

新型永生化人肝细胞系 HepZJ 的安全性研究

卢扬洲¹, 黎少¹, 姜华², 李路路², 王超², 霍艳², 黄瑛^{2*}, 高毅^{1*}

1. 南方医科大学珠江医院 肝胆二科, 广东 广州 510280

2. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心/药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

摘要: 目的 对新型永生化人肝细胞系 HepZJ 进行安全性研究。方法 获取 HepZJ 培养上清液, 通过 PCR 联合琼脂糖凝胶电泳法进行支原体检测, 通过显色基质法进行内毒素检测; 将 HepZJ 细胞悬液经尾 iv 进入 SD 大鼠后观察其生存情况并于不同时间点进行剖检, 通实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法分析该细胞系的生物分布; 将 HepZJ 细胞悬液 sc 进入 BALB/c-nu 裸鼠后分析其致瘤性。结果 HepZJ 支原体检测电泳图未见阳性条带; 内毒素检测浓度 < 2 EU/mL; SD 大鼠尾 iv HepZJ 后生存情况良好, 血液、肺脏、脾脏在不同时间点出现不同程度的 GAPDH-Human 和 TERT-Human 基因表达, 血液中 12 h 后、肺脏和脾脏中 1 周后基本被清除, 剖检过程中未见肿块形成; 裸鼠 sc HepZJ 后无硬性肿物形成。结论 新型永生化人肝细胞系 HepZJ 无支原体、细菌污染, 进入体内后无明显副反应及致瘤性, 具备应用安全性。

关键词: 新型永生化人肝细胞系; 安全性; 支原体; 内毒素; 生物分布; 致瘤性

中图分类号: R9-331 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)06-1062-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.022

Safety research on new immortalized hepatocyte cell line HepZJ

LU Yangzhou¹, LI Shao¹, JIANG Hua², LI Lulu², WANG Chao², HUO Yan², HUANG Ying², GAO Yi¹

1. Department of Hepatobiliary Surgery II, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China

2. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control/The Beijing Key Lab for Pre-clinical Safety Evaluation of Drugs, Beijing 100176, China

Abstract: Objective To complete the safety research for the new immortalized hepatocyte cell line HepZJ to confirm that it has applied security. **Methods** Obtaining the supernatant fluid of HepZJ for mycoplasma detection by PCR and bacterial endotoxin detection by Chromogenic End-point Tachypleus Amebocyte Lysate. Through tail vein HepZJ suspension was injected into SD rats to observe its survival and have autopsies at different time points for purpose of analyzing biodistribution of HepZJ by RT-PCR. The HepZJ suspension was injected subcutaneously into BALB/c nude mice to analyze its tumorigenicity. **Results** HepZJ mycoplasma detection electrophoregram did not show up positive stripe and endotoxin detection concentration was lower than 2 EU/mL; SD rats after injecting HepZJ intravenously survived well and its blood, lung, and spleen had different HepZJ gene expressions at different time but they were basically cleared away after one week. No lumps was discovered in the process of autopsy. Nude mice injecting HepZJ subcutaneously hadn't found any tumor. **Conclusion** The new immortalized hepatocyte cell line HepZJ had no mycoplasma, bacterial contamination, and obvious secondary reaction nor tumorigenicity. Therefore, HepZJ is secure to be a new cell line for clinical and basic research.

Key word: new immortalized hepatocyte cell line; safety; mycoplasma; endotoxin; biodistribution; tumorigenicity

收稿日期: 2018-01-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)资助(2012AA020505); 国家自然科学基金资助项目(81470875); 国家重点研发计划课题(2016YFA0101503); 广东省级科技计划项目(2014B020227002、2015B090903069、2015B020229002、2013B091100001); 广东省自然科学基金资助项目(2014A030312013); 中国食品药品检定研究院学科带头人课题(2015X1)

