

## 肝细胞生长因子基因转染对淋巴瘤细胞的生物学效应

岑东<sup>1</sup>, 赵行<sup>2</sup>, 沈蓉蓉<sup>2</sup>, 滑世轩<sup>2</sup>, 吕建新<sup>2</sup>, 裴仁治<sup>3</sup>, 涂植光<sup>4</sup>

(1. 浙江省鄞州疾病预防控制中心, 浙江宁波 315100;

2. 温州医学院浙江省医学遗传学重点实验室, 浙江温州 325027;

3. 浙江省鄞州人民医院血液科, 浙江宁波 315040;

4. 重庆医科大学医学检验系教育部“临床检验诊断学”重点实验室, 重庆 400016)

**[摘要]** 目的: 克隆肝细胞生长因子(HGF)基因, 构建重组真核表达载体, 并观察 HGF 基因转染对 Raji 细胞的生物学效应。方法: 从人肝组织中提取总 RNA, 反转录后行 PCR 获得 HGF 基因 cDNA, 与载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 构建重组真核表达载体, 转染 Raji 细胞。行潮霉素 B 筛选, 连续传代, 采用实时荧光定量 PCR、ELISA 和细胞免疫组化及半固体培养等方法, 观察 HGF 基因转染后的表达与对 Raji 细胞生物学性状的影响。结果: 成功克隆 HGF 基因并构建了重组真核表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF。经 RT-PCR 证实 HGF 基因成功转染 Raji 细胞。HGF 基因转染后可在 Raji 细胞稳定表达 HGF mRNA 和蛋白, 且可促进其增殖和迁徙及侵袭。结论: HGF 基因获成功克隆并构建了重组真核表达载体, 转染 Raji 细胞后可稳定表达, 并对其生物学性状具促进作用。

**[关键词]** 肝细胞生长因子/遗传学; 淋巴瘤/遗传学; 基因; 转染; 表达

**[中图分类号]** R 733.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2010)04-0378-08

## Effect of hepatocyte growth factor gene transfection on biological features of lymphoma cells

CEN Dong<sup>1</sup>, ZHAO Hang<sup>2</sup>, SHEN Rong-rong<sup>2</sup>, HUA Shi-xuan<sup>2</sup>, LÜ Jian-xin<sup>2</sup>, PEI Ren-zhi<sup>3</sup>, TU Zhi-guang<sup>4</sup> (1. *Yinzhou District Centre for Disease Control and Prevention, Ningbo 315100, China*; 2. *Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China*; 3. *Department of Hematology, Yinzhou People's Hospital, Ningbo 315040, China*; 4. *Department of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Clinical Diagnostics of Education Ministry of China, Chongqing Medical University, Chongqing 410016, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the biological effect of hepatocyte growth factor (HGF) on HGF

收稿日期: 2010-05-07 修回日期: 2010-06-10

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划(2003B172, 2007A175); 宁波市医药卫生科技计划(2003079); 宁波市科技计划(2007C10065)。

作者简介: 岑东(1971-), 男, 博士, 副主任技师, 主要从事恶性肿瘤的发病机制与分子诊断研究; E-mail: cendong2002@163.com

通讯作者: 涂植光(1946-), 男, 硕士, 博导, 教授, 主要从事药物的生物化学和分子生物学研究; E-mail: tuzhiguang2@163.com

gene-transfected Raji cells. **Methods:** Total RNA was extracted from human hepatic tissue, HGF gene cDNA was amplified by RT-PCR, and then cloned into vector pVITRO<sub>2</sub>-mcs to construct recombinant eukaryotic expression vector pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF. The recombinant vector was transfected to Raji cells, and the stably transfected cells were selected by homomycin B in serial passages, and confirmed by real-time fluorescent quantitative PCR, ELISA, immunocytochemistry. The biological features of transfected Raji cells were evaluated by semisolid culture. **Results:** RT-PCR results showed that Raji cells were transfected successfully with recombinant eukaryotic expression vector pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF. HGF mRNA and protein were expressed successfully in Raji cells. Expression of HGF gene enhanced proliferation, metastasis and invasion of Raji cells. **Conclusions:** HGF gene has been cloned and recombined to construct recombinant eukaryotic expression vector pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF successfully. Transfected HGF may change the biological features of Raji cells.

