

Fibroblastik Proliferasyonda, Hepatosit Growth Faktör (HGF) ve Somatostatin (SMS) İlişkisi[¶]

THE EFFECT OF SOMATOSTATIN WITH HEPATOCYTE GROWTH FACTOR ON FIBROBLAST PROLIFERATION

Abdulhalim BAKİ*, E OVALI**, M SARI*, N OKÇU*, S KAPICIOĞLU*

* Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD, Gastroenteroloji BD,

** Dr., Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD, TRABZON

Özet

Fibrozis aracı miyofibroblast proliferasyonunda hepatosit growth faktör (HGF) ve somatostatinin (SMS) rolü in vitro kültür ortamında araştırıldı. Steril sünnet derisinden sağlanan fibroblastlar ile 7 grup oluşturuldu. Grup 1: Kontrol, grup 2: HGF 10ng/ml, grup 3: HGF 20ng/ml, grup 4: SMS 12.5µg/ml, grup 5: SMS 25µg/ml, grup 6: SMS 12,5µg/ml + HGF 10ng/ml, grup 7: SMS 25µg/ml + HGF 20ng/ml. Gruplar 72 saat 37°C'de inkübe edildi. Hücre popülasyonlarının sayısı, flow-sitometri ile değerlendirilerek fibroblast gelişimi üzerine SMS ve HGF'nin etkisi incelendi. Hücre sayısı; Grup1'e (kontrol) göre hücre sayısının grup2,3,6'da arttığı, (p<0.0000002, 0.0000002, 0.003) grup5'te azaldığı (p<0.003) saptandı. Grup 4 ve 7'de değişme saptanmadı. Grup 2'de 3'e göre hücre sayısındaki artış belirgindi (p<0.0000002). Grup 3'e göre grup 7 farklılık göstermedi. Grup 2'ye göre 6'da hücre sayısının azaldığı (p<0.0001) gözlemlendi. Flow-sitometrik analizde; G1 fazındaki hücre konsantrasyonları ve proliferasyon indeksi (PI) kontrol grubundan farksızdı.

Sonuç olarak HGF'nin iki değişik dozda fibroblast proliferasyonunu artırdığı, somatostatinin yüksek dozda fibroblast proliferasyonunu inhibe ettiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Fibroblast proliferasyonu,
Hepatosit growth faktör (HGF),
Somatostatin (SMS)

T Klin Gastroenterohepatol 2001, 12:19-24

Summary

Aim: The effect of somatostatin (SMS) with hepatocyte growth factor (HGF) on the proliferation of myofibroblasts is studied in vitro.

Materials and Methods: Sterile circumcision skin was cultured and seven different study groups were constituted and following medications were administered to the cultured cells: group 1: placebo, group 2: HGF 10 ng/ml, group 3: HGF 20 ng/ml, group 4: SMS 12.5 mg/ml, group 5: SMS 25mg/ml, group 6: SMS 12.5 mg/ml + HGF 10 ng/ml, group 7: SMS 25mg/ml + HGF 20ng/ml. All groups were incubated at 37°C for 72 hours. The number of cell population on culture media and analyses of cell cyclus by flow-cytometry were evaluated.

Results: Cell counts were higher in groups 2, 3, and 6 compared to group 1 (p<0.0000002, 0.0000002, 0.003 respectively) while group 5 had lower counts compared to the group one (p<0.003). No significant difference was shown between in the group 4 and 7. Cell counts were increased in group 2 compared to group 3 (p<0.0000002). Group 6 had decreased number of cell populations compared to the group 2 (p<0.0001). There was no significant difference between groups 1, 3, and group 7. No significant difference was seen between the control group and others for G1 phase cell concentration and proliferative index in the flowcytometric analysis.

Conclusion: Hepatocyte growth factor was increased two different doses and SMS was inhibited high doses on fibroblast proliferation.

