



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114262686 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 01

(21) 申请号 202210194839.8

A61P 25/28 (2006.01)

(22) 申请日 2022.03.02

A61P 25/16 (2006.01)

(71) 申请人 深圳市夏同生物医药科技有限公司

地址 518107 广东省深圳市宝安区光明区
凤凰街道凤凰社区观光路招商局光明
科技园A1A2栋A2栋315

(72) 发明人 郭莹 高宏

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 陆惠中

(51) Int. Cl.

C12N 5/079 (2010.01)

A61K 35/30 (2015.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

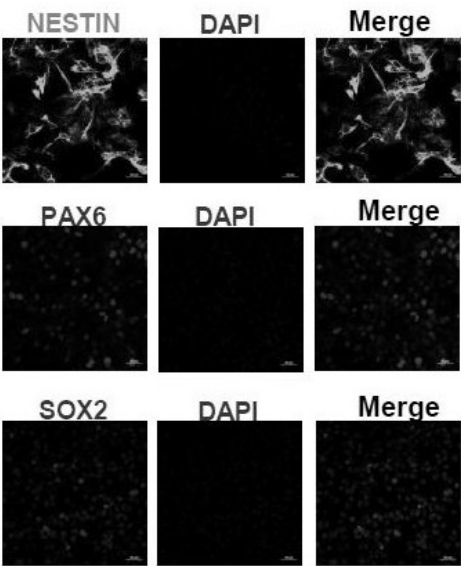
权利要求书2页 说明书14页
序列表3页 附图14页

(54) 发明名称

一种少突胶质细胞的制备方法及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种少突胶质细胞的制备方法及应用。提供的方案以显著短于为先前方案所需的75-95天的时间重演少突胶质细胞分化的主要步骤。通过大麻素受体激动剂WIN55212-2诱导NSC分化,促进OLIG2+OPC诱导。WIN衍生的OLIG2+祖细胞分化为PDGFR α +OPCs,具有高度迁移性,并且可以进一步分化为具有强大髓鞘化能力的成熟OL。将WIN衍生的OPC移植到病变部位时,脊髓损伤(SCI)小鼠的运动能力从移植后第2周开始显著改善。免疫染色结果表明,WIN衍生的OPC可以分化为成熟的OL,使受损的轴突髓鞘化。本发明的方法及产品在细胞治疗领域具有广泛的应用,尤其对于脊髓损伤具有显著的治疗效果。



1. 一种制备OLIG2+神经干细胞的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 生成PAX6+/NESTIN+/SOX2+的NSC:从第0天到第7天,将PSC用神经诱导培养基培养,并每天更换培养基;

(2) 从第8天开始,每天将培养基更换为含有视黄酸、Purmorphamine和CB受体激动剂的新鲜N2培养基,培养4-5天。

2. 一种制备少突胶质细胞前体细胞的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 生成PAX6 +/NESTIN+/SOX2+的NSC:从第0天到第7天,将PSC用神经诱导培养基培养,并每天更换培养基;

(2) 从第8天开始,每天将培养基更换为含有视黄酸、Purmorphamine和CB受体激动剂的新鲜N2培养基;

(3) 从第12天开始,将细胞手动分离并悬浮在含有视黄酸、Purmorphamine和CB受体激动剂的N2B27培养基中,每隔一天更换培养基;

(4) 从第20天开始,球体在PDGF-AA培养基中进一步悬浮培养;

(5) 从第30天开始,将膨胀的球体接种并在神经胶质分化培养基中的低生长因子的基质凝胶包被板或培养皿上培养3-15天。

3. 一种制备少突胶质细胞的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 生成PAX6 +/NESTIN+/SOX2+的NSC:从第0天到第7天,将PSC用神经诱导培养基培养,并每天更换培养基;

(2) 从第8天开始,每天将培养基更换为含有视黄酸、Purmorphamine和CB受体激动剂的新鲜N2培养基;

(3) 从第12天开始,将细胞手动分离并悬浮在含有视黄酸、Purmorphamine和CB受体激动剂的N2B27培养基中,每隔一天更换培养基;

(4) 从第20天开始,球体在PDGF-AA培养基中进一步悬浮培养;

(5) 从第30天开始,将膨胀的球体接种并在神经胶质分化培养基中的低生长因子的基质凝胶包被板或培养皿上培养16-36天。

4. 权利要求1-3任意一项所述的方法,其特征在于,将步骤(1)替换为PAX6 +/NESTIN+/SOX2+的NSC成品。

5. 根据权利要求1-3任一项所述的方法,其特征在于,所述的PSC在基质凝胶包被的六孔板上培养,在37°C培养箱中使用mTeSR™培养基,CO₂为5%的培养箱。

6. 根据权利要求1-3任一项所述的方法,其特征在于,所述的视黄酸浓度为10-1000nM, Purmorphamine浓度为0.1-10μM, CB受体激动剂浓度为0.1-10μM。

7. 根据权利要求1-3任一项所述的方法,其特征在于,所述的视黄酸浓度为100nM, Purmorphamine浓度为1μM, CB受体激动剂浓度为1μM。

8. 根据权利要求1-3任一项所述的方法,其特征在于,所述的CB受体激动剂选自CP55940, AM-1241, JVH-015, JVH-151, JVH-120, A-796260, L-768242, resunab, Arachidonylcyclopropylamide, 2-Arachidonoyl glycerol-d8, Bay 59-3074, BML-190, GW842166X, Noladin ether, Gp 1a中的一种或数种。

9. 根据权利要求1-3任一项所述的方法,其特征在于,所述的CB受体激动剂为WIN55212-2。

10. 一种少突胶质细胞前体细胞, 其特征在于, 根据权利要求2所述的方法制备得到。

11. 一种少突胶质细胞, 其特征在于, 根据权利要求3所述的方法制备得到。

12. 权利要求10所述的少突胶质细胞前体细胞或权利要求11所述的少突胶质细胞在用于制备治疗脱髓鞘疾病及髓鞘损伤疾病的药物中的应用;

所述脱髓鞘疾病包括脊髓损伤、脑卒中、多发性硬化、视神经脊髓炎、格林-巴利综合征、弥散播散性脑脊髓膜炎、急性播散性脑脊髓炎、同心圆硬化、弥漫性硬化、脑白质营养不良、缺血-缺氧性病引起的白质脑病、脑桥中央髓鞘溶解症、急性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、营养缺乏性疾病引起的亚急性联合变性、病毒感染引起的亚急性硬化性全脑炎或进行性多灶性白质脑病、糖尿病性神经病、系统性红斑狼疮的神经病变、白质消融性疾病、肾上腺脑白质营养不良、佩利措伊斯-梅茨巴赫病;

所述髓鞘损伤疾病包括唐氏综合症、阿尔茨海默症、帕金森。

13. 一种促进神经干细胞分化的培养基, 其成分包括: 含有视黄酸、Purmorphamine和CB受体激动剂的新鲜N2培养基。

14. 根据权利要求13所述的培养基, 其特征在于, 所述的视黄酸浓度为10-1000nM, Purmorphamine浓度为0.1-10 μ M, CB受体激动剂浓度为0.1-10 μ M。

15. 根据权利要求13所述的培养基, 其特征在于, 所述的视黄酸浓度为100nM, Purmorphamine浓度为1 μ M, CB受体激动剂浓度为1 μ M。

16. 一种促进神经干细胞分化的培养基, 其成分包括: 含有视黄酸、Purmorphamine和CB受体激动剂的新鲜N2B27培养基。

17. 根据权利要求16所述的培养基, 其特征在于, 所述的视黄酸浓度为10-1000nM, Purmorphamine浓度为0.1-10 μ M, CB受体激动剂浓度为0.1-10 μ M。

18. 根据权利要求16所述的培养基, 其特征在于, 所述的视黄酸浓度为100nM, Purmorphamine浓度为1 μ M, CB受体激动剂浓度为1 μ M。

19. 权利要求13-18任一项所述的培养基用于促进神经干细胞分化的用途。

一种少突胶质细胞的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于干细胞治疗领域,具体涉及一种少突胶质细胞的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 人诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPSC)可由人体皮肤、血液等体细胞在体外重编程而来,且具有和人胚胎干细胞(embryonic stem cell,ESC)类似的无限增殖能力,及在体外分化为几乎所有功能细胞,包括神经干细胞(neural stem cell,NSCs)的能力。iPSC这一特性成功地绕开了伦理性问题,在干细胞治疗方面具有广泛的应用。

[0003] 少突胶质细胞(Oligodendrocyte,OL)是存在于脊椎动物中的中枢神经系统细胞。它们产生富含脂质的层状髓鞘,其覆盖神经元轴突并产生限定的电绝缘区段以使动作电位传导速度最大化。髓磷脂对于轴突完整性和存活也是重要的,并且已显示即使影响少突胶质细胞代谢的小变化也可导致神经退化。

[0004] 动物实验表明,移植的少突胶质细胞前体细胞(Oligodendrocyte precursor cells,OPC)可促进白质存留,增加内源性少突胶质细胞数量,减小空腔容积,从而提高运动恢复。OPC其潜在的治疗机制可能是,再髓鞘化,调节局部免疫微环境,分泌神经营养因子,提供物理支架以支撑生长的轴突。OPC可以分泌一系列物质,包括生长因子,神经营养因子,趋化因子与细胞因子。

[0005] 脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)是一种导致局部神经缺损或脱髓鞘的毁灭性疾病。然而,由内源性少突胶质细胞前体细胞(OPCs)介导的髓鞘再生过程是不够的。因此,外源OPC的移植被认为是SCI模型中实现髓鞘再生的有效方法。然而,目前产生OPC的方法大多是耗时的或基于慢病毒技术,存在低效率或安全问题。

[0006] WIN55212-2是一种CB受体激动剂,在大鼠神经性疼痛模型中被发现是一种强效的镇痛剂。它通过受体介导的信号传递激活p42和p44 MAP激酶。

发明内容

[0007] 本发明的第一个方面提供了一种制备OLIG2+神经干细胞(NSC)的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)生成PAX6+/NESTIN+/SOX2+的NSC:从第0天到第7天,将PSC用神经诱导培养基培养,并每天更换培养基;优选地,PSC汇合率为70-90%;

(2)从第8天开始,每天将培养基更换为含有视黄酸(RA)、Purmorphamine(Pur)和CB受体激动剂的新鲜N2培养基,培养4-5天;

优选地,第12天时,OLIG2+神经干细胞至少达到90%;更为优选地,第12天时,OLIG2+神经干细胞至少达到95%。

[0008] 本发明的第二个方面提供了一种制备少突胶质细胞前体细胞(OPC)的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 生成PAX6⁺/NESTIN⁺/SOX2⁺的NSC:从第0天到第7天,将PSC用神经诱导培养基培养,并每天更换培养基;优选地,PSC细胞密度为70-90%;

(2) 从第8天开始,每天将培养基更换为含有RA、Pur和CB受体激动剂的新鲜N2培养基;

(3) 从第12天开始,将细胞手动分离并悬浮在含有RA、Pur和CB受体激动剂的N2B27培养基中,每隔一天更换培养基;

(4) 从第20天开始,球体在PDGF-AA培养基中进一步悬浮培养;

(5) 从第30天开始,将膨胀的球体接种并在神经胶质分化培养基中的低生长因子的基质凝胶包被板或培养皿上培养3-15天;

优选地,第34天时,PDGFR α ⁺的OPC至少达到90%;更为优选地,第34天时,PDGFR α ⁺的OPC至少达到95%;

优选地,第44天时,04⁺的OPC至少达到35%;更为优选地,第44天时,04⁺的OPC至少达到40%。

[0009] 本发明的第三个方面提供了一种制备少突胶质细胞(OL)的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 生成PAX6⁺/NESTIN⁺/SOX2⁺的NSC:从第0天到第7天,将PSC用神经诱导培养基培养,并每天更换培养基;优选地,PSC细胞密度为70-90%;

(2) 从第8天开始,每天将培养基更换为含有RA、Pur和CB受体激动剂的新鲜N2培养基;

(3) 从第12天开始,将细胞手动分离并悬浮在含有RA、Pur和CB受体激动剂的N2B27培养基中,每隔一天更换培养基;

(4) 从第20天开始,球体在PDGF-AA培养基中进一步悬浮培养;

(5) 从第30天开始,将膨胀的球体接种并在神经胶质分化培养基中的低生长因子的基质凝胶包被板或培养皿上培养16-36天。

[0010] 优选地,第66天时,共表达04和MBP的OL至少达到30%;更为优选地,第66天时,共表达04和MBP的OL至少达到35%。

[0011] 根据上述三个方面所述的方法,其特征在于,将步骤(1)替换为PAX6⁺/NESTIN⁺/SOX2⁺的NSC成品。

[0012] 根据上述三个方面所述的方法,其特征在于,所述的PSC在基质凝胶(Matrigel)包被的六孔板上培养,在37°C培养箱中使用mTeSR™培养基(Stem Cell Technologies, Canada),CO₂为5%的培养箱。

