

表1 静脉致敏法第8天不同组别豚鼠血清中的IL-4和总IgE值($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Contents of serum IL-4 and total IgE after sensitized by injection of different drugs on the 8th day($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-4/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	总IgE/ $\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$
生理盐水组	94.1 $\pm$ 13.3	44.5 $\pm$ 6.3
马血清组	142.5 $\pm$ 19.2 ¹⁾	109.9 $\pm$ 15.2 ¹⁾
绿原酸组	135.6 $\pm$ 17.4 ¹⁾	93.4 $\pm$ 13.0 ¹⁾
喘可治A组	95.2 $\pm$ 11.3	45.7 $\pm$ 7.0
喘可治A+绿原酸组	147.6 $\pm$ 19.5 ¹⁾	95.8 $\pm$ 11.6 ¹⁾
喘可治B组	93.6 $\pm$ 13.0	45.0 $\pm$ 7.2
喘可治B+绿原酸组	143.9 $\pm$ 14.0 ¹⁾	88.8 $\pm$ 14.6 ¹⁾
喘可治C组	94.4 $\pm$ 11.7	45.0 $\pm$ 5.6
喘可治C+绿原酸组	144.9 $\pm$ 15.1 ¹⁾	94.3 $\pm$ 16.3 ¹⁾

注:与生理盐水组比较,¹⁾ $P<0.01$

Note: Compared with NS group, ¹⁾ $P<0.01$

法定判断药物引起过敏反应的方法主要为豚鼠主动过敏反应检查法,存在检验周期偏长(2~3周)、观察指标不够客观等缺陷,不利于迅速得出结论。

3批喘可治注射液验证实验结果表明:单纯隔日腹腔或连续静脉注射喘可治注射液均不引起过敏反应,但在添加 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的绿原酸后,可诱发豚鼠出现过敏反应,过敏反应症状与相应组别豚

鼠连续静脉致敏第8天的血清IL-4和总IgE升高的时效相平行,证实绿原酸可能在药物引起的过敏反应中起到一定的作用,且所建立的连续静脉注射致敏检测方法比传统的隔日腹腔注射致敏法引起过敏反应的检测时间可提早1~2周,且二者结果一致。

REFERENCES

- [1] LI H J, OU Y C, ZUO X C, et al. Review of ARDs of ready-made Chinese drugs in the first OTC list [J]. J China Pharm(中国药房), 2001, 12(4): 249-251.
- [2] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 116.
- [3] XIAO G N, SHENG Y M, CHEN H A, et al. Effect of detection index of IL-4 and IgE on rapid examination of drug-induced allergic reaction [J]. J China Pharm(中国药房), 2010, 21(21): 1946-1948.
- [4] XIAO G N, SHENG Y M, CHENG Z H, et al. Rapid test for allergic reaction induced by cerebroprotein hydrolysate injection [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2010, 30(15): 7-10.
- [5] PULLERITS T. Cytokine modulation for anti-allergic treatment [J]. Curr Pharm Des, 2002, 8(20): 1845-1853.
- [6] BETTIOL J, SELE J, HENKET M, et al. Cytokine production from sputum cells after allergenic challenge in IgE-mediated asthma [J]. Allergy, 2002, 57(12): 1145-1150.

收稿日期: 2011-11-16

FGF21对HepG2细胞TGF- β 信号通路的影响

江松敏*, 蔡琳*, 朱婷婷, 施立华, 金岑, 夏清海(温州医学院药学院, 浙江 温州 325035)

摘要: 目的 研究 FGF21 对 TGF- β /Smads 信号通路中相关蛋白和 mRNA 表达的影响。方法 采用 Western blot 法检测 HepG2 cells 的 TGF- β 1, TGF- β R II, Smad 2, 3, 4, 7 的蛋白表达水平和采用 Q-PCR 方法检测 HepG2 cells 的 TGF- β 1, TGF- β R II, Smad 2, 3, 4, 7 的 mRNA 表达水平。结果 在不同 FGF21 浓度下, TGF- β 1, TGF- β R II, Smad 2, 3, 4, 7 蛋白和 mRNA 表达水平不同($P<0.05$)。结论 FGF21 通过促进 TGF- β 信号通路中的信号分子或受体的表达, 或者通过下调此信号通路的阻断分子而抑制肿瘤发生。

