(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103800895 B
(45)授权公告日 2016.12.28

(21)申请号 201310348088.1

(22)申请日 2009.06.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103800895 A

(43)申请公布日 2014.05.21

(30)优先权数据
08010651.1 2008.06.11 EP

(62)分案原申请数据
200980131229.6 2009.06.11

(73)专利权人 弗雷森纽斯医疗护理德国有限责任公司
地址 德国巴特洪堡

(72)发明人 M.B.赫雷拉桑切斯 V.方萨托 C.特塔 G.卡姆西

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 杜艳玲 万雪松

(51)Int.Cl.
A61K 38/20(2006.01)
A61P 39/00(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)
A61K 38/18(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)

(56)对比文件
WO 0069449 A2,2000.11.23,权利要求部分以及5.6-5.8部分.
WO 2006126219 A1,2006.11.30,全文.
BANAS AGNIESZKA ET AL.IFATS Collection:In Vivo Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem cells after Tranplatation into Mice with Liver injury.《STEM CELLS》.2008,第26卷(第10期),全文.

审查员 王超

权利要求书1页 说明书29页 附图8页

(54)发明名称

肝祖细胞的条件培养基

(57)摘要

本发明属于再生医学领域。已经发现,非卵圆的多能肝祖细胞的条件培养基发挥组织再生作用。因此,不含细胞的条件培养基制品可用于治疗损伤和器官衰竭、优选肝和/或损伤或衰竭。

CN 103800895 B

1.一种药物组合物,其包含药学有效量的至少肝细胞生长因子(HGF)、白介素 6 (IL-6)、白介素 8 (IL-8)和10- 400 ng/ml的浓度的血管内皮生长因子(VEGF)的混合物,其中所述混合物另外包含药学活性量的巨噬细胞刺激蛋白(MSP)。

2.根据权利要求1的药物组合物,其中所述肝细胞生长因子(HGF)是在1-100 ng/ml的浓度,白介素 6 (IL-6)是在10- 200 ng/ml的浓度,白介素 8 (IL-8)是在等于或高于35 ng/ml的浓度。

3.根据权利要求1或2的药物组合物,其中所述巨噬细胞刺激蛋白(MSP) 是在1-100 pg/ml的浓度。

4.根据权利要求1至3中任一项的药物组合物,其从根据权利要求1至3中任一项的药物组合物浓缩了至少5倍。

5.根据权利要求1至3中任一项的药物组合物,其从根据权利要求1至3中任一项的药物组合物稀释了至少5倍。

6.根据权利要求1至5中任一项的药物组合物用于制备治疗肝损伤或衰竭的药物的用途。

7.根据权利要求6的用途,其中所述药物适合施用0.01-1 mg/kg的肝细胞生长因子(HGF)剂量、0.01-1 mg/kg的白介素 6 (IL-6)剂量、0.01-1 mg/kg的白介素 8 (IL-8)剂量、和任选的0.01-1 mg/kg的血管内皮生长因子(VEGF)剂量。

肝祖细胞的条件培养基

[0001] 本申请是国际申请日为2009年6月11日、国际申请号为PCT/EP2009/057232、进入国家阶段的申请号为200980131229.6、发明名称为“肝祖细胞的条件培养基”的PCT申请的分案申请。

[0002] 本发明属于生物药用制品和再生医学的领域。

[0003] 经证实，干细胞制品对人或动物组织发挥再生作用。测试生物人工肝支持物在治疗暴发性肝功能衰竭 (FHF)中的效能的临床试验，已经提供了一些有希望的结果，然而现有的装置尚未表现出对于常规用途而言足够的效能和可靠性，主要是由于缺乏在功能上稳定的人肝细胞来源(Kobayashi N, Okitsu T, Tanaka N. Cell choice for bioartificial livers. Keio J Med. 2003;52(3):151-7)。肝干细胞或甚至源自其它组织的干细胞，可以潜在地提供人肝细胞的替代来源。除了骨髓以外，干细胞存在于成体组织(诸如肝和中枢神经系统)中，且具有比以前已知的大很多的可塑性。

[0004] 经证实，在国际专利申请WO2006/126236中所述的人肝多能祖/干细胞经历向多种组织细胞类型的分化，并发挥器官再生作用。这些细胞源自表达肝细胞标记物的非卵圆的人肝多能祖细胞系。

[0005] 国际专利申请 WO2006/126236 还公开了分离上述能经历向多种细胞类型的分化的人肝多能祖/干细胞的方法，所述方法包括下述步骤:

[0006] (i)在细胞培养基中培养成体肝-衍生的人成熟肝细胞，直至成熟肝细胞死亡，并选择具有上皮样形态的存活细胞群；

[0007] (ii)通过在含血清、含葡萄糖、补加hEGF (人上皮生长因子)和bFGF (碱性成纤维细胞生长因子)并包含哺乳动物细胞生长必需的常见无机盐、氨基酸和维生素的培养基中培养，扩增具有上皮样形态的存活细胞群，

[0008] 且特别地，其中在有冷冻保护剂存在下，在含血清的培养基中冷冻成熟肝细胞，然后在根据步骤(i) 培养之前解冻。

[0009] WO2006/126236的人多能祖细胞(在专利说明书中指定为HLSC)及其制备方法通过引用完整地并入本文。

[0010] 经证实，间质干细胞(MSC)制品对组织发挥再生作用。例如，已知骨髓-衍生的间质干细胞通过分泌许多营养分子(包括可溶的胞外基质糖蛋白、细胞因子和生长因子)天然地支持血细胞生成。

[0011] 但是，干细胞制品的主要缺点是，在施用时造成免疫反应。某些干细胞制品甚至具有造成癌症的可能性。

[0012] Parekkadan 等人 (Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. PLoS ONE. 2007 Sep 26;2(9):e941)首次评估了不同的MSC-治疗，诸如递送条件培养基(CM)，以测试它们在诱发严重肝损伤的大鼠模型中的效能。在该文章中，给大鼠腹膜内地施用共2次D-半乳糖胺 (Gal-N)注射。在第二个研究(Van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW,

Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. Hepatology. 2008 Jan 24;47(5):1634-1643)中，Parekkadan的研究组研究了MSC-CM的全身输注是否会在急性损伤的肝中产生肝保护应答，具体地通过抑制细胞死亡和刺激修复程序。该研究组使用D-半乳糖胺诱导的亚致死方案，证实了在MSC-CM治疗后显著的存活益处和肝酶释放的阻止。

[0013] 考虑到干细胞治疗的上述缺点，再生医学领域中现有的非常有效的制品通常含有细胞的事实，是应当克服的一个技术问题。

[0014] 因而，本发明的目的是，提供这样的制品，其可有效地用作再生医学领域中的药物组合物，但是其不含有细胞，从而避免含有细胞、尤其是干细胞的现有制品所造成的缺陷。

[0015] 本发明的另一个目的是，提供制备药物组合物的方法，所述药物组合物在再生医学领域中是有效的，但是其不含有细胞，从而避免含有细胞、尤其是干细胞的现有制品所造成的缺陷。

[0016] 通过独立权利要求中定义的制品和方法，实现这些和其它目的。

[0017] 从属权利要求涉及本发明的优选实施方案。从属权利要求和独立权利要求的主题构成说明书的一个完整部分。

[0018] 使用暴发性肝功能衰竭 (FHF)的小鼠模型，发明人证实了通过培养肝祖细胞系(例如在WO2006/126236中公开的非卵圆的人肝多能祖细胞系)生成的无细胞的条件培养基(无细胞的CM)会对肝发挥再生作用。经证实，通过培养肝祖细胞系生成的无细胞的条件培养基 (无细胞的CM)在器官衰竭的治疗(尤其是肝和肾衰竭的治疗)中是有效的。令人惊奇地，还发现，肝祖细胞系-CM比在相同条件下制备的间质干细胞-CM明显更有效。

[0019] 具体地，在本说明书的实施例1所述的研究中，给6至7周龄的雄性SCID小鼠腹膜内注射500 μL含有0.125 μg LPS和18 mg D-半乳糖胺 (GalN)的盐水，以诱导FHF。在施用LPS和GalN 后30分钟、1和3小时后，给小鼠腹膜内注射3 ml条件培养基，其源自在旋转生物反应器中培养的HLSC。条件培养基的初步分析揭示大量细胞因子、趋化因子和生长因子。丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶的血清水平在损伤诱导后显著增加，且在注射条件培养基治疗6天后显著降低。另一方面，通过BrdU、PCNA和Tunel测定法评价的肝组织的组织病理学分析揭示了降低的细胞凋亡和坏死指数和组织形态的恢复。

[0020] 这些研究提供了HLSC-衍生的条件培养基在炎症治疗和器官再生中的潜在治疗应用的第一份实验证据。

[0021] 因而，本发明的第一个方面是由无细胞的条件培养基组成的制品，所述无细胞的条件培养基可通过培养肝祖细胞系、优选非卵圆的人肝多能祖细胞系、更优选在国际专利申请 WO2006/126236(其通过引用并入本文)中公开的非卵圆的人肝多能细胞系得到。

[0022] 包含有效量的上面定义的制品的药物组合物也落入本发明范围内。

[0023] 在下面，构成本发明主题的源自肝祖细胞系的无细胞的条件培养基将被称作“无细胞的HLSC-CM”。

[0024] 术语“HLSC”表示肝多能祖/干细胞系。优选地，术语“HLSC”表示非卵圆的肝多能细胞系，更优选地表示在WO2006/126236中公开的肝多能祖/干细胞系。更优选地，HLSC细胞系具有在WO2006/126236的权利要求1-10的任一项中定义的特征，和/或在WO2006/126236的

第7页表I中总结的特征。这些特征通过引用并入本文。

[0025] 构成本发明主题的无细胞的HLSC-CM适合原样或以浓缩形式用作药物组合物。浓缩形式被浓缩了例如至少约5倍、优选至少约10倍、更优选至少约20倍、甚至更优选约25倍。

[0026] 优选地，从在技术人员已知的GMP条件下培养的肝多能祖/干细胞、优选在WO2006/126236中公开的HLSC 细胞系，得到本发明的无细胞的HLSC-CM。或者，从在技术人员也已知的BAL（生物人工肝）系统中培养的肝多能祖/干细胞、优选在WO2006/126236中公开的HLSC 细胞系，可以得到它。

[0027] 用于培养肝多能祖/干细胞和收集其无细胞的条件培养基(CM)的GMP条件的一个实例如下。

[0028] 通过在WO2006/126236中公开的方法，分离肝多能祖/干细胞，其中通过在有胎牛血清(FCS)(优选在约10%的浓度)、hEGF（人上皮生长因子)和bFGF（碱性成纤维细胞生长因子)存在下培养祖干细胞，进行所述扩增步骤。FCS、bFGF和hEGF优选地是GMP级，例如由Invitrogen生产的那些。

[0029] 为了在GMP条件下收集条件培养基，从培养物去除FCS，因为这是不适合注射进人的异源蛋白。为此，洗涤细胞，并在收集培养基(例如，由添加了GMP级人白蛋白的α-MEM组成)中培养24小时。白蛋白优选地在约0.05 %的浓度。然后通过离心或过滤，收集无细胞的条件培养基。

[0030] 在上述体内实验中，证实了本发明的无细胞的HLSC-CM向暴发性肝功能衰竭(FHF)的动物模型(SCID小鼠)的施用，会提供显著胜过用MSC-CM处理过的SCID小鼠的存活益处。

[0031] 因而，本发明的另一个方面是用作药物的无细胞的条件细胞培养基，其可通过培养肝祖细胞系、优选非卵圆的人肝多能祖细胞系、甚至更优选在国际专利申请 WO2006/126236中公开的非卵圆的人肝多能细胞系得到。

[0032] 根据一个优选的实施方案，所述药物用于治疗器官衰竭和/或损伤、优选肝和/或肾衰竭和/或损伤。

[0033] 另外，发明人分析了本发明的无细胞的HLSC-CM的组成，以便鉴别更可能为上述CM的有益效果提供重要贡献的那些蛋白(例如细胞因子、趋化因子、生长因子和/或其它蛋白)，从而提供由蛋白混合物组成的简化的药物组合物，所述蛋白混合物能至少部分地模仿通过如上所述培养HLSC生产的CM的器官再生能力。

[0034] 因而，本发明的另一个方面是简化的药物组合物，其包含药学有效量的至少肝细胞生长因子(HGF)、白介素 6 (IL-6)和白介素 8 (IL-8)的混合物。

[0035] 在一个优选的实施方案中，所述简化的药物组合物包含药学有效量的至少肝细胞生长因子(HGF)、白介素 6 (IL-6)、白介素 8 (IL-8)和血管内皮生长因子(VEGF)的混合物。

[0036] 在另一个优选的实施方案中，所述简化的药物组合物包含药学有效量的至少肝细胞生长因子(HGF)、白介素 6 (IL-6)、白介素 8 (IL-8)和巨噬细胞刺激蛋白(MSP)和任选的血管内皮生长因子(VEGF)的混合物。

[0037] 在另一个优选的实施方案中，所述简化的药物组合物包含药学有效量的根据上面定义的实施方案中的任一个的蛋白和至少一种选自下述的其它蛋白的混合物：激活素C、激

活的白细胞粘附分子(ALCAM)、趋化因子(C-C 基序) 受体 4 (CCR4)、富含半胱氨酸的跨膜BMP调节剂1 (chordin-样) (CRIM)、核心蛋白多糖、Ectodysplasin A2 (EDA-A2)、内皮缩血管肽、成纤维细胞生长因子受体-样1 (FGF R5)、磷脂酰肌醇聚糖 3、生长-相关的癌蛋白(GRO)、胰岛素-样生长因子结合蛋白 6 (IGFBP-6)、胰岛素-样生长因子1 (IGF-1)、白介素 20 受体、α (IL-20 R α)、含有三环域(kringle)的跨膜蛋白 2 (Kremen-2)、潜在转化生长因子β结合蛋白 1 (潜在TGF-β bp1)、晶状体纤维的主要内在蛋白(MIP-2)、MSP β-链、骨保护素/ TNFRSF11B (肿瘤坏死因子受体超家族、成员11b)、可溶的gp130 (sgp130)、富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白(骨结合素) (SPARC)。

