论著

文章编号:1000-5404(2008)21-2024-05

# PDGF-A基因逆转录病毒载体的构建及其在猪骨髓间充质干细胞中表达的研究

闫国和[1],杨余亮[2],侯爱莲[3],王锋超[1],许庆娥[4],熊 玮[5],程天民[1],王军平[1],粟永萍[1] (第三军医大学:[1]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,[5]西南医院呼吸内科,重庆 400038;[2]四川省古蔺县人民医院普外科,四川 古蔺 646500;[3]重庆医科大学基础医学院生理学教研室,重庆 400016;[4]解放军71613部队医院,山东 海阳 265100)

**摘 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,以逆转录病毒载体pLXSN为骨架携带PDGF-A基因转染猪骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, bMSCs),为应用PDGF-A基因修饰bMSCs进行创面修复奠定基础。**方法** 采用RT-PCR二步分离法,以人肝癌细胞总RNA为模板,扩增PDGF-A基因的全长cDNA编码序列,构建PDGF-A基因的逆转录病毒载体pLXSN/PDGF-A,并将其导入病毒包装细胞PA317中,经G418筛选并扩增,以病毒液感染NIH3T3细胞,选出抗性克隆,测其病毒滴度,将高滴度病毒液感染bMSCs。采用RT-PCR、Southern blot和ELISA法,分别检测PDGF-A基因转染bMSCs的效率及PDGF-A在bMSCs中的表达水平;光镜、MTT法、成骨与成脂诱导分别检测bMSCs转染PDGF-A基因后的生长状态、增殖情况及干细胞特性。**结果** 经测序验证,克隆到PDGF-A基因的全长cDNA序列与GenBank所报告的该基因序列完全一致。成功构建了PDGF-A链基因的逆转录病毒载体pLXSN/PDGF-A,并实现了PDGF-A基因在bMSCs的稳定表达。bMSCs转染PDGF-A后的生长状态、增殖情况良好,且仍具干细胞特性。**结论** 成功地将PDGF-A基因克隆到pLXSN载体中,并实现了PDGF-A基因在bMSCs中的稳定表达。bMSCs转染PDGF-A后仍具干细胞特性。

**关键词**:逆转录病毒载体;血小板衍生生长因子A链基因;骨髓间充质干细胞;稳定表达

**中图法分类号**:R331.2; R394-33; R394.2 **文献标识码**:A

# Cloning and expression of platelet-derived growth factor A chain in porcine marrow mesenchymal stem cells by retroviral vector transfection

YAN Guo-he[1], YANG Yu-liang[2], HOU Ai-lian[3], WANG Feng-chao[1], XU Qing-er[4], XIONG Wei[5], CHENG Tian-min[1], WANG Jun-ping[1], SU Yong-ping[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, [5]Department of Respiratory Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of General Surgery, People's Hospital of Guling County, Guling 646505, Sichuan; [3]Department of Physiology, Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [4]Hospital of 71613 Troop of PLA, Haiyang 265100, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To clone platelet-derived growth factor A chain (PDGF-A) gene sequence, construct pLXSN-PDGF-A plasmid and express it in porcine bone marrow derived mesenchymal stem cells (bMSCs). **Methods** cDNA fragment encoding human PDGF-A gene were amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) with the total mRNA isolated from human hepatoma cell line SMC-7721 as template. The PCR amplified fragment of PDGF-A gene was first cloned into pMD18-T vector, and then subcloned into the recombinant retroviral vector pLXSN to construct pLXSN/PDGF-A after seqencing. Subsequently, plasmid DNA of pLXSN/PDGF-A was transfected into packaging cell line PA317, and positive cell clones with higher titer were screened. bMSCs were infected with cell-free supernatant of the highest titer clone transfected with pLXSN/PDGF-A. The transfection and expression of PDGF-A in bMSCs were identified by RT-PCR, Southern blot hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Light microscopy, methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, and induced bone and fat formation were employed to examine the growth

**基金项目**:国家重点基础研究发展计划(973计划, 2005CB522605);国家自然科学基金(30200142, 30770929);全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G076)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522605), the National Nature Science Foundation of China (30200142, 30770929) and the Research Projects of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06G076)

