

成纤维细胞生长因子(FGF)受体-2 参与 FGF-21 介导的糖代谢活性*

任桂萍** 李璐** 孙国鹏 侯玉婷 王文飞 李德山***

(东北农业大学生命科学学院生物制药教研室, 哈尔滨 150030)

摘要 最近发现, FGF-21 具有很强的调节血糖和血脂的作用, 已经成为糖尿病研究领域的新热点, 但是其功能受体和作用机制还不清楚. 前期结果表明, FGF-21 促进 3T3L1 脂肪细胞代谢葡萄糖, 对前脂肪细胞无作用, 说明脂肪细胞表达 FGF-21 功能受体. 以 3T3L1 脂肪细胞为靶标, 旨在寻找 FGF-21 的功能受体. 结果表明, FGF-21 可与 3T3L1 脂肪细胞膜蛋白形成 FGF-21/受体复合物, 免疫检测结果发现, FGF-21/受体复合物中含有 FGF 受体-2(FGFR-2). 为明确 FGF-21/FGFR-2 的特异性关系, 系统研究了 FGFR-2 对 FGF-21 刺激后的酪氨酸磷酸化反应. 结果表明, 虽然前脂肪细胞和脂肪细胞均表达 FGFR-2, 但是 FGF-21 只诱导脂肪细胞中表达的 FGFR-2 磷酸化, 对前脂肪细胞表达的 FGFR-2 无作用, 与葡萄糖吸收试验相符. FGF-21 不仅可使原位表达的 FGFR-2 磷酸化, 还可使异位表达的 FGFR-2 磷酸化. 克隆后测序分析结果表明, FGFR-2Ⅲc 是 3T3L1 脂肪细胞表达的主要 FGFR-2 类型. 这些结果提示, FGFR-2Ⅲc 是 FGF-21 的功能受体, 参与 FGF-21 在脂肪细胞介导的糖代谢活性. 此外, 系统分析了 FGFR-2 在 3T3L1 分化过程中的差异表达, 为 FGF-21 在前脂肪细胞和脂肪细胞中的功能差异提供了依据.

关键词 FGF-21, 脂肪细胞, FGF-21/FGFR-2 受体复合物, FGFR-2

学科分类号 Q71

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00323

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)至少包括 23 个成员^[1]. FGF 家族成员曾被公认为是细胞增殖和分化的促进剂. 然而近年来分离的新成员, 如 FGF-21 和 FGF-23 改变了人们的传统看法, 这些 FGF 成员在动物体内代谢过程中起着非常重要的作用. 第一个引起人们注意的是 FGF-23, 该分子可促进钙释放, 这种作用与甲状旁腺激素无关. 第二个分子就是 FGF-21. FGF-21 是肝脏合成的多肽, 2005 年 Kharitonov 等^[2]报道 FGF-21 有很强的调节血糖作用, 有望成为治疗胰岛素抵抗的 2 型糖尿病的理想药物. 这一报道马上引起糖尿病研究领域的极大关注, 成为目前的研究热点之一. FGF-21 被认为是肝脏表达的细胞因子^[3], 动物实验表明, FGF-21 与胰岛素不同, 其降血糖的作用缓慢, 但持久, 大剂量给药也不会引起低血糖反应. FGF-21 不仅降低血糖, 还有调节血脂的作用, 糖尿病猴长期注射 FGF-21 除了血糖降到正常水平外, 还可降低血液中的胰岛素水平, 同时增强了机体对胰岛素的敏感性, 血脂也得到降

低, 特别是可选择性降低甘油三酯和低密度胆固醇脂蛋白, 而对高密度胆固醇脂蛋白还有升高的作用^[4]. FGF-21 转基因鼠可减少脂肪特别是腹部脂肪的沉积从而减少体重. 与其他 FGF 家族成员不同, 其更重要的生物学特性是, FGF-21 不结合肝素, 没有促进细胞分裂的作用, 动物长期注射没有发现明显的副作用^[2,4,5]. FGF-21 这些生物学特性引起各国学者的极大兴趣, 开始对其展开广泛的研究^[6~13]. 我们的前期试验表明, 尽管 FGF-21 可促进 3T3L1 脂肪细胞吸收葡萄糖, 但不能与该细胞膜结合. 虽然多数 FGF 成员均与 FGF 受体特异性结合而发挥功能, 但体外实验表明 FGF-21 不能与纯化的 FGF 受体-1、2、3 和 4 发生特异性结合. 这些特点提

* 黑龙江省科技厅重点攻关资助项目(2006G0461-00).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel: 0451-55190645, E-mail: deshanli@163.com

收稿日期: 2008-05-05, 接受日期: 2008-07-28

示 FGF-21 的受体或受体反应方式可能与其他 FGF 不同, 所以有必要对 FGF-21 的功能受体进行详细研究, 迄今为止未见关于对 FGF-21 的受体详细研究的报道.

FGF 的功能受体有四大类, 即受体 -1、-2、-3 和 -4. 虽然存在受体 -5, 但由于缺少细胞内部分, 故无受体活性. FGF 受体属于 Ig 超家族, 与该家族的其他成员一样, 它的结构包括 N 端信号肽, Ig I, Ig II 和 Ig III 区, 在 Ig I 和 Ig II 之间有一个酸盒, 跨膜区和胞内的酪氨酸激酶区域^[14, 15]. Ig II 和 Ig III 以及它们之间的连接序列对受体的特异性非常重要^[16, 17]. 相反, Ig I 以及 Ig I 和 Ig II 之间的连接序列对受体的亲和力起到相反作用^[17]. 除 FGFR-4 外, 所有与膜结合的 FGF 受体均有两种 Ig III 剪切异构体, 命名 Ig III b 和 Ig III c, 两种异构体具有相同的 N 端, 但 C 端则由不同剪切而形成. 因此, 共有 7 个 FGFR 剪切异构体^[14]. 此外, 其他部位的变化, 如缺少 Ig I, 跨膜区氨基酸的变化等都可以改变受体的特异性和生物反应效果. 典型的 FGF/受体复合物由一个配体二聚体和一个受体二聚体以及肝素样氨基葡聚糖组成, 肝素样氨基葡聚糖的作用是稳定 FGF/受体复合物的结构^[18~21]. FGF 受体家族只有 4 种功能受体, 一种 FGF 可以分别与多种 FGF 受体结合, 如 FGF-1 可以与所有 4 种受体反应^[14], 可是有些 FGF 只与一种受体结合, 如 FGF-19 特异性地与 FGFR-4 结合^[22]. 另一方面, 一种受体可以与多种配体反应, 取决于反应的组织和细胞内外环境^[14, 23].

