

EGFR 过表达对原代肝细胞 AKT 的激活作用

徐俊楠 何逸飞 王科嘉 朱晓彤 陈玉霞 刘志民 章卫平

摘要 **目的** 构建含表皮生长因子受体 EGFR 基因的重组腺病毒载体,并观察所构建腺病毒介导的 EGFR 过表达对其下游的 AKT 通路的激活。**方法** 将 EGFR 的 cDNA 片段克隆至 pshuffle - CMV 载体,将该载体与 pAdEasy 质粒进行细菌内同源重组从而获得重组腺病毒载体 pAd - EGFR,之后在 Ad293 细胞中进行包装以及扩增,并对病毒效价进行检测;最后利用所制备的腺病毒 Ad - EGFR 感染小鼠原代肝细胞,利用蛋白印迹法 Western blot 检测 EGFR 在原代肝细胞中的表达及其对信号分子 AKT 的活化作用。**结果** 成功制备具有生物学活性的 EGFR 重组腺病毒,并观察到该重组腺病毒在 Huh - 7 细胞介导 EGFR 的过表达以及在原代肝细胞中对 EGFR 下游 PI_3K - AKT 通路的激活作用。**结论** 所构建的 EGFR 重组腺病毒载体可以介导细胞中 EGFR 的过表达并激活 PI_3K - AKT 信号通路,为今后研究 EGFR 的相关生物学功能奠定了基础。

关键词 重组腺病毒 表皮生长因子受体 原代肝细胞

EGFR Overexpression Activates the AKT Signaling in Primary Hepatocytes. Xu Junnan, He Yifei, Wang Kejia, Zhu Xiaotong, Chen Yuxia, Liu Zhimin, Zhang Weiping. The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To prepare EGFR recombinant adenovirus, and examine the activation of PI_3K - AKT pathway in primary hepatocytes by EGFR overexpression. **Methods** Mouse EGFR cDNA was first cloned into the shuttle vector pShuttle - CMV, then recombined with pAdEasy - 1 plasmid in E. coli strain BJ5183 to obtain the pAd - EGFR vector, which was then transfected into 293A cells for viral package. Huh - 7 cells and mouse primary hepatocytes were infected with adenovirus Ad - EGFR and examined EGFR expression of and AKT phosphorylation by Western blotting analysis. **Results** We successfully prepared EGFR recombinant adenoviruses, and found that EGFR overexpression activates PI_3K - AKT pathway in primary hepatocytes. **Conclusion** The established EGFR adenovirus vector may provide a useful tool in investigating the role of EGFR in liver biology.

Key words Adenovirus; EGFR; Liver

表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是具有配体介导的酪氨酸激酶活性的多功能跨膜糖蛋白,存在于除造血系统之外的几乎所有组织中。研究表明在正常情况下 EGFR 能与相应配体结合而发生二聚化,可以引起细胞生长、增殖和分化,在正常的细胞生理过程中发挥重要的调控作用^[1]。近年来,对于 EGFR 及其活化后所激活的磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3 - kinase, PI_3K) - 丝氨酸/苏氨酸激酶 AKT (serine/threonine kinase) 通路在癌症中的研究引人关注。现已有研究表明,EGFR - PI_3K - AKT 通路在肝癌、非小细胞肺癌、胰腺癌等多种癌症的发生发展中均起着至关重要的作用,而

在正常肝细胞中的确切作用尚不明确^[2]。因而,对于 EGFR 及其下游的 PI_3K - AKT 通路生物学作用的深入研究,将有助于我们对肝癌等疾病的发病机制有更明确的认识。因此,本研究构建了 EGFR 过表达重组腺病毒,并检测了其在 Huh - 7 细胞中介导 EGFR 过表达的效果,并验证了该腺病毒在小鼠原代肝细胞中对 EGFR 下游通路 PI_3K - AKT 的激活,为深入研究 EGFR 对于肝细胞增殖能力的调控以及肝癌形成的影响奠定了基础。

