



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104293873 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201310297273. 2

(22) 申请日 2013. 07. 16

(71) 申请人 复旦大学附属华山医院

地址 200031 上海市静安区乌鲁木齐中路
12 号

(72) 发明人 刘春芳 吕元 马展

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所 (普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C12P 33/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

一种制备雌二醇的方法

(57) 摘要

本发明属于生物细胞工程领域,涉及一种制备雌二醇的方法,具体涉及使用诱导后哺乳动物细胞体外培养制备雌二醇的方法。本发明的方法中,采用由哺乳动物细胞通过体外的特殊诱导所产生的细胞群,在体外特定的条件下培养,能源源不断地分泌雌激素;所述体系中雌激素的分泌完全模拟体内的合成过程,生成雌二醇过程中的副产品少、方法简单、条件温和,对环境几乎不构成危害;与现有技术的制备手段相比具有不可取代的优势。本发明方法在体外经过特殊条件诱导后哺乳动物的体细胞具有产生雌二醇的能力,该方法为获得雌二醇提供了一条新的途径。

1. 一种制备雌二醇的方法,其特征在于,其包括步骤:

- (1) 离体的哺乳动物细胞进行原代培养;
- (2) 诱导处理上述哺乳动物细胞,得诱导后哺乳动物细胞;
- (3) 检测、分析诱导后哺乳动物细胞产生雌二醇的能力;
- (4) 分离、纯化,制得纯的雌二醇。

2. 按权利要求 1 所述的方法,其特征在于,

步骤(1)中,离体哺乳动物细胞原代培养,制备的细胞培养于含 15%胎牛血清的 DMEM 培养基,培养条件为 37℃,5%CO₂,至 10⁵ 个细胞 / 培养瓶;

步骤(2)中,培养基中加入 MCA,使其终浓度为 1ug/ml,每周更换含 MCA 的培养基 2 次;MCA 处理 1 周;细胞在 37℃,5%CO₂ 环境中,持续常规培养;

步骤(3)中,培养至 3 个月,培养物中出现生殖细胞样细胞;该生殖细胞样细胞表达生殖细胞的标志物:Oct4、Nanos3、c-Kit、DAZL、Vasa。

3. 按权利要求 2 所述的方法,其特征在于,步骤(3)中,MCA 诱导后 hBMDCs 中雌二醇高浓度表达;诱导后 hBMDCs 中有卵泡样结构形成;和卵泡发育相关基因 GDF9 在培养物中表达。

4. 按权利要求 1 所述的方法,其特征在于,诱导哺乳动物的诱导方式选自化合物诱导、天然物质处理、基因导入、辐射诱导、病毒诱导或传代方式。

5. 按权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的诱导的细胞在较高的细胞密度条件下培养后,增殖和分化成多能干细胞样细胞、颗粒细胞样细胞、原始生殖细胞样细胞或卵母细胞样细胞的细胞群,继续培养所述细胞产生滤泡样结构,产生雌激素。

6. 按权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)中,原代培养为骨髓冲洗或贴壁法。

7. 按权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的离体的哺乳动物细胞采用人骨髓来源细胞(HMBDCs,保藏号 CCTCC C2012173),小鼠骨髓来源细胞(mBMDCs),小鼠胚胎成纤维细胞,猪胚胎皮肤细胞,或大鼠胚胎干细胞。

一种制备雌二醇的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物细胞工程领域,涉及制备雌二醇的方法,具体涉及一种使用诱导后哺乳动物细胞体外培养制备雌二醇的方法。

背景技术

[0002] 现有技术公开了人体生理性存在的雌激素主要有三种:雌二醇、雌酮和雌三醇,其主要由卵巢、滤泡、黄体及妊娠胎盘生成,对于维持女性第二性征意义重大,缺乏雌激素会引起女性身体多个器官功能减退。据资料显示,女性进入更年期,雌激素急剧降低,仅仅在美国,女性更年期的雌激素类药物进行替代治疗的产值已近 20 亿美金。

