

表皮生长因子影响人羊膜间充质干细胞迁移的机制

李彩虹¹, 施 萍², 庞希宁¹

中国医科大学¹ 细胞生物学卫生部重点实验室干细胞与再生医学研究室
²附属第一医院全科医学教研室, 沈阳 110001

通信作者: 庞希宁 电话/传真: 024-23261091, 电子邮件: pxining@yahoo.com;
施 萍 电话: 024-83282946, 电子邮件: shiping57428@yahoo.com.cn

摘要: **目的** 研究表皮生长因子 (EGF) 影响体外培养的人羊膜间充质干细胞 (hAMSCs) 迁移的机制。**方法** 将体外培养的 hAMSCs 分为对照组 (未处理)、EGF 组、抑制剂 AG1478 + EGF 组、抑制剂 LY294002 + EGF 组和抑制剂 U0126 + EGF 组 5 组, 采用 Transwell 小室测定各组 hAMSCs 的迁移能力, Western blot 检测各组磷酸化 EGFR (P-EGFR)、磷酸化 AKT (P-AKT) 和磷酸化 ERK1/2 (P-ERK1/2) 及金属蛋白酶 (MMP) -2 和 MMP-9 的表达情况, RNA-Seq 技术对 EGF 组和对照组细胞中差异表达基因进行分析。**结果** EGF 组细胞的迁移能力明显高于对照组 ($P = 0.0361$), 抑制剂 AG1478 + EGF 组 ($P = 0.0113$)、抑制剂 LY294002 + EGF 组 ($P = 0.0169$) 和抑制剂 U0126 + EGF 组 ($P = 0.0293$) 明显低于 EGF 组。EGF 可增加 hAMSCs 的 P-EGFR、P-AKT 和 P-ERK1/2 及 MMP-2 的表达, 但 P-AKT 和 P-ERK 表达的增加可被 AG1478 和 LY294002 抑制。对 EGF 组和对照组细胞中差异表达基因的 GO 功能富集分析和 KEGG 代谢途径分析结果表明, EGF 组细胞中发生转录上调的基因主要参与转录调节、蛋白质修饰、凋亡抑制等生命过程, 其中与 MAPK 信号通路有关的基因为 DUSP5、IL1B、DUSP6、NGF 和 HSPA2。**结论** EGF 引起的 hAMSCs 迁移可能是通过 PI3K/AKT、ERK 信号通路介导的, 需要 MMP-2 的表达, 及其参与转录调节、蛋白质修饰和凋亡抑制等基因的协同表达。

关键词: 人羊膜间充质干细胞; 表皮生长因子; 磷脂酰肌醇激酶-3; 细胞外调节蛋白激酶

中图分类号: R329.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-503X(2011)06-0606-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2011.06.004

Effect of Epidermal Growth Factor on Migration of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells

LI Cai-hong¹, SHI Ping², PANG Xi-ning¹

¹Key Laboratory of Cell Biology of Ministry of Public Health, Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, ²Department of General Practice, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

Corresponding author: PANG Xi-ning Tel/Fax: 024-23261091, E-mail: pxining@yahoo.com;

SHI Ping Tel: 024-83282946, E-mail: shiping57428@yahoo.com.cn

ABSTRACT: Objective To explore the mechanism via which the epidermal growth factor (EGF) affects the migration of human amnion-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs). **Methods** *In vitro* cultured hAMSCs were divided into control (untreated), EGF group, inhibitor AG1478 + EGF group, inhibitor LY294002 + EGF group, and inhibitor U0126 + EGF group. The migration ability of hAMSCs in each group was measured using Transwell chamber. The expressions of phosphorylated EGFR (P-EGFR), phosphorylated AKT (P-AKT), and phosphorylated ERK1/2 (P-ERK1/2) as well as the expressions of metalloproteinase

