

人表皮细胞生长因子及其研究进展

赵 宏, 刘昱辉*

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘 要:表皮细胞生长因子是人体内一种重要自分泌/旁分泌的生长因子。人表皮细胞生长因子及其受体调控细胞增殖、分化、迁移、生存等与细胞命运密切相关的过程,在细胞发育、伤口愈合、器官发生中发挥重要作用。本文将对人表皮细胞生长因子的合成、分泌、生化特性、分子结构、家族、受体、信号通路、生物学活性、生理功能、应用及制备方法等方面进行综述。

关键词:人表皮细胞生长因子;信号通路;活性;制备

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2011.02.08

Human Epidermal Growth Factor and Reaserch Progress on it

ZHAO Hong, LIU Yu-hui*

Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract:Human epidermal growth factor (hEGF) is an important autocrine/paracrine factor in human body. hEGF and its receptor regulate key processes of cell biology, including proliferation, differentiation, migration and survival of cells. hEGF plays an important role in cell develepmnet, wound healing and organogenesis. This paper summarizes the hEGF synthesis, secretion, biochemical character, molecular structure, family, receptor, signal pathways, bioactivity, physiological function, applications, and the methods of production.

Key words:human epidermal growth factor (hEGF); signal pathways; activities; preparation

人表皮细胞生长因子(human epidermal growth factor, hEGF)是由 53 个氨基酸组成的小肽,能刺激细胞增殖、分化和迁移,在伤口愈合和器官发生中扮演着重要角色,随着生物技术的发展,在细胞信号传导中起着重要作用的细胞因子受到越来越多的关注,目前人表皮细胞生长因子已被广泛应用于医药和化妆品中。

1 人表皮细胞生长因子(hEGF)的特性

1.1 表皮细胞生长因子的发现

1962 年 Cohen 首次从成年小鼠颌下腺中分离获得一种小肽,发现它具有促进新生小鼠眼睑早开、牙齿早生长的作用,后来又研究发现其能直接刺激表皮的生长和角化,故将其命名为表皮生

长因子(epidermal growth factor, EGF)。1975 年 Gregory 首次从人尿中分离得到具有抑制胃酸分泌作用的物质,当时被称为胃抑素,后来发现胃抑素跟人表皮细胞生长因子是同一种物质^[1],之后人们又陆续分离获得猪、马、狗的表皮细胞生长因子。

1.2 hEGF 的编码基因、合成和分泌

hEGF 编码基因位于人 4 号染色体的 25 ~ 27 区,基因全长为 110 kb,其中包括 24 个外显子和 23 个内含子。成熟的 hEGF 基因是由外显子 20 和 21 编码的,分别编码 hEGF 基因的 N 端和 C 端结构域。在 hEGF 的合成过程中,首先合成前 hEGF 原,由 1 207 个氨基酸组成,其中前 22 个氨基酸为信号肽,剩余的组成了 hEGF 前体。hEGF 前体是一个跨膜的单链糖蛋白,分为胞外部分、跨

收稿日期:2011-01-24; 接受日期:2011-03-09

基金项目:国家 863 计划项目(2007AA100503)资助。

作者简介:赵 宏,硕士研究生,研究方向为植物基因工程。* 通讯作者:刘昱辉,副研究员,博士,主要从事植物生物反应器研究。Tel: 010-82106122; E-mail:liuyh@mail.caas.net.cn

膜区和胞内部分,其中胞外部分包括 9 个 LDL-receptor class B 重复、3 个 calcium-binding 区域和 6 个 EGF-like 区域。除此以外,还含有多对二硫键和 9 个 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 糖基化位点。如此复杂的结构,使它的作用不仅仅产生成熟的 EGF,而且研究发现人 hEGF 前体的胞内部分可负调控转基因小鼠的身体和器官的重量、甲状腺癌细胞的迁移和粘着,影响甲状腺癌细胞中微管的分布和转录后修饰,增加微管辅助蛋白 1 b 和微管辅助蛋白 2 的产量^[2]。EGF 前体和临近 EGF 受体的相互作用可以产生一些局部的生物学效应,比如细胞迁移、细胞生长和局部区域形态学的改变。

hEGF 广泛分布于人体内,如:血液、乳汁、唾液、尿液、胃液和十二指肠中,其中胃液和肠液中含量最高。在人体中,hEGF 通过旁分泌和自分泌的方式由血小板、唾液腺、胰腺、肾脏、十二指肠 Brunner 腺等合成和分泌^[3]。

