

肝前体细胞及其建系方法和应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，尤其涉及一种肝前体细胞及其建系方法和应用。

背景技术

细胞治疗方法，是一种相对安全有效且有前景的治疗方式。原代肝细胞是临床上最早应用于肝病治疗的细胞来源，1999年至2006年期间，原代肝细胞移植治疗克里格勒-纳贾尔综合征（英文名称为Crigler-Najjar Syndrome，英文简称为CNS）的8个临床案例中，全部患者血清胆红素整体下降了50%以上，2019年，英国A.Dhawan团队采用微囊包裹原代肝细胞腹腔内移植治疗8名急性肝脏衰竭儿童，其中4名儿童避免了肝移植，3名儿童渡过急性期成功桥接到肝移植。但是基于肝细胞的细胞治疗和疾病模拟，一直受限于原代肝细胞在体外扩增能力限制。

细胞永生化是指细胞在体外培养的过程中，由于自身基因变化或者外界各种刺激因素如病毒感染等，避免了正常细胞的衰老死亡过程，获得了无限增殖能力，因此在体外可以长期传代培养、无限分裂增殖。在体外将原代肝细胞永生化，可能是一个可以解决原代肝细胞体外培养数量局限性的方案。

目前原代肝细胞的永生化方式主要有三大类：

第一类是与病毒基因相关的原代肝细胞永生化方式，猴肾病毒

40T 抗原 (SV40T)、腺病毒 E1A 和 E1B 基因、人乳头状瘤病毒 E6/E7 基因、EB 病毒永生等,可通过各种机制失活细胞周期调节蛋白 pRB 和 p53,使得细胞绕过衰老期,持续传代。Kobayashi 等曾将含有编码 SV40T 肿瘤抗原的 PSV3neo 质粒转染 21 周人胎肝细胞,而获得永生化的肝细胞株 OUMS-29 永生细胞株。不同病毒的永生方法对于不同种类的细胞有适应性差异,HPV16 病毒株的 E6/E7 基因能高效地建立永生细胞株,同时大量研究表明 HPV16-E6/E7 对肝细胞的永生有较好的适用性。鄢和新教授团队采用 HPV16-E6/E7 基因,将肝前体细胞永生,可在体外持续传代 40 代次以上,并且表达肝前体细胞相关表面标记物。

第二类是端粒酶与端粒酶催化亚基相关的肝细胞永生, hTERT 作为端粒酶的催化亚基,与相关蛋白结合可以激活端粒酶,延长体外细胞培养的生存周期,是端粒酶的正向调控因子。Wege 等报道 hTERT 基因转染人胎肝细胞后,使细胞端粒延长,从而超越复制衰老期,该细胞在体外能传代 300 多代,并且能维持肝脏特有的功能。

第三类是可恢复永生,日本 Kobayashi 等将携带有 SV40T 抗原、单纯疱疹病毒胸苷激酶 (英文名称为 herpes simplex virus-thymidine kinase, 英文简称为 HSV-TK) 及潮霉素(链霉菌产生的氨基糖苷类抗生素)抗性基因,并且两侧连接 loxP 位点的重组 SSR69 逆转录病毒导入原代成人肝细胞,成功地建立了可恢复的永生肝细胞株 NKTK-3。利用表达 Cre 重组酶的重组的腺病毒载体转染肝细胞,SV40T 基因能被有效的切除,NKTK-3 细胞不再表达 SV40T,肝细胞株恢复到永生

前的状态。

目前肝前体细胞的永生化技术并不成熟，多数永生化基因并不能将肝前体细胞改造为永生化细胞株，且并不能在体外持续传代。

因此，有必要提供一种肝前体细胞及其建系方法和应用以解决现有技术中存在的上述问题。

发明内容

本发明的目的在于提供一种肝前体细胞及其建系方法和应用，以解决现有技术中的永生化基因并不能将肝前体细胞改造为永生化细胞株，且并不能在体外持续传代的问题。

为实现上述目的，本发明提供了一种肝前体细胞的建系方法，包括以下步骤：

S0：提供肝前体细胞、混合液和重编程培养基，其中，所述混合液包括无血清培养基、聚乙烯亚胺和 CLP 质粒；

S1：将所述肝前体细胞和所述混合液进行转染处理以得到转染后的肝前体细胞；

S2：将所述转染后的肝前体细胞放入所述重编程培养基中进行传代培养，以得到永生化的肝前体细胞。

本发明所述的肝前体细胞的建系方法的有益效果在于：本发明通过将所述肝前体细胞和所述混合液进行转染处理以得到转染后的肝前体细胞，将所述转染后的肝前体细胞放入所述重编程培养基中进行传代培养以得到永生化的肝前体细胞，本发明使用 CLP 质粒对所述肝

