

# 豬上皮細胞生長因子之基因選殖、表現與 生物活性

郭村勇 吳忠晉 李德南 吳輔祐\*

國立宜蘭大學動物科技學系

## 摘 要

上皮細胞生長因子(EGF)是人乳中的主要生長因子，有助幼小動物建立胃腸黏膜細胞屏障，也許可用於改善仔豬離乳下痢問題，有很大的經濟潛力。本實驗抽取豬顎下唾腺 mRNA，以 RT-PCR 增幅得預期 180 bp 大小的基因片段，經基因定序確定與已發表的 pEGF 基因完全相同。此基因與 pET24a 質體重組後轉型至 BL-21 大腸桿菌，以 IPTG 誘導表現，經分離、溶解、透析可得相當產值之復性 pEGF 蛋白質。經測試其影響細胞生長狀況，證實有促進細胞生長的活性。

**關鍵詞：**豬上皮細胞生長因子、基因選殖、表現、生物活性

## Gene Cloning, Expression, and Bioactivity of Porcine Epidermal Growth Factor

Tsun-Yung Kuo Jhong-Jin Wu Der-Nan Lee Fu-Yu Wu\*

Department of Animal Science, National Ilan University

## Abstract

Epidermal growth factor (EGF) is the major growth factor in human milk. EGF may help to establish the gastrointestinal mucous barrier, which may improve the weaning pig diarrhea problem, thus possess economic profits. Pig submaxillary gland was collected for mRNA extraction. RT-PCR was conducted to amplify the expected pEGF gene with the result of an 180bp fragment. Subsequent gene sequencing showed the fragment is identical to the published pEGF gene. The cloned gene was

inserted into pET24a plasmid and was transformed into BL-21 *E. coli*. Induction of gene expression by IPTG resulted in the production of EGF accumulated in inclusion body. Isolation, dispersion, and dialysis of the inclusion body produced abundant pEGF protein. With cell culture assay, the pEGF protein was demonstrated to have growth factor activity.

**Key words:** pEGF, gene cloning, expression, bioactivity

\*Corresponding author E-mail: fuywu@niu.edu.tw

## 前言

人類與小鼠的上皮細胞生長因子 (Epidermal growth factor, EGF)是由 53 個胺基酸構成，分子量約 6 KDa 的胜肽，對酸及胰蛋白酶安定(Carpenter and Wahl, 1991)。EGF 含有保留序列的 EGF unit : CX<sub>7</sub>CX<sub>4~5</sub>CX<sub>10~13</sub>CXCX<sub>8</sub>C，由 6 個半胱胺酸構成 3 對雙硫鍵。含有 EGF unit 的分子已發現將近 30 種，統稱為 EGF family (Carpenter and Wahl, 1991)，包括 EGF、TGF- $\alpha$  (Herrington et al., 1997)、Cripto-1 (Wechselberger et al., 2001)、amphiregulin (Forsyth et al., 1997)、heregulin (Normanno et al., 1995)、betacellulin (Dunbar et al., 1999)等。小鼠 EGF 的 mRNA 有 4,750 base，轉譯成 1,217 個胺基酸的 prepro-EGF，含有 1 個 EGF unit 和 7 個 EGF-like unit，分子有糖化。經酵素分切成 53 個胺基酸，其中含 1 個 EGF unit 的成熟 EGF (Scott et al., 1983; Gray et al., 1983)。Pascall et al.(1991)選殖出豬 EGF(pEGF)基因，發現與人 EGF 的基因或胺基酸序列都有 85%相同。

EGF 是人乳與許多動物乳中的主要生長因子 (Carpenter, 1980)。能促進初生動物胃腸黏膜細胞快速增生(Puccio and Lehy, 1988)，以建立消化道屏障，防止病菌或未消化的大分子進入動物體，造成發炎或過敏反應(Helm and Burks, 2000)。仔豬飼養爲了經濟利益大都提早離乳，由液態的乳汁更換爲固態的飼料時，增加纖維及顆粒對胃腸黏膜細胞的磨損，常會造成下痢。如果黏膜層損害過度，纖維母細胞增生而纖維化，造成局部無法吸收營養，更會影響往後飼養的成長及飼料換肉率。離乳飼料中如能補充 EGF，有助胃腸黏膜細胞的增生修復，減少仔豬下痢的損害(Donovan et al., 1994; Zijlstra et al., 1994)。

