

HNF4 α 真核表达载体的构建及其在人脐带间充质干细胞中的表达

禹亚彬,杭化莲*,卞建民

(南京医科大学附属南京医院普外科,江苏 南京 210006)

[摘要] 目的:构建 pcDNA3.1/HNF4 α 重组质粒,转染人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUMSCs),并检测其在 HUMSCs 中的表达。方法:采用基因重组技术构建载体 pcDNA3.1/HNF4 α ,经酶切和 DNA 测序鉴定,通过脂质体法转染 HUMSCs 后,进行 RT-PCR 和 Western blot 分析,免疫荧光检测转染后 1 周肝特异性生化指标。结果:成功构建真核表达质粒 pcDNA3.1/HNF4 α ,转染人脐带间充质干细胞后,RT-PCR 示转染后 HNF4 α mRNA 表达,Western blot 分析见 HNF4 α 蛋白表达,免疫荧光示转染 1 周后 HNF4 α 促进了 HUMSCs 向肝细胞方向分化。结论:成功构建真核表达载体,并在 HUMSCs 中正确表达,为进一步研究 HNF4 α 在干细胞向肝细胞分化中作用提供了实验基础。

[关键词] 质粒构建;HNF4 α ;人脐带间充质干细胞;肝细胞分化

[中图分类号] R329.26

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)10-1356-05

Construction of HNF4 α eukaryotic expression vector and its expression in human umbilical cord mesenchymal stem cells

YU Ya-bin, HANG Hua-lian*, BIAN Jian-min

(Department of General Surgery, Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To construct plasmid pcDNA3.1/HNF4 α , transfect it into human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUMSCs), and detect the expression in HUMSCs. **Methods:** pcDNA3.1/HNF4 α vector was constructed with recombinant DNA technology. After detected by enzyme digestion and DNA sequencing, the plasmid was transfected into HUMSCs. The expression of HNF4 α was detected simultaneously by using RT-PCR and Western blot. The hepatic specific protein ALB and AFP was detected by immunofluorescence after one week's transfection. **Results:** The plasmid pcDNA3.1/HNF4 α was constructed successfully. RT-PCR and Western blot results confirmed that HUMSCs expressed HNF4 α after transfection. The green fluorescent protein could be identified by immunofluorescence after one week's transfection. **Conclusion:** Recombinant eukaryote plasmid pcDNA3.1/HNF4 α was successfully constructed, and the HNF4 α protein can be expressed in HUMSCs.

[Key words] plasmid construction; HNF4 α ; human umbilical cord mesenchymal stem cells; hepatic differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(10): 1356-1360]

肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α) 是核激素受体超家族的一员,高表达于肝脏组织,在小肠、胰腺以及肾脏组织中也有表达。在成人肝脏中,HNF4 α 可与 12% 的基因启动子结合^[1]。HNF4 α 处于转录因子“网络调控”的上游,是肝细胞分化 and 功能维持最为关键的转录因子。本研究构建了人 HNF4 α 基因的真核表达载体,转染人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUMSCs),为研究其在 MSCs 分化为

肝细胞过程中的作用提供了良好的研究对象^[2]。

1 材料与方法

1.1 材料

脐带由南京医科大学附属南京医院妇产科提供,菌种 DH5 α (碧云天公司),限制性内切酶 *Eco*I 和 *Bam*H I (TaKaRa 公司,日本),质粒中量抽取试剂盒 (Promega 公司,美国),Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司,美国),细胞培养用 DMEM、胰酶、胎牛血清 (Hyclone 公司,美国),RT-PCR 试剂盒 (南京凯基公司),Western blot 用一抗 HNF4 α (Santa Cruz 公司,美国), β -actin (南京凯基公司),二抗 (博奥森公司)。

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81100306)

*通讯作者, E-mail: drhanghl-nju@163.com

1.2 方法

1.2.1 获取人 HNF4 α 基因

设计可以扩增 HNF4 α 全长的引物,上游引物为 5'-AGGATCCATGCGACTCTCCAAAACCCTCG-3',下游引物为 5'-AGAATTCCTAGATAACTTCCTGCTTGGTG-3'。提取原代肝细胞总 RNA 进行 RT-PCR,PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 解链 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 33 次,72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。扩增产物在琼脂糖凝胶上电泳,采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收并纯化目的基因片段。