[0038] 本发明的简化的药物组合物中的优选细胞因子浓度范围如下:

[0039] - HGF: 1-100 ng/ml,优选5-80 ng/ml,更优选10-65 ng/ml;

[0040] - IL-6: 10-200 ng/ml,优选20-100 ng/ml,更优选30-50 ng/ml;

[0041] - IL-8: ≥ 35 ng/ml,优选50-600 ng/ml,更优选100-300 ng/ml;

[0042] - VEGF (如果存在的话): 10-400 ng/ml,优选20-250 ng/ml,更优选35-175 ng/ml;和

[0043] - MSP (如果存在的话): 1-100 pg/ml,优选5-80 pg/ml,更优选5-65 pg/ml。

[0044] 但是,本发明的范围还包括简化的药物组合物的任意稀释或浓缩形式。浓缩形式是浓缩了例如至少约5倍、优选至少约10倍、更优选至少约20倍、甚至更优选约25倍。稀释形式是稀释了例如至少约5倍、优选至少约10倍、更优选至少约20倍、甚至更优选至少约25倍。

[0045] 本发明的简化的药物组合物适合用作药物,具体地用于治疗器官衰竭和/或损伤、优选肝和/或肾衰竭和/或损伤。根据一个优选的实施方案,配制药物组合物,以便施用下面的细胞因子剂量:

[0046] - HGF: 0.01-1 mg/kg,优选0.03-0.8 mg/kg,更优选0.1-0.5 mg/kg;

[0047] - 白介素 6 (IL-6): 0.01-1 mg/kg,优选0.03-0.8 mg/kg,更优选0.05-0.5 mg/kg;

[0048] - 白介素 8 (IL-8): 0.01-1 mg/kg,优选0.02-0.8 mg/kg,更优选0.03-0.5 mg/kg;

[0049] - VEGF (如果存在的话): 0.01-1 mg/kg,优选0.02-0.8 mg/kg,更优选0.04-0.5 mg/kg;

[0050] - MSP (如果存在的话): 0.01-1 mg/kg,优选0.02-0.8 mg/kg,更优选0.08-0.5 mg/kg。

[0051] 在一个特别优选的实施方案中,这些细胞因子剂量每天施用1次。

[0052] 应当理解,上面定义的简化的药物组合物,纯粹作为能至少部分地模仿可通过如上所述培养HLSC得到的CM的器官再生能力的简化的药物组合物的非限制性实例予以提供。

[0053] 从纯粹作为作为例证予以提供的下述实施例,将更清楚地看出本发明的其它目的和优点。

[0054] 还应当理解,基于下文提供的实施例,可以预见到要求保护的药物组合物和方法的其它实施方案,而不脱离本发明的范围。

[0055] 实施例 1 - 初步体内试验

[0056] HLSC和MSC细胞培养物的制备

[0057] 如WO2006/126236所述，分离人肝祖细胞(HLSC)。将细胞培养至60%-70%汇合(约2 × 10^6 HLSC/75-cm^2 烧瓶)，彻底洗涤，并在10 mL添加了0.05%人血清白蛋白 (GMP生产)的无血清的α-MEM培养基中培养。如以前报道的，从骨髓抽吸物分离人间质干细胞 (MSC)，培养，并表征。在MesenPRO RS™培养基中培养MSC，所述MesenPRO RS™培养基是为了支持MSC生长而专门配制的减少血清(2% FCS)的培养基。

[0058] 条件培养基的制备

[0059] 通过离心收集培养MSC和HLSC 24小时后的培养基，制备无细胞的条件培养基。使用2×10^6 细胞的细胞群，进行该实验。然后，使用具有3 kDa分子量截止的超滤单元(Amicon Ultra-PL 3, Millipore)，将培养基浓缩约25倍。得到共250 μl 条件培养基。在3 ml α-MEM (不含FCS)中稀释该浓缩的培养基，至终体积3 ml。在诱导肝损伤后30分钟、1和3小时，腹膜内地施用1 ml 条件培养基。

[0060] FHF体内模型

[0061] 为了诱导暴发性肝功能衰竭 (FHF)，如前所述(Lehmann V, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal toxicity of ipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. J Exp Med. 1987;165(3):657-63)，开发了脂多糖 (LPS)对用D-半乳糖胺 (2-氨基-2-脱氧-D-半乳糖)处理的动物的致死毒性。简而言之，一组10只SCID小鼠接受D-半乳糖胺 (GalN) (600 mg/kg)和每只动物0.125 μg LPS的腹膜内注射。发明人以前测得，在8小时内在GalN (600 mg/kg)和LPS (每只动物0.125 μg)处理的小鼠中诱发100%致死率。作为在500 μl 无热原的 NaCl 溶液中的混合物，施用GalN和LPS。记录死亡，直到注射后24小时。在LPS和GalN注射后30分钟、1和3小时，给小鼠腹膜内地注射3次1ml HLSC和MSC浓缩的条件培养基。如图1所示，5只注射HLSC-衍生的CM的小鼠中的4只存活，而用MSC-衍生的CM处理的小鼠都没有存活。

[0062] HLSC和MSC 条件培养基的细胞因子组成

[0063] 为了研究如上所述通过培养 HLSC和MSC得到的条件培养基的组成，通过多重ELISA (Bioclarma)，测量了31种不同细胞因子的集合。在含有10% FCS的培养基中培养两种细胞类型。在培养24小时后，收集条件培养基。还测量了单独的培养基的细胞因子组成。结果提供在下面的表1中。

[0064] 表 1. HLSC相对于MSC: 细胞因子生产*

[0065]

	HLSCs	MSCs	10% FCS 培养条件
IL1β	0	0	0.86
ILra	0	0	0
IL-2	0	0	0
IL-4	0	0	0.73
IL-5	0	0	0
IL-6	1130.89	2434.4	0
IL-7	0	0	0
IL-8	>4205.64	51.65	0.36
IL-9	0	0	0
IL-10	0.12	0.36	0.85
IL-12	0	0.47	0.24
IL-13	0	0	0
IL-15	0	0	0
IL-17	0	0	0
嗜酸性粒细胞趋化因子	5.1	3.96	0
bFGF	0	0	0
G-CSF	43.17	11.06	0
GM-CSF	1.75	0	0.03
IFNγ	38.46	104.73	0
IP-10	0	0	0
MCP-1	514.43	256.03	0
MIP-1α	0	0	0
MIP-1β	0	0	0
PDGF	0	0	0
Rantes	5.97	0	0
TNFα	3.7	13.04	0.19
VEGF	896.9	4961.43	0
HGF	5179	2.3	0
M-CSF	17.79	4.48	0
MIF	159.26	32.51	5.29
SCF	5.1	0.11	0

[0066] *（细胞因子浓度表示为pg/ml x 10^6个在10% FCS培养条件中培养24小时的HLSC和MSC细胞）

[0067] 实施例 2 - 从T-烧瓶培养物得到的HLSC和MSC-CM和蛋白混合物在(FHF)的D-半乳糖胺/内毒素体内模型中的作用

[0068] 在暴发性肝功能衰竭 (FHF)的体内模型 (SCID小鼠)中进行下面的实验研究。

[0069] 1) 第一个实验方案是腹膜内注射1ml从HLSC T-烧瓶培养物得到的25倍浓缩的上清液。用3KD膜(Millipore)实现25倍浓缩。在使用前，对上清液进行超速离心。在D-GalN/LPS注射诱导FHF后30分钟、1小时和3小时，施用注射。共处理12只SCID小鼠。

[0070] 2) 第二个实验方案是注射细胞因子混合物。给共10只SCID小鼠注射下述重组细胞因子混合物。HGF: 870.75 ng/ml X 30 ml α-MEM (静脉内注射)= 26 μg IL-6: 340.5 ng/ml X 30 (静脉内注射)= 10.4 μg IL-8: 261 ng/ml X 30 (静脉内注射)= 8 μg VEGF:202 ng/ml X 30 (静脉内注射)= 6 μg。制备30 ml该混合物，以便使共10只 SCID小鼠各自具有3 ml 混合物。在GALN/LPS 腹膜内注射后30分钟、1小时和3小时，给每只SCID小鼠注射1 ml该细胞因子混合物。每只SCID小鼠接受:[HGF]: 2.59 μg, [IL-6]: 1.02 μg , [IL-8]: 0.79 μg, [VEGF]: 0.6 μg。该混合物指定为MIX4。

[0071] 3）第三个实验方案是注射MIX4+MSP-1。共注射5只SCID小鼠。每只SCID小鼠接受：[HGF]: 2.59 μg ，[IL-6]: 1.02 μg ，[IL-8]: 0.79 μg ，[VEGF]: 0.6 μg（它们是从BAL实验得到的细胞因子的浓度)+[MSP-1]: 2 ug。

[0072] 4）第四个实验方案是注射MSC-CM或HLSC-CM。为了得到MSC-CM，将MSC培养至90%汇合(约2 × 10^6 MSC/75-cm^2 烧瓶)，彻底洗涤，并在10 mL MesenPRO RS™、2% FCS培养基中培养。24小时后收集条件培养基，并使用具有3-kDa截止的超滤单元(Millipore, Bedford, MA)浓缩25倍。为了生产HLSC-CM，将HLSC 培养至60%-70%汇合(约2 × 10^6 HLSC/75-cm^2 烧瓶)，彻底洗涤，并在10 mL补加0.05%人血清白蛋白 (GMP生产)的无血清的α-MEM培养基中培养。24小时后收集条件培养基，并使用具有3-kDa截止的超滤单元(Millipore, Bedford, MA)浓缩25倍。

[0073] 在这些实验中使用的SCID小鼠的平均重量是约25 g。

[0074] 材料和方法

[0075] FHF体内模型。为了FHF诱导，如前所述(Lehmann V, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal toxicity of ipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. J Exp Med. 1987;165(3):657-63)，开发了脂多糖(LPS)对用D-半乳糖胺 (2-氨基-2-脱氧-D-半乳糖)处理的动物的致死毒性。简而言之，SCID小鼠接受D-半乳糖胺 (GalN) (600 mg/kg，每只动物18mg)和每只动物0.125 μg LPS的腹膜内注射。发明人以前测得，在8小时内在GalN (600 mg/kg)和LPS (每只动物0.125 μg)处理的小鼠中诱发100%致死率。作为在500 μl 无热原的 NaCl 溶液中的混合物，施用GalN和LPS。记录死亡，直到注射后24小时。在LPS和GalN注射后30分钟、1和3小时，给小鼠腹膜内地注射1ml HLSC-条件培养基、MSC-条件培养基或细胞因子混合物。

[0076] 细胞培养。如以前报道的，从骨髓抽吸物分离人间质干细胞 (MSC)，培养，并表征。在MesenPRO RS™培养基中培养MSC，所述MesenPRO RS™培养基是为了支持MSC生长而专门配制的减少血清(2% FCS)的培养基。在第3-5代期间，将细胞用于实验。

[0077] MSC-条件培养基(CM)制备。如前所述，培养人MSC，并表征表面标记表达和脂肪形成和骨形成分化能力。为了得到MSC-CM，将细胞培养至90%汇合(约2 × 10^6 MSC/75-cm^2 烧瓶)，彻底洗涤，并在10 mL MesenPRO RS™、2 % FCS培养基中培养。24小时后收集条件培养基，并使用具有3-kDa截止的超滤单元(Millipore, Bedford, MA)浓缩25倍。

[0078] HLSC-CM制备。从冷冻的人肝细胞得到人HLSC。如前所述，培养HLSC，并表征表面标记表达和分化能力。为了得到HLSC-CM，将细胞培养至60%-70%汇合(约2 × 10^6 HLSC/75-cm^2 烧瓶)，彻底洗涤，并在10 mL补加0.05%人血清白蛋白 (GMP生产)的无血清的α-MEM培养基中培养。24小时后收集条件培养基，并使用具有3-kDa截止的超滤单元(Millipore, Bedford, MA)浓缩25倍。

[0079] 条件培养基的浓缩：培养24小时后，从T-烧瓶收集上清液。然后使用来自Millipore的具有3 KDa 分子量截止的超滤单元，将上清液浓缩约25倍。

[0080] 组织学分析: 通过H&E 染色 (苏木素和曙红染色)、增殖 (PCNA 染色)和TUNEL(凋亡细胞)，分析肝的坏死。

[0081] 生化分析。使用标准的临床自动分析仪，测量血清丙氨酸转氨酶 (ALT)和天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平。

[0082] 蛋白印迹：进行蛋白印迹，以检测BAX和BclXS/L。将肝匀浆化，并在4℃在裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 1% Triton X-100, 10 μmol/L苯基甲基磺酰基氟化物, 10 μmol/L亮抑蛋白酶肽，和100 U/ml 抑酶肽)中裂解1小时，在15,000 g离心。通过Bradford方法，测量上清液的蛋白含量。在还原条件下，对含有200 μg肝裂解物蛋白的等分试样进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，并电印迹到硝酸纤维素膜滤器上。用在20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5、500 mmol/L NaCl+0.1%吐温(TBS-T)中的5%去脂乳封闭印迹。随后在4℃用在适当浓度的有关第一抗体对膜免疫印迹过夜。用TBS-T充分洗涤后，在室温与过氧化物酶-缀合的同种型-特异性的第二抗体一起温育印迹1小时，用TBS-T洗涤，用ECL检测试剂显影1分钟，并暴露于X-Omat胶片。使用下述抗体：来自Santa Cruz Biotechnology的抗-BAX 单克隆抗体和抗- BclXS/L多克隆抗体。