**作者简介**:闫国和,男,四川省古蔺县人,博士,高级实验师,主要从事组织工程及创伤愈合方面的研究,发表论文20余篇。E-mail:heguoy2001@yahoo.com.cn
**通信作者**:粟永萍,电话:(023)68752279, E-mail: suyp2003@yahoo.com.cn
王军平,电话:(023)68752283, E-mail:wangjunp@yahoo.com

**收稿日期**:2008-06-10;**修回日期**:2008-08-26

and proliferation of bMSCs transfected with PDGF-A and their multilineage differentiation as stem cells. **Results** Full-length cDNA sequence encoding human PDGF-A gene was successfully cloned, and recombinant retroviral vector of pLXSN/PDGF-A is constructed. Stable expression of PDGF-A in porcine bMSCs was obtained with transfection of retroviral supernatant from pLXSN/PDGF-A clone. bMSCs after PDGF-A transfection were grown and proliferated well, and still possessed the trait of stem cells. **Conclusion** cDNA sequence encoding human PDGF-A gene is successfully cloned into pLXSN vector. Stable expression of PDGF-A gene in bMSCs is implemented by retroviral transfection. bMSCs transfected with PDGF-A still possesses the trait of stem cells.

**Key words**: retroviral vector; platelet-derived growth factor A chain gene; marrow mesenchymal stem cells; stable expression

血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factors,PDGFs)属糖蛋白二聚体家族。迄今为止,已有 4 种 PDGF 多肽亚单位 PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C 和 PDGF-D 被鉴定。这些亚单位经二硫键二聚化形成同型二聚体 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-CC、PDGF-DD 和异二聚体 PDGF-AB[1-3]。PDGFs 在胚胎发育、细胞分化和对组织损伤的反应等过程中拥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”。它还参与了癌症、动脉粥样硬化、软组织纤维化等疾病的发生[4,5]。本研究构建了 PDGF-A 链基因的原核质粒与逆转录病毒表达载体,并以逆转录病毒载体 PLXSN 为骨架,携带 PDGF-A 链基因进入猪骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, bMSCs),为进一步研究采用转入 PDGF-A 链基因的 bMSCs 修复创面奠定基础。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

本实验所用的逆转录病毒载体 PLXSN 由第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室毛琼国老师提供。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 引物合成于上海生工。基因组 DNA 抽提试剂购自 Promega 公司。本所的 DH10B 菌株用于扩增质粒。PA317 细胞由第三军医大学新桥医院口腔科何飞博士提供;转染用试剂 Fugene 6、G418 等为 Roch 公司产品。

### 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,上游:5′-GATGAGGACCTTGGCTTGCCTG-3′;下游:5′-TCACCTCACATCTGGTTGGCTG-3′。采用 RT-PCR 二步分离法,以人肝癌细胞系(SMC-7721)的总 RNA 为模板,以 63 ℃为最适退火温度扩增 PDGF-A 链基因的全长 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　重组逆转录病毒载体 pLXSN/PDGF-A 的构建和鉴定　　自行设计扩增 PDGF-A 基因并含有与 pLXSN 载体相同酶切位点的引物,上游:5′-TCGAAGCTTGAATTCATGAGGACCTTGGCTTGCCTG-3′;下游:5′-TACGGATCCCTCGAGGGTGGGTTTTAACCTTTTTCTT-3′。以 pMD18-T/PDGF-A 为模板,以 63 ℃为最适退火温度进行 PCR。用限制性内切酶切割以 pMD18-T/PDGF-A 质粒为模板的 PCR 产物和逆转录病毒载体 pLXSN,回收含 PDGF-A 的 cDNA 片段和含 pLXSN 载体的骨架片段,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,将可疑阳性重组子的质粒送 TaKaRa 公司测序。所构建的重组逆转录病毒载体被命名为 pLXSN/PDGF-A。

1.2.3　病毒包装用 PA317 细胞的转染、筛选和鉴定　　用 Fugene 6 介导转染法以纯化的质粒 pLXSN/PDGF-A 转化病毒包装用 PA317 细胞,用含 G418(500 μg/ml)的培养基筛选 10 ~ 12 d 获得抗性细胞克隆,将边界清晰的 7 个克隆转移、扩增培养供病毒滴度测定和感染用。

