

从干细胞生成神经细胞的方法、神经细胞及其应用

5 技术领域

本发明属于细胞移植领域。具体而言，本发明涉及生成可用于治疗神经功能丧失性伤病的神经细胞的方法，以及所述方法和所生成的神经细胞在治疗神经功能丧失性伤病中的用途。本发明还涉及治疗神经功能丧失性伤病的方法。

10

背景技术

帕金森氏（Parkinson's）病是一种中枢神经退化性疾病，通常由中脑多巴胺生成神经元的退化或病变引起。临床病理表现为多巴胺（Dopamine）缺乏。在理论上，补充多巴胺可以缓解或治疗帕金森氏症状。但是，由于多巴胺不能通过人体血脑屏障，因而目前临床上普遍应用的治疗药物为多巴胺的前体物，L-DOPA。然而，L-DOPA 注射后大部分将在到达中枢神经之前在体内代谢掉，只有不到 5% 的有效剂量可达到有效部位，其它 95% 的药物代谢后产生多种副作用，并通过反馈作用进一步降低体内多巴胺的生成。因此，长期使用 L-DOPA 已证明对帕金森氏病无治疗作用。

临床上尝试的另一种方法是使用多巴胺类似物，比如 Bromocriptine、Pergolide 或 Perxole 等，这些药物可以结合中枢神经元多巴胺受体，从而模仿多巴胺的作用。然而，研究表明，这种多巴胺类似物通常导致多巴胺受体逐渐丧失对多巴胺及其类似物的敏感性，因而长期使用结果是加重而不是缓解帕金森氏症状。

由于以上的原因，目前临床上对帕金森氏病只能作短期的缓解而不能治愈。

脊髓损伤是另一种中枢神经功能丧失性伤病，通常由运动损伤、局部缺血性损伤、神经退化性疾病及脊髓炎等原因引起，临床症状为运动神经元功能的丧失，由此导致受伤部位以下躯体的部分或全部瘫痪。由于目前临床上没有能让被损伤的运动神经元功能恢复的治疗方法，因而这一伤病目前无法治愈。

近年研究表明，细胞移植可为帕金森氏病和脊髓损伤的治疗提供一种有效的方法（Freed 等人, 2001; Kumar 等人, 2009）。Freed 等人将取自流产胎

儿中枢神经组织的细胞移植到帕金森氏病患者的中脑部，经一年研究发现，在试验的较年轻的患者组中，帕金森氏病症状有轻度改善。在这一研究中移植的细胞经体外培养证明可分泌神经因子，例如多巴胺，因而说明神经因子分泌细胞可用于细胞移植并治疗帕金森氏病。但因为胎儿中枢神经组织是多种不同细胞的混合体，其有效的神经因子分泌细胞的比例未知，因而这种细胞移植不能控制有效细胞的数量，从而不能控制多巴胺的水平。因此，这一研究表明神经因子分泌细胞可以通过细胞移植用于帕金森氏病的治疗，但所用的方法不能得到预期的效果。

Kumar 等人将取自脊髓损伤患者的骨髓单核细胞移植回相应的患者，发现有三分之一患者的症状有轻度改善。一年跟踪研究发现所有接受细胞移植的患者均没有明显的副作用。作者认为，脊髓损伤部位的环境诱导了骨髓细胞向神经细胞的分化，从而导致症状的改善。然而，骨髓单核细胞中只有微小比例的细胞具有向神经细胞分化的能力，因而 Kumar 的方法不能有效控制移植细胞中有效细胞的数量。而且，骨髓细胞中的间质细胞在损伤部位的附着可能增加一些糖蛋白的沉积，从而影响神经损伤的恢复。

为解决在临床细胞移植中使用的有效的神经因子生成细胞和运动神经元细胞的选用和数量控制的问题，许多研究试图从胚胎干细胞生成神经因子生成细胞和运动神经元细胞。Kawasaki 等人报告了用小鼠 PA6 细胞作滋养细胞可使人胚胎干细胞分化成多巴胺生成细胞和运动神经元细胞。应用这一方法，将人胚胎干细胞在由 PA6 细胞形成的细胞滋养层上培养，使胚胎干细胞分化成外胚层细胞。之后用适当的神经因子，比如 Wnt3 (Wingless family number 3) 或 Shh (Sonic hedgehog)，可以使外胚层细胞进一步分化成多巴胺分泌细胞和运动神经元细胞。这一方法的不足之处是需用小鼠来源的滋养细胞与人胚胎干细胞共同培养，动物来源的蛋白和可能的动物病源物质的污染使得由此方法得到的神经细胞不适于临床应用。

