·基础研究·

# 阻断肝再生增强因子的表达对人肝癌细胞株 HepG2 增殖的抑制作用

唐 琳[1], 孙 航[1], 张 林[2], 郭 晖[1], 张 玲[3], 刘 杞[1]

# Inhibitory Effect of Blocking Expression of Human Augmenter of Liver Regeneration (hALR) on Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2

TANG Lin[1], SUN Hang[1], ZHANG Lin[2], GUO Hui[1], ZHANG Ling[3], LIU Qi[1]

1. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 感染性疾病分子生物学实验室, 重庆 400010
2. 四川省医学科学院 四川省人民医院感染科, 成都 610072
3. 重庆医科大学附属第二医院 肾内科, 重庆 400010

*1. Laboratory of Molecular Biology for Infectious Disease, Institute for Viral Hepatitis, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing, 400010, P. R. China*
*2. Department of Infectious Disease, Sichuan Provincial Hospital, Chengdu, Sichuan, 610072, P. R. China*
*3. Department of Nephrology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing, 400010, P. R. China*

通讯作者:刘 杞
Correspondence to: LIU Qi
Tel: 86-23-63825854
Fax: 86-23-63822696
E-mail: liuqiz@hotmail.com

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30570826);重庆市科委攻关项目(No. 2001-38);重庆市自然科学基金项目(No. 2004-54)

**Grants**: National Natural Science Foundation of China (No. 30570826); Key Program Foundation from Sci-Tech Committee of Chongqing City (No. 2001-38); Natural Science Foundation of Chongqing City (No. 2004-54)

收稿日期:2005-10-10
修回日期:2005-12-24

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Human augmenter of liver regeneration (hALR) is highly expressed in hepatocellular carcinoma (HCC), but rarely expressed in normal liver cells. ALR could stimulate the proliferation of HCC cell line *in vitro*, but has no effect on normal hepatocytes. This study was to investigate the inhibitory effect of blocking the expression of hALR on the proliferation of HCC cell line HepG2 using small interfering RNA (siRNA) targeting ALR and anti-ALR monoclonal antibody (McAb). METHODS: RNA interference (RNAi) plasmid pSIALR-A targeting hALR cDNA and control plasmid pSIALR-B were constructed and transfected into HepG2 cells, respectively. After transfection, the expression of green fluorescent protein was observed under a fluorescent microscope to calculate transfection efficiency, the protein level of hALR was measured by immunocytochemistry; meanwhile, the expression of hALR mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). $^{3}$H-TdR incorporation approach was performed to detect the proliferation of HepG2 cells after transfection and after neutralization with anti-hALR McAb. RESULTS: hALR was expressed in HepG2 cells. Plasmids pSIALR-A and pSIALR-B were successfully constructed. Both immunocytochemistry and RT-PCR showed that pSIALR-A inhibited the expression of hALR in HepG2 cells significantly by 83% as compared with pSIALR-B. pSIALR-A specifically inhibited the growth of HepG2 cells after transfection. $^{3}$H-TdR incorporation of pSIALR-A/HepG2 cells was significantly lower than that of pSIALR-B/HepG2 cells (67 687±6 548 vs. 104 807±5 713, $P<0.05$). Anti-hALR McAb markedly inhibited the autonomous growth of HepG2 cells ($P<0.05$). CONCLUSIONS: hALR is highly expressed in HepG2 cells. The short interfering RNA targeting hALR gene could specifically suppress the expression of hALR, and subsequently inhibit the growth of HepG2 cells. Anti-hALR McAb could partially inhibit the autonomous growth of HepG2 cells.

KEYWORDS: Human augmenter of liver regeneration; siRNA; Liver neoplasm; Monoclonal antibody; HepG2 cell line; Cell proliferation

【摘 要】背景与目的:前期研究中已发现人肝再生增强因子(human augmenter of liver regeneration, hALR)在肝癌细胞中呈高表达,在正常肝细胞中几乎不表达,并在体外能刺激肝癌细胞株增殖,而对正常肝细胞无影响。本研究通过运用 hALR 的 siRNA 和hALR 单克隆抗体阻断人肝癌细胞株 HepG2 表达, 探讨 hALR 对细胞增殖的影响。方法:设计、构建 siRNA 表达质粒 pSIALR-A 及其阴性对照质粒 pSIALR-B。将构建的 pSIALR-A 和 pSIALR-B 分别转染 HepG2 细胞。荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达,以计算转染效率。转染 48 h 后,免疫细胞化学及 RT-PCR 法检测 HepG2 细胞中 hALR 的表达。用 $^{3}$H-TdR 掺入法检测 hALR 的 siRNA 和特异性单克隆抗体对 HepG2 细胞增殖的影响。结果:HepG2 细胞中有hALR 的

