

一种蜕膜胎盘间充质干细胞及其在制备促进血管新生药物组合中的用途

技术领域

本发明是关于一种蜕膜胎盘间充质干细胞（decidual placental mesenchymal stem cell）及其培养方法，特别是一种在现有的间充质干细胞培养方法中，加入诱导步骤，使所述蜕膜化胎盘间充质干细胞高度表达第3号诱饵受体（Decoy receptor 3; DcR3）。本发明还涉及一种蜕膜胎盘间充质干细胞用于制备促进血管新生的药物的用途。

背景技术

目前鉴定间充质干细胞所使用的生物标志多参考国际细胞与基因治疗学会（ISCT）所公布的标准：需表达CD73、CD90、CD105，同时不表达CD14、CD34、CD45及HLA-DR，然而此生物标志组合以骨髓间充质干细胞为基础，却缺乏组织的专一性，导致不同组织来源的间充质干细胞彼此之间难以区分。另一方面，许多报告指出不同来源的间充质干细胞其行为表现有所差异，也因此，开发具备区分特定组织来源间充质干细胞的特异性生物分子标志有其必要性。

间充质干细胞由于可表达多种血管新生因子，因此被认为可应用于促进血管新生以治疗缺血性疾病，然而不同来源的间充质干细胞促血管新生的机制可能因为其关键因子的表达不同而有所差异。

发明内容

本发明提供了一种培养高度表达第3号诱饵受体（DcR3）的蜕膜（decidual）胎盘间充质干细胞（pcMSCs）的方法，其为在无血清培养基配方（MCDB201培养基+EGF（表皮生长因子）+ ITS细胞培养添加物（ITS即胰岛素（Insulin）、转铁蛋白（Transferrin）、硒（Selenium）））中，加入诱导步骤，其中所述诱导步骤为在培养过程中，在细胞培养基中加入至少一种细胞激素进行刺激，使所述蜕膜胎盘间充质干细胞高度表达第3号诱饵受体（Decoy receptor 3; DcR3）。

本发明所述“高度表达”是指相较于通过现有的间充质干细胞培养方法培养的蜕膜胎盘间充质干细胞（decidual placental mesenchymal stem cell）的第3号诱饵受体（Decoy receptor 3; DcR3）表达量，通过本发明培养方法培养的蜕膜胎盘间充质干细胞的DcR3表达量具有统计

学上的显著高度表达。

在本发明的方法中，较佳的，其中所述至少一种细胞激素为选自肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)或其组合。

在本发明的方法中，较佳的，其中所述诱导步骤为在当所述蜕膜胎盘间充质干细胞贴盘后进行诱导。

在本发明的方法中，更佳的，其中所述TNF- α 的有效量为15~20 ng/ml，且所述IFN- γ 的有效量为10~20 ng/ml。

在本发明的方法中，更佳的，其中所述TNF- α 及所述IFN- γ 为进行刺激48小时。

在本发明的方法中，更佳的，其中所述TNF- α 及所述IFN- γ 为一起加入所述细胞培养基中。

本发明还提供一种通过前述的方法所培养出的蜕膜胎盘间充质干细胞，其中所述蜕膜胎盘间充质干细胞高度表达第3号诱饵受体 (Decoy receptor 3; DcR3)。

较佳的，本发明的蜕膜胎盘间充质干细胞表达雌激素受体 (Estrogen receptor; ER)、黄体激素受体 (Progesterone receptor; PR) 及第3号诱饵受体 (Decoy receptor 3; DcR3)。

进一步发掘DcR3在蜕膜间充质干细胞的应用潜力，本发明还包含一种医药组合物用于制备促进有需要的个体血管新生的药物的用途，所述医药组合物包含给有效量的高度表达第3号诱饵受体的蜕膜胎盘间充质干细胞。

较佳的，在本发明的用途中，其中所述个体为人类或哺乳类动物。

较佳的，在本发明的用途中，其中所述有效量的蜕膜胎盘间充质干细胞是为 1×10^4 cells ~ 2×10^5 cells。

附图说明

图1显示蜕膜胎盘间充质干细胞 (pcMSCs) 的表征。(A) pcMSCs在无血清培养条件下的形态学显示纺锤形贴壁细胞。比例尺：100 μ m。(B) pcMSCs的免疫表型分析显示CD29、CD44、CD73、CD90、CD105等生物标记呈现阳性，CD14、CD34、CD45和HLA-DR等生物标记呈现阴性。(C) pcMSCs分别在成骨 (C2)、软骨生成 (C4) 和脂肪生成 (C6) 中的体外分化能力。C1、C3、C5则分别代表各体外诱导条件的对照组，分别属于成骨、软骨和脂肪形成。比例尺：200 μ m。