为解决上述问题，一项已有的发明（美国专利申请号 20030162290）提供了不用动物来源的滋养层细胞的方法。这一发明应用白细胞抑制因子（LIF）和成纤维细胞生长因子（FGF）将胚胎干细胞诱导成胚胎小体（Embryoid body），再用烟碱（Nicotinamide）和胰岛素（insulin）将胚胎小体细胞分化成神经细胞。这一方法可以成功地将胚胎干细胞分化成具有神经功能的细胞，但未能从其他种类的干细胞，比如成体干细胞（Adult stem cell）生成有神经功能的细胞。应用这一方法生成临床使用的细胞的局限在于，对于任何一位患者，胚胎干细胞来源的细胞都属异体细胞，因而细胞移

植后将可能产生免疫排斥反应和相应的免疫反应综合症。同时，胚胎干细胞的使用将伴有共识性的伦理问题。

综合以上现状，目前干细胞用于帕金森氏病和脊髓损伤的治疗上有待解决的问题之一是如何从成体干细胞生成具有神经因子分泌特性和运动神经元特性的神经细胞。

发明内容

针对现有技术的不足，本发明的主要目标是提供一种从间质干细胞，包括人体来源的胎盘间质干细胞，骨髓间质干细胞，脂肪间质干细胞，肝脏间质干细胞和其它来源的间质干细胞，生成具有神经因子分泌特性和运动神经元特性的神经细胞的方法。这一方法不使用动物来源的细胞用于提供诱导环境，并可从成体干细胞生成具有神经功能的细胞，因而可更适合用于生成临床用的细胞。本发明的另一个目标是提供生成的具有神经功能的细胞。本发明的又一个目标是提供所述方法及其所生成的细胞的用途。

用于实现上述目的技术方案如下：

一方面，本发明提供一种从干细胞生成具有神经功能的细胞的方法，所述方法包括以下步骤：

- 1) 将获得的干细胞在高血清含量的培养基中培养；
- 2) 将经第 1 步培养的细胞转入低血清含量、含有细胞生长因子和神经营养因子的培养基中进行培养；
- 3) 将经第 2 步培养的细胞转入分化培养基中进行培养；
- 4) 将经第 3 步培养的细胞转入含有神经细胞成熟因子的培养基中进行培养；
- 5) 将经第 4 步培养的细胞转入含有神经因子的培养基中进行培养。

在上述方法中，优选采用的干细胞为人体来源的胎盘间质干细胞和骨髓间质干细胞，其它适用于本方法的干细胞包括来自成体的脂肪间质干细胞、肝脏间质干细胞和其他来源的成体间质干细胞；进一步优选为胎盘间质干细胞。

所述生成的具有神经功能的细胞为具有神经因子分泌特性和运动神经元特性的神经细胞。

优选地，步骤 1) 中采用的培养基为 DMEM，并添加 15-25% 的血清，其中血清优选 20% 的 FBS；细胞培养时间为 8-24 小时，优选培养 16 小时；

优选地，步骤 2) 中采用的培养基为起始分化培养基，为 DMEM/F12

混合培养基添加 0.1-0.5% 的血清, 并含一倍浓度 (转铁蛋白 100mg/L, 胰岛素 5mg/L, 孕激素 6.3ug/L, 腐胺 16mg/L, 亚硒酸盐 5.2ug/L) 的 N2 混合辅助因子、5-15 ng/ml 的成纤维细胞生长因子 (FGF) 和 5-15ng/ml 的上皮生长因子

(EGF), 细胞培养时间为 8-24 小时; 该起始分化培养基优选 DMEM/F12

- 5 混合培养基添加 0.2% 的 FBS, 并含一倍浓度的 N2 混合辅助因子、2 μ g/ml 肝素、1% MEM、10 ng/ml 的 bFGF (碱性 FGF) 和 10 ng/ml 的 EGF, 细胞培养时间优选 24 小时;

优选地, 步骤 3) 中采用的培养基为分化培养基, 为 DMEM/F12 混合培养基添加 0.1-0.5% 的血清, 并含一倍浓度的 N2 混合辅助因子以及 50-500

