

鼠源成纤维细胞生长因子-21 对 脂肪细胞糖代谢的作用*

姜媛媛^{1)**} 刘铭瑶^{1)**} 任桂萍¹⁾ 王文飞¹⁾ 刘晓民²⁾ 李德山^{1)***}

(¹⁾东北农业大学生命科学学院生物制药教研室, 哈尔滨 150030; ²⁾哈尔滨医科大学第一附属医院内分泌科, 哈尔滨 150001)

摘要 成纤维细胞生长因子-21(FGF-21)是 FGF 家族的成员之一。近年发现 FGF-21 是一种新的代谢调节因子。从小鼠肝脏克隆 FGF-21 cDNA, 经测序正确后亚克隆至具有羟胺切割位点的小泛素相关修饰物表达载体上, 转化宿主菌 Rosetta, 得到的转化子经 IPTG 诱导后获得稳定、高效、可溶的表达产物。表达产物经羟胺切割、透析、复性、柱层析纯化后, 在每升宿主菌中可获得 4 mg 纯度为 95% 的成熟鼠源 FGF-21 蛋白, 利用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶(POD-GOD)法在小鼠 3T3-L1 脂肪细胞中进行生物学活性检测。结果表明, 鼠源 FGF-21 具有促进脂肪细胞吸收葡萄糖的作用, 短期作用(1 h)与胰岛素相似, 长期作用(8 和 12 h)明显优于胰岛素。这一结果为以鼠源 FGF-21 为模型进一步研究 FGF-21 的生物学活性及其在糖代谢方面的作用机理奠定了基础。

关键词 成纤维细胞生长因子-21, 糖尿病, 糖代谢, 3T3-L1

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00311

糖尿病是一种常见的代谢疾病, 目前我国糖尿病患者已达 4 000 万左右^[1], 其患病率在过去 20 年中上升了 4 倍, 并呈现日益加速的态势^[2]。糖尿病慢性并发症及其终点事件具有明显致死致残的特点, 已成为危害人类健康和生命的重要杀手, 严重危害人们的健康^[3, 4]。因此如何更有效地控制血糖、防止糖尿病并发症的发生发展, 已成为糖尿病治疗中的热点和难点问题^[5]。

糖尿病患者中 2 型糖尿病患者占 80% 以上, 2 型糖尿病是一种缓慢进展性疾病, 其发病的生理基础是胰岛素抵抗和 β 细胞功能受损, 持续高血糖可损害胰岛 β 细胞功能及外周组织对胰岛素的敏感性^[1, 2]。近年来, 随着人们对糖尿病本质的深层次揭示和现代分子生物学手段的发展, 基因治疗^[6]、新型胰岛素制剂促泌剂和增效剂的临床应用, 使糖尿病治疗取得了长足进展。但仍然存在一些不容忽视的问题, 如低血糖、体重增加、继发失效、心血管毒副作用或药物的性价比差等。因此, 探寻更优良的新型药物是糖尿病临床实践中现实而紧迫的任务^[7, 8]。

成纤维细胞生长因子-21(FGF-21)是最近发现

的 FGF 家族中的一员, 主要在肝脏中表达, 脂肪组织可能是其作用靶点^[9]。一些动物实验表明, 它可以不依赖胰岛素调节血糖^[10], 改善 2 型糖尿病患者的胰岛素抵抗, 大剂量用药也不会导致低血糖的发生^[11], 对一些组织细胞的脂类代谢也有调节作用。因此, FGF-21 有很大潜力成为治疗 2 型糖尿病的新型药物。FGF-21 是 FGF 家族的新成员, 目前人们对其了解还很少, 其在生理和病理情况下的作用机理也不十分清楚。迄今世界上对鼠源 FGF-21 功能研究方面的报道很少, 本研究从小鼠肝脏中成功地克隆出 FGF-21cDNA, 在原核细胞中获得大量、稳定表达, 并通过葡萄糖氧化酶-过氧化物酶(POD-GOD)法对已纯化好的鼠源 FGF-21 蛋白在 3T3-L1 脂肪细胞模型中进行了生物活性鉴定, 结果表明, 纯化的鼠源 FGF-21 具有在脂肪细胞中