EGF 尚有廣泛的應用價值，如燒燙傷的治療、皮膚保養品、防治胃潰瘍(Konturek et al., 1991; Okita et al., 1991)等。因此以原核生物系統大量表現 EGF 重組蛋白，並分離、復性或有生物活性的分子，將有很大的經濟潛力。

## 材料與方法

### 一、pEGF mRNA 的萃取

核酸的萃取是以 Invitrogen mRNA purification kit 進行之。將豬隻新鮮採下的顎下唾腺組織快速冷凍，以全新的刀片切下樣品，依說明書步驟進行核酸萃取。所得 total RNA 以 oligo dT resin 分離 mRNA，70% 冰乙醇清洗後溶於 DEPC 處理過的水中備用。

### 二、RT-PCR 增幅 pEGF 基因

將純化好的 mRNA 以 RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction) 法增幅 EGF 基因。EGF 引子根據已發表的 pEGF 序列(Accession Number : X59516)設計，Forward 的引子在 EGF 基因前插入一段 *EcoR* I 的酵素切位成：5' CGGAATTCATGAATAGTTAC TCTGAATGCC；Reverse 的引子在 EGF 基因後插入一段 *Xho* I 的酵素切位成：5' CCGCTCGAGGCGCAGCTCCCACC ATT。mRNA 樣品先於 42°C、40min 進行反轉錄反應，合成第一條 cDNA。再加入引子進行 PCR 反應：樣品升溫至 95°C 維持 3min 以分離雙股 cDNA，再進行 94°C 1min、57°C 2min、72°C 2min 30 次循環增幅，最後進行 72°C 7min。反應後樣品降溫至 4°C 備用。反應產物以 3% 洋菜膠(agarose gel)進行電泳，溴乙錠(Ethidium Bromide)染色後於紫外光下觀

察螢光。

### 三、pEGF 基因的選殖

RT-PCR 產物經洋菜膠電泳分析後，預期片段以 Qiagen PCR purification kit 進行純化。所得基因與 pET24a 載體分別以 *EcoR* I、*Xho* I 酵素於 37°C、2hr 進行切割。反應後樣品再次以 Qiagen PCR purification kit 進行純化，以除去反應後的小片段。取經切割並純化的 PCR 產物及 pET24a 載體，加入 T4 ligase 及 ligase buffer 於 14°C、16hr 進行 DNA 連結。

轉型作用 (transformation) 之勝任細胞 (competent cell) 製備，以過夜培養之 Top 10 大腸桿菌，接種入新鮮 LB 培養液 (1% Tryptone, 1% NaCl, 0.5% Yeast extract, pH7.0)，於 37°C 震盪培養 3hr，以 2,000 xg、10min 離心取沈澱菌液，以冰冷的 0.1M CaCl<sub>2</sub> 處理 30 min 備用。取勝任細胞與重組質體混合，置於冰水槽中 30 min，放入 42°C 水浴槽中 90 sec，之後迅速放入 0°C 之冰水中。加入 LB 培養液於 37°C 培養 1hr 後，塗抹菌液至含有 25 μg/ml kanamycin、1.5% Bacto-agar 的 LB 洋菜培養基，於 37°C 培養過夜後挑選菌落。

將挑出的菌落接種至含 kanamycin 的 LB 培養液中培養過夜，以 Qiagen Spin Miniprep kit 萃取質體，加 *EcoR* I 與 *Xho* I 於 37°C、3hr 進行雙切割。樣品以 3% 洋菜膠電泳，溴乙錠染色後於紫外光下觀察，以確認 EGF 基因是否嵌入質體。

### 四、選殖基因的定序

核酸定序乃根據 Sanger 氏雙去氧鏈終止反應 (Sanger's dideoxynucleotide termination chain reaction) 的原理，採用 SequiTherm Long-Read 套組 (EpiCentre Technologies)，使用 DNA 螢光自動定序儀 (Mode 4000L, LI-COR) 進行定序。所得序列以 DNAsis 和 DNASTar 軟體進行分析。

### 五、pEGF 基因的表現

挑取單一嵌有 pEGF 基因片段的重组菌落，將之培養於含 25 μg/ml kanamycin 的 LB 培養液中，於 37°C 培養 16hr。然後再加 100 倍體積之培養液，於

37°C 震盪培養至菌液濃度達 OD<sub>600</sub> 0.6 左右時，加入最終濃度為 1mM 的 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)，分別於 0、2、4、6hr 收集 0.5 ml 菌液，離心去除上清液後，加入含 5% 2-mercaptoethanol 與 2% SDS 的 sample buffer，煮沸 10min，以 5% 聚膠/15% 分離膠之 SDS-PAGE 分析，凝膠以 coomassie blue 染色。