Key Words: Fibroblast proliferation,
Hepatosit growth factor, Somatostatin

T Klin J Gastroenterohepatol 2001, 12:19-24

Geliş Tarihi: 12.05.2000

Yazışma Adresi: Dr.Abdulhalim BAKİ
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD
Gastroenteroloji BD, 61080, TRABZON

[¶]Bu çalışma 16. Ulusal Gastroenteroloji Kongresi'nde tebliğ edilmiş ve Prof.Dr.Hasan Telatar Ödülünü almıştır.

T Klin J Gastroenterohepatol 2001, 12

Karaciğer sirozunda temel patoloji ilerleyici karaciğer fibrozisidir (1). Fibrozisin başlangıcında, etyolojik ajan ne olursa olsun karaciğerde normalde az miktarda kollajen sentezi yapan sinüzoid duvarına komşu perisitlerin (ito hücreleri, FSC "lipid depolayan hücreler", yıldız hücreleri) aktivitesi art-

makta ve bu hücrelerin miyofibroblastlara dönüşümü ile, defektif kollajen sentezi başlamaktadır (2).

Miyofibroblastlara dönüşümde fibroblast growth faktör (FGF), transforming growth faktör (TGF)-alfa, beta, epidermal growth faktör (EGF), insulin like growth faktör (IGF-1), platelet derived growth faktör (PDGF) gibi büyüme faktörleri önemli rol oynamaktadır (3,4).

TGF-a ve Hepatosit growth faktörün (HGF) alveolar epitel ve vasküler endotelin onarımında önemli rol oynadıkları ve bu iki büyüme faktörünün pulmoner fibrozisin temelinde önemli olduğu düşünülmektedir (5).

Somatostatin (SMS) analogu octreotid'in fibroblast proliferasyonunu anlamlı derecede inhibe ettiği gösterilmiştir.(6) Fibroblast proliferasyonunda rol alan HGF'nin etkisinin büyüme faktörü inhibitörü olan SMS ile değişip değişmediği henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmada HGF'nin miyofibroblast proliferasyonuna etkisi ve genel büyüme faktör inhibitörü olan SMS'in bu ilişkideki rolü in vitro kültür ortamında araştırılmak istenmiştir.

Materyel ve Metod

Steril sünet derisinden elde edilen ve derin dondurucuda - 80C° %10 DMSO4 + %20 FCS (Fetal kalf Serum) içeren IMDM içinde saklanan fibroblastlar çalışma günü hızla eritildiler. Elde edilen hücrelerin canlılık oranının en az %96 olduğu Etimidium bromide, Acridin Orange boyası ile hazırlanmış preparatların immün floresans mikroskopik değerlendirilmesi ile gösterildi ve sayıları standartize edildi. 3x10²/µl fibroblast IMDM +%10 FCC (Fetal kalf serum) + %1 Antibiyotik (100Ü/ml Penisilin +100 mikrogram/ml Streptomisin) içine alındıktan sonra tarif edilen grup özelliklerine göre aşağıdaki dozlarda ilaç ilave edildi. Kontrol (grup1): Fibroblast + Media, HGF10 (grup 2): Fibroblast + Media + HGF 10ng/ml, HGF20 (grup 3): Fibroblast + Media + HGF 20 ng/ml, SMS12.5 (grup 4): Fibroblast + Media + SMS 12,5 µg/ml, SMS25 (grup 5): Fibroblast + Media + SMS 25 µg/ml, SMS12.5 + HGF10 (grup 6): Fibroblast + Media + SMS 12,5

µg/ml + HGF 10 ng/ml, SMS25 + HGF20 (grup 7): Fibroblast + Media + SMS 25 µg/ml + HGF 20 ng/ml, Deney için kullanılan ilaçlar; Somatostatin (Somatostatin 3 mg - Ucb-Pharma), HGF (Sigma kat no: H1404) kültür ortamlarına ilave edildi. Örneklerden her grup için 7 plağa ekim yapıldı. (her bir gruptan 300 mikrolitrelik 7'şer örnek hazırlandı.) ve hücreler %5 CO₂ basıncı altında 37C°'de inkübasyona alındılar ve 72 saatlik takip sonunda hücre sayımı ve flow-sitometrik analiz yapıldı.

