



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 1784971 号



发明专利证书

发明名称：充质干细胞及其提取方法在制备银屑病的药物中的应用

发明人：王宏林；柯芳

专利号：ZL 2012 1 0002647.9

专利申请日：2012 年 01 月 06 日

专利权人：上海交通大学医学院

授权公告日：2015 年 09 月 09 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 01 月 06 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





(21) 申请号 201210002647.9

(22) 申请日 2012.01.06

(73) 专利权人 上海交通大学医学院

地址 200025 上海市卢湾区重庆南路 280 号
5 号楼 1001 室

(72) 发明人 王宏林 柯芳

(74) 专利代理机构 上海大邦律师事务所 31252

代理人 袁洋

(51) Int. Cl.

A61K 35/28(2015.01)

A61P 17/06(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

C12N 5/0775(2010.01)

审查员 郭亦欣

权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

充质干细胞及其提取方法在制备银屑病的药物中的应用

(57) 摘要

本发明的目的在于提供充质干细胞在制备具有治疗银屑病的药物中的应用,这种应用中涉及的皮肤间充质干细胞取得容易、不具免疫排斥性、疗效高、治疗后疾病不易复发而副作用小。

1. 充质干细胞在制备治疗具有免疫调节功能的药物中的应用,其中所述的充质干细胞来源于皮肤真皮层中,其中所述的充质干细胞通过下列方法提取:剪取背部皮肤置于 dispase 酶中,消化过夜后清洗,剥去表皮,将真皮置于胶原酶中消化,消化完成后再添加 DNase I 消化,用 PBS 洗一遍,用滴管吹打成单细胞悬液,过滤后接种于培养皿中,培养后,弃去悬浮细胞,将贴壁细胞继续培养,待长满瓶底大部分后,胰酶消化,常规传代。

2. 充质干细胞在制备治疗银屑病的药物中的应用,其中所述的充质干细胞来源于皮肤真皮层中,所述的充质干细胞通过下列方法提取:剪取背部皮肤置于 dispase 酶中,消化过夜后清洗,剥去表皮,将真皮置于胶原酶中消化,消化完成后再添加 DNase I 消化,用 PBS 洗一遍,用滴管吹打成单细胞悬液,过滤后接种于培养皿中,培养后,弃去悬浮细胞,将贴壁细胞继续培养,待长满瓶底大部分后,胰酶消化,常规传代。

充质干细胞及其提取方法在制备银屑病的药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及充质干细胞在制备免疫调节功能药物中的应用,特别是皮肤间充质干细胞(Skin-derived Mesenchymal Stem Cells)在制备治疗银屑病的药物中的应用。

背景技术

[0002] 银屑病(psoriasis)是一种常见的免疫相关性、复发性的皮肤慢性炎症,其特征是真皮内浓密的以 T 细胞、DC、自然杀伤 T 细胞和巨噬细胞为主的炎性细胞浸润。银屑病患者皮肤的表皮过度增生且无法正常分化,使其表皮显著增厚、结痂增多(Nestle et al., 2009)。银屑病的确切发病原因还不清楚,环境因子(诸如感染、外伤、压力等)和遗传因子等综合因素决定了个体的易感性。银屑病目前尚无根治的药物(Nestle et al., 2009),早期治疗多使用类固醇等非生物性的免疫抑制剂,此类非专一性免疫抑制剂具有相当程度的副作用。近年来,生物制剂如肿瘤坏死因子制剂 Etanercept(依那西普)等也被用于银屑病治疗,此类药物多为人源化抗体,用于阻隔银屑病相关炎症细胞因子与受体间的作用。由于许多炎症细胞因子在机体正常免疫反应中不可缺少,没有选择性地阻挡炎症细胞因子亦会导致用药后的副作用,停药后疾病容易反弹。此外,抗体类药物生产成本高、价格昂贵、普通病人很难能承受。我国从 1984 年以来我国约有超过 400 万患者被诊断为银屑病,自主研究开发我国有知识产权的治疗银屑病的新药物势在必行。

