

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00014

表皮生长因子及其受体在多囊肾病大鼠体液及肾组织中的表达及意义

李 林, 华振浩, 戴 兵, 汤 兵, 梅长林*
第二军医大学长征医院肾内科, 上海 200003

[摘要] **目的:**观察常染色体显性多囊肾病大鼠体液及肾脏组织中表皮生长因子(EGF)及其受体(EGFR)的表达,探讨二者在多囊肾病发病过程中的作用。**方法:**采用 ELISA 方法检测多囊肾病 Han;SPRD 大鼠血液、尿液中 EGF 含量,蛋白质印迹法、原位杂交及免疫组织化学方法观察 EGF/EGFR 在大鼠肾组织的表达。**结果:**大鼠尿液中 EGF 含量远高于血液,3 周龄大鼠体液 EGF 含量高于 3 个月龄,杂合患病大鼠尿液中 EGF 浓度(pg/ml)显著低于正常大鼠(263.45±48.53 vs 321.09±74.57, P<0.05)。患病大鼠肾组织 EGF 表达位置不变,但表达量显著低于正常;EGFR 异位表达在囊肿细胞基底膜面和腔膜面,且表达强于正常大鼠;EGFR 与磷酸化 EGFR 表达量从高至低依次为 cy/cy 大鼠、cy/+ 大鼠和 +/+ 大鼠。**结论:**多囊肾病大鼠发病过程中存在 EGF/EGFR 信号转导通路的异常激活。

[关键词] 常染色体显性多囊肾病;表皮生长因子;表皮生长因子受体;体液;肾

[中图分类号] R 692.12 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)01-0014-05

Expression of EGF/EGFR in body fluids and kidney tissues of rats with polycystic kidney disease and its significance

LI Lin, HUA Zhen-hao, DAI Bing, TANG Bing, MEI Chang-lin*

Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the expression of epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR) in the body fluids and renal tissues of rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) and to explore their roles in the development of the disease. **Methods:** EGF levels in the blood and urine of Han;SPRD rats were determined by ELISA. Western blotting, *in situ* hybridization and immunohistochemistry were used to examine the expression of EGF/EGFR in the kidneys of ADPKD rats. **Results:** The concentration of EGF in the urine was higher than that in the blood. EGF level in the body fluids of 3 weeks old rats was higher than that of the 3 months old rats. The urine EGF level of cy/+ rats was significantly lower than that in the normal rats ([263.45±48.53] pg/ml vs [321.09±74.57] pg/ml, P<0.05). The renal distribution pattern of EGF remained unchanged in rats with ADPKD, but the expression level was down-regulated. EGFR in ADPKD rats was ectopically overexpressed on the apical and basolateral membrane of cystic cells. The order of EGFR and phosphorylated EGFR expression was: cy/cy rat > cy/+ rat > +/+ rat. **Conclusion:** The abnormal EGF/EGFR might play a key role in the development and progression of the ADPKD.

[KEY WORDS] autosomal dominant polycystic kidney disease; epidermal growth factor; epidermal growth factor receptor; body fluids; kidney

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(1):14-18]

常染色体显性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 是最常见的威胁人类生命健康的遗传性肾病, 发病率高达 1%~2%^[1]。然而目前人们对于该病的发病机制知之甚少, 也缺乏

有效的干预措施。本研究采用目前公认的 ADPKD 的动物模型 Han;SPRD 大鼠检测表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 在大鼠体液中的含量, 观察 EGF 及其受体 (epidermal growth factor receptor, EG-

[收稿日期] 2008-10-13 **[接受日期]** 2008-11-06

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目 (30330640), 国家自然科学基金 (30170901), 国家科技部重大科技专项基金 (2002AA2Z3130). Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (30330640), National Natural Science Foundation of China (30170901) and the grant from the National Sciences and Technologies R&D Program (2002AA2Z3130).

