·实验研究·

SUMO 介导截短型人 HGF 制备及抗肝纤维化作用*

王小花[1,2], 李玉婷[2], 董艳[2], 刘亚威[2], 刘海峰[1,2]

【摘 要】**目的** 研究截短型人肝细胞生长因子突变体(tvNK1)对转化生长因子 β1(TGF-β1)诱导人肝星状细胞 LX-2 纤维化的影响。**方法** 把经 PCR 和双酶切的小分子泛素相关修饰蛋白(SUMO)和 tvNK1 的融合基因 SUMO-tvNK1 插入原核表达载体 pET28a, 诱导表达和 Ni^{2+}亲和层析纯化 SUMO-tvNK1; 进一步经 SUMO 蛋白酶 Ulp1 水解和 Ni^{2+}亲和层析纯化 tvNK1, MTT 法观察其对 TGF-β1 诱导 LX-2 纤维化细胞增殖的影响, qPCR 及蛋白印迹(WB)检测其对 I 型胶原蛋白(col1α1)和 α – 平滑肌球蛋白(α-SMA)蛋白表达的影响。**结果** 宿主菌 Rosetta/pET28a-SUMO-tvNK1 在 37 ℃ 经 1 mmol/L IPTG 诱导 5 h 获得 SUMO-tvNK1 的可溶性表达, 将超声破碎后上清液经 Ni^{2+}亲和层析成功获得 SUMO-tvNK1, 进一步经 Ulp1 水解和 Ni^{2+}亲和层析纯化 tvNK1, SDS-PAGE 鉴定其分子量约为 22.0 kDa, MTT 显示 20 和 40 ng/mL 的 tvNK1 能明显抑制 TGF-β1 活化的人肝星状细胞 LX-2 增殖, qPCR 及 WB 显示 20 和 40 ng/mL 的 tvNK1 能显著抑制活化的 LX-2 细胞中 Col1α1 和 α-SMA 在 mRNA 和蛋白水平表达。**结论** SUMO 蛋白可用于制备 tvNK1, 其能抑制 TGF-β1 活化的 LX-2 细胞增殖并具有抗纤维化作用, 为进一步体内外功能研究打下基础。

【关键词】截短型人肝细胞生长因子; 小分子泛素相关修饰蛋白(SUMO); 转化生长因子 β1(TGF-β1); 肝星状细胞
中图分类号:R 575.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-0580(2018)11-1532-05 **DOI:**10.11847/zgggws1117719

Preparation and anti-fibrotic activity of human truncated variant of hepatocyte growth factor with SUMO fusion in *Escherichia coli*

WANG Xiao-hua*, LI Yu-ting, DONG Yan, et al (**Medical Research Center*, *Mudanjiang Medical University*, *Mudanjiang*, *Heilongjiang Province* 157011, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the effect of human truncated variant of hepatocyte growth factor (tvNK1) on transforming growth factor-β1 (TGF-β1)-induced fibrosis in LX-2 cells. **Methods** The small ubiquitin-related modifier (SUMO) and tvNK1 genes were obtained with PCR and the fusion gene SUMO-tvNK1 with over-lap PCR. The expression vector pET28a/SUMO-tvNK1 was constructed and the soluble recombinant SUMO-tvNK1 protein was expressed in *Escherichia coli*. The SUMO-tvNK1 protein was purified with Ni^{2+}-affinity chromatograph and cleaved with a SUMO-specific protease (Ulp1) to obtain the tvNK1. The proliferation of TGF-β1-induced LX-2 cells was determined with 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. The mRNA and protein expression of collagen type 1 α1 (Col1α1) and α-smooth muscle actin (α-SMA) were assayed with quantitative PCR (qPCR) and Western blot (WB), respectively. **Results** The expression vector pET28a/SUMO-tvNK1 was successfully obtained and the soluble SUMO-tvNK1 protein was induced after 5 hours of induction at 37℃ with 1 mM isopropyl-β-d-thiogalactoside (IPTG) and purified with Ni^{2+}-affinity chromatograph. The molecular weight of the purified tvNK1 is 22.0 kilodalton based on the result of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results of MTT assay, qPCR and WB demonstrated that at the concentration of 20 and 40 ng/ml, the recombinant tvNK1 could obviously inhibit the proliferation of TGF-β1-induced LX-2 cells and reduce the mRNA and protein expression of Col1α1 and α-SMA in TGF-β1-induced LX-2 cells. **Conclusion** The recombinant tvNK1 protein was obtained with a SUMO fusion procedure and the prepared tvNK1 can inhibit the proliferation TGF-β1-induced LX-2 cells and is of anti-fibrotic activity. These findings provide a basis for further *in vitro* researches.

