

人肝细胞生成素的发现及其与 肝再生关系的研究

贺福初

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

[摘要] 较系统介绍本课题组在人肝细胞生成素的发现、蛋白质纯化、分子克隆、重组品研制及其性能研究等方面的工作,探讨了人肝细胞生成素在肝再生过程中的可能作用及作为重症肝病新型治疗药物的潜在价值。

[关键词] 人肝细胞生成素,肝再生,重症肝病,分子克隆,重组制品

众所周知,变色龙能够再生出丢失的长尾。实际上,在其它低等生物中这种附器或附肢的再生屡见不鲜。然而,高等哺乳动物的这种再生能力却非常有限。正因如此,哺乳动物肝脏特有的突出再生能力十分引人注目。人们发现肝脏独有的高再生能力已有几千年(普罗米修斯的古老传说即是其缩影),但人们对肝再生机制的研究仅百余年,而其真正的突破还是在1931年Higgins与Anderson建立大鼠肝部分切除的动物肝再生模型之后。此后,肝再生机制研究的焦点集中于分析并鉴定启动再生性反应的事件。

经过半个多世纪尤其是近20年的研究,人们已经知道:(1)肝细胞早期基因激活由高于阈值的循环生长因子启动;(2)部分切除后即刻出现的快速代谢适应,使肝细胞对肝内外生长因子产生反应并使大量反应性基因激活。大量事实证明^[1],生长因子在肝再生启动及其进程中发挥着举足轻重的作用。近20年来,肝再生机制的研究主要集中于生长因子这一侧面,其中,尤以对胰岛素、表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 α (TGF- α)、胰岛素样生长因子(IGF)以及肝细胞生长因子(HGF)的认识最为系统深入^[1]。这方面的早期研究偏重于胰岛素与EGF,中期则侧重于TGF- α 与IGF。人们对这些因子的研究结果虽然能解释不少肝再生过程中的观察与机制,但由于这些因子作用的靶细胞与靶组织均非常广泛,仅从这些因子出发很难理解和阐释肝部分切除后只有肝组织出现再生,而这些因子能够作用的其它组织和细胞则几无变化。

由于上述原因,近年人们逐渐集中寻找具有肝组织特异作用的生长因子,发现并克隆了血源性的肝细胞生长因子(HGF)。但随后的研究表明,HGF作用的靶细胞非常广泛,生物学作用多样(如负向调控肿瘤细胞的增殖,促进非肝组织再生与肾、胃、肺等组织损伤修复,正向调控造血,促进胚胎与多种器官发育,促进肾细胞等运动),而并非如人们最初想象的那样——特异作用于肝脏细胞、专一性地促进肝细胞再生。与此相反,大量已知事实提

863计划、国家杰出青年科学基金与国家自然科学基金青年基金资助项目。

本文于1997年2月25日收到。

示, HGF 可能仅作为早期信号, 启动肝细胞分裂, 而真正支持肝细胞完成其再生过程的一类来源于肝脏自身、特异性刺激肝细胞增殖的小分子物质, 即肝刺激物 (hepatic stimulatory substance, 简称 HSS), 或称胞源性肝细胞生长因子 (Cytosolic HGF, HGF-c), 或称肝细胞生成素 (HPO)。

1 人肝细胞生成素的发现及其纯化

1975年, LaBrecque 等^[2]首先报道断乳乳鼠的肝和肝部分切除后, 大鼠的再生肝中存在能特异刺激肝细胞 DNA 合成的肝刺激物(HSS)。随后的研究揭示, HSS 能在 100℃ 中保温 15 分钟不失活, 可被乙醇沉淀, 分子量略大于 10 kd, 只作用于肝脏细胞而无种属特异性, 为带强阴电荷的蛋白, 在 PH 2—9 范围内稳定, 其二硫键或三级结构的破坏不影响活性。我国学者对其它动物源性的 HSS 也开展了广泛的研究。苏志狮、陈光明及卜凤荣等分别从乳猪、兔、新生牛肝脏中分离的 HSS, 其功能与理化性质均与 LaBrecque 等报道的大鼠 HSS 一致。至此, 人们对多种动物来源的 HSS 已有不少认识, 但对人性 HSS 的认识则仍为空白。