[0003] 充质干细胞(mesenchymal stem cell)是一种未分化、能自我增生、且能分化成多种间充质组织细胞的多能性细胞(Nestle et al., 2009)。早期,间充质干细胞多从骨髓中取得,骨髓间充质干细胞具有抑制免疫应答和诱导外周免疫耐受的特质(Nestle et al., 2009),曾被应用于抑制骨髓移植时所导致的移植体对宿主排斥反应(graft-versus-host disease, GVHD)(Nestle et al., 2009)。除了骨髓以外,间充质干细胞也存在于其他成体组织中。不同于骨髓间充质干细胞,在皮肤真皮层中的间充质干细胞,除了能分化成中胚层(mesodermal)相关组织细胞(如脂肪细胞、平滑肌细胞),还具有分化成神经细胞、造血细胞、肝细胞等多种非中胚层组织细胞的特性,因此在临床上有极大的应用价值(Nestle et al., 2009)。由于大量的皮肤样本较骨髓易于取得,从皮肤样本提取治疗用间充质干细胞实属可行性高、用途广、侵入性小、且具经济效益的选择。然而,皮肤间充质干细胞的免疫调节功能目前尚未被发现,本发明将就此问题进行研究。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种充质干细胞在制备具有免疫调节功能的药物中的应用,以及相关充质干细胞的提取方法:

[0005] 充质干细胞在制备治疗具有免疫调节功能的药物中的应用。

[0006] 充质干细胞在制备治疗银屑病的药物中的应用。

[0007] 所述的充质干细胞在制备治疗具有免疫调节功能的药物中的应用,其中所述的充质干细胞来源于皮肤真皮层中。

[0008] 所述的充质干细胞在制备治疗银屑病的药物中的应用,其中所述的充质干细胞来源于皮肤真皮层中。

[0009] 所述的应用中所述的充质干细胞通过下列方法提取:剪取背部皮肤置于 dispase 酶中,消化过夜后清洗,剥去表皮,将真皮置于胶原酶中消化,消化完成后再添加 DNase I 消化,用 PBS 洗一遍,用滴管吹打成单细胞悬液,过滤后接种于培养皿中,培养后,弃去悬浮细胞,将贴壁细胞继续培养,待长满瓶底大部分后,胰酶消化,常规传代。

[0010] 本发明的有益效果是:充质干细胞在炎症环境中具有选择地抑制致病性效应 T 细胞应答并诱导调节性 T 细胞发生而达到治疗效果。从小鼠皮肤真皮中分离得到真皮间充质干细胞:取新生小鼠,处死后剪取背部皮肤置于 dispase 酶中,消化过夜后清洗,剥去表皮,将真皮置于胶原酶中消化,消化完成后再添加 DNase I 消化,用 PBS 洗一遍,用滴管吹打成单细胞悬液,过滤后接种于培养皿中,培养后,弃去悬浮细胞,将贴壁细胞继续培养,待长满瓶底大部分后,胰酶消化,常规传代,取传至第三代的细胞进行研究。对其进行鉴定,将体外培养的真皮间充质干细胞胰酶消化后接种于不同的分化诱导体系中,培养后经行组织染色,鉴定分化情况。向成骨细胞分化通过茜素红染色;向脂肪细胞分化通过形态学观察和油红染色。观察到从小鼠皮肤真皮中分离的皮肤间充质干细胞具有免疫调节的特性,在体外培养时异体皮肤真皮间充质干细胞(Allogeneic Skin-derived Mesenchymal Stem Cells)和自体皮肤真皮间充质干细胞(Autologous Skin-derived Mesenchymal Stem Cells)均能有效抑制效应 T 细胞免疫应答。在测试皮肤间充质干细胞对银屑病的治疗效果实验中发现,异体和自体皮肤间充质干细胞尾静脉注入患有“银屑病”的小鼠体内 21 天后,显著地改善小鼠的“银屑病”症状。本发明公开的皮肤间充质干细胞容易取得、不具有免疫排斥性、能够特异抑制致病性效应 T 细胞应答、疗效高、副作用小。

附图说明

[0011] 图 1:小鼠真皮间充质干细胞的分离鉴定:

[0012] A. 体外培养的真皮间充质干细胞;

[0013] B. 真皮间充质干细胞的成骨诱导分化;

[0014] C. 真皮间充质干细胞的成脂诱导分化。

[0015] 图 2:小鼠的异体皮肤间充质干细胞和自体皮肤间充质干细胞抑制效应 T 细胞免疫应答:

[0016] A. 自体骨髓间充质干细胞与 T 细共培养 3 天,有 11.5% T 细胞分裂增殖;

[0017] B. 体皮肤间充质干细胞与 T 细共培养 3 天,有 12.8% T 细胞分裂增殖;

[0018] C. 自体皮肤间充质干细胞与 T 细共培养 3 天,有 19.6% T 细胞分裂增殖;