【**Key words**】 truncated variant of hepatocyte growth factor; small ubiquitin-related modifier; transforming growth factor-β1; hepatic stellate cell

肝纤维化可引起肝脏结构改变和肝功能衰竭, 已成为危害人类健康的重要原因之一, 而肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是目前已知的一种高效的抗纤维化细胞因子[1]。研究表明, 酵母表达制备的截短型 HGF 突变体(truncated variant of hepatocyte growth factor, tvNK1)具有抗纤维化功能, 但由于其采用真核表达系统制备限制其进一步应用[2-4]。小分子泛素相关修饰蛋白(small ubiquitin-related modifier, SUMO)作为标签来制备外源蛋白得到广泛应用[5]。其优点在于增加 SUMO 融合蛋白可溶性以及经 SUMO 的蛋白酶水解获得天然结构的产物。本实验利用 SUMO 介导的原核表达系统

* **基金项目:**国家自然科学基金(81500471; 81700544); 黑龙江省自然科学基金(H2015080); 黑龙江省卫生厅项目(2016 – 355)
作者单位:1. 牡丹江医学院医药研究中心, 黑龙江牡丹江 157011; 2. 牡丹江医学院基础医学院病原微生物与免疫实验室
作者简介:王小花(1982 –), 女, 山西大同人, 高级实验师, 硕士, 研究方向: 抗纤维化工程药物。
通信作者:刘海峰, E-mail: fenghailiu510@163.com
数字出版日期: 2018 - 04 - 27 12:33
数字出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20180427.1233.018.html

来制备 tvNK1，并探讨其对纤维化的人肝星状细胞 LX-2 作用，为肝纤维化的防治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料　人肝星状细胞 LX-2、大肠杆菌 DH5α 和 Rosetta、质粒 pET-3c-SUMO 和 pET28a 均由牡丹江医学院医药研究中心保存；限制性内切酶 NdeI、BamHI 及 BCA 试剂盒购自美国 Thermo 公司；质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司；T4 DNA 连接酶及逆转录试剂盒购自大连宝生物 Takara 公司；Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒购自罗氏上海有限公司（Roche）；引物由生工生物工程（上海）公司合成。

1.2 方法

1.2.1 扩增 SUMO-tvNK1 融合基因　根据 GeneBank 公布的 SUMO 的核苷酸序列，利用 premier 5.0 软件，设计上下游引物：F1：5′-GGG AAT TCC ATA TGG GGT CGG ACT CAG AAG TCA ATC AAG AAG CT-3′；R1：5′-ATT TCT TCT TTT CCT TTG ACC ACC AAT CTG TTC TCT GTG AGC CT-3′。以质粒 pET-3c-SUMO 为模板，F1 和 R1 为引物按常规 PCR 扩增 SUMO 基因片段；同理，设计扩增 tvNK1 的上下游引物：F2：5′-GAG AAC AGA TTG GTG GTC AAA GGA AAA GAA GAA ATA CAA TTC AT-3′；R2：5′-CGC GGA TCC TTA GCA CTC CAC TTC TGA ACA CTG A-3′。以 pMD-18/tvNK1 为模板，F2 和 R2 为引物扩增 tvNK1 基因片段；以上述扩增的 SUMO 和 tvNK1 基因片段为模板，F1 和 R2 为引物扩增 SUMO-tvNK1 融合基因。PCR 产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 构建pET28a/SUMO-tvNK1 表达载体　将pET28a 载体和 SUMO-tvNK1 融合基因分别用 NdeI 和 BamHI 双酶切，酶切产物 1 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收纯化，用 T4 DNA 连接酶把双酶切后纯化的基因片段和载体 16 ℃ 连接 12 h，转化于氯化钙法制备的大肠杆菌感受态 DH5α，涂布到含有卡那霉素的 LB 固体平板培养基上，37 ℃ 烘箱过夜培养 12 h，挑取单克隆菌落进行 PCR 鉴定，将初步鉴定的阳性菌株送至上海生工生物工程有限公司测序，新阳性重组的质粒命名为：pET28a/SUMO-tvNK1。