[ **Key words** ] Hepatocyte growth factor/genet; Lymphoma/genet; Gene; Transfection; Expression

[ J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2010,39(4):378-385. ]

研究表明,肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)作为一种多功能细胞因子<sup>[1-2]</sup>,经 HGF/Met 信号转导系统发挥生物学功能,主要表现为丝裂原、能动原和形态发生原及促血管生成等效应。恶性肿瘤普遍伴有 HGF 的异常表达,且与其发生、发展和疗效及预后密切相关,因此, HGF 可能是肿瘤发生的另一促进因素<sup>[3-4]</sup>。我们通过克隆 HGF 基因,构建其重组真核表达载体,并观察转染后对 Raji 细胞生物学性状的影响,在细胞水平上评价 HGF 的生物学效应,进而为开发其抑制剂并拟行淋巴瘤基因治疗奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 主要材料** 载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs、潮霉素 B、脂质体转染试剂盒、HGF 蛋白 ELISA 检测试剂盒等购自 Invitrogen 公司; RPMI 1640 购自 Gibco 公司;兔抗人 HGF 多克隆抗体购自 Abcam 公司; EX Taq HS DNA 聚合酶、载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、限制性内切酶 *Mlu* I、*Sal* I、质粒提取试剂盒、RNAiso RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、DNA 胶回收试剂盒等购自 TaKaRa 公司;引物合成和测序由上海生工生物工程公司完成; Raji 细胞、*E. coli* DH5 $\alpha$  为本室保存。

## 1.2 方 法

**1.2.1 HGF 基因 cDNA 的扩增和回收** 取液氮速冻的新鲜人肝组织,按 RNAiso 操作说明书提取肝细胞总 RNA,测定浓度并行 1% 琼脂糖凝胶电泳,观察总 RNA 的完整性。采用 Primer Express Software Program 2.0 设计引物,上下游引物 5'端分别引入限制性内切酶 *Mlu* I、*Sal* I 酶切位点,用于定向克隆。上游引物:5'-ACG CGT CAC CAT CTG GGT GAC CAA AC-3';下游引物:5'-GTC GAC GGG TGC TTC AGA CAC ACT TAC TTC-3';扩增产物长度为 2 229 bp。取总 RNA 提取物,行 RT-PCR。25  $\mu$ l 反应体系含逆转录产物 5  $\mu$ l, 10  $\times$  PCR 缓冲液 2.5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, 上游、下游引物各 0.4  $\mu$ mol/L, dNTPs 2.0 mmol/L, EX Taq HS DNA 聚合酶 2.5 U。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 7 min、75 $^{\circ}$ C 3 min;变性和延伸条件分别为 94 $^{\circ}$ C 45 s 和 72 $^{\circ}$ C 2 min,退火温度由 63 $^{\circ}$ C 以每循环降 1 $^{\circ}$ C 的速率至 57 $^{\circ}$ C, 45 s, 7 个循环;94 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环。1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离特异性产物,按 DNA 胶回收试剂盒说明书回收并测定浓度。

**1.2.2 HGF 基因重组克隆载体的构建** 将回收的 HGF 基因 cDNA 与载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple 连接成重组克隆载体 pMD<sub>19</sub>-T simple-HGF。10  $\mu$ l 连接体系含 PCR 产物 1  $\mu$ l, 载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple 1  $\mu$ l, Solution I 5  $\mu$ l, 混匀后置 16 $^{\circ}$ C, 12

h. 将连接产物以冷  $\text{CaCl}_2$  法转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  并行氨苄青霉素和  $\alpha$ -筛选, 以未转染菌和转染载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple 菌为对照, 采用菌落直接 PCR、*Mlu* I 和 *Sal* I 双酶切和序列分析等方法行鉴定。

**1.2.3 HGF 基因重组真核表达载体的构建** 将转化重组克隆载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple-HGF 的 *E. coli* DH5 $\alpha$  增菌后, 提取重组克隆载体行 *Mlu* I、*Sal* I 双酶切。20  $\mu\text{l}$  酶切反应体系含重组克隆载体 10  $\mu\text{l}$ , 10  $\times$  H Buffer 2  $\mu\text{l}$ , *Mlu* I、*Sal* I 各 40 U, 混匀后置 37 $^\circ\text{C}$ , 12 h。酶切产物在 1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳分离后将目的片段行胶回收并测定浓度, 与经相同双酶切的载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 连接成重组表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF。25  $\mu\text{l}$  连接体系含回收产物 5  $\mu\text{l}$ , 10  $\times$  连接缓冲液 2.5  $\mu\text{l}$ , 载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 1  $\mu\text{l}$ , T<sub>4</sub> DNA 连接酶 1  $\mu\text{l}$ , 混匀后置 16 $^\circ\text{C}$ , 12 h。将 10  $\mu\text{l}$  连接产物以冷  $\text{CaCl}_2$  法转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  并行潮霉素 B (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 筛选, 以未转染菌和转染载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 菌为对照, 经菌落直接 PCR、*Mlu* I 和 *Sal* I 双酶切等方法, 确定目标片段的在。增菌后提取重组载体, 测定浓度, 用于转染。

