

表皮生长因子及其受体在山羊胎儿皮肤发育中的表达特征

卿素珠, 林吉茂, 张灵枝, 王磊磊, 罗时双

(西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

摘要: 运用组织学和免疫组化方法对山羊皮肤发育的组织学特点、山羊皮肤发育过程中表皮生长因子(EGF)及其受体(EGFR)的分布及变化规律进行了系统研究。结果显示:(1)表皮结构形成于胎儿发育的6周龄左右,开始为单层上皮,而后逐渐增殖为复层、厚度不断增加,15周龄后逐渐变薄;真皮层在10周龄时形成,11周龄后陆续有皮肤衍生结构从中发育形成。随着胚胎的继续发育,皮肤各部分结构的发育渐趋完善。(2)在胎儿发育的第6周就出现EGF与EGFR的较弱表达,以后随着胎龄的增加,EGF与EGFR表达量逐渐增加。从表达分布看,在胎儿发育的11周前,EGF阳性反应主要定位于表皮基底层细胞、毛囊上皮细胞和真皮成纤维细胞等的胞质内,EGFR则主要位于相应细胞的膜上;11—16周,EGF和EGFR表达量逐渐增高,分布范围从表皮的基底层细胞、棘细胞、毛囊上皮细胞和成纤维细胞扩展到血管内皮细胞、汗腺上皮细胞和竖毛肌,EGF主要定位于这些细胞的胞质,EGFR则主要分布于细胞膜;17周至出生,随着表皮的明显变薄,EGF及EGFR主要分布于表皮基底层细胞和毛囊上皮细胞,阳性反应继续增强。皮肤发育期间,EGF及EGFR的表达量总体呈增长趋势,只是EGFR的表达相对滞后,两者的表达曲线一致、相关性极显著。表明EGF及EGFR在皮肤及其衍生结构的发育中发挥着重要作用。

关键词: 表皮生长因子;表皮生长因子受体;皮肤;发育;山羊

中图分类号:S852.16

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2009)09-1383-06

Expression Characteristics of EGF and EGFR in Developing Skin of Goat Fetus

QING Su-zhu, LIN Ji-mao, ZHANG Ling-zhi, WANG Lei-lei, LUO Shi-shuang

(College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The histological characteristics, distribution and variation discipline of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) during skin's development of goat fetus were studied with histological methods and immunohistochemistry. The results showed that the epidermis formed at the embryonic 6th week, and then the thickness increased gradually because of transition from simple epithelium to stratified epithelium, and decreased after the 15th week. The structure of dermis occurred at the 10th week, and the derivates in dermis appeared after the 11th week. As the process of prenatal development, all structures of skin matured gradually. Low expression of EGF and EGFR could be observed at the 6th week. Afterwards, the expression of EGF and EGFR increased as growth. Before the 11th week, EGF positive reaction mainly located in cytoplasm of basal layer cells of epidermis, hair follicular epithelia cells and fibroblasts, and EGFR mainly located on cell membrane of these cells. From 11th to 16th week, the expressional range of EGF and EGFR extended from basal layer cells, prickle cells, hair

收稿日期:2008-12-03

基金项目:陕西省自然科学基金资助项目(2004C120);西北农林科技大学人才基金资助项目

作者简介:卿素珠(1969-),女,湖南永州人,副教授,博士,主要从事动物组织胚胎学和发育生物学研究工作,E-mail:suzhuqing@163.com

follicular epithelia cells and fibroblasts to vascular endothelial cells, epithelial cells of sweat gland and arrector pili muscle. EGF mainly distributed in cytoplasm of these cells, and EGFR were also located on membrane of these cells. From 17th week to birth, EGF mainly located in basal layer cells and hair follicular epithelia cells as the skin thinned, the positive intensity continued to increase. The expressed amount of EGF and EGFR trended to increase during the whole development stage just accompanied by a hysteresis in expression of EGFR. There were extreme significant correlations between expressed amount of EGF and EGFR. The results demonstrated that EGF and EGFR played important roles in the development of skin and its derivatives.

