



# 发明专利证书

Certificate of Invention Patent

中华人民共和国国家知识产权局

STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

证书号第 1721061 号



# 发明专利证书

发明名称：使成体干细胞产生为球体细胞群体的方法

发明人：徐善慧

专利号：ZL 2011 1 0355162.3

专利申请日：2011 年 11 月 10 日

专利权人：徐善慧

授权公告日：2015 年 07 月 08 日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 11 月 10 日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长  
申长雨

申长雨





(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102533640 B

(45) 授权公告日 2015.07.08

(21) 申请号 201110355162.3

C12N 5/10(2006.01)

(22) 申请日 2011.11.10

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

099138813 2010.11.11 TW

CN 101215545 A, 2008.07.09, 权利要求 1-10, 实施例 1.

(73) 专利权人 徐善慧

地址 中国台湾台北市

US 2006/0147430 A1, 2006.07.06, 说明书第 0010, 0041-0049 段.

(72) 发明人 徐善慧

WO 2010/107392 A1, 2010.09.23, 权利要求 1, 6, 8, 13, 说明书第 4 页最后 1 段至第 5 页第 1 段, 第 12 页第 5 段, 第 51 页第 3-4 段, 第 52 页第 2 段, 第 60 页第 3 段至第 61 页第 2 段.

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

代理人 钟晶 於毓桢

霍娜. 牙胚微环境诱导真皮和牙龈来源成体干细胞分化的实验研究. 《中国博士学位论文全文数据库医药卫生科技辑》. 2009, (第 12 期), E074-3.

(51) Int. Cl.

C12N 5/074(2010.01)

C12N 5/0797(2010.01)

C12N 5/077(2010.01)

C12N 5/073(2010.01)

A61K 35/12(2015.01)

A61K 35/28(2015.01)

A61K 35/30(2015.01)

A61K 35/42(2015.01)

A61K 35/50(2015.01)

A61P 43/00(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

钱莘. 肺干细胞研究进展. 《中国肺癌杂志》. 2007, 第 10 卷 (第 4 期), 第 337-340 页.

任晓庆等. 骨髓间叶干细胞与成心肌细胞分化研究进展. 《中华心律失常学杂志》. 2003, 第 7 卷 (第 2 期), 第 120-121 页.

审查员 李子东

权利要求书2页 说明书20页

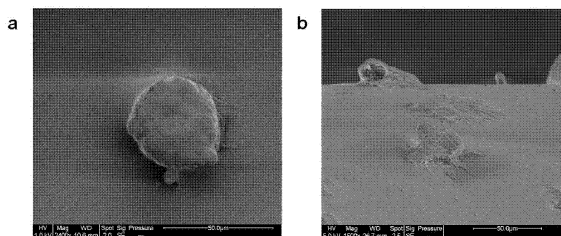
序列表1页 附图16页

(54) 发明名称

使成体干细胞产生为球体细胞群体的方法

(57) 摘要

本发明为提供一种使成体干细胞产生为球体细胞群体的方法, 包含体外培养成体干细胞于生物相容性高分子形成的薄膜上, 亦可将此薄膜以化学或物理方法被覆于其他基材的表面, 其中该生物相容性高分子为几丁聚糖、褐藻酸盐、透明质酸、银耳多糖、聚赖氨酸、聚己内酯或其任一组合, 经由此方法可使所培养的成体干细胞成球状, 且具有突出的自我更新及维持干性 (stemness) 能力。此方法可用于筛选纯化具较佳自我更新能力的干细胞, 亦可用于制备为医药组合物。另外, 经由此方法可使所培养的成体干细胞于摄入纳米粒子的效率以及在基因转殖的效率有优异的效果。



CN 102533640 B

1. 一种使成体干细胞产生为球体细胞群体的方法, 包含:

体外培养成体干细胞于生物相容性高分子形成的一薄膜上, 其中该生物相容性高分子为几丁聚糖、褐藻酸盐、透明质酸、银耳多糖、聚麸胺酸 (glutamic acid) 盐类、聚己内酯或其任一组合; 以及

收集由成体干细胞聚集成的球体细胞群体,

其中该球体细胞群体会扩大且具有自我更新及分化 (differentiation) 为一体细胞的能力;

其中该成体干细胞选自由自鼠分离而来的神经干细胞、自鼠分离而来的神经前驱细胞、脂肪干细胞、牙龈干细胞、骨髓间叶干细胞及小鼠肺干细胞所组成的群组。

2. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该生物相容性高分子薄膜可由涂布或接枝的方式被覆于任何基材上。

3. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该生物相容性高分子为几丁聚糖与透明质酸的组合, 且几丁聚糖与透明质酸的比例约为 3:0.177 至 3:4.425 (w/w)。

4. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该生物相容性高分子为几丁聚糖与银耳多糖的组合, 且几丁聚糖与银耳多糖的比例约为 3:0.4 至 3:4.5 (w/w)。

5. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该生物相容性高分子为聚己内酯与透明质酸的组合。

6. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该生物相容性高分子为聚麸胺酸与几丁聚糖的组合。

7. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该体细胞为神经细胞。

8. 如权利要求 1 所述的方法, 其中该球体细胞群体进一步具有分化为心肌细胞、软骨细胞、硬骨细胞或脂肪细胞的能力。

9. 如权利要求 7 所述的方法, 其中当该球体细胞群体为该脂肪干细胞时, 会分化为该心肌细胞。

10. 如权利要求 9 所述的方法, 进一步包含使该脂肪干细胞与 5-azacytidine 接触, 使脂肪干细胞分化为该心肌细胞。

11. 如权利要求 8 所述的方法, 其中当该球体细胞群体为该牙龈干细胞、或该脂肪干细胞时, 会分化为该软骨细胞。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 进一步包含使该牙龈干细胞、或该脂肪干细胞与转型生长因子  $\beta 3$  (TGF- $\beta 3$ ) 接触, 使分化为该软骨细胞。

13. 一种筛选具有自我更新能力成体干细胞的方法, 包含使候选成体干细胞与生物相容性高分子形成的薄膜接触一段有效时间, 然后判定具有形成球体细胞群体的成体干细胞为具有自我更新能力、生长力与分化潜能的成体干细胞, 其中该生物相容性高分子为几丁聚糖、褐藻酸盐、透明质酸、银耳多糖、聚麸胺酸、聚己内酯或其任一组合;

该成体干细胞选自由自鼠分离而来的神经干细胞、自鼠分离而来的神经前驱细胞、脂肪干细胞、牙龈干细胞、骨髓间叶干细胞及小鼠肺干细胞所组成的群组。

14. 如权利要求 17 所述的方法, 其中该有效时间较佳为 1 日到 4 日。

15. 如权利要求 17 所述的方法, 其中该生物相容性高分子薄膜可由涂布或接枝的方式被覆于任何基材上。

16. 一种标定成体干细胞的方法,包含:

使成体干细胞与生物相容性高分子形成的薄膜,其中该成体干细胞会聚集成球体细胞群体,及

把该成体干细胞与纳米粒子接触一段有效时间,使形成球体细胞群体的成体干细胞能以纳米粒子作为细胞标定,其中该生物相容性高分子为几丁聚糖、褐藻酸盐、透明质酸、银耳多糖、聚赖氨酸、聚己内酯或其任一组合;

该成体干细胞选自由自鼠分离而来的神经干细胞、自鼠分离而来的神经前驱细胞、脂肪干细胞、牙龈干细胞、骨髓间叶干细胞及小鼠肺干细胞所组成的群组。

17. 如权利要求 20 所述的方法,其中该纳米粒为纳米氧化铁。

18. 如权利要求 20 所述的方法,其中该有效时间较佳为 6 到 72 小时,更佳为 24 小时。

19. 一种使成体干细胞基因转殖的方法,包含:

使成体干细胞与生物相容性高分子形成的薄膜接触一段有效时间,其中该成体干细胞会聚集成球体细胞群体,及

将质体送入该球体细胞群体的成体干细胞,以得到基因转殖的成体干细胞,其中该生物相容性高分子为几丁聚糖、褐藻酸盐、透明质酸、银耳多糖、聚赖氨酸、聚己内酯或其任一组合;

该成体干细胞选自由自鼠分离而来的神经干细胞、自鼠分离而来的神经前驱细胞、脂肪干细胞、牙龈干细胞、骨髓间叶干细胞及小鼠肺干细胞所组成的群组。

20. 如权利要求 23 所述的方法,其中该有效时间较佳为 1 日到 4 日。

## 使成体干细胞产生为球体细胞群体的方法

### 技术领域

[0001] 本发明是关于一种成体干细胞的培养方法,尤其是有关一种应用生物相容性高分子使成体干细胞聚集成球体且分化能力提升的方法。

### 背景技术

[0002] 干细胞为一种尚未分化完全的细胞,具有自我更新 (self-renew) 与分化的可塑性,在组织工程以及再生医学的应用上极具潜力;干细胞根据分化的潜能,分为全能干细胞 (totipotent stem cells)、三胚层多能干细胞 (multipotent stem cells)、单胚层多潜能干细胞 (pluripotent stem cells) 与单能干细胞 (unipotent stem cells),例如:桑椹胚 (morula) 之前的每个细胞都保有全能性,也就是将任一个细胞放在子宫中都可以发育成一个完整的个体,具这种潜能的细胞称为全能干细胞。单独只有内细胞团块 (inner cell mass) 的细胞,虽然无法发育成整个个体 (因为缺乏分化成滋养外胚层的能力,滋养外胚层之后会分化成羊膜和胎盘),但具有发展成个体过程中分化为各种细胞的能力,称为三胚层多能干细胞。间叶干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 能分化成硬骨、软骨、脂肪和其他结缔组织或转分化为神经细胞、肝脏细胞等,称为单胚层多潜能干细胞。神经干细胞 (neural stem cells) 只能分化成神经元或是神经胶细胞,称为单能干细胞。

[0003] 干细胞又可依来源分为胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 和成体干细胞 (adult stem cells)。胚胎干细胞通常是指来自囊胚内细胞团的细胞,成体干细胞一般是指取自婴儿出生后的干细胞。成体干细胞包括但不限于造血干细胞 (hematopoietic stem cells)、间叶干细胞、神经干细胞 (neural stem cells, NSCs)、肝干原细胞 (oval cells) 等。其中间叶干细胞又依来源包括但不限于骨髓间叶干细胞 (BMSCs)、胎盘干细胞 (placenta-derived mesenchymal stem cells, PDMSCs)、脂肪干细胞 (adipose-derived adult stem cells, ADASs)、牙龈干细胞 (human gingival fibroblasts, HGF) 等等。

[0004] 胚胎干细胞具有无限次的复制能力和多潜能性的分化潜能,然而其临床应用上却有许多待克服的问题,例如道德上的争议以及移植时会产生免疫排斥等等。成体干细胞则因临床上多采自体移植的应用方式,可避免移植时产生免疫排斥的问题及道德上的争议的优点,然而成体干细胞分裂次数有限,且通常仅能分化成少数几种细胞,如神经干细胞经适当的条件下可分化为神经元 (neurons)、星状胶质细胞 (astrocytes) 以及寡树突胶质细胞 (oligodendrocytes),且成体干细胞在体外增殖培养过程中,常会产生不易维持生长分化活性及功能性的问题。

[0005] 另一方面,一般习知适合培养干细胞的材料以聚苯乙烯 (polystyrene)、明胶 (gelatin)、聚- $\alpha$ -羟基酸、聚乳酸乙醇酸等,其具有稳定生物适应性的优点,但该些材料用于成体干细胞的增殖培养过程,有不易分化及或丧失功能的缺点,影响成体干细胞增殖分化的成效。

[0006] 目前研究已发现细胞形态可调节干细胞治疗前分化因子的谱系,而球体的细胞形态已被证实与分化潜能有关,例如胚胎干细胞聚集的群落自紧密的细胞-细胞接触可以细

胞自我更新;胚胎体 (Embryoid bodies, EB) 为胚胎干细胞三度空间细胞聚集,可在模拟的正常胚胎生长环境下初始分化,但目前仍未有成体干细胞聚集为球体的有效方法。

## 发明内容

[0007] 为解决习知成体干细胞体外培养不易维持干性 (stemness) 及分化的问题,本发明的目的为提供一种使成体干细胞产生为球体细胞群体的方法,包含体外培养成体干细胞于生物相容性高分子形成的薄膜上,其中该生物相容性高分子为几丁聚糖、褐藻酸盐、透明质酸、聚己内酯、银耳多糖、聚赖氨酸或其任一组合;以及收集由成体干细胞聚集成成的球体细胞群体,其中该球体细胞群体会扩大且具有自我更新能力、生长力及分化为体细胞的能力,经由此过程亦可将不纯的细胞或老化的干细胞移除,达到纯化与筛选具较高活性干细胞的目标,并使此干细胞在体外可继代培养至较高的代数;该成体干细胞选自自由自鼠分离而来的神经干细胞、自鼠分离而来的神经前驱细胞、脂肪干细胞、牙龈干细胞、骨髓间叶干细胞、肺干细胞所组成的群组,而生物相容性高分子可为几丁聚糖与透明质酸的组合,且几丁聚糖与透明质酸的比例 (w/w) 约为 3/0.177 至 3/4.425,因本发明使用 0.1mg/cm<sup>2</sup>、0.5mg/cm<sup>2</sup>、2.5mg/cm<sup>2</sup>, 因为一个玻片 1.77cm<sup>2</sup>, 所以是 3mg(chitosan):0.177mg(HA)、3mg(chitosan):0.885mg(HA)、3mg(chitosan):4.425mg(HA) 都有效,是利用透明质酸负电吸附在几丁糖(正电)表面的双层材料,否则透明质酸抓不住表面会溶到水中,该体细胞可为神经细胞。另一方面,由成体干细胞产生的该球体细胞群体进一步具有转分化(transdifferentiation) 为心肌细胞或软骨细胞的能力,其中当该球体细胞群体为脂肪干细胞时,使脂肪干细胞与 5-azacytidine 接触会转分化为心肌细胞;而当该球体细胞群体为牙龈干细胞、脂肪干细胞时,使前述细胞与转型生长因子  $\beta 3$  (TGF- $\beta 3$ ) 接触会转分化为软骨细胞。

[0008] 本发明的另一目的为提供一种具有分化能力的成体干细胞,为由以下方法所制成,包含使成体干细胞与生物相容性高分子形成的薄膜接触一段有效时间,其中该生物相容性高分子为几丁聚糖、褐藻酸盐、透明质酸、聚赖氨酸或其任一组合;其中该成体干细胞会形成球体细胞群体,该球体细胞群体会扩大并具有转分化为软骨细胞或心肌细胞的能力;该成体干细胞选自自由自鼠分离而来的神经干细胞、自鼠分离而来的神经前驱细胞、脂肪干细胞、牙龈干细胞、所组成的群组,而生物相容性高分子可进一步包含具有如 SEQ ID NO:1 胺基酸序列的纤维素结合功能区域 -RGD 贴附序列 (cellulose binding domain-RGD, CBD-RGD) 能提升球体细胞群体的转分化能力;生物相容性高分子可为几丁聚糖与透明质酸的组合,且几丁聚糖与透明质酸的比例约为 3:0.177 至 3:4.425(w/w);可为几丁聚糖与银耳多糖的组合,且几丁聚糖与银耳多糖的比例约为 3:0.4 至 3:4.5(w/w);亦可为聚己内酯与透明质酸的组合;该体细胞可为神经细胞。

[0009] 本发明的又一目的为提供一种医药组合物,包含前述的成体干细胞及药学上可接受载体。载体可为赋形剂(如水)、填充剂(如蔗糖或淀粉)、黏合剂(如纤维素衍生物)、稀释剂、崩解剂、吸收促进剂或甜味剂,但并未仅限于此。本发明医药组合物可依一般习知干细胞疗法药剂的制备方法生产制造,将本发明成体干细胞与一种以上的载体相混合,制备出所需的剂型,此剂型可包括锭剂、粉剂、粒剂、胶囊或其他液体制剂,但未以此为限。本发明的医药组合物可应用于临床上干细胞疗法,以促进神经细胞、心肌细胞或软骨细胞的

再生，亦可藉此包含成体干细胞的医药组合物来避免胚胎干细胞取得不易及伦理上的考量。

[0010] 本发明的又一目的为提供一种标定成体干细胞的方法，包含使成体干细胞与生物相容性高分子形成的薄膜，其中该成体干细胞会聚集成为球体细胞群体，及把该成体干细胞与一纳米粒接触一段有效时间，使形成球体细胞群体的成体干细胞能以纳米粒作为细胞标定，其中该生物相容性高分子为几丁聚糖、褐藻酸盐、透明质酸、银耳多糖、聚赖氨酸、聚己内酯或其任一组合。

[0011] 本发明的又一目的为提供一种使成体干细胞基因转殖的方法，包含使成体干细胞与生物相容性高分子形成的薄膜接触一段有效时间，其中该成体干细胞会聚集成为一球体细胞群体，及将质体送入该球体细胞群体的成体干细胞，以得到基因转殖的成体干细胞，其中该生物相容性高分子为几丁聚糖、褐藻酸盐、透明质酸、银耳多糖、聚赖氨酸、聚己内酯或其任一组合。

[0012] 本发明的优点为提供一新颖的哺乳动物多能成体干细胞、其医药组合物、以及用于生产该成体干细胞的方法，是借由生物相容性高分子接触而达到自我更新及维持干性(stemness)的突出效果。另外，经由本发明生产该成体干细胞的方法生产的成体干细胞，在摄入纳米粒子的效率以及在基因转殖的效率皆有优异的效果。

[0013] 以下将配合图式进一步说明本发明的实施方式，下述所列举的实施例为用以阐明本发明，并非用以限定本发明的范围，任何熟习此技艺者，在不脱离本发明的精神和范围内，当可做些许更动与润饰，因此本发明的保护范围当视后附的申请专利范围所界定者为准。