第一作者: 卢扬洲(1991—), 男, 籍贯广东陆丰, 在读硕士, 研究方向为肝脏组织工程。

*通信作者: 高毅(1961—), 男, 籍贯北京, 医学博士学位, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向生物人工肝、肝脏组织工程

E-mail: gaoyi6146@163.com

黄瑛(1983—), 女, 籍贯广西, 助理研究员、博士学位, 主要从事药物临床前安全性评价 E-mail: huangying1002@nifdc.org.cn

我国是肝病大国, 各类病毒性肝炎、肝硬化、肝癌等肝病的最终结局是急性或慢性肝衰竭。治疗

终末期肝衰竭的传统有效方法是肝移植,但肝源短缺成为阻碍其全面推广的最大因素。随着细胞移植技术和组织工程学的发展,肝细胞移植和生物人工肝被认为是肝衰竭患者最有希望获得较好疗效的新方法^[1-2]。不管是肝细胞移植还是生物人工肝,其核心均为肝细胞。目前作为细胞移植的肝细胞来源以及生物人工肝的种子细胞,如原代肝细胞、干细胞、肿瘤来源肝细胞系和动物源性肝细胞等,都存在不同程度的缺陷^[3]。基于以上各类细胞存在的不足,实验室前期利用慢病毒表达载体对原代培养的正常人肝细胞稳定转染人端粒酶逆转录酶基因(hTERT)的方法,建立新型永生化人肝细胞系 HepZJ,并对其肝细胞功能进行生物学研究。在应用上,除了具备治疗有效性外,更重要的是细胞安全性。本实验对 HepZJ 进行支原体检测、内毒素检测、体内生物分布以及致瘤性研究,综合评价其生物安全性。

1 材料

1.1 主要试剂

PCR Master Mix 和 primer 购自日本 TAKARA 公司 (DRR071A); 支原体扩增引物序列为: 支原体-F: 5' -TCGTAACAAGGTATCCCTAC-3'、支原体-R: 5' -GCATCCAAATACTCT-3'; 生物分布各扩增引物序列为 TERT-Human-F: 5' -CGTGGTTTCTGTG TGGTGTC-3', TERT-Human-R: 5' -TGGAACCCA GAAAGATGGTC-3'; GAPDH-Rat-F: 5' -TGTTGC TGTAGCCATATTCATTGT-3', GAPDH-Rat-R: 5' -CCATTCTTCCACCTTTGATGCT-3'; GAPDH-Human-F: 5' -CGACCAAATCCGTTGACTCC-3', GAPDH-Human-R: 5' -CCTGTTTCGACAGTCAGC CG-3'。

显色基质鲎试剂盒,由厦门鲎试剂生物科技股份有限公司提供; TAKARA 逆转录试剂盒、TAKARA 荧光定量试剂盒、DMEM 基础培养基,购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清,购自美国 Hyclone 公司; 0.25% Trypsin & 0.02% EDTA 胰蛋白酶,购自吉诺生物医药技术有限公司。

1.2 主要仪器

Thermo 酶标仪 (multiscan MK3); 实时荧光定量 PCR 系统 (ABI7500)。

1.3 实验动物

6 周龄 170~200 g SD 大鼠 48 只,购自南方医科大学实验动物中心 (SPF 级),实验动物生产许可证号 SCXK (粤) 2011-0015; 6 周龄 12~18 g

BALB/c-nu 裸鼠 30 只 (SPF 级),由北京维通利华实验动物技术有限公司繁育,实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2016-0011。

2 方法

2.1 HepZJ 的支原体检测

以含 10%胎牛血清的培养基在 37 °C, 5% CO₂ 的条件下复苏并培养 HepZJ 细胞 (南方医科大学再生医学研究所,第 6 代),每隔 2 天换液 1 次。待细胞稳定增殖至第 9 代时吸取上清培养液作为 HepZJ 细胞组,共 3 个平行样品,另设阴性对照组 (ddH₂O) 和阳性对照组 (已污染的含 10%胎牛血清培养基) 各两个样品。以各样品为模板,在 0.2 mL EP 管中配制表 1 中体系,PCR 扩增仪反应条件设为 98 °C 2 min, 98 °C 15 s, 58 °C 15 s, 68 °C 20 s, 30 个循环; 68 °C 5 min; 16 °C 保存; 将体系在该扩增条件下进行 PCR 扩增,扩增后体系进行 2%琼脂糖凝胶电泳。

