

融合蛋白 HSA-HGF 的体内抗肝纤维化活性

蔡燕飞, 徐栋生, 陈蕴, 金坚*

(江南大学 药学院, 江苏无锡, 214122)

摘要: 肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)在治疗肝纤维化过程中扮演着重要角色, 但其在血液循环中并不稳定, 半衰期短, 提高 HGF 在血液循环中的稳定性是 HGF 应用性研究的重要内容。作者在课题组前期研究的基础上, 对人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)融合蛋白 HSA-HGF 的体内抗肝纤维化能力进行了研究。通过 CCl₄ 诱导构建小鼠肝纤维化模型, 并设置(1)正常组、(2)模型组、(3)阳性组、(4)HSA 组、(5)HGF 治疗组、(6)HSA-HGF 治疗组。经过苏木素-伊红染色、Masson 染色、血清肝功能指标活性检测、qRT-PCR 法检测肝组织中 α -SMA 和 COL I 基因转录水平、TRFIA 法检测体内半衰期, 从而鉴定各组抗肝纤维化效果。结果显示: 1) 运用 CCl₄ 构建肝脏损伤小鼠模型, 药物作用后结果显示融合蛋白 HSA-HGF 及其单体药物均可以明显地促进小鼠的肝脏恢复; 2) 与单体药物相比, 融合蛋白 HSA-HGF 在降低给药频率的情况下能取得相当的治疗效果; 3) 小鼠体内半衰期分析显示, 融合蛋白的体内半衰期由单体的 3 min 增加到 3 h 左右。表明融合蛋白 HSA-HGF 具有明显的抗纤维化效果, 与单体药物相比, 融合蛋白药物的半衰期明显延长, 表明该融合蛋白稳定性更佳, 具有成为抗肝纤维化药物的潜力。

关键词: 肝细胞生长因子; 人血清白蛋白融合蛋白; 肝纤维化

中图分类号: Q 51; R 730 文章编号: 1673-1689(2019)11-0093-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.013

Study on the Anti-liver Fibrosis Activity of HSA-HGF *in vivo*

CAI Yanfei, XU Dongsheng, CHEN Yun, JIN Jian*

(School of Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The hepatocyte growth factor (HGF) plays an important role in the treatment of liver fibrosis, but the instability and short half-life it is not stable in blood circulation limit its application. Thus, great efforts have been invested to improve the stability of HGF. Based on the preliminary research, this study is devoted to the study of the anti-liver fibrosis activity *in vivo* of human serum albumin (HSA) fusion protein HSA-HGF. Firstly, the mice were randomly divided into the following groups: (1) control; (2) liver fibrosis model; (3) positive control; (4) HSA group; (5) the treatment group of HGF; (6) the treatment group of HSA-HGF. And the mice liver fibrosis models were

收稿日期: 2017-07-18

基金项目: 国家 863 计划项目(2014AA021003)。

* 通信作者: 金坚(1960—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物设计与分子药理学方面的研究。E-mail: jinjian31@126.com

引用本文: 蔡燕飞, 徐栋生, 陈蕴, 金坚. 融合蛋白 HSA-HGF 的体内抗肝纤维化活性[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11): 93-99.

constructed by CCl₄ induction. Secondly, the anti-fibrosis effects were determined by hematoxylin eosin staining, masson staining, serum liver function index activity detection, qRT-PCR detection of α -SMA and COL I, and TRFIA detection of Half-Life *in vivo*. Finally, the results indicated that: 1) the fusion protein and its monomer drug could both significantly promote liver recovery of the mice liver fibrosis model; 2) Compared with the monomer drug, the fusion protein still maintained the significant anti-fibrosis effect even at low injection frequency; 3) the half-life of this fusion protein remarkably increased from 3 min to 3 h *in vivo*. Our study indicated that the HSA-HGF fusion protein could provide the capability for liver protection and anti-fibrosis, and the fusion protein shows higher stability and a longer half-life than the monomer drug. In general, the HSA-HGF fusion protein would be a potential drug for the treatment of liver fibrosis.

