维普资讯 http://www.cqvip.com

92,17(4)
253-256

重庆医科大学学报 1992年第17卷第4期

低分子量肝细胞生长素制备工艺研究

病毒性肝炎研究所 黄爱龙 张定凤 贾小平 TQ464.54

提 要 本文报道以乳猪肝脏为原料，采用加热、蛋白酶降解和超滤等手段，分离纯化低分子量肝细胞生长素(HPN，M.W.<10KD)的生产工艺，并对有关处理方法及其理化特性进行了初步的研究。经药效学研究证实，该制品能特异性地刺激肝细胞生长，具有保护肝脏、对抗肿瘤坏死因子的作用；另经毒理药理实验证实，该制品安全可靠，无任何毒副作用。因此，可望用于治疗重型肝炎及肿瘤坏死因子引起的中毒性休克等疾病

关键词 HSS；肝细胞生长素；肝脏再生
中图分类号 Q952.6，R458

肝脏再生现象，早在本世纪三十年代就为英国学者Higgins[1]等人所发现。当时推测在体内可能存在一种能够使肝脏再生的特异物质，在特定条件下（胚胎发育期或肝损伤时），表现活性，促进正常肝细胞增殖。七十年代以来，各国学者[2,3,4]相继从不同种属动物的肝脏、血小板和血浆中分离到能特异性刺激肝细胞生长的活性物质(Hepatitic Stimulated Substances，简称HSS)，并证实它不同于胰岛素、胰高血糖素、表皮生长因子（EGF)、血小板衍生因子（PDGF）和胰岛素样生长因子等已知的刺激肝细胞再生物质。经进一步分离纯化，发现来源不同，提取方法不同，得到活性物质的分子量也不尽相同，从1～2万到几十万不等。由此，我们设想此活性物质可能同乙型肝炎表面抗原类似，虽有不同的存在方式，但却具有一共同的分子量较小的活性多肽，我们称之为肝细胞生长素（Hepatopoeitin，简称HPN）。在血液和肝脏中因与其它载体蛋白结合，所以分子量差别较大，甚至可能表现出不同的理化特性和功能，影响研究工作的进行。基于上述观点，我们拟改良LaBrecque传统的提取方法，以来源广泛的乳猪肝脏为原料，制备HSS粗品，然后经蛋白酶降解和超滤处理，得到低分子量肝细胞生长素，供临床治疗重型肝炎使用，也为进一步分离纯化和了解其作用机理打下基础。

材料和方法

原料

新鲜乳猪肝脏（猪龄3月以内）

细胞株

人肝癌细胞株QGY-7703（培养基为1640)[5]。

EtoH-ppt-HSS的制备：

按照LaBrecque[6]的方法，将乳猪肝脏绞碎后，加70%生理盐水匀浆，然后95℃加热15min，再27,000g离心20min，取上清（Δ95℃上清）滴加2倍体积无水乙醇搅拌沉淀2h，此沉淀经27,000g离心20min后，用重蒸水复溶并离心除去残渣，得到的上清即为EtoH-ppt-HSS。

蛋白酶处理

称取4mg胰蛋白酶(Difco）加入400ml待处理的Δ95℃上清中（约含50mg蛋白），滴加1mol/L NaOH至pH7.5，37℃作用30min后，迅速冻干测活性。另取0.5个单位胃蛋白酶，加入400ml待处理Δ95℃上清中（约含50mg蛋白），滴加1.5mol/L HCl保持pH在1.5左右，37℃作用30min后，用

丛医学报

维普资讯 http://www.cqvip.com

1mol/L NaOH调pH至7.0，然后冻干测活性。

酸、碱及还原剂处理

取一定量Δ95℃上清，分别用1mol/L NaOH和1mol/L HCl调pH至12和2，37℃作用30min后，再分别将pH调回到7.0，冻干测活性；另取一定量Δ95℃上清，加入DTT至终浓度为10^{-2}mol/L，37℃作用30min，用生理盐水透析掉DTT后，冻干测活性。

超滤处理

经上述处理的样品（蛋白含量应<1%）用截留分子量10KD的Millipore膜超滤，滤出液冻干测活性。

肝细胞刺激活性测定[7]

在96孔板中，各加入1万个体外培养的肝癌细胞和10μg上述样品（用培养液稀释和溶解，每个样品测6个平行孔），放入37℃CO_2孵箱中保温约12h，然后加1uCi/孔^{3}H-TdR，6h后收获并计数，以细胞培养液代替样品为阴性对照。在上述条件下，实验组的^{3}H-TdR掺入量比对照组高出一倍所需样品量，即为1个活力单位。

蛋白含量测定

参照Bradford[8]描述的蛋白-染料结合法进行。

结　果

为比较不同来源肝脏中肝细胞刺激物活性的差异，我们将新鲜乳猪肝脏，小牛肝脏，5月龄水囊引产胎儿肝脏以及正常成人肝脏（－70℃冻存一年），照上述方法制备EtoH-ppt-HSS，活性测定结果见表1。

