

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.11.010

柱层析法纯化人血纤维蛋白原及其药理功能研究*

林孝发¹ 张运佳² 孙兆健¹ 王 妍^{1Δ} 郭采平^{2Δ}

(1 深圳职业技术学院 广东 深圳 518000; 2 深圳卫光生物制品股份有限公司 广东 深圳 518000)

摘要 目的:探讨层析法新工艺和原有的低温乙醇工艺制备纤维蛋白原在大鼠跟腱断裂模型中促恢复的效果差异。**方法:**构建大鼠跟腱部位断裂模型,将其分为空白组(未剪跟腱)、模型组(跟腱断裂未给药)、实验组(自制纤维蛋白原 2 mg/mL)与对照组(市售纤维蛋白原 2 mg/mL),观察各组大鼠在手术后三周跟腱部位的最大滑动距离、弹性模量和最大抗拉力差异。**结果:**采用冷沉淀溶解、酸沉除杂、S/D 灭活病毒、MacroCap Q 柱层析、过滤等流程可从人血浆冷沉淀组分 I 中成功分离纯度为 90.9%纤维蛋白原。试验中构建的大鼠跟腱部位断裂模型无感染、且均存活至试验终止。生物力学结果显示,四组大鼠跟腱在最大滑行距离上无明显统计学差异($P>0.05$);在跟腱部位弹性模量及最大抗压力比较上,实验组及对照组均优于模型组,但与空白组仍有一定差距,且差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**采用柱层析法分离人纤维蛋白原,不仅能有效提高分离效率,减少蛋白损失,还可增强纤维蛋白原在断裂跟腱中的促恢复效果。

关键词:柱层析法;纤维蛋白原;跟腱损伤

中图分类号:R-33;R554.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)11-2041-05

Studies on the Purification of Human Fibrinogen by Column Chromatography and Its Pharmacological Function*

LIN Xiao-fa¹, ZHANG Yun-jia², SUN Zhao-jian¹, WANG Yan^{1Δ}, GUO Cai-ping^{2Δ}

(1 Shen Zhen Polytechnic, Shenzhen, Guangdong, 518000, China;

2 Shenzhen Weiguang Biological Products Co. Ltd., Shenzhen, Guangdong, 518000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the difference between new technology of chromatography and old low temperature ethanol method in the preparation of fibrinogen, which is used in rat model with partial rupture of the Achilles tendon. **Methods:** The rat model with partial rupture of the Achilles tendon was constructed and divided into the blank group (the Achilles tendon wasn't cut), the model group (the Achilles tendon was cut and wasn't administered), the experimental group (administered with 2 mg/mL self-made fibrinogen) and the control group (administered with 2 mg/mL commercially available fibrinogen). Differences of before surgery and three weeks after surgery were observed on maximum sliding distance of Achilles tendon, Achilles tendon elastic modulus and the greatest tensile strength. **Results:** Fibrinogen of 90.9% purity was successfully isolated from human plasma cryoprecipitate component I using cryoprecipitation dissolving, acid precipitation purification, S/D inactivating virus, MacroCap Q column chromatography and filtration. Biomechanical results showed that the four groups had no significant difference in the Achilles tendon maximum sliding distance ($P>0.05$), but in the Achilles tendon elastic modulus and maximum resistance to pressure, the experimental group and the control group were better than the model group, and had a certain disparity with the blank group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusions:** Using column chromatography to separate human fibrinogen, not only can effectively improve the separation efficiency and reduce the loss of protein, but also enhance the effect of fibrinogen in promoting recovery of the Achilles tendon rupture.

Key words: Column chromatography; Fibrinogen; Achilles tendon rupture

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R554.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)11-2041-05

前言

纤维蛋白原(Fibrinogen, Fib)又称凝血因子 I, 主要由肝细胞、巨核细胞合成分泌, 并经凝血酶作用后参与凝血途径的最终环节, 是凝血途径中必不可少的底物^[1]。研究证实, 因 Fib 不

足所引起的异常出血及手术患者术后注射 Fib 均可获得令人满意的止血效果^[2], 同时, 市售止血带上也常添加 Fib 来增强产品的止血效果^[3]。此外, 有文献还报道^[4], Fib 还具有诱导平滑肌细胞增殖及趋化作用来促进受损组织修复的能力。可见, Fib 在临床应用中发挥着重要作用。但是, Fib 在血浆中含量较低, 仅

