(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103969442 A
(43)申请公布日 2014.08.06

(21)申请号 201310041328.3

(22)申请日 2013.02.01

(71)申请人 上海交通大学医学院附属第九人民医院
地址 200011 上海市制造局路639号

(72)发明人 陆信武 秦金保 李祥祥 叶开创 杨心蕊 蒋米尔

(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.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)
C12Q 1/68(2006.01)
A61K 49/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生的方法

(57)摘要

本发明属于细胞生物学领域,涉及一种促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生的方法。本发明方法从脂肪组织中利用胶原酶和酵素酶分离、筛选获得大量脂肪源细胞,同时采用纳米分子探针标记,MRI动态示踪其对不同时期血管损伤的修复,经体外实验验证了GFP-ADSCs能高表达periostin蛋白,periostin能调控脂肪干细胞粘附、迁移及低氧刺激下抗凋亡的能力;经体内实验显示了过表达periostin的ADSCs体内移植能促进缺血下肢血管新生。本发明方法能为临床实践中改善干细胞移植治疗严重肢体缺血性疾病的疗效提供新的参考策略和思路。

CN 103969442 A

1. 一种促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生的方法，其特征在于，其包括：从脂肪组织中利用胶原酶和酵素酶分离、筛选获得脂肪源细胞，同时采用纳米分子探针标记，MRI 动态示踪其对不同时期血管损伤的修复；其包括步骤：

(1) 用包括胶原酶和酵素酶的消化酶溶液分离、筛选获得干细胞或脂肪源细胞，对脂肪源细胞进行免疫荧光鉴定及流式分析鉴定；

(2) 以腺病毒为载体，采用基因转染的方式，periostin 转染脂肪源细胞使脂肪源细过表达调控蛋白；

(3) 检测 periostin 调控干细胞或脂肪源细胞粘附、迁移及低氧刺激下抗

凋亡的水平；

(4) 相关通路阻断剂共培养检测干细胞或脂肪源细胞迁移、诱导分化能力、低氧抗凋亡能力，测定 periostin 调控干细胞或脂肪源细胞的抗凋亡、促增殖、促迁移能力的变化；

(5) 检测获得的过表达 periostin 的干细胞或脂肪源细胞的存活及迁移浸润及促血管新生能力。

2. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (1) 中干细胞为成体干细胞、胚胎干细胞或诱导的全能干细胞。

3. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (1) 中的消化酶溶液中胶原酶 NB4 和酵素酶的浓度为 0.05-0.5%。

4. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (1) 的对脂肪源细胞进行 CD11B/CD34/CD31/CD45/KDR/CD90/HLA-1/MHC-2 免疫荧光鉴定及流式分析鉴定。

5. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (2) 的调控蛋白为细胞外基质成分，选自调控蛋白 periostin。

6. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (2) 的 periostin 转染脂肪源细胞的浓度为 0-1000 μmol/ml，标记的细胞量为 $0-1\times10^{8}$。

7. 按权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (2) 的 periostin 转染脂肪源细胞的浓度为 10-100 μmol/ml。

8. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述方法通过观察再生内皮细胞形态，免疫荧光、流式检测 CD31、vWF、SMA 的表达情况。

9. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述方法中，通过 HE，油红，免疫荧光染色和透射电镜检测组织标本的小血管的密度及数量。

10. 按权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述方法中，通过 Western-blot 和 Realtime-PCR 测定 periostin 调控脂肪干细胞粘附、迁移及促进血管新生的能力。

一种促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生的方法

技术领域

[0001] 本发明属于细胞生物学领域，涉及一种促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生的方法。

背景技术

[0002] 随着人口的老龄化和饮食结构的改变，动脉粥样硬化（arterial sclerosis，AS）所导致的外周动脉疾病（PAD）的发病率逐年升高，周围动脉闭塞或狭窄引起的肢体缺血、缺氧、坏死严重影响和危害中老年人的健康。目前临床上现有技术的内科药物治疗、外科手术和腔内介入治疗（球囊扩张及支架）等方法，虽能不同程度地改善患者的病情和预后，但部分患者的远期疗效尚不理想，对部分已失去手术和介入治疗机会的终末期患者甚至面临截肢的严重后果。因此，急需寻找一种新的治疗方法来提高疗效、改善下肢缺血患者的预后。

