

- J. Cell Biol.*, 31: 319—345.
- [9] De Duve C. 1969, The lysosome in retrospect. In: *Lysosomes in Biology and Pathology*, vol. 1. Dingle J. T. et al. (eds), North Holland Publishing Co. 3—40.
- [10] Bienkowski, R. S. 1983, *Biochem. J.*, 214: 1—10.
- [11] Orci, L., et al., 1968, *J. Cell Biol.*, 38: 462—466.
- [12] Orci, L. et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 98: 222—228.
- [13] Farquhar, M. G., 1969, Lysosomes function in regulating secretion, disposal of secretory granules in cells of the anterior pituitary gland. in: *Lysosomes in Biology and Pathology*, vol. 2. Dingle J. T. et al. (eds), North Holland Publishing Co. 462—482.
- [14] Bacsy, E. et al., 1983, *Histochem.*, 78: 231—239.
- [15] Bacsy, E. et al., 1985, *Histochemical J.*, 17: 548—551.
- [16] Picard, D. et al., 1978, in: *Brain-endocrine interaction III, Neural Hormones and Reproduction 3rd Int. Symp.*, Wurzburg, 1977, 33—45.
- [17] Holtzman, E. and R. Dominitz, 1968, *J. Histochem. Cytochem.* 16: 320—336.
- [18] Oldman, S. B. et al., 1971, *Am. J. Med.*, 50: 650—657.
- [19] Landstrom, A. H. S. et al., 1991, *Metabolism*, 40: 399—405.
- [20] 易静、汤雪明, 1991, *实验生物学报*, 24: 203—213.
- [21] 易静等, 1993, *实验生物学报*, 26: 222—232.
- [22] Skoglund, G. et al., 1987, *Diabetes Res.*, 6: 31—84.
- [23] Skoglund, G. et al., 1989, *Int. J. Pancreatol.*, 4: 29—40.
- [24] Paavola, L. C., 1978, *J. Cell Biol.*, 79: 59.
- [25] 汤雪明, 1988, *实验生物学报*, 21: 119—129.
- [26] Tang, X. M. et al., 1988, *J. Androl.*, 9: 284—293.
- [27] 汤雪明等, 1992, *实验生物学报*, 25: 39—47.
- [28] Conti, M. et al., 1976, *J. Biological Chem.*, 251: 7729—7731.
- [29] Ascoli, M. and D. Puett, 1973, *J. Biological Chem.*, 253: 4892—4899.
- [30] Ascoli, M., 1984, *J. Cell Biol.*, 99: 1242—1250.
- [31] Hermo, L. and M. Lalli, 1988, *J. Androl.*, 9: 1—14.
- [32] Genty, N. et al., 1987, *Biol. Cell.*, 59: 129—135.
- [33] Herzog, V., 1981, *Trends. Biochem. Sci.*, 6: 319—322.

肝细胞生长因子

林凌* 汤国枝

(南京大学生化系 210008)

肝脏在机体新陈代谢方面起着重要而广泛的作用,它的再生是动物组织修复最重要的方面之一。1975年Laprocque等从大鼠再生肝中纯化出具有刺激肝脏生长作用的物质,命名为肝细胞刺激物质(Hepatocyte Stimulator Substance, HSS)和肝细胞增殖因子(Hepatocyte Proliferation Factor, HPF)。1984年Nakamura等从部分肝切除大鼠的血清中分离到一种

能刺激原代培养的肝细胞生长和DNA合成的肝源性因子,并首次将它命名为肝细胞生长因子(Hepatocyte Growth Factor, HGF)^[1]。近几年来肝细胞生长因子也在大鼠血小板^[2,3]、正常大鼠血清及摘除肝肿瘤后的病人血清^[4]和

* 现在南京大学医学院。

本文承蒙秦浚川教授审校,特此致谢。

暴发性肝衰竭病人的血浆^[6]中发现。1986年 Nakamura 等从2000只大鼠血小板中纯化到 HGF 单一组份,并证明它是一种新的生长因子^[6,7],随后并成功地克隆到人和大鼠 HGF 的 cDNA,推导出它们全部的氨基酸序列。1989年 Zarnegar 等^[8]从人血浆中分离到一种能刺激肝再生的蛋白,称为 Hepatoprotein A (HPTA),经过研究发现其生物学和化学性质以及一级结构与 HGF 一样,是同一物质。