发表的结果表明, FGF-21 可促进 3T3L1 脂肪细胞对葡萄糖的吸收作用, 但对未分化的 3T3L1 细胞却没有作用^[2], 说明分化后的 3T3L1 脂肪细胞表达 FGF-21 的功能受体. 因此, 分化的 3T3L1 脂肪细胞是研究 FGF-21 受体的最好模型. 本文以 3T3L1 脂肪细胞为靶标, 寻找 FGF-21 在脂肪细胞中的功能受体. 结果表明 FGFR-2 参与 FGF-21 介导的糖代谢活性, 可能是 FGF-21 的功能受体.

1 材料和方法

1.1 制备人 FGF-21 蛋白

从人肝脏中分离 FGF-21 cDNA, 在原核表达系统 pET30a/BL21(DE3)中, 以蛋白质 C 端与 Flag 或 His 标签融合的形式表达. 蛋白质诱导表达, 包涵体纯化、变性和复性等按常规方法进行. 用抗 Flag 抗体标记的微珠(Sigma 公司)亲和层析纯化

FGF-21-Flag 融合蛋白, 用 Ni-NTA 琼脂糖(Qiagen 公司)亲和层析纯化 FGF-21-His 融合蛋白. HPLC (Waters 公司)分析纯度在 95%以上方可使用.

1.2 生物素标记人 FGF-21 蛋白

按照生物素标记试剂盒(Cat. No: 21336, Pierce Biotechnology Inc. Rockford, IL)推荐的方法进行标记. 纯化的人 FGF-21 与 50 倍的 biotin-NHS 混合. 混合物冰浴 2 h, 用色谱方法去除未标记 biotin-NHS. 用葡萄糖吸收试验检测生物素标记的 FGF-21 生物活性, 只有保持可促进葡萄糖吸收功能的 FGF-21 蛋白才能用于本试验.

1.3 检测 FGF-21 介导 3T3L1 脂肪细胞糖代谢活性

1.3.1 3T3L1 脂肪细胞的培养和分化. 鼠 3T3L1 细胞购自中国细胞中心, 用含 10%小牛血清的 DMEM 培养基培养和维持 3T3L1 成纤维细胞(即前脂肪细胞). 将生长状态良好的 3T3L1 成纤维细胞以 2.5×10^4 的密度接种于 12 孔板, 当 3T3L1 细胞形成单层后, 用脂肪细胞分化液 1(含 5 mg/L 胰岛素, 0.25 μ mol/L 地塞米松, 0.5 mmol/L IBMX, 10%胎牛血清的 DMEM 培养基)培养 2 天, 再用脂肪细胞分化液 2(含 5 mg/L 胰岛素, 10%胎牛血清的 DMEM 培养基)培养 2 天, 然后用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基维持, 每 2 天换液一次, 分化至 14 天, 当 90%以上的细胞分化成脂肪细胞方可使用. 胰岛素、地塞米松、IBMX 购自 Sigma 公司, DMEM、胎牛血清、小牛血清购自 Invitrogen 公司.

1.3.2 FGF-21 介导 3T3L1 脂肪细胞的葡萄糖消耗的测定和分析. 将纯化的浓度为 200 mg/L 的 FGF-21 用细胞培养基稀释, 使其终浓度分别为 0.1 nmol/L, 1 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L 和 1 000 nmol/L. 分化成熟的脂肪细胞饥饿培养 12 h 后, 用上述浓度的 FGF-21 处理细胞 24 h, 并设立未处理的空白对照组. 取培养基上清 2 μ l, 经微量化的 GOD-POD 法检测培养基中葡萄糖含量, 每个浓度至少设置 3 个独立的重复组, 统计学分析葡萄糖消耗率.

1.4 免疫印迹鉴定抗体的特异性

抗人 FGF-21 蛋白的单克隆抗体和多克隆抗体系本实验室制备, 为验证该抗体、FGFR-2 抗体的特异性, 分别将人 FGF-21 和 FGFR-2 克隆到逆转录病毒载体, 然后稳定转染到不表达 FGF-21 和 FGFR-2 的 BaF3 细胞, 以表达 FGF-21 和 FGFR-2 细胞的裂解液为材料, 用这些抗体进行免疫印迹来验证抗体的特异性. 免疫印迹方法如下: 将细胞裂

解物或免疫沉淀物沸水浴 8 min, 使其充分变性. 样品在 Tris-Glycine 蛋白胶上分离. 样品分离后转移到硝酸纤维素膜(Amersham 公司)上, 用 5% 的脱脂牛奶封闭硝酸纤维素膜. 然后与特异性抗体 4℃ 过夜, 用相应的标有 HRP 的二抗(Santa Cruz Biotechnology 公司)室温孵育 1 h, 用 SuperSignal (Pierce 公司)检测试剂检测反应信号.

1.5 FGF-21/受体复合物的形成和鉴定

3T3L1 脂肪细胞在 37℃ 无血清饥饿 2 h 后, 加入 FGF-21-Flag 或生物素标记的 FGF-21-His, 在 4℃ 与脂肪细胞单层细胞孵育 2 h. 用预冷的 Hanks 缓冲液清洗细胞, 除去游离的配体. 然后, 加入非还原性偶联剂 BS³(Pierce 公司), 在 4℃ 与脂肪细胞单层孵育 2 h. 除去偶联剂后, 加入含 50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl pH 7.5 的缓冲液, 37℃ 作用 15 min 终止反应. 用裂解液(50 mmol/L Tris, 1% Triton X-100, 0.1% Chaps, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA)和蛋白酶抑制剂混合物(Roche, Indianapolis, IN)裂解细胞. 裂解物脱脂上清用于免疫沉淀分离 FGF-21/受体复合物. 根据使用不同的配体标记物采用不同的方法沉淀 FGF-21/受体复合物: 使用生物素标记的 FGF-21 时, 用链霉亲和素琼脂糖(Sigma 公司)沉淀; 使用 Flag 尾标的 FGF-21 时, 用抗 Flag 抗体琼脂糖(Sigma 公司)沉降. IP 产物在 SDS-PAGE 中分离后, 用抗 FGF-21 抗体进行免疫印迹检测 FGF-21/受体复合物.

1.6 受体磷酸化分析

实验前 3T3L1 细胞血清饥饿过夜, 用 FGF-21 处理饥饿细胞 10 min, 立即用含磷酸酶抑制剂(Upstate, Waltham, MA)的裂解液裂解细胞, 脱脂裂解液用抗磷酸化酪氨酸抗体(4G10, Upstate)免疫沉淀, 用抗体 FGFR-2 抗体免疫印迹, 或反之用抗 FGFR-2 沉淀, 用抗磷酸化酪氨酸抗体免疫印迹.

