

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/06



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 1/38 G01N 33/53
G01N 33/00 A61K 35/48

[21] 申请号 01808098.7

[43] 公开日 2003 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 1423692A

[22] 申请日 2001.4.4 [21] 申请号 01808098.7

[30] 优先权

[32] 2000. 4. 7 [33] US [31] 09/545,435

[86] 国际申请 PCT/US01/10998 2001. 4. 4

[87] 国际公布 WO01/77298 英 2001. 10. 18

[85] 进入国家阶段日期 2002. 10. 15

[71] 申请人 雷文生物技术公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 李荣皓 J·P·玛瑟

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图 4 页

[54] 发明名称 人米勒管衍生上皮细胞及其分离和
使用方法

[57] 摘要

本发明公开了基本纯的人米勒管衍生上皮细胞群体，以及分离和培养米勒管衍生上皮细胞的方法。通过小心操作米勒管衍生上皮细胞生长其中的微环境，可以得到多次传代，其中米勒管衍生上皮细胞能够成为子宫、宫颈、阴道、和输卵管细胞。另外，本文还公开了使用人米勒管衍生上皮细胞及其分化的细胞的几种方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 基本纯的人米勒管衍生上皮细胞群体, 其中所述米勒管衍生上皮细胞具有分化成子宫、输卵管、宫颈、和阴道细胞的多能性。

2. 依照权利要求1的米勒管衍生上皮细胞, 其中在不含血清的培养基中维持米勒管衍生上皮细胞。

3. 依照权利要求2的米勒管衍生上皮细胞, 其中在不含血清的培养基中维持的米勒管衍生上皮细胞保留了分化成子宫、输卵管、宫颈、和阴道细胞的多能性。

4. 依照权利要求3的米勒管衍生上皮细胞, 其中所述米勒管衍生上皮细胞的细胞表面基本不含血清生物分子。

5. 依照权利要求1的米勒管衍生上皮细胞, 其中所述米勒管衍生上皮细胞能够通过至少一种细胞表面标记的表达而得到鉴定。

6. 依照权利要求5的米勒管衍生上皮细胞, 其中所述细胞表面标记是细胞角蛋白。

7. 依照权利要求6的米勒管衍生上皮细胞, 其中所述细胞角蛋白选自下组: 细胞角蛋白1、细胞角蛋白5、细胞角蛋白6、细胞角蛋白7、细胞角蛋白8、细胞角蛋白10、细胞角蛋白11、细胞角蛋白13、细胞角蛋白15、细胞角蛋白16、细胞角蛋白18、和细胞角蛋白19。

8. 依照权利要求7的米勒管衍生上皮细胞, 其中所述米勒管衍生上皮细胞还表达波形蛋白作为细胞表面标记。

9. 依照权利要求8的米勒管衍生上皮细胞, 其中所述米勒管衍生上皮细胞具有多边形上皮细胞的形态。

10. 分离基本纯的米勒管衍生上皮细胞群体的方法, 包括:

a) 显微解剖人胎米勒管衍生上皮细胞来源;

b) 将米勒管衍生上皮细胞来源置于不含血清的营养培养基中, 其培养条件足以维持所述米勒管衍生上皮细胞的存活, 其中不含血清的营养培养基所含营养物包括胰岛素、转铁蛋白、 α -生育酚、和抑酶肽;

c) 维持合适的培养条件, 该条件足以使米勒管衍生细胞由米勒管

衍生细胞来源迁移至不含血清的营养培养基中;

d) 维持合适的培养条件, 该条件足以使米勒管衍生细胞形成单层集落; 并

e) 将所述单层集落传代培养, 以获得基本纯的米勒管衍生上皮细胞群体。

11. 向异源受体提供免疫原的来源的方法, 包括以在所述受体中有效诱导免疫应答的量将权利要求1所述人米勒管衍生上皮细胞群体施用于所述受体。

12. 在非人哺乳动物受体中生成米勒管衍生细胞的人组织模型的方法, 包括将权利要求1所述人米勒管衍生上皮细胞群体施用于所述受体, 其中首先在不含血清的培养基中维持所述米勒管衍生上皮细胞, 然后施用于所述受体中能够支持所述米勒管衍生上皮细胞的生长和分化的部位。

13. 向受体提供细胞疗法的方法, 包括将权利要求1所述人米勒管衍生上皮细胞群体施用于所述受体, 其中首先在不含血清的培养基中培养所述米勒管衍生上皮细胞, 然后施用于所述受体中能够支持所述米勒管衍生上皮细胞的生长和分化的部位。

14. 提供米勒管衍生的组织特异性生物学成分的来源用于至少一种药物的药物开发的方法, 包括分离权利要求1所述人米勒管衍生上皮细胞群体, 并使用所述米勒管衍生上皮细胞或其任意细胞部分作为开发中药物的作用靶。

15. 提供核酸或蛋白质的来源用于生物测定法开发的方法, 包括由权利要求1所述人米勒管衍生上皮细胞分离核酸或蛋白质, 并使用所述核酸或蛋白质作为生物测定法中的一种或多种主要成分。

人米勒管衍生上皮细胞及其分离和使用方法

发明领域

本发明属于发育生物学和细胞生物学领域。具体而言，本发明涉及能够分化成子宫、输卵管、阴道、和宫颈细胞的米勒管衍生上皮细胞群体、分离米勒管衍生上皮细胞的方法、米勒管衍生上皮细胞的表征、和米勒管衍生上皮细胞的用途。

技术背景

在过去的几十年里，在关于女性生殖器官发育的研究中投入了大量的时间和精力。虽然研究背后的动力随实验室而不同，但是所有的研究工作都针对涉及女性整体健康的重要常见问题。这些问题包括：宫颈癌、不孕、子宫内膜异位症、子宫癌、宫外孕、卵巢囊肿、和子宫纤维瘤。例如，考虑到宫颈癌是世界范围内女性中第二位最常见癌症，每年诊断出大约450,000个新病例和近200,000例因宫颈癌的死亡，宫颈癌是关于女性健康的特别重要的话题（Pisani等人，*J. Cancer*, 55: 891 - 903, 1993）。尽管今天尚不知道宫颈癌的病因，然而有许多报告提出人乳头瘤病毒（特别是HPV-16和HPV-18）感染可能是形成宫颈癌的原因。尽管宫颈癌研究在过去已经获得进展，然而一些最关键的工作因人组织模型的缺乏而受阻。同样，关于卵巢癌、子宫癌、子宫纤维瘤、或子宫内膜异位的研究也将极大受益于宫颈、子宫、输卵管（法娄皮欧氏管）、和阴道的人组织模型的获得。

女性生殖系统的宫颈、子宫、输卵管、和部分阴道是在胚胎发生的早期由米勒管（也称为副中肾管）形成的。在人类胚胎中，原始性腺发育成原始性腺。在怀孕大约7周时，两性都具有原始生殖管和原始性腺，后者发育成皮质和髓质。在遗传女性中，皮质发育成米勒管，而髓质退化。相反，在遗传男性中，髓质发育成睾丸，而皮质退化。

随着人类胚胎发育的进行，随着米勒抑制物（或MIS）的分泌，男性的米勒管开始退化（Ganong, William F., 《Review of Medical Physiology》即医学生理学回顾，第23章“The Gonads: Development and Function of the Reproductive System”即性腺：生殖系统的发育和功能，第15版，Appleton和Lange, 1991）。米勒管是沿着与中肾管约略平行的中肾延伸并腾空形成泄殖腔的两对胚管。在女性中，米勒管的上部形成输卵管，而下部融合形成子宫、宫颈、和部分阴道。

