

[文章编号] 1000-1182(2011)02-0214-06

人血小板源性生长因子-B基因转染犬牙龈成纤维细胞的瞬时表达检测

钟泉¹ 闫福华¹ 李艳芬¹ 江一平²

(1.福建医科大学附属口腔医院 牙周科, 福州 350002; 2.福建医科大学 细胞与发育工程中心, 福州 350004)

[摘要] 目的 检测携带人血小板源性生长因子-B(hPDGF-B)基因的真核表达质粒在Beagle犬牙龈成纤维细胞内的表达。方法 扩增和鉴定携带hPDGF-B基因的质粒EX-A0380-M03, 脂质体介导的方法转染Beagle犬牙龈成纤维细胞, RT-PCR、免疫细胞化学、ELISA以及Western blot检测hPDGF-B的表达。结果 EX-A0380-M03所携带的目的基因为hPDGF-B基因, 转染牙龈成纤维细胞24 h后可观察到细胞内的绿色荧光蛋白, 48 h转染效率可达18%~38%。RT-PCR、免疫细胞化学、ELISA均能检测到细胞表达hPDGF-B。Western blot证实所表达的蛋白为融合蛋白。结论 携带hPDGF-B基因的真核表达载体EX-A0380-M03能被转入牙龈成纤维细胞, 并成功表达一种融合蛋白。

[关键词] 血小板源性生长因子-B; 基因转染; 牙龈成纤维细胞

[中图分类号] R 781.4 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.02.029

Transient expression of exogenous human platelet-derived growth factor-B in gingival fibroblasts of dog
ZHONG Quan¹, YAN Fu-hua¹, LI Yan-fen¹, JIANG Yi-ping². (1. Dept. of Periodontology, The Affiliated Stomatological Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350002, China; 2. Center of Cell Developmental Biology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China)

[Abstract] **Objective** To explore transient expression of the eukaryotic expression plasmid carrying human platelet-derived growth factor-B(hPDGF-B) in gingival fibroblasts of Beagle dog. **Methods** Plasmid carrying hPDGF-B (EX-A0380-M03) was amplified and identified, and then transfected into gingival fibroblasts of Beagle dog. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR), immunocytochemistry, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) and Western bolt were choose to detect the expression of hPDGF-B. **Results** Target gene carried by EX-A0380-M03 was hPDGF-B. Green fluorecence protein(GFP) expressed by transfected gingival fibroblasts was observed under inverted phase contrast fluorescence microscope(IPCFM)(after 24 hours) and the transfection efficiency was 18%-38% (after 48 hours). Serials other methods(RT-PCR, immunocytochemistry, and ELISA) mentioned above also convinced that cells expressed hPDGF-B, and the protein that was a kind of fusion protein composed of PDGF-BB and GFP was identified by Western blot. **Conclusion** Eukaryotic expression plasmid carrying hPDGF-B was transfected into gingival fibroblasts successfully, and a kind of fusion protein was expressed.

[Key words] platelet-derived growth factor-B; gene transfection; gingival fibroblasts

血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是结缔组织细胞和其他一些细胞的有丝分裂原。PDGF在胚胎神经系统的发育、创伤的愈合以及某些疾病(肝硬化、肾肺纤维化以及动脉粥样硬化)的发生和发展过程中起重要作用。常见的PDGF由A、B基因编码(近些年又发现了C、D^[1]基

因), 由二硫键形成3种同源或异源二聚体(PDGF-AA、BB以及AB)。研究^[2]发现: PDGF-BB在细胞增殖、创伤愈合等方面的作用强于其他二聚体。牙龈成纤维细胞是牙龈结缔组织中的主要成分, 牙龈成纤维细胞的质、量是促进牙龈组织再生、防止牙龈进一步退缩的关键因素。因此, 本实验拟以克隆有目的基因人血小板源性生长因子-B(human platelet-derived growth factor-B, hPDGF-B)的真核表达质粒EX-A0380-M03转染牙龈成纤维细胞, 为组织工程修复牙龈组织缺损提供一种新型的基因修饰的种子细胞。