[0013] 优选地,PSC是hPSC。PSC包括ESC和iPSC,优选是hESC和hiPSC。可将PSC接种在包含基质(诸如凝胶或基底膜基质)的表面上。

[0014] 根据上述三个方面所述的方法,其特征在于,所述的RA浓度为10-1000nM,Pur浓度为0.1-10 μ M,CB受体激动剂浓度为0.1-10 μ M。

[0015] 根据上述三个方面所述的方法,其特征在于,所述的RA浓度为100nM,Pur浓度为1 μ M,CB受体激动剂浓度为1 μ M。

[0016] 根据上述三个方面所述的方法,其特征在于,所述的CB受体激动剂选自CP55940, AM-1241, JVH-015 (及它的类似结构JVH-151, JVH-120), A-796260, and L-768242,

resunab, ACPA (Arachidonylcyclopropylamide), 2-Arachidonoyl glycerol-d8, Bay 59-3074, BML-190 (IMMA), GW842166X, Noladin ether, Gp 1a中的一种或数种。

[0017] 根据上述三个方面所述的方法,其特征在于,所述的CB受体激动剂为WIN55212-2。

[0018] 本发明的第四个方面公开了一种少突胶质细胞前体细胞,其特征在于,根据第二个方面所述的方法制备得到。

[0019] 本发明的第五个方面公开了一种少突胶质细胞,其特征在于,根据第三个方面所述的方法制备得到。

[0020] 本发明的第六个方面公开了所述的少突胶质细胞前体细胞或所述的少突胶质细胞在用于制备治疗脱髓鞘及髓鞘损伤疾病的药物中的应用;

优选地,所述脱髓鞘疾病包括脊髓损伤、脑卒中、多发性硬化、视神经脊髓炎、格林-巴利综合症、弥散播散性脑脊髓膜炎、急性播散性脑脊髓炎、同心圆硬化、弥漫性硬化、脑白质营养不良、缺血-缺氧性病引起的白质脑病、脑桥中央髓鞘溶解症、急性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、营养缺乏性疾病引起的亚急性联合变性、病毒感染引起的亚急性硬化性全脑炎或进行性多灶性白质脑病、糖尿病性神经病、系统性红斑狼疮的神经病变、白质消融性疾病、肾上腺脑白质营养不良、佩利措伊斯-梅茨巴赫病;

优选地,所述髓鞘损伤疾病包括唐氏综合症、阿尔茨海默症、帕金森等神经系统疾病。

[0021] 唐氏综合症、阿尔茨海默症、帕金森等神经系统疾病会引发明显的髓鞘损伤。

[0022] 本发明的第七个方面公开了一种促进NSC分化的培养基,其成分包括:含有视黄酸(RA)、Purmorphamine (Pur)和CB受体激动剂的新鲜N2培养基;

优选地,所述的RA浓度为10-1000nM, Pur浓度为0.1-10 μ M, CB受体激动剂浓度为0.1-10 μ M;

更为优选地,所述的RA浓度为100nM, Pur浓度为1 μ M, CB受体激动剂浓度为1 μ M。

[0023] 本发明的第八个方面公开了一种促进NSC分化的培养基,其成分包括:含有视黄酸(RA)、Purmorphamine (Pur)和CB受体激动剂的新鲜N2B27培养基。

[0024] 优选地,所述的RA浓度为10-1000nM, Pur浓度为0.1-10 μ M, CB受体激动剂浓度为0.1-10 μ M;

更为优选地,所述的RA浓度为100nM, Pur浓度为1 μ M, CB受体激动剂浓度为1 μ M。

[0025] 本发明的第九个方面公开了上述培养基用于促进NSC分化的用途。

[0026] 与现有技术相比,本发明取得了显著的技术效果:

(1) WIN55212-2促进hiPSC衍生的NSC以CB1/CB2依赖性方式表达OLIG2

表达PAX6, NESTIN和SOX2的NSCs是使用双SMAD神经诱导方法从hiPSC生成的(图2)。当用一系列浓度的WIN处理时,发明人发现1 μ M的浓度是安全的浓度,对NSC的生长没有副作用,1 μ M WIN大大提高了NSC的OLIG2阳性(OLIG2⁺)细胞的产生,95.4 $\pm$ 0.2%的细胞OLIG2⁺比对照组(78.8 $\pm$ 5.8%, n=3, P<0.05)在D12(图3的A和B)多。而上调效果被CB1抑制剂rimonabant或CB2抑制剂AM630显著抑制(图3的A、B、C)。在通过qRT-PCR验证的OLIG2 mRNA中也观察到了类似的结果(图3的C)。

[0027] 当在悬浮培养物中检测细胞时,由于这些细胞没有形成聚集体,OLIG2阴性细胞通

过培养基变化被消除 (Douvaras, P. and V. Fossati, Generation and isolation of oligodendrocyte progenitor cells from human pluripotent stem cells. Nature Protocols, 2015. 10(8): p. 1143-1154. Namchaiw, P., et al., Temporal and partial inhibition of GLI1 in neural stem cells (NSCs) results in the early maturation of NSC derived oligodendrocytes in vitro. Stem Cell Res Ther, 2019. 10(1): p. 272.)。在此过程中富集OLIG2阳性细胞,并在D20处确定球体的数量。如图3的D和E所示,WIN处理组的OLIG2+球体为对照组的 1.7 ± 0.1 倍($n=3, P<0.05$)。当与CB1或CB2抑制剂共处理时,OLIG2阳性球体显著减少($n=3, P<0.001$,与WIN组相比)。结果表明,WIN不仅促进了OLIG2的表达,而且还促进了以CB1/CB2依赖方式产生的OLIG2 +球体(图3的D和E)。

[0028] (2) WIN衍生的OLIG2+祖细胞分化为表达PDGFR α 、A2B5和NG2的高纯度的OPC

第34天,进一步分化时,发明人使用OPCs细胞标志物(如PDGFR α ,A2B5和NG2)进行免疫染色。同时,使用流式细胞术来更好地鉴定细胞组分和相应的阳性细胞比例。免疫荧光和流式细胞术的结果表明,WIN诱导的D34上超过95%的细胞表达OPC细胞标志物NG2和A2B5。对照组与WIN组差异无统计学意义(图4A、4B、4D、4 E 和 4G)。有趣的是,在WIN组中获得的超过 $95.4 \pm 2.2\%$ 的细胞表达PDGFR α ,这是OPC广泛使用的分子标记,而对照组中只有 $60.7 \pm 0.7\%$ ($n=3, P<0.001$,图4G)。在qRT-PCR中观察到类似的结果。与对照组相比,WIN组PDGFR α 的mRNA表达水平上调($n=3, P<0.01$,图4H)。D34处WIN组中的典型双极性OPC图像如图4I所示。

[0029] (3) WIN衍生的OPC表现出较强的迁移能力。

[0030] 在D30处的GFR基质凝胶包被板上接种直径范围为200至300 μm 的细胞球,细胞从用GDM培养的球体中迁移出来。在接种4,12,24和36小时后,观察细胞球和移出的细胞并在倒置显微镜下成像(图5A)。用图像J(即软件image J)对图像进行了分析。结果表明,36 h后,细胞从WIN衍生的细胞球的平均迁移距离($203.7 \pm 6.3\mu\text{m}$)明显长于对照细胞球($117.2 \pm 7.3\mu\text{m}, n=40, P<0.001$,图5B)。同时,发明人还比较了两组在单细胞状态下的迁移能力。在划痕实验中观察到类似的结果(图5C)。数据显示,48h时,WIN组迁移率为 $44.5 \pm 1.0\%$,对照组为 $29.9 \pm 3.3\%$ ($n=3, p<0.05$,图5D)。以上结果表明,WIN衍生的OPC具有更强的迁移能力。

[0031] 此外,发明人在D30的细胞上进行了RNA-Seq。与对照组相比,WIN组有983个基因上调,98个基因下调(图5E)。差异基因的热图,如图5F所示。根据差异基因,前10个KEGG通路,如PI3K-Akt信号通路和ECM受体相互作用在图5G。从GSEA分析,与对照组相比,WIN组中与细胞迁移相关的生物过程上调(图5H)。

[0032] (4) WIN衍生的OPC与成熟的OL在体外效率高。

[0033] 为了评估OPC在体外自然成熟的能力,OPCs在GFR (Growth Factor Reduced) 基质凝胶包被的板上用GDM培养。O4是一种晚期OPC标志物,通过使用免疫荧光和流式细胞术在D44处检测。结果表明,WIN组O4+细胞的百分比为 $42.4 \pm 2.1\%$,明显高于对照组($25.6 \pm 3.6\%, n = 4, p<0.01$,图6A、B、C和 6D)。在分化时间线的D55处,与对照组相比,WIN组中表达未成熟OL标记半乳糖神经酰胺酶 (GALC) 的细胞较多,分别为 $86.2 \pm 5.3\%$ 和 $60.6 \pm 5.3\%$, ($n=3, p<0.05$,图6B 和 6E)。D55处细胞的mRNA表达水平发现,WIN组MBP、GALC和PLP1的mRNA表达上调(图6F)。在分化结束时,在WIN组中检测到更成熟的OL共表达O4和MBP。WIN组和对组成熟OL的百分比分别为 $37.2 \pm 2.9\%$ 和 $6.6 \pm 0.4\%$ ($n=3, p<0.001$,图6G 和 6H)。此外,WIN

衍生的OPC可以分化为支链OL,MBP和CNP酶的阳性染色(图7中的A-C)。

[0034] (5) WIN衍生OL在体外发挥了强大的髓鞘形成能力。

[0035] 为了在体外测试WIN衍生的OL的髓鞘化能力,在无神经元的3D纳米纤维支架上培养了按MACS分类的O4 + OPCs,用于髓鞘包裹。该3D纳米纤维支架包含直径为700nm的电纺PCL排列的纳米纤维基质,可以模拟大脑的白质。培养2周后,发现WIN组中MBP+ OL的数量和MBP覆盖的纳米纤维面积与对照组相比显著增加(图7中的D-F)。

附图说明

[0036] 图1为hiPSC分化的时间轴。由图1可知,WIN以CB1/CB2依赖性方式促进了hiPSC衍生的NSC的OLIG2+祖细胞生成。

[0037] 图2为免疫染色图,用NESTIN,PAX6和SOX2免疫染色的PSC衍生NSCs。

[0038] 图3为PSC分化培养中,D12和D20时不同治疗组的细胞检测图。其中,A为OLIG2在D12不同治疗组中的代表性免疫染色图像;Ctrl为对照组,Rim为CB1抑制剂rimonabant,Am为CB2抑制剂AM630。B为不同治疗组在第12天时OLIG2阳性(OLIG2+)细胞百分比图。C为OLIG2在D12不同治疗组的相对mRNA表达图。D为不同治疗组中D20处的细胞球体的代表性图像。E为不同治疗组中D20处的相对细胞球数图。B、C和E中显示的数据均值为均值 $\pm$ SEM,n=3,p<0.05(*vs. ctrl; #vs. WIN),p<0.001(###vs. WIN)。

[0039] 图4A为WIN衍生的OLIG2+祖细胞分化为表达A2B5的OPC的代表性免疫染色图像。

[0040] 图4B为WIN衍生的OLIG2+祖细胞分化为表达NG2的OPC的代表性免疫染色图像。

[0041] 图4C为WIN衍生的OLIG2+祖细胞分化为表达PDGFR α 的OPC的代表性免疫染色图像。

[0042] 图4D为A2B5+的代表性流式细胞术数据图。

[0043] 图4E为NG2+的代表性流式细胞术数据图。

[0044] 图4F为PDGFR α +(CD140a+)的代表性流式细胞术数据图。

[0045] 图4G为对照组和WIN组流式细胞术中A2B5+、NG2+和PDGFR α +(CD140a+)细胞的百分比图,n=3,p<0.001(***vs. ctrl),ns,无显著差异。

[0046] 图4H为PDGFR α 在对照组和WIN组的相对mRNA表达图,时间为D30,n=3,p<0.01(**vs. ctrl)。图4G和图4H中显示的数据均值 $\pm$ SEM。

[0047] 图4I为D34处WIN组中的典型双极性OPC图像。

[0048] 图5A为细胞在对照组和WIN组在4、12、24和36 h从球体中移出的代表性图像。

[0049] 图5B为细胞从对照和WIN群中的球体迁移距离的量化图,n=40,p<0.05(*vs. ctrl),p<0.001(***vs. ctrl)。

[0050] 图5C为对照组和WIN组划痕后0、12、24、36、48、60和72h处的单细胞的代表性细胞迁移图像。

[0051] 图5D为在刮擦后0、12、24、36、48、60和72 h对照组和WIN组的迁移速率图,n=3,p<0.05(*与ctrl)。图5B和图5D中的数据均值 $\pm$ SEM。

