

花背蟾蜍胎肺发育中表皮生长因子受体的表达和定位作用

魏仲梅 俞诗源* 贾宗平 夏冰芝 王芳春 严峰

(西北师范大学生命科学院 兰州 730070)

摘要:取花背蟾蜍(*Bufo raddei*) 36、37、38、39期蝌蚪肺组织和幼蟾肺组织,进行常规石蜡切片,用免疫组化SP两步法检测EGFR的表达。观察了表皮生长因子受体(EGFR)在花背蟾蜍胎肺发育过程的表达特征,并探讨表皮生长因子(EGF)和转化生长因子 α (TGF- α)通过与EGFR的作用,对花背蟾蜍胎肺形态发生和肺泡上皮成熟分化的作用。结果表明,36期,EGFR在肺网状隔膜上皮细胞处有表达,37期,肺网状隔膜处EGFR阳性表达很明显,在肺泡囊处表达呈弱阳性,38期,肺网状隔膜处EGFR的阳性表达变弱,在远端的肺泡囊上皮细胞处其阳性表达增强,39期,EGFR在肺泡囊上皮细胞处阳性表达最活跃,在网状隔膜处EGFR的表达很弱,幼蟾期,EGFR阳性反应主要定位在肺泡上皮细胞。结论是,在胎肺发育的不同时期,EGFR在上皮细胞的定位有迁移,免疫组化反应强弱也有差异,说明EGFR在胎肺不同发育阶段发挥不同的功能,它对肺泡上皮细胞的成熟分化有重要调节作用。

关键词:花背蟾蜍 胎肺 表皮生长因子受体(EGFR) 免疫组化

中图分类号:Q954 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)06-115-05

Expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in the Fetal Lungs of *Bufo raddei*

WEI Zhong-Mei YU Shi-Yuan JIA Zong-Ping XIA Bing-Zhi

WANG Fang-Chun YAN Feng

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in the lungs of tadpole and young toad (*Bufo raddei*) were examined by immuno-histochemistry. The results showed that EGFR was mainly localized in epithelium of the reticular septa at stage 36, and the staining reached a peak level at stage 37. At stage 38, EGFR was mainly localized in epithelium of alveolar sac and the staining reached a peak level at stage 39. EGFR was mainly localized in alveoli epithelium in young toad lung. We conclude that the expression of EGFR changes during individual lung development, suggesting that it functions differently at various stages.

Key words: *Bufo raddei*; Fetal lung; EGFR; Immunity-histochemistry

胎肺发育分化过程中,肺上皮细胞受到多种活性物质的调控而具有严格和有条不紊的时空规律。文献报道,表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和转化生长因子 α (transforming growth factor, TGF- α)在胚胎生长发育过程中通过与相应膜受体结合,具有调控细胞生长的作

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30370163),甘肃省自然科学基金资助项目(No. ZS031-A25-005-Z)和创新人才基金;

* 通讯作者, E-mail: syyu@nwnu.edu.cn;

第一作者介绍 魏仲梅,女,硕士研究生,研究方向:发育生物学。

收稿日期:2006-03-10,修回日期:2006-08-31

用。免疫组化研究证实,EGF 和 TGF- α 在胎肺发育的不同阶段和不同部位有不同程度的表达。由于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)被认为是 EGF 和 TGF- α 的共同受体^[1-3],EGF 和 TGF- α 通过与 EGFR 结合可促进细胞增殖分化,对胎肺生长发育及功能成熟起重要作用。冉丕鑫等^[4]对大白鼠肺内表皮生长因子作了免疫组织化学研究;曾庆富、颜亚晖等^[5]对细支气管和肺泡细胞内表皮生长因子作了免疫组织化学分析;李贤等^[6,7]对小鼠胎肺发育中表皮生长因子等相关活性物质的表达进行了报道;熊轶、黄中新等^[8]对胎儿肺 II 型肺泡细胞中相关活性物质的表达做了分析。但有关它们的表达特征与两栖动物胎肺发育分化的直接关系认识并不多,EGF 和 TGF- α 对两栖动物胎肺的形态发生、肺泡上皮细胞的分化与功能建立等的调节作用及 EGFR 的表达未见报道。为了搞清两栖动物胎肺发育中 EGFR 的表达及特征,我们用免疫组化方法追踪分析研究了花背蟾蜍蝌蚪肺组织及幼蟾肺组织内 EGFR 的表达特征。

