



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101275121 B

(45) 授权公告日 2011.05.11

(21) 申请号 200710048724.3

(22) 申请日 2007.03.26

(73) 专利权人 芦银雪

地址 050000 河北省石家庄市桥东区长征街
圆明路 28 号银宏小区 13 栋 2 单元 301
号

(72) 发明人 芦银雪

(51) Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)

(56) 对比文件

US 5912177 A, 1999.06.15, 全文.

CN 1461341 A, 2003.12.10, 说明书第 7 页 25
行 - 第 9 页第 25 行, 实施例 6.1、6.7.

US 5789246 A, 1998.08.04, 全文.

CN 1351656 A, 2002.05.29, 全文.

CN 1609200 A, 2005.04.27, 全文.

Cornelia S et al. Evaluation of the
“Cellscreen” system for proliferation
studies on liver progenitor cells.
European Journal of Cell Biology 85
12. 2006, 1265-1274.

审查员 邢维玲

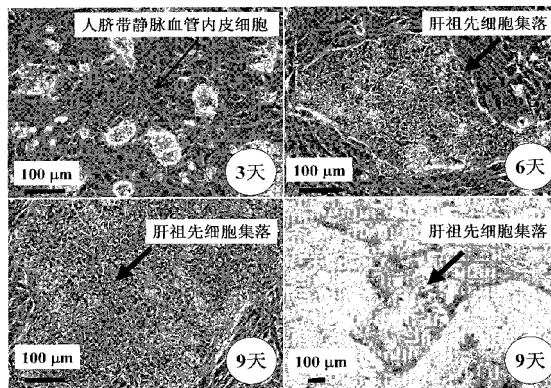
权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 7 页

(54) 发明名称

体外培养扩增的人肝脏祖先细胞及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种体外扩增传代的人肝祖先细胞 (human hepatic progenitor cell) 的制备方法, 该方法包括 : a、分离人肝祖先细胞 ; b、在含有人纤维蛋白胶或其类似物的胞外基质上, 用无血清的培养基共培养饲养细胞和步骤 a 分离到的人肝祖先细胞, 扩增得到人肝祖先细胞集落。该人肝祖先细胞集落, 经胶原酶简单的处理, 易于脱离人纤维蛋白胶的表面, 经更进一步的酶降解等单细胞制备技术处理, 人肝祖先细胞可被分离纯化或 / 和传代培养。本发明制备的人肝祖先细胞为肝细胞治疗, 包括肝细胞移植和生物人工肝支持系统, 药物筛选中的细胞毒性试验平台, 肝炎病毒感染及药物筛选平台等提供良好的人肝细胞来源。



1. 一种体外培养扩增传代的人肝祖先细胞的制备方法,该方法包括:a、分离人肝祖先细胞;b、在含有人纤维蛋白胶的胞外基质上,用无血清的培养基共培养饲养细胞和步骤 a 分离到的人肝祖先细胞,扩增得到人肝祖先细胞集落;

所述的人肝祖先细胞,包括人肝祖先细胞、肝母细胞或卵圆细胞;

步骤 b 中所述的饲养细胞为人内皮细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其还包括:步骤 c、利用单细胞制备方法,将步骤 b 得到的人肝祖先细胞集落制备成单细胞悬液,进一步分离纯化人肝祖先细胞。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,步骤 c 所述的单细胞制备方法包括:

(a) 将步骤 b 得到的人肝祖先细胞集落用胶原酶 collagenase 或高度纯化的胶原酶 liberase blendzyme 3,或者其中之一与透明质酸酶或其他的中性蛋白酶的混合,酶解不超过 4 分钟,收集培养物;

(b) 将步骤 (a) 的培养物,用胰蛋白酶或 Accutase 消化,在不超过室温条件下,消化时间不超过 5 分钟,收集细胞培养物;

(c) 将步骤 (b) 的细胞培养物悬浮于含分散酶的缓冲液中,再加入脱氧核糖核酸酶 I,至白色絮状物消失和细胞释放,过滤、沉淀、收集沉淀细胞、加入缓冲液,得到单细胞悬液。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,所述的人肝祖先细胞,来源于人肝组织或人胰脏、骨髓,或人脐带血、人脂肪组织。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,所述的人纤维蛋白胶是通过凝血酶作用于人纤维蛋白原或经聚乙二醇化修饰的人纤维蛋白原而制备的降解物。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,所述培养基是无血清的合成培养基,其含有碳水化合物代谢调解剂、转铁蛋白组合物、高浓度的核苷组合物、肝素钠、抗氧化物、人表皮细胞生长因子 EGF、人碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 和人血管内皮生长因子 VEGF。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,人内皮细胞是人脐带静脉血管内皮细胞或 / 和人肝窦内皮细胞,或 / 和其他的内皮细胞。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,所述扩增的人肝祖先细胞可传代培养至少 10 代。

体外培养扩增的人肝脏祖先细胞及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种体外扩增及制备人肝祖先细胞的方法。该培养方法及该培养方法制备的人肝祖先细胞可用于肝细胞治疗,包括肝细胞移植、和体外人工肝支持系统,药物筛选中的细胞毒性试验平台,肝炎病毒感染及药物筛选平台等。

背景技术

[0002] 原位肝移植手术是目前挽救终末期肝病病人生命的最有效的疗法。但其费用高、技术复杂、尤其是供体肝源严重短缺,很多病人在等待供肝时死亡。并且患者全肝移植后,要终生服用昂贵的抗免疫排斥药物,因此严重地影响病人的生活品质。肝细胞移植 (hepatocytet ransplantation) 作为原位肝移植的潜在替代疗法,是指将肝细胞通过脾动脉或肝门静脉等分别经灌注或注射导入肝或脾脏中,以恢复部份或全部的肝脏功能⁽¹⁾。另一种基于肝细胞治疗的方法是生物人工肝支持系统 (bioartificialliver)。在该系统中,患者的血浆通过含肝细胞的生物反应器而循环。由于在该反应器中的肝细胞具有生物合成、生物转化和解毒等功能,所以能辅助治疗肝功能不全、急慢性肝衰竭及其相关疾病⁽²⁾。尽管肝细胞移植和生物人工肝支持系统等肝细胞治疗方法先后在先天性肝脏代谢缺陷病、急慢性肝衰竭等的动物实验和临床研究阶段取得令人鼓舞的疗效,并且该疗法可克服肝移植费用昂贵、技术复杂、供体肝严重短缺、手术死亡率相对较高等困难,但由于肝细胞来源的严重短缺,因此限制了它的临床应用⁽¹⁻⁵⁾。通常肝细胞治疗方法需要大量的肝细胞(每个病人需至少 1 到 10 亿个细胞)来达到一定的疗效,而成人肝实质细胞来源非常有限、肝细胞功能不足、体外成活时间短而难于培养、更不用说代传和扩增,因此寻找合适的、可靠的和丰富的肝细胞来源是肝细胞治疗成功的前提条件。

[0003] 肝脏是人体中生物代谢分解、合成、解毒、和储存的中心,甚至是免疫器官,也是唯一能再生的器官。当成人肝脏受到轻微的损伤或部分肝(高达 70%)手术切除,肝脏能通过肝实质细胞的复制而修复受损伤的肝脏,直至恢复到正常的水平。此时的肝干/祖先细胞处于未受损伤和静止的状态。可是当病毒、化学毒物等引起大量肝细胞死亡,导致肝实质细胞的复制能力丧失,这时肝干/祖先细胞被激活,而且分化为肝实质细胞以修复部分肝功能。可是,当肝受到持续而严重的损伤时,肝干/祖先细胞的复制能力也将丧失,最终导致病程难以逆转⁽⁶⁾。

[0004] 由于肝干/祖先细胞具有超强的增殖与双向或多向分化潜能、强的抗缺血损伤能力、低免疫原性和非肿瘤源性,因此被认为是最安全有效和最具前景的肝细胞来源⁽⁷⁾。但是,现在人们对肝干/祖先细胞的认知还不够完整。例如,在肝脏中有多少种肝干/祖先细胞?非肝源性的干细胞在体内能否分化为肝干细胞吗?这些肝干/祖先细胞在肝中存在的部位及表面标记谱系有什么异同?这些肝干/祖先细胞怎样协同地参与肝再生和发育及分化?这些仍是研究的热点和争论的焦点⁽⁶⁾。1956年Farber等⁽⁸⁾首先在啮齿类动物肝损伤模型中发现一种胞浆少,核呈卵圆形,具有双向分化潜能的小细胞,并将这种细胞命名为卵圆细胞(oval cell)。通常情况下,卵圆细胞处于静止状态,数量极少,它主要分

布于闰管、门管和胆管树状分支区,只是肝在受到严重的损伤时,它才在门静脉周围大量增殖,并参与肝再生与肝损伤修复。由于卵圆细胞和造血干细胞有某些共同的细胞表面标记物(如Thy-1、CD34、SCF、c-kit),这暗示二者密切相关,并可能共同来源于骨髓。Taniguchi等⁽⁹⁾将造血干细胞移植到急性肝衰竭小鼠体内后,发现这些造血干细胞不仅在小鼠体内形成嵌合肝,而且重建了受体小鼠的骨髓造血功能,并可诱导移植后小鼠的免疫耐受,这表明功能性的造血干细胞能在肝脏中生存。Lagasse等⁽¹⁰⁾更进一步将正常小鼠的全骨髓细胞或纯化的造血干细胞KTLS(c-kit^{high}Thy^{low}lin⁻sca-1⁺)亚群移植给延胡索酰乙酰乙酸水解酶(Fumarylacetoacetate hydrolase, FAH)剔除的小鼠中,显示能显著改善其肝功能,提高存活率。在这些移植了造血干细胞的FAH剔除小鼠肝中,观察到造血干细胞竟能分化为肝实质细胞。后来的实验解释了这种现象,实际上是在特定的FAH剔除小鼠肝损伤模型中,造血干细胞和肝实质细胞的融合而不是造血干细胞的分化⁽¹¹⁾。这一实验引发人们更多的疑问:细胞融合是一种正常的肝再生机制吗?为什么细胞融合会在肝中发生?肝中细胞融合会引起癌变吗⁽¹²⁾?