表 1 支原体检测 PCR 反应体系

Table 1 PCR reaction system for mycoplasma detect

| 试剂 | 体积/ μ L | 终浓度 |
|---------------------------|-------------|------------------|
| 2 \times PCR Master Mix | 10 | 1 \times |
| 支原体-F (10 μ mol/L) | 0.5 | 0.25 μ mol/L |
| 支原体-R (10 μ mol/L) | 0.5 | 0.25 μ mol/L |
| 模板 | 5 | |
| ddH ₂ O | 4 | |
| 总计 | 20 | |

2.2 HepZJ 的内毒素检测

采用显色基质法,以 10%胎牛血清的培养基在 37 °C、5% CO₂ 的条件下复苏并培养 HepZJ 细胞,每隔 2 天换液 1 次。待细胞稳定增殖时吸取上清培养液作为供试品待用。取内毒素工作液 1 支,稀释成 1.0 EU/mL,再以其为母液稀释成 0.010、0.025、0.050、0.100 EU/mL 的浓度梯度作为标准溶液待用。分别取无热原试管,加入 100 μ L 内毒素标准溶液、细菌内毒素检查用水、供试品。再加入 100 μ L 鲎试剂溶液,混匀并 37 °C 温育 6 min; 温育结束,加入 100 μ L 显色基质溶液,混匀并 37 °C 温育 5 min; 温育结束,加入 500 μ L 偶氮化试剂 1 溶液,混匀加入 500 μ L 偶氮化试剂 2 溶液,混匀加入 500 μ L 偶氮化试剂 3 溶液,混匀静置 5 min,于 545 nm 波长处

读取吸光度 (A) 值, 重复 3 次取平均值。根据 A 值绘制标准曲线, 再由标准曲线计算出供试品以及细菌内毒素检查用水 (阴性对照) 的内毒素浓度。

2.3 HepZJ 在 SD 大鼠体内的生物分布

2.3.1 HepZJ 的培养及细胞悬液的配制 参考 Ra J C 等^[4]的操作方法, 以含 10% 胎牛血清的完全培养基培养细胞, 每 2 天换液一次, 待细胞生长至足量时, 消化并离心细胞, 生理盐水反复润洗除去血清, 并配制浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 的肝细胞生理盐水悬液备用。

2.3.2 SD 大鼠尾 iv 及各组织器官的获取 取健康 6 周龄 SD 大鼠 48 只, 分为对照组 16 只和实验组 32 只, 雌雄各半, 对照组和实验组分别尾 iv 生理盐水和 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 的肝细胞悬液 2 mL 后, 均观察动物体质量、饮食、症状, 有无体表肿物及死亡情况并记录。于 10、30 min、12、24 h、3 d、1、4、13 周等不同时间点进行解剖检查, 每次剖检取对照组 2 只, 实验组 4 只 (均雌雄各半)。ip 戊巴比妥 45 mg/kg 进行麻醉, 麻醉后开腹观察体内有无肿块形成。于下腔静脉进行采血, 采血量约 2 mL, 迅速以红细胞裂解液进行相关处理后加入 Trizol 于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。然后依次获取心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸、卵巢、子宫和大网膜, 迅速放入液氮中, 24 h 后移至 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱储存。