- 10 μ g/ml 的胚胎脑蛋白, 细胞培养时间为 3-15 天; 该分化培养基优选 DMEM/F12 混合培养基添加 0.2% 的 FBS, 并含一倍浓度的 N2 混合辅助因子、2 μ g/ml 肝素、1% MEM 以及 200 μ g/ml 的胚胎脑蛋白, 细胞培养时间优选 6 天;

其中, 步骤 3) 中采用的胚胎脑蛋白为胚胎脑组织来源的全蛋白, 典型的胚胎脑蛋白可由商业途径购买。

- 15 优选地, 步骤 4) 中采用的培养基为 DMEM/F12 混合培养基添加 0.1-0.5% 的血清, 并含一倍浓度的 N2 混合辅助因子以及 10-50 nM 的视黄酸 (RA) 和 100-1000ng/mL 的刺猬同源蛋白 (Shh), 细胞培养时间为 2-5 天; 该培养基优选 DMEM/F12 混合培养基添加 0.2% 的 FBS, 并含 1% 的 N2 混合辅助因子、2 μ g/ml 肝素、20nM 的 RA 和 500 ng/ml 的 Shh, 细胞培养时间优选 3
- 20 天;

优选地, 步骤 5) 中采用的培养基为 DMEM/F12 混合培养基添加 5-15% 的血清, 并含 5-20 ng/ml 的脑神经营养因子 (BDNF)、10-50 ng/ml 的胶质细胞营养因子 (GDNF) 和 20-50 ng/ml 类胰岛素因子 (IGF), 细胞培养时间为 5-10 天; 优选培养基为 DMEM/F12 混合培养基添加 10% 的 FBS, 并含

25 10 ng/ml 的 BDNF、20 ng/ml 的 GDNF 和 50 ng/ml IGF-II, 细胞培养时间优选培养 7 天。

在上述方法中, 采用的血清选自人脐带血血清和/或胎牛血清; 培养箱条件为 5%二氧化碳和 95%空气。

- 另一方面, 本发明提供上述方法所制备的具有神经功能的细胞, 所述细
- 30 胞优选为可表达神经元特异性烯醇酶 (NSE)、神经丝 M 蛋白 (NF-M), 并分泌神经营养因子 (NT) 和脑源性神经营养因子 (BDNF) 的神经细胞, 进一步优选为可表达神经元特异性烯醇酶 (NSE), 胶质纤维酸性蛋白 (GFAP), 生长相关蛋白因子 43 (GAP-43), 和神经丝 M 蛋白 (NF-M),

并分泌神经营养因子-3 (NT-3), 神经营养因子-4 (NT-4), 和脑源性神经营养因子 (BDNF) 的神经细胞。

又一方面, 本发明提供上述方法及所述方法所制备的具有神经功能的细胞在制备治疗神经功能丧失性伤病的药物中的用途;

- 5 优选地, 所述具有神经功能的细胞为表达神经元特异性烯醇酶 (NSE) 和神经丝 M 蛋白 (NF-M), 并分泌神经营养因子 (NT) 和脑源性神经营养因子 (BDNF) 的神经细胞; 所述神经功能丧失性伤病为帕金森氏病和脊髓损伤。

此外, 本发明还提供上述从干细胞生成具有神经功能的细胞的方法及其
10 所制备的具有神经功能的细胞在治疗神经功能丧失性伤病中的用途, 所述伤病优选帕金森氏病和脊髓损伤。

- 再一方面, 本发明提供一种治疗神经功能丧失性伤病的方法, 所述方法包括将上述方法制备的具有神经功能的细胞移植到神经疾病患者的伤病部位, 所述神经疾病包括但不限于帕金森氏病和脊髓损伤; 优选地, 所述具有
15 神经功能的细胞为表达神经元特异性烯醇酶 (NSE) 和神经丝 M 蛋白 (NF-M), 并分泌神经营养因子 (NT) 和脑源性神经营养因子 (BDNF) 的神经细胞。

以下是本发明的详细描述:

- 20 本发明的目标之一是提供一种从间质干细胞生成具有神经功能的细胞的方法, 尤其包括生成具有神经因子分泌特性和运动神经元特性的神经细胞的方法。本发明的另一目标是提供一种具有神经因子分泌特性和运动神经元特性的神经细胞, 这种细胞可用于帕金森氏病和脊髓损伤的治疗。本发明的又一目标是提供一种治疗帕金森氏病和脊髓损伤的方法, 这种方法通过移植
25 具有神经功能的细胞来恢复神经功能。