[0005] de Boer等⁽¹³⁾利用上皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EpCAM)抗体进行免疫组织化学观察正常肝、再生肝、胚胎肝脏及肝肿瘤组织,发现EpCAM的表达总是和细胞的生长相关。在胚胎肝脏组织中,EpCAM阳性(EpCAM⁺)的细胞不但在肝母细胞区,而且存在于肝母细胞与门静脉间充质结合的胆管细胞区,但在造血组织(微血管周围)中呈阴性;在成人肝脏组织中,肝实质细胞和大的肝胆管细胞不表达EpCAM。可是,小的肝胆管细胞及间充质表达强阳性的EpCAM。在肝损伤及再生时,也发现了大量EpCAM⁺的细胞。因此,这些生长的EpCAM⁺的肝细胞被认为是肝干细胞及祖先细胞。随着这些肝干细胞渐渐分化为成熟的肝细胞,EpCAM的表达也就完全消失⁽¹³⁻¹⁵⁾。另外,在肝母细胞瘤和胆管癌中也有发现大量EpCAM⁺的细胞⁽¹³⁾。

[0006] 最近的几篇报道更进一步地证实,EpCAM是一个可靠的肝干细胞及祖先细胞标记物,而且利用EpCAM标记物分离纯化了肝脏干细胞和肝祖先细胞。例如,Schmelzer等⁽¹⁶⁾从妊娠约16~20周的人胎肝和成人肝中,用荧光激活细胞分选法(fluorescence activated cell sorting, FACS),分离纯化了两种细胞,一种是EpCAM⁺、神经细胞黏附分子(neral cell adhesion molecule)阳性(NCAM⁺)、人细胞角蛋白19(cytokeratin 19)阳性(CK19⁺)、白蛋白(albumin)阴性或弱阳性,但甲胎蛋白(Alpha-fetoprotein, AFP)阴性的肝干细胞(liver stem cell);另一种是EpCAM⁺、NCAM^{-/low}、CK19^{+/low},但甲胎蛋白和白蛋白阳性的肝母细胞(hepatoblast)。这两种细胞的比例随着人肝生长发育的阶段而变化。在胎儿肝中,约有12% EpCAM⁺的细胞,其中约10% EpCAM⁺的细胞是肝母细胞,少于0.7%的细胞是肝干细胞。相反地,在成人及新生儿肝中,有约2% EpCAM⁺的细胞,其中约0.5% EpCAM⁺的细胞是肝干细胞,肝母细胞的比例少于0.1%。Dan等⁽¹⁷⁾经长期严格的培养,从妊娠约10~15周的人胎肝中也分离纯化了一种多潜能的干细胞(multipotent progenitor cell)。这种干细胞表达EpCAM⁺、CD45⁻、CD34⁺、CD90⁺、c-kit⁺、c-met⁺、SSEA-4⁺、CK18⁺、CK19⁺、CD44⁺(透明质酸寡聚糖受体, hyaluronan receptors),但甲胎蛋白和白蛋白阴性。该多潜能干细胞不仅能分化为肝实质细胞和胆管细胞,而且在特定的分化条件下可分化为脂肪、骨、软骨等组织细胞和内皮细胞。因此该多潜能的肝干细胞被认为是间充质-上皮移行细胞(epithelial-mesenchymal transitions)。Herrera等⁽¹⁸⁾经长期严格的培养,从成人肝中富集分离了一种

甲胎蛋白和白蛋白阳性, CK-19 阴性 (CK19⁻) 的不同于卵圆细胞的多潜能肝干细胞 (human liver stem cell, HLSC)。HLSC 表达间充质干细胞表面标记物 CD29、CD73、CD44 和 CD90, 但不表达血液干细胞标记物 CD34、CD45、CD117 和 CD133。HLSC 也表达波形蛋白 (vimentin) 和巢蛋白 (nestin)。HLSC 在体外不仅能分化为成熟的肝实质细胞, 而且能在适当的培养基中分化为骨、内皮细胞以及产胰岛素的胰岛样的结构。但这种多潜能的肝干细胞在成人肝中所占的比例极低。Turner 等⁽¹⁹⁾ 及 Kon 等⁽²⁰⁾ 更进一步证实 CD44 像 EpCAM 一样也在人肝干细胞及肝母细胞中表达。上述的几种肝干 / 祖先细胞都能在动物肝损伤模型中修复肝损伤。由于上述这些干细胞的表面标记和特性并不完全相同, 这暗示肝内的干细胞是一个非常异质的动态演化的种群。当前文献中描述的肝干细胞或许只代表肝脏中某一特殊发育分化阶段的干细胞。随着这些从人胎儿及成人肝脏的肝干 / 祖先细胞的进一步分离, 纯化及其表面标记谱系的鉴定及分化的诱导, 将为肝干 / 祖先细胞的细胞治疗提供了坚实的基础。另外, 由于干细胞的可塑性, 有文献报道, 非肝源性组织器官的干细胞, 例如骨髓或血液干细胞^(10,21)、人脐带血干细胞⁽²²⁾、人脂肪组织⁽²³⁾ 以及胰腺上皮细胞⁽²⁴⁾, 在特定的分化培养基中也可分化为成熟样的肝实质细胞。

[0007] 一般地, 干细胞在体内或体外有五种可能的命运: (1) 干细胞处于不分裂的潜伏状态 (quiescence); (2) 干细胞经对称分裂 (symmetric division) 或自我更新 (self-renewal) 而扩增 (expansion); (3) 干细胞经不对称分裂 (asymmetric division) 而维持相对稳定比例的干细胞和分化的细胞 (maintenance); (4) 干细胞经分化为成熟的细胞而耗尽 (depletion or differentiation); (5) 干细胞经细胞凋亡而消失 (apoptosis)。实际上干细胞所处的微环境决定了它的命运, 特别是在肝中, 肝干 / 祖先细胞处在一个有肝干 / 祖先细胞与间质细胞及肝实质细胞、肝干 / 祖先细胞与胞外基质、肝干 / 祖先细胞与各种体液因子之间极其复杂的相互作用的三维空间中^(6,25), 这些协同的相互作用所产生的信号构成了一个整合的网状的信号微环境。这些间质细胞包括肝星状细胞 (human stellate cell, HSTC)、肝胆管细胞 (human biliary duct cell, HBDC)、肝脏成纤维样细胞 (liver fibroblast-like cells)、肝内皮细胞 (human liver endothelial cell); 胞外基质包括胶原蛋白 (collagen), 如 I, III 或 IV、或非胶原糖蛋白 (noncollagenous glycoproteins), 如层粘连蛋白 (laminin), 纤维粘连蛋白 (fibronectin)、或蛋白多糖 (proteoglycan), 如透明质酸 (hyaluronic acid)、硫酸乙酰肝素糖蛋白 (heparan sulfate proteoglycans, HSPG) 等。体液因子包括肿瘤坏死因子 (TNF α)、人白细胞介素 3 (IL-3)、人白细胞介素 6 (IL-6)、肝生长因子 (HGF); 和甚至交感神经也被认为调控肝干 / 祖先细胞的生长⁽²⁶⁾。虽然文献报道肝非实质细胞, 包括内皮细胞, 能增强成熟肝实质细胞的功能, 但是在这些肝间质细胞中, 肝内皮细胞对肝再生和发育起着更重要的作用⁽²⁷⁻³²⁾。当成人肝脏实质细胞在体外培养时, 常常很快失去肝脏实质细胞的功能, 去分化甚至死亡。但是, 当它同成人肝窦内皮细胞 (liversinusoidal endothelial cell) 共培养时, 成人肝脏实质细胞变得对丙型肝炎病毒易感, 并维持其它成人肝脏实质细胞的功能⁽³³⁾。但现在, 还未见内皮细胞能选择性增强肝干 / 祖先细胞的功能和生长的文献报道。

[0008] 常规的干细胞传代培养方法是经机械的剪切 - 连贴或 / 和长时间的胶原酶降解而转移干细胞集落。机械的剪切 - 连贴法常常导致极低的传代效率, 长时间的胶原酶降解能损伤干细胞而导致大量的干细胞不能形成干细胞集落, 并且在操作过程中, 这些干细胞集

落不可避免地被其它的非干细胞污染。如果这些干细胞集落直接用于临床肝细胞移植中,会引起血管栓塞;如果直接用于冷冻保存会引起大量的肝干细胞死亡。因此,体外培养的干细胞集落必须经降解,重新分离纯化为单个人肝干细胞才能应用在临床肝细胞移植中和有效地冷冻保存及传代。

[0009] 冷冻保存是保存及运输骨髓和各种细胞系的标准方法。成人肝细胞较脆弱,普通冷冻保存方法可对肝细胞造成相当大的损伤。现有保存肝细胞的方法非常繁琐,需要昂贵的程控低温冰箱。如果经培养后肝祖先细胞能按标准冷冻保存方法保存和复苏,将为肝祖先细胞的研究和临床应用提供极大的方便。

[0010] 如果用于细胞治疗的细胞污染有动物血清、蛋白及细胞时,常在临床应用中引起急性免疫排斥反应及潜在的动物病毒感染。尽量减少这些污染而造成在临床上的急性免疫排斥反应,是体外扩增及制备肝祖先细胞时应充分考虑这些因子。

[0011] 在现行的生物人工肝支持系统中,普遍采用永久肝实质细胞株或肝肿瘤细胞株或异种动物的肝实质细胞等,这是因为成人肝实质细胞难于体外培养和长期维持其功能⁽²⁾。但这些细胞株或异种动物的肝实质细胞的生理代谢及功能同原代的成人肝实质细胞相比有很大的不同,并有潜在的致肿瘤性或可能带有人畜共患病的病毒。在生物人工肝支持系统这一概念提出二十多年后,生物人工肝支持系统仅在美国的 FDA 二期临床研究阶段。有限的细胞来源和缺乏成人肝实质细胞体外培养和长期维持其功能的方法是限制生物人工肝支持系统发展的瓶颈因素。

[0012] 由于人肝干/祖先细胞比成人肝实质细胞有无法比拟的优势,它有可能成为肝细胞治疗的合适的、可靠的和丰富的肝细胞来源。但人肝干/祖先细胞的数量非常有限,只有经体外大量培养,才能解决临床上肝细胞严重不足的矛盾。然而,现行的肝干/祖先细胞培养方法并没有充分考虑到肝干/祖先细胞生长的微环境和临床应用的要求,使得纯化的肝干/祖先细胞系难以在无动物细胞、病毒、血清、及蛋白等污染的条件下独立培养及传代,难以制备成临床所需的单细胞,因此离肝细胞临床应用还很遥远。例如,人肝干/祖先细胞培养在人胶原蛋白、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白等胞外基质,或聚乳酸羟乙酸 (PLGA)、多肽聚合物等人工合成的基质上,人肝干/祖先细胞易失去自我更新能力,并很快分化为肝实质细胞或/和胆管细胞而停止生长。例如,人肝干/祖先细胞培养在生长被抑制的鼠胚胎纤维母细胞滋养层上,能显著地提高人肝干/祖先细胞的自我更新和克隆生长能力⁽³⁴⁾。但动物(鼠)来源的蛋白及潜在的动物细胞及病毒污染严重地影响它的临床应用。例如,人肝干/祖先细胞培养在源于鼠肿瘤组织的 Matrigel[®]上,仍不能克服上述动物蛋白甚至肿瘤因子的污染。例如,共培养人肝干细胞和未纯化人胎肝非肝实质细胞,虽然克服了上述动物蛋白及细胞污染的因素,但似乎是将纯化人肝干/祖先细胞回复到未纯化的状态,并且人肝干/祖先细胞的自我更新和克隆生长能力仅有有限的提高。另一缺点是不同批次的未纯化人胎肝非肝实质细胞的技术指标很难质控。