1.2.3 融合蛋白 SUMO-tvNK1 诱导表达和纯化　将挑选的阳性单克隆菌株 Rosetta/pET28a-SUMO-tvNK1 过夜培养，按 1 % 比例接种与 300 mL 含卡那霉素抗性的 LB 培养基中，37 ℃、210 r/min 振荡培养 2.5 h，使 600 nm 的 A 值约为 0.6 时，加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基－β－d－硫代半乳糖苷（isopropyl-β-d-thiogalactoside, IPTG），37 ℃ 培养条件下诱导表达 5 h，进行十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）分析；进一步将诱导表达的菌以 4 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min，弃上清，收集菌体，用含 5 mmol/L 咪唑的结合缓冲液重悬菌体，冰浴超声破碎（功率 200 w，超声 5 s，暂停 5 s 为一个循环）裂解菌体 30 min，取超声破碎后上清液 12 000 r/min，4 ℃ 离心 30 min，流经结合缓冲液平衡过的镍柱，用 10 倍柱床体积的冲洗缓冲液清洗镍柱，洗脱杂蛋白，用洗脱缓冲液洗脱融合蛋白 SUMO-tvNK1，收集洗脱液，收集透析的样品进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 目的蛋白 tvNK1 的释放和纯化　将收集的洗脱液纯化的 SUMO-tvNK1 蛋白、SUMO 蛋白酶 Ulp1 和 SUMO 蛋白酶反应混合液 30 ℃ 反应 2 h，将反应混合液加入镍柱，收集流出液，其中未水解的 SUMO-tvNK1，水解释放的 SUMO 蛋白酶 Ulp1 结合在镍柱上，而释放的 tvNK1 存在流出液中，进一步将流出液浓缩收集。

1.2.5 目的蛋白 tvNK1 抑制 LX-2 纤维化细胞的增殖实验　取对数生长期的 LX-2 细胞，0.25 % 胰酶消化，细胞经血小球计数板计数后，将处于对数期细胞种入 96 孔板，待细胞培养 16 h 后，将细胞贴壁后加入转化生长因子（transforming growth factor-β1, TGF-β1）（5 ng/mL）和不同浓度的纯化目的蛋白 tvNK1（其终浓度为：0、10、20 和 40 ng/mL），继续孵育 48 h，噻唑蓝法检测 LX-2 细胞在 490 nm 的 A 值，并以 $\bar{x} \pm s$ 表示，并进行 t 检验分析。

1.2.6 目的蛋白 tvNK1 抑制 LX-2 细胞纤维化相关基因表达（表 1）　取生长对数期的 LX-2 细胞，经胰酶消化后，将含 2×10^5 个细胞的 2.5 mL 的 DMEM 培养基接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中，细胞经 5 ng/mL 的 TGF-β1 和不同浓度的 tvNK1 处理 48 h，qPCR 和蛋白印迹（Western blot, WB）检测 tvNK1 对纤维化相关基因（collagen type 1 α1, Col1α1）和 α-SMA 的 mRNA（引物序列见表 1）和蛋白表达。