## 附图说明

[0014] 图1为培养在 a. 明胶和 b. 组织培养板(TCPS)上三天的神经干细胞；无任何球体形成。比例尺为 100  $\mu\text{m}$ 。

[0015] 图2为培养在不同几丁聚糖(a. 几丁聚糖-1 b. 几丁聚糖-2)上的神经干细胞在第1、2、3天的形态；比例尺为 100  $\mu\text{m}$ 。

[0016] 图3为培养在几丁聚糖-1上的神经干细胞五天后利用扫描式电子显微镜(SEM)结果：a. 俯视图 b. 侧视图。

[0017] 图4为第 a. 3 b. 5 c. 7 d. 15 e. 20 f. 25 天细胞形态(左)和 F1B- 萤光绿蛋白表现(右)；比例尺为 200  $\mu\text{m}$ 。

[0018] 图5为培养在几丁聚糖-1上的神经干细胞在 a. F1B- 萤光绿蛋白和 b. nestin(免疫染色)第1、4、21天的表现；比例尺为 100  $\mu\text{m}$ 。

[0019] 图6为培养在几丁聚糖-1上的 a. DAPI(细胞核)和 b.  $\beta$  3-tubulin(免疫染色)在第4、14、21天的球体形态；比例尺为 100  $\mu\text{m}$ 。

[0020] 图7为培养在四种2D褐藻酸盐膜(a. A#1 b. A#2)上的神经干细胞/神经前驱细胞三天后的形态；比例尺为 250  $\mu\text{m}$ 。

[0021] 图8为 NSPCs 培养在褐藻酸盐薄膜和 TCPS 上的分化能力比较；TuJ1 为神经细胞、GFAP 为神经胶细胞。

[0022] 图9为大鼠脂肪干细胞在 TCPS(T)、PVA(P)材料上培养第1天、3天和第11天的

细胞球形态;-:无添加 5-aza;+:添加 5-aza。

[0023] 图 10 为大鼠脂肪干细胞 (rADASs) 在 Chitosan3(CS3)、Chitosan 1(CS1)、Chitosan1+CBD-RGD(CS1R) 材料上培养第 1 天、3 天和第 11 天的细胞球形态;-:无添加 5-aza;+:添加 5-aza。

[0024] 图 11 为大鼠脂肪干细胞 (rADASs) 在 TCPS(T)、Chitosan 1(CS1)、Chitosan1+CBD-RGD(CS1R) 材料上利用 RT-PCR 实验后的毛细管电泳图;Cardiomyocyte positive(CP);无添加 5-aza;+:添加 5-aza。

[0025] 图 12 为人类包皮纤维母细胞培养在 A. 几丁聚糖-1, 人类牙龈干细胞培养于 B. 几丁聚糖-1 C. 几丁聚糖-2 D. TCPS 上植入三天后的细胞形态;比例尺为 100  $\mu\text{m}$ ;放大倍率为 10 倍。

[0026] 图 13 为人类牙龈干细胞培养在几丁聚糖膜上在植入后 A. 12 B. 14 C. 16 D. 18 E. 20 F. 22 G. 24 小时同一范围的形态;比例尺为 100  $\mu\text{m}$ ,放大倍率为 10 倍。

[0027] 图 14 为人类牙龈干细胞培养在几丁聚糖上在植入后第 A. 0 B. 1 C. 2D. 3 天的形态;和培养在 TCPS 上在植入后第 E. 0 F. 1 G. 2 H. 3 天的形态;人类牙龈干细胞培养在 I. 含诱导培养液的几丁聚糖 J. 含基本培养液的几丁聚糖和 K. 含诱导培养液的 TCPS L. 含基本培养液的 TCPS 上 1 天后的形态;人类牙龈干细胞培养在 M. 含诱导培养液的几丁聚糖 N. 含基本培养液的几丁聚糖和 O. 含诱导培养液的 TCPS P. 含基本培养液的 TCPS 上 在软骨诱导后 2 天的形态;人类牙龈干细胞培养于 Q. 含诱导培养液的几丁聚糖 R. 含基本培养液的几丁聚糖和 S. 含诱导培养液的 TCPS T. 含基本培养液的 TCPS 上在软骨诱导后 7 天的形态;人类牙龈干细胞培养于 U. 含诱导培养液的几丁聚糖 V. 含基本培养液的几丁聚糖和 W. 含诱导培养液的 TCPS X. 含基本培养液的 TCPS 上在软骨诱导后 14 天的形态;比例尺为 100  $\mu\text{m}$ ,放大倍率为 10 倍。

[0028] 图 15 为骨髓间叶干细胞培养在几丁聚糖膜上 4 天后的细胞形态。

[0029] 图 16 为使用两种纯度不同的牙龈干细胞 (GF-A 及 GF-B), 经由几丁聚糖膜培养 1 天, 分出成球「S」与非成球「N」的细胞, 做各种细胞活性测试。A 图为各组牙龈干细胞在不同继代数下, 增殖倍增时间比较;B 图为各组的牙龈干细胞外观;C 图为各组的牙龈干细胞生成骨小结 (bone nodules) 数量的比较;D 图为各组的牙龈干细胞生成脂肪滴 (lipid droplets) 数量的比较。

[0030] 图 17 为不同干细胞培养在不同材料上。(A) 培养在 TCPS 上的细胞形态 (B) 培养载含基本培养液的几丁聚糖和几丁聚糖-透明质酸上三天后的细胞形态。

[0031] 图 18 为脂肪干细胞培养上含基本培养液几丁聚糖和几丁聚糖-透明质酸和 TCPS 上第 10 天的干性基因 (Oct4、Sox2 和 Nanog) 的 mRNA 表现量化结果。

[0032] 图 19 为培养在几丁聚糖和几丁聚糖-透明质酸膜 (与 TCPS 比较) 上在软骨诱导后 7 天以 RT-PCR 量化脂肪干细胞和胎盘干细胞的软骨细胞基因表现。

[0033] 图 20 为培养脂肪干细胞在几丁聚糖-银耳多糖膜上在 (A) 24 小时, 及 (B) 48 小时后的形态。

[0034] 图 21 为培养肺干细胞在聚己内酯、聚己内酯-几丁聚糖膜上第 1、2 天的形态。

[0035] 图 22 为肺干细胞培养在聚己内酯、聚己内酯-几丁聚糖膜上第 1、3 天干性基因 (actin、Oct4、Sox2 和 Nanog) 的 mRNA 表现结果。

[0036] 图 23 为脂肪干细胞培养在聚麸胺酸膜上脂肪小时的形态如图 22, (A) 图的培养材料为聚麸胺酸钠盐, (B) 图的培养材料为聚麸胺酸钙盐。

[0037] 图 24 由上至下分别为培养在 TCPS、几丁聚糖以及几丁聚糖-透明质酸上的脂肪干细胞在纳米氧化铁浓度 0ppm 以及 25ppm 24 小时后的普鲁士蓝染色照片。

[0038] 图 25 为质体 pTRE-Tight-DsRED2 的图谱。

[0039] 图 26 为由 TCPS、几丁聚糖以及几丁聚糖-透明质酸培养的脂肪干细胞经由两种不同转染方法的转染效率图, 其中 Y 轴为基因转殖的效率, 即为转殖成功的细胞数百分比。

## 具体实施方式

[0040] 本发明实施例使用的天然生物相容性高分子为几丁聚糖、褐藻酸盐、透明质酸或其任一组合, 其中几丁聚糖 (chitosan) 由胺基多糖类 (amino-polysaccharide) 所组成, 几丁聚糖包含与细胞外间质相同成分的葡萄糖胺多糖 (glycosamino-glycan), 所以生物相容性高且为生物可分解的材料。褐藻酸盐 (alginate) 为可增进神经轴突再生的天然软质聚合物, 褐藻酸盐可在生理条件 (于室温或是体温、生理 pH 值以及等渗透压) 下与钙离子交联; 褐藻酸钙 (calcium alginate) 为生物可相容性和无致免疫性, 所以为高稳定性以及高生物相容性的材料。透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 可增进细胞迁移 (migration)、增殖以及间质分泌的材料, 且为水溶性不会形成薄膜, 在本发明中是与几丁聚糖组合形成薄膜。因此, 本发明为揭露前述生物相容性高分子应用于成体干细胞培养的新颖方法。

[0041] 本发明实施例使用的成体干细胞为自鼠分离而来的神经干细胞、自鼠分离而来的神经前驱细胞、脂肪干细胞、牙龈干细胞, 经与前述的生物相容性高分子形成的薄膜接触, 会使该些成体干细胞聚集形成球体细胞群体, 且本发明的球体细胞群体以胰蛋白酶 (trypsin) 处理是会整粒球由薄膜上脱离, 若只是先前文献提及的干细胞聚集现象, 用胰蛋白酶 (trypsin) 处理是一颗一颗细胞分开脱离。

[0042] 本发明的各实施例中, 实施例 1 及 2 为利用不同分子量的几丁聚糖和不同 M/G 比的褐藻酸盐制成二度空间 (2D) 薄膜, 比较神经干细胞培养于其上和其他习知材料 (ex. TCPS) 的形态及分化结果比较。实施例 3-5 为利用不同分子量的几丁聚糖、改质的几丁聚糖、或与透明质酸结合的几丁聚糖膜分别培养脂肪干细胞、牙龈干细胞、包皮纤维母细胞, 与培养于其他习知材料 (ex. TCPS) 的形态以及分化结果比较。实施例 6 为利用几丁聚糖-银耳多糖培养脂肪干细胞与神经干细胞, 观察其形态。

[0043] 本发明的实施例为借由分析神经干细胞及神经前驱细胞在不同材料上的型态与分化, 判断其自我更新及干性维持与否; 其中不同材料为以去乙酰度、表面电位、及水接触角分析各材料产生出球体细胞群体的效果。进一步并确认球体细胞群体的细胞型态以及分化的效果, 其中 F1B- 萤光绿蛋白 (F1B-GFP) 在未分化的神经干细胞会表现出绿色萤光, 因此神经干细胞分化的分析为侦测 F1B- 萤光绿蛋白的表现, 进而配合免疫萤光侦测神经干细胞的标记 nestin 及未发育完全神经元的标记  $\beta$  3-tubulin。

[0044] 在本发明中所使用者, “神经干细胞” 或 “神经前驱细胞” 为指未分化的中枢神经 (CNS) 多能干细胞。

[0045] “具有分化能力的成体干细胞” 是指成体干细胞容易分化为多种类的体细胞。依照本发明的方法处理成体干细胞, 能使成体干细胞具有自我更新及分化的能力, 提升成体干

细胞的可塑性。

[0046] “一段有效时间”是指生物相容性高分子与本发明的成体干细胞形成一球体细胞群体所必需的一段时间,例如神经干细胞与几丁聚糖接触一段时间使其聚集形成球体。关于与生物相容性高分子接触的一段有效时间,在本说明书中可为4个小时到14日或更多,较佳为1日到4日。

[0047] “药学上可接受载体”是指用于达成或增进本发明医药组合物成功递送的物质,可为赋形剂(如水)、填充剂(如蔗糖或淀粉)、黏合剂(如纤维素衍生物)、稀释剂、崩解剂、吸收促进剂或甜味剂,但并未仅限于此。

[0048] “约”、“约略”或“近似地”一般是指20%,较佳为10%,最佳为5%的范围内。本文中的数值为近似值,在未明确定义的情况下可隐含「约」「约略」或「近似地」的含义。

[0049] “一”为指一个或一个以上(即是至少一个)的冠词语法受词。举例而言,“一细胞”为指一个细胞或一个以上的细胞。

[0050] 本发明实施例中测量生物相容性高分子表面电位的分析方法,准备4cm×1.5cm的薄膜,利用表面电位分析仪(Beckman Coulter)测其表面电位(mV, Surface zeta potential)。

[0051] 本发明实施例所用的神经干细胞免疫荧光染色方法,为量测几丁聚糖膜上神经干细胞球的分化状态,细胞标记(nestin,标记于神经干细胞; $\beta$ 3-tubulin,标记于神经元)用于免疫荧光染色。在细胞培养不同周期时间被固定于4%仲甲醛(paraformaldehyde)中。以磷酸盐缓冲液润洗三次。加入0.5% Triton X-100(t-octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma, USA)500  $\mu$ l 10分钟以破坏细胞膜及核膜。以磷酸盐缓冲液润洗样本几次,加入20  $\mu$ l 一级抗体于暗室37°C培养置放1小时。为将细胞染色,加入0.1%的4,6-联脒-3-苯吡啶二盐酸盐(4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)(购于DAPI, Sigma, D9542, USA)200  $\mu$ l于暗室30分钟。最后,润洗样本后将其架于显微镜载玻片上,以甘油凝胶密封。样本于正立式荧光显微镜观察(购于Nikon, 80i)。一级抗体稀释比例如下:anti-nestin(R-20)goat-poly IgG抗体(购于Santa Cruz, USA;1:1000)以及anti- $\beta$ 3-tubulin mouse-mono IgG(购于Santa Cruz, USA;1:1000)。二级抗体稀释比例为FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(以马血清蛋白稀释;1:100;购于Chemicon, CA)以及goat anti-rabbit IgG-horse radish peroxidase(HRP)(购于Santa Cruz, USA;1:100)。

[0052] 本发明实施例对于心肌分化能力的分析是利用正立荧光显微镜(NIKON):样品以磷酸盐缓冲液润洗,加入4% paraformaldehyde 室温下固定20分钟,以磷酸盐缓冲液清洗3次,每次10分钟,加入3% BSA/磷酸盐缓冲液室温下30分钟后,吸出,加入3% BSA配制的一抗,稀释倍率为下表,以parafilm封住后放入4°C冰箱过夜;隔天,将一抗吸出,以磷酸盐缓冲液润洗三次(以下步骤全程避光),加入3% BSA配制的二抗,以铝箔纸盖住避光后放入37°C培养箱1小时;将二抗吸出,磷酸盐缓冲液润洗三次,加入3% BSA配制的DAPI染剂3分钟,吸出,磷酸盐缓冲液清洗三次后,加入磷酸盐缓冲液,利用针头与夹子将材料从24孔培养板取出,放置于载玻片上以正立荧光显微镜(购于NIKON)观察。

[0053] 本发明实施例所分析细胞表面蛋白特征,是使用流式细胞仪分析方法,利用流式细胞仪(购于FACScan, BD, USA)。首先,将细胞从培养盘上取下来,取 $5 \times 10^5$  cells/ml以

磷酸盐缓冲液清洗,以 1000rpm 离心 5 分钟,重复三次后收集细胞,加入 100  $\mu$ l 磷酸盐缓冲液回溶细胞后,在细胞液中加入 10  $\mu$ l 一抗,反应 30 ~ 60 分钟,磷酸盐缓冲液润洗三次后,避光下加入 10  $\mu$ l 二抗反应 30 ~ 60 分钟,以磷酸盐缓冲液清洗,1000rpm 离心 5 分钟,重复三次以移除未反应的抗体,最后加入 500 $\mu$ l 磷酸盐缓冲液回溶细胞,即可移至流式细胞仪进行分析。

[0054] 前述该些分析结果是以平均值  $\pm$  标准差表示的,并使用 t 检定 (t-test) 作统计数据分析,当 p 值小于 0.05 则具有统计上意义的差异性。

[0055] 以下,本发明将结合各种实例详细叙述。这些实例仅提供作为例示目的,并非推断本发明限于这些实例。另外,尽管在实例中例示成体干细胞中的神经干细胞、神经前驱细胞及脂肪干细胞自鼠分离而来;牙龈干细胞、胎盘干细胞自人类分离而来,但本发明不可局限于此,而是可应用于自包含人类、大鼠、小鼠及猴等哺乳类动物分离而来者。

[0056] 实施例 1

[0057] 以二种分子量的几丁聚糖薄膜培养成体神经干细胞 / 神经前驱细胞

[0058] 1.1 几丁聚糖薄膜制备

[0059] 利用二种几丁聚糖 -1 (购于 Fluka, USA) 及几丁聚糖 -2 (购于 Sigma, USA) 各自配制浓度为 1% 的几丁聚糖,为称取 0.5g 几丁聚糖粉末溶于 49.5ml 二次水,室温下搅拌半小时后加入 0.5ml 乙酸,并于室温中轻拌 12 小时。隔天使用滤网过滤杂质即为 1% 几丁聚糖溶液,其中几丁聚糖 -1 的分子量约为 510kDa,几丁聚糖 -2 的分子量约为 400kDa。将所得溶液以 100  $\mu$ m 的网目过滤,再涂布于玻璃盖玻片上 (每片直径 15mm 玻片涂布 100  $\mu$ l 溶液),并晾干两天。将几丁聚糖膜浸入 0.5N NaOH 溶液中 5 分钟,再以蒸馏去离子水大面积润洗直到薄膜附近的水的酸碱值达到中性 (neutral)。最后,将该几丁聚糖膜充分晾干。

[0060] 1.2 鼠脑神经干细胞萃取及培养

[0061] 由基因转殖鼠含启动子 F1B- 萤光绿蛋白 (F1B-GFP) 基因的脑部分离出神经干细胞。两个月大的小白鼠整个脑部绞碎再轻磨成更小碎块,取得单一细胞悬浮液。绞碎的细胞植入 35-mm 无补充基质和附着力因子的培养皿中,以 DMEM/F-12 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F-12, 购于 Gibco, USA) 1 : 1 培养液含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (购于 Gibco, USA)。两天后,每个培养皿有将近 10-20 个细胞进行细胞分裂。以胰蛋白酶处理后将其中,并继续培养 2-3 天。进一步用由 200  $\mu$ g/ml 的糖甘类抗生素 geneticin (G418, 购于 Gibco) 挑选出稳定的细胞系 (cell line)。以流式细胞仪 (FACS Aria, 购于 BD Biosciences) 重复纯化 GFP- 阳性的鼠脑细胞至纯度达 95% 以上。

