维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)08-0817-05

人角化上皮生长因子基因(hKGF)达载体对大鼠肺泡II型细胞增殖的影响

邱 林[1],郭春宝[1],邓 春[1],张殿良[2]

(1. 重庆医科大学儿童医院外科,重庆 400014;2. 青岛大学附属医院肝胆外科,青岛 266003)

【摘 要】目的:构建人角化上皮生长因子基因真核表达载体 pEGFP-C2-hKGF,为以后的 hKGF 基因功能和基因治疗研究提供实验材料。方法:提取人胚肺成纤维细胞(HLF)总 RNA,逆转录酶-多聚酶链式反应(RT-PCR)扩增 hKGF 基因全长 cDNA 序列,经与 pMD18-T 载体连接、筛选、克隆、抽提质粒和双酶切后,将纯化的 hKGF 基因 cDNA 全长序列插入绿色荧光蛋白表达载体 pEGFP-C2 中,筛选、克隆、抽提质粒,从而构建 hKGF 基因真核表达载体 pEGFP-C2-hKGF。载体转染后大鼠肺泡 II 型细胞进行免疫细胞化学及荧光显微镜鉴定,并进行细胞记数,绘制生长曲线。结果:经 RT-PCR 获得 609bp 含限制性内切酶位点的 DNA 片段,T 载体克隆后经双酶切、测序,确定该片段为 hKGF 基因 cDNA,进而构建 hKGF 真核表达载体 pEGFP-C2-hKGF,经双酶切,测序确证。转染载体后,有 hKGF 的阳性表达并随时间逐渐增加,大鼠肺泡 II 型细胞也随时间出现明显分裂增殖。结论:成功构建 hKGF 基因真核表达载体 pEGFP-C2-hKGF,为进一步应用于基因治疗研究提供工具。

【关键词】人角化上皮生长因子;基因克隆;多聚酶链式反应;真核表达载体

【中国图书分类法分类号】Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-08

Effect of the neukaryotic vector expressing human keratinocyte growth factor (hKGF) gene on rat AEC II proliferation

QIU Lin, et al

(*Department of Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the pEGFP-C2-hKGF vector, a neukaryotic expression plasmid of hKGF gene in order to provide experimental material for the studies of hKGF gene function and hKGF gene therapy afterward. *Methods*: The hKGF gene was amplified by reverse transcriptage polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was extracted from human embryo lung fibroblast (HLF) and then cloned into pMD18-T vector. The recombinant plasmid were screened and extracted. The pEGFP-C2-hKGF vector, an eukaryotic expression plasmid of hKGF gene was constructed after the object hKGF cDNA fragment was inserted into pEGFP-C2 vector and the recombinant were screened, cloned and extracted. The recombinant plasmid vector was transferred into AEC II, and expression of hKGF was assayed by immunohistochemistry. The effect of AEC II proliferation was analyzed by cell count. *Results*: 609bp DNA fragment containing hKGF gene and restriction sites were obtained by RT-PCR. After cloned by pMD18-T vector and certified by restriction analysis and sequencing, pEGFP-C2-hKGF vector was successfully constructed by means of recombinant DNA technology. pEGFP-C2-hKGF encoding the green fluorescent protein (GFP), capable of directing the expression of functional hKGF successfully. Furthermore, hKGF had the effect on AEC II proliferation. *Conclusion*: The efficient expression vector of hKGF gene is constructed, which can be used to establish the hKGF gene therapy vector.

【Key words】 Human embryo lung fibroblast; Gene clone; Reverse transcriptage polymerase chain reaction; Eukaryotic expression vector

角化上皮生长因子(KGF)能促进肺损伤后肺泡II型细胞的增殖分化,促进肺表面活性物质的合成,参与肺损伤修复的重要病理生理过程[1]。有研究发现内源性及外源性 KGF 能防止或缓解博莱霉素、过氧化氢、射线、高氧等所致的肺损伤。KGF 对肺的保护作用不仅局限于肺泡II型细胞,还包括血管内

作者介绍:邱 林(1968-),女,博士,副教授,
主要研究方向:瘢痕的成因及基因治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

皮细胞、肺泡Ⅰ型细胞等整个肺泡隔的结构。KGF的基础性研究为临床应用KGF预防和治疗肺损伤性疾病提供了依据。本研究采用分子克隆的方法从人胚肺成纤维细胞中克隆出KGF的全长cDNA,构建于真核表达载体,转染大鼠肺泡Ⅱ型细胞,应用免疫细胞化学的方法进行鉴定。探讨KGF有效表达载体构建的可行性及转染效率和表达时间,为KGF基因治疗的临床应用打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 人胚肺成纤维细胞HLF的培养