自行设计用于扩增 pLXSN/PDGF-A 中 $Neo^r$ 基因的引物,序列如下:上游 5′-ATGGATTGCACGCAGGTTCTC-3′;下游 5′-TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG-3′。扩增 pLXSN/PDGF-A 中 PDGF-A 基因的引物见 1.2.1。分别以各单克隆细胞病毒基因组 DNA 为模板,以 61.7 ℃的退火温度进行 PCR,在同一反应体系中,扩增 $Neo^r$ 基因(759 bp)与 PDGF-A 基因(678 bp),结果阳性者为阳性克隆。

1.2.4　滴度测定　　取扩增的阳性克隆细胞及其培养上清,一并于 -80 ℃反复冻融后,过 0.45 μm 滤膜,形成病毒原液,用于感染对数期生长的 NIH3T3 细胞,再经抗性筛选近 2 周,以甲醇固定,再用 Giemsa 染色,计算集落数。最后根据稀释倍数及病毒原液用量计算滴度,以克隆形成单位/ml(G418-抗性 CFU/ml)表示。

1.2.5　小香猪 bMSCs 的分离、培养与扩增　　参照文献[6-9]进行 bMSCs 的分离、培养与体外扩增,具体方法:从耳缘静脉注入 3% 的戊巴比妥钠(30 mg/kg)3 ~ 8 ml 麻醉小香猪(2 ~ 3 月龄),剔尽其髂骨处毛发。碘酒、70% 的酒精消毒剔毛处皮肤,各 3 min。铺上无菌洞巾,用经肝素润湿的 12 号骨髓穿刺针沿髂后上棘刺入髂骨,抽取 1 ~ 2 ml 骨髓。

将骨髓注入经肝素润湿的 10 ml 离心管中,混匀,加入红细胞裂解液 6 ~ 8 ml,混匀,离心 1 000 r/min,弃上清,重复 2 次。0.01 mol/L PBS 离心(1 200 r/min)洗涤 2 次,每次 5 min,计数细胞。

将有核细胞按 $2 \times 10^9$ $ml^{-1}$ 的细胞数种植在盛有含 10% FBS、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 IMDM 培养基的培养瓶中,于 37 ℃、5 % $CO_2$,饱和湿度培养箱中培养,4 ~ 6 h 后换液,

弃悬浮细胞,以后每2~3天换液1次,培养3~5 d,挑取单克隆细胞,放入6孔板,于37 ℃、5% $CO_2$,饱和湿度培养箱中培养,每2~3天换液,细胞增殖至90%~100%汇片时,0.25%的胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化,按约$6.5\times10^3$ $cm^{-2}$的细胞数接种传代扩增。

1.2.6 PDGF-A基因转染小香猪bMSCs及其转染后的鉴定

1.2.6.1 PA317-pLXSN/PDGF-A高效价病毒原液转染bMSCs 参照文献[10,11]进行bMSCs的转染,具体方法:以$6.5\times10^3cm^{-2}$的细胞数接种第3代小香猪bMSCs,24 h后换入含8 μg/ml聚凝胺的PA317-pLXSN/PDGF-A高效价病毒原液,在37 ℃、5% $CO_2$、饱和湿度条件下培养5 h后加入含G418(100 μg/ml)的IMDM完全培养基,使聚凝胺的浓度为4 μg/ml,48 h后换入新鲜含G418(100 μg/ml)的IMDM完全培养基,3~5 d后按1∶2的比例传代扩增,以经PA317-pLXSN高效价病毒原液转染的细胞与未经转染的细胞作对照。

1.2.6.2 PCR法扩增PDGF-A和$Neo^r$基因 以经PA317-pLXSN/PDGF-A的高效价病毒原液转染的bMSCs的基因组DNA为模板,在同一反应体系中,扩增PDGF-A和$Neo^r$基因,以经PA317-pLXSN的高效价病毒原液转染的bMSCs和未经转染的bMSCs做对照,以此鉴定pLXSN/PDGF-A能否携带PDGF-A基因成功转染bMSCs,具体方法与1.2.2相同。

1.2.6.3 转染效率的检测 参照文献[10]采用Southern blot技术检测重组逆转录病毒载体pLXSN/PDGF-A携带PDGF-A基因转染bMSCs的效率,以未经转染的bMSCs做对照。