关键词: FGF21; HepG2 细胞; Smad

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)08-0675-04

Effect of FGF21 in TGF- β Signaling Pathway of HepG2 Cells

JIANG Songmin, CAI Lin*, ZHU Tingting, SHI Lihua, JIN Qin, XIA Qinghai(School of Pharmacy, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of FGF21 on relative proteins and mRNA expression involved in

基金项目: 浙江省教育厅科研项目(Y200907097)

作者简介: 江松敏, 男, 硕士生 Tel: 13958827005 E-mail: 314527759@qq.com *通信作者: 蔡琳, 女, 博士, 副教授 Tel: 15058323373 E-mail: cailin33@126.com

TGF- β /Smads signaling pathway. **METHODS** Detect the protein expressions of TGF- β 1, TGF- β R II, Smad 2,3,4,7 of HepG2 cells with Western blot and detect the mRNA expression of TGF- β 1, TGF- β R II, Smad 2, 3, 4, 7 of HepG2 cells with Q-PCR. **RESULTS** The expressions of the protein and mRNA of TGF- β 1, TGF- β R II, Smad 2, 3, 4, 7 varied with the different concentrations of FGF21($P<0.05$). **CONCLUSION** FGF21 might inhibit tumor by promoting TGF- β signaling pathway in the expression of signaling molecules or receptors, or by decreasing the blocking molecules of this signaling pathway. **KEY WORDS:** FGF21; HepG2 cells; Smad

肝癌是最常见且恶性程度最高的肿瘤之一,其发生、发展是多因素、多阶段、多基因相互作用的结果。由于肝癌恶性程度高,发展迅速,治疗困难,病死率高,而传统的外科手术加化疗或放疗的方法有其局限性,肝癌根治性切除后的复发率很高。因此,生物学治疗加常规疗法是肝癌治疗的未来趋势。

成纤维细胞生长因子最早由 Gospodarowicz 等从牛垂体中分离纯化而得。目前,成纤维细胞生长因子家族(FGFs)有 23 个成员 FGF1~23^[1],主要由成纤维细胞、内皮细胞、骨细胞、多形细胞等分泌,相对分子质量一般在 17~34 kD。FGF21 是 FGFs 家族成员之一,主要在肝脏表达。FGF21 可能通过与抑癌信号通路的相互作用而延缓肝癌发生。

大量研究发现,细胞内外信号传导的紊乱在各种肿瘤发生中普遍存在。而在肝癌组织、癌旁肝组织、正常肝组织之间,同样发现存在多种信号分子的差异表达,如 TGF、EGF、TNF 等^[2]。同时这些信号分子构成了相关的信号通路。其中,酪氨酸激酶受体行使其信号传导作用的转化生长因子 β 通路(TGF- β 通路)在肿瘤的发生中具有肿瘤抑制和致瘤活性两方面不同且相反的作用。Smad 蛋白^[3]是 TGF- β 1 与其细胞表面丝/苏氨酸激酶受体结合后,将其信号从细胞膜传递到细胞核过程中极其重要的细胞内信号介导分子^[4-5]。

因此,笔者推测,FGF21 有可能通过促进 TGF- β 信号通路中的信号或受体表达,或下调此信号通路的阻断分子而抑制肿瘤发生。而本实验目的是检测在不同 FGF21 浓度下人肝癌细胞 HepG2 的 TGF- β 1, TGF- β R II, Smad 2, 3, 4, 7 蛋白和 mRNA 表达。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 HepG2 购自中国典型培养物保藏中心; RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司;胰酶(含 0.25%EDTA)购自美国 Gibco 公司; FBS 购自杭州四季青公司;人 TGF- β 1, TGF- β R II, Smad 2, 3, 4, 7 抗体均购自美国 Santa Cruz 生物公司;蛋白检测试剂盒(BCA 试剂)以及兔抗人 actin

单抗均购自武汉博士德生物公司。

1.2 方法

1.2.1 HepG2 细胞的制备 将 HepG2 细胞接种于 35, 100 mm 培养皿,培养液为 RPMI 1640(含 10% FBS 及 100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 μ g·mL⁻¹ 链霉素、4 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺及 1 mol·L⁻¹ HEPES),置于 37 °C、5%恒温 CO₂ 培养箱中,细胞贴壁生长,每 3~4 d 用胰酶(含 0.25% EDTA)进行消化传代。

1.2.2 细胞培养 培养肝癌细胞株到对数生长期,胰酶消化,将细胞传代于无血清培养基中,血清饥饿 24 h 后,更换新的含有 FGF21 的无血清培养基,使 FGF21 终浓度分别为 0, 1, 5, 10, 20 ng·mL⁻¹,继续培养 24 h 后,再进行相关实验。