Keywords: hepatocyte growth factor; human serum albumin fusion protein; liver fibrosis

目前我国感染乙型肝炎病毒的人口基数巨大,发展至肝纤维化的比例也在逐年升高。早期肝纤维化可通过干预治疗缓解或治愈,然而早期肝纤维化往往没有临床症状,容易错失治疗的最佳机会,患者在不知情的情况下长期不改变生活状态,从而造成肝纤维化的程度缓慢加重,最终发展至代偿性肝硬化^[1]。到目前为止,除了肝脏移植,终末期肝硬化几乎没有更有效的治疗方式^[2]。因此寻找缓解、治疗肝纤维化的药物,避免肝纤维化发展为肝硬化具有重要意义。

肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是一种主要由肝脏非实质细胞分泌的多功能细胞因子, HGF 在体内以单链前体被合成和分泌, 其单链前体不具有任何生物学活性, 需要通过丝氨酸蛋白酶水解, 然后在二硫键作用下形成双链分子才具有生物学活性^[3]。成熟的 HGF 可以刺激多种组织器官修复, 在多种疾病的研究中均具有一定的治疗潜力, 包括: 肝纤维化、急性肾衰竭、慢性皮肤溃烂、肌萎缩侧索硬化症等。已有研究显示, HGF 能促进肝脏再生以及抗肝纤维化, 是具有治疗作用的潜力药物分子^[3-4]。有报道显示, HGF 在血液循环中的稳定性较差, 其药物半衰期只有 3~5 min, 因此提高 HGF 在血液循环中的稳定性是研究其应用潜力的重要部分^[5]。

作者所在研究室前期针对成熟 HGF 的氨基酸分子结构特点, 对其酶水解部位进行了重新设计和定位改造, 即采用融合 PCR 的方法将人 HGF 的第 494 位的精氨酸 R 定点突变成谷氨酸 E, 改造后的蛋白质不经过活化过程就能保持活性, 并在此基础

上利用融合蛋白技术将改造后的 HGF 分子与人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 基因融合, 获得了长效重组基因 HSA-HGF(R494E), 通过 CHO 表达系统可获得纯度超过 90% 的 HSA-HGF(R494E) 蛋白及 HSA 单体对照品^[6-8]。本研究中所用的 HSA-HGF 融合蛋白即研究室前期制备的 HSA-HGF(R494E) 蛋白。通过该融合蛋白的体内抗肝纤维化分析, 以期找到更佳稳定的抗肝纤维化药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 BALB/c 小鼠: 雄性, 体重 (25±2) g, 购自扬州大学比较医学中心, 许可证号为 SCXK (苏) 2012-0004; SPF 级 C57BL/6 小鼠: 体重 (20±2) g, 购自扬州大学比较医学中心, 许可证号为 SCXK (苏) 2012-0004。动物伦理审查号为: JN. No20170106-20170315^[9]

按照每笼 5 只将小鼠分笼, 在室温 25 ℃、光照 12 h/d、湿度 55 % 的条件下饲养, 喂食普通饲料与白开水, 小鼠自由摄取食物。小鼠处死均在麻醉状态下操作。

1.1.2 主要试剂 四氯化碳 (CCl₄)、玉米油: 购自上海腾翌生物科技有限公司; 谷丙转氨酶 (ALT) 试剂盒、谷草转氨酶 (AST) 试剂盒、苏木素-伊红 (H-E) 染液、Masson 染液: 均购自南京建成生物工程研究所; Eu³⁺ 标记时间分辨荧光检测试剂盒: 购自 PE 公司; 人 HGF 对照品: 购自 R&D 公司; HSA 抗体: 购自 abcam 公司; 水飞蓟素: 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立以及给药 根据大量的文献调研^[9-10],选择合适的给药方式设定实验分组,具体分组及给药方式如下:

BALB/c 小鼠随机分为 6 组,每组 6 只。

1)正常组:按照 2 μ L/g 腹腔注射玉米油,每周给药 2 次,共 6 周;

2)模型组:按照 2 μ L/g 腹腔注射体积比为 25% 的 CCl₄ 玉米油溶液,每周给药 2 次,共 6 周;