人胚肺成纤维细胞株(MRC-5,由复旦大学华山医院胡作为医生惠赠),DMEM+10%小牛血清培养液中培养,置于二氧化碳培养箱中生长良好,24~48h传代1次。

1.2 引物设计

引物由上海生工生物工程有限公司合成,根据GeneBank中hKGF基因cDNA序列,用引物设计软件Primer Premier5.0设计1对引物,扩增hKGF基因的609bp cDNA片段。在上、下游引物的5'端分别引入BglII和XhoI限制性内切酶位点。上游引物:5'-CCT AGA TCT GCC ACC ATG CAC AAA TGG ATA CTG AC-3'(35 bp);下游引物:5'-CCT CTC GAG TTA AGT TAT TGC CAT AGG AAG-3'(30 bp)。

1.3 RT-PCR

RNA提取:取消化细胞,加Trizol(Promega公司),加氯仿,离心取上层液相,加异丙醇沉淀RNA,75%(DEPC水配制)乙醇清洗,溶于DEPC水中。cDNA合成:模板,Oligo(dT),DEPC Water,70℃ 5~10min,然后加入MMLV Buffer,dNTPs,Rnasin,DEPC Water,MMLV,37℃ 60min,90℃ 5min。PCR扩增:dNTPs,DEPC Water,逆转录cDNA,10×Buffer,$MgCL_2$,引物A,B,Taq酶,混合在扩增仪上扩增;然后94℃预变性2min,按94℃ 30 s,54℃ 45 s,72℃ 1min扩增36个循环,最后1个循环72℃延伸10min。RT-PCR产物用质量浓度为1.5%的琼脂糖凝胶电泳鉴定。胶回收(上海生工生物工程有限公司胶回收试剂盒)按试剂盒说明书进行。

1.4 T载体连接

取回收产物1μl,pMD18-T Vector(大连宝生物工程公司)4 μl,连接液(试剂盒自带)5μl,共10μl,16℃,16h,放-20℃冰箱待用。

1.5 TSS法制备感受态细胞

大肠埃希菌DH5α在LB培养基中震摇至吸光度A600值为0.3~0.4,取1ml菌液4℃1000 g离心10min,将菌体重悬于100μl TSS液。

1.6 pMD18-T/hKGF载体的构建

取连接产物与感受态大肠杆菌混合(1:19),冰上30 min,42℃ 2min,热休克。加2ml LB培养液,冰上2min,37℃ 80min。稍离心浓缩,放于平板培养皿,加X-gal 40 μl,IPTG 20μl,玻璃混合珠混匀,37℃,培养箱过夜,第二天挑白斑,用蓝-白斑试验,筛选白色阳性菌落,提取重组质粒(上海生工生物工程有限公司胶回收试剂盒)按试剂盒说明书进行。

1.7 双酶切鉴定

取重组质粒于EP管,加内切酶PST1、ECOR1及缓冲液10×H,双蒸水共20μl体系,37℃作用40min,凝胶电泳鉴定。并由上海申友生物技术有限公司用通用引物M13测序。

1.8 hKGF真核表达载体pEGFP-C2-hKGF构建

用BglII、XhoI分别双酶切重组pMD18-T载体及pEGFP-C2载体,凝胶电泳后回收目的片段。建立连接反应体系,10μl反应体系中含5μl 2×连接反应缓冲液,1μl pEGFP-C2载体,1μl插入片段(约0.25μg),1μl T4连接酶,置于4℃冰箱过夜。同T载体克隆步骤转化大肠埃希菌DH5α,卡那霉素筛选出白色阳性菌落,提取重组质粒pEGFP-C2-hKGF,双酶切鉴定同上,并用合成的上游引物测序确证。

1.9 大鼠肺泡II型细胞分离培养,pEGFP-C2-hKGF转染,细胞记数

大鼠肺泡II型细胞分离培养按文献方法进行,pEGFP-C2-hKGF质粒6g与20μl脂质体混合于500μl RPMI1640培养液中,室温孵育20min,加入细胞培养体系4h后,进行细胞记数和荧光显微镜观察。

