

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.01.006

HGF 基因真核表达质粒的构建及其细胞表达*

徐 莲 舒 雄 常志静 刘文娟 王 雪 周立军[△]

(天津大学 天津市现代药物传递及功能高效化重点实验室 天津 300072)

摘要 目的:构建真核表达质粒 pEGFP-N1-HGF 并观察干细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)在人皮肤成纤维细胞中的表达。**方法:**从扩增人的间充质干细胞中提取全长 RNA 为模板,设计合成引物,用 RT-PCR 法扩增出 HGF 基因片段,然后将 HGF 基因片段连接于真核表达质粒 pEGFP-N1 中。双酶切鉴定及测序分析后,用脂质体包裹转染体外培养的人的皮肤成纤维细胞,通过荧光显微镜观察其转染效果,酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 HGF 蛋白的表达。**结果:**经酶切鉴定及测序验证 pEGFP-N1-HGF 构建正确,经转染的人皮肤纤维细胞中观察到较强的绿色荧光并且可以表达一定量的 HGF。**结论:**成功构建了真核表达质粒 pEGFP-N1-HGF,为基因治疗脱发疾病提供实验基础。

关键词:HGF; 转染; 成纤维细胞; 真核表达质粒

中图分类号:Q78; Q751 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)01-21-04

Construction of HGF Eukaryotic Expression Plasmid and Expression in Fibroblasts*

XU Lian, SHU Xiong, CHANG Zhi-jing, LIU Wen-juan, WANG Xue, ZHOU Li-jun[△]

(Tianjin University, Key laboratory of modern drug delivery and function efficiency, Tianjin, 300072, China)

ABSTRACT Objective: To construct eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1-HGF and to detect the expression of hepatocyte growth factor (HGF) in human skin fibroblasts. **Methods:** Total RNA was extracted from human marrow mesenchymal stem cells (MSCs), specific primers were designed and HGF gene was amplified by RT-PCR. And then the gene fragment was constructed into eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1. The recombinant plasmid was identified by digestion with restriction enzyme and gene sequencing. Human skin fibroblasts (HSF) were transfected with the recombinant plasmid using lipofectamine. The transfection efficiency was analyzed with fluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect the expression of HGF. **Results:** Restriction enzyme digestion and gene sequencing confirmed the correct construction of recombinant eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1-HGF. Bright fluorescence and a certain amount of HGF were detected in human skin fibroblasts (HSF). **Conclusion:** The recombinant eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1-HGF can be used to express HGF and will provide a foundation for the gene therapy of alopecia.

Key words: HGF; Transfection; Fibroblasts; Eukaryotic expression plasmid

Chinese Library Classification(CLC): Q78; Q751 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)01-21-04

前言

脱发是头发脱落的现象,有生理性及病理性之分。生理性脱发指头发正常的脱落,病理性脱发是指头发异常或过度的脱落。随着社会压力不断增大和生活节奏的加快,环境的不断恶化,以及不良饮食的饮食习惯,病理性脱发在人群的发病越来越高同时也变得越来越年轻化,脱发不止影响人的外观而更重要的已严重影响了人们的心理健康。导致脱发的因素很多,其中毛囊的损伤是引起的脱发主要原因。毛囊是毛发的生长主要器官,很多内源性和环境因素影响毛发的生长周期,其中一

些特殊的细胞因子和生长因子备受关注特别是研究肝细胞生长因子对毛囊的调控作用也越来越受到重视。肝细胞生长因子(Hepatocyte Growth Factor, HGF)^[2]是由间质细胞分泌的具有广泛生物学活性的一种多功能性细胞生长因子,在某些上皮细胞、内皮细胞、肝脏的枯否氏细胞和脂肪储存细胞表达分泌的,甚至在一些肿瘤细胞中也可产生。HGF 与其特异性受体 c-Met 构成的信号系统能调节细胞增殖、迁移、促进人体黑素细胞黑素的形成,并能促进血管发生及组织再生的过程。Jindo 等在体外培养的毛囊的乳头细胞检测到了较大量 HGF 的表达,在小鼠背部的局部皮肤皮下注射 HGF 后发现可以促进新生小鼠