胎肝含有丰富的造血干/祖细胞与肝细胞的干/祖细胞。70 年代末期, 在吴祖泽、叶根耀两教授的带动下, 我国逐步开展了胎肝细胞的实验与临床研究。结果表明, 胎肝细胞对于治疗再生障碍性贫血、促进肿瘤化疗后的造血恢复以及治疗其它几种血液病均具有显著疗效。受此启示, 费瑞高与陈成伟合作^[3], 首次将人胎肝细胞悬液用于治疗重症肝炎, 取得显著疗效, 引起医学界与学术界的高度重视。此后, 应用胎肝细胞输注治疗慢性活动性肝炎、急性黄疸性肝炎等多类肝炎均取得明显效果, 重症肝炎死亡率从原来的 60%—80% 降至 30%—40%, 慢性活动性肝炎好转率从 44% 上升至 78.4%。当时曾有人推测治疗机理存在下面两种可能性: (1) 胎肝细胞移植或胎肝细胞在体内暂时存活发挥替代支持作用; (2) 胎肝中含有免疫调节物。

受胎肝细胞治疗再生障碍性贫血不依赖胎肝细胞完整性机理的启示, 张开瑞主任医师与吴祖泽教授课题组从 1987 年开始合作近 5 年, 系统观察了胎肝细胞裂解液治疗慢性活动性肝炎的临床疗效, 表明此疗效同样也不依赖细胞的完整, 进而指出其疗效成分很可能为活性因子^[4]。因此, 从 1989 年初始, 吴祖泽教授指导其博士生涂强进行有效成分的寻找与纯化, 同时安排贺福初课题组确定此类活性成分是否为基因表达产物, 以探讨用基因工程生产此类活性成分的可能性。涂强等^[5]研究表明, 人胎肝细胞裂解液经膜超滤, 在分子量 10—30 kd 组分中可检测出刺激肝源细胞 DNA 合成的活性。并证明, 此活性成分生物学作用具有肝组织特异性而无种属特异性, 为一热稳定的肽类物质。该肽类物质的生物活性和理化性质与已知能刺激肝细胞增殖的胰岛素、胰高血糖素、EGF、IGF、TGF- α 等有所不同, 而与动物源性的 HSS 一致, 因此提示它为后者的人源同源体 (homologue)。为确定其一级结构与序列, 他们在超滤的基础上, 又对其进行了 DEAE 离子交换层析、FPLC 与 HPLC 色谱分析, 并将其纯化为单体, 使其相对活性提高 5 万倍, 确定其分子量为 14 kd 左右, 纯品的生物活性、靶细胞特异性及理化性质与其粗品一致, 并与动物源性的 HSS 一致, 而与体液来源的 HGF 明显不同^[6], 因此进一步肯定它是动物源性 HSS 的同源体。与此课题组工作同步进行的还有杨为松教授课题组, 他们也获得了几乎相同的结果^[7]。由此可见, 人源肝细胞生成素的发现及其纯化是由我国学者首先完成的。

2 人肝细胞生成素的分子克隆

一般新型蛋白质的分子克隆途径有三:(1)测定其氨基酸序列,然后依此合成寡核苷酸并以核酸杂交筛选 cDNA 文库;(2)制备其特异性抗体,然后以免疫方法筛选表达型 cDNA 文库;(3)富集目标蛋白 mRNA,构建表达型 cDNA 文库,然后以功能筛选之。其中,第一最为直接、可靠,但前提是必须已知其氨基酸序列;第二假阳性率较高;第三最为繁琐、耗时。

从 1990 年开始,我们先后与中国科学院上海生物化学研究所、北京大学、复旦大学以及国外的斯坦福大学、哈佛大学等单位蛋白质序列分析组合作,尝试其氨基酸序列分析,均未成功。在此之前,国外在动物源性细胞生成素的氨基酸序列分析方面亦进行数年尝试,也没有成功。因此,国内外对此因子是否是肽类物质,是否是基因表达产物,普遍表示怀疑。为澄清此疑问,1989 年,我们课题组采用 SDS/氯仿/苯酚法和 oligo(dT) 纤维素亲和层析,从人胎肝中纯化 poly(A)⁺ mRNA,通过体外翻译,证明人胎肝细胞 mRNA 能指导翻译出其生物性能与理化性质均与纯化人肝细胞生成素完全一致的蛋白质,证明此因子是胎肝细胞基因表达产物^[8],从而初步澄清了上述疑问,并在此基础上,构建了表达型人胎肝 cDNA 文库^[9]。由于此因子的性能及临床应用前景明确,且拥有自己的专利,以及已有证据表明它是基因表达的产物,因此在 1991 年国家“863”计划生物领域将此因子的 cDNA 克隆列题并予专项资助。

