文章编号:1000-5404(2005)20-2005-04

论著

重组真核表达载体 pEGFP-N1/PDGF-A 的构建及真皮干细胞的转染

闫国和[1],粟永萍[1],王军平[1],汪代杰[2],艾国平[1],王锋超[1],冉新泽[1],程天民[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室、全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]四川省泸州市人民医院肿瘤科,泸州 646000)

提 要: 目的 克隆血小板衍生生长因子A链(platelet-derived growth factor A chain,PDGF-A)基因,以增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)载体pEGFP-N1为骨架,携带PDGF-A基因进入真皮间充质干细胞(dermis-drived mesenchymal stem cells, DMSCs),为采用转入PDGF-A基因的DMSCs修复创面奠定基础。**方法** 采用RT-PCR二步分离法,以人肝癌细胞系(SMC-7721)的总RNA为模板,扩增PDGF-A基因的全长cDNA编码序列,克隆入载体pMD18-T,随后又将PDGF-A基因亚克隆入pEGFP-N1载体中,构建PDGF-A基因的真核表达载体pEGFP-N1/PDGF-A,并采用Fugene 6介导转染技术将PDGF-A基因导入DMSCs。**结果** 克隆到PDGF-A基因的全长cDNA序列,经测序验证,其序列与GenBank所报告的该基因的序列完全一致。**结论** 成功地将PDGF-A基因克隆到pEGFP-N1载体中,并实现了PDGF-A基因在DMSCs的表达。

关键词: 克隆;真核表达载体;血小板衍生生长因子A链基因;绿色荧光蛋白;真皮间充质干细胞
中图法分类号: Q782;R322.991;R394.2 **文献标识码**: A

Construction of eukaryotic expressing vector pEGFP-N1/PDGF-A for transducting Dermis-derived mesenchymal stem cells

YAN Guo-he[1], SU Yong-ping[1], WANG Jun-ping[1], WANG Dai-jie[2], AI Guo-ping[1], WANG Feng-chao[1], RAN Xin-ze[1], CHENG Tian-min[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Oncology, Luzhou People's Hospital, Luzhou 646000, China)

Abstract: **Objective** To clone platelet-derived growth factor A chain (PDGF-A) gene and insert PDGF-A gene into. Enhanced green fluorescent protein (EGFP) vector and then transformed into dermis-drived mesenchymal stem cells (DMSCs). **Methods** cDNA clones encoding human PDGF-A gene were isolated from a human hepatoma cell line mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The PCR amplified fragment of PDGF-A gene was cloned into pMD18-T vector. The eukaryotic expression vector pEGFP-N1/PDGF-A was constructed by subcolone PDGF-A gene into pEGFP-N1 vector. PDGF-A gene was transfected into DMSCs with the help of Fugene 6 transfection reagent. **Results** Full cDNA sequence encoding human PDGF-A gene had been cloned, which sequence was consistent with the reported sequence in GenBank by sequence assaying. **Conclusion** cDNA sequence encoding human PDGF-A gene was successfully cloned into pEGFP-N1. The transient expression of PDGF-A gene in DMSCs has been realized.

Key words: cloning; eukaryotic expression vector; platelet-derived growth factor A chain gene; enhanced green fluorescent protein; dermis-drived mesenchymal stem cells

PDGFs在胚胎发育、细胞分化和对组织损伤的反应等过程中具有许多极为重要的作用。特别是对一些慢性难愈性伤口,如糖尿病溃疡、慢性静脉性溃疡、褥疮、放射性溃疡等均有明显促进愈合作用,因此,PDGFs被称为损伤修复因子,它也参与了癌症、动脉粥样硬化、软组织纤维化等疾病的发生[1~5]。

我们以人肝癌细胞系(SMC-7721)的总RNA为模板克隆PDGF-A链基因,构建其原核质粒与真核表达载

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目2005CB522605),国家自然科学基金资助项目(30200142)
National Key Basic Research and Development Plan of of China ("973" Projects, 2005CB522605) and Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200142)

作者简介:闫国和(1968-),男,四川省古蔺县人,博士研究生,实验师,主要从事组织工程及创面愈合方面的研究。电话:(023)68753664
通讯作者:粟永萍,电话:(023)68752009

