

网络出版时间:2015-01-05 08:59

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.02.029

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150105.0859.029.html>

# 转角质细胞生长因子-2 基因红花研究

杨 晶,王 兰,黄 建,陈玉斌,郭咏昕,易善勇,  
官丽莉,杜林娜,李海燕,李校堃,姜 潮

(吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心,吉林 长春 130118)

**【摘要】** **【目的】**构建转角质细胞生长因子-2 基因(*KGF2*)红花,为 *KGF2* 药用蛋白的生产奠定了基础。**【方法】**利用融合 PCR 方法扩增人源 *KGF2* 基因与拟南芥油体蛋白 *Oleosin* 基因的融合基因,将融合基因克隆至表达载体 pOP 上,构建了重组质粒 pOP-OL-*KGF2*,采用冻融法将质粒 pOP-OL-*KGF2* 转入根癌农杆菌 EHA105 中,通过农杆菌介导法转化红花,采用 PCR 检测筛选转基因红花阳性植株,SDS-PAGE 检测 *Oleosin-KGF2* 融合蛋白的表达情况。**【结果】**成功构建了植物特异表达载体 pOP-OL-*KGF2*,转染后共获得了 12 株转基因红花植株,其中 2 株鉴定为阳性,阳性率为 17%,对转化植株进行 DNA 水平检测和蛋白水平检测,可知 *KGF2* 基因已经整合进红花基因组中,且有所表达。**【结论】**成功获得转 *KGF2* 基因的红花株系。

**【关键词】** 角质细胞生长因子-2;红花;遗传转化

**【中图分类号】** Q786

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2015)02-0210-07

## Construction of safflower with keratinocyte growth factor-2 gene (*KGF2*)

YANG Jing, WANG Lan, HUANG Jian, CHEN Yu-bin,  
GUO Yong-xin, YI Shan-yong, GUAN Li-li,  
DU Lin-na, LI Hai-yan, LI Xiao-kun, JIANG Chao

(Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development in Jilin Agriculture University, Changchun, Jilin 130118, China)

**Abstract:** **【Objective】** Safflower with keratinocyte growth factor gene (*KGF2*) was constructed to improve *KGF2* protein production. **【Method】** Molecular biology method was used to amplify *KGF2* with *Oleosin* fusion gene. The fusion gene was cloned into the expression vector pOP to construct recombinant plasmid pOP-OL-*KGF2* and the freeze-thaw method was used to transfer plasmid pOP-OL-*KGF2* into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. It was transformed into safflower cotyledons by *Agrobacterium*-mediated. Positive transgenic plants were determined by PCR analysis. **【Result】** Plant binary expression vector pOP-OL-*KGF2* was successfully constructed. A total of 12 positive safflower plants were obtained after transfection with a positive rate of 17%. From the DNA and protein level, *KGF2* gene was integrated into the safflower genome and target protein was expressed. **【Conclusion】** Safflower lines with *KGF2* gene were obtained successfully.

**【收稿日期】** 2013-09-09

**【基金项目】** 国家高新技术研究与发展计划项目(2011AA100606);吉林省中小企业创新基金项目(13C26212201223);吉林省教育厅项目(201458);教育部博士点基金青年教师基金项目(20122223120002);长春市重大科技攻关项目(2014077)

**【作者简介】** 杨 晶(1981-),女,吉林吉林人,副研究员,主要从事植物生物反应器研究。E-mail:yangjing5122010@163.com

**【通信作者】** 姜 潮(1955-),男,加拿大人,研究员,主要从事植物生物反应器研究。E-mail:chaojiang10@hotmail.com

**Key words:** KGF2; safflower; transgenic

角质细胞生长因子-2(Keratinocyte growth factor-2, KGF2), 又称为成纤维细胞生长因子-10 (Fibroblast growth factor, FGF10), 是一个多功能的细胞生长因子, 主要由成纤维细胞和其他间质来源的细胞分泌, 以高亲和力和低亲和力分别与表达于上皮细胞表面的 2 种上皮细胞表面的酪氨酸激酶受体 FGFR2-IIIb 和 FGFR1-IIIb 相结合, 通过间质上皮相互作用的旁分泌方式发挥作用<sup>[1-4]</sup>。此外, 还有研究表明, 在小鼠肺的发育过程中, KGF2 可能是一个十分关键的生长因子和趋化物质<sup>[5]</sup>。另外, KGF2 在胚胎发育、组织修复、神经再生、血管生成和肿瘤发展中具有重要作用<sup>[6-11]</sup>, 显示出了较好的开发和应用前景。

