DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.16.006
第25卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 16
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)16-1415-03

论著

P物质对体外培养大鼠成纤维细胞表皮生长因子及其受体基因表达的影响

朱金明,赖西南,王正国,王丽丽 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第六研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨P物质(Substance P,SP)作用于离体培养的大鼠肉芽组织成纤维细胞后,对其表皮生长因子(EGF)及受体(EGFR)基因表达的影响。方法 采用大鼠肉芽组织成纤维细胞培养和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术,观察SP在不同浓度(1×10^{-9}~1×10^{-5} mol/L)及不同孵育时间(0、3、6、12、24 h)情况下刺激大鼠成纤维细胞后,成纤维细胞EGF、EGFR mRNA表达的改变情况。结果 SP可上调大鼠肉芽组织成纤维细胞EGF、EGFR mRNA表达。其中,SP对EGF的量-效曲线呈双相分布,最大效应浓度为1×10^{-7} mol/L。但SP仅在高浓度时(1×10^{-6}~1×10^{-5} mol/L)促进EGFR表达。在最大效应浓度(1×10^{-7} mol/L,1×10^{-5} mol/L)时,SP对大鼠成纤维细胞EGF、EGFR mRNA表达的上调作用分别于孵育细胞后6、12 h达高峰。结论 SP对大鼠肉芽组织成纤维细胞EGF、EGFR基因表达存在直接影响,其表现形式与SP的刺激浓度及孵育时间有关。这种影响可能是SP在创伤愈合过程中发挥调控作用的生物学机制之一。

关键词:P物质;表皮生长因子;成纤维细胞;基因表达
中图法分类号:R392.11;R392.13;R341.6 文献标识码:A

Effect of substance P on EGF and EGFR gene expressions in cultured rat fibroblasts

ZHU Jin-ming, LAI Xi-nan, WANG Zheng-guo, WANG Li-li (Department 6, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of substance P(SP) on epidermal growth factor(EGF) and epidermal growth factor receptor(EGFR) gene expressions in cultured rat granulation tissue fibroblasts. **Methods** The changes of EGF and EGFR gene expressions in cultured rat granulation tissue fibroblasts treated with SP at different concentrations(1×10^{-9}~1×10^{-5} mol/L) and incubating time(0, 3, 6, 12 and 24 h) were observed by semi-quantitative RT-PCR. **Results** SP could up-regulate EGF and EGFR gene expressions in rat granulation tissue fibroblasts *in vitro*. The response curve of EGF treated by SP showed a two-way distribution at the maximal effect concentration of 1×10^{-7} mol/L, but SP could up-regulate EGFR gene expression only at higher concentrations(1×10^{-6}~1×10^{-5} mol/L). After stimulation of rat fibroblasts with SP at 1×10^{-7} mol/L and 1×10^{-5} mol/L, EGF and EGFR gene expressions peaked at 6 and 12 h, respectively. **Conclusion** SP has a direct effect on EGF and EGFR gene expressions in rat fibroblasts *in vitro* in dose- and time-dependent manners. This effect might be one of the biological mechanisms of the regulatory role of SP during wound healing.

Key words: substance P; epidermal growth factor; fibroblast; gene expression

创伤发生后,损伤部位感觉神经释放的感觉神经肽和修复细胞自分泌或旁分泌的生长因子对组织修复进程和结局起着重要的调控作用[1]。但迄今尚无感觉神经肽(Substance P, SP)对成纤维细胞内源性生长因子及其受体基因表达影响的报道。本实验采用大鼠肉芽组织成纤维细胞离体培养和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术,观测SP在不同刺激浓度及孵育时间情况下,对成纤维细胞表皮生长因子(EGF)及其受体(EGFR)基因表达的影响,初步探讨感觉神经肽在创伤愈合过程中调控修复细胞增殖、分化的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar大鼠,体质量120 g(由第三军医大学附属大坪医院实验动物中心提供),DMEM基础培养基(Gibco),胰蛋白酶(宝灵曼),P物质(Sigma),TriPure试剂(宝灵曼),第1链cDNA合成试剂(上海Sangon),TaKaRa Ex Taq DNA聚合酶(大连宝生物),GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder(MBI),紫外分光光度仪(Perkin Elmer),PTC-100TMPCR合成仪(MJ公司),凝胶图像分析仪(Bio-Rad)。