[作者简介] 李 林, 博士, 讲师、主治医师. E-mail: lilin_616@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-63610109-73292, E-mail: chlmei1954@126.com

FR)在大鼠肾组织中的表达,以明确 EGF/EGFR 在多囊肾病发病过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 大鼠 EGF 定量 ELISA 试剂盒购自上海森雄公司,兔抗大鼠 EGF 抗体、兔抗大鼠 EGFR 抗体、EGF、EGFR 原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德公司,兔抗大鼠磷酸化 EGFR(P-EGFR)抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。焦碳酸二乙酯(DEPC)及其他试剂均为 Sigma 公司产品,分析纯。动物代谢笼为第二军医大学动物中心设备。

1.2 实验动物 Han:SPRD 大鼠由美国 Mayo Clinic 的 Dr. Torres 惠赠,在第二军医大学实验动物中心 SPF 级动物房饲养、繁殖。选取杂合(cy/+)多囊肾病大鼠交配后第4代的3周龄纯合多囊肾病大鼠(cy/cy)和3个月龄杂合多囊肾病大鼠(cy/+)各18只进行实验,3周龄和3个月龄同窝正常纯合大鼠(+ / +)各18只作为对照,雌雄各半。

1.3 大鼠体液中 EGF 的定量检测

1.3.1 体液标本的采集及处理 采用眼眶静脉丛采血并收集血液标本;压迫大鼠颈侧,长颈玻璃滴管刺入眼内角,采血 2.0 ml。标本 4℃ 静置过夜,4℃ 3 000×g 离心 10 min,收集血清,分装后-80℃ 保存待检。采用代谢笼收集法收集尿液;大鼠编号后放入代谢笼,正常供水、喂食,收集 12 h 以上的尿液,瓶中加入甲苯(体积分数 2%)防腐。3 000×g 离心 10 min 后取上清,分装贮存于-20℃ 保存待检。

1.3.2 ELISA 方法检测 EGF 含量 采用 ELISA 方法检测大鼠血液、尿液中的 EGF 含量。按说明书建立标准曲线;设 8 个标准孔,第 8 孔作为空白对照。在检测孔中分别加入样品稀释液和待测体液各 50 μl,混合后 37℃ 孵育 2 h。洗涤液洗涤,加入一抗工作液混合后 37℃ 孵育 60 min。洗涤,加入稀释酶标抗体工作液混合后 37℃ 孵育 60 min。洗涤,加入预混 TBM 底物溶液 37℃ 暗室孵育 10 min,加入终止液终止反应。振荡 5 min,30 min 内用酶标仪测定 492 nm 的光密度(D)值。以标准孔的 D 值在半对数纸上画出标准曲线,根据样品 D 值查出相应 EGF 含量。

1.4 EGF/EGFR 在 Han:SPRD 大鼠肾组织中的定位

1.4.1 组织标本处理 大鼠腹腔注射戊巴比妥(40 mg/kg 体质量)麻醉,称量,开腹后夹闭右肾动脉,摘除右肾,称量,迅速投入液氮中保存供蛋白质印迹检

测。左心室插管灌注 4% 多聚甲醛(含 0.1% DEPC)固定 10 min,摘除左肾,称量。取 1/2 以 10% 中性甲醛溶液固定,作为免疫组化标本,其余组织切成厚度 4 mm 的小块,多聚甲醛固定 2 h 作为原位杂交标本。两者常规脱水、透明后石蜡包埋,切片厚度 5 μm(原位杂交标本 6 μm)。

1.4.2 原位杂交方法 EGF 探针序列如下:5'-AGA ATC TAT TGG GTG GAT TTA GAA AGA CAA-3';5'-TGT TCT GCT TCC TGA TGG GAA ACG ATG TCA-3';5'-GTA CGT CTC CAA GGC AGC ATG CTG AAG CCC-3'。EGFR 探针序列如下:5'-TAC AAC CCC ACC ACG TAC CAG ATG GAT GTG-3';5'-ACA GAC TCC AAC TTC TAC CGT GCC CTG ATG-3';5'-CCC TGA CTA CCA GCA GGA CTT CTT TCC CAA-3'。

所用试剂及器械均用 0.1% DEPC 处理以灭活 RNA 酶。切片常规脱蜡入水,分别滴加 3% H₂O₂ 和胃蛋白酶作用。滴加预杂交液 38℃ 孵育 4 h。滴加 20 μl 杂交液,阴性对照为未标记地高辛的寡核苷酸。38℃ 孵育过夜后分别经 37℃ 的 2×SSC、0.5×SSC、0.2×SSC 洗涤。封闭 30 min 后滴加生物素化鼠抗地高辛抗体 37℃ 作用 60 min,洗涤。SABC 试剂 37℃ 作用 20 min,洗涤。生物素化过氧化物酶 37℃ 作用 20 min,洗涤。DAB 显色液镜下显色,蒸馏水冲洗终止。苏木精复染 2 min,盐酸乙醇分化,常规脱水、透明、封片。光学显微镜下观察、摄片。