1.2.2 载体的构建

使用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切消化 PCR 产物及 pcDNA3.1 载体,回收目的片段及载体,T4 连接酶 4 $^{\circ}$ C 连接过夜,转化到 DH5 α 感受态细菌,挑选克隆,37 $^{\circ}$ C 摇床过夜扩增,次日提取质粒,操作按说明书进行,选用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定重组质粒 pcDNA3.1/HNF4 α ,1% 琼脂糖电泳,目的片段回收后送公司测序证实。

1.2.3 HUMSCs 的分离与培养

在征得胎儿父母同意后取健康剖宫产胎儿脐带,无菌条件下将脐带中的血液冲洗干净,撕下动静脉,剥掉外层的羊膜,将脐带剪成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 的组织块,置于培养皿中,加入适量含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM,5% 二氧化碳饱和温度培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养。待细胞贴壁后,将组织块移除,此后每 3~

4 d 换液 1 次,细胞达 80% 左右融合时用 0.25% 胰酶消化,按 1:3 比例传代培养。

1.2.4 流式细胞仪鉴定 HUMSCs

取 P3 细胞密度达 80%~90% 汇合,0.25% 胰酶消化细胞,细胞离心后用 PBS 洗 2 次,最后加入 1 ml PBS 重悬细胞,计数,每 BD 管中加入细胞 2×10^5 个/ml。再次离心去上清,200 μ l PBS 重悬细胞,按抗体使用说明书中的量加入流式直标抗体 CD90、CD105、CD13、CD59、HLA-DR、CD45、CD34,4 $^{\circ}$ C 暗室染色 30 min,加入 3 ml PBS,离心后洗 2 次,用流式固定液固定待测,流式细胞仪为 BD 公司的 FACSCalibur systems。

1.2.5 转染 HUMSCs

将干细胞接种于 6 孔板中,当细胞铺满瓶底 80%~90% 后,采用阳离子脂质体将质粒 pcDNA3.1/HNF4 α 转染到 HUMSCs 中,对照组转染空质粒 pcDNA3.1,操作步骤按 Lipofactamine2000 说明书进行。

1.2.6 RT-PCR 检测 HUMSCs 中 HNF4 α 基因 mRNA 的转录

细胞转染 48 h 后,吸去培养基,加入 PBS 洗 2 次,再加入 TRIzol 裂解细胞,提取细胞总 RNA,按照说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,PCR 扩增出目的片段。引物序列及退火温度见表 1,PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 解链 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 35 次,72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。取 5 μ l PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers

基因	引物序列	目的片段长度	退火温度
HNF4 α	F:GCACCAACCTCAACGC	313 bp	56 $^{\circ}$ C
	R:AGGCTGCTGTCTCATAG		
GAPDH	F:AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	258 bp	52 $^{\circ}$ C
	R:AGGGCCATCCACAGTCTTC		

1.2.7 Western-Blot 检测 HUMSCs 中 HNF4 α 蛋白表达

细胞转染 48 h 后,吸去培养基后,加入冷 PBS 洗 2 次,再加入细胞裂解液,用细胞刮匙刮下贴壁细胞,将细胞及裂解液转移至离心管中,4 $^{\circ}$ C 摇床温和震荡 15 min,高速离心 15 min 后取上清,加入 5 \times SDS 加样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 变性 5 min。经 10% 的 SDS-PAGE 分离蛋白,转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入小鼠抗人 HNF4 α 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日加入羊抗小鼠二抗,室温孵育 2 h 后,碱性磷酸酶显色液中显色。

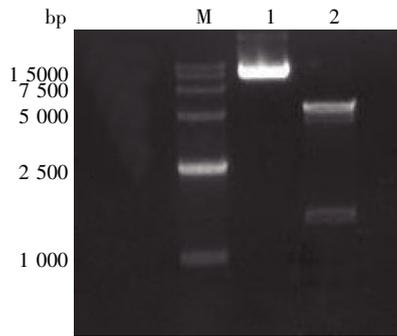
1.2.8 免疫荧光分析甲胎蛋白(ALB)、白蛋白(AFP)

