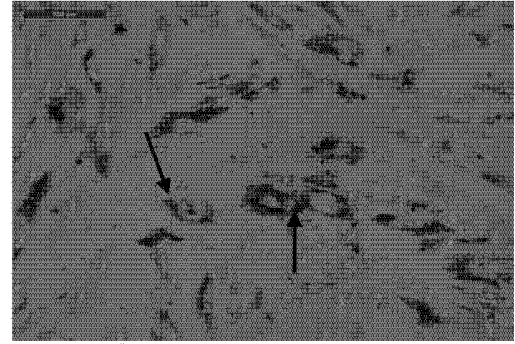


图 4

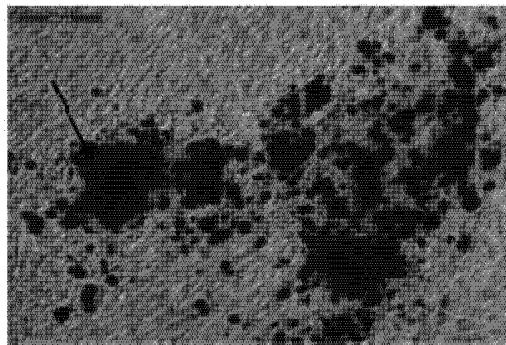


图 5

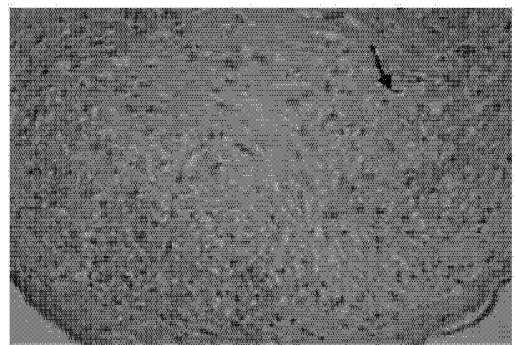


图 6