前体细胞进行转染，不会产生细胞毒性，然后通过重编程培养基中进行传代培养，以使得转染后的肝前体细胞能够在体外持续传代。因此，本发明解决了现有技术中的永生化基因并不能将肝前体细胞改造为永生化细胞株，且并不能在体外持续传代的问题。

优选的，所述无血清培养基和所述聚乙烯亚胺的体积比为(500-1000):1。

优选的，所述 CLP 质粒的终浓度为(1-5) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

优选的，所述提供肝前体细胞的步骤包括：将肝细胞放入所述重编程培养基中进行扩增培养，然后将所述重编程培养基换成减血清培养基继续培养以得到肝前体细胞。

优选的，所述重编程培养基包括 DMEM/F12 基础培养基，以及以占 DMEM/F12 基础培养基的含量计：15-25ng/mL 的肝细胞生长因子 HGF，15-25ng/mL 的上皮细胞生长因子 EGF，5-15 μM 的 ROCK 激酶抑制剂 Y27632，1-5 μM 的 Wnt 信号通路激动剂 CHIR99021，1-5 μM 的 TGF- β 信号抑制剂 A8301，1-5 μM 的鞘氨醇-1-磷酸 S1P and 5 μM 的吲哚乙酸 LPA。

优选的，所述重编程培养基还包括 N2 营养补充剂、B27 营养补充剂、丙酮酸钠和抗坏血酸。

优选的，所述重编程培养基包括 DMEM/F12 基础培养基，以及以占 DMEM/F12 基础培养基的含量计：含量为 1-10% 的 N2 营养补充剂，含量为 1-10% 的 B27 营养补充剂，1mM 的丙酮酸钠，5-15 μ

g/mL 的抗坏血酸, 15-25ng/mL 的肝细胞生长因子 HGF, 15-25ng/mL 的上皮细胞生长因子 EGF, 5-15 μ M 的 ROCK 激酶抑制剂 Y27632, 1-5 μ M 的 Wnt 信号通路激动剂 CHIR99021, 1-5 μ M 的 TGF- β 信号抑制剂 A8301, 1-5 μ M 的鞘氨醇-1-磷酸 S1P and 5 μ M 的吲哚乙酸 LPA。

本发明同时提供了一种肝前体细胞, 由所述肝前体细胞的建系方法制备得到。

本发明所述的肝前体细胞的有益效果在于: 本发明使用 CLP 质粒对所述肝前体细胞进行转染, 不会产生细胞毒性, 然后通过重编程培养基中进行传代培养, 以使得转染后的肝前体细胞能够在体外持续传代。因此, 本发明解决了现有技术中的永生化基因并不能将肝前体细胞改造为永生化细胞株, 且并不能在体外持续传代的问题。

优选的, 所述肝前体细胞阴性表达 CD34、CD45 和 HLA-DRPQ, 所述肝前体细胞阳性表达 CD24 和 CD326。

本发明又提供了一种肝前体细胞的应用, 所述肝前体细胞应用于制备治疗急性肝衰竭的药物。

本发明所述的肝前体细胞的应用的有益效果在于: 包含肝前体细胞的注射液对 D-gal 诱导剂联合 LPS 诱导剂诱导的小鼠急性肝衰竭模型有显著疗效。

附图说明

图 1 为本发明实施例的质粒的示意图;

图 2 为本发明实施例的细胞株 B42 的细胞形态示意图；

图 3 为本发明实施例的第十五代细胞株 B42 的细胞形态示意图；

图 4 为本发明实施例的细胞株 B42 阴性表达 CD34 的流式细胞术检测结果示意图；

图 5 为本发明实施例的细胞株 B42 阴性表达 CD45 的流式细胞术检测结果示意图；

图 6 为本发明实施例的细胞株 B42 阴性表达 HLA-DRPQ 的流式细胞术检测结果示意图；

图 7 为本发明实施例的细胞株 B42 阳性表达 CD24 的流式细胞术检测结果示意图；

图 8 为本发明实施例的细胞株 B42 阳性表达 CD326 的流式细胞术检测结果示意图；

图 9 为本发明实施例的的实验组和对照组小鼠急性肝衰竭模型生存率的对照示意图。

具体实施方式

为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。除非另外定义，此处使用的技术术语或者科学术语应当为本发明所属领域内具有一般技

能的人士所理解的通常意义。本文中使用的“包括”等类似的词语意指出现该词前面的元件或者物件涵盖出现在该词后面列举的元件或者物件及其等同，而不排除其他元件或者物件。

病毒转染、腺病毒转染和电穿孔转染法是常用的构建永生化细胞系的方法。

病毒可以将外源基因导入到细胞内，从而实现对细胞基因组的改造。通过病毒转染，可以构建出稳定的永生化细胞系，用于长期的细胞培养和实验研究。病毒转染可以将外源基因高效地导入到细胞内，使细胞表达目的基因。但是慢病毒感染需要使用大量的慢病毒载体和试剂，成本较高。此外，慢病毒感染需要对实验室环境进行严格的控制，以避免病毒泄露等安全问题。慢病毒感染只能用于特定类型的细胞，而且不同类型的细胞对慢病毒的感染效率也不同，因此，慢病毒感染构建永生化细胞系的适用范围受到限制。慢病毒感染可能会引入外来基因，导致细胞发生突变甚至致癌。此外，慢病毒本身也可能存在安全隐患，例如病毒感染后会导致细胞死亡后者炎症反应等。