现结合本发明的目的对本发明逐一加以描述。

上述发明内容的实施可以包括如下步骤:

- 1、将人体来源的间质干细胞在高血清含量的培养基中培养 16 小时;
- 2、将第一步得到的细胞在低血清含量, 含有细胞生长因子和神经营养
30 因子的培养基中培养 16 小时;
- 3、将第二步得到的细胞在分化培养基中培养 6 天;
- 4、将第三步得到的细胞在含有神经细胞成熟因子的培养基中培养 3 天;
- 5、将第四步得到的细胞在含有神经因子的培养基中培养 7 天;

6、将第五步得到的细胞移植到治疗帕金森氏病患者的中脑部位和脊髓损伤患者的损伤部位以恢复患者丧失的神经功能。

其中，在本发明的第一步，用以分化的细胞可以为人体来源的各种间质干细胞（Mesenchymal stem cell），包括胎盘间质干细胞，骨髓间质干细胞，脂肪间质干细胞、肝脏间质干细胞和其他来源的成体间质干细胞。所用培养基为标准的 DMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）培养基，使用的血清可以是人脐带血清或胎牛血清（FBS），血清含量为 15-25%。培养箱条件为 5%二氧化碳和 95%空气。这一培养箱条件将适用以下所有步骤。

在第二步，将第一步的细胞转入低血清含量的培养基中诱导分化的启动，使用的培养基为标准的 DMEM/F12（DMEM/Nutrient Mix 12）混合培养基。血清含量为 0.1-0.5%。此外，培养基中含一倍浓度的 N2 混合辅助因子（Invitrogen），5-15ng/ml 的成纤维细胞生长因子（FGF）和 5-15ng/ml 的上皮生长因子（EGF）。

在第三步，将第二步的细胞转入分化培养基培养。此培养基的主要诱导成分为胚胎脑蛋白，使用浓度为 50-500μg/ml 纯蛋白。所用基础培养基与第二步相同，但不含 FGF 和 EGF。

在这一步，每两天更换培养基一次，共培养 3-15 天。

在第四步，将第三步的细胞在含有神经细胞成熟因子的培养基中向功能细胞转化，神经细胞成熟因子包括 20 nM 的视黄酸（RA）和 500ng/ml 的刺猬同源蛋白（Shh）。使用的基础培养基与第三步相同，但不含胚胎蛋白。

在第五步，将来自第四步的细胞在神经细胞培养基中增殖。使用培养基为标准的 DMEM/F12 混合培养基，含 5-15%的血清，5-20ng/ml 的脑神经营养因子（BDNF），10-50ng/ml 的胶质细胞营养因子（GDNF）和 20-50ng/ml 的类胰岛素因子（IGF）。

由上述方法得到的细胞具有成纤维细胞的形态（图 1），表达神经细胞特异性蛋白，包括神经元特异性烯醇酶（NSE）、巢蛋白（Nestin）、生长相关因子-43（GAP-43）、胶质纤维酸性蛋白因子（GFAP）和神经丝蛋白（NF-M）（图 2），并分泌神经营养因子-3（NT3）、神经营养因子-4（NT4）和脑源性神经营养因子（BDNF）等神经细胞特异性蛋白因子（图 3）。这些结果说明由本发明的方法生成的细胞具有神经功能细胞的特性。

本发明进一步提供一种应用以上获得的细胞治疗神经功能丧失性伤病的方法，包括将本发明获得的细胞移植到神经疾病患者的伤病部位。治疗疾病包括但不限于帕金森氏病和脊髓损伤。细胞移植的方法可以用现行临床同

类疾病细胞移植的方法，比如 Freed 等人移植多巴胺分泌细胞治疗帕金森氏病的方法和 Kumar 等人移植骨髓细胞治疗脊髓损伤的方法。

本发明的有益效果在于：

- 5 1、本发明的方法在生成具有神经功能的细胞中，不使用动物来源的细胞提供诱导环境，排除了动物来源的蛋白和可能存在的动物病原物质的污染，使得由此方法得到的神经细胞更适于临床应用；
- 2、本发明的方法可以采用自体来源的干细胞进行具有神经功能的细胞的生成，避免了细胞移植后可能产生的免疫排斥反应和相应的免疫反应综合
- 10 症；
- 3、本发明的方法可以采用成体干细胞生成具有神经功能的细胞并用于临床应用，避免了伴随使用胚胎干细胞的具有共识性的伦理问题。