* 基金项目: 深圳市科技创新委基金项目(JCYJ20160527172247868; GGJS20130331152344401)

作者简介: 林孝发, 初级工程师, 医学免疫学, 硕士, 从事血液制品研究

Δ 通讯作者: 王妍, 研究员, 生物化学与分子生物学, 博士, 从事蛋白质技术研究, E-mail: wangSusan@szpt.edu.cn;

郭采平, 教授级高工, 分子细胞生物学, 博士, 从事生物制品的研究和开发, E-mail: gcpzxy0402@aliyun.com

(收稿日期: 2016-06-01 接受日期: 2016-06-27)

为 2-4 g/L,按照以往低温乙醇工艺,大量纤维蛋白原随废料丢弃,从而造成资源的严重浪费,而改进分离技术则能从根本上解决以上问题。目前,杨笃才等^[9]尝试在以往工艺中引入 EDTA 去除 Ca^{2+} 、甘氨酸沉淀去除多聚体等步程,该法有助于回收低温乙醇废液中的 Fib,且保持 Fib 具有较高的纯度及较短的复溶时间。但是,低温乙醇技术耗时久、蛋白活性差的问题仍未得到有效解决^[9]。而国外采用层析技术,则只需适当的样前处理步骤及离子交换层析即可获得高纯度的纤维蛋白原^[7],这不仅节约了制备时间,也有助于提高 Fib 产出率。而 Fib 的大量制备,不仅有利于临床应用的顺利开展,也可为进一步研究 Fib 的生物学功能提供基础。因此,本文通过层析技术快速获得高纯度纤维蛋白原,并对 Fib 在跟腱断裂组织中的促恢复效果做了初步研究,以期能为更好的开发及利用 Fib 提供实验基础。

1 实验材料及仪器

1.1 主要材料

人血组分 I (由深圳市卫武光明生物制品有限公司提供);纤维蛋白原对照品购自中国质量检定研究院 (批号:140626-201310);SPF 级 SD 大鼠,体重 200 ± 20 g,购自广东省医学实验动物中心,许可证号:SCXK-(粤)2013-0002;Macro-Cap Q 柱层析购自 GE 公司,10%福尔马林购自西陇化工股份有限公司;蛋白高分子量 marker 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;纤维蛋白原含量检测试剂盒(批号:2400130)购自长春汇力生物技术有限公司;硫酸铵等试剂购自广州鼎国生物技术有限公司。

1.2 主要仪器

蛋白电泳仪、凝胶成像仪购自 BIO-RAD 公司,LEICA ASP300S 全密封式组织脱水机、LEICA EG 1150H 组织包埋机购自徕克医疗仪器有限公司;3220 Serise III 力学测定仪购自 BOSE 公司。

2 实验方法

2.1 纤维蛋白原制备

(1)溶解及酸沉:依据冷沉淀组分 I 重量,加入 10 倍体积的磷酸盐缓冲液(40 mM PB, 15 mM Gly pH 为 7.2),加入终浓度 8 IU/mL 肝素钠,37 °C 水浴锅中融化 30 min,4 °C,4000 rpm,10 min 离心,收集上清液,加入 0.5 mol/L 醋酸使 pH 调至 6.9,并放于 4 °C,4 h 后,进行 4 °C,4000 rpm,10 min 离心,吸取上清液。(2)病毒灭活:取上清液,每 50 mL,加入终浓度为 10 mg/mL Tween-80 及 3 mg/mL TnBP,放于恒温磁力搅拌器上,25 °C,搅拌 6 h,置于 4 °C 备用。(3)Macrocap Q 柱层析:以平衡液(40 mmol/L PB, 15 mmol/L Gly pH 为 6.9)平衡介质,将病毒