近些年来, 随着基因工程等生物技术的不断发展, 以转基因技术为代表的植物基因工程技术, 为农业的可持续发展提供了强有力的支持, 已有几十种药用蛋白或多肽在植物中成功表达, 但有关 KGF2 在植物中表达的研究尚未见报道。红花种子富含红花油, 该油集工业用油与保健用油于一体, 色泽洁白, 油滴粒径在 2  $\mu\text{m}$  左右, 易于吸收, 市场需求量很大。本研究选用红花作为受体系统来表达 KGF2 蛋白, 旨在获得转 KGF2 基因的红花株系, 为以红花为生物反应器的药物蛋白生产提供支持。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 改造后的 pCAMBIA1301(命名为 pOP, 含有 bar 筛选标记基因、油体蛋白特异启动子和终止子)、pUC19-Oleosin、pUC19-KGF2 质粒、大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌 EHA105 等, 均由吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心构建及保存。

1.1.2 试剂 PCR 引物合成、KGF2 基因合成和测序由金唯智生物科技(北京)有限公司完成。DNA 小量提取试剂盒、Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒、DNA Fragment Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒、Mini BEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒及 DNA Ligation Kit Ver. 2 等, 均购自大连宝生物工程有限公司; 限制性内切酶 *Nco* I、*Hind* III 及 *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等, 均购自日本 TaKaRa 公司; 细胞分裂素(6-BA)、生长素(NAA)、卡那霉素(Kan)和利福平

(Rif)等, 均购自美国 Sigma 公司; 头孢曲松钠(Cef)和羧苄西林钠(Carb), 均购自哈尔滨制药股份有限公司; 草铵膦, 购自 Boehringer Mannheim 公司; 其他常规试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.1.3 植物材料 红花(*Carthamus tinctorius* L.) 种子, 购自新疆红花缘科技有限公司, 品种为塔城 1 号。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计 选择植物偏好的 KGF2 和拟南芥油体蛋白基因序列, 利用 Primer 5.0 软件设计引物。根据 KGF2 基因序列设计特异性引物 KGF2-P/KGF2-R; 根据 *Oleosin* 基因序列设计特异性引物 F(Oil-b)/R(Oil-b), 然后经由上海生工生物工程有限公司合成, 其中上游引物 F(Oil-b)含有 *Nco* I 酶切位点(序列中的斜体部分), 下游引物 KGF2-R 含有 *Hind* III 酶切位点(序列中的斜体部分), 引物序列如下。

F(Oil-b): 5'-CCATGGCGGATACAGCTAGAGGAACCCATCAC-3',

R(Oil-b): 5'-CATGTCCTGACCAAGGGCAGTAGTGTGCTGGC-3',

KGF2-P: 5'-GCCAGCACACTACTGCCCTTGGTCAGGACATG-3',

KGF2-R: 5'-CCCAAGCTTCTATTATGAGTGTACCACCATTGGAAGAAAG-3'。

先用引物 F(Oil-b)/R(Oil-b) 克隆 *Oleosin* 基因, 用 KGF2-P/KGF2-R 引物克隆 KGF2 基因, 然后以 *Oleosin* 基因和 KGF2 基因为模板, 利用 F(Oil-b)和 KGF2-R 克隆 *Oleosin-KGF2* 融合基因。

### 1.2.2 拟南芥油体蛋白 *Oleosin* 基因的 PCR 扩增

以质粒 pUC19-Oleosin 为模板, F(Oil-b)和 R(Oil-b)为上、下游引物进行 PCR 扩增, ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照。50  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系如下: 10 $\times$  Ex *Taq* Buffer 25  $\mu\text{L}$ , 引物 F(Oil-b)1  $\mu\text{L}$ , 引物 R(Oil-b)1  $\mu\text{L}$ , Ex *Taq* 酶 0.25  $\mu\text{L}$ , 模板 pUC19-Oleosin 质粒(ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照模板)1  $\mu\text{L}$ , dNTP 4  $\mu\text{L}$ , 去离子水 17.75  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 8 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 62  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  预延伸 90 s, 共 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  终止反应。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 检测并回收目的片段。