表1　不同来源肝脏中HSS活性比较

样　品	比活(U/10μg蛋白)
乳猪EtOH-ppt-HSS	12.5
小牛EtOH-ppt-HSS	7.8
五月人胎肝EtOH-ppt-HSS	15.3
成人肝EtOH-ppt-HSS	19.0

从上表可看出，四种来源不同的肝脏提取物在体外都具有不同程度刺激肝细胞增殖的活性，其中成人肝脏提取物活性最高，5月人胎肝比乳猪肝略高，小牛肝脏提取物刺激活性最低。在保证活性较高的情况下，考虑到原材料的来源，成本的高低，我们决定选取乳猪肝脏作为进一步研究制备工艺的材料。

表2所示的是乳猪EtOH-ppt-HSS制备过程中，蛋白含量和活性变化的情况。

表2　乳猪EtOH-ppt-HSS的制备

样　品	蛋白量（mg）	比　活 (U/10μg蛋白)
肝匀浆	4243	1.2
95℃上清	244	32.8
EtOH-ppt-HSS	33	16.1

从表2可看出：乳猪肝脏中同样存在有刺激肝细胞生长的活性物质，且此作用不具种属特异性，但有器官特异性（数据未公布）。未经任何处理的肝匀浆，未检测到刺激活性，可能表明在天然状态下，HSS活性中心未暴露或活性部位为载体蛋白所屏蔽，95℃加热处理能有效地除去杂蛋白，提高比活；而乙醇沉淀虽然能沉淀大量蛋白质，但HSS活性损失严重，所以我们从为，在LaBrecque经典方法中，乙醇沉淀作为进一步纯化的手段，可能实无必要。另外，在实验中我们发现选取不同胎龄的乳猪肝脏为原料，对刺激物的比活影响不大，所以为提高产量，我们一般选用近满月的乳猪肝脏为原料。

表3是我们用各种条件处理Δ95℃上清得到的结果。

从表3中可看出，Δ95℃上清经超滤处理后，活性丧失，说明在肝脏内，HSS活性存在于分子量1万以上的蛋白质中，但Δ95℃上清经胃蛋白酶、胰蛋白酶和酸性环境部份降解后，却仍能保持活性，则表明在此蛋白中其活性的维持，并不需要一个完整的大分子，很可能就是一个分子量相对较小的多肽起活性部位的作用，我们称之为肝细胞生长素（Hepatopoeitin，简称HPN）。

为减少异种动物来源的生物制品注入人体后可能带来的免疫排异反应，通常将其降解为分子量较小的片段，以减低免疫原性，

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3　各种因素影响下HSS活性的变化

样　品	比活（U/10μg蛋白）	样品	比活（U/10μg蛋白）
胃蛋白酶处理	32.6	酸处理	29.2
胰蛋白酶处理	32.7	碱处理	1.3
超滤处理	0.8	DTT处理	1.1

表 4　超滤处理对HSS活性的影响

样　品	比活（U/10μg蛋白）	样　品	比活（U/10μg蛋白）
酸处理	6.9	酸处理-滤出液	3.6
胃蛋白酶处理	10.9	胃蛋白酶处理-滤出液	8.5
胰蛋白酶处理	9.5	胰蛋白酶处理-滤出液	10.3

表 5　HSS与HPN的比活比较

批　次	样　品	蛋白含量（μg）	活性（U）	比活（U/10μg蛋白）	纯化倍数
1	HSS	10	9.5	9.5	1
	HPN	3.5	9.0	25.7	2.7
2	HSS	10	10.2	10.2	1
	HPN	3.2	9.8	30.6	3.0
3	HSS	10	10.5	10.5	1
	HPN	3.9	12.3	31.5	3.0

为此我们将上述经蛋白酶和稀酸部分降解仍具活性的产物，再经截留分子量 10KD的超滤膜处理，观察滤出液中是否含有肝细胞刺激物质。

从表 4 可看出，上述经稀酸和蛋白酶处理的样品，超滤前后，HSS活性相差较小，提示在处理混合液中，HSS活性主要存在于分子量小于 1 万的多肽（HPN）中。

从表 5 亦可看出，超滤后，蛋白含量减少，但肝细胞刺激活性基本保留，比活提高近 3 倍，说明超滤能有效地去除杂蛋白，提高 HPN 的纯度和回收大部分活性物质，不同批次之间差异较小，也说明作为制备工艺的主要环节，超滤处理是相当稳定的。

下面我们以活性较高的胰蛋白酶处理为例，探讨胰蛋白酶处理浓度对 HSS 活性的影响。分别取1ml，2.5ml，5ml，10ml胰蛋白酶液照前述方法处理样品，然后再经超滤处理，结果如表 6 所示。