关于米勒管的先前工作集中于米勒管的解剖和结构特征。例如，一项研究揭示了鸟类中极其类似人的米勒管的运动和米勒管的免疫组织化学染色（Jacob, M. 等人, Cells Tissues Organs, 164 (2): 63-81, 1999）。在另一项研究中，通过超声波检查人类胎儿来研究发育中的尿殖道（Lawrence, W.D. 等人, American Journal of Obstetrics and Gynecology, 167 (1): 185-193, 1992）。其它研究聚焦于发育中胎儿的基因表达模式（Pellegrini, M. 等人, Anat. Embryol., 196 (6): 427-433, 1997）。虽然这些研究在其各自领域是重要的，但是它们没有提供关于分离米勒管衍生上皮细胞的方法的任何传授，它们也没有提供关于培养米勒管衍生上皮细胞并使之保留多能性的方法的方法的任何传授。只有很少（如果有的话）的报告是关于已经分离的米勒管衍生上皮细胞，关于具有分化成子宫、宫颈、输卵管、和阴道细胞的多能性的米勒管衍生上皮细胞的报道更少。因此，需要发现米勒管衍生上皮细胞群体，和分离并表征米勒管衍生上皮细胞的方法。本文公开的发明满足了这些需要，并公开了其它使用方法。

发明概述

在一个方面，本发明涉及基本纯的人米勒管衍生上皮细胞群体，它们具有分化成输卵管、子宫、阴道、或宫颈细胞的多能性。

在另一方面，本发明涉及分离基本纯的人米勒管衍生上皮细胞群体的方法，它们具有分化成输卵管、子宫、阴道、和宫颈细胞的多能性。

在还有一个方面，本发明涉及维持基本纯的人米勒管衍生上皮细胞群体的方法，它们具有分化成输卵管、子宫、阴道、和宫颈细胞的多能性，以及维持或培养这些米勒管衍生上皮细胞并使之保持多能性的方法。

在还有一个方面，本发明涉及向异源受体提供免疫原的来源的方法，以及基本纯的米勒管衍生上皮细胞群体作为免疫原的用途。

在还有一个方面，本发明涉及通过使用基本纯的米勒管衍生上皮细胞群体或由其分化的细胞作为米勒管衍生细胞的来源并将米勒管衍生上皮细胞施用于非人哺乳动物受体来生成米勒管衍生细胞或由其分化的细胞（即输卵管、子宫、阴道、和宫颈细胞）的人组织模型的方法。

在另一方面，本发明涉及提供细胞疗法的方法，即将基本纯的人米勒管衍生上皮细胞群体或由其分化的细胞导入受体。

在另一方面，本发明涉及提供药物开发手段的方法，其中基本纯的人米勒管衍生上皮细胞群体用作米勒管衍生生物学成分的来源，其中一种或多种上述米勒管衍生生物学成分是中药物开发的作用靶。

在另一方面，本发明涉及提供生物测定法开发的方法，其中基本纯的人米勒管衍生上皮细胞群体用作核酸或蛋白质的来源，其中核酸或蛋白质用作生物测定法或生物测定法开发中的一种或多种主要成分。

图的简述

本专利的文件包括至少一幅彩图。专利和商标事务所将在收到请求和必需的费用后提供本专利及彩图的拷贝。

图1A显示了在相差显微镜下看到的米勒管上皮（MTE）细胞，呈紧密的上皮细胞集落。

图1B显示了在相差显微镜下看到的MTE细胞，在培养物中具有高密度时MTE细胞形成圆顶样结构（由箭头指示）。

图1C显示了在相差显微镜下看到的MTE细胞，具有平滑细胞外形和

纤细的突起。这种细胞形态类似子宫内皮细胞培养物。

图2显示了关于MTE细胞上几种标记的免疫过氧化物酶染色的显微照片。图2A显示了MTE细胞关于细胞角蛋白19的染色。图2B显示了MTE细胞关于细胞角蛋白10、11、和18的染色。图2C显示了MTE细胞关于细胞角蛋白13和16的染色。图2D显示了MTE细胞关于波形蛋白的染色。

图3显示了RT-PCR实验结果，其中将Hoxa9、Hoxa10、和Hoxa11基因特异的PCR引物用于检测由MTE细胞提取的总RNA中的HOX基因转录本。箭头指示HOX基因转录本条带的预期大小。

图4显示了移植到裸鼠中的米勒管上皮细胞移植重组体的组织学分析结果。MTE细胞形成类似子宫内皮和输卵管的构造。“M”指示间充质部分，“L”指示内腔，长箭头指示顶端上皮的位置，短箭头指示腺上皮的位置。

发明实施方式

为了帮助本领域技术人员实践本发明而提供下文详述。不应将详述解释成对本发明的限制，因为本领域普通技术人员可以修改本文公开的实施方案而不违背本发明的精神和范围。在整篇公开书中，引用了多种发表物、专利、和已发表专利说明书作为参考。将这些发表物、专利、和已发表专利的公开书完整收入本公开书作为参考。

除非另有说明，本发明的实践将采用免疫学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、和重组DNA的常规技术，它们属于本领域的技术范围之内。参阅例如《MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL》即分子克隆：实验室手册，Sambrook等人，第2版，1989；《CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY》即分子生物学通用方案，F. M. Ausubel等人编，1987；《METHODS IN ENZYMOLOGY》即酶学方法丛书，Academic出版公司，PCR 2: PRACTICAL APPROACH即PCR 2: 实践方法，M. J. MacPherson、B. D. Hames、和G. R. Taylor编，1995；《ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL》即抗体：实验室手册，Harlow和Lane编，1988；和《ANIMAL CELL CULTURE》即动物细胞培养，

R. I. Freshney编, 1987.

定义

在用于说明书和权利要求书时, 单数形式“一个”和“一种”包括复数指称, 除非文章另有清楚说明。例如, 术语“一个细胞”包括一群细胞, 还包括它们的混合物。

在用于说明书和权利要求书时, 术语“米勒管衍生上皮细胞”、“米勒管衍生细胞”、和“米勒管细胞”可以互换, 指由人米勒管衍生的细胞。这些细胞能够分裂, 而且尚未开始定型为基本不分裂的终端分化阶段。“米勒管衍生上皮细胞”和“米勒管细胞”最初衍生自人胚的副中肾嵴。尽管男性和女性胚胎都具有米勒管, 然而男性的米勒管随着胚胎发育、随着米勒抑制物(MIS)的分泌而退化, 而女性的米勒管发育成输卵管、子宫、子宫内膜、宫颈、和阴道上部。

“米勒管上皮细胞”和“MTE细胞”在本文中可以互换, 指在标准体外细胞条件下培养的米勒管衍生上皮细胞。

在用于本文时, “副中肾管”和“米勒管”可以互换。“副中肾管”和“米勒管”衍生自胚胎发育早期的原始生殖管。

“多能性”指细胞仍能成为多种细胞但不再能够成为体内任何细胞类型(即全能性)的阶段。

在用于本文时, “由预定的米勒管衍生的”指多能细胞越过作为原始性腺嵴的一部分的阶段且在最终分化的米勒管衍生细胞(诸如成熟的输卵管、子宫、宫颈、和阴道细胞)阶段之前的发育阶段。称为“由预定的米勒管衍生的”细胞被定型成为米勒管衍生细胞, 但尚未开始发育成最终分化的米勒管衍生细胞。引起预定的米勒管衍生细胞开始分化的因素是不同的。非限制性范例包括暴露于激素(如雌激素、孕酮、促黄体素、等)、与周围组织(即间充组织)的细胞-细胞接触、和细胞的微环境。

“抗体”指能够结合抗原的免疫球蛋白分子。在用于本文时, 该术语不仅涵盖完整的免疫球蛋白分子, 还包括抗独特型抗体、突变体、

片段、融合蛋白、人源化蛋白质、和包含具有所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的修饰。

术语“抗原”指包含抗体能够结合的一个或多个表位的分子。抗原可能是具有免疫原性的分子，即能够诱导免疫应答。抗原被认为是一类免疫原。在用于本文时，术语“抗原”意欲指全长蛋白及其包含一个或一群表位的肽片段。

术语“表面抗原”和“细胞表面抗原”在本文中可以互换，指细胞的质膜成分。这些成分包括但不限于整合型和外周型膜蛋白、糖蛋白、多糖、脂类、和糖基磷脂酰肌醇（GPI）连接蛋白。“整合型膜蛋白”指穿越细胞质膜脂双层的跨膜蛋白。典型的整合型膜蛋白包含至少一个跨膜区段，它通常包含疏水氨基酸残基。外周型膜蛋白不伸入脂双层的疏水内部，它们通过与其它膜蛋白的非共价相互作用而结合膜表面。GPI连接蛋白是通过插入脂双层的脂尾而停留在细胞表面的蛋白质。