Hücre sayımı: Hücre sayımını değerlendirmek için acridine orange'ın hücre boyayıcı özelliğinden faydalanıldı. Bu amaçla acridine orange'ın optimal ışık absorbe ettiği dalga boyu aşağıdaki yöntemle tespit edildi. %0.2'lik acridine orange solusyonu 12 farklı dalga boyunda 390 ve 670 nm lik bir aralıkla (nonfloresan aralık) tekrarlanan ölçümler yapılarak en yüksek ışık absorban-sının 450-510 nm arasında olduğu saptandı. 493 nm' lik dalga boyu bu çalışmada optimal olarak kabul edildi. (7) Yetmişiki saat inkübasyon sonrasında her gruptan 4 örnek (4x7) ve 4 boş kontrol olmak üzere 32 kuyucuk akridine orange ile boyandı. Kuyular 3 kez PBS (Fosfat tampon Solusyonu) ile yıkandıktan sonra 493 nm dalga boyunda okundu. Işık absorbansı boş kontrole göre sıfırlandı (cut off belirlendi) ve çalışma gruplarının hücre sayısı ışık absorbansı cinsinden hücre konsantrasyonu olarak ifade edildi.

Flow-sitometrik analiz: Hücrelerin G₀/G₁, G₂/M ve sentez safhasındaki yüzdeleri saptandı. Flow-sitometri ile çalışma için inkübasyon sonrası elde edilen hücreler, PBS ile yıkandı ve hücre sayıları en az 3x10³/ml olacak şekilde ayarlandı. Hücreler daha sonra "DNA-prep work station" da işleme tabi tutuldu. Bu işlem sırasında otomatize olarak 1. solüsyon olan LPR solüsyonu ile hücre membran permeabilitesi artırılarak, 2. solüsyon olan DNA-prep stain ilave edildi. Bu solüsyonda kırmızı floresan içeren promidium iodide (Pİ) ve ribonükleaz bulunmakta olup, LPR solüsyon ile membranında porlar açılmış hücrelerin DNA ve RNA sının Pİ'le boyanması sağlandı. Ribonükleaz vasıtasıyla boyanmış olan RNA'ların ortadan kaldırılması sağladı. Böylece DNA içeriğinin Pİ'le işaretlenmesi amaçlandı. 15 dakikalık Pİ ile inkübasyondan sonra flow-sitometride X ekseninde

PmT-4 peak ve Y ekseninde PmT-4 integral kullanılarak çalışmaya alınacak hücre grupları kapı ile belirlendi. Böylece doubled (çift) hücreler elimine edildikten sonra PmT-4 integral X ekseninde, hücre sayısı Y ekseninde yer alacak şekilde grafiklendirildi. Çıkan sonuçların değerlendirilmesi multi-cycle DNA analiz programıyla yapıldı (8).

Hücrelerin G0/G1,G2/M ve sentez safalarında ki yüzdeleri saptandıktan sonra aşağıdaki formül ile proliferatif indeks hesaplandı.

Proliferatif İndeks (PI): $S+G2/M$

İstatistiksel yöntem olarak student t uygulandı. İstatistiksel anlamlılık için $p<0.01$ kabul edildi.

Tablo 1. Grupların hücre sayıları($X\pm SD$)/Işık absorpsiyonu-dalga boyu

Gruplar	Hücre Sayısı
Grup 1 (Kontrol)	213±0.009
Grup 2 (HGF ₁₀)	291±0.03*,t
Grup 3 (HGF ₂₀)	242±0.028**
Grup 4 (SMS _{12.5})	231±0.3
Grup 5 (SMS ₂₅)	189±0.01***
Grup 6 (SMS _{12.5} +HGF ₁₀)	263±0.6****,tt
Grup 7 (SMS ₂₅ +HGF ₂₀)	244±0.6