[0003] 随着再生医学及临床转化医学研究的进展，干细胞移植治疗缺血性疾病展现了较好的临床应用前景，为下肢缺血患者带来新的希望。有研究发现，与自体骨髓和外周血干细胞相比，脂肪组织供区丰富，脂肪干细胞（ADSCs）采集更方便、体外扩增能力更强，免疫源性相对较低。已有研究相继证实将自体或异体脂肪干细胞（ADSCs）移植用于缺血下肢的治疗，可以促进新生血管的形成，但同时国内外大量文献及本申请发明人的前期研究结果均表明该干预方案对严重肢体缺血性疾病的疗效不佳，其疗效尚有待提高。研究还进一步证实：移植的 ADSCs 在缺血部位的存活、迁移归巢及促进血管新生的能力均显减弱，是影响疗效的关键。

[0004] Periostin 从小鼠成骨细胞系 MC3T3-E1cDNA 文库中克隆出的一种具有调节成骨细胞分化和粘附的功能骨粘附分子（Takeshita；1993 年），曾命名为成骨细胞特异因子（OSF-2），其为细胞外基质（extracellular matrix，ECM）蛋白的一种。1999 年 Horiuchi 等在骨膜和牙周韧带中发现该蛋白并重新命名为 periostin。所述 Periostin 蛋白的分子量约为 90KDa，其包含的四个氨基酸序列与果蝇的成束蛋白基因 fasciclin I（FAS I）密切相关。之前的研究认为该蛋白仅特异性表达于骨组织，目前越来越多的研究证实其在牙周韧带、皮肤、肿瘤、心脏瓣膜等组织中均有表达。还有研究发现 periostin 在正常的血管组织中不表达，但当肌肉、血管受到损伤、低氧等刺激时却表达升高；因此，相关研究人员推测该 periostin 蛋白可能与血管损伤修复有着密切的关系。其中，Gyongyosi 等发现在颈动脉球囊损伤血管内膜后，periostin 蛋白于血管损伤后 3 天及 7 天分别在血管中膜以及血管内膜中开始表达，且在血管损伤的晚期阶段 28 天仍在血管内膜中高表达；Stanton 等发现在平滑肌细胞中过表达 periostin 基因能够显著增强细胞的迁移能力，而 periostin 特异性抗体能阻断该效应；同时发现缺氧可诱导 periostin 蛋白在肺动脉血管平滑肌中表达，表明在慢性缺氧状态下 periostin 蛋白可参与肺血管的重构；临床实践研究观察到，下肢缺血或组织损伤时导致的局部肌肉组织处于低灌流状态，其必然导致创伤愈合组织内细胞处于低氧、低营养的应激条件下，业有研究证实低氧能够直接诱导内皮细胞或者干细胞的凋亡；

Ouyang 等观察肿瘤细胞和内皮细胞在低氧刺激下的反应，结果显示 periostin 不但能够抑制低氧状态下的肿瘤细胞的凋亡，还能抑制应激状态（低氧、低营养状态）所诱导的内皮细胞的凋亡；Kuhn 及 Dorn 等研究发现在心肌梗死大鼠模型，经 periostin 治疗数周后心肌细胞重新进入细胞分裂周期并增殖分化，治疗组梗死面积较非治疗组明显减小，且梗死区及其周围区域新生毛细血管及小动脉血管密度均高于非治疗组；Siriwardena 等采用组织形态学分析方法检测口腔鳞癌组织中的血管密度，证实过表达 periostin 的组织中血管密度明显增高，对体外培养的脐静脉内皮细胞用不同浓度的 periostin 处理并进行小管评分，结果显示 periostin 能以剂量依赖的方式促进毛细血管新生。上述研究均表明：periostin 能够促进细胞的迁移、归巢以及新生血管的形成。但是，ADSCs 迁移到内皮损伤部位的数量及再内皮化或再血管化的效率较低。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术存在的 Periostin 在脂肪干细胞 (ADSCs) 中表达水平低的缺陷和不足，提供一种促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生的方法。

[0006] 本发明的方法，以腺病毒为载体，采用基因转染的方式，使干细胞过表达 periostin，经体内、体外试验证实，所述的 periostin 能促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生；本发明方法能为临床实践中改善干细胞移植治疗严重肢体缺血性疾病的疗效提供新的参考策略和思路。