Key words: epidermal growth factor; epidermal growth factor receptor; skin; development; goat

哺乳动物皮肤由表皮、真皮及皮下组织构成,其中存在各种衍生结构,皮肤的发生、发育和损伤修复受到各种生长因子和细胞因子的综合调控。近年来的研究表明,在皮肤发生发育的诸多调控因子之中,表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)作为皮肤发育中重要的多功能信号分子的一部分,在皮肤的生长发育以及创面愈合过程中起着十分重要的作用^[1-2]。EGF 能有效地促进和调节表皮细胞的生长和增殖、促进皮肤细胞的再生,同时增加其他内源性生长因子的含量,促进细胞分泌透明质酸和糖蛋白等大分子物质的合成,合理调整皮肤结构。EGFR 是一种受体酪氨酸激酶,EGF 通过和靶细胞表面特异性受体 EGFR 结合而发挥生物学作用^[3]。有关 EGF 和 EGFR 在不同发育阶段人皮肤组织内的定位表达已有较多资料报道^[2,4-6],研究结果提示 EGF 和 EGFR 对皮肤的发生、结构功能的维持以及损伤后的修复具有重要作用;此外,EGF 及其受体还积极地参与皮肤衍生物的发生发育过程,并可能在皮肤衍生物的功能维持中发挥重要作用^[4,7-10]。

研究动物皮肤发育中生长因子、细胞因子的表达规律及其调控,可为动物表皮干细胞、真皮干细胞及其相关研究,以及人与动物皮肤发育的差异性研究奠定试验和理论基础。迄今为止,关于山羊胎儿皮肤发生发育过程中 EGF 和 EGFR 表达特征方面的研究尚未见报道。作者运用组织学方法对山羊胎儿皮肤发育的形态特点进行了观察,并运用免疫组织化学方法对皮肤发育过程中 EGF 和 EGFR 的表达规律进行研究,以进一步探讨 EGF 及其受体 EGFR 在皮肤生长发育以及皮肤衍生物形成过程中的生物学作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

根据曹贵方的方法^[11],自西安某屠宰场取交配后 6~21 周龄的山羊胎儿,每周龄 3 只。

1.2 试剂

EGF、EGFR 兔抗多克隆抗体(武汉博士德生物工程有 限 公 司);免 疫 组 化 超 敏 SP 试 剂 盒(福 州 迈 新 生 物 技 术 开 发 公 司);牛 血 清 白 蛋 白(华 美 生 物 工 程 有 限 公 司);组 织 学 制 片 用 常 规 试 剂。

1.3 样本采集

对所取胚胎开胸,经左心室插管入主动脉,先用生理盐水冲洗,再用含 4%多聚甲醛的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(PB, pH7.2~7.4)经心脏灌注固定,取胎儿背部皮肤入相同固定液中后固定、保存。在灌注前取 11 和 15 周龄胎儿背部皮肤组织 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 制备透射电镜样本。

1.4 组织制片和染色

固定好的组织进行石蜡包埋、连续切片,片厚 $6 \mu\text{m}$,隔 5 取 1,裱片于经多聚赖氨酸处理的载玻片上,共制得 4 套切片:其中 2 套切片分别行 EGF 和 EGFR 免疫组化 SP 法染色,染色程序参照文献^[12]进行,抗体工作浓度均为 1:200;1 套进行 HE 染色,以做阳性细胞定位;1 套用于阴性对照。

1.5 显微摄像、图像分析及数据处理

将制得的切片在光镜下观察、记录, MotiC 数码显微镜拍照,用“JEDA801 系列形态分析系统”软件对阳性产物进行分析,每个组别随机选取 5 张切片,测量阳性细胞的面积、平均光密度以及灰度值,用均数±标准差表示,运用 SPSS 软件进行统计学处理和相关性分析。

1.6 皮肤透射电镜切片制作

11 和 15 周龄山羊胎儿皮肤组织样本,经戊二

醛-多聚甲醛固定,然后分别用 10% (体积分数) 醋酸和 0.5% (体积分数) 醋酸铀固定和组织浸染, Epon 812 包埋和修块定位,作超薄切片和柠檬酸铅复染,透射电镜下观察,分析结果。