### 1.2.3 KGF2 基因的 PCR 扩增 以质粒 pUC19-

KGF2 为模板, KGF2-P 和 KGF2-R 为上、下游引物进行 PCR 扩增, 将扩增得到的 KGF2 基因连接到 T 载体上, 然后转化大肠杆菌感受态细胞, 经 37 °C 培养后, 挑选阳性菌落送上海生工生物工程有限公司测序。50  $\mu$ L PCR 反应体系如下: 10  $\times$  Ex Taq Buffer 25  $\mu$ L, 引物 KGF2-P 1  $\mu$ L, 引物 KGF2-R 1  $\mu$ L, Ex Taq 酶 0.25  $\mu$ L, 模板 pUC19-KGF2 质粒 1  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, 去离子水 17.75  $\mu$ L。PCR 反应程序同 1.2.2 节。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 检测并回收目的片段。

1.2.4 *Oleosin-KGF2* 融合基因的 PCR 扩增 以回收产物 *Oleosin* 基因和 KGF2 基因为模板, F(Oil-b) 和 KGF2-R 分别为上、下游引物扩增得到 *Oleosin-KGF2* 融合基因片段。50  $\mu$ L PCR 反应体系如下: 10  $\times$  Ex Taq Buffer 25  $\mu$ L, 引物 F(Oil-b) 1  $\mu$ L, 引物 KGF2-R 1  $\mu$ L, Ex Taq 酶 0.25  $\mu$ L, 模板 *Oleosin* 基因 1  $\mu$ L, 模板 KGF2 基因 1  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L, 去离子水 16.75  $\mu$ L。PCR 反应程序同 1.2.2 节。回收 PCR 产物, 置于 -20 °C 保存。将融合目的基因片段 *Oleosin-KGF2* 与 pEASY-Blunt Vector 连接, 转化大肠杆菌, 37 °C 培养后挑取阳性菌落进行 PCR 验证, 将阳性克隆摇菌保种, 命名为 pEASY-OL-KGF2, 并进行测序分析。

1.2.5 植物表达载体 pOP-OL-KGF2 的构建 将改造后的质粒 pOP 和质粒 pEASY-OL-KGF2 分别用 *Nco* I 和 *Hind* III 在 37 °C 水浴中双酶切 4 h, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳及 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收后, 用 T4 DNA Ligase 于 16 °C 水浴中连接过夜, 将反应产物转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 利用 Kan 抗性筛选后, 挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定, 将鉴定正确的单菌落摇菌保种(命名为 pOP-OL-KGF2), 并提取质粒进行 *Nco* I 和 *Hind* III 酶切鉴定和测序, 将测序正确的表达载体 pOP-OL-KGF2 通过冻融法转化根癌农杆菌菌株 EHA105, 用 PCR 和双酶切方法对转化菌落进行鉴定。

1.2.6 红花的转化 红花种子经过表面灭菌处理后, 在种子萌发培养基中, 25 °C 暗培养 3 d, 选用上述含有 pOP-OL-KGF2 载体的根癌农杆菌 EHA105 侵染红花子叶, 在芽诱导培养基上培养 2 周后, 转移到芽分化培养基上继续培养 4 周, 待长出阳性苗后将其转移到伸长生根培养基内培养。试验所用培养基如下。

芽诱导培养基: MS 粉 + 30 g/L 蔗糖 + 1.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 体积分数 10% 有机

溶液 + 100 mg/L 肌醇 + 8 g/L 琼脂。

芽分化培养基: MS 粉 + 30 g/L 蔗糖 + 1.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 100 mg/L Cef + 200 mg/L Carb + 体积分数 10% 有机溶液 + 100 mg/L 肌醇 + 8 g/L 琼脂。

芽筛选培养基: MS 粉 + 30 g/L 蔗糖 + 1.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 100 mg/L Cef + 200 mg/L Carb + 体积分数 0.05% Basta + 体积分数 10% 有机溶液 + 100 mg/L 肌醇 + 8 g/L 琼脂。

伸长生根培养基: MS 粉 + 30 g/L 蔗糖 + 1.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 3.8 mg/L KNO<sub>3</sub> + 100 mg/L Cef + 200 mg/L Carb + 体积分数 10% 有机溶液 + 100 mg/L 肌醇 + 8 g/L 琼脂。