[收稿日期] 2010-08-09; [修回日期] 2010-11-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471892); 福建医科大学重点学科建设学术发展基金资助项目[闽医大口腔(2008)39号]

[作者简介] 钟泉(1981—), 男, 湖北人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 闫福华, Tel: 0591-83736426

1 材料和方法

1.1 材料

克隆有目的基因hPDGF-B的真核表达质粒EX-A0380-M03(广州复能基因有限公司),大肠杆菌DH5 α 、脂质体LipofectaminTM 2000、Trizol Reagent(Invitrogen公司,美国),限制性内切酶Xho 和Xmn (NEB公司,美国),GeneRulerTM100 bp DNA Ladder(Fermentas公司,美国),100 bp DNA Ladder(上海水源生物有限公司),293T细胞(ATCC公司,美国),Hyclone胎牛血清(北京海克隆生物化学有限公司),EndoFree Plasmid Maxi Kits(Qiagen公司,美国),OPTI-MEM(Gibco公司,美国),ReverTra Acer- α TM(Toyobo公司,日本),LA PCRTM Kit Ver.2.1(TaKa-Ra公司,日本),RayBio hPDGF-BB ELISA检测试剂盒(RayBiotech公司,美国),兔抗人 hPDGF-BB多克隆抗体(Chemicon公司,美国),羊抗兔Ultra-sensitiveTM SP超敏试剂盒以及DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司),重组的hPDGF-BB蛋白(Peprotech公司,美国),HRP标记的羊抗兔二抗IgG、PVDF膜(Millipore公司,美国),ECL显色试剂盒(Cell Signaling公司,美国),预染蛋白相对分子质量标准P0066(Tiagen公司,北京),兔抗人GAPDH抗体(北京中杉金桥有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 真核表达质粒EX-A0380-M03的鉴定和扩增 将购买的EX-A0380-M03真核表达质粒转化至感受态的DH5 α ,进行小量扩增,随后抽提质粒DNA。通过Xho 和Xmn 双酶切和测序鉴定质粒。设计测序引物,上游引物:5'-GCGGTAGGCGGTACGGT-3';下游引物:5'-CCGGACACGCTGAACCTGT-3'。测序时采取双向重复测序,以保证能够完全测通整个阅读框区域。测序结果与从GeneBank中获得的标准cDNA序列进行比对。鉴定正确后,使用EndoFree Plasmid Maxi Kits大抽试剂盒进行质粒的大量抽提。

1.2.2 真核表达质粒EX-A0380-M03转染Beagle犬牙龈成纤维细胞 参照文献[3]所提供的方法体外分离培养Beagle犬牙龈成纤维细胞。转染前2~3 d,以每孔1.5 \times 10⁵个密度接种第2~3代的牙龈成纤维细胞于6孔板内。37℃,5%CO₂饱和湿度下培养2~3 d,待细胞长至孔底80%~90%时,使用OPTI-MEM作为辅助培养基,LipofectaminTM 2000介导质粒转入牙龈成纤维细胞内。转染后24~48 h在倒置相差荧光显微镜下观察蛋白的表达情况。293T细胞以每孔5 \times 10⁴个接种6孔板,接种2~3 d后,同样的方法实施转染,以具有高表达率的293T细胞作为确认转染成功的强

阳性对照组。

1.2.3 RT-PCR检测Beagle犬牙龈成纤维细胞中hPDGF-B基因的表达式 细胞转染48 h后,使用Trizol分别抽提转染细胞和未转染细胞的总RNA。ReverTra Acer- α TM将2组RNA逆转为DNA,随后实施PCR反应。设计针对质粒EX-A0380-M03阅读框(hPDGF-B)部分片段的引物,命名为TG-1;设计跨越阅读框及下游绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)部分片段的引物,命名为TG-2;设计通用型内参引物(适合于犬和人 β -actin),命名为IR-1;设计针对Beagle犬 β -actin的特异性内参引物,命名为IR-2。具体的引物信息以及扩增产物大小见表1。