表达。成功构建了针对 hALR 基因编码区的 siRNA 表达质粒 pSIALR-A。转染入细胞后发现，pSIALR-A 能明显抑制 hALR 的表达（mRNA 的表达量减少 83%），而随机序列的 siRNA 却无此作用。hALR 的 siRNA 在体外能显著抑制人肝癌细胞株 HepG2 增殖，分别转染质粒 pSIALR-A 和 pSIALR-B 后 HepG2 细胞的 cpm 值为 67 687±6 548 和 104 807±5 713（$P<0.05$）。抗 hALR 单克隆抗体特异性地阻断 hALR 的作用后，可部分抑制肿瘤细胞自主性生长（$P<0.05$）。结论：HepG2 细胞高表达 hALR；针对 hALR 的 siRNA 能显著、特异性地抑制 hALR 表达，进而抑制 HepG2 细胞的生长。抗 hALR 单克隆抗体也能部分抑制 HepG2 细胞自主性生长。

关键词：人肝再生增强因子；siRNA；肝肿瘤；单克隆抗体；HepG2 细胞株；细胞增殖
中图分类号：R392；R575　　文献标识码：A
文章编号：1000-467X(2006)06-0671-06

人肝再生增强因子（human augmenter of liver regeneration，hALR）是 Hagiya 等[1]于 1994 年发现并克隆的一种非特异性、具有热稳定性、不同于 HGF 的促肝细胞再生因子。在对 hALR 的前期研究中发现，hALR 在体外能刺激肝癌细胞增殖，并呈浓度依赖性，但对原代肝细胞却没有刺激增殖作用[2-4]。将 hALR 表达质粒转入肝癌细胞可明显促进肝癌细胞增殖和增强其抗损伤能力[5]。研究也证实，在肝癌细胞膜上存在 hALR 特异性受体，肝癌细胞膜受体较原代肝细胞多、亲和力高，而且肝癌细胞自身能分泌 hALR[6,7]。这些研究均提示 hALR 在肝癌发生、发展过程中可能发挥重要的作用，但是，以上研究多是用外源性加入 hALR，观察其对肝癌细胞增殖的影响。我们采用免疫细胞化学方法检测发现，在正常成年肝组织中除个别散在的肝细胞表达 hALR 外，绝大多数肝细胞不表达 hALR；而在肝癌组织中癌细胞却高表达 hALR[8]。对肝癌细胞为什么会高表达 hALR，hALR 是否参与维系肝癌细胞的恶性增殖，目前仍不清楚。因此，我们拟采用 RNA 干扰（RNA interference，RNAi）技术和 hALR 单克隆抗体，在核酸水平阻断 hALR 的表达，在蛋白质水平中和它的作用，观察体外培养的 HepG2 细胞生长是否受影响，从而阐明内源性表达的 hALR 是否在促进肝癌细胞的生长中发挥重要作用，这也为肝癌的诊治寻找新的作用靶点提供实验依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

1.1.1　质粒和细胞　质粒 Pgenesil-1［含绿色荧光蛋白（green fluorecence protein，GFP）表达基因］购于武汉晶赛公司。人肝癌细胞株 HepG2 由本所保存。

1.1.2　主要试剂　DNA marker 购于宝生物（大连）有限公司；脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 购于美国 Invitrogen 公司；免疫细胞化学试剂盒及 DAB 显色试剂盒购于北京中山试剂公司；小量质粒提取试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司；大量质粒提取试剂盒、总 RNA 提取试剂盒购于德国 Qiagen 公司；RT-PCR 试剂盒购于美国 Promega 公司；新生牛血清购于杭州四季青生物工程公司；胎牛血清购于美国 HyClone 公司；$^3$H-胸腺嘧啶核苷（$^3$H-TdR）购于中国原子能研究所（3.737 Bq/ml）；小鼠抗 hALR 单克隆抗体、SP2/0 骨髓瘤细胞制备腹水为本所制备[9]。引物合成和测序由华大基因-上海鼎安生物科技有限公司完成。hALR 上游引物序列：5′-ATGCGGACCCAGCAGAAGC-3′，下游：5′-CTTAGTCACAGGAGCCGTCCTT-3′，扩增产物大小为 379 bp；β-actin 上游：5′-CAAAGACCTGTACGCCAACA-3′，下游 5′-GAAGCATTTGCGGTGGAC-3′，扩增产物大小为 255 bp。以 β-actin 作为内参照，排除操作误差。