1.2.7 再生植株的 PCR 检测 取转化红花苗的新鲜叶片 100 mg, 用新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应总体系为: 2  $\times$  Power Taq PCR MasterMix 10  $\mu$ L, KGF2-P 和 KGF2-R 各 0.1  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。PCR 反应程序同 1.2.2 节。试验同时以野生型红花的新鲜叶片为阴性对照, pOP-OL-KGF2 质粒为阳性对照。PCR 扩增产物经 1% 核酸琼脂糖凝胶电泳后, 在 DNRBio Imaging Systems (购自以色列 DNR 成像系统有限公司) 紫外灯下进行分析。

1.2.8 红花种子的 SDS-PAGE 电泳检测 取 500 mg 转基因红花种子, 加入 200  $\mu$ L PBS 缓冲液充分研磨, 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 将上层油体部分和液体部分混合均匀后弃沉淀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取出上层油体, 加入 500  $\mu$ L PBS 缓冲液, 12 000 r/min 离心 4 min, 然后将液体部分吸出, 油体挂在管壁上。取上述样品、大肠杆菌表达的 KGF2 和野生型红花种子提取的油体, 按体积比 1:1 加入 2  $\times$  SDS 样品缓冲液, 混匀后煮沸 10 min, 冷却至室温后, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 每孔加样 10  $\mu$ L, 用 12% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳分离, 考马斯亮蓝 R250 染色 2 h, 用脱色液脱色后观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 拟南芥油体蛋白 *Oleosin* 基因的克隆

以 pUC19-*Oleosin* 质粒为模板, 利用 F(Oil-b) 和 R(Oil-b) 上、下游引物进行 PCR 扩增, 拟南芥 *Oleosin* 基因的 PCR 扩增结果见图 1。图 1 显示, 在约 762 bp 处扩增出目的片段, 说明拟南芥 *Oleosin* 基因克隆成功。

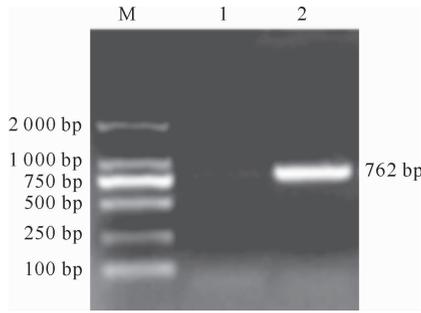


图 1 拟南芥 *Oleosin* 基因的 PCR 扩增结果

M. DL2000 DNA Marker; 1. 阴性对照; 2. *Oleosin* 基因

Fig. 1 PCR amplification of *Oleosin* gene of *Arabidopsis*

M. DL2000 DNA Marker; 1. Negative control; 2. *Oleosin* gene

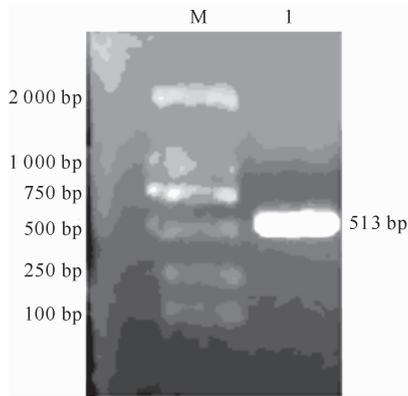


图 2 *KGF2* 基因的 PCR 扩增结果

M. DL2000 DNA Marker; 1. *KGF2* 基因

Fig. 2 PCR amplification of *KGF2* gene

M. DL2000 DNA Marker; 1. *KGF2* gene

#### 2.4 植物表达载体 pOP-OL-KGF2 的鉴定

对 pOP-OL-KGF2 质粒进行 PCR 鉴定和 *Nco* I、*Hind* III 双酶切鉴定。PCR 鉴定结果(图 4)