[0003] 目前,用于补充雌激素的最主要药物有两类,一类为来源于马尿的雌酮;另一类为化学合成的雌二醇。马尿雌酮是最早应用的雌激素替代物,被全世界广泛应用达数十年之久,几乎成为雌激素的代名词,其制备和纯化的方法已相当成熟。但研究显示,人体真正需要的雌激素为雌二醇,而孕马尿中的雌激素成分主要是雌酮、马烯雌酮、马奈雌酮等;所述雌酮为雌二醇的代谢产物,活性不足雌二醇的十分之一,且有提高心血管疾病的风险、肝损伤、乳腺癌等毒副作用;因此由于雌酮具有高度的副作用,而通常被俗认为是坏雌激素。

[0004] 雌二醇主要来源于化学合成,由于化学合成雌二醇具有合成路径很长、副产物多及污染环境的问题,排放到环境中的雌激素类似物产生的生态环境问题也日趋受到重视。作为类固醇激素,雌激素与蛋白质激素不同,无法循传统的“DNA——mRNA——蛋白质”这一传统的生物工程路径进行,而只能利用胆固醇为原料由细胞内的酶系进行合成。在生理状况下雌激素主要来源于卵泡内膜细胞和卵泡颗粒细胞;在卵泡发育过程中,先经促黄体生成素(LH)刺激卵泡内膜分泌睾酮,再经颗粒细胞在卵泡刺激素(FSH)刺激下转化为雌二醇并进一步代谢生成其他雌激素成分。雌激素的生成涉及多种细胞和激素的协同作用,由于各种细胞间、激素间调控网络非常复杂,为细胞工程制备雌激素带来了困难。迄今为止,尚未见有关细胞工程制备雌激素的报道。

[0005] 本申请的发明人拟提供一种通过基因工程或细胞工程制备雌二醇的方法。

[0006] 与本发明有关的参考文献:

1. Beral V; Million Women Study Collaborators, Bull D, Green J, Reeves G. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. Lancet. 2007; 369:1703-1710.

2. Scarabin PY, Hemker HC, Clément C, Soisson V, Alhenc-Gelas M. Increased thrombin generation among postmenopausal women using hormone therapy: importance of the route of estrogen administration and progestogens. Menopause. 2011; 18:873-9.

3. Renoux C, Suissa S. Hormone therapy administration in postmenopausal women and risk of stroke. Womens Health (Lond Engl). 2011; 7:355-61.

4. Liu C, Xu S, Ma Z, Zeng Y, Chen Z, Lu Y. Generation of pluripotent

cancer-initiating cells from transformed bone marrow-derived cells. Cancer Lett. 2011; 303(2):140-9.

5. Nicholas CR, Chavez SL, Baker VL, Reijo Pera RA. Instructing an embryonic stem cell-derived oocyte fate: lessons from endogenous oogenesis. Endocr Rev 2009; 30: 264 - 283. 。

发明内容

[0007] 本发明的目的是克服现有技术的缺陷和不足,提供一种制备雌二醇的方法,具体涉及一种通过基因工程或细胞工程制备雌二醇的方法,尤其涉及使用诱导后哺乳动物细胞体外培养制备雌二醇的方法;该方法通过利用诱导后哺乳动物细胞,建立体外细胞工程,制备雌二醇。

[0008] 本发明所述方法中,所采用的细胞群由哺乳动物细胞通过特殊的诱导方式,包括化合物处理、基因导入、天然物质诱导、病毒感染、辐射诱导、体外长期培养等方法诱导体外培养的哺乳细胞后,使具有产生雌二醇的能力;由于上述体系中雌二醇的分泌模拟了体内的生物合成过程,因此产生的雌激素具有与起始细胞具有完全的物种同源性,生成雌二醇过程中的副产品少,条件温和;对环境几乎不构成危害。

[0009] 具体的,本发明的制备雌二醇的方法,其特征在于,其包括步骤:

- (1) 离体的哺乳动物细胞使用现有技术进行原代培养;
- (2) 诱导处理上述哺乳动物细胞,得到诱导后哺乳动物细胞;
- (3) 检测、分析上述诱导后哺乳动物细胞产生雌二醇的能力;
- (4) 按现有方法分离、纯化,制得纯的雌二醇。

[0010] 更具体的,本发明的制备雌二醇的方法,其特征在于,包括步骤:

(1) 离体哺乳动物细胞采用现有技术进行原代培养制备,制备的细胞培养于含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基,培养条件为 37℃, 5%CO₂, 直至 10⁵ 个细胞 / 培养瓶;