[0083] 结果

[0084] 得到的结果如图2-4所示。

[0085] 图2显示了用HLSC-CM (n=22; 73%存活)、MSC-CM (n=5; 0%存活)或用细胞因子混合物(细胞因子: VEGF、IL6、IL8、HGF; n=10; 40%存活)和细胞因子混合物+MSP-1(细胞因子*: VEGF、IL6、IL8、HGF +MSP-1; n=5; 100%存活)处理的GalN/LPS损伤的-SCID小鼠的存活率(%)。

[0086] 图3显示了对照、GalN/LPS和GalN/LPS处理过的小鼠的天冬氨酸转氨酶 (AST)和丙氨酸转氨酶 (ALT)血清水平，所述小鼠在FHF诱导6天后注射HLSC-CM。

[0087] 图4的照片显示了在FHF诱导3和6天后注射HLSC-CM的GalN/LPS处理过的SCID小鼠的H&E和PCNA染色。

[0088] 实施例 3 -使用HLSC-和MSC-条件培养基(CM)和细胞因子混合物的体外实验

[0089] 在该实验方案中，研究了HLSC-CM的直接抑制培养的人原代肝细胞的细胞凋亡的能力。使用细胞凋亡的体外试验，证实了源自HLSC的条件培养基会对肝细胞死亡发挥直接的抑制作用。还将该体外活性与MSC-CM的体外活性进行了对比。还在人肝细胞凋亡试验中研究了在该细胞生产的条件培养基中存在的6种人重组细胞因子的作用。

[0090] 材料和方法

[0091] 细胞培养。如以前报道的，从骨髓抽吸物分离人间质干细胞 (MSC)，培养，并表征。在MesenPRO RS™培养基中培养MSC，所述MesenPRO RS™培养基是为了支持MSC生长而专门配制的减少血清(2% FCS)的培养基。在第3-5代期间，将细胞用于实验。如前所述，分离人肝祖细胞 (HLSC)，并在补加4ng/ml hEGF和hFGF的含有10 % FCS (GMP; 胎牛血清)的α-MEM/EBM (3:1)中培养。

[0092] MSC-条件培养基 (CM)。如前所述，培养人MSC，并表征表面标记表达和脂肪形成和骨形成分化能力。为了得到MSC-CM，将细胞培养至90%汇合(约2 × 10^6 MSC/75-cm^2 烧瓶)，彻底洗涤，并在10 mL MesenPRO RS™、2 % FCS培养基中培养。24小时后收集条件培养基，进行超速离心，并使用具有3-kDa截止的超滤单元(Millipore, Bedford, MA)浓缩25倍。

[0093] HLSC-CM。从冷冻的人肝细胞得到人HLSC。如前所述，培养HLSC，并表征表面标记表达和分化能力。为了得到HLSC-CM，将细胞培养至60%-70%汇合(约2 × 10^6 HLSC/75-cm^2 烧瓶)，彻底洗涤，并在10 mL补加0.05%人血清白蛋白 (GMP生产)的无血清的α-MEM培养基中培养。24小时后收集条件培养基，进行超速离心，并使用具有3-kDa截止的超滤单元

(Millipore, Bedford, MA)浓缩25倍。

[0094] 体外肝细胞凋亡(TUNEL)。在纤连蛋白包被的平板中,以30000 细胞/孔,在96-孔平板中培养肝细胞1天。以5 mM的浓度,加入半乳糖胺-D 24小时,随后加入不同剂量的如前所述得到的源自HLSC和MSC的条件培养基(从0.5%到16%)、4种细胞因子的混合物(MIX4代表IL-8、IL-6、HGF、VEGF)。将结果表示为8个不同实验的平均值± 标准差。

[0095] 细胞因子浓度。在体外实验中使用的人重组细胞因子的浓度选自浓缩25倍的HLSC在烧瓶培养条件中24小时后生产的浓度。在MSP的情况下,使用在BAL培养条件中得到的浓度。第一个浓度视作与条件培养基储液相同,然后用16%的每种储液浓度刺激细胞,所述浓度代表在体外使用的条件培养基的最高浓度。

[0096] IL-6=56.5 ng/ml,使用的终浓度 = 9 ng/ml

[0097] IL-8=210 ng/ml,使用的终浓度= 33.6 ng/ml

[0098] HGF=259 ng/ml,使用的终浓度 = 41.4 ng/ml

[0099] VEGF= 44.8 ng/ml,使用的终浓度= 7.2 ng/ml

[0100] MCP-1= 25.7 ng/ml,使用的终浓度 = 4.1 ng/ml

[0101] MSP= 60 ng/ml,使用的终浓度= 9.6 ng/ml

[0102] 结果如图5-10所示。

[0103] 图5显示了低浓度的HLSC-CM的肝细胞凋亡体外抑制。在纤连蛋白包被的平板中培养原代人肝细胞。用D-半乳糖胺 (GalN) 诱导细胞凋亡。在暴露于GalN期间,在补加0.5%、2%、8%或16%的25倍浓缩的HLSC-CM (GMP生产)的细胞培养基中培养肝细胞。使用每个孔4张图像的数字图像分析,定量细胞死亡。显示的数据是8个实验的平均值±标准差。P <0.05。

[0104] 图6显示了GalN-处理的人肝细胞的TUNEL试验的代表性显微照片。(A) 24小时后的5 mM GalN-处理的肝细胞,和(B) 24小时后用2 % HLSC-CM刺激的5mM GalN-处理的肝细胞。

[0105] 图7显示了低浓度的MSC-CM的体外肝细胞凋亡抑制。在纤连蛋白包被的平板中培养原代人肝细胞。用D-半乳糖胺 (GalN) 诱导细胞凋亡。在暴露于GalN期间,在补加0.5%、2%、8%或16%的25倍浓缩的MSC-CM的细胞培养基中培养肝细胞。使用每个孔4张图像的数字图像分析,定量细胞死亡。显示的数据是8个实验的平均值±标准差。P <0.05。

[0106] 图8显示了不同的细胞因子混合物的体外肝细胞凋亡抑制。在有D-半乳糖胺(GalN; 5 mM)存在下,培养人肝细胞24小时。将MIX4 + MSP施用于GalN-处理的肝细胞,导致24小时后细胞凋亡抑制。还与MIX4 + MCP-1一起,或与MIX4 + MSP + MCP-1的组合一起,培养用GalN处理过的肝细胞。使用每个孔4张图像的数字图像分析,定量细胞死亡。显示的数据是8个实验的平均值±标准差。*P <0.05。

[0107] 实施例 4 -通过多路和酶联免疫吸附试验分析CM组成

[0108] 已经证实,人肝干细胞 (HLSC)生产进培养基中的可溶性细胞因子会增强肝愈合。为了进一步阐明涉及的机理,测定了由HLSC释放的细胞因子,并与由人骨髓间质干细胞(MSC)生产的细胞因子进行了对比。通过不同细胞培养条件(诸如滚瓶、在正常含氧量条件下的T-烧瓶和在低含氧量条件下的T-烧瓶)下条件培养基的生产,扩展了分泌的细胞因子的特性的分析。在MSC的情况下,仅在正常含氧量培养条件下的T-烧瓶中培养细胞。得到共16种不同的条件培养基。用多路系统(来自Bio-rad)对培养24小时的HLSC和MSC生产的条件

培养基进行的所有分析，指示细胞因子和趋化因子的存在，诸如大量的HGF、IL6、IL8、VEGF、MCP1以及其它，共31种不同的蛋白。还通过ELISA(IL-6、IL-8、HGF、VEGF、MCP1和MSP1)评估了用于Bio-Rad人多路试验的几种抗体。根据生产商的说明书，使用RayBio ®人ELISA试剂盒进行ELISA。发明人还对比地评估了多路和酶联免疫吸附试验(ELISA)。所述对比是基于在生产的16种不同的条件培养基中存在的6种细胞因子的测量。通过不同的试剂盒测量的细胞因子浓度表现出类似的趋势，尽管测得的绝对浓度是不同的。

[0109] 材料和方法

[0110] 细胞培养

[0111] HLSC。如前所述分离人肝祖细胞 (HLSC)，并在补加4 ng/ml rhEGF和rhFGF的含有10 % FCS (GMP; 胎牛血清)的α-MEM/EBM (3:1)中培养。

[0112] 在用培养24小时的HLSC进行的所有实验中，用于条件培养基(CM)收集的最初细胞接种和培养基组成如下所述。

[0113] - 2个实验使用在滚瓶中培养的第3代细胞：在100 ml RPMI + 0.05%人白蛋白中的$20x10^6$ HLSC培养物

[0114] - 2个实验使用在滚瓶中培养的第10代细胞：在100 ml RPMI + 0.05%人白蛋白中的$20x10^6$ HLSC培养物

[0115] - 3个实验使用在正常含氧量条件下的T-烧瓶中培养的第3代细胞：在10 ml RPMI+ 0.05%人白蛋白中的$2x10^6$ HLSC培养物

[0116] - 3个实验使用在正常含氧量条件下的T-烧瓶中培养的第10代细胞：在10 ml RPMI+ 0.05%人白蛋白中的$2x10^6$ HLSC培养物

[0117] - 2个实验使用在低含氧量条件下的T-烧瓶中培养的第3代细胞：在10 ml RPMI+ 0.05%人白蛋白中的$2x10^6$ HLSC培养物

[0118] - 2 个实验使用在低含氧量条件下的T-烧瓶中培养的第10代细胞：在10 ml RPMI+ 0.05%人白蛋白中的$2x10^6$ HLSC培养物

[0119] hMSC。如以前报道的，从人骨髓抽吸物分离人间质干细胞 (hMSC)，培养，并表征。在MesenPRO RS™培养基中培养MSC，所述MesenPRO RS™培养基是为了支持MSC生长而专门配制的减少血清(2% FCS)的培养基。在第3代期间，将细胞用于实验。

[0120] 在用培养24小时的hMSC进行的实验中，用于条件培养基(CM)收集的最初细胞接种和培养基组成如下所述。

[0121] - 2个实验使用在正常含氧量条件下的T-烧瓶中培养的第3代细胞：在10 ml RPMI+ 0.05%人白蛋白中的$2x10^6$

[0122] CM的制备。如下得到HLSC-衍生的CM：以$2x10^6$的浓度，将细胞接种进T-烧瓶，并在培养箱中温育它们过夜。次日，彻底洗涤细胞，并在有0.05%人白蛋白存在下，在10 ml RPMI (不含酚红)中培养。24小时后，收集CM培养基，并在-20℃冷冻来自每个实验的所有等分试样。使用来自Millipore的具有3-kDa截止孔径的超滤单元，在4℃、2700 g离心1.30小时，浓缩CM。

[0123] 如下得到hMSC-衍生的CM：培养至90%汇合(约2×10^6 MSC/75-cm^2 烧瓶)，彻底洗涤，并在有0.05%人白蛋白存在下，在10 ml RPMI (不含酚红)中培养。24小时后，收集条件培养基，并在-20℃冷冻来自每个实验的所有等分试样。使用来自Millipore的具有3-kDa截

止孔径的超滤单元，在4℃、2700 g离心1.30小时，浓缩CM。

[0124] 收集CM后，取出细胞，通过锥虫蓝染料排除，评估细胞生存，在所有实验中得到超过95 %的生存力。

[0125] 总蛋白量化。按照生产商的手册，根据Bradford 方法(Bio-Rad Laboratories)，测定CM中的总蛋白浓度。使用牛血清白蛋白 (BSA) 建立标准参照。将5 μl每个样品加入1ml来自Bradford试剂的染料，用蒸馏水稀释1-5倍，并混合。在室温温育5 min后，用荧光光度计检测在595 nm可见光处的吸光度。根据线性化的 BSA吸光度曲线，计算来自每个样品的蛋白浓度。

[0126] ELISA。使用RayBio ®人ELISA (酶联免疫吸附测定)，进行IL-8、IL-6、VEGF、HGF、MCP1和MSP1的定量测量。该测定采用对提及的人细胞因子特异性的抗体，所述抗体包被在96-孔板上。将标准品和样品吸入孔中，在样品中存在的细胞因子被固定化的抗体结合到孔上。洗涤孔，并加入生物素化的抗-人细胞因子抗体。洗掉未结合的生物素化的抗体后，将HRP-缀合的抗生蛋白链菌素吸入孔中。再次洗涤孔，将TMB底物溶液加入孔中，与结合的细胞因子的量成比例地显色。停止溶液使颜色从蓝色变成黄色，在450 nm测量颜色的强度。

[0127] Bioclarma测定。使用来自Bio-rad的多路生物测定免疫测定，其含有用对靶蛋白特异性的单克隆抗体缀合的荧光染色的微球体，根据生产商的说明书 (Bio-Plex人细胞因子测定; Bio-Rad)，进行细胞因子测量。测定下述细胞因子: IL-1β、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、CXCL8 (IL-8)、IL-9、IL-10、HGF、M-CSF、MIF、SCF、PDGF、Rantes、VEGF、嗜酸性粒细胞趋化因子、bFGF、IP-10、IFNγ、IL-12 (p70)、IL-13、IL-15、IL-17、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、单核细胞化学吸引蛋白(MCP-1)、巨噬细胞炎性蛋白 (MIP-1β/CCL4)、MIP-1α和TNF-α。

[0128] 简而言之，与抗体-偶联的珠子一起温育250 μl未稀释的CM。洗涤复合物，然后与生物素化的检测抗体一起温育，最后与抗生蛋白链菌素-藻红蛋白一起温育，然后评估细胞因子浓度滴度。使用范围为1.95-40.000 pg/ml的重组细胞因子，建立标准曲线，并使灵敏度和测定动态范围最大化。使用来自Luminex™ Instrumentation System的多路阵列读数器，测定细胞因子水平。使用生产商提供的软件，计算浓度。得到的结果如下面的表2-8所示。

[0129] 表2. 24小时后收获的细胞的数目

[0130]