### 六、包涵體重組蛋白之分離、溶解、與透析

基因轉殖細菌於 LB 培養液中繁殖，加入 IPTG 誘導適當時間後，分離、清洗細菌。加入 Lysozyme 溶液分解細胞壁，並以超音波震碎菌體至溶液不再黏稠。離心 10,000 xg、10min 收集沈澱，以清洗液 (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7.5) 清洗沈澱至呈白色，是為包涵體。將之溶解於 0.3% N-lauroylsarcosine, 50 mM CAPS, pH 11.0 溶液中，使蛋白質濃度為 20 mg/ml。室溫放置 15min 後，離心 10,000 xg、10min 收集上清液，於 20 mM Tris-HCl, 0.1 mM DTT (dithiothreitol), pH 8.5、4°C 中透析 3hr，更換相同透析液後透析過夜，隔天更換不含 DTT 的透析液。

### 七、西方墨漬法 (Western blot)

SDS-PAGE 電泳分離之凝膠浸泡於含 20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, pH 8.3 的轉漬液中，以半乾式轉印器將凝膠中蛋白質轉印至尼龍膜。轉印後之尼龍膜以 5% BSA 阻擋非特異性反應，anti-His tag 與 anti-IgG-Alkaline Phosphatase conjugated 抗體偵測，以 NBT 及 BCIP 呈色。每道反應間以 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.3% Tween 20, pH 8.0 清洗 3 次。

### 八、細胞活性偵測

依吳與 Elsasser (1995) 方法略做修改。簡言之，MME (mouse mammary epithelial) 細胞以 DME/F-12、抗生素/抗黴素、BSA、運鐵素、及 1% 胎牛血清 (FBS) 培養液稀釋，於 48 孔培養盤加入 20,000 細胞/cm<sup>2</sup> 培養。細胞長滿後更換為無 FBS 的培養液使細胞進入休止生長，再加入樣品，每一樣品皆採三重複以上。18hr 後加入 0.5 μCi

<sup>3</sup>H-Thymidine, 3hr 後以冰冷之醋酸: 甲醇(1:3)固定 1hr, 5% 三氯醋酸洗一次, 以除去未用於合成 DNA 之 <sup>3</sup>H-Thymidine。再以 0.5M NaOH, 0.2% Triton X-100 將細胞游離, 並轉至小型測放射線試管, 加醋酸中和後加液態閃爍液混合, 以 Packard Tri-Carb 液態閃爍計數儀(Meriden, CT, USA)測 CPM 值(count per minute)。每批細胞培養皆以不同濃度之 hEGF 做標準曲線, 將 CPM 值換算成 hEGF 相當值。

## 結果與討論

### 一、pEGF 基因的選殖

生長因子在正常細胞內的表現大都很微量。Rall et al(1985) 報導 EGF mRNA 在小鼠各種組織中的含量, 最多的是母鼠的顎下唾腺, 只佔 poly A RNA 的 0.2%。公鼠顎下唾腺佔 0.02%, 肺、胰、腦、肝則佔 20 PPM 或以下。mRNA 中只佔微量比例的 gene 要以 RT-PCR 增幅就相對較困難。我們採 EGF mRNA 最多的豬顎下唾腺抽 RNA, 初步以 total RNA 進行 RT-PCR, 都無法順利增幅出預期的產物。後來分離出 mRNA 做 RT-PCR, 才得以增幅出一段約 180 bps 的片段(如圖 1) 與預期 EGF 基因 159 bps 再加兩端的酵素切位大小約略相同。由於分子量小, 必須以 3% 洋菜膠進行電泳分析, 同時採用小分子量的 DNA marker。

PCR 增幅的 180bps 片段和 pET24a 質體分別以 *EcoR* I、*Xho* I 兩種限制酶切割。經純化、過夜連接後轉殖入 Top10 大腸桿菌培養。挑選繁殖的菌落進行培養過夜, 抽出其質體再以 *EcoR* I、*Xho* I 兩個酵素切割。洋菜膠電泳結果可見除了質體片段外, 另有一段約 180 bps 的片段出現(如圖 2) 顯示 pEGF 基因成功被嵌入質體中。