3)阳性组:按照 2 μ L/g 腹腔注射体积比为 25% 的 CCl₄ 玉米油溶液构建肝纤维化模型,同时按照 100 μ g/g 灌胃给予保肝药水飞蓟素,每天给药 1 次,共 6 周。

4)HSA 组:按照 2 μ L/g 腹腔注射体积比为 25% 的 CCl₄ 玉米油溶液 6 周后,按照 50 pmol/g 尾静脉注射 CHO 表达的 HSA,每三天给药 1 次,共 2 周;

5)HGF 组:按照 2 μ L/g 腹腔注射体积比为 25% 的 CCl₄ 玉米油溶液 6 周后,按照 250 pmol/g 尾静脉注射 HGF 对照品,每天给药 1 次,共 2 周;

6)HSA-HGF 组:按照 2 μ L/g 腹腔注射体积比为 25% 的 CCl₄ 玉米油溶液 6 周后,按照 250 pmol/g 尾静脉注射 CHO 表达的 HSA-HGF,每三天给药 1

次,共 2 周。HGF 与 HSA-HGF 的浓度保持一致。

1.2.2 肝组织石蜡切片的制备 肝组织用 PFA 固定,然后依次经体积比为 75%、85%、95%、100%、100% 的酒精梯度进行组织脱水,脱水后浸入二甲苯透明,随后浸蜡包埋,将包埋好的蜡块切片,于 45 $^{\circ}$ C 烘箱中烘干备用。

1.2.3 肝组织切片的 HE 染色 苏木素-伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色是组织学技术的常规染色方法,能很好地反映正常组织与病变组织的形态结构差异,其具体操作步骤参照说明书。

1.2.4 肝组织切片的 Masson 染色 Masson 染色是显示组织中纤维以及炎性因子的染色方法之一,胶原纤维呈蓝色,肌纤维呈红色,具体操作步骤参照说明书。

1.2.5 血清中肝功能指标的测定 应用商业化试剂盒检测各组小鼠血清中的肝功能指标,包括谷丙转氨酶 ALT 以及谷草转氨酶 AST,具体操作步骤参照说明书。

1.2.6 肝组织中 α -SMA 和 COL I 基因转录水平测定 将肝组织剪碎后加入液氮速冻并充分研磨,然后加入 Trizol 裂解液裂解,提取总 RNA 后进行 qRT-PCR,所用引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物

Table 1 Primer sequences for real-time RT-PCR

基因名称	上游引物 5'-3'	下游引物 5'-3'
α -SMA	TGGGACGACATGGAAAAGATCTGGC	ATACATGGCAGGGACATTGAAGG
COL I	TGCCATCAAGGTCTACTGCAACAT	GGAATCCATCGGTCATGCTCTCTCC

1.3 融合蛋白 HSA-HGF 的体内半衰期分析

1)融合蛋白 HSA-HGF 标记 Eu³⁺离子:将 0.5 mg HSA-HGF 蛋白脱盐换液至 50 mmol/L 后备用。按照 Eu³⁺标记盒说明书,将上述制备的 0.5 mg HSA-HGF 蛋白溶液与 0.1 mg Eu³⁺-N₂-[p-异氰酸-苄基]-二乙烯三胺四乙酸 (Eu³⁺-DTTA) 溶液在 30 $^{\circ}$ C 下搅拌反应 20 h。反应液经过 SepharoseCL-6B 柱层析后收集,紫外可见分光光度计在 280 nm 条件下检测收集的蛋白质峰,稀释后分装备用。

2)Eu³⁺离子标记融合蛋白 HSA-HGF 的稳定性检测:标记 Eu³⁺后的融合蛋白质量浓度为 200 mg/L,将蛋白质稀释 10 倍后分成两组,分别置于 37 $^{\circ}$ C 与 4 $^{\circ}$ C 保持 72 h,Western blot 检测样品中蛋白质的完整性,其中一抗为抗 HSA 抗体(1:1000 稀释)。