收稿日期:2005-03-03;**修回日期**:2005-09-12

体,并以 pEGFP-N1(4.7 kb)为骨架,携带 PDGF-A 基因进入真皮间充质干细胞,为进一步研究采用转入 PDGF-A 基因的真皮间充质干细胞修复创面奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用的增强型绿色荧光蛋白(EGFP)质粒 pEGFP-N1/PDX1 由我所屈纪富博士后惠赠。RT-PCR 二步法试剂盒,克隆载体 pMD18-T,限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶、*Taq* 聚合酶等购自 TaKara 公司;PCR 引物合成且购于上海生工。基因组 DNA 抽提试剂购自 Promega 公司,转染试剂 Fugene 6 购自德国 Roche 公司。本所王军平博士提供的 DH10B 菌株用于扩增质粒。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pMD18-T/PDGF-A 的构建和鉴定 自行设计引物,序列如下:上游引物:5′-GATGAGGACCTTGGCTTGC-CTG-3′;下游引物:5′-TCACCTCACATCTGGTTGGCTG-3′。采用 RT-PCR 二步分离法[6],以人肝癌细胞系(SMC-7721)的总 RNA 为模板,以 63 ℃为最佳退火温度扩增 PDGF-A 基因的全长 cDNA 编码序列,克隆入载体 pMD18-T 中,采用菌液 PCR 和限制性内切酶对重组子进行初步鉴定,将可疑阳性重组子的质粒送 TaKaRa 公司测序。所构建的重组质粒被命名为 pMD18-T/PDGF-A。

1.2.2 重组真核表达载体的构建和鉴定 自行设计引物,序列如下:上游引物:5′-TCGAAÇTTGAATTCATGAGGACCTTG-GCTTGCCTG-3′;下游引物:5′-TACGGATCCCTCGAGGGTGGG-TTTTAACCTTTTTCTT-3′。以 pMD18-T/PDGF-A 为模板,以 63 ℃为最佳退火温度进行 PCR。用限制性内切酶切割以 pMD18-TPDGF-A 质粒为模板的 PCR 产物和 pEGFP-N1/PDX1,回收含 PDGF-A cDNA 片段和含 pEGFP-N1 载体片段,纯化后连接,采用菌液 PCR 和限制性内切酶对重组子进行初步鉴定,可疑阳性重组子质粒被送 TaKara 公司测序。所构建的重组真核表达载体被命名为 pEGFP-N1/PDGF-A。

1.2.3 基因转染用细胞的准备 采用我所分离、鉴定,并长期传代培养的大鼠真皮间充质干细胞[7]作基因转染的靶细胞。

1.2.4 重组质粒 pEGFP-N1/PDGF-A 导入真皮间充质干细胞及其检测 用 Fugene 6 介导转染法以纯化的质粒 pEGFPN1/PDGF-A 转染真皮间充质干细胞,具体方法按 Fugene 6 转染试剂说明书进行。

1.2.4.1 GFP 的表达检测 用倒置荧光显微镜检测转染 48 h后真皮间充质干细胞 GFP 的表达,荧光数码相机拍照。

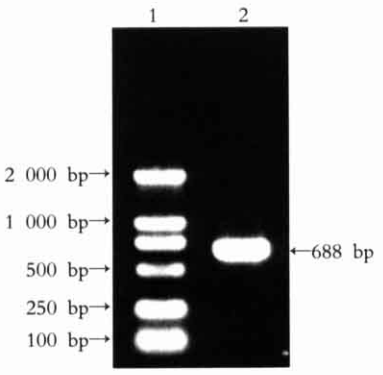
1.2.4.2 检测转染效率 真皮间充质干细胞经质粒 pEGFPN1/PDGF-A 转染后,立即用核荧光标记物 DAPI 标记其细胞核[8],48 h后,倒置荧光显微镜下,拍摄同一视野表达 GFP 的真皮间充质干细胞与经 DAPI 标记其核的真皮间充质干细胞的图像,用 Image-Pro Plus 图像分析系统(Media Cybernetics Inc. USA)分别计算表达 GFP 与经 DAPI 标记核的真皮间充质干细胞的数量,并计算其转染效率:转染效率 = 表达 GFP 的真皮间充质干细胞计数/经 DAPI 标记核的真皮间充质干细胞计数 × 100%。