### 1.2　方法

1.2.1　免疫细胞化学方法检测 HepG2 细胞 hALR 表达　将常规培养的 HepG2 细胞以每孔 $2.5\times10^6$ 个接种于 6 孔板，培养 24 h 后 PBS 洗 2 次，4%多聚甲醛固定，PBS 洗 3 次，按过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒说明书进行染色，一抗为 1:500 小鼠抗 hALR 单克隆抗体，阴性对照一抗为 1:500 SP2/0 骨髓瘤细胞制备腹水，DAB 显色，图像采集。

1.2.2　hALR siRNA 表达载体的构建　(1)针对 hALR 基因编码区的双链核苷酸的设计：根据 siRNA 的设计原则，从 hALR 基因起始密码子下游寻找符合设计特征的靶序列，设计针对其编码区 187~207 核苷酸碱基序列的一对正、反义核苷酸链（序列 A），同时根据 siRNA 的阴性对照设计原则设计这对核苷酸的阴性对照核苷酸链（序列 B），并同时进行同源序列分析（BLAST），以确保与其它基因无同源性。寡核苷酸形成双链后，5′端带有 *Bam*H Ⅰ的酶切位点，3′端带有 *Hind* Ⅲ的酶切位点，便于与质粒 Pgenesil-1 连接。5′端开始为 21 个核苷酸的正义链，中间以 9 个核苷酸 TTCAAGACG 间隔形成发夹结构，其后为 21 个核苷酸的反义链，3′端加有转录终止信号 TTTTTT。具体设计见图 1。(2)载体质粒 pSIALR-A 及 pSIALR-B 的构建与鉴定：siRNA 真核表达载体的构建及鉴定由武汉晶赛公司完成后，根

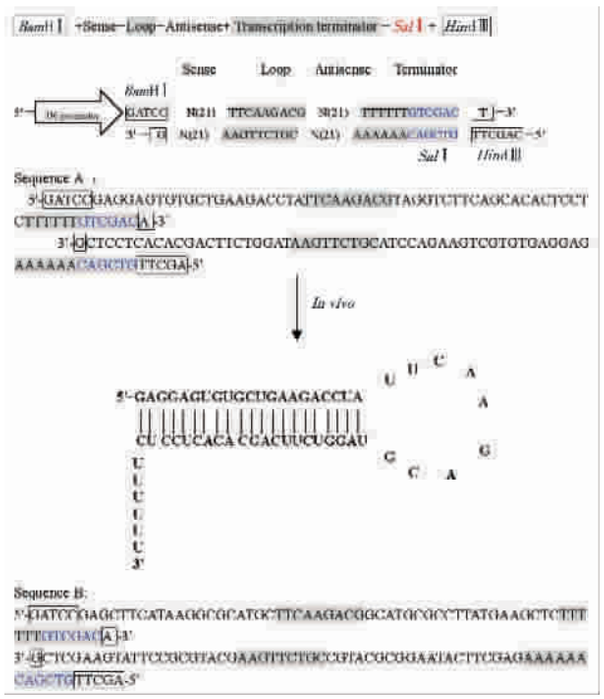


**图 1　hALR siRNA 设计示意图**

Figure 1　Small interfering RNA (siRNA) targeting human augmenter of liver regeneration (hALR)