腺病毒感染是一种非致病性病毒，可以将外源基因导入到细胞内，从而实现对细胞基因组的改造，通过腺病毒感染，可以构建出稳定的永生化细胞系，用于长期的细胞培养和实验研究。腺病毒感染存在以下缺陷，腺病毒感染只能用于特定类型的细胞，而且不同类型的细胞对腺病毒的感染效率也不同。因此，腺病毒感染构建永生化细胞系的适用范围受到限制，腺病毒感染需要使用大量的腺病毒载体和试剂，成本较高。此外，腺病毒感染需要对实验室环境进行严格的控制，以

避免病毒泄露等安全问题。

电穿孔转染法利用高压电脉冲将外源 DNA 导入细胞内，从而实现了对细胞基因组的改造，通过电穿孔转染法，可以构建出稳定的永生化细胞系，用于长期的细胞培养和实验研究。电穿孔转染法需要使用高压电脉冲，如果操作不当可能会对实验人员造成安全隐患，此外，电穿孔转染法可能会引起细胞的损伤和死亡，影响实验结果。不同类型的细胞对电穿孔转染的适应性不同，有些细胞可能会因为电穿孔转染而受到伤害或者死亡，因此，电穿孔转染法构建永生化细胞系的适用范围受到限制。电穿孔转染法构建的细胞系可能会因为基因组的不稳定性而失去稳定性，导致基因表达的不一致性，影响实验结果。

现有技术对于肝前体细胞永生化的构建还不够成熟，无法在体外持续传代。

本发明使用质粒转染直接对细胞进行永生化的改造，获取供体来源清晰、信息可追溯的肝前体细胞（HepLPCs），将携带外源基因 HPV-16-E6/E7-deltaTK 基因的质粒 CLP-ET，用 PEI 转染试剂转染的方法，转导进入肝前体细胞基因组内，构建稳定转染的细胞系。PEI 转染试剂，是阳离子聚合物转染试剂的一种，能够与 DNA 结合，形成复合物微粒，并且通过胞吞作用进入细胞。DNA 进入细胞后，可通过随机整合的方式，将外源基因插入细胞基因组 DNA 中，转染试剂不需要在插入的基因片段中引入病毒来源或者转座酶等核酸序列，对于后续细胞株的临床使用更安全。

细胞转染后，通过两轮单克隆筛选的方法，筛选出稳定转染的细胞株，并且通过对细胞株表面标记物进行检测、细胞功能验证、药效学预实验、细胞株基因组测序、代谢组学测序等实验，验证筛选到的细胞株功能性。细胞株解决了肝前体细胞无法永生化培养的问题，并且因仅使用质粒对细胞进行改造，不存在安全性问题。

本发明提供了一种肝前体细胞的建系方法，包括以下步骤：

S0：提供肝前体细胞、混合液和重编程培养基，其中，所述混合液包括无血清培养基、聚乙烯亚胺和 CLP 质粒；

S1：将所述肝前体细胞和所述混合液进行转染处理以得到转染后的肝前体细胞；

S2：将所述转染后的肝前体细胞放入所述重编程培养基中进行传代培养，以得到永生化的肝前体细胞。

具体的，本发明通过将所述肝前体细胞和所述混合液进行转染处理以得到转染后的肝前体细胞，将所述转染后的肝前体细胞放入所述重编程培养基中进行传代培养以得到永生化的肝前体细胞，本发明使用 CLP 质粒对所述肝前体细胞进行转染，不会产生细胞毒性，然后在重编程培养基中进行传代培养，以使得转染后的肝前体细胞能够在体外持续传代。因此，本发明解决了现有技术中的永生化基因并不能将肝前体细胞改造为永生化细胞株，且并不能在体外持续传代的问题。

本发明的一些实施例，所述无血清培养基和所述聚乙烯亚胺的体

积比为(500-1000):1。

本发明的一些实施例，所述 CLP 质粒的终浓度为(1-5) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

本发明的一些实施例，所述提供肝前体细胞的步骤包括：将肝细胞放入所述重编程培养基中进行扩增培养，然后将所述重编程培养基换成减血清培养基继续培养以得到肝前体细胞。

本发明的一些实施例，所述重编程培养基包括 DMEM/F12 基础培养基，以及以占 DMEM/F12 基础培养基的含量计：15-25ng/mL 的肝细胞生长因子 HGF, 15-25ng/mL 的上皮细胞生长因子 EGF, 5-15 μM 的 ROCK 激酶抑制剂 Y27632, 1-5 μM 的 Wnt 信号通路激动剂 CHIR99021, 1-5 μM 的 TGF- β 信号抑制剂 A8301, 1-5 μM 的鞘氨醇-1-磷酸 SIP and 5 μM 的吡啶乙酸 LPA。