* 黑龙江省科技厅重点攻关项目(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: 2008-04-29, 接受日期: 2008-06-30

促进葡萄糖吸收的活性,并具有剂量依赖性,与同样具有促进葡萄糖吸收的胰岛素相比,作用一定时间后比胰岛素作用效果更明显.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、受体菌和细胞株. 质粒 pMD18-T 和自构建表达载体、受体菌 *E. coli* 菌株 DH5 α 、Rosetta(含 DE3)由东北农业大学生命科学学院生物制药教研室提供,小鼠成纤维细胞系 3T3-L1 购自 ATCC.

1.1.2 酶和主要生化试剂. *Bsa* I、*Asc* I 购自 New England BioLabs 公司; dNTPs、其他限制性内切酶、T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; RNA 抽提试剂盒为 Invitrogen 公司产品; IPTG(异丙基硫代- β -D-半乳糖苷), DEPC(焦碳酸二乙酯),溶菌酶,氨苄青霉素(Amp)购自 TaKaRa 公司; DNA 回收试剂盒、WHATMAN 滤纸、硝酸纤维素膜(NC 膜)购自上海华舜生物工程有限公司; Ni-NTA 琼脂糖颗粒购自 QIAGEN 公司; 高糖 DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司,新生牛血清(NCS)、优质胎牛血清(FBS)购自 Invitrogen 公司, dexamethasone (Dex)、isobutyl methylxanthine (IBMX)、重组人胰岛素购自 Sigma 公司; 葡萄糖检测试剂盒购自四川迈克科技有限责任公司. 其他化学试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 引物设计. 本研究的目的是克隆出鼠源 FGF-21,并在 *E. coli* 中表达小泛素相关修饰物^[12]-鼠源 FGF-21 融合蛋白,最终得到成熟 FGF-21 纯品,为进一步研究其生物学活性及调节代谢作用的机理奠定基础. 但因小泛素相关修饰物蛋白酶价格昂贵并且在国内购买比较困难,故我们在构建融合蛋白表达载体时在小泛素相关修饰物和鼠源 FGF-21 两基因间加入了羟胺切割位点,可使得融合蛋白经过羟胺切割后得到成熟 FGF-21. 根据 GenBank 中的 FGF-21 完整 cDNA 序列,利用引物设计软件 Primer 5.0 分析设计克隆引物 P1、P2,并在 P1 中加入了 *Nco* I 酶切位点以便于重组质粒的鉴定. 依据软件分析得到的成熟蛋白 FGF-21 cDNA 序列,设计用于连接表达载体的引物 P3、P4. 合成 5'端引物 P3 时加入酶切位点 *Asc* I 及羟胺切割位点 AAT-GGT,从而在 FGF-21 基因插入自构建的表达质粒后,两蛋白质之间形成了羟胺切割位点 Asn-Gly^[13],3'端引物 P4 是从 TAA 开始 3'

端编码区内的序列,并加入了酶切位点 *Bam*H I (如下划线部分). 引物均由 Invitrogen 公司合成.

P1, 5' CATGCCATGGAATGGATGAGATC,
Nco I

P2, 5' TCAGGACGCATAGCTGGGGCTTCGG,

P3, 5' GGCGCGCC AATGGT TACCCCATCCCT-
Asc I 羟胺切割

GACTCCAGCCCCC, P4, 5' CGCGGATCC TTA -
*Bam*H I

GGACGCATAGCTGGGGCTTCGG.

1.2.2 鼠源 FGF-21 克隆. 从鼠肝中提取出总 RNA,取 100 ng 总 RNA 为模板,以 Oligo(dT)为引物用 RT-PCR 试剂盒合成 cDNA 第一条链. 以 P1、P2 为引物,用 rTaq 酶进行 PCR 扩增(反应体系 25 μ l, 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 15 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min),扩增产物为 638 bp 片段. PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳分离后,胶回收试剂盒回收. 回收的 DNA 利用 T4 DNA 连接酶连接于 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌后进行筛选. 选取阳性克隆提取质粒后,酶切鉴定并进行 DNA 测序.