1.3 hEGF 的理化性质、结构及 EGF 家族

hEGF 是由 53 个氨基酸组成的小肽,分子量为 6 045 Da,等电点 pI 为 4.6,对热稳定,耐受胰蛋白酶、糜蛋白酶和胃蛋白酶。hEGF 在 -20℃ 中能保持长期稳定;在中性 pH 条件下 100℃ 煮沸 30 min 仍保持稳定,但在 100℃ 0.1 mol/L NaOH 或 0.2 mol/L HCl 中失活^[4]。hEGF 含有 6 个半胱氨酸,形成 3 对分子内二硫键,使得整体构象在 6~20 位、14~31 位和 33~42 位氨基酸之间分别形成 A、B、C 三个环^[5,6],这三对二硫键结构使 hEGF 具有较高的稳定性,同时它们对 EGF 生物活性的发挥起着至关重要作用(如图 1)。对 hEGF 结构进一步研究发现^[5]:在 hEGF 的 N 端结构域中存在一个短的 α 螺旋(6~14 位氨基酸),一个双层的反向平行 β 折叠片(19~23 位,28~32 位氨基酸),两个 β 折叠片由一个 β 转角连接。在 hEGF 的 C 端结构域中包含一个双层的反向平行 β 折叠片(36~38 位,44~46 位氨基酸),通过一个不常见的左手 α 螺旋连接。另外,Burgess 等^[7]定点突变实验结果表明:Leu47 与 Tyr37 是高度保守的,Leu47 的取代将大大降低 EGF 的活性;Tyr37 则参与 β 片层间氢键的形成;对于形成 hEGF 表面疏水袋的 4 个芳香族氨基酸残基(10 位、13 位、22 位和 29 位),单个非保守性取代都将显著改变 hEGF 的活性。

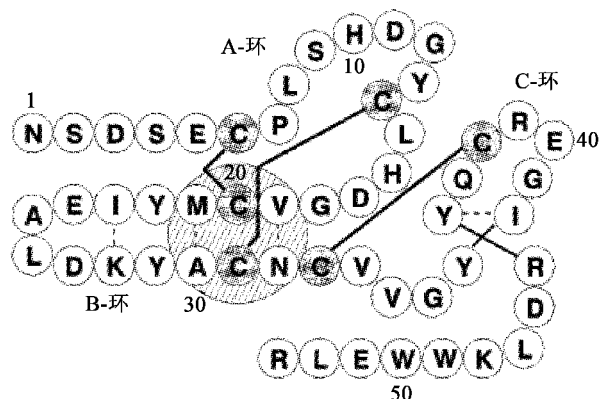


图1 表皮细胞生长因子结构

Fig.1 The structure of EGF.

自 1962 年 Cohen 发现表皮细胞生长因子起,到现在近 50 年中,人们相继发现了一些与 EGF 的保守结构类似的生长因子^[8]如:转化生长因子 α (TGF α)、肝素结合的表皮细胞样生长因子 (HBEGF)、双调蛋白 (AREG)、乙胞素 (BTC)、外调蛋白 (EREG)、表皮细胞分裂素同系物 (EPGN) 和神经调节蛋白 (NGRs) 等。它们的前体都是 I 型跨膜蛋白,包括 N 端前导肽、一个或多个与 EGF 相似的结构 (CX7 CX4-5 CX10-13 CXCX8 GXRC,与 EGFR/ErB 家族结合位点)、短的近膜机杆部分、疏水的跨膜结构域、胞内部分和由 6 个半胱氨酸组成的三对分子内二硫键。虽然家族内各成员中都含保守的 6 个半胱氨酸,但它们之间蛋白质序列的相似性不高,大约只有 25%。而且,在糖基化位点的分布、有无肝素结合和生物学功能上,EGF 家族各成员之间也各不相同。

1.4 hEGF 受体 (EGFR/ErBb-1)

EGF 是通过与其受体结合发挥作用的。其中,hEGF 受体是一个单次跨膜的糖蛋白,由 1 210 个氨基酸组成,分子量为 170 kDa,包含一条 130 kDa 的多肽链,其 N 端为寡聚糖^[9]。hEGF 受体有三部分组成:N 端的细胞膜外侧部分、单次跨膜的疏水 α 螺旋区和 C 端的细胞质部分。hEGF 受体的细胞质部分又分为近膜区、含有酪氨酸激酶 (TK) 结构域和 C 端区,其中酪氨酸残基可以自身磷酸化。hEGF 受体的细胞膜外侧部分氨基末端具有 EGF 结合位点,其中有两个相似的富含半胱氨酸的结构域,许多半胱氨酸以二硫键形式结合,该部分还含有大量的潜在的糖基化位点。

hEGF 受体属于保守的细胞表面受体酪氨酸

激酶 (RTKs) ErbB 家族成员, 该家族的其他成员为: HER2/c-neu (ErbB-2)、Her 3 (ErbB-3) 和 Her 4 (ErbB-4), 它们是原癌基因 *v-erbB* 的表达产物。EGF、TGF α 、AR、HB-EGF 和 BTC 是 EGFR/ErbB-1 的配体, NDF/HRG 是 ErbB-3 和 ErbB-4 的配体。