[0013] 尽管在公开号为 CN1742082A 的专利中提到了人肝干/祖先细胞的分离、传代,然而,其“从塑胶传代到 STO 饲养层以后的集落形成效率很低,……可能由于需要将细胞置于漫长的胶原酶消化以获得单细胞悬液的缘故”(见说明书第 51 页),获得适于临床应用的、大量纯化的,多次独立传代的人肝干/祖先细胞依然难如人意。

[0014] 如何得到在体外能大量扩增,可独立传代的纯化的人肝干/祖先细胞始终是一个

难题。

发明内容

[0015] 为了克服现有技术的缺陷,本发明提供一种体外扩增传代的人肝祖先细胞 (human hepatic progenitor cell) 的制备方法,该方法包括:a、分离人肝祖先细胞;b、在含有人纤维蛋白胶或其类似物的胞外基质上,用无血清的培养基共培养饲养细胞和步骤 a 分离到的人肝祖先细胞,扩增得到人肝祖先细胞集落。

[0016] 优选的,所述的方法还包括:步骤 c、利用单细胞制备技术,将步骤 b 得到的人肝祖先细胞集落制备成单细胞悬液,进一步分离纯化人肝祖先细胞。

[0017] 具体地,步骤 c 所述的单细胞制备技术包括:

[0018] (a) 将步骤 b 得到的人肝祖先细胞集落用胶原酶 (collagenase) 或高度纯化的胶原酶 liberase blendzyme3,或者其中之一与透明质酸酶 (hyaluronidase) 或其他的中性蛋白酶 (如链霉菌蛋白酶, pronase) 的混合,酶解不超过 4 分钟,收集培养物;

[0019] (b) 将步骤 (a) 的培养物,用胰蛋白酶 (trypsin) 或 Accutase 消化,在不超过室温条件下,消化时间不超过 5 分钟,收集细胞培养物;

[0020] (c) 将步骤 (b) 的细胞培养物悬浮于含分散酶 (dispase) 缓冲液中,再加入脱氧核糖核酸酶 I (DNase I),至白色絮状物消失和细胞释放,过滤、沉淀,收集沉淀细胞,加入缓冲液,得到单细胞悬液。从该单个细胞悬液中经免疫选择法分离纯化人肝祖先细胞,该分离纯化人肝祖先细胞可在液氮中冷冻保存。

[0021] 上述方法中,所述的人肝祖先细胞,包括人肝祖先细胞 (human liverprogenitor cell)、肝母细胞 (hepatoblast)、卵圆细胞 (oval cell)。

[0022] 这些人肝祖先细胞可从人肝干细胞 (Hepatic stem cell) 分化得到,也可从非肝源性的胰脏、骨髓等器官,或人脐带血、人脂肪组织、分化的人胚胎干细胞经免疫选择法或特别严格的培养法而富集得到。

[0023] 上述方法中,所述的胞外基质为人纤维蛋白胶或经聚乙二醇化修饰的人纤维蛋白胶或它们与其他胞外基质的组合物,其他胞外基质可为:胶原蛋白,如 III 或 IV,或非胶原糖蛋白,如层粘连蛋白、纤维粘连蛋白,或蛋白多糖,如透明质酸、硫酸乙酰肝素糖蛋白或它们的混合物、或富含胞外基质的组织抽提物。

[0024] 所述的人纤维蛋白胶 (fibrin) 或其类似物,例如,聚乙二醇化修饰的人纤维蛋白胶 (fibrin-PEG) 是通过凝血酶 (thrombin) 作用于人纤维蛋白原 (fibrinogen) 或经聚乙二醇化 (PEGylation) 修饰的人纤维蛋白原 (fibrinogen-PEG) 而制备的降解物。

[0025] 简单地,凝血酶降解人纤维蛋白原或经聚乙二醇化修饰的人纤维蛋白原为人纤维蛋白单体 (fibrin monomer),血浆纤维蛋白肽 (fibrinopeptide) A 和 B。多个人纤维蛋白胶单体自集合为人纤维蛋白多体 (fibrin multimer) 而成的一种无色或白色的无定形纤维状的弹性胶状降解物 - 即为人纤维蛋白胶。

[0026] 所述的经聚乙二醇化修饰的人纤维蛋白原是指将人纤维蛋白原的氨基或羧基或羟基或巯基或 N- 末端,被聚乙二醇共价修饰。如单甲氧聚乙二醇硝基苯基碳酸盐 (Methoxy-poly(ethylene glycol)-nitrophenylcarbonate, mPEG-NPC) 或单甲氧聚乙二醇酰肼 (mPEG-hydrazide) 或单甲氧聚乙二醇环氧化物 (mPEG-epoxide) 或单甲氧聚乙二醇顺

丁烯二酰亚胺 (mPEG-maleimide) 或单甲氧聚乙二醇乙醛 (mPEG-aldehyde)。

[0027] 上述方法中,所述培养基是无血清的合成培养基,其含有碳水化合物代谢调解剂、转铁蛋白组合物、高浓度的核苷组合物、肝素钠、抗氧化物、重组的人表皮细胞生长因子 (EGF)、人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、重组的人血管内皮生长因子 (VEGF) 等,籍此维持内皮细胞的生存及促进人肝祖先细胞集落形成。

[0028] 上述方法中,所述的饲养细胞优选为人内皮细胞,具体的,人内皮细胞是人脐带静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 或 / 和人肝窦内皮细胞 (human liver sinusoidal endothelial cell, HLSEC), 或 / 和其他的内皮细胞。

[0029] 本发明还提供一种由权利要求 1 所述的方法制备的体外扩增传代的人肝祖先细胞,该人肝祖先细胞依共培养方法可传代培养至少 10 代,而未见明显的人肝祖先细胞自我更新能力和克隆能力丢失。

[0030] 按照本发明所述的方法,在共培养条件下的人肝祖先细胞,当在无血清的培养基中添加细胞分化因子时,人肝祖先细胞可在体外分化为成熟样的肝实质细胞。

[0031] 本发明的方法可以体外选择性地增强人肝祖先细胞的自我更新,优选的实施方案中,在胞外基质人纤维蛋白胶上共培养人内皮细胞和人肝祖先细胞,优先扩增的细胞是人肝祖先细胞。

[0032] 本发明制备的人肝祖先细胞为肝细胞治疗,包括肝细胞移植和生物人工肝支持系统,药物筛选中的细胞毒性试验平台,肝炎病毒感染及药物筛选平台等提供良好的人肝细胞来源。

[0033] 本发明公开的体外培养扩增及制备人肝祖先细胞的方法,可以在体外选择性地增强人肝干 / 祖先细胞的自我更新。该方法充分考虑了细胞相互作用 (肝祖先细胞与非肝实质细胞的接触)、生长因子、及胞外基质等各种因素的相互作用的微环境,使肝干细胞可以在体外实现对称分裂 (自我更新),同时降低肝祖先细胞的分化 (不对称分裂) 而大量扩增,该培养方法时也为下游的代传培养、单细胞制备、和临床应用提供了条件。详细地,在含有人纤维蛋白胶胞外基质上,用无血清的培养基共培养人肝祖先细胞和人内皮细胞 (提供生长因子和细胞接触甚至胞外基质),扩增得到大量人肝祖先细胞集落;在含有人纤维蛋白胶胞外基质上,该人肝祖先细胞集落,经胶原酶简单的处理,易于脱离人纤维蛋白胶的表面,经更进一步的酶降解等单细胞制备技术处理,人肝祖先细胞可被分离纯化或 / 和传代培养。

附图说明

[0034] 图 1 显示人胎肝祖先细胞在共培养条件下不同时间点的人肝祖先细胞集落形态 (A)、数量 (B) 及上清液中白蛋白 (C) 和甲胎蛋白 (D) 的含量。

[0035] 图 2 显示用荧光活化细胞分选法分析人胎肝祖先细胞和不同的细胞共培养物中 EpCAM⁺ 肝祖先细胞的比例 (A)、数量 (B) 及上清液中白蛋白 (C) 和甲胎蛋白 (D) 的含量。

具体实施方式

[0036] 下面结合附图,通过对本发明较佳实施方式的详细描述,说明但不限制本发明。

[0037] 本发明是一种体外扩增及制备人肝祖先细胞的方法。该方法包括 (1) 经共培养法

体外扩增人肝祖先细胞；(2) 利用单细胞制备技术，从该扩增的细胞中分离纯化人肝祖先细胞。

[0038] 本发明优先的实施的方案中，在胞外基质人纤维蛋白胶上共培养人内皮细胞和人肝祖先细胞，优先扩增的细胞是人肝祖先细胞。

[0039] 本发明中所使用的“扩增”，意思是在特殊的培养条件下的人肝祖先细胞数量的增加。这也意味着增强人肝祖先细胞的对称分裂或自我更新，同时降低或抑止不对称分裂和分化。本发明所涉及的人肝祖先细胞，可根据公开发表的文献^(13,16-18,35)或/和公开的专利文献(WO03/078588A2, WO2005/068612A2, WO2004/009766A2, WO2006/126236A1, WO03/000848A2, CN1728946A, CN1742082A)等所述的方法分离纯化，该细胞的分子标志物为：EpCAM⁺、CD44⁺、AC133⁺、CK19⁺、甲胎蛋白和白蛋白阳性，但CD45⁻、神经元细胞粘附分子(NCAM)阴性和HLA^{-low}。尽管本发明申请中的人肝祖先细胞最好是源于人肝脏，特别是人胎肝脏。但是，基于人干细胞的可塑性，人肝祖先细胞也可从肝干细胞分化得到或从其他的来源得到，例如从人胰脏、骨髓等器官，或人脐带血、人脂肪组织以及分化的人胚胎干细胞中分离得到。

[0040] 本发明是一种体外扩增及制备人肝祖先细胞的方法。该方法是在人纤维蛋白胶上共培养人肝祖先细胞和内皮细胞，使用一种无血清的、含细胞生长因子的合成培养基，从而扩增人肝祖先细胞。

[0041] 尤其是，本发明中人内皮细胞最好是人脐带静脉血管内皮细胞或人肝窦内皮细胞，或两者的混合物。同其它的肝间质细胞（如肝星状细胞、肝胆管细胞、肝脏成纤维样细胞）相比，人内皮细胞在共培养条件下，能更有效地增强人肝祖先细胞的自我更新（对称分裂），同时降低人肝祖先细胞的分化（不对称分裂），能更好地保持人肝祖先细胞的特性。