表 1 4种引物的具体信息及扩增产物大小

Tab 1 Four kinds of primer and corresponding amplified productions

引物名称	上下游引物	扩增产物大小/bp
TG-1	5'-TCGATCCGCTCCTTTGAT-3'	423
	5'-TGCCAGGTGGTCTTCCAG-3'	
TG-2	5'-GACCCTTGGAGCCTACCTC-3'	530
	5'-TCACCTTGATGCCGTTCTT-3'	
IR-1	5'-TACGCCAACACAGTGCTGTCTG-3'	200
	5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'	
IR-2	5'-TCGATCCGCTCCTTTGAT-3'	292
	5'-TGCCAGGTGGTCTTCCAG-3'	

1.2.4 Western blot确定hPDGF-BB-GFP融合蛋白的大小 将Beagle犬牙龈成纤维细胞和293T细胞以每孔5 \times 10⁴个接种6孔板,接种2~3 d后,实施转染。转染48 h后裂解细胞,同时收集转染组与未转染组的蛋白。蛋白经变性后,用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析转染组和未转染组蛋白的表达。以重组的hPDGF-BB作为标准品。

1.2.5 免疫细胞化学检测牙龈成纤维细胞中hPDGF-BB的表达式 转染组和未转染组预先制备好细胞爬片,分别于转染后48 h以4%的多聚甲醛固定后,使用SABC法实施免疫细胞化学染色。以1:1 000的兔抗人hPDGF-BB多克隆抗体作为一抗,羊抗兔Ultra-sensitiveTM SP超敏试剂盒中的抗体作为二抗,DAB显色。

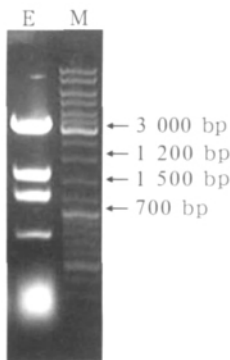
1.2.6 ELISA检测培养上清中PDGF-BB的浓度 取12孔板1块,每孔接种1 \times 10⁴个牙龈成纤维细胞,转染组和未转染组各取6个孔。培养2~3 d,待细胞长至70%~80%后进行转染。转染后,于24、48、72、96 h同时收集2组上清。所有上清收集后使用现用的细胞培养液定容。按每管250 μ L进行分装,储存于-80℃冰箱。按RayBio hPDGF-BB ELISA检测试剂盒说明书中的要求绘制标准曲线并检测培养上清中

PDGF-BB的含量(在检测待测样品前,先检测现用培养液中PDGF-BB的含量)。绘制标准曲线,同时确定转染组和未转染组中PDGF-BB的实际表达量。

2 结果

2.1 酶切和测序鉴定

EX-A0380-M03质粒全长7 050 bp,限制性内切酶*Xho* 能够在7 036 bp处将其切断;限制性内切酶*Xmn* 能够在1 647、5 030、6 299 bp处将其切断。因此,实施双酶切时,整个质粒被切成4段,即730、 1.3×10^3 、 1.6×10^3 、 3.3×10^3 bp(图1)。



E: 经双酶切后的质粒; M: 100 bp DNA Ladder.