[0062] 1.3 神经干细胞 / 神经前驱细胞在几丁聚糖薄膜上的形态分析与分化为神经细胞的情形

[0063] 将神经干细胞植入培养材料前,玻璃盖玻片上的几丁聚糖膜浸于 75% 乙醇,再以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 润洗,然后放进 24 孔培养板的每一孔中。神经干细胞植入密度为每孔  $5 \times 10^4$  个细胞。用 DMEM/F-12 培养基添加 10% 的胎牛血清 (购于 Gibco, USA), 400  $\mu$ g/ml 糖甘类抗生素 (G418) 以及链霉素 - 青霉素 (100U/ml) 作为培养液。培养于温度 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 的加湿培养箱,每周更换培养液两次;另外并以未加生长因子的聚苯乙烯组织培养板 (tissue culture polystyrene surface, TCPS) 及明胶

(gelatin) 作为对照组,结果如图 1 及图 2 所示。

[0064] 图 1 显示神经干细胞培养在 TCPS 和明胶上三天的形态,在 TCPS 和明胶上无观察到任何细胞聚集,且细胞贴于 TCPS 和明胶。另一方面,培养在几丁聚糖薄膜上的细胞在 1-2 天开始聚集,最终聚集为球状,刚开始 24 小时,大部分的细胞形状为圆形;48 小时内多数细胞聚集形成球体。在几丁聚糖-1 上球体的数量和大小都大致比几丁聚糖-2 还要大(如图 2 所示)。

[0065] 为确认本发明实施例所产生的球体为三度空间的立体球体而不只是聚集,由第三图的扫描式电子显微影像,球体的侧视图可清楚显示其三度结构,而由光学影像显示球体大小随着时间增加,可达约 100  $\mu\text{m}$ 。

[0066] 另外,第四至六图则显示神经干细胞的分化程度。神经干细胞的荧光强度,有绿色荧光显现表示未分化。绿色荧光在 15 天之后开始消退,但仍然清晰(如图 46d 所示)。在 15 天时,一些细胞开始从球内移出,因此,神经干细胞球体的大小改变相当快速,而移出的细胞未显现任何绿色荧光。球体在 15 天后荧光消没除了显示细胞的移出外,球体内的细胞也已经分化。

[0067] 在免疫荧光染色试验上,神经干细胞的标示蛋白培养于几丁聚糖-1 的表示图 5 所示(nestin)和图 6 所示( $\beta$ 3-tubulin)。发现球体在 21 天时仍强烈显示具有 nestin 阳性,显示球体的细胞可维持神经干细胞状态达 21 天;Nestin 的显示在培养时间增加时些微降低。另一方面,整个过程中  $\beta$ 3-tubulin 的表现皆低。此结果显示神经干细胞培养在几丁聚糖薄膜上可为维持这些细胞自我更新能力和干性(stemness)的方法,或用于自细胞群中纯化神经干细胞。

[0068] 1.4 几丁聚糖的去乙酰度、表面电位,以及水接触角值列于表 1。

[0069] 表 1 不同的几丁聚糖(几丁聚糖-1(CS-1)和几丁聚糖-2(CS-2))特性比较(a)去乙酰度(b)表面电位,和(c)表面水接触角。组织培养板(TCPS)的表面水接触角为  $64.9 \pm 4.57^\circ$ 。

[0070]

材料	去乙酰度	表面电位(mV)	表面水接触角 ( $^\circ$ )
CS-1	77.7%	$-3.47 \pm 0.21$	$87.0 \pm 2.08$
CS-2	86.0%	$-1.97 \pm 0.15$	$74.2 \pm 3.67$

[0071] 几丁聚糖-1、几丁聚糖-2 的去乙酰度分别约为 77.7%、86.0%。几丁聚糖去乙酰度值越高,表面水接触角越低,亲水性越高,即亲水性几丁聚糖-2 大于几丁聚糖-1,而两者几丁聚糖表面亲水性都高于 TCPS,因细胞在亲水性高的基质中较容易贴附,神经干细胞贴附在 TCPS 上比几丁聚糖上来得好。而且,神经干细胞在几丁聚糖-2 上的贴附比几丁聚糖-1 要好,且在几丁聚糖-1 上球体形成时间延迟。几丁聚糖的去乙酰度提高,氨基群和分子内的氢键会增加,可能造成表面变硬和强结晶性,也与我们的结果一致。几丁聚糖-1 与几丁聚糖-2 的表面电位皆为负值,但数值接近中性,表面电性较负的表面,在本实施例的结果中,神经干细胞并没有贴附得很好而呈现聚集的状况。几丁聚糖-1 的表面硬度(压痕深度

约 50nm) 近似于内部 (压痕深度 100-150)。另一方面,几丁聚糖-2 的表面硬度高于内部且亦高于几丁聚糖-1,几丁聚糖-2 较几丁聚糖-1 粗糙且表面上更加密集的晶体结构。因更硬和结晶性更高的表面,神经干细胞可能贴附于几丁聚糖-2 比几丁聚糖-1 更好且形成的球体较小。

[0072] 实施例 2

[0073] 以二种褐藻酸盐薄膜培养成体神经干细胞 / 神经前驱细胞、脂肪干细胞

[0074] 2.1 褐藻酸盐薄膜制备

[0075] 利用两种褐藻酸盐制备薄膜,包括较低 M/G 比 ( $\beta$ -D-mannuronic acid/ $\alpha$ -L-guluronic acid ratio) 的褐藻酸盐 A#1 (M/G ratio = 0.5, 分子量 110,000, 购于 Hayashi, Japan) 和较高 M/G 比的褐藻酸盐 A#2 (M/G ratio = 1.59, 分子量 12,000-80,000, Sigma, USA)。褐藻酸盐 A#1 及 A#2 先分别溶于 9mg/ml 氯化钠溶液使溶液浓度为 40mg/ml。调整溶液 pH 值至 7,以高压灭菌 (125°C 以及 1.5atm) 30 分钟后加入 2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸 (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid, 购于 HEPES, Invitrogen) 维持与人体相同的酸碱值。本发明实施例使用的二种褐藻酸盐皆可制作成平滑或是有皱褶的膜。褐藻酸盐薄膜为在每孔加入 400  $\mu$ l 褐藻酸盐至 24 孔培养板 (购于 Corning, USA), 经层流风干 60 分钟再沿孔缘缓慢滴入 102mM 氯化钙制备。

[0076] 2.2 大鼠脂肪干细胞 (rADASs) 的萃取及培养

[0077] 从大鼠 (Sprague-Dawley rate, SD rate) 皮下取得脂肪组织,使用磷酸盐缓冲液清洗,剪成小碎块,第一次离心 (1500rpm, 5mins)。将上层脂肪倒入新的离心管和加入少许磷酸盐缓冲液,再尽量剪小块,进行第二次离心 (1500rpm, 5mins)。取上层脂肪,同时配制消化液:1mg/ml 第一型胶原蛋白酶 (collagenase type I, 购于 Sigma)/Hank's Balanced Salt Solution 溶液 (购于 Invitrogen)。

[0078] 将脂肪与上述消化液混合,放入细胞培养箱震荡 (100rpm, 1 小时)。第三次离心 (1500rpm, 10 分钟)。使用 70m 细胞筛 (购于 Falcon, BD Bioscience) 过滤细胞液,第四次离心 (1500rpm, 5mins)。将上面的油层吸走,后加入培养液,放入 75T-flask 培养皿 (购于 Falcon, BD Bioscience)。隔天细胞贴附培养材料,将上清液抽出,加入新的培养液。培养至脂肪细胞 8 分满后以 0.25% 胰蛋白酶 / 乙二胺四乙酸 (购于 Gibco) 继代细胞,细胞密度为 50000cells/T-flask。

[0079] 2.3 神经干细胞 / 神经前驱细胞于褐藻酸盐薄膜的形态分析与分化为神经细胞的情形

[0080] 鼠脑神经干细胞 / 神经前驱细胞萃取步骤如实施例 1 所述。取得到的细胞培养于 2D 褐藻酸盐膜上,NSPCs 植入含有核藻胶的 24 孔培养板中 (2ml 培养液中植入  $2.5 \times 10^4$  个细胞)。每隔一天更换一半的培养液。

[0081] 12-24 小时后发现 NSPCs 在褐藻酸盐膜上聚集,三天后,发现褐藻酸盐膜上的细胞团无一致的大小 (图 7)。

[0082] 在分化的表现上,NSPCs 培养在 2D 褐藻酸盐膜上形成球体时,能表现出神经细胞与神经胶细胞的基因;而培养在 TCPS 上,呈现类纤维形态的 NSPCs 却无法表现神经细胞与神经胶细胞的基因 (见图 8)。

[0083] 脂肪干细胞、神经干细胞培养 28 天在 A#1 及 A#2 上成球的大小如表 2 所示 (培养

14 天时已有球体形成,且球体大小与 28 天时相似):

[0084] 表 2 脂肪干细胞、神经干细胞培养 28 天在 A#1 及 A#2 上成球的大小。

[0085]

植入数量: $5 \times 10^4$ /孔	在 A#1 上是否聚 为球状	在 A#2 上 是否聚为 球状	A#1 上球 体的直径 (mm)	A#2 上球体 的直径(mm)
神经干细胞	是	是	138.73± 37.04	121.10± 36.90
脂肪干细胞	是	是	192.16± 27.94	141.25± 31.84

[0086] 实施例 3

[0087] 以二种分子量几丁聚糖薄膜以及纤维素结合功能区域 -RGD 贴附序列 (CBD-RGD) 改质的几丁聚糖薄膜培养脂肪干细胞

[0088] 3.1 二种分子量的几丁聚糖薄膜制备

[0089] 本实施例为使用分子量不同于前述实施例的几丁聚糖 -3 (购于 Kiotec), 分子量约为 170kDa, 及几丁聚糖 -1 (购于 Fluka), 分子量约为 510kDa。称取 0.5g 几丁聚糖粉末溶于 49.5ml 二次水, 室温下搅拌半小时后加入 0.5ml 乙酸继续搅拌一天。隔天使用滤网过滤杂质即为 1% 几丁聚糖溶液。

[0090] 表 3 二种几丁聚糖的去乙酰度与分子量

[0091]

	去乙酰度	分子量
几丁聚糖 -3	97%	170kDa
几丁聚糖 -1	77.7%	510kDa

[0092] 取 1% 几丁聚糖溶液 200  $\mu$ l 均匀滴入 1.5cm 圆形玻片, 在常温下自然烘干 1-2 天; 确定膜干之后, 加入 0.5N NaOH 盖过玻片 5 分钟, 之后用二次水清洗 3 次后, 继续泡在二次水至隔天; 隔天把二次水倒掉, 在室温下自然阴干存留的二次水后, 即为几丁聚糖 -3 及几丁聚糖 -1 薄膜。另外并以未加生长因子的聚苯乙烯组织培养板 (tissue culture polystyrene surface, TCPS) 作为控制组之一。

[0093] 另一对照组为聚乙烯醇 (PVA) 薄膜, 因有文献表示牙胚细胞在 PVA 膜上, 细胞会聚集可形成细胞球帮助硬骨分化; 其制备则是称取 2.5g 聚乙烯醇 (Poly vinyl alcohol, PVA, 购于 Sigma, Hot water soluble) 粉末溶于 50ml 二次水, 利用高温高压灭菌釜使的溶解后, 温度降至常温即为 5% 聚乙烯醇溶液。取 5% 聚乙烯醇溶液 150  $\mu$ l 均匀滴入 1.5cm 圆形玻片, 放置 60°C 烘箱下一天即为聚乙烯醇膜。

[0094] 3.2 以纤维素结合功能区域 -RGD 贴附序列 (CBD-RGD) 改质的几丁聚糖 -1 的薄膜制备

[0095] 纤维素结合功能区域 -RGD 贴附序列 (CBD-RGD) 为中兴大学陈震汉教授所提供, 来源为真菌 *Tricoderma konigii* 的纤维水解酶 cellulobiohydrolase I (CBH I) 的基因。

CBH I 的 N 端有一段 36 个氨基酸大小的 cellulose binding domain(CBD),利用聚合酶链锁反应的方法修改的第五个氨基酸的密码,由原来的 tyrosin 改成了 tryptophan,藉以提高 CBD 对纤维素的亲和力,同时在 CBD 基因的 3 端加入一段 PT linker 及一段 RGD 序列基因。RGD 是细胞贴壁因子 (Fibronectin) 中促进细胞贴附的最小功能位,纤维素结合功能区域 -RGD 贴附序列 (CBD-RGD) 具有如 SEQ ID NO:1 氨基酸序列,因 CBD-RGD 有很高的分子量 (25KDa),只需利用库伦引力,便形成一种可以促进细胞贴附于纤维素上的双功能蛋白质。

[0096] 本发明实施例将几丁聚糖 -1 形成的薄膜结合 CBD-RGD,将该薄膜泡于 75% 酒精 3 小时后,使用磷酸盐缓冲液清洗两次,放置半小时等几丁聚糖 -1 的薄膜干;将 CBD-RGD(4  $\mu$ g/20  $\mu$ l) 均匀滴在几丁聚糖 -1 的薄膜上 (4  $\mu$ g CBD-RGD/1.77cm<sup>2</sup>),等 1-2 小时 CBD-RGD 干后,用磷酸盐缓冲液清洗一次即为以 CBD-RGD 改质的几丁聚糖 -1 的薄膜。

[0097] 3.3 大鼠脂肪干细胞 (rADASs) 的萃取及培养

[0098] 大鼠脂肪干细胞 (rADASs) 的萃取及培养如实施例 2。

[0099] 3.4 脂肪干细胞在三种几丁聚糖薄膜的形态分析与分化为心肌细胞的情形

[0100] 本实施例分为两部份,第一部分为比较组织培养板 (T)、聚乙烯醇 (P)、几丁聚糖 3(CS3) 和几丁聚糖 1(CS1)。将 T, P, CS3 和 CS1 薄膜以 75%酒精泡 3 小时,以磷酸盐缓冲液润洗后,放入 24 孔培养板内;使用 0.25%胰蛋白酶 (购于 Gibco) 将大鼠脂肪干细胞 (实验室用细胞代数为 2-6 代) 打下,收集在培养液内,每孔放入  $5 \times 10^4$  细胞液后,摇晃培养板,使细胞均匀分散,再放入细胞培养箱内培养。

[0101] 5-azacytidine(5-aza) 是 DNA 去甲基化的化合物,据研究显示,借着 5-aza 不规则地去甲基化,会诱导细胞成为心肌细胞,故在第四天换成含有 10M 5-aza(5-azacytidine, Sigma) 的培养液,实验组别分为有添加 5-aza(w 5-aza) 与无添加 5-aza(w/o 5-aza) 的组别,所以 w/o 5-aza 的组别,依旧添加原本的培养液。第五天,将培养液吸出,再次换成不含 5-aza 的培养液,继续培养 1 星期后 (共 11 天),利用反转录聚合酶链锁反应 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR),比较心肌分化的能力,结果如表 4 与第九、十图所示。

[0102] 第二部分为比较 T、CS1 与 CS1 结合 CBD-RGD(CS1R) 的心肌分化能力。第二部分与第一部分的实验条件一致,实验组改为 T, CS1, CS1R,由 RT-PCR 和免疫荧光染色实验分析分化心肌能力,结果如表 5 与第九、十图所示。

[0103] 表 4 脂肪干细胞 (rADASs) 在不同材料上形成的细胞球大小

[0104]

	第1天	第3天	第11天	
	球体大小( $\mu\text{m}$ )			
<b>5-aza</b>	-	-	-	+
<b>T</b>	X	X	X	X
<b>P</b>	350 $\pm$ 50	400 $\pm$ 100	X	X
<b>CS3</b>	35 $\pm$ 15	70 $\pm$ 60	70 $\pm$ 60	30 $\pm$ 20
<b>CS1</b>	25 $\pm$ 15	55 $\pm$ 45	55 $\pm$ 45	55 $\pm$ 45
<b>CS1R</b>	X	175 $\pm$ 90	140 $\pm$ 65	160 $\pm$ 75

[0105] T :TCPS ;P :PVA ;CS3 :Chitosan1 ;CS1 :Chitosan1 ;

[0106] CS1R :Chitosan1+CBD-RGD.

[0107] - :无添加 5-aza ;+ :添加 5-aza ;X :无细胞球 .