[0042] 本发明中的胞外基质最好是人纤维蛋白胶或经聚乙二醇化修饰的人纤维蛋白胶或它们与其他的胞外基质的组合，例如与胞外基质包括胶原蛋白，如 III 或 IV、或非胶原糖蛋白，如层粘连蛋白，纤维粘连蛋白、或蛋白多糖，如透明质酸、硫酸乙酰肝素糖蛋白或富含胞外基质的组织抽体物等的组合。人纤维蛋白胶或经聚乙二醇化修饰的人纤维蛋白胶是通过凝血酶降解人纤维蛋白原或经聚乙二醇化修饰的人纤维蛋白原而制备的凝胶状降解物。在制备人纤维蛋白胶与其他的胞外基质的组合时，其他的胞外基质可在凝血酶加入之前加入。人纤维蛋白胶或人纤维蛋白胶与其他的胞外基质的组合可直接制备在培养皿的表面。

[0043] 本发明所涉及的支持人肝祖先细胞体外扩增的培养基是无血清培养基，所述的培养基包括碳水化合物、核苷组合物、代谢调节剂、转铁蛋白、肝素钠、抗氧化物和细胞生长因子等，籍此维持内皮细胞的生存及促进人肝祖先细胞集落形成。一个典型的无血清的培养基的组份是：在等体积比的 DMEM、F12K、M199、和 RPMI1640 中，包含 10mM 烟酰胺(nicotinamide)、0.5mM L-抗坏血酸-2-磷酸酯镁(ascorbic acid-2-phosphate Mg)、 10^{-7} M 氢化可的松(hydrocortisone)、4mM 谷氨酰胺(glutamine)、0.45% 葡萄糖(glucose)、1% ITS 组合物(Insulin-Transferring-Selenious acid) 组合物 [6.25 μg/ml 胰岛素(insulin)、6.25 μg/ml 转铁蛋白(transferrin)、6.25 μg/ml 亚硒酸(selenious acid)、1.25mg/ml 小牛血清白蛋白(BSA)]、2.5 μg/ml 肝素钠(heparin)、0.1mM 核苷组合物 [胸苷(Thymidine), 尿苷(uridine), 胞苷(cytidine), 鸟苷(guanosine), 及肌苷(inosine)]、

10ng/ml 重组的人表皮细胞生长因子 (epithelial growth factor, EGF)、重组的人血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 各 5ng/ml。也可选择地加入 5ng/ml 重组的人 TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) 来刺激人肝祖先细胞生长⁽³⁶⁾。

[0044] 在人内皮细胞和人肝祖先细胞共培养前,所使用的人内皮细胞应预先培养在上述的无血清的培养基中,以适应无血清培养条件。

[0045] 发明人已经发现在人纤维蛋白胶表面上共培养人肝祖先细胞和人内皮细胞,在无血清的培养基中,能扩增人肝祖先细胞。该人肝祖先细胞扩增的形态方式可以是扩散式的、细胞集落式的或克隆形成式的,并能在体外长期生存。

[0046] 本发明也涉及一种从优先扩增的人肝祖先细胞共培养物中制备单个人肝祖先细胞悬液的技术。该技术包括依次用 (1) 胶原酶或高度纯化胶原酶 Liberase Blendzyme3, (2) 胰蛋白酶, (3) 分散酶和脱氧核糖核酸酶 I 三步降解优先扩增的人肝祖先细胞的共培养物而产生单细胞悬液。人肝祖先细胞可从单细胞悬液中通过免疫选择法 (CD44⁺ 或 / 和 EpCAM⁺) 或者在体外选择性的培养条件下更进一步纯化,例如 FACS、免疫磁珠分选技术,组织培养瓶铺展贴壁等。

[0047] 同其它的胞外基质相比,在人纤维蛋白胶上共培养的人肝祖先细胞经较短时间的胶原酶降解,细胞即可脱离人纤维蛋白胶表面,因此极大地降低了因常规的胶原酶过度降解而引起的肝干细胞损伤。

[0048] 另外,需要说明的时,并不是每代经共培养扩增的人胎肝祖先细胞都需要制备为单细胞悬浮液才能传代。当共培养物中的 CD44⁺ 或 / 和 EpCAM⁺ 细胞的比例大于 50% 时,该共培养物经胶原酶 H 或高度纯化的胶原蛋白酶 liberase Blendzyme3 简短降解,离心收集和清洗含内皮细胞和人胎肝祖先细胞的共培养物,按 1:2 或 1:3 比例,能成功地直接传代培养该共培养物。直到共培养物中的 CD44⁺ 或 / 和 EpCAM⁺ 细胞的比例低于 50% 时,应用上述的单细胞制备技术分离纯化 CD44⁺ 或 / 和 EpCAM⁺ 的细胞,再继续经共培养扩增及传代。

[0049] 上述纯化的人肝祖先细胞能在体外至少可共培养到第 10 代。

[0050] 在上述的无血清的培养基中扩增的人肝祖先细胞的数量可以用不同的方法检测。例如,可用血球计数器记数总的细胞数,又可用流式细胞术记数 CD44⁺ 或 / 和 EpCAM⁺ 的细胞比例。一般地,按上述的共培养方法,培养到两周左右,将增强人肝祖先细胞的对称分裂或自我更新,同时降低不对称分裂或分化,能使人肝祖先细胞的数量增加 5 到 20 倍。

[0051] 经本体外扩增及制备人肝祖先细胞的方法上述方法分离纯化的人肝祖先细胞能用标准冷冻保存方法在液氮中保存。冷冻保存培养基包含 75% 上述的无血清的培养基、10% 成人 AB 型血清或人血清白蛋白和 15% 二甲亚砜。该冷冻保存的人肝祖先细胞经解冻后,按上述的共培养方法培养仍然存活,仍能自我更新能力和形成克隆。

[0052] 当在上述的共培养条件下和在无血清的培养基中添加 10^{-7} M 地塞米松 (dexamethasone)、2ng/ml 重组的人胰高血糖素 (glycogen), 5ng/ml 重组的人成纤维细胞生长因子 4 (FGF4)、5ng/ml 重组的人肝细胞生长因子 (HGF) 和 10ng/ml 重组的人抑瘤素 (oncostatinM) 时,人肝祖先细胞可在体外分化培养条件下分化为甲胎蛋白阴性、白蛋白阳性的成熟样的肝实质细胞。

[0053] 经本发明制备纯化的人肝祖先细胞一方面可直接移植到病人组织或器官中,最好

是病人的肝脏中。在病人的肝脏中,该扩增后的人肝祖先细胞将在肝中分化为成熟肝实质细胞;另一方面,在人纤维蛋白胶上的该共培养物,不经降解和纯化也可直接应用于人工肝支持系统、药物筛选中的细胞毒性试验平台、肝炎病毒感染及药物筛选平台。

[0054] 尽管发明人在此公开了最适宜的人肝祖先细胞扩增方法,本发明的范围不只仅仅限于下述所提供的特述的实例。在本发明的范围内的变通方法也可被仔细考虑用来扩增人肝祖先细胞。

[0055] 本发明中,除特别注明外,所有的化合物、培养基、抗体、生长因子以及组合物均购自 Sigma 公司。

[0056] 实例 1 人纤维蛋白胶的制备

[0057] 在含有 3 ~ 5mg/ml 人纤维蛋白原(上海新兴医药,中国)的 M199 培养基中,加入凝血酶(上海新兴医药,中国)至终浓度为 0.02 单位/ml。很快地在六孔板的一个孔内加入 0.5 至 2ml 的上述溶液以覆盖整个孔。将该六孔板置于 37°C 的细胞培养箱中。在人纤维蛋白原被降解至少两小时后,加入抑肽酶(aprotinin)(杭州澳亚,中国)到无血清培养基至终浓度为 20 单位/ml,来抑制凝血酶活性至少两小时。该制备的人纤维蛋白胶可密封置于 4°C 长期保存备用。当人纤维蛋白胶和其他的胞外基质(如与层粘连蛋白、纤维粘连蛋白或两者)共同使用时,可先加入到人纤维蛋白原的 M199 培养基中,然后加入凝血酶降解。如果使用含胶原蛋白 III 或 IV 等酸性的溶液,该溶液可加入到人纤维蛋白原的 DMEM/F12K 培养基中,并用 0.1N NaOH 调节 pH 至中性(pH7.0-7.4),然后加入凝血酶降解。

[0058] 当制备聚乙二醇化的人纤维蛋白胶时,先制备聚乙二醇化的人纤维蛋白原⁽³⁷⁾,再用如上的人纤维蛋白胶的制备法制备聚乙二醇化的人纤维蛋白胶。简单地,聚乙二醇化的人纤维蛋白原可按如下的方法制备:将单甲氧聚乙二醇硝基苯基碳酸盐(Methoxy-poly(ethyleneglycol)-nitrophenyl carbonate, NC-mPEG, 平均分子量:5kDa)或聚乙二醇双硝基苯基碳酸盐(nitrophenyl carbonate-poly(ethyleneglycol)-nitrophenyl carbonate, NPC-PEG-NPC, 平均分子量:3.4kDa)(Nektar, San Carlos, CA, 美国)同人纤维蛋白原(MW:340kDa)以 2:1 摩尔比混合在 TBS 缓冲盐中(0.05M Tris-HCl, 0.138M NaCl, 0.0027M KCl; pH7.8),并置于 37°C 至少 1 个小时,其中的人纤维蛋白原的终浓度为 3 ~ 5mg/ml。为了将以上聚乙二醇修饰的人纤维蛋白原降解为人纤维蛋白胶,加入凝血酶至终浓度为 0.02 单位/ml,并置于 37°C 过夜降解。之后,用 1× 磷酸盐(PBS)缓冲液清洗聚乙二醇化的人纤维蛋白胶六次,以去除多余的单甲氧聚乙二醇硝基苯基碳酸盐或聚乙二醇双硝基苯基碳酸盐。加入含有终浓度为 20 单位/ml 抑肽酶的无血清培养基至六孔板的一个孔内,来抑制凝血酶活性至少两小时。该制备的人纤维蛋白胶可密封置于 4°C 长期保存备用。

[0059] 实例 2 在人纤维蛋白胶上共培养人胎肝祖先细胞和人脐带静脉血管内皮细胞

[0060] 按文献报道的方法,将 16 ~ 22 周妊娠龄的胎儿肝或成人肝脏,经预热的含 0.2mg/ml 脱氧核糖核酸酶 I 和 0.1% 胶原酶 H 或 120 μg/ml 高度纯化的胶原蛋白酶 liberase Blendzyme 3(Roche Applied Sciences, 美国)Hank's 缓冲液(含 Ca²⁺和 Mg²⁺离子的 Hank's Balanced Salt Solution)降解,制备为人肝脏单细胞悬液。富含 EpCAM⁺或 / 和 CD44⁺但 CD45⁻、NCAM⁻、HLA^{-low}的人胎肝祖先细胞可用 Schmelzer 等描述的方法经 FACS 或免疫磁珠分离技术分离纯化⁽¹⁶⁾,或用 Dan 等⁽¹⁷⁾、Herraza 等⁽¹⁸⁾、Turner 等⁽¹⁹⁾描述的方法被富集。为