* $p<0.00000002$, ** 0.0000002 , *** 0.003 , **** 0.003 ; kontrolden fark

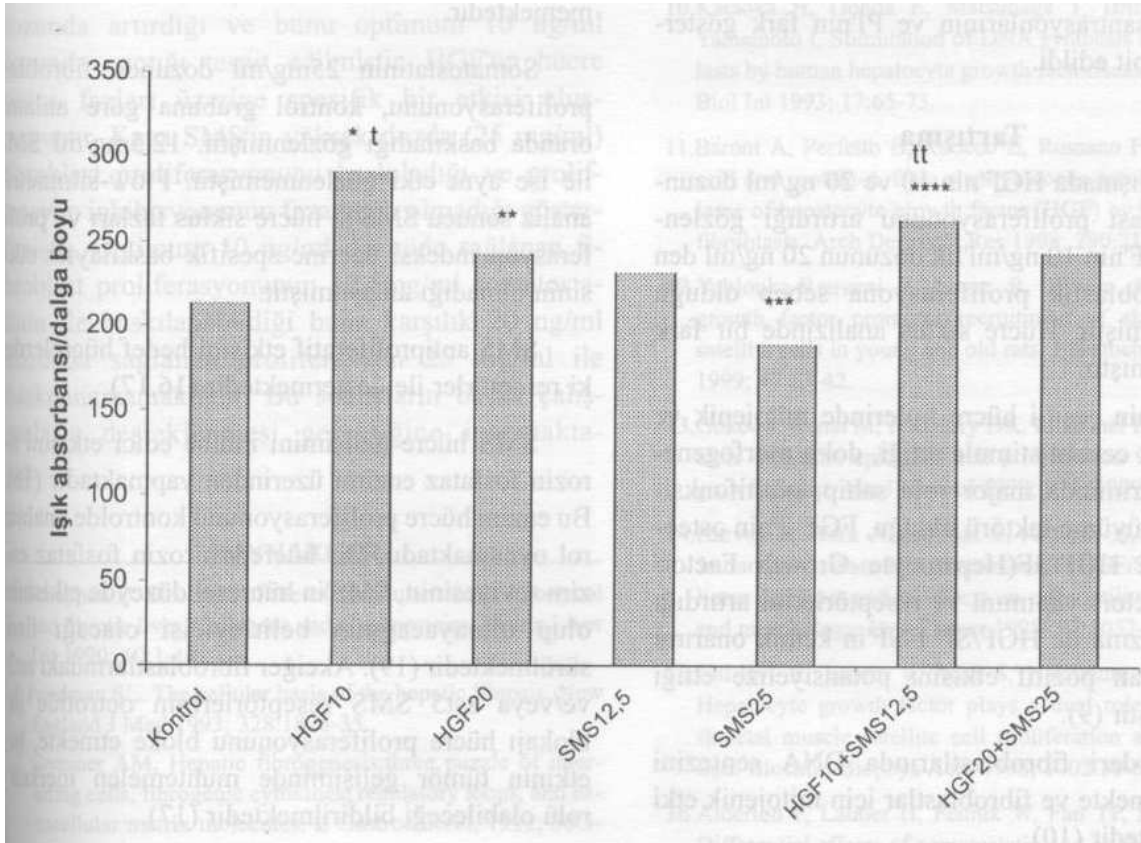
t $p<0.0000002$; grup 3'ten fark

tt $p<0.0001$; grup 2'den fark

Bulgular

Grupların hücre sayısı: İnkübasyonun 3. gününde saptanan optik dansite değerleri Tablo 1 ve Şekil 1'de özetlenmiştir. Grup1'e (kontrol) göre hücre sayısının grup2, 3, 6'de arttığı

($p<0.00000002$, 0.0000002 , 0.003), 5'de azaldığı, ($p<0.003$) saptandı. Grup 4 ve 7'de değişme saptanmadı. Grup 2'de hücre sayısı artışı 3'e göre belir-