3)标记蛋白质上 Eu³⁺离子稳定性检测:标记 Eu³⁺

后的融合蛋白质量浓度为 200 mg/L,将蛋白质稀释 10 倍后分成两组,分别置于 37 $^{\circ}$ C 与 4 $^{\circ}$ C 保持 72 h。随后样品经 10 000 的超滤浓缩管浓缩;滤出液再次经 3 500 的超滤浓缩管浓缩。在滤出液中加入等体积的苯酚:氯仿=1:1 混合液,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,重复抽提两遍以去除蛋白质。运用时间分辨荧光法检测去除蛋白质样品的吸收值,设置 PBS 为阴性对照,设置 20 mg/L 标记的融合蛋白为阳性对照。

4)融合蛋白 HSA-HGF 的体内半衰期检测:将 C57BL/6 小鼠分为三笼,每笼 6 只,每笼小鼠分别按照 200、100、20 ng/g 尾静脉注射 Eu³⁺离子标记 HSA-HGF。在 0.5、1、2、4、8、12、24、36、48 h 用断尾的方式收集小鼠血液,室温静置 15 min,330 r/min 离心 20 min,每只小鼠每个时间点可取 10~20 μ L

血清,血清样品进行时间分辨荧光免疫检测。

2 结果与讨论

2.1 融合蛋白 HSA-HGF 的体内抗肝纤维化分析

2.1.1 小鼠生长情况及肝脏观察

1)生长情况:正常组小鼠生长正常,无死亡现象;模型组小鼠前两周因 CCl_4 毒性作用有约 15% 的死亡率,两周后不再继续死亡,但小鼠普遍精神不振,毛色暗淡,体质重下降,建模后期,小鼠整体状态有所回升。HSA 组小鼠生长状况与模型组相似,阳性组、HGF 组和融合蛋白 HSA-HGF 组小鼠在给药后生长状态有所好转,各项指标均有所回升。

2)肝脏表观观察:各组小鼠的肝脏表观见图 1。正常组小鼠肝脏质地柔软,表面光滑,形态规整,呈健康的鲜红色;模型组小鼠肝脏肿胀,表面呈明显的颗粒状,质地变硬,无光泽;HSA 组小鼠肝脏与模型组类似,没有明显的表观差异;阳性组、HGF 组和融合蛋白 HSA-HGF 组小鼠肝脏颜色恢复鲜红色,质地变软,表面变光滑,与模型组相比差异明显,表明和阳性药物水飞蓟素一样, HGF 和融合蛋白 HSA-HGF 均具有一定的肝脏保护功效。



图 1 各组小鼠肝脏外观

Fig. 1 The liver appearance of each group

3)检测各组小鼠的肝脏质量和肝脏指数:结果见表 2。与正常组相比,模型组小鼠肝脏质量显著增加,肝脏指数也显著升高,表明模型组小鼠肝脏处于代偿性增生阶段;阳性组、HGF 组和 HSA-HGF 组经过药物干预作用后,小鼠肝脏质量及肝脏指数有着不同程度的下降,与模型组相比有显著性差异,表明药物作用后,小鼠的肝脏出现了不同程度的恢复。HSA 组与模型组相比,其肝质量和肝脏指数均没有显著性差异。

表 2 各组小鼠肝脏质量和肝脏指数

Table 2 Liver weight and liver index of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	肝质量/g	(肝质量/体质量)/%
正常组(n=4)	1.301±0.073	5.6±0.6
模型组(n=5)	2.332±0.105 $\Delta\Delta$	9.6±0.4 $\&\&$
阳性组(n=5)	1.355±0.043 **	5.2±0.4 $^{##}$
HSA(n=4)	2.311±0.099	9.2±0.7
HGF(n=5)	1.435±0.072 **	5.5±0.7 $^{##}$
HSA-HGF(n=5)	1.505±0.070 **	5.6±0.6 $^{##}$

与正常组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组相比, $^{**} P < 0.01$;
与正常组相比, $\&\& P < 0.01$;与模型组相比, $^{##} P < 0.01$ 。