(MMP)-2 and MMP-9 were detected using Western blot analysis. The differentially expressed genes in the culture solutions in EGF groups and control group were analyzed with RNA-Seq technique. **Results** Cells in EGF group had significantly stronger migration ability than in control group ($P=0.0361$), inhibitor AG1478 + EGF group ($P=0.0113$), inhibitor LY294002 + EGF group ($P=0.0169$), and inhibitor U0126 + EGF group ($P=0.0293$). EGF increased the phosphorylation levels of EGFR, AKT and ERK, and increased the expression of MMP-2. However, the increased expressions of P-AKT and P-ERK could be suppressed by AG1478 and LY294002. As shown by GO functional enrichment analysis and KEGG pathway analysis, EGF increased the transcription of genes, which were mainly involved in transcriptional regulation, protein modification, and apoptosis inhibition. Genes that were involved in the MARK pathway included DUSP5, IL1B, DUSP6, NGF, and HSPA2. **Conclusion** EGF-induced migration of hAMSCs may be mediated by the signaling pathways of PI3K and ERK, which needs MMP-2 expression and the co-expression of genes involved in transcriptional regulation, protein modification, and apoptosis inhibition.

Key words: human amniotic mesenchymal stem cells; epidermal growth factor; phosphatidylinositol 3-kinases; extracellular regulated protein kinases

Acta Acad Med Sin., 2011, 33(6):606-610

人羊膜间充质干细胞 (human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs) 在羊膜中含量丰富, 分化能力强, 能在体外进行分离、培养, 且生物性能稳定, 可以为实验和临床提供充足的细胞来源。表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 可与 EGF 受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 结合并激活 EGFR 信号通路, 在促进细胞增殖、存活、迁移等方面发挥重要作用^[1]。笔者以往研究发现, EGF 能促进 hAMSCs 的增殖和迁移^[2]。

研究显示, 磷脂酰肌醇激酶-3 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K) 家族参与了多种信号通路, 通过转录调控降低或促进其表达, 可以调节细胞生理活动。Jak/STAT 和细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 通路可调节细胞增殖、分化和凋亡, 对肠道病理生理过程起着重要的调控作用^[3-5]。Sheng 等^[6] 研究证实, ERK 和 PI3K/AKT 信号通路在调节肠上皮细胞的生长、迁移、分化和凋亡中均发挥十分重要的作用。在多种病理生理过程中, PI3K/AKT 和 ERK 通路之间可产生多样的相互作用^[7-8], 两者可协同调节细胞周期和凋亡等病理生理过程^[9-10]。

基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 是降解细胞外基质骨架蛋白 IV 型胶原的主要酶之一, 主要参与伤口愈合等生理功能, 在正常成人组织中水平较低, 只有在系统接受一个刺激或病理状态下才会升高。研究表明, 肿瘤细胞侵袭过程中首先需要水解细胞外基质, 多种肿瘤细胞的侵

袭均伴随 MMP-2 表达升高, EGF 促进小鼠胚胎干细胞迁移时, MMP-2 表达也有升高^[11]。

转录组学研究是基因功能研究的基础和出发点, 通过在整体水平研究基因的表达, 揭示特定生物学过程以及疾病发生过程的分子机制, 是连接基因组遗传信息与蛋白质组功能信息的必然纽带^[12]。目前关于细胞迁移机制的研究主要集中在具体某条信号通路上, 缺少整体水平的研究。本研究观察了 EGF 对体外培养 hAMSCs 迁移的影响, 并在转录组水平上检测了基因表达的差异, 探讨了 EGF 影响 hAMSCs 迁移的机制。

材料和方法

材料 DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco BRL 公司, FBS 购自美国 Hyclone 公司, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, EGF、AG1478、LY294002、U0126 购自美国 Sigma 公司, 磷酸化表皮生长因子 (phosphorylated Epidermal growth factor, P-EGFR)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, P-AKT)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (phosphorylated extracellular regulated protein kinases, P-ERK1/2)、MMP-2 抗体购自美国 Cellsignaling 公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自中国 Kangchen 公司, 山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗、Trizol 购自美国 Invitrogen 公司, RT-PCR 试剂盒、Realtime-PCR 试剂盒购自大连 Takara