* 基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划(11JCZDJ16300)

作者简介:徐莲(1987-),女,硕士研究生,研究方向:肿瘤及遗传性疾病的基因治疗、再生医学的研究

[△]通讯作者:周立军,副教授,博士, E-mail: ljshun@hotmail.com

(收稿日期:2014-06-15 接受日期:2014-07-13)

毛囊的生长, HGF 通过延长毛发生长初期的时间和其轻微的毛发生长初期诱导活性促进了毛发的生长^[3-5]。

随着对基因转移技术分子细胞生物学机制的深入探究, 基因治疗在各种疾病的治疗研究中发挥着越来越重要的作用^[6]。传统的基因运载体分为病毒载体和非病毒载体两大类, 由于病毒载体的细胞毒性、免疫原性、致变异性等缺点严重地限制了它的广泛应用^[7], 而非病毒载体因其安全性好、制备简单、可重复给药且无基因大小限制等优点, 在基因治疗领域有着广阔的发展前景, 其中脂质体作为一种有效的基因转染工具, 已在肿瘤的基因治疗、干细胞治疗、脑缺血 - 再灌注、帕金森病、眼角膜、视网膜等^[8-10]各种疾病的临床前期治疗研究中取得了一定效果。本研究建立的非病毒型人肝细胞生长因子的基因治疗方式, 避免病毒载体基因治疗所导致的副作用^[11]。采用 DNA 重组技术构建含人的肝细胞生长因子基因的真核表达重组质粒 pEGFP-N1-HGF, 通过脂质体转染体外培养的成纤维细胞后检测到 HGF 的表达, 为基因治疗脱发病提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒和菌株

E.coli DH5 α 由本实验室保存, MSCs 购自于天津协和干细胞公司。质粒 pEGFP-N1 载体购自 CLONTECH 公司。

1.2 主要试剂及工具酶

工具酶及试剂盒: 限制性内切酶 *Bam*H1 和 *Sac*I 购自于 TaKaRa 公司, PCR 胶回收试剂盒、T4 DNA 连接酶、普通质粒提取试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒购自于北京天根生化科技有限公司, PCR 试剂盒和 TransZol 提取试剂盒购自于北京全式金生物技术有限公司, RT-PCR 试剂盒购自于 Promega 公司, Human HGF ELISA Kit 武汉博士德生物有限公司, Lipofectamine™ 2000 购自于 Invitrogen 公司。

1.3 培养基

DMEM 及 FBS 购自 GIBCO 公司。

1.4 引物设计

根据 genebank 中 HGF 的 cDNA 序列[NM_000601], 使用 premier5.0 软件进行引物设计, 并带有 *Bam*H1 和 *Sac*I 特异性的酶切位点。引物的序列为: 上游引物 5'-GAGCGAGCTCAT-GTGGGTGACCAACTCC (*Sac*I)-3'; 下游引物 5'-CGCG-GATCCTGACTGTGGTACCTTATATGTTAAAATAATT (*Bam*H1)-3', 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.5 实验方法

1.5.1 MSCs 总的 RNA 提取 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 的培养液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下培养 MSCs 细胞于六孔板板长满单层后按商业化的 TransZol 提取试剂盒说明书步骤提取 MSCs 细胞中的总 RNA。保存样品于 -70 $^{\circ}$ C 以备长期使用。在紫外分光光度计上测定总 RNA 吸光度 (A260 和 A280 的值), 以确定其浓度和纯度。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.5.2 RT-PCR 和胶回收 HGF 基因 以总 RNA 为模板通过逆转录合成 cDNA, 操作按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行。然后以 cDNA 为模板加入上述已合成的引物进行 PCR 扩增。反