自1987年以来,我国用正常的胎肝细胞悬液治疗重症肝炎取得了显著疗效,发现胎肝中存在一种特异性的肝细胞刺激物质,能促进损伤的肝组织恢复,但都未纯化到单一的活性组分^[9,12]。总结比较已报道的肝细胞生长因子,虽然它们均具有促进肝细胞生长和增殖的功能,但在来源、分子量和性质等方面有较大的差异,看来促肝再生可能是多种因子共同调控的。

一、HGF 的来源及生化特性

目前的研究表明, HGF 有3种来源: (1) 血浆和血清: 从部分肝切除后或肝损伤后动物血清中都能分离到 HGF^[7]。(2) 肝脏^[10]: 实验证明大鼠、狗、兔、猪等多种动物肝脏中可提取到这种物质,尤其在肝损伤时 HGF 含量也会大大提高。最近 Ichiroshimizu^[11]等从肝硬化病人的腹水和血浆中也纯化到 HGF。(3) 小肠: 1985年冈部和彦等从部分肝切除40小时后的 Wistar 大鼠小肠粘膜的可溶性成分中提取出一种可使肝细胞增殖的生长因子,但若切除小肠粘膜 Peyer's 淋巴结,肝细胞再生率将下降约80%,这说明小肠也是 HGF 的来源之一。Starzl 等的实验也证明了这种结果。

由于实验动物的种类及 HGF 来源不同, HGF 分子量的报道有4种: (1) MW > 119 kD^[11]; (2) MW 在 82—85 kD^[6]; (3) MW 在 29.8—49.6 kD^[7]; (4) MW 在 10 kD 左右^[12]。

1. 化学性质

Nakamura 等^[9,7]从大鼠血小板中经过肝

素亲和层析等四个步骤得到单一的 HGF。其他学者也利用肝素亲和层析分别从暴发性肝炎病人的血浆^[13]和人的血清中纯化到 HGF^[6]。这说明 HGF 对肝素有很强亲和性。另外, HGF 也是一种对刀豆球蛋白 A (Concanavalin A) 有很强亲和性的糖蛋白^[6,7]。

HGF 是一个异二聚体, 根据 SDS-PAGE 分析, MW 82—85 kD 的 HGF 是由 69 kD 的大亚基(重链)和一个 34 kD 的小亚基(轻链)组成, 两条链通过一对二硫键相连。HGF 对热不稳定, 56℃ 30 分钟或 100℃ 1.5 分钟几乎失去活性, 醋酸作用下部分失活, 胰酶消化或还原剂处理完全失活。

2. 生物学性质

HGF 单独作用时能大大地刺激成年大鼠肝细胞 DNA 的合成且能使大约 40% 的大鼠肝细胞进入 S 期。若在 HGF、表皮生长因子和胰岛素共同作用下 80% 以上的大鼠肝细胞可进入 S 期。

HGF 无种属特异性。它不刺激非实质性肝细胞和诸如 Swiss 3 T 3 细胞和 NRK-49 F 细胞等许多成纤维细胞的生长和 DNA 的合成。

最近发现, HGF 不仅仅局限作用于肝细胞, 也能刺激传代兔正常肾上皮细胞^[14]、人正常表皮黑色素细胞^[15]和角化细胞^[16] DNA 的合成和生长。除刺激细胞生长以外, HGF 也能大大增加如狗肾上皮细胞^[17]和人角化细胞^[16]等多种上皮细胞的活动性(Motility)。另外 HGF 也强烈抑制许多肿瘤细胞的生长, 如 B 6/F 黑色素瘤^[18], 这为临床上应用 HGF 治疗某些癌症提供了依据。

最近发现的能增进上皮细胞活动、造成克隆散射的散射因子(scatter factor)与 HGF 很相似^[19,20], 也能刺激人正常表皮黑色素细胞和角化细胞 DNA 的合成和生长, 而且有一种成纤维细胞衍生的肿瘤细胞毒素因子也与 HGF 相似^[21], 它强烈抑制成纤维细胞的生长。由此可见, 对许多上皮细胞来说, HGF 是一种具