术语“单克隆抗体”在用于本文时指具有基本同质的抗体群体的抗体组合物。它并非意欲限制抗体的来源或生成方式（如通过杂交瘤或重组合成）。单克隆抗体是高度特异的，针对单一的抗原位点。与通常包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的常规（多克隆）抗体制剂相反，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

“单克隆抗体群体”指一群异质单克隆抗体，即群体所包含的各个单克隆抗体可能识别彼此不同的抗原决定簇。

“免疫原”指能够诱导免疫应答的任何物质。将称为免疫原的物质描述成具有“免疫原性”。诱导免疫应答包括但不限于激活体液应答（如生成抗体）或细胞应答（如引发细胞毒性T细胞）、炎症应答（如募集白细胞）、和分泌细胞因子和淋巴因子。

术语“异源”在指称用于免疫或移植的细胞时指细胞衍生自基因型与受体不同的实体。例如，异源细胞可以衍生自相对于受体的不同物种或相同物种的不同个体。衍生自一种物种的个体的胚细胞与相同物种的成体是异源的。“异源”在指称受体时指受体的基因型与将要

导入受体的细胞的来源不同。

“外植体”指取自人胎的米勒管组织。通常将外植体用作米勒管衍生细胞的来源。可以通过几种方法由外植体分离细胞。一种方法是将米勒管组织外植体（整个组织或切成小块）置于已知成分基本培养基中，并使米勒管的细胞由实体组织块自然迁移到培养基中。另一种方法是将米勒管组织进行酶促消化或机械处理，促使细胞离开实体组织。

若细胞衍生自胚胎的三种胚层（外胚层、内胚层、或中胚层）之一，则细胞分别具有“外胚层”、“内胚层”、或“中胚层”起源。外胚层是外层，生成表皮细胞和神经系统。内胚层是内层，生成消化管的内衬及其相关器官。中间层即中胚层生成几种器官（包括但不限于心脏、肾脏、间皮、和性腺）、结缔组织（如骨、肌肉、腱）、和血细胞。

术语“培养基”和“细胞培养基”可以互换，指培养过程中哺乳动物细胞生长其中的水性微环境。培养基包含物理化学、营养、和激素微环境。

当血清在培养基中的体积百分比不能屏蔽细胞表面的抗原性位点或抗体结合位点时，则细胞培养基“基本不含血清”。通常在细胞培养基包含低于大约50%（体积比）、优选低于大约25%、甚至更优选低于大约5%、最优选低于大约0.1%的血清时，采用术语“基本不含血清”。

当在至少大约50%、更优选至少大约75%、甚至更优选至少大约90%、最优选至少大约95%的米勒管上皮细胞表面上，没有衍生自血清的血清生物分子结合细胞表面，使得抗原位点或抗体结合位点受到结合或不能受到抗体或其部分的抗原识别，则此时细胞表面“基本不含血清生物分子”。可以通过显微镜或流式细胞计量术测量细胞大小，从而测定细胞表面。例如，各种已知大小的合成珠常用于校准流式细胞计量术。可以将少量的校准珠与MTE细胞混和，并通过流式细胞计量术分析产生的群体。然后可以将MTE细胞与校准珠的大小进行比较。既

然珠的大小是已知的，那么就可以实现细胞表面积的计算。

在用于本文时，“基本纯的”米勒管上皮细胞群体指包含至少大约85%、优选至少大约90%、甚至更优选至少大约95%或更多米勒管上皮细胞的细胞群体。

“已知成分培养基”、“基本细胞维持培养基”、“营养培养基”、和“基本营养培养基”在本文中可以互换，指包含培养过程中细胞存活和/或生长所必需的营养和激素需求且其成分已知的培养基。通常通过加入生长和/或存活所必需的营养物和生长因子来配制已知成分培养基。已知成分培养基通常提供至少一种来自下列一项或多项的成分：1) 所有必需氨基酸，通常是基本的一套20种氨基酸加胱氨酸；2) 能源，通常是碳水化合物的形式，诸如葡萄糖；3) 维生素和/或有低浓度需要的其它有机化合物；4) 游离脂肪酸；和5) 微量元素，其中微量元素定义为通常有很低浓度（通常是微摩尔级范围）需要的无机化合物或天然存在元素。已知成分培养基还可任选的添加一种或多种来自下列任何项的成分：1) 一种或多种促有丝分裂剂；2) 盐和缓冲液，例如钙、镁、和磷酸盐；3) 核苷和碱基，诸如腺苷、胸苷、次黄嘌呤；和4) 蛋白质和组织水解物。

在用于本文时，“条件培养基”指不含完整细胞、MTE细胞曾在其中生长的培养基。在营养培养基中生长的米勒管衍生细胞可能释放可促进前分化原始状态的米勒管上皮细胞连续存活、生长、和维持的因子。条件培养基可用于重建细胞沉淀，或者加到早已存在于培养板中的细胞中。条件培养基可以单独使用，或者添加到用于饲养米勒管衍生细胞的营养培养基中。既然条件培养基衍生自营养培养基，而且本文所述营养培养基基本不含血清，那么条件培养基也基本不含血清。

“标准保温条件”指在放置细胞的保温箱中为了组织培养而设计的物理化学条件。标准保温条件通常是大约37℃和大约5% CO₂及增湿。应当在无菌条件下执行所有组织培养技术和设备。

“米勒管上皮细胞聚集体”、“MTE聚集体”、和“MTE细胞球”在全文中可以互换，指一块米勒管上皮细胞单层，即在物理上紧密接

近且具有细胞-细胞接触的成片细胞。

“移植重组体”在用于本文时指米勒管上皮细胞聚集体与间充组织一起放置的组合单位。间充组织可以具有米勒管衍生的或非米勒管衍生的来源。间充组织可以来自移植受体的异源物种。间充组织还可以来自米勒管上皮细胞来源的异源物种。可以将移植重组体在底层(优选柔软的生物学底层,如琼脂)上保温一段时间,即大约1小时-96小时、更优选大约6小时-48小时、甚至更优选过夜(大约24小时)。

“血清”在用于本文时指哺乳动物血液在血液凝结后剩余的流动相。

“血清生物分子”在用于本文时指在血清中发现的生物学组合物。范例包括但不限于清蛋白、 $\alpha 1$ -球蛋白、 $\alpha 2$ -球蛋白、 β -球蛋白、和 γ -球蛋白。血清生物分子可以包括在血清中自然发现的或衍生自对血清的加工和处理的生物学组合物(整个或部分)。

术语“哺乳动物”指温血脊椎动物,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔、猿猴、运动动物、和宠物。

米勒管上皮细胞的分离和维持

本发明的米勒管上皮细胞是由人胎米勒管衍生组织分离得到的。胎儿的年龄在大约1周-大约40周之间、优选大约8周-大约30周之间、甚至更优选大约17周-大约25周之间。可以通过大体解剖、外观、和在胎儿中的定位来鉴定米勒管衍生组织。辨别米勒管的外观特征是沿着与中肾管约略平行的中肾延伸并在女性中腾空形成泄殖腔的两对胚管,管的上部形成输卵管,而下部融合形成子宫和部分阴道。一旦进行了鉴定,将胎儿米勒管衍生组织与过量的结缔组织分开,用基本培养基清洗五次,然后进行显微解剖。显微解剖的目的是将实体组织分成完整组织块的小块使得基本营养培养基更多的接触组织块中的米勒管衍生细胞,和/或将米勒管衍生细胞与米勒管组织块分开。显微解剖的非限制性范例包括实施机械剪切强制的装置(即匀浆器、钵与杵、捣碎机、等)、实施切割或撕裂的装置(即解剖刀、注射器、镊子、