应体系总体积 50 μ L。扩增条件为先 95 $^{\circ}$ C 5 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 20 s, 62 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 2 min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 用胶回收试剂盒进行回收。

1.5.3 质粒载体的制提取 将载体 pEGFP-N1 转入 *E.coli* DH5 α 细胞在含卡那霉素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。按普通质粒提取试剂盒说明书提取 pEGFP-N1。经适当浓度稀释后用紫外分光光度计分别测定 OD260 和 OD280, 通过 OD260/OD280 的比值计算 DNA 的浓度, 以确定载体 pEGFP-N1 的纯度。

1.5.4 目的基因的克隆、筛选及鉴定 用 *Bam*H1、*Sac*I 内切酶对 pEGFP-N1 质粒进行双酶切, 采用 40 μ L 酶切体系, 37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h, 取少量进行琼脂糖凝胶电泳分析, 观察酶切效果, 剩余酶切产物用胶回收试剂盒进行回收。将上述 HGF 基因的 cDNA 的 PCR 扩增产物后回收产物与双酶切后的 pEGFP-N1 采用 10 μ L 反应体系在 16 $^{\circ}$ C 条件下连接过夜。连接产物转化到 *E.coli* DH5 α 细胞中, 接种于含卡那霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单菌落接种到卡那霉素的液体培养基中, 提取质粒, 分别用 *Bam*H1 和 *Sac*I 进行双酶切验证。阳性重组质粒 pEGFP-N1-HGF 送往上海生工生物工程公司测序。

1.5.5 细胞的复苏、传代及冻存 从液氮中取出冻存细胞立即放入 37 $^{\circ}$ C 水浴, 震荡使其快速溶解 1 min 然后移入离心管中 1000 rpm 离心 5 min 弃上清, 加入 5 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 吹吸混匀后移入培养瓶于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 培养箱中培养, 当细胞达到 80% 融合时以 1:3 进行传代。选 3-6 代细胞以 5×10^6 /mL 进行冻存, 冻存前一天更换新鲜培养基, 冻存液 10% DMSO+90% 胎牛血清, 冻存过程: 4 $^{\circ}$ C (20 min), -20 $^{\circ}$ C 30 min, -80 $^{\circ}$ C 过夜后投入液氮长期保存。

1.5.6 重组质粒转染皮肤成纤维细胞 挑取测序正确的单菌落扩大培养后用无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒后于 -20 $^{\circ}$ C 保存。于 24 孔板中, 每孔加入 500 μ L DMEM (含血清, 不含抗生素) 培养皮肤成纤维细胞, 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下培养至细胞密度达 60%。将 0.8 μ g 质粒 DNA (pEGFP-N1-HGF) 和 2 μ L Lipofectamine™ 2000 分别稀释于 50 μ L 无血清无双抗的 DMEM 中, 然后将两者轻轻混匀, 室温中置 20 min, 形成转染复合物。吸掉细胞表面的培养液, 用 100 μ L 不含血清与双抗的 DMEM 清洗两次后, 加入 100 μ L 不含血清与双抗的 DMEM。然后将 100 μ L 转染复合物缓缓加入每孔的培养液中, 轻摇培养板, 混匀后, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中置 4-6 h, 更换新鲜的含血清和双抗的培养基, 于培养箱内培养 48 h 后置于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白信号。

1.5.7 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay) 培养的成纤维细胞传代至 4 个培养瓶, 当细胞融合达 60% 后按上述方法进行转染, 重组质粒 pEGFP-N1-HGF 的用量分别为 6 μ g、8 μ g、10 μ g, Lipofectamine™ 2000 20 μ L, 无血清的 DMEM 培养基 5 mL, 并设定一瓶做为阴性对照阴性对照。转染后 48 h 后收集上清, 放入液氮罐中保存。对收集的上清进行酶联免疫吸附分析, 用酶标仪测定 450 nm 波长的 OD 值, 利用标准品作