本发明的一些实施例，所述重编程培养基还包括 N2 营养补充剂、B27 营养补充剂、丙酮酸钠和抗坏血酸。

本发明的一些实施例，所述重编程培养基包括 DMEM/F12 基础培养基，以及以占 DMEM/F12 基础培养基的含量计：含量为 1-10% 的 N2 营养补充剂，含量为 1-10% 的 B27 营养补充剂，1mM 的丙酮酸钠, 5-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗坏血酸, 15-25ng/mL 的肝细胞生长因子 HGF, 15-25ng/mL 的上皮细胞生长因子 EGF, 5-15 μM 的 ROCK 激酶抑制剂 Y27632, 1-5 μM 的 Wnt 信号通路激动剂 CHIR99021, 1-5 μM 的 TGF- β 信号抑制剂 A8301, 1-5 μM 的鞘氨醇-1-磷酸 SIP and 5 μM 的吡啶乙酸 LPA。

本发明同时提供了一种肝前体细胞,由所述肝前体细胞的建系方法制备得到。

具体的,本发明使用 CLP 质粒对所述肝前体细胞进行转染,不会产生细胞毒性,然后通过重编程培养基中进行传代培养,以使得转染后的肝前体细胞能够在体外持续传代。因此,本发明解决了现有技术中的永生化基因并不能将肝前体细胞改造为永生化细胞株,且并不能在体外持续传代的问题。

本发明的一些实施例,所述肝前体细胞阴性表达 CD34、CD45 和 HLA-DRPQ,所述肝前体细胞阳性表达 CD24 和 CD326。

本发明又提供了一种肝前体细胞的应用,所述肝前体细胞应用于制备治疗急性肝衰竭的药物。

具体的,包含肝前体细胞的注射液对 D-gal 诱导剂联合 LPS 诱导剂诱导的小鼠急性肝衰竭模型有显著疗效。

实施例

一、质粒转染肝前体细胞

图 1 为本发明实施例的质粒的示意图。

由发明人提供 E6E7 的插入位点,由云舟生物科技(广州)股份有限公司合成,获得的 E6E7 通过酶切连接插入到载体上,构建得到的 CLP 质粒如图 1 所示。

重编程培养基的组成包括:DMEM/F12 基础培养基,以及以占 DMEM/F12 基础培养基的含量计:含量为 1%的 N2 营养补充剂(100X),

含量为 1% 的 B27 营养补充剂(50X), 1mM 的丙酮酸钠, 10 μ g/mL 的抗坏血酸, 20ng/mL 的肝细胞生长因子 HGF, 20ng/mL 的上皮细胞生长因子 EGF, 10 μ M 的 ROCK 激酶抑制剂 Y27632, 3 μ M 的 Wnt 信号通路激动剂 CHIR99021, 1 μ M 的 TGF- β 信号抑制剂 A8301, 1 μ M 的鞘氨醇-1-磷酸 S1P and 5 μ M 的吲哚乙酸 LPA。其中的 DMEM/F12、N2 营养补充剂、B27 营养补充剂和丙酮酸钠来源于 Invitrogen; 抗坏血酸来源于 Sigma-Aldrich; HGF 和 EGF 来源于 Novoprotein; Y27632、CHIR99021、A8301、S1P 和 LPA 均来源于 TargetMol。

如无特殊说明, 本发明实施例进行传代培养所使用的的培养基为重编程培养基。

复苏两株肝前体细胞, 20 万个细胞每孔接种至 6 孔板, 使用 2 毫升重编程培养基培养, 待细胞过夜贴壁后进行转染, 转染操作前 30 分钟, 先将重编程培养基换成 1 毫升减血清培养液, 放回培养箱中培养以得到待转染肝前体细胞。

取两个 1.5 毫升的离心管分别记为第一离心管和第二离心管, 向第一离心管中加入 50 微升无血清培养基和 6 微升聚乙烯亚胺, 用移液枪快速吹吸混匀 10 次以得到第一混合液; 向第二离心管中加入 50 微升的无血清培养基和 2 微克 CLP 质粒, 用移液枪吹吸混匀, 静置 10 分钟后以得到第二混合液, 将第二离心管中的第二混合液用移液枪加入到第一离心管中的第一混合液, 并快速吹吸混匀 10 次以得到混合液, 将混合液逐滴加入到装有待转染肝前体细胞的 6 孔板中, 然后将 6 孔板放入二氧化碳培养箱中进行转染, 转染 8 小时后, 将 6 孔