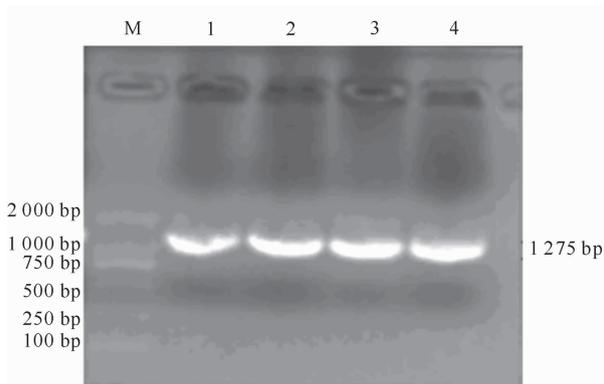


图 4 重组质粒 pOP-OL-KGF2 的 PCR 鉴定结果

M. DL2000 DNA Marker; 1. 阳性对照;

2~4. *Oleosin-KGF2* 基因全长

Fig. 4 PCR identification of pOP-OL-KGF2

M. DL2000 DNA Marker; 1. Positive control;

2-4. *Oleosin-KGF2* gene

#### 2.2 *KGF2* 基因的克隆

以 pUC19-KGF2 质粒为模板, *KGF2*-P 和 *KGF2*-R 为上、下游引物进行 PCR 扩增, 结果(图 2)显示, 在约 513 bp 处扩增出目的片段, 与预期结果一致。对扩增片段进行测序分析, 表明扩增片段与 *KGF2* 基因序列一致, 说明 *KGF2* 基因克隆成功。

#### 2.3 *Oleosin-KGF2* 融合基因的克隆

以 *Oleosin* 基因和 *KGF2* 基因为模板, F(Oil-b) 和 *KGF2*-R 为引物进行 PCR 扩增, 结果(图 3)显示, 在约 1 275 bp 处扩增出目的片段, 说明成功克隆了融合基因 *Oleosin-KGF2*。

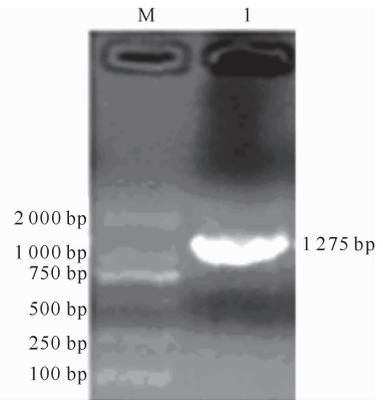


图 3 *Oleosin-KGF2* 融合基因的 PCR 扩增结果

M. DL2000 DNA Marker; 1. 融合基因 *Oleosin-KGF2*

Fig. 3 PCR amplification of *Oleosin-KGF2*

M. DL2000 DNA Marker; 1. *Oleosin-KGF2* gene

显示, 在 1 275 bp 处出现目的条带; 双酶切鉴定结果(图 5)显示, *Nco* I、*Hind* III 双酶切得到了 1 275 bp 的目的条带。