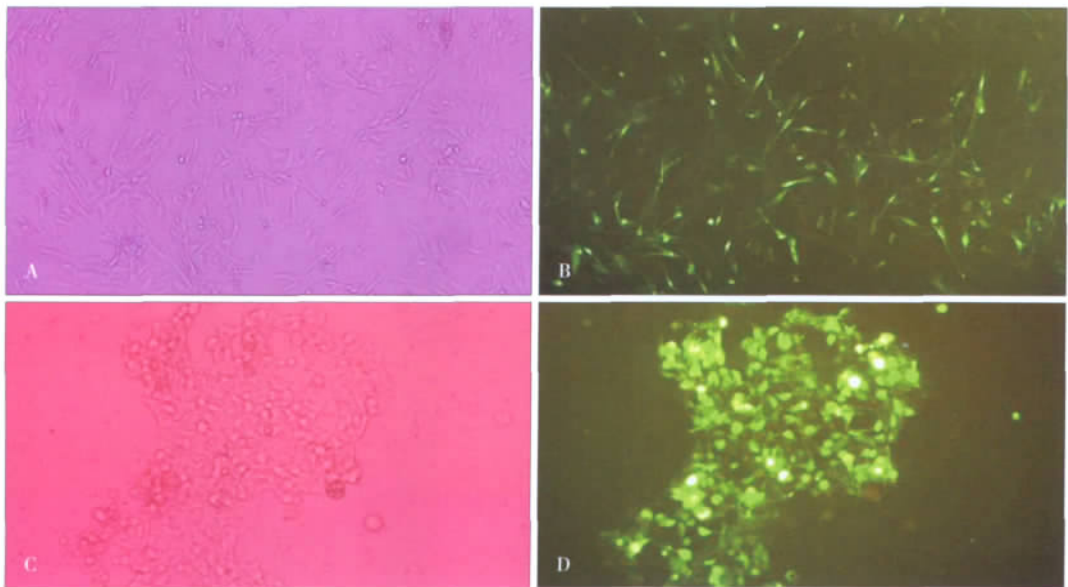
图1 EX-A0380-M03酶切分析电泳图

Fig 1 Restriction analysis of plasmid EX-A0380-M03

使用DNAMAN对上海生工生物有限公司测序结果[编号: 0509258(3)0409076P1和0509259(3)0409-077P2]与GeneBank中的标准序列(NM_002608)进行比对。结果显示: 阅读框(hPDGF-B)的第369个碱基由C突变为A, 此时三联密码子由CCC→CCA(第123个氨基酸)突变, 但此突变为同义突变, 均为脯氨酸。阅读框的终止密码由TAG→TAC突变, 这可使质粒的转录和翻译继续向下游行进, 从而使得下游的GFP得到表达, 形成融合蛋白。实施大量抽提后, 使用NanoDrop ND-1000测得质粒的浓度为 $1\,580.6\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}=1.92$, $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}=2.23$ 。所抽提的DNA浓度、纯度均很高。

2.2 hPDGF-B基因在牙龈成纤维细胞中的表达

hPDGF-B转染Beagle犬牙龈成纤维细胞后, 在倒置相差荧光显微镜下可见绿色荧光。以24 h后的相同视野、荧光视场下的发光细胞作为转染成功的细胞。转染成功细胞与同一视野总细胞数的比值作为转染效率。EX-A0380-M03对Beagle犬牙龈成纤维细胞的转染效率在18%~38%之间; 而对肿瘤细胞293T而言, 其转染效率则可高达60%以上, 且其蛋白合成的能力也较牙龈成纤维细胞强(荧光亮度更高)(图2)。转染2周, 传2代后, 仍有少量荧光表达。



A: 明场下的牙龈成纤维细胞 $\times 100$; B: 荧光场下的牙龈成纤维细胞 $\times 100$; C: 明场下的293T细胞 $\times 200$; D: 荧光场下的293T细胞 $\times 200$ 。

图2 hPDGF-B基因转染牙龈成纤维细胞及293T细胞后的形态 倒置相差荧光显微镜

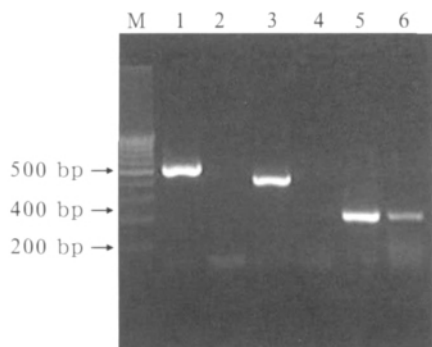
Fig 2 The image of transfected hPDGF-B in gingival fibroblasts and 293T inverted phase contrast fluorescence microscope

2.3 RT-PCR检测Beagle犬牙龈成纤维细胞中hPDGF-B的表达

转染48 h的2组细胞经Trizol抽提总RNA, 经NanoDrop ND-1000测量吸光度值, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}=1.91$

(转染组), $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}=1.89$ (未转染组), 样品RNA较纯。转染组与未转染组均能扩增出 β -actin的特异性条带, 见图3条带5和6, 表明2组的总RNA在逆转录过程中均获得了成功。分别使用引物TG-1和TG-

2扩增转染组及未转染组的cDNA,发现转染组均能获得目的条带,见图3条带1和3,而未转染组则无任何条带出现。此结果表明质粒携带的目的基因在转染组的mRNA水平有表达。