[0052] 图5E为与D30处RNA-Seq组相比,WIN组的差异基因直方图;上调基因为UP,下调基因为DOWN。

[0053] 图5F为对照组和WIN组前20个差异基因的热图。

[0054] 图5G为KEGG分析中富集的前10个途径。

- [0055] 图5H为GSEA对细胞迁移正调控的分析图。
- [0056] 图6A为对照组和WIN组D44处的代表性细胞图像。
- [0057] 图6B为对照组和WIN组D44染色的代表性荧光图像。
- [0058] 图6C为O4-APC的代表性流式细胞术数据。
- [0059] 图6D为流式细胞术中O4⁺细胞在对照组和WIN组D44处的百分比图, $n = 4, p < 0.01$ (**与ctrl)。
- [0060] 图6E为对照组和WIN组D55处的代表性细胞图像。
- [0061] 图6F为GALC、PLP1和MBP在D55组和WIN组的相对mRNA表达, $n = 3, p < 0.05$ (*vs. ctrl), $p < 0.01$ (** vs. ctrl)。
- [0062] 图6G为在对照组和WIN组用MBP和O4在D66处染色的代表性荧光图像。
- [0063] 图6H为成熟OL在对照组和WIN组D66处的百分比图, $n = 3, p < 0.001$ (***) vs. ctrl)。
- [0064] 图7为WIN衍生OPC的体外髓鞘形成检测图。A为WIN衍生的成熟OL在D66的代表性细胞图像。B为WIN衍生的成熟OL染色与MBP和O4的代表性荧光图像。C为WIN衍生的成熟OL染色与CNP酶的代表性荧光图像。D为MBP免疫染色与对照组和WIN组纳米纤维的比对的代表性图像。比例尺, 50 μm 。
- [0065] E为对照组和WIN组MBP⁺细胞数的相对倍数变化图。 $n = 3, p < 0.05$ (* vs. ctrl), $p < 0.001$ (***) vs. ctrl)。F为对照组和WIN组MBP⁺面积的相对倍数变化图。 $n = 3, p < 0.05$ (* vs. ctrl), $p < 0.001$ (***) vs. ctrl)。
- [0066] 图8为WIN衍生的OPCs对SCI小鼠的治疗效果图, 结果显示, WIN衍生的OPCs对SCI小鼠具有更好的治疗效果;

其中, A为SCI小鼠细胞移植示意图及时间线图。B为不同组小鼠的BMS评分图, $n = 10, p < 0.01$ (**vs. Vehicle), $p < 0.001$ (***)vs. Vehicle)。C为移植后第8周运动诱发电位(MEP)的电生理学分析图。D为不同组N1峰和P1峰的相对潜伏期图。 $n = 5, p < 0.05$ (* vs. Vehicle; # vs. ctrl-OPC), $p < 0.01$ (** vs. Vehicle; ## vs. ctrl-OPC), $p < 0.001$ (***) vs. Vehicle)。E为不同组病变震中LFB染色的代表性图像。比例尺, 500 μm 。F为不同组中相对LFB⁺区域图。 $n = 5, p < 0.05$ (# vs. ctrl-OPC), $p < 0.001$ (***) vs. Vehicle)。G为不同组病变震中的髓鞘的代表性TEM图像。上行和下排的比例尺分别为 5 和 1 μm 。H为每组3只不同小鼠TEM图像中髓鞘G比的定量分析图。 $p < 0.05$ (* vs. Vehicle), $p < 0.01$ (## vs. ctrl-OPC), $p < 0.001$ (***) vs. Vehicle)。I为透射电镜图像中的轴突数/ mm^2 图。 $n = 3, p < 0.05$ (* vs. Vehicle, # vs. ctrl-OPC), $p < 0.01$ (** vs. Vehicle)。在B, D, E, H和I中显示的数据 $\pm$ SEM。

- [0067] 图9为WIN衍生的OPCs可以分化为SCI小鼠病变部位的成熟OL检测图;

其中, A为MBP(红色)和人类核hNA(绿色)的代表性IHC图像, 上下行的刻度条为50 μm 。B为不同组MBP的相对荧光强度图, $n = 3, p < 0.01$ (** vs. Vehicle, ##与ctrl-OPC)。C为GFAP(红色)和人类核hNA(绿色)的代表性IHC图像, 上下行的刻度条为50 μm 。D为不同组的GFAP的相对荧光强度图, $n = 3, p < 0.01$ (##vs. ctrl-OPC), $p < 0.01$ (***) vs. Vehicle)。E为MBP⁺/GFAP⁺细胞在病变部位HNA⁺细胞中的p分布图, $n = 3, p < 0.05$ (*vs. Vehicle, # vs. ctrl-OPC)。F为MBP在不同组中的相对mRNA表达图, $n = 3, p < 0.05$ (* vs. Vehicle, # vs. ctrl-OPC)。G为来自WIN衍生的OPCs, MBP和STEM121⁺(定于人类细胞的细胞质蛋白)的成熟

OL的代表性IHC图像。比例尺为20 μ m。

具体实施方式

[0068] 下面结合附图和实施例对本发明的技术方案进行详细描述,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。

[0069] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0070] 定义与解释:

WIN55212-2是一种CB受体激动剂,在大鼠神经性疼痛模型中被发现是一种强效的镇痛剂。它通过受体介导的信号传递激活p42和p44 MAP激酶,在本发明中简称为WIN。

[0071] RA指Retinoic acid,RA,即视黄酸。

[0072] rimonabant是一种CB1抑制剂,本发明中简称Rim;AM630是一种CB2抑制剂,本发明中简称Am。

[0073] 本发明中的Pur是指Purmorphamine,Purmorphamine是第一个针对Smoothed蛋白开发的小分子激动剂。Purmorphamine激活Hedgehog (Hh) 信号通路,导致其下游靶基因的上调和下调。

[0074] 术语“PSC”具有它在本领域中的常用含义,即能够发育成内胚层、外胚层和中胚层细胞的自我复制性细胞。优选地,PSC是hPSC。PSC包括ESC和iPSC,优选是hESC和hiPSC。可将PSC接种在包含基质(诸如凝胶或基底膜基质)的表面上。

[0075] 本发明中所有培养基及其组成均列在表S1中:

表S1

培养基	成分
mTeSR1	mTeSR1 基础培养基补充 50×mTeSR1 补充剂和 100×青霉素-链霉素，以获得最终浓度为 1×。
基础培养基 (basal medium)	DMEM/F12 辅以非必需氨基酸 (NEAA) 1×、GlutaMAX 2 mM、2-巯基乙醇和青霉素-链霉素，最终浓度分别为 1×。
神经诱导培养基 (Neural Induction Medium, NIM)	基础培养基补充 SB431542 (10μM), LDN193189 (250nM) 和 RA (0.1μM)
N2 培养基	补充 N2 补充剂的基础培养基 (美国 Gibco, 100×储备液)，最终浓度为 1×N2，层粘连蛋白 4μg/mL (瑞士，罗氏)，bFGF 10 ng/mL (美国 Peprotech) 和 Noggin 20 ng/mL (美国 Peprotech)。在更换培养基时新鲜加入 RA 0.1μM (Sigma-Aldrich, 美国) 和 1μM Purmorphamine (美国，
N2B27 培养基	基础培养基，含有 1×N2 (美国 Gibco, 100×储存) 和 1×B27 (美国 Gibco, 50×储存) 补充剂。
PDGF-AA 培养基	含有 1×N2 (美国 Gibco, 100×储存)、1×B27 (美国 Gibco, 50×储存) 补充剂、生物素 100 ng/mL (美国, SigmaAldrich)、PDGF-AA 10 ng/mL (美国 Peprotech)、IGF-1 10 ng/mL (美国 Peprotech)、T3 60 ng/mL (美国 Sigma-Aldrich)、NT3 10 ng/mL (美国 Peprotech)、HGF 5 ng/mL (美国 Peprotech) 和 cAMP 1 μM (Sigma-Aldrich, 美国)。
神经胶质分化培养基 (Glial differentiation medium, GDM)	含有 1×N2、1×B27 补充剂、生物素 100 ng/mL (美国 Sigma-Aldrich)、T3 60 ng/mL (美国 Sigma-Aldrich)、抗坏血酸 20 μg/mL (美国 Sigma-Aldrich)、NT3 10 ng/mL (美国 Peprotech)、HEPES 10 mM (美国 Sigma-Aldrich)、cAMP 1 μM (美国 Sigma-Aldrich)、Y-27632 10 μM (美国 Cayman) 和 Heregulin 10 ng/mL (Peprotech, 美国)。

本发明中免疫荧光染色所用的一抗和二抗 (表S2和S3)：

表S2

一抗	公司	货号
Rabbit anti-Olig2	abcam	ab254043
Rabbit anti-PDGFRα	CST	3174
Rabbit anti-NG2	abcam	ab129051
Rabbit anti-MBP	CST	78896
Mouse anti-A2B5	Invitrogen	433110
Rabbit anti-SOX2	Cell Signaling	3579S
Mouse anti-NESTIN	Cell Signaling	33475
Rabbit anti-PAX6	Cell Signaling	60433
Mouse anti-GFAP	Bioworld	MB9017
Rabbit anti-NeuN	abcam	ab177487
Mouse anti-NeuN	NOVUS	NBP1-92693SS
Mouse anti-NKX2.1	Millipore	MAB5460

表S3

Donkey anti-mouse 594	abcam	ab150108
Donkey anti-rabbit 594	Invitrogen	1987293
Goat anti-mouse 488	abcam	ab150117
Goat anti-rabbit 488	abcam	ab150077
Sheep anti-mouse 594	abcam	ab6806
Goat anti-chicken 488	abcam	ab150173
Donkey anti-rabbit 647	abcam	ab150075

本发明中实时荧光定量 PCR的靶基因引物序列：

表S4

靶基因	上游引物	下游引物
GLI1	AGCGTGAGCCTGAATCTGTG (SEQ ID NO:1)	CAGCATGTACTGGGCTTTGAA (SEQ ID NO:2)
OLIG2	CCAGAGCCCGATGACCTTTT (SEQ ID NO:3)	TCCGGCTCTGTCATTGCTT (SEQ ID NO:4)
MBP	CCGGCAAGAACTGCTCACTA (SEQ ID NO:5)	CGTCTAGCCATGGGTGATCC (SEQ ID NO:6)
NESTIN	GAAGGGCAATCACAACAGGT G (SEQ ID NO:7)	GGGGCCACATCATCTTCCA (SEQ ID NO:8)
PATCH1	GAAGAAGGTGCTAATGTCCTG AC (SEQ ID NO:9)	GTCCCAGACTGTAATTCGCC (SEQ ID NO:10)
PLP1	ACCTATGCCCTGACCGTTG (SEQ ID NO:11)	TGCTGGGGAAGGCAATAGACT (SEQ ID NO:12)
PDGFR	TTGAAGGCAGGCACATTTACA (SEQ ID NO:13)	GCGACAAGGTATAATGGCAGAAT (SEQ ID NO:14)
SMO	TCGAATCGCTACCCTGCTG (SEQ ID NO:15)	CAAGCCTCATGGTGCCATCT (SEQ ID NO:16)
SOX10	CCTCACAGATCGCCTACACC (SEQ ID NO:17)	CATATAGGAGAAGGCCGAGTAGA (SEQ ID NO:18)

实施例1

1.1细胞培养和细胞分化

由中国科学院广州生物医药与健康研究院来源人诱导多能干细胞(hiPSC)系(UE017C1)在基质凝胶(Matrigel)包被的六孔板上培养,在37°C培养箱中使用mTeSR™培养基(Stem Cell Technologies, Canada),CO₂为5%的培养箱。

[0076] 为了生成PAX6+/NESTIN+/SOX2+ NSC,应用了双SMAD神经诱导方法,从第0天(D0)到第7天处理~80%密度的hiPSC与神经诱导培养基(NIM),并每天更换培养基。从D8开始,每天将培养基更换为含有RA(100nM),嘌呤胺(PUR,1μM)和WIN(1μM)的新鲜N2培养基。从D12开始,将细胞手动分离并悬浮在含有RA(100nM),PUR(1μM)和WIN(1μM)的N2B27培养基中的超低附着板中,每隔一天更换培养基。从D20开始,球体在PDGF-AA培养基中进一步悬浮培养。在D30上,将膨胀的球体接种并在神经胶质分化培养基(GDM)中的低生长因子的基质凝胶包

被板或培养皿上。所有培养基及其组成均列在表S1。图1为本发明培养过程的时间轴。

[0077] 应当理解,本发明所述的PAX6+/NESTIN+/SOX2+ NSC并不限于用hiPSC诱导分化得到,也可以直接采用市售产品,并按照本发明所述的方法进一步培养得到少突胶质细胞前体细胞(OPC)和少突胶质细胞(OL),并用于治疗脊髓损伤(SCI)。

[0078] 上述的人诱导多能干细胞(hiPSC)也可用人胚胎干细胞(hESC)替代,所用的人胚胎干细胞均为已建立的,可无限增殖的细胞系,不涉及对人胚胎的工业或商业目的的应用。如H9人胚胎干细胞系。