[0108] 由表 4 与第九、十图可发现培养于组织培养板的大鼠脂肪干细胞都无法成球,在聚乙烯醇上的大鼠脂肪干细胞在第三天细胞会聚集最大,但之后不管有无加 5-aza,细胞皆会从聚集的细胞球跑出,所以在第 11 天时细胞呈现形态与培养于组织培养板上雷同。在 CS3 中,第一天可发现细胞逐渐聚集成细胞球,球大小约 35  $\mu\text{m}$  ;第三天,可发现一颗颗的细胞球,大小比第一天大些,约 70  $\mu\text{m}$  ;但继续培养,会发现较大颗细胞球会逐渐漂走,在第 11 天发现 CS3(-) 比 CS3(+) 的细胞球较小颗。在 CS1 中,第一天也可发现细胞逐渐聚集成细胞球,球大小约 25  $\mu\text{m}$  ;第三天,可发现一颗颗的细胞球,大小比第一天大些,约 55  $\mu\text{m}$  ;虽然 CS1 所形成的球比 CS3 形成的小要小,但球就不易漂走 ;CS1(-) 和 CS1(+) 在第 11 天的细胞球都约 55  $\mu\text{m}$  。在 CS1R 中,第一天发现细胞未成球,细胞摊开贴在材料上,与 TCPS 相似,但有逐渐聚集的趋势 ;第三天,可发现一颗颗大的细胞球,最大颗有达到 250  $\mu\text{m}$  ;CS1R 上形成的球都很大颗,但却几乎不会漂走 ;在第 11 天,CS1R 所形成细胞球比 CS3 和 CS1 大 100 $\mu\text{m}$  以上。在第 11 天,会发现 CS3、CS1、CS1R 细胞所聚集的球,有些细胞会跑出细胞球,未加 5-aza 的组别比有加 5-aza 的组别,细胞跑出细胞球的趋势更盛。

[0109] 因此,第一部分的实验结果为 CS1 薄膜最佳,细胞球越大分化效果越好,但 PVA 聚集的大球会再跑出去贴回材料上,而 CS3 留不住大球,而使剩下的细胞球比 CS1 要小,所以分化效果较 CS1 差。

[0110] 比较第一部分的实验结果,脂肪干细胞转换为心肌细胞在材料 PVA、CS3、CS1 薄膜的基因表现上,由前期转录因子的基因 GATA4 来看,CS1(+) 和 CS1(-) 比其他组有更好的表现 ;而后期心肌蛋白的基因  $\alpha$ -MHC, CS1(+) 有最好的表现。故第二部份的实验以 CBD-RGD 改质 CS1 的 CS1R 及 CS1 为主。

[0111] 第二部分的实验在第三天细胞会逐渐聚集成球,细胞球大小比 CS3 和 CS1 大很多,却不会像 CS3 形成的大球容易飘走影响分化。从实验中看出,CS1R(+) 和 CS1R(-) 在分化到第 11 天时,球的大小都在 155  $\mu\text{m}$  左右,但添加 5-aza 的 CS1R(+) 分化能力较佳且与从细胞球跑出的细胞寡 ;以 RT-PCR 分析验证,CS1R(+) 在 GATA4、 $\alpha$ -MHC 与 Troponin I 都呈现

出比 CS1R(-) 分化能力较好的趋势,所以有加 5-aza 能确实增加分化效果;球的大小与球的形成也决定了心肌分化效果,CS1R > CS1 > TCPS。

[0112] 由免疫染色也可发现,GATA4 与  $\alpha$ -MHC 都只有在细胞球的地方表现,单一颗细胞几乎无荧光表现,跑出细胞球的细胞也无荧光表现。CBD-RGD 改质 CS4 的基因表现图 11 可看出前期基因 GATA4、后期基因  $\alpha$ -MHC Troponin I,分化能力最好为 CSR(+),其次为 CSR(-),所以添加 5-aza 对于心肌分化是有帮助的。也由此可看出 CBD-RGD 改质 CS1 确实比未改质的 CS1 有更好的分化能力。因此,脂肪干细胞在 CS1 薄膜和 CS1R 薄膜,在基因表现与免疫化学染色上都有突出的心肌分化效果。

[0113] 另外,CBD-RGD 改质的生物高分子包括但不限于几丁聚糖,本发明提及的生物相容性高分子皆可用 CBD-RGD 改质以增进成体干细胞成球状。

[0114] 实施例 4

[0115] 以二种几丁聚糖膜培养牙龈干细胞及包皮纤维母细胞

[0116] 4.1 几丁聚糖膜制备

[0117] 利用中黏度的几丁聚糖-1、去乙酰度 77.7%、平均分子量约为 510kDa 的 1% 几丁聚糖(购于 Fluka)溶于 1% 乙酸(购于 Showa),过滤后涂布于 15mm 盖玻片(购于 Marienfeld)。几丁聚糖薄膜于室温风干,以 0.5N 氢氧化钠溶液中和几丁聚糖的酸性。再以二次蒸馏水清洗几丁聚糖薄膜上多余的氢氧化钠。再将所有的几丁聚糖膜浸于 75% 酒精和照射紫外线以达到杀菌效果。该几丁聚糖膜最后以磷酸盐缓冲液清洗掉多余的 75% 酒精。为比较几丁聚糖的结果,另以去乙酰度 86%、分子量约 400kDa 的几丁聚糖膜(购于 Sigma)以上述相同方式制备。在本实施例中,以几丁聚糖-1 代表几丁聚糖(Fluka),以几丁聚糖-2 代表几丁聚糖(Sigma)。

[0118] 4.2 人类牙龈干细胞及人类包皮纤维母细胞萃取和培养

[0119] 由健康成人牙龈中取得人类牙龈组织。人类牙龈干细胞培养于含有最低必须  $\alpha$  培养液( $\alpha$ -MEM,购于 Gibco)加 10% 胎牛血清和 2% 抗生素-抗真菌药物(2units/ml 盘尼西林(基底)、2  $\mu$ g/ml 链霉素(基底)和 5ng/ml 两性霉素)(购于 Gibco)的细胞培养瓶(Corning)中,培养于 37°C,5% CO<sub>2</sub>的培养箱中。每两天更换基本培养液一次。在人类牙龈干细胞覆盖达 60%到 70%时以 0.25%胰蛋白酶/乙二胺四乙酸溶液(购于 Gibco)收取。本实施例使用第三到七代的牙龈干细胞。

[0120] 经由取得健康成人的包皮纤维母细胞(Human foreskin fibroblasts,HSF)。人类包皮纤维母细胞以含高糖源的 DMEM(购于 Gibco)添加 10% 胎牛血清(购于 Gibco),200mM 谷氨酰胺(购于 Gibco),1% MEM 非必需氨基酸 100X 溶液(购于 Sigma),和 1% 盘尼西林/链霉素(5000units/mL 盘尼西林(基底)和 5000  $\mu$ g/mL 链霉素(基底))培养于细胞培养瓶中。HSF 培养于 37°C,5% CO<sub>2</sub>的培养箱中,每两天更换基本培养液一次。在人类包皮纤维母细胞覆盖达 80%到 90%时以 0.25%胰蛋白酶/乙二胺四乙酸溶液(购于 Gibco)收取。本实施例使用第 28 代的包皮纤维母细胞(HSF)。

[0121] 4.3 人类牙龈干细胞于几丁聚糖薄膜上的形态分析与分化为软骨细胞的情形

[0122] 人类牙龈干细胞( $4 \times 10^4$  cells/ml)植入每一置于 24 孔组织培养板中的几丁聚糖膜,每两天更换培养液一次。

[0123] 细胞植入后三天,加入软骨细胞诱导培养液以诱导二种几丁聚糖膜和 TCPS 上人

类牙龈干细胞的软骨形成。软骨细胞诱导培养液含有含高糖源的DMEM(购于Gibco)、10ng/ml的TGF- $\beta$ 3(CytoLab/PeptoTech,购于Rehovot,Israel)、 $10^{-7}$ M的dexamethasone(购于Sigma)、50 $\mu$ g/ml的1-抗坏血酸-2-磷酸(购于Sigma),40 $\mu$ g/ml的L-脯氨酸(购于Sigma)、10 $\mu$ g/ml的ITS-预混料10 $\times$ (购于Sigma)、10%的胎牛血清(购于Gibco),和2%的抗生素-抗真菌剂。人类牙龈干细胞培养于含诱导培养液的培养箱中7天和14天,每两天更换诱导培养液一次。人类牙龈干细胞培养于几丁聚糖-1、几丁聚糖-2和TCPS薄膜上植入后三天的形态见图12。

[0124] 4.4 人类包皮纤维母细胞于几丁聚糖薄膜上的形态分析与分化为软骨细胞的情形

[0125] 另以相同条件的人类包皮纤维母细胞做为对照组,人类包皮纤维母细胞( $4 \times 10^4$ cells/ml)植入每一置于24孔组织培养板中的几丁聚糖薄膜和TCPS,继续以基本生长培养液和软骨细胞诱导培养液培养,每两天更换培养液一次,人类包皮纤维母细胞培养在几丁聚糖-1薄膜上植入后三天的形态见图12。

[0126] 请参阅图12,培养在几丁聚糖-1薄膜上的人类包皮纤维母细胞无球体形成(图12A)。而培养在几丁聚糖-1薄膜上的人类牙龈干细胞有球体形成(图12B),此清楚显示并非所有的细胞培养在几丁聚糖-1薄膜上皆会形成球体,因为在本实施例中,本身并不会形成球体的人类牙龈干细胞却可在几丁聚糖-1薄膜上形成球体,而人类包皮纤维母细胞并未形成。图12D即显示人类牙龈干细胞培养在TCPS上无球体形成的情况。此外,人类牙龈干细胞培养在不同分子量的几丁聚糖薄膜时,形成球的比例也不相同;在图12(B、C),在人类牙龈干细胞植入后三天,培养在几丁聚糖-1薄膜形成的球体比在几丁聚糖-2薄膜上来得多。这表示几丁聚糖-1可能较几丁聚糖-2容易诱导人类牙龈干细胞球体的形成。

[0127] 并可进一步参阅图13,为显示人类牙龈干细胞培养在几丁聚糖-1上在植入后12、14、16、18、20、22和24小时同一范围的活细胞造影。培养在几丁聚糖-1上的人类牙龈干细胞于植入后12小时开始形成球体,24小时后初步形成球体。刚植入时人类牙龈干细胞贴附在几丁聚糖-1上呈现类纤维的形态。但随着培养时间的增加,越来越多的人类牙龈干细胞聚集成球,而贴附在几丁聚糖-1的人类牙龈干细胞越来越少。

[0128] 另外,参阅图14显示培养在几丁聚糖和TCPS,有无软骨诱导培养液在植入后0到3天、加入软骨诱导培养液后0、1、2、7和14天的人类牙龈干细胞形态。人类牙龈干细胞在整个培养过程中为类纤维的形态。随着细胞培养时间增长,人类牙龈干细胞形成相对越来越大的细胞球体。此外,许多人类牙龈干细胞看似自细胞球中迁出,形成细胞团和细胞群。当在添加基本生长培养液的几丁聚糖-1薄膜上的人类牙龈干细胞细胞球数量随时间渐增,大约在软骨诱导后14天(或植入后17天)看起来似乎有自球体的分泌物。另一方面,培养于TCPS的人类牙龈干细胞则完全没有形成球状。

[0129] 由前述结果可知,不是所有培养在几丁聚糖的细胞都会形成球体,例如人类包皮纤维母细胞,也不是所有类型的几丁聚糖(例如几丁聚糖-1和几丁聚糖-2)都有相同诱导细胞成球的效果。培养在几丁聚糖薄膜上的人类牙龈干细胞比培养在TCPS的人类牙龈干细胞有较高的软骨分化潜能。特别重要的是,培养在无软骨诱导的几丁聚糖薄膜的人类牙龈干细胞的软骨细胞分化潜能竟能比培养在有软骨诱导的TCPS上人类牙龈干细胞要高。换句话说,人类牙龈干细胞的软骨细胞分化潜能可因单纯培养在本发明几丁聚糖薄膜上而提升。

[0130] 在确定本发明人类牙龈干细胞球具有多潜能性和干性,为借由 NANOG 和 Oct 4 两种干性标记决定未分化干细胞的自我更新过程,因此,NANOG 和 Oct 4 常被用来作为区别未分化细胞的标记,Oct 4 特别用来防止细胞分化。另外,神经脊细胞为短暂多能和迁移能力的细胞群。特定两段神经脊 SLUG 和 Sox10 决定神经脊的规范及分化。本实施例中,我们发现 SLUG、Sox 10、NANOG 和 Oct 4 基因表现在培养在几丁聚醚薄膜的人类牙龈干细胞都比培养在 TCPS 的人类牙龈干细胞高。这表示只形成在几丁聚醚上的人类牙龈干细胞的球体与一般类纤维形态相比,有较高的神经脊基因表现和干性基因表现。换句话说,形成球体的人类牙龈干细胞与短暂多能、迁移能力且大多数都为未分化的细胞相关。另外,在人类牙龈干细胞球体时似乎在多能、迁移能力和干性上有增加。这可在植入后 0 到 3 天人类牙龈干细胞在几丁聚醚薄膜上的球体在 SLUG、Sox 10、NANOG 和 Oct 4 基因表现上得到证实。因此,球体的形成帮助维持人类牙龈干细胞的多潜能性、迁移能力以及干性。另外,从活细胞成像中观察上述人类牙龈干细胞在几丁聚醚上成球形,球形由人类牙龈干细胞的连续细胞-基质交互作用和细胞-细胞交互作用导致动态运动而形成。这球体的动态状态亦证实从神经脊基因表现指出球体中人类牙龈干细胞的迁移能力。本研究中观察到人类牙龈干细胞形成的所有形态中,形成球体内的人类牙龈干细胞持续进出球体。当人类牙龈干细胞自球体内迁出,人类牙龈干细胞会散出并以类纤维形态附着在几丁聚醚上。因此,球体形态的人类牙龈干细胞仍维持多潜能性和干性,这是在类纤维形态的人类牙龈干细胞所没有的。

[0131] 另外,将骨髓间叶干细胞 (bone marrow-derived MSCs) 培养在几丁聚醚-1 膜上,亦会形成球形 (见图 15)。

[0132] 4.5 人类牙龈干细胞细胞在几丁聚醚薄膜上的成球与非成球细胞活性比较

[0133] 使用两种牙龈干细胞 (GF-A 及 GF-B),分别为 GF-A 牙龈干细胞 ( $4 \times 10^4$  cells/ml) 及 GF-B 牙龈干细胞 ( $4 \times 10^4$  cells/ml),经由几丁聚醚膜培养 1 天,分出成球”S”与非成球”N”的细胞,成球”S”细胞是具多向分化的干细胞,非成球”N”的细胞是只能变成骨细胞的细胞,做各种细胞活性测试如图 16,第十六 A 图为各组牙龈干细胞在不同继代代数增殖倍增时间比较,发现成球的牙龈干细胞活性较高增殖较快,到第 15 继代细胞数量增殖一倍所需时间仍显著较短;第十六 B 图为第十六 A 图各组牙龈干细胞外观,可以看出成球的细胞能长出许多个细胞聚落 (colony),代表成球的细胞在形成细胞聚落的能力较高;前述各组成球的牙龈干细胞有较高的骨分化潜能及脂肪分化潜能,详见第十六 C 图为各组牙龈干细胞生成骨小结 (bone nodules) 数量的比较,可看出成球的牙龈干细胞 (GF-AS, GF-BS) 骨小结数量较多,拥有较佳的骨化能力;第十六 D 图为各组牙龈干细胞生成脂肪滴 (lipid droplets) 数量的比较,可看出成球的牙龈干细胞脂肪滴数量较多,拥有较佳的脂肪分化能力。搜集成球细胞即成为筛选纯化过的细胞族群,其较佳的生长能力与分化潜力可维持到较高的培养继代数 (10-15 代)。

[0134] 实施例 5

[0135] 以几丁聚醚和几丁聚醚-透明质酸膜培养胎盘、脂肪干细胞

[0136] 5.1 几丁聚醚和几丁聚醚-透明质酸 (HA) 薄膜制备

[0137] 几丁聚醚-1 粉末分子量为 510kDa (购于 Fluka) 溶于 1% 乙酸以取得 1% 几丁聚醚溶液。溶液 ( $300 \mu\text{l}$ ) 涂布于 24 孔培养板的每一孔中。样本置于层流柜 24 小时溶剂蒸发后,即为几丁聚醚膜。每孔加入氢氧化钠 (0.5N) 停留 30 分钟,再以磷酸盐缓冲液清洗

数次。

[0138] 制备几丁聚糖-透明质酸膜,透明质酸溶液(购于科研或资生堂皆有,效果皆相同)300  $\mu$ l 以 0.1、0.5 或 2.5mg/cm<sup>2</sup> 的不同的量加入几丁聚糖膜中。透明质酸带有很强的负电,会立刻与带正电的几丁聚糖膜结合。几丁聚糖和不同透明质酸剂量的几丁聚糖-透明质酸膜以 C、CH0.1、CH0.5 和 CH2.5 来简称。不同透明质酸量的几丁聚糖-透明质酸膜以磷酸盐缓冲液清洗 5 次以去除未键结的透明质酸然后冻干。CH0.1、CH0.5 和 CH2.5 的有效吸收率分别为 94%、95% 和 89%。透明质酸被吸收的总量依初始添加透明质酸量增加而增加。另外并以未加生长因子的聚苯乙烯组织培养板(tissue culture polystyrene surface, TCPS) 作为对照组。

[0139] 5.2 人类胎盘干细胞(hPDMSC)的萃取和培养

[0140] 取健康母体怀孕后期(38-40 周)捐赠的胎盘。将胎盘以磷酸盐缓冲液清洗几次然后将其打碎和在 37°C 以 0.25% 胰蛋白酶处理约 10 分钟。在打碎和酶处理后,此匀浆培养于 DMEM-LG(Dulbecco's Modified Eagle Medium-low glucose)(购于 Gibco)完全培养基,添加 10% 胎牛血清(购于 Gibco)、10mg/l 盘尼西林-链霉素和 10mg/l L-谷氨酰胺(购于 Tedia)。细胞培养于 37°C 水气饱和的空气,以及 5% 的 CO<sub>2</sub>。每周更换培养液两次。

[0141] 5.3 脂肪干细胞(hADAS)的萃取和培养

[0142] 脂肪干细胞可在脂肪组织中取得。从脂肪组织中以酶萃取出细胞。先将脂肪组织打碎成数块再以 200U/ml 第一型胶原酶(购于 Sigma-Aldrich)磷酸盐缓冲液中在 37°C 轻拌 30 分钟。将匀浆培养在 DMEM-LG(Dulbecco's Modified Eagle Medium-low glucose)(购于 Gibco)完全培养基中,添加 10% (v/v) 胎牛血清(购于 Gibco)、10mg/l 盘尼西林-链霉素。培养箱维持 37°C /5% CO<sub>2</sub>。每周更换培养液两次。

[0143] 5.4 胎盘干细胞和脂肪干细胞在几丁聚糖和几丁聚糖-透明质酸薄膜上的形态分析及分化为软骨细胞的情形

[0144] 脂肪干细胞和胎盘干细胞(3 $\times$ 10<sup>4</sup>个细胞)植入每一含基本培养液的几丁聚糖膜培养三天后,将培养液更换为软骨细胞诱导培养液。诱导培养液为 DMEM-LG,含有 10ng/ml TGF- $\beta$ 3(购于 CytoLab/Peptrotech, Rehovot, Israel)、0.1  $\mu$ M dexamethasone、50  $\mu$ g/ml L-ascorbate-2-磷酸,40  $\mu$ g/ml L-脯氨酸(Sigma)、1% 胰岛素-转铁因子-硒补充剂(ITS+premix)100 $\times$ (购于 Sigma)以及 1% 盘尼西林-链霉素。诱导培养液每周更换两次。另一组(植入后 3 天)仍以基本培养液培养作为控制组。

