

## 表皮生长因子诱导人成纤维细胞基因表达谱的变化\*

马宏 张宗玉 童坦君

(北京大学医学部生物化学与分子生物学系 北京 100083)

表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)是一种较强的有丝分裂原,在哺乳动物胚胎发育过程中起重要作用;对体外培养的多种细胞,包括人二倍体成纤维细胞,均有刺激增殖的作用。EGF与表皮生长因子受体(Epidermal Growth factor receptor, EGFR)结合,活化EGFR。EGFR除介导EGF信号以外,还参与G蛋白耦联受体的配体、细胞因子、细胞黏附及多种细胞压力信号的转导<sup>[1]</sup>。

本实验室曾以EGF作用2BS细胞,可快速诱导DNA的合成,并发现可活化细胞周期中起重要作用的P34<sup>cdc2</sup>激酶,促进G1期周期素(CLN1)的表达<sup>[2]</sup>。近年来信号传导研究方面的发展证明EGF除诱导细胞有丝分裂外,还参与离子通道活性的调节、压力纤维的形成和趋化因子转录等细胞反应<sup>[3]</sup>。目前,对EGF诱导细胞反应的全面分子基础尚未明了。另外,EGF作为调节胚胎发育的一种重要的生长因子,其迟发、持久的作用更为重要,而此方面分子机理的研究甚少。本实验以基因芯片技术检测EGF处理人胚肺二倍体成纤维细胞(2BS细胞)后48小时基因的表达情况,结果显示:EGF诱导2BS细胞大范围基因表达的变化,表达变化的基因参与细胞的能量代谢、生物合成、细胞的周期进程以及受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTKs)和G蛋白耦联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)的信号传导。

## 材料与方 法

## 1. 材料

人胚肺二倍体成纤维细胞(2BS细胞):卫生部北京生物制品研究所建系。

## 2. 方法

(1) 细胞培养 按本室常规方法。2BS细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养液,于37℃5%(体积分数)CO<sub>2</sub>条件下培养至28代,用含1%胎牛血清的培养液饥饿细胞48小时,弃去原培养液,加入含100 ng/ml EGF的培养液,继续培养48小时,提取总RNA。

(2) 总RNA的提取 参考Gibco公司的TRIzol试

剂提取总RNA的方法。

(3) 基因芯片制备 芯片所用的4096个cDNA克隆由上海联合基因科技有限公司提供,用通用引物进行PCR扩增。用Cartesian7500点样仪(Cartesian公司)及硅烷化玻片(Telechem公司)进行点样。点样后经水合、干燥、UV交连等处理备用。

(4) 探针制备、杂交、荧光扫描和结果分析 参考文献<sup>[4]</sup>。

## 结 果

## 1. 基因芯片的质量标准控制

提取纯化EGF诱导前、后细胞的mRNA,分别逆转录合成以Cy3和Cy5标记的cDNA探针,混合后与含有4096条人类全长基因的芯片(HGEC-40S)杂交,用预先选定的内参基因(40个管家基因)对Cy3和Cy5的原始信号进行均衡和修正。同时,为了监控芯片制备和杂交过程,设定水稻U2RNA、HCV外壳蛋白及空白液为阴性对照,经验证这些点都为阴性,从而证明了数据的可靠性。

## 2. EGF诱导2BS细胞基因表达谱的变化

EGF诱导2BS细胞48小时后,在所检测的4096种人类基因中,有855种基因的荧光信号强度比在2倍以上(该结果的详细内容请与作者联系, email: hongma@sun.bjmu.edu.cn)。荧光信号强度比在3倍或3倍以上的基因有216种,其中上调的有48种,而下调的有168,见表1。

表1 EGF诱导2BS细胞部分表达变化的基因

受录号	基因名称	荧光信号强度比
A. 参与生物合成及能量代谢的酶		
X02308	Thymidylate synthase	6.077
D78130	Squalene epoxidase	4.767
U41668	Deoxyguanosine kinase	4.334
L16842	Ubiquinol cytochrome-c reductase core 1 protein	3.546