鉴于此因子的蛋白质序列测定一直未果,我们选择第二条路线进行其分子克隆。为此,首先需要利用纯化的肝细胞生成素制备特异抗体。由于此因子分子量较小,免疫原性弱,早期抗体制备遭遇了较大困难。后来,通过摸索多种免疫方法,组合多种佐剂,才得到特异性抗体^[10]。用此抗体对所建人胎肝 cDNA 文库进行多轮筛选,得到 9 株阳性克隆。序列测定表明,其中 7 株编码为已知蛋白质(如 α 珠蛋白),两株为未知序列^[11]。对这些已知蛋白进行活性分析,表明无 HPO 活性;对未知序列进行表达后也表明无 HPO 活性,因此初步判定这些克隆均为假阳性克隆。在第一条克隆路线无从进行,第二条路线宣告失效之后,唯一选择只能是最为繁琐且最为耗时、耗财的第三条克隆途径——文库的功能筛选。为了增加功能筛选的成功率,我们利用蔗糖密度梯度离心法首先对人胎肝 mRNA 进行了划级分离,确定并得到人肝细胞生成素的 mRNA 组分^[12]。用此 mRNA 构建了能在 cos7 细胞中表达的小型 cDNA 文库(严格说来应是 cDNA 池),经转染 cos7 细胞后的四轮功能筛选,耗时年余,终于获得了人肝细胞生成素全长 cDNA^[13,14]。此序列与 Hagiya 等^[15]新近报道的大鼠肝再生增强因子(ALR) cDNA 有 87% 同源性,氨基酸序列有 84.8% 同源性,而与 Lisowsky 等^[16]1995 年报道的人源 ERV1 cDNA 序列完全一致。

ERV1 (Essential for Respiration and Viability) 基因最早由 Lisowsky^[17]于 1992 年在筛选啤酒酵母温敏突变体时发现。此基因在酵母氧化磷酸化与营养性生长中具有双重作用。酵母单倍体时此基因的缺失突变导致细胞死亡,孢子(二倍体)中此基因只要有一个拷贝异常就会表现严重的生长缺陷,并于 3—4 日后出现细胞分裂的不可逆停止。人源 ERV1 基因与啤酒酵母 ERV1 蛋白序列同源性达 42%,这是通过定位克隆(Positional cloning)从人 16 号染色体上多囊肾病 1 (polycystic kidney disease, PKD1) 基因区域获得(此区域基因极为丰富,仅 1992—1994 年间就已发现至少 19 个基因)。在酵母系统中,人源 ERV1 具有类似于酵母

ERV1 的功能,但在哺乳动物尤其是人体中有何作用,该实验室则不甚清楚。

需要补充的是,我们在争取功能筛选克隆人肝细胞生成素的同时,还进行了另一尝试,即先从大鼠再生肝中克隆大鼠肝细胞生成素 DNA,然后以此为探针筛选人胎肝 cDNA 库,我们^[18]首先观察了大鼠肝再生过程中肝细胞生成素 mRNA 表达的动态变化,揭示 2/3 肝部分切除后 24 小时其 mRNA 达高峰。我们用此时的 mRNA 借助 PCR 法构建了表达型大鼠肝再生 cDNA 文库,并从中筛选出大鼠肝细胞生成素 cDNA。在拟进一步以此筛选人胎肝 cDNA 文库时,我们通过功能筛选已获人肝细胞生成素 cDNA,因此已无必要再续此途径而作罢。

从可见,我们在揭示人肝细胞生成素为胎肝细胞基因表达产物的基础上,首先确定其 cDNA 序列与蛋白质序列,并首次证明它与酵母 ERV1 基因的人同源体蛋白为同一分子,为 ERV1 与肝细胞生成素的进一步研究与基因工程生产奠定了基础。

3 重组人肝细胞生成素的研制

天然人肝细胞生成素在胎肝中含量极微,靠生化分离手段所得纯品量很难满足对其性能研究与分析的需要。因此,继获得人肝细胞生成素 cDNA 之后,我们迅即开展了重组制品的研制。

首先,我们选择张智清等构建的原核表达载体 pBV220,实现了在大肠杆菌中的高效表达;进而完成了发酵、纯化、复性等实验室工艺研究。所得制品纯度达 95% 以上,其分子量、氨基酸组成及 N 端氨基酸序列均与理化预期值一致。目前此工艺正进行中试放大,且已能为实验研究提供一定规格的重组纯品(此工艺已申请发明专利)。