1.5 hEGF 的作用机理和信号通路

hEGF 与其受体结合后, 引起受体二聚化, 激活激酶, 引起自身酪氨酸磷酸化, 磷酸化的酪氨酸残基成为第二信使分子的结合位点, 从而激活一系列下游信号通路 (如图 2)^[10]。与激活的表皮细胞生长因子受体直接相结合的第二信使包括磷脂酶 C- γ (PLC γ)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、Ras-GTP 酶激活蛋白 (Ras-GAP)、生长因子受体结合蛋白 2 (Grb2)、信号转导和转录激活因子 (STAT)、Nck、接头蛋白 Shc 和含有磷酸化酪氨酸磷

酸酶 2 (SHP-2)^[11]。下面将逐一介绍各 hEGF 作用的通路:

1.5.1 磷脂酶 C- γ /蛋白激酶 C (PKC) 通路 当 EGF 与其受体结合后, 激活的 EGF 受体使磷脂酶 C- γ 中的酪氨酸残基磷酸化, 使磷脂酶 C- γ 激活。活化的磷脂酶 C- γ 水解磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP₂) 成二酰基甘油 (DAG) 和 1,4,5-三磷酸肌醇 (IP₃)。DAG 和 IP₃ 作为第二信使, 进一步激活 CaMK 和 PKC 途径。

1.5.2 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (PKB) 通路 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 可以特异性地催化磷脂酰肌醇 3-位羟基磷酸化, 产生具有第二信使作用的肌醇脂物质 (PI(3,4,5)P₃)。PKB 为反转录病毒 Akt-8 的癌基因 *v-akt* 的编码产物, 因此又称作 Akt。PI(3,4,5)P₃ 是 PKB 的激

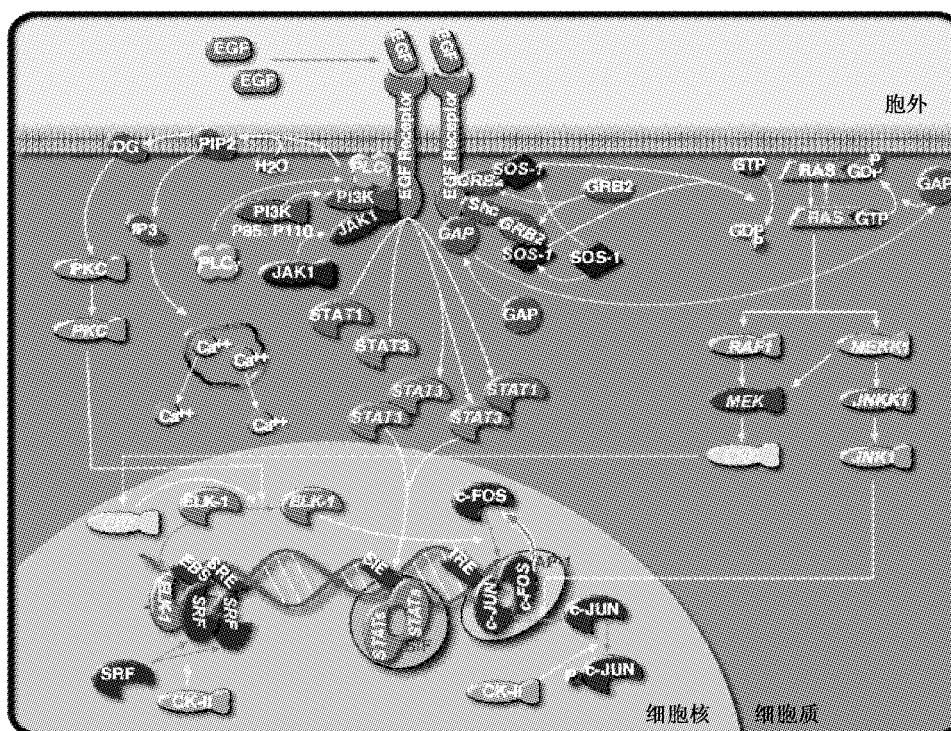


图 2 表皮细胞生长因子的信号通路^[10]

Fig. 2 Signal pathways of EGF^[10].