出标准曲线来计算样品 HGF 的浓度。

1.6 统计学处理

实验数据经 OriginPro 8.0 统计软件处理, 统计变量以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用双样本 t 检验, α 值取双侧, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MSCs 细胞提取的总 RNA 的完整性检测

电泳图片中呈现 28SrRNA 和 18SrRNA 两条条带, 且 28SrRNA 的亮度, 是 18SrRNA 的两倍。表明 RNA 无降解, 即得高质量的总 RNA(图 1)。

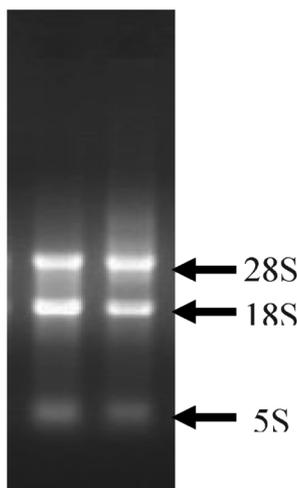


图 1 从 MSCs 中提取的总 RNA
Fig. 1 Total RNA extracted from MSCs

2.2 HGF 的 PCR 产物

经梯度 PCR 筛选退火温度得到最适退火温度为 59 °C, 扩增获得全长约 2.2 kb 的 HGF 基因片段(图 2)。

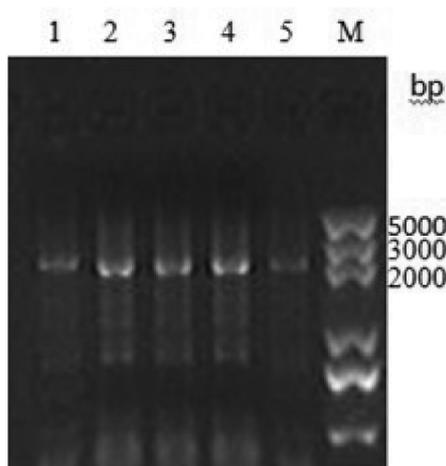


图 2 HGF 全长基因的 PCR 扩增产物
Fig. 2 PCR product of HGF
M:marker; 1-5: HGF

2.3 质粒 pEGFP-N1 和重组质粒 pEGFP-N1-HGF 的双酶切鉴定结果

pEGFP-N1 经 *SacI* 和 *BamHI* 双酶切, 跑琼脂糖凝胶电泳, 回收的片段大约 4.7 kbp (图 3A)。重组质粒

pEGFP-N1-HGF 经 *SacI* 和 *BamHI* 双酶切后出现分子量分别为 4.7 kb 和 2.2 kb 的两条带, 正好与质粒 pEGFP-N1 和 HGF 基因的分子量一致(图 3B), 初步证实连接成功, 同时通过菌落测序后, 确认连接是正方向。

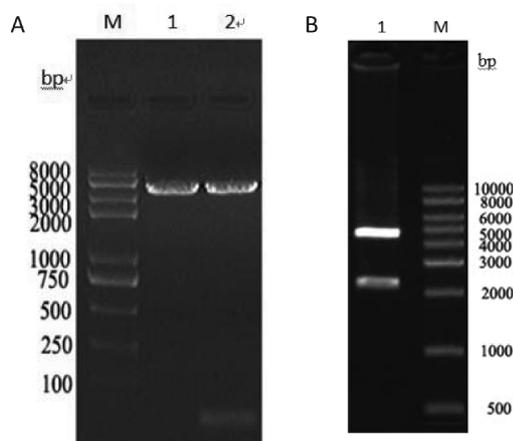


图 3 pEGFP-N1 质粒 (A) 及重组质粒 pEGFP-N1-HGF (B) 的酶切鉴定
Fig. 3 Restriction digestion of plasmid pEGFP-N1 (A) and recombinant plasmid pEGFP-N1-HGF (B)
M:marker; 1-2: pEGFP-N1 or recombinant plasmid pEGFP-N1-HGF