[0019] D. T 细胞单独培养有 85.0% 的分裂增殖;

[0020] E. 没有用 anti-CD3 和 anti-CD28 抗体刺激的 T 细胞几乎没有分裂增殖。这个预备实验说明了和骨髓间充质干细胞一样异体皮肤间充质干细胞和自体皮肤间充质干细胞均可以在体外抑制抗体刺激下的 T 细胞分裂增殖。

[0021] 图 3:通过 PASI 指数,小鼠异体皮肤间充质干细胞和自体皮肤间充质干细胞对小鼠的“银屑病”的治疗效果明显:

[0022] A. 异体皮肤间充质干细胞治疗前后;

[0023] B. 自体皮肤间充质干细胞治疗前后；

[0024] C. 6 只患病小鼠自体皮肤间充质干细胞治疗前后；

[0025] D. 6 只患病自体皮肤间充质干细胞治疗前后。

[0026] PASI：“银屑病”小鼠“病情”评分指数。PASI(Psoriasis Area and Severity Index)即银屑病面积和严重程度指数是目前国际上通用的评定银屑病严重程度的方法。银屑病斑块的厚度、红斑、鳞屑 3 项指标均按 0-4 共 5 级计分(0=无,1=轻度,2=中度,3=重度,4=极重度),严重程度分是这三项指标得分之和。皮损面积按 1-6 共 6 级计分,皮损面积<10%为 1 分,>10%为 2 分,>30%为 3 分,>50%为 4 分,>70%为 5 分,>90%为 6 分。最后按公式来计算 PASI 总分,PASI 总分=0.1X(头部面积分 X 头部严重程度分)+0.2X(上肢面积分 X 上肢严重程度分)+0.3X(躯干面积分 X 躯干严重程度分)+0.4X(下肢面积分 X 下肢严重程度分)。

具体实施方式

[0027] 1. 小鼠真皮间充质干细胞的分离：

[0028] 取出生 3 天左右的新生小鼠，引颈处死，酒精消毒，剪取背部皮肤置于 0.25% 的 dispase 酶中，4℃消化过夜，PBS 液清洗 3 次，剥去表皮，将真皮置于 0.2% 的胶原酶中消化一个小时，消化完成后再添加 DNase I 消化 10 到 15 分钟，用 PBS 洗一遍，用滴管吹打成单细胞悬液，过滤除去大块组织和碎片，接种于培养皿中，培养条件为 DMEM (low glucose)+10% 胎牛血清，37℃，5%CO₂。培养 6 小时后，轻轻弃去悬浮细胞，将贴壁细胞继续培养，待长满瓶底大部分后，胰酶消化，常规传代。取传至第三代的细胞进行研究。

[0029] 2. 小鼠真皮间充质干细胞的鉴定：

[0030] 将体外培养的真皮间充质干细胞胰酶消化后接种于不同的分化诱导体系中，培养 3 周 后经行组织染色，鉴定分化情况。向成骨细胞分化通过茜素红染色；向脂肪细胞分化通过形态学观察和油红染色。

[0031] 3. 小鼠的皮肤间充质干细胞抑制效应 T 细胞免疫应答：

[0032] 用细胞标记物 CFSE 来标记免疫磁珠分离的小鼠 CD4+CD25⁻ T 细胞，与皮肤间充质干细胞共培养(皮肤间充质干细胞:T 细胞为 1:4);在共培养中用 anti-CD3 和 anti-CD28 抗体刺激 T 细胞 3 天。CFSE 标记过的细胞的分裂增殖情况可以被流式细胞仪检测，这个预备实验说明了和骨髓间充质干细胞一样自体皮肤间充质干细胞和自体皮肤间充质干细胞均可以在体外抑制抗体刺激下的 T 细胞分裂增殖。

[0033] 4. 小鼠皮肤间充质干细胞对小鼠的“银屑病”的治疗：

[0034] 运用第 1 步方法分离从小鼠皮肤真皮中分离间充质干细胞，培养至 P3 代。每只患病小鼠尾静脉注射 1×10⁶ 个皮肤间充质干细胞，观察 21 天后评分，可以从图 3 看出小鼠自体皮肤间充质干细胞和自体皮肤间充质干细胞对小鼠的“银屑病”的治疗效果明显。