据 Qiagen 大量抽提质粒试剂盒说明书抽提大量质粒，供转染细胞用。

1.2.3　**重组质粒的转染及功能鉴定**　(1)重组质粒的转染及转染后 GFP 的表达：以每孔 $1.5\times10^6$ 个密度将 HepG2 细胞接种于 12 孔板，在无抗生素、含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养 24 h 后，按 Lipofectamine 2000 说明书分别进行 pSIALR-A 及 pSIALR-B 转染，并于转染 6、24 h 换液。细胞转染 24~48 h 后在荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况，以判断转染是否成功，并照相。随机选择 5 个高倍视野(20×10 倍)，计数绿色荧光细胞数及总细胞数，绿色荧光细胞发生率=(绿色荧光细胞数/总细胞数)×100%，以确定转染成功率。(2)免疫细胞化学检测转染质粒后 HepG2 细胞 hALR 表达：HepG2 细胞分别转染 pSIALR-A、pSIALR-B 48 h 后，按过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒说明书进行染色，图像采集。(3)RT-PCR 检测转染质粒前后 HepG2 细胞 hALR mRNA 的表达：分别将 HepG2 细胞于转染前和转染 48 h 后按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。2 μl RNA 用 1%琼脂糖凝胶电泳，然后取 5 μl RNA 按 RT-PCR 试剂盒说明进行扩增。反应总体积 50 μl，反应条件为：48℃逆转录 45 min，94℃ AMV RT 灭活和 RNA/cDNA/引物变性 2 min；94℃变性 30 s，60℃退火 1 min，68℃延伸 2 min，40 次循环后 68℃延伸 7 min。取 2 μl PCR 反应产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定，图像采集。

1.2.4　**$^3$H-TdR 掺入法检测转染质粒后细胞增殖**　将 HepG2 细胞按每孔 $5\times10^3$ 个密度接种于 96 孔培养板，分两组，每组设 12 个平行孔，37℃、5% $CO_2$ 孵箱培养。24 h 后，按 Lipofectamine 2000 说明书分别对两组细胞进行 pSIALR-A 及 pSIALR-B 转染，再分别于转染后 6、24 h 换液。转染 48 h 后，每孔加 $^3$H-TdR $3.737\times10^{-3}$ Bq，继续培养 12 h。用细胞收集器收集细胞于玻璃纤维滤纸上，干燥后置液体闪烁计数仪测定 $^3$H 放射强度(cpm 值)。

1.2.5　**$^3$H-TdR 掺入法检测单克隆抗体作用后细胞增殖**　将 HepG2 细胞按每孔 $4\times10^3$ 个接种于 96 孔培养板，种板同时分别加入终浓度为 1:125、1:250、1:500、1:1 000 小鼠抗 hALR 单克隆抗体，每一抗体浓度设 3 个复孔；分别用终浓度为 1:125、1:250、1:500、1:1 000 SP2/0 骨髓瘤细胞制备腹水做阴性对照；同时设不加处理因素的空白对照。37℃、5%$CO_2$ 培养，分别于种板后 24、48 h 换液，换液同时均按上述浓度加入抗 hALR 单克隆抗体及其阴性对照，60 h 每孔加 $^3$H-TdR $3.737\times10^{-3}$ Bq，继续培养 12 h，收集细胞至玻璃纤维滤膜，烘干，用液体闪烁计数仪测定 cpm 值，DNA 合成抑制率=(1−实验组/空白对照组)×100%。

1.2.6　**统计学处理**　计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS12.0 软件包进行处理，两组间差异比较采用 $t$ 检验。

## 2　结　果

### 2.1　免疫细胞化学检测 HepG2 细胞 hALR 表达

HepG2 细胞有 hALR 表达，而以 SP2/0 骨髓瘤细胞制备腹水作为一抗的阴性对照 DAB 显色为阴性(图 2)。

### 2.2　GFP 在转染细胞中的表达

转染 24 h 后 HepG2 细胞有大量明亮的 GFP 表达(图 3)。经两种质粒转染的细胞均有 85%以上的细胞有绿色荧光的表达(转染率)，说明转染是成功的。

### 2.3　转染后 hALR 在蛋白水平及 mRNA 水平表达

免疫细胞化学方法证实，转染 pSIALR-A 的 HepG2 细胞 hALR 表达明显减少，而转染阴性对照质粒 pSIALR-B 的 HepG2 细胞仍然有 hALR 表达