EGF: 表皮细胞生长因子; EGF receptor: 表皮细胞生长因子受体; PLC γ : 磷脂酶 C- γ ; PI3K: 磷脂酰肌醇 3-激酶; JAK1: Janus 酪氨酸激酶 1; GRB2: 生长因子受体结合蛋白 2; GAP: GTP 酶激活蛋白; Shc: 接头蛋白; PIP₂: 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸; DAG: 二酰基甘油; PKC: 蛋白激酶 C; IP₃: 1,4,5-三磷酸肌醇; PLC: 磷脂酶 C; STAT: 信号转导和转录激活因子; SOS-1: 鸟嘌呤核苷酸交换因子-1; RAS: 小分子量鸟苷酸结合因子; RAF: 丝氨酸苏氨酸蛋白激酶; MEK1: 丝裂原活化蛋白激酶激酶 1; MEK: 激酶 MAP; JNK1: CJUN 末端激酶激酶; JNK1: CJUN 末端激酶 1; cFOS: 转录因子; cJUN: 转录因子; TRE: TRE 序列; CK II: 酪蛋白激酶 II; SIE: v-sis 编码的一种 PDGF 前体物质, 引起类似信号转导; SRF: 血清反应因子; ELK1: 转录因子; ERK: 丝裂原活化蛋白激酶。

活剂。激活的表皮细胞生长因子受体通过与 p85 亚基 SH2 区相互作用,激活磷脂酰肌醇 3-激酶。活化的 PI3K 催化 PIP₂ 生成 PI(3,4,5)P₃;PI(3,4,5)P₃ 通过与 PKB 的 PH 结构域(血小板白细胞 C 激酶底物同源结构域)结合,使之从细胞质转移至细胞膜,引起 PKB 构象改变。同时,细胞质之中的 PI(3,4,5)P₃ 依赖的蛋白激酶(PDK1)还借助自身的 PH 结构域与 PI(3,4,5)P₃ 结合,导致构象已改变得 PKB 与 PDK1 相互靠近;在 PDK1 的催化下,PKB 激酶活性区的 Thr³⁰⁸ 磷酸化,然后在 PDK2 的帮助下,C 端尾部区的 Ser⁴⁷³ 也发生磷酸化,这样 PKB 被激活。激活的 PKB 通过激活或抑制下游靶蛋白,进而调节细胞的生长、生存、物质转运、迁移和凋亡等活动。

1.5.3 JAK-SATA 信号通路^[12] JAK 家族是一类非受体酪氨酸蛋白激酶。EGF 与其受体结合后引起受体的同源或异源二聚化,使得接头蛋白 JAK1 激酶相互接近并通过交互磷酸化被活化。JAK1 激活后催化 EGFR 上的酪氨酸残基发生磷酸化,磷酸化的 EGF 受体与含有 SH2 结构域的 STAT 蛋白结合。最后,激活的 JAK1 催化结合在受体上的 STAT 蛋白发生磷酸化,活化的 STAT 蛋白脱离 EGFR,以二聚体的形式进入细胞核内与靶基因结合,调控基因的转录。

1.5.4 受体酪氨酸激酶(RTK)-Ras-丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路 当 EGF 结合到其受体上后,引起相邻受体的二聚化,然后自身磷酸化激活,接头蛋白 Crb2 通过其 SH2 区结合到活化的受体上。接下来 Crb2 与鸟苷酸释放因子 SOS1 结合,形成复合体。在 SOS 核苷酸转移酶的作用下,Ras 脱落 GDP 的同时结合 GTP,随即 Ras 被活化。活化后的 Ras 磷酸化激活丝裂原活化蛋白激酶激酶 MAPKKK(Raf)的两个丝氨酸,使 Raf 激活。Raf 通过磷酸化激活丝裂原活化蛋白激酶激酶 MAPKK(MEK),MEK 通过磷酸化激活其下游靶蛋白丝裂原活化蛋白激酶 MAPK(ERK)。活化的 ERK 可以激活细胞质中的核糖体 S6 激酶(RSK),RSK 可以进一步激活 CREB,促进基因转录和蛋白合成。活化的 ERK 还可以磷酸化和激活核内转录因子 Elk-1,刺激转录因子 c-Fos 和 c-Jun,进而影响转录和细胞生长。

2 hEGF 的生物、生理活性及其应用

2.1 hEGF 的生物学活性

如上所述,EGF 与其受体结合后,可以激活多条细胞通路,发挥生物学功效:RTK-Ras-MAPK 信号通路可以促进蛋白质合成,促使细胞由 G₁ 进入 S 期;磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通路通过 Bcl-2 家族促进细胞生长,通过作用 Bad、Caspase9 前体阻断细胞凋亡,维持细胞生存,还参与膜泡转运、细胞迁移等生命活动;PKC 除促进细胞生长分化外,还参与神经发育、突触传递等生理过程;JAK-SATA 信号通路可以调控转录,且各个通路之间存在相互作用。

2.2 hEGF 的生理功能

2.2.1 hEGF 对肠、胃的生理功能 哺乳动物出生后,EGF 能促进胃肠粘膜的发育。在正常生理条件下,EGF 参与营养的摄取吸收、胃肠上皮细胞的增殖、分化及成熟;在病理条件下,EGF 保护上皮细胞,参与受损后粘膜的修复^[13,14]。此外,EGF 还可抑制胃酸的分泌。