[0007] 具体而言，本发明的促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生的方法，其特征在于，其包括：从脂肪组织中利用胶原酶和酵素酶分离、筛选获得大量脂肪源细胞，同时采用纳米分子探针标记，MRI 动态示踪其对不同时期血管损伤的修复；其包括步骤：

[0008] (1) 用包括胶原酶和酵素酶的消化酶溶液分离、筛选获得干细胞，本发明的实施例中获取的干细胞为实验 GFP 小鼠的脂肪源细胞 (GFP-ADSCs)，对脂肪源细胞进行免疫荧光鉴定及流式分析鉴定；

[0009] (2) 以腺病毒为载体，采用基因转染的方式，periostin 转染 GFP-ADSCs，使 GFP-ADSCs 过表达调控蛋白；

[0010] (3) 检测 periostin 调控脂肪干细胞粘附、迁移及低氧刺激下抗凋亡的水平；

[0011] (4) 相关通路阻断剂等共培养检测 GFP-ADSCs 迁移、诱导分化能力、低氧抗凋亡能力，测定 periostin 调控 ADSCs 的抗凋亡、促增殖、促迁移能力的变化；

[0012] (5) 检测获得的过表达 periostin 的 GFP-ADSCs 在缺血组织中存活及迁移浸润及促血管新生能力。

[0013] 本发明方法中，步骤 (1) 中干细胞可为各种干细胞，包括成体干细胞、胚胎干细胞、诱导的全能干细胞；

[0014] 本发明方法中，步骤 (1) 中的消化酶溶液中胶原酶 NB4 和酵素酶的浓度为 0.05-0.5%；

[0015] 本发明方法中，步骤 (1) 的对脂肪源细胞进行免疫荧光鉴定及流式分析鉴定 (CD11B/CD34/CD31/CD45/KDR/CD90/HLA-1/MHC-2 等)；

[0016] 本发明方法中，步骤 (2) 的调控蛋白为细胞外基质成分；本发明的一个实施例中，调控蛋白为 periostin；

[0017] 本发明方法中，步骤(2)的periostin转染GFP-ADSCs的浓度为0-1000μmol/ml，最佳的浓度为10-100μmol/ml，标记的细胞量为$0-1\times10^8$；

[0018] 本发明方法中，通过观察再生内皮细胞形态，免疫荧光、流式检测CD31、vWF、SMA的表达情况；

[0019] 本发明方法中，进行部分标本的组织学观察(HE，油红，免疫荧光染色，透射电镜等)，观察小血管的密度及数量；

[0020] 本发明方法中，通过Western-blot和Realtime-PCR测定periostin调控脂肪干细胞粘附、迁移及促进血管新生的能力。

[0021] 本发明方法，从脂肪组织中利用胶原酶和酵素酶分离、筛选获得大量脂肪源细胞，同时采用纳米分子探针标记，MRI动态示踪其对不同时期血管损伤的修复，经体外实验验证了GFP-ADSCs能高表达periostin蛋白，periostin能调控脂肪干细胞粘附、迁移及低氧刺激下抗凋亡的能力；经体内实验显示了过表达periostin的ADSCs体内移植能促进缺血下肢血管新生。本发明方法能为临床实践中改善干细胞移植治疗严重肢体缺血性疾病的疗效提供新的参考策略和思路。

[0022] 为了便于理解，以下将通过具体的附图和实施例对本发明的促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生的方法进行详细地描述。需要特别指出的是，具体实例和附图仅是为了说明，显然本领域的普通技术人员可以根据本文说明，在本发明的范围内对本发明做出各种各样的修正和改变，这些修正和改变也纳入本发明的范围内。

附图说明

[0023] 图1：从GFP转基因小鼠腹股沟脂肪组织中分离获得GFP-ADSCs，

[0024] 图A为P3代光镜下GFP-ADSCs，图B为荧光显微镜下ADSCs发绿色荧光；流式检测发现ADSCs高表达干细胞的特异性标记CD90、CD105、Sca-1，而造血系及内皮细胞系等标记CD11b、CD31、CD34、CD45、CD83、CD133表达较低，免疫源性MHC-2阴性。