(2) 培养基中加入 MCA, 使其终浓度为 1ug/ml, 并每周更换含 MCA 的培养基 2 次; MCA 处理 1 周后结束; 细胞在 37℃, 5%CO₂ 环境中, 持续常规培养;

(3) 培养至 3 个月, 培养物中见细胞中出现生殖细胞样细胞; 该生殖细胞样细胞表达生殖细胞的标志物: Oct4、Nanos3、c-Kit、DAZL、Vasa;

本发明中, 培养液中检测到雌二醇的持续表达, 与未经诱导处理 hBMDCs (E2=65±14.8pmol/L, n=6) 相比, MCA 诱导后 hBMDCs 中 (E2=3243±947 pmol/L, n=6) 雌二醇的浓度高达 50 倍 (p<0.01) 差异有显著性; 重新传代后, 观察到随着培养时间的延长, 雌二醇浓度进行性增加, 传代培养至 10 天左右达到高峰, 高达 4500pmol/L, 随后逐步下降, 最终维持到较高水平;

体内雌二醇是由卵巢中卵泡合成, 本发明中, 在体外培养的诱导后 hBMDCs 中, 观察到卵泡样结构的形成; 卵母细胞的发育需雌二醇的促进, 若缺乏雌二醇, 卵母细胞的最大只能长到 25 微米; 而本发明诱导后 hBMDCs 中的卵母细胞样细胞体积达到 40-50 微米; 免疫荧光证实上述大细胞为卵母细胞;

本发明涉及的卵泡相关基因, 包括雌二醇合成的关键性基因: STAR、p450arom、p450c17, 以及卵泡发育相关基因 GDF9 在培养物中表达;

本发明经优化培养条件,能增加雌二醇产生的能力,并降低培养液中血清的浓度;上述生殖细胞样细胞可进一步增大产生早期卵泡样结构和卵母细胞样细胞;

(4) 按现有方法分离、纯化,制得雌二醇。

[0011] 本发明中,所述细胞系可通过诱导哺乳动物正常细胞发生转化的方式制备,诱导方式可包括化合物诱导、天然物质处理、基因导入、辐射诱导、病毒诱导或长时间传代等方式进行;所述的诱导产生的细胞在较高的细胞密度条件下进行培养,可自发的增殖和分化成为包括多能干细胞样细胞、颗粒细胞样细胞、原始生殖细胞样细胞、卵母细胞样细胞的细胞群,继续培养上述细胞可进一步自组织产生滤泡样结构,产生的雌激素分泌在培养液中,可使用现有技术进行富集和纯化,制得雌二醇。

[0012] 本发明方法的优点有:

本发明通过细胞工程手段制备雌二醇,其中所采用的细胞群由哺乳动物细胞通过体外的特殊诱导所产生;所述细胞群可在体外特定的条件下培养,源源不断地分泌雌激素;所述体系中雌激素的分泌完全模拟了体内的合成过程,生成雌二醇过程中的副产品少、方法简单、条件温和,对环境几乎不构成危害;与现有技术的制备手段相比具有不可取代的优势。

[0013] 本发明的制备雌激素的细胞工程方法,在体外经过特殊条件诱导后哺乳动物的体细胞具有产生雌二醇的能力,该方法为获得雌二醇提供了一条新的途径。

附图说明

[0014] 图 1 为 MCA 诱导后, hBMDCs 产生生殖细胞样细胞, 其中,

A :MCA 诱导后, hBMDCs 中出现生殖细胞样细胞;

B :生殖细胞样细胞表达生殖细胞相关蛋白 :Oct4、Nanos3、c-Kit、DAZL、Vasa。

[0015] 图 2 显示了诱导前后雌二醇浓度变化, 其中, 与未经诱导处理 hBMDCs ($E2=65 \pm 14.8 \text{ pmol/L}$, $n=6$) 相比, MCA 诱导后 hBMDCs 中 ($E2=3243 \pm 947 \text{ pmol/L}$, $n=6$) 雌二醇的浓度高达 50 倍 ($p<0.01$)。

[0016] 图 3 为培养物中雌二醇浓度变化曲线, 其中, MCA 诱导后, 培养的 hBMDCs 上清中出现雌二醇 (E2); 传代初期, 随着培养时间的延长雌二醇进行性增加, 然后逐步降低。