细胞	24 h后的细胞数量
hLSC，滚瓶，第3代	$4,25 \pm 0,49 \times 10^6$
hLSC，滚瓶，第10代	$2,3 \pm 2,1 \times 10^6$
hLSC，低氧，第10代	$1,82 \pm 0,74 \times 10^6$
hLSC，低氧，第3代	$1,04 \pm 0,88 \times 10^6$
hLSC，正常氧，第10代	$2,56 \pm 0,79 \times 10^6$
hLSC，正常氧，第3代	$1,70 \pm 0,18 \times 10^6$
正常氧，MSC，第3代	$2,35 \pm 0,78 \times 10^6$

[0131] 表 3. 培养24小时后和用Amicon过滤器浓缩后的CM中的蛋白浓度

[0132]

CM来源：	CM中的蛋白浓度 (mg/ml) ±SD	Amicon浓缩后CM中的蛋白浓度 (mg/ml) ±SD
HLSC，滚瓶，第3代	0,36 ± 0,004	7,405 ± 0,106
HLSC，滚瓶，第10代	0,335 ± 0,021	7,37 ± 0,141
HLSC，低氧，第10代	0,315 ± 0,021	7,68 ± 0,396
HLSC，低氧，第3代	0,31 ± 0,013	7,55 ± 0,707
HLSC，正常氧，第10代	0,29 ± 0,012	7,18 ± 0,490
HLSC，正常氧，第3代	0,28 ± 0,078	7,72 ± 0,132
正常氧，MSC，第3代	0,23 ± 0,042	7,75 ± 0,276

[0133] 表 4. 通过多路 (Bioclarma)测得的细胞因子浓度(pg/ml) (pg/ml ±SD)

[0134]

细胞因子	常氧，第3代 HLSC	常氧，第10代 HLSC	低氧，第10代 HLSC	低氧，第3代 HLSC	正常氧，第10代 HLSC	正常氧，第3代 HLSC	正常氧，第3代 MSC
IL1β	22 ± 0,14	34 ± 13	30,8 ± 19,8	83,4 ± 32,5	17,1 ± 9,9	51,8± 35,9	7,5± 2,6
IL1a	96 ± 0,32	87 ± 5	99,8 ± 26,5	163,4 ± 31,9	86,1 ± 7,9	91,7±32,6	596±404
IL-2	0	0	0	0	0	0	0
IL-4	2,6±0,02	2,8 ± 0,05	2,9 ± 1,1	4,8 ± 0,9	2,4 ± 0,3	2,4±1,3	2 ± 1,4
IL-5	0	0	0	0	0	0	0
IL-6	>40000	>40000	>40000	>40000	>40000	>40000	>40000
IL-7	0	4,4 ± 2,5	8,4 ± 2,4	24,1 ± 7,9	7,4 ± 3,7	18,5± 9	7,6±1,6
IL-8	>35000	>35000	>35000	>35000	>35000	>35000	>35000
IL-9	52 ± 0,8	42 ± 3,6	32,7 ± 12,4	41,9 ± 15,2	24,6 ± 7,7	26,1±4,8	27,9±3,0
IL-10	32 ± 3,9	33 ± 5,5	32,9 ± 0,1	36 ± 4,2	28,5 ± 3,7	31,3±1,3	35,6±7,9
IL-12	59,1± 11	52,8 ± 11,6	56,7 ± 8,7	74 ± 6,6	56 ± 8,1	41,1±17	36,6±13
IL-13	9,2 ± 2,2	7,7 ± 0,8	5,6 ± 2,1	7,8 ± 3,4	4,4 ± 2,0	2,2±1	4,9±1,3
IL-15	93,3± 9,8	87,1 ± 8,3	94,6 ± 5,6	95,9 ± 13,4	93,9± 10,7	81,8±9,7	64,5±22
IL-17	0	0	0	0	0	0	0
趋化因子	81,3± 19	359 ± 227	2350 ± 532	2748 ± 76	1932 ± 133	2417±453	21±17
bFGF	49,8±3,9	79 ± 14	30,1 ± 5,6	23,5 ± 2,8	44 ± 59	22,1±26	6,7±9,2
G-CSF	1150±149	1714± 183	1371 ±1670	16275 ± 8389	490 ± 468	2188±921	359,3±212
GM-CSF	47 ± 0,8	37,4 ± 5,6	49,5 ± 2,4	59 ± 51	38,8 ± 3,8	60,4±21	65±65

[0135]

IFNγ	156 ± 1,6	168 ± 10,1	171 ± 49,8	236 ± 27	147 ± 14,5	176,1±44	174,5±38
IP-10	0	54 ± 77	30 ± 42	61 ± 86	14,5 ± 25	283,5±132	28043,3±13513
MCP-1	?	?	5622 ± 2131	2999± 494	4614 ± 872	5647,9±2821	1410,5±767
MIP-1α	3,6 ± 1,4	2,1 ± 0,4	2,6 ± 0,2	2,8 ± 2,3	2,1 ± 0,5	5,8±0,5	12,5±1,1
MIP-1β	0	0	0	0	0	0	0
bbPDGF	0	0	0	0	0	0	0
Rantes	109 ± 28	328 ± 227	279 ± 210	909 ± 566	576 ± 522	118±24	1135±9310
TNFα	22 ± 2	24 ± 4	29 ± 4	40,5 ± 7,7	22 ± 2,5	24,6±6,7	30,2±5,3
VEGF	33817±6318	24814±1567	22591±7330	32286±4297	14830±3860	16664±10951	16485±3722
HGF	12238±1109	6674±2872	20901±1033	15508±1159	20842±3543	15853±4380	340±145
M-CSF	555 ± 39	256 ± 26	496 ± 177	538 ± 299	649 ± 628	548±33	173±65
MIF	35047±4014	45045±1835	30773±9632	24216±11108	24719±14645	17956±4115	10512±1367
SCF	119 ± 10	119 ± 64	209 ± 32	144 ± 31	265 ± 218	211±79	15,4±3,6

[0136] 表 5. 通过多路(bioclarma)测得的第3代HLSC和MSC生产的所有CM的浓度范围(pg/ml)(或特别指出的ng/ml)

[0137]

	HLSC	MSC
IL1β	15,9-87,7	4,9-10,1
ILra	59,1-124,3	192-1000
IL-2	0	0
IL-4	0-3,7	0-3,4
IL-5	0	0
IL-6	>40000	>40000
IL-7	6,7-27,9	6-9,2
IL-8	>35000	>35000
IL-9	21,3-30,9	19,8-30,9
IL-10	12,9-32,6	15-43,7
IL-12	20,9-58,1	21,9-49,6
IL-13	0-3,2	0-6,2
IL-15	57-91,4	25-109
IL-17	0	0
[illegible]	505-2870	10-38
bFGF	22-6055	0
G-CSF	1267-3109	11-571
GM-CSF	19,8-81,4	0-130
IFNγ	97-220	107-213
IP-10	152-416	0,9-41,6 (ng/ml)
MCP-1	1658-8500	600-2296
MIP-1α	5,3-13	11,4-90
MIP-1β	4,4-6,2	0-1000
bbPDGF	0	0
Rantes	94-142	124-20700
TNFα	17,9-31,3	24,9-35,5
VEGF	34,9-91 (ng/ml)	25,9-65,9 (ng/ml)
HGF	11,5-20,2 (ng/ml)	195-485
M-CSF	515-1072	91-238
MIF	9114-22100	8280-11900
SCF	128-290	9,9-19

[0138] 表 6. 通过RayBio ® 人ELISA测得的细胞因子浓度(pg/ml)

[0139]

细胞因子	缺氧，第3代 HLSC	缺氧，第10代 HLSC	低氧，第10代 HLSC	低氧，第3代 HLSC	正常氧，第10代 HLSC	正常氧，第3代 HLSC	正常氧，第3代 MSC
VEGF	154572±3903	121884±50131	153456±3479	132132±297	118708±16848	118936±56365	157896±4811
HGF	33822±823	24312±3971	90540±23215	49050±9631	88488±9267	51716±12211	0
MCP1	6383±98	6397±126	5966±9	5635±38	5823±319	5680±189	5497±465
MSP1	20,4±14,4	6,4±4,5	5,4±4,2	0	39,4±1,4	34,4±28	0
IL6	20604±453	27694±3493	28744±2008	33319±1732	27264±10578	37971±4381	30389±3444
IL8	180432±7682	183909±10799	191568±3311	189114±803	203349±13125	206652±14639	227796±12760

[0140] 表 7.通过ELISA测得的浓度范围

[0141]

细胞因子	HLSC	MSC
VEGF	63-175(ng/ml)	153-163(ng/ml)
HGF	39,5-64(ng/ml)	0
IL-6	33,6-42,3(ng/ml)	26,9-33,8(ng/ml)
IL-8	192-221(ng/ml)	215-240(ng/ml)
MCP1	5491-5869 (pg/ml)	5032-5962 (pg/ml)
MSP1	6,4-62,4 (pg/ml)	0

[0142] 表 8. 通过多路和ELISA测得的选择的细胞因子的浓度范围（ND: 未测出）

[0143]

细胞因子	HLSC	MSC	HLSC	MSC
VEGF	34,9-91 (ng/ml)	25,9-65,9 (ng/ml)	63-175 (ng/ml)	153-163 (ng/ml)
HGF	11,5-20,2 (ng/ml)	185-485 (pg/ml)	39,5-64 (ng/ml)	0
IL-6	>40 ng/ml	>40 ng/ml	33,6-42,3 (ng/ml)	26,9-33,8 (ng/ml)
IL-8	>35 ng/ml	>35ng/ml	192-221 (ng/ml)	215-240 (ng/ml)
MCP1	1658-8500 (pg/ml)	600-2296 (pg/ml)	5491-5869 (pg/ml)	5032-5962 (pg/ml)
MSP1	ND	ND	6,4-62,4 (pg/ml)	0

[0144] 来自HLSC 条件培养基的MSP-1的免疫沉淀和蛋白印迹

[0145] 通过免疫沉淀和蛋白印迹，测定HLSC培养上清液中的MSP-1。在4000 x g、在4℃，将15 ml培养24小时后的培养上清液离心70分钟，在Amicon 3KD超滤器上浓缩至250 μL。为

了沉淀蛋白，将1 ml冷的(-20℃)纯乙醇加入250 μl浓缩的上清液中，并在-80℃温育过夜。在1.200 g离心后，收集沉淀的蛋白，并用500 l RIPA缓冲液裂解。使用与蛋白 A-琼脂糖交联的抗-MSP 抗体 (R&D system)，免疫沉淀18小时。关于SDS-PAGE，将沉淀物悬浮于40 μL 2-β-巯基乙醇中，并在100℃加热。通过在8%丙烯酰胺凝胶中的SDS-PAGE，分离蛋白，转移至硝酸纤维素膜。用在含有0.05%吐温20的Tris-缓冲盐水中的5%脱脂奶粉封闭1小时后，与2 μg/ml 抗-人MSP 抗体一起在4℃温育膜过夜，洗涤3次后，与辣根过氧化物酶(BioRad)缀合的山羊抗-小鼠 IgG一起在室温温育1小时。用化学发光剂显示膜，并用chemidoc分析。

[0146] 结果如图9所示，显示了来自3个不同代(1、2、5)的HLSC的条件培养基的MSP的免疫沉淀。85-KDa带表示单体MSP (MSP原)，且55-KDa带表示二聚体(有活性的) MSP的α-链。

[0147] 实施例 5 -通过Raybio基于生物素标记的抗体阵列分析CM组成

[0148] 同时检测了源自HLSC和MSC CM的507种人靶蛋白的表达水平。如在蛋白阵列方案中所述，在有补加0.2% FCS的αMEM存在下培养$1x10^6$ 细胞48小时后，收集CM。分子集合包括细胞因子、趋化因子、脂肪因子(adipokine)、生长因子、血管生成因子、蛋白酶、可溶受体、可溶粘附分子、和细胞培养上清液中的其它蛋白。

[0149] 材料和方法

[0150] CM的制备。为了制备HLSC和MSC CM，以1 x 10^6 细胞/培养皿的密度，将细胞涂布在100 mm组织培养皿中。然后，用完全培养基培养细胞24-48小时。此后，将培养基替换为更低的血清(0.2% FCS)，然后再培养细胞48小时另外一次。收集CM，并在1000 g离心。渗析来自两类细胞的CM，然后进行生物素标记步骤。通过简单的过程，将样品中蛋白的伯胺生物素化，随后进行透析，以去除游离的生物素。然后，将新生物素化的样品添加到阵列膜上，并在室温温育。与HRP-抗生蛋白链菌素一起温育后，通过化学发光显示信号。在该阵列中，使用内部对照来监测整个过程，包括生物素-标记和抗体阵列。用RayBio分析工具分析结果，所述RayBio分析工具是为RayBio基于生物素标记的抗体阵列的分析特别设计的程序。关于该试验的其它细节，可以参见RayBio®基于生物素标记的人抗体阵列I用户手册。

[0151] 图10显示了来自HLSC (A)和MSC-衍生的上清液(B)的RayBio基于生物素标记的人阵列图谱。

[0152] 在下面的表9中，总结了RayBio基于生物素标记的抗体阵列试验的完整结果。

[0153] 表 9

[0154]

蛋白	HLSC（聚度计分析）	HLSC/MSC 比
6Ckine	6,11	2,06
激活素A	6,54	2,16
激活素B	5,42	2,18
激活素C	7,27	2,56
激活素 RIA / ALK-2	5,63	2,18
激活素 RIB / ALK-4	5,27	1,95
激活素 RII A/B	5,18	1,76
激活素 RIIA	5,28	1,71
脂联素 / Acrp30	5,57	1,48
AgRP	5,67	1,59
ALCAM	10,30	2,62
血管生成素	9,40	2,38
血管生成素-1	6,45	1,45
血管生成素-2	5,92	1,48
血管生成素-4	5,62	1,40
血管生成素-样1	5,76	1,36
血管生成素-样2	6,51	1,51
血管生成素-样因子	6,26	1,53
血管生成抑制因子	6,90	1,66
APJ	6,00	1,40
AR（双向调节因子）	6,34	1,47
APRIL	7,03	1,47
Artemin	7,30	1,52
Axl	8,83	1,70