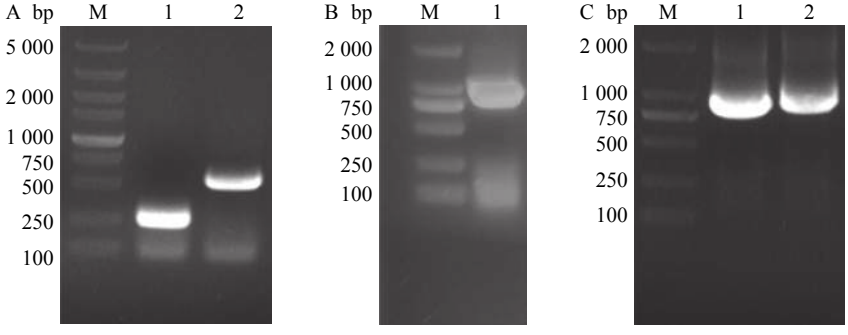
表 1 引物序列

引物名称	核苷酸序列（5′－3′）
Col1α1-F	GTG CTA AAG GTG CC AAT GGT
Col1α1-R	CTC CTC GCT TTC CTT CCT CT
α-SMA-F	TTC AAT GTC CCA GCC ATG TA
α-SMA-R	GAA GGA ATA GCC ACG CTC AG
GAPDH-F	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C
GAPDH-R	AAG ATG GTG ATG GGA TTT C

2 结 果

2.1 SUMO-tvNK1 融合基因的扩增、克隆和鉴定（图 1）

以 pET-3c-SUMO 质粒为模板，以 F1 和 R1 为引物，进行常规 PCR，扩增产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳分析，大小约为 300 bp（图 1A，泳道 1），与预测 SUMO 基因片段大小一致；同理，以 pMD-18/tvNK1 质粒为模板，以 F2 和 R2 为引物，进行常规 PCR，扩增产物经 1 % 琼脂糖凝胶电泳分析，大小约为 530 bp（图 1A，泳道 2），与预测 tvNK1 基因片段大小一致；进一步以上述扩增的 SUMO 和 tvNK1 为模板，以 F1 和 R2 为引物，进行 over-lap PCR，扩增产物经大小约为 800 bp（图 1B），与预测 SUMO-tvNK1 融合基因片段大小一致。进一步将扩增的 SUMO-tvNK1 融合基因和抽提的 pET28a 进行 NdeI 和 BamHI 双酶切，经 16 ℃ 连接后转化至大肠杆菌 DH5α，挑选克隆并抽提质粒 pET28a-SUMO-tvNK1，进行 PCR 鉴定，1 % 琼脂糖凝胶电泳结果表明，在 800 bp 处有一明亮单一条带（图 1C），与预期结果相符。将转化后的含 pET28a-SUMO-tvNK1 的菌株送往上海生工生物工程有限公司测序，结果表明 SUMO-tvNK1 融合基因成功插入 pET28a 载体。