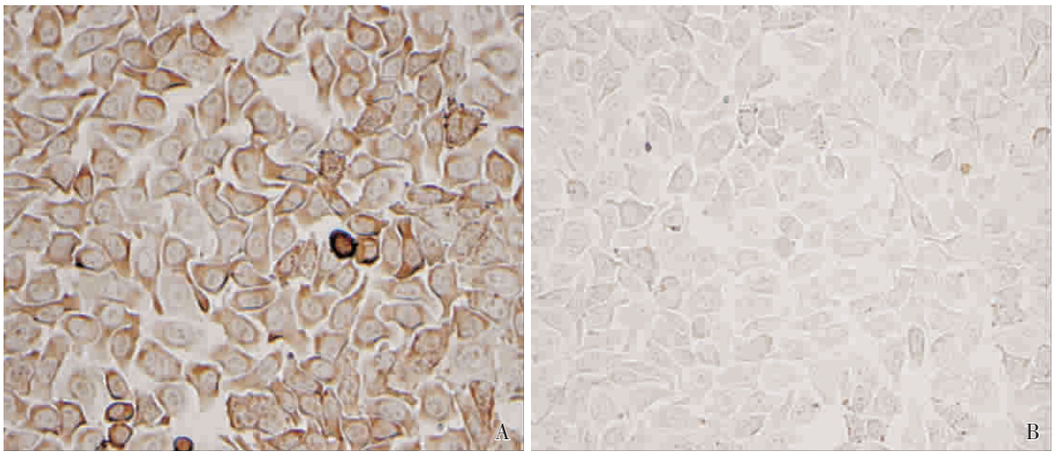


**图 2　免疫细胞化学法检测 HepG2 细胞中 hALR 的表达**(DAB ×200)

Figure 2　Expression of hALR in HepG2 cells detected by immunocytochemistry (DAB ×200)

A: Positive expression of hALR (in brownish yellow) in the plasma of HepG2 cells. B: Negative expression of hALR in HepG2 cells incubated in ascites produced by SP2/0 cells.

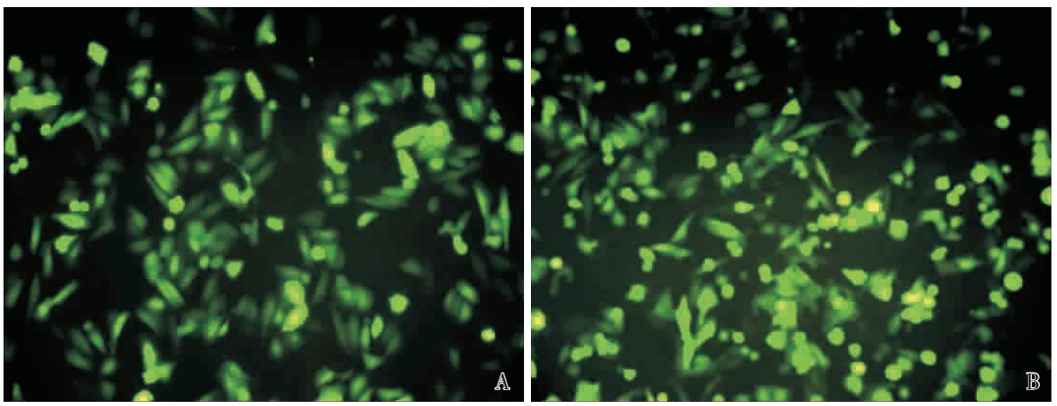


**图 3　质粒转染 HepG2 细胞后绿色荧光蛋白的表达**(×200)

Figure 3　Green fluorescent protein in the cytoplasm of HepG2 cells at 24 h after transfection with plasmid pSIALR-A targeting hALR (A) or negative control plasmid pSIALR-B (B) observed under an inverted fluorescent microscope (×200)