板中的无血清培养基更换为 2 毫升的重编程培养基持续传代培养。

复苏 Pr 代的原代肝前体细胞并接种至 6 孔板中, 进行 CLP-ET 质粒的转染, 并用重编程培养基持续培养。待原代肝前体细胞融合度大于 80% 时进行传代培养, 转染后的原代肝前体细胞每传代一次记为 P0+1, 均使用 10cm 细胞培养皿培养, 待 P0+5 代原代肝前体细胞融合度大于 80% 时使用有限稀释法进行 96 孔板的接种。

将 P0+5 代原代肝前体细胞的融合度达到 80% 时进行传代培养, 进行单克隆挑选, 采用有限稀释法稀释细胞悬液至 70 个细胞/20 毫升, 96 孔板中每孔加入 200 微升培养液, 约等于 0.7 个细胞/孔/200 微升, 共铺 4 块 96 孔板, 克隆号以挑选出的单克隆细胞顺序命名, 共挑选出 21 株单克隆细胞, 将 21 株单克隆细胞记为 P1 代单克隆细胞。

P1 代单克隆细胞置于 96 孔板中进行培养, 96 孔板铺板 3 天后, 在 96 孔板中挑选出单个细胞的孔, 待 P1 代单克隆细胞的汇合度达到 80% 以上时, 进行传代培养, 常规消化、传代, 将 96 孔板中的 P1 代单克隆细胞全部消化下来, 离心后直接将 P1 代单克隆细胞接种到 24 孔板中, 放入二氧化碳培养箱中培养以得到 P1+1 代单克隆细胞, 24 孔板中的 P1 代单克隆细胞 2-3 天更换一次培养液。

P1+1 代单克隆细胞置于 24 孔板中进行培养, 待 P1+1 代单克隆细胞汇合度达到 80% 以上时, 进行传代培养, 常规消化、传代, 24 孔板中的 P1+1 代单克隆细胞, 全部消化下来, 离心后直接将 P1+1 代单克隆细胞接种到 6 孔板中, 放入二氧化碳培养箱中培养以得到

P1+2 代单克隆细胞，6 孔板中的 P1+1 代单克隆细胞 2-3 天更换一次培养液。

P1+2 代单克隆细胞置于 6 孔板中进行培养，待 P1+2 代单克隆细胞汇合度达到 80%以上时，进行传代培养，收集 6 孔板内的 P1+2 代单克隆细胞的培养上清，将 P1+2 代单克隆细胞的培养上清在零下 20 摄氏度冷冻保存，用于 AAT 分泌和尿素合成的检测。6 孔板中的 P1+2 代单克隆细胞，全部消化下来，离心后进行细胞计数，按照 10000 个细胞/cm² 细胞密度接种到 10 cm 培养皿中，放入二氧化碳培养箱中培养以得到 P1+3 代单克隆细胞，10 cm 培养皿中的细胞 2-3 天更换一次培养液。

将 P1+3 代单克隆细胞置于 10 cm 培养皿中进行培养，待 P1+3 代单克隆细胞汇合度达到 80%以上时，进行传代培养，常规消化、传代，10 cm 培养皿中的 P1+3 代单克隆细胞，全部消化下来，离心后进行细胞计数，按照 10000 个细胞/cm² 细胞密度接种到 10 cm 培养皿中，放入二氧化碳培养箱中培养以得到 P1+4 代单克隆细胞，长满后收获 P1+4 代单克隆细胞冷冻保存，10 cm 培养皿中的 P1+3 代单克隆细胞 2-3 天更换一次培养液。

经过多次培养，21 株单克隆细胞还剩 11 株单克隆细胞存活，将 11 株单克隆细胞标记为 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N，对 11 株单克隆细胞进行 AAT、ALB 和尿素进行检测，检测结果见表 1。

表 1

名称	ALB 分泌 ($\mu\text{g}/\text{million cell}/24\text{h}$)	AAT 分泌 ($\text{ng}/\text{million cell}/24\text{h}$)	尿素合成 ($\text{ng}/\text{million cell}/24\text{h}$)
A	231.57	231.57	179.57
B	212.98	222.98	196.98
C	180.47	165.47	126.47
D	140.86	140.86	140.86
E	120.75	120.75	120.75
F	261.98	162.58	162.58
G	157.25	157.25	151.25
H	149.96	149.96	145.96
I	80.57	80.57	80.57
J	95.76	95.76	95.76
K	107.76	107.76	107.76
L	112.7	112.7	112.7
M	40.67	40.67	40.67
N	75.46	75.46	75.46

根据表 1 中 AAT、ALB 和尿素的合成检测结果，从 11 株 P1+2 代单克隆细胞选取 6 株单克隆细胞进行第二轮筛选，6 株单克隆细胞记为 6 株 P2 代单克隆细胞，6 株单克隆细胞分别为 A、B、C、F、G、H。