本文2001年12月3日收到,2002年3月18日接受。

\*国家重点基础研究发展规划资助项目(G2000057001) 国家自然科学基金重点资助项目(39930170)。

续表 1

受录号	基因名称	荧光信号强度比
L06845	CysteinyI-tRNA aynthetase	3.545
J03459	Leukotriene A-4 hydrolase	3.503
AF038406	NADH dehydrogenase-ubiqinone Fe-s protein subunit	3.385
NM_2493	NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex	3.344
X80695	Cytochrome-c oxigenase(OXA1Hs)	3.211
M16505	Steriod sulfatase(STS)	3.095
D84273	AsparaginyI tRNA synthesase	3.056
U39067	Translation initiation factor eIF3 p36 subunit	3.025
D32053	Lysyl-tRNA synthesae	0.323
B. 参与细胞周期进程的蛋白		
D86984	Cyclin E2	0.318
X77794	Cyclin G1	3.459
M25753	Cylin B	4.903
D49738	Cytoskeleton associated protein (CG22)	3.008
AF103796	Centromere/Kinetochore	2.597
U12022	Calmodulin(CALM1)	2.582
C. 细胞骨架与细胞外基质组分及介导二者相互作用的蛋白		
U19718	Microfibril-associated glycoprotein (MFAP2)	0.181
J05243	Nonerythroid alpha-spectrin (SPTAN1)	0.198
M30269	Nidogen	0.277
U16306	Chondroitin sulfate proteoglycan versican precursor	0.282
M24486	Proxyl 4-hydroxylase alpha subunit	0.230
Y14690	Procollagen alpha 2(V)	0.270
D. 参与蛋白质降解的酶及蛋白因子		
AK000362	Sorting-nexin	3.227
AB003102	Proteasome subunit p44.5	2.136
AF117386	Ubiquitin-specific protease	2.142
U39318	E2 ubiquitin conjugating enzyme	3.241
M23254	Ca <sup>2+</sup> activated neutral protease large subunit	3.642
M73047	Tripeptidyl peptidase II	0.241
AB008112	Pex1	0.308
E. 细胞膜受体及离子通道		
U16129	Glutamate receptor(GluR4)	0.109
S62908	Gammma-aminobutyric acidA receptor	0.134
00672	Interleukin-10 receptor	0.146
M60626	N-formylpeptide receptor(fMLP-R98)	0.180
U78180	Sodium ion channel	0.184
AB028999	KIAA1076protein	0.190
M92303	Votage-dependent calcium channel beta-1 subunit	0.190
NM_004518	Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily	0.191
L27745	Voltage-dependent calcium channel alpha-1 subunit	0.202
M37981	Alpha-3neuronal nicotinic acetylcholine receptor	0.224
NM_00256	Purinergic receptor P2Xligand-gated ion channel 5	0.227

续表 1

受录号	基因名称	荧光信号强度比
U33632	Two P-domain K+ channel TWIK-1	0.227
NM_002310	Leukemia inhibitory factor (LIFR)	0.250
L36645	Receptor protein-tyrosine kinase (HEK8)	0.264
D26443	Glutamate transptorter	0.267
AF225988	Voltage-gated sodium channel alpha subunit(SCN8A)	0.296
Z75190	Apolipoprotein E receptor 2	0.333

## 讨 论

EGF 是一种刺激细胞生长、诱导胚胎发育的重要生长因子,EGF 诱导 2BS 细胞 48 小时后,有 855 种基因的表达发生变化,这 855 种基因参与细胞各种重要的生命活动,说明 EGF 具有多种生物功能。我们重点分析表达差异显著(荧光信号强度比 $\geq 3$ )的 216 种基因。