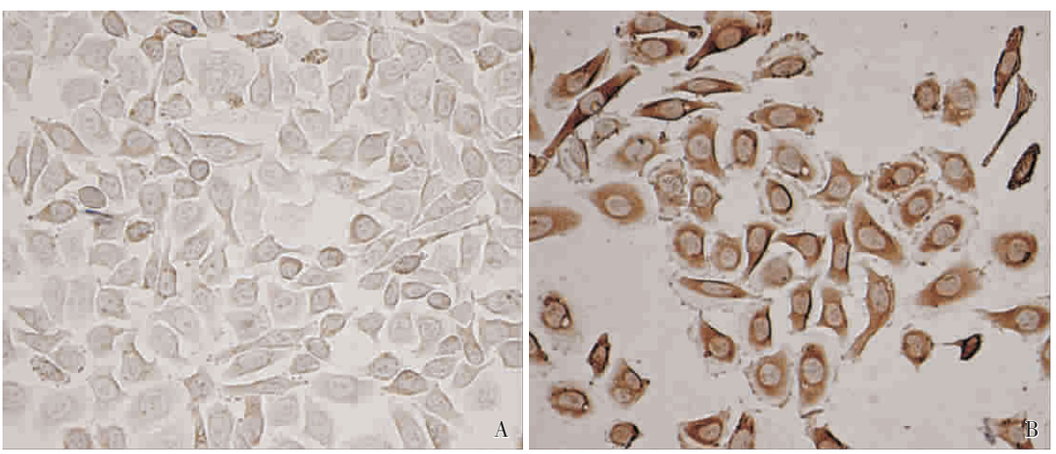


**图 4　免疫细胞化学结果显示 hALR siRNA 对 hALR 表达的影响**(DAB ×200)

Figure 4　Expression of hALR in HepG2 cells after transfection with pSIALR-A (A) or pSIALR-B (B) detected by immunocytochemistry (DAB ×200)

（图 4）。在蛋白水平证明 hALR 的 siRNA 具有显著的抑制 hALR 表达的作用。经 RT-PCR 证实转染 pSIALR-A 的 HepG2 细胞 hALR mRNA 的表达量比阴性对照组减少 83%（计算机灰度分析）（图 5）。说明在 mRNA 水平 hALR 的 siRNA 具有显著和特异性地抑制 hALR 表达的作用。证实 hALR 的 siRNA 表达质粒的设计、构建是成功的。

### 2.4　$^{3}$H-TdR 掺入法检测转染质粒后细胞增殖

转染质粒 pSIALR-A 组 HepG2 细胞的 cpm 值为 67 687±6 548，阴性对照组 HepG2 细胞的 cpm 值为 104 807±5 713。与阴性对照质粒 pSIALR-B 比较，质粒 pSIALR-A 转染 48 h 能够明显抑制 HepG2 细胞增殖，两组有显著性差异（$P$<0.01）。

### 2.5　$^{3}$H-TdR 掺入法检测单克隆抗体作用后细胞增殖

分别与相同浓度的 SP2/0 骨髓瘤细胞制备腹水比较，浓度为 1:125、1:250、1:500 的单克隆抗体，作用于 HepG2 细胞 72 h 均能够部分抑制 HepG2 细胞增殖，尤以抗 hALR 单克隆抗体浓度为 1:250 时抑制作用最强（表 1）。

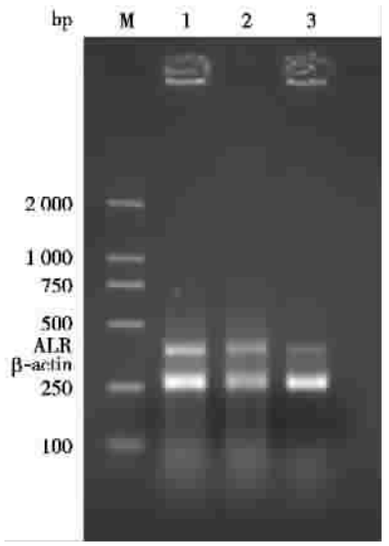


图 5　转染 pSIALR-A、pSIALR-B 及未转染质粒 HepG2 细胞 hALR mRNA 的表达

Figure 5　Expression of hALR mRNA in HepG2 cells detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)
Lane M: DNA marker; lane 1: HepG2 cells transfected with pSIALR-B; lane 2: untransfected HepG2 cells; lane 3: HepG2 cells transfected with pSIALR-A.

表 1　不同浓度抗 hALR 单克隆抗体对 HepG2 细胞增殖的影响

Table 1　The effect of anti-hALR McAb on the proliferation of HepG2 cells detected by 3H-TdR incorporation approach

| Final dilution | Anti-hALR McAb group (cpm) | Inhibitory rate (%) | Ascites induced by SP2/0 cells group (cpm) | Inhibitory rate (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1:125 | 176 600± 8 127[a] | 56.1 | 208 577±11 501 | 48.1 |
| 1:250 | 91 900±18 821[b] | 77.2 | 197 290±22 062 | 51 |
| 1:500 | 150 403±21 757[a] | 62.6 | 326 846±81 409 | 18.7 |
| 1:1000 | 384 838± 6 948 | 4.3 | 395 991±45 671 | 1.6 |
| Blank control | | | 402 256±17 170 | |

[a]$P$<0.05, [b]$P$<0.01, vs. ascites induced by SP2/0 cells group.