等)、或超声装置。或者,显微解剖胎儿米勒管衍生组织的另一种方法是使用酶处理。本领域众所周知用于显微解剖组织的多种酶。一种方法包括在维持由米勒管衍生组织分离的细胞存活的缓冲培养基中使用胶原酶-分散酶消化经部分剪切的米勒管衍生组织。酶量取决于胎儿的年龄和米勒管组织的大小。在一个实施方案中,使用胶原酶-分散酶的酶处理可能降低总的细胞产量。因此,应降低酶的用量,或者根本不用。在其它实施方案中,酶处理可能增加总的细胞产量。因此,可以单独使用酶处理,或者联合显微解剖方法。有极其多种基本细胞维持培养基可用于将液体的pH维持在促进米勒管上皮细胞存活的范围内并提供能够在其中进行酶促消化的额外体积。非限制性范例包括F12/DMEM、Ham氏F10(Sigma)、CMRL-1066、极限必需培养基(MEM, Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、Dulbecco氏修改Eagle氏培养基(DMEM, Sigma)、和Iscove氏修改Eagle氏培养基(IMEM)。另外,可以使用Ham和Wallace, Meth. Enz., 58: 44, 1979; Barnes和Sato, Anal. Biochem., 102: 225, 1980; 或Mather J.P.和Roberts P.E., 1998, 《Introduction to Cell and Tissue Culture》即细胞和组织培养导论, Plenum出版社, 纽约中描述的任何基本营养培养基。

然后将小块米勒管组织置于基本细胞维持培养基中。可以使用多种基本细胞维持培养基。范例包括但不限于Ham氏F12培养基、RPMI-1640、和CMRL-1066。为了获得促进米勒管上皮细胞存活和生长的更佳条件,可以向基本培养基中添加多种营养物。范例包括但不限于胰岛素、转铁蛋白、 α -生育酚、和抑酶肽。在一个优选实施方案中,使用下列量的营养物来促进米勒管上皮细胞的存活和生长: 至少大约10ng/ml 胰岛素且不超过大约1mg/ml 胰岛素, 更优选大约10 μ g/ml 胰岛素; 至少大约1 μ g/ml 转铁蛋白且不超过大约100 μ g/ml 转铁蛋白, 更优选大约10 μ g/ml 转铁蛋白; 至少大约0.1 μ g/ml α -生育酚且不超过大约1mg/ml α -生育酚, 更优选大约5 μ g/ml α -生育酚; 至少大约1 μ g/ml 抑酶肽且不超过大约100 μ g/ml 抑酶肽, 更优选大约5 μ g/ml 抑酶肽。

米勒管上皮细胞由米勒管组织迁移至米勒管组织所处培养基中。在一个实施方案中，米勒管上皮细胞以聚集体形式由米勒管组织迁移至培养基中。在另一个实施方案中，米勒管上皮细胞以单细胞形式由米勒管组织迁移至培养基中。在另一个实施方案中，由米勒管组织迁移出来的米勒管上皮细胞不再包埋在米勒管组织中，而是与该组织松散相连。然后将米勒管衍生细胞重悬于基本细胞维持培养基。可以在未经或经过不同底层包被的组织培养容器（即烧瓶、平板、等）中培养米勒管上皮细胞。可以使用的底层的非限制性范例包括纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原、聚赖氨酸、硝酸纤维素、尼龙、和聚四氟乙烯。在一个实施方案中，在经层粘连蛋白包被的组织培养容器中在上文所述优选营养培养基中培养米勒管上皮细胞。在另一个实施方案中，在未经包被的组织培养容器中在上文所述优选营养培养基中培养米勒管上皮细胞。组织培养容器的大小与将要置于容器中的米勒管组织的量成正比。熟练技术人员可以通过逐步增加置于组织培养容器中的米勒管组织来确定组织培养容器的正确大小。当首次将米勒管组织置于组织培养容器中时，培养基就总浊度而言通常是清澈的。当米勒管衍生细胞由米勒管组织碎块迁移出来后，培养基将变得越来越不透明和越来越混浊。当由于由米勒管组织迁移出来的米勒管衍生细胞的数量增加或由于米勒管衍生细胞的生长而培养基高度混浊时，向组织培养容器中加入更多营养培养基以补充米勒管细胞消耗掉的营养物。或者，当随着米勒管上皮细胞的数量增加而培养基变得混浊时，可以由组织培养容器中取出少量细胞并检查细胞存活力，例如通过锥虫蓝染色。已经超越限度容纳过多细胞的组织培养容器将开始显示细胞存活力下降。熟练技术人员就可以将组织培养容器的内容物转移至更大（如更大的体积）的其它容器以容纳数目渐增的细胞。在一个实施方案中，将组织培养容器的整个内容物转移至更大体积的另一个容器。在另一个实施方案中，将米勒管细胞悬浮液分配到装有新鲜营养培养基的几个分开的组织培养容器中（也称为“传代培养”）。以这种方式可以获得基本纯的米勒管细胞群体。

可以在未经或经过不同底层包被的组织培养容器（如烧瓶、平板、等）中培养培养的米勒管细胞或米勒管上皮（MTE）细胞。可以使用的底层的非限制性范例包括纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原、聚赖氨酸、硝酸纤维素、尼龙、和聚四氟乙烯。当在具有或没有底层的优选营养培养基中培养时，MTE细胞形成单层。在一个实施方案中，在未被包被的组织培养瓶中生长的MTE细胞形成单层。在另一个实施方案中，在优选营养培养基中处于高密度的MTE细胞形成闭合的膨胀囊，其自由漂浮在优选营养培养基中。在还有一个实施方案中，MTE细胞在组织培养容器中形成单层片或单层聚集体。在还有一个实施方案中，MTE聚集体粘附于组织培养容器的表面并增殖形成单层细胞集落。可以传代培养这些集落以繁殖MTE细胞。多种方法可用于MTE细胞集落的传代培养。一种方法是通过酶处理使集落由塑料组织培养瓶壁脱附。在一个更优选的实施方案中，使用诸如胶原酶-分散酶等酶，其用量有效的使MTE聚集体由组织培养瓶壁解离同时保持细胞的聚集体结构。有效量是至少大约10%、更优选至少大约1%、最优选至少大约0.1%胶原酶-分散酶（体积比）。在MTE集落由组织培养瓶壁脱附后，用基本培养基（优选本文公开的营养培养基）洗去酶，并将MTE集落置于装有营养培养基（优选本文公开的营养培养基）的新瓶中。可以将全部MTE集落置于一个加入营养培养基的组织培养瓶中，或者将部分MTE集落置于一个加入营养培养基的组织培养瓶中。通过这种方式的传代培养，可以在至少大约2个月内、更优选至少1个月内、最优选至少2-3周内获得汇合的细胞培养物。或者，可以量渐增的加入诸如碱性成纤维细胞生长因子（FGF）和毛喉素等生长因子以刺激增殖。在有些实施方案中，加入的FGF和/或毛喉素可促进MTE细胞的更高增殖速率且不缩短寿命。因此，当熟练技术人员期望较高增殖速率时，可以加入FGF和/或毛喉素。在其它实施方案中，加入的FGF和/或毛喉素可促进MTE细胞的更高增殖速率但缩短MTE细胞的寿命。因此，熟练技术人员可以根据他的需要来决定是否对MTE细胞数目增加的渴求高于对MTE细胞寿命的考虑。

饲养米勒管上皮细胞的频率取决于MTE细胞的营养物代谢速率。营

养物代谢速率越高，需要越频繁的饲养MTE细胞。一般而言，随着细胞代谢培养基中的营养物，培养基的酸度将升高。有些营养培养基（如RPMI-1640、DMEM、EMEM、等）具有指示酸度的培养基颜色，当培养基高度酸性时将变成明亮的粉红色。然后可以加入营养培养基，将原有培养基的酸度降至维持MTE细胞存活并促进MTE细胞生长的酸度。或者，可以由组织培养容器中取出一小部分MTE细胞并检查细胞存活力，例如通过锥虫蓝染色检查。若营养培养基已被代谢掉，则细胞存活力将变差（即低于50%）。在一个实施方案中，可以通过用新的营养培养基更换整个旧的营养培养基来饲养米勒管上皮细胞。在另一个实施方案中，可以用曾经培养这些细胞的条件培养基来饲养米勒管上皮细胞。因为要求保护的米勒管上皮细胞对于本发明而言是独特的，而且将分泌这些细胞特异的因子，所以由米勒管上皮细胞衍生的条件培养基也是独特的。促进米勒管上皮细胞存活和生长的饲养频率优选大约每周一次。本发明的米勒管上皮细胞可以传代多次（大约4-5次）而不衰老且未诱导这些米勒管上皮细胞分化成最终分化的子宫、宫颈、阴道、或输卵管细胞。