将转染后 1 周的细胞用 PBS 洗 2 次,再加入 4% 多聚甲醛固定 30 min。固定后 PBS 洗 3 次,加入 0.1% Triton X-100 破膜 20 min。然后加入小鼠抗人 AFP 与 ALB 一抗并于 4 $^{\circ}$ C 过夜,次日加入二抗 Dy-light594 羊抗小鼠免疫球蛋白 G,DAPI 复染细胞核,最后封片上镜观察。对照组为转入空质粒 pcDNA3.11 周后细胞。

2 结果

2.1 pcDNA3.1/HNF4 α 真核质粒载体酶切鉴定及测序结果

pcDNA3.1/HNF4 α 质粒进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切。结果显示,双酶切后产物在 1.4 kb 和 5 kb 左右各出现 1 条阳性条带,与目的基因大小和空质粒 pcDNA3.1 大小相符(图 1)。目的基因测序结果与 GenBank 网站公布的 HNF4 α 序列经 Blast 完全相同,无一错配。



M; Marker; 1; pcDNA3.1/HNF4 α ; 2; pcDNA3.1/HNF4 α was digested with *EcoR* I and *Bam*H I。

图 1 pcDNA3.1/HNF4 α 双酶切鉴定图

Figure 1 Identification of pcDNA3.1/HNF4 α by double enzyme digestion

2.2 HuMSCs 形态观察

脐带组织块贴壁培养 2 周后见细胞从组织块边缘游出, 移除组织块继续培养 1 周, 细胞达 80%~90% 融合, 细胞传代培养后生长加快, 细胞生长排列规则, 形态大多呈梭形、多边形及不规则形(图 2)。

2.3 HUMSCs 鉴定结果

流式细胞鉴定结果示细胞高表达间充质细胞相关抗原 CD90、CD105 和 CD13, 而低表达造血细胞相关抗原 CD34、CD45 和 HLA-DR(图 3)。

2.4 RT-PCR 检测 HNF4 α 基因的转录

pcDNA3.1/HNF4 α 转染细胞 48 h 后, 通过 RT-PCR 技术检测 HNF4 α 基因表达情况。结果可见, 转染目的基因组有 HNF4 α 表达, 转染质粒 pcDNA3.1 组无 HNF4 α 表达(图 4)。

2.5 Western blot 检测 HNF4 α 蛋白的表达

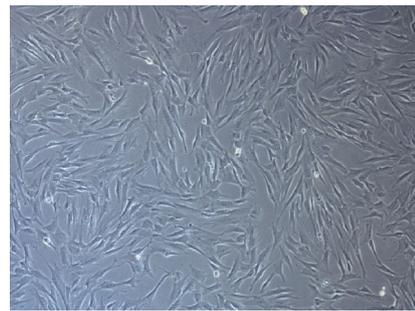
质粒转染细胞 48 h 提取总蛋白, 用 Western blot 检测 HNF4 α 蛋白表达情况。结果发现, 转染 HNF4 α 组可见目的蛋白表达, 对照组不表达(图 5)。

2.6 免疫荧光检测 AFP 与 ALB 表达

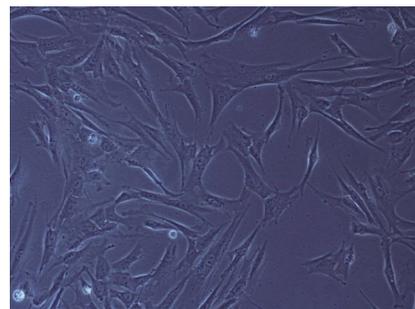
显微镜下观察, 转染 pcDNA3.1/HNF4 α 组见胞内有绿色荧光, 而对照组绿色荧光极弱。提示目的基因促进了干细胞向肝细胞方向的分化(图 6)。

3 讨论

生物人工肝和肝细胞移植通过对肝衰竭患者提



P2 HuMSCs ($\times 100$)



P2 HuMSCs ($\times 200$)