了增加人胎肝祖先细胞的纯度,以上分离纯化的人胎肝祖先细胞(CD44⁺或/和EpCAM⁺)可经FACS分选技术再分离纯化一次。在共培养前,低代次的人脐带静脉血管内皮细胞被先置于无血清的培养基中适应培养至少一代。在一个典型的共培养例子中,将 2×10^5 个人胎肝祖先细胞和 5×10^4 个人脐带静脉血管内皮细胞(美国典型培养物保藏中心,ATCC)加入无血清的培养基中,置于人纤维蛋白胶的表面上过夜培养。第二天,更换新鲜的培养基。上述的人脐带静脉血管内皮细胞的数量可以在 $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^5$ 的范围内变动。一个好的技术人员可改变人血管内皮细胞和人胎肝祖先细胞两者的比例和数量等来最优化实验条件。在不同的时间点,相差显微镜下观察照相和计数细胞集落的数量。一个典型的人胎肝祖先细胞集落在形态上可定义为10个以上紧密相连的、有完整的边缘的一群细胞。每2~3天更换共培养物的培养基一次并收集培养上清液。上清液中的白蛋白和甲胎蛋白含量用标准的白蛋白(罗氏诊断,中国)和甲胎蛋白(广州万孚,中国)夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定。由图1A可以看出,经共培养3天后,单个的人胎肝祖先细胞集落清晰可见;6天后,人胎肝祖先细胞集落变大但边缘清晰,并被人脐带静脉血管内皮细胞包围;9天后,位于孔中央的大的细胞集落之间开始接触;15天后,细胞集落之间相互接触,单个细胞集落不易于分辨。尽管单独培养的人胎肝祖先细胞也能在人纤维蛋白胶上形成人肝祖先细胞集落,但是,在不同的时间点,其细胞集落数比共培养条件的人肝祖先细胞集落数少将近至少一倍(图1B)。在不同的时间点上,共培养条件下的人肝祖先细胞比单独培养的人胎肝祖先细胞分泌更多的白蛋白(图1C)和甲胎蛋白(图1D)。在另一组人脐带静脉血管内皮细胞单独培养的对照中,人脐带静脉血管内皮细胞不分泌白蛋白和甲胎蛋白。这一结果表明在人纤维蛋白胶上共培养人胎儿肝祖先细胞和人血管内皮细胞,比单独在人纤维蛋白胶上培养人胎儿肝祖先细胞,能显著地增强人胎儿肝祖先细胞集落的形成、白蛋白和甲胎蛋白的分泌。相同的共培养试验已经重复至少三次,每次使用不同批次的人胎肝祖先细胞。以上的结果仅代表其中的一个典型批次的结果。

[0061] 实例3 从人胎肝祖先细胞和人血管内皮细胞共培养物中制备人肝祖先细胞

[0062] 用1×磷酸盐(PBS)缓冲液清洗人胎肝祖先细胞和人血管内皮细胞共培养物两次后,加入0.5ml含有0.1%胶原酶H或 $120 \mu\text{g/ml}$ 高度纯化的胶原蛋白酶liberase Blendzyme 3(Roche Applied Sciences,美国)的Hank's缓冲液(含Ca²⁺和Mg²⁺离子的Hank's Balanced Salt Solution)到每个孔中,于37℃降解1~4分钟并伴有轻微的摇动,直到大部份的培养物脱离人纤维蛋白胶的表面,另外加入2ml Hank's缓冲液到每个孔中,收集培养物到无菌管中,低速离心($100 \times g$)10分钟沉淀细胞培养物。将该细胞沉淀物悬浮在不含Ca²⁺和Mg²⁺离子的Hank's缓冲液中,加入等体积的胰蛋白酶-EDTA至终浓度为1mM EDTA、2.5mg/ml胰蛋白酶,于10℃或室温下消化细胞培养物1~5分钟,并伴有轻微的摇动至白色的絮状物出现,加入4倍体积的冷的含5%成人血清的DMEM/F12K培养基或胰蛋白酶抑制剂来中和胰蛋白酶的活性。离心($300 \times g$)10分钟沉淀消化的细胞培养物。将沉淀的细胞培养物悬浮在含有5mg/ml中性蛋白酶-分散酶(dispace)的Hank's缓冲液(含Ca²⁺和Mg²⁺离子)中,并慢慢加入1mg/ml脱氧核糖核酸酶I(DNaseI)至白色的絮状物消失和细胞被释放。加入2倍体积的冷的含5%成人血清的DMEM/F12K培养基到降解物中,经40微米的滤网除去未消化的培养物,滤液经离心($300 \times g$)10分钟沉淀。沉淀的细胞悬浮在含有0.1%牛血清白蛋白(BSA)和2mM EDTA的PBS缓冲液(不含Ca²⁺和Mg²⁺离子)

中,至浓度为 2×10^7 个细胞 / $100 \mu\text{l}$ 。在 $80 \mu\text{l}$ 细胞悬液中加入 $20 \mu\text{l}$ EpCAM 耦连的磁性小球 (Miltenyi biotech, CA, 美国),置于 4°C 15 分钟,富含人肝祖先细胞的 EpCAM⁺ 细胞用 MiniMACS 或 AutoMACS (Miltenyibiotec, CA, 美国) 经生产商描述的方法分离纯化。或用 DYNAL CELLlection™ Epithelial Enrich 试剂盒 (Invitrogen, CA, 美国) 描述的方法分离纯化。细胞悬液中 CD44⁺ 或 / 和 EpCAM⁺ 的细胞也可经 FACS (FACSstar, BD Pharmingen, 美国) 分离纯化。简单地,加入荧光染色剂 PerCP-Cy5.5 耦连的鼠抗人 EpCAM 单克隆抗体 (1:100, BD Pharmingen) 或 / 和荧光染色剂 FITC 耦连的鼠抗人 CD44 (1:100, BD Pharmingen) 至细胞悬液中, CD44⁺ 或 / 和 EpCAM⁺ 的细胞被分选纯化。同时, PerCP-Cy5.5 耦连的鼠 IgG1 或 / 和 FITC 耦连的鼠 IgG1 作为对照。高度纯化的人肝祖先细胞可经再次荧光活化细胞分选或免疫磁珠分选技术分离纯化而得到。

[0063] 另外,需要说明的时,并不是每代经共培养扩增的人胎肝祖先细胞都需要制备为单细胞悬浮液才能传代。当共培养物中的 CD44⁺ 或 / 和 EpCAM⁺ 细胞的比例大于 50% 时,该共培养物经 0.1% 胶原酶 H 或 $120 \mu\text{g/ml}$ 高度纯化的胶原蛋白酶 liberase Blendzyme3 简短降解,离心收集和清洗含内皮细胞和人胎肝祖先细胞的共培养物。按 1:2 或 1:3 比例可成功地传代培养该共培养物。直到共培养物中的 CD44⁺ 或 / 和 EpCAM⁺ 细胞的比例低于 50% 时,应用上述的单细胞制备技术分离纯化 CD44⁺ 或 / 和 EpCAM⁺ 的细胞,再继续经共培养扩增及传代。

[0064] 实例 4 人内皮细胞最优化地增强人胎肝祖先细胞的扩增

[0065] 为了比较不同种类的细胞对扩增 EpCAM⁺ 细胞的影响,将 2×10^5 个人胎肝祖先细胞,同生长停止的鼠胚胎纤维母细胞 (mSTO)、人脐带静脉血管内皮细胞 (HUVEC)、成人皮肤成纤维细胞 (human adult skin fibroblast, HASF) (美国典型培养物保藏中心, ATCC)、成人肝窦内皮细胞 (HLSEC)、成人肝星状细胞 (HSTC)、成人肝胆管细胞 (HBDC) (ScienCell Research Laboratories, 美国) 和经培养后第三代人胎肝 EpCAM⁻ (阴性) 非实质细胞的细胞组分 (human fetal liver non-parenchymal cell, HFNPC) 等各 1×10^5 个细胞分别共培养在人纤维蛋白胶上。在另一组试验中,将等数量的成人肝窦内皮细胞 (HLSEC)、成人肝星状细胞 (HSTC) 和成人肝胆管细胞 (HBDC) 等细胞混合后,构成成人肝非实质细胞混合物。按上述的方法同人胎肝祖先细胞共培养。在不同的时间点,每三天收集共培养物的上清液,简单的离心后保存在 -80°C 用于 ELISA。在共培养两周后,共培养物按实例 3 的方法被制成单细胞悬液。首先,用血球计数器计数每组共培养物中总的细胞数,每组共培养物中的 EpCAM⁺ 细胞的百分比例经流式细胞术测定。简单地,在 $200 \mu\text{l}$ 含 2×10^6 个细胞的单细胞悬液中,加入 $2 \mu\text{l}$ PerCP-Cy5.5 耦连的鼠抗人 EpCAM 单克隆抗体 (BD Pharmingen, 中国),反应液置于 4°C 45 分钟,简单的离心清洗后,悬浮在 PBS 缓冲液中。一个 PerCP-Cy5.5 耦连的鼠 IgG1 被作为荧光染色试验的对照。在荧光活化细胞分选仪 (FACSstar, BD Pharmingen, 中国) 上,用 Cellquest 软件 (BD Pharmingen) 分析 EpCAM⁺ 细胞的比例。由图 2A 可以看出,当人肝祖先细胞和人脐带静脉血管内皮细胞或肝窦内皮细胞共培养两周时,导致 EpCAM⁺ 细胞分别占细胞总数的 68.5% 或 53.8%。这一比例远高于其它的共培养组合,例如,和生长停止的鼠胚胎纤维母细胞、成人皮肤成纤维细胞、成人肝星状细胞、成人肝胆管细胞和人胎肝 EpCAM⁻ 的细胞组分等的共培养。有趣的是,由等数量的成人肝窦内皮细胞、成人肝星状细胞和成人肝胆管细胞混合构成的成人肝非实质细胞混合物的共培养,导致 EpCAM⁺ 细胞占细胞