1.2.3 免疫印迹分析 经过处理的细胞先用冷 PBS 洗 2 遍,再用蛋白裂解液裂解细胞,冰上放置 40 min 后,离心,收集上清,取一部分用 BCA 法测定蛋白含量;其余样品做 SDS-PAGE 电泳,之后转膜,和相应的一抗、二抗反应,显色液显色,凝胶成像分析。

1.2.4 Q-PCR 从培养的肝癌细胞株中,用 TRIZOL RNA 提取试剂盒提取总 RNA,将提取的总 RNA 样品经稀释后,用 DNA/RNA 微量定量仪进行定量, A260/280 判断其纯度。同时取适量总 RNA,加入逆转录反应缓冲液,适当条件下进行逆转录反应,反应产物中加入待测目的引物, Q-PCR 仪扩增,扩增产物作定量分析。

1.3 统计学处理

采用 Graph Pad prime 5 软件,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同 FGF21 浓度下, Western blot 方法检测各组细胞的 TGF- β 1, TGF- β R II, Smad 2, 3, 4, 7 的蛋白表达水平

在 HepG2 细胞蛋白表达中, TGF- β 1 随 FGF21 浓度增加而降低($P<0.05$), TGF- β R II 随 FGF21 浓度增加而增加($P<0.05$), Smad 2/3 随 FGF21 浓度增加而增加($P<0.05$), Smad 4 在 0 ng·mL⁻¹ 时比

1 ng·mL⁻¹ 蛋白表达略高, 但随 FGF21 浓度(1, 5, 10, 20 ng·mL⁻¹)增加而增加($P<0.05$), Smad 7 随 FGF21 浓度增加而降低($P<0.05$)。结果见图 1 和表 1。

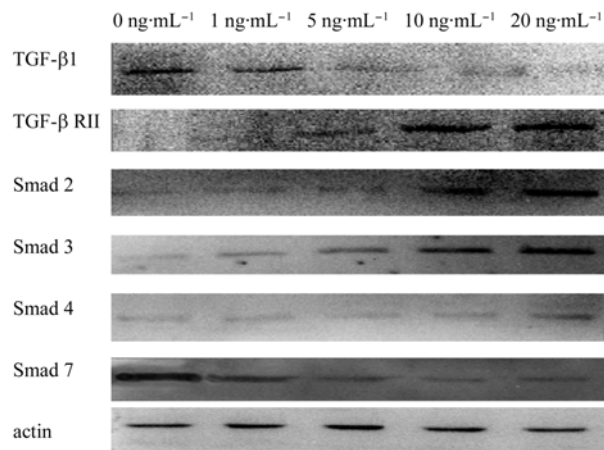


图 1 不同 FGF21 浓度下, 各组细胞的 TGF-β1, TGF-β RII, Smad 2, 3, 4, 7 的蛋白表达

Fig 1 The protein expression of TGF-β1, TGF-β RII, Smad 2,3,4,7 with different concentrations in HepG2 cells

2.2 不同 FGF21 浓度下, Q-PCR 方法检测各组细胞的 TGF-β 1, TGF-β RII, Smad 2, 3, 4, 7 的 mRNA 表达水平

在人 HepG2 细胞 mRNA 表达中, TGF-β1 随 FGF21 浓度增加而降低($P<0.05$), TGF-β RII 随 FGF21 浓度增加而增加($P<0.05$), Smad 2/3, 随 FGF21 浓度增加而增加($P<0.05$), Smad 4 在 0 ng·mL⁻¹ 与 1 ng·mL⁻¹ 相比, mRNA 表达略高, 但

随 FGF21 浓度(1, 5, 10, 20 ng·mL⁻¹)增加而增加($P<0.05$), Smad 7 随 FGF21 浓度增加而降低($P<0.05$)。结果见图 2 和表 2。