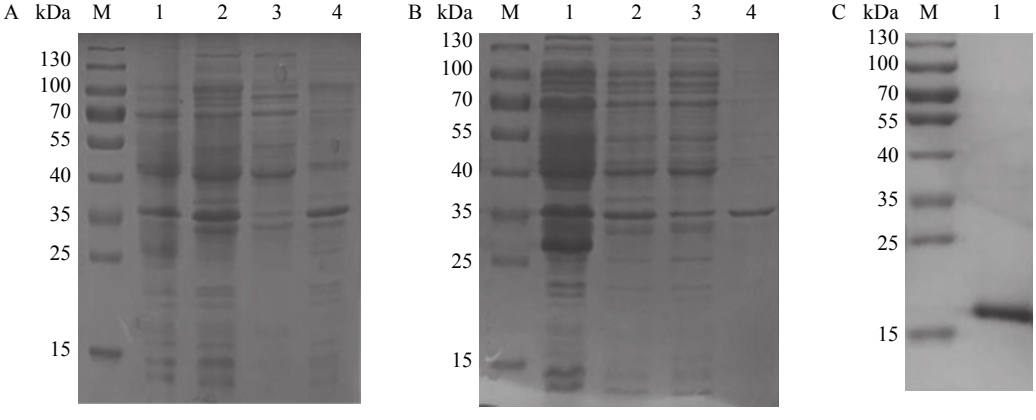


注：A：1：SUMO PCR；2：tvNKl PCR；B：1：SUMO-tvNKl PCR；C：1 ~ 2：PCR 鉴定重组质粒。

图 1 SUMO-tvNKl 融合基因的扩增、克隆和鉴定

2.2 SUMO-tvNK1 融合蛋白的诱导表达纯化及目的蛋白 tvNK1 纯化（图 2）

将过夜培养的 Rosetta/pET28a-SUMO-tvNK1 以 1 % 接种量接种于液体 LB 培养基中，37 ℃，210 r/min 振荡培养 3 h 至 OD_{600} 约为 0.6，加入诱导剂 IPTG，使其终浓度达到 1 mmol/L，在 37 ℃ 培养行诱导 5 h，离心收集菌体后超声破碎，将未诱导的全菌，诱导后的全菌、诱导后全菌超声破碎后上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析，结果如图 2A 所示。与未经诱导相比，SUMO-tvNK1（约 38 kDa）融合蛋白获得诱导表达（图 2A，泳道 2），同时，融合蛋白 SUMO-tvNK1 大部分存在于超声破碎后的沉淀（图 2A，泳道 4），但上清中仍存在少量融合蛋白（图 2A，泳道 3）。将超声破碎后上清中经 Ni^{2+}亲和层析纯化后，不含 6 × His tag 标签的杂蛋白经 Ni 柱流出，而融合蛋白 SUMO-tvNK1 由于含有 6 × His tag 标签而结合在 Ni^{2+}上，经含 250 mmol/L 的咪唑的洗脱缓冲液洗脱纯化融合蛋白 SUMO-tvNK1（图 2B，泳道 4）。进一步将纯化的 SUMO-tvNK1 加入 SUMO 蛋白酶 Ulp1，在 37 ℃ 孵育 2 h 后经 Ni^{2+}亲和层析，水解后释放的 SUMO 蛋白仍结合在 Ni^{2+}亲和层析柱，而 tvNK1 目的蛋白随流出液流出，收集流出液浓缩并进行 SDS-PAGE 分析，在约 22.0 kDa 为特异性的目的蛋白 tvNK1 条带（图 2C，泳道 1）。



注：A：1：未诱导全菌；2：诱导全菌；3：诱导全菌超声上清；4：诱导全菌超声沉淀；B：1：诱导全菌；2 ~ 3：诱导全菌超声上清；4：纯化的 SUMO-tvNK1；C：1：SUMO-tvNK1 经 SUMO 蛋白酶水解后纯化的 tvNK1。

图 2 SUMO-tvNKl 融合蛋白的诱导表达和纯化以及 tvNKl 的纯化

2.3　目的蛋白 tvNK1 抑制活化 LX-2 细胞增殖实验（表 2）　将纯化的目的蛋白 tvNK1（终浓度为：0、10、20 和 40 ng/mL），处理 5 ng/mL TGF-β1 诱导的 LX-2 细胞，作用 48 h，在 490 nm 测得的 A 值如表 2 所示，结果表明，与 0 ng/mL TGF-β1 组相比，5 ng/mL TGF-β1 组促进 LX-2 细胞的增殖（$P < 0.001$）；与 5 ng/mL TGF-β1 组相比，tvNK1 处理组（10、20 和 40 ng/mL）以剂量依赖的方式抑制活化的 LX-2 细胞增殖，统计学分析显示，20 和 40 ng/mL tvNK1 显著抑制 LX-2 细胞的增殖，差异有统计学意义（分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$）。

表 2　tvNK1 对 TGF-β1 诱导 LX-2 细胞增殖的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

组别	吸光值（A）
对照组（0 ng/mL TGF-β1）	0.627 ± 0.116
模型组（5 ng/mL TGF-β1）	1.691 ± 0.126 [a]
处理组（10 ng/mL tvNK1）	1.519 ± 0.031
处理组（20 ng/mL tvNK1）	1.359 ± 0.072 [b]
处理组（40 ng/mL tvNK1）	1.196 ± 0.085 [c]