[0035] 5. 皮肤间充质干细胞对银屑病患者的治疗：

[0036] 从人的皮肤中分离出皮肤间充质干细胞，无菌环境下培养至 P3 代。每位患者静脉注射 50×10⁶ 个皮肤间充质干细胞进行治疗。

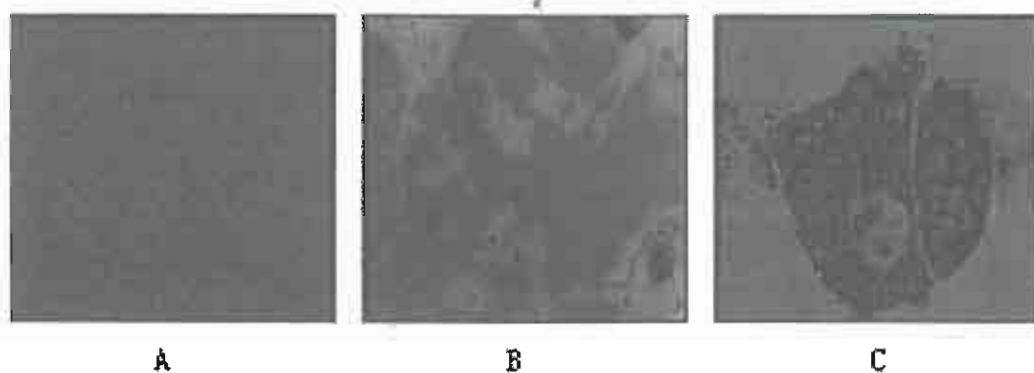