[0155]

B7-1 /CD80	9,33	1,66
BAFF R / TNFRSF13C	9,12	1,48
BCMA / TNFRSF17	4,68	1,79
BD-1	4,64	1,77
BDNF	4,71	1,68
β-连环蛋白	4,23	1,61
β-防御素2	4,31	1,63
β-NGF	4,38	1,66
BIK	4,56	1,73
BLC / BCA-1 / CXCL13	4,36	1,56
BMP-2	4,25	1,50
BMP-3	4,43	1,43
BMP-3b / GDF-10	4,34	1,43
BMP-4	4,60	1,41
BMP-5	4,46	1,40
BMP-6	4,47	1,34
BMP-7	4,44	1,31
BMP-8	4,87	1,31
BMP-15	4,74	1,33
BMPR-IA / ALK-3	5,30	1,49
BMPR-IB / ALK-6	6,35	1,69
BMPR-II	5,76	1,59
BTC	5,71	1,61
心脏营养素-1 / CT-1	5,89	1,61
CCL14 / HCC-1 / HCC-3	5,92	1,50
CCL28 / VIC	6,67	1,57
CCR1	7,76	1,42
CCR2	9,00	1,63
CCR3	8,21	1,49
CCR4	8,04	3,02
CCR5	5,02	1,97
CCR6	5,59	2,08
CCR7	5,52	1,89
CCR8	4,43	1,51
CCR9	4,10	1,48
CD14	4,21	1,55
CD27 / TNFRSF7	3,94	1,50
CD30 / TNFRSF8	3,70	1,38
CD30 配体 / TNFSF8	4,28	1,40
CD40 / TNFRSF5	4,40	1,56
CD40 配体 / TNFSF5 /CD154	4,14	1,38
CD 163	3,69	1,33
Cerberus 1	3,86	1,29
Chem R23	3,59	1,22
Chordin-样1	3,62	1,14
Chordin-样2	3,74	1,16
Csk	5,97	1,51
CLC	4,23	1,20
CNTF	4,73	1,35
CNTF R α	4,51	1,29
凝固因子 III / 组织因子	4,70	1,38
CRIM 1	8,98	2,55
Cripto-1	5,26	1,50
CRTH-2	5,11	1,44

[0156]

Cryptic	5,65	1,59
CTACK / CCL27	6,33	1,66
CTGF / CCN2	6,97	1,77
CTLA-4 /CD152	10,38	2,31
CV-2 / Crossveinless-2	7,80	1,61
CXCL14 / BRAK	6,49	2,03
CXCL16	4,64	1,67
CXCR1 / IL-8 RA	4,56	1,61
CXCR2 / IL-8 RB	4,41	1,55
CXCR3	4,01	1,56
CXCR4 (融合素)	3,85	1,44
CXCR5 /BLR-1	3,84	1,41
CXCR6	3,92	1,40
D6	3,77	1,38
DAN	4,02	1,36
DANCE	3,78	1,38
DcR3 / TNFRSF6B	3,62	1,28
核心蛋白多糖	9,12	2,86
Dkk-1	4,35	1,36
Dkk-3	3,41	1,12
Dkk-4	3,50	1,09
DR3 / TNFRSF25	3,53	1,11
DR6 / TNFRSF21	4,20	1,25
Dtk	9,06	2,17
EDA-A2	237,46	2,94
EDAR	6,79	1,88
EDG-1	4,43	1,25
EGF	4,63	1,30
EGF R / ErbB1	4,69	1,31
EG-VEGF / PK1	5,03	1,34
EMAP-II	6,15	1,75
ENA-78	6,28	1,74
Endocan	8,34	2,14
内皮因子 / CD105	8,97	2,02
内皮糖	8,59	1,53
EN-RAGE	5,09	2,04
嗜酸性粒细胞趋化因子 / CCL11	4,52	1,77
嗜酸性粒细胞趋化因子-2 / MPIF-2	4,27	1,47
嗜酸性粒细胞趋化因子-3 / CCL26	4,24	1,52
表皮调节素	3,87	1,43
ErbB2	3,90	1,43
ErbB3	4,17	1,56
ErbB4	3,82	1,34
促红细胞生成素	4,16	1,26
E-选择素	3,79	1,33
内皮细血管脉	14,95	3,86
FADD	3,77	1,29
FAM3B	6,05	1,76
Fas / TNFRSF6	3,73	1,21
Fas 配体	3,61	1,11
FGF 碱性	3,67	1,08
FGF-BP	3,78	1,16
FGF R3	4,05	1,19
FGF R4	4,72	1,29

[0157]

FGF R5	17,21	2,92
FGF-4	4,68	1,30
FGF-5	4,05	1,13
FGF-6	4,27	1,16
FGF-7 / KGF	4,93	1,22
FGF-8	4,89	1,37
FGF-9	5,40	1,49
FGF-10 / KGF-2	5,74	1,56
FGF-11	6,19	1,66
FGF-12	8,68	1,98
FGF-13 18	7,74	1,60
FGF-16	5,31	1,77
FGF-17	3,91	1,37
FGF-18	4,00	1,44
FGF-19	3,88	1,37
FGF-20	3,67	1,33
FGF-21	3,88	1,42
FGF-23	3,90	1,22
FLRG	3,84	1,34
Flt-3 配体	3,69	1,32
滤泡抑素	5,33	1,58
滤泡抑素-样1	5,81	1,15
CXXC趋化因子	3,94	1,28
卷曲蛋白-1	3,88	1,23
卷曲蛋白-3	3,80	1,18
卷曲蛋白-4	3,78	1,21
卷曲蛋白-5	4,52	1,36
卷曲蛋白-6	5,46	1,62
卷曲蛋白-7	4,17	1,23
干扰素-3	5,86	1,56
GASP-1 / WFIKKNRP	5,03	1,44
GASP-2 / WFIKKN	4,39	1,20
GCP-2 / CXCL6	4,69	1,26
GCSF	5,57	1,52
G-CSF R / CD 114	4,68	1,26
GDF1	5,00	1,28
GDF3	6,38	1,77
GDF5	6,55	1,74
GDF8	6,08	1,58
GDF9	10,31	2,25
GDF11	8,84	1,70
GDF-15	4,64	1,34
GDNF	3,87	1,27
GFR α-1	3,67	1,25
GFR α-2	3,92	1,21
GFR α-3	4,09	1,39
GFR α-4	4,01	1,45
GITR / TNFRF18	3,80	1,33
GITR 配体 / TNFSF18	4,04	1,44
胰高血糖素	3,89	1,31
Glut1	3,61	1,23
Glut2	3,73	1,22
Glut3	3,87	1,25
Glut5	4,00	1,29

[0158]

磷脂酰肌醇聚糖 3	34,34	2,73
磷脂酰肌醇聚糖 5	5,27	1,48
GM-CSF	4,20	1,24
GM-CSF R alpha	4,37	1,28
粒酶A	4,92	1,41
GREMLIN	8,49	2,19
GRO	21,75	3,69
GRO-a	4,90	1,32
生长激素 (GH)	5,17	1,34
生长激素 R (GHR)	5,42	1,36
HB-EGF	5,37	1,46
HCC-4 / CCL16	4,91	1,33
HCR / CRAM-A/B	5,09	1,39
Hepassocin	6,08	1,61
调蛋白 / NDF / GGF / 神经调节蛋白	6,08	1,45
HGF	15,29	3,38
HGFR	6,53	1,31
HRG-α	4,47	1,40
HRG-β 1	4,09	1,25
HVEM / TNFRSF14	4,06	1,24
I-309	3,67	1,25
ICAM-1	3,49	1,25
ICAM-2	3,28	1,16
ICAM-3 (CD50)	3,77	1,15
ICAM-5	3,49	1,24
IFN- α / β R1	3,50	1,19
IFN- α / β R2	3,52	1,18
IFN- β	3,66	1,19
IFN- γ	3,67	1,17
IFN- γ R1	3,89	1,22
IGFBP-1	4,95	1,39
IGFBP-2	13,69	2,11
IGFBP-3	6,11	1,66
IGFBP-4	5,90	1,64
IGFBP-6	27,78	4,59
IGFBP-rp1 / IGFBP-7	333,01	2,75
IGF-I	13,74	3,15
IGF-I SR	5,23	1,35
IGF-II	4,76	1,26
IGF-II R	6,57	1,69
IL-1 α	9,12	2,26
IL-1 β	4,87	1,30
IL-1 F5 / FIL1 δ	5,25	1,42
IL-1 F6 / FIL1 ε	7,50	1,79
IL-1 F7 / FIL1 ζ	5,73	1,37
IL-1 F8 / FIL1 η	5,91	1,25
IL-1 F9 / IL-1 H1	6,37	1,24
IL-1 F10 / IL-1HY2	4,26	1,19
IL-1 R3 / IL-1 R AcP	4,11	1,25
IL-1 R4 /ST2	4,29	1,33
IL-1 R6 / IL-1 Rrp2	3,69	1,21
IL-1 R8	3,32	1,13
IL-1 R9	3,32	1,07
IL-1 ra	3,36	1,11

[0159]

IL-1 sRI	3,29	1,09
IL-1 sRII	3,25	1,03
IL-2	3,53	1,12
IL-2 R α	4,82	1,43
IL-2 R β /CD122	3,88	1,15
IL-2 R γ	4,07	1,17
IL-3	4,34	1,26
IL-3 R α	4,64	1,24
IL-4	4,72	1,25
IL-4 R	5,53	1,11
IL-5	6,31	1,60
IL-5 R α	16,15	2,21
IL-6	35,23	1,46
IL-6 R	6,41	1,51
IL-7	6,01	1,51
IL-7 R α	6,10	1,30
IL-8	38,69	1,37
IL-9	6,41	1,47
IL-10	5,27	1,39
IL-10 R α	5,42	1,36
IL-10 R β	5,54	1,38
IL-11	5,71	1,20
IL-12 p40	6,30	1,17
IL-12 p70	4,14	1,22
IL-12 R β 1	3,44	1,08
IL-12 R β 2	8,52	1,70
IL-13	3,81	1,11
IL-13 R α 1	4,12	1,14
IL-13 R α 2	3,59	1,03
IL-15	4,07	1,19
IL-15 R α	4,37	1,19
IL-16	4,16	1,17
IL-17	4,13	1,18
IL-17B	4,59	1,17
IL-17B R	4,89	1,16
IL-17C	5,24	1,23
IL-17D	5,18	1,24
IL-17E	5,74	1,41
IL-17F	5,96	1,40
IL-17R	5,29	1,35
IL-17RC	9,68	2,10
IL-17RD	6,54	1,60
IL-18 BPa	7,23	1,50
IL-18 R α /IL-1 R5	5,76	1,44
IL-18 R β /AcPL	5,84	1,44
IL-19	6,69	1,61
IL-20	6,79	1,58
IL-20 R α	15,60	3,16
IL-20 R β	7,48	1,34
IL-21	3,14	0,98
IL-21 R	3,18	0,95
IL-22	3,34	0,91
IL-22 BP	3,22	0,93
IL-22 R	3,51	0,97

[0160]

IL-23	4,14	1,07
IL-23 R	3,75	1,06
IL-24	4,14	1,07
IL-26	4,28	1,17
IL-27	5,71	1,42
IL-28A	9,23	2,20
IL-29	5,31	1,18
IL-31	4,89	1,23
IL-31 RA	5,80	1,26
抑制素 A	5,19	1,31
抑制素 B	5,93	1,37
胰岛素	5,29	1,25
胰岛素 R	5,13	1,22
Insulysin / IDE	7,60	1,78
IP-10	5,86	1,36
I-TAC / CXCL11	5,83	1,40
Kininostatin / 激肽素	7,18	1,75
Kremen-1	6,35	1,54
Kremen-2	13,18	3,01
Lck	7,05	1,42
潜在TGF-β bp1	28,04	4,90
LBP	4,34	1,23
LECT2	3,38	1,00
Lefty - A	3,38	1,01
瘦素R	3,66	0,98
瘦素(OB)	3,52	1,03
LFA-1 α	3,75	1,05
LIF	4,12	1,09
LIF R α	4,43	1,02
LIGHT / TNFSF14	4,34	1,09
脂质运载蛋白-1	4,58	1,14
LRP-1	9,89	1,81
LRP-6	29,80	2,28
L-选择素 (CD62L)	5,94	1,51
溶菌素酶	5,29	1,25
淋巴细胞趋化因子 / XCL1	8,21	1,50
淋巴毒素 β / TNFSF3	5,97	1,39
淋巴毒素 β R / TNFRSF3	5,61	1,30
MAC-1	5,54	1,20
MCP-1	22,87	1,84
MCP-2	5,83	1,37
MCP-3	6,96	1,65
MCP-4 / CCL13	6,09	1,48
M-CSF	6,90	1,65
M-CSF R	7,02	1,62
MDC	8,30	1,64
MFG-E8	8,93	1,62
MFRP	3,43	0,98
MIF	3,73	1,02
MIG	3,67	1,03
MIP-1a	5,17	1,42
MIP-1b	3,49	0,98
MIP-1d	3,45	0,93
MIP 2	11,45	2,56

[0161]