有多种功能的因子,并且在许多重要的生命活动例如伤口愈合、组织或器官再生、以及胚胎器官发育过程中,都起着重要的作用。

二、HGF 的基因结构及定位

Nakamura 等利用 Northern Blot 证实 HGF mRNA 的大小约为 6 kb,并在 1989 年克隆出大鼠和人的 HGF 完整的 cDNA^[22]。人的 HGF 核苷酸序列由一个 2184 核苷酸长的开放阅读框和 3580 核苷酸长的 3 个富含 A-U 序列的非编码区组成。HGF 的 α -和 β -亚基编码在同一 mRNA 中,728 个氨基酸的多肽由人的 cDNA 编码从甲硫氨酸开始的前 31 个氨基酸残基是疏水的。这是一种典型的信号序列。 β -亚基的 N 端直接连在 α -亚基的 C 端。蛋白水解位点在 α -、 β -亚基之间的 Arg-Val(第 495 和 496 残基)。因此,成熟的 HGF 二聚体是经蛋白酶从一个含有 728 个氨基酸的前体蛋白(Pre-pro precursor)切割而来。 α -、 β -亚基分别有 463 个和 234 个氨基酸。

HGF 与纤溶酶原有 38% 的同源性。HGF

的 α -链有四个 Kringle 结构,与纤溶酶原 A 链的五个 Kringle 结构相似。每个 Kringle 结构由两个外显子编码^[23],并且外显子-内含子的排列也与纤溶酶原相似^[24]。这说明 HGF 基因和纤溶酶原基因可能由同一个原祖基因复制的。另一方面,HGF 的 β -链与各种丝氨酸蛋白酶和纤溶酶原的 B 链同源,但是丝氨酸蛋白酶活化位的 Ser 和 His 在 HGF 的 β -链中被 Glu 和 Tyr 替换,所以 HGF 不显示水解活性。

最近 Seki 等克隆并分析了 hHGF 基因^[25],图 1 显示了 hHGF 基因的结构和外显子定位。这段基因长约 70 kb,有 18 个外显子被 17 个内含子隔开。第一个外显子编码 5' 端非翻译区和信号肽;接下去的 10 个外显子编码具有 4 个 Kringle 结构的 α -链,每个 Kringle 结构由两个被称为 Kringle 内含蛋白的外显子编码; α -、 β -链之间的水解位点由第十三个外显子编码;剩下的 6 个外显子编码 β -链;最后,第十八个外显子编码 β -链 C 末端和一个 3' 端非编码区。

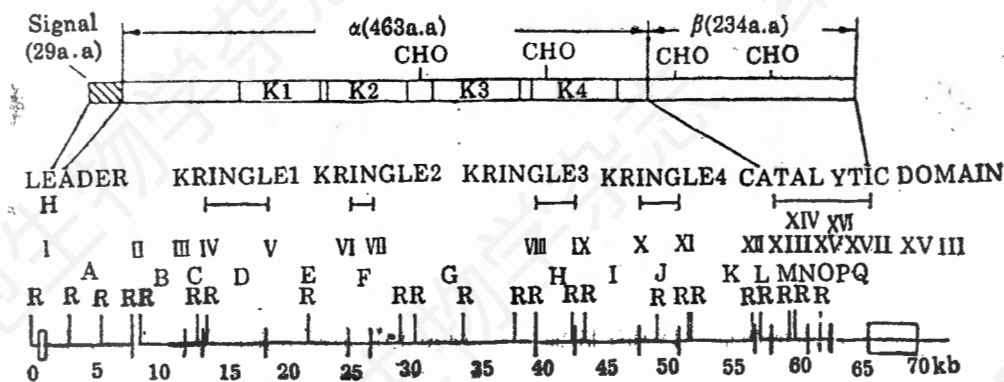


图 1 hHGF 基因的外显子-内含子结构^[36]。

根据 S₁ 核酸酶图谱和引物扩增分析判断,hHGF 基因的主要转录起始点位于转录起始密码上游 76 bp 处^[26]。

Fukuyama 等^[27]利用新的基因定位法:

(1) 流动细胞计数法分类染色体,(2) 分析 Spot Blot 杂交的图谱,(3) 原位杂交的激光扫描荧光显微镜分析,确定了 hHGF 基因位于

人染色体 7q21.1 上。

三、HGF 的受体及对肝细胞生长的调控

Zarnegar 等 1990 年报道^[28]大鼠肝细胞上 HGF 受体的 kD 值为 3.5 nmol/L,每个肝细胞上的受体数为 120000,并分离到一个 160 kD