將含有 pEGF 基因重組質體(pET24a-EGF)的大腸桿菌繁殖、抽取質體, 以核酸自動定序儀定序結果(如圖 3)。已知的 pEGF 有 159 個鹼基, 另外我們於 pEGF 基因開頭多加了起始碼 ATG, 末端多加了 *Xho* I 切位 6 個鹼基及 6 個 CAC, 轉譯成 6x His tag, 以便後續蛋白之分離與確認。選殖基因之序列與目

前基因庫所發表的豬 EGF 序列 100%相同。

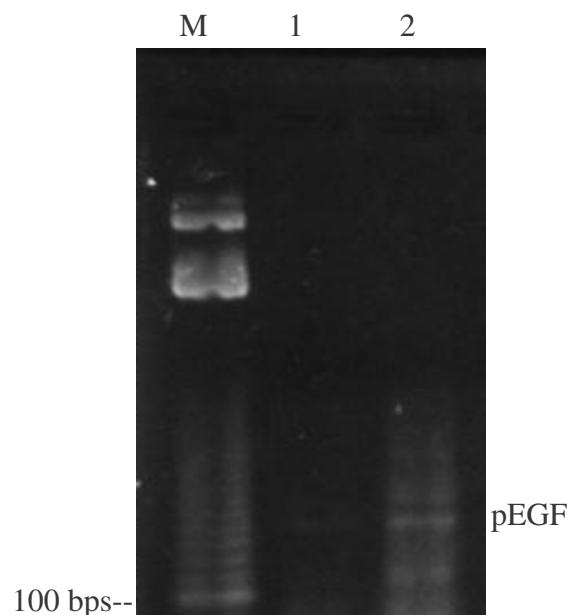


圖 1. 以 RT-PCR 增幅 pEGF 基因。純化之豬顎下腺 mRNA 為模板進行 RT-PCR, 產物以 3% 洋菜膠電泳分析。Lane M: 20 bps marker; Lane 1: 負控制組; Lane 2: 豬顎下腺 mRNA。

Fig 1. Amplification of pEGF gene by RT-PCR. mRNA from porcine submaxillary gland was used as template for RT-PCR. The product was analyzed by 3% agarose gel. Lane M: 20 bps ladder; Lane 1: negative control; Lane 2: mRNA from submaxillary gland.

### 二、pEGF 基因的表現

將培養達到生長對數期的菌液以 IPTG 誘導不同時間後, 分離細菌進行 SDS-PAGE 分析, 發現隨著誘導時間增加, 在分子量 6 kDa 處明顯增加一 band(圖 4A), 與預期 pEGF 蛋白的分子量相同。將電泳凝膠之蛋白轉印至尼龍膜, 以 anti-His tag 抗體進行西方墨漬法偵測。經 IPTG 誘導 2、4、6、8hr 的細菌同樣在 6 kDa 處有一呈色 band。而誘導 0hr 或僅含 pET24a 質體未插入 pEGF 基因之細菌則不見呈色 band(圖 4B)。證實 pEGF 重組基因可於細菌被 IPTG 誘導產生 pEGF 蛋白。

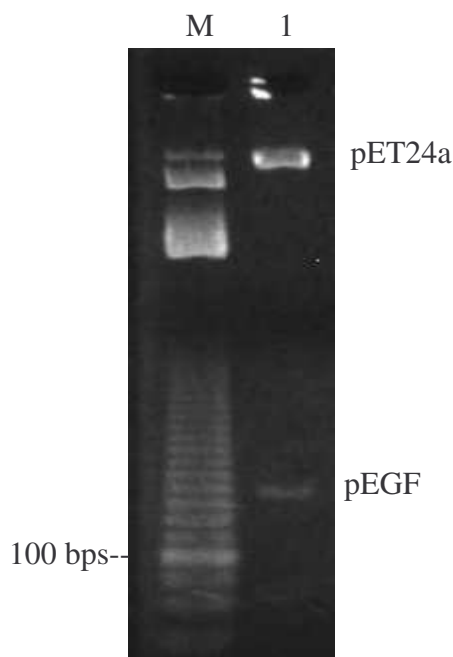


圖 2. pEGF 基因重組質體之酵素切割。將 pET24a-pEGF 重組質體以 *EcoR* I 及 *Xho* I 限制酶進行切割，產物以 3% 洋菜膠電泳分析。確認質體中嵌入 180 bps 基因片段。Lane M: 20 bps marker; Lane 1: pET24a-pEGF 重組質體。

Fig 2. Restriction digestion of pEGF recombinant plasmid. Recombinant plasmid of pET24a-pEGF was double digested with *EcoR* I and *Xho* I and then analyzed by 3% agarose gel. Lane M: 20 bps marker; Lane 1: pET24a-pEGF.