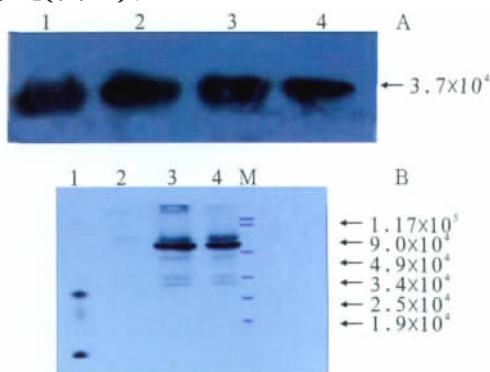


1、3、5: 转染组; 2、4、6: 未转染组; 1、2: TG-2扩增; 3: TG-1扩增; 5、6: IR-1扩增; M: 100 bp DNA Ladder。

图3 RT-PCR产物电泳图

Fig 3 RT-PCR identification after transfection

2.4 Western blot检测PDGF-BB-eGFP融合蛋白大小
所有组均获得了 3.7×10^4 的GAPDH条带,证实总蛋白抽提成功(图4A)。Western blot检测证实,转染组均存在 5.4×10^4 的PDGF-BB-eGFP融合蛋白,而未转染组未出现任何影像。标准组出现大小约 2.7×10^4 和 1.4×10^4 的2条蛋白条带,其中 2.7×10^4 者为PDGF-BB标准品影像,而 1.4×10^4 则考虑为解链后的PDGF-BB多肽单链(图4B)。



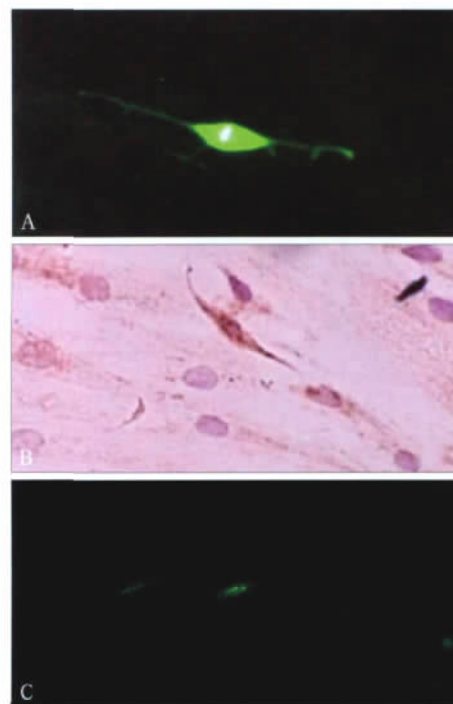
A: 使用抗GAPDH抗体检测总蛋白; 1、2: 转染组; 3、4: 未转染组。B: 使用抗PDGF-BB抗体检测融合蛋白; 1: 标准品组; 2: Beagle犬牙龈成纤维细胞未转染组; 3: 293T转染组; 4: Beagle犬牙龈成纤维细胞转染组; M: 100 bp DNA Ladder。

图4 Western blot检测蛋白表达

Fig 4 Target proteins detected by Western blot

2.5 免疫细胞化学检测Beagle犬牙龈成纤维细胞中hPDGF-BB的表达

通过实施染色前的定位和固定,成功获得了同一细胞在活体和免疫细胞化学染色后的图像(图5)。牙龈成纤维细胞在转染后,细胞核周围的蛋白似乎浓度很高,呈颗粒状聚集于细胞核周围(图5C)。免疫细胞化学检测也证实,细胞核周围的目的蛋白浓度很高(图5A、B)。



A: 细胞核高亮,胞体两侧呈轴突样 荧光显微镜 $\times 400$; B: 同一细胞,2侧轴突样胞体略有收缩,细胞核周围见棕色的颗粒,胞浆也被染成棕色 免疫细胞化学染色 $\times 400$; C: 细胞核周围见绿色发光颗粒 荧光显微镜 $\times 400$ 。