1.7 蛋白质脱糖试验鉴定 FGF-21/FGFR-2 复合物

FGFR-2 免疫沉淀后, 使用糖蛋白脱糖试剂盒(Calbiochem, San Diego, CA)脱糖, 主要按照说明书介绍的方法进行. 用 FGF-21 刺激脂肪细胞, 裂解细胞, 用抗 FGFR-2 抗体琼脂糖或抗磷酸化酪氨酸抗体琼脂糖(Upstate)进行免疫沉淀, 用 PBS 充分清洗捕获 FGFR-2 的琼脂糖, 用试剂盒中的混合酶, 包括 N-糖苷酶 F(N-glycosidase F, New England Biolabs 公司)、 α -N-乙酰半乳糖胺酶(Endo- α -acetylgalactosaminidase, Sigma 公司)、 α -神经氨

(糖)酸苷酶(α -2-3, 6, 8, 9-neuraminidase, Calbiochem 公司)、 β -半乳糖苷酶(β -1, 4-galactosidase, Merk 公司)和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶(β -N-acetylglucosaminidase, Merk), 37℃ 消化过夜. 原则上 O-连糖和 N-连糖都可被消化. 脱糖后的 FGFR-2 经 SDS-PAGE 后, 用抗 FGFR-2 抗体(C-17)或抗磷酸化酪氨酸抗体(Santa Cruz Biotechnology 公司)免疫印迹.

1.8 鉴定使异位表达的 FGFR-2 的磷酸化

1.8.1 克隆 FGFR-2 cDNA. 提取 3T3L1 脂肪细胞 RNA, 应用 FGFR-2 的 5'和 3'端非翻译区引物通过 RT-PCR 方法克隆全长 FGFR-2 cDNA. 上游引物为 5' GCCCATGGTCTCAGAAGAAGTG 3', 下游引物为 5' GTTCCTGGTGCTGTCCTGTTTG 3'. PCR 产物克隆到 T 载体(TaKaRa 公司)后, 随机挑取 10 个 cDNA 克隆进行序列分析. 引物由 Invitrogen 公司合成.

1.8.2 免疫印迹法鉴定异位表达的磷酸化 FGFR-2. 将全长 FGFR-2 IIIc cDNA 克隆到逆转录病毒表达载体 pBMN- I -GFP(Stanford 公司)上, 用 FuGene (Roche 公司)转染试剂转染包装细胞 EcoPack (Clontech, Mountain View, CA). 包装细胞上清液感染无 FGFR-2 表达的 BaF3 细胞, 用含 0.1 mg/L FGF-1(R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN)无 IL-3 培养基筛选稳定表达 FGFR-2 的 BaF3 细胞. 用 FGF-21 处理稳定表达 FGFR-2 的 BaF3 细胞, 用抗磷酸化酪氨酸抗体 IP 裂解液, IP 产物经 SDS-PAGE 后, 用抗 FGFR-2 抗体进行免疫印迹, 观察外源表达的 FGFR-2 磷酸化情况. 本试验采用 FGF-1 作为阳性对照, FGF-1 可与所有的 FGFR 反应, 并使其磷酸化.

1.9 FGFR-2 在 3T3L1 分化过程中的差异表达分析

在鼠 3T3L1 细胞分化前后不同时间随机抽取 2 瓶细胞, 裂解后混合, 取脱脂上清进行 SDS-PAGE, 用抗 FGFR-2 抗体进行免疫印迹鉴定 FGFR-2 在 3T3L1 细胞分化过程中的差异表达情况.

2 结 果

2.1 FGF-21 介导 3T3L1 脂肪细胞糖代谢活性

鼠 3T3L1 细胞用脂肪细胞分化液 1 和脂肪细胞分化液 2 处理后, 90%以上的细胞表现出脂肪细胞特征(图 1). 用不同浓度的 FGF-21 处理鼠 3T3L1 成纤维细胞和分化成熟的脂肪细胞, 24 h 后取培养基上清经微量化的 GOD-POD 法检测培养基中葡萄

糖含量, 统计学分析结果显示, FGF-21 对未分化的成纤维细胞不起作用, 但能促进分化后的脂肪细胞消耗葡萄糖. 与未经处理的脂肪细胞对照组相比, 经 FGF-21 处理后脂肪细胞对葡萄糖的摄取利用显著增加, 残存在培养基中的葡萄糖含量明显减少(两样本比较的 t 检验, $P < 0.05$ 差异显著, $P < 0.001$ 差异极显著). 本实验未经处理的小鼠 3T3L1 脂肪细胞葡萄糖消耗率只有 30.24%, 而经 FGF-21 作用的脂肪细胞葡萄糖消耗率显著增加, 在浓度为 0.1 nmol/L 时即可达到 46.32%, 并且随着 FGF-21 浓度的增加, 细胞葡萄糖消耗率显著增加, 呈剂量依赖关系, 在浓度为 1 000 nmol/L 时高达 61.01%, 比对照增加了 30%(图 2).

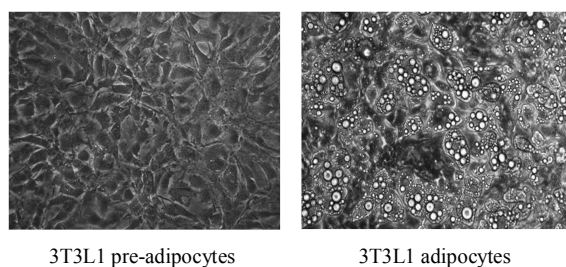


Fig. 1 Differentiation of 3T3L1 pre-adipocytes (200 $\times$)

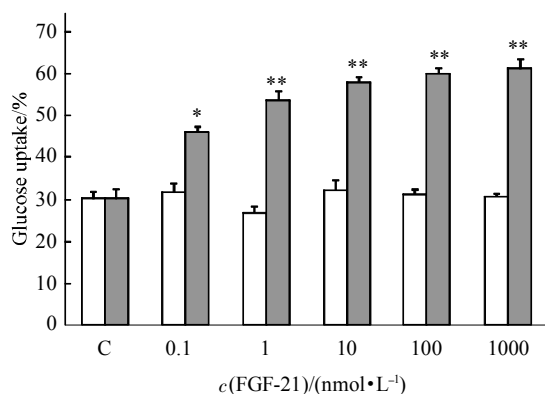


Fig. 2 Analysis of the glucose uptake of 3T3L1 pre-adipocyte and adipocytes by FGF-21 stimulation

The glucose uptake of 3T3L1 pre-adipocyte and adipocytes stimulated by FGF-21. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared with no stimulation control. □: 3T3L1 pre-adipocytes; ■: 3T3L1 pre-adipocytes.