附图说明

- 15 图 1 表示由人胎盘间充质细胞诱导生成的神经细胞；
- 图 2 表示由人胎盘间充质细胞诱导生成的神经细胞表达神经细胞特异性蛋白。其中：
- 图 2-1 为未诱导的人胎盘间充质细胞（200×），神经细胞因子染色阴性；
- 图 2-2 为由胎盘间充质细胞诱导生成的神经细胞（200×），棕黄色为
- 20 Nestin 染色；
- 图 2-3 为由胎盘间充质细胞诱导生成的神经细胞（200×），棕黄色为 NSE 染色；
- 图 2-4 为由胎盘间充质细胞诱导生成的神经细胞（200×），棕黄色为 GFAP 染色；
- 25 图 2-5 为由胎盘间充质细胞诱导生成的神经细胞（200×），棕黄色为 GAP-43 染色。
- 图 2-6 为由胎盘间充质细胞诱导生成的神经细胞（200×），棕黄色为 NF-M 染色。
- 图 3 表示由人胎盘间充质细胞诱导生成的神经细胞分泌神经因子和神经
- 30 营养因子。
- 图 3-1 为 ELISA 测定的神经营养因子-3（NT-3）蛋白的分泌，其中：
- 1、 对照培养基，未经过细胞培养，NT-3 浓度为 0 pg/ml；
- 2、 对照组细胞（未诱导的人胎盘间充质干细胞细胞）的培养基，NT-3

浓度为 0 pg/ml;

3、 胚胎脑蛋白诱导后细胞的培养基, NT-3 浓度为 36645 pg/ml。

图 3-2 为 ELISA 测定的神经营养因子-4 (NT-4) 蛋白的分泌, 其中:

1、 对照培养基, 未经过细胞培养, NT-4 浓度为 0 ng/ml;

5 2、 对照组细胞(未诱导的人胎盘间充质干细胞细胞)的培养基, NT-4 浓度为 0ng/ml;

3、 胚胎脑蛋白诱导后细胞的培养基, NT-4 浓度为 9789 pg/ml。

图 3-3 为 ELISA 测定的脑神经因子 (BDNF) 蛋白的分泌, 其中:

1、 对照培养基, 未经过细胞培养, 此培养基成分含 10ng/ml 的

10 BDNF;

2、 对照组细胞(未诱导的人胎盘间充质干细胞细胞)的培养基, BDNF 浓度为 10 ng/ml;

3、 胚胎脑蛋白诱导后细胞的培养基, BDNF 浓度为 55 ng/ml。

15 **实施发明的最佳方式**

以下实施例用以帮助读者理解本发明的内容, 但不限定本发明内容的范围。比如, 以下实施例应用人胎盘间质干细胞作为被分化的细胞, 但熟悉本领域的读者不难理解, 其他来源的间质干细胞, 包括骨髓间质干细胞, 脂肪间质干细胞, 肝脏间质干细胞, 及其他来源的成体间质干细胞同样适用于本
20 发明的方法。

实施例 1: 分离人胎盘间质干细胞

本实验利用的胎盘为健康产妇的足月胎盘, 从宁夏医科大学附属医院产科临床获得, 捐献者自愿无偿捐赠并签署知情同意书。在无菌的条件下,
25 将大约 20g 的新鲜的人胎盘组织从分娩后的胎盘上分割下来。将该组织保存在 50ml 的离心管中, 该离心管装有 20ml 含有 1%的人脐带血血清和 1%的青霉素/链霉素溶液 (Invitrogen, 产品号 15140122) 的 DMEM (Invitrogen, 产品号 11885084) 培养液。将在以上保护液中的胎盘组织在 30 分钟之内转移到 cGMP 实验室中。在处理之前, 将该组织在含有 1%的青霉素/链霉
30 素的 PBS (Invitrogen, 产品号 14040133) 溶液中清洗三次。

利用无菌手术剪刀从胎盘组织上分割绒毛膜盘, 并将绒毛膜盘在 PBS 中洗三次, 并切成大约 1mm³ 大小的碎块, 然后在 37℃ 下利用每毫升 270 个单位的胶原酶 IV (Invitrogen, 17104019) 和每毫升 2.4 个单位的分散酶 II