2 结果

2.1 不同胎龄山羊皮肤的组织学特点

6—7 周龄:皮肤表面平整,出现单层扁平上皮的表皮结构,其与深部的间充质之间界限不清(图 1-A)。8 周龄:表皮变为单层柱状上皮,仍与深层间充质界限不清。9 周龄:皮肤表面平整,表皮细胞开始增生为 2 层,细胞排列较紧密,外层细胞呈单层扁平状,深层细胞为单层立方状、构成基底层。表皮与间充质之间以基膜为界,深层间充质细胞排列较稀疏。10 周龄:表皮深层细胞不断增殖出现中间层,形成由表层、中间层和基底层组成的表皮结构;真皮层开始出现,与表皮分界明显,其中含有少量胶原纤维和弹性纤维,在局部还可见到基底层细胞围成的团状实心细胞群向间充质内突出形成的毛芽,血管断面明显可见。11 周龄:皮肤表皮基底层细胞继续增殖使中间层加厚,可见由基底层细胞围成细胞群形成原始毛囊,在原始毛囊的生发层附近形成实心的细胞索,即汗腺;真皮层增厚,表皮与真皮发生紧密接触(图 1-B)。电镜下,表皮的深层细胞(棘细胞层)胞质内可见有少量张力原纤维的存在和糖原颗粒,并发现朗格汉斯细胞(以网球拍状的伯贝克颗粒为特征)(图 1-G);基底层和中间层细胞间隙增大,内容物电子密度较低,有指状突起伸入,在相邻细胞间出现桥粒结构(图 1-H)。12—13 周龄:表皮细胞出现角质层、透明层及颗粒层的分化。汗腺结构明显,真皮乳头层形成,真皮内胶原纤维的数量明显增多(图 1-C)。14 周龄:皮脂腺形成(图 1-D)。15 周龄:表皮的 5 层结构特征明显,基底层为 1 层立方或矮柱状细胞;棘细胞层为 2~3 层多角形细胞,核圆形、较大、染色浅;颗粒层细胞由 1~2 层扁平的梭形细胞组成;透明层细胞轮廓不清,为 1 层均质的嗜酸性;角质层明显。毛球上皮细胞索开始分化为外根鞘、内根鞘的原基,在毛囊的两侧可见皮脂腺和竖毛肌(图 1-E),真皮内胶原纤维继续增多,深部可见较多汗腺分泌部的断面。电镜下,表皮深层细胞胞质内张力原纤维增多、变粗,糖原颗粒增多(图 1-I);随着中间层细胞的增殖变厚,棘细胞之间出现典型的桥粒结构。16—17 周龄:表皮开始变薄、角质层明

显。毛开始形成,并随着发育逐渐长出体表,真皮内胶原纤维和弹性纤维增多致使真皮层厚度增加。18 周龄至出生:表皮层变得更薄,但角质层增殖变厚,毛囊的内、外根鞘分层明显,毛干形成并伸出体表(图 1-F);皮脂腺及汗腺逐渐发达,血管更加丰富,真皮深层布满胶原纤维。

2.2 山羊胎儿皮肤发育过程中 EGF 和 EGFR 的表达特点

经免疫组化 SP 法染色的切片,背景无色或浅蓝色,免疫反应阳性产物为蓝色或蓝黑色;对照组切片染色为阴性,说明该染色具有免疫反应的特异性。

6—8 周龄:单层的表皮组织 EGF 和 EGFR 表达较弱,阳性反应部位结构不清晰(图 2-A、B)。

第 9 周:EGF 和 EGFR 主要分布于表皮的深层,EGF 阳性反应产物主要分布于表皮深层细胞的胞质内,细胞相互连接呈波浪状;EGFR 定位于表皮细胞的细胞膜上。

第 10 周:表皮细胞内 EGF 和 EGFR 阳性反应区域扩大,主要为基底层细胞的一致着色;刚形成的毛芽区域也出现阳性反应;真皮内的成纤维细胞也可见不同程度的阳性反应。EGF 阳性产物主要存在于各部位细胞的胞质内,细胞核不着色呈空泡状;EGFR 则定位于细胞膜。