1 材料与方 法

从黄河兰州沿岸捕捉抱对的花背蟾蜍(*Bufo raddei*),放入盛水的培养缸,待其产卵、排精后,选取受精卵在 18~21℃ 条件下培养,根据葛瑞昌^[9]和赵振芳^[10]分期方法,取 36、37、38、39 期蝌蚪的肺组织和幼蟾肺组织,共 5 组。其中,36、37、38、39 每组 4 例,幼蟾 2 例,成年花背蟾蜍肺组织作正常对照。各标本用 10% 中性福尔马林液固定,常规石蜡包埋切片(7 μm),用 H.E 染色,作正常形态观察。用免疫组化 SP 法(辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素试剂盒),分析研究表皮生长因子受体的表达特征。一抗用羊抗表皮生长因子受体 Goat-Anti EGFR 1005-G(北京中山生物技术有限公司),工作浓度 1:100,孵育前微波处理进行抗原修复;一抗置 4℃ 冰箱过夜;空白对照以 PBS 代替一抗。DAB 显色,苏木素复染。其中选取 36 期蝌蚪肺组织切片 10 张,37 期 10 张,38 期 11 张,39 期

10 张,幼蟾 10 张,成年花背蟾蜍 6 张,进行观察分析并拍照。

2 结 果

2.1 H.E 染色 花背蟾蜍的肺成囊状,并且在肺的内壁上有许多网状隔膜,将肺的内壁分隔形成许多小室,在每个小室内又有少数次级皱褶将小室分隔为数个近似半球形或“C”形小腔^[11],花背蟾蜍肺壁内面由网状隔膜分隔出的小室称为肺泡囊,小室内的“C”形小腔称为肺泡,肺泡囊内的次级皱褶称为肺泡隔,肺内表面覆盖有一层肺上皮细胞。两栖动物肺壁内面网状隔膜及次级皱褶的出现较大地增加了囊状肺的内表面积,提高了气体交换的能力。

2.2 免疫组织化学 EGFR 定位于细胞质和细胞膜,EGFR 的阳性表达,出现在花背蟾蜍肺发育全过程的各个阶段,EGFR 表达可见于肺泡囊内的上皮细胞与肺泡上皮。

36 期:EGFR 主要表达于肺网状隔膜的上皮细胞,且较集中于上皮细胞的游离表面,在远端的肺泡囊处上皮细胞反应尚弱(图版 I:1)。

37 期:在肺网状隔膜处 EGFR 的阳性表达仍然很明显,在远端肺泡囊处上皮细胞的表达呈弱阳性(图版 I:2)。

38 期:在肺网状隔膜处 EGFR 的阳性表达变弱,在远端的肺泡囊与肺泡处其阳性反应表达很明显,EGFR 在间充质细胞区域性分布更加明显(图版 I:3)。

39 期:EGFR 在肺泡囊及肺泡上皮细胞的阳性表达最活跃,在肺网状隔膜处 EGFR 的阳性染色很弱(图版 I:4)。

幼蟾期:EGFR 阳性反应主要定位在肺泡上皮细胞。在肺网状隔膜处几乎不表达(图版 I:5A 和图版 I:5B)。

另外在血管,EGFR 染色始终呈强阳性。成肺中,肺泡上皮细胞 EGFR 的阳性染色基本消失,呈阴性反应,仅间质尚有阳性表达。

3 讨 论

EGFR 是能与 EGF 和 TGF- α 特异结合的细

胞表面蛋白,是一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白,是 EGF 和 TGF- α 的共同受体^[7]。当 EGF 或 TGF- α 与 EGFR 的氨基端区域结合,能促进 EGFR 自身磷酸化及细胞内其他蛋白质的酪氨酸磷酸化,从而产生相应的生物学效应,促使细胞由静止期进入增殖期,并加速 DNA 的复制,推动细胞周期进程,因而使分裂加快,周期缩短^[12]。