**1.2.4 细胞转染与鉴定** 采用脂质体转染法进行重组表达载体的转染: 取静置培养处对数生长期的 Raji 细胞, 以  $1 \times 10^6$ /孔接种至 6 孔板, 按脂质体转染试剂盒说明书操作, 将重组表达载体、脂质体和细胞悬液混匀物 37 $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  常规静置培养 24 h 后, 用 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  潮霉素 B 进行筛选。以载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染 Raji 细胞为阴性对照, 以未处理 Raji 细胞和仅加脂质体 Raji 细胞为空白对照。取筛选后存活组  $5 \times 10^5$  个细胞提取总 RNA, 行 RT-PCR, 电泳, 检测 HGF 基因的存在以确定转染成功。

**1.2.5 转染后 HGF 基因表达的鉴定**

**1.2.5.1 实时荧光定量 (FQ) PCR 检测转染细胞 HGF mRNA 的表达** 取第 1、7、15 代培养物各约  $5 \times 10^5$  个细胞提取总 RNA, RT 后采用实时 FQ-PCR<sup>[5]</sup> 检测 HGF mRNA 的表达水平, 上游引物: 5'-GGA TGG ATG GTT AGT TTG AGA TAC A-3'; 下游引物: 5'-CTC TTC CGT GGA CAT CAT GAA T-3', 双荧光标记探针: 5' FAM-CTT ACT GCA CGA CAG TGT TTC CCT TCT

CGA-TAMRA3'。以未转染 Raji 细胞和载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染组为对照。

**1.2.5.2 ELISA 法定量检测转染细胞 HGF 蛋白的表达** 取上述各代培养物上清液, 采用 ELISA 法按 HGF ELISA 试剂盒说明书测定 HGF 蛋白浓度<sup>[6]</sup>, 以未转染 Raji 细胞组、载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染组和培养基作为对照。

**1.2.5.3 免疫细胞组化检测转染细胞 HGF 蛋白的表达** 取转染的 Raji 细胞涂片, 甲醇固定, 0.5% 过氧化氢灭活内源性酶, 1% 牛血清白蛋白封闭; 加生物素化抗 HGF 单抗<sup>[6]</sup>, 4 $^\circ\text{C}$  12 h; 加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素, 室温避光 1 h; 加底物四甲基联苯胺, 避光显色, 镜检, 细胞浆呈蓝染或有蓝色颗粒者为阳性。未转染 Raji 细胞组和载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染组作为对照。

**1.2.5.4 Western blot 检测转染细胞 HGF 蛋白的表达** 取转染的 Raji 细胞培养上清液, 行 12% SDS-PAGE, 转至 PVDF 膜, 封闭; 加 500 倍稀释的兔抗人 HGF 多克隆抗体<sup>[6]</sup>, 4 $^\circ\text{C}$  过夜; 洗膜后加 1 000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗兔多抗, 室温振荡 1 h; 洗膜后以 DAB 试剂盒显色。以未转染 Raji 细胞组和载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染组作为对照。

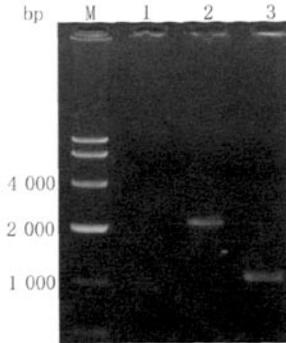
**1.2.5.5 HGF 基因转染后 Raji 细胞的生物学性状变化** 取转染的 Raji 细胞分别作半固体克隆培养、穿刺培养和单层细胞培养, 37 $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  常规静置培养。第 3 天起每天观察细胞生长情况至第 14 天, 照相记录集落形成情况, 分别评价对 Raji 细胞的增殖和侵袭及迁徙等生物学性状的影响。以未转染 Raji 细胞组和载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染组作为对照。