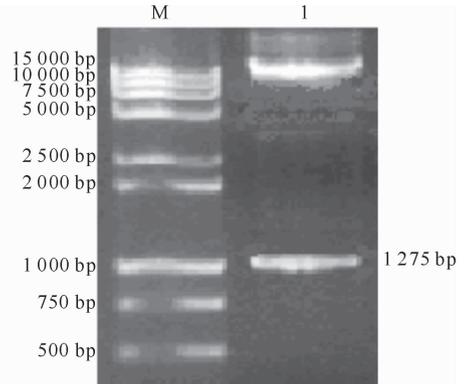


图 5 重组质粒 pOP-OL-KGF2 的双酶切鉴定结果

M. DL15000 DNA Marker; 1. pOP-OL-KGF2 质粒的

*Nco* I 和 *Hind* III 双酶切

Fig. 5 Identification of pOP-OL-KGF2

M. DL15000 DNA Marker; 1. pOP-OL-KGF2

plasmid digested by *Nco* I 和 *Hind* III

## 2.5 红花的遗传转化

通过农杆菌介导法对红花进行遗传转化,结果发现,将红花子叶放在含有 *KGF2* 基因的农杆菌 (OD 值为 0.6) 中侵染 15 min, 然后置于芽诱导的共

培养基上培养一段时间后,置于芽筛选培养基上进行抗性筛选,培养 1 个月后成功获得抗性植株。具体培养过程如图 6 所示。

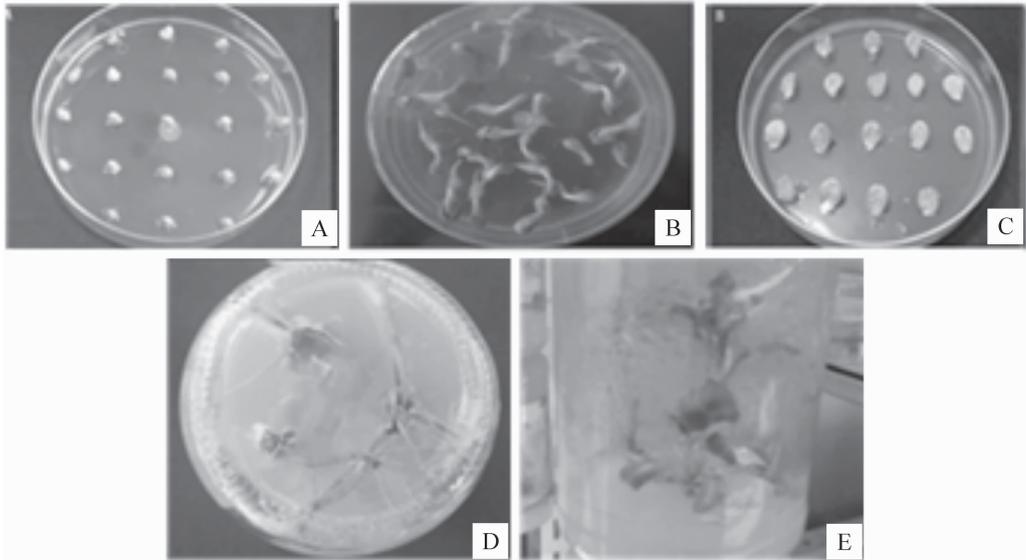


图 6 红花抗性植株的遗传转化过程

A. 播种; B. 预培养; C. 共培养; D. 不定芽分化; E. 生根

Fig. 6 Process of genetic transformation of safflower resistant plants

A. Sowing; B. Preincubate; C. Co-culture; D. Adventitious bud differentiation; E. Root

## 2.6 转基因红花植株的 PCR 检测

试验共获得了 12 株转 *KGF2* 基因的红花苗,对其进行的 PCR 检测结果(图 7)表明,在 2 株转基因红花植株中扩增获得了 513 bp 的 *KGF2* 基因片