EGF 具有普遍的促上皮细胞增生作用,胎肺细胞通过自分泌和旁分泌 EGF 的方式来调节上皮细胞的分化及成熟,因此在胎肺发育过程中 EGF 起着非常重要的作用。TGF 能诱导正常细胞表型发生转化,是一种可刺激或抑制细胞增殖的多肽活性物质,具有多功能调节作用。TGF- α 虽然和 EGF 是完全不同的分子,但在结构上具有同源性,故生物学特性非常相似;至今未发现 TGF- α 的独立受体,其生物反应也是通过与 EGFR 结合而促进细胞增殖。EGF 和 TGF- α 均可与 EGFR 发生特异性反应。

有研究报道^[2,43],在人肺中沿呼吸道分布的各种呼吸上皮中,无论细胞分化程度如何,EGF 免疫染色均呈阳性,TGF- α 亦分布于正常胎肺的上皮细胞中。因为 EGF 和 TGF- α 与共同的受体 EGFR 结合,免疫组化反应中 EGFR 定位反映出的是 EGF 或 TGF- α 的作用部位,而无法将两者明确区分。在小鼠胎肺发育过程中^[6],EGFR 依然反映出的是 EGF 或 TGF- α 作用的部位,EGFR 免疫组化阳性反应定位于呼吸道上皮细胞,从气管直到远侧肺泡的任一水平。如果将无活性的 EGFR 导入后,鼠胚胎发育到第 12 d 气管的缺陷明显,将 12 d 的胎肺移出体外继续培养,结果肺组织内支气管芽仅为正常者的一半,肺泡 II 型细胞也发育不成熟^[14]。EGFR 缺乏的转基因新生小鼠经常出现肺不成熟的表现,肺组织内缺乏支气管,肺容积减少约一半,因气体交换面积明显减少导致呼吸困难^[14]。本实验观察到花背蟾蜍胎肺发育过程 EGFR 免疫组化阳性反应定位于肺泡上皮细胞,从网状隔膜直到远侧肺泡囊上皮细胞的任一水平,与已有研究报道相符。但我们观察到,

在花背蟾蜍胎肺发育的不同时期,EGFR 在肺泡上皮细胞定位有迁移,免疫组化反应强弱也有差异,提示在胎肺发育的不同阶段 EGFR 具有不同的功能。

有文献报道^[15,16],EGF 可刺激胚胎前肠形成较多的支气管芽及促进支气管形成分支,EGF 可促使细支气管变形进而凸向周围组织^[17],TGF- α 可参与远侧呼吸道的形成^[13]。李贤等^[7]认为,在小鼠胎肺发育的早期,EGFR 集中于支气管分叉处正在形成新管腔的成群细胞中,本研究表明在花背蟾蜍胎肺发育的 36、37 期,EGFR 主要存在于肺网状隔膜的上皮细胞,EGFR 的表达部位与上述报道基本一致。因此推测蝌蚪肺发育此阶段 EGFR 的作用可能与囊状肺内隔膜的形成功能有关,促进肺内形成更多的网状隔膜。在 38、39 期,EGFR 在肺泡囊处的上皮细胞阳性表达最活跃,此时,肺泡囊内的网状隔膜已基本形成,进入了肺泡构建的阶段,因此可以认为,此时 EGFR 的表达,可能是刺激上皮细胞进一步的成熟分化。李贤等^[7]报道,在小鼠胎肺发育的中、后期,小鼠肺支气管树分支基本完成,原始肺泡开始分化为 I 型和 II 型细胞,支气管处 EGFR 染色反应渐淡,定位移向终末囊泡。因此在胎肺发育的后期,EGFR 的作用已不再是促进更多分支,而是刺激肺泡的成熟分化,可能直接参与调节 I 型和 II 型细胞的分化,本实验观察到 EGFR 在两栖动物肺内的表达与在哺乳类小鼠肺中的表达基本一致。