1.10 免疫组织化学染色

培养细胞经固定后,非免疫性动物血清封闭液37℃ 15 min;第一抗体(Sigma公司),室温1h;生物素标记的二抗,室温10~15min;链亲和素—过氧化物酶溶液,10~15min;DAB显色,显微镜下观察[DAB配法:在0.9ml蒸馏水中加DAB solutionA和DAB solutionB各50μl(1~2滴)];苏木素复染,脱水,透明,中性树胶封片。以PBS代替一抗体作阴性对照,已知阳性片作对照。结果判定:阳性反应为胞膜或胞浆染成棕色。每张切片计数200个细胞,计算各级阳性细胞所占百分率。0,无着色;1,轻微染色;2,中度染色;3,重度染色。

2 结 果

2.1 总RNA完整性与纯度鉴定

RNA凝胶电泳结果如图1所示,28s亮度明显强于18s,5s很弱,说明总RNA完整性较好。分光光度法测吸光度A260/280比值为2.00,表明RNA纯度符合RT-PCR要求。

2.2 RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果

上述RNA经RT-PCR后进行电泳,在DNA marker 609 bp附近有明亮条带,与预期目的片段(609bp)大小一致,可能为目的片段(图2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 1 总 RNA 凝胶电泳鉴定

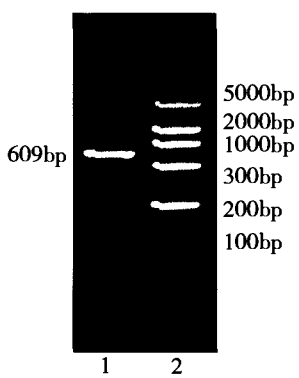


图 2 RT-PCR 产物凝胶电泳

2.3 T 载体克隆鉴定

RT-PCR 产物电泳后回收并克隆入 T 载体后，挑选白色阳性菌落，提取质粒 DNA 并用 PST1、ECOR1 双酶切，酶切物电泳鉴定，重组 T 载体长约 3.3kb，双酶切后产生 601bp 目的片段及 2.7kb 载体片段(图 3)，筛选含有目的片段的克隆。

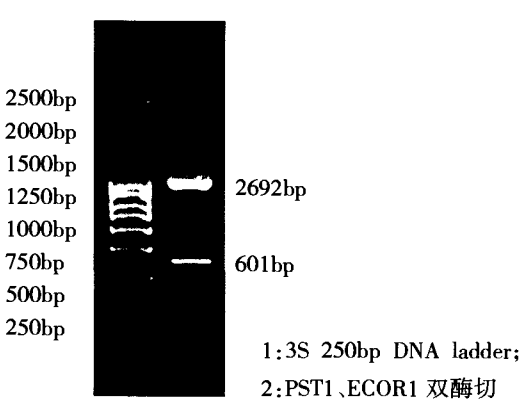
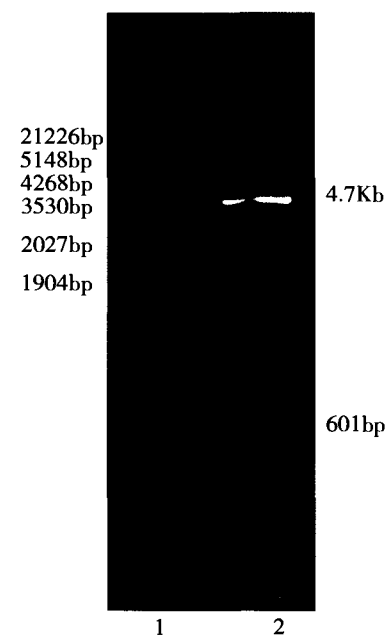


图 3 重组 T 载体酶切凝胶电泳

2.4 hKGF 真核表达载体 pEGFP-C2-hKGF 鉴定

T 载体扩增 hKGF 后重新克隆入 pEGFP-C2-hKGF 重组质粒并转化大肠埃希菌，筛选白色阳性菌落提取质粒 DNA，BglII、XhoI 双酶切鉴定。含插入片段的重组质粒长约 5.3kb，双酶切产生 601bp 目的片段及 4.7kb 载体片段（图 4）。pEGFP-C2-hKGF 测序结果与 GeneBank 内 hKGF 基因 cDNA 比较，符合率达 99%，而且目的片段中的 3'端连接在 pEGFP-C2 的 5'端，结果表明 hKGF 基因 cDNA 片段正确插入 pEGFP-C2 载体。