[0079] 1.2免疫荧光染色

本发明中细胞标记物的鉴定是采用免疫荧光染色法,将不同培养阶段的细胞(NSC,OPCs和OL)培养在基质凝胶或生长因子降低的基质凝胶包被的共聚焦培养皿上,用预冷PBS洗涤三次,并在室温下用4%多聚甲醛(PFA)固定15分钟。然后将固定样品洗涤三次,渗透并用含有0.5%Triton X-100和2%牛血清白蛋白(BSA)的封闭溶液在室温下封闭30分钟。将表S2中列出的稀释的一抗在4°C下覆盖细胞过夜。第二天,加入相应的二抗(列于表S3中)用于洗涤后在室温下在黑暗中染色60分钟。然后将含有抗荧光淬灭剂的DAPI加入培养皿中进行核染色。使用共聚焦显微镜(蔡司,LSM880)或倒置显微镜(尼康,Eclipse Ti2-U)拍摄图像。

[0080] 1.3实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

本发明使用qRT-PCR计算相对mRNA表达折叠变化,具体方法为:根据制造商的说明,使用RNA快速纯化试剂盒(ES Science,中国上海)收集和纯化细胞和脊髓组织的总RNA。在用NANODROP ONE(赛默飞世尔科技,美国)量化RNA浓度后,使用EasyScript®一体化一线cDNA合成SuperMix与T100TM热循环仪(BIO-RAD)进行qPCR(一步gDNA去除)的一体化,然后使用PerfectStart Green qPCR SiperMix(TRANS,中国)与LightCycler® 96(罗氏)通过qRT-PCR进行定量。所有过程均按照制造商的说明执行。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对mRNA表达折叠变化。所有靶基因引物序列均列于表S4。

[0081] 1.4细胞迁移能力测试

为了测试迁移能力,发明人在球体和单细胞状态的两个维度上进行了实验。首先,发明人已经观察到对照组和WIN组中的细胞从球中迁移出来的能力。将来自对照组和WIN组的30天处的相同尺寸的选定球体接种在GDM培养基中的生长因子减少的基质凝胶包被的6孔板上。在4,12,24和36小时后,观察细胞球和移出的细胞并在倒置显微镜下成像。

[0082] 在划痕测定中,用预热的Accutase消化34天的细胞,并通过40μm细胞过滤器过滤以产生单细胞悬浮液。离心后,将这些单细胞以 2×10^6 /mL的密度接种在生长因子降低的基质凝胶包被的24孔板上,并用GDM培养。当细胞汇合达到70-80%时,用10μl移液器尖端在细胞上形成划痕。用DPBS洗涤后,将新鲜的GDM添加到孔中。使用倒置显微镜在0,12,24,36,48,60和72小时收集细胞图像。所有图像均由图像J(即软件image J)测量和分析。

[0083] 1.5流式细胞术

以基于抗O4-APC抗体的流式细胞术为例,将2μL抗体加入到含有 1×10^6 个细胞和细胞染色缓冲液的98μL单细胞悬浮液中,充分混合并在冰箱中黑暗中孵育10分钟。孵育后,将细胞洗涤并干燥。然后将细胞沉淀重悬于适量的缓冲液中,并在分析前通过40μm细胞过滤器过滤。流式细胞术在CytoFLEX细胞仪(美国贝克曼)上进行。流式细胞术的一抗列于表

S2中。

[0084] 1.6MACS细胞分离

O4 + OPC分离是根据制造商的说明使用基于抗O4微珠(德国MiltenyiBiotec)的MACS。通过在第44天用预热的Accutase在37°C下消化细胞30分钟来制备单细胞悬浮液。消化后,用预冷的DMEM/F12稀释细胞混合物,并在室温下以300g离心5分钟。然后将细胞重悬于DMEM/F12中,通过40 μ m细胞过滤器过滤,并通过在室温下以300g离心5分钟来收集细胞。混合均匀后,将细胞混合物在冰箱中孵育15分钟。然后加入1ml冷MACS缓冲液,并以300g离心10分钟。将细胞沉淀重悬于500 μ l冷MACS缓冲液中,并充分混合。之后,将细胞混合物加入到MS柱中,在合适的MACS分离器的磁场中用500 μ l冷MACS缓冲液预冲洗,并用500 μ l缓冲液洗涤柱3次。未标记的细胞是从流出物中收集的。当柱储液器为空时,将柱置于15ml收集管上,用1ml缓冲液冲洗。通过将柱塞牢固地推入柱子中,从流出物中收集磁性标记的细胞。然后将洗脱的富含O4 +的细胞以300g离心5分钟并重悬于1ml GDM中。

[0085] 1.7纳米纤维髓鞘化测定

从Sigma-Aldrich购买与直径为700nm的静电纺丝聚己内酯(PCL)对齐的纳米纤维室载玻片,并在37°C下涂覆生长因子的基质胶过夜。通过MACS分选的O4 + OPCs接种在每个腔室 5×10^4 个细胞,并加1ml GDM,每2天更换培养基。培养3周后,按照免疫荧光部分所述固定,封闭和染色细胞。图像由共聚焦显微镜(蔡司,LSM880)拍摄。

[0086] 1.8RNA测序

根据制造商的说明,使用RNA快速纯化试剂盒(ES Science,中国上海)提取总RNA。RNA文库测序由Gene Denovo Biotechnology Co.,Ltd.(中国广州)在Illumina HiSeqTM 2500/4000上进行。生物信息学分析是使用Omicsmart进行的,Omicsmart是一个用于数据分析的实时交互式在线平台(<http://www.omicsmart.com>)。

[0087] 构建脊髓损伤模型并验证细胞移植的治疗效果:

(1) 脊髓损伤模型

雌性C57BL/6小鼠通过腹膜内注射以每20g300 μ l的剂量接受1.25%三溴乙醇麻醉,并在T12周围剃除毛发,T12是小鼠背部的最高点。T12周围的皮肤被切开约1.0厘米,以暴露脊柱两侧的椎旁肌肉和脊髓的硬脑膜。将小鼠固定在一个特殊的脊髓槽中,并接受一次打击,这是通过使用脊髓撞击器从6.25毫米的高度掉落10克重量的杆子进行的(纽约大学撞击器模型II)。止血后,用手术针依次缝合小鼠的深筋膜,皮下组织和皮肤。用碘伏消毒伤口后,腹膜内注射每只小鼠含有庆大霉素150 μ l的生理盐水。通过监测撞击器的设置(例如挫伤冲击速度和压缩速率)来保证小鼠之间损伤程度的一致性。然后将小鼠置于从麻醉恢复期间的小动物加热垫上。手术后,每天人工排尿三次,直到动物独立排尿。在SCI后的第一周每天给予庆大霉素注射,以防止感染。

[0088] (2) 细胞移植

D34的对照和WIN组均超过95%的细胞为NG2和A2B5阳性。SCI小鼠在SCI后的第八天接受OPC或载体(vehicle)(盐水)移植。在麻醉下,重新暴露脊髓,并在损伤中心上方的硬膜上打开一个小孔。将悬浮在5 μ l盐水中的 1×10^5 个细胞在30秒内注射到SCI小鼠的病变部位。注射后,将微注射器留在注射部位60秒并缓慢抽出以避免细胞悬浮液流出。对于免疫抑制,从细胞移植前的第一天开始,每天腹腔内给予小鼠环孢菌素-A(10mg / kg),并持续

到移植后第4周。

[0089] (3) 巴索鼠标刻度(Basso Mouse Scale)

后肢的运动功能恢复通过巴索小鼠量表(BMS)进行评估。简而言之,两个独立的评分员接受了BMS记录的训练,并且对整个实验中的小鼠分组视而不见。术后检查在SCI后的第1天和第7天进行,然后每周进行一次,直到移植后第8周。根据量表标准,在空旷的场地中自由行走4分钟,使用0~9分的评分系统对每只小鼠进行评分。

[0090] (4) 电生理学

细胞移植8周后,通过使用Powerlab/15 T(ADInstruments, Inc., 澳大利亚)记录的运动诱发电位(MEP)。简而言之,在用1%戊巴比妥钠完全麻醉后,将银电极放置在靠近右侧皮质感觉运动区域和小鼠右侧感觉运动皮层的地方。同时,将双极记录电极放置在对侧坐骨神经的表面。脉冲发生器的频率设置为4 Hz,强度设置为4.5 mA,持续时间为0.2 ms,以产生刺激。MEP的模拟信号被放大了100,000倍,平均256次扫描。记录并分析了机电站N1波和P1波的间隔期。

[0091] (5) 免疫组化

用1%戊巴比妥钠深度麻醉后,在移植后8周用0.1M磷酸盐缓冲盐水制备PBS和4%多聚甲醛心电泳输注小鼠。将解剖的脊髓固定在4%PFA中24小时,然后在4°C下在15%和30%蔗糖溶液中进行梯度脱水,并嵌入OCT中(日本东京樱花精细技术有限公司)。使用低温恒温器(CRYOSTAR NX50, Thermo)冷冻切片嵌入的脊髓组织,厚度为8-10 μ m。

[0092] 对于IHC,将冷冻切片提前解冻,用PBS洗涤三次,用含有3%BSA和0.3%Triton X-100的封闭溶液在PBS中在37°C下封闭60分钟,并在4°C下与一抗孵育过夜。第二天,用冷PBS冲洗切片3次,并在室温下在黑暗中与二抗孵育1小时。然后用含有DAPI的安装溶液覆盖载玻片,并用指甲油密封载玻片。使用共聚焦显微镜(蔡司,LSM880)收集图像。

[0093] (6) 卢克索尔快速蓝(LFB)染色

用4%多聚甲醛固定新鲜脊髓组织24小时以上,然后用梯度醇(90%, 95%, 无水乙醇),酒精苯和二甲苯脱水,然后打蜡。将打蜡的组织包埋在包埋机中并修剪。使用切片机(徕卡)将修剪后的石蜡块切割成厚度为4 μ m的碎片。脱蜡和洗涤后,将切片与预热的髓鞘染色溶液A孵育1小时。然后将切片浸入髓鞘染色液B中2秒钟,并直接浸入髓鞘染色液C中15s,并通过用水洗涤终止染色过程。在用曙红复染后,用无水乙醇和二甲苯脱水切片,并用中性胶安装。使用倒置显微镜(尼康,Eclipse Ti2-U)收集图像。

[0094] (7) 透射电子显微镜

将从损伤部位取出的脊髓组织,修剪至1mm $\times$ 1mm $\times$ 1mm,置于电子显微镜固定液中,在4°C下放置2~4小时,再用0.1M PBS(PH 7.4)洗涤3次,室温下固定在含1%渗透酸的0.1M PBS中2h。固定和洗涤后,用梯度酒精(50%-70%-80%-90%-95%-100%-100%)和丙酮脱水组织。然后用丙酮和812包埋剂的组合分别以1:1和2:1的比例渗透组织2-4h和过夜。之后,用812包埋剂渗透组织5-8小时。然后将组织插入装有812种包埋剂的包埋板中,在37°C烘箱中过夜,并在60°C烘箱中聚合48h。将切片用2%乙酸铀酰饱和醇溶液染色15分钟,柠檬酸铅15分钟,并在室温下干燥过夜。使用透射电子显微镜(HT7700, HITACHI)观察和收集TEM图像。

[0095] (8) 统计分析

使用不成对的 t 检验进行双样本比较,或使用单因子方差分析与事后 Bonferroni 检验进行三样本比较,进行统计显著性分析。显著差异表现为 $p < 0.05$ (*, #), $p < 0.01$ (**, ##), $p < 0.001$ (***, ###)。所有实验均独立进行至少3次。所有数据均显示为均值 $\pm$ SEM。

[0096] 实施例2 WIN衍生OPC移植改善SCI小鼠的运动恢复

为了研究WIN衍生的OPC作为SCI治疗的潜力,发明人将OPCs移植到SCI小鼠的病变中,并使用BMS量表评估运动功能,如图8A和8B所示。SCI后,小鼠瘫痪并失去后肢活动性(BMS评分= 0)。SCI后第7天,将WIN组或对照组的OPC放疗至SCI病变部位。vehicle组在病变部位接受了相同体积的盐水。细胞移植后,小鼠后肢的功能逐渐恢复。从移植后第二周开始,WIN组小鼠的后肢运动功能与vehicle组相比有显著改善。而对照组,小鼠后肢的运动功能在细胞移植第4周后明显改善,明显晚于WIN组。此外,与接受control OPCs移植小鼠相比,用WIN衍生OPC移植的小鼠BMS评分从移植后2周到行为测试的最后一天显著增加($n = 10, p < 0.01$)。细胞移植第8周后,WIN组小鼠的恢复率明显优于对照组,相应的BMS评分分别为 7.2 ± 0.4 和 5.5 ± 0.6 ($n = 10, p < 0.05$, 图8B)。