[0145] 脂肪干细胞在培养在几丁聚糖-透明质酸薄膜上 1 天后,脂肪干细胞聚集而成的三维球形成。随着几丁聚糖膜上的透明质酸增加,形成的球体越明显,且数量和大小皆较大。脂肪干细胞和胎盘干细胞培养在 TCPS、几丁聚糖、几丁聚糖-透明质酸膜上第 3 天的形态如图 17 所示。培养在薄膜上 3 天后,培养在几丁聚糖和几丁聚糖-透明质酸薄膜的脂肪干细胞和胎盘干细胞都形成球状。不同细胞在这些膜上平均细胞球的大小列于表 5。

[0146] 表 5 胎盘干细胞与脂肪干细胞在不同膜上形成的球体平均大小

[0147]

	TCPS	C	CH0.1	CH0.5	CH2.5
<b>hADA</b>	无球体	22±5μ	30±15	35±15μ	40±18μ
<b>S</b>	生成	m	μm	m	m
[0148]					
<b>hPDM</b>	无球体	20±7μ	33±12	45±19μ	54±25μ
<b>C</b>	生成	m	μm	m	m

[0149] \* 每一平均值为至少 20 个球体直径的平均

[0150] 在确定本发明在培养期间脂肪干细胞和胎盘的干性标记基因 (Oct4、Sox2 和 Nanog) 的表现。在基本培养液的脂肪干细胞和胎盘的 Oct4、Sox2 和 Nanog 的 mRNA 表现以即时 RT-PCR 分析。在图 18 显示脂肪干细胞培养在不同材料和 TCPS 对照的 Oct4、Sox2 和 Nanog 的 mRNA 表现量化结果。在几丁聚糖和几丁聚糖-透明质酸上的 Oct4、Sox2 和 Nanog 基因表现在第 3 天增加,然后在第 7 和第 10 天降低。在第一天和第三天,这些基因的表现 CH2.5 薄膜上为最高 ( $p < 0.05$ )。

[0151] 大致上,胎盘的这些基因可被几丁聚糖和几丁聚糖-透明质酸膜上的向上调节可维持七天的时间。在脂肪干细胞中,这些基因的向上调节可维持三天的时间。在脂肪干细胞中,CH2.5 比其他材料维持这些基因效果较好。在胎盘中,CH 0.5 与 CH 2.5 维持这些基因特性表现的效果一样好。

[0152] 脂肪干细胞和胎盘干细胞培养在几丁聚糖和几丁聚糖-透明质酸(与 TCPS)上在软骨诱导后 7 天,以 RT-PCR 量化脂肪干细胞和胎盘的软骨细胞基因表现,结果如图 19。在形成球体后,软骨基因表现 (Sox-9、aggrecan 和 collagen type II) 在软骨诱导下显著增加(图 19B、D、F),与培养在基本培养液上比较(图 19A、C、E)。当脂肪干细胞培养在有基本培养液的几丁聚糖和几丁聚糖-透明质酸时,这些基因有高度的表现(与 TCPS/基本培养液比较)。另一方面,当胎盘干细胞培养在有基本培养液的几丁聚糖和几丁聚糖-透明质酸上时,这些基因呈低度表现(与 TCPS/基本培养液比较)。培养在有基本培养液的几丁聚糖和几丁聚糖-透明质酸的脂肪干细胞的软骨分化能力比胎盘干细胞要好,特别是几丁聚糖-透明质酸。由上述结果显示,胎盘干细胞和脂肪干细胞在有软骨诱导液的情况下,培养在几丁聚糖-透明质酸的软骨基因表现为最高,其次为几丁聚糖,最低为 TCPS。因此,有吸收透明质酸的几丁聚糖膜,可大幅增进胎盘干细胞和脂肪干细胞聚集形成球体细胞群体,且维持胎盘干细胞和脂肪干细胞自我更新和干性,以及往后增进软骨的分化能力。

[0153] 本发明实施例诱导胎盘干细胞和脂肪干细胞在薄膜上自发地形成立体球体,在涂布透明质酸的几丁聚糖上形成许多大球体,亦证实透明质酸能增进球体形成。

[0154] 实施例 6

[0155] 以几丁聚糖-银耳多糖培养脂肪干细胞、神经干细胞

[0156] 6.1 几丁聚糖-银耳多糖膜制备

[0157] 利用实施例 5 的 1% 的几丁聚糖-1(购于 Fluka) 做为基材,以实施例 5 的几丁聚糖膜制备方法制备,先加入 3mg 的几丁聚糖于 24 孔培养板的每一孔中,每孔再加入 3mg 银耳多糖,比例为 1 : 1。

- [0158] 6.2 萃取和培养脂肪干细胞、神经干细胞
- [0159] 脂肪干细胞的萃取及培养同实施例 5。
- [0160] 神经干细胞的萃取及培养同实施例 2。
- [0161] 6.3 脂肪干细胞、神经干细胞培养在几丁聚糖 - 银耳多醣膜上的形态
- [0162] 脂肪干细胞培养在几丁聚糖 - 银耳多醣膜上 24 小时和 48 小时的形态如图 20, 另外神经干细胞亦成球形。
- [0163] 几丁聚糖与银耳多醣的比例包括但不限于 1 : 1, 约 3 : 0.4 至 3 : 4.5 皆可。
- [0164] 实施例 7
- [0165] 以几丁聚糖、几丁聚糖 - 透明质酸、聚己内酯、聚己内酯 - 透明质酸膜培养肺干细胞 (lung stem cell, LSC)
- [0166] 7.1 几丁聚糖、几丁聚糖 - 透明质酸、聚己内酯 (polycaprolactone, PCL)、聚己内酯 - 透明质酸膜制备
- [0167] 几丁聚糖、几丁聚糖 - 透明质酸脂制备与实施例 5 相同。
- [0168] 取分子量 80kDa 的聚己内酯 (购于 Sigma), 溶于 1,4- 二氧六环 (1,4-dioxane), 即为 11% 的聚己内酯。将上述聚己内酯铸于玻片, 即为聚己内酯薄膜。然后以大气电浆 (能量 1kW, 购于德国 Plasmatreteat) 以距离 10mm 速度 6m/min 扫描后, 将 300ul 2.95mg/ml 透明质酸水溶液滴在上面, 隔夜后洗去, 透明质酸就会电浆接枝于表面, 密度为 0.5mg/cm<sup>2</sup>。
- [0169] 7.2 小鼠肺干细胞 (lung stem cell, LSC) 的萃取及培养
- [0170] 小鼠肺干细胞系依据 Ling TY, Kuo MD, Li CL, Yu AL, Huang YH, Wu TJ, Lin YC, Chen SH, Yu J. Identification of pulmonary Oct-4+ stem/progenitor cells and demonstration of their susceptibility to SARS coronavirus (SARS-CoV) infection in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 20 ;103(25) :9530-5. Epub2006 Jun 13, 由小鼠肺脏所取得。
- [0171] 7.3 肺干细胞培养在几丁聚糖、几丁聚糖 - 透明质酸、聚己内酯及聚己内酯 - 透明质酸膜上的结果
- [0172] 肺干细胞在几丁聚糖以及几丁聚糖 - 透明质酸上会形成球状, 且 nanog/oct4 基因表现提升。
- [0173] 而在聚己内酯及聚己内酯 - 透明质酸膜上亦会成球 (见图 21), 聚己内酯表面呈晶状排列, 故看得到圆晶 (似表面龟裂); 且干性基因 nanog/oct4 表现提升 (图 22)。
- [0174] 实施例 8
- [0175] 以聚麸胺酸钠盐及聚麸胺酸钙盐培养脂肪干细胞
- [0176] 聚麸胺酸钠盐及聚麸胺酸钙盐薄膜为购自味丹公司, 脂肪干细胞的萃取及培养同实施例 5。
- [0177] 脂肪干细胞培养在聚麸胺酸膜上 48 小时的形态如图 23, 第二十三 A 图的培养材料为聚麸胺酸钠盐, 第二十三 B 图的培养材料为聚麸胺酸钙盐, 因此, 由图 23 可知脂肪干细胞培养于聚麸胺酸钠盐与聚麸胺酸钙盐上皆会呈现球形。
- [0178] 另外, 以聚麸胺酸与几丁聚糖以 2 : 1、1 : 1、1 : 2 的比例混合, 亦有相似的结果。
- [0179] 实施例 9
- [0180] 以纳米氧化铁标定脂肪干细胞

[0181] 近年来干细胞移植治疗研究已应用在许多不同的疾病上,而移植后需要观察并追踪其细胞是否确实到达组织损伤部位。可将干细胞利用磁振造影对比剂作细胞标定,磁振造影技术可对被标定的细胞做非侵入性的追踪,除了可以知道细胞所在位置的外,亦可观察细胞数量。

[0182] 超顺磁性对比剂(superparamagnetic contrast agents)是磁振造影对比剂的一种,以氧化铁粒子作为材料(superparamagnetic iron oxide,简称SPIO),利用铁质的强磁特性扭曲磁场,改变组织水分子弛缓的速率,使影像中对比剂所在位置的亮度变暗,而变暗的程度与对比剂的浓度相关。

[0183] 然而,单纯的超顺磁性纳米粒子本身,并无法有效进入细胞内发挥细胞标定的功能(愈多超顺磁性物质进入细胞,磁振造影仪器侦测到的磁性讯号愈强),因此限制了超顺磁性纳米粒子在干细胞磁振造影追踪的应用性。而在几丁聚糖或几丁聚糖-透明质酸上的成球细胞都可以有效摄入纳米氧化铁。摄入的纳米氧化铁可以被普鲁士蓝染成蓝色,可由光学显微镜观察细胞摄入纳米氧化铁的情形。

[0184] 本实施例的纳米氧化铁粒子( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles)以化学共沉淀(coprecipitation)方式制备。由8.95g的 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 与18.25g的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于150mL蒸馏水中搅拌,接着缓慢加入50mL的NaOH,再用力搅拌30分钟后,溶液颜色从浅棕色变成黑色,氧化铁纳米粒子即形成。将溶液离心并用蒸馏水再悬浮重复三次以清洗氧化铁纳米粒子。将1.5g油酸钠(Sodium oleate)溶于50mL蒸馏水,并加入氧化铁纳米粒子强力搅拌30分钟,多余的油酸钠以透析方式去除。

[0185] 干细胞对于氧化铁纳米粒子摄入量的量化以感应耦合电浆质谱分析仪(inductively coupled plasma optical emission spectrometry,简称ICP-OES,购于Thermo, USA)分析。细胞以磷酸盐缓冲液冲洗三次,用0.25%胰蛋白酶取下并离心收集。将细胞球溶于6%  $\text{HNO}_3$ ,离子浓度利用ICP-OES测量。DNA Hoechst33258染色分析并用365nm紫外光激发,用萤光分光光度计(购于Hitachi F2500, Japan)接收458nm的萤光,以测量细胞数量。每个细胞平均摄入量(单位pg/cell)即可经由计算而得。

[0186] 在不同的基质中,摄入纳米氧化铁粒子最大量的是培养在几丁聚糖上的细胞,平均摄入量为4.4pg/cell,其次是培养在几丁聚糖-透明质酸上的细胞,平均摄入量为2.5pg/cell,最后是培养在TCPS上的细胞,平均摄入量为0.9pg/cell。

[0187] 请参考图24,该图由上至下分别为培养在TCPS、几丁聚糖以及几丁聚糖-透明质酸上的脂肪干细胞在纳米氧化铁浓度0ppm以及25ppm中24小时后的普鲁士蓝染色照片,由图中可看出培养在几丁聚糖以及几丁聚糖-透明质酸上的细胞球都可以明显看出摄入纳米氧化铁,而培养在TCPS上的细胞摄入纳米氧化铁的现象不明显。

[0188] 故由上可知,成球干细胞对粒子的吞噬作用增加,可借此特性应用于超顺磁粒子的细胞标定,利用磁振造影技术对被标定的细胞做非侵入性的追踪,以观察细胞所在位置及数量。

[0189] 另外,纳米氧化铁加入培养细胞的时间为6~72小时,较佳为24小时,可达到较佳标定效果。

[0190] 实施例10

[0191] 成球脂肪干细胞基因转殖效果

[0192] 使用的 DNA 质体 pTRE-Tight-DsRED2 (购于 BD) 试验脂肪干细胞的转殖效果, 该质体的图谱如图 25。干细胞摄入该质体后会发出红色荧光, 再用流式细胞仪定义有红荧光的细胞比例, 基因转殖详细步骤如下:

[0193] 细胞以  $5 \times 10^4$  个细胞 / 孔的密度植入 TCPS、几丁聚糖或几丁聚糖 - 透明质酸的基质上, 再加入含有  $1 \mu\text{l}$  质体 (pTRE-Tight-DsRED2, 购于 BD Biosciences) 的 1mL 无血清培养液。24 小时后, 培养液换成 10% 胎牛血清再培养 2 天。细胞以磷酸盐缓冲液冲洗三次, 用 0.25% 胰蛋白酶取下并离心收集。一部份的成球细胞于磷酸盐缓冲液中再悬浮, 用流式细胞仪 (FACSCalibur, BD) 计算荧光强度 (以波长 551.5nm 的光激发并侦测细胞放出波长为 583nm 的荧光)。于 PolyFect+ 质体转染组, 细胞以每孔  $5 \times 10^4$  个细胞的密度植入 TCPS 或几丁聚糖基质, 并以 10% 胎牛血清的培养液 1ml 培养 12 小时。然后将培养液换成含有  $1 \mu\text{g}$  质体 (pTRE-Tight-DsRED2) 及  $5 \mu\text{g}$  PolyFect (购于 Qiagen) 的无血清培养液。细胞与质体及 PolyFect 接触 24 小时后, 用完全培养液培养 2 天, 再以上述方式利用流式细胞仪分析。细胞数量以 Hoechst 33528 染色分析。

[0194] 请参考图 26, 该图为由 TCPS、几丁聚糖以及几丁聚糖 - 透明质酸培养的脂肪干细胞经由两种不同转染方法的转染效率图, 其中 Y 轴为基因转殖的效率, 即为转殖成功的细胞数百分比。图中 Polyfect 是传统基因转殖载体 (gene carrier; transfection agents), 细胞使用 polyfect+ 质体是传统方法, TCPS 上基因转殖比例非常低, 然而在几丁聚糖上基因转殖效率却非常优异; 或是单使用质体的方法, 几丁聚糖或几丁聚糖 - 透明质酸培养的脂肪干细胞与相同转殖条件, 但培养在 TCPS 上的脂肪干细胞相较, 基因转殖效率皆大幅提升。

[0195] 由实施例 1 ~ 8 的结果显示, 本发明提供的一多能成体干细胞、其医药组合物、以及用于生产该成体干细胞的方法, 为借由生物相容性高分子接触, 确实能达到细胞自我更新及维持干性 (stemness) 的突出效果。

[0196] 另外, 由实施例 9 可知成球的成体干细胞, 其摄入纳米粒子的比例提高, 于实施例 10 可知成球的成体干细胞于基因转殖的效率上有优异的表现, 此现象代表细胞吞噬作用 (endocytosis) 增加, 可将此特性应用于提升细胞追踪或是基因转殖的效果。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 徐善慧

&lt;120&gt; 使成体干细胞产生为球体细胞群体的方法

&lt;130&gt; OITW1131428-E

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工合成

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 纤维素结合功能区域-RGD 贴附序列(CBD-RGD)