米勒管上皮细胞的表征

以本文公开的方式分离得到的本发明的米勒管上皮细胞群体具有几个定义特征。首先，米勒管上皮细胞处于可以描述成“由预定的米勒管衍生的”阶段。本发明的米勒管上皮细胞具有成为子宫、宫颈、阴道、或输卵管细胞的能力。可以通过形态学或特异标记或者这两种技术的联合来实现米勒管上皮细胞的鉴定。MTE细胞的形态表征为彼此紧密接近、具有细胞-细胞接触、且在紧密集落中生长的多边形或卵形细胞的单层结构。当MTE细胞在组织培养容器中处于高密度时，它们能够形成圆顶样结构。圆顶样结构的形成是腺上皮细胞的独特特征。圆顶样结构的形成指示MTE细胞在相邻细胞之间形成闭合连接或紧密连接。通过常规或冷冻断裂电子显微术，或者通过对闭合连接标记的染色（即闭合连接蛋白质ZO1、ZO2、等），可以使闭合连接显现出来。

除了形成圆顶样结构，MTE细胞还能够将蛋白质分泌到圆顶的内腔中。可以通过染料（即苏木精、曙红、等）的染色使蛋白质显现出来。MTE细胞能够呈现的其它形态是具有平滑外形和纤细突起的上皮细胞类型，与来自成人子宫内膜的子宫内膜上皮细胞培养物相似。

可用于检测MTE细胞的标记包括但不限于MTE细胞表面上的细胞角蛋白（CK）1、5、6、7、8、10、11、13、15、16、18、和19和波形蛋白。可以采用对CK和波形蛋白特异的抗体来评估这些细胞表面标记。可以使用的抗体的范例包括但不限于来自Sigma化学公司的抗细胞角蛋白（CK）抗体克隆4.62、克隆8.12、克隆8.13和来自Sigma化学公司的抗波形蛋白抗体克隆13.2。抗CK抗体和抗波形蛋白抗体可用于免疫组织化学或流式细胞计量术中对MTE细胞的直接或间接染色。

本发明的MTE细胞还可由HOX基因的表达来表征。HOX基因是在果蝇中沿前后轴确定位置数值的同源异型选择者基因的脊椎动物同系物。Hoxa9基因表达限于法娄皮欧氏管（输卵管），Hoxa10基因表达限于子宫内膜，Hoxa11基因表达限于宫颈内上皮细胞（Taylor, H. S. 等人, *Biology of Reproduction*, 57: 1338 - 1345, 1997）。使用本文公开的方法分离并培养MTE细胞，由MTE细胞提取总RNA，并使用对Hoxa9、Hoxa10、和Hoxa11基因序列特异的引物进行逆转录酶聚合酶链式反应（RT-PCR）。

本发明的MTE细胞还可由它们对不同激素或化合物的敏感性来表征。已知米勒抑制物（MIS）引起男性胚胎中米勒管的退化。将MIS应用于MTE细胞能够引起几种通过相差显微镜可观察到的细胞形态效应。或者，可以通过暴露于MIS来调控MIS受体的表达。可以通过流式细胞计量术及MIS受体特异抗体来评估受体表达。激素诸如孕酮、雌激素、或促黄体素（LH）能够影响MTE细胞。在女性胚胎中，暴露于孕酮和雌激素引起米勒管分化成子宫、输卵管、宫颈、和部分阴道。在暴露于LH后，可以使用相差显微镜对MTE细胞监测细胞形态效应。或者，可利用增殖实验监测细胞应答LH的生长。再或者，可以对MTE细胞进行子宫、宫颈、输卵管、或阴道组织特异标记的染色，并通过免疫组织化学或

流式细胞计量术进行分析。

在不含血清的培养基中将本发明的米勒管上皮细胞维持在可以描述成“由预定的米勒管衍生的”阶段的阶段。本文公开的基本细胞维持培养基或优选营养培养基或者条件培养基可用于在体外培养米勒管上皮细胞。本发明的米勒管上皮细胞具有在本文公开的优选无血清营养培养基中传代多次的能力。在每次传代的过程中和在每次传代后的任意时间点，多能性得到维持，本发明的米勒管上皮细胞能够分化成有功能的米勒管衍生细胞。另外，正如本文公开的，在每次传代后的任意时间点，米勒管上皮细胞可以用作免疫原、用于细胞疗法、用于生物测定法、用于建立人米勒管衍生模型、或用于药物发现和/或开发。

本发明米勒管上皮细胞的另一个特征是在移植到受体哺乳动物的肾膜下后能够分化成子宫、宫颈、输卵管、或阴道细胞。米勒管上皮细胞可以单层形式生长，然后联合间充组织并置于受体哺乳动物的肾膜下。优选的是，将人米勒管上皮细胞聚集体联合大鼠尿殖间充组织，并置于受体哺乳动物的肾膜下。可以取下部分移植物用于使用标记、形态学、或其联合的分析来鉴定米勒管衍生细胞及由其分化的细胞。

米勒管上皮细胞的用途

作为免疫原的用途

米勒管上皮细胞的一种用途是作为免疫原。正如本发明公开的，独特的无血清培养条件允许米勒管上皮细胞的细胞表面保持不含可能结合表面的血清蛋白质或血清生物分子。通过使用本文公开的无血清分离和培养技术，避免了抗原性位点可能被血清生物分子的结合所“屏蔽”的潜在问题。因此，可以生成针对最近才能够获得的、在使用含血清培养条件时被“屏蔽”的抗原的一组抗体。通过本文公开的方法分离和培养的米勒管上皮细胞可以作为免疫原施用于异源受体。可以通过几种方法来实现MTE细胞作为免疫原的施用。将MTE细胞作为免疫原施用于异源受体的方法包括但不限于：免疫接种、通过直接接触（诸如擦拭或刮涂装置）施用于膜、通过气雾剂施用于粘膜、和口服施用。

正如本领域众所周知的，免疫接种可以是消极的或积极的免疫。可以通过不同路径来执行免疫接种方法，包括但不限于腹膜内注射、皮内注射、局部注射。免疫接种的受试者包括哺乳动物，诸如小鼠。免疫接种的路径和方案通常遵循已建立的用于抗体刺激和生成的常规技术。虽然此实施方案采用小鼠，但是可以依照本发明方法操作任何哺乳动物受试者包括人或由此而来的抗体生成细胞，作为生成哺乳动物杂交瘤细胞系的基础。通常，将小鼠腹膜内接种免疫原性量的MTE细胞，然后用相似量的免疫原进行加强。或者，通过外科手术将在非生物学膜基质上生长的细胞移植到宿主哺乳动物腹膜内。最后一次加强后几天收集淋巴样细胞（优选来自小鼠的脾淋巴样细胞），并由此制备细胞悬浮液用于融合。

使用Kohler B.和Milstein C., *Nature*, 256: 495 - 497, 1975的一般体细胞杂交技术，依照Buck D.W.等人, *In Vitro*, 18: 377 - 381, 1982的修改方案，由淋巴细胞和永生化骨髓瘤细胞制备杂交瘤。可以利用的骨髓瘤系，包括但不限于X63-Ag8.653和来自美国加利福尼亚州圣迭戈市细胞分配中心（Cell Distribution Center）索尔克研究所（Salk Institute）的细胞系，可用于杂交。该技术包括使用融合剂诸如聚乙二醇或者通过本领域技术人员众所周知的电手段来融合骨髓瘤细胞和淋巴样细胞。融合后，将细胞与融合培养基分开，并在选择生长培养基诸如HAT培养基中培养，以消除未杂交的亲本细胞。本文所述任何培养基都可用于培养分泌单克隆抗体的杂交瘤。作为细胞融合技术的另一种变通，可以将EBV永生化B细胞用于生成本发明的单克隆抗体。如果需要，将杂交瘤进行扩增和亚克隆，并通过常规免疫测定流程（如放射免疫测定法、酶免疫测定法、或荧光免疫测定法）对上清液测定抗免疫原活性。