11—16 周:随着胎儿的生长发育,EGF 和 EGFR 的阳性细胞表达量逐渐增大、表达范围也逐渐扩大,特别是在皮肤的衍生物发生及发育过程中较明显。EGF 除了广泛分布于表皮的基底层、棘细胞层和真皮的毛囊细胞胞质外,在真皮的成纤维细胞、血管的内皮细胞、汗腺上皮细胞和竖毛肌细胞胞质内也可见到阳性染色,EGFR 主要分布于这些细胞的膜上(图 2-C、D)。

第 17 周一初生:随着表皮的明显变薄,EGF 主要分布于基底层细胞和毛囊上皮细胞,阳性颗粒主要分布于胞质内,EGFR 主要定位于相应细胞的细胞膜上。阳性反应不断增强(图 2-E、F)。

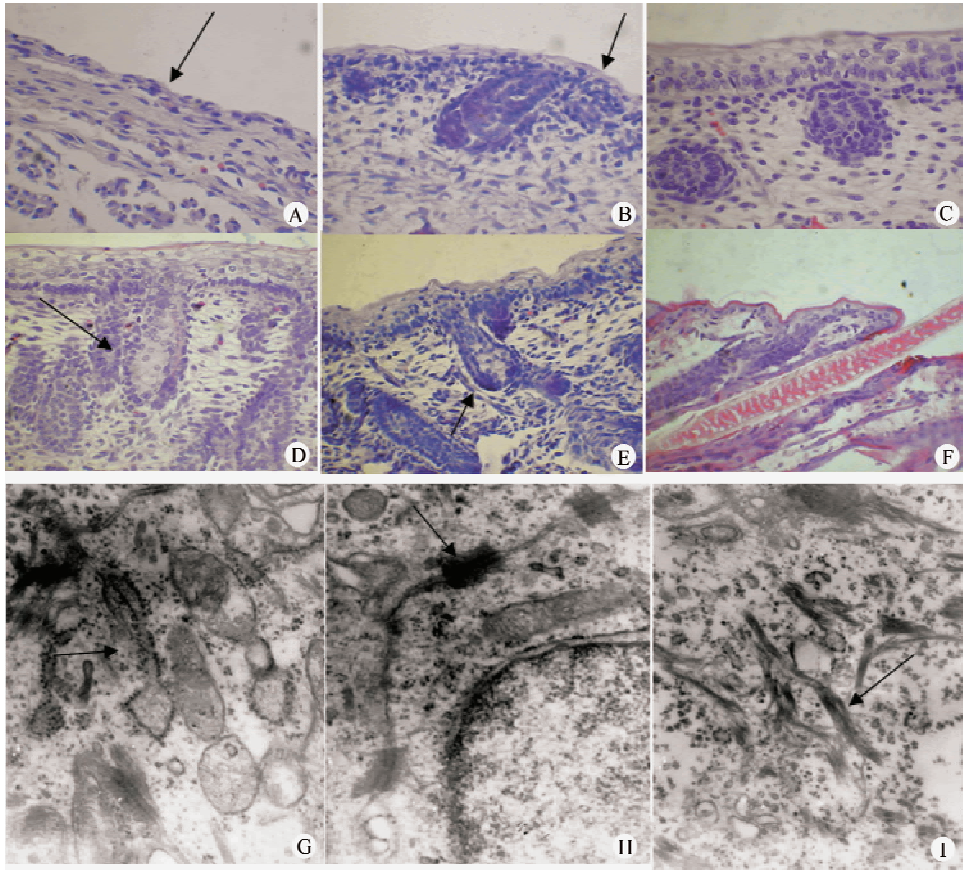
2.3 皮肤发育过程中 EGF 和 EGFR 阳性产物灰度值分析

不同胎龄山羊皮肤组织中 EGF 和 EGFR 的阳性产物灰度值见表 1。从表 1 可以看出,在山羊胎儿发育过程中,皮肤 EGF 和 EGFR 表达强度随着皮肤发育的进程而逐渐增大。

