

# 人黄素化颗粒细胞中 EGF 受体家族的表达

## Expression of epidermal growth factor receptor family in human luteinized granulosa cells

潘伯臣, 叶莹心, 王秀霞, 张淑兰

(中国医科大学附属盛京医院妇产科生殖中心, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 研究人黄素化颗粒细胞中表皮生长因子(EGF)受体家族成员的表达。收集体外受精-胚胎移植过程中的人黄素化颗粒细胞进行体外培养,应用 RT-PCR 和免疫细胞化学法分别检测 EGF 受体家族的 mRNA 和蛋白表达。人黄素化颗粒细胞中 EGF 受体家族的 4 个成员 *HER1~HER4* 均有 mRNA 表达。但 *HER4* 的 mRNA 表达量较低,而且位于细胞核。

[关键词] EGF 受体家族;人黄素化颗粒细胞;卵巢;黄体

[中图分类号] R711.75 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)02-0183-02

卵巢黄体是卵泡排卵后剩余的颗粒细胞等卵泡成分所形成的暂时性的内分泌器官,对于维持女性正常月经周期及妊娠都是必需的。实验证据表明,卵巢黄体的结构和功能变化是受其局部因子如生长因子调控的。为了探讨表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)受体家族及其相应配体在黄体结构及功能变化中的作用,我们利用辅助生殖技术中获得的人黄素化颗粒细胞(类黄体细胞)首先研究了 EGF 受体家族成员在这些细胞中的表达。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂及仪器

RNA 提取试剂盒购自日本 Nippon Gene 公司。M-MLV 逆转录酶及限制性内切酶 Dde I、Msp I、Nco I 和 Xho I 为美国 GibcoBRL 公司产品。DNA 聚合酶 (Expand High Fidelity PCR System) 由德国 Boehringer Mannheim 公司生产。PCR 仪为美国 Perkin-Elmer 公司的 GeneAmp™ PCR System 9600 扩增仪。*HER4* 多克隆抗体(C-18)购自美国 Santa Cruz 公司。免疫组织化学(SABC 法)试剂盒及 AEC 染色试剂盒购自美国 Vector Laboratories 公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 人黄素化颗粒细胞的分离与培养: 人黄素化颗粒细胞取自因男性或输卵管性不孕而接受体外受精-胚胎移植(IVF-ET)患者的卵泡吸出液。卵泡吸出液首先以 133.1 g 离心 5 min。然后,将沉淀细胞置于 Ficoll-Paque 细胞分离液表层,20℃下以 33.3 g 离心 30 min 以除去红细胞。收集中间相细胞,以  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  的 Hank' 平衡盐溶液(HBSS)洗净后,用孔径为 70 μm 的尼龙网过滤。台盼蓝染色排除法计数存活细胞后,每个直径为 60 mm 的平皿中接种  $2 \times 10^5$  个活细胞,37℃、5%  $CO_2$  条件下培养。细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 中培养 48 h,其间于 24 h 换液 1 次。

1.2.2 RT-PCR: (1)总 RNA 的提取及 cDNA 的制备:使用总

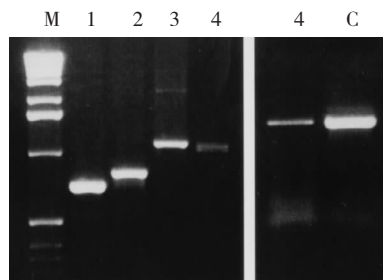
RNA 提取试剂盒,按使用说明操作。逆转录(RT)反应体系为 10 μl,含总 RNA 1 μg、DTT 0.1 μmol、oligo (dT)12-18 0.25 μg、逆转录酶 M-MLV 100 IU 和每种 dNTP 各 5 nmol。(2)PCR: cDNA 的 PCR 为 20 μl 反应体系,含 RT 产物 1 μl、DMSO 2 μl、每种 dNTP 各 4 nmol、 $MgCl_2$  30 nmol、DNA 聚合酶 0.3 μl、每种引物对各 6 pmol。EGF 受体家族成员 *HER1~HER4* 的 PCR 引物序列均已发表<sup>[1,2]</sup>。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳后,溴化乙锭染色,紫外线下观察并摄影。