为了进一步评估运动功能的恢复,发明人在移植后8周对SCI小鼠进行了MEPs的电生理学分析(图8C)。对照OPC和WIN-OPC移植组N1峰和P1峰的相对晚 t 周期均短于vehicle组。与对照OPC移植组同床,WIN-OPC移植组N1峰和P1峰的相对晚期 t 周期均显著缩短(图8D)。 $n = 5, p < 0.05$ (* vs. Vehicle; # vs. ctrl-OPC), $p < 0.01$ (** vs. Vehicle; ## vs. ctrl-OPC), $p < 0.001$ (***) vs. Vehicle)。上述结果表明,WIN衍生的OPC通过增强运动恢复对SCI具有更好的治疗效果。

[0097] 实施例3将WIN衍生的OPC移植到SCI小鼠中可以改善其脱髓鞘状况

为了证明每组小鼠病变震中的髓鞘,发明人在脊髓冠状切片上进行了LFB染色。结果表明,与sham组相比,vehicle组lfb+的面积 s 显著减小,表明脱髓鞘发生在SCI之后(图8E和8F)。虽然将OPCs植入病变部位可以增加LFB+面积,改善脱髓鞘并保持组织完整性。WIN组的LFB+面积 s 大于control组的LFB+面积,表明与control OPCs相比,WIN衍生的OPC具有更好的髓鞘再生效应(图8E和8F), $n = 5, p < 0.05$ (# vs. ctrl-OPC), $p < 0.001$ (***) vs. Vehicle)。

[0098] 为了更显微镜观察病变部位的髓鞘轴突,发明人通过透射电子显微镜(TEM)进行观察。首先,计算了髓鞘轴突的数量。如图8G和8H,vehicle组中的轴突与sham组相比经历了很大的损失。与vehicle小鼠相比,接受OPC移植的小鼠在病变部位周围具有增加的髓鞘轴突数量。而WIN-OPC中每毫米²的髓鞘轴突数量明显高于对照-OPC,分别为 7.15 ± 0.74 和 9.70 ± 0.78 。 $n = 3, p < 0.05$ (* vs. Vehicle, # vs. ctrl-OPC), $p < 0.01$ (** vs. Vehicle)。

[0099] 此外,髓鞘的厚度可以通过测 g 比来估计, g 比是内轴突直径与外径的比值。如图8G和8H所示, g 比值越大,髓鞘的厚度越薄。vehicle组的 g 比为 0.88 ± 0.01 ,大于其他组,表明SCI小鼠中剩余的轴突 s 正在进行脱髓鞘。与vehicle小鼠相比,接受OPC移植的小鼠具有更多的髓鞘轴突和更厚的致密髓鞘。移植外源性OPC可缓解SCI脱髓鞘过程。然而,在WIN-OPC组中观察到更多具有致密髓鞘。WIN-OPC组的 g 比值为 0.67 ± 0.02 ,低于control-OPC组的 0.81 ± 0.02 ($n = 3, p < 0.01$),表明WIN-OPCs的治疗效果优于control-OPCs。 $p < 0.05$ (* vs.

Vehicle), $p < 0.01$ (## vs. ctrl-OPC), $p < 0.001$ (***) vs. Vehicle)。

[0100] 实施例4 WIN衍生的OPC可以区分参与髓鞘再生的功能OL

为了确定移植细胞的命运,使用带有抗人核(HNA)抗体的IHC来跟踪它们。脊髓矢状冰冻部分的IHC显示,WIN-OPC组中大多数HNA阳性细胞都可以用抗MBP抗体染色(图9A和9E)。WIN-OPC组HNA/MBP双阳性细胞的百分比为 $83.2 \pm 5.9\%$,显著高于control-OPC组的 $47.7 \pm 9.9\%$, ($n = 5, p < 0.01$, 图9E)。对照组和WIN组HNA/GFAP双阳性细胞的百分比分别为 $41.3 \pm 4.4\%$ 和 $21.2 \pm 6.5\%$ ($n = 5, p < 0.01$, 图9C和9E)。将WIN衍生的OPC移植到SCI小鼠的脊髓中后,大多数细胞分化成OLs。在相同的拍摄条件下,WIN组MBP的相对平均荧光强度明显强于对照组,而两组对GFAP的相对平均荧光强度上表现相反 ($n=3, p < 0.01$, 9B 和 9D)。WIN-OPC组MBP的相对mRNA表达高于对照OPC组 ($n= 3, p < 0.05$, 9F)。此外,使用STEM121 (绿色) (特定于人类细胞的c型胞浆蛋白) 和MBP (红色) 来可视化SCI小鼠脊髓组织中的人髓鞘OLs。图9G中的荧光图像显示,WIN衍生的OPC可以在体内分化为分支的OL,并整合到脊髓中进行髓鞘再生。

[0101] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 深圳市夏同生物医药科技有限公司

<120> 一种少突胶质细胞的制备方法及应用

<130> L22010063F

<160> 18

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 1

agcgtgagcc tgaatctgtg 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 2

cagcatgtac tgggctttga a 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 3

ccagagcccg atgacctttt 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 4

tccggctctg tcatttgctt 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 5

ccggcaagaa ctgctcacta 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 6
cgtctagcca tgggtgatcc 20
<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 7
gaagggcaat cacaacaggt g 21
<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 8
ggggccacat catcttcca 19
<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 9
gaagaagggtg ctaatgtcct gac 23
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 10
gtcccagact gtaatttcgc c 21
<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 11
acctatgccc tgaccgttg 19
<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 12

tgctggggaa ggcaatagac t 21
<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 13
ttgaaggcag gcacatttac a 21
<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 14
gcgacaaggt ataatggcag aat 23
<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 15
tcgaatcgct accctgctg 19
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 16
caagcctcat ggtgccatct 20
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 17
cctcacagat cgcctacacc 20
<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<400> 18
catataggag aaggccgagt aga 23