(Dispase II) (Roche, 产品型 04942078001) 的组合来消化 1 小时, 从而分离出胎盘羊膜间质细胞和胎盘绒毛膜间质细胞。在消化后, 使消化容量中的组织残渣静置沉淀 30 秒钟, 然后收集细胞悬浮液中的中间层。将收集的细胞悬浮液用等量的 PBS 稀释并在 700g 离心力下离心 10 分钟, 倒掉上清液后, 将沉淀的细胞在含有 1% 人脐带血清的 PBS 中洗两遍, 再在含有 1% 人脐带血清的 DMEM 培养基中洗一遍。

实施例 2: 胚胎脑蛋白诱导间质干细胞向神经细胞分化

诱导间质干细胞向神经细胞分化的步骤包括:

- 10 1、将从实施例 1 中获得的人胎盘间质干细胞 (MSC) 在标准培养基 (DMEM+10% FBS) 培养至密度为 80%。
- 2、将细胞用 200 u/ml 胶原酶 IV (Invitrogen) 在 37°C 消化 3-5 分钟以得到单个细胞。
- 3、将细胞移入胶原蛋白-IV (Invitrogen) 包被的培养瓶中, 加标准 DMEM
15 培养基培养 24 小时。
- 4、用新鲜的培养基 (DMEM+20% FBS) 换液, 培养 16 小时。
- 5、将细胞在起始分化培养基中继续培养 16 小时, 其中该起始分化培养基为标准 DMEM/F12 培养基, 并含一倍浓度的 N2 混合辅助因子 (Invitrogen), 2ug/ml 肝素 (Heparin, Sigma), 1% 最低必需培养基 (MEM,
20 Invitrogen), 0.2% FBS, 10ng/ml bFGF (R&D Systems), 10ng/ml EGF (Gibco)。
- 6、将细胞在分化培养基中继续培养 6 天, 其中分化培养基为起始分化培养基, 但不含 FGF 和 EGF, 且含 200 ug/ml 胚胎脑蛋白 (购自 Capital Biosciences, Rockville, USA, 商品号 TCB-1977), 培养期间每 2 天用新鲜的分化培养基换液一次。
- 25 7、将细胞在成熟培养基中继续培养 3 天。成熟培养基与起始分化培养基相似, 但不含 FGF 和 EG, 含 20nM RA (Sigma) 和 500ng/ml SHH (Biosource)。
- 8、将细胞在神经细胞培养基中继续培养 7 天, 其中神经细胞培养基与起始分化培养基相似, 但含 10% FBS, 10ng/ml BDNF (Invitrogen), 20ng/ml
30 GDNF (Sigma), 50ng/ml IGF- II (R&D Systems), 且不含 FGF 和 EGF。此期间每两天换新鲜培养基一次。

经诱导分化培养所获得的类神经细胞见图 1。

实施例 3: 神经细胞特异性蛋白的测定

测定步骤包括:

- 1、细胞爬片: 将从实施例 3 中获得的神经细胞 (试验组) 以 3×10^5 密度传入有盖玻片的培养皿中并在神经细胞培养基 (与实施例 3 步骤 6 相同) 中培养。另将未诱导的人胎盘间质干细胞在同条件下培养作对照组。在以下所有步骤中试验组和对照组接受完全相同的处理。
 - 2、24 小时后, 将长有细胞 (分别为类神经细胞和对照细胞) 的玻片用 PBS 洗细胞 3 次, 每次 5 分钟。
 - 3、将玻片在加 30% H_2O_2 (1 份) 和纯甲醇 (50 份) 的混合液中处理 30 分钟, 再用蒸馏水洗 2 次。
 - 4、在玻片的细胞上滴加含 5% 牛血清蛋白 (BSA) 的封闭液, 室温放置 20 分钟, 甩去多余液体不洗。
 - 5、滴加适当稀释 (各种不同抗体根据供应厂家的说明进行稀释) 的第一抗体, 包括 NSE、Nestin、GAP-43、GFAP、NF-M 的一抗 (中国博士德公司), 在 $4^\circ C$ 过夜培养。
 - 6、将细胞用 PBS (PH 7.2-7.6) 洗 3 次, 每次 2 分钟。
 - 7、滴加第二抗体, 并在 $37^\circ C$ 孵育 20 分钟。
 - 8、用 PBS 洗 3 次, 每次 2 分钟。
 - 9、滴加链酶亲和素 - 生物素 - 过氧化物酶复合物 (SABC), 在 $37^\circ C$ 孵育 20 分钟, PBS 洗 4 次, 每次 5 分钟。
 - 10、Diaminobenzidine (DAB) 显色 (使用 DAB 试剂盒, 由中国博士德公司提供)。
 - 11、梯度酒精脱水、二甲苯透明、树胶封片, 在显微镜下观察并拍照。
- 测定结果表明经诱导得到的类神经细胞能够表达神经细胞特异性蛋白 (见图 2)。