1.2.3 限制性酶切法: PCR 产物特异性的验证采用限制性酶切法。酶切体系为 20 μl,包括各种限制性内切酶 1 μl、各种酶反应缓冲液 2 μl、各扩增产物 6 μl、0.1% BSA 2 μl。反应体系 37℃下水浴 2 h。酶切产物经 2% 琼脂糖电泳后,溴化乙锭染色,紫外线下观察并摄影。

1.2.4 免疫细胞化学染色: 将培养后的细胞于室温下在 PBS 缓冲的 4% 多聚甲醛中固定 15 min,用 0.3%  $H_2O_2$  甲醇液处理 20 min 以灭活内源性的过氧化物酶。其余按试剂盒说明操作。

### 2 结果

2.1 EGF 受体家族成员的 mRNA 表达 RT-PCR 检测清楚显示黄素化颗粒细胞中 EGF 受体家族所有 4 个成员的 cDNA 扩增片段。但是与其它 3 个成员相比,*HER4* 的 mRNA 的表达量很低(图 1)。为了除外 *HER4* 的低表达量是由于 PCR 扩增效率低造成的可能性,我们用同一 PCR 体系扩增了阳性对照(OVCAR-3 细胞系),结果显示,阳性对照的 *HER4* 表达得到了显著扩增(图 1)。



M: DNA 分子量参照;1-4: *HER1~HER4* PCR 片段 C: 阳性对照  
图 1 人黄素化颗粒细胞中 EGF 受体家族 mRNA 的 RT-PCR 检测

[基金项目] 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2005]383)

[作者简介] 潘伯臣(1963-),男,副教授,博士。

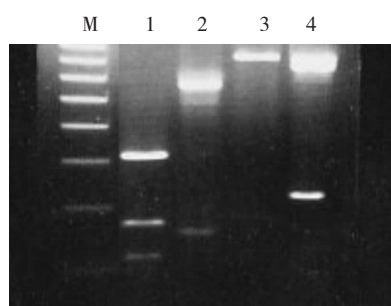
E-mail: panbochen@cmu.edu.cn

2.2 PCR 产物特异性的验证 采用限制性酶切法。*HER1~HER4* 的 PCR 片段长度分别为 727 bp, 822 bp, 1129 bp 和 1096 bp。使用的相应内切酶、其作用位点数及酶切产物片段的长度见表 1。

表 1 *HER1~HER4* PCR 片段酶切位点及酶切产物

PCR 产物	限制性内切酶	作用位点(个)	酶切产物强度 (bp)
HER1	Dde I	5	359, 178, 98, 60, 23, 9
HER2	Msp I	1	666, 156
HER3	Nco I	2	857, 199, 73
HER4	Xho I	1	850, 246

限制性酶切反应结果与表 1 一致(图 2), 说明 RT-PCR 所产生的 *HER1~HER4* 片段是特异的。



M: DNA 分子量参照; 1~4: *HER1~HER4* PCR 片段的酶切产物

图 2 *HER1~HER4* PCR 片段限制性酶切反应的电泳结果

2.3 *HER4* 蛋白表达的检测 免疫细胞化学染色显示, *HER4* 蛋白几乎存在于所有的人黄素化颗粒细胞中。不过, *HER4* 染色位于细胞核内, 而不是细胞膜(图 3)。用正常血清取代一抗或用过量的封闭肽吸附一抗后染色, 细胞不着色(结果未显示), 说明 *HER4* 抗体 C-18 的染色是特异的。