2.2.2 hEGF 对神经的生理功能 EGF 及其受体在大脑中枢神经区域也有分布,作为强力的有丝分裂原,它同样能促进中枢神经系统中神经干/母细胞的增殖和分裂期神经细胞的增殖。在细胞体外培养中,EGF 能保持神经干/母细胞处于增殖状态,但在正常的啮齿动物大脑中,它只能促进侧脑室室下区(SVZ)的神经干/母细胞的增殖相迁移。对受损的成熟纹状体 EGF 可以增加神经细胞的替换。有研究表明,EGF 能促进受伤大脑的侧脑室室下区和海马齿状回颗粒下区中神经细胞的增殖,阻止受损的海马体神经细胞的丢失,但不能维持新生细胞的长期存活。另外,Garcez 等^[15,16]首次发现 EGF 可以诱导神经嵴母细胞分化成神经元细胞和黑色素细胞,参与外周神经系统的发育。

2.2.3 hEGF 对肾的生理功能 在人体肾组织中,EGF 分布在近端小管、亨利氏环升支粗段和远曲小管中,在肾小管的顶部和基底也有分布。EGF 受体分布在远曲小管和收集管的基底膜上。EGF 参与胚胎期肾发生过程;在正常肾组织中,

调节肾小球血流动力学。在收集管部分,EGF 参与调控钠离子通道。EGF 受体在肾组织中,参与镁离子平衡的调控^[17,18]。

2.2.4 hEGF 对骨骼的生理功能 研究发现,在无血清培养基中添加 EGF 可以使间叶干细胞增殖形成成纤维细胞^[19];Tamama 等^[20] 研究发现 EGF 能刺激人骨髓间叶干细胞的增殖和改变,但不能改变其分化成脂肪细胞系和成骨细胞系的潜力;EGF 还可以通过降低 IGF-1 浓度和 IGF-1 结合蛋白水平间接引起生长迟缓。体外实验表明 EGF 负调控间叶细胞成为软骨细胞,EGF 可以直接调节生长面软骨细胞的增殖和成熟;EGF 及其受体还能刺激成骨细胞增殖,EGF 还可以分解骨骼,参与骨骼重塑^[21,22]。

2.2.5 hEGF 的其他生理功能 除上述功能外,EGF 还参与雌性体内黄体生成素(LH)刺激卵巢的过程,与雌性生殖有关。EGF 还参与其他组织器官中皮肤与毛囊的增殖、分化、迁移等。

2.3 hEGF 在医药临床和化妆品中的应用

hEGF 临床上具有广泛的应用,例如在促进外科手术后伤口的愈合、反复鼻中隔糜烂黏膜的愈合、烧伤创面的愈合、进眼角膜创伤的愈合中发挥着重要的作用;在胃肠道溃疡、糖尿病引起的体表溃疡^[23] 的治疗中也具有重要作用;通过与天花粉蛋白(TCS)、单核-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)融合表达,hEGF 具有治疗肿瘤的功能。

由于 EGF 是一种强力的有丝分裂原,能刺激表皮细胞的增殖,分化和迁移,可以调节人体皮肤的新陈代谢,20 世纪 80 年代末,EGF 被首次用于皮肤养护,随后广泛用于护肤化妆品。

3 hEGF 的制备

3.1 人源性 EGF 的提取

最初的 hEGF 是利用亲和离子交换层析从人的尿液中提取出来的,1 000 L 原尿能得到不足 2 mg 的 EGF,且包括氨基酸组成不完整的 EGF。此外,还从唾液、母乳、泪液和血浆中提取过 hEGF,产量都很低,因此,目前已不再使用这种方法了。

3.2 化学合成法

就像早期很多小肽一样,hEGF 同样利用化学合成法生产过^[24],但由于其自身复杂的结构,化学合成法生产的 hEGF 的活性和产量无法满足大规模应用的需求。

3.3 基因工程表达

随着基因工程技术的发展,人们更多希望借助基因工程手段获得具有高生物学活性的 EGF 供临床和化妆品的使用。

3.3.1 EGF 的原核表达 1982 年 Smith 等^[25] 首次在大肠杆菌(*Escherichia. coli*)中表达 hEGF 融合蛋白,但最终并未成功,可篋是在细胞质中被降解了。1990 年,美国孟山都公司和康奈尔大学应用 tac 启动子和 ompA 信号肽在 *E. coli* 中表达了 hEGF^[26]。1992 年,中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所甘人宝等^[27] 利用 *E. coli* 的碱性磷酸酶启动子、信号肽序列及该酶缺失的 *E. coli* 变异菌株 YK539 成功表达了分泌型 hEGF,表达量为 1.5 mg/L。2006 年 Liu 等^[28] 把 hEGF 融合到来源于耶尔森氏鼠疫杆菌的 CafI 信号肽上,产物分泌到周质和培养基中。2008 年 Roman 等^[29] 利用 Ssp dnaB mini-intein 系统表达 hEGF;2009 年韩国人把致病性鳃弧菌金属蛋白酶的胶原(明胶)结合域 CBD 融合到 hEGF 的 C 端,表达了有上皮细胞增殖活性的 hEGF-CBD 蛋白^[30]。

