

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.24.010

## 重组 pcDNA3.0-FGF10 的构建及其转染人间充质干细胞的生物学表达\*

张迅轶, 尹 喆, 沈智君, 冯 云, 杨 敏, 陈子昂, 纪亚忠<sup>△</sup>

同济大学附属同济医院生殖医学科, 上海 200065

**摘要:**目的 构建成纤维细胞生长因子 10(FGF10)的载体 pcDNA3.0-FGF10, 观察 FGF10 在体内外的生物学作用。方法 人早胚组织总 RNA, 扩增得到人 FGF10 cDNA 片段并将其插入载体 pcDNA3.0 中, 构建成 pcDNA3.0-FGF10 重组真核表达载体。将其转染入人胚源间充质干细胞(MSC), 得到 pcDNA3.0-FGF10-MSC。利用免疫荧光、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、Western-blot 等方法鉴定转染效果。结果 成功构建能持续稳定表达目的蛋白 FGF10 的重组质粒表达载体 pcDNA3.0-FGF10-MSC。结论 成功构建并转染质粒载体, 为观察 FGF10 在体内外的生物学作用提供了实验工具。

**关键词:**成纤维细胞生长因子 10; 间充质干细胞; 转染

**中图分类号:**R715.5

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-9455(2019)24-3585-03

### Construction of recombinant pcDNA3.0-FGF10 and its biological efficiency in transfecting human mesenchymal stem cells\*

ZHANG Xunyi, YIN Zhe, SHEN Zhijun, FENG Yun, YANG Min, CHEN Ziang, JI Yazhong<sup>△</sup>  
Reproductive Center, Tongji Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200065, China

**Abstract: Objective** To construct the recombinant pcDNA3.0-FGF10 and to explore its biological efficiency in transfecting human mesenchymal stem cells. **Methods** We extracted total RNA from the early embryo and amplified the cDNA coding for FGF10 by Reserved Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), then it was subcloned into pcDNA3.0 and transfected into human mesenchymal stem cell (MSC). Effect of pcDNA3.0-FGF10-MSC was identified by the transfection through RT-PCR, immuno-fluorescence, ELISA and Western-blot after selecting the clones of pcDNA3.0-FGF10-MSC under the pressure of G-418. **Results** The recombinant vector pcDNA3.0-FGF10-MSC which could express aim protein constantly was successfully reconstructed. **Conclusion** A kind of useful tool to investigate the biological function of FGF10 in vitro and in vivo has been constructed.

**Key words:** fibroblast growth factor 10; mesenchymal stem cell; transfection

成纤维细胞生长因子(FGF)家族是由众多成员组成的一个超家族,从诱导脊椎动物胚胎早期的三层发育到后期器官组织形成的各阶段都发挥着重要的作用<sup>[1-3]</sup>。其中,FGF10是早期胚胎中胚层发育的重要间质调控因子,对白色脂肪组织的发生尤为重要<sup>[4-6]</sup>。在人体中,白色脂肪组织主要由未分化的白色脂肪前体细胞(ADSC)和成熟白色脂肪细胞构成,FGF10仅特异表达于ADSC,且受到各种调控因素影响<sup>[7-10]</sup>。此外,FGF10的半衰期也较短,仅为10h左右<sup>[11-14]</sup>。本研究在体外构建了能持续表达FGF10的载体pcDNA3.0-FGF10,并转染已建株的人间充质干细胞(MSC),旨在观察FGF10在体内外的生物学作用。现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 本实验室成功建系并保存的MSC在含10%胎牛血清的DMEM-HG培养基(GIBCO)中培

养;pcDNA3.0质粒载体为本实验室保存;RNA抽提试剂盒、3S Plasmid Miniprep Kit V3.1、感受态细菌制备试剂盒(中科英达);AMV Reverse Transcriptase、OligdT(15) Primer、限制性内切酶BamHI及NdeI(Promega);Taq DNA Polymerase、T4 DNA连接酶(Fermentas);脂质体FuGene6 Transfection Reagent(Roche)。人重组FGF10、羊抗人FGF10一抗(Santa Cruz);驴抗羊荧光二抗(华美生物);G-418(AMRESCO);Western-blot发光体试剂购自Santa Cruz;抗小鼠 $\beta$ -actin单克隆抗体购自Sigma公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 人 FGF-10 cDNA 的克隆及 pcDNA3.0-FGF10 的构建** 经同济大学伦理委员会批准,患者填写知情同意后,分别从手术室、产科门诊取得人皮肤组织、人早胚组织及脂肪组织,应用试剂盒抽提总 RNA,以 M-MLV 反转录酶、随机六聚体引物进行反转录,并以