[0017] 图 4 为 MCA 诱导的 hBMDCs 中出现早期卵泡样结构及卵母细胞样细胞, 其中,

(A-B) 早期卵泡样结构; (C-D) 早期卵泡样结构中, 体积较大的细胞表达生殖细胞的标志 Oct4, 而周围细胞不表达; (I-G) 卵母细胞样细胞; (H-M) 卵母细胞样细胞表达卵母细胞相关的标志, Vasa、SCP3、DAZL、GDF9; 标尺: 20 微米。

[0018] 图 5 为诱导后的细胞表达卵泡相关的基因其中, 雌二醇合成的关键性基因: STAR、p450arom、p450c17; 以及卵泡发育相关基因 GDF9 在培养物中表达。

[0019] 图 6 为本发明所述制备方法的流程图。

[0020]

具体实施方式

[0021] 本发明的实施过程将通过下面的非限制性实例予以说明。

[0022] 实施例 1

采用人骨髓来源细胞使用化合物三甲基胆蒽(MCA)诱导产生并筛选出本发明所述的细胞,并使用该细胞在体外合成性雌二醇;所述细胞已由中国典型培养物保藏中心保藏,保藏号 CCTCC C2012173;

制备步骤为:

(1)人骨髓来源细胞(HMBDCs,主要成分为人骨髓间充质干细胞)采用现有技术(本实施例采用骨髓冲洗、贴壁法)进行原代培养制备,制备的细胞培养于含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基,培养条件为 37℃,5%CO₂,直至 10⁵ 个细胞 / 培养瓶;

(2)培养基中加入 MCA,使其终浓度为 1ug/ml,并每星期更换含 MCA 的培养基 2 次;MCA 处理 1 周后结束;细胞在 37℃,5%CO₂ 环境中,持续常规培养;

(3)培养至 3 个月,培养物中可见细胞中出现生殖细胞样细胞(如图 1A 所示);上述生殖细胞样细胞表达生殖细胞的标志物:Oct4、Nanos3、c-Kit、DAZL、Vasa(如图 1B 所示);

(4)培养液中检测到雌二醇的持续表达,与未经诱导处理 hBMDCs (E2=65±14.8pmol/L, n=6)相比, MCA 诱导后 hBMDCs 中(E2=3243±947 pmol/L, n=6)雌二醇的浓度高达 50 倍(p<0.01)差异有显著性(如图 2 所示);重新传代后,观察到随着培养时间的延长,雌二醇浓度进行性增加,传代培养至 10 天左右达到高峰,高达 4500pmol/L,随后逐步下降,最终维持到较高水平(如图 3 所示);

(5)体内雌二醇是由卵巢中卵泡合成,在体外培养的诱导后 hBMDCs 中,观察到卵泡样结构的形成(如图 4A-E 所示,为诱导后 hBMDCs 中产生雌激素提供细胞支持);卵母细胞的发育需雌二醇的促进,若缺乏雌二醇,卵母细胞的最大只能长到 25 微米;而诱导后 hBMDCs 中的卵母细胞样细胞体积达到 40-50 微米(如图 4I-G 所示);免疫荧光证实上述大细胞为卵母细胞(如图 4H-M 所示);

(6)卵泡相关基因,包括雌二醇合成的关键性基因:STAR、p450arom、p450c17,以及卵泡发育相关基因 GDF9 在培养物中表达(如图 5 所示,进一步支持诱导后 hBMDCs 具有合成雌二醇的能力);

(7)优化培养条件,增加雌二醇产生的能力,并降低培养液中血清的浓度(有利于雌二醇的进一步分离纯化);上述生殖细胞样细胞可进一步增大产生早期卵泡样结构和卵母细胞样细胞;

(8)按现有方法分离、纯化,制得雌二醇。

[0023] 实施例 2

采用小鼠骨髓来源细胞(mBMDCs)经体外长期培养诱导后,产生并筛选出本发明所述的细胞,并使用该细胞在体外合成性雌二醇;其具体步骤为:

(1)分离纯化小鼠骨髓来源细胞(mBMDCs),在体外连续传代培养,传约 20 代后或连续培养约 6 个后,诱导后的 mBMDCs 具有产生雌二醇的能力;