图 2 第 2 代 HuMSCs

Figure 2 Second passages of human umbilical cord mesenchymal stem cells

供代谢支持, 已经被认为是患者过渡到全肝移植的桥梁^[3-5]。理论上, 原代人肝细胞是最合适的肝细胞治疗来源, 但肝细胞来源有限, 不能满足临床应用需求, 且肝脏不易于保存、冷冻存活率较低^[6]。随着干细胞技术的发展, 越来越多的科研机构致力于研究一种简单高效的诱导干细胞分化为肝细胞的方法。

近年来肝细胞核因子被认为在肝脏发育和分化中起重要作用。维持肝细胞分化和控制肝脏特异性基因的表达在很大程度上归因于肝细胞核因子。研究显示, HNF4 α 对肝细胞形态功能和分化必不可少^[7-8]。Nagy 等^[9]发现在成熟肝脏中, HNF4 α 在卵圆细胞分化为肝细胞时即开始表达, 据此认为其在卵圆细胞向肝细胞分化过程中发挥重要作用。体外实验显示应用 RNAi 干扰 HNF4 α 表达后肝细胞分化被抑制, 在肝细胞中过表达 HNF4 α 可使肝细胞分化相关基因恢复表达, 肝功能恢复正常^[10-11]。此外, 国外一些研究表明, 上调 HNF4 α 表达可以促进多能性干细胞、骨髓间充质干细胞分化为肝细胞^[12-13]。本实验首次将 HNF4 α 转染进 HUMSCs 中并尝试诱导其向肝细胞分化。

HUMSCs 与胚胎干细胞以及其他一些干细胞相比更容易获得, 且不存在伦理学问题。HUMSCs 是具有高效增殖能力的专能干细胞, 移植后不具有致瘤性^[14]。另外在不使用免疫抑制剂的情况下, 异种移植

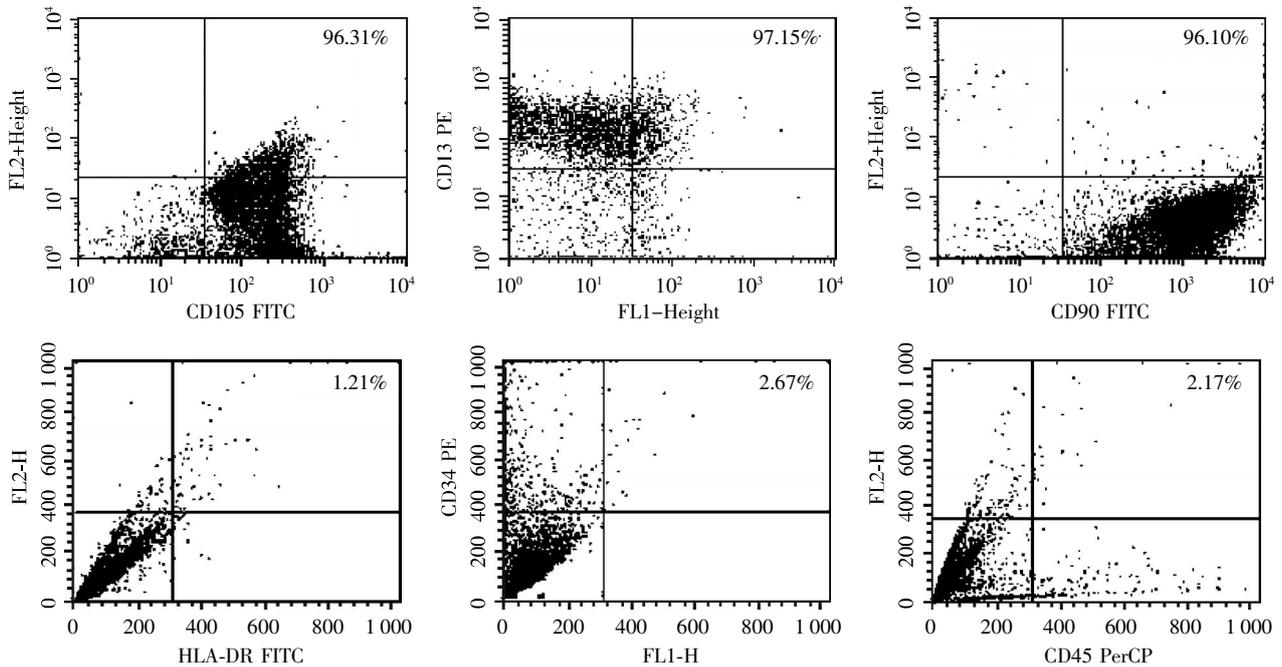
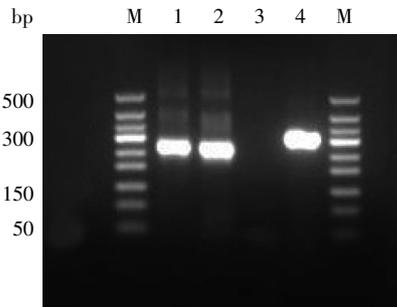