1.2.3 含羟胺位点小泛素相关修饰物 -FGF-21 融合蛋白表达载体的构建. 以质粒 pMD18-T-鼠 FGF-21 为模板, P3、P4 为引物,用 rTaq 酶进行 PCR 扩增,反应体系为 50 μ l. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 15 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min. 扩增产物和小泛素相关修饰物载体^[12]分别用 *Bam*H I 和 *Asc* I 双酶切,回收酶切片段,回收产物采用 T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,提取重组质粒,将酶切鉴定后的阳性克隆进行测序.

1.2.4 小泛素相关修饰物 - 鼠 FGF-21 融合蛋白的表达. 将含重组质粒小泛素相关修饰物 - 鼠 FGF-21 的表达菌株 Rosetta 单菌落接种至 5 ml 含氨苄青霉素 (100 mg/L) LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 10 h, 以 1 : 100 接种于 500 ml 含氨苄青霉素 (100 mg/L) LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 h, $A_{600}=0.3\sim 0.4$ 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L 进行诱导, 2 h、3 h 分别取样进行 12% SDS-PAGE^[14],并确定目的蛋白的最佳作用时间以及表达的目的蛋白占菌体总蛋白的百分比. 最佳条件下收集菌体经超声破碎后离心^[15],分别取上清和沉淀,进行 12% SDS-PAGE 电泳分析.

1.2.5 鼠源 FGF-21 的纯化.

菌体经超声破碎后离心, 上清经 Ni-NTA 柱亲和层析, 用清洗液(30 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH₂PO₄ pH8.0)洗去杂蛋白后, 用洗脱液(250 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH₂PO₄ pH8.0)洗脱融合蛋白, 收集洗脱的第一、二峰, 即为 FGF-21 融合蛋白.

在融合蛋白洗脱收集液中, 直接加入羟胺切割液^[3], 使终浓度为 1.0 mol/L 盐酸羟胺, 0.1 mol/L N-2- 环己胺基乙磺酸(Ches), 在 45℃ 条件下调节 pH 值至 9.3, 45℃ 反应 3 h 后用 15% SDS-PAGE 检测, 20 mmol/L Tris- HCl(pH8.0)透析以除去切割液. 再经 Ni-NTA 颗粒亲和层析, 收集唯一的洗脱峰, 即为 FGF-21 成熟蛋白, 用洗脱液(250 mmol/L 咪唑, 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaH₂PO₄ pH 8.0)洗脱 Ni-NTA 颗粒结合的小泛素相关修饰物蛋白, 15% SDS-PAGE 检测.

1.2.6 鼠源 FGF-21 的免疫活性检测. 本实验一抗为实验室自制兔抗人 FGF-21 抗体, HRP 标记的二抗为鼠抗兔抗体, 购自 R&D 公司. 将 1.2.5 中所得的 FGF-21 成熟蛋白、小泛素相关修饰物及 BSA 对照样品进行蛋白质印迹分析. 首先将样品进行 15% SDS-PAGE, 转移至硝酸纤维素膜, 用 5% 的脱脂奶粉封闭, 然后将膜用相应一抗 4℃ 孵育过夜约 12 h, 二抗室温孵育 2 h 后, 洗涤, 加入化学发光底物 SuperSignal 检测试剂(PIERCE), 暗室 X 光片暗匣曝光、显影.

1.2.7 3T3-L1 脂肪细胞的分化. 3T3-L1 小鼠成纤维细胞置于含 10% 新生小牛血清 NCS(Invitrogen Corporation)的高糖 DMEM 培养基中, 37℃、5% CO₂, 饱和湿度条件下培养. 试验时以 2.5×10⁴ 的密度接种细胞于 12 孔板中, 待细胞长至接触抑制时, 用含 10% 胎牛血清 FBS、0.25 μmol/L dexamethasone (Dex)、0.5 mmol/L isobutyl methylxanthine (IBMX)、5 mg/L 重组人胰岛素(human recombinant insulin)的 DMEM 培养基分化 48 h 后, 撤去 Dex、IBMX, 用重组人胰岛素再继续分化 48 h, 此后用含 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养 10 天, 每 2 天换一次液直到细胞完成分化, 90% 以上的细胞表现出脂肪细胞特征.