\* 基金项目:同济大学附属同济医院临床研究培育项目[ITJ(QN)1809]。

作者简介:张迅轶,男,主管技师,主要从事辅助生殖、干细胞诱导分化方面的研究。△ 通信作者,E-mail:jiyazhongivf@163.com。

反转录产物作为模板进行聚合酶链反应。正向引物: 5'GGG AAT TCC ATA TGA TGT GGA AAT GGA TAC TG3', 其 5'端引入 NdeI 酶切位点(下划线)和保护碱基(斜体)。反向引物: 5'CGC GGA TCC ATG AGT GTA CCA CCA TTG3', 其 5'端引入 BamHI 酶切位点(下划线)和保护碱基(斜体), 目的扩增片段长度为 628 bp。具体反应条件如下: 94 °C 2 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s 进行 30 个循环后, 于 72 °C 延伸 10 min, 所得产物经 BamHI 与 NdeI 双酶切后用 T4 DNA 连接酶接入同样经双酶切的 pcDNA3.0 质粒载体, 同时设 pcDNA3.0 质粒载体自连对照组, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选鉴定后得到 pcDNA3.0-FGF10 重组质粒。

**1.2.2 重组质粒体外转染 MSC** 大量抽提质粒 pcDNA3.0-FGF10 及自连对照组, 以脂质体转染 MSC, 在 G418 压力下筛选, 挑选单克隆细胞行无限稀释培养, 14 d 后得到稳定携带目的质粒细胞株 pcDNA3.0-FGF10-MSC 及转染自连对照的 pcDNA3.0-MSC。

**1.2.3 转染基因蛋白表达** 抽提指数生长期 pcDNA3.0-FGF10-MSC 及 pcDNA3.0-MSC 总 RNA, 行反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测各株细胞中 FGF10 mRNA; 对 pcDNA3.0-FGF10-MSC 和 pcDNA3.0-MSC 制片, 应用免疫荧光法检测 FGF10 分布; 收集细胞培养液, 利用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 FGF10 水平; 利用 Western-blot 免疫印迹检测 FGF10 的表达情况。

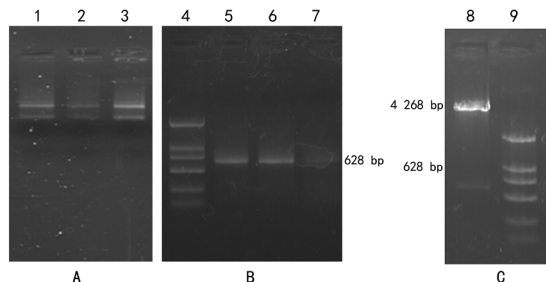
**1.3 统计学处理** 采用 Excel2010 对数据进行整理分析。

## 2 结 果

**2.1 重组质粒 pcDNA3.0-FGF10 的鉴定** RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳显示单一条带, 大小为 628 bp, 与理论预期值一致。且显示人早胚组织中 FGF10 表达最为丰富。由人早胚组织得到的 FGF10 以及 pcDNA3.0 质粒由 NdeI 和 BamHI 双酶切。连接、转化、筛选后再经 NdeI 和 BamHI 双酶切鉴定, 显示产物大小为 628 bp 及 4 268 bp, 与 FGF10 及 pcDNA3.0 相对应, 见图 1。将重组质粒用 T7/SP6 通用引物双向测序。测序结果均与目的序列 100% 相符, 序列插入方向正确。

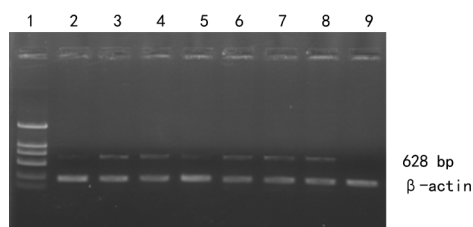
**2.2 重组表达载体 pcDNA3.0-FGF10-MSC 的鉴定** 重组质粒载体 pcDNA3.0-FGF10 及自连对照分别转染 MSC, 经 G-418 筛选 10 d 后, 由于成功转染入 MSC 的 pcDNA3.0-FGF10 含有 neo 基因, 能够抵抗 G-418 的杀细胞作用, 故 pcDNA3.0-FGF10-MSC 能逃逸 G-418 的作用而存活下来, 生长出的细胞克隆即为成功转染。选取 7 株 pcDNA3.0-FGF10-MSC 细胞(1#~7#)及 1 株自连对照 pcDNA3.0-MSC 作为阴性对照, 进行 RT-PCR, 发现 1#~7# 细胞株均表达 FGF10 mRNA, 但表达量不一, 见图 2。对 pcDNA