的受体,Higuchi 和 Nakamura 也从大鼠肝细胞质膜上分离到一个 220 kD 的类似分子^[29]。Bottar 等从 B 5/589 人乳腺上皮细胞上分离到一个具有 c-met 蛋白性质的 HGF 受体^[30]。Naldini 等从 A 549 人肺癌细胞和 GTL 16 胃癌细胞中也分离到 c-met 蛋白性质的 HGF 受体^[31]。最近, Massyuki 等^[32]从 Meth A 肉瘤细胞表面分离到两类 HGF 受体,其中之一是 c-met 蛋白,它传递 HGF 抑制 Meth A 肉瘤细胞生长的信号,即 HGF 与其受体 c-met 蛋白结合后,促使它的酪氨酸磷酸化,从而抑制 Meth A 肉瘤细胞生长。由此看来, HGF 不但在肝再生,而且在其他组织的修复以及体内平衡的转换方面可能都具有重要的调控作用。

HGF 受体也存在于肺、肾和脾等许多内分泌器官以及不同的上皮细胞系,但 HGF 受体在非实质性肝细胞和许多间质来源的细胞系包括血细胞和成纤维细胞上没有发现,而间质分化细胞如肝窦星形细胞(Kupffer cell)和上皮细胞可以合成和分泌 HGF,因而 HGF 是一种能影响上皮细胞生长和细胞活动的因子。

目前已知对肝细胞生长有促进作用的因子有 HGF、表皮生长因子、前列腺素-1、胰岛素、胰高血糖素及去甲肾上腺素等。对肝细胞生长有抑制作用的因子有抑肝素、血小板源性的肝细胞生长抑制因子、转化生长因子等。正常情况下,促进肝脏生长的作用与抑制肝脏生长的作用处于动态平衡,以维持肝脏的正常结构与功能。当肝脏受到损伤时,这种平衡就被打破,于是促肝生长机制被激活,以利于肝细胞的再生与修复。

在促进肝细胞生长的诸多因子中, HGF 起着相当重要的作用。肝再生中 HGF 可能是启动肝细胞增殖的主要早期信号^[4]。如前所述,在暴发性肝炎病人和部分肝切除病人的血浆中^[6]以及肝硬化病人的腹水和血浆中^[10]都发现有高水平的 HGF 存在。在肝毒素 CCl₄ 和 D-氨基半乳糖造成的大鼠肝损伤中, HGF 及其 mRNA 显著增加^[10]。CCl₄ 造成肝损伤后,

HGF 的 mRNA 只在非实质肝细胞中检测到而在实质肝细胞中却测不到。利用原位杂交发现 HGF 主要由星形细胞(Kupffer Cell)和窦状小管内细胞分泌^[33],这说明肝损伤后,肝再生与修复存在着一种旁分泌机制,且肝细胞的生长主要由非实质肝细胞产生和分泌的 HGF 启动。

另一方面,由于肝脏再生早期血浆中 HGF 活性也会增大,说明肝切除后肝再生的启动并非只依赖于肝脏中新产生的 HGF,还依赖于肝脏以外器官和血液循环中的 HGF^[34]。有证据显示血衍生的 HGF 对部分肝切除后肝再生的启动有重要作用^[34]。残存在肝质膜上的 HGF 受体数量在手术 6 小时后急剧减少。HGF 结合位点的快速减少,或许是 6 小时内肝脏以外器官或细胞产生的 HGF 占据其受体的结果。正如前文所述,在肾、肺等许多器官中可检测到大量的 HGF mRNA,而且大鼠血小板中也含有大量的 HGF^[7],看来这些器官或细胞的某些部位是 HGF 的储存处。因此,部分肝切除后肝再生过程中肝细胞生长的启动,可能主要依赖于肝脏以外器官和细胞分泌的或血液循环中产生的 HGF,而不是星形细胞,这是肝再生的另一种内分泌机制。

四、肝再生启动的分子机理

在正常的肝小叶中,肝细胞在静脉血管周围呈辐射状排列且是紧密接触的。这种情况下,肝细胞只完全行使其特异性的功能但并不增殖,即它们处于静止的 G₀ 期。但根据 Nakamura 等利用成年大鼠肝细胞在体外原代培养,阐明了肝细胞的生长和分化功能是通过细胞-细胞间的接触来调控的。高细胞密度下培养肝细胞和正常的肝小叶中一样,形成紧密的细胞-细胞间接触,其细胞生长停留在静止的 G₀ 期,此时即使加大量的生长因子它们也不会增殖,但却完全具有肝细胞特有的功能。相反,肝细胞在低密度下培养时,并不形成紧密的细胞-细胞间接触则可以进入 G₁ 期,此时它们能对生长因子产生应答且完成 G₁ 期到 S 期的细胞周