公司。

hAMSCs 迁移能力的测定 采用带有 8 μm 微孔聚碳酸酯膜的 Transwell 小室测定细胞的迁移能力, 具体为: hAMSCs 用无血清的 DMEM/F12 饥饿 12 h, 胰酶消化并用无血清培养基制成密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液, 然后分为对照组 (未处理)、EGF 组、抑制剂 AG1478 + EGF 组、抑制剂 LY294002 + EGF 组和抑制剂 U0126 + EGF 组 5 组; 将 100 μl 细胞悬液分别加入各孔上室, 下室加入 600 μl 含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基; 培养 24 h 后取出小室, 以棉签拭去小室滤膜上的细胞, 小室滤膜下的细胞于 4% 多聚甲醛中固定 10 min, DAPI 染色。由于 DAPI 能将细胞核染成蓝色, 1 个细胞只有 1 个细胞核, 所以通过计数蓝色的细胞核数目就可以得到穿过膜的细胞数。在荧光显微镜下随机取 5 个高倍视野, 计数穿过滤膜的细胞数目, 取平均值, 实验重复 3 次。

Western blot 取等量细胞总蛋白, 用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 将蛋白转印到 PVDF 膜上。用 TBST [10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20] 洗 3 次, 然后用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗杂交过夜, TBST 洗 3 次, 再用辣根过氧化物酶标记的二抗杂交 1 h, TBST 洗 3 次, 最后用 ECL plus (GE Healthcare) 检测。

Real-time PCR 采用 ABI Prism 7500 (美国 ABI 公司), 用 SYBR Green 法进行检测, 每个样品做 3 个副孔, 以 GAPDH 做对照, 具体为: 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 以 RNA 为模板反转录成 cDNA, 用特异性引物做 q-PCR, 检测基因的相对表达量。引物采用 Primer 5 设计, GAPDH 上游引物 5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC, 下游引物 5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A; MMP-2 上游引物 5'-CTC ATC GCA GAT GCC TGG AA, 下游引物 5'-CAG CCT AGC CAG TCG GAT TTG。

RNA-Seq 技术 提取生物样品的总 RNA, 从中纯化出 mRNA; 利用二价阳离子处理 mRNA 使其片段化, 然后将片段化的 mRNA 反转录合成双链 cDNA, 构成 cDNA 文库, 并用高保真聚合酶进行 PCR 扩增以富集所得到的 cDNA 文库; 利用 Illumina Genome Analyzer 平台对得到的 cDNA 文库进行测序, 对测序数据进行生物信息学处理及后续分析。

统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件, 数据以均数 \pm 标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统

计学意义。

结 果

各组 hAMSCs 的迁移情况 对照组、EGF 组、抑制剂 AG1478 + EGF 组、抑制剂 LY294002 + EGF 组和抑制剂 U0126 + EGF 组穿过的细胞数目分别为 41.13 ± 2.862 、 60.33 ± 5.482 、 35.73 ± 0.8110 、 37.40 ± 1.943 和 40.97 ± 1.977 , 其中, EGF 组是对照组的 1.5 倍 ($P = 0.0361$), 抑制剂 AG1478 + EGF 组 ($P = 0.0113$)、抑制剂 LY294002 + EGF 组 ($P = 0.0169$) 和抑制剂 U0126 + EGF 组 ($P = 0.0293$) 明显低于对照组。