Şekil 1. Grupların hücre sayıları ($X\pm SD$) / Işık absorpsiyonu-dalga boyu

* $p<0.00000002$, ** 0.0000002 , *** 0.003 , **** 0.003 ; kontrolden fark
t $p<0.0000002$; HGF 20'den fark
tt $p<0.0001$; HGF10'dan fark

Tablo 2. Grupların G1 fazındaki hücre konsantrasyonları ve proliferasyon indeksi (Pİ) değerleri (X±SD)/% konsantrasyon

Gruplar	G1 Fazı	PI
Grup 1 (Kontrol)	38±11.3	63±12.1
Grup 2 (HGF ₁₀)	47±0.72	53±0.72
Grup 3 (HGF ₂₀)	39.8±0.13	60±0.10
Grup 4 (SMS _{12.5})	41.8±0.63	58.2±0.65
Grup 5 (SMS ₂₅)	48 ±17.3	51±0.11
Grup 6 (SMS _{12.5} +HGF ₁₀)	40.5±0.28	60.8±0.28
Grup 7 (SMS ₂₅ +HGF ₂₀)	38.7±0.08	61.2±0.08

gindi (p<0.0000002). Grup 3'e göre 7 farklılık göstermedi. Grup 2'ye göre 6'da hücre sayısının azaldığı gözlemlendi (p<0.0001).

Flow-sitometrik analiz; Grupların G1/G0(dinlenme) fazı / Proliferasyon indeksi (Pİ) yüzde konsantrasyonları Tablo2'de özetlenmiştir. Grup1'e (kontrol) göre diğer gruplarda G0/G1 fazındaki hücre konsantrasyonlarının ve Pİ'nin fark göstermediği tespit edildi.

Tartışma

Bu çalışmada HGF'nin 10 ve 20 ng/ml dozunda fibroblast proliferasyonunu artırdığı gözlenmiştir. HGF'nin 10 ng/ml'lik dozunun 20 ng/ml den fazla fibroblastik proliferasyona sebep olduğu tespit edilmiştir. Hücre siklus analizinde bir fark bulunamamıştır.

HGF'nin çeşitli hücre tiplerinde mitojenik ve morfojenik cevabı stimule ettiği, doku morfogenesis ve onarımında major role sahip, multifonksiyonel bir büyüme faktörü olduğu, FGF-2'nin osteoblastlardan HGF/SF(Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor) yapımını ve reseptörlerini artırdığı bu mekanizma ile HGF/SF FGF'in kemik onarımı üzerine olan pozitif etkisini potansiyelize ettiği gösterilmiştir (9).

HGF deri fibroblastlarında DNA sentezini stimule etmekte ve fibroblastlar için mitojenik etki göstermektedir (10).

HGF ve FGF2'nin sıçanlarda karaciğer yıldız (satellit) hücrelerinin proliferasyonunda da etkisi olduğu bildirilmiştir.(11) Fibroblastlar intestinal epitelial hücre gelişimini dominant olarak HGF'nin

rol aldığı parakrin mekanizma ile stimule ederler. Bu etkileşimde HGF'nin rolü, intestinal epitel hücreleri ve fibroblastlarda c-met transkrip yapımını uyarması şeklindedir (13) HGF/SF'nin malign mezotelyomanın gelişim ve yayılımında parakrin ve otokrin mekanizma ile önemli rol oynadığı saptanmıştır (14). HGF kas yıldız hücreleri ve myogenik C2 hücre dizilerinde proliferasyon ve farklılaşmasında rol oynar, DNA sentezini artırır. Ayrıca bu büyüme faktörü aynı hücrelerde büyüme ve rejenerasyon üzerine inhibitör etkide gösterir. Bu bulgular HGF'in yıldız hücre miyogenezisi üzerine çift taraflı etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (15).