1.4.3 免疫组织化学方法 切片常规脱蜡入水,0.1 mol/L PBS 洗涤。滴加 3% H₂O₂,室温封闭 5~10 min,蒸馏水洗涤。微波修复抗原,PBS 洗涤。正常山羊血清室温封闭 20 min,分别滴加 1:700 稀释的兔抗鼠 EGF 抗体和兔抗鼠 EGFR 抗体,4℃ 孵育过夜。PBS 洗涤后滴加生物素化二抗,室温孵育 20 min,洗涤。滴加 SABC 试剂,室温孵育 20 min。PBS 洗涤。DAB 显色液镜下显色,蒸馏水冲洗终止。苏木精复染 2 min,盐酸乙醇分化,常规脱水、透明、封片。光学显微镜下观察、摄片。

1.5 蛋白质 Western 印迹方法检测大鼠肾组织中的 EGFR 及 P-EGFR 表达 预冷 RIPA 缓冲液裂解液氮冻存的肾脏标本。沸水浴 10 min,13 000×g 离心 30 min,取上清。Bradford 法测定蛋白含量,每孔上样 30 mg 蛋白,经 10% 浓度的 SDS-PAGE 凝胶电泳后电转移至硝酸纤维素膜。经封闭,洗涤后 1:1 000 稀释的兔抗鼠 EGFR 抗体和 P-EGFR 抗体,4℃ 过夜。1:1 000 稀释偶联辣根过氧化物酶的羊抗兔抗体,室温孵育 1 h 后采用加强化学发光法

(ECL)显色,暗室曝光、压片。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 9.0 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,体液 EGF 含量的组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体液中 EGF 的定量检测 结果显示大鼠尿液中 EGF 含量远高于血液;3 周龄的 *cy/cy* 大鼠体液中 EGF 远高于 3 个月龄的正常大鼠或患病大鼠;3 个月龄患病大鼠尿液中 EGF 含量 (263.45 ± 48.53) pg/ml ,显著低于相同月龄正常大鼠的 (321.09 ± 74.57) pg/ml ($P < 0.05$,表 1)。

2.2 EGF/EGFR 在 Han:SPRD 大鼠肾组织中的定位 原位杂交与免疫组织化学显示在正常大鼠肾组织中 EGF 主要分布于远端肾小管和髓攀上皮细胞的胞质和腔膜面(图 1A、1C)。多囊肾病大鼠 EGF 除分布于以上部位外,还见于囊肿衬里上皮细胞,表达弱于正常大鼠(图 1B、1D);EGFR 主要表达于正常大鼠近端肾小管和集合管(图 2A、2D),患病大鼠 EGFR 还见于囊肿衬里上皮细胞,且表达强于

正常大鼠(图 2B、2C、2E、2F)。在亚细胞定位上,EGFR 蛋白出现了显著差异:正常大鼠的 EGFR 位于细胞基底膜面,而多囊肾大鼠的 EGFR 蛋白除分布在基底膜面上,同时还异位表达于细胞的腔膜面。

表 1 大鼠体液中 EGF 的含量

Tab 1 Contents of EGF in body fluids of rats

[$n=18, \bar{x} \pm s, \rho_B(\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$]

Group	Blood	Urine
3 week +/+ normal rat	193.54 ± 58.33	437.69 ± 157.92
3 week <i>cy/cy</i> PKD rat	186.21 ± 42.53	376.24 ± 61.57
3 month +/+ normal rat	148.44 ± 58.05*	321.09 ± 74.57*
3 month <i>cy/+</i> PKD rat	149.85 ± 45.52*	263.45 ± 48.53* [△]

* $P < 0.05$ vs 3 week +/+ normal rat; [△] $P < 0.05$ vs 3 month +/+ normal rat. PKD: Polycystic kidney disease

2.3 EGFR 及磷酸化 EGFR 在 Han:SPRD 大鼠肾组织中的定量 Western 印迹检测结果显示 EGFR 蛋白的表达量与 EGFR 的磷酸化程度相符,从高至低依次为 *cy/cy* 大鼠、*cy/+* 大鼠和 +/+ 大鼠(图 3)。