灭活后样品以流速 1.5 cm/min 速度流经介质后,平衡液平衡 2-3 个柱体积后,分别用洗脱液 1 (平衡液 +0.05 mol/L NaCl pH7.2)、洗脱液 2 (平衡液 +0.15 mol/L NaCl pH7.2)和洗脱液 3 (平衡液 +1 mol/L NaCl pH7.2)以相同流速洗脱 1~2 个柱体积,并根据紫外吸收值收集每次洗脱蛋白,标记为 X1、X2 和 X3。对其进行蛋白电泳验证,X2 为纤维蛋白原。(4)浓度测定:采用透射比浊法进行测定,大致步骤如下:将标准品及待测样品按一定浓度梯度稀释后加入到含有亚硝酸盐及中心分散剂中,在波长 630 nm 下绘制标准曲线,并计算待测品种纤维蛋白原含量。(5)分装:将确定浓度的纤维蛋白原经 0.22 μm 滤膜过滤后,并以 2 mg/mL 进行分装。

2.2 动物模型制备及给药

2.2.1 分组 将 22 只 SD 大鼠,分为 4 组,其中空白组 4 只(切开皮肤后直接缝合),造模组 6 只(仅实施手术未给药)、实验组 6 只(采用自制纤维蛋白原)、对照组 6 只。(市售纤维蛋白原)。

2.2.2 大鼠跟腱断裂模型制备 对四组大鼠术前均断水、断食一天。手术当天,按 0.1 mL/100 g 腹腔注射 3%戊巴比妥钠溶液,待大鼠麻醉处理后,在无菌条件下,在其后肢双侧跟腱跟骨止点处作 10 mm 横向切口并显露跟腱,用剪刀剪约 1-2 mm 缺口(见图 1),术后直接以 5-0 缝合线缝合伤口,不实施外固定,笼中自由饲养。术后三日,每日给予手术大鼠两侧后肢各 20 万单位青霉素注射以防感染。



图 1 跟腱断裂造模

Fig.1 Achilles tendon rupture model

2.2.3 给药剂量、途径及周期 将自制纤维蛋白原及市售纤维蛋白原用生理盐水均稀释至 2 mg/mL,并按照 500 μL /次/侧注射剂量进行注射,同时,模型组及空白组注射生理盐水 500 μL /次/侧。四组大鼠每周一次,共给药三周。

2.2.4 取材 第一次给药后一周每组处死 2 只大鼠,剩余大鼠均在末次给药后一周全部处死。具体操作如下所示。

手术日	观察期	第一次给药	第二次给药 / 处死	第三次给药	处死
0 天	第 3 天	第 4 天	第 11 天	第 18 天	第 25 天

2.2.5 观察指标 (1)一般情况检测:术后每周观察大鼠存活及活动情况,并对其跟腱愈合程度、腱周组织水肿及粘连情况进行比较。(2)生物力学检查:取刚处死大鼠的另一侧跟腱,用浸有

生理盐水的纱布包裹跟腱两侧以增大跟腱摩擦力(见图 2),随即进行跟腱最大滑动距离(mm)、跟腱弹性模量(MPa)及最大抗拉力(N)分析。

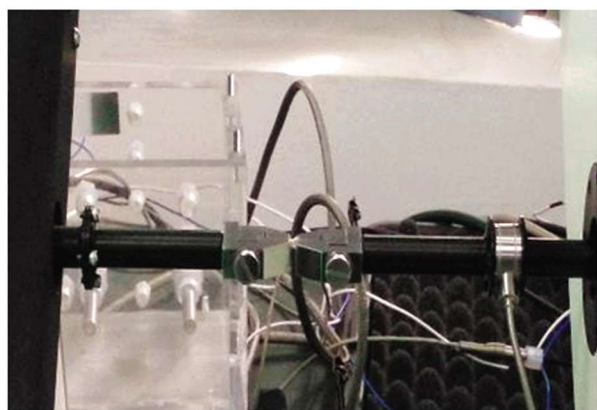


图2 生物力学测试
Fig.2 Biomechanical Testing

表1 纤维蛋白原纯化工艺表

Table 1 Purification process table of Fibrinogen

Purification Process	Total protein(mg)	Fibrinogen (mg)	Purity(%)	Purification factor	Recovery rate(%)
I components dissolve	1000.0	162.8	16.2	1.00	100.0
Acid precipitation	489.0	148.2	30.3	1.86	91.0
S/D Inactivated	481.0	146.2	30.4	1.00	89.8
Macrocap Q Flowthrough	115.9	5.1	4.4	0.14	3.1
Macrocap Q Eluent 1	69.7	9.6	13.7	0.45	5.9
Macrocap Q Eluent 2	124.8	113.5	90.9	2.99	69.7
Macrocap Q Eluent 3	173.3	12.2	7.0	0.23	7.5