2.1.2 肝脏病理学观察 各组小鼠肝脏石蜡切片经 HE 染色后结果见图 2。正常组小鼠肝细胞形态正常、排列整齐、多个肝细胞有双核现象,表明有丝分裂旺盛,肝脏再生能力强; CCl_4 模型组小鼠肝脏结构紊乱,肝细胞间隙变大,呈丝状,肝脏组织呈空泡样变,大量的中性粒细胞聚集在血管周围,表明炎症严重;HSA 组小鼠肝脏与模型组类似,肝细胞数目明显减少,表明 HSA 并没有改善肝纤维化的效果;与阳性组小鼠肝脏相比, CCl_4 模型组有较大改善,趋近于正常组小鼠肝脏;HGF 组与 HSA-HGF 组小鼠肝脏与阳性组类似,肝脏再生能力强。

综上所述, CCl_4 损伤肝脏一段时期后,肝脏细胞被严重损坏,保肝药水飞蓟素可以明显改善肝脏状态。通过尾静脉注射 HGF 或其融合蛋白 HSA-HGF 都可以明显促进 CCl_4 损伤小鼠的肝脏恢复。本研究选用的每天注射 250 pmol/g 人 HGF 与每三天注射等摩尔的 HSA-HGF 引起的治疗效果类似,该结果从侧面证明了与单体药物 HGF 相比,融合蛋白 HSA-HGF 在小鼠体内的稳定性有很大的提高。

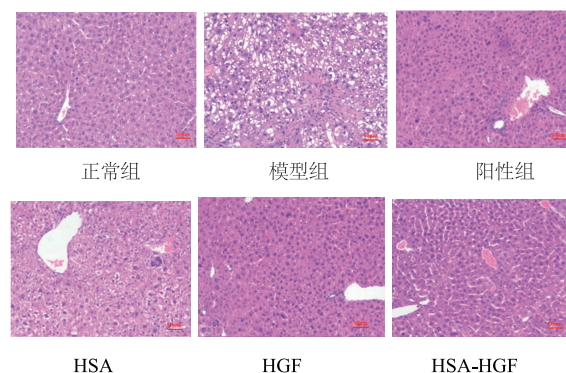


图 2 各组小鼠的 HE 染色

Fig. 2 Effect of HE staining on each group

Masson 染色结果见图 3。Masson 染色肝脏结构与 HE 染色的类似,Masson 染色主要用于观察胶原沉积效果。正常组的肝脏内部几乎没有胶原沉积,肝脏状态良好;模型组小鼠肝脏细胞大量坏死,胶原堆积,纤维化程度高,与正常组相比差异明显;HSA 组小鼠肝脏与模型组相似,表明 HSA 组没有明显的抗肝纤维化效果;阳性组的小鼠肝脏结构恢复比较理想,坏死细胞减少,但是细胞间隙还存在较多胶原,表明水飞蓟素对肝脏纤维化有一定的缓解作用;单体 HGF 与融合蛋白 HSA-HGF 组都有一定的缓解肝纤维化效果,肝脏整体结构良好。

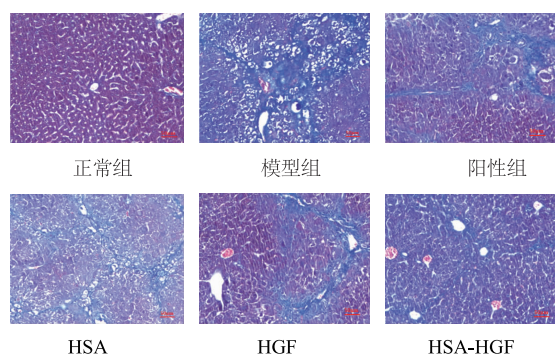


图 3 各组小鼠的 Masson 染色

Fig. 3 Effect of Masson staining on each group

2.1.3 肝功能指标检测 经过 CCl₄ 持续损伤后,小鼠肝细胞出现大量坏死,血液中的 AST 和 ALT 含量开始急剧升高。与正常组相比,CCl₄ 模型组的 AST 和 ALT 活性明显提高。而阳性组、HGF 组以及 HSA-HGF 组肝功能指标比模型组下降,具有显著性差异,而 HSA 组与模型组相比无显著性差异,表明融合蛋白 HSA-HGF 具有良好的肝脏保护作用,见表 3。