2.4 山羊皮肤发育过程中 EGF 和 EGFR 表达的相关性分析

对皮肤发育过程中 EGF 和 EGFR 的表达进行

相关性分析,结果表明二者的表达相关系数为 0.918,为极显著正相关。



A-F 均为 HE 染色,400 \times ,A. E6W (The embryonic 6th week,胚胎发育 6 周龄,以下各周龄的表述与此相同),箭头示表皮,此时为单层扁平上皮;B. E11W,表皮增厚(\uparrow),有原始毛囊形成,汗腺出现;C. E12W,真皮内胶原纤维增多;D. E14W,皮脂腺形成(\uparrow);E. E15W,出现竖毛肌(\uparrow);F. E18W,皮肤各部分结构基本形成;G-I 均为透射电镜图像,G. E11W,箭头示朗格汉斯细胞内的伯贝克颗粒,30 000 \times ;H. E11W,桥粒(\uparrow),30 000 \times ;I. E15W,棘细胞内张力原纤维(\uparrow)增多,25 000 \times

Fig. A to F stained by hematoxylin and Eosin, 400 \times , A. The arrow indicated epidermis which was lined by simple squamous epithelium at the embryonic 6th week; B. At the 11th week, thickened epidermis (arrow), original hair follicle and sweat gland could be seen; C. At the 12th week, the collagenous fibers in dermis increased; D. At the 14th week, the sebaceous gland (arrow) appeared; E. The arrow showed arrector pilli muscle at the 15th week; F. At the 18th week, the structures of skin formed on the whole; G. The arrow indicated Birbeck granule of Langerhans' cell at the 11th week, TEM 30 000 \times ; H. The arrow showed desmosome at the 11th week, TEM 30 000 \times ; I. The number of tonofibril (arrow) in cytoplasm of acanthocyte increased at the 15th week, TEM 25 000 \times

图 1 山羊皮肤发育的组织学特点

Fig. 1 Histological characteristics of developing goat skin

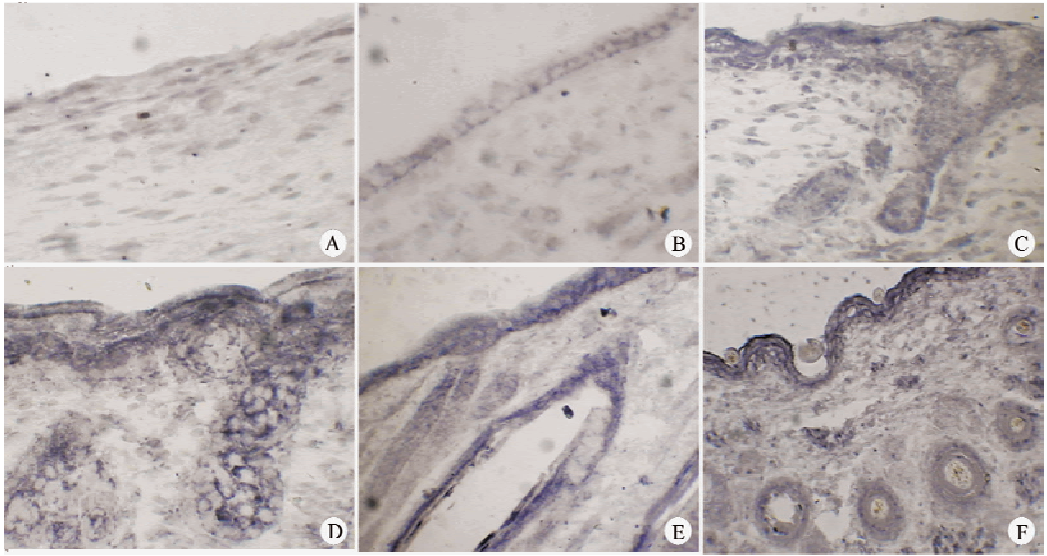
表 1 山羊胎儿各周龄 EGF 和 EGFR 的灰度值($\bar{x}\pm s$)