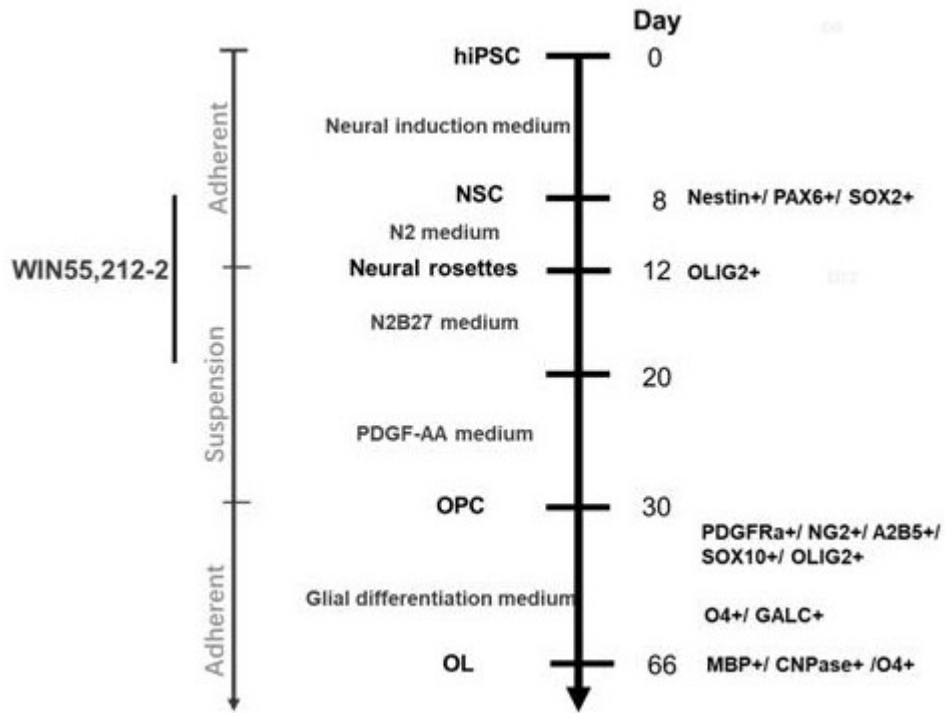


图1

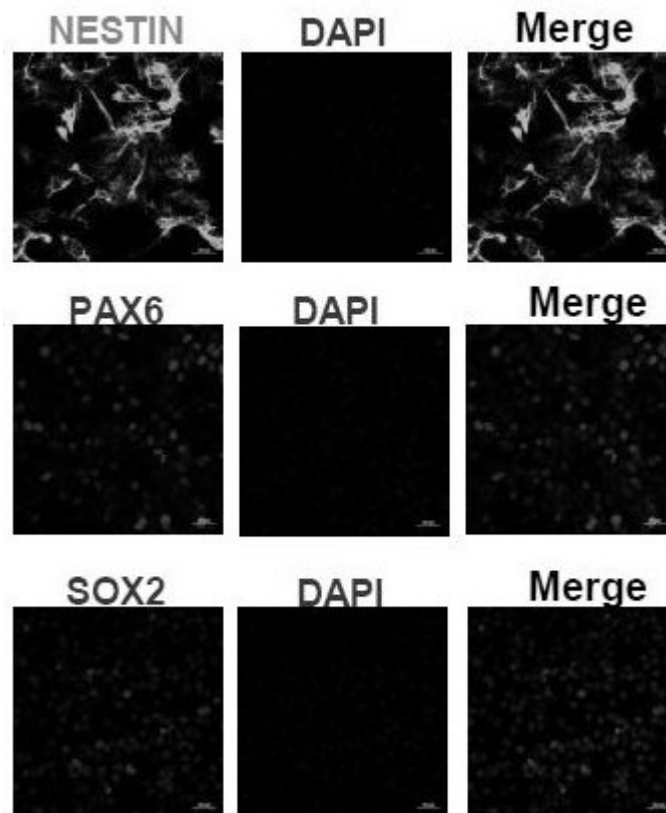


图2

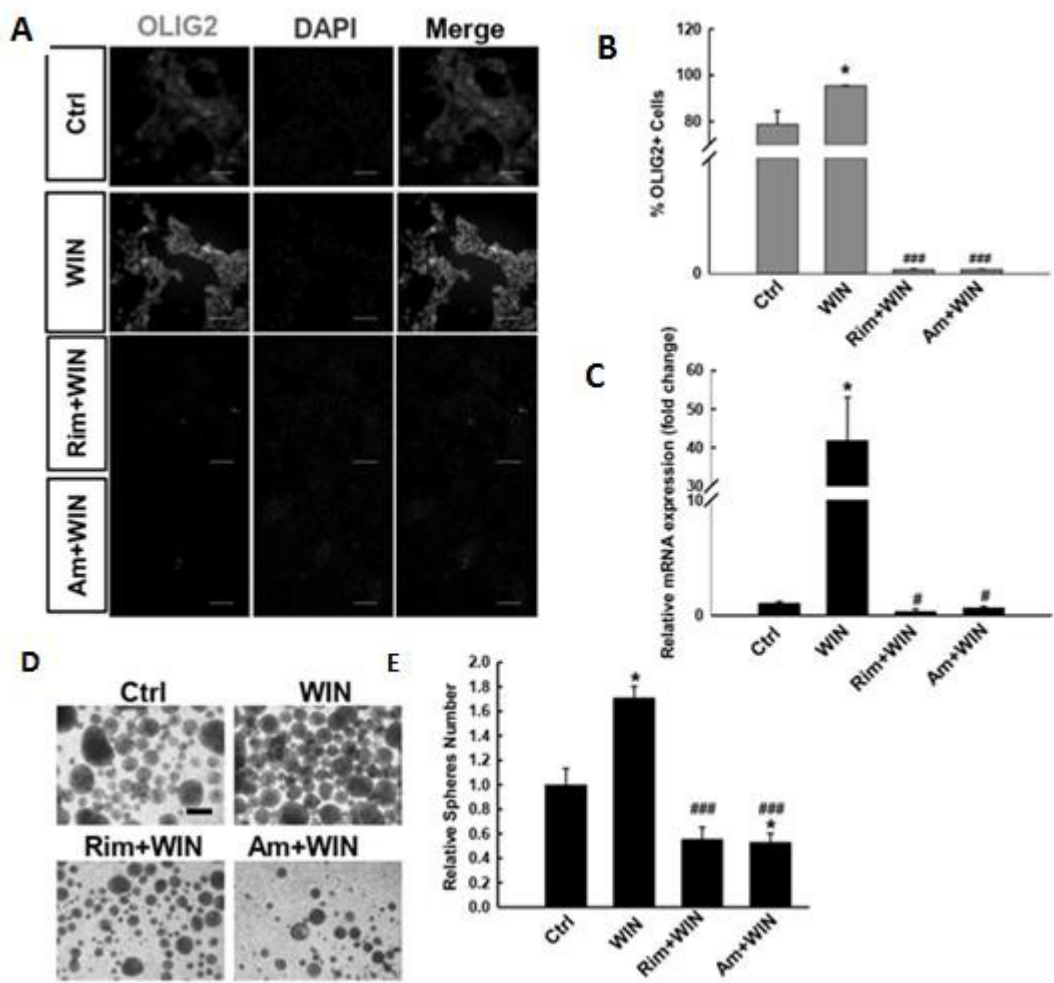


图3

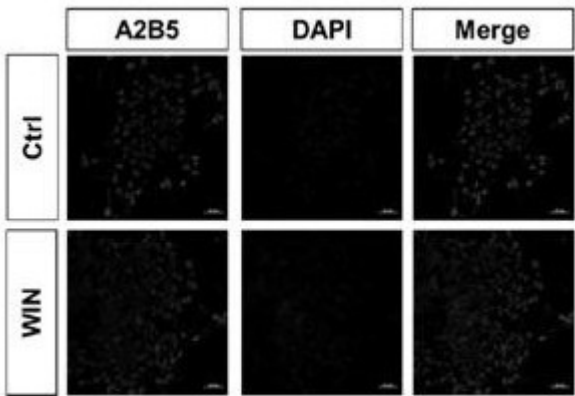


图4A

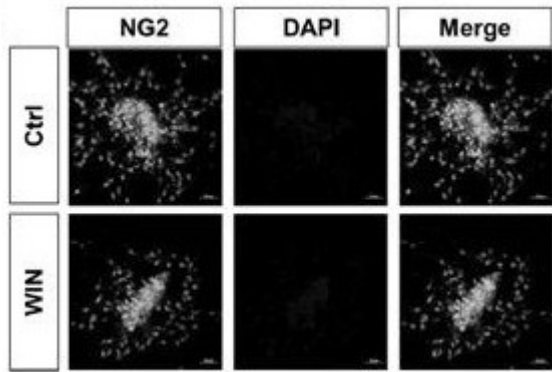


图4B

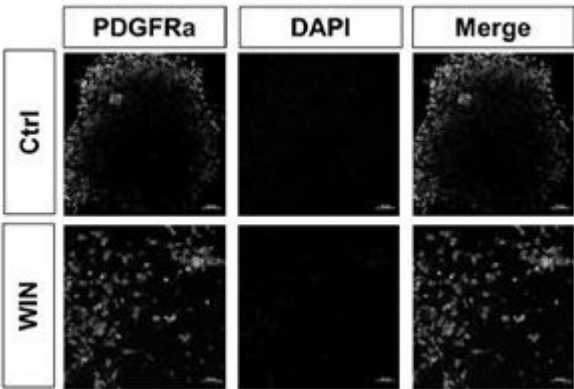


图4C

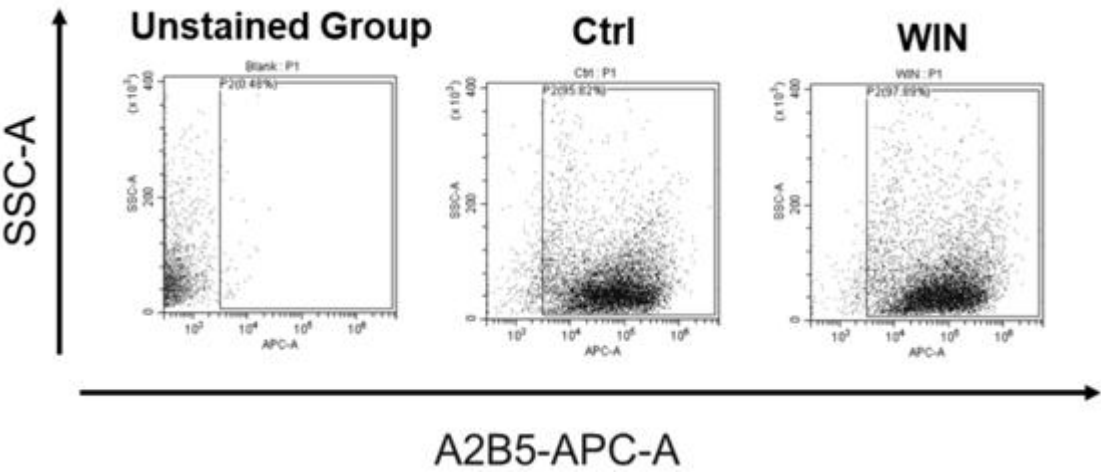


图4D

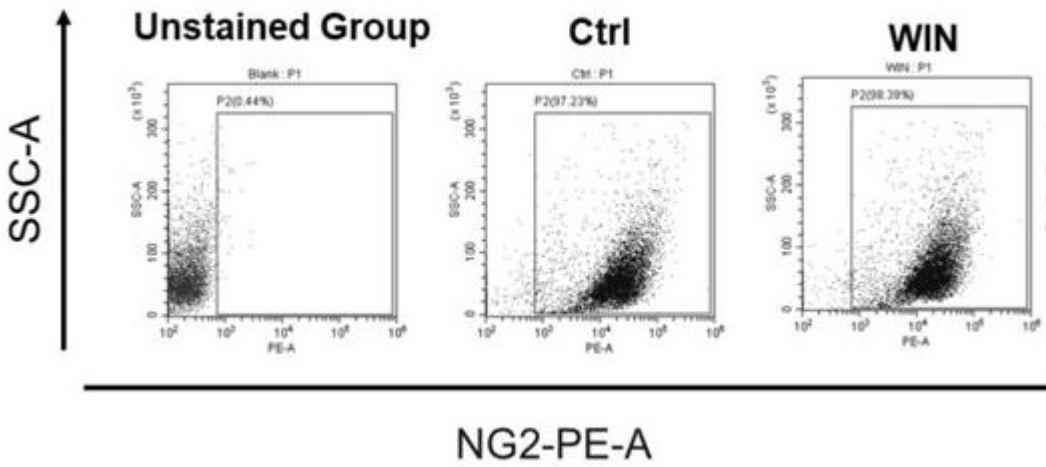


图4E

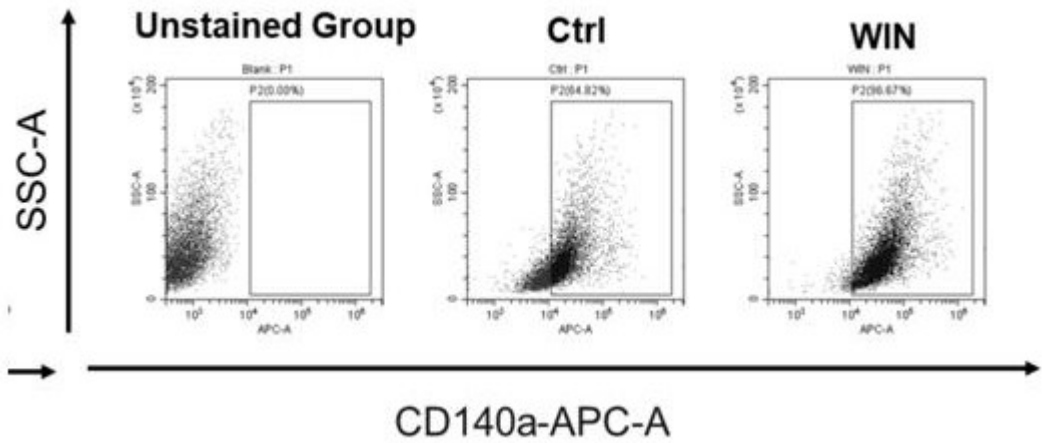


图4F

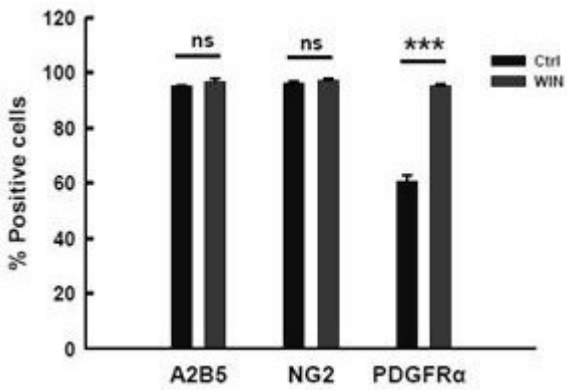


图4G