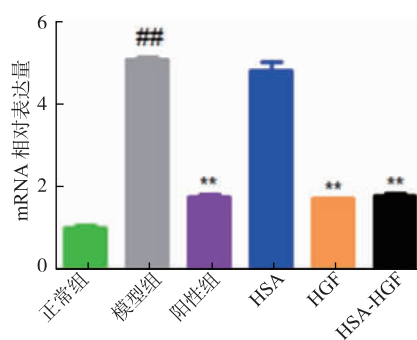
表 3 血清肝功能检测

Table 3 Detection of blood liver function indexes($\bar{x} \pm s$)

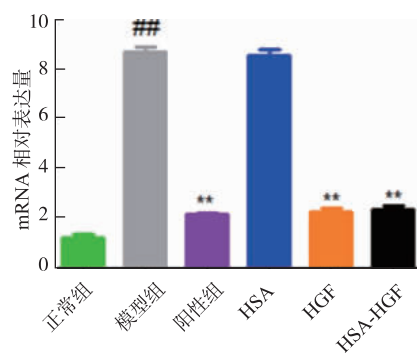
组别	AST(U/L)	ALT(U/L)
正常组(n=4)	98±6	56±7
模型组(n=5)	293±29 $\Delta\Delta$	205±11&&
阳性组(n=5)	134±10 ^{***}	94±7 ^{***}
HSA(n=4)	281±19	186±13
HGF(n=4)	146±11 ^{***}	85±9 ^{***}
HSA-HGF(n=4)	150±9 ^{***}	92±9 ^{***}

与正常组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组相比,^{***} $P < 0.01$;
与正常组相比,&& $P < 0.01$;与模型组相比,### $P < 0.01$ 。

2.1.4 肝纤维化标志物 α -SMA 和 COL I 的转录水平变化 肝纤维化在发展过程中,会引起其标志物 α -SMA 和 COL I 的表达水平逐渐上升,结果见图 4。两种标志物的 mRNA 水平在模型组中明显升高,HSA 组与模型组表现相似,而阳性组、HGF 组和 HSA-HGF 组的结果表明三者均可以明显下调 α -SMA 和 COL I 的转录水平,提示有较好的抗肝纤维化能力。



(a) α -SMA



(b) COL I

与正常组相比,### $p < 0.01$;与模型组相比,** $p < 0.01$

图 4 α -SMA 和 COL I 的 mRNA 水平检测

Fig. 4 mRNA level of α -SMA and COL

2.2 HSA-HGF 的体内半衰期检测

通过 Eu³⁺离子螯和标记蛋白 HSA-HGF,将标记后的融合蛋白以尾静脉注射小鼠体内后,通过检测血清中 Eu³⁺离子的含量来确定其体内半衰期。首先对该方法学的可靠性进行验证,将标记后的蛋白质稀释 10 倍,分成 2 组后分别置于 37 °C 与 4 °C 保持 72 h,通过 Western blot 检测,结果显示没有任何降解片段,检测到的蛋白质相对分子质量约为 130 000,与融合蛋白质实际相对分子质量相符,见图 5。说明 Eu³⁺离子标记后没有明显影响蛋白质稳定性。

