

## 人肝细胞生长因子 cDNA 克隆在 CHO 细胞中的表达

李孝圭\* 应其龙 顾云娣\*\* 朱 慧 张艳玲 宋后燕

(上海医科大学分子遗传研究室,组胚教研室\*\* 上海 200032)

肝细胞生长因子是一种由  $\alpha$ 、 $\beta$  链组成的杂合二聚体糖蛋白,能促进肝细胞、多种上皮细胞、内皮细胞和神经胶质细胞的有丝分裂,并对多种肿瘤细胞具有细胞毒性作用或者抑制其生长<sup>[1-4]</sup>,其作用无种属特异性,如人肝细胞生长因子能促进大鼠肝细胞增殖<sup>[5]</sup>。由于天然 HGF 分离纯化非常困难,我们采用 RT-PCR 方法以胎肝 mRNA 为模板克隆人肝细胞生长因子 cDNA,经核苷酸序列分析证实 C 末端接近终止密码区比文献报道增加两个氨基酸编码序列(另文发表)。将 hHGF 全长 cDNA 与 pcDNA3 载体构建哺乳动物细胞表达质粒,后者转染 CHO 细胞,用 G418 筛选阳性克隆,同时测定表达产物的活性。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

1.1.1 质粒:含 hHGF 全长 cDNA 的 pSL-1 质粒系本室采用 RT-PCR 方法克隆获得<sup>[6]</sup>,pcDNA3 质粒购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 酶与试剂:限制酶购自 BRL 公司和 Promega 公司,T4 DNA 连接酶购自 BM 公司,磷酸钙沉淀法转染试剂盒购自 BRL 公司,质粒纯化柱购自 Pharmacia 公司,胶原酶购自 Sigma 公司,MTT 购自 Fluka Biochemica 公司,用 0.01 mmol/L PBS pH7.2,0.14 mol/L NaCl 配成 5 mg/ml,膜过滤除菌,4℃ 避光保存。

1.1.3 细胞和培养基:CHO 细胞系本室保存,其生长培养基为 DMEM,10% 小牛血清,青霉素和链霉素各 100 u/ml,选择培养基为上述培养基加入 G418 组成。

1.1.4 Wistar 大鼠由本校实验动物部提供。

#### 1.2 方 法

1.2.1 hHGF 真核表达质粒的构建:将 pSL-1 质粒中的 hHGF cDNA(2.2kb)经 T4DNA 连接酶插入到 pcDNA3Xba I 和 BamHI 位点上,构建哺乳动物细胞表达质粒,命名为 pSL-3,采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定内切酶图谱。pSL-3 质粒转化大肠杆菌 JM109 进行扩增,用 Qiagen Kit 抽提质粒并溶于 TE 缓冲液,置于 -20℃ 保存。

1.2.2 pSL-3 转染 CHO 细胞:CHO 细胞在 DMEM 生长培养基中培养,转染前 3h 换培养液 1 次,以 20  $\mu$ g pSL 3 质粒转染 CHO 细胞,转染步骤按磷酸钙沉淀试剂盒说明书进行,转染后 12 h 换培养液,60h 后以终浓度为 300~500  $\mu$ g/ml 的 G418 筛选阳性克隆。

1.2.3 hHGF 生物学活性测定:A.大鼠原代肝细胞的分离:雄性 Wistar 大鼠体重约 180~200 g,异戊巴比妥钠麻醉后,常规消毒,剖腹分离门静脉进行插管,用无钙的 Krebs-henseleit 溶液(pH7.4)灌注肝脏约 10min,再以含 0.05% 胶原酶含钙缓冲液灌注约 6~8min,取出肝脏,去除肝包膜,加入含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,轻轻吹打分散肝细胞,经尼龙网过滤后离心弃上清,再以 RPMI-1640 培养液洗 1 次,用 0.05% 胎蓝染色检测细胞活力,以含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液调节细胞浓度。B. MTT 法测定 hHGF 对肝细胞和 HepG2 肝癌细胞的生物学活性:取上述肝细胞液加入 96 孔培养板,每孔