**1.3 统计学处理** 实验数据均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用统计软件 SPSS 12.0 作方差分析, 两两比较采用 *q* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HGF 基因的克隆与扩增** RT-PCR 扩增产物经 15 V/cm、含 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EB 的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 发现存在一约为 2.2 kb 的特异性条带, 与目的片段大小相似 (2 229 bp), 提示

HGF 基因 cDNA 已成功克隆(图 1)。



M:DNA 分子标准; 1: 阴性对照; 2: HGF 基因的 RT-PCR 产物; 3:  $\beta$ -actin.

图 1 HGF 基因的 RT-PCR 产物

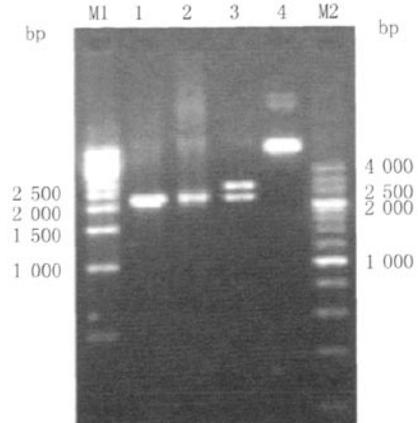
Fig. 1 RT-PCR product of HGF gene

**2.2 重组克隆载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple-HGF 的构建与鉴定** 将纯化的 HGF 基因 cDNA 与载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple 连接, 获得重组克隆载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple-HGF, 转染 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 行氨苄青霉素和  $\alpha$  筛选获阳性菌落, 增菌后提取重组克隆载体。将菌落直接 PCR 产物、*Sal* I 和 *Mlu* I 双酶切产物、重组载体提取物同时以同上条件电泳, 发现存在与目的片段相似大小(2 229 bp) 的特异性条带, 提示 pMD<sub>19</sub>-T Simple-HGF 重组克隆载体构建成功(图 2)。

取纯化的重组克隆载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple-HGF, 采用双脱氧链末端终止法行双向测序, 序列测定结果与 Genebank 报道的 2.3 kb HGF mRNA 的 cDNA 序列(M60718) [长度为 2 306 bp, cds = (73, 2 259)] 报道区域(69, 2 285) 的序列相同, 表明重组于载体 HGF 基因片段序列正确。

**2.3 重组表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 的构建与鉴定** 重组克隆载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple-HGF 经 *Mlu* I、*Sal* I 双酶切后回收目的片段, 与经相同双酶切的载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 连接, 获得重组表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF, 转染 *E. coli* DH5 $\alpha$  行潮霉素 B 筛选出阳性菌落, 扩增后提取重组载体。将 HGF 基因的 RT-PCR 产物、菌落直接 PCR 产物、*Sal* I 和 *Mlu* I 双酶切产物、

重组载体提取物, 同时以同上条件电泳, 发现有与目的片段相似大小(2 229 bp) 的特异性条带存在, 提示重组表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 获成功构建(图 3)。



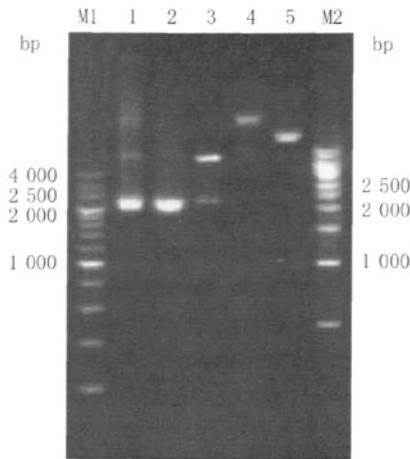
M1、M2:DNA 分子标准; 1:HGF 基因的 RT-PCR 产物; 2: 阳性菌落的直接 PCR 产物; 3: 重组载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple-HGF 经 *Sal*I、*Mlu*I 双酶切后的产物; 4: 未酶切的重组载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple-HGF.