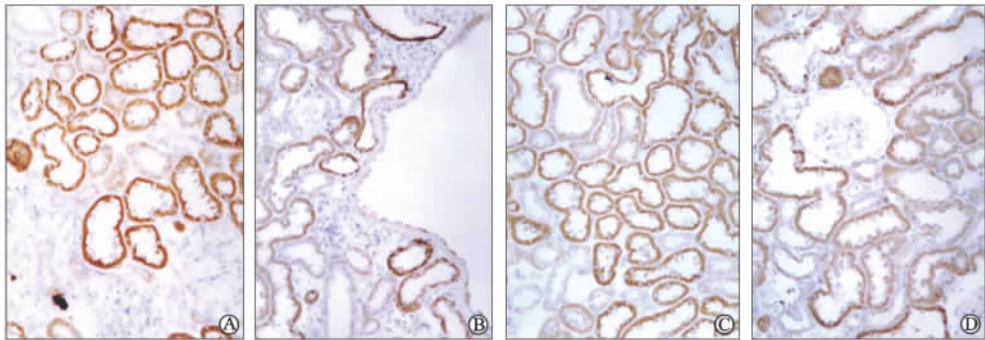


图 1 大鼠肾脏 EGF 蛋白表达

Fig 1 Expression of EGF protein in rat kidney tissues

A, B: *In situ* hybridization; C, D: Immunohistochemistry. A, C: Normal rat; B, D: *cy/+* PKD rat. Original magnification: $\times 100$

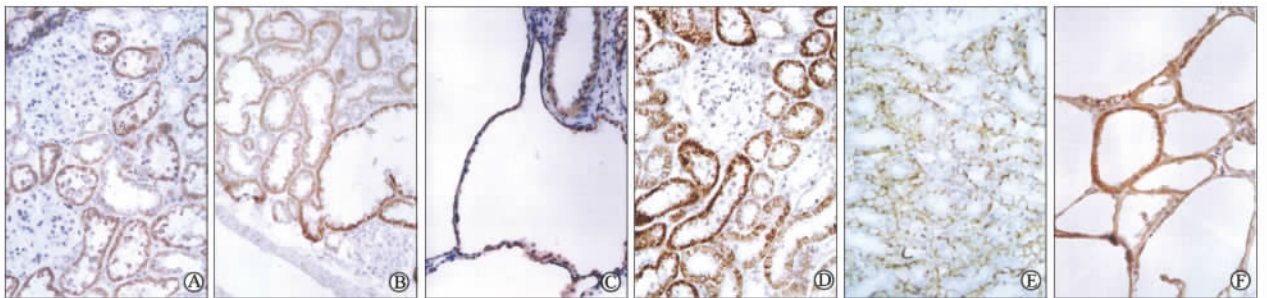


图 2 大鼠肾脏 EGFR 蛋白表达

Fig 2 Expression of EGFR protein in rat kidney tissues

A-C: *In situ* hybridization; D-F: Immunohistochemistry. A, D: Normal rat; B, E: *cy/+* PKD rat; C, F: *cy/cy* PKD rat. Original magnification: $\times 100$

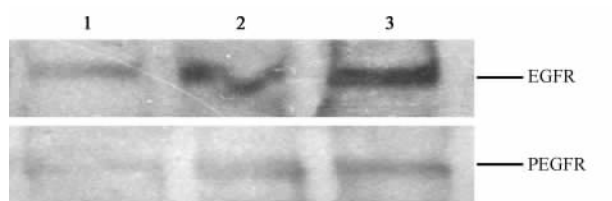


图3 各组大鼠肾脏 EGFR 及磷酸化 EGFR 蛋白蛋白质印迹表达

Fig 3 Expression of EGFR and phosphorylated EGFR (P-EGFR) protein in rat kidney tissues of different groups

1: +/+ rat; 2: cy/+ PKD rat; 3: cy/cy PKD rat

3 讨论

ADPKD 发病率高、危害严重而且至今没有药物医治,因此成为目前肾脏病研究领域的热点^[2]。作为一种肿瘤疾病,各种细胞因子、生长因子和趋化因子在多囊肾病的发病过程中起着关键的作用,这些因子通过自分泌、旁分泌方式不断刺激囊肿衬里上皮细胞分裂增殖,最终导致囊肿的发生及增大^[3]。在这些致病因子中 EGF/EGFR 的异常引起了广泛的重视。本研究选用了 ADPKD 的 Han:SPRD 大鼠模型,该模型由自发突变形形成,临床特点与遗传方式特征与人类的 ADPKD 十分相似。Han:SPRD 大鼠是由 Kaspareit-Rittinghausen 等^[4]于 1989 年发现并命名的,是目前公认的 ADPKD 动物模型之一。患病纯合大鼠出生后不久,腹部能触及肿大的肾脏,2 周龄时可观察到肾脏组织学和超微结构的明显变化^[5],3 周后死于尿毒症,因此纯合大鼠只能选择 3 周龄作为研究对象。而杂合大鼠出生后 2 个月左右可通过腹部触诊与正常大鼠鉴别,所以选取 3 个月龄的杂合大鼠作为研究对象。而 3 周龄的正常对照大鼠(+ / +)与杂合大鼠(cy / +)无法直接区分。本研究中的 3 周龄正常对照大鼠(+ / +)是事先测定标本,而分组是在 3 个月后才根据肾脏大小确定的。