&lt;400&gt; 1

Pro Thr Gln His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro

1

5

10

15

Thr Val Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr Tyr

20

25

30

Ser Gln Cys Leu Pro Thr Thr Pro Thr Gly Arg Gly Asp Ser Ala Ser

35

40

45

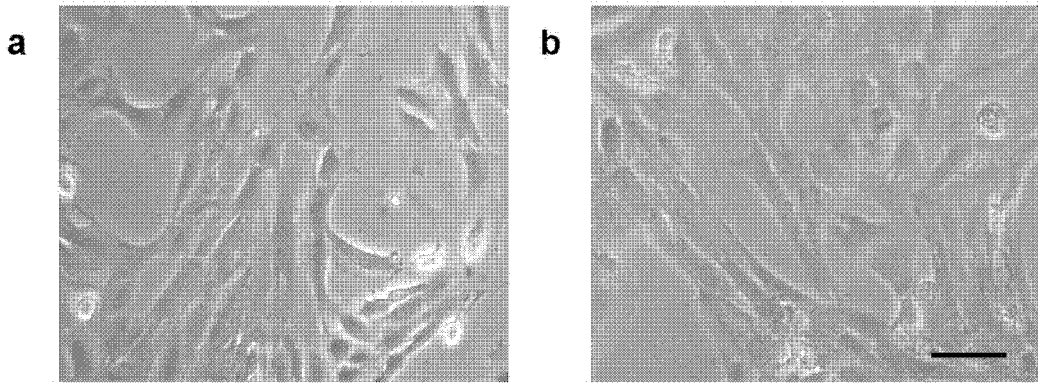


图 1

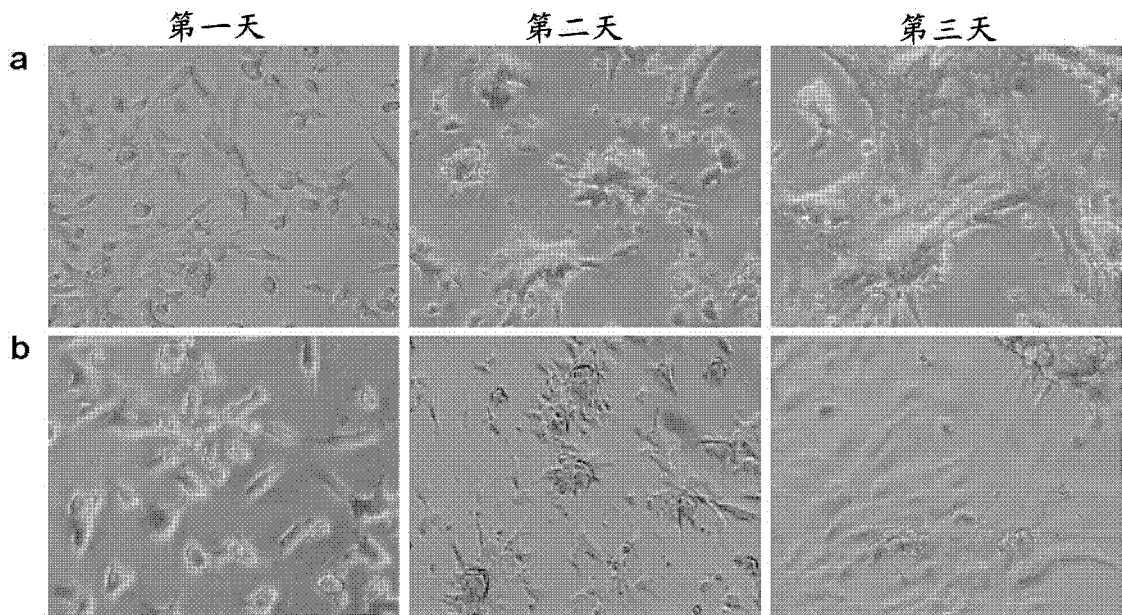


图 2

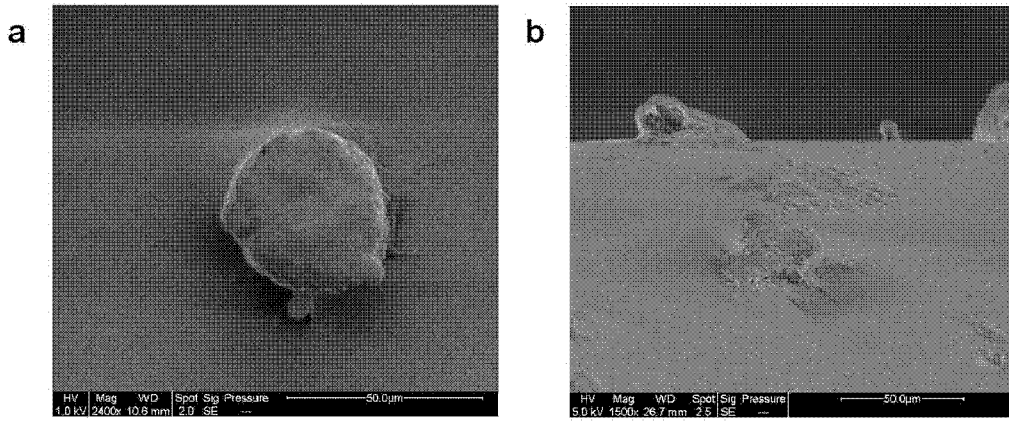


图 3

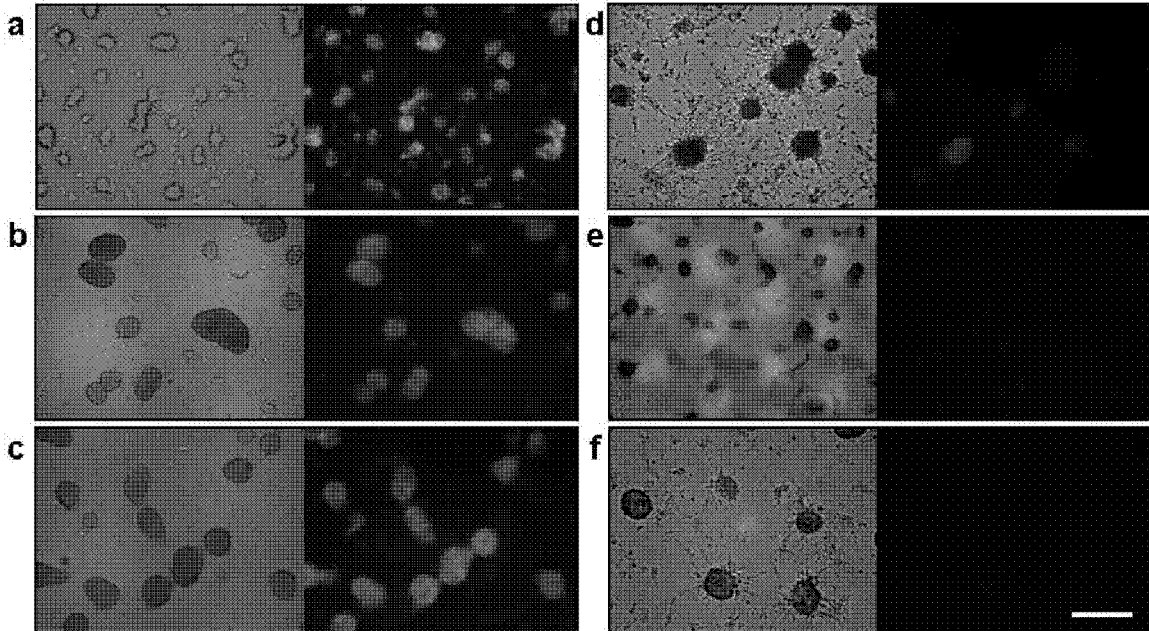


图 4

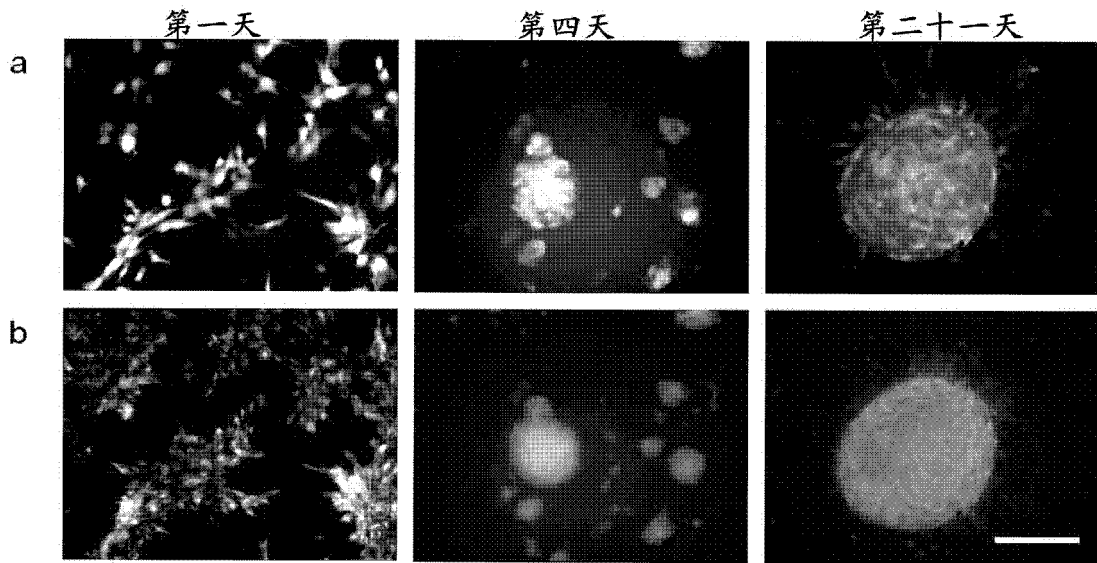


图 5