2.2 FGF-21 与 3T3L1 脂肪细胞的膜蛋白形成 FGF-21/FGFR-2 复合物

用 Flag 标记的 FGF-21 与细胞表面作用, 用抗 Flag 抗体 IP 细胞裂解液, IP 产物经 SDS-PAGE

后, 用抗 FGF-21 多克隆抗体进行免疫印迹. 发现 FGF-21 与 3T3L1 脂肪细胞膜蛋白形成两个复合物, 分子质量均在 250 ku 以上(图 3).

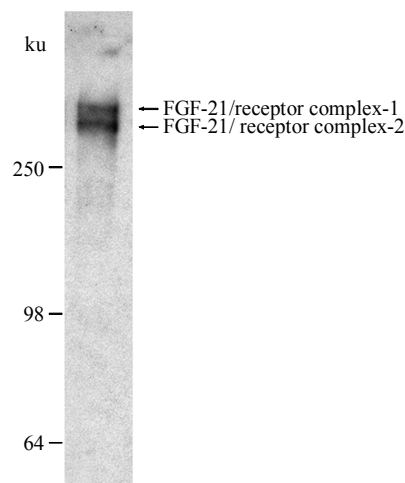


Fig. 3 Identification of FGF-21/receptor complexes in 3T3L1 adipocytes by Western blot

The 3T3L1 adipocyte lysate treated with FGF-21 was immunoprecipitated with anti-Flag antibody and the IP products were immunoblotted with anti-FGF-21 antibodies.

为明确 FGF-21/受体复合物的受体成分, 用各种 FGFR 抗体对复合物进行了免疫检测. 发现只有抗 FGFR-2 的抗体与其中一个复合物发生特异性结合(图 4a), 说明该复合物中含有 FGFR-2. 为证明结果的可靠性, 我们使用 Biotin 标记的 FGF-21-His 与 3T3L1 脂肪细胞表面作用, 用 Streptavidin IP 细胞裂解物, IP 产物经 SDS-PAGE 后, 用抗 FGFR-2 抗体进行免疫印迹. 结果再次证明抗 FGFR-2 抗体与同一分子质量的复合物发生特异性结合(图 4b). 这些结果提示 FGF-21/受体复合物中含有 FGFR-2.

2.3 FGF-21 引起 3T3L1 脂肪细胞中 FGFR-2 磷酸化

上述结果表明, FGF-21/受体复合物中含有 FGFR-2, 提示 FGFR-2 可能是 FGF-21 在脂肪细胞中的功能受体. 如果 FGFR-2 是 FGF-21 的功能受体, FGFR-2 应对 FGF-21 处理做出反应, 反应的标志之一是受体的磷酸化. 我们用 FGF-21 分别对饥饿后的前脂肪细胞和脂肪细胞进行处理, 以 FGF-1 作为阳性对照, 用抗磷酸化酪氨酸抗体 IP 裂解液, IP 产物经 SDS-PAGE 后, 用抗 FGFR-2 抗体免疫印迹. 与预期相一致, 阳性对照 FGF-1 处理可使 FGFR-2 磷酸化, 与细胞分化状态无关,

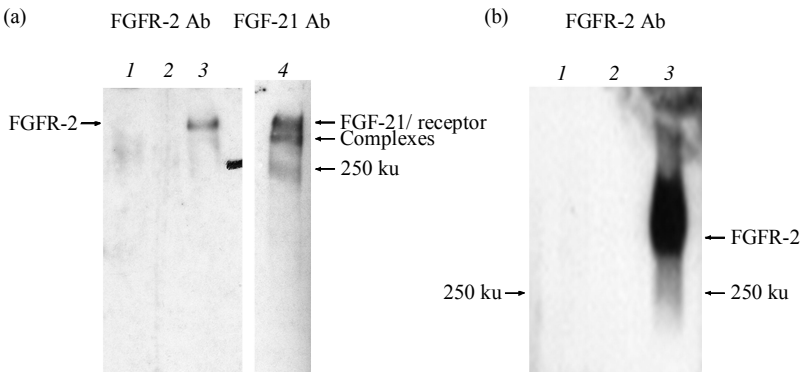


Fig. 4 Identification of FGFR-2 in FGF-21/receptor complexes

(a) Adipocyte membrane proteins were cross-linked with Flag-tagged FGF-21 and the cell lysate was immunoprecipitated with anti-Flag antibody, the FGF-21/receptor complexes were immunoblotted with anti-FGFR-2 antibody. 1: BS³ control; 2: FGF-21 control; 3: FGF-21/BS³; 4: FGF-21/BS³. (b) Adipocyte membrane proteins were cross-linked with biotinylated FGF-21 and the cell lysate was immunoprecipitated with streptavidin, the FGF-21/receptor complexes were immunoblotted with anti-FGFR-2 antibody. 1: FGF-21 control; 2: BS³ control; 3: FGF-21/BS³.

说明前脂肪细胞和脂肪细胞均表达活性 FGFR-2 受体。然而 FGF-21 处理只能使脂肪细胞 FGFR-2 磷酸化，对前脂肪细胞 FGFR-2 无作用，与报道的葡萄糖吸收试验结果相符(图 5a)。为证实结果的可信性，进行了反向 IP，即用抗 FGFR-2 抗体 IP 细胞

裂解液，用抗磷酸化酪氨酸抗体免疫印迹，得到同样的结果(图 5b 左)，用抗 FGFR-2 抗体免疫印迹的结果表明，FGF-21 处理和未经处理的细胞 IP 产物中 FGFR-2 的含量一致(图 5b 右)。说明 FGFR-2 磷酸化不是由于受体含量不同所致。

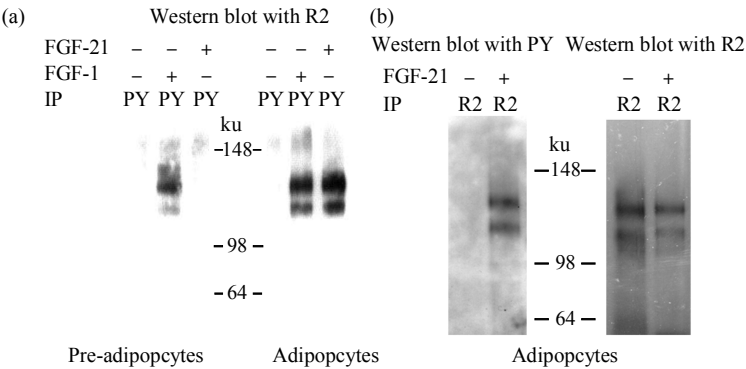


Fig. 5 FGF-21-induced tyrosine-phosphorylation of FGF receptor-2 in 3T3L1 adipocytes

Adipocytes and pre-adipocytes were treated with either FGF-21 or FGF-1. (a) The cell lysate was immunoprecipitated with anti-tyrosine phosphorylation antibody and the IP products were immunoblotted with anti-FGFR-2 antibody. (b) The cell lysate was immunoprecipitated with anti-FGFR-2 antibody, the IP products were immunoblotted with anti-tyrosine phosphorylation antibody. R2: Anti-FGFR-2 antibody. PY: Anti-tyrosine phosphorylation antibody.