用重编程培养基重悬 6 株 P2 代单克隆细胞并铺板，待 6 株 P2 代单克隆细胞的汇合度达到 80% 时进行传代培养，然后挑选单克隆细胞，采用有限稀释法稀释至 70 个细胞/20 毫升，96 孔板中每孔加入 200 微升培养液，约等于 0.7 个细胞/孔/200 微升。

铺板 24 小时后，在 96 孔板中挑选出只有单个 P2 代单克隆细胞的孔，并做标记，当 P2 代单克隆细胞的汇合度达到 80% 时，进行传代培养，常规进行消化、传代，96 孔板中的 P2 代单克隆细胞全部消化下来，离心后直接将 P2 代单克隆细胞接种到 24 孔板中，放入二氧化碳培养箱中培养以得到 P2+1 代单克隆细胞，24 孔板中的 P2+1 代

单克隆细胞约 3-4 天更换一次培养液或传代。

24 孔板中的 P2+1 代单克隆细胞的汇合度达到 80%以上时，进行传代培养，常规进行消化、传代，24 孔板中的 P2+1 代单克隆细胞，全部消化下来，离心后直接接种到 6 孔板中，放入二氧化碳培养箱中培养以得到 P2+2 代单克隆细胞，6 孔板中的 P2+2 代单克隆细胞约 3-4 天更换一次培养液或传代。

6 孔板中的 P2+2 代单克隆细胞的汇合度达到 80%以上时，进行传代培养，常规进行消化、传代，6 孔板中的 P2+2 代单克隆细胞，全部消化下来，离心后进行细胞计数，按照 20000 个/cm² 细胞密度接种到 10 cm 培养皿中，放入二氧化碳培养箱中培养以得到 P2+3 代单克隆细胞，收集 P2+3 代单克隆细胞上清，在 200 g 的转速下离心 5 min 去除 P2+3 代单克隆细胞的碎片，零下 80 摄氏度存放，用于尿素和 AAT 的合成检测。

10 cm 培养皿中的 P2+3 代单克隆细胞的汇合度达到 80%以上时，进行传代培养，常规进行消化、传代，10 cm 培养皿中的 P2+3 代单克隆细胞，全部消化下来，离心后进行细胞计数，按照 20000 个/cm² 细胞密度接种到 T75 瓶中，放入二氧化碳培养箱中培养以得到 P2+4 代单克隆细胞。

表 2 检测结果

名称	AAT 分泌(ng/million cell/24h)	尿素合成(ng/million cell/24h)
A14	270.57	179.57
B42	350.98	220.98

C17	101.47	116.47
F25	140.58	132.58
G47	125.25	151.25
H53	149.96	145.96

图 2 为本发明实施例的细胞株 B42 的细胞形态示意图；图 3 为本发明实施例的细胞株 B42 培养到第十五代的细胞形态示意图。

通过筛选选择细胞株 B42 为永生化肝前体细胞，并将细胞株 B42 进行传代培养至第十五代以得到第十五代细胞株 B42，对细胞株 B42 和第十五代细胞株 B42 的细胞形态图进行拍照得到图 2 和图 3。参照图 2 和图 3，第十五代细胞株 B42 的细胞形态与细胞株 B42 的细胞形态几乎一致，说明细胞株 B42 经过传代培养之后依然具有肝前体细胞的特征，即能证明细胞株 B42 具有永生化。

使用流式细胞术对细胞株 B42 进行鉴别分析，具体步骤包括：

对细胞株 B42 进行表面标记物染色：取培养中细胞株 B42，吸弃培养基，使用 5 ml 无菌 PBS 缓冲液润洗，然后用往培养皿中滴加 2 ml 胰酶消化液进行消化处理得到细胞混合物，将细胞混合物置于 15ml 离心管中，将离心管放入离心机中，以 200g 的速率进行转速进行 5 分钟的离心处理，弃去离心处理后的细胞混合物的上层清液，得到细胞沉淀物；

向细胞沉淀物中加入 100μL 的染色缓冲液对细胞沉淀物进行重悬，将重悬后的细胞沉淀物转移到 6 个 1.5ml 离心管，规格为 100μL/管。分别往上述 6 个 1.5ml 离心管中加入 5μL 的待测流式抗体，吹打混匀；将离心管置于 2-8℃ 冰箱静置 30 分钟后，按照 800 微升/管的

剂量往每个离心管中加入无菌 PBS 缓冲液,然后将离心管放入离心机中,以 300g 的转速进行 5 分钟的离心处理。离心结束后,弃上清,将离心管置于试管架上在 37 摄氏度温度下孵育 20 分钟,往孵育完成后的每个离心管中分别加入 400 μ L 染色缓冲液对细胞沉淀物进行重悬,然后转移至流式管中,将重悬后的细胞混合物进行表面标记物的流式检测;