\* 现在中科院上海生命科学研究中心工作,上海 200031。

收稿日期:1997-04-10,修回日期:1997-12-22。

200  $\mu\text{l}$ , 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 4 h 后, 绝大部分细胞贴壁, 更换培养液并加入不同数量阳性克隆培养液上清, 同时以 CHO 宿主细胞培养液上清作对照, 并加入 DMEM 培养液使每孔总液量均为 300  $\mu\text{l}$ , 第二天同样操作并更换培养液, 加入样品, 48h 后取出培养板, 每孔加入 MTT 溶液 20  $\mu\text{l}$ , 继续培养 4 h, 小心吸弃每孔上清, 再加入 100  $\mu\text{l}$  DMSO, 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜, 酶标仪测定光吸收, 测定波长 570 nm。HepG2 细胞传代培养 3~4 d 处于对数生长期, 用 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液调节细胞浓度, 加入 96 孔板培养, 按上述 MTT 法观察阳性克隆培养液对 HepG2 细胞增殖的影响。将 hHGF 对肝细胞或 HepG2 细胞增殖的影响定义为:

$$\text{增殖率} \% = (\text{用药孔 OD 值} - \text{对照孔 OD 值}) / \text{对照组 OD 值} \times 100$$

正值为刺激细胞增殖, 负值为抑制细胞增殖。

## 2 结 果

### 2.1 pSL-3 质粒的构建

将本室构建的 pSL-1 质粒中 hHGFcDNA 插入到 pcDNA3 质粒的 BamH I 和 Xba I 位点上, 构建的 pSL-3 质粒如图 1, 其内切酶图谱如图 2。

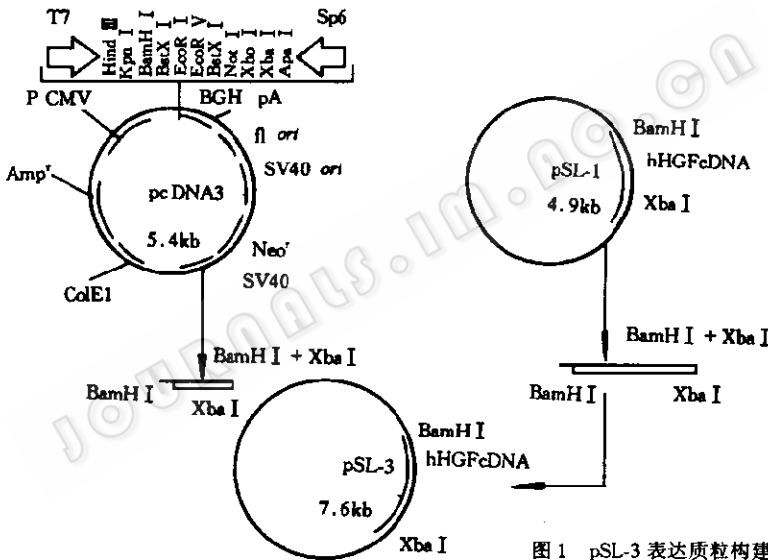


图 1 pSL-3 表达质粒构建图

### 2.2 hHGF 在 CHO 细胞中的表达

纯化 pSL-3 质粒转染 CHO 细胞后在含有 G418 的 DMEM 培养基中培养, 约 2 周后出现阳性克隆, 挑出阳性克隆, 继续以含 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 的 DMEM 培养基培养, 然后以不含 G418 的 10% 小牛血清 DMEM 扩增培养阳性克隆, 1 周后收集 CHO 培养液, 用于测定生物学活性。

### 2.3 肝细胞生长因子生物学活性测定

收集表达阳性克隆培养液, 测定 hHGF 的生物学活性。如表 1 所示, 随着所加含 hHGF 的条件培养液量的增加, 刺激肝细胞生长的增殖率越高, 最高达到 150% 以上, 而对 HepG2 细胞的抑制作用也越强, 最大抑制效应达到 40% 以上。