图 3 第 3 代 HuMSCs 流式细胞鉴定结果

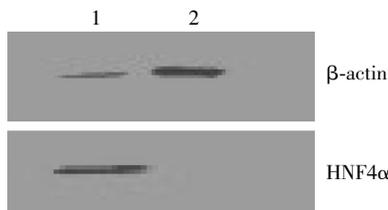
Figure 3 Phenotypes of third-passage human umbilical mesenchymal stem cells by flow cytometry



M: Marker; 1: GAPDH of transfected pcDNA3.1 group; 2: GAPDH of transfected pcDNA3.1/HNF4 α group; 3: HNF4 α of transfected pcDNA3.1 group; 4: HNF4 α of transfected pcDNA3.1/HNF4 α group.

图 4 RT-PCR 检测 HNF4 α 在转染后细胞中的表达

Figure 4 Expression of HNF4 α in transfected HuMSCs detected by RT-PCR



1: Transfected pcDNA3.1/HNF4 α group; 2: Transfected pcDNA3.1 group.

图 5 Western blot 检测 HNF4 α 在转染后细胞中的表达

Figure 5 Expression of HNF4 α in transfected HuMSCs detected by Western blot

HUMSCs 不会引起免疫反应^[15-16]。本实验采用组织块直接贴壁方法分离 HUMSCs, 组织贴壁 2 周后见

组织块边缘有大量纤维母细胞样细胞游出, 移除组织块后细胞生长加快。细胞传至 3 代, 本研究对这些纤维母细胞样细胞进行鉴定。流式细胞结果显示, 细胞表达 CD90、CD105、CD13 和 CD59, 这些表型主要是间质细胞、内皮细胞和表皮细胞的标志, 符合间充质干细胞的特征; 另外, 细胞不表达造血细胞和淋巴细胞标志 CD34、CD45 和人类白细胞抗原(HLA), 提示细胞纯度良好, 不包含或包含少量造血干细胞和脐血干细胞。本研究将质粒转入细胞中, 48 h 后通过 RT-PCR 和 Western blot 技术检测转染是否成功, 结果显示, 转染 pcDNA3.1/HNF4 α 质粒后 HUMSCs 中 HNF4 α mRNA 和蛋白都得到了表达, 而转染空质粒 pcDNA3.1 的对照组 HNF4 α 表达皆为阴性, 提示通过脂质体转染方法得到了很高的转染效率。为了检测转染 HNF4 α 是否有促进 HUMSCs 向肝细胞方向分化的作用, 通过免疫荧光技术来分析肝特异性蛋白 AFP 与 ALB 是否表达, 结果显示目的基因转染 1 周后荧光显微镜下细胞内有绿色荧光产生, 提示转染 HNF4 α 后细胞具有了部分肝细胞特征, 转染 HNF4 α 具有促进干细胞向肝细胞分化的功能, 这就为以后进一步开展 HNF4 α 促进分化机制的研究奠定了基础。综上所述, 本实验成功将目的基因 HNF4 α 转染入 HUMSCs 中, 转染后 1 周细胞具有了部分肝细胞特征, 具有良好的研究前景。