[0025] 图2：图A为免疫荧光染色鉴定periostin在转染及未转染的GFP-ADSCs的表达情况，可见经转然后P-ADSCs高表达periostin蛋白；图B为Western Blot检测转染及未转染的GFP-ADSCs表达periostin的差异；图C数据统计图进一步证实P-ADSCs高表达periostin蛋白。

[0026] 图3：Annexin检测低氧培养条件下GFP-ADSCs的凋亡情况，其中显示，经periostin基因转染的GFP-ADSCs可以减少细胞的凋亡。

[0027] 图4：研究证实GFP基因可以示踪ADSCs促进缺血下肢的血管新生，但是新生血管数量及密度较低，其中，

[0028] A为荧光显微镜下可以观察示踪色的GFP-ADSCs；B为ADSCs可以促进血管新生，但是新生血管数量及密度较低。

[0029] 图5：经periostin基因转染的GFP-ADSCs可以明显促进缺血下肢的血管新生，新生血管较多，其中，M为CD31染色；N为SMA染色；0为F4/80染色；P为MAC-3染色。

具体实施方式

[0030] 实施例1促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生实验，

[0031] (1) 体外实验：研究 periostin 调控脂肪干细胞粘附、迁移及低氧刺激下抗凋亡的能力；

[0032] GFP 转基因小鼠腹股沟脂肪组织中经消化酶溶液处理分离获得 GFP-ADSCs，以腺病毒为载体，采用基因转染的方式，使 GFP-ADSCs 过表达 periostin 及相关通路阻断剂等共培养检测 GFP-ADSCs 体外迁移、多向诱导分化能力、低氧抗凋亡能力测定，结果显示，GFP-ADSCs 高表达 periostin 蛋白，经 periostin 基因转染的 GFP-ADSCs 可减少细胞的凋亡；荧光显微镜下 ADSCs 发荧光；流式检测显示 ADSCs 高表达干细胞的特异性标记 CD90、CD105、Sca-1，而造血系及内皮细胞系等标记 CD11b、CD31、CD34、CD45、CD83、CD133 表达较低，免疫源性 MHC-2 阴性；

[0033] 所述的 periostin 转染 GFP-ADSCs 的浓度为 0-1000μmol/ml，标记的细胞量为 $0-1\times10^{8}$；

[0034] 所述的的消化酶溶液中胶原酶 NB4 和酵素酶的浓度为 0.05-0.5%；

[0035] (2) 体内实验：测定过表达 periostin 的 ADSCs 体内移植促进缺血下肢血管新生的能力；

[0036] 将获得的过表达 periostin 的 GFP-ADSCs，体内移植修复 Apo E 基因敲除的动脉粥样硬化小鼠下肢缺血，测定过表达 periostin 的 GFP-ADSCs 在缺血组织中存活及迁移浸润能力，以及缺血组织的新生血管密度及肢体缺血的变化；

[0037] 其中，通过观察再生内皮细胞形态，免疫荧光、流式检测 CD31、vWF、SMA 的表达情况；部分标本进行组织学观察（HE，油红，免疫荧光染色，透射电镜等），观察小血管的密度及数量；通过 Western-blot 和 Realtime-PCR 探讨 periostin 调控脂肪干细胞粘附、迁移及促进血管新生能力；结果显示，ADSCs 可促进血管新生，但是新生血管数量及密度较低；经 periostin 基因转染的 GFP-ADSCs 可明显促进缺血下肢的血管新生，新生血管较多，本发明方法，经体外实验验证了 periostin 调控脂肪干细胞粘附、迁移及低氧刺激下抗凋亡的能力；经体内实验显示了过表达 periostin 的 ADSCs 体内移植能促进缺血下肢血管新生。