## 3 讨 论

MTT 显示法的原理是利用活细胞线粒体脱氢酶将染料 MTT 还原成甲臜颗粒, 以颗粒溶解后所显示的染色深浅(以 OD 值表示)反映活细胞的数量以及代谢的活跃程度, 与  $^3\text{H}$ -TdR 掺入法反映细胞增殖状态无明显差异<sup>[7]</sup>。

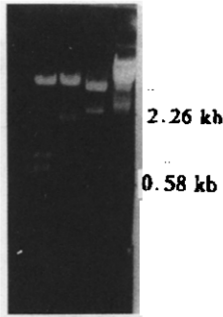


图2 pSL-3质粒的内切酶图谱

- A. pSL-3/EcoR I : 0.6kb, 0.8kb, 6.2kb  
 B. pSL-3/EcoRV + Xba I ; 1.5kb, 6.1kb  
 C. pSL-3/BamH I + Xba I ; 2.2kb, 5.4kb  
 D.  $\lambda$ /Hind III

表1 含 hHGF 的 CHO 培养液上清对 HepG2 和原代大鼠肝细胞作用的比较

条件培养基 用量/ $\mu$ l	MTT 法增殖率	
	原代大鼠肝细胞	HepG2 细胞
10	17.8 $\pm$ 4.5	-21.6 $\pm$ 2.5
20	45.8 $\pm$ 3.8	-28.6 $\pm$ 3.4
40	94.1 $\pm$ 9.9	-31.9 $\pm$ 1.6
60	156.8 $\pm$ 11.8	-47.2 $\pm$ 5.4
80	158.1 $\pm$ 8.5	-46.8 $\pm$ 4.8

我们采用 pcDNA3 载体构建了一种哺乳动物细胞表达 hHGF 的质粒。重组质粒转染 CHO 细胞后, 人肝细胞生长因子得到表达, 通过 MTT 法显示表达产物能促进原代大鼠肝细胞增殖, 并能抑制 HepG2 细胞的分裂, 结果表明重组产物 hHGF 具有生物学活性, 为 hHGF 的基因工程生产奠定了基础, 但表达水平有待进一步提高。

### 参 考 文 献

- Ilgawa T, Kanda S, Kanetake H *et al.* Biophy Biochem Res Commun, 1991, 174(2):831
- Krasnoselsky A, Massay M J, DeFrances M C *et al.* J Neurosci, 1994, 14(12):7284
- Shiota G, Rhoads D S, Wang T C *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:373
- Honda S A, Kagoshima M, Wanaka A *et al.* Brain Res Mol Brain Res, 1995, 32(2):197
- Matsumoto K, Nakamura T. J Biochem, 1996, 119:591
- 李孝圭, 顾银良, 朱运松等. 药物生物技术, 1997, 4(4):193
- 虞冠华, 龙 娜, 施凤霞等. 细胞生物学杂志, 1994, 16(1):48

## Expression of Human Hepatocyte Growth Factor with Chinese Hamster Ovary(CHO) Cells

Li Xiaogui Ying Qilong Gu Yundi\* Zhu Hui Zhang Yanling Song Houyan

(Department of Molecular Genetics, \* Department of Histology and Embryology of Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

**Abstract** The cDNA gene encoding human hepatocyte growth factor(hHGF) was inserted into pcDNA3 plasmid and obtained pcDNA3/hHGF expression plasmid. The pcDNA3/hHGF plasmid was transfected into CHO cells with calcium phosphate-DNA precipitate method. The expression clones was obtained by G418 selection. The culture supernatant from the positive clones could stimulating the mitosis of primary culture of rat hepatocytes and inhibiting proliferation of HepG2 cells were observed.

**Key words** Expression of hHGF cDNA, CHO cells, HepG2 cells