注：与对照组比较，a $P < 0.001$；与模型组比较，b $P < 0.01$，c $P < 0.001$。

2.4　tvNK1 对 TGF-β1 诱导的 LX-2 细胞中 Col1α1 和 α-SMA 影响（表 3、图 3）　为了研究 tvNK1 抗纤维化的功能，将纯化的目的蛋白 tvNK1（终浓度为：0、20 和 40 ng/mL），处理 5 ng/mL TGF-β1 诱导的 LX-2 细胞，作用 48 h，qPCR 和 WB 分析 tvNK1 对 TGF-β1 诱导的 LX-2 细胞在 mRNA和蛋白表达的影响。qPCR 结果显示，与 0 ng/mL TGF-β1 组相比，5 ng/mL TGF-β1 组促进 LX-2 细胞的 α-SMA 和 Col1α1 mRNA 表达（$P < 0.001$）；与 5 ng/m LTGF-β1 组相比，20 和 40 ng/mL tvNK1 抑制 LX-2 细胞中 Col1α1 和 α-SMA 的 mRNA 表达，且 40 ng/mL tvNK1 能显著抑制 Col1α1 和 α-SMA mRNA 的表达（分别为 $P < 0.001$ 和 $P < 0.01$），见表 3。另外，WB 结果表明，与 0 ng/mL tvNK1 组相比，20 和 40 ng/mL tvNK1 处理组细胞中 α-SMA 和 Col1α1 的蛋白表达显著降低，见图 3。以上结果表明，tvNK1 能下调 TGF-β1 诱导的 LX-2 细胞中 Col1α1 和 α-SMA mRNA 和蛋白表达。

表 3　tvNK1 对 LX-2 细胞的 α-SMA 和 Col1α1 mRNA 表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

组别	α-SMA	Col1α1
对照组（0 ng/mL TGF-β1）	0.327 ± 0.053	0.325 ± 0.022
模型组（5 ng/mL TGF-β1）	1.006 ± 0.172 [a]	1.060 ± 0.120 [a]
处理组（20 ng/mL tvNK1）	0.691 ± 0.105	0.663 ± 0.086 [b]
处理组（40 ng/mL tvNK1）	0.519 ± 0.145 [b]	0.493 ± 0.057 [c]

注：与对照组比较，a $P < 0.001$；与模型组比较，b $P < 0.01$，c $P < 0.001$。

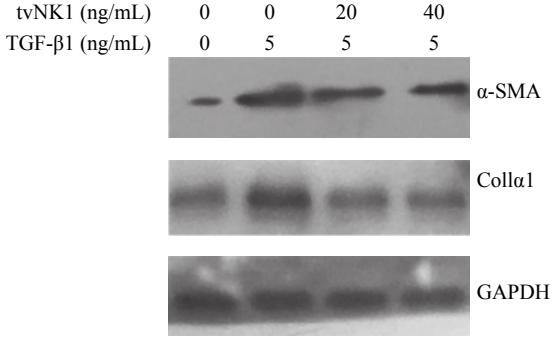


图 3　WB 检测 tvNK1 对 TGF-β1 诱导 LX-2 细胞中 α-SMA 和 Col1α1 蛋白影响

3　讨　论

肝纤维化是指肝脏受到内外源性致病原（毒物、粉尘、细菌、病毒、真菌和寄生虫等）的刺激下，损伤的组织（主要包括肝星状细胞）将不能通过肝细胞再生或上调基质金属蛋白酶（其降解活性相对或绝对不足）来降解在损伤过程中产生的过量细胞外基质，使其在肝内过度沉积形成纤维化的病理性疾病[6－7]，最终将导致肝功能衰竭。因此，肝纤维化是其对持续性损伤的一种失衡应答。肝细胞生长因子是目前已知的一种高效的抗纤维的细胞因子，其主要通过：（1）上调与细胞外基质降解有关的基质金属蛋白酶和胶原酶的表达与活性来减少细胞外基质的过度沉积。研究表明，过表达 HGF 能通过转录因子 Ets-1 依赖途径上调肝星状细胞中基质金属蛋白酶－1（matrix metalloproteinase-1，MMP-1）和胶原酶的表达和活性来预防纤维化的发生[8]。（2）下调基质金属蛋白酶抑制因子金属蛋白酶组织抑制因子（tissue inhibitors of metalloproteinases，TIMPs）的表达和活性来增强 MMPs 的活性。研究表明，尾静脉注射腺病毒表达的 HGF 能够通过下调 CCl_4 或二甲基亚硝胺（diaminomaleonitrile，DMN）诱导的纤维化大鼠肝组织中 TIMP-1 蛋白的表达来缓解纤维化[9]。（3）介导细胞之间以及细胞与细胞外基质（extracellular matrix，ECM）之间的相互作用来刺激或活化与 ECM 降解有关的蛋白酶网络，进而下调 TGF-β1 的表达水平，并促进损伤组织的再生和修复。Ogaly 等[10]研究表明，HGF 通过调控 PLC 信号