图 1

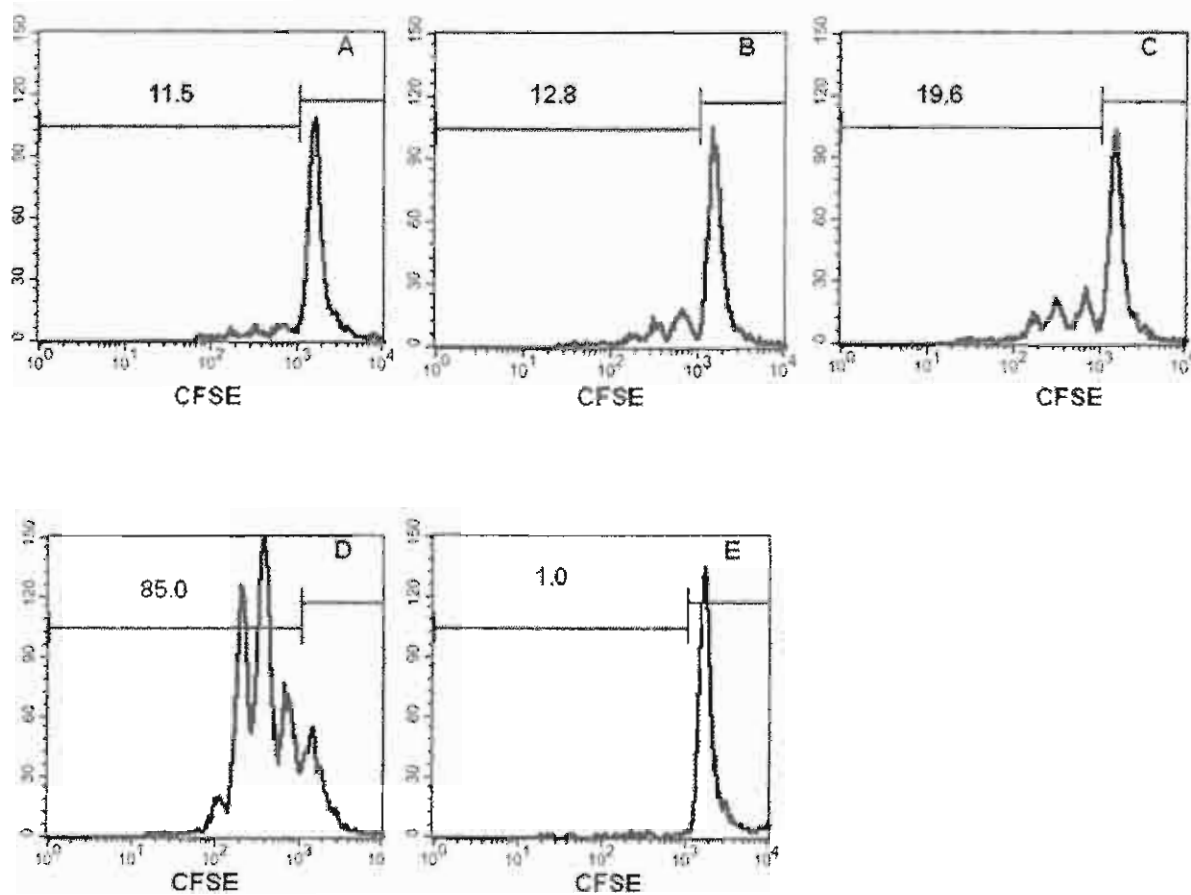


图 2

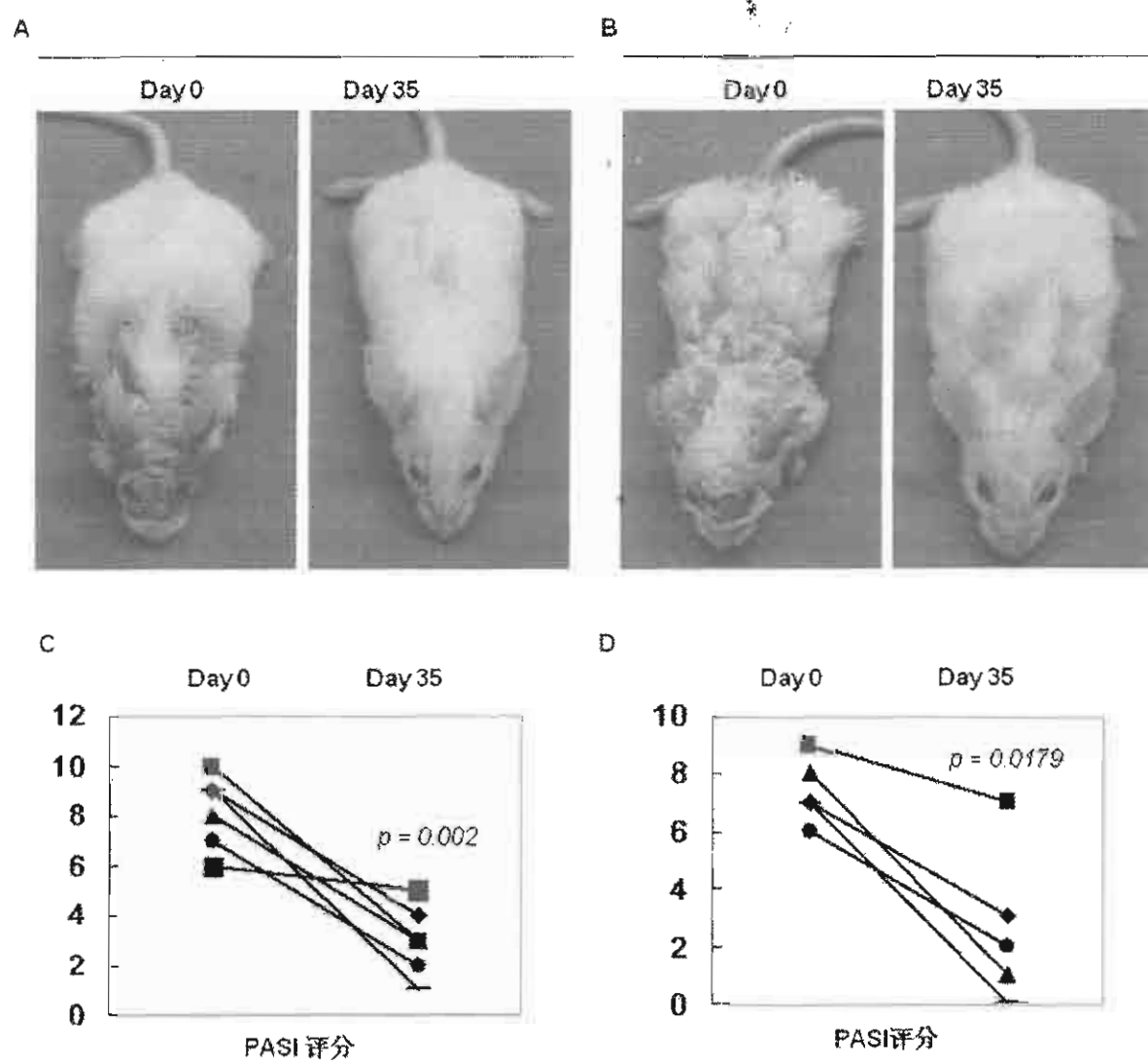


图 3