Table 1 The gray scale of EGF and EGFR on different stages($\bar{x}\pm s$)

| | E7W | E11W | E12W | E13W | E17W | E18W |
|------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| EGF | 130.61 \pm 1.43 ^a | 101.68 \pm 3.83 ^b | 95.11 \pm 7.96 ^b | 85.94 \pm 5.96 ^b | 68.95 \pm 2.76 ^c | 66.94 \pm 2.10 ^c |
| EGFR | 135.61 \pm 2.67 ^a | 119.42 \pm 0.58 ^b | 114.73 \pm 2.01 ^b | 104.20 \pm 4.03 ^b | 81.15 \pm 4.90 ^c | 76.35 \pm 3.63 ^c |

同行内上标字母相同者表示差异不显著($P>0.05$);字母不同的表示差异显著($P<0.05$)

In the same row, the same letter represent no significant difference($P>0.05$); the different letters represent significant difference($P<0.05$)



A. E8W EGF 阳性反应不明显,400×;B. E8W 表皮细胞膜上出现较弱的 EGFR 阳性反应,400×;C. E15W EGF 免疫反应产物弥散分布于表皮和真皮,400×;D. E15W EGFR 阳性反应主要位于表皮细胞和毛囊上皮细胞膜上,400×;E. E17W EGF 阳性反应产物主要位于变薄的表皮细胞及毛囊上皮内,400×;F. E17W 表皮细胞、毛囊上皮细胞和汗腺上皮细胞膜上的 EGFR 阳性反应,100×

A. At the 8th week, EGF positive immunoreactions (IR) were not very clear,400×; B. At the 8th week, the weak EGFR expression could be seen on the cell membrane of epidermal cells,400×; C. At the 15th week, EGF-IR products were distributed in epidermis and dermis dispersely,400×; D. At the 15th week, EGFR-IR products were mainly distributed in cell membrane of epidermal cells and hair follicular epithelial cells,400×; E. At the 17th week, EGF-IR products were mainly distributed in thinner epidermal cells and hair follicular epithelium,400×; F. At the 17th week, EGFR-IR products were mainly located on cell membrane of epidermal cells, hair follicular epithelia cells and sweat glandular epithelial cells, 100×

图 2 山羊胎儿皮肤发育过程中 EGF 和 EGFR 的表达 免疫组织化学染色

Fig. 2 The expression of EGF and EGFR of developing skin in goat fetus Immunohistochemical staining

3 讨论

3.1 山羊皮肤组织的发育特点

本研究结果表明,山羊胎儿表皮于 6 周龄开始形成,而后由单层扁平上皮逐渐增殖分化为 2 层(8 周龄)、3 层(10 周龄)乃至典型的复层扁平上皮,到 13 周龄时表皮厚度达到最大,至 16 周龄表皮开始变薄,这种发育趋势与云南半细毛羊皮肤表皮的发育变化^[13]相似。整体发育过程显示 11—15 周龄是山羊皮肤发育的重要时期,此时表皮、真皮、毛囊前体细胞的生长和发育都呈现出特征性变化,伴随着血管的不断迁入,真皮的发育逐渐完善。有关汗腺与皮脂腺的发生,有报道^[14]显示绒山羊胎儿皮肤发育过程中,皮脂腺较汗腺出现得早,而本研究结果表明,汗腺比皮脂腺出现得早,可能由于品种不同所致。

3.2 山羊皮肤组织发育过程中 EGF 及 EGFR 的表达特征及其功能意义

表皮生长因子(EGF)及其受体 EGFR 是细胞

信号传导系统的一部分,EGF 对角质形成细胞的分裂具有较强的促进作用,其作用主要通过 EGFR 的介导来完成^[3]。本研究结果显示,在羊胎皮肤发育早期就出现 EGF 与 EGFR 的较弱表达,随着胎龄的增加,EGF 与 EGFR 的表达呈不断增高的趋势。这与陈伟等在人胎儿皮肤发育中的研究结果^[5]类似,他们用免疫组化结合病理组织学技术研究了 EGF 和 EGFR 在胎儿和成人皮肤中的表达情况,结果表明 EGF 和 EGFR 在胎儿和成人皮肤内均有分布,且随着胎儿生长发育,表达 EGF 和 EGFR 的细胞数量逐渐增加。