表面标志物流式检测使用到的抗体名称是:CD24、CD326、CD34、CD45 和 HLA-DR/DP/DQ;其中,CD34 购自 abcam,货号 ab81289;CD45 购自 abcam,货号 ab40763;HLV-DR/DP/DQ 购自 abcam,货号为 ab7856;CD326 购自 BD Biosciences,货号为 565399;CD24 购自 abcam,货号为 ab290730;染色缓冲液购自 Biosharp,货号为 BL1136A,胰酶消化液购自源培,货号为 S310JV。

图 4 为本发明实施例的细胞株 B42 阴性表达 CD34 的流式细胞术检测结果示意图;图 5 为本发明实施例的细胞株 B42 阴性表达 CD45 的流式细胞术检测结果示意图;图 6 为本发明实施例的细胞株 B42 阴性表达 HLA-DRPQ 的流式细胞术检测结果示意图;图 7 为本发明实施例的细胞株 B42 阳性表达 CD24 的流式细胞术检测结果示意图;图 8 为本发明实施例的细胞株 B42 阳性表达 CD326 的流式细胞术检测结果示意图。

对细胞株 B42 进行流式细胞术检测,参照图 4、图 5、图 6、图 7 和图 8,细胞株 B42 阴性表达 CD34、CD45、HLA-DRPQ,阳性表达 CD24、CD326。

二、细胞株 B42 对肝衰竭的治疗

1) D-gal 诱导剂的制备：称取 D-gal 500mg，加 10mL 生理盐水，涡旋溶解以得到 D-gal 诱导剂，D-gal 诱导剂的浓度为 50mg/mL，将 D-gal 诱导剂放在 2-8 摄氏度的环境下储存，2 小时内使用完，D-gal 来源于 Sigma 公司。

2) LPS 诱导剂的制备：称取 LPS 6.9mg，加 NS 6.9mL，涡旋溶解以得到第一溶液，第一溶液的浓度为 1mg/mL，将第一溶液分装成 100 μ L/管，在零下 80 摄氏度条件下保存；实验当天取一管并向管内加入 0.9mL 的 NS 以得到第二溶液，第二溶液的浓度为 100 μ g/mL，取 0.4mL 的第二溶液，向第二溶液加 9.6mL 的 NS，混合均匀以得到 LPS 诱导剂，LPS 诱导剂的终浓度为 4 μ g/mL，将 LPS 诱导剂放在 2-8 摄氏度的环境下储存，2 小时内使用完，LPS 来源于上海懋康生物科技有限公司。

3) 造模方法：小鼠适应环境 2 天后，随机选取 24 只称重，按 10mL/kg 单次腹腔注射 D-gal 诱导剂(500mg/kg)，3 小时后按 10mL/kg 单次腹腔注射 LPS 诱导剂（40 μ g/kg）以得到肝衰竭小鼠模型。小鼠的种属品系：C57BL/6N 小鼠；小鼠的级别：SPF；小鼠的性别：雄性；小鼠的周龄：8 周龄；小鼠的数量：24 只；小鼠的来源：浙江维通利华实验动物技术有限公司；小鼠的许可证号：SCXK（京）2021-0006；小鼠的合格证号：1100112301103117632。

4) 药物制备：将若干细胞株 B42 从液氮罐中取出，置于干冰上转

运；细胞株 B42 立即没于 37℃水浴锅中，轻轻摇晃，至液体完全融化，左右晃匀。注意软管接头处不要浸入水浴锅内。将全部液体用移液枪取出，加入 50 mL 无菌离心管中，离心机在 200g 的条件下离心 5 分钟，离心结束后，弃上清，用生理盐水将细胞株 B42 稀释至 5×10^6 个/mL，临用前使用 40 μ m 细胞滤网过滤以得到含有细胞株 B42 的注射液。

5) 动物分组：

将肝衰竭小鼠模型随机分为对照组和实验组，每组 12 只，对照组按表 3 在注射 LPS 诱导剂之前的 30 分钟通过尾静脉注射 0.2mL 的生理盐水；实验组按表 3 在注射 LPS 诱导剂之前的 30 分钟通过尾静脉注射 0.2mL 的含有细胞株 B42 的注射液：

表 3 动物分组表

组别	动物数	性别	药物	剂量	给药途径	频次
对照组	12	雄性	生理盐水	0.2mL/只	尾静脉	单次
实验组	12	雄性	含有细胞株 B42 的注射液	0.2mL/只	尾静脉	单次

6)受试物注射

尾静脉注射操作步骤如下：

- a. 小鼠急性肝衰竭模型装入固定器中；
- b. 将小鼠急性肝衰竭模型的尾巴拉直固定，并擦拭酒精消毒；
- c. 将细胞吹打均匀，注射器吸取 0.2mL 的含有细胞株 B42 的注