Miettinen 等报道^[14],用 EGF 作用于正常肺组织,会使得肺泡上皮表面的某些相关活性蛋白(SP-C 和 TTF-1)表达增加。在妊娠的最后 3 个月内,外源性 EGF 可加快肺泡 II 型细胞结构功能的分化和成熟,表现在肺泡的表面相关活性蛋白 A(SP-A)明显增加及 II 型肺泡上皮细胞内嗜铁性板层小体增加^[18,19],亦表明 EGFR 在肺泡发育中对肺呼吸功能建立有重要调节作用。新生儿肺开始呼吸,肺泡处于相对高氧状态,EGF 可促进表面活性剂的合成,以保护胎肺不受高氧的影响^[20]。李贤^[7]等认为,新生鼠的支气管和肺泡上皮 EGFR 重新呈较强阳性,与

EGF 作用增强相吻合。本实验显示,幼蟾肺泡上皮细胞 EGFR 呈较强阳性表达,EGFR 的作用为促进肺泡进一步成熟,到成肺时 EGFR 呈阴性,表明肺泡上皮细胞趋于成熟。

参 考 文 献

[1] Ruocco S ,Lallemand A ,Tournier J M ,et al . Expression and localization of epidermal growth factor ,transforming growth factor- α ,and localization of their common receptor in fetal human lung development . *Pediatr Res* ,1996 ,**39**(3):448 ~ 455 .

[2] Strandjord T P , Clark J G , Guralnick D E , et al . Immunolocalization of transforming growth factor- α , epidermal growth factor(EGF) ,and EGF-receptor in normal and injured developing human lung . *Pediatr Res* ,1995 ,**38**(6)851 ~ 856 .

[3] Fujita Y ,Kurchi H ,Monrshige K ,et al . Decrease in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels in intrauterine growth-retarded and diabetes mellitus-complicated pregnancies . *J Clin Endocrinol Metab* ,1991 ,**72**(6):1 340 ~ 1 345 .

[4] 冉丕鑫 ,段生福 ,刘绍春 . 大白鼠肺内表皮生长因子免疫组织化学定位 . 同济医科大学学报 ,1994 ,**23**(1):76 ~ 77 .

[5] 曾庆富 ,颜亚晖 ,蒋海鹰等 . 细支气管肺泡细胞增生和细支气管肺泡细胞癌内生长因子和蛋白激酶 C 的表达 . 中国组织化学与细胞化学杂志 ,1998 ,**7**(1)82 ~ 85 .

[6] 李贤 ,黄中新 ,覃莉 . 胎肺发育分化中表皮生长因子受体的表达和作用 . 解剖学研究 ,2000 ,**22**(2):107 ~ 110 .

[7] 李贤 ,黄中新 ,夏潮涌等 . 胎肺发育中相关活性物质的表达及其调控意义 . 解剖学报 ,2003 ,**34**(2):187 ~ 191 .

[8] 熊轶 ,黄中新 ,覃莉等 . 胎儿肺 II 型肺泡细胞发育中相关活性物质的表达及其意义 . 解剖学报 ,2005 ,**36**(2):

190 ~ 195 .

[9] 葛瑞昌 ,冯伯森 ,仝允棚 . 花背蟾蜍(*Bufo raddei* Strauch) 的早期胚胎发育及分期 . 兰州大学(自然科学版) ,1982 ,**18**(4):125 ~ 136 .

[10] 赵振芳 . 花背蟾蜍胚胎发育的初步观察 . 动物学杂志 ,1991 ,**26**(2):10 ~ 16 .

[11] 俞诗源 ,李重阳 . 花背蟾蜍肺微血管的扫描电镜观察 . 兰州大学学报(自然科学版) ,1996 ,**32**(2):126 ~ 129 .

[12] 丁明文 ,兰恭赞 ,李海群 . 表皮生长因子的研究进展 . 畜牧兽医杂志 ,2001 ,**20**(5)20 ~ 23 .