1:Lambda DNA/EcorR1+Hind111 Marker;
2:BglII、XhoI 双酶切鉴定

图 4 pEGFP-C2-hKGF 载体双酶切凝胶电泳

2.5 测序结果

测序结果与 GeneBank 内 hKGF 基因 cDNA 比较完全符合，证实为 hKGF 基因 cDNA 片段(图 5)。

2.6 外源 KGF 表达的检测

KGF 阳性着色为棕色，全部染色切片无非特异性背景染色，阳性与阴性染色对比鲜明。在大鼠肺泡 II 型细胞中存在 KGF 的表达。这种表达主要表现为细胞的细胞膜和(或)细胞浆出现阳性染色。在 24h、48h、72h 表达逐渐增高，得分分别为 0.5±0.5，1.8±0.8，2.1±0.8（图 6）。对照组免疫染色为阴性。荧光表达的结果与免疫细胞化学完全一致(图 7)。

2.7 KGF 对大鼠肺泡 II 型细胞生长的影响

通过细胞记数并绘制生长曲线发现在 24h、48h

维普资讯 http://www.cqvip.com

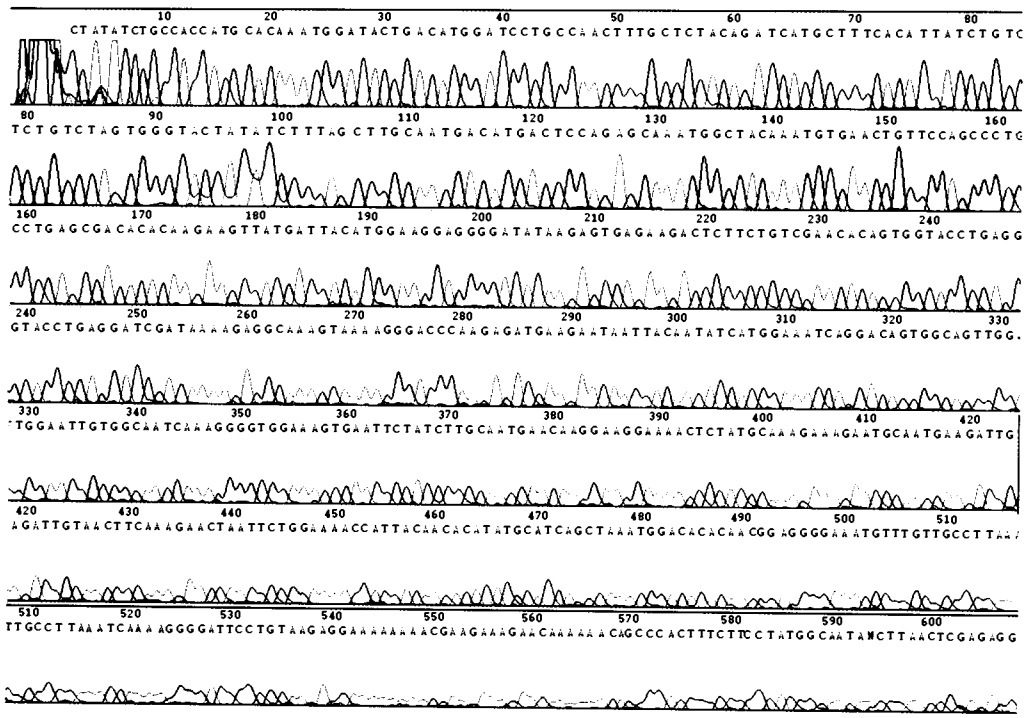


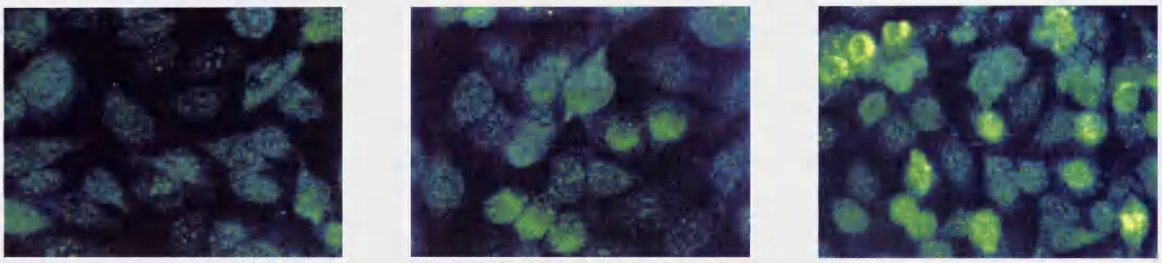
图 5　hKGF 基因测序图谱



A：对照组 24；　B：对照组 48h；　C：对照组 72h；　D：pEGFP-C2-hKGF 转染后 24h；
E：pEGFP-C2-hKGF 转染后 48h；　F：pEGFP-C2-hKGF 转染后 72h