1.2.7 经转染的小香猪bMSCs生长状态与增殖能力的检测

用PA317-pLXSN/PDGF-A病毒源液转染从单克隆分离培养的bMSCs,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培养接种细胞数为$6.5\times10^3cm^{-2}$的bMSCs,每6天传1代,传至第3代。培养与扩增过程中镜检bMSCs的生长状态,以未经转染的bMSCs做对照。

取经转染与未转染的第3代bMSCs,以$5\times10^7$ $ml^{-1}$的细胞数接种至7个96孔板中,200 μl/孔,设空白对照孔,每孔加入200 μl IMDM培养基,每天于固定时间取出一96孔板,每孔加入5 g/L的MTT 20 μl,相同条件下继续培养4 h,弃培养液,每孔加DMSO 150 μl,振荡30 min混匀,HTS7000紫外高效分析仪测定492 nm波长处光密度值$D(492)$,连续检测7 d。以光密度值为Y轴,时间为X轴绘制经转染与未转染的bMSCs生长曲线。

1.2.8 经转染bMSCs干细胞特性的鉴定

1.2.8.1 成骨诱导 经转染的bMSCs传代后加入诱导剂:0.2 μmol PL的地塞米松(Dex)、50 μg/ml的抗坏血酸(Vc)、30 mmol PLβ2磷酸甘油(β2GP)联合诱导培养,钙-钴法行成骨细胞的标志——碱性磷酸酶(ALP)染色。

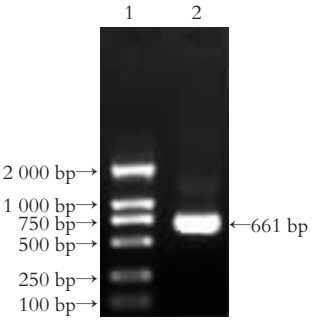
1.2.8.2 成脂诱导 接种于正常培养体系的经转染bMSCs,3~5 d接近融合,加入诱导性培养基:2 μmol/L的地塞米松(Dex)、0.6 mmol/L IBMX、15 μg/ml胰岛素、120 μg/ml吲哚美辛和10% FBS,继续培养48~72 h,换加维持培养基包括15 μg/ml胰岛素、10% FBS维持培养24 h,重复上述步骤直至油红染色出现脂滴。

1.2.9 ELISA法检测PDGF-AA的表达 采用ELISA检测试剂盒检测经PA317-pLXSN/PDGF-A的高效价病毒原液感染的bMSCs的培养上清液中PDGF-AA的表达,以未经PDGF-A基因转染的bMSCs的培养上清液作对照。

## 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661 bp(图1)。

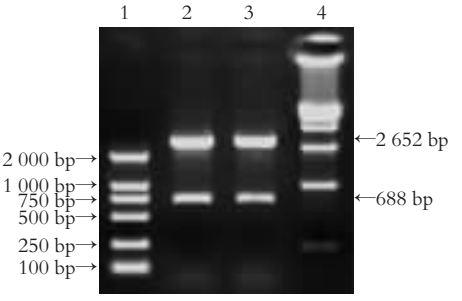



1:DNA标准(DL 2000);2:PDGF-A全长cDNA

**图1 PDGF-A cDNA RT-PCR产物电泳分析**

### 2.2 重组质粒pMD18-T/PDGF-A的酶切鉴定与序列分析

重组质粒pMD18-T/PDGF-A DNA经*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ酶切,用0.7%琼脂糖凝胶电泳分析,显示2 652 bp的pMD18-T骨架片段和688 bp的PDGF-A cDNA目的片段(图2),TaKaRa公司测序结果表明,所克隆到的PDGF-A基因的序列与GenBank所报告的该基因的序列完全一致。




1,4:标准;2,3:用*Bam*HⅠ与*Hind*Ⅲ酶切pMD18-T/PDGF-A质粒DNA

**图2 pMD18-T/PDGF-A酶切鉴定**

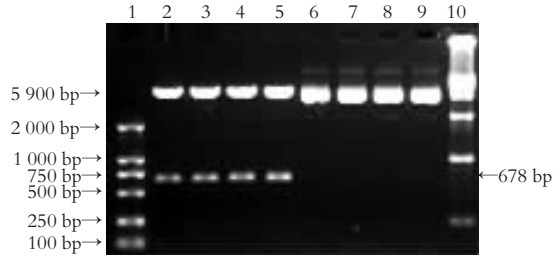
### 2.3 重组逆转录病毒载体pLXSN/PDGF-A的酶切鉴定与序列分析

重组质粒pLXSN/PDGF-A DNA经*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ酶切,0.7%琼脂糖凝胶电泳分析,显示5.9 kb的pLXSN骨架片段和678 bp的PDGF-A cDNA目的片段(图3),TaKaRa公司测序结果表明,逆转录病毒载体pLXSN/PDGF-A得以成功构建。