表达上调的基因多与能量代谢和生物合成有关,如:参与三羧酸循环的异柠檬酸脱氢酶、顺乌头酸酶,介导氧化磷酸化 ATP 合成的 ATP 合成酶、细胞色素 C 氧化酶、NADH 脱氢酶  $\beta$  亚单位及 Fe-S 蛋白及泛醌细胞色素 C 还原酶等,参与蛋白质生物合成翻译起始因子 3、翻译起始因子 4 及多种氨基酸-tRNA 合成酶,参与核酸生物合成的二氢乳清酸还原酶、脱氧鸟苷激酶和胸苷酸合成酶,此结果提示:EGF 诱导细胞的生物合成,促进能量代谢。另外,参与白三烯生物合成的白三烯 A4 羟化酶,生成雌激素的类固醇硫酸酶表达亦上调,前者可能参与 Ca<sup>2+</sup> 通道的活化;而雌激素可以调节 EGFR 的表达,后者可能在 EGF 诱导胚胎发育过程中起正向调节作用。

快速有效地降解多余的蛋白质在细胞周期的调控中起着重要的作用,EGF 诱导 2BS 细胞后,介导溶酶体有效降解蛋白质 sorting-nexin,溶酶体的组分 P<sub>44.5</sub>、泛素特异的蛋白酶及一种依赖钙离子的甲硫蛋白酶的表达上调,但是参与外溶酶体多肽降解的三肽酰基酶和超氧化物酶体合成因子的表达下调,这可能是因为后二者是前四者参与的蛋白质降解系统的补充,当前者活性增强,可以胜任蛋白质降解的任务,后者便相应的下调。

作为调节细胞增殖的主要信号分子,周期蛋白在 EGF 诱导后表达的变化显著,调节 G1 期进程的周期蛋白 E2 表达下调,而控制 G2/M 期转换的周

期蛋白 B 及周期蛋白 G1 的表达显著上调。另外,促微管组装的细胞骨架连接蛋白、着丝粒蛋白及钙调蛋白等与细胞周期进程相关基因上调,此结果提示:EGF 促进细胞周期的进程,EGF 诱导 48 小时后,2BS 细胞将进入 G2/M 转换期,这与唐左琴等人的实验结果相符<sup>[5]</sup>。

EGF 持续作用并未诱导 EGFR 基因表达的下调,此时,MAP3K7 和 MAP3K13 的表达水平仍较对照组高,说明 MAPK 通路是 EGF 持久的作用途径之一,MAPK 通路可能是 EGF 在胚胎发育及伤口愈合过程中发挥作用的主要途径。

除上面提到的细胞骨架连接蛋白以外,促进微丝聚合的微丝连接蛋白,介导细胞骨架变化及细胞与外基质相互作用的非红细胞血影蛋白、巢蛋白及硫酸软骨素蛋白前体等表达下调,与胶原合成相关的脯氨酰-4 羟化酶  $\alpha$  亚基及胶原的组分 IV 型胶原显著下调,与细胞转化关系密切的钙调蛋白基因表达亦上调,主要组织相容性抗原表达显著下调,上述结果似乎提示:2BS 细胞在 EGF 的持续诱导下出现一些转化的特征;但是,介导细胞黏附的血小板反应素、整合素调节分子 KIP 表达却上调,诱导细胞凋亡的肿瘤坏死因子的表达亦显著下调,这些基因的表达可能与 EGF 诱导细胞对抗无血清诱导凋亡的机理相关。