通路来调控 TGF-β1 的表达，进而在肝切除后肝细胞的再生过程中起调节作用。综上所述，HGF 在抗纤维化领域的治疗中表现出良好的临床应用前景，但由于其半衰期极短，生物利用度有限，造成其应用受到限制。

研究表明，HGF 的 N 末端发夹样结构及 C 末端的第 1 个 Kringle 发夹结构（K1 区）是 HGF 与受体 c-Met 结合的关键部位；同时，Ghazwani 等[1]研究表明，通过酵母表达系统制备 tvNK1（将 α 链中的发卡结构和第一个环状结构域中的赖氨酸和精氨酸突变为谷氨酸，K132E 和 R134E）具有抗纤维化的生物活性。但由于该表达系统具有生产周期长等特点限制其广泛应用，为了获得大量的 tvNK1，本研究通过 SUMO 介导的原核表达系统来诱导表达融合蛋白 SUMO-tvNK1，进而通过 Ni^{2+}亲和层析纯化 SUMO-tvNK1；进一步借助 SUMO 蛋白酶 Ulp1 来水解 SUMO-tvNK1 使其释放 tvNK1，进而将水解反应液加入 Ni^{2+}亲和层析柱，收集流出液并浓缩纯化 tvNK1；为进一步明确 tvNK1 抗纤维化的功能，将纯化的 tvNK1 作用于 TGF-β1 活化的人肝星状细胞 LX-2，发现 tvNK1 可显著降低 TGF-β1 诱导的 LX-2 细胞中 Col1α1 和 α-SMA 的 mRNA 和蛋白表达水平。以上结果表明，tvNK1 对肝纤维化有一定的保护作用，可减轻 TGF-β1 所诱发的肝纤维化，为进一步在体内研究其抗纤维化的功能奠定基础。

综上所述，tvNK1 有明显的抗肝纤维化活性，有助于为抗纤维化药物的研发提供理论研究基础。

参考文献

[1] Ghazwani M, Zhang Y, Gao X, et al. Anti-fibrotic effect of thymoquinone on hepatic stellate cells[J]. Phytomedicine, 2014, 21: 254 – 260.

[2] Tulinsky A. The structures of domains of blood proteins[J]. Thromb Haemost, 1991, 66: 16 – 31.

[3] Xue F, Takahara T, Yata Y, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy[J]. Gut, 2003, 52: 694 – 700.

[4] Ross J, Gherardi E, Mallorqui-Fernandez N, et al. Protein engineered variants of hepatocyte growth factor/scatter factor promote proliferation of primary human hepatocytes and in rodent liver[J]. Gastroenterology, 2012, 142: 897 – 906.

[5] Gao X, Chen W, Guo C, et al. Soluble cytoplasmic expression, rapid purification, and characterization of cyanovirin-N as a His-SUMO fusion[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2010, 85: 1051 – 1060.

[6] Wu X, Wu X, Ma Y, et al. CUG-binding protein 1 regulates HSC activation and liver fibrogenesis[J]. Nature Communication, 2016, 7: 13498.

[7] 左魁阳, 陈梦茜, 韩瑞杰, 等. TGF-β1 和 TGF-βⅡ型受体酵母表达载体构建[J]. 中国公共卫生, 2017, 33(6): 926 – 929.

[8] Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, et al. Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis[J]. Hepatology, 1997, 26: 81 – 89.

[9] Kim MD, Kim SS, Cha HY, et al. Therapeutic effect of hepatocyte growth factor-secreting mesenchymal stem cells in a rat model of liver fibrosis[J]. Experimental and Molecular Medicine, 2014, 46: e110.

[10] Ogaly HA, Eltablawy NA, El-Behairy AM, et al. Hepatocyte growth factor mediates the antifibrogenic action of ocimum bacilicum essential oil against CCl_4-induced liver fibrosis in rats[J]. Molecules, 2015, 20: 13518 – 13535.

收稿日期: 2017 - 11 - 24 （吴少慧编校）