图5 牙龈成纤维细胞核周围见hPDGF-BB-eGFP融合蛋白

Fig 5 Fusion protein hPDGF-BB-eGFP around the nuclear of gingival fibroblasts

2.6 ELISA检测培养上清中hPDGF-BB的浓度

使用Curve Expert1.3对酶标仪测得的光密度值与其实际浓度值拟合标准曲线。依据此标准曲线计算转染组与未转染组二者的实际质量浓度。转染组8组的均值为 $82.94 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$,而未转染组和培养液则均无法测出(为0值)。转染后,培养上清中PDGF-BB的质量浓度均值随培养时间的延长而增高。

3 讨论

作为一种促进细胞趋化和有丝分裂的生长因子,PDGF在牙周组织再生领域具有广泛的应用前景。多项研究证实:各型PDGF对牙周韧带细胞具有促增殖的作用。Bartold等^[4]研究发现:PDGF对牙龈成纤维细胞的促增殖作用与透明质酸酶的表达增高和蛋白多糖的合成减少相关,这一现象表明PDGF对牙周组织缺损修复具有积极的作用。另外PDGF在骨组织再生中的作用已经得到广泛的认可。PDGF能同时促进成骨细胞和破骨细胞的增殖和分化,这将有助于新骨的形成和牙周不良骨形态的改建。Nevins等^[5]在临床病例中使用重组的人PDGF-BB蛋白以及冻干异体骨治疗患者的度根分叉病变,通过组织学切片和影像学观察发现:PDGF联合冻干异体骨能够促进骨、牙周膜以及牙骨质的再生。本研究之所以选择

牙龈成纤维细胞作为转染的靶细胞,一方面是因为其取材较易,细胞量较多;另一方面也是期望在未来能通过基因修饰的牙龈成纤维细胞增加局部牙周组织中PDGF-BB的表达量来促进多种牙周组织结构的再生——包括促进牙龈再生以防止牙龈退缩、促进牙周膜和牙槽骨的再生等等。

和许多其他生长因子类似,PDGF无法回避价格昂贵、半衰期短、体内易降解以及使用繁琐等不利因素^[6]。如何提高生长因子在体内存留的时间、保持其生物学活性、缓慢持续促进牙周再生是当前研究的热点之一。基因工程技术为解决这一弊端提供一条新的思路。基因转移技术可将目的基因及其调控序列转移到靶细胞中,作为遗传物质发挥作用,从而促进组织的再生。而将基因工程技术与组织工程技术相结合,以表达某种特定的生长因子的细胞作为种子细胞构建组织工程化复合物并植入牙周组织缺损中,有望为实现牙周组织再生提供新的治疗方法,这种结合了基因工程技术的组织工程又被称为基因强化组织工程(gene-enhanced tissue engineering, GETE)^[7]。

当前,常用的转基因技术主要包含以下2类:病毒法和非病毒法^[8]。常见的病毒法包括以腺病毒^[9]、牛痘病毒^[10]、腺相关病毒、噬菌体以及棒状病毒等作为载体的转染体系。而非病毒法则是指以脂质体包裹的DNA(质粒)或单纯的裸DNA转染靶细胞^[11]。尽管当前病毒法,尤其是慢病毒/腺病毒由于具有较高和较为稳定的转染效率而得到了广泛的应用,但病毒法的远期安全性仍然值得商榷。脂质体包裹质粒的转染方法尽管转染效率相对较低,但由于其不存在病毒DNA骨架,因此其安全性较高。通过改善转染的条件,也能获得相对较好的转染效率。本实验通过使用OPTI-MEM作为转染辅助培养基,可使正常哺乳动物细胞达到30%的转染效率,而肿瘤细胞的转染效率可以达到60%以上。

PDGF对细胞产生的各种生物学活性是通过结合细胞表面受体而产生的。已经知晓,多种受体能够与PDGF进行结合。其中 α 受体能同时和PDGF-A和PDGF-B进行结合,而 β 受体则只能和PDGF-B结合。鉴于PDGF-BB受体结合的广泛性,有研究证实,PDGF-BB在促进有丝分裂方面要强于PDGF-AA^[12],而且,由于细胞迁移受 β 受体调节,PDGF-BB的趋化作用似乎更强。因此,鉴于以上因素,本实验采用了PDGF-B基因作为目的基因,以质粒作为载体,实施转基因技术的研究。