2.3.3 qRT-PCR 检测 SD 大鼠各组织器官的基因表达量 通过 Trizol 法分别提取血液、心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸、卵巢、子宫和大网膜总 RNA, 根据 TAKARA 逆转录试剂盒操作步骤进行去除基因组 DNA 反应、逆转录反应以合成 cDNA 并作为 RT 反应液。按表 2 配制 PCR 反应液 (冰上进行), 根据 TAKARA 荧光定量试剂盒两步法 PCR 反应程序, 在实时荧光定量 PCR 系统 (ABI 7 500) 上进行 RT-PCR 扩增, 每个样本分成 3 个平行管测量取平均值, 定量检测人源基因 GAPDH-Human、TERT-Human 和鼠源基因 GAPDH-Rat 的表达。并通过两种检测指标判断人源 HepZJ 在大鼠体内的表达: ① 以人源基因 GAPDH-Human 为目的基因, 鼠源基因 GAPDH-Rat 为内参基因, 计算 GAPDH-Human 的相对表达量; ② 以人源基因 TERT-Human 为目的基因, 人源基因 GAPDH-Human 为内参基因, 计算 TERT-Human 的相对表达量。根据双 $\Delta\Delta C_t$ 法计算相对表达量 $= 2^{-\Delta\Delta C_t}$, 其中 $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})_{\text{实验组}} - (C_{t \text{ 目的基因}} - C_{t \text{ 内参基因}})_{\text{对照组}}$, 进而分析该细胞系在大鼠体内的生物分布。

表 2 支原体检测 qRT-PCR 反应体系
Table 2 qRT-PCR reaction system for mycoplasma detect

| 试剂 | 体积/ μL | 终浓度 |
|--|-------------------|------------------------------|
| SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) | 25.0 | $1 \times$ |
| 正向引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) | 2.0 | $0.4\text{ }\mu\text{mol/L}$ |
| 反向引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) | 2.0 | $0.4\text{ }\mu\text{mol/L}$ |
| ROX Reference Dye ($50 \times$) | 1.0 | $1 \times$ |
| RT 反应液 | 4.0 | |
| dH ₂ O | 16.0 | |
| 总计 | 50.0 | |

2.4 HepZJ 的致瘤性实验

取 6 周龄 BALB/c-nu 裸鼠 30 只, 分为 HepZJ 细胞组、Hela 细胞 (阳性对照) 组和阴性对照组各 10 只, 雌雄各半, 分别 sc 浓度为 $2.5 \times 10^8/\text{mL}$ ^[4, 13] 的 HepZJ 细胞、浓度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 的 HeLa 细胞 (中国食品药品检定研究院, 第 19 代) 和生理盐水各 0.2 mL, 给药后观察并记录裸鼠注射部位有无结节或肿物形成、皮肤破溃及死亡, 并持续观察 5 周后脱臼处死, 分析 HepZJ 的致瘤性情况。

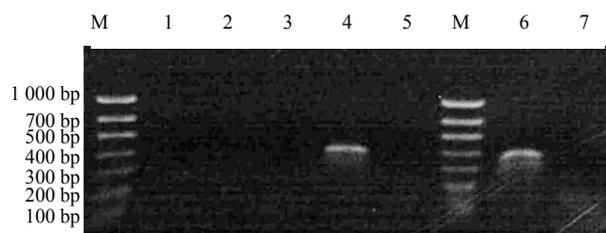
2.5 数据处理

使用 Office Excel 2003 和 Graphpad prism 5 软件进行数据处理及图表绘制。

3 结果

3.1 支原体检测

由电泳图 (图 1) 可见, 阳性对照组在 400 bp 出现阳性条带, 阴性对照组及 HepZJ 细胞上清液样品均未出现条带, 提示 HepZJ 细胞无支原体污染。



泳道 M-DL1000 DNA Marker; 泳道 1、2、3-HepZJ 细胞上清液; 泳道 4、6-阳性对照; 泳道 5、7-阴性对照
Lane M - DL1000 DNA Marker; Lane 1, 2, 3 - supernatant of HepZJ cell; Lane 4, 6 - positive control; Lane 5, 7 - negative control

图 1 HepZJ 细胞上清液 PCR 法支原体检测电泳图
Fig. 1 Mycoplasma detection electrophoregram of HepZJ cell supernatant through PCR method