MIP-3 α	4,64	1,33
MIP-3 β	3,68	1,03
MMP-1	5,06	1,20
MMP-2	4,30	1,14
MMP-3	4,08	0,75
MMP-7	4,49	0,93
MMP-8	4,80	1,15
MMP-9	4,25	0,98
MMP-10	6,05	1,44
MMP-11 / 基质溶素-3	5,23	1,22
MMP-12	5,12	1,33
MMP-13	5,75	1,40
MMP-14	7,60	1,79
MMP-15	5,71	1,39
MMP-16 / MT3-MMP	7,86	1,80
MMP-19	9,10	1,70
MMP-20	8,06	1,68
MMP-24 / MT5-MMP	6,44	1,48
MMP-25 / MT6-MMP	6,20	1,36
Musk	6,62	1,41
MSP α 链	6,85	1,40
MSP β 链	16,76	2,65
NAP-2	9,61	1,71
NCAM-1 / CD56	5,11	1,24
Neuritin	4,04	1,06
NeuroD1	3,86	1,07
神经营养蛋白-3	3,58	1,01
Neurturin	3,58	0,94
NGF R	3,63	1,03
NOV / CCN3	3,58	1,13
NRG1 同种型 GGF2	3,60	1,10
NRG1-α / HRG1-α	3,58	1,03
NRG1-β1 / HRG1-β1	4,12	1,20
NRG2	4,09	1,02
NRG3	4,45	1,11
NT-3	3,73	0,96
NT-4	4,10	0,85
Orexin A	4,34	0,65
Orexin B	4,80	0,55
OSM	4,89	0,69
骨桥蛋白 / OPN	5,20	0,98
Osteocrin	8,16	1,73
骨保护素 / TNFRSF11B	265,56	5,65
OX40 配体 / TNFSF4	11,27	2,49
PARC / CCL18	5,35	1,26
PD-ECGF	5,31	1,20
PDGF R α	5,73	1,32
PDGF R β	6,80	1,49
PDGF-AA	7,08	1,54
PDGF-AB	6,91	1,52
PDGF-BB	7,03	1,51
PDGF-C	7,12	1,43
PDGF-D	7,08	1,31
PECAM-1 /CD31	4,21	1,18

[0162]

五聚环蛋白3 / TSG-14	11,67	2,24
Persephin	4,49	1,20
PF4 / CXCL4	3,88	1,10
PIGF	3,69	1,10
PLUNC	3,72	1,17
Pref-1	3,88	1,20
颗粒体蛋白质	4,96	1,52
催乳素	4,16	1,26
P-选择素	3,86	1,10
RAGE	3,93	1,06
RANK / TNFRSF11A	4,43	1,17
RANTES	3,86	1,05
RELM β	3,74	0,98
RELT / TNFRSF19L	4,28	0,93
ROBO4	4,21	1,08
S100 A8/A9	4,84	1,18
S100A10	4,89	1,19
SAA	5,14	1,23
SCF	7,37	1,53
SCF R /CD117	5,51	1,32
SDF-1 / CXCL12	5,32	1,18
sFRP-1	6,65	1,47
sFRP-3	6,42	1,35
sFRP-4	69,46	5,43
sgp130	15,48	2,93
SIGIRR	7,82	1,55
Siglec-5/CD170	7,13	1,47
Siglec-9	7,91	1,63
SLPI	7,96	1,29
Smad 1	4,78	1,23
Smad 4	10,65	2,26
Smad 5	4,59	1,15
Smad 7	4,59	1,22
Smad 8	3,92	1,09
SMDF / NRG1 Ⅱ异构体	4,11	1,05
Soggy-1	3,92	1,14
音猬因子(Shh N-末端)	3,77	1,10
SPARC	56,56	3,63
Spinesin	6,40	1,68
TACI / TNFRSF13B	4,40	1,10
Tarc	3,85	1,07
TCCR / WSX-1	3,80	1,00
TECK / CCL25	3,79	0,98
TFPI	5,18	1,22
TGF-α	4,28	1,09
TGF-β 1	4,64	1,19
TGF-β 2	4,85	1,22
TGF-β 3	5,26	1,32
TGF-β 5	5,28	1,29
TGF-β RI / ALK-5	6,94	1,51
TGF-β RII	5,43	1,30
TGF-β RIIb	5,72	1,34
TGF-β RIII	6,70	1,53
血小板生成素 (TPO)	7,40	0,94

[0163]

血小板反应酶反应蛋白（TSP）	325,53	3,99
血小板反应酶反应蛋白-1	281,16	3,76
血小板反应酶反应蛋白-2	10,81	1,94
血小板反应酶反应蛋白-4	7,96	1,57
胸腺生成素	7,60	1,44
Tie-1	4,03	0,88
Tie-2	3,92	0,86
TIMP-1	137,73	1,08
TIMP-2	54,09	7,91
TIMP-3	7,21	1,73
TIMP-4	4,31	1,05
TL1A / TNFSF15	4,70	1,14
TLR1	4,81	1,21
TLR2	5,77	1,36
TLR3	4,47	1,06
TLR4	4,16	1,01
TMEFF1 / Tomoregulin-1	4,91	1,10
TMEFF2	4,66	1,16
TNF-α	5,07	1,26
TNF-β	5,36	1,26
TNF RI / TNFRSF1A	8,08	1,77
TNF RII / TNFRSF1B	5,79	1,19
TRADD	5,70	1,26
TRAIL / TNFSF10	5,83	1,26
TRAIL R1 / DR4 / TNFRSF10A	6,28	1,40
TRAIL R2 / DR5 / TNFRSF10B	6,57	1,36
TRAIL R3 / TNFRSF10C	6,98	1,44
TRAIL R4 / TNFRSF10D	8,02	1,36
TRANCE	9,17	1,53
TREM-1	4,77	0,95
TROY / TNFRSF19	5,21	1,04
TSG-6	5,72	1,10
TSLP	4,90	1,03
TWEAK / TNFSF12	5,00	1,03
TWEAK R / TNFRSF12	5,14	1,07
泛素-1	4,92	1,03
uPA	4,94	0,90
uPAR	5,41	1,11
Vasorin	6,12	1,27
VCAM-1 (CD106)	5,02	1,11
VE-钙粘蛋白	5,20	1,18
VEGF	10,00	1,61
VEGF R2 (KDR)	5,73	1,25
VEGF R3	5,48	1,19
VEGF-B	5,24	1,15
VEGF-C	7,98	1,60
VEGF-D	6,11	1,18
VEGI / TNFSF15	6,03	1,20
WIF-1	6,07	1,21
WISP-1 / CCN4	6,68	1,30
XEDAR	7,81	1,46

[0164] 基于等于或大于2.5的HLSC/MSC比，将共25种蛋白鉴别为最可能为CM的活性做出贡献的蛋白。这些蛋白在表9中突出显示。

[0165] 实施例 6 - HLSC-和HLSC-CM-处理对体内FHF模型的效果的对比

[0166] D-半乳糖胺/内毒素急性中毒致命性肝炎体内模型

[0167] 半乳糖胺的肝毒作用的根本机理是由于UDP-半乳糖胺衍生物在肝中的高度积累，导致肝UTP的耗尽。结果，大分子(RNA、蛋白、糖蛋白、糖原等)的生物合成停止。这些改变导致最终的细胞损伤和细胞死亡，它们在反应后期可以通过血液中肝酶的增加和组织学予以鉴别。与此同时，内毒素诱发肿瘤坏死因子a (TNF-a)的生成——其发展出大量肝细胞凋亡。我们在SCID小鼠中开发了该体内模型，用于研究HLSC在该致死体内系统中的作用。

[0168] 方法

[0169] 动物和实验方案。在动物设施中圈养6-7周龄雄性SCID小鼠，自由接近食物和水。给这些动物腹膜内注射500 μL含有0.125 μg LPS和18 mg GalN的盐水。在D-GalN/LPS注射2小时后，给小鼠腹膜内注射30 x 10^6 HLSC。

[0170] 在注射LPS和GalN的同时、之后30分钟和2小时，给第二组SCID小鼠腹膜内接种1 ml在盐水中的HLSC上清液。给对照小鼠注射LPS和GalN的混合物。

[0171] 在T-烧瓶中从HLSC生产上清液；为了从HLSC生产CM (CM-HLSC)，将细胞培养至60%至70%汇合(约2 × 10^6 HLSC/75-cm^2 烧瓶)，彻底洗涤，并在10 mL补加0.05%人血清白蛋白(GMP生产)的无血清的α-MEM培养基中培养。24小时后收集条件培养基，并使用具有3-kDa截止的超滤单元(Millipore, Bedford, MA)浓缩25倍。

[0172] 组织学分析：通过H&E 染色、增殖 (PCNA 染色)和TUNEL (凋亡细胞)，分析肝的坏死。

[0173] 蛋白印迹：进行蛋白印迹，以检测BAX和BclXS/L。将肝匀浆化，并在4℃在裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 1% Triton X-100, 10 μmol/L苯基甲基磺酰基氟化物, 10 μmol/L亮抑蛋白酶肽，和100 U/ml 抑酶肽)中裂解1小时，在15,000 g离心。通过Bradford方法，测量CM的蛋白含量。在还原条件下，对含有200 μg肝裂解物蛋白的等分试样进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，并电印迹到硝酸纤维素膜滤器上。用在20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5、500 mmol/L NaCl+0.1%吐温(TBS-T)中的5%去脂乳封闭印迹。随后在4℃用在适当浓度的有关第一抗体对膜免疫印迹过夜。用TBS-T充分洗涤后，在室温与过氧化物酶-缀合的同种型-特异性的第二抗体一起温育印迹1小时，用TBS-T洗涤，用ECL检测试剂显影1分钟，并暴露于X-Omat胶片。使用下述抗体：来自Santa Cruz Biotechnology的抗-BAX 单克隆抗体和抗- BclXS/L多克隆抗体。

[0174] 结果

[0175] 为了评估HLSC对施用内毒素 (LPS)和GalN的小鼠的致死率的可能的有益效果，使用6只小鼠进行了存活研究。注射了0.125 μg LPS和18 mg GalN和30 x 10^6 HLSC的动物的存活百分比是75%。在注射LPS和18 mg GalN的同时、之后30分钟和2小时注射浓缩的1 ml在盐水中的HLSC上清液的动物的存活百分比是70 % (n=17)。在注射HLSC 7天后，血清丙氨酸转氨酶 (ALT)的水平从273 U/L降低至57 U/L，血清天冬氨酸转氨酶 (AST)的水平从1693 U/L降低至291 U/L。在注射CM-HLSC 6天后AST的水平从1693 U/L降低至1000 U/L。

[0176] 在注射HLSC 7天后，肝切片的组织学分析显示降低的细胞凋亡和坏死指数。

[0177] 在上清液处理3和6天后，肝切片的组织学分析显示降低的细胞凋亡(TUNEL)和坏死指数。观察到大块组织再生。这些发现与组织增殖指数(PCNA 染色)的增加相关联。通过蛋白印迹证实，在用单独的GalN/LPS处理的动物中存在促凋亡蛋白BAX的上调，且在两种浓

缩的上清液的不同时间点存在下调。在表达促凋亡蛋白 BcLX/L的情况下，观察到该蛋白在用浓缩的上清液处理的动物中上调，且在用单独的GalN/LPS处理的动物中的表达下调。

[0178] 上述结果如图11-13所示。

[0179] 图11a显示了注射HLSC的LPS/GalN致死模型中的小鼠存活（n=6）。

[0180] 图11b显示了注射浓缩的HLSC的LPS/GalN致死模型中的小鼠存活（n=17）。

[0181] 图12显示了肝衰竭诱导(GalN/LPS) 3和6天后，注射了从T-烧瓶纯化的来自HLSC的浓缩CM的GalN/LPS处理过的SCID小鼠的H&E和PCNA 染色。