### 2.4 已转入pLXSN/PDGF-A和pLXSN的PA317病毒包装细胞阳性克隆的鉴定

以经pLXSN/PDGF-A转染的PA317病毒包装细胞的基因组DNA为模板进行PCR,可同时扩增出PDGF-A基因(678 bp)与$Neo^r$基因(759 bp),而以经pLXSN转染的PA317病毒包装细胞的基因组DNA为模板进行PCR,仅能扩增出$Neo^r$基因,由

此提示 pLXSN/PDGF-A 和 pLXSN 已成功获得 PA317 病毒包装细胞的包装。




1,10:标准;2 ~ 5:用 *Eco*R Ⅰ与 *Xho* Ⅰ酶切 pLXSN/PDGF-A 质粒 DNA;6 ~ 9:pLXSN/PDGF-A

**图 3　重组逆转录病毒载体 pLXSN/PDGF-A 的酶切鉴定**

## 2.5　逆转录病毒效价的测定

通过计算其抗性细胞克隆数,得到其病毒效价最高值,PA317-pLXSN/PDGF-A:$1.76 \times 10^5$ CFU/ml;PA317-pLXSN:$2.54 \times 10^5$ CFU/ml。

## 2.6　小香猪 bMSCs 的分离、培养与扩增

首次分离的小香猪 bMSCs, 培养 3 ~ 5 d 后,挑取其单克隆(图 4),经传代扩增的单克隆 bMSCs,培养 5 ~ 8 d,细胞长势良好(图 5)。

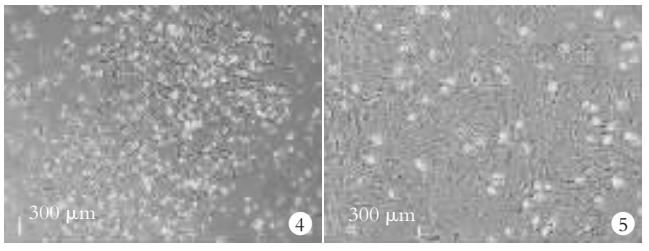
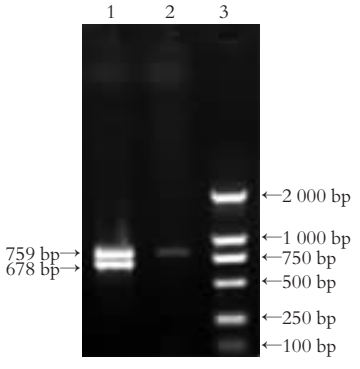



**图 4　倒置显微镜下观察原代培养 3 d 的猪 bMSCs**

**图 5　倒置显微镜下观察培养 6 d 经传代扩增的单克隆猪 bMSCs**

## 2.7　PDGF-A 基因转染 bMSCs 及其转染后的鉴定

以 PA317-pLXSN/PDGF-A 的高效价病毒原液转染的 bMSCs 的基因组 DNA 为摸板,能扩同时增出 PDGF-A 和 $Neo^r$ 基因, 以 PA317-pLXSN 的高效价病毒原液转染的 bMSCs 基因组 DNA 为模板,仅能扩增出 $Neo^r$ 基因(图 6),由此提示重组逆转录病毒载体 pLXSN/PDGF-A 能携带 PDGF-A 基因成功转染 bMSCs。

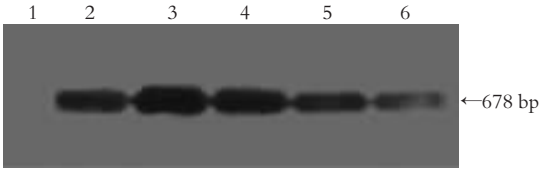



1:PDGF-A 和 $Neo^r$ 全长 cDNA;2:$Neo^r$ 全长 cDNA;3:DNA 标准(DL 2000)