总数的 21.6%，这明显高于成人肝星状细胞及成人肝胆管细胞等单个共培养时 EpCAM⁺ 的细胞的比例 (3.3% 和 7.1%)，但低于成人肝窦内皮细胞时的比例 (53.8%)。同人胎肝祖先细胞单独培养相比，将人胎肝祖先细胞和生长停止的鼠胚胎纤维母细胞、成人皮肤成纤维细胞及人胎肝 EpCAM⁻ 的细胞组分等共培养，并不能显著地增强人胎肝祖先细胞组分的比例。当将每组 EpCAM⁺ 细胞的比例乘以相应组的细胞总数，就能推测出相应共培养组中 EpCAM⁺ 细胞的数量。与起始培养时的人肝祖先细胞数量相比，人胎肝祖先细胞和人脐带静脉血管内皮细胞或肝窦内皮细胞共培养导致近 9 倍或 8 倍的增加 (图 2B)，但其他的共培养组仅有少于 1 倍的增加。这表明和人脐带静脉血管内皮细胞或肝窦内皮细胞共培养能增强人胎肝祖先细胞的自我更新，降低其分化。图 2C 和 2D 更进一步表明和人脐带静脉血管内皮细胞或肝窦内皮细胞共培养的人胎肝祖先细胞，比其他的共培养条件下的人胎肝祖先细胞分泌更多的白蛋白和甲胎蛋白。在单独培养的对照实验组中，例如，生长停止的鼠胚胎纤维母细胞、人脐带静脉血管内皮细胞、成人皮肤成纤维细胞、成人肝窦内皮细胞、成人肝星状细胞、成人肝胆管细胞、人胎肝 EpCAM⁻ (阴性) 非实质细胞的细胞组分、及成人肝非实质细胞混合物等，它们均不分泌白蛋白和甲胎蛋白。因此，同其它的非肝实质细胞相比，内皮细胞最优化地增强人肝祖先细胞的自我更新。相同的试验已经重复至少三次，每次使用不同批次的人胎肝祖先细胞。以上的结果仅代表其中的一个典型批次的结果。

[0066] 实例 5 人胎肝祖先细胞的低温保存、复苏及传代

[0067] 按实例 3 描述的方法，将从共培养物中分离纯化的第八代 5×10^6 个 EpCAM⁺ 的人肝祖先细胞，悬浮在由 75% 无血清培养基、15% 二甲亚砜 (DMSO) 和 10% 成人血清 (AB 型) 组成的冻存液中，移至 2ml 冻存管中。先将其置于 Nalgene™ Cryo1 °C 冷冻容器中在 4°C 1 小时，然后转移到 -80°C 过夜，最后置于液氮中长期保存。该冻存的细胞也可经下面的步骤活化。将冻存的细胞很快置于 37°C，直到完全冻融。然后缓缓加入 10ml 经预热至 37°C 的含 90% 无血清培养基及 10% 成人血清 (AB 型) 的培养基中并伴有轻微振动，这一个过程将花费 10 ~ 15 分钟。经 $100 \times g$ 离心 10 分钟去除含二甲亚砜的上清液后，将 4×10^5 个活的人肝祖先细胞悬浮在无血清培养中，和 5×10^4 人血管内皮细胞共培养在人纤维蛋白胶上。经培养两周后，在相差显微镜下观察和计数人肝祖先细胞集落的数量，我们发现经低温保存的人肝祖先细胞仍能形成克隆 (12 ± 3 个 / 每孔)，并分泌高水平白蛋白 ($9810 \pm 120 \text{ng/ml}$) 和甲胎蛋白 ($321 \pm 62 \text{ng/ml}$)。尽管低温保存的人肝祖先细胞的克隆形成能力 (12 ± 3 个 / 每孔) 低于原代的人肝祖先细胞的能力 (21 ± 4 个 / 每孔)，但低温保存的人胎肝祖先细胞的白蛋白分泌水平仍和原代的人胎肝祖先细胞可比。这些结果表明经共培养制备的人胎肝祖先细胞仍能低温保存、并复苏及传代。

[0068] 实例 6 在共培养条件下，人胎肝祖先细胞可分化为成熟样的肝实质细胞

[0069] 当在共培养条件下的培养物中添加分化因子时，人胎肝祖先细胞可在体外分化为成熟的肝实质细胞。简单地，在第三代含人胎肝祖先细胞和人内皮细胞的培养物中加入 10^{-7}mM 地塞米松、 5ng/ml 重组的人肝细胞生长因子、 5ng/ml 重组的人成纤维细胞生长因子 4 (FGF4)、 2ng/ml 重组的人胰高血糖素和 10ng/ml 重组的人抑瘤素，在无血清的培养基中共培养 12 天，每 3 天收集培养上清液并更换新鲜培养基。ELISA 分析表明该培养物在第 12 天分泌高水平的白蛋白 ($1210 \pm 98 \text{ng/ml}$)，但基础水平的甲胎蛋白阴性 ($54 \pm 21 \text{ng/ml}$)。这表明在此分化培养条件下的人胎肝祖先细胞已失去了肝祖先细胞的特性，而分化为成熟样的

人肝实质细胞。

[0070] 参考文献

[0071] 1. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006 ;82 :441-449.

[0072] 2. Jalan R, Sen S, Williams R. Prospects for extracorporeal liver support. *Gut* 2004 ;53 :890-898.

[0073] 3. Horslen SP, Fox IJ. Hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2004 ;77 :1481-1486.

[0074] 4. Onodera K, Sakata H, Yonekawa M, Kawamura A. Artificial liver support at present and in the future. *J Artif Organs* 2006 ;9 :17-28.

[0075] 5. David A, Shafritz MO, AMDNMDD. Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells. *Hepatology* 2006 ;43 :S89-S98.

[0076] 6. Roskams T. Different types of liver progenitor cells and their niches. *J Hepatol* 2006 ;45 :1-4.

[0077] 7. Susick R, Moss N, Kubota H, Lecluyse E, Hamilton G, Luntz T, Ludlow J, et al. Hepatic progenitors and strategies for liver cell therapies. *Ann N Y Acad Sci* 2001 ;944 :398-419.

[0078] 8. Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956 ;16 :142-148.

[0079] 9. Taniguchi H, Toyoshima T, Fukao K, Nakauchi H. Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nat Med* 1996 ;2 :198-203.

[0080] 10. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000 ;6 :1229-1234.

[0081] 11. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003 ;422 :897-901.

[0082] 12. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* 2006 ;43 :2-8.

[0083] 13. de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rijn CM, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 1999 ;188 :201-206.

[0084] 14. Ponder KP. Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies. *Faseb J* 1996 ;10 :673-682.

[0085] 15. Marceau N. Epithelial cell lineages in developing, restoring, and transforming liver: evidence for the existence of a 'differentiation window'. *Gut* 1994 ;35 :294-296.

[0086] 16. Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM. The Phenotypes of Pluripotent Human

Hepatic Progenitors. *Stem Cells* 2006.

[0087] 17. Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C, Teoh N, Haque J, Campbell JS, Fausto N. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ;103 :9912-9917.

[0088] 18. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, et al. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 2006 ;24 :2840-2850.

[0089] 19. Turner WS, Schmelzer E, McClelland R, Wauthier E, Chen W, Reid LM. Human hepatoblast phenotype maintained by hyaluronan hydrogels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006.

[0090] 20. Kon J, Ooe H, Oshima H, Kikkawa Y, Mitaka T. Expression of CD44 in rat hepatic progenitor cells. *J Hepatol* 2006 ;45 :90-98.

[0091] 21. Krause DS. Engraftment of bone marrow-derived epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 2005 ;1044 :117-124.

[0092] 22. Ishikawa F, Drake CJ, Yang S, Fleming P, Minamiguchi H, Visconti RP, Crosby CV, et al. Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann N Y Acad Sci* 2003 ;996 :174-185.

[0093] 23. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ;328 :258-264.

[0094] 24. Tosh D, Shen CN, Slack JM. Differentiated properties of hepatocytes induced from pancreatic cells. *Hepatology* 2002 ;36 :534-543.

[0095] 25. Theise ND. Gastrointestinal stem cells. III. Emergent themes of liver stem cell biology: niche, quiescence, self-renewal, and plasticity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 ;290 :G189-193.

[0096] 26. Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Li Z, Torbenson M, et al. Sympathetic nervous system inhibition increases hepatic progenitors and reduces liver injury. *Hepatology* 2003 ;38 :664-673.

[0097] 27. Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, Zaret KS. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 2001 ;294 :559-563.

[0098] 28. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003 ;299 :890-893.

[0099] 29. Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, Nakagawa K, et al. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2001 ;34 :683-689.

- [0100] 30. Sato T, El-Assal ON, Ono T, Yamanoi A, Dhar DK, Nagasue N. Sinusoidal endothelial cell proliferation and expression of angiopoietin/Tie family in regenerating rat liver. *J Hepatol* 2001 ;34 :690-698.
- [0101] 31. Ross MA, Sander CM, Kleeb TB, Watkins SC, Stolz DB. Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 2001 ;34 :1135-1148.
- [0102] 32. Taniguchi E, Kin M, Torimura T, Nakamura T, Kumemura H, Hanada S, Hisamoto T, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves the survival following liver injury in mice. *Gastroenterology* 2006 ;130 :521-531.
- [0103] 33. Nahmias Y, Casali M, Barbe L, Berthiaume F, Yarmush ML. Liver endothelial cells promote LDL-R expression and the uptake of HCV-like particles in primary rat and human hepatocytes. *Hepatology* 2006 ;43 :257-265.
- [0104] 34. Kubota H, Reid LM. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 ;97 :12132-12137.
- [0105] 35. Selden C, Chalmers SA, Jones C, Standish R, Quaglia A, Rolando N, Burroughs AK, et al. Epithelial colonies cultured from human explanted liver in subacute hepatic failure exhibit hepatocyte, biliary epithelial, and stem cell phenotypic markers. *Stem Cells* 2003 ;21 :624-631.
- [0106] 36. Jakubowski A, Ambrose C, Parr M, Lincecum JM, Wang MZ, Zheng TS, Browning B, et al. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. *J Clin Invest* 2005 ;115 :2330-2340.
- [0107] 37. Liu H, Collins SF, Suggs LJ. Three-dimensional culture for expansion and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials* 2006 ;27 :6004-6014.