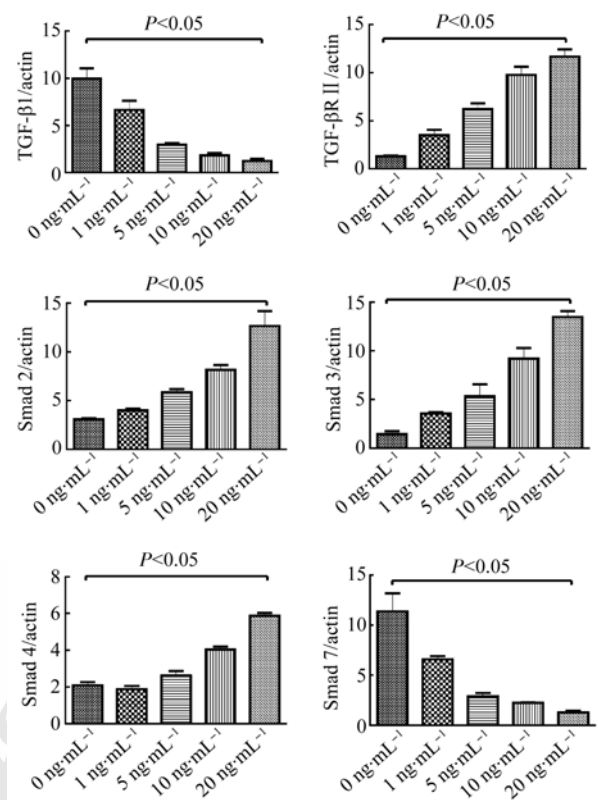


图 2 不同 FGF21 浓度下, 各组细胞的 TGF-β1, TGF-β RII, Smad 2, 3, 4, 7 的 mRNA 表达

Fig 2 The mRNA expression of TGF-β1, TGF-β RII, Smad 2, 3, 4, 7 with different concentrations in HepG2 cells

表 1 不同 FGF21 浓度下, 各组细胞的 TGF-β1, TGF-β RII, Smad 2, 3, 4, 7 的蛋白表达

Tab 1 The protein expression of TGF-β1, TGF-β RII, Smad 2,3,4,7 with different concentrations in HepG2 cells

浓度/ng·mL ⁻¹	TGF-β1/actin	TGF-β RII /actin	Smad 2/actin	Smad 3/actin	Smad 4/actin	Smad 7/actin
0	2.31±0.04	0.26±0.02	0.38±0.02	0.32±0.03	0.33±0.02	2.41±0.04
1	1.42±0.04	0.52±0.02	0.73±0.03	0.61±0.03	0.31±0.02	1.35±0.07
5	0.78±0.03	0.79±0.04	0.92±0.04	0.88±0.03	0.37±0.01	0.95±0.03
10	0.44±0.02	2.13±0.04	2.21±0.03	2.29±0.04	0.42±0.02	0.69±0.03
20	0.30±0.03	3.30±0.04	3.22±0.04	3.3±0.04	0.67±0.03	0.51±0.03

表 2 不同 FGF21 浓度下, 各组细胞的 TGF-β1, TGF-β RII, Smad 2, 3, 4, 7 的 mRNA 表达

Tab 2 The mRNA expression of TGF-β1, TGF-β RII, Smad 2, 3, 4, 7 with different contrations in HepG2 cells

浓度/ng·mL ⁻¹	TGF-β1/actin	TGF-β RII /actin	Smad 2/actin	Smad 3/actin	Smad 4/actin	Smad 7/actin
0	10.16±0.10	1.04±0.02	2.84±0.02	2.09±0.03	1.99±0.03	11.93±0.09
1	6.8±0.06	3.98±0.04	4.01±0.03	4.20±0.03	1.96±0.02	6.41±0.03
5	3.26±0.04	6.18±0.06	5.98±0.03	5.52±0.06	2.21±0.03	3.08±0.03
10	2.12±0.03	9.84±0.08	8.27±0.04	8.93±0.06	4.05±0.03	2.7±0.03
20	1.12±0.03	12.06±0.09	12.56±0.08	13.84±0.06	6.02±0.04	1.22±0.03

3 讨论

在肿瘤的发生发展中, TGF- β 信号通路的作用尚没有完全明确。此信号通路在肿瘤的发生中具有肿瘤抑制和致瘤活性两方面不同且相反的作用^[6-7]。TGF- β 1 首先被细胞表面的受体 TGF- β R II 识别并结合, 使其构象发生改变, 然后被另一受体 TGF- β R I 识别形成三者的复合物。此时, TGF- β R II 的胞内丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域可将 TGF- β R I 的胞内丝氨酸/苏氨酸磷酸化, TGF- β R I 被激活, 磷酸化的 Smad 2 或 Smad 3 进入细胞核, 与 Smad 4 结合, 形成复合物, 然后再与核内的各类转录因子结合, 调控靶基因的转录。