2.4 FGF-21 诱导的磷酸化蛋白是 FGFR-2

为排除 FGF-21 诱导的磷酸化蛋白是与 FGFR-2 分子质量相似的其他蛋白质的可能性。本试验比较了 FGF-21 诱导的磷酸化蛋白与 FGFR-2 脱糖基前后的分子质量。如果磷酸化蛋白不是 FGFR-2，由于糖基化种类和程度不同，脱糖基后两种蛋白质会显示出分子质量差异。图 6 结果表明，脱糖前 FGF-21 诱导的磷酸化蛋白与没有处理

的 FGFR-2 分子质量一致。脱糖后 FGF-21 诱导的磷酸化蛋白与 FGFR-2 均演变成完全一致的两条带，一条可能是 FGFR-2 前体，一条可能是部分脱糖的 FGFR-2(图 6a)。反向 IP 和免疫印迹(用抗 FGFR-2 抗体 IP，用抗磷酸化酪氨酸抗体免疫印迹)获得同样的结果(图 6b)。结果证明 FGF-21 诱导的磷酸化蛋白是 FGFR-2。

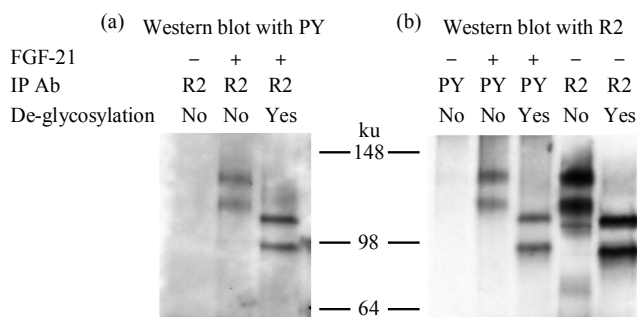


Fig. 6 Comparison of deglycosylation pattern of FGFR-2 with tyrosine phosphorylated proteins induced by FGF-21 in 3T3L1 adipocytes

The adipocyte lysate treated with FGF-21 was immunoprecipitated with anti-FGFR-2 antibody and anti-tyrosine phosphorylation antibody respectively, the IP products were de-glycosylated and immunoblotted with indicated antibodies. PY: Anti-tyrosine phosphorylation antibodies; R2: Anti- FGFR-2 antibodies.

2.5 FGF-21 在脂肪细胞的受体是 FGFR-2Ⅲc

为明确 FGF-21 的受体类型, 用 RT-PCR 的方法从 3T3L1 脂肪细胞的 RNA 中克隆了全长 FGFR-2 cDNA. 序列分析后, 与标准 FGFR-2 Ⅲb

和 FGFR-2 Ⅲc 序列比较结果表明, 10 个 cDNA 克隆均为 FGFR-2 Ⅲc(图 7), 这些结果表明 FGFR-2 Ⅲc 是 FGF-21 的功能受体.

```

R2(Ⅲb)  ERSPHRPILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGSKYGPDGLPYL
R2(Ⅲc)  ERSPHRPILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGSKNGPDGLPYL
R2 cDNA  ERSPHRPILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGSKYGPDGLPYL

R2(Ⅲb)  KVLK-----HSGINSSNAEVLALFN
R2(Ⅲc)  KVLKAAGVNTTDKEIEVLYIRNVTTFEDAGEYTCLAGNSIGISFH-----
R2 cDNA  KVLKAAGVNTTDKEIEVLYIRNVTTFEDAGEYTCLAGNSIGISFH-----

R2(Ⅲb)  VTEM DAGEYICKVS NYIGQANQSAWLT VLP
R2(Ⅲc)  -----SAWLT VLP
R2 cDNA  -----SAWLT VLP
  
```

Fig. 7 Analysis of amino acid sequence from FGFR-2 cDNA

Comparison of amino acid sequences of FGFR-2 cDNA isolated from 3T3L1 adipocytes with standard FGFR-2 Ⅲb and Ⅲc published in GenBank.

2.6 FGF-21 使异位表达的 FGFR-2 磷酸化

2.4 的结果说明 FGF-21 可使 FGFR-2 在脂肪细胞中发生磷酸化. 为进一步研究 FGF-21/FGFR-2 相互反应的特异性和直接关系, 用 FGF-21 处理稳定表达 FGFR-2 的 BaF3 细胞, 结果表明 FGF-21 可使异位表达的 FGFR-2 磷酸化, 但反应强度弱于脂肪细胞内的受体. 5 mg/L FGF-21 可使 FGFR-2 明显磷酸化, 且磷酸化程度呈 FGF-21 剂量依赖性, 同时 β -actin 抗体(Santa 公司)免疫印迹说明样品的磷酸化程度与样品量无关, 25 mg/L FGF-21 的作用与阳性对照 FGF-1 相似(图 8). 实验结果进一步证明了 FGF-21 与 FGFR-2 的特异性和直接关系.

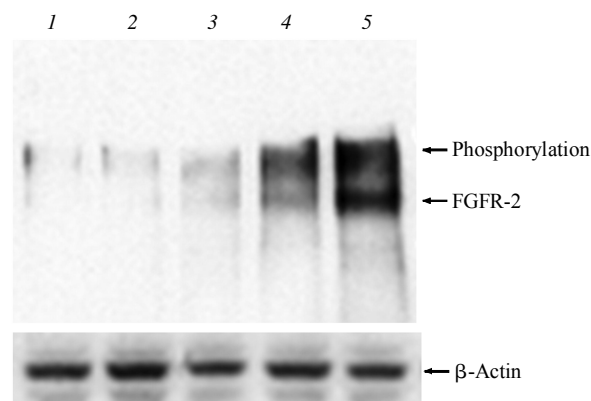


Fig. 8 FGF-21-induced FGFR-2 phosphorylation in FGFR-2-expressed BaF3 cells

1: BaF3 cells without treatment; 2: BaF3 cells treated with 1 mg/L FGF-21; 3: BaF3 cells treated with 5 mg/L FGF-21; 4: BaF3 cells treated with 25 mg/L FGF-21; 5: BaF3 cells treated with FGF-1.