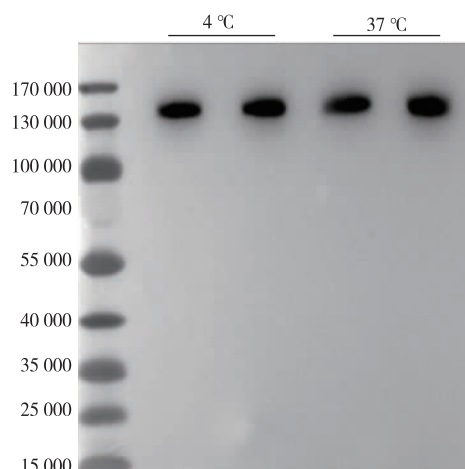
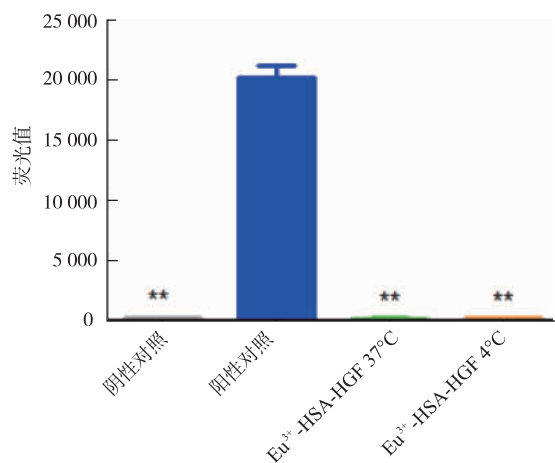


图 5 Eu^{3+} 离子标记蛋白质稳定性的 Western blot 检测

Fig. 5 Stability detection of Eu^{3+} labeled protein by western blot

将标记后的蛋白质样品稀释 10 倍，然后分成两组，分别置于 37 °C 与 4 °C 保持 72 h，经 10 000 与 3 500 的超滤和蛋白质抽提，去除蛋白质，检测溶液里残留的 Eu^{3+} 离子，见图 6。结果显示，待检测溶液中的 Eu^{3+} 离子非常少，表明用此方法标记的 Eu^{3+} 离子一旦标记到蛋白质上就不容易产生脱离。



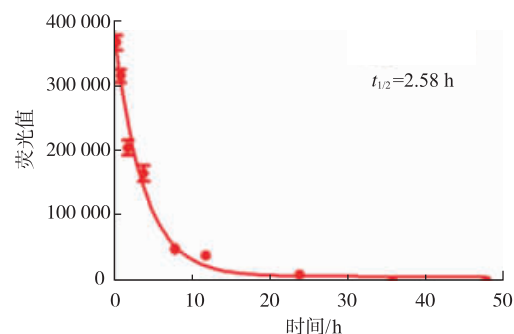
与阳性对照组比, ** $p < 0.01$

图 6 标记蛋白质上 Eu^{3+} 离子稳定性的检测

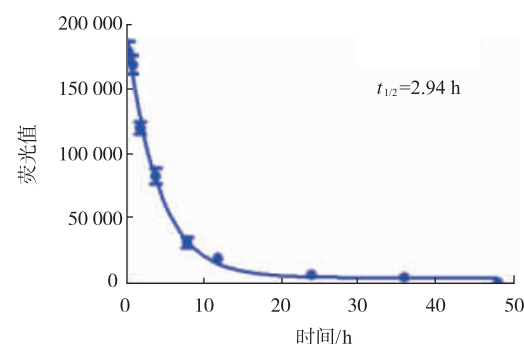
Fig. 6 Stability detection of Eu^{3+} on labeled protein. $\bar{x} \pm s$, $n=3$.

实验设置了 200、100、20 ng/g 三个浓度梯度，通过一次性尾静脉注射 Eu^{3+} 离子标记的 HSA-HGF 蛋白，分别在 0.5、1、2、4、8、12、24、36、48 h 收集小鼠血液，以血液中 Eu^{3+} 标记的 HSA-HGF 含量变化体现其体内半衰期，结果见图 7。HSA-HGF 融合蛋白的半衰期延长到 3 h 左右。已有研究显示 HGF 单体分子的半衰期仅仅在 3 min 左右^[8-9]，相比较而言，

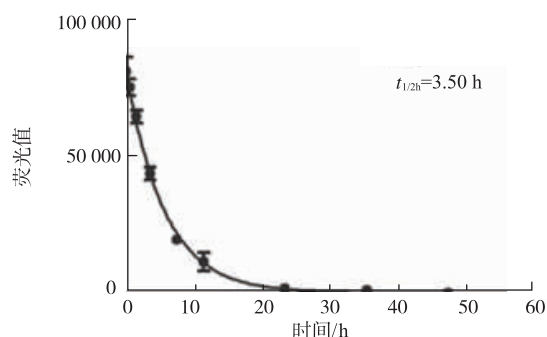
融合蛋白 HSA-HGF 的半衰期有显著提高，体现了优越的稳定性。



(a) HSA-HGF 的用药质量分数为 200 ng/g;