3.2 内毒素检测

由内毒素浓度条形图 (图 2) 可见, 各细胞上

清液样品均远小于文献报道标准 2 EU/mL^[5], 采用双因素方差分析, 各样品内毒素浓度与 2 EU/mL 比较均具有显著性差异 ($P < 0.001$), 提示细胞无细菌污染。

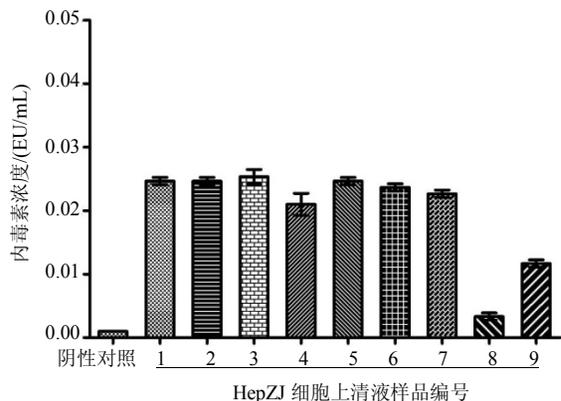


图2 HepZJ 细胞上清液 9 个样品的内毒素检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Endotoxin detection of nine samples of HepZJ supernatant fluid ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 HepZJ 在 SD 大鼠体内的生物分布

3.3.1 SD 大鼠一般情况 大鼠实验过程中体质量呈生理性增长, 饮食正常, 精神活泼, 被毛柔顺、有光泽, 皮肤正常, 眼睛有神, 四肢无畸形, 肛门洁净, 粪便黑色、形状正常, 无异常死亡情况, 剖检未见肿块形成。

3.3.2 HepZJ 在 SD 大鼠体内的生物分布 基因相对表达量结果采用双因素方差分析, 如图 3 所示, SD 大鼠尾 iv Hep ZJ 细胞后, 血液中 GAPDH-Human 和 TERT-Human 的表达随即升高, 于 10 min 时最高, 然后逐渐降低; 与对照组比较, 于 10 和 30 min 时, 具有显著性差异 ($P < 0.001$), 在 12 h 时表达无显著性差异。尾 iv Hep ZJ 细胞后, 肺组织 GAPDH-Human 和 TERT-Human 表达同样升高, 于 3 d 时最高, 然后降低, 于注射后 12、24 h 和 3 d 时具有显著性差异 ($P < 0.001$), 在 1 周后表达量明显降低; 脾组织中只有 GAPDH-Human 少量表达, 但于 12、24 h 和 3 d 时同样具有显著性差异 ($P < 0.001$)。其余脏器基因表达量均低于对照组或无统计学差异, 未列出。结果提示, HepZJ 进入体内 12 h 后在血液中被清除, 1 周后在组织中被清除。