2.7 FGFR-2 在 3T3L1 分化过程中的差异表达

在细胞分化前后不同时间取样, 用抗 FGFR-2 抗体进行免疫印迹. 结果表明, 虽然 3T3L1 细胞在分化前后均表达成熟的 FGFR-2, 但是只有在分化后才能观察到 FGFR-2 前体, 而且随着分化成熟前体表达逐渐增多, 14 天达到高峰, 14 日龄脂肪细胞也是葡萄糖吸收试验和磷酸化试验的最佳时间. 提示 FGFR-2 前体蛋白与受体的生物活性有关. 此外, 还注意到分化前有分子质量在 64~98 ku 之间的受体降解产物, 说明 FGFR-2 在前脂肪细胞中不稳定(图 9).

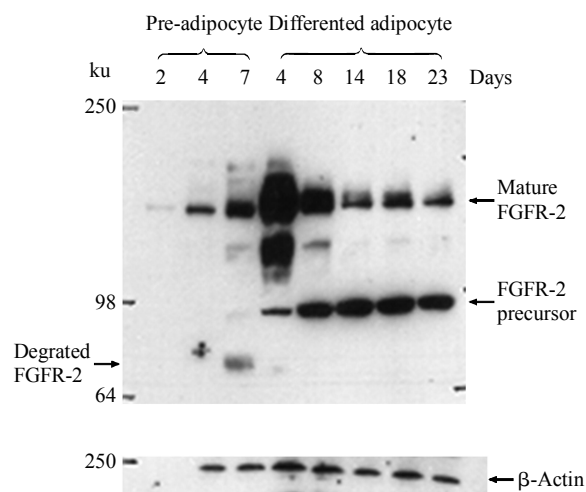


Fig. 9 FGFR-2 differential expression during 3T3L1 differentiation

The expression level of FGFR-2 were analyzed by immunoblot before and during 3T3L1 differentiation.

3 讨 论

自从 2005 年 Kharitononkov 等报道 FGF-21 有很强的调节血糖作用, 有望成为 2 型糖尿病的理想药物, 对 FGF-21 的研究就成为目前糖尿病研究领域的热点之一. 探讨 FGF-21 调节糖代谢机理是研究的主要内容. 迄今还没有 FGF-21 受体的详细报道. FGF-21 调节血糖和血脂的机理还不清楚. 本试验的目的是明确 FGF-21 的功能受体.

应用偶联剂研究配体 / 受体的特异性和亲和力已有悠久的历史. 早在 1985 年, Neufeld 等^[24]用双功能交联剂 DSS(disuccinimidyl suberate)将 FGF-2 与 BHK-21 细胞表面分子相交联, 发现分子质量大小分别为 145 ku 和 125 ku 的两个 FGF 受体分子. 1986 年, Moenner 等^[25]分别用 DSS 和 EGS(ethylene

glycol bis [succinimidylsuccinate]) 将 EDGF (eye-derived growth factor)-1 与牛晶状体上皮细胞(bovine epithelial lens cells, BEL)上的表面分子相交联发现了分子质量大小为 130 ku 的 EDGF-1 受体分子. 同年, Neufeld 等^[26]用 DSS 分别将 FGF-1 和 FGF-2 与 BHK-21 细胞表面的 FGF 受体相交联, 发现两者所形成的 FGF/ 受体复合物完全相同, 确定了 FGF-1 和 FGF-2 能与相同的受体结合, 并且两者与受体结合的亲和力不同. 本文用交联剂 BS³ 将 FGF-21 与脂肪细胞表面分子相交联, 旨在发现 FGF-21 的特异性受体.

前期结果表明, FGF-21 可促进 3T3L1 脂肪细胞对葡萄糖的吸收作用, 鼠源 FGF-21 也具有相同的功能^[27], 但对未分化的 3T3L1 细胞却没有作用, 这与 Kharitononkov 等^[2]所报道的相一致, 说明分化后的 3T3L1 脂肪细胞表达 FGF-21 的功能受体. 因此, 分化的 3T3L1 脂肪细胞是研究 FGF-21 受体的最好模型. 本文以 3T3L1 脂肪细胞为靶标, 旨在寻找 FGF-21 在脂肪细胞中的功能受体. 结果表明, 在交联剂 BS³ 存在的条件下 FGF-21 可与 3T3L1 脂肪细胞的膜蛋白形成分子质量大于 250 ku 的 2 个特异性复合物, 在前脂肪细胞中不能形成, 与葡萄糖吸收试验结果一致. 根据以往的研究结果, 多数 FGF 以二聚体的形式与其受体结合, 即 2 个 FGF 分子与 2 个 FGF 受体发生特异性结合, 根据 FGF 和 FGF 受体的分子质量, FGF/ 受体复合物的大小应在 300 ku 左右. 本试验获得的 FGF-21/ 受体复合物在 250 ku 以上(由于没有大于 250 ku 的标准分子质量, 无法准确估计 FGF-21/ 受体复合物的分子质量)与此相符, 提示复合物中可能含有 FGF 受体.

为明确复合物的内涵, 对复合物进行了免疫检测, 发现抗 FGFR-2 抗体与其中一个复合物发生特异性反应, 提示 FGFR-2 是复合物的组成成分. FGF 受体的结构中含酪氨酸激酶区域, 该区域在 FGF/ 受体的信号传导中被磷酸化, 因此可以作为鉴定功能受体的依据. 早在 1988 年, Coughlin 等^[28]在研究 FGF-1 和 FGF-2 刺激体内酪氨酸激酶活性时发现, FGF-1 和 FGF-2 可以刺激 3T3 成纤维细胞酪氨酸磷酸化, 并用抗磷酸化酪氨酸抗体进行免疫印迹证实了这一结果. 为明确 FGF-21 与 FGFR-2 的特异性关系, 我们检测了 FGFR-2 对 FGF-21 处理后的酪氨酸磷酸化反应, 结果表明, FGF-21 处理 3T3L1 脂肪细胞 10 min 后可特异性引

起 FGFR-2 酪氨酸磷酸化, 同样的处理方法对前脂肪细胞 FGFR-2 无作用. 这一结果与报道的 FGF-21 在 3T3L1 中的葡萄糖吸收试验相符. 为进一步明确 FGF-21 与 FGFR-2 的直接关系, 通过逆转录病毒转导的方式, 将来自 3T3L1 脂肪细胞的全长 FGFR-2 转染到无 FGFR-2 表达的 BaF3 细胞中, 观察异位表达的 FGFR-2 对 FGF-21 的应答情况. 结果表明 FGF-21 可使异位表达的 FGFR-2 磷酸化, 并且这种磷酸化作用呈剂量依赖性. 综上所述, 我们可以作出这样的结论: FGFR-2 是 FGF-21 在 3T3L1 脂肪细胞中的功能受体(或功能受体之一), 参与 FGF-21 诱导的糖代谢活动. FGFR-2 至少有 2 种剪切异构体, 即 FGFR-2 IIIb 和 FGFR-2 IIIc, 为明确 FGF-21 受体类型, 通过 RT-PCR 技术从 3T3L1 脂肪细胞中克隆了 FGFR-2 cDNA, DNA 测序结果表明 3T3L1 只表达 FGFR-2 IIIc, 没有发现 IIIb, 因此推测 FGF-21 的受体应该是 FGFR-2 IIIc.