可以使用已知流程在体外或在体内培养生成这些抗体的杂交瘤。如果需要，可以通过常规免疫球蛋白纯化流程，诸如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、层析、和超滤，由培养基或体液分离单克隆抗体。若存在非期望活性，则可以通过例如使制剂流过由免疫原附着于固相而

制成的吸附剂并由免疫原洗脱或释放期望抗体而进行消除。

以这种方式，可以使用本发明的米勒管上皮细胞，生成针对米勒管上皮细胞特异性细胞表面抗原的一组新抗体。一旦通过本文公开的方法生成了针对米勒管上皮细胞上的细胞表面抗原的单克隆抗体，抗体就具有几种用途。为了构建重组抗体或人源化抗体，可以将抗体测序和克隆。米勒管上皮细胞特异抗体的其它用途包括但不限于生物学测试或纯化（即通过诸如流式细胞计量术和淘选等方法来分离米勒管衍生上皮细胞）、治疗性用途（即通过抗体与靶细胞的结合来促进或阻滞细胞的生长或者通过抗体与靶细胞的结合来促进或阻滞细胞团的生长）、生物学标记（即其它米勒管衍生细胞或非米勒管衍生细胞的鉴定）、和临床诊断（即癌性子宫、宫颈、输卵管、或阴道细胞的鉴定）。

作为免疫原的另一种用途是调控异源受体中总的免疫应答。正如本领域详细记录的，导入异源受体的外源物质诸如细胞或器官可以诱导多种免疫应答。免疫应答可能是排斥（如在器官移植中）、T细胞激活（如交叉引发）、无反应性、或耐受的形式。总的免疫应答可能是全身的或局部的。在期望局部免疫应答的情况中，例如在性腺区域中，以有效量将免疫原诸如米勒管上皮细胞导入性腺区域。可以将量渐增的米勒管上皮细胞导入异源受体，随后监测免疫应答，由此以逐步方式测定有效量。可以通过许多方法来监测总的免疫应答（如抗体生成、细胞因子生成、T细胞增殖、无反应性、耐受、等），包括但不限于ELISA、增殖实验、使用细胞表面标记的流式细胞计量术、和免疫组织化学。

米勒管上皮细胞用于药物发现的用途

米勒管上皮细胞的另一种用途涉及药物发现。既然尚未以本文公开的方式分离和培养预定的多能米勒管上皮细胞群体，那么米勒管上皮细胞群体可能分泌迄今尚未发现或表征的蛋白质。使用血清的先前培养技术可能抑制蛋白质的分泌。或者，当蛋白质分泌和与血清生物分子相互作用时，它们的功能、构象、或活性可能发生变化。由米勒管上皮细胞分泌的蛋白质受到来自血清生物分子的最小干涉，因而可

能在生理学和拓扑学上更准确。因此，由米勒管上皮细胞分泌的蛋白质可以作为作用靶用于药物开发。在一个实施方案中，可以将药物制成在体内靶向米勒管上皮细胞和/或由其分化的细胞上的特异蛋白质。药物的结合可能促进米勒管上皮细胞分化成子宫、宫颈、输卵管、和阴道细胞。当期望子宫、宫颈、输卵管、或阴道细胞新生时，例如在部分和完全子宫切除或组织损伤的情况中，这种方法可能是有用的。

米勒管上皮细胞用于细胞疗法的用途

在另一种用途中，将米勒管上皮细胞系用于细胞疗法。米勒管上皮细胞及其衍生的细胞的移植是细胞疗法的这样一种范例。在期望成熟性腺细胞诸如子宫、宫颈、输卵管、子宫内膜、和阴道细胞的情况中，可以使用本发明的米勒管衍生细胞，因为它们具有分化成子宫、宫颈、输卵管、子宫内膜、和阴道细胞的能力。为了实践这种用途，使用本文公开的方法分离米勒管上皮细胞，并在不含血清的已知成分营养培养基中进行培养。在经过或未经底层包被的组织培养容器中培养米勒管上皮细胞以获得米勒管上皮细胞单层聚集体。将米勒管上皮细胞聚集体在标准保温条件下培养至少大约一次细胞周期传代、更优选至少大约两次细胞周期传代、最优选至少大约三次细胞周期传代。然后将米勒细胞聚集体施用于受体并使之分化。或者，米勒细胞聚集体可用作基因疗法的细胞载体，其中用一种或多种基因转染米勒细胞，装入投递装置，然后施用于受体。在另一个实施方案中，将米勒细胞聚集体置于肾膜下，并使之分化成子宫、宫颈、输卵管、和阴道细胞。在另一个实施方案中，将米勒细胞聚集体用于包含细胞且限制其它细胞接近的装置（即Theracyte®），以限制免疫系统应答。

米勒管上皮细胞用于生成组织模型的用途

米勒管上皮细胞的另一种用途是在非人哺乳动物中构建人组织模型。将米勒管上皮细胞聚集体置于间充组织的顶端以形成移植重组体。间充组织可以是米勒管衍生组织或非米勒管衍生组织，而且可以衍生自与用于分离米勒管上皮细胞的物种不同的物种。在一个工作实施例中，将人米勒管上皮细胞置于大鼠间充尿殖组织的顶端以形成移植重

组体。通过首先使用本文公开的方法分离人米勒管上皮细胞，然后联合来自不同器官的间充组织，熟练技术人员可以逐步方式确定最佳组合。在有些实施方案中，使用不同物种（如大鼠）作为间充组织的来源，与人米勒管上皮细胞联合。异源物种的使用允许将人特异标记用于测定已分化米勒管衍生细胞的身份。若使用大鼠间充组织，则假阳性的可能性降低。同样，使用尿殖间充组织取代米勒管衍生间充组织降低了鉴定已分化米勒管衍生细胞时假阳性的可能性。将包含米勒管上皮细胞球且其置于间充组织上的移植重组体在柔软底层（诸如琼脂）培养优选大约半天 - 大约3天、更优选大约1天，然后置于受体哺乳动物的肾膜下。可能的受体哺乳动物包括但不限于小鼠和大鼠。通常，在移植部位，供体组织容易受到受体免疫系统的攻击。为了减轻移植排斥，可以使用几种技术。一种方法是以亚致死剂量辐射照射受体，以破坏可能攻击移植物的免疫细胞。另一种方法是给予受体以环孢菌素或其它T细胞免疫遏制药。在使用小鼠作为受体哺乳动物时，多种方法可能减轻移植排斥。这样的一种方法是使用免疫缺陷小鼠（裸鼠或重度联合免疫缺陷或SCID）。在一个工作实施例中，将人米勒管上皮细胞球置于大鼠尿殖间充组织上，并置于免疫缺陷小鼠的肾膜下。将移植重组体在受体中保留大约1周 - 大约52周、优选大约5周 - 大约40周、甚至更优选大约6周 - 大约8周之后，收获移植物并分析米勒管上皮细胞分化。在有些情况中，需要移植物的一小部分用于分析。在免疫组织化学分析中可以利用本文公开的MTE细胞及其衍生的细胞的特异标记。另外，这些标记的一种或多种的联合可以联合细胞形态学使用，以测定移植的功效。

在一个实施方案中，可以在SCID（重度联合免疫缺陷）小鼠中构建人米勒管衍生模型。可以如下构建这种人米勒管衍生模型：使用通过本文公开的方法分离和培养人米勒管上皮细胞，使用人米勒管上皮细胞生成移植重组体，然后将移植重组体置于小鼠的肾膜下。在植入肾膜下大约1 - 10周、优选大约6 - 8周后，收获移植物或其部分，并进行免疫组织化学分析。可以使用的米勒管衍生细胞上的细胞表面标记