研究中使用的质粒属于一种真核表达载体。空载体在连接阅读框的过程中,通过定点诱变,将

PDGF-B基因的终止密码子由TAG \rightarrow TAC突变,这使得转录和翻译不在此终止密码子停止,而是经过无意义的短片段(阅读框下游的多克隆位点)后继续向下游进行,从而形成PDGF-BB-eGFP融合蛋白。通过RT-PCR(扩增片段530 bp)以及Western blot分别从转录和翻译两方面证实了最终获得的目的蛋白为融合蛋白。关于PDGF-BB-eGFP融合蛋白形成后、目的蛋白PDGF-BB的结构以及其对细胞生物学活性的影响是否发生变化,尚不能做出确切结论,但通过免疫细胞化学、ELISA以及Western blot检测发现:原有目的蛋白PDGF-BB的抗原决定簇仍然可以得到暴露,因此推测其结构或者与细胞表面受体结合的部位并未发生显著变化。另外,在融合蛋白和标准品同时使用上样缓冲液处理的情况下,标准品部分发生双链解离,而融合蛋白则无变化。分析其原因,可能是标准品PDGF-BB的二硫键在煮沸的过程中被上样缓冲液中的成分破坏,而导致其部分形成单链,而融合蛋白的PDGF-BB尾端上的eGFP可能形成了一种锁扣结构而使其无法发生断裂。融合蛋白这种结构上的稳定性可能使其更适合体内复杂的环境。

PDGF因最早从血小板分离而得名,但实际上除血小板外,许多其他类型细胞也能分泌PDGF,如血管内皮细胞、上皮细胞、间质细胞、活化的单核细胞等。一些成纤维样的细胞,如血管平滑肌细胞、皮肤的成纤维细胞也能在一定的条件下合成PDGF^[13]。另外,由于PDGF-B基因与原癌基因v-sis高度同源,因此,PDGF-BB在某些肿瘤细胞中高度表达(如神经胶质瘤细胞)^[14]。有研究^[15]表明:成纤维细胞能够产生PDGF-B的mRNA,但不能表达PDGF-BB蛋白,在人正常的皮肤成纤维细胞中,PDGF-BB表达较弱,而在肉芽组织和瘢痕组织中表达较高,因此推测正常成纤维细胞中可能存在PDGF-BB的翻译阻抑因素。鉴于以上诸多因素,为排除内源性PDGF-B基因表达,本研究通过设计2种引物,证实了正常的牙龈成纤维细胞在mRNA水平并不表达PDGF-B,而经转染的细胞所表达的mRNA仅为质粒携带的外源性DNA表达所致(转染组同时扩增出530 bp和423 bp)。ELISA和Western blot也证实了正常的牙龈成纤维细胞并不表达PDGF-BB蛋白。推测正常成纤维细胞中存在的这种阻抑因素可能与细胞内部抑制原癌基因v-sis活化、防止细胞过度增殖有关。

用于细胞培养的血清中含有大量的营养成分和生长因子,这些成分可促进细胞的生长和增殖。为排除血清中可能还有的PDGF-BB对ELISA检测的影响,本实验通过预实验检测了含10%胎牛血清的DMEM中PDGF-BB的含量,检测结果发现:培养液

中的PDGF-BB为零。推测其可能的原因是：胎牛血清中的PDGF经DMEM稀释后，浓度已经非常低，无法通过ELISA检测出；又或者牛的PDGF-BB与试剂盒中包被的抗体无法结合(人、牛的PDGF-BB抗原决定簇并不相同)所致。

[参考文献]