**图 6　分别以经 pLXSN/PDGF-A、pLXSN 转染的小香猪 bMSCs 的基因组 DNA 为模板,扩增 PDGF-A 和 $Neo^r$ 基因**

## 2.8　PDGF-A 基因转染 bMSCs 效率的检测

采用 Southern blot 技术检测重组逆转录病毒载体 pLXSN/PDGF-A 携带 PDGF-A 基因转染小香猪 bMSCs 的效率,结果表明重组逆转录病毒载体 pLXSN/PDGF-A 能携带约 50% 的 PDGF-A 基因进入 bMSC(图 7)。



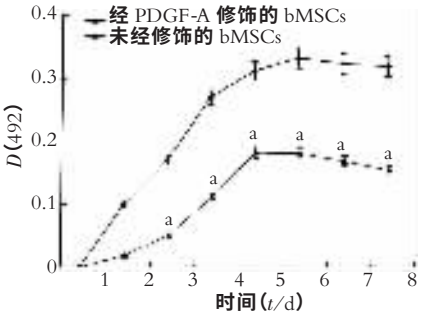

1: *Eco*R Ⅰ与 *Xho* Ⅰ酶切未经 PDGF-A 修饰的 bMSCs 基因组 DNA 40 μg; 2: *Eco*R Ⅰ与 *Xho* Ⅰ酶切经 PDGF-A 修饰 bMSCs 基因组 DNA 40 μg; 3:每个基因组 2 个拷贝数的 PDGF-A cDNA; 4:每个基因组 1 个拷贝数的 PDGF-A cDNA; 5:每个基因组 0.5 个拷贝数的 PDGF-A cDNA; 6:每个基因组 0.25 个拷贝数的 PDGF-A cDNA

**图 7　Southern blot 检测重组逆转录病毒载体 pLXSN/PDGF-A 携带 PDGF-A 基因转染 bMSCs 的效率**

## 2.9　经转染的 bMSCs 生长状态与增殖能力的检测

从单克隆分离培养的 bMSCs,经 pLXSN/PDGF-A 转染,在 100 μg/ml 的 G418 筛选压力下,bMSCs 每 6 天传 1 代,传至第 3 代,与未经转染的 bMSCs 相比,其形态无异常改变,提示 bMSCs 能携带外源性基因 PDGF-A 正常的生长与扩增。

如图 8,细胞总的生长趋势是 1 ~ 2 d 潜伏期, 3 ~ 5 d 快速增长期,6 ~ 7 d 平台期。将曲线拟和后,计算出经转染 bMSCs 在 2.69 d 时增长速度最快, $D(492)$ 为 0.25; 未转染的 bMSCs 在 3.5 d 时增长速度最快, $D(492)$ 为 0.11, 两组相比有显著差异($P < 0.05$), 未转染 bMSCs 在培养早期增殖较快,随培养时间延长增殖速度逐渐减慢, 经转染 bMSCs 增殖速度快于未转染 bMSCs。




a: $P < 0.05$, 与经 PDGF-A 修饰的 bMSCs 比较

**图 8　经转染与未转染的 bMSCs 生长曲线**

## 2.10　经转染的 bMSCs 干细胞特性的鉴定

经转染的 bMSCs 成骨诱导后,钙-钴法染色发现,21 ~ 24 d 阳性细胞细胞质中出现灰黑色 ALP 颗粒沉淀;成脂诱导后,培养细胞逐渐变圆, 油红染色发现,20 d 左右,一些细胞核周出现折光性强的脂肪小滴,继续培养 1 ~ 3 d,脂肪小滴逐渐增多并融合成大脂肪滴。

## 2.11　ELISA 法检测 PDGF-AA 的表达

采用 ELISA 技术检测经 pLXSN/PDGF-A 转染 bMSCs 的培养上清中 PDGF-AA 的表达。以未经转染的 bMSCs 作对照。以

标准液的平均光密度值为 Y 轴,其浓度为 X 轴绘得标准曲线。根据标准曲线查算各上清中 PDGF-AA 的表达量,结果表明,在经 pLXSN/PDGF-A 的高效价病毒原液感染的 bMSCs 培养 7 d 的上清中能检测到 PDGF-AA,与对照相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。