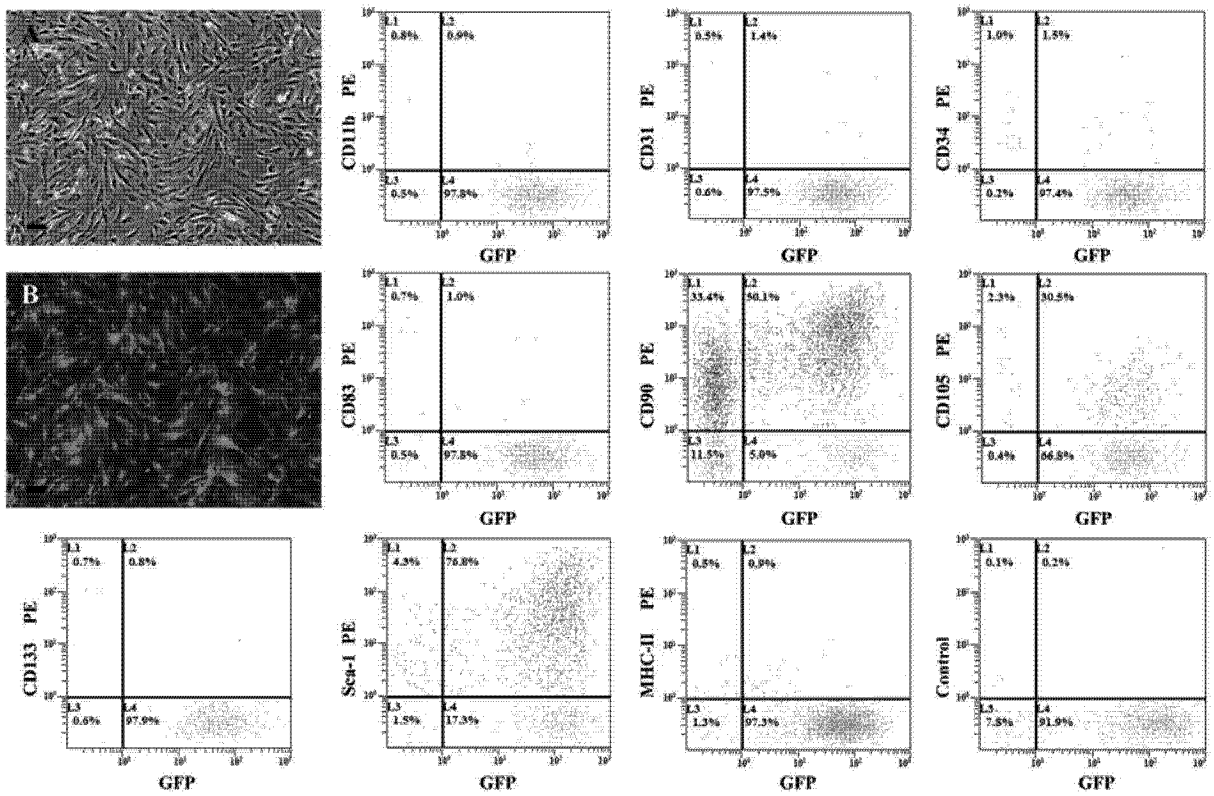

A
B
CD11b PE
CD31 PE
CD34 PE
CD83 PE
CD90 PE
CD105 PE
CD133 PE
Sca-1 PE
MHC-II PE
Control
GFP

图 1

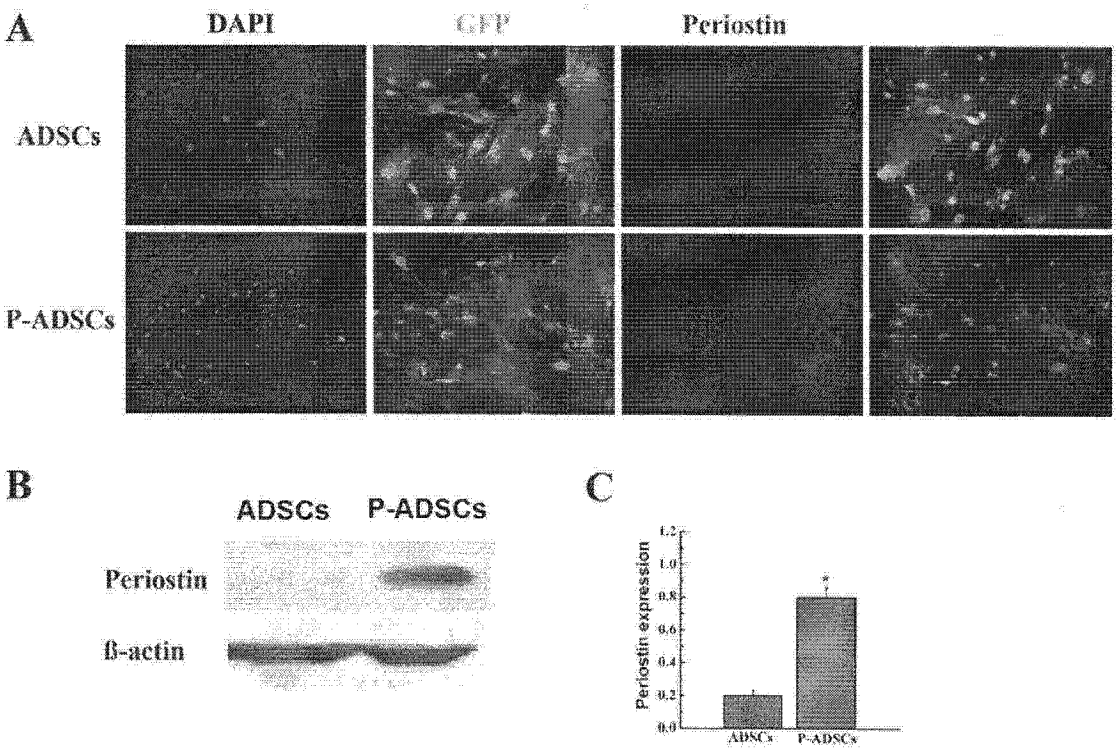

A
DAPI
GFP
Periostin
ADSCs
P-ADSCs