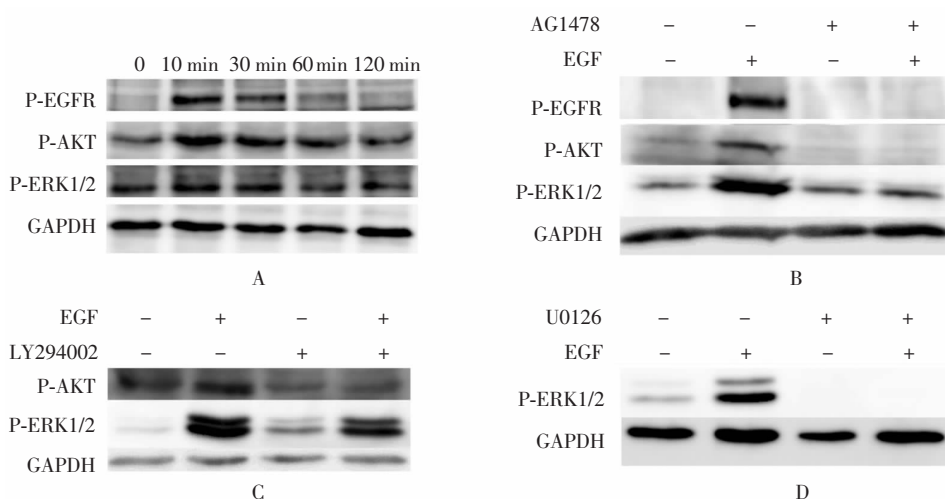
各组 P-EGFR、P-AKT 和 P-ERK1/2 的表达情况 Western blot 检测结果显示, EGF 处理 10 min 后, EGF 组的 P-EGFR、P-AKT 和 P-ERK1/2 表达水平增加; 60 min 后, P-EGFR 恢复至原来的水平, P-AKT 和 P-ERK1/2 仍低于原来的水平。抑制剂 AG1478 + EGF 组的 P-EGFR 表达未见升高、P-AKT 和 P-ERK1/2 表达也未升高。抑制剂 LY294002 + EGF 组的 P-AKT 表达水平显著下降, P-ERK 表达水平较 EGF 组有所降低, 但较对照组有所升高。抑制剂 U0126 + EGF 组的 P-ERK1/2 显著降低 (图 1)。

EGF 作用后 MMP-2 的表达情况 Western blot 检测结果显示, EGF 作用 24 h 后, MMP-2 蛋白表达水平升高, MMP-9 表达没有变化。Real-time PCR 检测结果, EGF 处理 12 h 后, MMP-2 mRNA 表达水平增高, 之后下降 (图 2)。

差异表达基因的筛选情况 对 EGF 组和对照组细胞中差异表达基因的 GO 功能富集分析和 KEGG 代谢途径分析结果表明, EGF 组细胞中发生转录上调的基因主要参与转录调节、蛋白质修饰、凋亡抑制等生命过程, 其中与 MAPK 信号通路有关的基因为 DUSP5、IL1B、DUSP6、NGF 和 HSPA2。

讨 论

为了评估 EGF 作用于 hAMSCs 后对其迁移的影响以及其中可能涉及的信号通路, 本研究首先采用 Transwell 小室检测了不同处理条件下 hAMSCs 的迁移情况, 此外还检测了 EGFR、AKT、ERK 等信号分子的磷酸化水平, 并采用 AG1478、LY294002、U0126 等一系列信号分子的抑制剂来进一步验证各信号分子



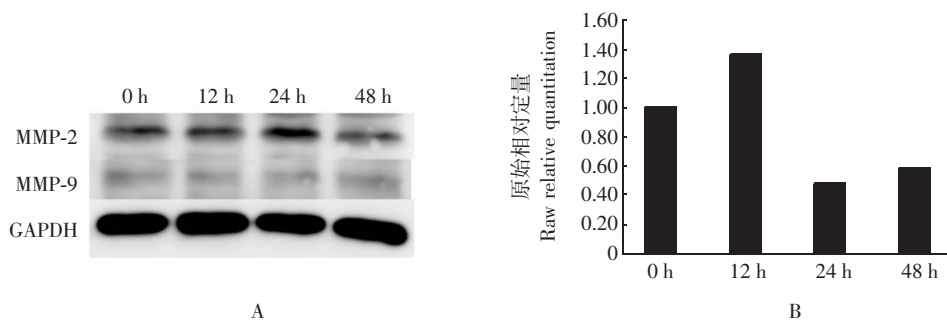
EGF: 表皮生长因子; P-AKT: 磷酸化蛋白激酶 B; P-ERK1/2: 磷酸化细胞外调节蛋白激酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶
 EGF; epidermal growth factor; P-AKT: phosphorylated protein kinase B; P-ERK1/2: phosphorylated extracellular regulated protein kinases1/2; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