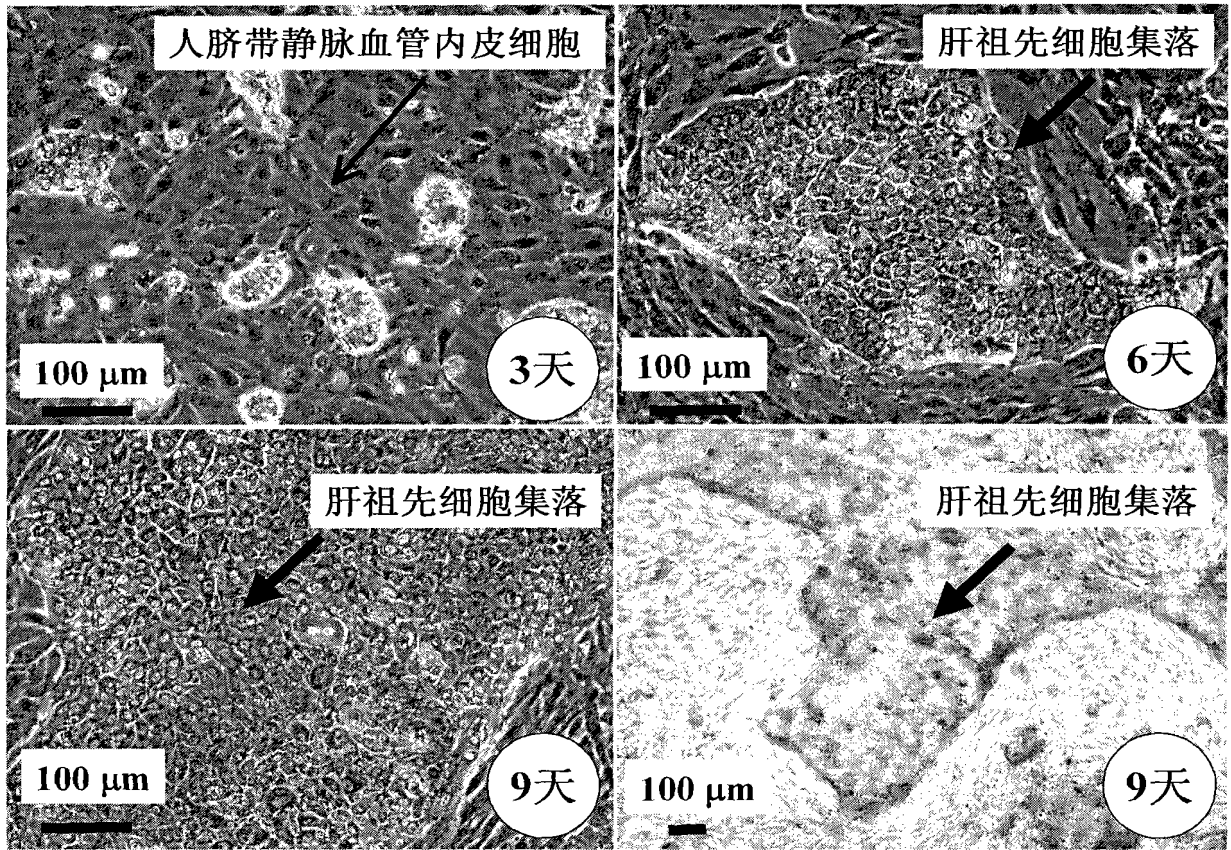


图 1A

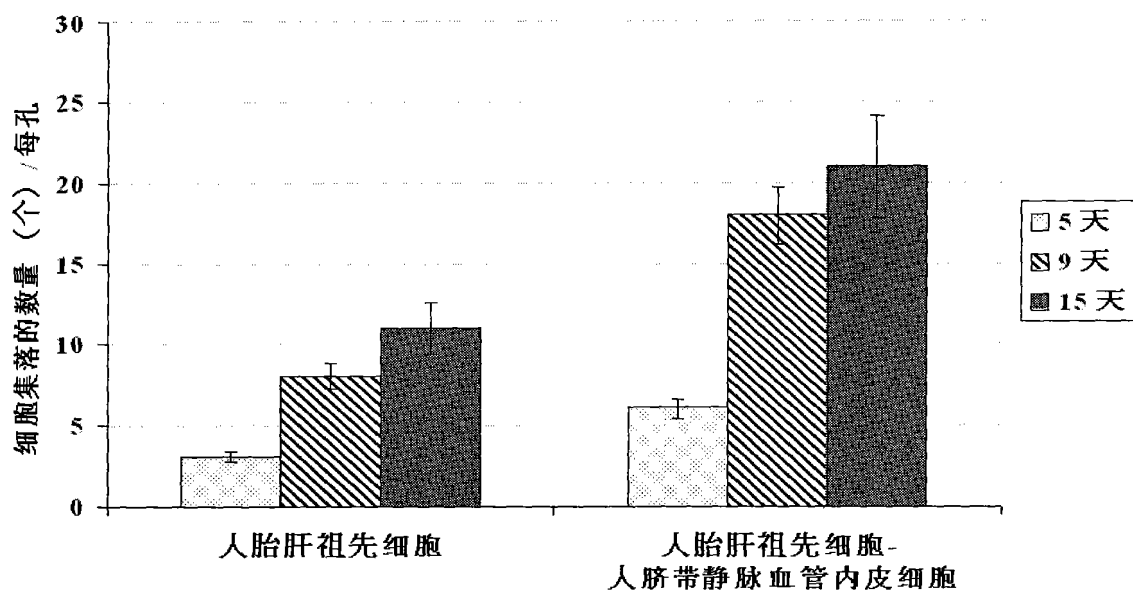


图 1B

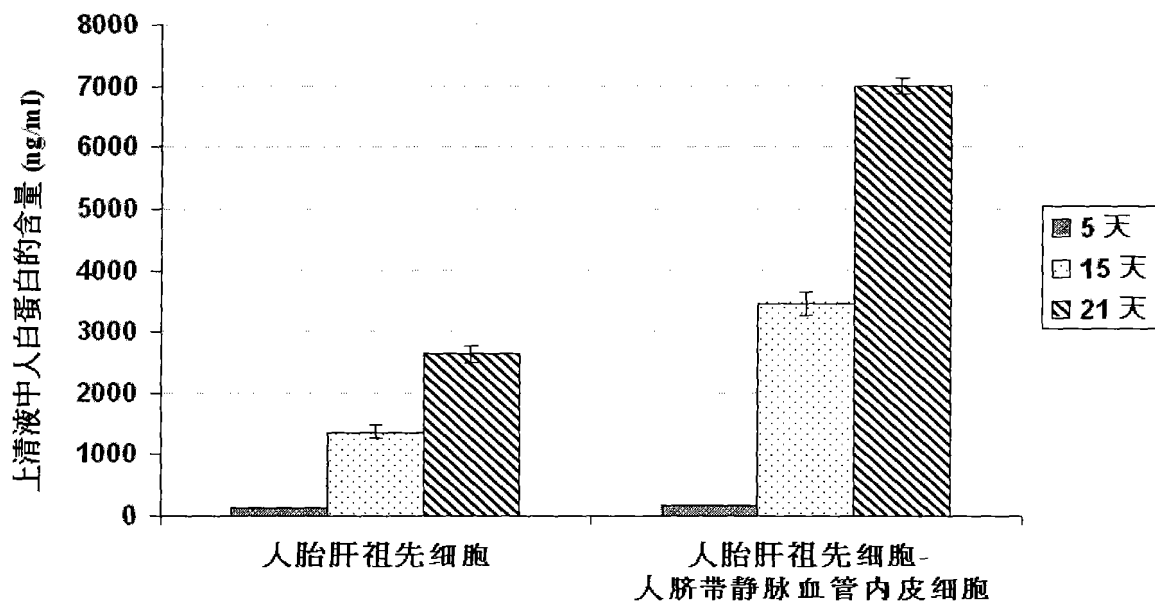


图 1C

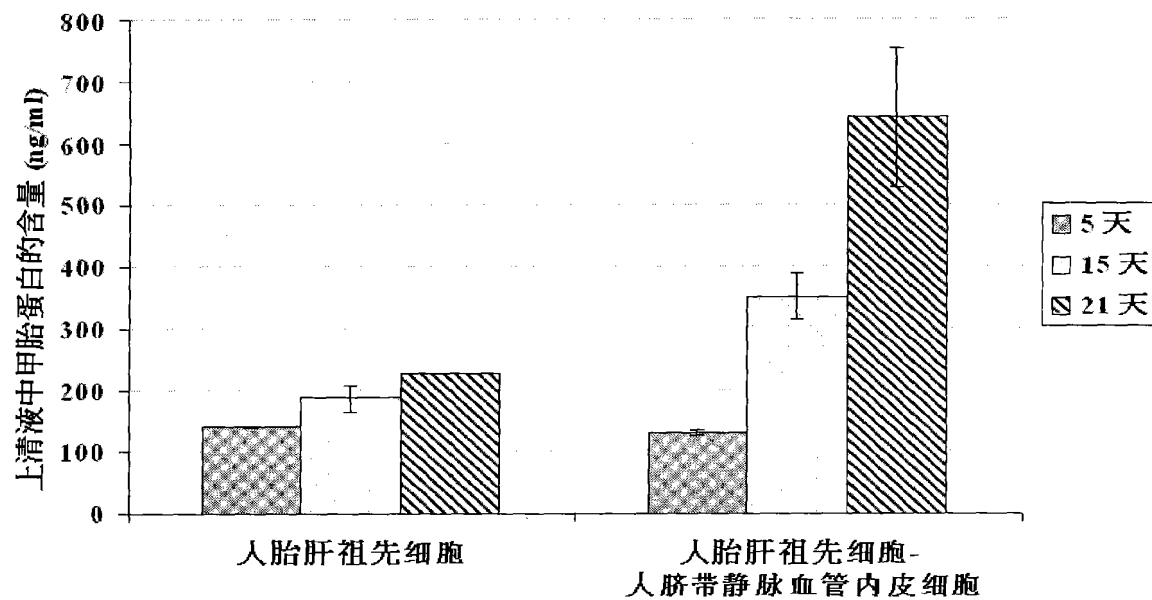


图 1D