Literatürdeki bulgular HGF'nin nonspesifik olarak (benign veya malign) etki ettiği tüm hücrelerde mitozu uyarıcı etki yaptığını göstermektedir. Çalışmamızda HGF ile fibroblast proliferasyonunun arttığı tespit edilmiştir. HGF'nin etkisi artan dozlarda azalmıştır. HGF'nin doz cevap eğrisi bilinmemektedir.

Somatostatinin 25mg/ml dozunda fibroblast proliferasyonunu, kontrol grubuna göre anlamlı oranda baskıladığı gözlenmiştir. 12.5mg/ml SMS ile ise aynı etki gözlenmemiştir. Flow-sitometrik analiz sonucu SMS'in hücre siklus fazları ve proliferasyon indeksi üzerine spesifik baskılayıcı etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.

SMS antiproliferatif etkisini hedef hücrelerdeki reseptörler ile göstermektedir (16,17).

SMS hücre gelişimini inhibe edici etkisini tirozin fosfataz enzimi üzerinden yapmaktadır (18). Bu enzim hücre proliferasyonunu kontrolde anahtar rol oynamaktadır. Bir hücrede tirozin fosfataz enzim seviyesinin, SMS'in hücre düzeyde etkisinin olup olmayacağı belirleyicisi olacağı ileri sürülmektedir (19). Akciğer fibroblastlarındaki sst2 ve/veya sst5 SMS reseptörlerinin octrotide ile blokajı hücre proliferasyonunu bloke etmekte, bu etkinin tümör gelişiminde muhtemelen merkezi rolü olabileceği bildirilmektedir (17).

Çalışmamızda yüksek doz HGF ile elde edilen hücre sayısı artışının 25mg/ml SMS ile baskılanamamasına karşın 10 ng/ml ile sağlanan hücre sayısı artışının 12.5 mg/ml SMS ile baskılandığı ve hücre

sayısının anlamlı oranda azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgular SMS'in tek başına fibroblast proliferasyonunun inhibisyonu üzerine olan etkisinin doza bağlı olarak arttığını, büyüme faktörünün etkisini düşük dozda antagonize ettiğini düşündürmektedir.

Literatürde SMS'in HGF varlığında fibroblast proliferasyonu üzerine olan etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. HGF ve SMS'in hücre proliferasyonu üzerine olan etkilerinin farklı reseptörler vasıtasıyla olduğu bilinmektedir (16,20,21). SMS'in HGF'nin oluşturduğu proliferatif etkiyi düşük dozda bloke etmesi, hücre proliferasyonu regülasyonunda anahtar rol oynayan tirozin fosfataz enziminin muhtemelen doz bağımsız olarak bu iki ajan tarafından da kullanılıyor olmasına bağlanabilirmiş sorusunu akla getirmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada invitro kültürde HGF'nin fibroblast proliferasyonunu 10-20 ng/ml dozunda artırdığı ve bunu optimum 10 ng/ml dozunda yaptığı tespit edilmiştir. HGF'ün hücre siklus fazları üzerine spesifik bir etkisi oluşmamıştır. Keza SMS'in yüksek dozda (25 mg/ml) fibroblast proliferasyonunu baskıladığı ve proliferasyon inhibisyonunun faza bağlı olmadığı gösterilmiştir. Optimum 10 ng/ml dozunda sağlanan fibroblast proliferasyonunun 12.5mg/ml somatostatinin ile baskılanabildiği buna karşılık 20 ng/ml dozunda sağlanan proliferasyon 25 mg/ml ile baskılanamamaktadır. Bu sonuçların başka çalışmalarla desteklenmesi gerektiğine inanmaktayız.