1.2.4.3 经转染的真皮间充质干细胞的活性检测及其转入的 PDGF-A 基因编码蛋白检测 经 PDGF-A 基因转染的真皮间充质干细胞,在 37 ℃、5% CO_2 和饱和湿度条件下,用含 10% 胎牛血清与 100 μg/ml 的 G418 的 IMDM 培养至第 3 代,提取此代真皮间充质干细胞的总 RNA,并以之为模板,采用 RT-PCR 二步分离法扩增 PDGF-A 基因的全长 cDNA 编码序列。

2 结果

2.1 PDGF-A 全长 cDNA 的扩增

用 RT-PCR 扩增的 PDGF-A 全长 cDNA 为 688 bp(图 1)。



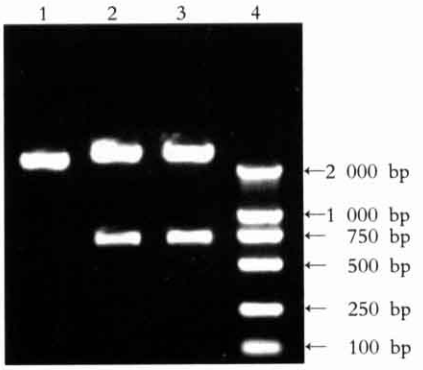
1: Marker; 2: PDGF-A full-length cDNA

图 1 PDGF-A cDNA RT-PCR 产物电泳分析

Fig 1 The electrophoregram of RT-PCR product of PDGF-A cDNA

2.2 重组质粒 pMD18-T/PDGF-A 的酶切鉴定

重组质粒 pMD18-T/PDGF-A DNA 经 *Bam*H Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 酶切,用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳进行分析,电泳显示 2 652 bp 和 688 bp 片段(图 2),以及 TaKara 公司测序结果表明,所克隆序列与 GenBank 所报告的 PDGF-A 基因序列完全一致。



1: pMD18-T/PDGF-A; 2 - 3: pMD18-T/PDGF-A digested by *Bam*H Ⅰ + *Hind* Ⅲ; 4: Marker

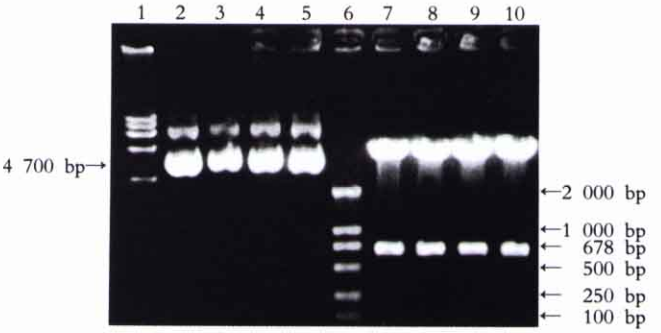
图 2 pMD18-T/PDGF-A 的酶切鉴定

Fig 2 The restriction analysis of pMD18-T/PDGF-A

2.3 重组真核表达质粒的限制性内切酶片段分析

重组真核表达质粒 pEGFP-N1/PDGF-A DNA 经 *Bam*H Ⅰ 和

*Hind*Ⅲ酶切，0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测分析，切下 4 700 bp 和 678 bp 片段（图 3）。TaKara 公司测序结果表明，以 pEGFP-N1 为骨架携带 PDGF-A 基因的真核表达载体得以成功构建。



1：DL15000 marker；2 - 5：pEGFP-N1/PDGF-A；6：DL2000 marker；7 - 10：pEGFP-N1/PDGF-A digested by *Bam*H Ⅰ + *Hind*Ⅲ

图 3　重组真核表达质粒 pEGFP-N1/PDGF-A 的酶切鉴定

Fig 3　The restriction analysis of recombinant eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1/PDGF-A

2.4　重组质粒 pEGFP-N1/PDGF-A 导入真皮间充质干细胞及其检测

2.4.1　GFP 的表达检测　　用 Fugene 6 介导转染法以纯化的质粒 pEGFP-N1/PDGF-A 转染真皮间充质干细胞（图 4），在 37 ℃、5% CO_2 和饱和湿度条件下培养 24 ~ 48 h 后，用荧光显微镜检测到 GFP 的有效表达（图 5）。