图2显示从男性新生儿胎盘中分离的pcMSCs的核型特征。(A) 显示第20代pcMSCs (N100)染色体分析的代表性图像；所述分析显示为三个个体的46条独立染色体，包括N98 (B)、N99 (C) 和N100 (D)。从男性新生儿胎盘中分离的pcMSCs的荧光原位杂交显示X染色体 (以红色荧光表示) 呈阳性，而Y染色体 (以绿色荧光表示) 为阴性 (F)，其与来自男性新生儿的人脐静脉内皮细胞 (Human umbilical vein endothelial cell、HUVEC) 呈现X和

Y染色体的双阳性结果（E）相反。左下角是各个面板的白框中图像的放大视图。比例尺：50 μm 。

图3显示与骨髓间充质干细胞（BMMSC）相比，pcMSCs的基因表达分析。缩写：pcMSCs：蜕膜胎盘间充质干细胞；BMMSC：骨髓间充质干细胞；Adsv：脂肪间充质干细胞；hES：人类胚胎干细胞；UniRef：基因家族数据库。

图4显示pcMSCs的激素受体与BMMSC的激素受体相比的结果。缩写：PRA：黄体激素受体A；PRB：黄体激素受体B；ER：雌激素受体 α 次单位。

图5显示pcMSCs可以在体外被黄体激素受体（PR）和雌激素受体（ER）诱导蜕膜化。（A）为PCR定量分析的结果、（B）为蛋白质印迹法（Western Blot）定量分析的结果、（C）为ELISA定量分析的结果。*表示 $0.01 < P \leq 0.05$ ；**表示 $0.005 < P \leq 0.01$ ；***表示 $P \leq 0.005$ ；N.D.表示未检测到。

图6显示pcMSCs和BMMSCs的肿瘤坏死因子（TNF）受体超家族相关基因表达量的比较。

图7显示pcMSCs和BMMSCs中DcR3蛋白表达量的结果。

图8显示DcR3的表达量通过TNF- α 和IFN- γ 的诱导而增强。

图9显示体外管形成试验证明pcMSCs通过DcR3而促进血管生成的实验流程。

图10显示体外管形成试验证明pcMSCs通过DcR3而促进血管生成的结果。（A）为ELISA测定结果。（B）为荧光显微镜拍摄图像。（C）为荧光显微镜拍摄图像的统计结果。结果表示为平均值 $\pm$ SD (n=3)，*表示 $0.01 < P \leq 0.05$ ；**表示 $0.005 < P \leq 0.01$ ；***表示 $P < 0.005$ 。

具体实施方式

应理解的是，实施例的详细描述是为了说明本发明的较佳实施例，而非欲将本发明限制在某些实施例。应注意的是，本发明意在涵盖所有在本发明相同精神和范围内的替代实施例。其他人根据本发明理念所做出的一些非本质的修改和调整仍属于本发明的保护范围。

实施例1 蜕膜胎盘间充质干细胞（pcMSCs）的鉴定

在本发明的研究中，我们成功地从人类胎盘蜕膜中分离出一种间充质干细胞，命名为胎盘绒毛膜蜕膜间充质干细胞(placenta choriodecidual-derived mesenchymal stromal cells, pcMSCs)。

我们自胎盘的绒毛膜蜕膜部位分离出一种间充质干细胞，符合国际上对间充质干细胞的基本定义（如图1），而后在染色体鉴定及荧光原位杂合染色分析中，确定了此细胞来源为母体部位，亦即是蜕膜部位（如图2）。

由于间充质干细胞的基本定义无法区分不同组织来源分离的细胞，为找出足以鉴定蜕膜间充质干细胞的生物标志，本发明分析了骨髓间充质干细胞与蜕膜间充质干细胞的基因表

达。

本发明收集了几个受体基因以证明骨髓间充质干细胞（BMMSCs）和pcMSCs之间的差异。如图3所示，pcMSCs表达了BMMSCs不表达的雌激素受体（ESR）和黄体激素受体（PGR），而BMMSCs和pcMSCs均表达IFN- γ 受体（IFNGR）和TNF- α 受体（TNFRSF1A），结果证实，雌激素受体与黄体激素受体为蜕膜间充质干细胞所独有。

进一步比较pcMSCs的激素受体与BMMSC的激素受体，蛋白质表达通过分别用不同受体特异性抗体进行蛋白质印迹法（Western Blot）加以证实，并分别利用乳腺癌细胞株MDA-MB-231和T47D作为黄体激素受体（PR）和雌激素受体（ER）的阴性和阳性对照。其结果显示，与BMMSCs（BM）和脂肪间充质干细胞（AdMSC）相比，只有pcMSCs表达黄体激素受体（PR）和雌激素受体（ER）（如图4）。