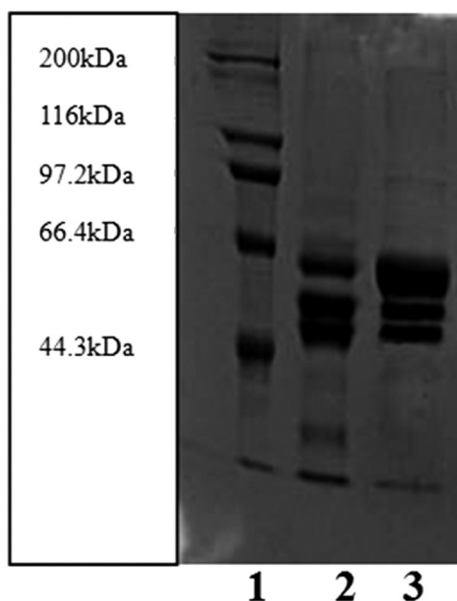


图3 蛋白电泳图
Fig. 3 Protein electrophoresis

3.2 大鼠生理指标分析

各组大鼠术后切口愈合良好,无感染症状且均存活至试验处死时。术后 1-3 天进行跟腱断裂手术的大鼠精神较差,活动量少,喜欢蜗居于角落,行走时存在跛行或后肢无力现象,术后 1 周后,精神状态正常,可正常行走。

3.3 生物力学结果

结果显示,四组大鼠在最大滑动距离上差异无统计学差

2.3 统计分析

采用 SPSS19.0 统计分析软件,对所得计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,并进行 t 检验,对计数资料进行卡方检验。当 $P < 0.05$ 时,组间差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 纤维蛋白原分离

研究显示,Macrocap Q 柱对纤维蛋白原有较好的吸附能力,且在平衡液 0.15 mol/L NaCl PH7.2 洗脱条件下,目的蛋白可大部分被洗脱。Fib 最终纯度在 90%以上,回收率约 70%(见表 1、图 3 和图 4),电泳图中泳道 2 及泳道 3 分别为对照品及层析法制备的纤维蛋白原。

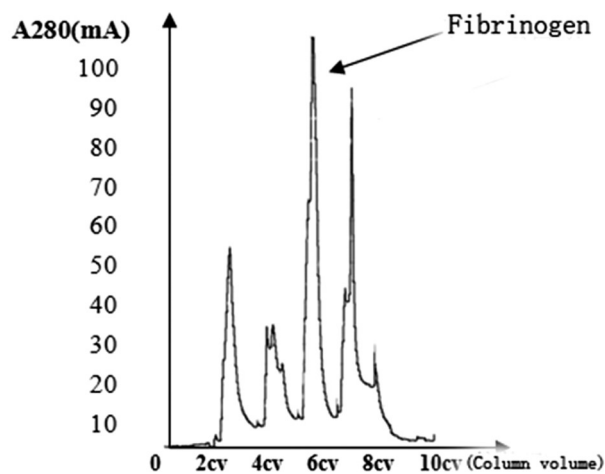


图4 蛋白层析图

Fig. 4 Protein chromatograms

Note: 1 Marker; 2 Fibrinogen Standard; 3 self-made fibrinogen finished

异,但在跟腱弹性模量及最大抗拉力上,实验组大鼠恢复效果略优于对照组($t_{\text{跟腱弹性模量}} = 5.464, P < 0.05; t_{\text{最大抗拉力}} = 5.234, P < 0.05$),且两者均优于模型组。见表 2。

4 讨论

层析技术的快速发展,不仅有效的提高了目前血液制品产品的分离效率,也为分离微量蛋白提供了可能。然而,我国大部分血液制品企业并未对目前低温乙醇法工艺进行替换,其主要原因之一是低温乙醇法制备血液制品工艺相对稳定,且成本较低,仅需要提供低温离心设备。但是随着国际血液制品巨头产