另外,应用其他原核菌株也成功表达了 hEGF。Yamagata 等^[31] 于 1989 年利用短芽孢杆菌 *Bacillus brevis* 47 分泌表达了 hEGF,表达量为 0.24 g 活性 hEGF/L 培养基;1996 年 Ebisu 等^[32] 利用短芽孢杆菌 *Bacillus brevis* HPD31 表达 hEGF,表达量为 30 g 活性 hEGF/L 脆外培养基。

3.3.2 EGF 的酵母表达 1983 年 Urdea 等^[33] 在年酿酒酵母中表达了有活性的 hEGF;1984 年 Brake 等^[34] 将 hEGF 融合到 α -因子前导肽上,成功实现分泌表达;1989 年 Coppella 和 Dhurjati^[35], 1991 年 Clements 等^[36] 也分别在酿酒酵母中进行了 hEGF 的表达;国内,1989 年黄秉仁等^[37] 在酿酒酵母中进行了表达;1991 年,复旦大学袁汉英等^[38] 用酿酒酵母分泌表达了有活性的 hEGF,产量在 0.4~1.0 mg/L 培养基上清液。

1991 年 Clare 等^[39] 首次用毕赤酵母表达了

hEGF;1998年黄秉仁^[40]转化甲基营养型酵母株 GS115 后,筛选出 Mut^s 基因型菌株。高密度培养及诱导表达后该株可分泌具完好生物活性和正确物理化学性质的 hEGF,产量达 100 mg/L,提纯纯度可达 95%;2009 年 Baradaran 等^[41]将构建好的酵母表达载体 pPIC9K-hEGF 转化毕赤酵母 KM71 获得了表达;此外,1998 年 Hamsa 等^[42]利用耶罗维亚酵母(*Yarrowia lipolytica*) BC-93 表达了有活性的 hEGF。2002 年 Heo 等^[43]将 hEGF 和来源于酿酒酵母的 α -因子前导肽序列融合,在多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*) UR2 中成功表达了有活性的 hEGF,表达量为 3.5 mg/L,纯化后的回收率为 23%,即 0.8 mg/35 mg。

3.3.3 EGF 的植物表达 1993 年,Higo 等^[44]首次在西红柿叶片中表达了 hEGF,约 60 pg/mg 可溶蛋白;1996 年,Salmanian 等^[45]在马铃薯块茎中表达了 hEGF,产量可达 120 pg/mg 可溶蛋白;2002 年,戴激等^[45]将人工合成的 hEGF 基因连接到质粒 pRL-489 上,用三亲接合转移法导入海水单细胞藻聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC7002 和淡水丝状藻鱼腥藻 *Anabaena* sp. PCC7120 中进行表达,表达效率为 0.5 μ g/mg 可溶性蛋白和 1.4 μ g/mg 可溶性蛋白,其中聚球藻 PCC7002 中是分泌表达;2007 年,智庆文等^[47]构建了 hEGF 基因的表达载体 p-2300-2A11-hEGF,通过电激法转化到农杆菌菌株 C58 中,采用叶盘法转化番茄品系 cg2002-1 中,放射免疫法测得重组 hEGF(rhEGF)在鲜重果实中平均含量为 3.85 ± 0.86 ng/g;2007 年,Bai 等^[48]在烟草中表达了 hEGF,产量为可溶性总蛋白的 0.3%。

3.3.4 EGF 的其他表达系统 2002 年,浙江大学的赵玲秀^[49]利用家蚕杆状病毒表达系统,以家蚕作为生物反应器,在家蚕细胞和幼虫中表达人表皮生长因子,细胞中粗略估计表达量约 $6 \sim 7 \mu$ g/ 2×10^6 个细胞(相当于 EGF 标准品),家蚕血淋巴中的蚕血淋巴的表达量约 32 μ g/mL。

4 结语

EGF 自其发现之日起,就引起了广泛的关注。从最初的生物化学性质的研究,一直到现在

的工业化生产方法的探索,在正常细胞和肿瘤细胞中信号转导机制研究,以及在伤口愈合、器官发生、肿瘤治疗中的作用,EGF 显示出复杂的功能与广泛的应用前景。虽然经过半个世纪多的研究,人类对 EGF 有了比较清楚的认识,但仍有很长的研究之路要走。近年来,在对 EGF 自身活性、前体的功效和作用机制及自身突变体功效等方面引起了研究人员的持续关注。在生产应用方面,人们正在积极寻求操作简单、成本低廉、高产量、高活性的适合工业化生产的方法;在信号转导方面,由 EGF 与其受体、其他激素及其他细胞因子交互作用构成的信号网络还有很多是未知的,需要进一步探索,比如,除了前面所述的通路外又新发现了磷脂酶 D 介导的通路。hEGF 在伤口愈合、器官发生以及肿瘤治疗方面具有重要作用,其生理病理作用及新型抗癌药物^[50]的开发也有待于进一步研究。相信随着对表皮细胞生长因子的深入研究,EGF 将会给我们带来更大的惊喜。