(b) HSA-HGF 的用药质量分数为 100 ng/g;



(c) HSA-HGF 的用药质量分数为 20 ng/g; $\bar{x} \pm s$, $n=3$

图 7 HSA-HGF 蛋白小鼠体内半衰期检测

Fig. 7 The half-life detection of HSA-HGF protein in mice

3 结 语

本研究是在课题组前期研究基础上，通过对融合蛋白的体内抗肝纤维化及其体内半衰期进行分析，进一步评价了新型融合蛋白 HSA-HGF 的稳定性，挖掘其应用潜能。小鼠体内实验结果显示，融合蛋白可以明显促进小鼠的肝脏恢复。其中 HGF 治

疗组用药频率为每天用药,而相应的融合蛋白 HSA-HGF 治疗组为三天给一次药,两者的抗肝纤维化效果相当,表明在低注射频率下融合蛋白具有明显提高肝功能以及抗肝纤维化的效果。同时,小鼠体内半衰期实验进一步证明了融合蛋白的体内半衰期显著长于单体。综上所述,融合蛋白 HSA-HGF 具有成为抗肝纤维化药物的潜力。本研究也存在一些不足之处,如动物实验设置的组别可进一步

完善,最好设置所有组别的低频给药和高频给药组;由于 HGF 单体蛋白质药物价格昂贵,本实验在检测药物半衰期时,未设置 HGF 单体对照组,后期考虑通过 CHO 表达系统制备 HGF 单体蛋白质药物,从而进一步证明融合蛋白质的稳定优势;HSA-HGF 想要真正成为抗肝纤维化药物依然任重道远,如该产品的肝特异性、无肝细胞毒性、安全性等均需要进一步的评估。

参考文献:

- [1] ZHAO Q, REN H, ZHU D, et al. Stem/progenitor cells in liver injury repair and regeneration[J]. **Biology of the Cell**, 2009, 101(10):557-571.
- [2] TACKE F, TRAUTWEIN C. Mechanisms of liver fibrosis resolution[J]. **Journal of Hepatology**, 2015, 63(4):1038-1039.
- [3] MIZUNO S, NAKAMURA T. Hepatocyte growth factor: a regenerative drug for acute hepatitis and liver cirrhosis[J]. **Regenerative Medicine**, 2007, 2(2):161-170.
- [4] YOU WK, MCDONALD DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis[J]. **Bmb Reports**, 2008, 41(12):833-839.
- [5] PULAYENDRAN S, ROSE C, MANDAL AB. Hepatocyte growth factor incorporated chitosan nanoparticles augment the differentiation of stem cell into hepatocytes for the recovery of liver cirrhosis in mice[J]. **Journal of Nanobiotechnology**, 2011, 9(1):1-11.
- [6] XU DS, WAN AN, PENG L, et al. Production of human mutant biologically active hepatocyte growth factor in Chinese hamster ovary cells[J]. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 2017, 47(5):489-495.
- [7] XU DS, WAN AN, ZHANG JJ, et al. Inhibition of the ubiquitin ligase activity improves the production of biologically active fusion protein HSA-HGF in Chinese hamster ovary cells[J]. **Bioengineered**, 2017, 8(3):256-264.
- [8] 徐栋生. 肝细胞生长人血清白蛋白-肝细胞生长因子融合蛋白突变体的表达及其活性分析[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [9] CLICHICI S, OLTEANU D, FILIP A, et al. Beneficial effects of silymarin after the discontinuation of CCl₄-induced liver fibrosis [J]. **Journal of Medicinal Food**, 2016, 19(8):789-797.
- [10] IDO A, TSUBOUCHI H. Translational research to identify clinical applications of hepatocyte growth factor [J]. **Hepatology Research the Official Journal of the Japan Society of Hepatology**, 2009, 39(8):739-747.