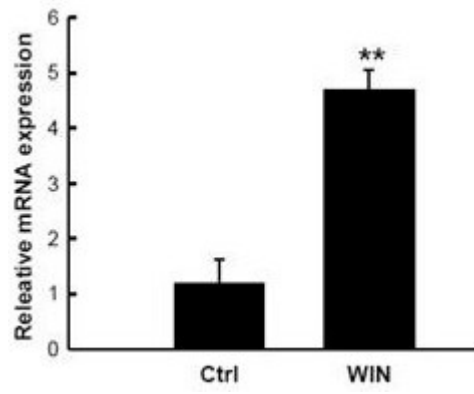


图4H

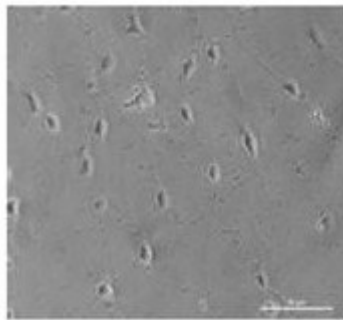


图4I

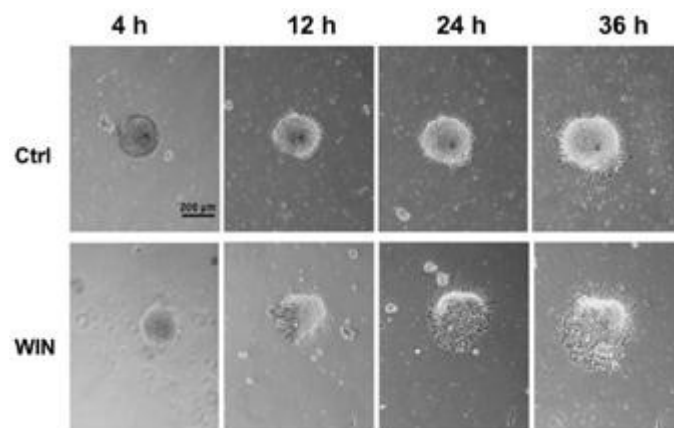


图5A

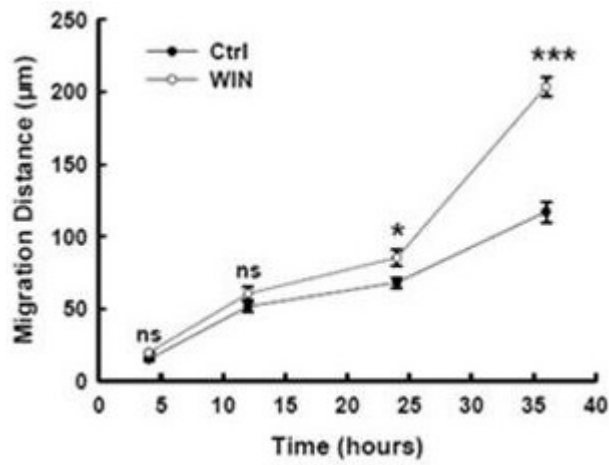


图5B

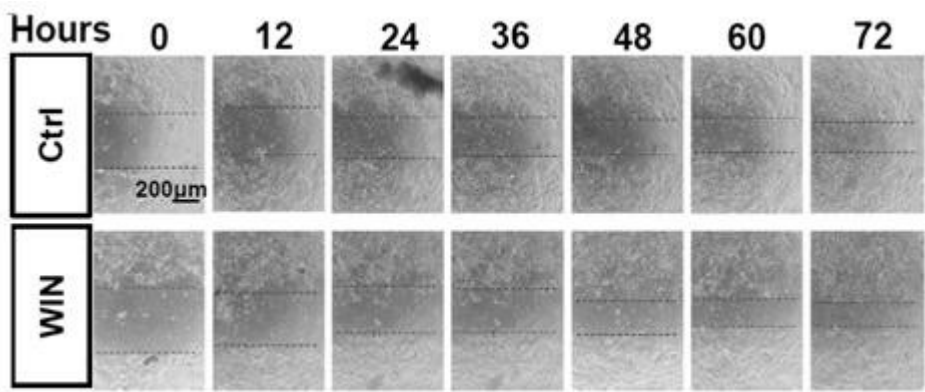


图5C

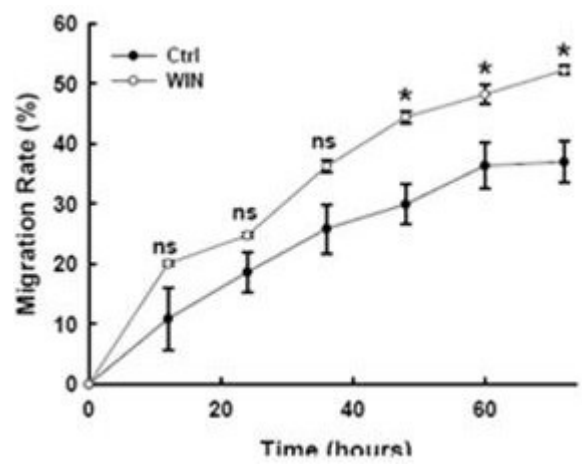


图5D

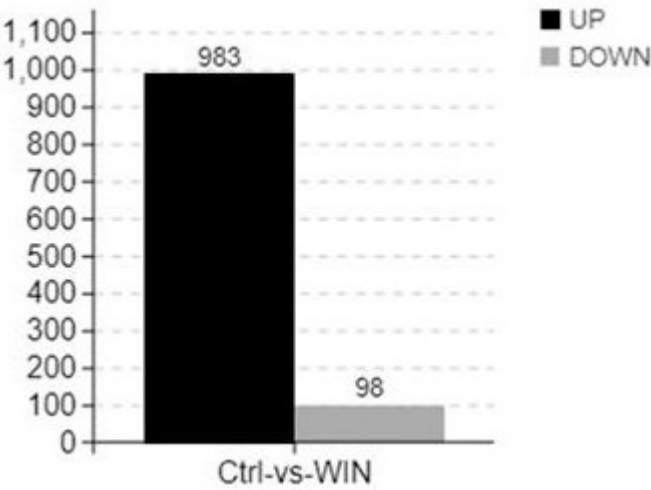


图5E

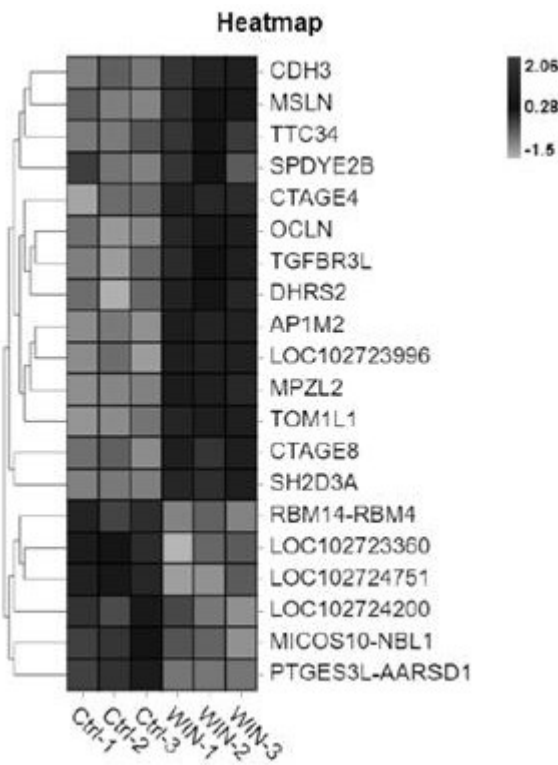


图5F

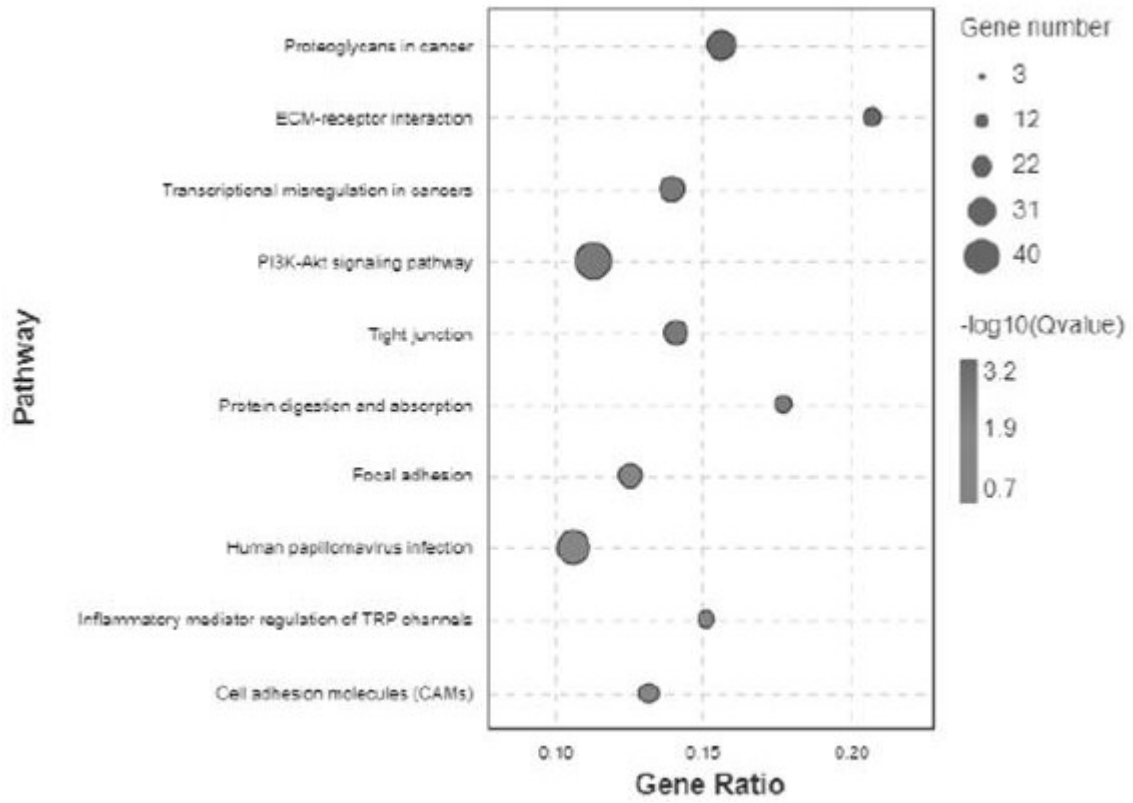


图5G

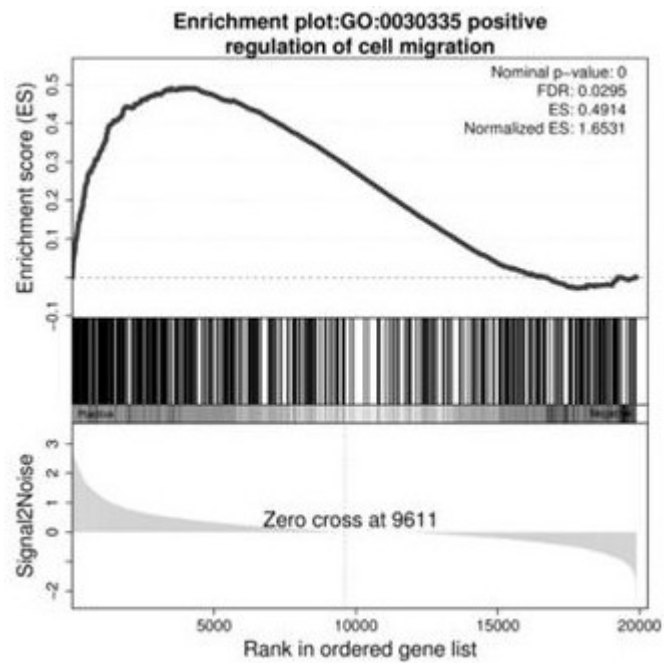


图5H

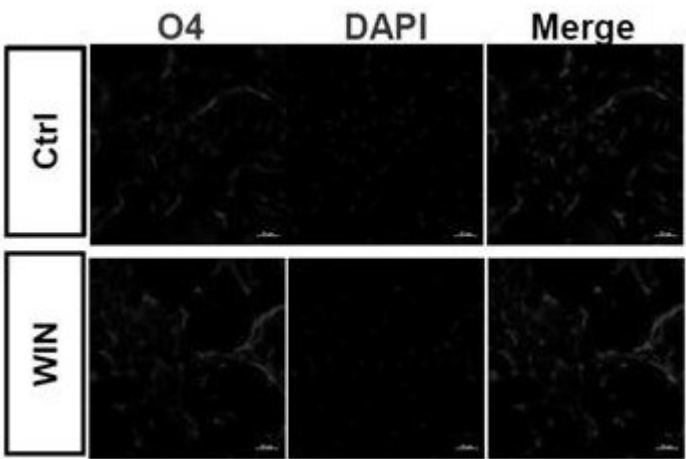