参 考 文 献

- [1] Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor[J]. *Nature*, 1975, 257(5524):325-327.
- [2] Klonisch T, Glogowska A, Gratao A A, et al. The C-terminal cytoplasmic domain of human proEGF is a negative modulator of body and organ weights in transgenic mice[J]. *FEBS Lett.*, 2009, 583(8):1349-1357.
- [3] Clark J A, Lane R H, MacLennan N K, et al. Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis[J]. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 2005, 288(4):G755-762.
- [4] Fanger B O, Stephens J E, & Staros J V. High-yield trapping of EGF-induced receptor dimers by chemical cross-linking[J]. *FASEB J.*, 1989, 3(1):71-75.
- [5] Watts C R, Lovas S, Murphy R F. Molecular dynamics simulations of epidermal growth factor and transforming growth factor- α structures in water[J]. *Proteins*, 1998, 33(3):396-407.
- [6] Savage C R, Jr., Hash J H, Cohen S. Epidermal growth factor. Location of disulfide bonds[J]. *J. Biol. Chem.*, 1973, 248(22):7669-7672.
- [7] Groenen L C, Nice E C, Burgess A W. Structure-function relationships for the EGF/TGF- α family of mitogens[J]. *Growth Factors*, 1994, 11(4):235-257.
- [8] Harris R C, Chung E, Coffey R J. EGF receptor ligands[J]. *Exp. Cell Res.*, 2003, 284(1):2-13.
- [9] Wong R W, Guillaud L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS[J]. *Cytokine Growth*