[0182] 图13显示了用于评价凋亡的肝细胞的TUNEL试验的结果。通过蛋白印迹分析，评价了促凋亡蛋白 BAX和抗细胞凋亡蛋白BclX的存在。

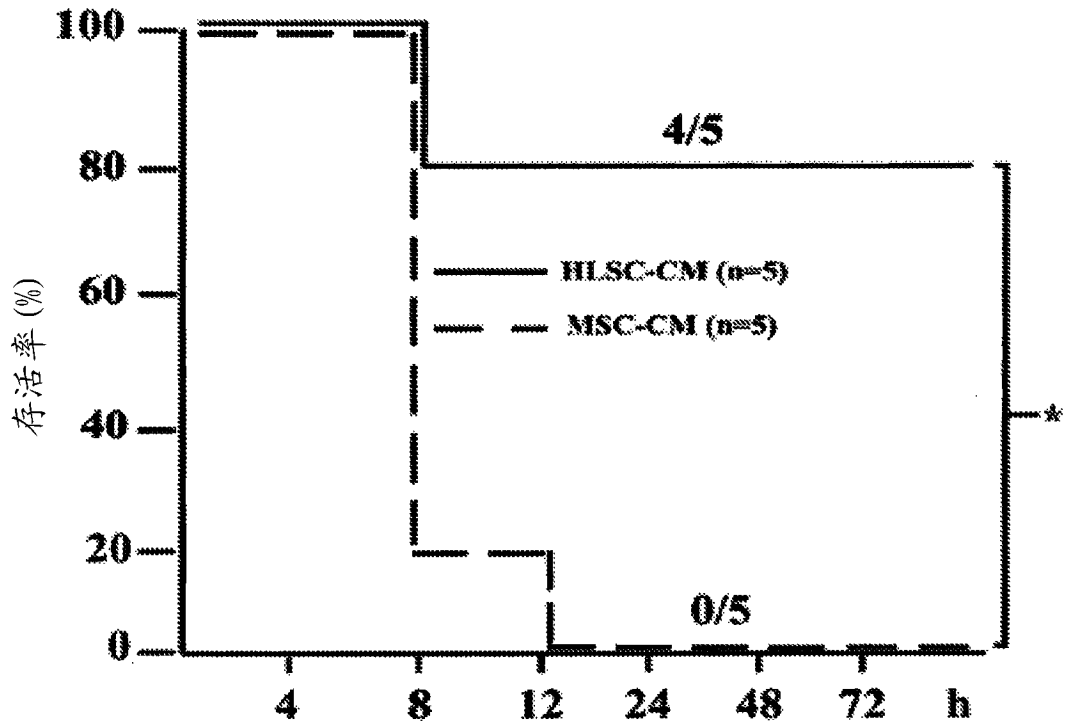


图1

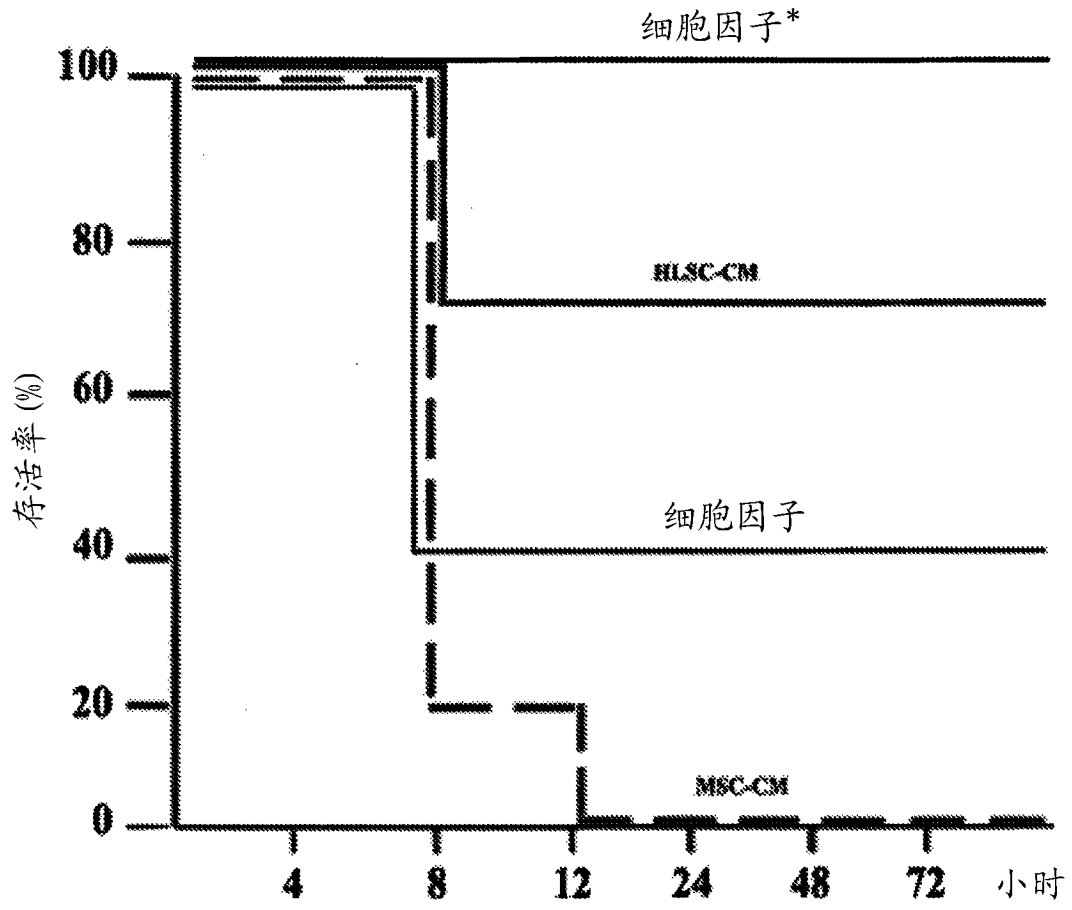

细胞因子*
100
80
60
40
20
0
存活率 (%)
HLSC-CM
细胞因子
MSC-CM
4
8
12
24
48
72
小时

图2

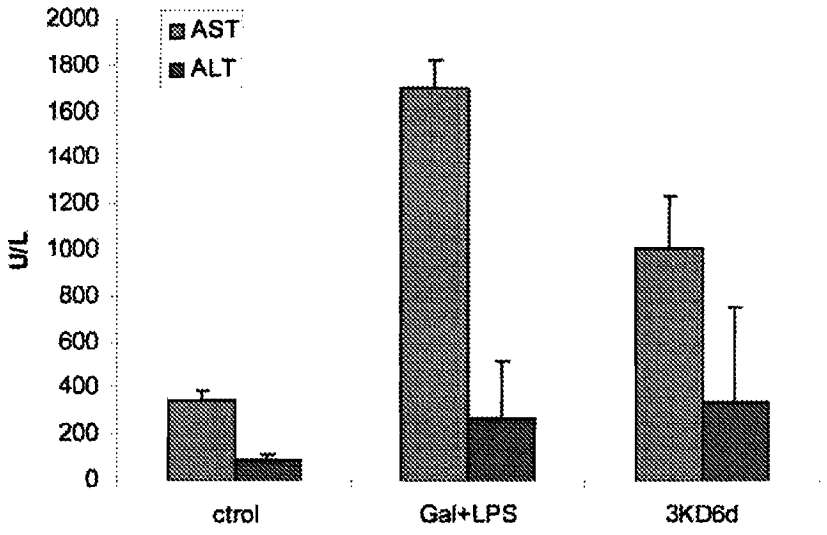

2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
U/L
AST
ALT
ctrol
Gal+LPS
3KD6d

图3

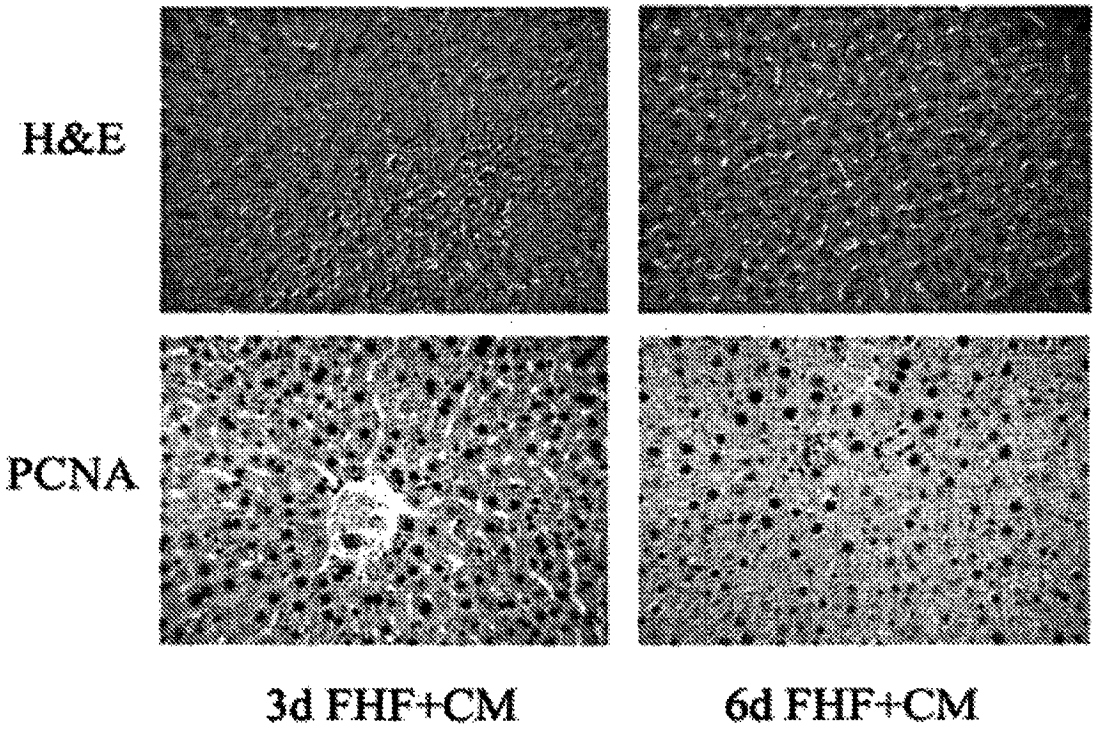

H&E
PCNA
3d FHF+CM
6d FHF+CM

图4

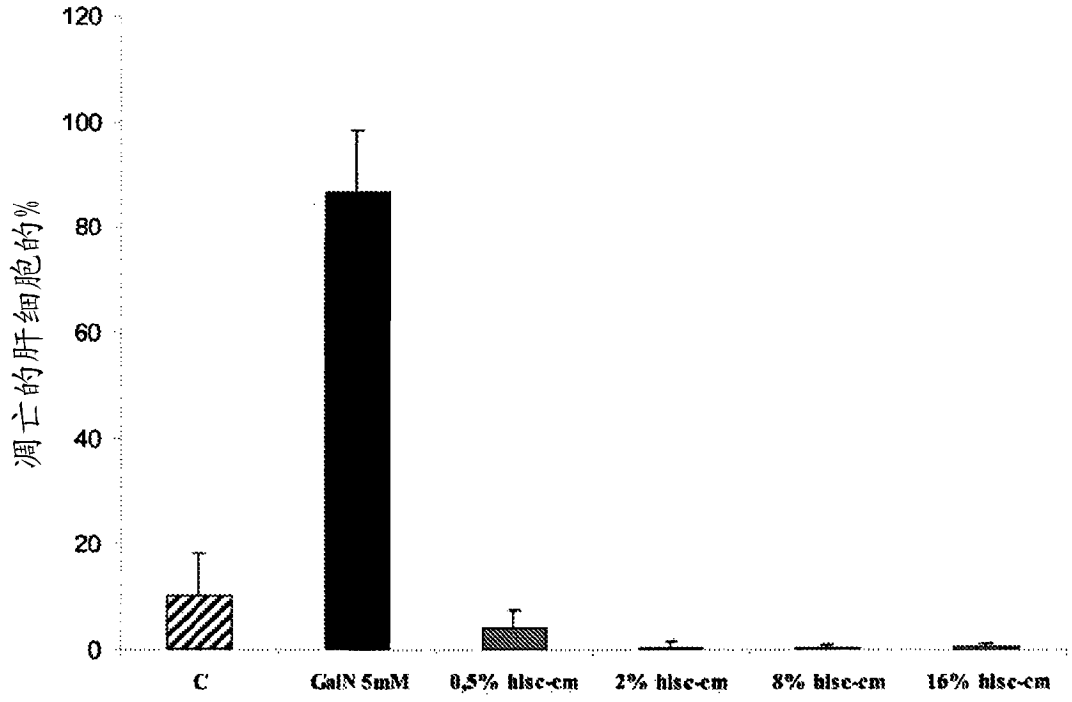

凋亡的肝细胞的%
120
100
80
60
40
20
0
C
GalN 5mM
0,5% hisc-cm
2% hisc-cm
8% hisc-cm
16% hisc-cm

图5

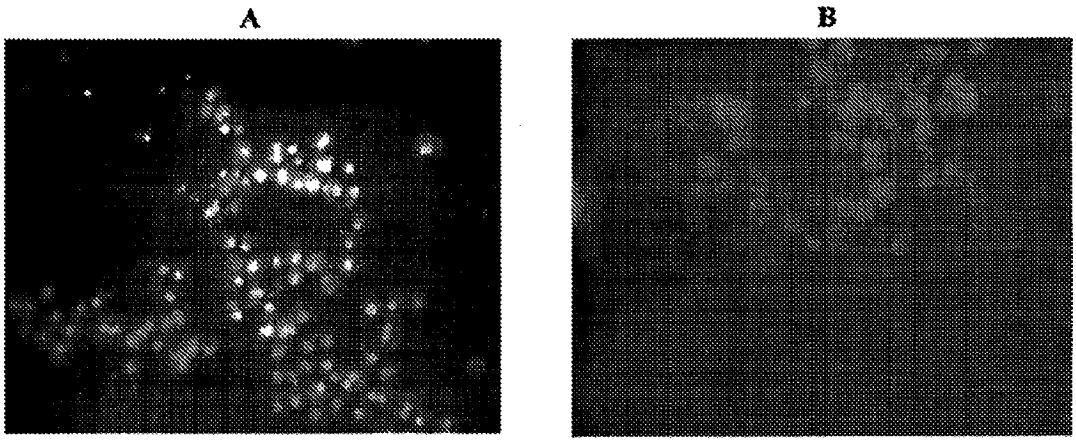

A
B

图6

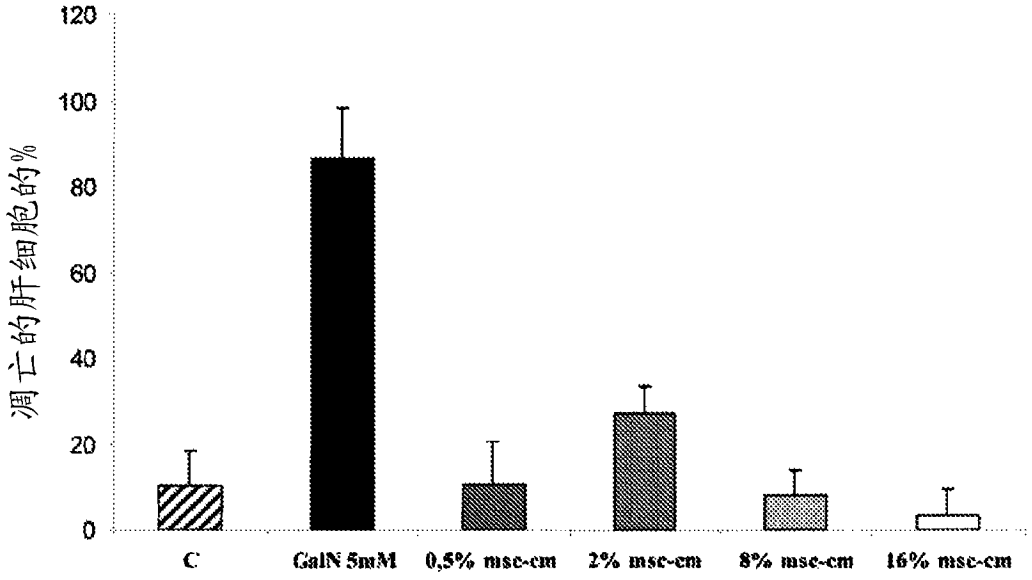

120
100
80
60
40
20
0
凋亡的肝细胞的%
C
GalN 5mM
0,5% msc-cm
2% msc-cm
8% msc-cm
16% msc-cm