段,说明目的基因已经整合到这 2 株红花基因组中;而在其余 10 株转基因红花植株中均未扩增出目的基因片段,说明目的基因未转入这 10 株红花基因组中。

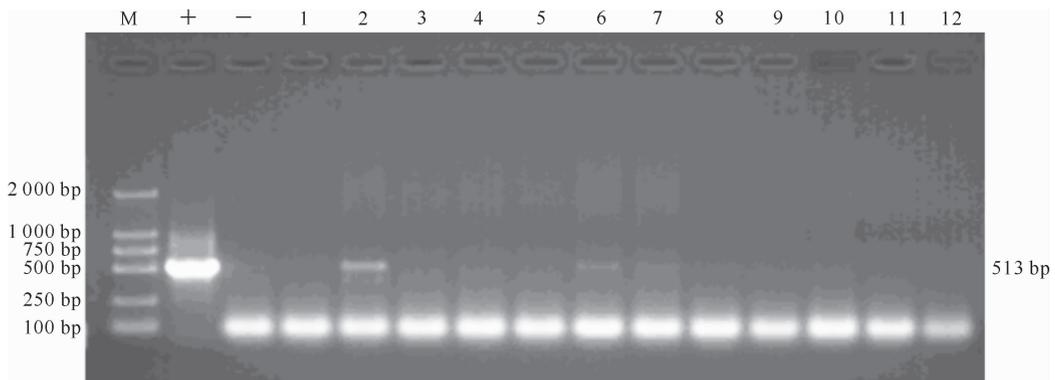


图 7 转 pOP-OL-KGF2 质粒红花植株的 PCR 检测结果

M. DL 2000 DNA Marker; +. 阳性对照; -. 阴性对照; 1~12. 红花再生植株

Fig. 7 PCR analysis of transgenic pOP-OL-KGF2 safflower plants

M. DL2000 DNA Marker; +. Positive control; -. Negative control; 1-12. Safflower regrowth plant PCR determination

## 2.7 转基因红花种子的 SDS-PAGE 检测

对 PCR 检测呈阳性的 3 株转基因红花植株进行 SDS-PAGE 检测,结果(图 8)表明,转基因红花植

株在 35.4 ku 均表达了 Oleosin-KGF2 融合蛋白,而野生型转基因植株在 35.4 ku 没有 Oleosin-KGF2 融合蛋白的表达。

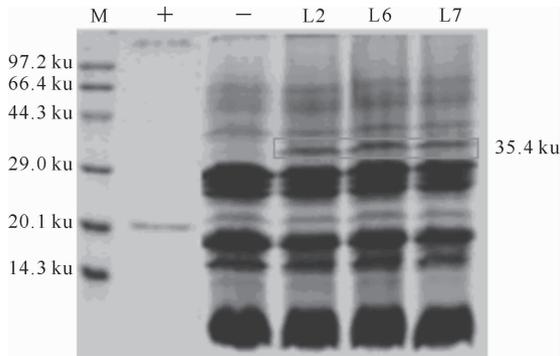


图 8 转 *KGF2* 基因红花植株的 SDS-PAGE 检测结果

M. 蛋白 Marker; +. 大肠杆菌表达 *KGF2*;

-. 野生型红花种子; L2、L6、L7. 转基因种子

Fig. 8 PCR analysis of transgenic *KGF2* gene safflower plants

M. Protein Marker; +. *KGF2* expressed in *E. coli*;

-. WT; L2, L6, L7. Transgenic safflower seeds

### 3 讨 论

通过组织培养途径获得红花再生植株尚比较困难,目前国内外关于红花高效再生体系建立的报道也不多见。本研究克服了红花不易生根的困难,建立了完善的花再生体系,为利用红花作为生物反应器生产药物蛋白奠定了良好的基础。另外,本课题组选用植物油体表达系统,将拟南芥油体蛋白与 *KGF2* 蛋白融合,锚定在油体表面,使 *KGF2* 蛋白可在种子中长期稳定贮存,正如 Boothe 等<sup>[12]</sup>认为,含有融合蛋白的种子即使贮存时间长达 2 年也仍然不会降解。

随着人们在植物分子生物学领域研究的发展,利用植物反应器生产基因工程药物蛋白的研究,必将为各种廉价药物蛋白的生产和应用开拓更广阔的前景<sup>[13-14]</sup>。本研究利用红花植物反应器生产 *KGF2* 具有安全高效、成本低的特点,有助于大规模生产以降低 *KGF2* 的市场价格。然而,利用转基因红花大规模生产 *KGF2* 还有一个很长的研发过程,还有许多问题需要解决<sup>[15-17]</sup>,如本研究获得的转 *KGF2* 基因红花中外源基因的整合情况、*KGF2* 基因的表达水平、转基因红花中蛋白的生物学活性等尚有待研究。目前,关于利用农杆菌介导法将 *KGF2* 基因导入药用植物中的报道也较少。本研究通过构建 *Oleosin-KGF2* 融合基因植物表达载体,选用红花作为转基因材料,主要基于红花的诸多药理作用,以及红花为自花授粉作物,不会对环境产生污染等原因。本试验首次成功获得了转 *Oleosin-KGF2* 融合蛋白