射液；

d. 注射器针头刺入小鼠急性肝衰竭模型的尾静脉内，注入含有细胞株 B42 的注射液，推注时间约 1 分钟；

e. 推注结束后撤注射器，干棉球压迫穿刺点止血；

f. 小鼠急性肝衰竭模型放回笼盒饲养。

7)临床观察

对照组和实验组的肝衰竭小鼠模型注射含有细胞株 B42 的注射液后：对照组中的肝衰竭的小鼠模型未见给药相关不良反应，实验组中的肝衰竭小鼠模型主要表现为活动减少和精神萎靡体温低的症状。

8)生存率

图 9 为本发明实施例的的实验组和对照组小鼠急性肝衰竭模型生存率的对照示意图。

实验组中的小鼠急性肝衰竭模型在注射 D-gal 诱导剂(500mg/kg)联合 LPS 诱导剂(40 μ g/kg)后观察小鼠急性肝衰竭模型的生存状况并记录死亡时间，采用 GraphPad Prism 8 作生存曲线。参照图 9，实验组和对照组相比较，实验组中的小鼠急性肝衰竭模型的生存率为 60%，而对照组中的小鼠急性肝衰竭模型的生存率为 0%，实验组具有显著性差异，故肝前体细胞对 D-gal 诱导剂(500mg/kg)联合 LPS 诱导剂(40 μ g/kg)诱导的小鼠急性肝衰竭模型有显著疗效。

虽然在上文中详细说明了本发明的实施方式，但是对于本领域的技术人员来说显而易见的是，能够对这些实施方式进行各种修改和变

化。但是，应理解，这种修改和变化都属于权利要求书中所述的本发明的范围和精神之内。而且，在此说明的本发明可有其它的实施方式，并且可通过多种方式实施或实现。

权利要求书

1.一种肝前体细胞的建系方法，其特征在于，包括以下步骤：

S0：提供肝前体细胞、混合液和重编程培养基，其中，所述混合液包括无血清培养基、聚乙烯亚胺和 CLP 质粒；

S1：将所述肝前体细胞和所述混合液进行转染处理以得到转染后的肝前体细胞；

S2：将所述转染后的肝前体细胞放入所述重编程培养基中进行传代培养，以得到永生化的肝前体细胞。

2.根据权利要求 1 所述的肝前体细胞的建系方法，其特征在于，所述无血清培养基和所述聚乙烯亚胺的体积比为(500-1000):1。

3.根据权利要求 1 所述的肝前体细胞的建系方法，其特征在于，所述 CLP 质粒的终浓度为(1-5) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

4.根据权利要求 1 所述的肝前体细胞的建系方法，其特征在于，所述提供肝前体细胞的步骤包括：将肝细胞放入所述重编程培养基中进行扩增培养，然后将所述重编程培养基换成减血清培养基继续培养以得到肝前体细胞。

5.根据权利要求 1 所述的肝前体细胞的建系方法，其特征在于，所述重编程培养基包括 DMEM/F12 基础培养基，以及以占 DMEM/F12 基础培养基的含量计：15-25ng/mL 的肝细胞生长因子 HGF，15-25ng/mL 的上皮细胞生长因子 EGF，5-15 μM 的 ROCK 激酶抑制剂 Y27632，1-5 μM 的 Wnt 信号通路激动剂 CHIR99021，1-5 μM

的 TGF- β 信号抑制剂 A8301, 1-5 μ M 的鞘氨醇-1-磷酸 S1P and 5 μ M 的吲哚乙酸 LPA。

6.根据权利要求 5 所述的肝前体细胞的建系方法, 其特征在于, 所述重编程培养基还包括 N2 营养补充剂、B27 营养补充剂、丙酮酸钠和抗坏血酸。

7.根据权利要求 1 所述的肝前体细胞的建系方法, 其特征在于, 所述重编程培养基包括 DMEM/F12 基础培养基, 以及以占 DMEM/F12 基础培养基的含量计: 含量为 1-10% 的 N2 营养补充剂, 含量为 1-10% 的 B27 营养补充剂, 1mM 的丙酮酸钠, 5-15 μ g/mL 的抗坏血酸, 15-25ng/mL 的肝细胞生长因子 HGF, 15-25ng/mL 的上皮细胞生长因子 EGF, 5-15 μ M 的 ROCK 激酶抑制剂 Y27632, 1-5 μ M 的 Wnt 信号通路激动剂 CHIR99021, 1-5 μ M 的 TGF- β 信号抑制剂 A8301, 1-5 μ M 的鞘氨醇-1-磷酸 S1P and 5 μ M 的吲哚乙酸 LPA。

8.一种肝前体细胞, 其特征在于, 由权利要求 1-7 任一项所述的肝前体细胞的建系方法制备得到。

9.根据权利要求 8 所述的肝前体细胞, 其特征在于, 所述肝前体细胞阴性表达 CD34、CD45 和 HLA-DRPQ, 所述肝前体细胞阳性表达 CD24 和 CD326。

10.一种如权利要求 8-9 任一项所述的肝前体细胞的应用, 其特征在于, 应用于制备治疗急性肝衰竭的药物。