(2)所述诱导后细胞产生雌二醇的浓度,最高可达 5000pmol/L。

[0024] 实施例 3

采用小鼠胚胎成纤维细胞,经体外导入多能性基因 Oct4、Sox2、Nanog、c-KIT 诱导后,产生并筛选出本发明所述的细胞,并使用该细胞在体外合成性雌二醇;步骤为:

(1)分离培养小鼠胚胎成纤维细胞;

(2)采用基因导入的方法,转入多能性基因 Oct4、Sox2、Nanog、c-KIT,筛选获得的所述

细胞,选出能产生较高浓度雌二醇的细胞,增殖培养;

(3) 上述诱导后细胞产生雌二醇的浓度,可达约 3000pmol/L。

[0025] 实施例 4

采用猪胚胎皮肤细胞,经 X 线诱导后,产生并筛选出本发明所述的细胞,并使用该细胞在体外合成性雌二醇;步骤为:

(1) 分离猪胚胎皮肤细胞;

(2) 采用 X 线诱导处理猪胚胎皮肤细胞;筛选获得的细胞,选出能产生较高浓度雌二醇的细胞,增殖培养;

(3) 上述诱导后细胞产生雌二醇的浓度,可达约 2500pmol/L。

[0026] 实施例 5

采用大鼠胚胎干细胞,经分化诱导后,产生并筛选出本发明所述的细胞,并使用该细胞在体外合成性雌二醇;步骤为:

(1) 分离大鼠胚胎干细胞;

(2) 将获得的大鼠胚胎干细胞去除支持细胞和 LIF 因子,使其自发或在维甲酸的作用下,发生分化;筛选获得的细胞,选出能产生较高浓度雌二醇的细胞,增殖培养;