[13] Strandjord P ,Clark J G ,Hodson W A ,et al . Expression of transforming growth factor- α in midgestation human fetal lung . *Am J Respir Cell Mol Biol* ,1993 ,**8**(3)266 ~ 272 .

[14] Mettinen P J ,Warburton D ,Bu D ,et al . Impaired lung branching morphogenesis in the absence of functional EGF receptor . *Dev Biol* ,1997 ,**186**(2)224 ~ 236 .

[15] 陈玲 . 表皮生长因子及其生物学效应 . 国外医学儿科学分册 ,1997 ,**24** :240 ~ 242 .

[16] 王凤英 ,何世荣 . EGF 与胚胎生长发育 . 国外医学妇产科学分册 ,2003 ,**30**(1)26 ~ 29 .

[17] Strum J M ,DeSanti A M ,McDowell E M . Patterns of cellular proliferation and airway branching in cultured fetal hamster lung explants . *Tissue Cell* ,1993 ,**25**(5)645 ~ 655 .

[18] Yasui S ,Nagai A ,Oohira A ,et al . Effects of anti-mouse EGF antiserum on prenatal lung development in fetal mice . *Pediatr Pulmonol* ,1993 ,**15**(4)251 ~ 256 .

[19] Plopper C G ,George J A ,Read L C ,et al . Acceleration of alveolar type II cell differentiation in fetal rhesus monkey lung by administration of EGF . *Am J Physiol* ,1992 ,**262**(3Pt1)313 ~ 321 .

[20] Price L T ,Chen Y ,Frank L . Epidermal growth factor increases antioxidant enzyme and surfactant system development during hyperoxia and protects fetal rat lungs *in vitro* from hyperoxic toxicity . *Pediatr Res* ,1993 ,**34**(5)577 ~ 585 .