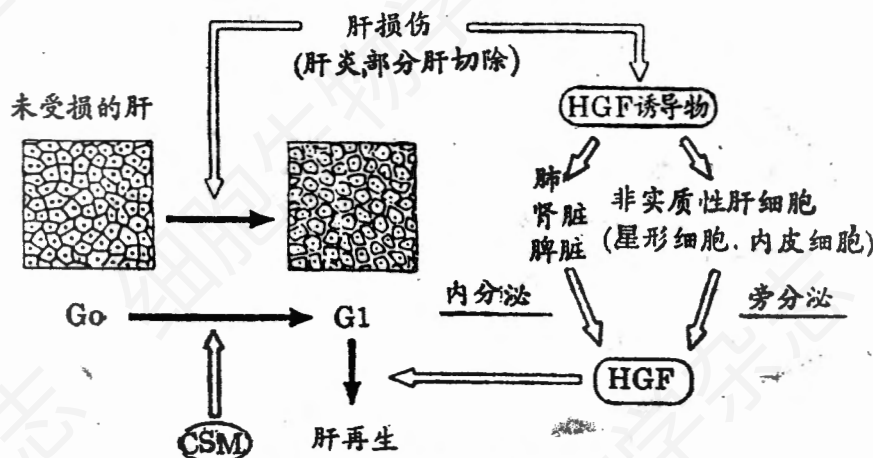


图2 肝损伤后肝再生启动的可能机理。

期。由细胞-细胞间接触的疏密所决定的肝细胞 G_0 - G_1 期的转变是通过一个被称为“细胞表面调节物(Cell Surface Modulator, CSM)”的质膜蛋白来调节的^[35]。

这个机理可能也适用于体内肝自生的肝细胞生长和分化的调节^[36]。在完好的肝小叶中,肝细胞膜上的CSM会产生一种信号来抑制肝细胞的生长、并刺激它们产生各种不同的功能。然而,当肝脏受到诸如肝炎或部分肝切除等损伤时,肝细胞间的细胞-细胞间接触被破坏,CSM可能从膜上释放使得它对肝细胞生长的抑制被解除,于是肝细胞就从 G_0 期进入 G_1 期。肝细胞再生时肝细胞间接触变疏松,就是对这种机理的支持;另外还发现部分肝切除后的早期有 *c-myc* 基因表达,也支持了这种机理。处于 G_1 期的肝细胞可以对旁分泌和内分泌系统分泌的HGF产生应答而开始生长。肝再生可能的启动机理总结于图2。

另外,转化生长因子(TGF)在肝再生中也起着重要作用^[37]。TGF α 在已修复的肝细胞中会短暂性的增多,被认为是肝细胞增殖的一种自分泌刺激物。幼年转基因小鼠中TGF α 的过量表达会导致肝脏肥大,并且促进大多数十二月龄转基因小鼠的肝细胞大量增殖成为肿瘤。再生肝脏中TGF β_1 也会短暂增多,它可以促进细胞外基质成分的形成,发出终止肝细

胞增殖的信号。

尽管肝再生调控机理的研究取得了很大的进展,但是肝再生过程中HGF与TGF α 、TGF β 之间的相互关系,以及HGF与其他生长因子或激素之间的关系还不很清楚。

实验证明多种肝损伤均可诱导HGF的产生,这说明一定存在着一种HGF的诱导因子来应答各种各样的肝损伤并且诱导产生HGF的细胞中HGF mRNA的产生。看来,HGF诱导因子的纯化和克隆可能不但会提供组织修复和肝再生分子机理的信息,而且也会提供体内组织结构稳定的分子机理的信息。这方面的研究还有待于进一步弄清。

结 语

肝脏的再生与调控机理非常复杂,至今还不十分清楚。在肝脏的生长调控机制中,HGF占有极其重要的地位,它不仅能促进肝细胞生长,启动肝损伤后的再生与修复,而且还可抑制某些肿瘤细胞和癌细胞的生长。临床上应用HGF治疗肝损伤和癌症患者,并弄清肝脏生长调控和再生机理将是一个非常有意义的研究课题。