2.4 重组质粒转染皮肤成纤维细胞

载体 pEGFP-N1 上含有绿色荧光蛋白报告基因, 转染细胞经细胞表达后, 可在倒置荧光显微镜下观察到明亮的荧光, 因此我们可以直接看到重组质粒 pEGFP-N1-HGF 的转染效果。与对照组相比重组质粒已经成功转至成纤维细胞(图 4)。

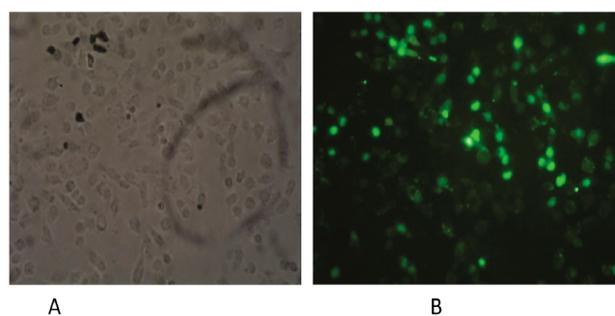


图 4 荧光显微镜下观察重组质粒 pEGFP-N1-HGF 转染成纤维细胞 (20× 10)
A、普通纤维镜下观察转染了 pEGFP-N1-HGF 质粒后的成纤维细胞 B、荧光显微镜下观察转染后的成纤维细胞
Fig. 4 Fibroblasts transfected with recombinant plasmid pEGFP-N1-HGF (20× 10)
A: DIC image; B: Fluorescent image

2.5 ELISA 检测重组质粒中 HGF 蛋白的检测

所有的标准品和样品的最终的吸光值减去零孔的吸光值后, 得到的数据以标准品蛋白浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 画出曲线。得到的标准曲线 ($y=0.001x+0.059 R^2=0.996$), 根据标准曲线计算转染 pEGFP-N1-HGF 重组质粒后表达 HGF 的量(表 1)。

表 1 ELISA 检测转染 48h 后皮肤成纤维细胞 HGF 的表达量($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Table 1 HGF expression from transfected fibroblasts at 48 hours by ELISA

Plasmid (μg)	HGF($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)						
	Control	1	2	3	4	5	6
6	0	1.15	1.10	1.17	1.19	1.24	1.21
8	0	1.49	1.44	1.52	1.58	1.55	1.46
10	0	1.32	1.28	1.30	1.34	1.24	1.32

实验数据用 OriginPro 8.0 统计软件进行统计学处理,统计变量以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示,当所转染 pEGFP-N1-HGF 重组质粒为 6 μg 时,HGF 的表达量为(1.18 ± 0.049) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。重组质粒为 8 μg 时,HGF 的表达量为(1.51 ± 0.054) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。重组质粒为 10 μg 时,HGF 的表达量为(1.31 ± 0.036) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。采用不同量梯度的 pEGFP-N1-HGF 重组质粒转染皮肤成纤维细胞后,取上清用 ELISA 方法检测细胞 HGF 的表达量,结果表明转染 48 h 后,细胞可表达 5.9~7.55 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HGF。

3 讨论

迄今为止,对于脱发症还没有完整全面的治疗手段,我们发现在中药防治脱发方面虽然具有疗效独特、整体调节、副作用小的优点,但是疗效慢,治愈率低临床方面西药治疗的方法中,见效快,恢复速度好,但存在着不同程度的副作用,停药后容易复发等缺点。所以在基因治疗的水平上根本上解决因毛囊损伤引起的脱发疾病将成为日后研究的热点。

HGF 在体外实验中对毛囊生长有明显促毛发生长作用,近年来的研究发现 HGF 可主要通过(1)调节真皮乳头细胞和上皮角质形成细胞之间的相互作用^[12,13],(2)诱导毛囊周围血管的形成^[14-18],(3)影响毛囊的周期性循环^[9],三个方面对毛囊作用来影响毛发的生长。通过构建 HGF 基因的真核表达质粒可以为基因治疗脱发疾病提供一种可行性方法。