## 3　讨　论

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，我国每年新发病例约占全球 45%，已成为世界上肝癌发病最集中的国家。经过近半个世纪的努力，在肝癌的治疗上已取得了巨大成就。但目前肝癌患者的生存率尚不令人满意，原因在于对肝癌的基础研究工作未取得重大突破，对肝癌的发病机理认识不足。现已发现一些细胞因子可能参与了肝癌的发生、发展，但针对这些细胞因子开展的生物学治疗尝试，其疗效并不理想。随着研究的深入，一些与肝癌发生、发展有关的新的细胞因子被不断发现，研究这些细胞因子在肝癌发生、发展中的作用，将会充实和完善人们对肝癌发生、发展机制的认识，为肝癌的防治开启新的思路。

hALR 是近年来发现的促肝细胞再生的因子。目前对 hALR 主要进行了促进肝脏再生[10]、抗肝纤维化[11,12]、免疫调控[13-16]等方面的研究。我们在对 hALR 的前期研究中发现，hALR 在肝癌发生、发展过程中可能发挥重要的作用，而且 hALR 可能通过自分泌作用参与人肝癌的发生、发展过程。但是目前尚不清楚 hALR 在肝癌的发生、发展中发挥的作用及其地位。因此我们拟通过在核酸水平抑制 hALR 的表达，以及在蛋白质水平中和 hALR 的作用后，观察体外培养肝癌细胞生物学行为的变化，从而确定内源性的 hALR 在肝癌发生、发展过程中发挥的作用及其地位。

RNA 干扰（RNAi）现象是近年来研究发现的生物进化上的防御机制[17]，是一种序列特异性的转录后基因沉默（post-transcriptional gene silencing，

PTCS)现象。目前人们利用 RNAi 作为一种简单有效的代替基因敲除的有力工具来研究基因功能、信号转导以及进行初步基因治疗的研究[18,19]。它具有抑制作用强、稳定性高、细胞摄取相对容易等优点[20,21]。在肿瘤研究方面,可以运用 RNAi 技术使一些基因的表达降低从而抑制肿瘤细胞增殖。因此在本实验中,我们运用 RNAi 技术,通过 hALR 的 siRNA 下调 hALR 的表达以抑制肿瘤细胞增殖。

HepG2 为人源性肝癌细胞株,在确定了 HepG2 细胞表达 hALR 后,针对 hALR 的编码区构建了 siRNA 表达质粒 pSIALR-A 及其阴性对照质粒 pSIALR-B,并将 pSIALR-A 和 pSIALR-B 分别转染 HepG2 细胞,转染细胞后发夹结构被加工为 siRNA,其特异性地与 hALR mRNA 结合,降解了 hALR mRNA 从而引发基因沉默。研究结果证实 hALR 的 siRNA 具有显著和特异性地抑制 hALR 表达的作用(抑制组比阴性对照组减少 83%);并且抑制了 hALR 表达后,HepG2 细胞的生长受到明显抑制($P<0.01$);同时也发现抗 hALR 单克隆抗体在一定浓度范围内,能特异性地抑制 HepG2 的增殖($P<0.01$)。这也证实了 hALR 是通过自分泌方式参与维持肝癌细胞的自主性生长。但是,无论是用 hALR 的 siRNA 和 hALR 单克隆抗体均未起到完全抑制的作用,究其原因可能与以下因素有关:①脂质体转染试剂对 pSIALR-A 的转染率未达到 100%;而且 RNAi 技术有可能使基因功能不完全被沉默,因此有部分未被 hALR 的 siRNA 沉默的 hALR 仍然在发挥作用。②hALR 在肿瘤细胞内产生后不仅释放到胞外刺激自身增殖,而且可能还存在不释放到胞外,在胞内刺激自身细胞增殖作用[22],因此仅在胞外加入 anti-hALR McAb 不能完全抑制增殖。③hALR 仅是刺激肿瘤细胞增殖的细胞因子中的一种,还有很多其它的细胞因子在肿瘤细胞的生长过程中发挥着刺激增殖的作用。

本实验在核酸及蛋白质水平证实了阻断 hALR 能够明显抑制肿瘤细胞增殖,说明 hALR 是促进肝癌发生、发展的因素之一,为肝癌的生物治疗提供了理论基础。

## [参 考 文 献]


[1] Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: Expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994,91(17):8142-8146.