我們重組表現的 pEGF 蛋白是以包涵體 (inclusion body) 形式存在。將轉殖細菌大量培養經 IPTG 誘導 6hr 後，進行包涵體分離、溶解、與透析。經 SDS-PAGE 分析，主要於 6KDA 處有一 band，以影像軟體分析 (Alpha Imager 2200, Alpha Innotech, Washington, D.C., USA)，得知其純度為 90% 以上 (圖 5A)。再以 anti-His tag 抗體進行西方墨漬法分析，確認為預期的 pEGF 蛋白 (圖 5B)。500 ml 的菌液約可製得 25mg 的 pEGF，以市售 1mg hEGF 需 1 萬元新

台幣計算，產值可觀。

### 三、pEGF 的生物活性

基因重組產製的生長因子，必須具有生物活性才有意義。分泌性的蛋白在真核細胞的內質網與高基氏體內常有轉譯後修飾 (post-translational modification)，除了蛋白質的三級構型，還常加糖基 (glycosylation) 或磷酸基 (phosphorylation)。為了產製的蛋白有生物活性，有時需使用真核細胞的酵母菌來表現 (Clare, 1991)。我們產製的 pEGF 以 MME 細胞測活性，具有促進 DNA 合成的能力 (圖 6)。然而經過計算，100  $\mu$ g/ml 的 pEGF 活性只相當於 30 ng/ml hEGF。此可能 MME 細胞膜受體對 pEGF 的反應較 hEGF 差，由於未見市售 pEGF，無法比較。理想上應以預期作用的組織做初級細胞培養，觀察待測生長因子的活性，然而豬小腸黏膜細胞取得與培養不易，故先以小鼠 MME 細胞測試。另外，細胞活性低也可能是包涵體的 pEGF 沒有完全復性。Zijlstra (1994) 報導口服重組 hEGF 蛋白質需添加 1.0 mg/L，才有助環狀病毒感染仔豬的小腸黏膜增生。此可能口服的 EGF 被胃小腸破壞，也可能是其 EGF 分子沒有完全復性。

pre-proEGF 約含 1,200 個胺基酸，1 個 EGF unit，8 個 EGF-like unit，分子有糖化 (Mroczkowski et al., 1989)。然而成熟的 EGF 只含 53 個胺基酸，1 個 EGF unit，其中有三對雙硫鍵。細菌如果快速轉譯重組蛋白，蛋白質來不及正常進行折疊，常聚成包涵體，雖然產量高，卻呈變性狀態。我們以 N-lauroylsarcosine 溶解包涵體蛋白質，使各蛋白分子呈變性分散狀態。初期透析液含 DTT 還原劑，讓變性的 pEGF 蛋白有機會折疊成正確的構形。後期透析液移除 DTT，讓構形後的蛋白質形成雙硫鍵。另外，人的成熟 EGF 沒有糖化與磷酸化，豬的成熟 EGF 則未見報告，也許糖化或磷酸化會影響 pEGF 的活性。

分子與細胞膜受體的作用有多樣性，包括分子間親和力的差異，以及產生的細胞反應有可能是促進的 agonist 或是抑制的 antagonist。本實驗產製的豬 EGF 對小鼠的 MME 細胞有促進 DNA 合成的作用，

```

1      GAATTCATGAATAGTTACTCTGAATGCCCGCCGTCCCACGACGGGTACTGCCTCCACGGT
1      M N S Y S E C P P S H D G Y C L H G
61      GGTGTGTGTATGTATATTGAAGCCGTCGACAGCTATGCCTGCAACTGTGTTTTTGGCTAC
21      G V C M Y I E A V D S Y A C N C V F G Y
121     GTTGGCGAGCGATGTCAGCACAGAGACTTGAAATGGTGGGAGCTGCGCCTCGAGCACCAC
41      V G E R C Q H R D L K W W E L R L E H H
181     CACCACCACCACTGA
61      H H H H *
    
```

圖 3. 選殖之 pEGF 基因序列分析。將 pET24a-pEGF 進行 DNA 序列分析。底線標示處分別為 *EcoR* I 和 *Xho* I 切位，結尾多加 6 個 CAC，供轉譯成 His-tag。

Fig 3. Sequence analysis of the cloned pEGF gene. The sequence of the pET24a-pEGF was analyzed. Restriction sites for *EcoR* I and *Xho* I were underlined. Six CAC repeats were added to the end of the gene for the translation of His-tag.