前期结果表明, 3T3L1 在分化前后均表达 FGFR-2, 但是 FGF-21 只对分化后的脂肪细胞后发挥作用, 包括促进葡萄糖吸收和诱导 FGFR-2 磷酸化, 对前脂肪细胞无作用. 为明确 FGFR-2 在脂肪细胞分化前后的作用机理, 我们观察了在 3T3L1 分化过程中 FGFR-2 的表达情况. 3T3L1 细胞分化前后均表达成熟的 FGFR-2, 而且表达水平无明显差异. 不同的是分化前在分子质量 64~98 ku 之间出现了 FGFR-2 降解产物, 而分化后观察不到这种现象, 说明 FGFR-2 在前脂肪细胞中不稳定. 分化第 4 天成熟受体表达显著增加, 分化后 14 天恢复到分化前水平. 分化后最明显的特征是受体的前体分子大量表达, 分化后第 8 天达到高峰, 在成熟的脂肪细胞中一直保持较高水平. 提示, 在脂肪细胞中 FGFR-2 的总体表达水平提高, 表达速度增强, 配体/受体内吞作用加快, 受体变得活跃. 这可能是 FGFR-2 从前脂肪细胞中无活性状态变为脂肪细胞中有活性的重要原因. 此外, 也不排除在脂肪细胞表达的其他蛋白参与 FGF-21/受体的活性. 如最近报道的 β -Klotho 参与 FGF-21/受体的反应^[29].

本文明确 2 个 FGF-21/受体复合物中的一个复合物, 即大分子复合物至少由 FGF-21 和 FGFR-2 构成, 但对小复合物的化学特性还不清楚, 有待进一步研究证实.

参 考 文 献

- Mohammadi M, Olsen S K, Ibrahimi O A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, **16**(2): 107~137
- Kharitonov A, Shiyanova T L, Li D S, *et al.* FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest*. 2005, **115**(6): 1627~1635
- Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, *et al.* Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1492**(1): 203~206
- Kharitonov A, Wroblewski V J, Koester A, *et al.* The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology*, 2007, **148**(2): 774~781
- Wente W, Efanov A M, Brenner M, *et al.* Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes*, 2006, **55**(9): 2470~2478
- Moyers J S, Shiyanova T L, Mehrbod F, *et al.* Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling. *J Cell Physiol*, 2007, **210**(1): 1~6
- Huang X, Yu C, Jin C, *et al.* Forced expression of hepatocyte-specific fibroblast growth factor 21 delays initiation of chemically induced hepatocarcinogenesis. *Mol Carcinog*. 2006, **45**(12): 934~942
- Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, *et al.* Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-Mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab*, 2007, **5**(6): 415~425
- Badman M K, Pissios P, Kennedy A R, *et al.* Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab*, 2007, **5**(6): 426~437
- Chen W W, Li L, Yang G Y, *et al.* Circulating FGF-21 levels in normal subjects and in newly diagnose patients with type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2008, **116**(1): 65~68
- Wang H, Qiang L, Farmer S R. Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Mol Cell Biol*, 2008, **28**(1): 188~200
- Lundäsen T, Hunt M C, Nilsson L M, *et al.* PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **360**(2): 437~440
- Hsueh H, Pan W, Kastin A J. The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides*, 2007, **28**(12): 2382~2386
- Powers C J, McLeskey S W, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer*, 2000, **7**(3): 165~197
- Eswarakumar V P, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, **16**(2): 139~149
- Yeh B K, Igarashi M, Eliseenkova A V, *et al.* Structural basis by which alternative splicing confers specificity in fibroblast growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(5): 2266~2271
- Olsen S K, Ibrahimi O A, Raucci A, *et al.* Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(4): 935~940

- 18 Pellegrini L, Burke D F, von Delft F, *et al.* Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature*, 2000, **407**(6807): 1029~1034
- 19 Plotnikov A N, Schlessinger J, Hubbard S R, *et al.* Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell*, 1999, **98**(5): 641~650
- 20 Bellot F, Crumley G, Kaplow J M, *et al.* Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO J*, 1991, **10**(10): 2849~2854
- 21 Schlessinger J, Plotnikov A N, Ibrahim O A, *et al.* Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Molecular Cell*, 2000, **6**(3): 743~750
- 22 Xie M H, Holcomb I, Deuel B, *et al.* FGF-19, a novel fibroblast growth factor with unique specificity for FGFR4. *Cytokine*, 1999, **11**(10): 729~735
- 23 Ezzat S, Asa S L. FGF receptor signaling at the crossroads of endocrine homeostasis and tumorigenesis. *Horm Metab Res*, 2005, **37**(6): 355~360
- 24 Neufeld G, Gospodarowicz D. The identification and partial characterization of the fibroblast growth factor receptor of baby hamster kidney cells. *J Biol Chem*, 1985, **260**(25): 13860~13868
- 25 Moenner M, Chevallier B, Badet J, *et al.* Evidence and characterization of the receptor to eye-derived growth factor I, the retinal form of basic fibroblast growth factor on bovine epithelial lens cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**(14): 5024~5028
- 26 Neufeld G, Gospodarowicz D. Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. *J Biol Chem*, 1986, **261**(12): 5631~5637
- 27 姜媛媛, 刘铭瑶, 任桂萍, 等. 鼠源成纤维细胞生长因子-21 对脂肪细胞糖代谢的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(2): 157~164
Jiang Y Y, Liu M Y, Ren G P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(2): 157~164
- 28 Coughlin S R, Barr P J, Cousens L S, *et al.* Acidic and basic fibroblast growth factors stimulate tyrosine kinase activity *in vivo*. *J Biol Chem*, 1988, **263**(2): 988~993
- 29 Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, *et al.* β Klotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(18): 7432~7437