B
ADSCs
P-ADSCs
Periostin
ß-actin
C
Periostin expression
ADSCs
P-ADSCs

图 2

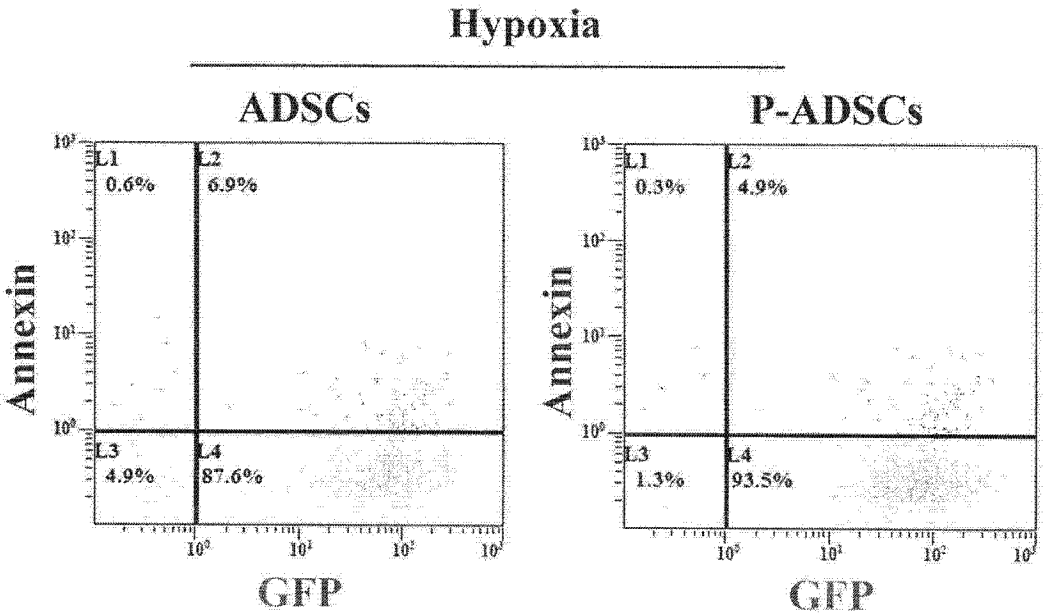

Hypoxia
ADSCs
P-ADSCs
Annexin
GFP
L1
0.6%
L2
6.9%
L3
4.9%
L4
87.6%
L1
0.3%
L2
4.9%
L3
1.3%
L4
93.5%