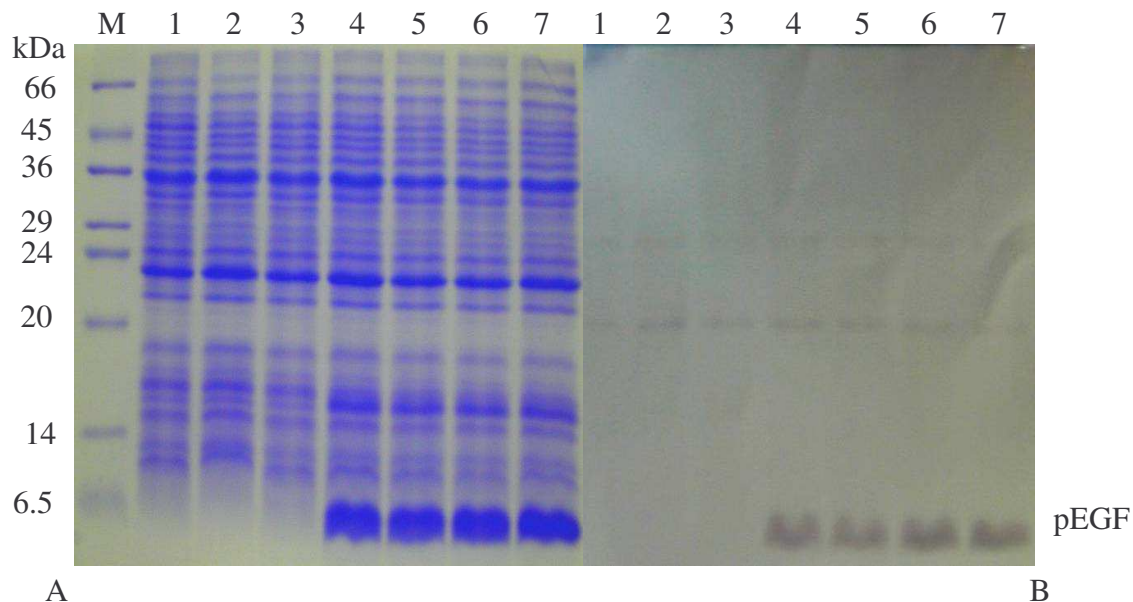


圖 4. pEGF 基因表現之 SDS-PAGE 電泳分析(A)；及以抗 His-tag 單株抗體偵測之西方墨漬法(B)。Lane M：標準分子量； Lane 1：含 pET24a 質體之菌株；Lane2：含 pET24a 質體之菌株經 1 mM IPTG 誘導 8 小時；Lane3~7：含 pET24a-pEGF 重組質體之菌株以 1 mM IPTG 分別誘導 0, 2, 4, 6, 8 hr。

Fig 4. Expression of pEGF gene followed by SDS-PAGE analysis (A); and Western blot detected by anti-His-tag monoclonal antibody (B). Lane M: protein markers; Lane 1: bacteria with pET24a; Lane 2: bacteria with pET24a induced by 1mM IPTG for 8 hr; Lane3-7: bacteria with pET24a-pEGF induced by 1mM IPTG for 0, 2, 4, 6, 8 hr respectively.