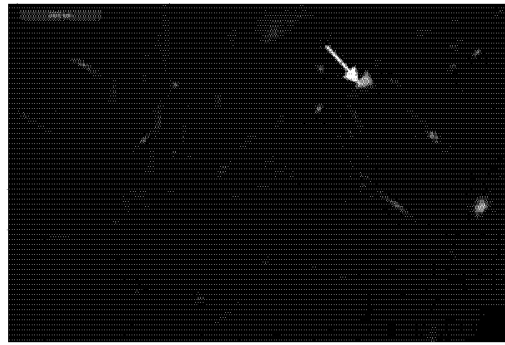


图 7

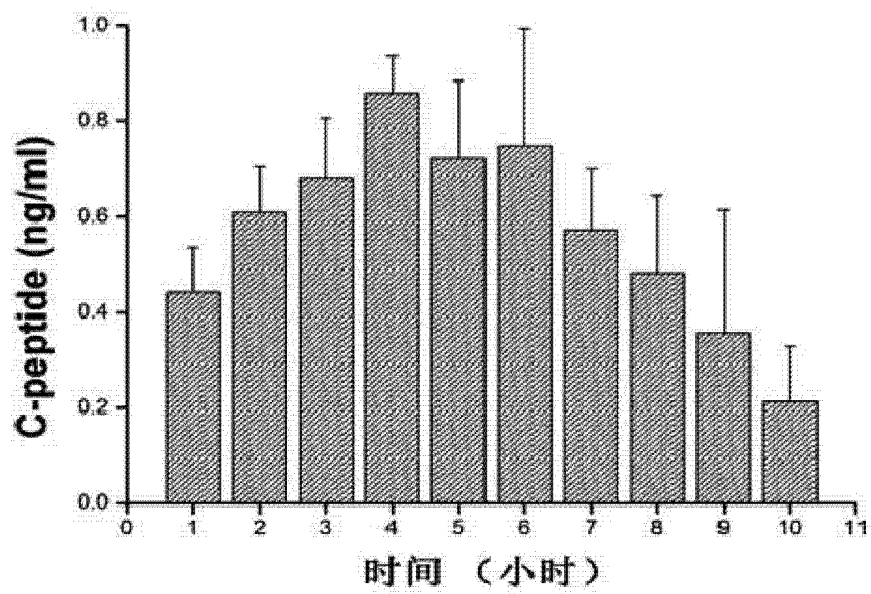


图 8

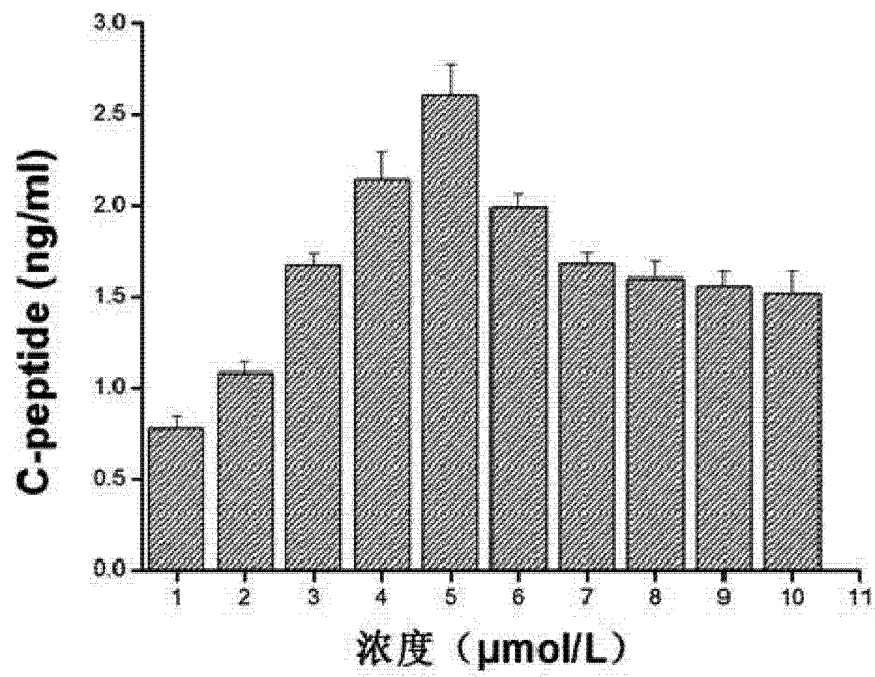


图 9