本实验中我们采用逆转录 PCR 的方法扩增出目的基因 HGF 的 cDNA 片段,将其与真核表达载体连接,经双酶切、基因测序鉴定载体构建成功后,将其转染至体外培养的成纤维细胞,ELISA 方法检测到在细胞内成功表达了 HGF,下一步实验再将 HGF 真核重组质粒用于动物模型的体内检测。期待 HGF 可以代替毛乳头的的作用来调控毛囊的发育周期,促进毛发再生,为基因治疗脱发疾病的研究奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Danilenko DM, Ring BD, Pierce GF. Growth factors and cytokines in hair follicle development and cycling: recent insights from animal models and the potentials for clinical therapy [J]. *Mol Med Today*, 1996, 2(11):460-467
- [2] Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984,122(3): 1450-1459
- [3] Jindo T, Tsuboi R, Imai R, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates hair growth of mouse vibrissae in organ culture[J]. *Jinvest Dermatol*, 1994, 103(3): 306-309
- [4] Jindo T, Tsuboi R, Imai R, et al. The effect of hepatocyte growth factor/scatter factor on human hair follicle growth [J]. *Journal of Dermatological Science*, 1995,10(3): 229-232
- [5] Jindo T, Tsuboi R, Takamori K, et al. Local injection of Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) alters cyclic growth of murine hair follicles[J]. *J Invest Dermatology*, 1998, 110(4):338-342
- [6] Oritiz R, Melguizo C, Prados J, et al. New Gene Therapy Strategies for Cancer Treatment: A Review of Recent Patents [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2012,7(3):297-321
- [7] Haccin-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency[J]. *N Engl J Med*, 2003,348(3):255-256
- [8] Matsumoto K, Kubo H, Murata H, et al. A Pilot Study of Human Interferon β Gene Therapy for Patients with Advanced Melanoma by in vivo Transduction Using Cationic Liposomes[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2008,38(12):849-856
- [9] Xia CF, Boado RJ, Zhang Y, et al. Intravenous glial-derived neurotrophic factor gene therapy of experimental Parkinson's disease with Trojan horse liposomes and a tyrosine hydroxylase promoter[J]. *J Gene Med*, 2008,10(3):306-315
- [10] 李新宇,刘磊,李贵刚. 脂质体介导 Bcl-XL 基因体外转染人角膜基质细胞的动态表达[J]. *国际眼科杂志*, 2010,10(2):229-230
- [11] Li Xin-yu, Liu Lei, Li Gui-gang. Investigation of liposome mediated Bcl-xL gene transfer into keratocyte [J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2010,10(2):229-230
- [12] Yukio U, Tsutomu M, Yukihiko M, et al. Skeletal muscle targeting in vivo electroporation-mediated HGF gene therapy of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *J Laboratory Investigation*, 2004, 84(7): 836-844
- [13] Fujie T, Katoh S, Oura H, et al. The chemotactic effect of a dermal papilla cell-derived factor on outer root sheath cells [J]. *J Dermatol Sci*, 2001,25(3):206-212
- [14] Lindner G, Botchkarev VA, Botchkareva NV. Analysis of apoptosis during hair follicle regression(catagen)[J]. *Am J Pathol*, 1997,151(6): 1601-1617
- [15] Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, et al. The biology of leptin: a review[J]. *J Anim Sci*, 1998,76(5): 1405-1420
- [16] Boulton M. A role for hepatocyte growth factor in diabetic retinopathy[J]. *Br J Ophthalmol*, 1999,83(7): 763-764
- [17] Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, et al. The biology of leptin: a review[J]. *J Anim Sci*, 1998, 76(5): 1405-1420
- [18] Zhang YW, Su Y, Volpert OV, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003,100 (22): 12718-12723
- [19] Mecklenburg L, Tobin DJ, Muller-Rover S, et al. Active hair growth (anagen) is associated with angiogenesis [J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 114(5):906-916