- [1] Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family[J]. FEBS J, 2005, 272 (22) 5723-5741.
- [2] Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor[J]. Physiol Rev, 1999, 79(4) : 1283-1316.
- [3] 钟泉, 闫福华, 李艳芬, 等. Beagle犬牙龈成纤维细胞的体外分离培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(50) 9801-9805. ZHONG Quan, YAN Fu-hua, LI Yan-fen, et al. Isolation and culture of gingival fibroblasts of Beagle dogs *in vitro*[J]. J Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Res, 2008, 12(50) 9801-9805.
- [4] Bartold PM. Platelet-derived growth factor stimulates hyaluronate but not proteoglycan synthesis by human gingival fibroblasts *in vitro*[J]. J Dent Res, 1993, 72(11) :1473-1480.
- [5] Nevins M, Camelo M, Nevins ML, et al. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB(rhPDGF-BB) and allogenic bone[J]. J Periodontol, 2003, 74(9) :1282-1292.
- [6] 储庆, 何海丽, 吴织芬, 等. 基因转移技术及其在牙周组织再生中的应用[J]. 国外医学口腔医学分册, 2004, 31(4) 256-258. CHU Qing, HE Hai-li, WU Zhi-fen, et al. Gene transfer technique and its application for periodontal regeneration[J]. Foreign

- Medical Sciences(Stomatology), 2004, 31(4) 256-258.
- [7] Edwards PC, Mason JM. Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration: Dentin-pulp and periodontal regeneration[J]. Head Face Med, 2006, 2 :16.
 - [8] Partridge KA, Oreffo RO. Gene delivery in bone tissue engineering: Progress and prospects using viral and nonviral strategies [J]. Tissue Eng, 2004, 10(1/2) 295-307.
 - [9] Lin Z, Sugai JV, Jin Q, et al. Platelet-derived growth factor-B gene delivery sustains gingival fibroblast signal transduction[J]. J Periodontal Res, 2008, 43(4) :440-449.
 - [10] Norton A, Peplinski GR, Tsung K. Expression of secreted platelet-derived growth factor-B by recombinant nonreplicating and noncytopathic vaccinia virus[J]. Ann Surg, 1996, 224(4) 555-560.
 - [11] Zhang Y, Wang Y, Shi B, et al. A platelet-derived growth factor releasing chitosan/coral composite scaffold for periodontal tissue engineering[J]. Biomaterials, 2007, 28(8) :1515-1522.
 - [12] Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, et al. Recombinant human platelet-derived growth factor: Biology and clinical applications [J]. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90(Suppl 1) :48-54.
 - [13] Anusaksathien O, Webb SA, Jin QM, et al. Platelet-derived growth factor gene delivery stimulates *ex vivo* gingival repair[J]. Tissue Eng, 2003, 9(4) :745-756.
 - [14] Hermanson M, Funa K, Koopmann J, et al. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas[J]. Cancer Res, 1996, 56(1) :164-171.
 - [15] Breitbart AS, Grande DA, Laser J, et al. Treatment of ischemic wounds using cultured dermal fibroblasts transduced retrovirally with PDGF-B and VEGF121 genes[J]. Ann Plast Surg, 2001, 46 (5) 555-561.

(本文编辑 汤亚玲)

开封市卫生学校招生

开封市卫生学校是国家级重点中等职业学校，省级文明单位；师资力量雄厚，教学实验实习设施完善；是德国牙科技术协会中国大陆牙科技师培训基地。

2011年，开封市卫生学校招收普通中专和“3+2”分段高职班学生。普通中专开设专业有：口腔医学技术、药剂、护理、助产、农村医学；“3+2”大专开设专业有：口腔医学、临床医学、高级护理。学习期满分别颁发普通中专和普通大专毕业证书，国家承认学历。毕业生由学校推荐就业，也可参加对口升学或专升本考试，升入普通高等医学院校学习。

开封市卫生学校除单设药剂专业外，还与上海医药学校联办该专业，前2年在开封市卫生学校学习，第3年在上海带薪顶岗实习，颁发上海医药学校毕业证书。另开封市卫生学校与德国牙科技术协会联办牙科技师班，培养高水平牙科技师。

注：到开封市卫生学校学习的农村学生和城市困难学生前2年可享受人均1500元的国家资助。报考“3+2”大专者必须在河南省参加中招考试，资料免费索取，详情咨询杜老师。电话：0378-2636016、2954447，网址：http://www.kfwx.cn，E-mail：kfwsxx@126.com。联系人：杜瑶敏(13839964586)，安海军(13839963613)，李颖(13592126967)。

开封市卫生学校