(3) 上述诱导后细胞产生雌二醇的浓度,可达约 4000pmol/L。

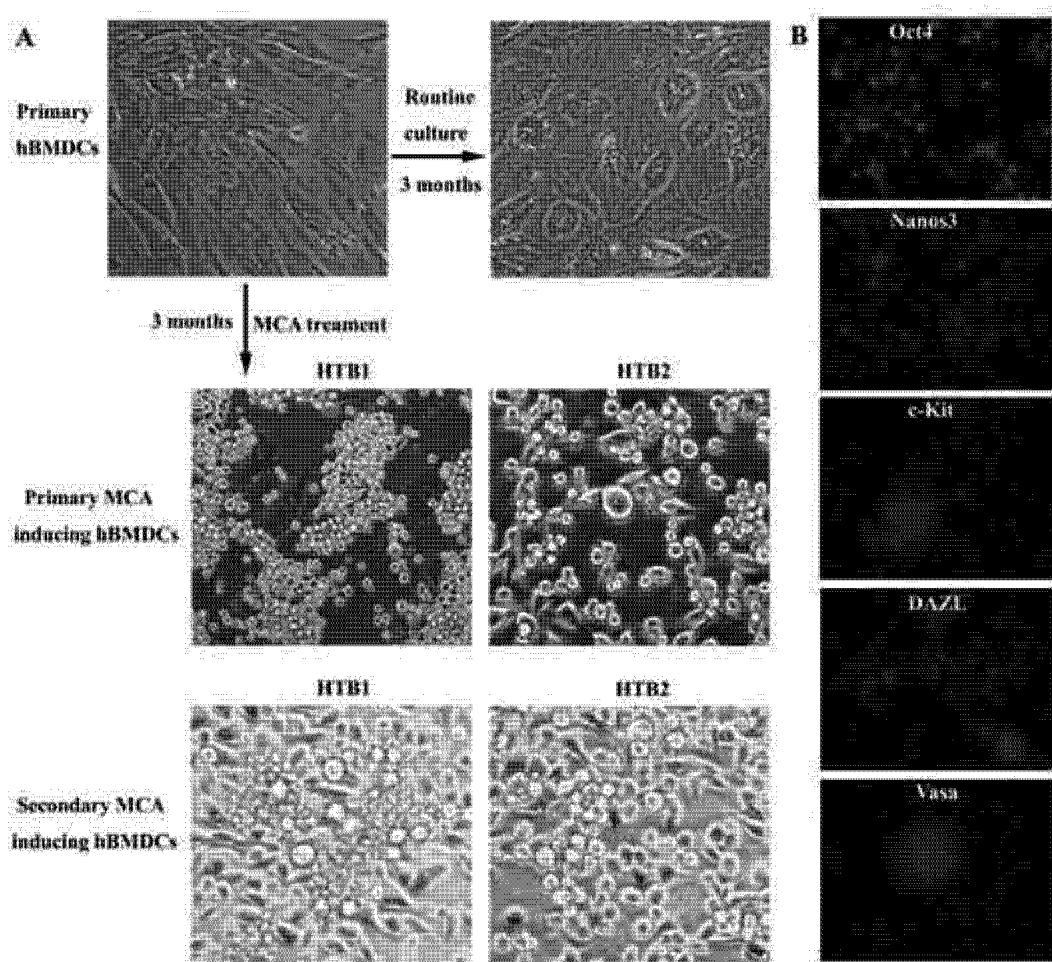


图 1

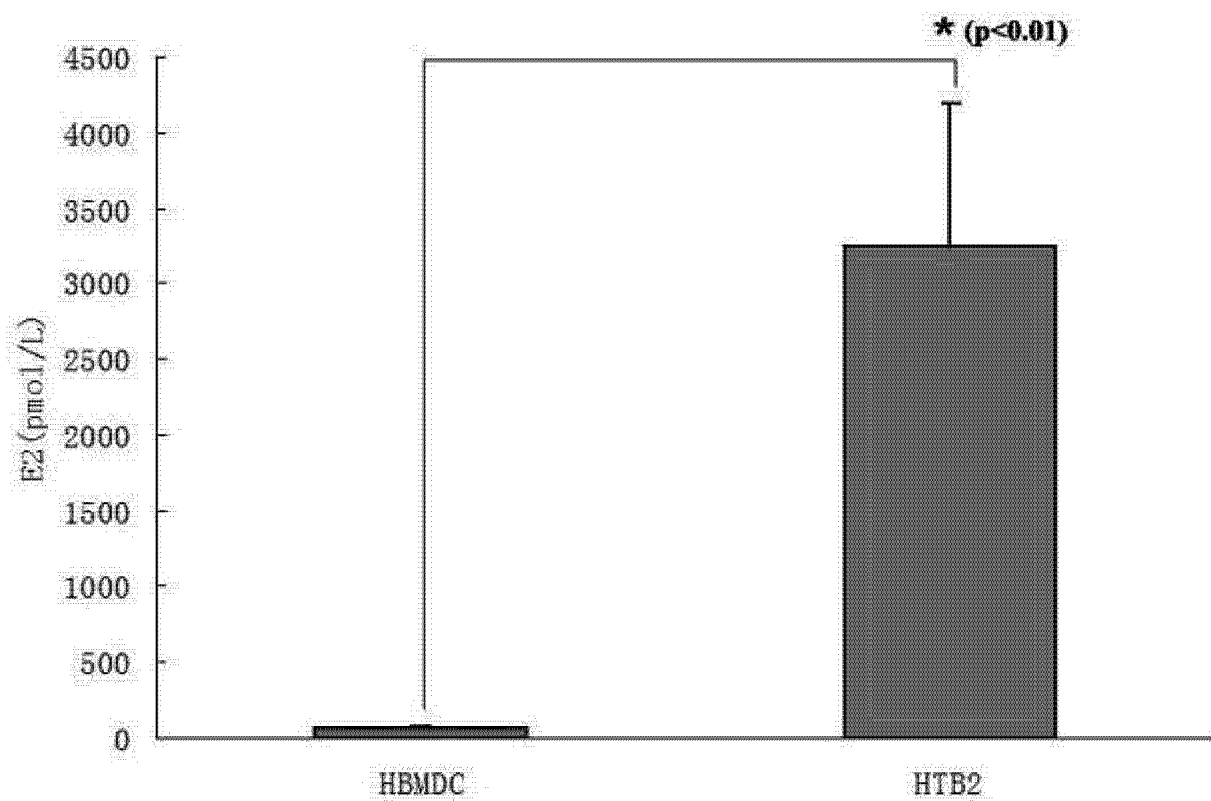