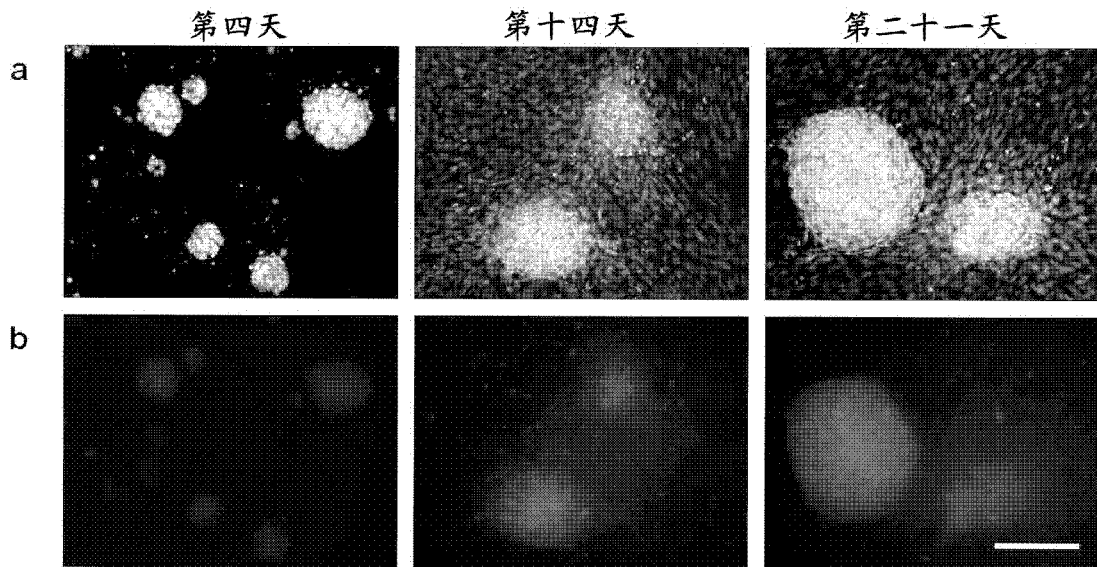


图 6

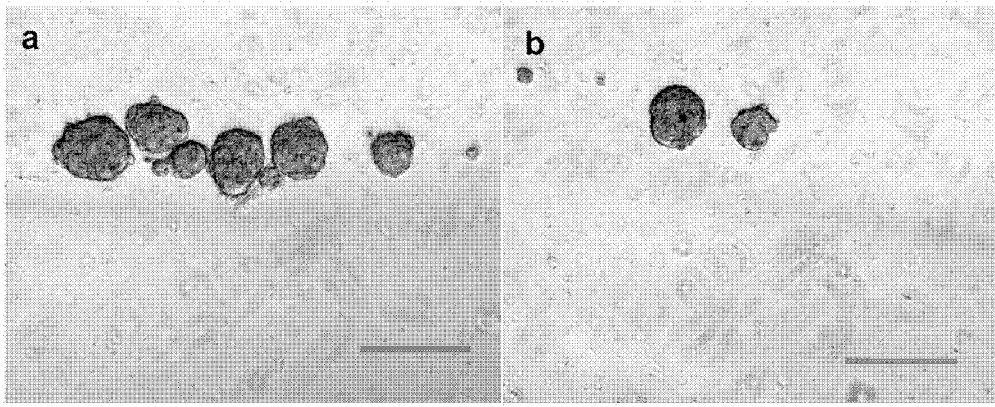


图 7

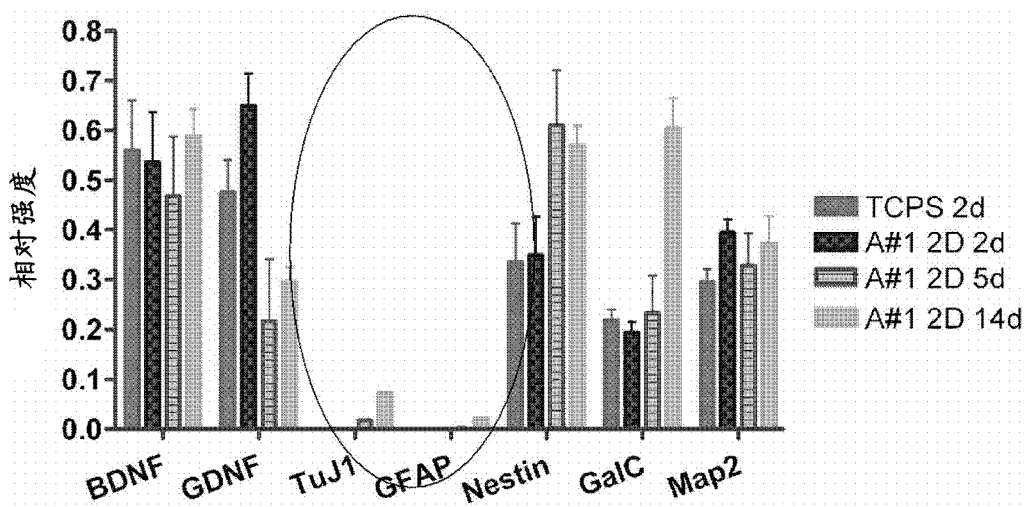


图 8

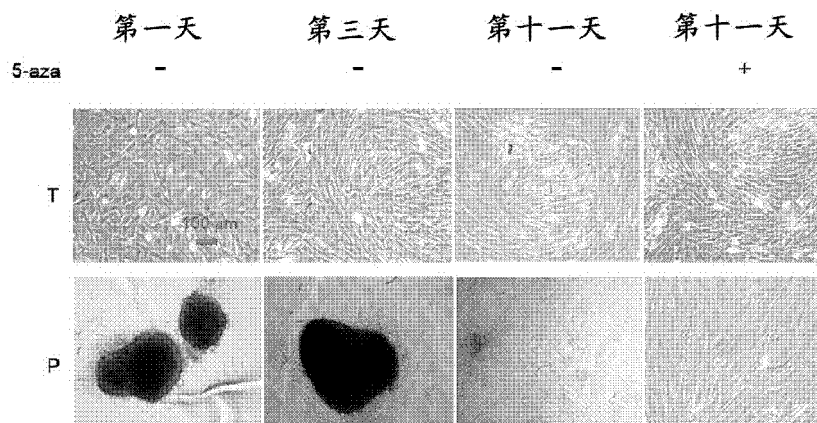


图 9

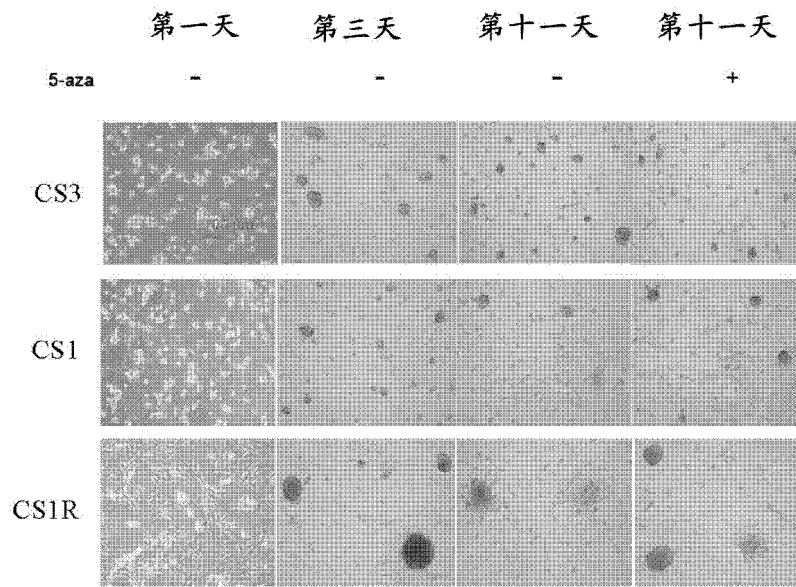


图 10

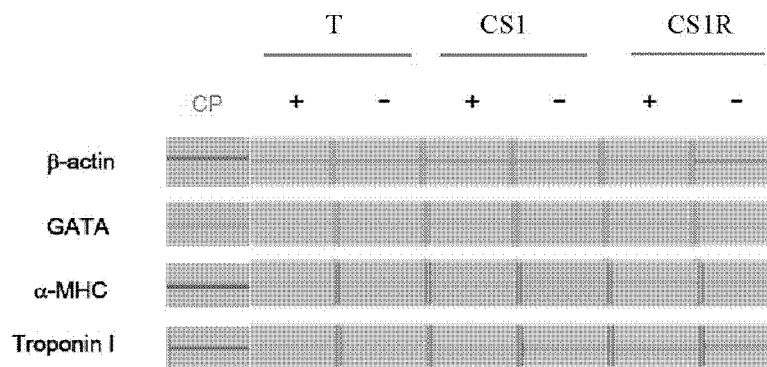


图 11

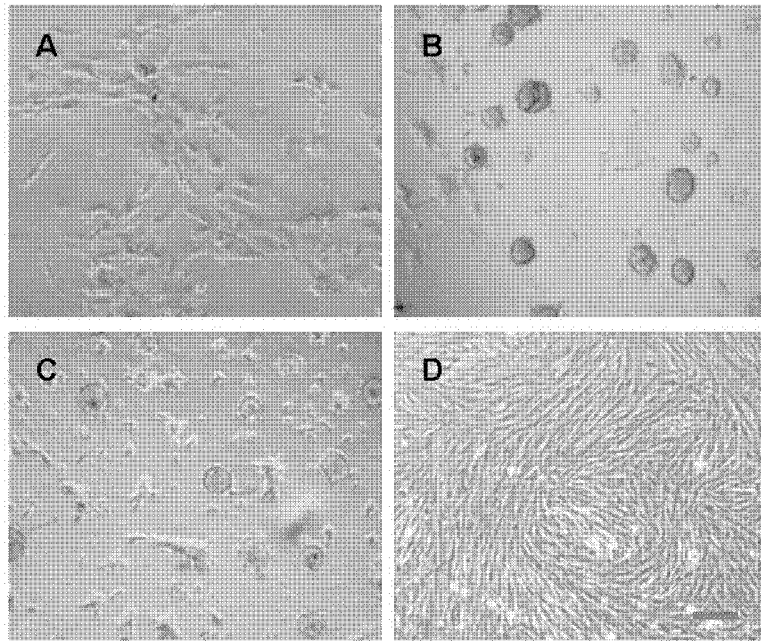


图 12

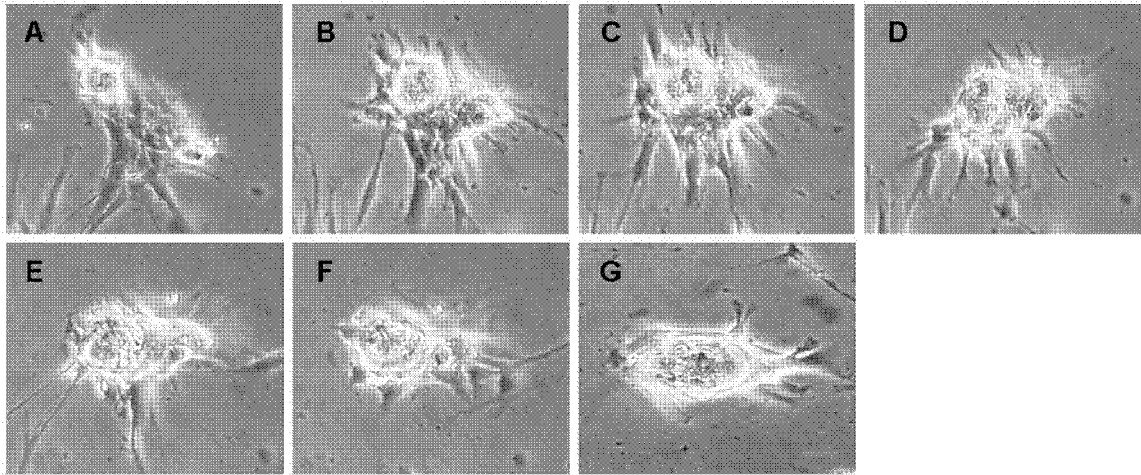


图 13

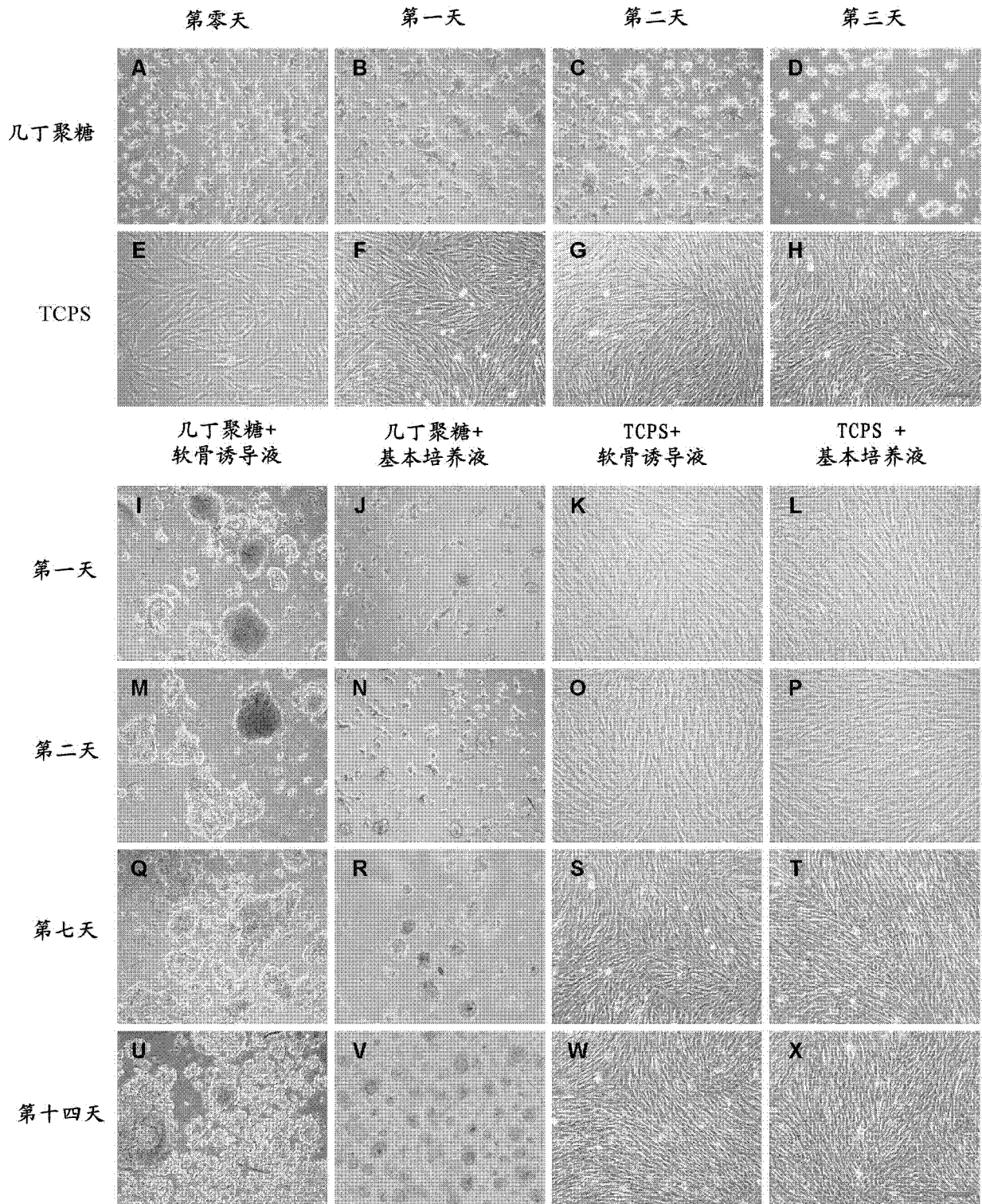


图 14

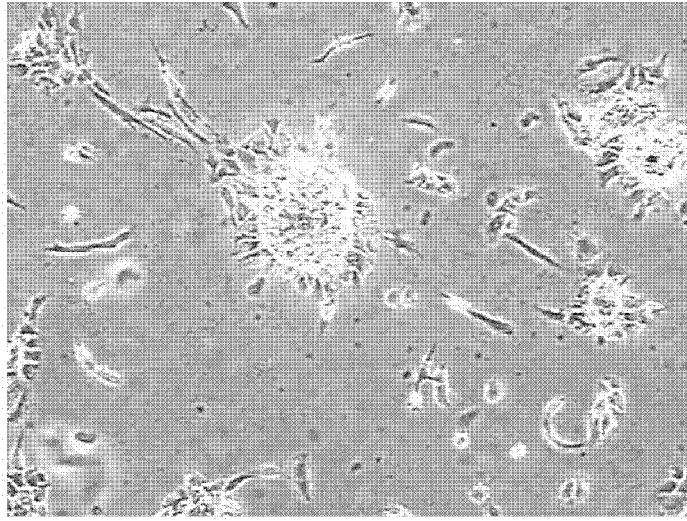


图 15

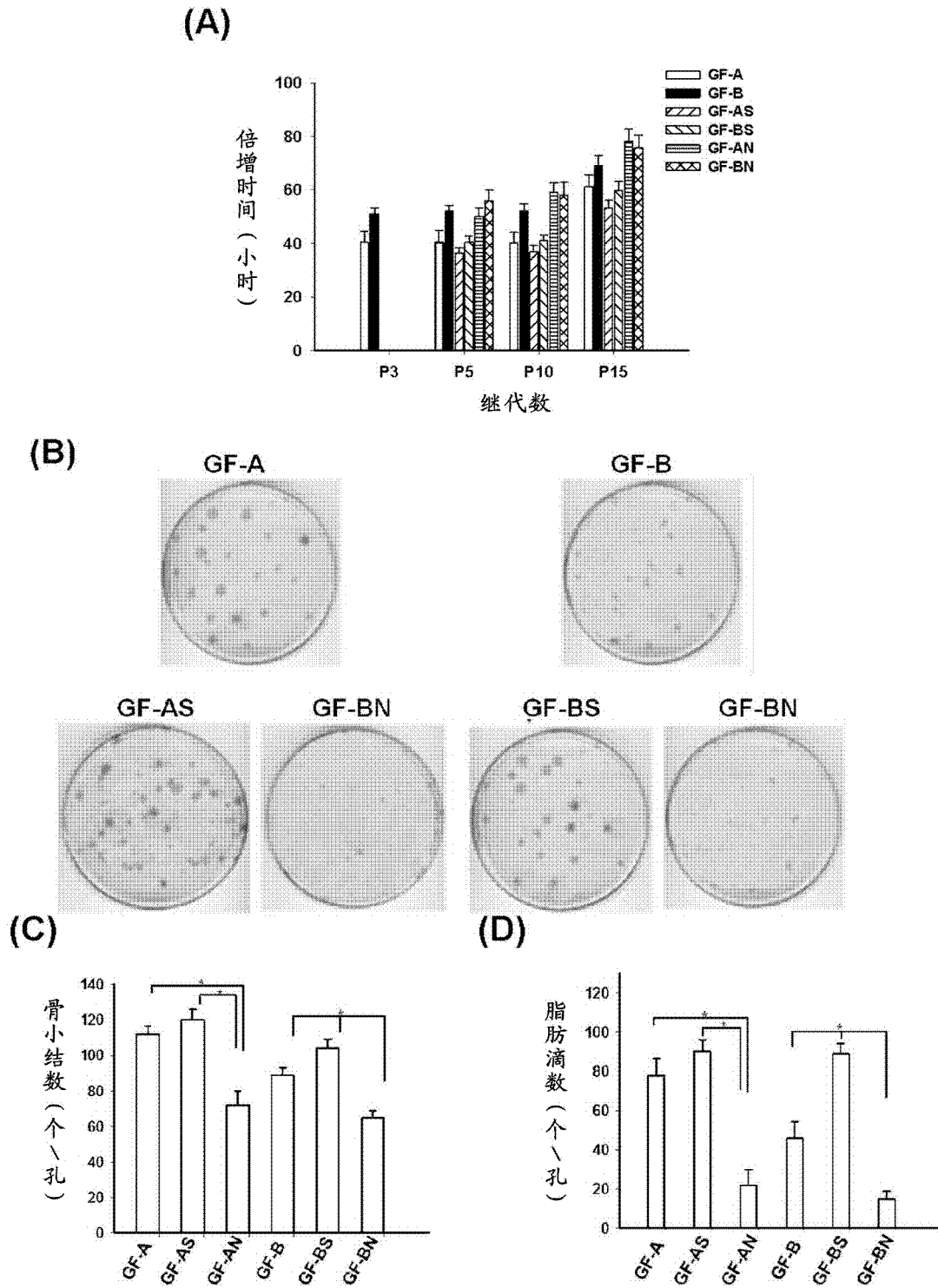