3.0-FGF10-MSC 和 pcDNA3.0-MSC 细胞行 FGF10 免疫荧光检测结果显示, 7 株 pcDNA3.0-FGF10-MSC 均有 FGF10 阳性信号, 信号表达于细胞质, 几乎不表达于细胞膜, 见图 3。对 7 株 pCDNA 3.0-FGF10-MSC 细胞培养上清液进行 ELISA, 显示 7 株细胞克隆均高表达 FGF10, 见图 4。最后, 对 pcDNA3.0-FGF10-MSC 行 FGF10 Western-blot 检测, 与 RT-PCR 结果基本相符, 见图 5。



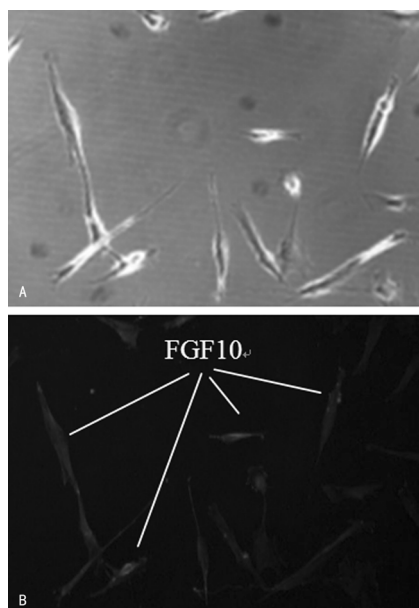
注: A 中 1~3 分别为皮肤组织、早胚组织及脂肪组织总 RNA; B 中 4~7 分别为 DNA Marker 及各组织 RT-PCR 扩增的 FGF-10 片段; C 中 8~9 分别为 pcDNA3.0-FGF10 重组质粒双酶切鉴定条带及 DNA Marker

图 1 重组质粒 RT-PCR 电泳图



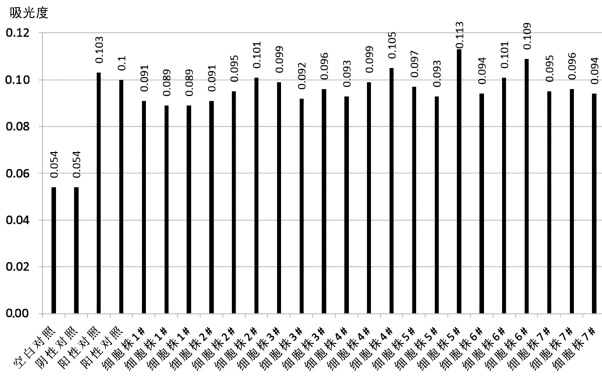
注: 1 为 DNA Marker; 2~8 为 1#~7# pcDNA3.0-FGF10-MSC 细胞克隆; 9 为 pcDNA3.0-MSC 自连对照(阴性对照); 条带灰度扫描显示第 2#、3#、5#、6#、7# 细胞株高表达, 1#、4# 细胞株低表达

图 2 RT-PCR 检测 pcDNA3.0-FGF10-MSC 细胞株 FGF10 mRNA 情况



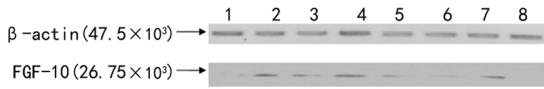
注: A 为光镜下 pcDNA3.0-FGF10-MSC; B 为 pcDNA3.0-FGF10-MSC 免疫荧光下显示 FGF10 阳性信号表达于细胞质

图 3 免疫荧光检测 pcDNA3.0-FGF10-MSC 表达 FGF10 情况( $\times 200$ )



注:每个细胞株做 3 个复孔

图 4 ELISA 检测 7 株细胞 pCDNA3.0-FGF10-MSC 表达 FGF10 的吸光度原始数值



注:1~7 为 1#~7# pCDNA3.0-FGF10-MSC 细胞克隆;8 为 pCDNA3.0-MSC(阴性对照);条带灰度扫描值显示第 2#、3#、4#、7# 细胞株高表达,1#、5#、6# 细胞株低表达