1.2 成纤维细胞培养及SP刺激实验

成纤维细胞获取按文献[2]方法进行。成纤维细胞培养在

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054204)
作者简介:朱金明(1972—),男,河北省邢台市人,硕士研究生,医师,主要从事创伤修复分子生物学机制方面的研究。电话:(023)68757574
收稿日期:2002-08-22;修回日期:2003-01-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

含10%精制小牛血清(fcs)的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中培养,以 0.5%胰蛋白酶按 1∶3 传代,第 3~5 代细胞用于实验。实验前将贴壁的成纤维细胞用 0.5%胰蛋白酶消化下来,加入 DMEM+10% fcs 吹打成细胞悬液,以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔培养板,置于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中孵育 12 h 后,换用 DMEM+0.5% fcs 的培养基继续培养 12 h,然后加入以 DMEM+0.5% fcs 配制的一定终浓度 SP 进行刺激实验。

1.2.1 SP 作用时间对成纤维细胞中 EGF 和 EGFR mRNA 表达的影响 应用系列稀释(1×10^{-9}~1×10^{-5} mol/L)SP+DMEM+0.5% fcs 继续孵育细胞 6 h 后收样,同时以 0 mol/L SP 作为对照。

1.2.2 SP 浓度对成纤维细胞中 EGF 和 EGFR mRNA 表达的影响 应用最大效应浓度 SP+DMEM+0.5% fcs 继续孵育细胞 0、3、6、12、24 h 后收样,同时各时相点以 0 mol/L SP 作为对照。以上各实验组及相应对照组皆设 3 个平行孔,样本应用 RT-PCR 技术检测 EGF 和 EGFR mRNA 的表达情况。

1.3 总 RNA 制备及 RT-PCR

①总 RNA 提取依 TriPure 试剂操作说明进行,紫外分光光度仪定量并确保 $A_{260}/A_{280}=1.7\sim2.0$。②第 1 链 cDNA 合成按试剂盒说明书进行。③将逆转录产物 cDNA 作为模板在 PTC-100™PCR 合成仪上扩增相应基因。所有相关引物源自文献[3,4]发表的序列,由上海 Sangon 合成,见表 1。PCR 反应混合物为:2 μl cDNA,5 μl 10× Buffer,4 μl 25 mmol/L $MgCl_2$,8 μl 2.5 mmol/L dNTPs,25 μmol/L 上下游引物各 0.5 μl,5 u/μl TaKaRa Ex *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl,以灭菌双蒸水补加至反应总体积为 50 μl,无菌石蜡油覆盖。目的基因 EGF/EGFR 和参照基因 β-Actin 的扩增循环参数为:94 ℃预变性 3 min,[94 ℃,1 min;57 ℃,30 s;72 ℃,1.5 min],分别进行 35/30/24 次循环后,72 ℃延伸 7 min。

表 1 引物序列及理论扩增长度

Tab 1 Sequences of primers and theoretical lengthes of products

Gene	Sequence	Length
EGF	Sense: 5′AGC-AAT-TGG-TGG-TGG-ATG 3′	103 bp
	Anti-S: 5′ACT-CTT-TGC-AAA-AGT-TGT-C 3′	
EGFR	Sense: 5′GAG-AGG-AGA-ACT-GCC-AGA-A 3′	454 bp
	Anti-S: 5′GTA-GCA-TTT-ATG-GAG-AGT-G 3′	
β-actin	Sense: 5′ATC-ATG-TTT-GAG-ACC-TTC-A 3′	318 bp
	Anti-S: 5′CAT-CTC-TTG-CTC-GAA-GTC 3′	

1.4 PCR 产物鉴定及半定量分析

将样本 EGF/EGFR 和 β-actin 基因的 PCR 扩增产物各 5 μl,点样于含有 EB 的 2%琼脂糖凝胶上电泳,以 GeneRuler™ 50 bpDNA Ladder 测定分子量。采用凝胶图像分析仪分别测定各样本 EGF/EGFR 和 β-actin 条带的 V 值(Volume=平均光密度值×条带面积)。各样本 EGF/EGFR 的表达强度 Rv=V[目的基因]/Vβ-actin。