材料与方法

1. 材料与试剂:人 EGFR 反转录病毒表达载体 pLWERNL 由美国加州大学 Frank Fumari 博士惠赠、从上海市第六人民医院滕银成教授实验室获取^[3,4]。AdEasyTM 腺病毒系统购于美国 Qbiogene 公司,由 293A 细胞由第二军医大学东方肝胆医院外科研究所钱其军教授惠赠。Effectene 转染试剂盒购自 Qiagen 公司,限制性内切酶、T4DNA 连接酶等均购自美国 NEB 公司。质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒均购自 Axygen 公司。兔抗人 EGFR 单克隆抗体、兔抗 p - AKT 单克隆抗体、鼠抗总 AKT 单克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔与羊抗小鼠二抗

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81130084)

作者单位:200433 上海,第二军医大学病理生理教研室 (徐俊楠、何逸飞、王科嘉、朱晓彤、陈玉霞、章卫平);第二军医大学附属长征医院内分泌科 (何逸飞、刘志民)

通讯作者:章卫平,教授,博士生导师,电子信箱:wzhang@smmu.edu.cn

购自 Cell Signaling 公司。

2. EGFR 重组腺病毒载体的构建与鉴定: Sal I 酶切 EGFR 表达质粒 pLWERNL (#485), 回收 EGFR 的 cDNA 片段 (约 3.8kb), 克隆至穿梭质粒 pShuttle - CMV, 得到重组质粒 pShuttle - EGFR。利用热休克法将腺病毒骨架质粒 pAdEasy - 1 转化到感受态细菌 BJ5183 中, 在含氨苄的 LB 平板培养后, 挑取单克隆菌落, 提取质粒, 并利用 Hind III 进行酶切鉴定阳性克隆, 然后利用 CaCl_2 法制备含 pAdEasy - 1 的感受态细菌 BJ5183。穿梭载体 pShuttle - EGFR 经 Pme I 酶切线性化后, 转化到感受态细菌 BJ5183 - pAdEasy 中进行同源重组, 并在卡那霉素抗性的培养基上进行筛选, 挑取单克隆, 利用 Pac I 酶切鉴定后, 最终得到重组成功的腺病毒载体 pAd - EGFR (#491); 将其转化至 Top10 感受态细菌中, 纯化制备质粒 DNA。

3. 重组腺病毒 Ad - EGFR 的包装及效价测定: 利用 Effectene 转染试剂盒将 Pac I 酶切线性化的 pAd - EGFR 质粒转染进 293A 细胞, 转染 10 ~ 14 天后观察到部分细胞出现细胞病变反应 (CPE)。细胞完全被病毒感染后, 收集细胞, 通过液氮和 37℃ 水浴反复冻融细胞 3 次, 释放出腺病毒, 并利用初次收集病毒液重复感染 293A 细胞, 使腺病毒进一步扩增, 从而得到更高效价的腺病毒 Ad - EGFR。之后采用 TCID50 的方法来检测病毒效价: 利用再次收集的病毒液做连续 10 倍的梯度稀释 (病毒效价由 10^{-3} 稀释至 10^{-10}), 之后将稀释后的病毒液接种到 96 孔培养板中, 每孔 100 μl , 每个稀释度 10 个孔, 另设 10 孔为阴性对照。培养 10 天时观察每孔细胞病变现象 (若某孔细胞全部病变, 则该孔所对应浓度的比率为 1, 若某孔无细胞病变, 则该孔所对应浓度的比率为 0), 计算病毒效价。

4. 原代肝细胞经 pAd - EGFR 诱导后其 EGFR 的蛋白表达分析: 使用本实验室已经比较成熟的两步原位胶原酶灌注法分离小鼠原代肝细胞^[5], 分别接种于两个 60mm 培养皿中进行培养; 在肝细胞贴壁生长之后, 用 PBS 清洗两遍, 分别于两个培养皿中加入含有腺病毒 Ad - EGFR 和 Ad - LacZ 的新鲜培养基 (MOI = 20 ~ 100), 分别作为实验组与对照组 (培养基需分两次加, 初次加少量, 之后再补加, 使更多的肝细胞感染腺病毒); 培养 48h 之后利用 RIPA 裂解液裂解肝细胞、提取蛋白, 95℃ 变性, 并采用 Western blot 法检测实验组与对照组 EGFR 蛋白含量。