在功能较明确的表达下调基因中,约 1/4 为编码膜受体及离子通道的基因。这其中包括:白介素-10 受体、白血病抑制因子受体、嗜中性细胞趋化因子受体、血管内皮生长因子受体等细胞因子受体, $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体、乙酰胆碱受体及谷氨酸受体 (GluR4) 等神经递质受体,以及其它配体门离子通道和电压依赖的离子通道。另外,受高渗环境诱导的甜菜碱转运蛋白,氧化压力激活的蛋白激酶 25,以及受光调节的 RIGUI 在 EGF 诱导后均下调,G 蛋白和 G 蛋白耦联的蛋白激酶的表达在 EGF 诱导后下调,而使 G 蛋白失活的调节蛋白 RGP4 的表达却上调。目前已知:高渗、氧化剂可以刺激 EGFR 磷酸化,而光、神经递质、血管活性多肽等能使 G 蛋白的活化,EGFR 是活化 G 蛋白介导的有丝分裂信号的基本传导者。曾有报道,EGF 可通过磷酸化 GPCR<sup>[6]</sup>、G 蛋白<sup>[7]</sup>或其它机制<sup>[8]</sup>使 GPCR 去敏感化,而我们的结果提示:在 EGF 持续作用使 GPCR 及相关蛋白低表达,对其配体或非配体的刺激因素可能处于一种低敏感状态。

EGF 对基因转录的调控是其细胞核内作用之

一,彭勇等曾报道 EGF 持续作用诱导 DNA 特异结合蛋白质表达的增加<sup>[9]</sup>。在我们检测的 294 种与 DNA 结合及转录相关的蛋白因子中,约有 1/6 的表达发生了变化,其中 21 种转录因子表达差异显著。

体外培养细胞的复制衰老是研究生物体衰老的一个重要模型,复制衰老的一个最基本的特征是对有丝分裂原的刺激失去反应,EGF 持续诱导 2BS 细胞,Werner 综合症相关基因 WRN 的表达显著下调,与早发性退行性疾病相关的硫胺素载体蛋白、载脂蛋白受体 2 等基因表达下调,另外,端粒结合蛋白 TRF1 和 TRF2 的表达亦下调,这些基因在 EGF 信号传导通路中及其在复制衰老中的作用还有待进一步研究。

总之,EGF 诱导 2BS 细胞的基因表达谱发生广泛而显著的变化,目前,我们还不很清楚这些基因表达变化的因果关系,本研究为阐明 EGF 诱导细胞增殖、癌变及抗凋亡等生命活动的分子机理提供丰富的信息,为进一步探讨 EGF 的生物学功能提供了新的方向。

## 摘 要

深入研究 EGF 对靶细胞的作用有助于揭示细胞增殖、转化、凋亡以及胚胎发育的分子机理。本文采用 cDNA 微阵列技术,检测 EGF 持续作用 48 小时后人胚肺二倍体成纤维细胞基因表达谱的变化。结果显示:EGF 长期作用诱导广泛的基因表达变化,在所检测的 4096 种人类基因中,有 855 种发生了变化,这些表达变化的基因参与细胞的能量代谢、生物合成、细胞周期调控及受体酪氨酸激酶和 G 蛋白耦联受体信号转导等细胞反应,其中最显著的变化趋势是 GPCR 及其相关蛋白基因表达的下调。

关键词: EGF 成纤维细胞 cDNA 微阵列  
基因表达谱 G 蛋白耦联受体

## 参 考 文 献

- [1] Ilackel, P. O. et al., 1999, *Curr Opin Cell Boil.*, 11: 177-183.
- [2] 蔡家新、童坦君,1994,生物化学与生物物理学报,26: 423-426.
- [3] Zwick, E. et al., 1999, *Trends Pharmacol Sci*, 20:408-412.
- [4] 许沈华等,2001,中国肿瘤,10:41-43.
- [5] Tang, Z. Q. et al., 1994, *Mech. age. dev.*, 73:57-67.
- [6] Hadcock, J.R. et al., 1992, *J. boil. chem.*, 267:26017-26022.
- [7] Leibmann, C. et al., 1996, *J Biol. Chem.*, 271:31098-31105.
- [8] Lamm, M.L. et al., 1999, *Endocrinology*, 140:29-36.
- [9] 彭勇等,1993,生物化学杂志,9:400-405.