图 16

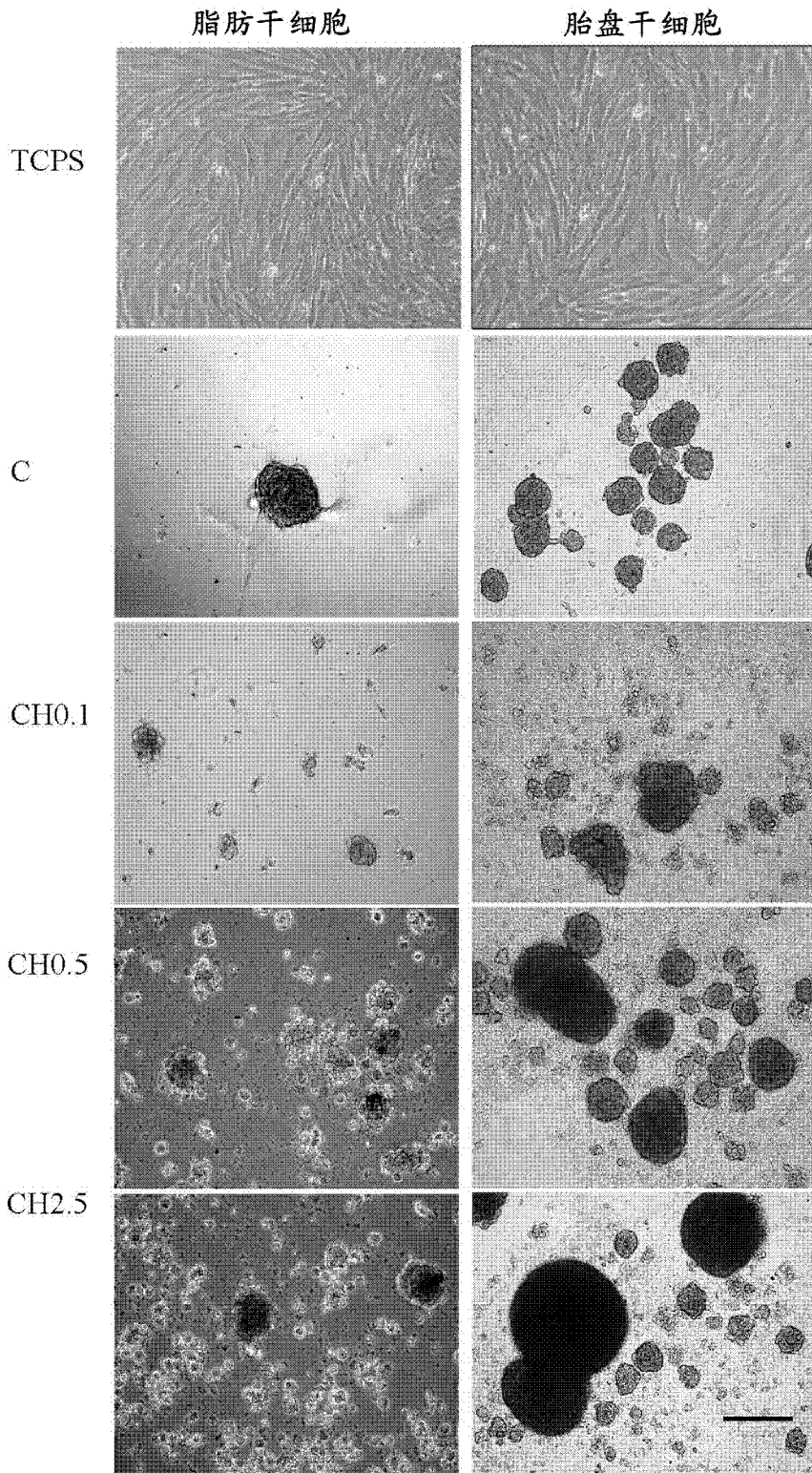


图 17

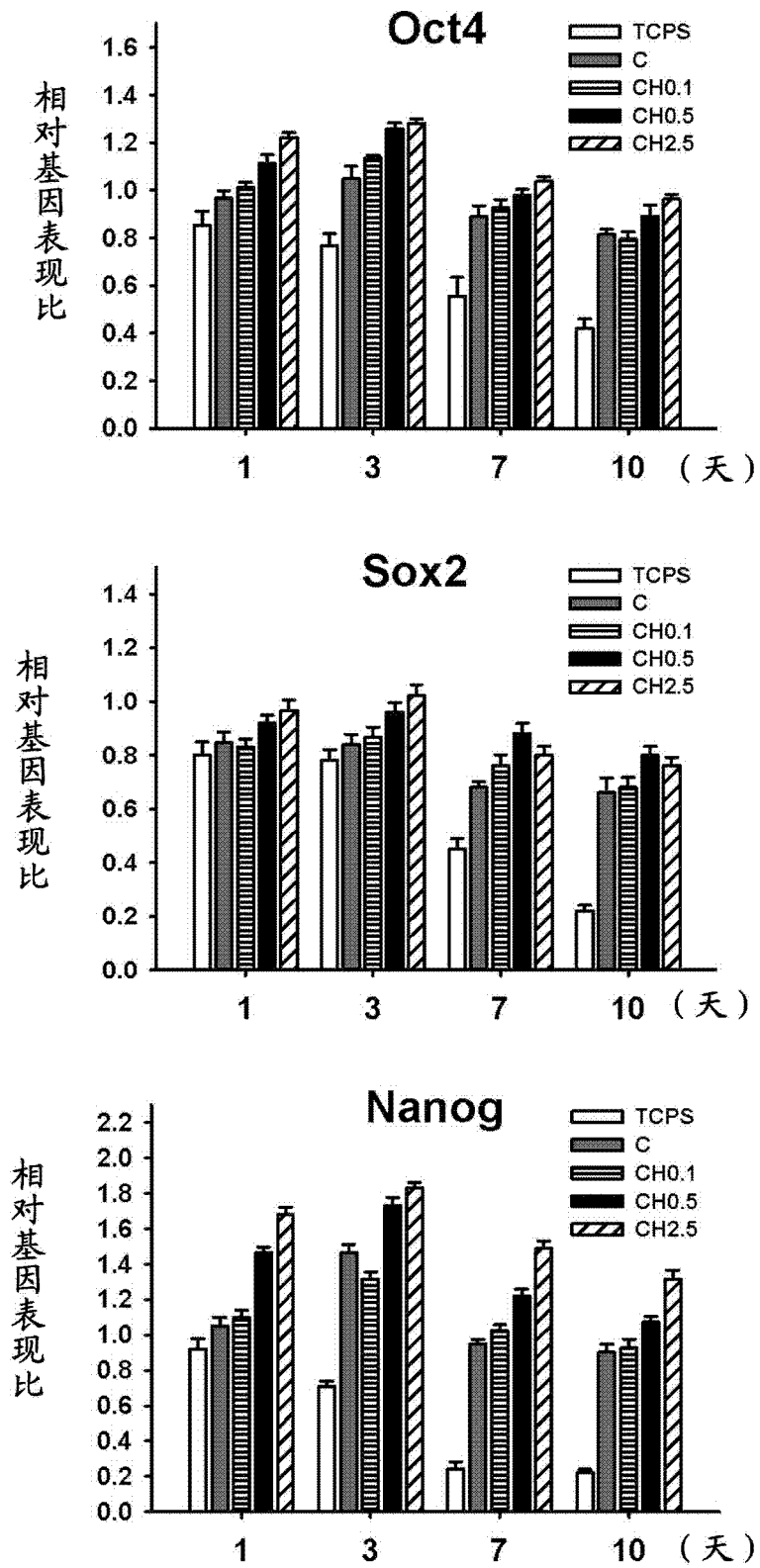


图 18

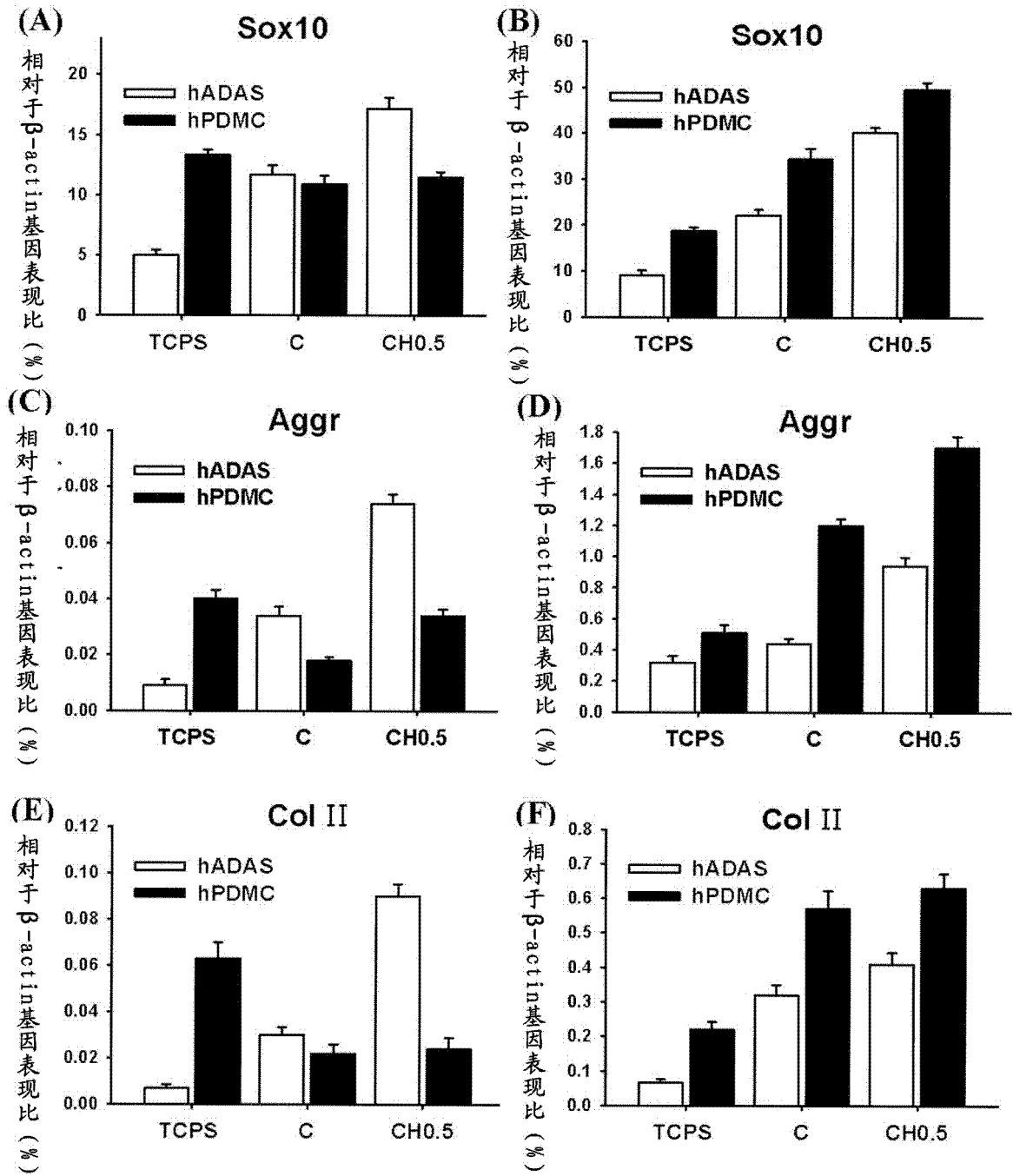


图 19

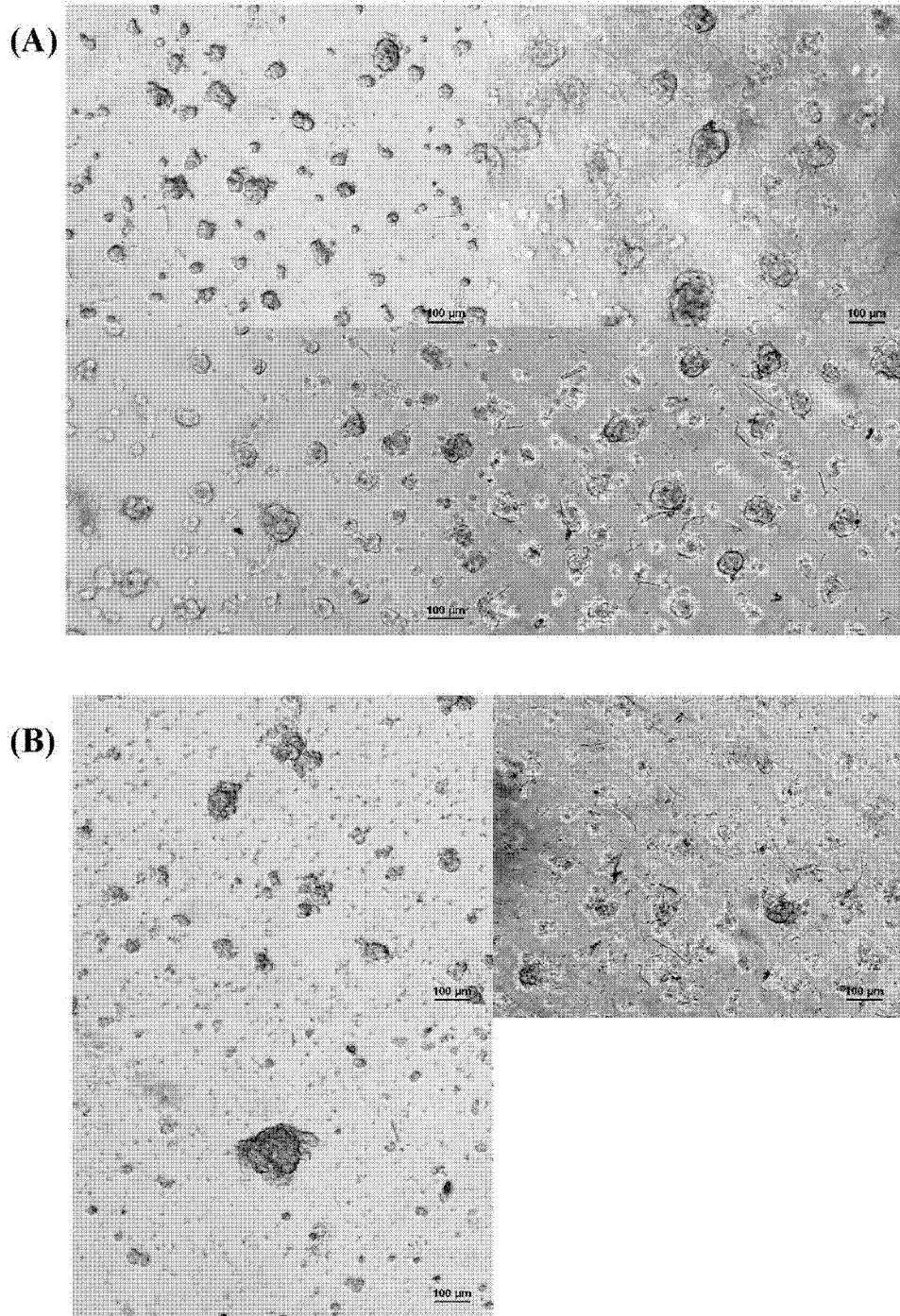


图 20

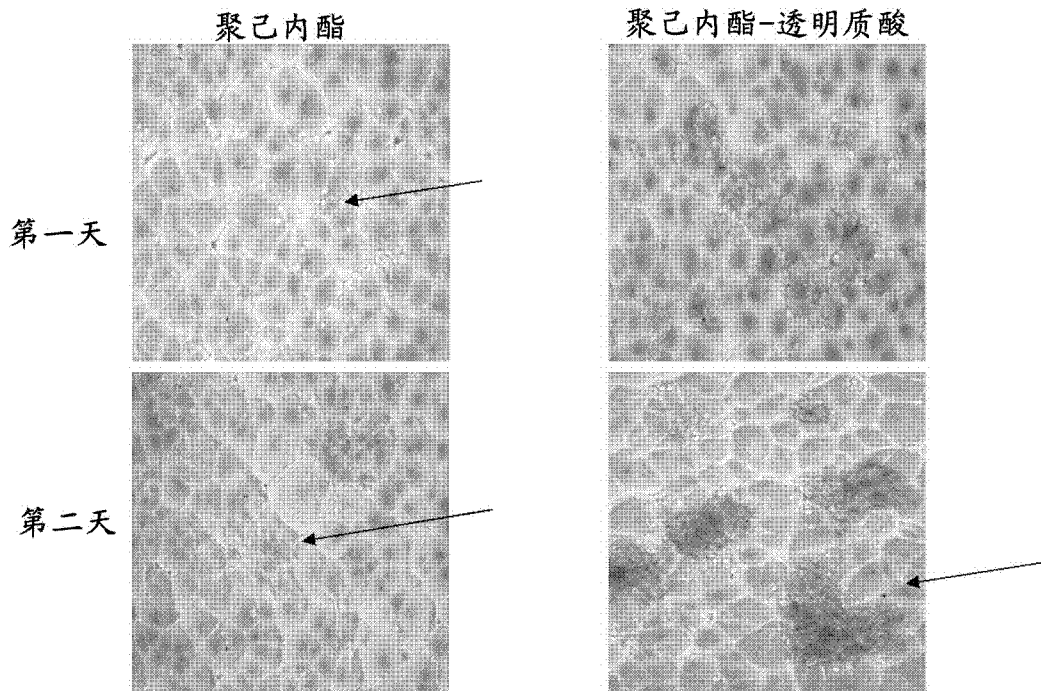


图 21

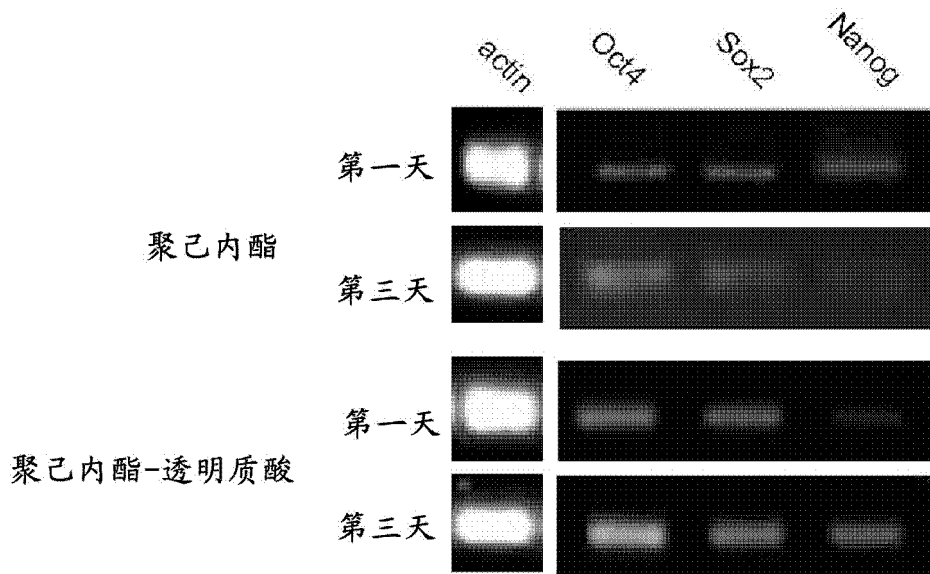


图 22

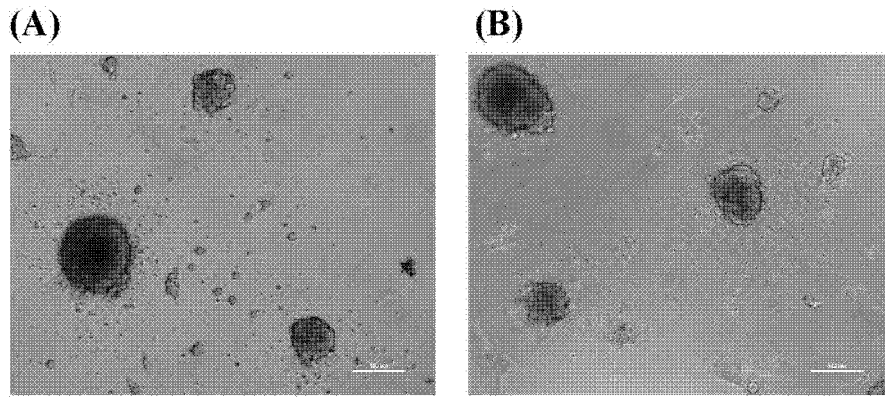


图 23

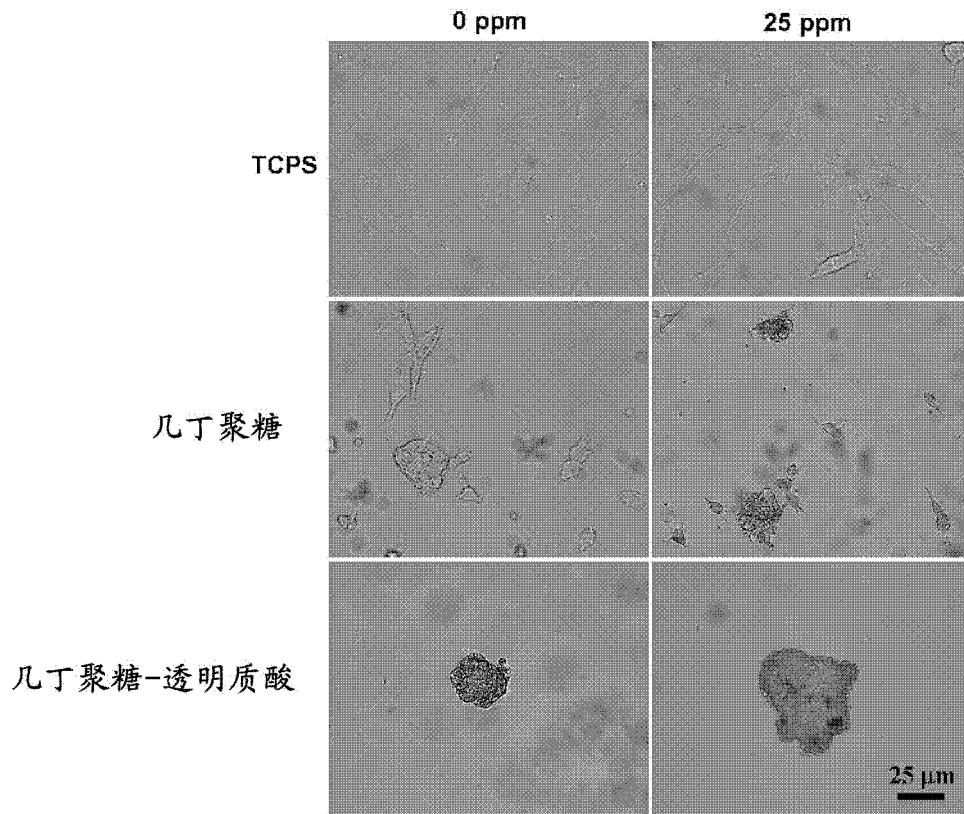


图 24

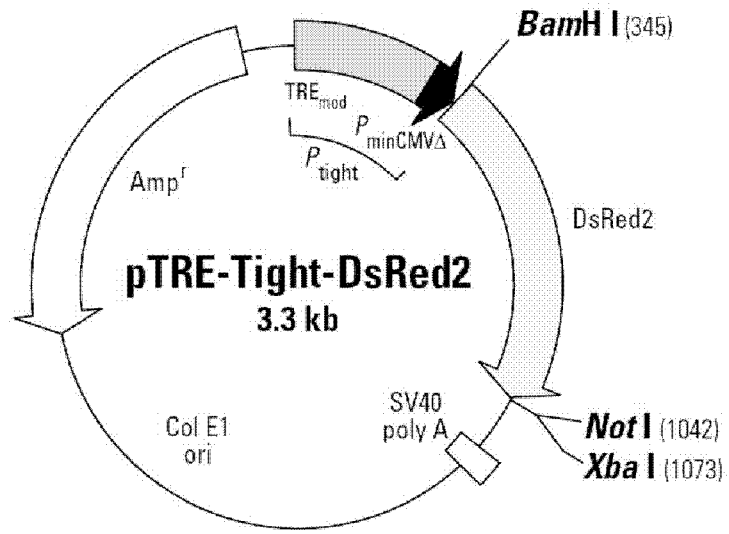


图 25

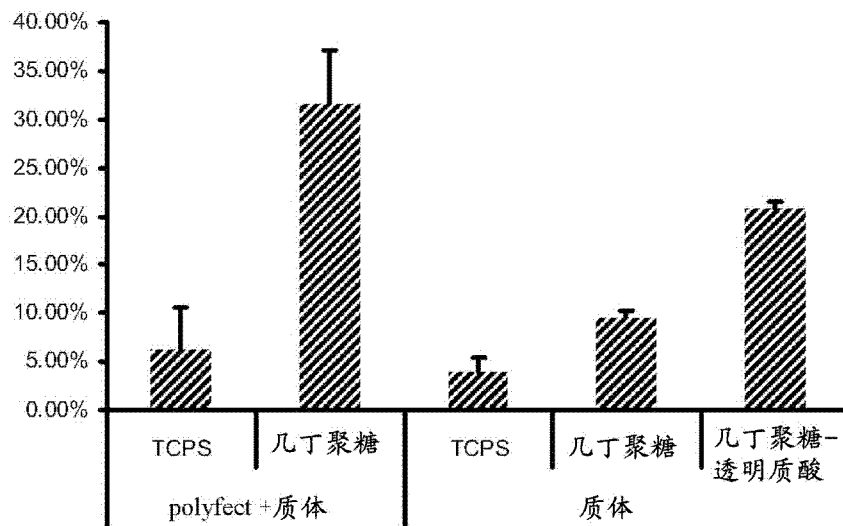


图 26