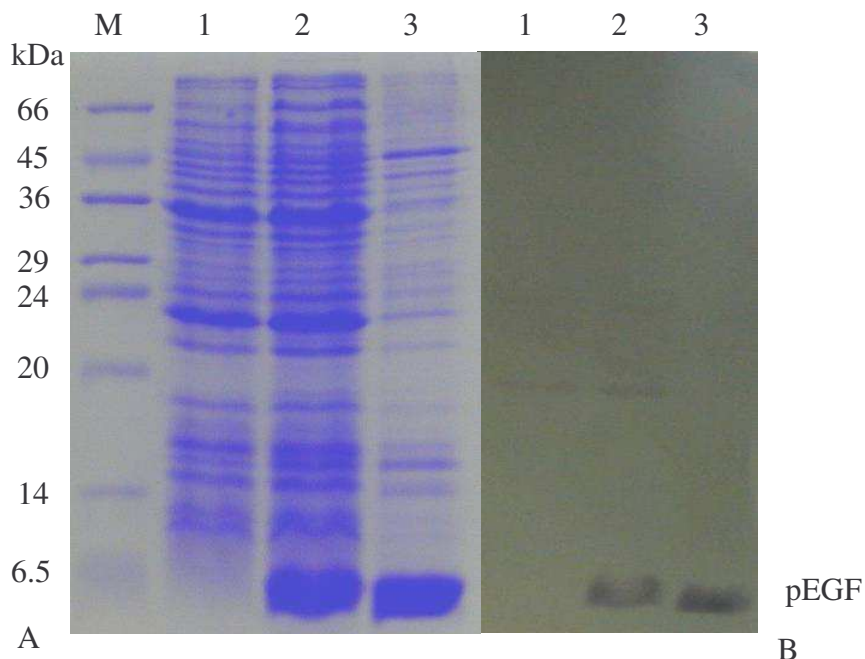


圖 5. pEGF 重組蛋白分離後之 SDS-PAGE 電泳分析(A)；及以抗 His-tag 單株抗體偵測之西方墨漬法(B)。Lane M：標準分子量；Lane 1：含 pET24a 質體之菌株；Lane2：含 pET24a-pEGF 重組質體之菌株以 1 mM IPTG 誘導 6 hr；Lane 3：經分離後之 pEGF 重組蛋白。

Fig 5. Isolation of pEGF recombinant protein followed by SDS-PAGE analysis (A); and Western blot detected by anti-His-tag monoclonal antibody (B). Lane M: protein markers; Lane 1: bacteria with pET24a; Lane 2: bacteria with pET24a-pEGF induced by 1mM IPTG for 6 hr; Lane 3: isolated pEGF recombinant protein.

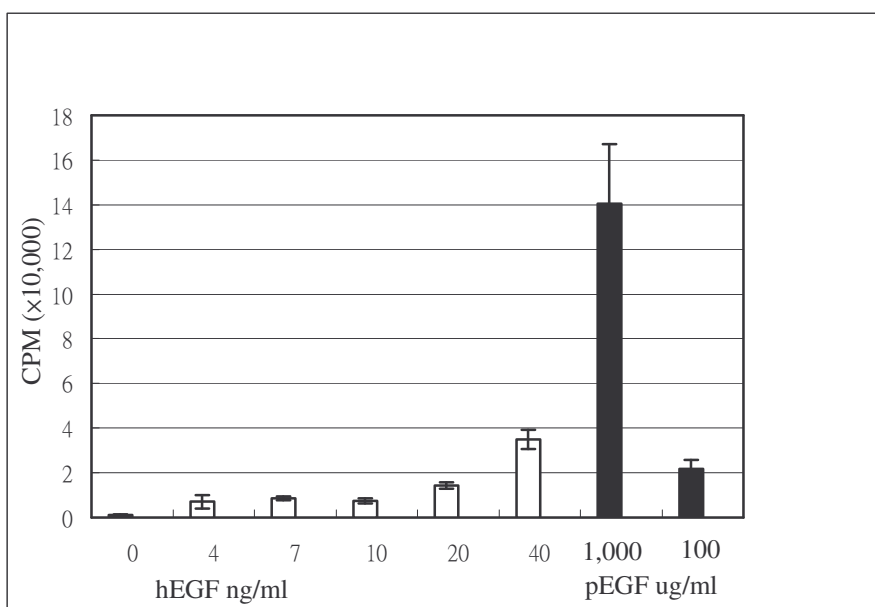


圖 6. pEGF重組蛋白之生物活性測定。以  $^3\text{H}$ -Thymidine 測試樣品促進 MME 細胞合成 DNA 之活性。□：市售 hEGF；■：pEGF 重組蛋白

Fig 6. Bioactivity assay of pEGF recombinant protein. The bioactivity was assayed by the ability of promoting  $^3\text{H}$ -Thymidine incorporation in MME cell. □: commercial hEGF; ■: pEGF recombinant protein.

然而活性不如市售人的 EGF。是動物細胞間的差異，還是包涵體的 pEGF 沒有完全復性，值得進一步研究。

## 結 論

本實驗抽取豬顎下唾腺 mRNA，以 RT-PCR 增幅得 180bp 片段，經定序確定為 pEGF 基因。與 pET24a 質體重組後轉型至細菌，以 IPTG 誘導表現呈包涵體，經純化、溶解、復性所得 pEGF 蛋白質，證實有促進細胞生長的活性。