结 果

1. 重组腺病毒载体 Ad - EGFR 的构建与鉴定: 利用 Sal I 酶切质粒 pLWERNL, 获得 EGFR cDNA 片段, 大小为 3.8kb (图 1), 克隆至穿梭载体 pShuttle - CMV; 将 Pme I 线性化的重组穿梭质粒 pShuttle - EGFR 转入细菌 BJ5183, 与腺病毒骨架质粒 pAdEasy - 1 同源重组, 阳性重组腺病毒质粒 pAd - EGFR 经 Pac I 酶切鉴定 (图 3)。在 Top10 细菌中大量提取扩增

质粒 DNA。

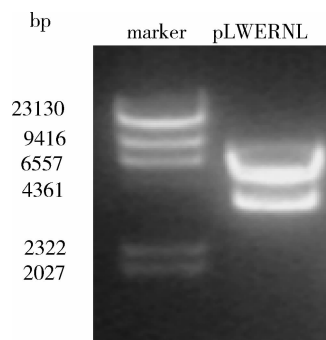


图 1 携带有 EGFR cDNA 的质粒 pLWERNL 经 Sal I 酶切后的电泳鉴定

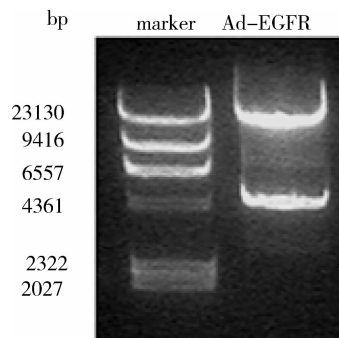


图 2 重组腺病毒载体 pAd - EGFR 经 Pac I 酶切后的电泳鉴定

2. 重组腺病毒包装及效价测定: 用 Effectene 转染试剂盒将线性化后的 pAd - EGFR (转染到培养好的 293A 细胞, 转染后 14 天, 细胞完全出现细胞病变反应, 收集细胞, 反复冻融法释放出病毒。再次感染 293A 细胞, 收集细胞, 反复冻融法释放出病毒, 检测病毒效价, 第二次感染收集的病毒效价可达到 1.99×10^{11} TCID50/ml (对照组 Ad - GFP 的效价为 1.5×10^{11} TCID50/ml)。

3. 重组腺病毒在小鼠原代肝细胞中的表达及 EGFR 下游信号通路的激活: 对所构建的 Ad - EGFR 是否具有生物学功能进行了验证。首先利用重组腺病毒感染人肝癌细胞 Huh7 和小鼠原代肝细胞, 用抗人 EGFR 的特异性抗体, Western blot 检测发现, Ad - EGFR 感染后的小鼠肝细胞有明显的人 EGFR 表达, 而感染 GFP 对照病毒的肝细胞没有检测到人 EGFR 的表达 (图 3)。在确认了 Ad - EGFR 可以使细胞过表达 EGFR 之后, 利用对 EGFR 下游信号通路的激活进行了验证, 选取 EGFR 下游通路的重要组份 p - AKT 来进行检测, 结果显示, 在分别转染 MOI 值 (感

染时病毒与细胞数量的比值)为 50 与 100 的 Ad - EGFR 后, p - AKT 在蛋白水平的表达显著增强(图 4)。以上实验结果说明本研究所构建的 Ad - EGFR 重组腺病毒不仅可介导细胞过表达 EGFR, 还可以成功激活受 EGFR 调控的下游信号通路。