KAYNAKLAR

- Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver. *Collegens and glycoproteins. Semin Liver Dis* 1990; 10:1-10.
- Friedman SL. The cellular basis of the hepatic fibrosis. *New England J Med* 1993; 328:1828-35.
- Gressner AM. Hepatic fibrogenesis: three puzzle of interacting cells, fibrogenic cytokines, regulatory loops, and extracellular matrix molecules. *Z Gastroenterol*, 1992; 30:5-16.
- Morgan CJ, Platger JW. Fibroblast proliferation. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ. *Wound healing: Biochemical and Clinical Aspects. Philadelphia: WB Saunders Co.* 1992: 76-83.
- Matsuse T. Growth factors in the process of inflammation and fibrosis in the lung. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 1998; 36:413-20.
- Hofland LJ, van der Burg B, van Eijck CH, sprij DM, van Koetsveld PM, Lamberts SW. Role of tumor-derived fibroblasts in the growth of primary cultures of human breast-cancer cells: effects of epidermal growth factor and the somatostatin analogue octreotide. *Int J Cancer* 1995; 60:93-9.
- Ekşioğlu-Demiralp E, Alpdoğan Ö, Aktan M, Fıratlı T, Öztürk A, Budak T, Bayık M, Akoğlu T. Variable expression of CD49d antigen in B cell chronic lymphocytic leukemia is related to disease stages. *Leukemia* 1996; 10:1331-39.
- Riley RS, Mahin EJ, Ross W. DNA ploidy and cell cycle analysis, in *Clinical Applications of Flow Cytometry*, Eds Riley RS, Mahin RJ, Ross W. Igaku-Shoin New York-Tokyo, 1993: 251-322.
- Blanquaert F, Delany AM, Canalis E. Fibroblast growth factor-2 induces hepatocyte growth factor/scatter factor expression in osteoblasts. *Endocrinology* 1999; 140:1069-74.
- Kataoka H, Gohda E, Matsunaga T, Ishii T, Hara H, Yamamoto I. Stimulation of DNA synthesis in skin fibroblasts by human hepatocyte growth factor/scatter factor. *Cell Biol Int* 1993; 17:65-73.
- Baroni A, Perfetto B, Ruocco E, Rossano F. Lipoteichoic acid and protein-A from staphylococcus aerus stimulate release of hepatocyte growth factor (HGF) by human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 1998; 290:211-4.
- Yablonka-Reuveni Z, Seger R, Rivera AJ. Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. *J Histochem Cytochem* 1999; 47:23-42.
- Goke M, Kanai M, Podolsky DK. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol* 1998; 274:G809-18.
- Harvey P, Warn A, Dobbin S, Arakaki N, Daikuhara Y, Jaurand MC, Warn RM. Expression of HGF/SF in mesothelioma cell lines and its effects on cell motility, proliferation and morphology. *Br J Cancer* 1998; 77:1052-59.
- Gal-levi R, Lasem y, Aoki S, Nakamura T, Halevy O. Hepatocyte growth factor plays a dual role in regulating skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1402:39-51.
- Alderton F, Lauder H, Feniuk W, Fan TP, Humphrey PP. Differential effects of somatostatin and angiopeptin on cell proliferation. *Br J Pharmacol* 1998; 124:323-30.
- Siehler S, Seuwen K, Hoyer D. (125I)(Tyr3) Octreotide labels human somatostatin sst2 and sst5 receptors. *Eur J Pharmacol* 1998; 348:311-20.
- Lopez F, Esteve JP, Buscail L, Delesque N, Saint-Laurent N, Vaysse N, Susini C. Molecular mechanisms of antipro-

- liferative effect of somatostatin: involvement of a tyrosine phosphatase. *Metabolism* 1996; 45:14-6.
19. Douziech N, Calvo E, Coulombo Z, Muradia G, Bastien J, Aubin RA, Lajas A, Morisset J. Inhibitory and stimulatory effects of somatostatin on two human pancreatic cancer cell lines: a primary role for tyrosine phosphatase SHP-1. *Endocrinology* 1999; 140:765-77.
20. Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudina G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* 1991; 6:501-4.
21. Arakaki N, Hirono S, Ishii T, Kimoto M, Kawakami S, Nakayama H, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y. Identification and partial characterization of two classes of receptors for human hepatocyte growth factor on adult rat hepatocytes in primary culture. *J Biol Chem* 1992; 267: 7101-07.