表 6　胰蛋白酶浓度对HPN活性的影响

样品	比　活（U/10μg蛋白）	样　品	比　活（U/10μg蛋白）
处理1	3.6	滤出液1	3.4
处理2.5	4.3	滤出液2.5	3.9
处理5	3.9	滤出液5	3.2
处理10	4.3	滤出液10	4.3

从表 6 可看出，胰蛋白酶作用浓度在一定范围内对 HPN 的活性并无明显影响，可能和胰蛋白酶在 HSS 中的作用位点相对比较恒定，而上述采用的酶量均能有效地降解有关。另外在研究胰蛋白酶作用动力学时，我们发现酶作用时间在0.5—8h内，对HPN活性影响很小。所以为缩短工艺，通常采用 2.5ml 0.4% 胰蛋白酶液对 50mg 蛋白的 Δ95℃ 上清处理0.5—1h。

下面是我们对 HPN 刺激活性最低有效剂量的研究结果。

可以看出，在蛋白含量低至 0.1μg时，

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 7　HPN刺激活性的最低有效剂量

剂量（μg）	比活（U/mg蛋白）
3HPN	10.8
1.5HPN	15.7
0.3HPN	2.0
0.1HPN	2.4

其中 HPN 活性仍比对照高出 1 倍多，说明 HPN 已是具有一定纯度的生物制品，在临床应用时，只需低剂量注射即可达到治疗效果。此外，我们还对 HPN 保存条件进行了初步的研究，发现冻干后容易保存，干粉在不加保护剂情况下，可于 4℃ 存放半年以上。

经过上述研究，我们初步确定 HPN 生产工艺为以新鲜乳猪肝脏（或冷冻乳猪肝脏）为原料，制备Δ95℃上清，然后采用胰蛋白酶处理（1mg胰蛋白酶：50mg蛋白）和超滤技术分离（M.W.<10KD），滤出液经冻干后，得到具有刺激肝细胞生长活性及免疫原性较低的小分子多肽 HPN，并作为临床治疗重型肝炎的一种生物制品。

讨　论

综上所述，我们在体外证实了乳猪肝脏内确实存在有刺激肝细胞生长的活性物质。在生理状态下，大多为耐热、耐酸的大分子蛋白质，对蛋白酶处理不敏感，但经还原剂和碱处理后失活，它在体外能刺激人肝癌细胞株的生长，但不刺激人喉癌细胞株的生长，说明它可能具有器官特异性，但不具有种属特异性；直接超滤（M.W.<10KD）Δ95℃上清，滤出液不具此活性，提示HSS活性存在于大分子蛋白质中；经蛋白酶和稀酸部分降解后再超滤，滤出液仍保留较高活性，比活提高近 3 倍，表明其活性中心为一小分子多肽，定名为肝细胞生长素(HPN)。

几年前，国内用人胎肝细胞悬液治疗重型肝炎虽然取得了一定疗效，但由于该法实际上是采用整体细胞移植，供体的来源、宿主的免疫排异等方面都面临难以解决的困难，直接影响计划生育的基本国策，无法在临床广泛应用[9]。最近，日本学者NaKamura[10,11]和NaKaYama[12,13]等在不同实验室分别纯化和克隆成功具有特异性刺激人肝细胞生长的活性物质 hHGF，但其分子量均较大，且理化性质与我们得到的 HPN 略有差异，因此，可能为相似但并不相同的活性物质。

最近，采用体内体外实验，我们证实 HPN 能在大白鼠体内保护半乳糖胺引起的肝坏死[14]，具有对抗肿瘤坏死因子减轻鸭子肝脏病变[15]的作用，因此我们从乳猪肝脏中提取的多肽具有保护肝脏，特异性促进肝细胞再生的能力，同时具有来源方便，分子量低，不产生排异反应等特点，可作为临床治疗重型肝炎的药物，鉴于 HPN 有对抗肿瘤坏死因子的作用，预计今后对治疗严重感染性和炎症性疾病均有重大意义。

参 考 文 献

[1] Higgins GM, et al. Arch Pathol 1931; 12:186

[2] LaBrecque DR, et al. J physiol 1975; 248:278

[3] Starzl TE, et al. Lancet 1971; 1:127

[4] Russell WE, et al. J Cell Physiol 1984; 119:183

[5] 王金兵，等. 中华肿瘤杂志 3(4):241

[6] LaBrecque DR, et al. Hepatology 1987; 7:100

[7] LaBrecque DR, et al. Exp Cell Res 1984; 150:419

[8] Bradford MM, et al. Anal Biochem 1976; 72:248

[9] 陈成伟，等. 中华内科杂志 1987; 26(5):5

[10] Nakamura T, et al. PNAS 1986; 83:6489

[11] Nakamura T, et al. Nature 1989; 342:440