为了鉴定雌激素受体与黄体激素受体为蜕膜间充质干细胞所独有，本发明进一步以10 nM雌激素及1 μ M黄体激素刺激（E/P）蜕膜间充质干细胞（pcMSCs）及骨髓间充质干细胞（BMMSCs），并在第3、6和9天收获培养基和细胞，用于随后的qPCR、蛋白质印迹法（Western Blot）及酵素结合免疫吸附分析法（ELISA）定量分析以评估催乳激素（prolactin; PRL）的表达。蛋白质印迹法（Western Blot）以 β -肌动蛋白（ β -actin）作为定量标准，所有实验均三次重复。

其结果如图5，无论qPCR（A）、蛋白质印迹法（Western Blot）（B）或ELISA（C）定量分析都显示，只有蜕膜间充质干细胞能产生蜕膜化分化，指标性基因PRL显著上升，而骨髓间充质干细胞则不受荷尔蒙调控，再次证实蜕膜间充质干细胞能表现其源自蜕膜部位的特有行为。

此外，我们也比较了pcMSCs和BMMSCs的肿瘤坏死因子（TNF）受体超家族相关基因的表达量，我们收集和分析TNF受体超家族相关基因以评估pcMSCs和BMMSCs之间的特定表现模式。

尽管几个基因在pcMSCs中呈现出可区分的模式（如图6），但我们更专注于第3号诱饵受体（DcR3；或TNFRSF6B）进行进一步分析，以确认DcR3仅在pcMSCs中表现，而在BMMSCs中不表现。其结果如图7所示，发现蜕膜间充质干细胞表达DcR3，而在从不同性别分离的BMMSCs则无。因此，我们认为雌激素受体（ER）、黄体激素受体（PR）、诱饵受体3型（DcR3）能够成为具有生理意义的蜕膜间充质干细胞生物标志，用以区分不同组织来源的间充质干细胞。

实施例2 高度表达第3号诱饵受体（DcR3）的蜕膜胎盘间充质干细胞（pcMSCs）的培养方法

本发明提供一种新的蜕膜胎盘间充质干细胞的培养方法，所述方法为在现有间充质干细

胞培养方法中，加入发炎相关的细胞激素TNF- α 及IFN- γ 进行刺激。

具体地，蜕膜胎盘间充质干细胞以现有无菌操作细胞增殖培养方式，使用无血清的干细胞培养基进行细胞的传代培养，培养期间每三日更换新鲜的干细胞培养溶液，其中该培养基包含有MCDB201配方培养基、浓度1%的胰岛素-转铁蛋白-硒（insulin transferrin selenium, ITS）及浓度10 ng/ml的表皮生长因子（epidermal growth factor, EGF）。

不同于现有培养方式的是，本发明为在当所述蜕膜胎盘间充质干细胞贴盘后，即加入诱导步骤。

本发明将细胞分成四组，分别是(1) 阴性对照组、(2) 20ng/mL细胞激素TNF- α 诱导组、(3) 20ng/mL细胞激素IFN- γ 诱导组以及(4) 同时加入20ng/mL细胞激素TNF- α 及20ng/mL细胞激素IFN- γ 诱导组。

首先， 1×10^5 个蜕膜胎盘间充质干细胞培养于六孔培养板中，于培养箱中隔夜培养后，移除培养基并依各组条件分别加入(1) 未加入刺激因子的完全培养基，(2) 含20ng/mL细胞激素TNF- α 的完全培养基，(3) 含20ng/mL细胞激素IFN- γ 的完全培养基，以及(4) 同时含20ng/mL细胞激素TNF- α 及20ng/mL细胞激素IFN- γ 的完全培养基，并培养48小时。经诱导后的蜕膜胎盘间充质干细胞以蛋白质印迹法（Western Blot）进行鉴定，其结果显示，所有的诱导组都显示可增强DcR3在蜕膜间充质干细胞的表达量（如图8）。

本发明也进一步测试诱导蜕膜胎盘间充质干细胞增强DcR3表达量的细胞激素适用剂量，结果发现，使用15ng/mL细胞激素TNF- α 亦能增强蜕膜胎盘间充质干细胞中DcR3的表达量，而10ng/mL的细胞激素IFN- γ 即可增强蜕膜胎盘间充质干细胞中DcR3的表达量，同样地，将两者一起加入进行诱导亦观察到增强蜕膜胎盘间充质干细胞中DcR3表达量的结果。