图 6　KGF 免疫细胞化学染色结果

维普资讯 http://www.cqvip.com



A:24h B:48h C:72h

图 7 pEGFP-C2-hKGF 转染后荧光表达(对照组无荧光表达)

和 72h 细胞数量分别为 2.8×10^6、3.6×10^6 和 5.0×10^6。而对照组分别为 2.6×10^6、3.2×10^6 和 3.9×10^6。可知外源 KGF 对大鼠肺泡 II 型细胞分裂增长有刺激作用。

3 讨 论

角化上皮生长因子(KGF)又称 FGF-7,是介导间质与上皮之间相互作用的一种细胞因子。它只在间质细胞中表达,以旁分泌的方式作用于上皮细胞,特异性地刺激上皮细胞增生,而对间质细胞及其他细胞无此作用。KGF 在肺发育及防止、缓解肺损伤等方面都起到重要作用。内源性及外源性 KGF 对多种因素所引起的肺损伤都有保护作用。有研究表明[2]在给大鼠博莱霉素前 48h 及后 24h 两次给予重组人 KGF 与未给重组人 KGF 的大鼠进行比较,肺组织内Ⅰ、Ⅲ型胶原 mRNA 表达及其相应蛋白聚集明显减少,同时 SP-A,B,C mRNA 表达相对增加,从而有效缓解博莱霉素所致的肺纤维化病变;另有研究发现[3]KGF 能诱导肺泡Ⅱ型细胞的增殖分化,减弱肺泡Ⅱ型细胞中 DNA 的破坏;对放射线所致的肺损伤也有保护作用。现已公认,气道内及静脉内给予 KGF 对肺损伤都有保护作用,气道内给予效果更好。因此外源性 KGF 治疗是必要的。但是外源 KGF 人工提纯工艺复杂,KGF 价格昂贵,在临床实际应用受到很大限制。国外有研究报道[4,5]成功克隆 KGF 基因并通过腺病毒载体转染肺泡Ⅱ型细胞,腺病毒载体在人体基因治疗中存在一定危险性,且有嵌入细胞基因组,表达时间较长等不符合 KGF 短期表达的治疗特点。

由于本课题构建 hKGF 基因真核表达载体,是为了以后转染真核细胞以获得 hKGF 蛋白进行基因治疗研究,必须选择人体正常细胞系进行细胞转化实验,故选取人体正常细胞 HLF 进行 cDNA 克隆,从而保证以后转染的效果。本实验选用的真核表达载体是一种新型增强绿色荧光蛋白 GFP 高效表达载体,具有许多优点,一方面有助于真核细胞转染的筛选;另一方面在转染细胞成功后可以保持 hKGF 基因的高水平表达。在真核表达载体构建中,本实验采用的方法效率及准确率较高。T 载体克隆时,插入片段可正向或反向与 T 载体连接,用 BglII 和 XhoI 筛选插入目的片段的重组 T 载体,然后双酶切,将纯化的目的片段又反向插入用相同酶双酶切的 pEGFP-C2 载体。本实验构建的 hKGF 基因真核表达载体可用于转染人体细胞,建立 hKGF 基因高表达细胞株,观察 hKGF 蛋白高表达对细胞代谢等效应的影响,从而探讨该基因在细胞转化等过程中发挥的作用和可能机制。

应用构建好的真核细胞表达载体转染大鼠肺泡 II 型细胞,荧光显微镜下,转染真核细胞表达载体的细胞有明显荧光发出,且大鼠肺泡 II 型细胞有明显的 hKGF 表达,说明真核细胞表达载体构建成功;进一步观察细胞的生长情况发现,大鼠肺泡 II 型细胞增生明显加快,表明外源 hKGF 有明显活性,且可以刺激细胞增殖。有报道称 hKGF 具有促进肺泡Ⅱ型细胞的增生分化为肺泡Ⅰ型细胞的的作用,本研究主要目标为克隆和构建 hKGF 表达载体,对其在肺泡Ⅱ型细胞增殖分化中的具体作用机制未进行深入探讨。文献报道 hKGF 的作用机制可概括以下几方面:KGF 促进肺泡Ⅱ型细胞的增生分化;KGF 调节水钠转运作用,防止肺水肿的发生;能加强细胞内损伤的 DNA 修复,减少肺组织内富含蛋白的水肿液生成以及致纤维化生长因子的合成等,下一步可应用克隆成功的表达载体对其在肺发育及修复中机制进行深入探讨并探索它在肺部疾病中的可能治疗价值。Jay W[6]等报道可通过外源药物