4 人肝细胞生成素的性能、表达调控及其与肝再生的关系

肝细胞生成素相继发现于大鼠再生肝^[2]、断乳鼠肝、新生牛肝以及人胎肝^[5,7]中。性能研究表明,不同种属来源的肝细胞生成素均特异性刺激肝细胞增殖。但由于已经用于进行性能研究的样品均为粗制品,不易排除其它成分对实验的影响,为避免此问题,我们采用纯化单一组分的人肝细胞生成素,观察了它的体内外生物活性,证明能特异刺激肝细胞增殖^[6],治疗急性肝衰竭^[19],其增殖刺激作用主要基于促使细胞从 G₀/G₁ 期进入 S 期。

肝细胞生成素的组织来源及其性能提示,它在肝再生过程中可能具有重要的生物学作用,此已得到其 mRNA 特定表达时期及其组织分布的支持。首先,我们在未知其 cDNA 序列的情况下,采用体外翻译后的功能测试,观察到^[18]大鼠肝部分切除后 24 小时,肝细胞生成素的 mRNA 在肝脏细胞中即达最高峰,随后逐渐降低。此动态变化与肝再生的启动与进行完全一致。随后,我们利用已克隆的大鼠肝细胞生成素 cDNA 为探针,进行大鼠肝部分切除后不同时间 mRNA 的 Northern Blot 分析,亦得到相同的结果。此外,组织分布研究表明,它在正常肝脏中表达很低,在肾与肺组织中有较低表达,其它组织中则检测不到表达。由此可见,此因子的表达具有组织特异性与时相特异性,与肝再生具有直接的关联。

重组制品的研制为肝细胞生成素的性能研究提供了充分的纯品。大鼠肝细胞生成素克隆后不久,我们即进行其高效表达与重组品生物性能研究^[20]。结果表明,此因子能显著救治 CCl₄ 所致大鼠急性肝损伤与肝衰竭(存活率提高 25%),并明显降低中毒大鼠外周血 ALT 和 AST 水平。在我们克隆出人肝细胞生成素 cDNA 并完成其重组品研制之后,首次发现重

组 hHPO 在体外能明显刺激肝细胞和肝癌组织的增殖。而 Hagiya 等^[15]在报道大鼠 HPO 分子克隆时未发现此因子任何体外活性。我们的发现对于 hHPO 的进一步研究与开发具有不可忽视的作用(但目前尚不清楚为何 Hagiya 等未观察到此种活性)。随后,我们在动物模型上证明重组 hHPO 具有明显的体外促进受损肝细胞再生与恢复,体内救治急性肝衰竭与重症肝炎,促进肝脏再生的功能,它很可能发展为一种治疗严重肝病的新药。

经过 10 多年的努力,我们独立地发现了人肝细胞生成素,并相继完成其蛋白质纯化、分子克隆、重组产品研制及其性能研究。此因子的发现及其重组品的研制将可能推动肝再生机制的理论研究与严重肝病的临床救治。