包括但不限于CK1、5、6、7、8、10、11、13、15、16、18、和19和波形蛋白。将本文公开的抗CK抗体或抗波形蛋白抗体用于分析组织模型系统的功效。或者，可使用米勒管衍生组织的已分化细胞中的受体（诸如雌激素受体和孕酮受体）特异标记。评估米勒管上皮细胞分化结果的还有一种方法是形态学。米勒管上皮细胞具有多边形或卵形外观，而已分化细胞类型具有与上皮细胞一致的形态，这对于本领域普通技术人员是众所周知的。为了更完整的评估，可以将形态学联合细胞表面标记使用。

米勒管上皮细胞在生物测定法中的用途

本文公开的米勒管上皮细胞可用于多种生物测定法。在一种用途中，将米勒管上皮细胞用于测定哪种生物学因子是分化所必需的。通过以逐步方式使用米勒管上皮细胞并联合不同生物学化合物（诸如激素、特定生长因子、等），可发现一种或多种特定生物学化合物能够诱导成为子宫细胞的分化。采用相同的逐步联合，可发现一种或多种特定生物学化合物能够诱导成为输卵管细胞的分化，这对宫颈和阴道细胞同样是可能的。米勒管上皮细胞在生物学测定法中的其它用途是差异显示（即mRNA差异显示）和使用来自米勒管上皮细胞的分泌型蛋白质的蛋白质-蛋白质相互作用。可以通过诸如酵母双杂交系统等技术来测定蛋白质-蛋白质相互作用。来自米勒管上皮细胞的蛋白质可用于鉴定与米勒管上皮细胞相互作用的其它未知蛋白质或其它细胞类型。这些未知蛋白质可以是下列一种或多种：生长因子、激素、酶、转录因子、翻译因子、和肿瘤抑制基因。涉及米勒管上皮细胞和这些细胞形成的蛋白质-蛋白质相互作用和蛋白质-蛋白质或甚至细胞-细胞接触的效果的生物测定法可用于测定周围组织（诸如间充组织）如何促进米勒管上皮细胞的分化。

下列实施例提供了分离、表征、和使用米勒管上皮细胞的详述。这些实施例并非意欲以任何方式限制本发明。

实施例

实施例1: 米勒管上皮细胞的分离

由加利福尼亚州Alameda县的Advanced Bioscience Research即高级生物科学研究所获得孕龄17-25周的人胎米勒管组织。当组织抵达后,立即将米勒管清除过多的结缔组织,并在显微镜下用刀片或剪刀切成小段。

将每个样品的小段米勒管置于T75组织培养瓶中。培养基是添加10 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素、10 $\mu\text{g/ml}$ 转铁蛋白、5 $\mu\text{g/ml}$ α -生育酚、和5 $\mu\text{g/ml}$ 抑酶肽的无血清F12/DMEM,培养条件是37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 。没有加入附着因子。小段米勒管中的上皮细胞增殖,迁移出来,并在原代培养的第一周附着于塑料表面。有些小段形成闭合膨胀囊并漂浮在培养基中。大多数小段组织保留在悬浮液中。附着于瓶壁上的上皮细胞增殖而形成大型集落。集落的大小在大约2周内达到直径大约1-2cm。此时,可以将细胞传代培养用于增殖。

可以用0.1% (体积比) 胶原酶-分散酶处理MTE细胞集落。该酶混合物使细胞由塑料表面脱附,并使细胞保持小型单层聚集体形式。用营养培养基洗去酶后,以1:10的稀释因子在营养培养液中涂布MTE细胞。涂布效率较低,但是细胞级分在传代培养后的第一周贴壁,并在2-3周内产生汇合的细胞培养物。每周补充培养基。碱性成纤维细胞生长因子(FGF)和毛喉素能够刺激细胞增殖,但是生长因子似乎会缩短细胞的寿命。以这种方式将细胞传代4-5次。

实施例2: 米勒管上皮细胞的表征

在相差显微镜下,根据形态将在原代培养中生长的细胞集落鉴定为都是上皮细胞。细胞保持彼此紧密接触。由MTE细胞呈现的细胞形态有两种。一种是紧密的上皮细胞集落(图1A)。这些MTE细胞经历了活泼的细胞分裂。MTE细胞显得较小。处于高密度时,MTE趋向于形成圆顶样结构(图1B,以箭头指示)。圆顶样结构指示MTE细胞在相邻细胞之间形成闭合连接。另外,MTE细胞将蛋白质分泌到圆顶的空腔中。另

外，处于高密度时，细胞能够在附着于塑料表面的最底层的上面形成第二层圆形细胞。

观察到的另一种形态是具有平滑外形和纤细突起的MTE细胞（图1C）。还在衍生自成人子宫内膜的子宫内膜上皮细胞培养物中观察到这种细胞形态。这可能是由于米勒管产生许多类型的上皮细胞（即输卵管、子宫、阴道、和宫颈）所致。

实施例3: MTE细胞关于细胞角蛋白和波形蛋白的免疫组织化学染色

将MTE细胞单层培养物用3%低聚甲醛原位固定大约1小时。或者，可以将MTE细胞单层培养物用乙醇于-20℃固定大约5秒钟，然后使之空气干燥。用磷酸盐缓冲液（PBS）洗去固定剂后，将细胞顺序在封闭缓冲液（5%山羊血清和0.1%吐温20溶于PBS）中保温大约30分钟，然后是一抗大约1小时，再然后是抗小鼠Ig-辣根过氧化物酶大约1小时，各步之间用PBS漂洗。所用一抗是来自Sigma化学公司的抗细胞角蛋白抗体克隆4.62、8.12、8.13（图3C）、和抗波形蛋白克隆VIM 13.2，使用供应商推荐的稀释度。为了呈现抗体对MTE细胞的染色，将MTE细胞在由Sigma片剂制备的过氧化物酶底物DAB/H₂O₂中保温。棕色产物指示存在特异抗原（图2）。MTE细胞中的细胞角蛋白染色大大强于MTE细胞中的波形蛋白染色。

实施例4: MTE细胞中HOX基因转录本的检测

未成熟米勒管上皮细胞表达所有三种HOX基因，Hoxa9、Hoxa10、和Hoxa11（Taylor, H. S. 等人, *Biology of Reproduction*, 57: 1338 - 1345, 1997）。Hoxa9限于输卵管细胞；Hoxa10限于子宫内膜细胞；而Hoxa11限于宫颈内上皮细胞。为了测试Hox基因的表达，由5代后的MTE细胞提取总RNA，并使用Hox特异引物通过RT-PCR扩增RNA。所用引物是：

Hoxa9: accagaactggtcggat 和 agaggtacctggagacgat (SEQ ID NOS: 1-2)

Hoxa10: cgcagaacatcaaagaagag 和 tgagaaaggcggaagtagc (SEQ ID NOS: 3-4)

Hoxa11: tacgtctcgggtccagat 和 atggcgtactctctgaaggt (SEQ ID NOS: 5-6)

在2%琼脂糖凝胶上将PCR产物分开，并用溴化乙锭将凝胶染色，以检测PCR条带。MTE细胞表达所有三种HOX基因（Hoxa9、Hoxa10、和Hoxa11）（图3）。该结果得到了原位杂交的进一步确认。

实施例5: MTE细胞用于构建人组织模型或细胞疗法的用途

将由3代后的单层培养物收获的MTE细胞与大鼠尿殖窦间充组织联合使用，以生成组织移植重组体。将移植重组体在琼脂板上培养大约24小时。然后，将移植重组体植入裸鼠（重度联合免疫缺陷或SCID小鼠）的肾膜下。使植入物生长大约2个月，然后切除移植重组体组织并进行组织学分析。结果显示MTE细胞形成类似子宫内膜或输卵管的_{结构}（图4）。