图版说明

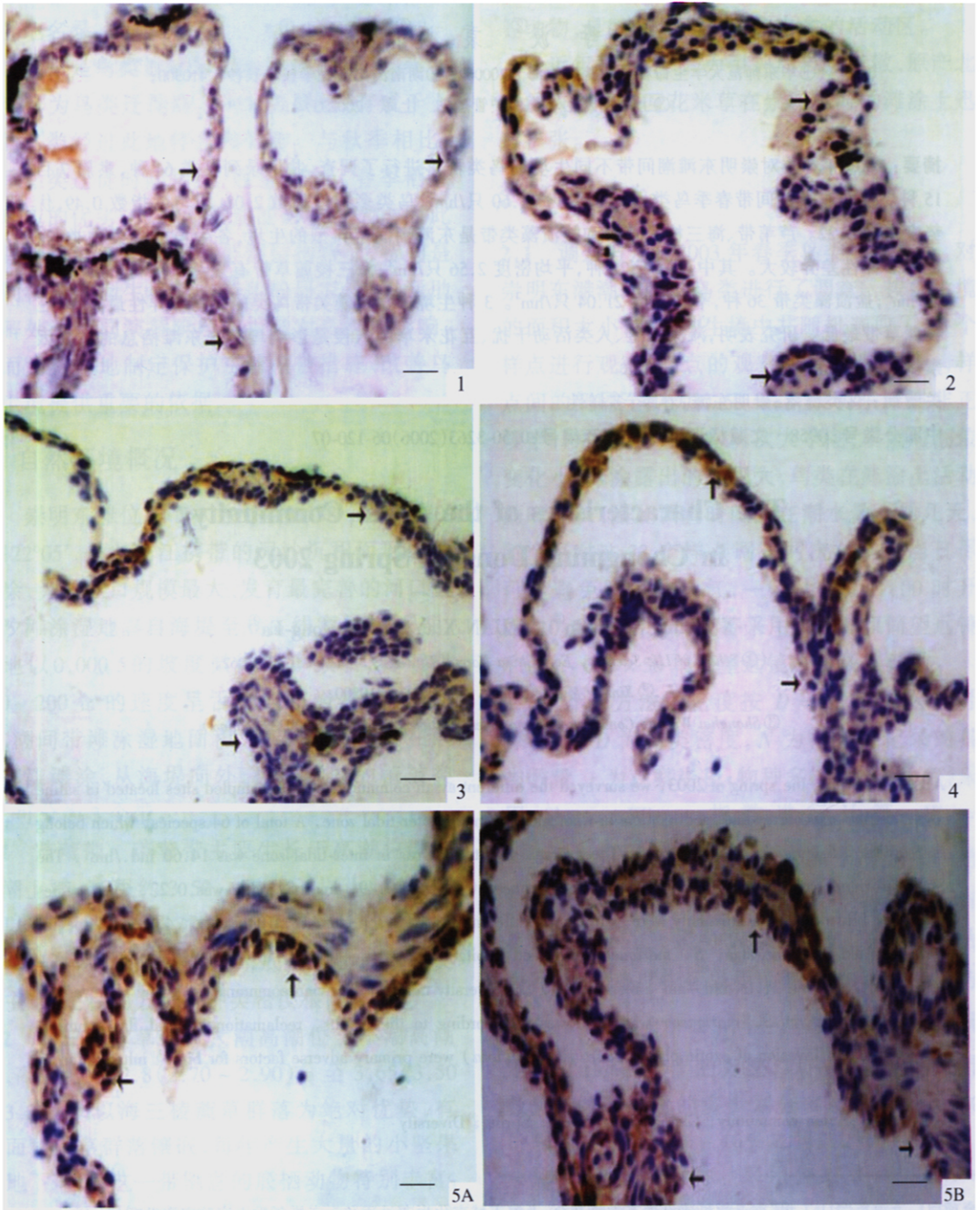
1. 36 期胎肺 ,EGFR 表达于肺网状隔膜上皮细胞 ,集中于细胞的游离面(\uparrow) ,标尺 8 μm ; 2. 37 期胎肺 ,肺网状隔膜处 EGFR 的阳性表达很明显 ,在肺泡囊处表达呈弱阳性(\uparrow) ,标尺 9 μm ; 3. 38 期胎肺 ,肺网状隔膜处 EGFR 的阳性表达变弱 ,在肺泡囊上皮细胞处其阳性反应表达增强(\uparrow) ,标尺 10 μm ; 4. 39 期胎肺 ,EGFR 在肺泡囊上皮细胞处阳性表达最活跃 ,在肺网状隔膜处几乎不表达(\uparrow) ,标尺 9 μm ; 5A. 幼蟾胎肺 ,EGFR 大量表达于肺泡上皮细胞处(\uparrow) ,标尺 9 μm ; 5B. 幼蟾胎肺 ,EGFR 阳性反应主要定位在肺泡上皮细胞处(\uparrow) ,标尺 10 μm .

Explanation of Plate

1. At stage 36 ,EGFR was mainly localized in epithelium of the reticular septa ,concentrating on the surface of the cell(\uparrow) ,bar = 8 μm ; 2. At stage 37 ,rich EGFR was mainly localized in epithelium of the reticular septa ,with a little in epithelium of alveolar sac(\uparrow) ,bar = 9 μm ; 3. At stage 38 ,the EGFR immunoreactivity was reduced in the epithelium of reticular septa ,but evident staining was observed in epithelium of alveolar sac(\uparrow) ,bar = 10 μm ; 4. At stage 39 ,EGFR was mainly localized in epithelium of alveolar sac ,while hardly observed in epithelium of the reticular septa(\uparrow) ,bar = 9 μm ; 5A. In young toad lung ,rich EGFR was mainly localized in alveoli epithelium(\uparrow) ,bar = 9 μm ; 5B. In young toad lung ,the EGFR immunoreactivity was mainly accumulated in alveoli epithelium(\uparrow) ,bar = 10 μm .

魏仲梅等:花背蟾蜍胎肺发育中表皮生长因子受体的表达和定位作用
WEI Zhong-Mei *et al.*: Expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)
in the Fetal Lungs of *Bufo raddei*

图版 I
Plate I



图版说明见文后