的红花植株,并对 *KGF2* 目的基因在红花基因组中的整合及表达情况进行了初步检测,为利用红花作为生物反应器生产药用重组 *KGF2* 蛋白奠定了基础。

### [参考文献]

- [1] 陈千益,付晋凤,葛茂星. 角质细胞生长因子-2 在创面修复中的作用 [J]. 医学综述,2007,13(17):1299-1301.  
Chen Q Y, Fu J F, Ge M X. Effects of keratinocyte growth factor-2 in wound healing [J]. Medical Recapitulate, 2007, 13 (17):1299-1301. (in Chinese)
- [2] 王艳春,张兆山. 角质形成细胞生长因子-2 的应用研究进展 [J]. 生物技术通讯,2005,16(4):432-434.  
Wang Y C, Zhang Z S. Advances in application of keratinocyte growth factor-2 [J]. Letters in Biotechnology, 2005, 16 (4): 432-434. (in Chinese)
- [3] Jaskoll T, Abichaker G, Witcher D, et al. FGF10/FGFR2b signaling plays essential roles during in vivo embryonic submandibular salivary gland morphogenesis [J]. BMC Dev Biol, 2005, 5(1):11-22.
- [4] Beer H, Vindevoghel L, Mary J G, et al. Fibroblast growth factor (FGF) receptor 1-III b is a naturally occurring functional receptor for FGFs that is preferentially expressed in the skin and the brain [J]. J Biol Chem, 2000, 275(21):16091-16097.
- [5] Govindarajan V, Ito M, Makarenkova H P, et al. Endogenous and ectopic gland induction by FGF-10 [J]. DevBIOL, 2000, 225(1):188-200.
- [6] Steiling H, Werner S. Fibroblast growth factors: Key player in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection [J]. Curr Opin Biothech, 2003, 14(5):533-537.
- [7] Jeschke M G, Herndon D N. The combination of IGF-I and *KGF* cDNA improves dermal and epidermal regeneration by increased VEGF expression and neovascularization [J]. Gene Ther, 2007, 14(16):1235-1242.
- [8] Sandborn W J, Sands B E, Wolf D C, et al. Repifermin (keratinocyte growth factor-2) for the treatment of active ulcerative colitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2003, 17(11):1355-1364.
- [9] Pereira C T, Herndon D N, Rocker R, et al. Liposomal gene transfer of keratinocyte growth factor improves wound healing by altering growth factor and collagen expression [J]. J Surg Res, 2007, 139(2):222-228.
- [10] Chen X, Hu W, Wei W G, et al. Effects of keratinocyte growth factor 2 (*KGF-2*) on keratinocyte growth, migration and on excisional wound healing [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2009, 36(7):854-862.
- [11] 宗宪磊,蔡景龙,姜筠银,等. 角质细胞生长因子研究进展 [J]. 中国修复重建外科杂志,2009,23(2):188-192.  
Zong X L, Cai J L, Jiang D Y, et al. Research progress on keratinocyte growth factor [J]. Chinese Journal of Reparative

- and Reconstructive Surgery, 2009, 23(2): 188-192. (in Chinese)
- [12] Boothe J G, Saponja J A, Parmenter D L. Molecular farming in plants: Oil seeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins [J]. Drug Development Research, 1997, 42: 172-181.
- [13] 杨 晶, 邵明龙, 李校堃, 等. 利用分子生物学技术在植物生物反应器领域的应用 [J]. 河北农业科学, 2009, 13(1): 27-30.  
Yang J, Shao M L, Li X K, et al. Application of molecular biological techniques on plant bioreactor [J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2009, 13(1): 27-30. (in Chinese)
- [14] 荆玉祥, 匡廷云, 李德葆. 植物分子生物学成就与前景 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 254-267.  
Jing Y X, Kuang T Y, Li D B. Achievements and prospects of plant molecular biology [M]. Beijing: Science Press, 1995: 254-267. (in Chinese)
- [15] 杨 晶, 李天航, 李校堃, 等. 外界条件的改变对红花离体培养的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3): 708-710.  
Yang J, Li T H, Li X K, et al. Effect of changed cultivation condition on safflower culture *in vitro* [J]. Li Shizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(3): 708-710. (in Chinese)
- [16] Yang J, Shao M L, Li T H, et al. The effect of safflower regeneration plant by phytohormone [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2009, 9(32): 1335-1338.
- [17] Babul A, Gonul B, Dincer S, et al. The effect of VVEGF application in gel from on histamine content of experimentally induced wound in mice [J]. Amino Acids, 2004, 27(3): 321-326.
- [15] 孙春青, 杨 伟, 戴忠良, 等. 人工老化处理对结球甘蓝种子生理生化特性的影响 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(8): 1615-1620.  
Sun C Q, Yang W, Dai Z L, et al. Physiological and biochemical characteristics of 'Dongsheng' cabbage seeds during artificial aging [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2012, 32(8): 1615-1620. (in Chinese)
- [16] 薄丽萍, 吴 震, 蒋芳玲, 等. 不结球白菜种子活力及抗氧化特性在人工老化过程中的变化 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(4): 724-730.  
Bo L P, Wu Z, Jiang F L, et al. Seed vigor and antioxidant characteristics of non-heading Chinese cabbage seeds during artificial aging [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2011, 31(4): 724-730. (in Chinese)
- [17] 唐祖君, 宋 明. 大白菜种子人工老化及劣变的生理生化分析 [J]. 园艺学报, 1999, 26(5): 319-322.  
Tang Z J, Song M. Physiological and biochemical analysis of artificially aged Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson) [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1999, 26(5): 319-322. (in Chinese)
- [18] Goel A, Sheoran I S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial aging in cotton (*Gossyium hirsutum* L.) seeds [J]. Science, 2004, 28: 1157-1162.

(上接第 209 页)