图 1

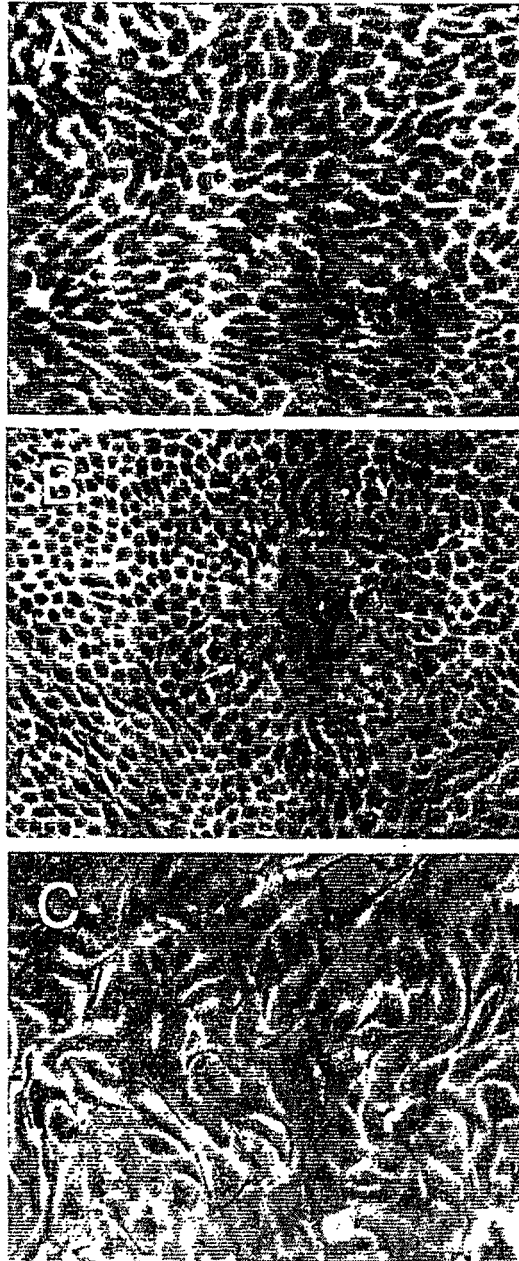


图 2

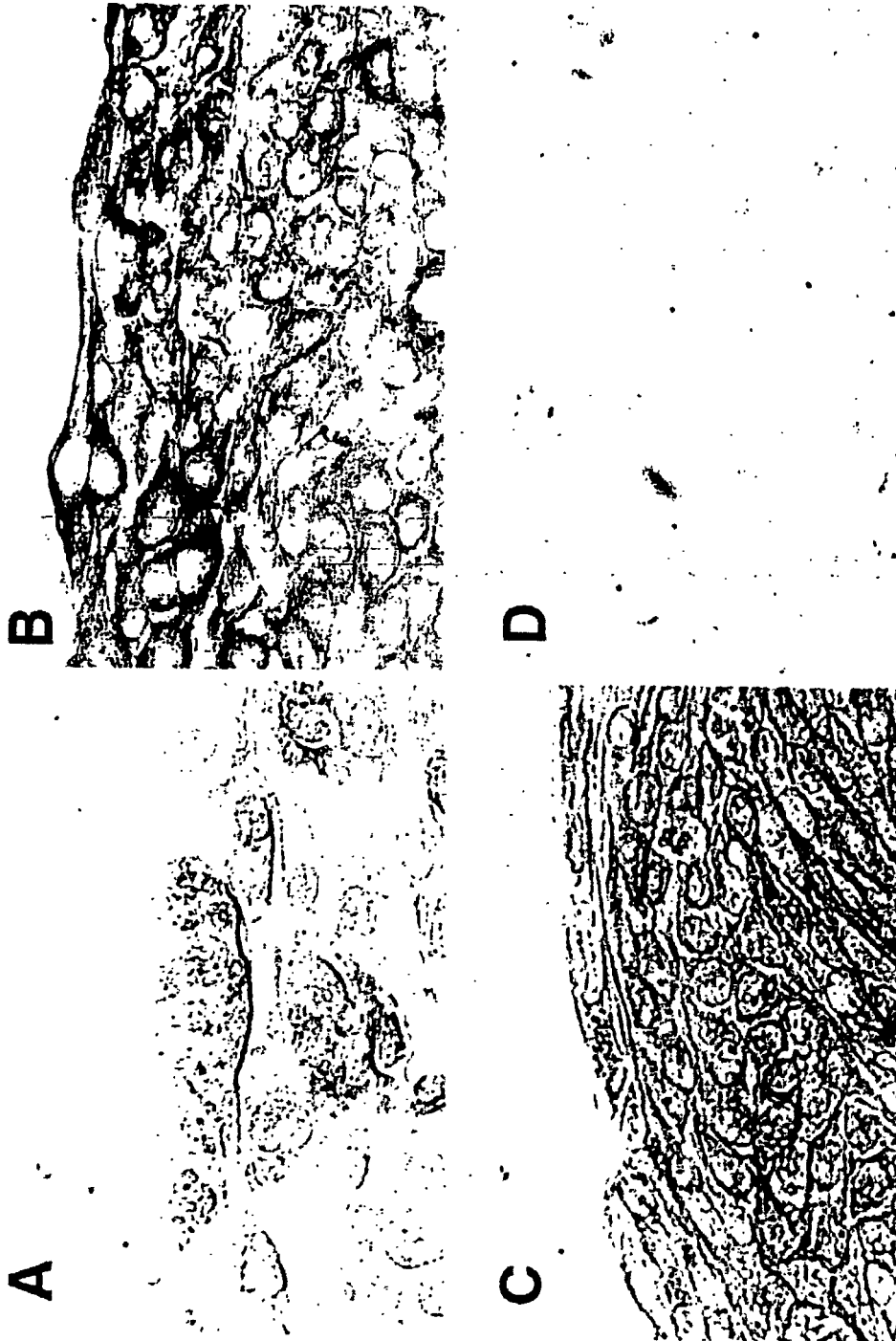


图 3

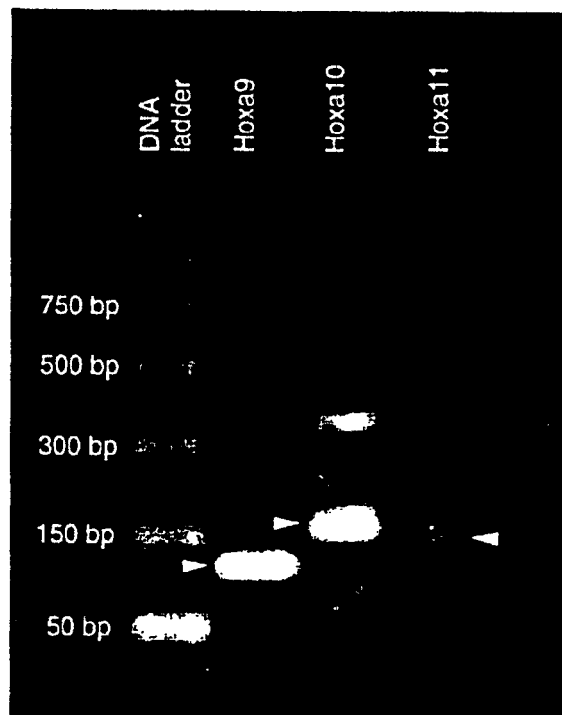


图 4



专利名称(译)	人米勒管衍生上皮细胞及其分离和使用方法		
公开(公告)号	CN1423692A	公开(公告)日	2003-06-11
申请号	CN01808098.7	申请日	2001-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	雷文生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	雷文生物技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	雷文生物技术公司		
[标]发明人	李荣皓 JP玛瑟		
发明人	李荣皓 J·P·玛瑟		
IPC分类号	C12N15/09 A61K35/12 A61K35/48 A61P15/00 C12N5/02 C12N5/074 C12N5/06 C12N1/38 G01N33/53 G01N33/00		
CPC分类号	C12N2500/25 C12N2501/70 C12N2500/99 C12N2500/38 A61K35/12 C12N5/0682 C12N2503/00 A61P15/00 C12N2500/90		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	09/545435 2000-04-07 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了基本纯的人米勒管衍生上皮细胞群体,以及分离和培养米勒管衍生上皮细胞的方法。通过小心操作米勒管衍生上皮细胞生长其中的微环境,可以得到多次传代,其中米勒管衍生上皮细胞能够成为子宫、宫颈、阴道、和输卵管细胞。另外,本文还公开了使用人米勒管衍生上皮细胞及其分化的细胞的几种方法。