实施例 4: 神经细胞因子和神经营养因子的测定

测定步骤包括:

- 1、将从实施例 3 中获得的神经细胞 (试验组) 以 5×10^5 密度在神经细胞培养基 (与实施例 3 步骤 6 相同) 中培养。另将未诱导的人胎盘间质细胞在同条件下培养作对照组。在以下所有步骤中试验组和对照组接受完全相同的处理。48 小时后, 收集细胞培养基, 并将培养基在 $4^\circ C$ 下以 12000 转/分钟离心 5 分钟。

2、将酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（上海森雄科技公司）平衡至室温（20-25℃）。

3、建立标准曲线：设标准孔 8 孔，每孔中分别加入梯度稀释的标准样品 100 μl 。

5 4、加样：在待测品孔的每孔中各加待测样品 100 μl 。

5、将反应板置 37℃120 分钟。

6、洗板：用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次，向滤纸上印干。

7、每孔中加入第一抗体工作液 100 μl ，将反应板充分混匀后置 37℃60 分钟。

10 8、洗板：用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次，向滤纸上印干。

9、每孔加酶标抗体工作液 100 μl ，将反应板置 37℃60 分钟。

10、洗板：用洗涤液将反应板充分洗涤 4-6 次，向滤纸上印干。

11、每孔中加底物工作液 100 μl ，置 37℃暗处反应 5-10 分钟。

12、每孔加入 50 μl 终止液混匀，在 492nm 处测吸光值。

15

引用文献

1. CURT R. FREED, PAUL E. GREENE, ROBERT E. BREEZE et al, 2001. TRANSPLANTATION OF EMBRYONIC DOPAMINE NEURONS FOR SEVERE PARKINSON'S DISEASE. N Engl J Med 2001;344:710-9.

20

2. Arachiman A. Kumau, Sankaran R. Kumar, Raghavachary Narayanan et al, 2009. Autologous Bone Marrow Derived Mononuclear Cell Therapy for Spinal Cord Injury: A Phase I/II Clinical Safety and Primary Efficacy Data. Experimental and Clinical Transplantation 4:241-248.

25

3. Hiroshi Kawasaki, Hirofumi Suemori, Kenji Mizuseki et al, 2002. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. PNAS 99(3):1580-1585.

30

4. Inoue, Kazutomo; Kim, Dohoon;; Gu, Yanjun; et al, 2003. Method for inducing differentiation of embryonic stem cells into functioning cells. United States Patent Application 20030162290.

权 利 要 求

1. 一种从干细胞生成具有神经功能的细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

- 5 1) 将获得的干细胞在高血清含量的培养基中培养;
 2) 将经第 1 步培养的细胞转入低血清含量、含有细胞生长因子和神经
 营养因子的培养基中进行培养;
 3) 将经第 2 步培养的细胞转入分化培养基中进行培养;
 4) 将经第 3 步培养的细胞转入含有神经细胞成熟因子的培养基中进行
10 培养;
 5) 将经第 4 步培养的细胞转入含有神经因子的培养基中进行培养;
 优选地,所述干细胞为人体来源的间质干细胞;进一步优选胎盘间质干
 细胞、骨髓间质干细胞和脂肪间质干细胞;更优选胎盘间质干细胞;
 优选地,所述生成的具有神经功能的细胞为表达神经元特异性烯醇酶
15 (NSE) 和神经丝 M 蛋白(NF-M),并分泌神经营养因子(NT)和脑源性
 神经营养因子(BDNF)的神经细胞。

2、根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述步骤 1) 中采用的培养基为
DMEM,并添加 15-25%的血清,其中血清优选 20%的 FBS;细胞培养时间
为 8-24 小时,优选培养 16 小时。

- 20 3、根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,所述步骤 2) 中采用的培养
 基为起始分化培养基,为 DMEM/F12 混合培养基添加 0.1-0.5%的血清,并
 含一倍含量的 N2 混合辅助因子、5-15 ng/ml 的成纤维细胞生长因子(FGF)
 和 5-15ng/ml 的内皮生长因子(EGF),细胞培养时间为 8-24 小时;所述起
 始分化培养基优选 DMEM/F12 混合培养基添加 0.2%的 FBS,并含 1%的 N2
25 混合辅助因子、2 μ g/ml 肝素、1% MEM、10 ng/ml 的 bFGF 和 10 ng/ml 的
 EGF,细胞培养时间优选 16 小时。