Smad 蛋白是 TGF- β 1 与其细胞表面丝/苏氨酸激酶受体结合后, 将其信号从细胞膜传递到细胞核过程中极其重要的细胞内信号介导分子。在哺乳动物细胞中, 其家族可分为 3 大类: ①受体激活型 Smad(R-Smads), 包括 Smad 1、Smad 2、Smad 3、Smad 5 和可能的 Smad 8 和 Smad 9; ②共同通路型 Smad(Co-Smads)即 Smad 4; ③抑制 Smad(I-Smad), 包括 Smad 6 和 Smad 7。其中参与 TGF- β 1 信号传导的 Smad 蛋白主要包括 Smad 2、Smad 3、Smad 4 和 Smad 7。

在这条信号传导途径中癌细胞通过突变失活或下调信号传导通路因子的表达而逃避 TGF- β 的抗增殖作用。在许多肿瘤细胞中 TGF- β 的肿瘤抑制作用和致瘤作用通过降低受体的功能和改变 TGF- β I 型受体/II 型受体的比率来相互协调^[8]。该通路中任一元件的异常都可导致信号传导的紊乱, 影响 TGF- β 的生物效应, 与肿瘤的发生发展关系密切。

TGF- β 信号通路对于肿瘤的影响开始表现为抑制效应, 随着肿瘤的发展而成为促进其发展的正性介质。这与 FGF21 延缓二乙基亚硝胺(DEN)诱导的肝癌发生现象相似。大量研究表明: 在 DEN 诱导 8 个月时, 相比较野生型鼠有 50% 发展成肝肿瘤, FGF21 鼠只有 10% 发展成肿瘤^[9]; 但在 DEN 诱导 10 个月时, 两组的肝癌发病率相同。前期 FGF21 表现为延缓肝癌发生的抑制现象, 可能与

FGFR4 的结合有关; 而在后期, 推测其因与促进肝癌发生的 FGFR1 结合而加速了肝癌发展。

本实验以 HepG2 细胞为研究对象, 利用 Western blot 和 Q-PCR 方法检测 TGF- β 1, TGF- β R II, Smad 2, 3, 4, 7 的蛋白和 mRNA 表达来探讨 FGF21 通过 TGF- β /Smads 信号通路延缓肝癌发生发展的可能分子机制。结果表明: 在人 HepG2 细胞中, TGF- β 1 随 FGF21 浓度增加而降低, TGF- β R II 随 FGF21 浓度增加而增加, Smad 2/3, 随 FGF21 浓度增加而增加, Smad 4 在 0 ng·mL⁻¹ 时比 1 ng·mL⁻¹ 表达略高, 但随 FGF21 浓度(1, 5, 10, 20 ng·mL⁻¹) 增加而增加, Smad 7 随 FGF21 浓度增加而降低。

综上所述, 这些结果说明了 FGF21 可能通过促进 TGF- β 信号通路中的信号分子或受体的表达, 或者通过下调此信号通路的阻断分子而抑制肿瘤发生。

REFERENCES

- [1] ITOH N, ORNITZ D M. Evolution of the fgfr gene families [J]. Trends Genet, 2004, 20(11): 563-569.
- [2] BEACHY P A, KARHADKAR S S, BERMAN D M. Mending and malignancy [J]. Nature, 2004, 431(7007): 402-406.
- [3] FENG X H, DERYNCK R. Specificity and versatility in TGF-beta signaling through Smads [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005, 21(15): 659-693.
- [4] PARSONS R, MYEROFF L L, LIU B, et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type III receptor gene in colorectal cancer [J]. Cancer Res, 1995, 55(23): 5548-5550.
- [5] MARKOWITZ S, WANG J, MYEROFF L, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability [J]. Science, 1995, 268 (5215): 1336-1338.
- [6] DUPONT S, MAMIDI A, CORDENONSI M, et al. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGF-beta signaling, controls Smad 4 monoubiquitination [J]. Cell, 2009, 136(1): 123-135.
- [7] HOOVER L L, KUBALAK S W. Holding their own: the noncanonical roles of Smad proteins [J]. Sci Signal, 2008, 1(46): 135-144.
- [8] KAWATE S, TAKENOSHITA S, OHWADA S, et al. Mutation analysis of transforming growth factor beta type II receptor, Smad 2, and Smad 4 in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Oncol, 1999, 14(1): 127-131.
- [9] HUANG X, YU C, JIN C, et al. Forced expression of hepatocyte-specific fibroblast growth factor 21 delays initiation of chemically induced hepatocarcinogenesis [J]. Mol Carcinog, 2006, 45(12): 934-942.

收稿日期: 2011-12-27