1.2.8 FGF-21 对 3T3-L1 脂肪细胞糖代谢作用的测定.

将已分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞饥饿 12 h, 用不同浓度重组人胰岛素处理细胞 24 h, 取上清培

养基 2 μl 放入 200 μl 的葡萄糖检测液中测定葡萄糖的含量. 每个浓度至少重复 3 次, 并运用统计学分析实验结果.

3T3-L1 脂肪细胞饥饿 12 h, 用不同浓度的成熟鼠源 FGF-21 蛋白处理细胞 24 h 后, 取上清培养基 2 μl 放入 200 μl 的葡萄糖检测液中测定葡萄糖的含量. 每个浓度至少重复 3 次, 并运用统计学分析实验结果.

3T3-L1 脂肪细胞饥饿 12 h, 用 1 000 nmol/L 重组人胰岛素, 1 000 nmol/L 已纯化好的成熟鼠源 FGF-21 蛋白和 1 000 nmol/L 牛血清白蛋白 BSA 单独处理细胞, 在 1 h, 4 h, 8 h, 12 h 分别取培养上清液 2 μl 放入 200 μl 的葡萄糖检测液中测定葡萄糖的含量. 每组数据至少重复 3 次, 并运用统计学分析实验结果.

2 结 果

2.1 RT-PCR 扩增产物鉴定

以鼠肝总 RNA 为模板经 RT-PCR 扩增, 产物大小为 638 bp 左右, 与预期产物大小相符(图 1).

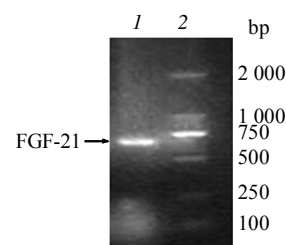


Fig. 1 RT-PCR product of mFGF-21 cDNA

1: RT-PCR product; 2: DNA marker (DL2000).

回收扩增产物, 与 T- 载体连接后转化大肠杆菌 DH5α, 挑选阳性克隆进行 PCR 鉴定和酶切鉴定, 对两者均为阳性的克隆进行测序. 测序结果表明, 该片段包括部分信号肽序列及成熟蛋白序列的完整编码区, 与 GenBank 中的鼠源 FGF-21cDNA 序列完全一致.

软件 ANTHEPROT4.3 分析表明, 成熟鼠源 FGF-21 为 182 个氨基酸残基, 与人源 FGF-21 氨基酸序列同源性约为 80%. 氨基酸序列通过 ExPASy Proteomics 网站分析结果表明, 鼠源 FGF-21 有 1 个 N- 糖苷键连接的糖基化位点, 位于 106 位的 N VYQ, O- 糖苷键糖基化位点有 5 个分别位于 164, 168, 177, 179, 182 的丝氨酸位点上, 无传统肝素结合位点.

2.2 含羟胺切割位点的小泛素相关修饰物-FGF-21 表达载体的构建

以 pMD18-T-FGF-21 为模板, P3、P4 为引物扩增成熟鼠源 FGF-21, 扩增片段为 572 bp, 此片段为鼠源 FGF-21 的成熟蛋白核苷酸序列. 表达载体阳性重组子经测序证明, 小泛素相关修饰物 (SUMO) 与 FGF-21 之间存在羟胺位点, 且成熟 FGF-21 的核苷酸序列以正确的读码框插入到小泛素相关修饰物的下游. 成熟鼠源 FGF-21 插入位置见图 2.