从统计学结果来看,随胎龄的增加,EGF 的表达量总体呈高水平趋势,而 EGFR 的表达量稍稍滞后,表达曲线与 EGF 一致,且两者之间有极显著的相关性($P < 0.01$)。表达量增幅最快是在皮肤衍生物形成时期(即胎龄 13—15 周),该时期也是皮肤生长的活跃期,毛囊、汗腺、皮脂腺等皮肤衍生物在此时萌芽;至胎儿发育后期,EGF 和 EGFR 的表达持续较高水平。从细胞定位来看,EGF 主要存在于表

皮深层细胞、毛囊上皮细胞、真皮内血管内皮细胞及部分成纤维细胞的细胞质中,在汗腺上皮细胞和竖毛肌细胞胞质内也可见到不同程度的着色;EGFR 则主要定位于这些细胞的细胞膜上。研究结果提示,EGF 及其受体 EGFR 在羊皮肤及其衍生结构的形态发生、生长发育及结构和功能的维持中发挥着重要作用。

胚胎皮肤形态发生是一个复杂的多基因参与过程,目前尚不清楚哪些因子参与诱导和调控早期胎儿皮肤 EGF 信号系统的表达,EGF 及其受体 EGFR 在诱导并维持皮肤及其衍生结构形成的作用机制仍有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 周 岗,温 博. 汗腺发育及其调控研究进展[J]. 感染、炎症、修复, 2005, 6(3): 170-172.
- [2] 周 岗,付小兵,陈 伟,等. 胎儿皮肤 EGF、EGFR 基因表达特征与汗腺形成的关系研究[J]. 创伤外科杂志, 2006, 8(1): 65-68.
- [3] 叶 榕. 表皮生长因子受体及其临床应用[J]. 医学新知杂志, 2008, 18(3): 164-166.
- [4] AKIYAMA M, SMITH L T, HOLBROOK K A. Growth factor and growth factor receptor localization in the hair follicle bulge and associated tissue in human fetus[J]. *J Invest Dermatol*, 1996, 106(3): 391-396.
- [5] 陈 伟,付小兵 孙同柱,等. 表皮细胞生长因子及其受体在胎儿皮肤组织内的表达特征及其意义[J]. 中国临床康复, 2002, 6(8): 1128-1130.
- [6] 程 颺,付小兵,盛志勇,等. 胎儿、成人皮肤 EGFR 与 FGFR-2 表达的研究[J]. 中华整形外科杂志, 2003, 19(2): 91-94.
- [7] SAGA K. Structure and function of human sweat glands studied with histochemistry and cytochemistry [J]. *Prog Histochem Cytochem*, 2002, 37(4): 323-386.
- [8] LI H H, ZHOU G, FU X B, et al. Antigen expression of human eccrine sweat glands [J]. *J Cutan Pathol*, 2009, 36(3): 318-324.
- [9] SAGA K, JIMBOW K. Immunohistochemical localization of activated EGF receptor in human eccrine and apocrine sweat glands [J]. *J Histochem Cytochem*, 2001, 49(5): 597-602.
- [10] LI J F, FU X B, SUN X Q, et al. The interaction between epidermal growth factor and matrix metalloproteinases induces the development of sweat glands in human fetal skin [J]. *J Surg Res*, 2002, 106(2): 258-263.
- [11] 曹贵方. 山羊体形和卵巢发生及卵泡组织化学的研究[D]. 杨凌: 西北农业大学, 1998.
- [12] 卿素珠,林吉茂,徐永平,等. 山羊胎儿脊神经节发育过程中 NGF 及其受体 TrKA 的表达[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(10): 1102-1108.
- [13] 洪琼花,兰 蓉,邵庆勇,等. 云南半细毛羊不同发育阶段皮肤毛囊性状的发育规律研究[J]. 中国畜牧杂志, 2001, 37(2): 19-21.
- [14] 张燕军,尹 俊,李长青,等. 内蒙古阿尔巴斯绒山羊胎儿期皮肤毛囊发生发育规律研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(8): 761-768.