## 參考文獻

- 吳輔祐、T.H. Elsasser。1995。羊乳促進細胞生長活性之研究。中國農業化學會誌 33(3): 326-332。
- Carpenter, G. 1980. Epidermal growth factor is a major growth-promoting agent in human milk. *Science*. 210(10): 198-199.
- Carpenter, G. and M.I. Wahl. 1991. The epidermal growth factor family. in "Peptide Growth Factors and Their Receptors I", M.B. Sporn and A.B. Roberts, ed. pp. 73-76. Springer-Verlag, New York, NY, U.S.A.
- Clare, J.J., M.A. Romanos, F.B. Rayment, J.E. Rowedder, M.A. Smith, M.M. Payne, K. Sreekrishna and C.A. Henwood. 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105(2): 205-212.
- Donovan, S.M., R.T. Zijlstra and J. Odle. 1994. Use of the piglet to study the role of growth factors in neonatal intestinal development. *Endocr Regul.* 28(4): 153-162.
- Dunbar, A.J., I.K. Priebe, D.A. Belford and C. Goddard. 1999. Identification of betacellulin as a major peptide growth factor in milk: purification, characterization and molecular cloning of bovine betacellulin. *Biochem J.* 344: 713-721.
- Forsyth, I.A., J.A. Taylor, S. Keable, A. Turvey and S. Lennard. 1997. Expression of amphiregulin in the sheep mammary gland. *Molecular & Cellular Endocrinol.* 126: 41-48.
- Gray, A., T.J. Dull and A. Ullrich. 1983. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature*. 303: 722-725.
- Helm, R.M. and A.W. Burks. 2000. Mechanisms of food allergy. *Curr Opin in Immunol.* 12: 647-653.
- Herrington, E.E., T.G. Ram, D.S. Salomon, G.R. Johnson, W.J. Gullick, N. Kenney and H.L. Hosick. 1997. Expression of epidermal growth factor-related proteins in the aged adult mouse mammary gland and their relationship to tumorigenesis. *J. Cell Physiol.* 170: 47-56.
- Konturek, J.W., T. Brzozowski and S. Konturek. 1991. Epidermal growth factor in protection, repair, and healing of gastroduodenal mucosa. *J. Clin. Gastroenterol.* 13(Suppl.1): S88-S97.
- Mroczkowski, B., M. Reich, K. Chen, G.I. Bell and S. Cohen. 1989. Recombinant human EGF precursor is a glycosylated membrane protein with biological activity. *Mol. Cell. Biol.* 9: 2771-2778.
- Normanno, N., N. Kim, D. Wen, K. Smith, A.L. Harris, G. Plowman, G. Colletta, F. Ciardiello and D.S. Salomon. 1995. Expression of messenger RNA for amphiregulin, heregulin, and cripto-1, three new members of the epidermal growth factor family, in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res. & Treat.* 35: 293-297.
- Okita, K., M. Kartia, N. Nakanishi and T. Takemoto. 1991. Role of epidermal growth factor in protection and repair of gastric mucosal injury. *J. Clin. Gastroenterol* 13 (Suppl.1) : S103- S108
- Pascall, J.C., D.S.C. Jones, S.M. Doel, J.M. Clements, M. Hunter, T. Fallon, M. Edwards and K.D. Brown. 1991.



- Cloning and characterization of a gene encoding pig epidermal growth factor. *J. Mol. Endocrinol.* 6: 63-70.
- Puccio, F. and T. Lehy. 1988. Oral administration of epidermal growth factor in suckling rats stimulates cell DNA synthesis in fundic and antral gastric mucosae as well as in intestinal mucosa and pancreas. *Regulatory Peptides.* 20: 53-64.
- Rall, L.B., J. Scott, G.I. Bell, R.J. Crawford, J.D. Penschow, H.D. Niall and J.P. Coghlan. 1985. Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature.* 313: 228-231.
- Scott, J., M. Urdea, M. Quiroga, R. Sanchez-Pescador, N. Fong, M. Selby, W.L. Rutter and G.I. Bell. 1983. Structure of a mouse submacillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science.* 221: 236-240.
- Wechselberger, C., A.D. Ebert, C. Bianco, N.I. Khan, Y. Sun, B. Wallace, R. Jones, R. Montesano and D.S. Salomon. 2001. Cripto-1 enhances migration and branching morphogenesis of mouse mammary epithelial cells. *Exper. Cell Res.* 266: 95-105.
- Zijlstra R.T., J. Odle, W.F. Hall, B.W. Penschow, H.B. Gelberg and R.E. Litov 1994. Effect of orally administered epidermal growth factor on intestinal recovery of neonatal pigs infected with rotavirus. *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.* 19(4): 382-390.

94年10月14日投稿

94年12月22日接受