EGF 是一种多肽生长因子,由 Cohen^[6]于 1962 年首先从成年雄性小鼠的颌下腺分离提纯。EGF 和 EGFR 广泛分布于全身各种器官及组织中,以颌下腺丰度最高,其次是肾组织,其他脏器中含量极低^[7]。Pastore 等^[8]研究表明 EGF/EGFR 与胚胎发育有关,对内胚层和外胚层来源的组织有促分裂和刺激合成代谢的作用,能刺激表皮细胞、上皮细胞、间质细胞和血管内皮细胞的增殖,参与了组织损伤后的修复。EGF 通过 EGFR 实现其作用,当 EGF

与受体结合后,受体二聚化并激活了受体胞内区的酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK),该酶将受体本身或底物上的酪氨酸残基磷酸化,从而引起下游一系列信号蛋白和酶的磷酸化(活化),主要经 MAPK 等途径将增殖信号传入细胞核,引起 c-fos、c-jun 等即刻基因的转录和翻译,最终促使细胞进入 S 期,导致细胞增殖。在正常情况下 EGF/EGFR 介导的信号通路调控细胞的增殖、分化^[9]。而该信号通路活性异常升高则导致细胞过度增殖,导致各种实体性肿瘤和增殖性疾病如牛皮癣、非小细胞性肺癌、乳腺癌、肾癌等,高表达的 EGFR 通常提示疾病的预后不良^[10]。

本研究结果显示,大鼠血液中 EGF 含量均明显低于尿液中的含量,这与 EGF 的合成部位以及在肾脏中的作用有关。切除大鼠一侧肾脏后,血浆 EGF 水平不变,而尿液中 EGF 含量下降 50%;切除大鼠颌下腺后尿液中 EGF 浓度无明显改变,说明尿液中 EGF 主要来源于肾脏本身。此外 EGF 作为一种促分裂因子,起着维持和修复肾小管上皮的作用,因此尿液中始终维持着较高浓度的 EGF;同时,尿液 EGF 的来源解释了多囊肾病大鼠尿液的 EGF 含量低于同龄正常鼠的现象。随着多囊肾病的发展,正常肾组织的减少,肾脏所产生的 EGF 也随之减少,尿液中 EGF 含量也随之下降;此外,EGF 受年龄影响。动物尿中 EGF 浓度从出生开始升高,达到高峰后逐渐下降,维持一稳定水平,动物衰老后进一步下降,这种生理变化与正常生长发育有关。因此 3 周龄大鼠体液 EGF 浓度均明显高于 3 个月龄大鼠。

本研究结果证实 EGF/EGFR 在多囊肾病 Han:SPRD 大鼠的发病过程中起着重要的致病作用。当大鼠罹患多囊肾病时,EGF/EGFR 的表达位置和表达量都出现了明显的异常:多囊肾病大鼠血液、尿液和肾脏中 EGF mRNA 和蛋白的表达低于正常大鼠。与之相反,EGFR 的表达量显著增高,更重要的是 EGFR 不仅表达在囊肿衬里上皮细胞的基底膜面(与正常小管上皮细胞相同),还异位表达于囊肿衬里细胞的腔膜面。最终结果是囊液内低浓度的 EGF 与囊肿细胞腔膜面异位高表达的受体结合,EGFR 磷酸化,EGF/EGFR 介导的信号通路被异常活化了。

以上 EGF/EGFR 的这些异常改变为囊肿的发生和发展提供了结构和功能基础。正常情况下腔膜面的 EGF 释放入小管腔后穿过上皮细胞与基底膜的 EGFR 结合,在胚胎期肾脏发育阶段 EGF 起着促进上皮细胞分化、成熟的作用,在发育结束后的成熟