图7

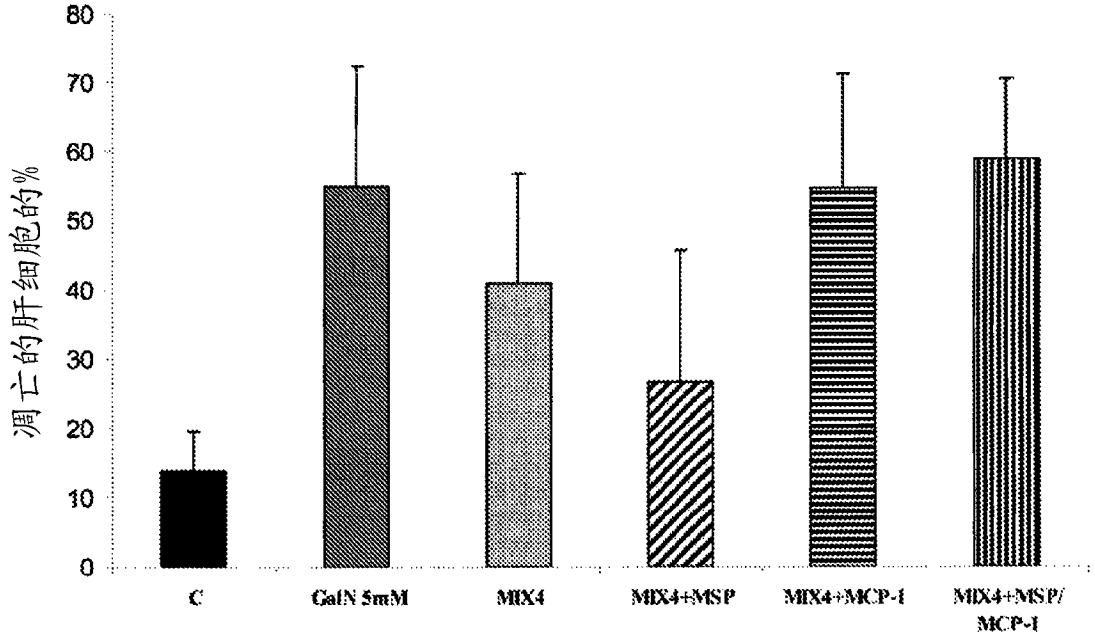

80
70
60
50
40
30
20
10
0
凋亡的肝细胞的%
C
GalN 5mM
MIX4
MIX4+MSP
MIX4+MCP-1
MIX4+MSP/
MCP-1

图8

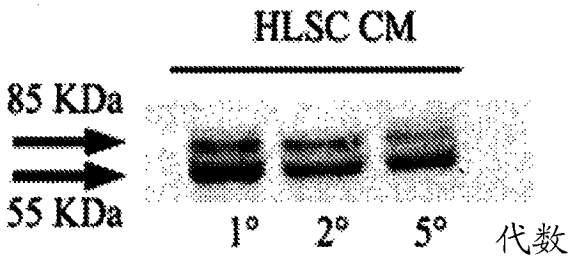

HLSC CM
85 KDa
55 KDa
1°
2°
5°
代数

图9

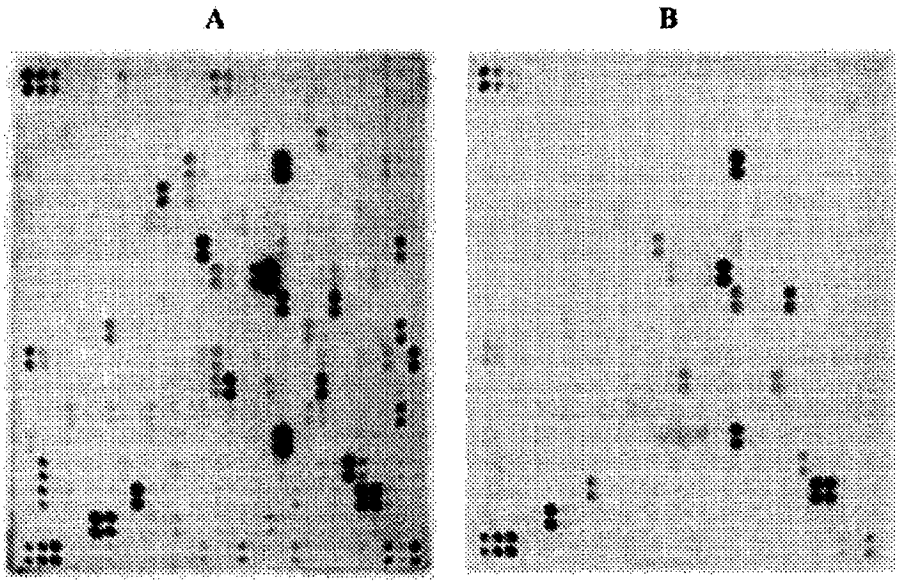

A
B

图10

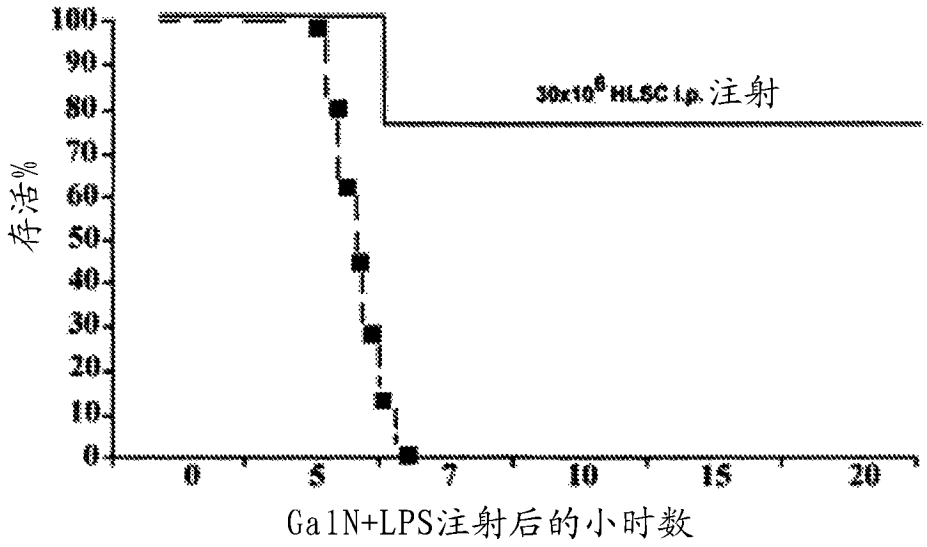

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
存活%
0
5
7
10
15
20
30x10^6 HLSC i.p.注射
GalN+LPS注射后的小时数

图11a

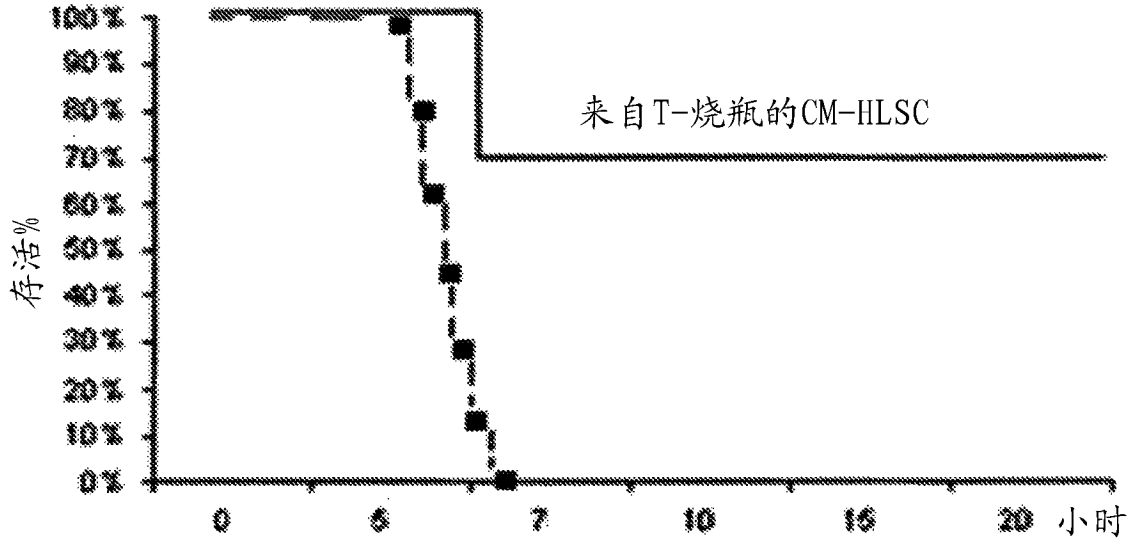

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
存活%
来自T-烧瓶的CM-HLSC
0
5
7
10
15
20
小时

图11b

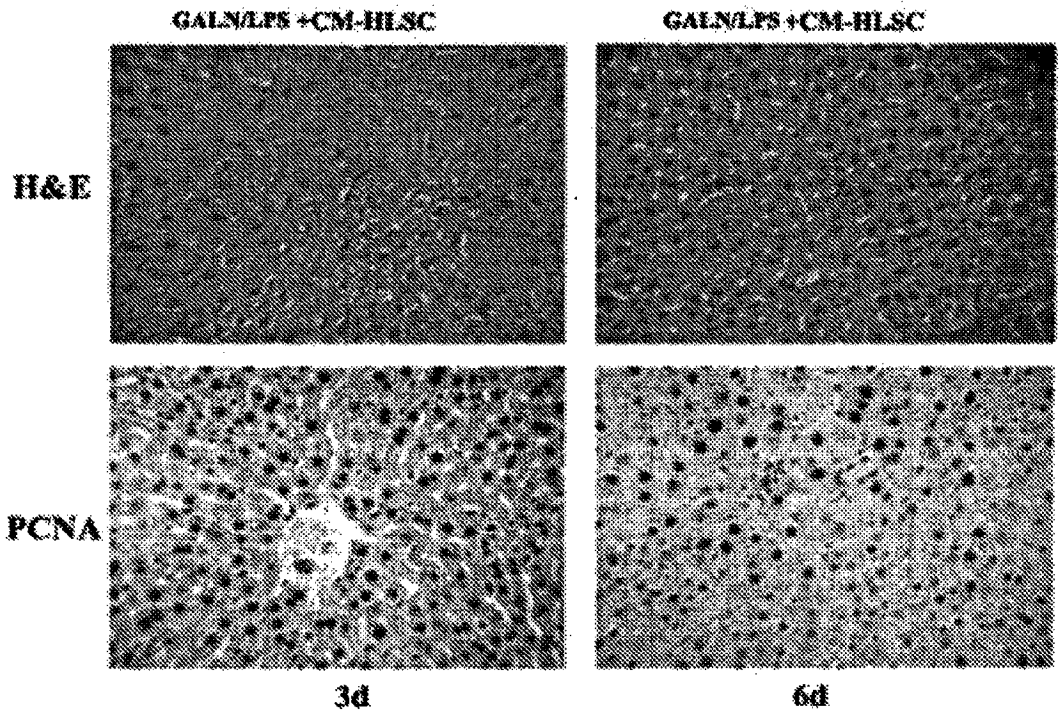

GALN/LPS +CM-HLSC
GALN/LPS +CM-HLSC
H&E
PCNA
3d
6d

图12

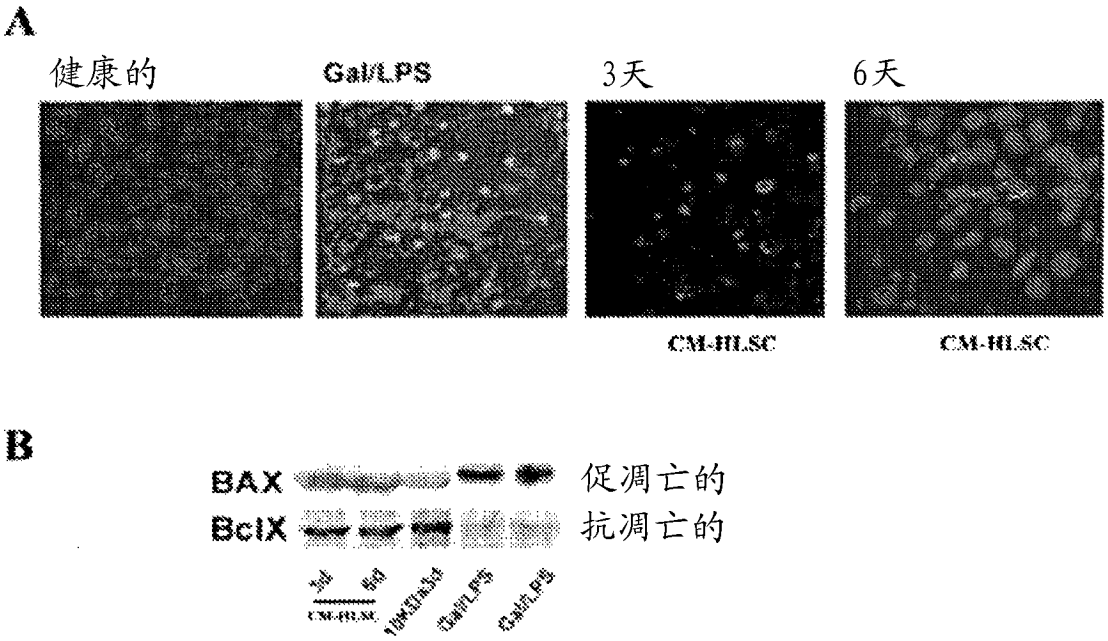


图13