- Factor Rev. , 2004,15(2-3):147-156.
- [10] BioCtuta. EGF Signal Pathway[EB/OL]. http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/h_egfPathway.
- [11] Jorissen R N, Walker F, Pouliot N, *et al.* . Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling[J]. Exp. Cell Res. , 2003,284(1):31-53.
- [12] Li W X. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling[J]. Trends Cell Biol. , 2008,18(11):545-551.
- [13] Dvorak B. Milk epidermal growth factor and gut protection[J]. J. Pediatr. , 156(Suppl. 2):S31-35.
- [14] Znalesniak E B, Hoffmann W. Modulation of cell-cell contacts during intestinal restitution *in vitro* and effects of epidermal growth factor (EGF) [J]. Cell Physiol. Biochem. , 25(4-5):533-542.
- [15] Garcez R C, Teixeira B L, Schmitt Sdos S, *et al.* . Epidermal growth factor (EGF) promotes the *in vitro* differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes[J]. Cell Mol. Neurobiol. , 2009,29(8):1087-1091.
- [16] Sun D, Bullock R, Altememi N, *et al.* . The effect of epidermal growth factor in the injured brain following trauma in rats [J]. J. Neurotrauma,2010,27(5):923-928.
- [17] Zeng F, Singh A B, Harris R C. The role of the EGF family of ligands and receptors in renal development, physiology and pathophysiology[J]. Exp. Cell Res. , 2009,315(4):602-610.
- [18] Melenhorst W B, Mulder G M, Xi Q, *et al.* . Epidermal growth factor receptor signaling in the kidney: key roles in physiology and disease[J]. Hypertension, 2008,52(6):987-993.
- [19] Gronthos S, Simmons P J. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions *in vitro* [J]. Blood, 1995,85:929-940.
- [20] Tamama K, Fan V H, Griffith L G, *et al.* . Epidermal growth factor as a candidate for *ex vivo* expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells,2006,24:686-695.
- [21] Xian C J. Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth[J]. Endocr. Rev. , 2007,28(3):284-296.
- [22] Lu X, Kang Y. Epidermal growth factor signalling and bone metastasis[J]. Br. J. Cancer, 102(3):457-461.
- [23] Hong J P, Jung H D, Kim Y W. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers[J]. Ann. Plast. Surg. , 2006,56(4):394-400.
- [24] Batchikova N V, Skaptsova N V, Tvardovskaia S E, *et al.* . Chemical synthesis and cloning of the human epidermal growth factor gene[J]. Bioorg. Khim. , 1988,14(5):621-630.
- [25] Smith J, Cook E, Fotheringham I, *et al.* . Chemical synthesis and cloning of a gene for human betaurogastrone[J]. Nucl. Acids Res. , 1982,10:4467-4482.
- [26] Chalmers J J, Kim E, Telford J N, *et al.* . Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor [J]. Appl. Environ. Microbiol. , 1990,56(1):104-111.
- [27] 甘人宝,黄慕宇,姚 军,等. 人表皮生长因子在大肠杆菌中高效表达和分泌[J]. 生物化学与生物物理学报,1992,24:587-589.
- [28] Liu Y L, Huang L M, Lin W P, *et al.* . Secretion of biologically active human epidermal growth factor from *Escherichia coli* using *Yersinia pestis* CsfI signal peptide[J]. J. Microbiol. Immunol. Infect. , 2006,39(5):366-371.
- [29] Esipov R S, Stepanenko V N, Chupova L A, *et al.* . Production of recombinant human epidermal growth factor using Ssp dnaB mini-intein system[J]. Protein Expr. Purif. , 2008,61(1):1-6.
- [30] Kim D G, Min M K, Ahn S C, *et al.* . Expression of a fusion protein containing human epidermal growth factor and the collagen-binding domain of *Vibrio mimicus* metalloprotease[J]. Biotechnol. Lett. , 2009,31(2):259-264.
- [31] Yamagata H, Nakahama K, Suzuki Y, *et al.* . Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989,86(10):3589-3593.
- [32] Ebisu S, Takagi H, Kadowaki K, *et al.* . The efficient production of human epidermal growth factor by *Bacillus brevis* [J]. Ann. NY Acad. Sci. USA, 1996,782:115-122.
- [33] Urdea M S, Merryweather J P, Mullenbach G T, *et al.* . Chemical synthesis of a gene for human epidermal growth factor urogastrone and its expression in yeast[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983,80(24):7461-7465.
- [34] Brake A J, Merryweather J P, Coit D G, *et al.* . α -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1984,81(15):4642-4646.
- [35] Coppella S J, Dhurjati P. α -Factor directed expression of the human epidermal growth factor in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnol. Bioengin. , 1989,33(8):976-983.
- [36] Clements J M, Catlin G H, Price P J, *et al.* . Secretion of human epidermal growth factor from *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic leader sequences[J]. Gene, 1991,106(2):267-271.
- [37] 黄秉仁,蔡良琬,张 岱. 人表皮生长因子在酵母系统的表达[J]. 中国医学科学院学报,1989,11:331-336.
- [38] 袁汉英,阎永洁,石 松,等. 人表皮生长因子基因的化学合成和克隆及其在酵母中的表达[J]. 生物工程学报,1991,7(4):300-306.
- [39] Clare J J, Romanes M A, Rayment F B, *et al.* . Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies [J]. Gene, 1991,105(2):205-212.
- [40] 黄秉仁,蔡良琬,廖洪涛,等. 人工合成表皮生长因子基因在甲基营养型酵母中的高效表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报,1998,14(5):512-517.
- [41] Baradaran B, Hosseini A Z, Majidi J, *et al.* . Development and characterization of monoclonal antibodies against human

- epidermal growth factor receptor in Balb/c mice [J]. Hum. Antibodies, 2009, 18(1-2): 11-16.
- [42] Hamsa P V, Kachroo P, Chattoo B B. Production and secretion of biologically active human epidermal growth factor in *Yarrowia lipolytica* [J]. Curr. Genet., 1998, 33(3): 231-237.
- [43] Heo J H, Won H S, Kang H A, *et al.*. Purification of recombinant human epidermal growth factor secreted from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* [J]. Protein Expr. Purif., 2002, 24(1): 117-122.
- [44] Higo K, Saito Y, Higo H. Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic tobacco [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1993, 57(9): 1477-1481.
- [45] Salmanian A H, Gushchin A, Medvedeva T, *et al.*. Synthesis and expression of the gene for human epidermal growth factor in transgenic potato plants [J]. Biotechnol. Lett., 1996, 18(9): 1095-1098.
- [46] 载 激, 施定基, 张 卉, 等. 人表皮生长因子(hEGF)基因在蓝藻中的表达[J]. 植物学报, 2001, 43(12): 1260-1264.
- [47] 智庆文. 人表皮生长因子在转基因番茄中成功表达[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(5): 692-695.
- [48] Bai J Y, Zeng L, Hu Y L, *et al.*. Expression and characteristic of synthetic human epidermal growth factor (hEGF) in transgenic tobacco plants [J]. Biotechnol. Lett., 2007, 29(12): 2007-2012.
- [49] 赵秀玲. 多角体-人表皮生长因子融合蛋白基因(Ph-EGF)在家蚕细胞和幼虫中表达的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- [50] Tseng C L, Wang T W, Dong G C, *et al.*. Development of gelatin nanoparticles with biotinylated EGF conjugation for lung cancer targeting [J]. Biomaterials, 2007, 28(27): 3996-4005.