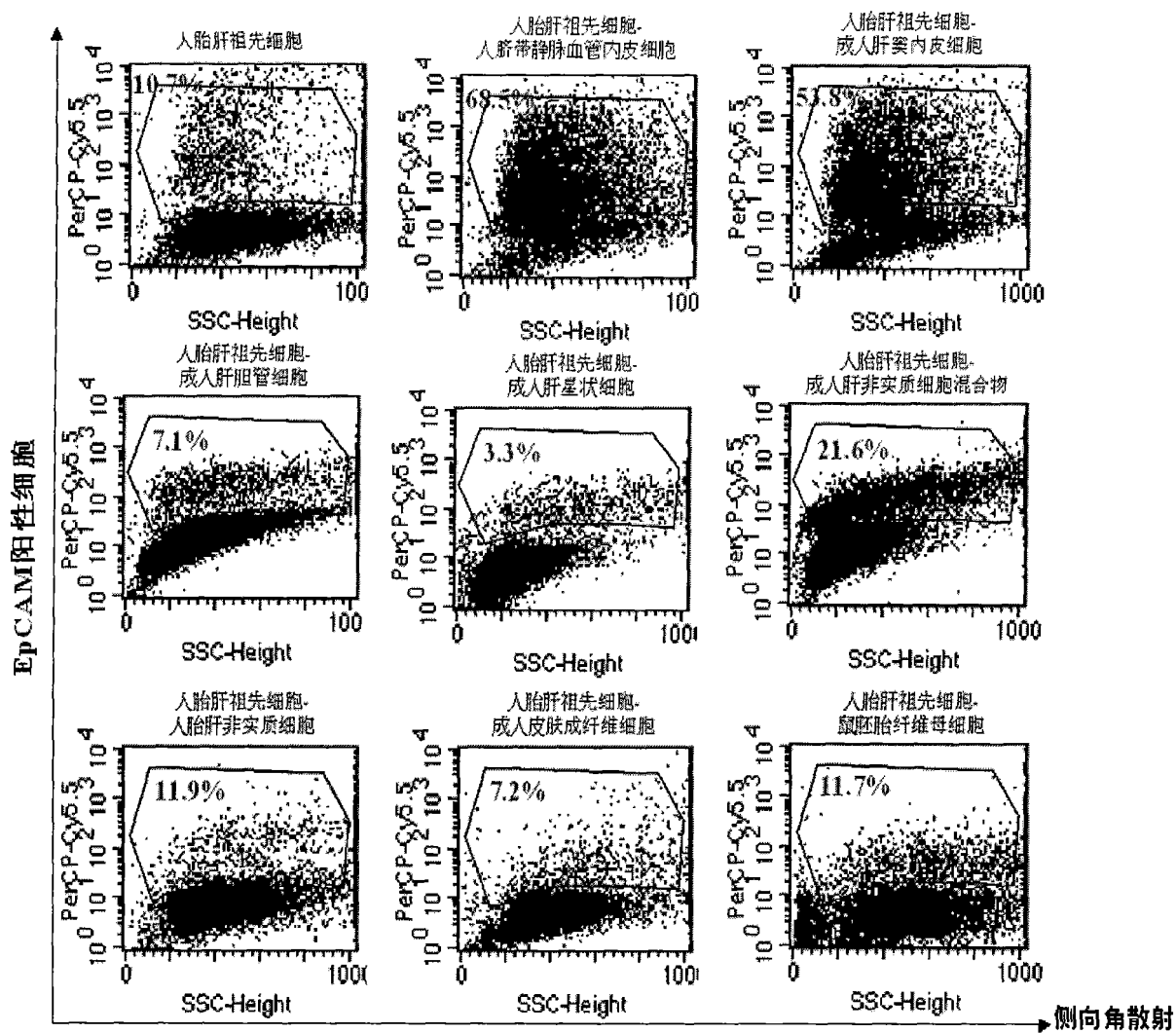


图 2A

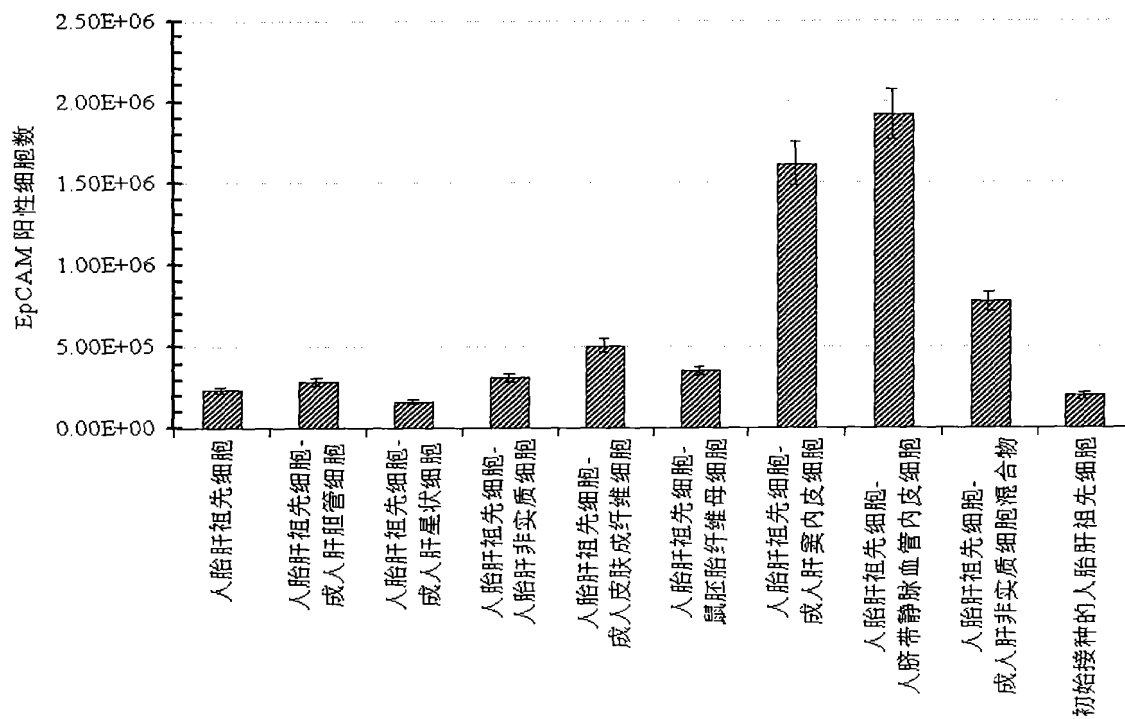


图 2B

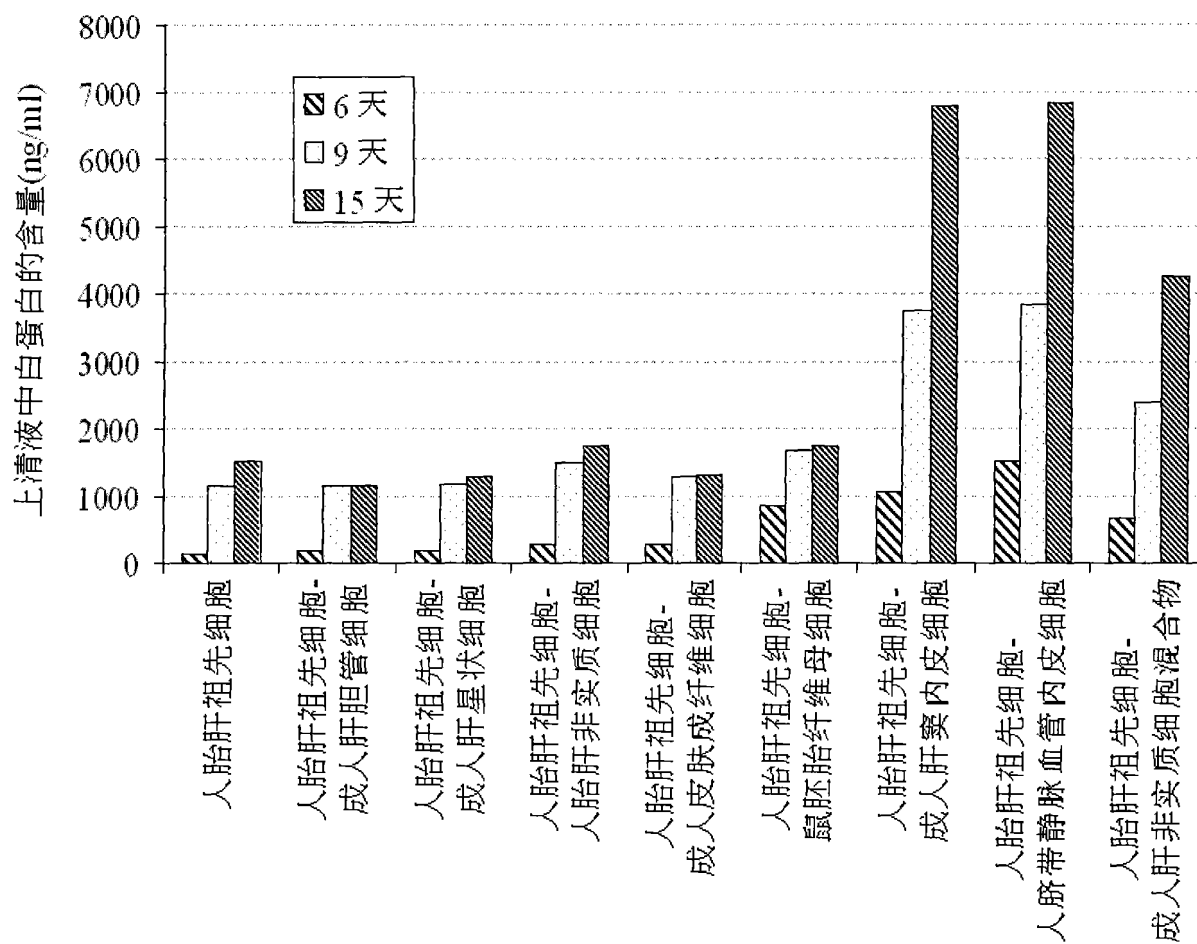


图 2C

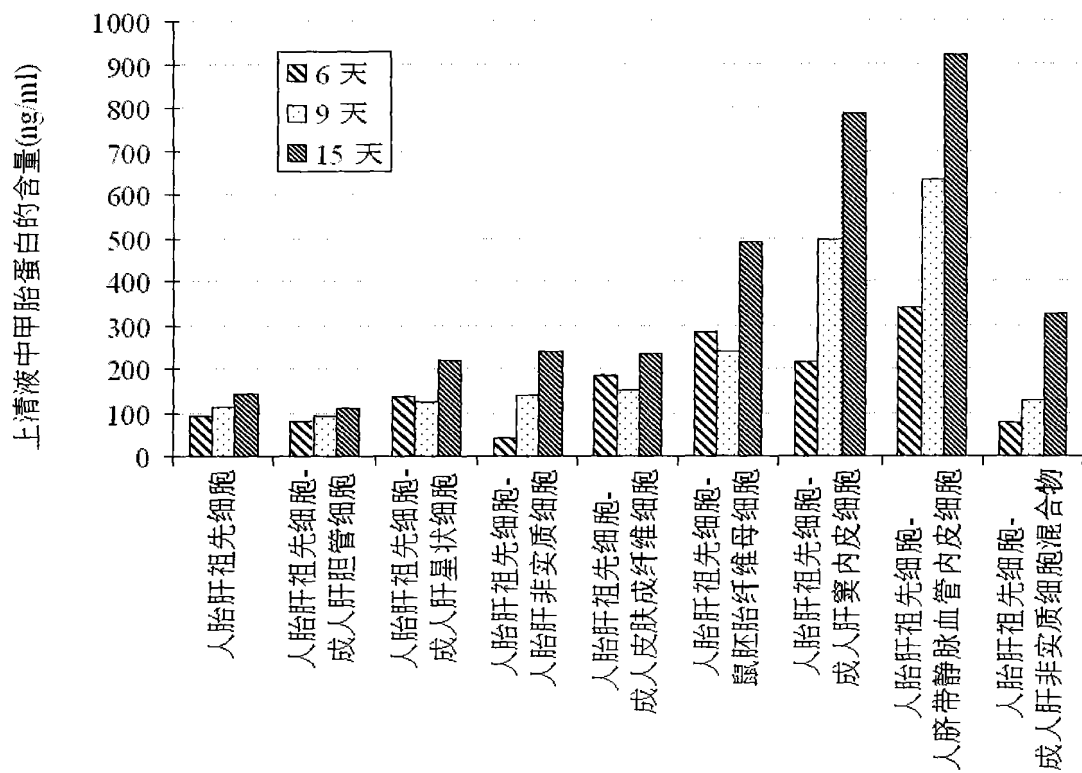


图 2D