图 4　倒置显微镜下，真皮间充质干细胞生长良好（标尺 = 202 μm）

Fig 4　Dermis-derived mesenchymal stem cells growing fine under invert microscope（Bar = 202 μm）

2.4.2　检测细胞的转染效率　　用 Image-Pro Plus 图像分析系统分别计算表达 GFP 与经 DAPI 标记核的真皮间充质干细胞的数量，并计算出其转染效率约为 50%。

2.4.3　经转染的真皮间充质干细胞的活性检测及其转入的 PDGF-A 基因编码蛋白情况检测　　经 PDGF-A 基因转染的真皮间充质干细胞，在 100 μg/ml 的 G418 筛选压力下，每 3 天传 1 代，传至第 3 代，仍生长良好，提取此代细胞的总 RNA，并以之为模板，可扩增出 PDGF-A 基因的全长 cDNA 编码序列，提示转入真皮间充质干细胞的 PDGF-A 基因已具备编码其相关蛋白的能力。

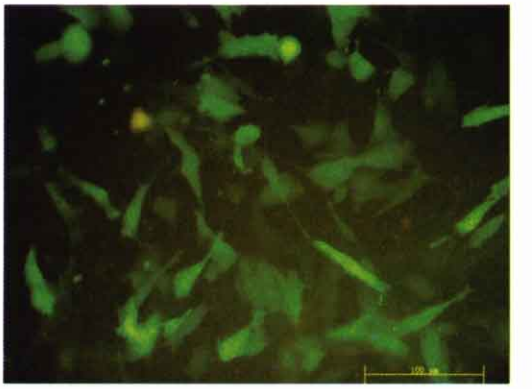


图 5　倒置荧光显微镜检测，已转入 PDGF-A 链基因的真皮间充质干细胞表达绿色荧光蛋白（标尺 = 100 μm）

Fig 5　Dermis-derived mesenchymal stem cells transfected with PDGF-A gene express green fluorescence protein under invert microscope（Bar = 100 μm）

3　讨论

PDGF-A 链基因的转录子已被发现存在于正常人的内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、胎盘及某些肿瘤细胞系[9,10]。尤其在胶质母细胞瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤和肝癌细胞系存在特别高的水平。

许多组织和细胞都表达 PDGFs[1]，如肌肉、神经、脉管系统和上皮类细胞。除胚胎发育过程外，PDGF 的组成型表达在这些细胞内是罕见的。在大多数情况下，如创伤治愈、炎症以及暴露于可溶性致有丝分裂因子（生长因子、细胞因子、其它致有丝分裂因子）可见 PDGF 的组成型表达。

PDGFs 在体内通过激活巨噬细胞合成 bFGF 和 TGF-B，再作用于内皮细胞来诱导血管增生。PDGF 可促使巨噬细胞和成纤维细胞的趋化性，诱导巨噬细胞活化和成纤维细胞迁移，能强力地诱导成纤维细胞的再生，增加肉芽组织内成纤维细胞的量，促使细胞外基质的合成，从而加速伤口的愈合[1]。

选择能携带目的基因靶向性高效表达，且易于操作的载体是基因治疗成功的关键因素之一。pEGFP-N1 真核表达载体所含有的巨细胞病毒（cytomegalovirus，CMV）启动子可使插入其多克隆位点内的外源基因早期立即转录，该载体 3′端连接有报告基因即增强绿色荧光蛋白（enhanced green fluorescent protein，EG-

FP)基因。插入的外源基因与 EGFP 具有相同的读码框,无读码框内终止信号,编入的基因应包括启动的 ATG 序列,最终产物为目的基因所表达蛋白与荧光蛋白的融合体。EGFP 在 488 nm 激发波处形成鲜明的绿色荧光,标示出基因的表达情况。在组织和细胞中,EGFP 能耐受各种处理而保持其发光特性[11,12]。