Fibroblast Growth Factor Receptor-2 Involved in FGF-21-mediated Glucose Metabolism*

REN Gui-Ping**, LI Lu**, SUN Guo-Peng, HOU Yu-Ting, WANG Wen-Fei, LI De-Shan***

(College of Life Science, North-east Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract FGF-21 is a new member of FGF family and reported to regulate glucose metabolism, as well as lipid homeostasis, therefore, FGF-21 is a potential therapeutics for treatment of diabetes and metabolic syndrome. However, little is known about its functional receptor(s) and mechanism of action. The aim of the paper is to investigate the functional receptor(s) for FGF-21 in order to understand the mechanism of action of the molecule. Previous result showed that FGF-21 could stimulate glucose uptake in differentiated 3T3L1 adipocytes, but not in pre-adipocytes, suggesting that differentiated 3T3L1 adipocytes express functional receptor (s) for FGF-21. Therefore, the differentiated 3T3L1 adipocyte is a perfect target for searching receptor (s) of FGF-21. 3T3L1 pre-adipocytes were differentiated into adipocytes. The cell membrane of the life adipocytes were incubated with FGF-21 which was labeled with either Flag-tag or biotin, the FGF-21/receptor complexes were cross-linked once they interacted by cross-link reagent BS³. The FGF-21/receptor complexes were immunoprecipitated by either Flag antibody or streptavidin and analyzed by SDS-PAGE. The results showed that FGF-21 could form putative FGF-21/receptor (s) complexes with surface membrane protein of differentiated 3T3L1 adipocytes, not pre-adipocytes. The molecular mass of the complexes is proximate 300~400 ku. The complexes were formed by the FGF-21 labeled with either Flag-tag or biotin, suggesting the complex formation was not influenced by different labeling. To understand the component of the FGF-21/receptor(s) complexes, Western blot assay was used to examine the interaction of the complexes with known antibodies. FGFR-2 was detected within the FGF-21/receptor complexes by specific antibody for FGFR-2. To confirm the specific relationship between FGF-21 and FGFR-2, FGF-21-induced FGFR-2 tyrosine-phosphorylation was studied in 3T3L1 adipocytes. The results showed that although FGFR-2 was expressed in both pre-adipocytes and adipocytes FGF-21 could only enable adipocyte-expressed FGFR-2 tyrosine phosphorylation, which was consistent with glucose-uptake by FGF-21 in this two cell types. FGF-21 not only phosphorylated *in situ* adipocyte-expressed FGFR-2, but also ectopically expressed FGFR-2 in mouse pre-B cell line BaF3 cells. Sequencing analysis of FGFR-2 cDNA from

adipocytes revealed that FGFR-2 III c was the only subtype of FGFR-2 expressed in adipocytes, suggesting that FGFR-2 III c is at least one of the functional receptors for FGF-21 and involved in glucose metabolism in the cells. In order to understand the reason why the same FGFR-2 only functions in adipocyte and not in pre-adipocytes, differential expression of FGFR-2 before and after 3T3L1 cell differentiation was systematically analyzed, the result showed that adipocytes expressed high level precursors of FGFR-2, which were not observed in pre-adipocytes, suggesting FGFR-2 turn-over rate could be a key factor to determine the function the molecule. Alternatively, adipocyte-specific molecules could be another key factor participating the signal transduction of FGF-21.

Key words FGF-21, adipocytes, FGF-21/FGF receptor-2 complex, FGFR-2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00323

*This work was supported by a grant from Science and Technology Planning Program of Heilongjiang Province (2006G0461-00).

**REN Gui-Ping and LI Lu contributed equally to this paper.

***Corresponding author. Tel: 86-451-55190645, E-mail: deshanli@163.com

Received: May 5, 2008 Accepted: July 28, 2008

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

谷地云冷杉林对全球气候变化的响应

王庆贵 著

978-7-03-021997-8 ¥ 58.00 2009 年 1 月 出版

本文详细分析了黑龙江省尤其是研究地区近 50 年来的气候变化, 同时通过人工模拟气候变化, 系统地研究了谷地云冷杉林对于全球气候变化的响应。从红皮云杉本身的生物学特性、红皮云杉幼苗对温湿度变化的响应、气候变化背景下的红皮云杉病虫害发生情况、谷地云冷杉林的生境条件, 以及气候变化作为驱动力是否会导致红皮云杉物种变异等角度入手, 揭示了谷地云冷杉林对于全球气候变化的响应表现为明显的衰退。

本书为森林生态学和全球变化科学领域的专著, 可供高等农林院校研究生、教师及相关科研人员参考。

清洁农作和林作在低碳经济中的作用

(美)Z.威利 B.查米迪斯 主编 林而达 郭李萍 李迎春 等译

978-7-03-023850-4 ¥ 75.00 2009 年 1 月 出版

美国一些地方政府为应对气候变化鼓励实行低碳经济, 减少二氧化碳排放的信用额将逐渐成为一个可在市场自由买卖的商品。农民和其他土地所有者都可以参与到这个新型的经济体系之中, 他们通过土地管理措施增加固碳或减少温室气体排放, 然后将产生的碳信用卖给工厂用于抵消工业过程中排放的温室气体。为了回答上述过程中任何具体的农业或林业项目将会减少多少温室气体排放量的问题, 作者应用独特和广泛的经验提供了陆地生态系统温室气体抵消量的计算方案。这基于一个合理的、科学层面上的清晰的定义和标准。这种标准将会给类似的温室气体买方和卖方建立一个确定抵消量的基础。

本书是清洁农作和林作确立、测量和核证温室气体抵消量的一本指南。

本指南的翻译出版将帮助我们了解一个能够看得见的国际合作应对气候变化的市场机制的机会。因为本指南已经在美国和世界其他地方寻求控制温室气体排放的政策机构提供了重要的指导。

本书的第一部分用非技术性的语言阐述了如何评估项目的成本和效益, 如何量化不同环境和条件下的抵消量, 如何认证和注册抵消量。第二部分提供了与农业和林业活动中产生抵消量有关的具体技术信息, 即确定项目抵消量的步骤。

本书可供从事全球变化、农业气象、生态、环境、农业、林业、土壤、畜牧业等领域的研究人员, 从事清洁发展机制(CDM)及碳交易的专业技术人员、教学人员和相关专业的研究生、大学生, 从事相关计划、宣传、管理的人员参考。同时也可以为土地承包者、农民、林业管理者、温室气体排放交易者、投资者、政策制定者等非专业人士提供技术指导。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学销售中心, 联系人: 周文宇 联系电话: 010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目