期 EGF 维持着正常小管上皮的完整性。当多囊肾病发生时,肾脏表达 EGF 明显减少,上皮细胞成熟障碍,形成了去分化、不成熟的囊肿衬里上皮细胞,出现囊肿表型。随着肾小管逐渐扩张,上皮细胞之间的紧密连接受到破坏,腔膜面的 EGF 通过异常的细胞间隙与基底膜的 EGFR 结合,直接刺激细胞增殖。因此,异常 EGF/EGFR 可能是囊肿发生的始动因素之一。随着囊肿衬里上皮细胞表型异常的加剧,EGFR 错位位于囊肿细胞的腔膜面。当囊壁腔膜面的 EGFR 与囊液中具有促增殖作用浓度的 EGF、TGF- α 等各种生长因子直接结合,就形成了自分泌环,激活了相应的信号通路,更加剧了上皮细胞增殖,形成了恶性循环,使囊肿不断长大。因此 EGF/EGFR 在多囊肾病的发病过程中可能起到了关键的致病作用。

本研究检测了多囊肾病大鼠尿液中 EGF 的含量,明确了 EGF/EGFR 在多囊肾病 Han:SPRD 大鼠肾脏的表达部位及表达量,探讨了相关的信号转导机制,从而证实了异常的 EGF/EGFR 在多囊肾病大鼠的发病过程中可能起着重要作用。

[参考文献]

[1] Schrier R W, McFann K K, Johnson A M. Epidemiological study of kidney survival in autosomal dominant polycystic kid-

ney disease[J]. *Kidney Int*,2003,63:678-685.

[2] Grantham J J. Clinical practice. Autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *N Engl J Med*,2008,359:1477-1485.

[3] Wilson P D, Goilav B. Cystic disease of the kidney[J]. *Annu Rev Pathol*,2007,2:341-68.

[4] Kaspereit-Rittinghausen J,Deerberg F,Rapp K G,Weislo A. A new rat model for polycystic kidney disease of humans[J]. *Transplant Proc*,1990,22:2582-2583.

[5] 李林,戴兵,孙田美,颜永碧,梅长林.常染色体显性多囊肾病 Han:SPRD 大鼠肾脏病理观察及其意义[J]. *第二军医大学学报*,2005,26:83-86.

Li L, Dai B, Sun T M, Yan Y B, Mei C L. Morphology of renal tissue in Han:SPRD, a rat model of autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*,2005,26:83-86.

[6] Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF)[J]. *Dev Biol*,1965,12:394-407.

[7] Goodsell D S. The molecular perspective: epidermal growth factor[J]. *Oncologist*,2003,8:496-497.

[8] Pastore S, Mascia F, Mariani V, Girolomoni G. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation [J]. *J Invest Dermatol*,2008,128:1365-1374.

[9] Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment [J]. *N Engl J Med*,2008,358:1160-1174.

[10] Krause D S, Van Etten R A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy[J]. *N Engl J Med*,2005,353:172-187.

[本文编辑] 贾泽军

· 消息 ·

上海市烧伤急救中心揭牌仪式暨长海医院烧伤科建科 50 周年庆活动隆重举行

2008年12月20日下午,上海市烧伤急救中心揭牌仪式暨长海医院烧伤科建科50周年庆活动隆重举行。盛志勇院士、吴孟超院士、王正国院士、王红阳院士、第二军医大学曹国庆政委和上海市卫生局徐建光局长等到会并讲话。总后卫生部张雁灵部长、中华医学会白忠书副会长发来贺电表示祝贺。中华医学会烧伤分会前任主任委员杨宗城教授、孙永华教授,现任主任委员黄跃生教授到会祝贺。共有来自全国各单位的烧伤界人士近400人参加。

长海医院烧伤科创建于1958年,是全国最早成立的烧伤专科之一,是国家首批硕士学位及博士学位授权学科和博士后流动站。早年以擅长特大面积深度烧伤的救治享誉军内外。近年来,在继续保持危重烧伤治疗特色的同时,大力开展科学研究,在国际上首次提出了“烧伤休克延迟复苏引起再灌注损伤”的理论,同时一大批科研项目分别获得国家 and 军队奖项及基金,其中省部级二等奖以上的奖励共18项,包括国家科技进步一等奖两项。烧伤科现在已经发展成为国家重点学科,211工程重点建设学科,上海市医学领先专业重点学科,也是华东地区六省一市的烧伤救治牵头单位。