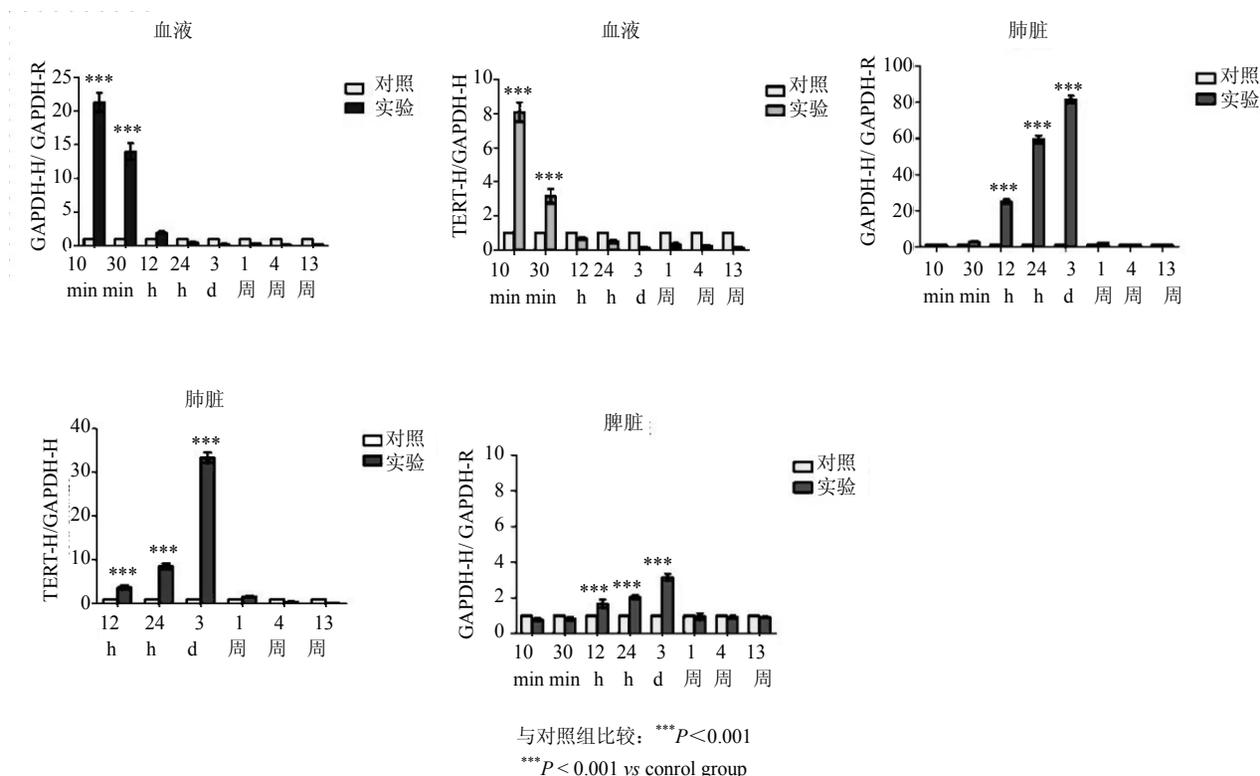


图3 SD 大鼠尾静脉注射后不同时间点 RT-PCR 检测不同组织的 HepZJ 基因表达量条形图 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Gene expression bar charts of HepZJ in different tissue by RT-PCR at different time points after tail vein injection of SD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 HepZJ 的致瘤性实验

裸鼠 sc 细胞后, HeLa 细胞组 1 周后开始出现注射部位皮下硬性肿物, 并逐渐增大, 每周测量瘤体长径 a 和宽径 b 并根据公式 $V=1/6\pi \times a \times b^2$ 估算瘤体积, 绘制 5 周内肿瘤生长曲线 (图 4); 实验组于 3 d 时个别裸鼠注射部位出现皮下小结节, 随后逐渐缩小, 2 周后小结节消失; 阴性对照组未见皮下肿物形成 (图 5)。观察期内所有裸鼠均未出现皮肤破溃及死亡情况。

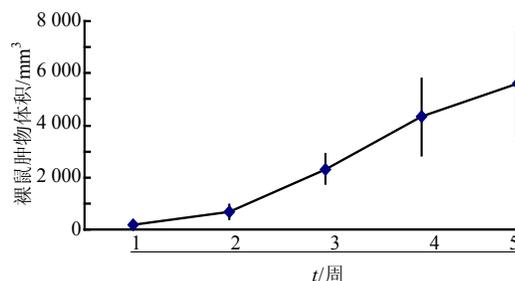


图 4 阳性对照组裸鼠的肿瘤生长曲线 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 4 Tumor growth curve of rats in positive control ($\bar{x} \pm s, n=5$)



图 5 裸鼠皮下注射 HepZJ、生理盐水和 HeLa 后第 3 周肿瘤大小的比较

Fig. 5 Comparison of subcutaneous tumor after cell injection of nude mice

4 讨论

细胞永生是将猿猴病毒大 T 抗原 (SV40T) 基因或人端粒酶逆转录酶 (hTERT) 基因导入到原代培养细胞, 从而使原代细胞在体外获得无限增殖和传代的能力。国内外均具有成熟的细胞永生技术, 已经成功构建了 HepCL、NeHepLxHT、LIV0APOLY 和 HSD11B1-TG 等永生肝细胞系^[6-9]。