参 考 文 献

- [1] Fausto N, Laird A D, Webber E M. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J*, 1995, 9: 1527 - 1536.
- [2] LaBrecque D R, Pesch L A. Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (ss) from rat liver. *J. Physiol.*, 1975, 248: 273 - 284.
- [3] 陈成伟, 费瑞高等. 人胎肝细胞悬液治疗重症肝炎 7 例报告. *中华消化杂志*, 1987, 7: 84.
- [4] 张开瑞, 王秀珍, 涂强, 卢知吾, 吴祖泽. 人胎肝细胞裂解液治疗慢性活动性肝炎伴肝硬化的疗效观察. *中华实验与临床病毒学杂志*, 1992, 1: 100.
- [5] 涂强, 吴祖泽. 人胎肝中肝细胞生长因子生物活性的研究. *中国应用生理学杂志*, 1990, 6 (3): 199-203.
- [6] 涂强, 吴祖泽. 人胎肝中肝细胞生长因子的纯化及某些生物学特性的研究. *中国病理生理杂志*, 1991, 7 (5): 537-541.
- [7] Yao Z, Yang W, Zhang W, Chen Y, Yang F. Human hepatic regenerative stimulator substance: Partial purification and biological characterization of hepatic stimulator substance from human fetal liver cells. *Hepatology*, 1990, 12: 1144 - 1151.
- [8] He F, Wu C, Tu Q, Xiang G. Human hepatic stimulator substance: a product of gene expression of human fetal liver tissue. *Hepatology*, 1993, 17 (2): 225 - 229.
- [9] 贺福初, 邢桂春, 吴祖泽. 人胎肝 cDNA 文库的构建. *军事医学科学院院刊*, 1992, 16 (2): 86-90.
- [10] 唐瀚满, 贺福初, 杨晓明, 王立生, 李胜华, 吴祖泽. 人胎肝细胞生长因子抗血清制备及鉴定. *高技术通讯*, 1993, 3 (7): 6-8.
- [11] 杨晓明, 贺福初, 邢桂春, 吴祖泽. 人胎肝 cDNA 文库的免疫筛选. *免疫学杂志*, 1996, 12 (2): 78-81.
- [12] 杨晓明, 贺福初, 谢玲, 邢桂春, 吴祖泽. 人肝脏刺激物质特异 mRNA 的部分分离与鉴定. *高技术通讯*, 1995, 5 (9): 47-49.
- [13] 杨晓明, 谢玲, 邱兆华, 胡志远, 吴祖泽, 贺福初. 人肝再生增强因子的 cDNA 克隆与序列分析. *军事医学科学院院刊*, 1996, 20 (4): 241-244.
- [14] 杨晓明, 谢玲, 贺福初, 宫锋, 何浩, 邱兆华, 吴祖泽. 人肝再生增强因子的 cDNA 克隆, 高效表达及生物活性研究. *解放军医学杂志*, 1996, 21 (1): 80.
- [15] Hagiya M et al. Cloning and sequence analysis of the rat augementer of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *PNAS*, 1994, 91: 8142 - 8146.
- [16] Lisowsky T et al. A new human gene located in the PKD1 region of chromosome 16 is a functional homologue to ERV1 of yeast. *Genomics*, 1995, 29: 690 - 697.
- [17] Lisowsky T. Dual function of a new nuclear gene for oxidative phosphorylation and vegetative growth in yeast. *Mol Gen Genet*, 1992, 232: 58 - 64.
- [18] 邱兆华, 贺福初, 杨晓明. 大鼠肝再生过程中肝再生刺激物及其 mRNA 的动态变化. *中国应用生理学杂志*, 1996, 12 (3): 236-238.

- [19] 涂强, 吴祖泽. 肝细胞生长因子治疗小鼠中毒性肝炎的实验研究. 中国病理生理学杂志, 1991, 7 (5): 554—447.
- [20] 谢玲, 杨晓明, 贺福初, 吴祖泽. 重组大鼠肝再生增强因子救治急性肝衰竭的实验研究. 中国应用生理学杂志, 1996, 12 (4): 324—326.

HUMAN HEPATOPOIETIN: ITS DISCOVERY AND SIGNIFICANCE IN LIVER REGENERATION

He Fuchu

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

Abstract This article mainly introduces the progress in the study on human hepatopoietin including its discovery, purification of protein, molecular cloning, development of genetic engineering and its functional identification, and discusses its possible roles in liver regeneration and its potential therapeutical application in the treatment of fulminant hepatic failure.

Key words human hepatopoietin, liver regeneration, fulminant hepatic failure, molecular cloning, genetic engineering

· 信 息 ·

我国正式参加欧洲核子研究中心新的大科学国际合作计划

高能物理是物理学的最前沿, 是典型的国际化和开放程度最高的大科学领域。

目前位于瑞士日内瓦的科技基础雄厚的欧洲核子研究中心 (CERN) 正在计划实施一项国际性大型科学工程——建造世界最高能量的 LHC 大强子对撞机。

为了确保我国能够利用世界上最好的研究设备, 使高能物理方面的人才得到培养和储备, 为前沿科学研究创造更好的国际合作研究条件, 对 CERN 保持合作或跟踪合作的态势, 使我国在 21 世纪有可能在高能物理的前沿占有一席之地。在国家科委领导的支持下, 经过国家自然科学基金委员会国际合作局和 CERN 国际合作关系部一年多的共同努力, 探索和商定了协议草案, 国家自然科学基金委员会张存浩主任于今年 8 月 14 日与欧洲核子研究中心总主任施密斯先生分别在北京和日内瓦签署了国家自然科学基金委员会和欧洲核子研究中心促进发展高能物理合作的科学技术合作协议。

此协议的签订将拓展我国高能物理学界的科学家与欧洲核子研究中心 19 个成员国和相关大科研工程计划的参加国 (美国、日本、加拿大、印度等非成员国) 科学界的合作和交流渠道。

(国际合作局 吕蓓蕾 供稿)