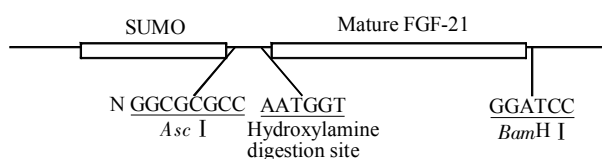


Fig. 2 Part schematic representation of the SUMO expression vector

The FGF-21 cDNA was ligated into SUMO expression vector utilizing *Ascl* I and *BamH* I restriction sites.

2.3 小泛素相关修饰物-鼠源 FGF-21 融合蛋白的表达及纯化

将含重组小泛素相关修饰物-FGF-21 质粒的表达菌株 Rosetta 单菌落接种至 5 ml 含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 培养基中, 37℃ 培养 10 h, 以 1:100 接种于 500 ml 含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 培养基中 37℃ 培养 2 h, $A_{600}=0.3\sim0.4$ 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L 进行诱导, 2 h 和 3 h 后取样进行 12% SDS-PAGE. 结果表明, 该蛋白质大部分是可溶的, 且诱导 3 h 蛋白质表达量较高, 分子质量约为 44 ku (小泛素相关修饰物蛋白只有 10 ku, 但在 SDS-PAGE 时相当于 20 ku 左右^[16,17]). 诱导 3 h 收集的菌体经超声破碎后融合蛋白绝大部分释放到缓冲液中, 离心, 分别取上清和沉淀, 进行 12% SDS-PAGE 分析. 上清经 Ni-NTA 柱亲和层析, 用洗脱液洗脱, 收集洗脱的第 1 峰, 得到纯度较高的融合蛋白, 见图 3.

2.4 融合蛋白的切割及成熟鼠源 FGF-21 的纯化

在融合蛋白洗脱收集液中, 直接加入羟胺切割液, 终浓度为 1.0 mol/L 盐酸羟胺, 0.1 mol/L Ches, pH 9.3 (45℃ 时测) 45℃ 反应 3 h, 用 15% SDS-PAGE 检测, 20 mmol/L Tris-HCl pH8.0 透析以除去切割液, 再经 Ni-NTA 柱亲和层析, 收集唯一的洗脱峰, 得到纯度大于 95% 的目的蛋白即为 FGF-21, 电泳检测, 分子质量约为 24 ku, 小泛素

相关修饰物分子质量为 20 ku (实际分子质量约为 10 ku), 见图 4.

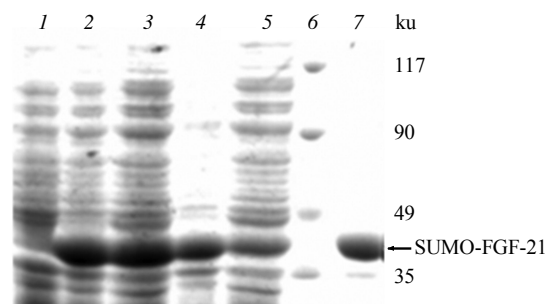


Fig. 3 Analysis of expression products of SUMO-FGF-21 in reduced SDS-PAGE

1: Lysates of *E. coli* cells harboring SUMO expression vector 4 h without IPTG induction; 2: Lysates of *E. coli* cells harboring SUMO expression vector 2 h after IPTG induction; 3: Lysates of *E. coli* cells harboring SUMO expression vector 3 h after IPTG induction; 4: Supernatant of *E. coli* cells harboring SUMO expression vector 3 h after IPTG lysate; 5: Precipitate of *E. coli* cells harboring SUMO expression vector 3 h after IPTG lysate; 6: Protein molecular mass marker; 7: Purified SUMO-mouse FGF-21 protein.

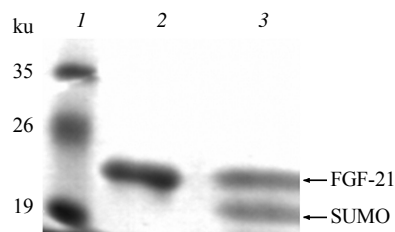


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purification products of the mouse FGF-21

1: Protein molecular mass marker; 2: Purified mouse FGF-21; 3: Cleavage products of mouse FGF-21/SUMO fusion protein after cut with hydroxylamine.