图 3

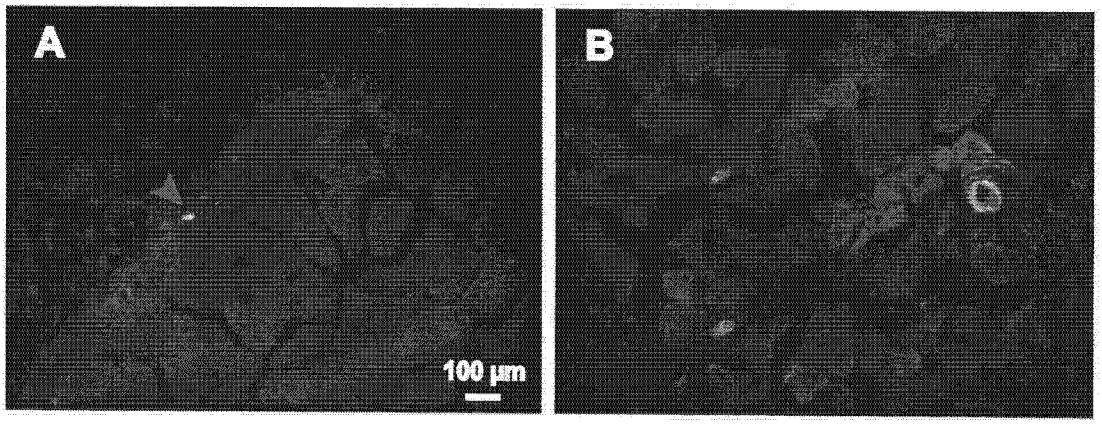

A
B
100 μm

图 4

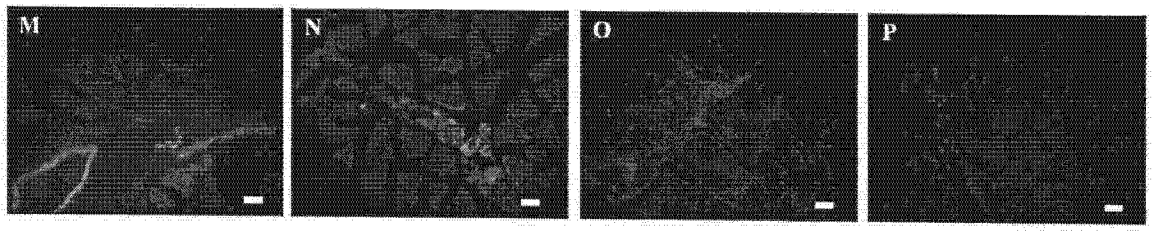
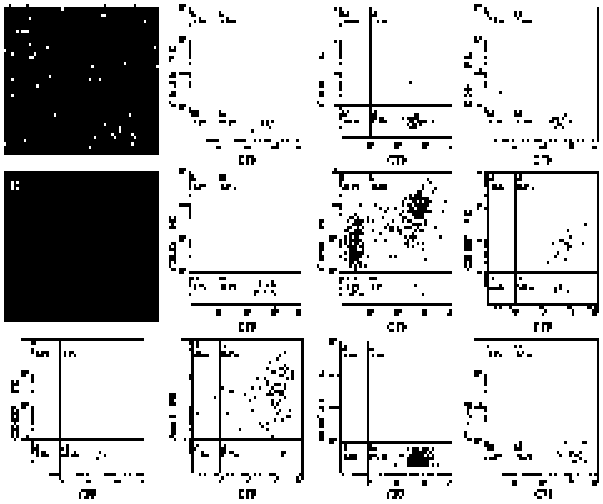

M
N
O
P

图 5

专利名称(译)	一种促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生的方法		
公开(公告)号	CN103969442A	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	CN201310041328.3	申请日	2013-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属第九人民医院		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属第九人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属第九人民医院		
[标]发明人	陆信武 秦金保 李祥祥 叶开创 杨心蕊 蒋米尔		
发明人	陆信武 秦金保 李祥祥 叶开创 杨心蕊 蒋米尔		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 C12Q1/68 A61K49/00		
CPC分类号	G01N33/6803 A61K49/00 G01N33/582		
代理人(译)	吴桂琴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于细胞生物学领域，涉及一种促进干细胞粘附、迁移、归巢及血管新生的方法。本发明方法从脂肪组织中利用胶原酶和酵素酶分离、筛选获得大量脂肪源细胞，同时采用纳米分子探针标记，MRI动态示踪其对不同时期血管损伤的修复，经体外实验验证了GFP-ADSCs能高表达periostin蛋白，periostin能调控脂肪干细胞粘附、迁移及低氧刺激下抗凋亡的能力；经体内实验显示了过表达periostin的ADSCs体内移植能促进缺血下肢血管新生。本发明方法能为临床实践中改善干细胞移植治疗严重肢体缺血性疾病的疗效提供新的参考策略和思路。