表 2 四组大鼠生物力学结果比较

Table 2 Comparison of biomechanical results in four groups of rats

Groups	Maximum sliding distance(mm)	Achilles tendon elastic modulus(Mpa)	Maximum tensile strength(N)
Blank group	4.39 ± 2.31	8.81 ± 3.15	33.58 ± 7.42
Model group	5.24 ± 2.15	1.37 ± 0.43	14.39 ± 4.21
Experimental group	4.69 ± 3.52	7.55 ± 1.42 ^{*△}	30.28 ± 7.39 ^{*△}
Control group	4.72 ± 3.64	6.24 ± 1.14 ^{*△}	26.21 ± 6.42 ^{**△}

Note: compared with the black group, * P<0.05; ** P<0.01; compared with the model group, △ P<0.05; △△ P<0.01.

品种类的更新和产品产量的显著增长压力,国内血液制品企业也开始积极寻找新的分离方法。纤维蛋白原的分离是近年来研究较多的蛋白之一,范彩彩^[8]等对目前应用于分离纤维蛋白原的经典冷沉淀法、反复冷沉淀法、冷乙醇法、硫酸铵沉淀法、PEG 沉淀法进行比较发现,反复冷沉淀具有更好的提纯效果及分离效率。虽然该研究并未引入层析技术,但其在原有分离基础上进行归纳分析,为寻找更合适纤维蛋白原分离技术提供思路。此外,黄璠^[9]等采用铝胶吸附、酸沉淀、离子交换层析、低温乙醇沉淀流程最终获得纯度 91.5%Fib,远高于《中华人民共和国药典》2010 版第三部中的国家标准(≥ 70.0%),但是该法在引入层析技术同时,仍需要以氢氧化铝凝胶作为样品吸附剂,使得在后续流程中需要对氢氧化铝残留情况进行检测。喇文军^[10]等采用扩张床吸附层析,其以原料血浆为待分离样品,通过一步结合,分步洗脱的方法,分离出多种活性蛋白。虽然该法相对于以往分离单一活性蛋白具有明显优势,但我国目前血液制品行业无法马上抛弃原有技术工艺及设备,因此该技术并不适用于国内期望在原有工艺基础上开发新品种或提高原品种分离效率的思路。因此,针对现有低温乙醇工艺中常见废弃物组分 I,本文希望采用新型层析技术对废料起到回收再利用的目的。

本研究中首先采用对组分 I 进行溶解并加入肝素钠,其目的是使 Fib 在溶解及酸沉处理过程中不发生凝集反应。结果显示,在进行上柱前,该方法明显有效保证了 Fib 活性含量。此外,本流程中采用了 Macrocap Q 柱作为纤维蛋白原分离的主要介质。该介质不仅能结合纤维蛋白原,同时对肝素钠、Tween-80 及 TnBP 也有去除效果。而国外多采用大孔径的层析介质,如 DEAE-650M,其可能原因是纤维蛋白原主要由 α、β、γ 分子组成,大孔径的离子层析介质更有利于纤维蛋白原结合到离子介质上^[11],随后通过不同盐浓度进行洗脱,可使得纤维蛋白原与其他杂蛋白有效分离。而本研究采用 Macrocap Q 离子介质最终回收 69.7%、纯度为 90.9%的 Fib。此外,目前尚未查到有相关文献同时采用与本流程相同介质及流程的纯化工艺。

另外,大鼠跟腱部分断裂模型的治疗效果明显,也进一步说明层析技术不仅在分离效率上优于低温乙醇技术,其蛋白在促组织修复功能也具有一定优势。Linsley C^[12]等研究发现,Fib 所形成的三维纤维蛋白有利于干细胞的增殖及分化,此外,肿瘤患者血液中常常出现高表达纤维蛋白原,其可能原因是 Fib 具有促进新生血管生成,从而为肿瘤增殖提供充足营养^[13,14]。研究显示^[15,16],早期跟腱愈合主要以细胞数目增加及胶原蛋白纤维任意排列为,而晚期愈合则是以胶原纤维按机械应力方向排列生长,从而逐渐恢复跟腱抗应力、抗张力等机械力学性能。