实验室前期采用导入 hTERT 基因的方法, 通过 PCR 扩增 hTERT 质粒中的 hTERT 基因, 将其克隆入 pIRES-RFP 载体, 构建慢病毒载体 phTERT-IRES-RFP。再以慢病毒载体 phTERT-IRES-RFP 为模板 PCR 扩增并克隆入 plenti6.3-MCS-V5 质粒, 构建重组载体 pLENT6.3/V5-hTERT-IRES-RFP。最后用重组载体感染人原代肝细胞, 通过杀稻瘟筛选获得阳性克隆, 建立新型永生肝细胞系 HepZJ。故本实验可通过检测 GAPDH-Human 和 TERT-Human 分析 HepZJ 的生物分布。镜下观察发现, 该细胞系具备人原代肝细胞的形态特点, 增殖能力强, 染色体核型分析表明当 HepZJ 传代 50 次时其细胞核型仍未见异常。RT-PCR 检测发现 HepZJ 有 hTERT、ALB、P4503A、HNF4、GS、GST- π 、HBCF-X、CK18、ASGPR 等的基因表达; 全自动生化分析仪

检测发现, 随着 HepZJ 培养时间的延长, 培养上清中的丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 呈递减趋势, 而尿素则呈上升趋势, 这些结果都提示该细胞系具备一般肝细胞的功能。

该细胞系作为细胞材料进入临床应用前, 除了具备肝细胞功能, 保证治疗有效性外, 更重要的是其安全性。于是, 本课题对新型永生肝细胞系 HepZJ 的安全性设计了支原体、内毒素检测, 生物分布和致瘤性等实验。目前, 国内外安全性研究多数停留在干细胞领域或者某些药物及其制剂, 未见永生细胞系全面的安全性评估相关报道^[10-12]。永生肝细胞系 HepZJ 主要用于肝细胞移植、生物人工肝系统等, 属于细胞治疗产品。本实验对该新型治疗产品进行较为全面的安全性研究, 具有一定的创新性和实用性。

实验证明, HepZJ 细胞无支原体、细菌感染, 说明以 HepZJ 作为细胞材料在临床应用上符合无菌原则, 不会造成机体的病菌感染。

在生物分布方面, 以正常 SD 大鼠为动物模型, 以尾 iv 为给药方式设计了实验。结果表明, 该细胞注射进入体内后, 通过血液循环迅速到达全身, 在 10 min 时血液中肝细胞含量最高, 随后快速下降,

约 12 h 后基本清除。另外, 细胞在血液循环中可能蓄积在各器官组织, 引起相应靶器官的功能障碍。实验中各脏器组织的 RT-PCR 结果提示, 肺组织是最主要的细胞蓄积靶器官。在细胞进入体内后即不断滞留在肺脏中, 第 3 天时蓄积细胞量最大, 1 周后基本清除。脾组织中也有少量肝细胞, 其余器官如心、肝、肾、脑、睾丸、卵巢、子宫和大网膜均未见细胞滞留, 所有器官组织均未见异样肿块形成。此结果和 Yun 等^[13]对干细胞的研究结论类似, 和 Lee 等^[14]相比, 则细胞停留在肺脏的时间明显延长, 可能与注射细胞量过大有关。

细胞移植的临床治疗量一般为 $1 \times 10^6/\text{kg}$ ^[15], 本生物分布实验所用细胞量至少为临床用量的 100 倍以上。但通过 13 周的剖检以及观察, 大鼠的生长情况良好, 剖检未见肿块形成, 亦未见意外死亡情况。该结果初步提示, 新型永生生化人肝细胞系作为细胞治疗材料是安全的。另外, 细胞易蓄积在肺脏的现象, 提示 iv 细胞进行临床治疗时, 应严格控制注射速度, 以免造成肺栓塞^[16]。