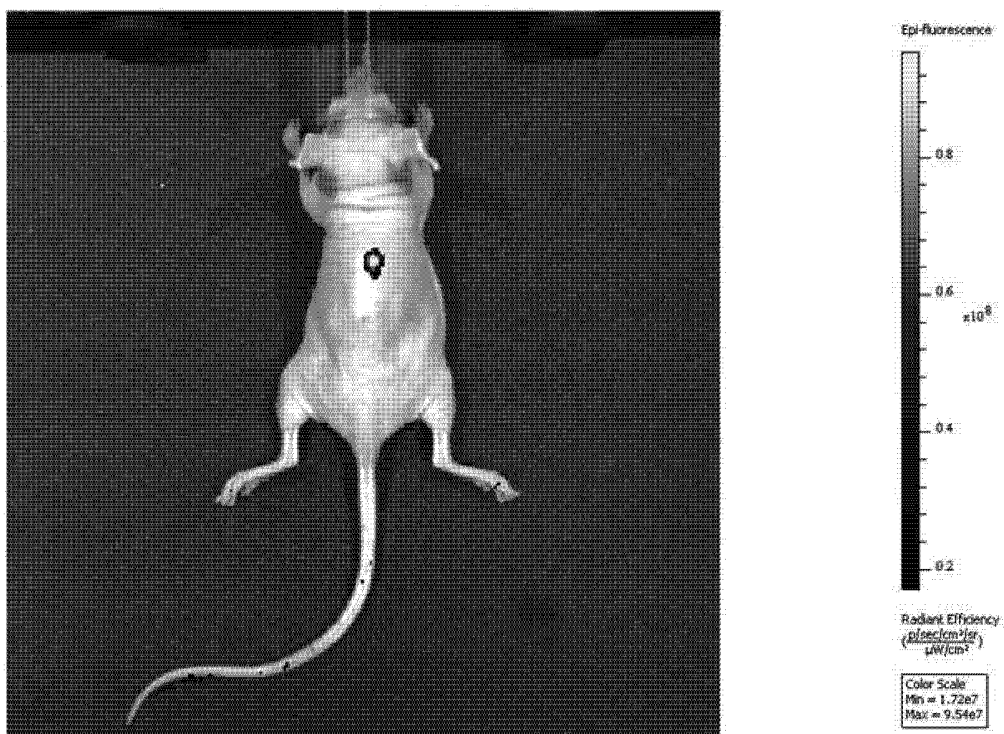


图 10

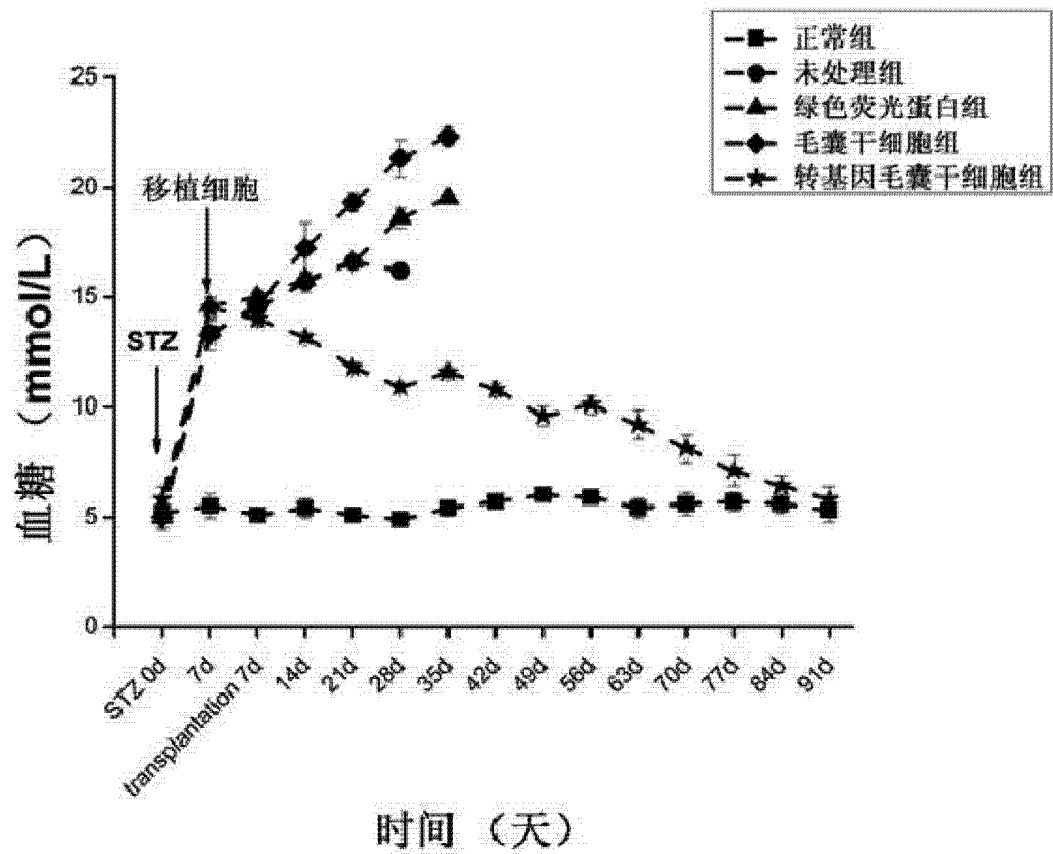


图 11

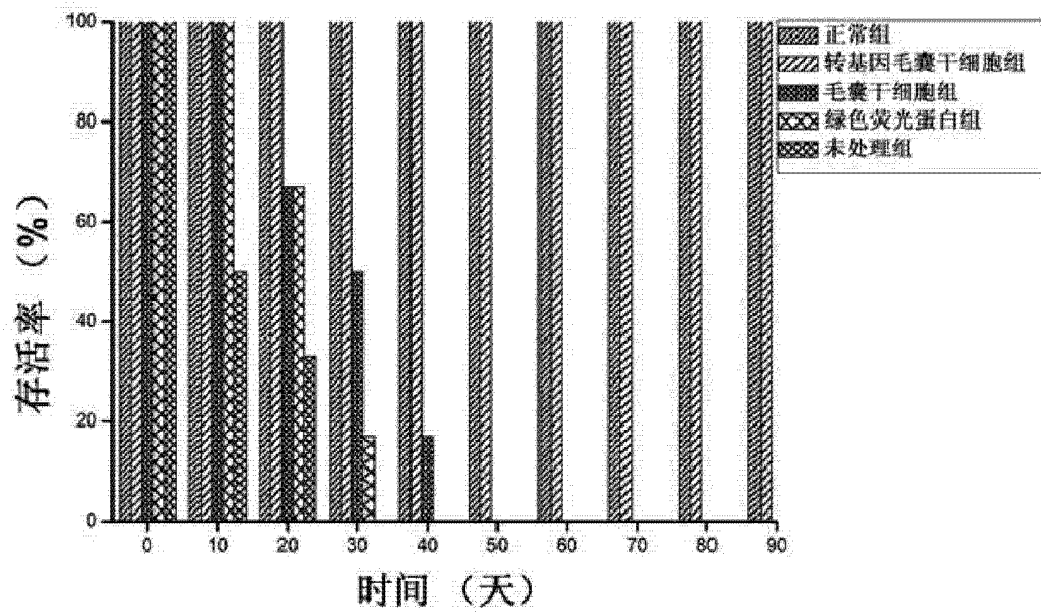


图 12