2.5 鼠源 FGF-21 免疫活性蛋白质印迹结果分析

通过软件比对鼠源 FGF-21 与人源 FGF-21 的氨基酸序列同源性达 80.66%, 如图 5 所示, 表明兔抗人全长 FGF-21 抗体可与鼠源 FGF-21 发生很强的交叉反应, 因此可用兔抗人 FGF-21 抗体作为一抗检测鼠源 FGF-21. 蛋白质印迹试验中 1 号泳道加入 1 μ g BSA 作为阴性对照, 2 号泳道加入 1 μ g 小泛素相关修饰物蛋白 (1.2.5 中所得), 3 号泳道加入 10 ng 纯化的鼠 FGF-21 蛋白 (1.2.5 中所得) 作为待检物. 结果分析表明, 只有 3 号泳道的蛋白与抗人 FGF-21 抗体发生反应, 该条带即为鼠源 FGF-21, 分子质量约为 24 ku. 证明抗人 FGF-21 抗体与鼠 FGF-21 反应的特异性, 且所纯化的蛋白为成熟鼠源 FGF-21, 如图 6 所示.

```
1  AYPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDQDTEAHLEIREDGTVVGAHRSPESLLELKALK
    |||
1  .HPIDSSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQDTEAHLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALK

61  PGVIQILGVKASRFLCQPDGALYGSPHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLRLP
    |||
60  PGVIQILGVKTSRFLCQRPDGLYGLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHLP

121 QKDSPNQDATSWGPFVRFLPMPGLLHEPQDQAGFLPPEPPDVGSSDPLSMVEPLQGRSPSY
...  |||. |:. |:. |. |||: ||| .. |:. |:. |:. |. |||: |||: |||
120 GNKSPHRDPAPRGPARFLPLPGLPPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGSPSQGRSPSY

181 AS←Amino acid sequence of mFGF-21
    ||
180 AS←Amino acid sequence of hFGF-21
```

Fig. 5 Homology comparison of mature mouse and human FGF-21

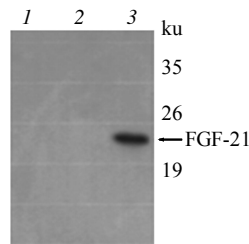


Fig. 6 Western blotting analysis of the mouse FGF-21
1: BSA; 2: SUMO; 3: Mouse FGF-21.

2.6 3T3-L1 脂肪细胞的分化

小鼠成纤维细胞 3T3-L1 形成单层后, 用脂肪细胞分化液 1 (含 5 mg/L 重组人胰岛素, 0.25 μmol/L Dex, 0.5 mmol/L IBMX, 10%胎牛血清的 DMEM 培养基)诱导分化 2 天, 再用脂肪细胞分化液 2 (含 5 mg/L 重组人胰岛素, 10%胎牛血清的 DMEM 培养基)继续诱导 2 天, 此后用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基维持, 每 2 天换一次液, 分化 14 天后, 分化率达 90%以上的细胞方可使用(图 7).

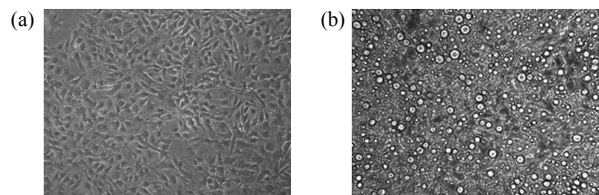


Fig. 7 Differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes (100×)
(a) 3T3-L1 pre-adipocytes. (b) 3T3-L1 adipocytes.