A. Western blot 检测 EGF 处理不同时间后 P-EGFR、P-AKT、P-ERK1/2 的表达情况; B. AG1478 对 EGF 引起的 P-EGFR、P-AKT、P-ERK1/2 表达的影响; C. LY294002 对 EGF 引起的 P-AKT、P-ERK1/2 表达的影响; D. U0126 对 EGF 引起的 P-ERK1/2 表达的影响

A. expressions of P-EGFR, P-AKT, and P-ERK1/2 after having been treated with EGF for different time were detected using Western blot analysis; B. effects of AG1478 on EGF-induced expressions of P-EGFR, P-AKT, and P-ERK1/2; C. effects of LY294002 on EGF-induced P-AKT and P-ERK1/2 expressions; D. effects of U0126 on EGF-induced P-ERK1/2 expressions

图 1 各组 P-EGFR、P-AKT 和 P-ERK1/2 的表达情况

Fig 1 Expressions of P-EGFR, P-AKT, and P-ERK1/2 in each group



MMP: 基质金属蛋白酶

MMP: matrix metalloproteinase

A. Western blot 检测 EGF 处理不同时间后 MMP-2 和 MMP-9 的表达情况; B. realtime PCR 检测 EGF 处理不同时间后 MMP-2 表达情况

A. the expressions of MMP-2 and MMP-9 after having been treated with EGF for different time were detected using Western blot analysis; B. expressions of MMP-2 after having been treated with EGF for different time were detected using real-time PCR

图 2 EGF 作用不同时间后 MMP-2 和 MMP-9 的变化情况

Fig 2 Expressions of MMP-2 and MMP-9 after having been treated with EGF for different time

的活性受到抑制后对 EGF 作用所产生的影响。结果显示 EGF 处理后 hAMSCs 迁移能力增强, 并且 PI3K/AKT 通路中的 AKT 磷酸化水和 ERK 信号通路中的 ERK1/2 磷酸化水平增高。用 EGFR 的抑制剂 AG1478 作用后, EGFR、AKT、ERK1/2 的磷酸化水平平均下降; PI3K 的抑制剂 LY294002 作用后, AKT

和 ERK1/2 的磷酸化水平下降, 细胞的迁移能力也下降。由此推测, EGF 与 EGFR 构成的信号通路可能是经过 PI3K、ERK 等信号分子, 进一步将迁移信号传导致核内, 引起基因转录, 编码细胞生长、细胞骨架变化所必需的蛋白质, 促进细胞的迁移。

研究表明, 基质金属蛋白酶, 特别是 MMP-2 和

MMP-9 可通过降解细胞外基质使得细胞-基质和细胞-细胞间的连接降解, 从而参与内皮细胞和肿瘤细胞的迁移^[13]。干细胞与肿瘤细胞一样, 具有分化程度低的特点, 两者在一些基因调节方面也有相似之处。有研究证实, MMP-2 的过表达与肿瘤侵袭程度密切相关, 小鼠胚胎干细胞中可表达 MMP-2 和 MMP-9, 但其表达是否与细胞的迁移有关目前尚不清楚^[11]。本研究检测了 EGF 作用不同时间后 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达量, 发现 MMP-2 在 EGF 作用 24 h 后显著升高, MMP-9 表达没有变化; 之后用 Real-time PCR 技术检测 EGF 作用后 MMP-2 在 mRNA 水平的表达, 发现 EGF 作用 12 h 后 MMP-2 表达增高; 由此推测 MMP-2 可能参与了 EGF 对 hAMSCs 的调控, 与细胞迁移有关。