在致瘤性方面, 裸鼠 sc 剂量显著大于 Ra 等^[4]的 $1 \times 10^8/\text{kg}$ 和 Yun 等^[13]的 $2 \times 10^8/\text{kg}$, 未见硬性肿瘤形成, 个别动物出现小结节, 后逐渐消失, 考虑是注射细胞量较大导致细胞聚集成团滞留于皮下, 随后被机体缓慢吸收的结果。因此, 可以证实该细胞系在体内无致瘤性。

本研究设计并完成了新型永生生化人肝细胞系 HepZJ 的安全性实验, 验证了其体内安全性, 为肝细胞移植、生物人工肝系统等临床和基础研究提供了一种新的细胞材料, 同时也为其他种类的细胞系的安全性评价提供一个可参考的实验设计方法。然而, 本实验也存在不足之处, 如实验动物数量偏少, 致瘤性实验未行病理学检查等, 有待进一步完善。

参考文献

- [1] 丁义涛, 施晓雷. 生物人工肝脏临床研究现状 [J]. 中国研究型医院, 2017, 4(5): 17-25.
- [2] Sakiyama R, Blau B J, Miki T. Clinical translation of bioartificial liver support systems with human pluripotent stem cell-derived hepatic cells [J]. WJG, 2017, 23(11): 1974.
- [3] Forbes S J, Gupta S, Dhawan A. Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory [J]. J Hepatol, 2015, 62(1 Suppl): 157-169.
- [4] Ra J C, Shin I S, Kim S H. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans [J]. Stem Cells Dev, 2011, 20(8): 1297-1308.
- [5] Gong W, Han Z B, Zhao H. Banking human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for clinical use [J]. Cell Transpl, 2012, 21(1): 207-216.
- [6] Chen Y, Li J, Liu X. Transplantation of immortalized human fetal hepatocytes prevents acute liver failure in 90% hepatectomized mice [J]. Transpl P, 2010, 42(5): 1907-1914.
- [7] Yu G, He G, Li C. Hepatic expression of HCV RNA-dependent RNA polymerase triggers innate immune signaling and cytokine production [J]. Molecular Cell, 2012, 48(2): 313-321.
- [8] Green C J, Johnson D, Amin H D. Characterization of lipid metabolism in a novel immortalized human hepatocyte cell line [J]. Am J Physiol-Endoc M, 2015, 309(6): 511-522.
- [9] Kang H Y, Choi Y K, Jeong Y I. Immortalization of porcine 11 β - hydroxysteroid dehydrogenase type 1-transgenic liver cells using SV40 large T antigen [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(12): 2625.
- [10] 吴鹏飞, 周光纪. 诱导性多能干细胞治疗: 移植排斥与安全性问题 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(10): 1619-1623.
- [11] 胡泽斌, 王立生, 崔春萍, 等. 干细胞临床应用安全性评估报告 [J]. 中国医药生物技术, 2013, 8(5): 349-361.
- [12] 汪溪洁, 马 璟. 药物安全性评价新技术和新方法研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48(3): 341-350.
- [13] Yun J, Ahh J H, Kwon E. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in acute liver injury: Hepatoprotective efficacy, subchronic toxicity, tumorigenicity, and biodistribution [J]. Regul Toxicol Pharm, 2016, 81: 437-447.
- [14] Lee R H, Pulin A A, Seo M J. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6 [J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(1): 54-63.
- [15] He J, Ruan G, Yao X. Chronic toxicity test in cynomolgus monkeys for 98 Days with repeated intravenous infusion of cynomolgus umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(3): 891-904.
- [16] Mäkelä T, Takalo R, Arvola O. Safety and biodistribution study of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and mononuclear cells and the impact of the administration route in an intact porcine model [J]. Cytotherapy, 2015, 17(4): 392-402.