1.5 统计学分析

检测指标为 RV 值。采用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析-均数间差别多重比较的 LSD(Least significant difference)-t 检验,数值以 $\bar{x}\pm s$ 表示。数据统计结果的图形化由 Excel 2000 绘图程序完成。

2 结果

2.1 SP 对成纤维细胞 EGF 和 EGFR mRNA 表达的量-效影响

在 1×10^{-8}~1×10^{-6} mol/L 范围内,SP 可显著上调成纤维细胞 EGF mRNA 表达,其量-效曲线呈双相分布,最大效应浓度为 10^{-7} mol/L;另外,在高浓度(1×10^{-6}~1×10^{-5} mol/L)时 SP 可显著上调 EGFR mRNA 表达,见表 2。

表 2 SP 对 EGF/EGFR 基因表达的量-效影响($n=3$; RV 值, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of SP concentrations on fibroblasts EGF/EGFR gene expressions($n=3$; RV, $\bar{x}\pm s$)

Items	0(Control)	Stimulating concentrations(mol/L)				
		10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
EGF	0.377±0.029	0.421±0.042	0.475±0.037**	0.529±0.046**	0.459±0.038*	0.433±0.035
EGFR	0.628±0.035	0.644±0.048	0.622±0.041	0.650±0.054	0.717±0.062*	0.739±0.041*

**: $P<0.01$, *: $P<0.05$ *vs* control

2.2 SP 对成纤维细胞 EGF 和 EGFR 基因表达的时-效影响

分别应用最大效应浓度(1×10^{-7} mol/L、1×10^{-5} mol/L)SP 刺激成纤维细胞后,EGF、EGFR mRNA 表达高峰时间分别在 SP 作用后 6 h 和 12 h 出现,见表 3。

表 3 SP 对 EGF/EGFR mRNA 表达的时-效影响($n=3$; RV 值, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Dynamic effect of SP on EGF/EGFR gene expressions($n=3$; RV, $\bar{x}\pm s$)

Items	Group	Incubating times(h)				
		0	3	6	12	24
EGF	SP	0.267±0.030	0.397±0.036	0.512±0.068**	0.356±0.041	0.311±0.022
	Control	0.267±0.030	0.383±0.051	0.374±0.045	0.310±0.034	0.286±0.038
EGFR	SP	0.581±0.054	0.620±0.044	0.731±0.055*	0.781±0.053**	0.575±0.081
	Control	0.581±0.054	0.600±0.081	0.632±0.050	0.595±0.045	0.564±0.024

**: $P<0.01$, *: $P<0.05$ *vs* control

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

创伤发生后, 感觉神经肽由神经末梢释放至损伤组织局部, 启动神经源性炎症反应, 诱导炎性细胞趋化和释放细胞因子, 促进成纤维细胞、内皮细胞增殖与血管新生。其中, P 物质(SP)作用尤为突出。

EGF 是 EGFs 家族的重要成员, 其前体为大分子量跨膜糖蛋白, 经蛋白酶水解为小分子量活性片段而发挥作用。EGF 与其酪氨酸激酶型受体结合后, 通过胞内 cAMP-蛋白激酶 A 和或 1, 4, 5-三磷酸肌醇-蛋白激酶 C 途径, 进而激发 Ras/MAPKs(有丝分裂激活蛋白激酶)产生生物学效应。它可以刺激上皮细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞移行、增殖和分化, 并诱导血管新生。EGF 受体(EGFR)则与细胞转化关系密切。

成纤维细胞作为肉芽组织的主要成分细胞, 其增殖、分化等生物活性影响着创伤修复的进程和结局。以往文献将 SP 归为感受态因子, 推动成纤维细胞由 G_0 和 G_1 期进入分裂前的感受态, EGF 则做为增进态因子促使感受态细胞进入 S 期。我们前期的动物在体实验还显示: SP 对伤口愈合有显著促进作用, 这一作用发挥可能是通过影响修复细胞内源性生长因子及其受体表达实现的[5]。为深入了解感觉神经肽与创伤修复细胞内源性生长因子及其受体表达的关系, 探讨感觉神经肽在创伤修复过程中发挥调控作用的可能机制, 同时排除在体多因素干扰, 我们采用大鼠肉芽组织成纤维细胞体外培养和 RT-PCR 技术, 检测 SP 刺激成纤维细胞后, 成纤维细胞内源性 EGF 及其受体基因表达的改变情况。