图 5 Western-blot 检测各 pCDNA3.0-FGF10-MSC 克隆表达 FGF10 情况

### 3 讨论

本研究选择 FGF10 表达丰富的组织来源进行 RT-PCR,成功构建 pCDNA3.0-FGF10 后转染人胚来源 MSC,转染效率的高低直接关系到 pCDNA3.0-FGF10-MSC 的克隆生长情况。加入 G-418 进行筛选后细胞死亡较多,由于缺少细胞间相互作用,单个细胞生长较为缓慢,需要近 2 周时间才能生长出单细胞克隆。同时,本研究用局部消化法消化得到的单细胞克隆进行扩大培养,得到了纯度较高的基因表达载体。

鉴定已成功构建的目的基因表达载体 pCDNA3.0-FGF10-MSC 的方法有很多,本研究选择了 RT-PCR、ELISA、Western-blot 和免疫荧光的方法分别从转录和翻译等不同层面来进行鉴定,获得 7 个单细胞克隆。鉴定同时利用转染自连对照空质粒的 MSC (pCDNA3.0-MSC) 作为阴性对照,并利用软件进行灰度值扫描来量化各株细胞的表达情况,结果显示 7 株细胞均有 FGF10 的表达,RT-PCR 结果显示 2#、3#、5#、6#、7# 细胞株高表达,1#、4# 细胞株低表达;Western-blot 结果显示 2#、3#、4#、7# 细胞株高表达,1#、5#、6# 细胞株低表达;ELISA 结果则显示 7 株细胞 FGF10 表达量没有明显差异,3 种方法结果有一定的规律性。本研究发现第 2#、3#、7# 细胞株表达 FGF10 较稳定且表达量较高,所以可选择 2#、3#、7# 细胞株进行后续实验,为下一步实验提供了能持续稳定表达目的蛋白 FGF10 的细胞工具。

### 参考文献

[1] OHTA H, KONISHI M, ITOH N. FGF10 and FGF21 as

regulators in adipocyte development and metabolism[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2011, 11(4):302-309.

[2] TURNER N, GROSE R. Fibroblast growth factor signaling: from development to cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(2):116-129.

[3] 窦易铭,白活,李光明.成纤维细胞生长因子的代谢作用研究进展[J]. *山东医药*, 2018, 58(39):89-92.

[4] KONISHI M, ASAKI T, KOIKE N, et al. Role of FGF10 in cell proliferation in white adipose tissue[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 249(1/2):71-77.

[5] OHTA H, ITOH N. Roles of FGFs as Adipokines in Adipose Tissue Development, Remodeling, and Metabolism[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5:18-22.

[6] FISCHER C, SEKI T, LIM S, et al. A miR-327-FGF10-FGFR2-mediated autocrine signaling mechanism controls white fat browning[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):2079-2097.

[7] AL ALAM D, EL AGHA E, SAKURAI R, et al. Evidence for the involvement of fibroblast growth factor 10 in lipofibroblast formation during embryonic lung development[J]. *Development*, 2015, 142(23):4139-4150.

[8] ITOH N, OHTA H. Fgf10: a paracrine-signaling molecule in development, disease, and regenerative medicine[J]. *Curr Mol Med*, 2014, 14(4):504-509.

[9] GERHARD G S, STYER A M, STRODEL W E, et al. Gene expression profiling in subcutaneous, visceral and epigastric adipose tissues of patients with extreme obesity[J]. *Int J Obes (Lond)*, 2014, 38(3):371-378.

[10] MATSUBARA Y, AOKI M, ENDO T, et al. Characterization of the expression profiles of adipogenesis-related factors, ZNF423, KLFs and FGF10, during preadipocyte differentiation and abdominal adipose tissue development in chickens[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2013, 165(3):189-195.

[11] 陈巍,傅海龙,田谋利,等.成纤维细胞生长因子 10 的功能及机制进展[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2018, 39(6):590-594.

[12] JIN L, WU J, BELLUSCI S, et al. Fibroblast Growth Factor 10 and Vertebrate Limb Development[J]. *Front Genet*, 2018, 9:705-713.

[13] 彭大颖,吴迪.肿瘤环境下人类脂肪间充质干细胞的旁分泌特征变化与肿瘤细胞侵袭的关系分析[J]. *中国现代药物应用*, 2017, 11(7):60-62.

[14] THOMSON A A, CUNHA G R. Prostatic growth and development are regulated by FGF10[J]. *Development*, 1999, 126(16):3693-3701.

(收稿日期:2019-03-03 修回日期:2019-07-08)