而本研究通过 Fib 对大鼠跟腱断裂模型的治疗效果发现,跟腱断裂处在受到高浓度的 Fib 时,其恢复速度明显快于注射生理盐水的模型组。而这与 Fib 促新生血管生成^[17]及趋化平滑肌细胞及成纤维细胞具有一定相关性^[18]。与此同时,我们还发现低温乙醇法纯化的 Fib 对组织的修复作用略弱于柱层析法纯化的 Fib,可能是由于长时间的低温分离操作对凝血因子的部分生物学功能造成影响^[19]。

随着医学技术的快速发展,目前对纤维蛋白原的作用并不仅仅作为纤维蛋白胶成分局限于促凝血,而其形成的三维结构,还可用于细胞生长及活性物质的载体等^[20]。在我国处于血浆投浆量无明显增长的情况下,通过新工艺、新技术分离纤维蛋白原将对产品的生产和应用提供新的思路。而采用层析技术结合低温乙醇法,不仅无需大量更新以往设备,又可将原有废料变废为宝,应鼓励推广应用。

参考文献(References)

- [1] 刘刚. 纤维蛋白(原)降解产物检测及临床研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(19): 1653-1656
Liu Gang. Fibrin (original) Degradation Product Testing and Clinical Research Progress[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2014, 13(19): 1653-1656
- [2] 吴秀文, 任建安. 纤维蛋白胶的外科应用 [J]. 中华外科杂志, 2014, 52(1): 63-65
Wu Xiu-wen, Ren Jian-an. Surgical Application of Fibrin Glue [J]. Chinese Journal of Surgery, 2014, 52(1): 63-65
- [3] 黄远铿, 肖百全, 欧慧瑜, 等. 新型止血材料纤维蛋白贴的止血作用研究[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1140-1145
Huang Yuan-keng, Xiao Bai-quan, Ou Hui-yu, et al. Hemostatic effect New Hemostatic Fibrin Paste Material Research[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2013, 29(8): 1140-1145
- [4] Linsley C, Wu B, Tawil B. The effect of fibrinogen, collagen type I, and fibronectin on mesenchymal stem cell growth and differentiation into osteoblasts[J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(11-12): 1416-1423
- [5] 杨笃才. 一种从冷沉淀提取凝血因子 VIII 的废料中提取人纤维蛋白原的制备工艺: 中国, 201410524351.2[P]. 2014-10-09
Yang Du-cai. Extracting Factor VIII from Cryoprecipitate Extracted from Scrap Preparation of Human Fibrinogen: CHINA, 201410524351.2[P]. 2014-10-09
- [6] 章烽, 邱颖婕, 金魏名, 等. 冷沉淀制备时间对凝血因子的影响[J]. 临床输血与检验, 2013, 15(2): 169-170
Zhang Yi, Qiu Ying-jie, Jin Wei-ming, et al. Effect of Cryoprecipitate Preparation Time of Coagulation Factors [J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2013, 15(2): 169-170
- [7] Goheen S C, Hilsenbeck J L. High-performance ion-exchange chro-