[2] 杨晓明,胡志远,谢 玲,等. 重组人肝再生增强因子在体外能刺激 HTC 肝癌细胞 DNA 合成 [J]. 生理学报, 1997,45(5):557-561.

[3] 余慧锋,刘 杞. hALR 在毕赤酵母菌 GS115 中表达和体外活性检测 [J]. 中华肝脏病杂志, 2003,11(7):421-423.

[4] Liu Q, Yu H F, Sun H, et al. Expression of human augmenter of liver regeneration in pichia pastoris yeast and evaluation of its bioactivity in vitro [J]. World J Gastroenterol, 2004,10(21):3188-3190.

[5] 陈 莉,孙红柳,安 威. 重组人肝刺激因子的促增殖和抗损伤作用 [J]. 解剖学报, 2003,34(2):155-158.

[6] 王 阁,房殿春,刘为纹,等. 人肝细胞生成素受体的确定及特性 [J]. 第三军医大学学报, 2001,23(9):1051-1054.

[7] Gandhi C R, Kuddus R, Subbotin V M, et al. A fresh look at augmenter of liver regeneration in rats [J]. Hepatology, 1999, 29(5):1435-1445.

[8] 孙 航,余慧锋,吴传新,等. 肝再生增强因子在肝癌细胞中的表达及意义 [J].中华肝脏病杂志, 2005,13(3):204-207.

[9] 马华锋,刘 杞. 重组 hALR 单克隆抗体的制备:以非纯化抗原筛选杂交瘤 [J]. 中国免疫学杂志, 2002,18(10):671-673.

[10] 杨晓明,谢 玲,吴祖泽,等. 肝部分切除后 hALR mRNA 表达增强 [J]. 生理学报, 1997,49(5):599-601.

[11] 王爱民,杜双存,杨晓明,等. 重组 hALR 可逆转免疫损伤性肝纤维化 [J]. 中国病理生理杂志, 2000,16(4):298-300.

[12] 王爱民,杨晓明,郭瑞峰,等. 重组 hALR 对大鼠实验性肝纤维化的保护作用 [J]. 中华医学杂志, 1998,78(9):707.

[13] Tanigawa K, Sakaida I, Masuhara M, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases [J]. J Gastroenterol, 2000,35(2):112-119.

[14] Francavilla A, Vujanovic N L, Polimeno L, et al. The in vivo effect of hepatotrophic factors augmenter of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-Ⅱ on liver natural killer cell functions [J]. Hepatology, 1997,25(2):411-415.

[15] Polimeno L, Margiotta M, Marangi L, et al. Molecular mechanisms of augmenter of liver regeneration as immunoregulator: its effect on interferon-gamma expression in rat liver [J]. Dig Liver Dis, 2000,32(3):217-225.

[16] Adams G A, Maestri M, Squiers E C, et al. Augmenter of liver regeneration enhances the success rats of fetal pancreas transplantation in rodents [J]. Transplantation, 1998,65(1):32-36.

[17] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans [J]. Nature, 1998,391(6669):806-811.

[18] 曾小莉,涂植光. 人参皂甙 Rh2 对人肝癌细胞 SMMC-7721 的诱导分化作用 [J]. 癌症, 2004,23(8):879-884.

[19] 姜 萌,王长谦,王彬尧,等. SiRNA 干扰 HIF-1α 抑制人外周血内皮祖细胞分化 [J]. 癌症, 2005,24(11):1293-1300.

[20] Chi J T, Chang H Y, Wang N N, et al. Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003,100(11):6343-6346.

[21] Wall N R, Shi Y. Small RNA:can RNA interference be exploited for therapy? [J]. Lancet, 2003,362(9393):1401-1403.

[22] Chengrong L, Yong L, Yanlin Z, et al. Intracrine hepatopoietin potentiates AP-1 activity JAB1 independent of MAPK pathway [J]. FASEB J, 2001,16(1):90-92.


[编辑:张 菊;校对:夏宁静]