图 2

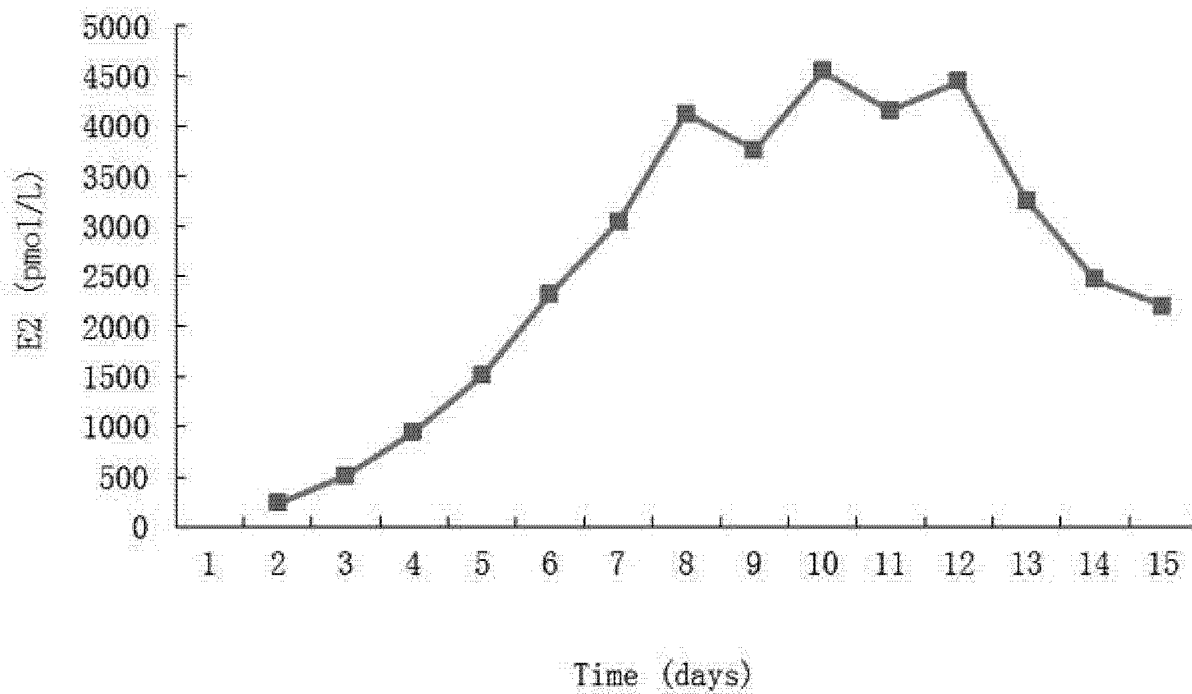


图 3

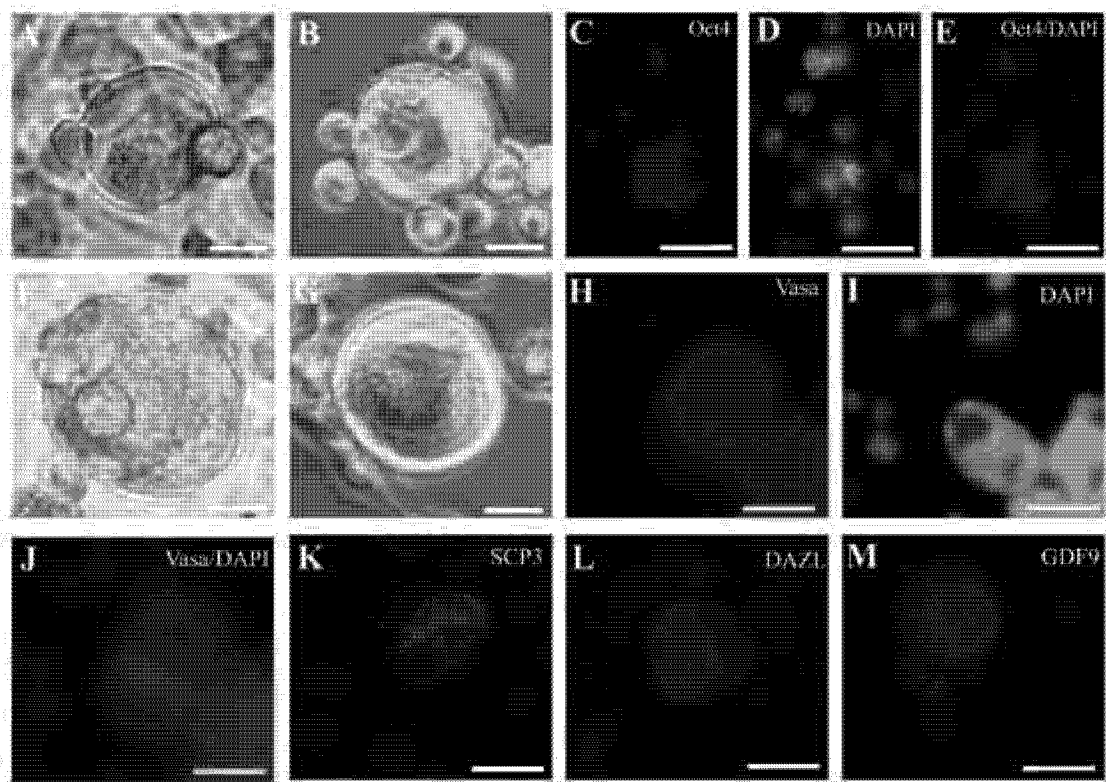