图 2 重组克隆载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple-HGF 的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant cloning vector pMD<sub>19</sub>-T Simple-HGF

**2.4 转染后阳性克隆筛选与鉴定** 各组经 50  $\mu$ g/ml 潮霉素 B 处理 6 天后出现大量细胞死亡。约 2 周后空白对照组均死亡, 而阴性对照和实验组存活。约 26 天后存活细胞增加, 50  $\mu$ g/ml 潮霉素 B 维持, 并扩大培养。分别取各组细胞  $5 \times 10^5$  个提取总 RNA, 行 RT-PCR。扩增产物经电泳发现, 实验组存在特异性条带(2 229 bp), 而空白对照组和阴性对照组均未发现, 提示重组表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 已成功转染, 且对照组无 HGF mRNA 表达(图 4)。

**2.5 HGF 基因转染后表达的检测** 分别采用实时 FQ-PCR 和 ELISA 法检测第 1、7、15 代培养物 HGF mRNA 和培养液上清中 HGF 蛋白的水平, 结果发现: HGF mRNA 分别为  $7.83 \pm 0.52$ 、 $7.15 \pm 0.41$ 、 $7.67 \pm 0.39$ , HGF 蛋白浓度分别为  $5.31 \pm 0.37$  ng/ml、 $5.24 \pm 0.43$  ng/ml、

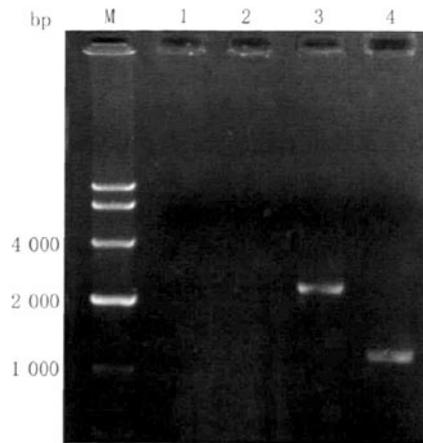


M1, M2: DNA 分子标准; 1: 重组载体 pVITRO<sub>2</sub>-HGF 的 PCR 产物; 2: 阳性菌落的直接 PCR 产物; 3: 重组载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HG 经 *Sal* I, *Mlu* I 双酶切后产物; 4: 未酶切 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF; 5: 载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs.

**图 3** 重组表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 的鉴定

**Fig. 3** Identification of recombinant expression vector pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF

5.47 ± 0.29 ng/ml, 而对照组均呈极弱表达或不表达, 结果提示第 1、7、15 代培养物 HGF 的 mRNA 和蛋白表达均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

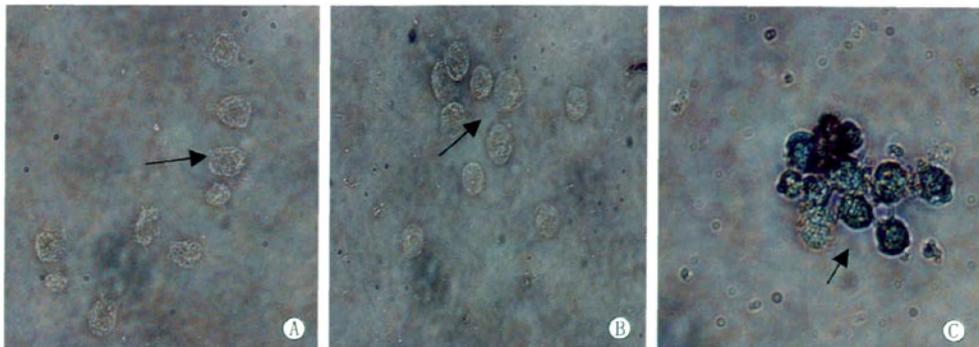


M: DNA 分子标准; 1: 未转染 Raji 细胞; 2: 载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染的 Raji 细胞; 3: 重组载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 转染的 Raji 细胞; 4:  $\beta$ -actin.

**图 4** RT-PCR 鉴定转染后阳性细胞中 HGF 基因的表达

**Fig. 4** Identification of expression of HGF gene in positive transfected cell strain by RT-PCR

免疫细胞组化结果表明, 重组表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 转染细胞的细胞浆呈蓝色且有明显的蓝色颗粒, 而未转染 Raji 细胞组和载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染组均为阴性, 提示转染后 Raji 细胞中有 HGF 蛋白表达(图 5)。



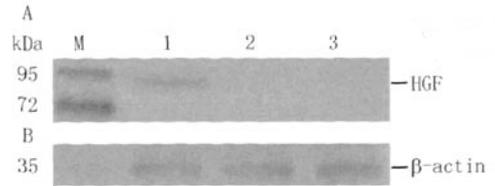
A: 未转染的 Raji 细胞; B: 载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染的 Raji 细胞; C: 重组载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 转染的 Raji 细胞(×400).