- matography and adsorption of plasma proteins [J]. J Chromatogr A, 1998, 816(1): 89-96
- [8] 范彩彩, 陈智华, 高宇航, 等. 纤维蛋白原的 5 种提取方法比较研究 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(29): 22-26
Fan Cai-cai, Chen Zhi-hua, Gao Yu-hang, et al. Comparative Study of Five Kinds of Extraction Methods of Fibrinogen[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(29): 22-26
- [9] 黄璠, 梁小明, 杨笃才, 等. 外用纤维蛋白原的分离纯化 [J]. 临床医药实践, 2015, 24(12): 923-925
Huang Pan, Liang Xiao-ming, Yang Du-cai, et al. Isolation and Purification of Fibrinogen from External Use [J]. Proceeding of Clinical Medicine, 2015, 24(12): 923-925
- [10] 喇文军, 王妍, 周靖, 等. 一步柱层析纯化血浆分离多种血液制品组分[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(2): 194-198
La Wen-jun, Wang Yan, Zhou Jing, et al. Column chromatography separation step plasma components more blood products[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2015, 28(2): 194-198
- [11] Foster P R, Griffin B D, Bienek C, et al. Distribution of a bovine spongiform encephalopathy-derived agent over ion-exchange chromatography used in the preparation of concentrates of fibrinogen and factor VIII[J]. Vox Sang, 2004, 86(2): 92-99
- [12] Linsley C, Wu B, Tawil B. The effect of fibrinogen, collagen type I, and fibronectin on mesenchymal stem cell growth and differentiation into osteoblasts[J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(11-12): 1416-1423
- [13] Sheng L, Luo M, Sun X, et al. Serum fibrinogen is an independent prognostic factor in operable nonsmall cell lung cancer [J]. Int J Cancer, 2013, 133(11): 2720-2725
- [14] Wang H, Gao J, Bai M, et al. The pretreatment platelet and plasma fibrinogen level correlate with tumor progression and metastasis in patients with pancreatic cancer[J]. Platelets, 2014, 25(5): 382-387
- [15] 加莎热特·杰力勒, 白靖平. 跟腱愈合过程中的力学生物学 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(42): 8352-8357
Jiasharete · Jielile, Bai Jing-ping. Biomechanics during Achilles tendon healing [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(42): 8352-8357
- [16] Muthard R W, Welsh J D, Brass L F, et al. Fibrin, γ' -Fibrinogen, and Transclot Pressure Gradient Control Hemostatic Clot Growth During Human Blood Flow Over a Collagen/Tissue Factor Wound[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2015, 35 (3): 645-654
- [17] Ndrepepa G, Braun S, King L, et al. Relation of fibrinogen level with cardiovascular events in patients with coronary artery disease [J]. The American journal of cardiology, 2013, 111(6): 804-810
- [18] Wu W, Okamoto O, Kato A, et al. Functional peptide of dermatopontin produces fibrinogen fibrils and modifies its biological activity[J]. Journal of dermatological science, 2014, 76(1): 34-43
- [19] Mousavi Hosseini K, Nasiri S, Heidari M. Separation of Albumin from the Human Plasma by Ethanol and Low Temperature[J]. ZUMS Journal, 2013, 21(85): 74-84
- [20] Wang J, Wang H, Wang Y, et al. Alternate layer-by-layer assembly of graphene oxide nanosheets and fibrinogen nanofibers on a silicon substrate for a biomimetic three-dimensional hydroxyapatite scaffold [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2014, 2(42): 7360-7368
-
- (上接第 2011 页)
- [14] Mekahli D, Parys JB, Bultynck G, et al. Polycystins and cellular Ca^{2+} signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(15): 2697-2712
- [15] Pinto CS, Raman A, Reif GA, et al. Phosphodiesterase Isoform Regulation of Cell Proliferation and Fluid Secretion in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(4): 1124-1134
- [16] Rehman G, Shehzad A, Khan AL, et al. Role of AMP-activated protein kinase in cancer therapy[J]. Arch Pharm (Weinheim), 2014, 347 (7): 457-468
- [17] Pema M, Drusian L, Chiaravalli M, et al. mTORC1-mediated inhibition of polycystin-1 expression drives renal cyst formation in tuberous sclerosis complex[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10786
- [18] de Stephanis L, Bonon A, Varani K, et al. Double inhibition of cAMP and mTOR signalling may potentiate the reduction of cell growth in ADPKD cells[J]. Clin Exp Nephrol, 2016
- [19] Distefano G, Boca M, Rowe I, et al. Polycystin-1 regulates extracellular signal-regulated kinase-dependent phosphorylation of tuberin to control cell size through mTOR and its downstream effectors S6K and 4EBP1[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(9): 2359-2371
- [20] Baba M, Furihata M, Hong SB, et al. Kidney-targeted Birt-Hogg-Dube gene inactivation in a mouse model: Erk1/2 and Akt-mTOR activation, cell hyperproliferation, and polycystic kidneys [J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(2): 140-154
- [21] Huang JL, Woolf AS, Long DA. Angiogenesis and autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. Pediatr Nephrol, 2013, 28 (9): 1749-1755
- [22] Couillard M, Guillaume R, Tanji N, et al. c-myc-induced apoptosis in polycystic kidney disease is independent of FasL/Fas interaction[J]. Cancer Res, 2002, 62(8): 2210-2214