图6A

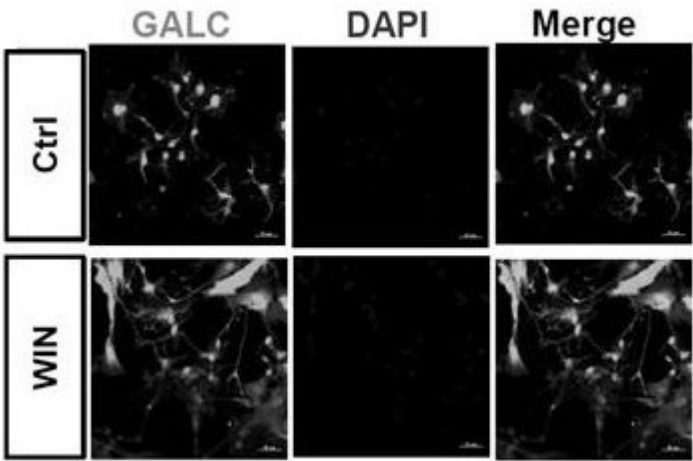


图6B

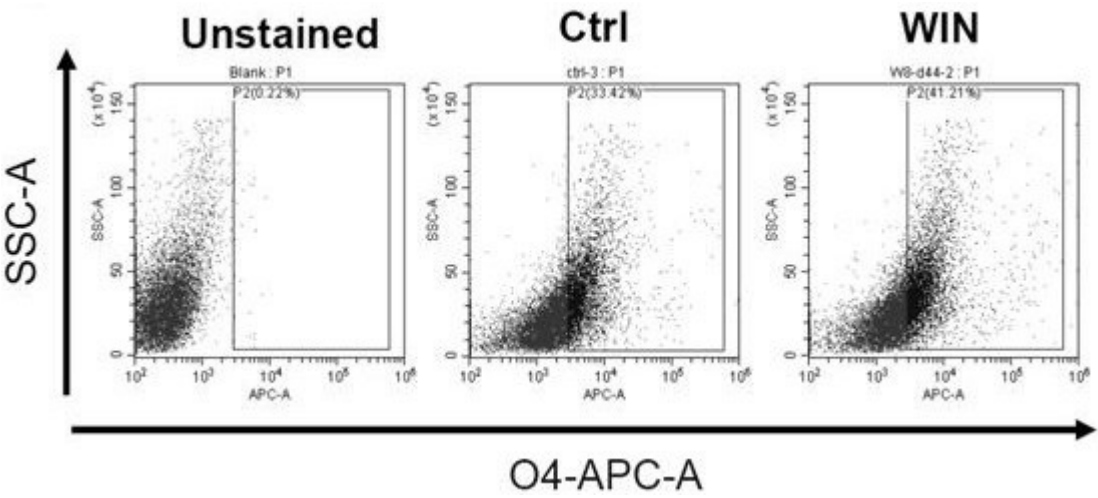


图6C

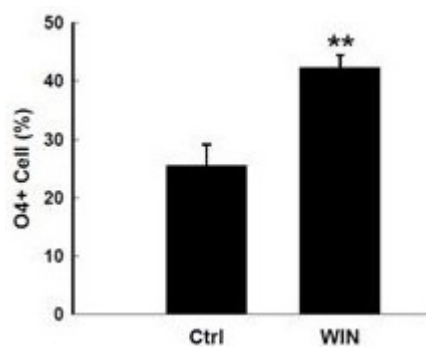


图6D

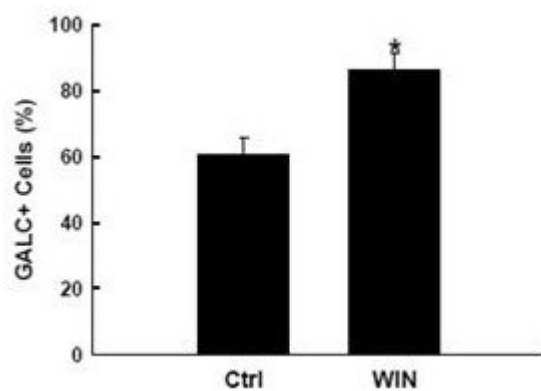


图6E

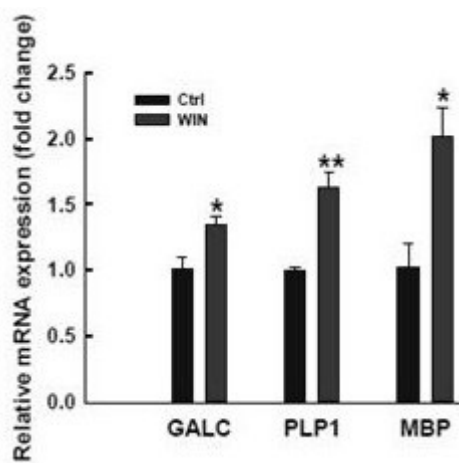


图6F

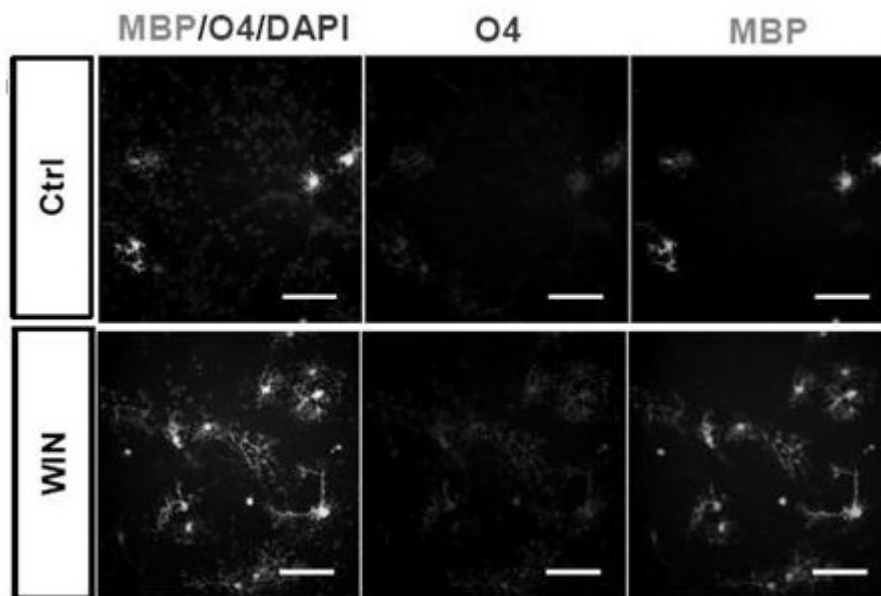


图6G

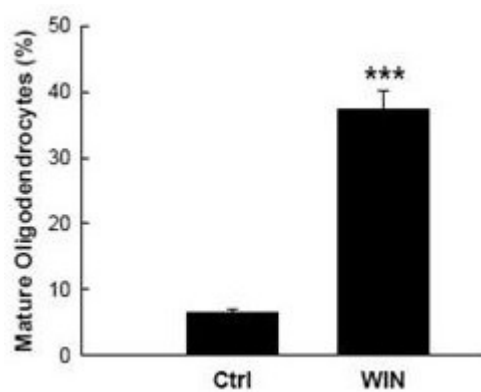


图6H

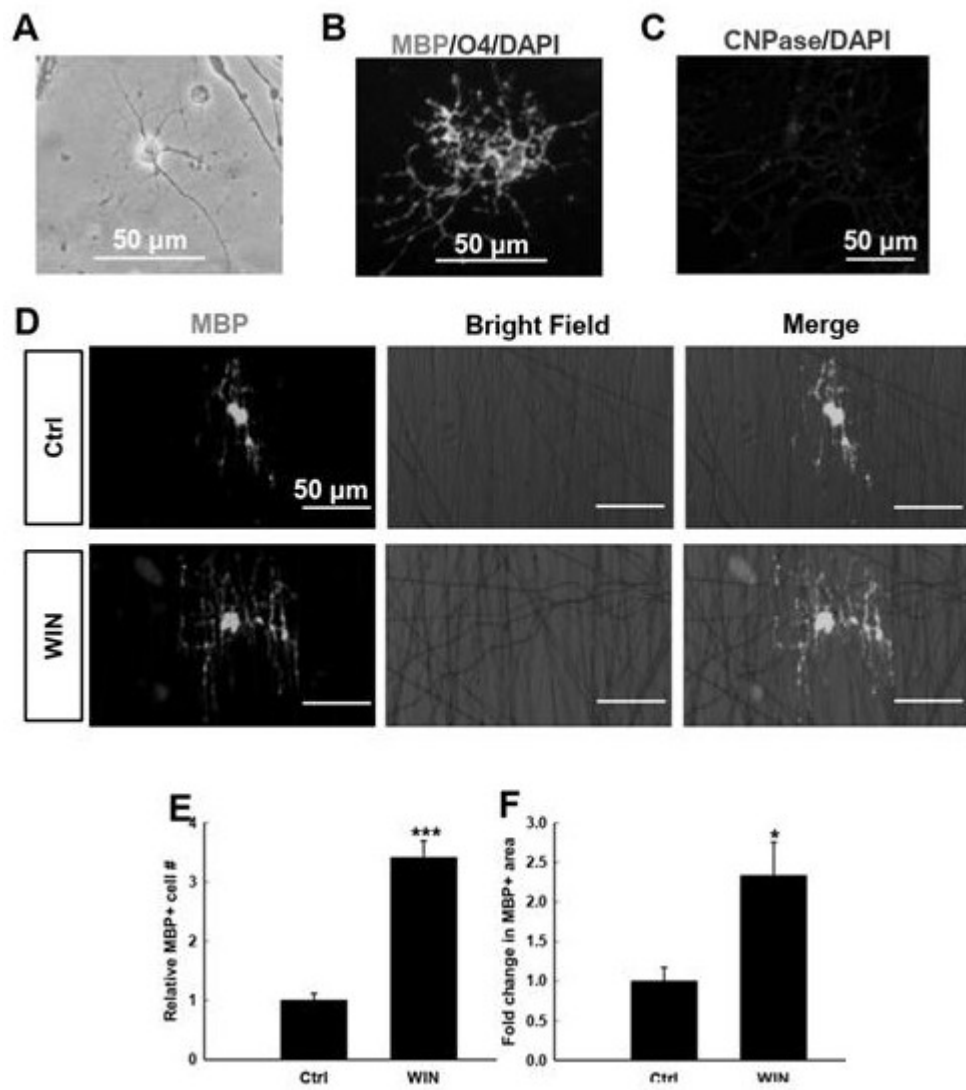


图7

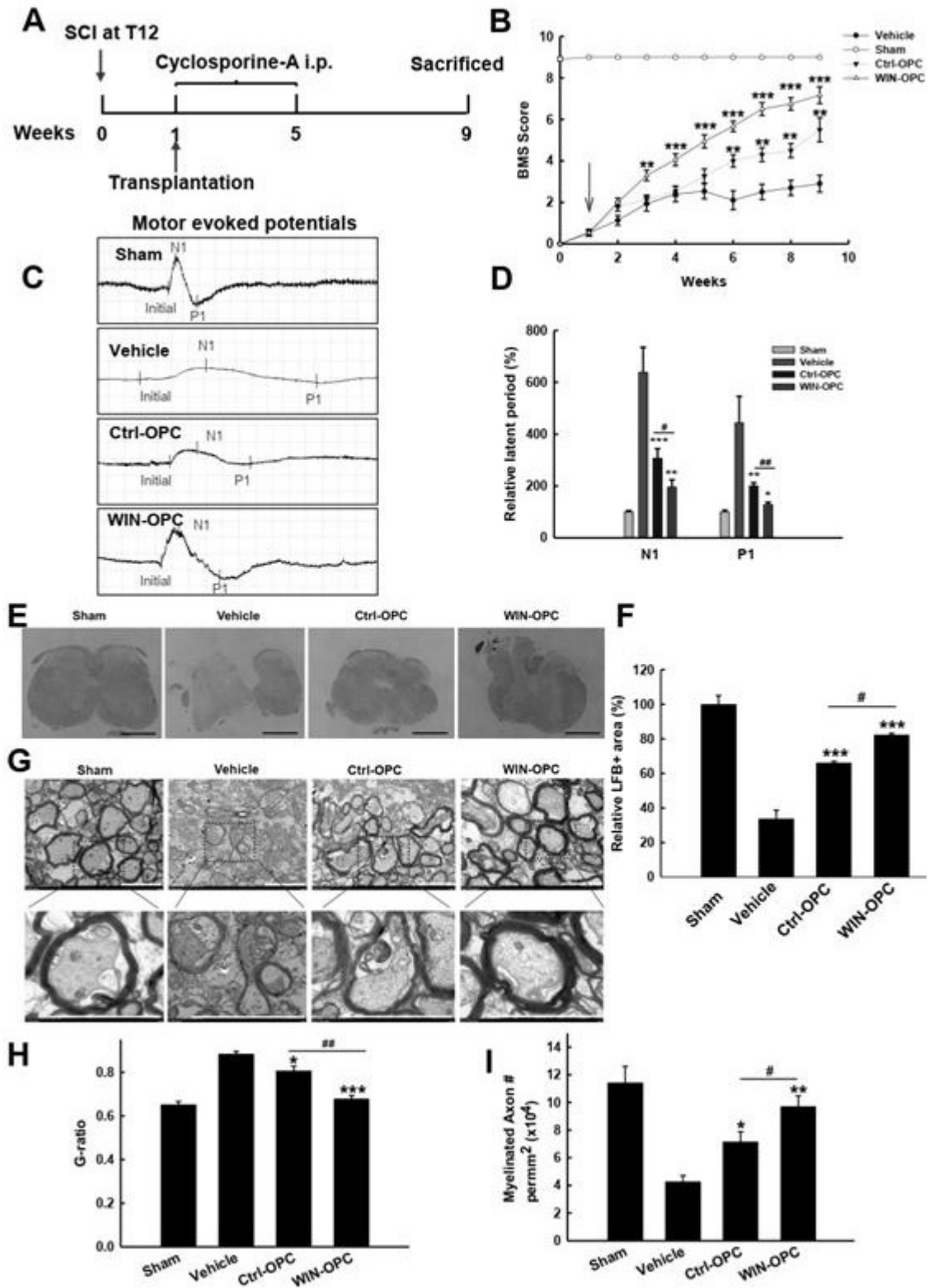


图8

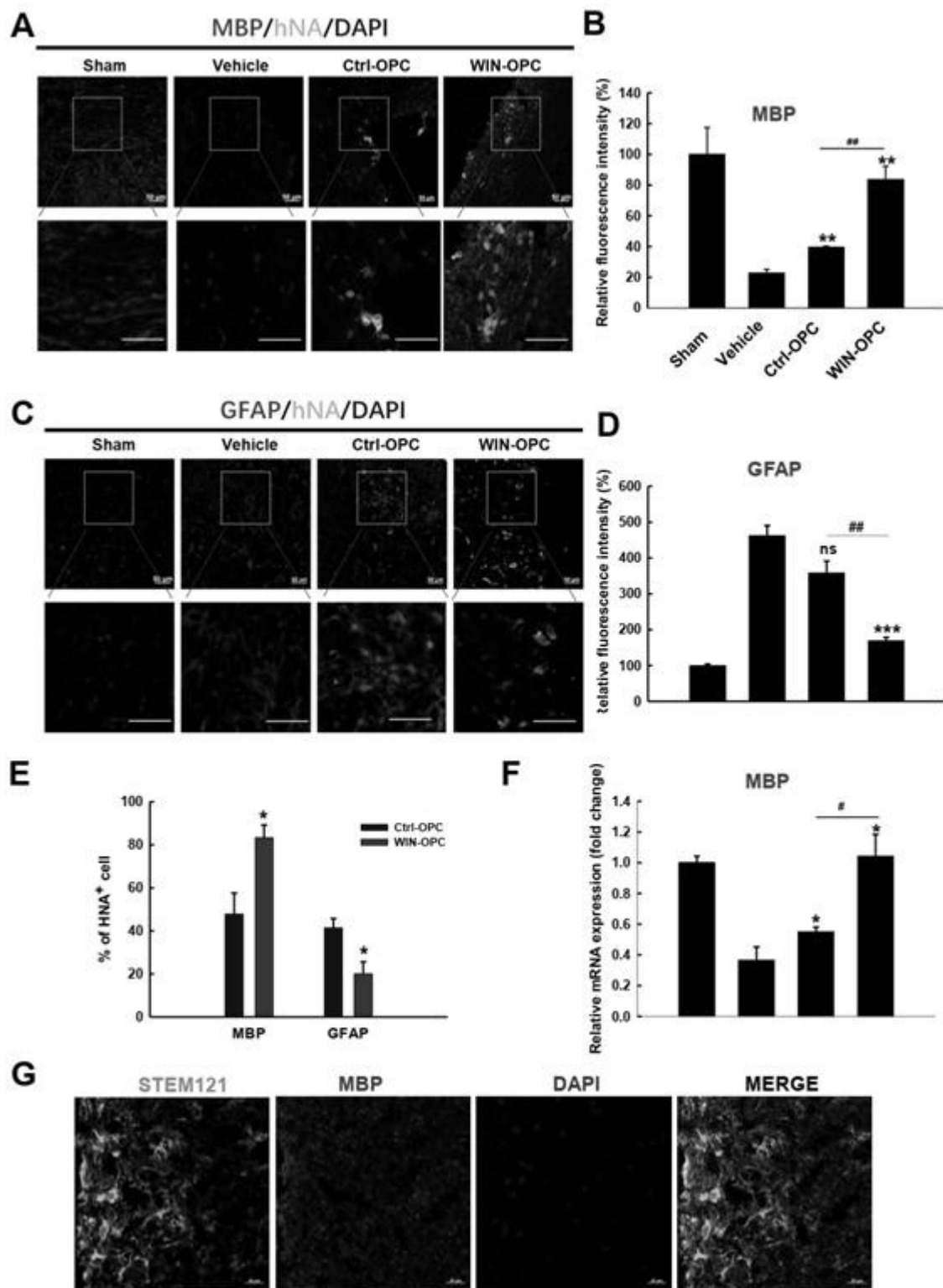


图9