随着分子生物学及基因工程技术的迅猛发展,基因治疗已经成为治疗人类疾病的重要方法之一,同时也是维护人类健康最有发展前景的手段之一。但其应用的一个关键环节是寻找满足要求和易于操作的靶细胞。我所以往的研究已证实大鼠的真皮组织间充质干细胞[7],经地塞米松诱导后可向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞分化植入受损的皮肤和肌组织后可参与受损组织的修复。这类细胞,由于真皮组织易于获取,将为间充质干细胞的研究与应用提供一个新的来源途径。因此,该实验选用真皮间充质干细胞作为基因转染的靶细胞。

因此,我们以人肝癌细胞系(SMC-7721)的总 RNA 为模板,扩增了 PDGF-A 链基因的全长 cDNA 编码序列,克隆入载体 pMD18-T 中,构建了 PDGF-A 链基因的原核质粒 pMD18-T/PDGF-A 与真核表达载体 pEGFP-N1/PDGF-A,该真核表达载体以 pEGFP-N1 为骨架,携带 PDGF-A 链基因成功地转染经长期培养的真皮间充质干细胞,为进一步研究采用转入 PDGF-A 链基因的真皮间充质干细胞修复创面奠定了基础。

参考文献:

[1] Heldin C H, Westermark B. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor[J]. Physiol Rev, 1999, 79(4): 1283 - 1316.

[2] Furuhashi M, Sjoblom T, Abramsson A, *et al*. Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate [J]. Cancer Res, 2004, 64(8): 2725 - 2733.

[3] Yu J, Ustach C, Kim H R. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer[J]. J Biochem Mol Biol, 2003, 36 (1): 49 - 59.

[4] Ostman A, Heldin C H. Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists[J]. Adv Cancer Res, 2001, 80: 1 - 38.

[5] Changsirikulchai S, Hudkins K L, Goodpaster T A, *et al*. Platelet-derived growth factor-D expression in developing and mature human kidneys[J]. Kidney Int, 2002, 62(6): 2043 - 2054.

[6] 奥斯伯, 布伦特, 金斯顿, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 123 - 125.

[7] 史春梦, 程天民. 大鼠真皮间充质干细胞的体外长期培养及胶原海绵对其生长的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 2002, 19(4): 660 - 663.

[8] 闫国和, 粟永萍, 艾国平, 等. 羊膜负载骨髓间充质干细胞与表皮细胞对放创性皮肤损伤促愈合研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2004, 18(6): 497 - 501.

[9] Farhadi M R, Capelle H H, Erber R, *et al*. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor signaling: effects on the angiogenesis, microcirculation, and growth of orthotopic malignant gliomas[J]. J Neurosurg, 2005, 102(2): 363 - 370.

[10] Liu B, Maul R S, Kaetzel D M Jr. Repression of platelet-derived growth factor A-chain gene transcription by an upstream silencer element. Participation by sequence-specific single-stranded DNA-binding proteins[J]. J Biol Chem, 1996, 271(42): 26281 - 26290.

[11] Dalle B, Rubin J E, Alkan O, *et al*. eGFP reporter genes silence LCR β-globin transgene expression *via* CpG dinucleotides[J]. Mol Ther, 2005, 11(4): 591 - 599.

[12] Towner J S, Paragas J, Dover J E, *et al*. Generation of eGFP expressing recombinant Zaire ebolavirus for analysis of early pathogenesis events and high-throughput antiviral drug screening[J]. Virology, 2005, 332(1): 20 - 27.

(编辑 薛国文)

关于医学符号的使用

统计学符号不论用哪种字母,也不论大写或小写一律都用斜体。要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母 $\bar{x}$,卡方的符号是希腊字母 χ^2,自由度的符号是希腊文"ν"、不是拉丁文"V"。样本的相关系数是英文"r",不能误为希腊文"γ"。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号,都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加"-"或"+"表示。例如 Na^+、Ca^{2+}、P^{3-} 等等,不采用 Ca^{++}、P^{---}、Al^{+++}、O^{--} 表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角,例如:^{131}I、^{32}P。表示激发状态的 m 写在右上角,例如:$^{99}Te^m$、$^{113}In^m$。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称,即不能写成"[131]碘、铟^{113m}、P^{32}、Te^{99m}"。

近几年分子生物学发展很快,并已渗透到许多学科,大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式,要对符号的来源及其内涵有深刻的了解,使用时不致发生错误,例如:RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA)3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写,RNA 应大写。

本刊编辑部