本研究表明: SP 对体外培养大鼠肉芽组织成纤维细胞 EGF mRNA 表达有上调作用, 其量-效曲线呈双相分布, 最大效应浓度为 1×10^{-7} mol/L; 但 SP 仅在高浓度($1\times10^{-6}\sim1\times10^{-5}$ mol/L)时对 EGFR mRNA 表达有上调作用。应用最大效应浓度(1×10^{-7} mol/L、1×10^{-5} mol/L)SP 刺激成纤维细胞后, EGF mRNA 表达高峰时间(6 h)早于 EGFR mRNA 表达的高峰时间(12 h)。

本实验提示: SP 不仅自身具有促细胞进入感受态的作用, 同时还可上调增进态因子 EGF 及其受体表达促使感受态细胞进入 S 期, 从而参与了细胞增殖调控的全过程。值得注意的是: Nillson 和 Harrison 等人曾观察到 SP 促成纤维细胞增殖的效应也呈双相分布, 低浓度时作用明显, 其最大效应浓度在 1×10^{-8} mol/L 左右, 这与本实验观察到的 SP 促成纤维细胞内源性生长因子表达情况在一定程度上相对应。

文献[6, 7]报道, SP 可影响成纤维细胞花生四烯酸代谢, 导致前列腺素释放增加, 前列腺素则可上调 EGF、EGFR、C-fos mRNA 表达, 同时还可增强 EGF 诱导的原癌基因 c-myc 表达。SP 还可动员细胞内 Ca^{2+} 并增高 cAMP 水平, 激活 MAPKs, 进而上调早期即刻基因 C-jun 和 C-fos mRNA 表达。C-fos 和 C-jun 可形成异源二聚体活性蛋白-1(AP-1), AP-1 通过增强 EGFR 启动子活性, 上调 EGFR 表达[8]。而 C-myc 等早期即刻基因可作为 EGF/EGFR 下游信号激活产物促使静止细胞进入有丝分裂, 与细胞增殖密切相关。

总之, 感觉神经肽(SP)对大鼠肉芽组织成纤维细胞 EGF、EGFR 基因表达的影响可能是其在创伤修复过程中调控修复细胞增殖、分化和生物学功能发挥的机制之一, 同时为从神经调控角度完善生长因子网络调控机制, 促进伤口愈合提供了理论依据。

(致谢: 特别感谢第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第七研究室周元国教授及其研究室技术人员对本实验的支持与帮助!)

参考文献:

[1] Onuoha G N. Circulating sensory peptide levels within 24 h of human bone fracture[J]. Peptides, 2001, 22(7): 1107—1110.

[2] 朱旭东, 张　燕, 陈荣德. 肉芽组织修复细胞的简易培养方法[J]. 中国修复重建外科杂志, 1994, 8(3): 157.

[3] Bor M V, Sorensen B S, Nexo E. Simutaneous quantitation of several mRNA species by calibrated reverse transcription polymerase chain reaction and capillary electrophoresis: analysis of the epidermal growth factor receptor and its activating ligands EGF, TGF-α, and HB-EGF in rat liver[J]. Lab Invest, 2000, 80(6): 983—986.

[4] 韩安平, 陆爱丽, 王申五, 等. 含重组人血小板生成素基因的小鼠成纤维细胞的克隆筛选与鉴定[J]. 北京医科大学学报, 1999, 31(2): 110—112.

[5] 魏　力, 赖西南, 王正国, 等. 创伤愈合中周围神经末梢分泌的 P 物质与表皮生长因子及其受体表达的关系[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(8): 488—491.

[6] Pai R, Soreghan B, Szabo I L, *et al*. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy[J]. Nat Med, 2002, 8(3): 289—293.

[7] Handler J A, Danilowicz R M, Eling T E. Mitogenic signaling by epidermal growth factor (EGF), but not platelet-derived growth factor, requires arachidonic acid metabolism in BALB/c 3T3 cells. Modulation of EGF-dependent c-myc expression by prostaglandins[J]. J Biol Chem, 1990, 265(7): 3669—3673.

[8] Johnson A C, Murphy B A, Matelis C M, *et al*. Activator protein-1 mediates induced but not basal epidermal growth factor receptor gene expression [J]. Mol Med, 2000, 6(1): 17—27.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net