## 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,尤其在肝癌细胞系、胶质母细胞瘤、骨肉瘤和横纹肌肉瘤存在特别高的水平[12]。PDGFs 在体内通过激活巨噬细胞合成 bFGF 和 TGF-β,再作用于内皮细胞来诱导血管增生。它可促使巨噬细胞的趋化性,诱导巨噬细胞活化。PDGFs 又是成纤维细胞重要的趋化因子,可诱导成纤维细胞向伤口迁移,同时又是成纤维细胞的有丝分裂原,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,促进成纤维细胞分化并诱导成纤维细胞分泌其他细胞因子,促进细胞基质成分的合成、分泌,从而加速伤口的愈合[12]。

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。pLXSN 是改良的逆转录病毒载体,它保留了包装信号 7,能产生高滴度的重组病毒,同时将 GAG 翻译起始密码子 ATG 突变为终止密码子 TAG,并将小鼠肉瘤病毒的同源序列取代小鼠白血病病毒 5′LTR 上游序列,可防止野生病毒的产生[13],对人类基因治疗是安全的。pLXSN 的 1 个突出优点是带有新霉素抗性基因($Neo^r$),其表达产物新霉素磷酸转移酶可使 G418 失活,是最常用的失踪基因。因此,本实验选用逆转录病毒载体 pLXSN 为携带目的基因 PDGF-A 的载体。

近年来,尽管人们已成功地应用自体成熟细胞,如成纤维细胞、表皮细胞来修复软组织缺损创面。但 bMSCs 与这些分化细胞相比具有更大的优势,因在体外培养过程中,bMSCs 可以保持未分化表型不断增殖,后经诱导可分化为所需表型,这些表型包括脂肪细胞、内皮细胞、成骨细胞等多种间充质来源的细胞。而已分化细胞来源有限,在体外培养时,增殖速度慢,且存在去分化问题。再者,bMSCs 易于从骨髓中分离获得,而避免了通过手术从患者自身获取成熟细胞所造成的二次损伤。所以,本实验选用 bMSCs 作为基因修饰的靶细胞。

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 与逆转录病毒载体 pLXSN/PDGF-A。RT-PCR、Southern blot 和 ELISA 检测结果表明,该真核稳定表达载体以 pLXSN 为骨架,能携带 PDGF-A 链基因成功地转染小香猪 bMSCs;光镜、MTT 法、成骨与成脂诱导检测表明,bMSCs 转染 PDGF-A 后生长状态、增殖情况良好,且仍具干细胞特性。这些结果均为进一步研究采用转入 PDGF-A 链基因的 bMSCs 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] LaRochelle W J, Jeffers M, McDonald W F, *et al*. PDGF-D, a new protease-activated growth factor[J]. Nat Cell Biol, 2001,3(5): 517-521.

[3] Gilbertson D G, Duff M E, West J W, *et al*. Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor[J]. J Biol Chem, 2001, 276(29): 27406-27414.

[4] 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.

[5] 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.

[6] Park J S, Kim H Y, Kim H W, *et al*. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells[J]. Mech Ageing Dev, 2005, 126(5): 551-559.

[7] Shake J G, Gruber P J, Baumgartner W A, *et al*. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 73(6):1919-1925.

[8] 闫国和,栗永萍,艾国平,等. 人羊膜负载猪骨髓间充质干细胞生长的形态学研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(7):775-777.

[9] 艾国平, 栗永萍,闫国和, 等. 骨髓间充质干细胞的分离与培养[J]. 第三军医大学学报,2001,23(5):553-555.

[10] Supp D M, Bell S M, Morgan J R,*et al*. Genetic modification of cultured skin substitutes by transduction of human keratinocytes and fibroblasts with platelet-derived growth factor-A[J]. Wound Repair Regen,2000,8(1):26-35.

[11] Eming S A, Lee J, Snow R G, *et al*. Genetically modified human epidermis overexpressing PDGF-A directs the development of a cellular and vascular connective tissue stroma when transplanted to athymic mice--implications for the use of genetically modified keratinocytes to modulate dermal regeneration[J]. J Invest Dermatol,1995, 105(6): 756-763.

[12] 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.

[13] Miller A D, Rosman G J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression[J]. Biotechniques,1989,7(9):980-982, 984-986, 989-990.


(编辑　吴培红)