鉴于单独研究某条信号通路的局限性, 本研究采用 RNA-Seq 技术对 hAMSCs 基因组、基因匹配情况进行了统计分析, 并对 EGF 组和对照组差异表达基因进行 GO 功能富集分析, 结果显示 EGF 组细胞发生转录上调的基因主要参与转录调节、蛋白质修饰、抑制凋亡等生命过程, 与 MAPK 信号通路有关的基因为 DUSP5、IL1B、DUSP6、NGF 和 HSPA2。其中, DUSP5 是一种双特异性蛋白质酪氨酸磷酸酶, 酪氨酸磷酸化在控制正常细胞的生长、分化、代谢、细胞周期、细胞-细胞通信、细胞迁移、基因转录、离子通道、免疫应答及生存方面非常重要, 因此 DUSP5 基因有望成为调节 hAMSCs 迁移的靶点。

综上, 本研究结果显示, EGF 可以促进体外培养 hAMSCs 的迁移, 其可能是通过 PI3K/AKT、ERK 信号通路介导的, 需要 MMP-2 的表达, 及其参与转录调节、蛋白质修饰和凋亡抑制等基因的协同表达。由于 EGF 在干细胞治疗过程中可能通过促进有丝分裂、新生血管生成、抗炎、细胞保护、抗凋亡、调节免疫等旁分泌机制来发挥作用^[14], 因此可望在 hAMSCs 的临床治疗中发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane [J]. *Curr Eye Res*, 2000, 20(3):173-177.
- [2] 李彩虹, 施 萍, 庞希宁. 表皮生长因子干预人羊膜间充质干细胞的增殖和迁移 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 5(23):4312-4315.
- [3] Tebbutt NC, Giraud AS, Inglese M, et al. Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice [J]. *Nat Med*, 2002, 8(10):1089-1097.
- [4] Naka T, Kishimoto T. Joint disease caused by defective gp130-mediated STAT signaling [J]. *Arthritis Res*, 2002, 4(3):154-156.
- [5] Ernst M, Inglese M, Waring P, et al. Defective gp130-mediated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling results in degenerative joint disease, gastrointestinal ulceration, and failure of uterine implantation [J]. *J Exp Med*, 2001, 194(2):189-203.
- [6] Sheng H, Shao J, Townsend CM Jr, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells [J]. *Gut*, 2003, 52(10):1472-1478.
- [7] Marino M, Acconcia F, Trentalance A. Biphasic estradiol-induced AKT phosphorylation is modulated by PTEN via MAP kinase in HepG2 cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(6):2583-2591.
- [8] Bradley EW, Ruan MM, Vrabie A, et al. Pathway crosstalk between Ras/Raf and PI3K in promotion of M-CSF-induced MEK/ERK-mediated osteoclast survival [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(4):1439-1451.
- [9] Shelton JG, Steelman LS, White ER, et al. Synergy between PI3K/AKT and Raf/MEK/ERK pathways in IGF-1R mediated cell cycle progression and prevention of apoptosis in hematopoietic cells [J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(3):372-379.
- [10] Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, et al. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis [J]. *Leukemia*, 2004, 18(2):189-218.
- [11] Park JH, Han HJ. Caveolin-1 plays important role in EGF-induced migration and proliferation of mouse embryonic stem cells; involvement of PI3K/AKT and ERK [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(4):C935-C944.
- [12] Wang B, Guo G, Wang C, et al. Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA sequencing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(15):5075-5087.
- [13] Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(9):1227-1230.
- [14] Xu YX, Chen L, Wang R, et al. Mesenchymal stem cell therapy for diabetes through paracrine mechanisms [J]. *Med Hypotheses*, 2008, 71(3):390-393.

(收稿日期: 2011-09-30)