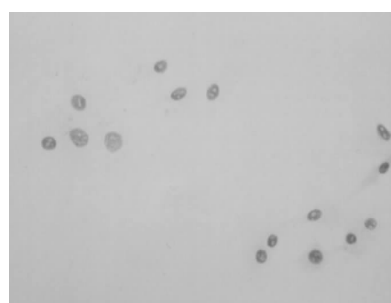


图 3 人黄素化颗粒细胞中 *HER4* 蛋白的免疫组织化学染色

### 3 讨论

EGF 受体家族现有 4 个成员: *HER1/erbB1*、*HER2/erbB2*、*HER3/erbB3* 和 *HER4/erbB4*。其中, *HER1* 和 *HER4* 是肝素结合性表皮生长因子(heparin-binding epidermal growth factor like growth factor, HB-EGF) 的直接受体。但由于 *HER2* 和 *HER3* 对前两者存在修饰作用, 影响其功能活性, 因此, 我们同时对前两者的 mRNA 表达也进行了检测。RT-PCR 结果证实了人

黄素化颗粒细胞中存在 *HER2* 和 *HER3* 的表达, 提示了 *HER2* 和 *HER3* 这种修饰作用存在的可能性。因为已有报道显示人黄素化颗粒细胞中存在 *HER1* 蛋白<sup>[3]</sup>, 所以本文未对 *HER1* 蛋白的表达进行研究。尽管如此, 本研究的 RT-PCR 结果证实了这些细胞中存在 *HER1* 基因的转录物。

迄今为止, 国内有关黄体细胞中 *HER4* 表达的报道很少。我们的 RT-PCR 和免疫细胞化学染色法分别显示, *HER4* 的 mRNA 和蛋白存在于人黄素化颗粒细胞。但是与 EGF 受体家族其他成员相比, *HER4* mRNA 的表达量较低。尤其值得一提的是, *HER4* 蛋白存在于细胞核的结果出乎我们的预料, 因为多肽性生长因子受体多为细胞膜蛋白。我们认为 *HER4* 蛋白的这种分布不太可能是染色方法造成的假象。因为在其他细胞中, 同一多克隆抗体(C-18)既可以染细胞浆内的受体, 也可以染细胞膜上的受体。另外, 有一份研究同时使用了两种 *HER4* 抗体: C-18 和 HFR-1 (识别 *HER4* 另一个抗原表位的单克隆抗体), 均证实了 *HER4* 存在核表达现象<sup>[4]</sup>。多肽性生长因子和它们受体的核迁移现象近年来引起了人们的注意。有人提出, 这是经典的受体介导的信号传导通路之外新的信号传导通路<sup>[5]</sup>。但 *HER4* 在人黄素化颗粒细胞核中发挥什么作用尚不清楚。

黄体细胞是构成卵巢黄体最重要的成分。辅助生殖技术中获得的人黄素化颗粒细胞无论是在形态还是在功能上都类似于卵巢黄体细胞, 因此被广泛地应用于黄体功能及形态学方面的研究。我们的研究表明, EGF 受体家族成员的表达存在于人黄素化颗粒细胞, 提示 EGF 受体家族可能在介导相应生长因子配体(如 HB-EGF) 的过程中发挥一定的作用。本文的研究结果为进一步阐明这些局部生长因子在黄体结构和功能变化中的作用奠定了一定的基础。

### 参考文献:

- [1] ADAM RM, BORER JG, WILLIAMS J, et al. Amphiregulin is coordinately expressed with heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the interstitial smooth muscle of the human prostate [J]. *Endocrinology*, 1999, 140 (12): 5866-5875.
- [2] ZHAO YY, SAWYER DR, BALIGA RR, et al. Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes: persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (17): 10261-10269.
- [3] ALMAHBOBI G, MISAJON A, HUTCHINSON P, et al. Hyperexpression of epidermal growth factor receptors in granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 1998, 70 (4): 750-758.
- [4] SRINIVASAN R, GILLET CE, BARNES DM, et al. Nuclear expression of the c-erbB-4/HER-4 growth factor receptor in invasive breast cancers [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (6): 1483-1487.
- [5] WILLIAMS CC, ALLISON JG, VIDAL GA, et al. The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone [J]. *J Cell Biol*. 2004, 167 (3): 469-478.

[收稿日期] 2006-11-21