**图 5** 免疫细胞组化检测转染 HGF 基因后 Raji 细胞的 HGF 蛋白表达

**Fig. 5** Expression of HGF protein in Raji cells transfected with HGF gene by immunocytochemistry

Western blot 结果表明,转染 HGF 基因的 Raji 细胞培养液有大小约为 90 kDa 的蛋白条带存在,而对照组均无,提示 HGF 基因转染 Raji 细胞后可表达 HGF 蛋白(图 6)。

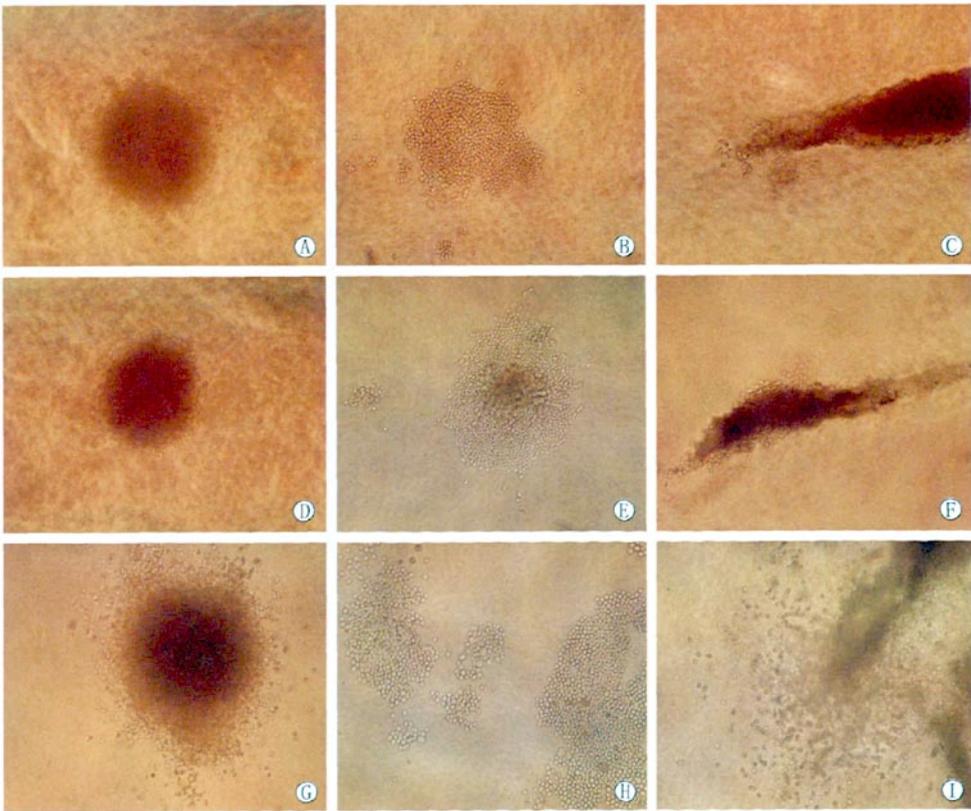
细胞培养试验表明,经 37℃、5% CO<sub>2</sub> 半固体培养至 14 天时发现:行克隆培养的 2 对照组形成的克隆边缘较整齐,向外生长细胞少,而 HGF 基因转染细胞形成的克隆明显大,边缘细胞呈辐射状向外生长;经单层培养发现,HGF 基因转染组明显较 2 对照组形成的单层细胞团更呈无规则生长;经穿刺培养结果更为直观,各组均有条索状细胞团形成,但与对照组相比,实验组细胞团明显疏松且呈发散性向周围生长,提示 HGF 基因转染促进了 Raji 细胞的增殖和迁徙及侵袭(图 7)。



A: HGF 蛋白; B.  $\beta$ -actin; M: 标准蛋白分子量; 1: 重组载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 转染的 Raji 细胞; 2: 未转染的 Raji 细胞; 3: 载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染的 Raji 细胞。

图 6 Western blot 检测转染 HGF 基因后 Raji 细胞的 HGF 蛋白表达

Fig. 6 Expression of HGF protein in Raji cells transfected with HGF gene by Western blot



A, B, C: 未转染的 Raji 细胞; D, E, F: 载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染的 Raji 细胞; G, H, I: 重组载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 转染的 Raji 细胞. A, D, G: 常规克隆培养; B, E, H: 单层培养; C, F, I: 穿刺培养(×100).