(下转第 850 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

究中发现月经过少组子宫内膜 MMP-11 蛋白表达在增殖期腺上皮和间质均显著低于正常子宫内膜。而分泌期腺上皮月经过少组和正常组两者没有差异，间质中 MMP-11 蛋白表达正常组要高于月经过少组。

TIMPs 是 MMPs 活性的特异性抑制剂，在正常情况下保持平衡，维持体内基质合成和分解代谢的稳定。如前所述，TIMP-1 在整个月经周期都有表达。TIMP-1 蛋白表达在正常子宫内膜增殖期和分泌期都较强，腺上皮和间质没有差异。月经过少组子宫内膜腺上皮中 TIMP-1 蛋白表达，在增殖期和分泌期均显著低于正常子宫内膜。而间质中，在增殖期和分泌期与正常子宫内膜没有差异。不同之处体现在腺上皮上。TIMP-1 蛋白表达较正常组织弱，但 MMP-11 蛋白表达也表现为减弱，说明 TIMP-1 对 MMP-11 的调节不是唯一因素。本研究仅仅揭示了在月经过少子宫内膜中 MMP-11 和 TIMP-1 的改变情况，证明了 MMP-11 可能参与了子宫内膜的重建、增生，但 MMP-11 是怎样参与子宫内膜重建、以及调节 MMP-11 蛋白表达的因素有哪些还需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] Goffin F, Munaut C, FrankenneF, et al. Expression pattern of metalloproteinases in cycling human endometrium[J]. Biol Reprod, 2003; 69(3): 976-984.

[2] Graesslin O, Cortez A, Fauvet R, et al. Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study[J]. Ann Oncol, 2006; 17(4): 637-645.

[3] Pilka R, Kudela M, Eriksson P. Casslen B MMP-26 mRNA and estrogen receptor alpha co-expression in normal and pathological endometrium[J]. Ceska Gynekol, 2005; 70(1): 56-62.

[4] Pilka R, Kudela M, Eriksson P. Casslen B Endometrial expression profiles of mRNA for selected matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1[J]. Ceska Gynekol, 2004; 69(6): 472-476.

[5] Basset P, Bellocq JP, Wolf C, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas[J]. Nature, 1990; 20: 699-704.

(上接第 821 页)

控制转基因 KGF 的表达，从而控制其治疗作用。本研究首次提出应用真核表达载体转染 KGF 基因进入靶细胞，避免了上述缺点，并通过真核表达载体研究 KGF 的作用机理。新型的治疗载体在设计上可控制转染基因的表达，从而降低毒副作用，提高疗效。克隆和构建可在真核细胞中表达 KGF 的的真核表达载体，将为进一步开展肺部疾病的 KGF 基因治疗的临床研究奠定基础。

参 考 文 献

[1] Frank L. Protective Effect of Keratinocyte Growth Factor against Lung Abnormalities Associated with Hyperoxia in Prematurely Born Rats[J]. Biol Neonate, 2003; 83(4): 263-272.

[2] Sugahara K, Iyama K, Kuroda MJ, et al. Double intratracheal instillation of keratinocyte growth factor prevents bleomycin-induced lung fibrosis in rats[J]. J Pathol, 1998; 186(1): 90-98.

[3] Chelly N, Mouhieddine-Gueddiche OB, Barlier-Mur AM, et al. Keratinocyte growth factor enhances maturation of fetal rat lung type II cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999; 20(3): 423-432.

[4] Ray P, Devaux Y, Stolz DB, et al. Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia[J]. PNAS, 2003; 100: 6098-6103.

[5] Morikawa O, Walker TA, Nielsen LD, et al. Effect of Adenovector-Mediated Gene Transfer of Keratinocyte Growth Factor on the Proliferation of Alveolar Type II Cells In Vitro and In Vivo[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000; 23: 626-635.

[6] Jay W, Ticbelaar, Wei Lu, et al. Conditional Expression of Fibroblast Growth Factor-7 in the Developing and Mature Lung[J]. J Biol Chem, 2000; 275(16): 11858-11864.