摘 要

本文介绍了肝细胞生长因子(HGF)的来

源,阐述了它的化学和生物学性质、分子克隆和初级结构、基因、受体、它与肝脏生长和调控的关系以及在肝再生中的作用。

参考文献

- [1] Nakamura, T. et al., 1984, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122: 1450—1459.
- [2] Russel, W E. et al., 1984, *J. Cell Physiol.*, 119: 183—192.
- [3] Russel, W E. et al., 1984, *J. Cell Physiol.*, 119: 193—197.
- [4] Selden, C. et al., 1986, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139: 361—366.
- [5] Gohda, E. et al., 1986, *Exp. Cell Res.*, 166: 139—150.
- [6] Nakamura, T. et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 6489—6493.
- [7] Nakamura, T. et al., 1987, *FEBS Lett.*, 224: 311—318.
- [8] Zarnegar, R. et al., 1989, *Cancer Res.*, 49: 3314—3320.
- [9] 张宜俊等: 1991, 临床肝胆病杂志, 7: 15—18.
- [10] Asami, O. et al., 1991, *J. Biochem.*, 109: 8—13.
- [11] Ichiroshimizu, I. et al., 1991, *ibid*, 109: 14—18.
- [12] 戴炜等: 1992, 细胞生物学杂志, 14(1): 34—37.
- [13] Gohda, E. et al., 1988, *J. Clin. Invest.*, 81: 414—419.
- [14] Igawa, T. et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174: 831—838.
- [15] Matsumoto, K. et al., 1991, *ibid*, 176: 45—51.
- [16] Matsumoto, K. et al., 1991, *Exp. Cell Res.*, 196: 114—120.
- [17] Konishi, T. et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180: 765—773.
- [18] Tajama, H. et al., 1991, *FEBS Lett.*, 291(2): 229—232.
- [19] Gherardi, E. et al., 1990, *Nature*, 346: 228.
- [20] Weidner, K M. et al., 1990, *J. Cell Bio.*, 111: 2097—2108.
- [21] Higashio, K. et al., 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 170: 397—404.
- [22] Nakamura, T. et al., 1989, *Nature*, 342: 440—443.
- [23] Miyazawa, K. et al., 1991, *Eur. J. Biochem.*, 197: 15—22.
- [24] Petersen, T. et al., 1990, *J. Biochem.*, 265: 6104—6111.
- [25] Seki, T. et al., 1991, *Gene*, 102: 213—219.
- [26] Miyazawa, K. et al., 1991, *Biochemistry*, 30(38): 9170—9176.
- [27] Fukuyama, R. et al., 1991, *Genomics*, 11: 410—415.
- [28] Zarnegar, R. et al., 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173: 1170—1185.
- [29] Higuchi, O. et al., 1991, *ibid*, 176: 599—607.
- [30] Naldini, L. et al., 1991, *EMBO J.*, 10: 2867—2878.
- [31] Masayuki, K. et al., 1992, *Eur. J. Biochem.*, 204: 857—864.
- [32] Zarnegar, R. et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177: 559—565.
- [33] Noji, S. et al., 1990, *ibid*, 173: 42—47.
- [34] Kinoshita, T. et al., 1991, *ibid*, 177: 330—335.
- [35] Nakamura, T. et al., 1984, *J. Biol. Chem.*, 259: 8056—8058.
- [36] Nakamura, T. et al., 1991, *Progress in Growth Factor Research*, 3: 67—85.
- [37] Fausto, N. et al., 1991, *ibid*, 3: 219—234.

书讯 徐承水同志主编的《分子细胞生物学手册》已由北京农业大学出版社出版发行。全书52万字,压膜封面,定价11.50元(含邮挂费)。

该书是一部细胞生物学方面的工具资料书。全书共分为四部分:第一部分综合汇集了分子细胞生物学所涉及的名词术语2500余条,按词汇英文名称的字母顺序排列,并作详尽的解释;第二部分为教学实验;第三部分为大事年表;第四部分为国内外本学科领域的主要期刊和参考书目。

本书可作为生物学工作者的工具资料书,亦是大学本、专科学生和研究生学习参考书,对研究生入学应试有一定参考价值。欲购者可与山东曲阜师范大学(邮编 273165)生物系细胞室联系。