图 7 HGF 基因转染对 Raji 细胞生物学性状的影响

Fig. 7 Influences of HGF gene transfection on the biological characters of Raji cells

上述结果提示,重组表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 转染 Raji 细胞后,能稳定表达 HGF,并促进 Raji 细胞的生物学性状变化。

### 3 讨论

研究证实,HGF 的生物学效应具有矛盾性<sup>[1-2]</sup>:一方面,HGF 可促进肿瘤的发生发展,另一方面,在胚胎形成、器官发生和正常组织形成及组织损伤再生等过程中发挥重要的有益作用。此外,Jiang 等<sup>[7]</sup>还发现 HGF 具潜在的促淋巴管生成活性,可能有助于肿瘤细胞在淋巴结的扩散。

HGF 与淋巴瘤的发生、发展及预后有密切的关系:淋巴瘤的发展过程中,往往伴随 HGF 水平的升高。两者可能存在相互促进关系:HGF 的高分泌促进淋巴瘤发生发展,而淋巴瘤细胞的增殖又促进 HGF 自分泌<sup>[3,8]</sup>。我们观察了 HGF 在淋巴瘤的表达和预后价值<sup>[5]</sup>,尚未见国内相关报道。

通过载体导入方式进行表达是目前研究基因功能的主要策略<sup>[9-11]</sup>,而转染导入是最为常用且稳定高效的研究方法<sup>[10-11]</sup>。我们设计特异性引物,通过 RT-PCR 克隆了 HGF 基因的编码序列(2 187 bp),并与载体 pMD<sub>19</sub>-T Simple 连接构建了重组克隆载体,完成了 HGF 基因克隆和扩增。氨苄青霉素和  $\alpha$ -筛选、Mlu I 和 Sal I 限制性双酶切及序列分析等途径,证实了 HGF 基因的存在和序列正确。在载体选择方面,目前腺病毒在 HGF 基因介导中最为常用,但因转染腺病毒而存在的潜在风险是今后研究,尤其是将来可能的临床研究所必须正视的。为避免这一问题,我们采用了原核/真核表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs,原因在于其不存在相应风险,同时可在 *E. coli* 和哺乳动物细胞中稳定高效表达,且可采用潮霉素 B 进行筛选。这样,既可利用 *E. coli* DH5 $\alpha$  的高效复制特性获得大量重组载体,也为成功转染后阳性 Raji 细胞的筛选提供技术保障。

我们采用多种方法对阳性细胞株进行鉴定以确认转染的成功:①采用 RT-PCR,发现重组表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 转染组存在 HGF 基因特异性产物,而空白对照组和阴性对照组

均未发现,证实 HGF 基因的成功重组。②免疫细胞组化结果表明:重组表达载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs-HGF 转染细胞呈阳性,而载体 pVITRO<sub>2</sub>-mcs 转染细胞、未转染 Raji 细胞均呈阴性,提示 HGF 基因转染后成功表达蛋白。③采用实时 PQ-PCR 和 ELISA,分别检测第 1、7、15 代培养物的细胞内 HGF mRNA 和培养液中 HGF 蛋白的水平,发现组间均无显著差异( $P > 0.05$ )。④分别采用常规克隆培养、穿刺培养和单层细胞培养等半固体培养方法发现,HGF 基因转染明显促进 Raji 细胞的增殖和迁徙及侵袭等生物学行为。上述结果证实,HGF 基因成功转染 Raji 细胞并能稳定表达,具有一定生物活性。

基于 HGF 通过 HGF/Met 信号转导途径发挥其生物学效应,因此,阻断该途径可能成为抗肿瘤治疗的新策略之一。目前,该策略主要有两类途径:其一是通过 c-MET 抑制剂,直接抑制受体酪氨酸激酶的活性<sup>[12]</sup>。其二是通过与 HGF 竞争性结合 c-MET,阻断 HGF/Met 信号转导途径<sup>[6,10,13]</sup>。本研究旨在通过在细胞水平观察 HGF 的生物学效应,继而开展动物实验行全面评价,从而为其抑制剂或拮抗剂的开发提供实验基础。