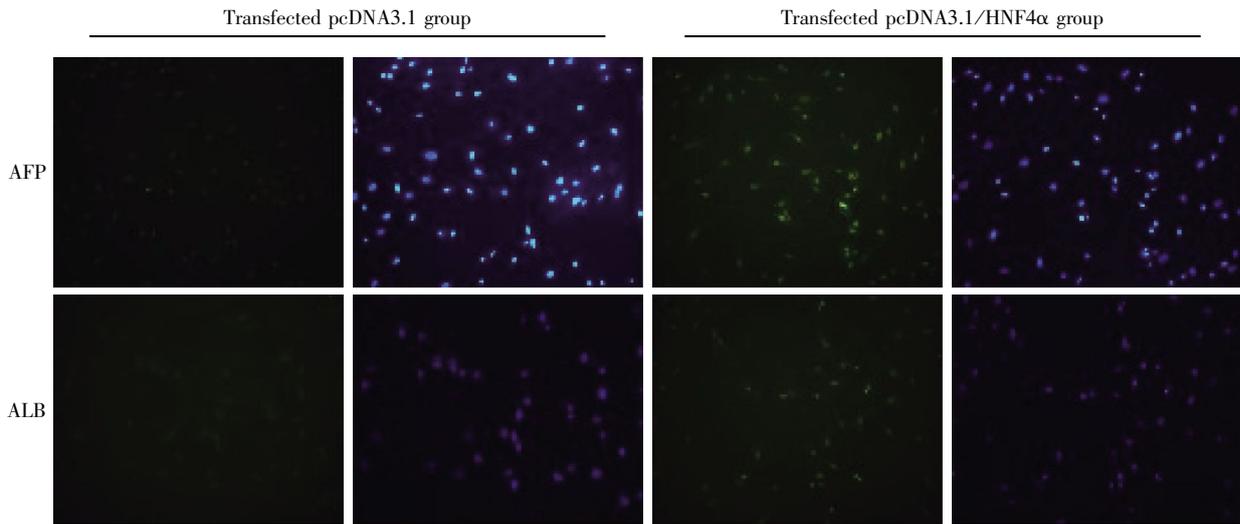


图 6 免疫荧光鉴定 AFP 与 ALB 表达

Figure 6 Expression of AFP and ALB was detected by immunofluorescence

[参考文献]

- [1] Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors[J]. *Science*, 2004, 303(5662): 1378-1381
- [2] Torres-Padilla ME, Fougere-Deschatrette C, Weiss MC. Expression of HNF4alpha isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3' end splicing [J]. *Mech Dev*, 2001, 109(2): 183-193
- [3] Strain AJ, Neuberger JM. A bioartificial liver--state of the art[J]. *Science*, 2002, 295(5557): 1005-1009
- [4] Terry CM, Blumenthal DK, Sikharam S, et al. Evaluation of histological techniques for quantifying haemodialysis arteriovenous (AV) graft hyperplasia [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21(11): 3172-3179
- [5] Li ZR, Mao XH, Hu XX, et al. Primary human hepatocyte transplantation in the therapy of hepatic failure: 2 cases report[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2012, 5(2): 165-168
- [6] 成峰, 王学浩, 钱晓峰, 等. 冷保存时间对部分肝移植肝再生影响的实验研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2006, 26(11): 1035-1037, 1055
- [7] Li J, Ning G, Duncan SA. Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(4): 464-474
- [8] Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(4): 1393-1403
- [9] Nagy P, Bisgaard HC, Thorgeirsson SS. Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation [J]. *J Cell Biol*, 1994, 126(1): 223-233
- [10] Kimata T, Nagaki M, Tsukada Y, et al. Hepatocyte nuclear factor-4alpha and -1 small interfering RNA inhibits hepatocyte differentiation induced by extracellular matrix [J]. *Hepatol Res*, 2006, 35(1): 3-9
- [11] Naiki T, Nagaki M, Asano T, et al. Adenovirus-mediated hepatocyte nuclear factor-4alpha overexpression maintains liver phenotype in cultured rat hepatocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(2): 496-500
- [12] Chen ML, Lee KD, Huang HC, et al. HNF-4alpha determines hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells from bone marrow [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(40): 5092-5103
- [13] Delaforest A, Nagaoka M, Si-Tayeb K, et al. HNF4A is essential for specification of hepatic progenitors from human pluripotent stem cells [J]. *Development*, 2011, 138(19): 4143-4153
- [14] Fong CY, Richards M, Manasi N, et al. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly [J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15(6): 708-718
- [15] Fu YS, Cheng YC, Lin MY, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons *in vitro*: potential therapeutic application for Parkinsonism [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1): 115-124
- [16] Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 781-792

[收稿日期] 2012-04-19