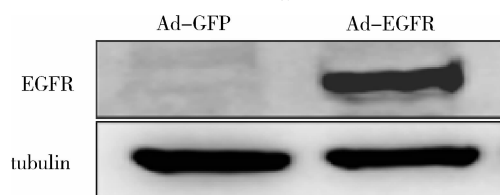


图 3 小鼠原代肝细胞 Ad - EGFR 后人 EGFR 蛋白的过表达

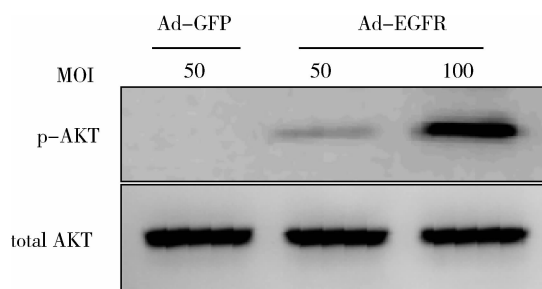


图 4 Ad - EGFR 感染小鼠肝细胞对下游 AKT 信号通路的激活效应

讨 论

EGF 是生长因子家族成员之一。在 1962 年, EGF 由诺贝尔奖获得者 Conhen 博士从小鼠颌下腺中分离并纯化出来, 相对分子质量为 6kDa, 由 53 个残基组成^[6]。EGFR 则是具有配体介导的酪氨酸激酶活性的多功能跨膜糖蛋白, 是定位于人第 7 号染色体短臂的原癌基因 C - erbB - 1 的表达产物, 分子质量为 170kDa。EGFR 分子分为伸向膜外识别并结合配体的氨基端、跨膜区和羧基端 3 个区域。EGFR 的配体包括 EGF、TGF - α 、HB - EGF 和 amphiregulin 等。

EGFR 在多种组织介导了具有广泛的生物学功能。肝脏 EGFR 参与肝细胞的增殖。EGFR 肝脏特异性敲除小鼠行 70% 肝脏切除手术后, 肝再生也出现了明显的延迟现象, 说明 EGFR 对于肝脏再生过程具有着重要的调节作用^[7]。近年发现, EGFR 还参与丙型肝炎病毒入侵肝细胞^[8]。此外, 在肿瘤的发生和发展中, EGFR 也扮演着十分重要的角色。已经有许多证据表明在以非小细胞肺癌 (nonsmall cell lung cancer, NSLLC) 为代表的多种上皮源性肿瘤中存在

有 EGFR 的过现象, 且往往伴随着存活率低、预后差、转移可能性大的情况, 而在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 中也能检测到 EGFR 的过表达现象, 并且与肿瘤的侵袭性生长具有明显的相关性, 可能是治疗的靶点^[9-11]。

对于 EGFR 在非小细胞肺癌、肝癌等疾病研究中, 人们发现, EGFR 主要是通过调控 JAKs/STATs、Ras/MAPK、PI₃K - AKT 这 3 条信号通路来影响肿瘤的发生与发展, 尤其是 PI₃K - AKT 通路的激活在这其中起着非常重要的作用。研究表明, 当 EGFR 活化后, 首先激活磷酸肌醇 3 激酶 (PI₃K), 在通过 PI₃K 激活蛋白激酶 B (AKT), 而活化的 AKT (p - AKT) 进一步激活下游信号分子, 从而促进肿瘤细胞的增殖。

目前, 对于 EGFR 在以肝癌为代表的多种恶性肿瘤的发生发展过程当中所具有的作用仍有待进一步研究。我们成功构建了 EGFR 的过表达腺病毒, 也为进一步研究 EGFR 生物学功能提供了更为有效的工具。腺病毒过表达载体与慢病毒、反转录病毒载体相比具有更高的转染效率, 更重要的是, 它既可以感染增殖期细胞, 也可感染静止期细胞, 并不会使基因失活或激活抑癌基因。我们利用 AdEasyTM 系统, 成功构建了复制缺陷型过表达腺病毒 Ad - EGFR, 为继续深入研究 EGFR 在肝癌等肿瘤中的作用奠定了基础。

参考文献

- Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signaling mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37 (Suppl 4): S3 - S8
- Hayase Y, Higashiyama S, Sasahara M, *et al*. Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in rat brain [J]. *Brain Res*, 1998, 784 (1 - 2): 163 - 178
- Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, *et al*. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272 (5): 2927 - 2935
- Ai Z, Wang J, Wang Y, *et al*. Overexpressed epidermal growth factor receptor (EGFR) - induced progesterone insensitivity in human endometrial carcinoma cells by the EGFR/mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. *Cancer*, 2010, 116 (15): 3603 - 3613
- Zhang Y, Xie Z, Zhou L, *et al*. The zinc finger protein ZBTB20 regulates transcription of fructose-1,6-bisphosphatase 1 and beta cell function in mice [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142 (7): 1571 - 1580
- Lambotte L, Saliez A, Triest S, *et al*. Effect of sialoadenectomy and epidermal growth factor administration on liver regeneration after partial hepatectomy [J]. *Hepatology*, 1997, 25 (3): 607 - 612