(致谢:感谢温州医学院附属台州医院颜卫华博士、林爱芬博士在基因转染相关工作中给予的指导和帮助。)

### References:

- [1] NAKAMURA K, NISHIZAWA T, HIGIYA M, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor [J]. *Nature*, 1989, 342 (6248):440-443.
- [2] FORTE G, MINIERI M, COSSA P, et al. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1):23-33.
- [3] TJIN E P, GROEN R W, VOGELZANG I, et al. Functional analysis of HGF/MET-signaling and aberrant HGF-activator expression in diffuse large B cell lymphoma [J]. *Blood*, 2006, 107(2):760-768.
- [4] CEN D, LU JX, PEI RZ, et al (岑东,吕建新,裴仁治,等). Clinical significance of hepatocyte

- growth factor mRNA expression in acute leukemia with real-time fluorescence quantitative PCR [J]. **Chinese Journal of internal medicine** (中华内科杂志), 2008, 47(5):401-404. (in Chinese)
- [5] CEN D, LI JX, PEI RZ, et al (岑东, 吕建新, 裴仁治, 等). Establishment of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction analysis system for hepatocyte growth factor mRNA expression and estimation of its value in lymphoma [J]. **Chinese Journal of laboratory medicine** (中华检验医学杂志), 2008, 31(4):384-388. (in Chinese)
- [6] SON G, HIRANO T, SEKI E, et al. Blockage of HGF/c-Met system by gene therapy (adenovirus-mediated NK4 gene) suppresses hepatocellular carcinoma in mice [J]. **J Hepatol**, 2006, 45(5):688-695.
- [7] JIANG W G, DAVIES G, MARTIN T A, et al. The potential lymphangiogenic effects of hepatocyte growth factor/scatter factor in vitro and *in vivo* [J]. **Int J Mol Med**, 2005, 16(4):723-728.
- [8] TOYAMA T, IDO A, SASAKI H, et al. Possible involvement of neutrophils in a serum level increase of hepatocyte growth factor in non-Hodgkin's lymphoma [J]. **Oncol Rep**, 2005, 13(3):439-444.
- [9] KANEHIRA M, XIN H, HOSHINO K, et al. Targeted delivery of NK4 to multiple lung tumors by bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. **Cancer Gene Ther**, 2007, 14(11):894-903.
- [10] OKASORA T, JO JI, TABATA Y. Augmented anti-tumor therapy through natural targetability of macrophages genetically engineered by NK4 plasmid DNA [J]. **Gene Ther**, 2008, 15(7):524-530.
- [11] DU W, HATTORI Y, YAMADA T, et al. NK4, an antagonist of hepatocyte growth factor (HGF), inhibits growth of multiple myeloma cells: molecular targeting of angiogenic growth factor [J]. **Blood**, 2007, 109(7):3042-3049.
- [12] ZOU H Y, LI Q, LEE J H, et al. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms [J]. **Cancer Res**, 2007, 67(9):4408-4417.
- [13] WEN J, MATSUMOTO K, TANIURA N, et al. Inhibition of colon cancer growth and metastasis by NK4 gene repetitive delivery in mice [J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2007, 35(1):117-123.

[责任编辑 张荣连]

## 浙江大学举办中国大型公立医院国际医疗合作论坛

2010年是中国全面推进医药卫生体制改革的关键之年。4月30日,由浙江大学医学院主办的中国大型公立医院国际医疗合作论坛在杭州举行。来自全国70多家大型公立医院的代表,就推进公立医院改革试点、研究建立公立医院国际医疗实体化合作模式和运行机制进行了探讨。

美国加州大学洛杉矶分校(UCLA)医学院副院长孙仁说,医学领域国际合作成功的关键因素是“人”。如何培养“人”的观念、理念,这是达到国际间医学思想无缝链接的关键。浙江大学医学院附属第二医院院长王建安表示,向UCLA学技术,不仅要消化吸收,还要根据医院的具体情况充分融合。浙江大学医学院附属第一医院院长郑树森院士从自身研究领域出发,提出了坚持医疗技术创新、打造创新科研平台等建议。

目前,浙江大学医学部及其7家附属医院,已与美国加州大学洛杉矶分校医学院、德国基尔大学医学院、美国罗马琳达大学医学院、美国布朗大学医学院、美国罗切斯特医学中心、美国希望城国家医学中心等多所国际知名医学院校和医院,建立了良好的合作关系。