图 4

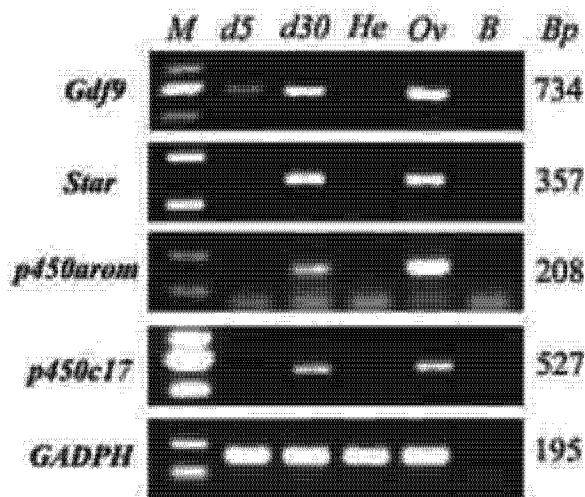


图 5

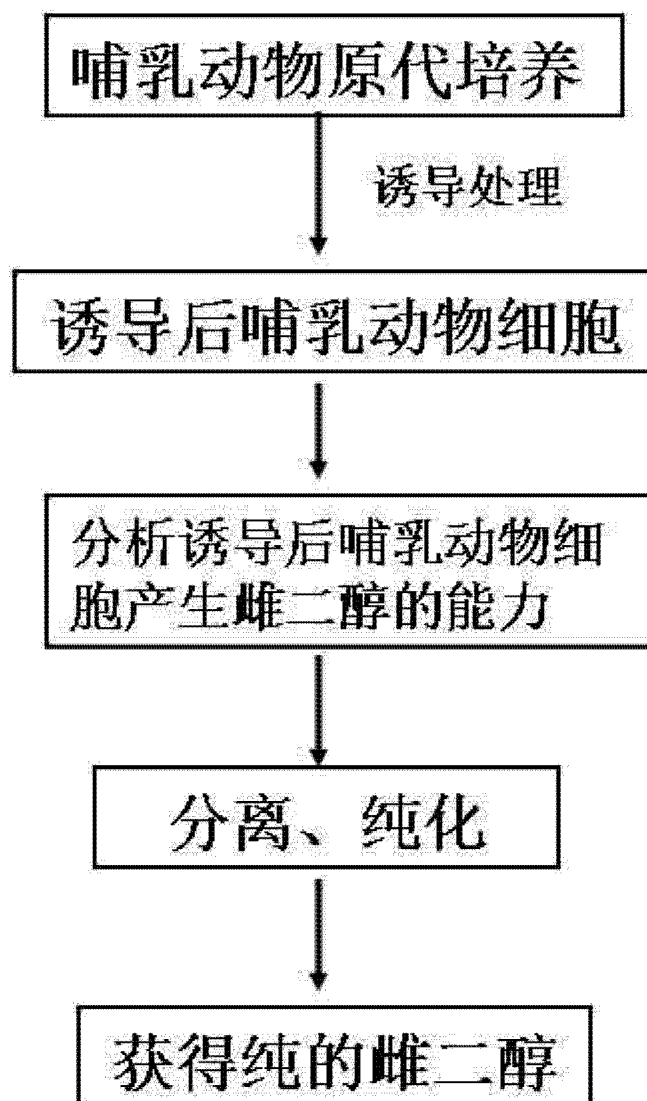


图 6