- 7 Natarajan A, Wagner B, Sibilia M. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (43): 17081–17086
- 8 Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, *et al.* EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy [J]. *Nat Med*, 2011, 17(5): 589–595
- 9 da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR mutations and lung cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 49–69
- 10 Chettouh H, Fartoux L, Aoudjehane L, *et al.* Mitogenic insulin receptor – A is overexpressed in human hepatocellular carcinoma due to EGFR – mediated dysregulation of RNA splicing factors [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(13): 3974–3986
- 11 Schiffer E, Housset C, Cacheux W, *et al.* Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis [J]. *Hepatology*, 2005, 41(2): 307–314

(收稿日期: 2013–07–24)

(修回日期: 2013–08–30)

肺泡灌洗液计数中性粒细胞百分比与血浆 MMP-9、TIMP-1 在油酸制备急性 肺损伤大鼠模型中的相关性研究

邓晓慧 田巍 薛婧

摘要 目的 检测油酸制备大鼠急性肺损伤模型支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 计数中性粒细胞 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) 百分比及血浆基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinases 9, MMP-9)、组织基质金属蛋白酶抑制因子-1 (tissue matrix metalloproteinase inhibitor-1, TIMP-1) 含量, 分析 BALF 中性粒细胞百分比与 MMP-9 及 TIMP-1 的相关性及临床意义。**方法** 雄性 SD 大鼠 36 只随机分为 3 组: 空白对照组 ($n=12$)、油酸造模 2h 组 ($n=12$)、油酸造模 6h 组 ($n=12$)。空白对照组大鼠尾静脉注射生理盐水 (0.1 ml/kg) 6h 后观察。油酸造模组大鼠尾静脉缓慢注射油酸 (OA, 0.1 ml/kg) 2、6h 后观察, 以复制油酸诱导大鼠急性肺损伤模型。观察及检测指标为光镜下肺组织病理形态学变化、动脉血氧分压 (PaO_2)、肺湿/干重比 (W/D)、血浆 MMP-9 和 TIMP-1 含量及肺泡灌洗液中性粒细胞计数百分比。**结果** 光镜下, 与空白对照组比较, 油酸造模组大鼠肺组织可见明显形态学改变。2h 及 6h 油酸造模组 PMN% 明显升高, PaO_2 明显降低, IQA 及 W/D 明显升高, (P 均 <0.01); 血浆 MMP-9 含量明显升高 ($P<0.001$), 血浆 TIMP-1 含量明显降低 ($P<0.05$) 血浆 MMP-9 含量与 PMN% 均呈高度正相关, 血浆 TIMP-1 含量与 PMN% 均呈高度负相关。**结论** 油酸制备急性肺损伤大鼠模型肺泡灌洗液 PMN% 明显升高, 血浆 MMP-9 含量明显升高, TIMP-1 含量明显降低。血浆 MMP-9、TIMP-1 与肺泡灌洗液 PMN% 呈高度相关性; 检测血浆 MMP-9、TIMP-1 有助于急性肺损伤的病理诊断和治疗, 从而为临床急性肺损伤的诊断、治疗及预后提供更为简单、可行、准确的检测方法和途径。

关键词 MMP-9 TIMP-1 PMN 急性肺损伤

Correlation between BALF and MMP-9 and TIMP-1 in Acute Lung Injury Model of Rat Induced by Oleic Acid. Deng Xiaohui, Tian Wei, Xue Qiang. *Department of Senile Disease, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China*

Abstract Objective To detect the percentage of polymorphonuclear leukocyte (PMN%) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the levels of matrix metalloproteinases 9 (MMP-9) and tissue matrix metalloproteinase inhibitor-1 (TIMP-1) in plasma of acute lung injury model of rats induced by oleic acid to analyze the clinical meaning and Correlation between BALF and MMP-9, TIMP-1. **Methods** 36 male SD rats were randomly divided into three groups: normal control group ($n=12$), oleic acid model control group for 2h ($n=12$) and oleic acid model control group for 6h ($n=12$). With the slow tail vein injection of oleic acid (OA, 0.1 ml/kg) of rats in oleic acid model control group, rats in normal control group were injected with sodium chloride (0.1 ml/kg). The observation and measurement indi-

基金项目: 国家重点基础研究发展规划基金资助项目 (2006CB503807); 国家自然科学基金资助项目 (30425010, 30571971, 30630031); 国家长江学者奖励计划项目 (7072082); 北京市自然科学基金资助项目 (7052043)

作者单位: 100035 北京积水潭医院干部保健科

通讯作者: 田巍, 主任医师, 电子信箱: twttd@163.com