实施例3 蜕膜胎盘间充质干细胞（pcMSCs）具有促进血管新生的潜力

进一步发掘DcR3在蜕膜间充质干细胞的应用潜力，本发明利用所述蜕膜胎盘间充质干细胞（pcMSCs）进行研究。

本发明进一步试验未经细胞激素处理的蜕膜胎盘间充质干细胞及经细胞激素TNF- α 及IFN- γ 进行刺激的蜕膜胎盘间充质干细胞在血管新生试验上的差异。

依据前述的培养方法，将本发明的蜕膜间充质干细胞培养于悬挂式薄膜细胞培养皿（Transwell），实验流程如图9所示，依据悬挂式薄膜细胞培养皿孔径不同从而调整使用的细胞数量。

本发明首先将 1×10^4 个本发明的蜕膜间充质干细胞培养于24孔细胞培养板用的悬挂式薄膜细胞培养皿（Transwell），并以15ng/mL的TNF- α 及10ng/mL的IFN- γ 诱导48小时后，将所述悬挂式薄膜细胞培养皿（Transwell）移至内皮细胞株（SVEC）的培养皿中，使诱导后的本发明的蜕膜间充质干细胞与SVEC共培养用于管形成测定。SVEC细胞株培养于细胞培养用基

质凝胶（matrigel）上，共培养6小时后，通过荧光显微镜拍摄的图像计算总分支点的数量。

本发明的蜕膜间充质干细胞以细胞激素诱导48小时后，以ELISA测定培养基中DcR3浓度可发现，诱导组别相较于对照组可以显著提高pcMSCs的DcR3表达量（如图10A）。

本发明的蜕膜间充质干细胞与SVEC共培养6小时后，通过荧光显微镜拍摄的图像计算总分支点的数量，每组的代表性图像显示如图10B。

本发明也将 2×10^5 个本发明的蜕膜间充质干细胞培养于6孔细胞培养板用的悬挂式薄膜细胞培养皿（Transwell）中进行相同实验也得到相同的结果（结果未显示）。

统计结果显示，与正常培养条件组（Normal control）相比，用TNF- α 和IFN- γ 诱导的pcMSCs显著诱导出更多的分支点产生，并且这种现象被抗DcR3抗体（0.5 $\mu\text{g/mL}$ ）的应用逆转（如图10C）。抗DcR3抗体（DcR3 antibody）中和组的分支点数量最低，甚至低于正常培养条件组，反映出DcR3的恒定表达对血管生成有影响。因此，蜕膜间充质干细胞能通过表达DcR3可促进血管新生。

权 利 要 求 书

1. 一种培养蜕膜胎盘间充质干细胞的方法，其特征在于，所述方法包括在无血清培养基配
方中，加入诱导步骤，其中所述诱导步骤为在培养过程中，在细胞培养基中加入至少一
种细胞激素进行刺激，使所述蜕膜胎盘间充质干细胞高度表达第3号诱饵受体；所述无血
5 清培养基配方含有MCDB201培养基、表皮生长因子和ITS细胞培养添加物。
2. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述至少一种细胞激素为选自肿瘤坏死因子- α 、干扰素- γ 或其组合。
3. 如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述诱导步骤为在所述蜕膜胎盘间充质干细胞贴
盘后加入所述至少一种细胞激素。
- 10 4. 如权利要求2所述的方法，其特征在于，所述肿瘤坏死因子- α 的有效量为15~20 ng/ml，
且所述干扰素- γ 的有效量为10~20 ng/ml。
5. 如权利要求2所述的方法，其特征在于，所述肿瘤坏死因子- α 及所述干扰素- γ 为进行刺
激48小时。
6. 如权利要求2所述的方法，其特征在于，所述肿瘤坏死因子- α 及所述干扰素- γ 为一起加
15 入所述细胞培养基中。
7. 一种通过如权利要求1所述的方法所培养出的蜕膜胎盘间充质干细胞，其特征在于，所述
蜕膜胎盘间充质干细胞高度表达第3号诱饵受体。
8. 如权利要求7所述的蜕膜化胎盘间充质干细胞，其特征在于，所述蜕膜化胎盘间充质干
细胞表达雌激素受体、黄体激素受体及第3号诱饵受体。
- 20 9. 一种医药组合物在制备促进血管新生的药物中的用途，其特征在于，所述医药组合物包
含一种有效量的如权利要求7所述的蜕膜化胎盘间充质干细胞。
10. 如权利要求9所述的用途，其特征在于，所述蜕膜化胎盘间充质干细胞表达雌激素受体、
黄体激素受体及第3号诱饵受体。
11. 如权利要求 9 所述的用途，其特征在于，所述有效量的蜕膜胎盘间充质干细胞为 1×10^4
25 个细胞 ~ 2×10^5 个细胞。