- 4、根据权利要求 1-3 任一项所述的方法,其中,所述步骤 3) 中采用的
培养基为分化培养基,为 DMEM/F12 混合培养基添加 0.1-0.5%的血清,并
含一倍含量的 N2 混合辅助因子,以及 50-500 μ g/ml 的胚胎脑蛋白,细胞培
30 养时间为 3-15 天;所述分化培养基优选 DMEM/F12 混合培养基添加 0.2%的
 FBS,并含 1%的 N2 混合辅助因子、2 μ g/ml 肝素、1% MEM 以及 200 μ g/ml
 的 CNS 蛋白,细胞培养时间优选 6 天。

- 5、根据权利要求 1-4 任一项所述的方法,其中,所述步骤 4) 中采用的
培养基为 DMEM/F12 混合培养基添加 0.1-0.5%的血清,并含一倍含量的 N2
35 混合辅助因子以及 10-50nM 的视黄酸(RA)和 100-1000ng/ml 的 Shh,细胞

培养时间为 2-5 天；所述培养基优选 DMEM/F12 混合培养基添加 0.2% 的 FBS，并含 1% 的 N2 混合辅助因子、2 $\mu\text{g/ml}$ 肝素、20nM 的 RA 和 500 ng/ml 的 Shh，细胞培养时间优选 3 天。

6、根据权利要求 1-5 任一项所述的方法，其中，所述步骤 5) 中采用的培养基为 DMEM/F12 混合培养基添加 5-15% 的血清，并含 5-20 ng/ml 的脑神经营养因子 (BDNF)、10-50 ng/ml 的胶质细胞营养因子 (GDNF) 和 20-50 ng/ml 类胰岛素因子 (IGF)，细胞培养时间为 5-10 天；培养基为 DMEM/F12 混合培养基添加 10% 的 FBS，并含 10 ng/ml 的 BDNF、20 ng/ml 的 GDNF 和 50 ng/ml IGF-II，细胞培养时间优选培养 7 天。

7、根据权利要求 1-6 任一项所述的方法，其中，所述血清选自人脐带血血清和/或胎牛血清；培养箱条件为 5% 二氧化碳和 95% 空气。

8、根据权利要求 1-7 任一项所述的方法所制备的具有神经功能的细胞；优选地，所述细胞为可表达神经元特异性烯醇酶 (NSE)、神经丝 M 蛋白 (NF-M)，并分泌神经营养因子 (NT) 和脑源性神经营养因子 (BDNF) 的神经细胞，进一步优选为可表达神经元特异性烯醇酶 (NSE)，胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)，生长相关蛋白因子 43 (GAP-43)，和神经丝 M 蛋白 (NF-M)，并分泌神经营养因子-3 (NT-3)，神经营养因子-4 (NT-4)，和脑源性神经营养因子 (BDNF) 的神经细胞。

9、根据权利要求 1-7 任一项所述的方法及权利要求 8 所述的具有神经功能的细胞在制备治疗神经功能丧失性伤病的药物中的用途；

优选地，所述具有神经功能的细胞为表达神经元特异性烯醇酶 (NSE) 和神经丝 M 蛋白 (NF-M)，并分泌神经营养因子 (NT) 和脑源性神经营养因子 (BDNF) 的神经细胞。

优选地，所述神经功能丧失性伤病为帕金森氏病和脊髓损伤。

10、根据权利要求 1-7 任一项所述的方法及根据权利要求 8 所述的具有神经功能的细胞在治疗神经功能丧失性伤病中的用途；

优选地，所述伤病为帕金森氏病和脊髓损伤。

11、一种治疗神经功能丧失性伤病的方法，所述方法包括将根据权利要求 8 所述的具有神经功能的细胞移植到神经疾病患者的伤病部位，所述神经疾病包括但不限于帕金森氏病和脊髓损伤；

优选地，所述具有神经功能的细胞为表达神经元特异性烯醇酶 (NSE) 和神经丝 M 蛋白 (NF-M)，并分泌神经营养因子 (NT) 和脑源性神经营养因子 (BDNF) 的神经细胞。