2.7 鼠 FGF-21 有调节脂肪细胞吸收葡萄糖的作用

GOD-POD 法是临床检测血糖常用的方法, 早有文献报道, 可用此方法微量化在细胞水平上检测培养基中的葡萄糖含量. 胰岛素有促进其靶细胞吸收培养基中葡萄糖的作用, 而 3T3-L1 脂肪细胞是胰岛素的靶细胞, 因此本实验用不同浓度的重组人胰岛素刺激已分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞, 24 h 后取样检测. 由实验结果可见(图 8), 胰岛素浓度在 1 nmol/L 时细胞消耗培养基中的葡萄糖达 63.94%, 比未经处理的对照组 55.90%多消耗了 8% 左右, 且随浓度的增加呈剂量依赖关系, 证明该方法的可行性.

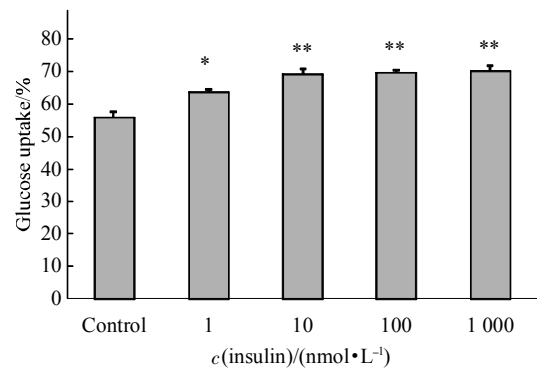


Fig. 8 Dose dependent manner of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by human recombinant insulin stimulation

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.

用不同浓度的鼠源 FGF-21 处理小鼠 3T3-L1 脂肪细胞 24 h, 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, 细胞对葡萄糖的摄取利用显著增加, 与未经任何处理的对照组相比, 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 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗率只有 43.31%, 而经鼠源 FGF-21 作用的脂肪细胞葡萄糖消耗率显著增加, 在浓度为 1 nmol/L 时即可达到 67.63%, 并且随着鼠源 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 86.93%, 比对照增加了 40% 以上(图 9), 进一步说明了脂肪细胞可能是对 FGF-21 敏感的靶细胞.

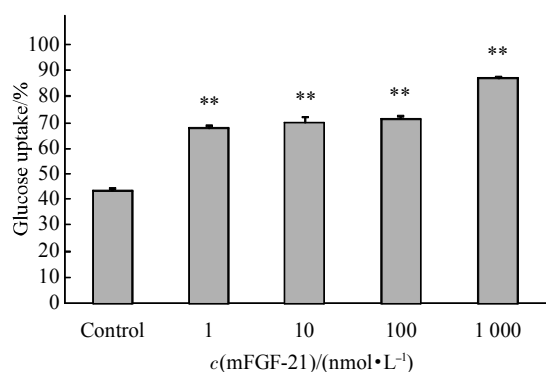


Fig. 9 The glucose uptake of 3T3-L1 adipocytes treated with different concentrations of the mouse FGF-21

The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. $**P < 0.001$ compared with no stimulation control.

分别用 1 000 nmol/L BSA, 1 000 nmol/L 重组人胰岛素, 1 000 nmol/L 鼠源 FGF-21 成熟蛋白处理 3T3-L1 脂肪细胞, 在 1 h, 4 h, 8 h, 12 h 分别取样检测, 实验结果可见, BSA 对细胞的糖代谢无作用, 与未经处理的空白对照组差异不显著, 而胰岛素和鼠源 FGF-21 都能促进脂肪细胞消耗葡萄糖, 随着作用时间的延长, 细胞利用葡萄糖效率越高. 在处理 8 h 后经鼠源 FGF-21 处理的脂肪细胞比未经处理的对照组相比, 葡萄糖利用率显著增加. 鼠源 FGF-21 与胰岛素两处理组再进行差异显著性比较, 8 h 以前两者对细胞的作用效果几近相同, 差异不显著, 在作用 8 h 之后, 鼠源 FGF-21 作用效果比胰岛素要好, 且差异极显著. 本实验表明, FGF-21 作用于靶细胞, 有促进细胞对培养基中葡萄糖摄取、使培养基中残留的葡萄糖含量减少的作用, 并且 FGF-21 作用一定时间后促进细胞葡萄糖吸收的效果显著好于胰岛素的作用(图 10).

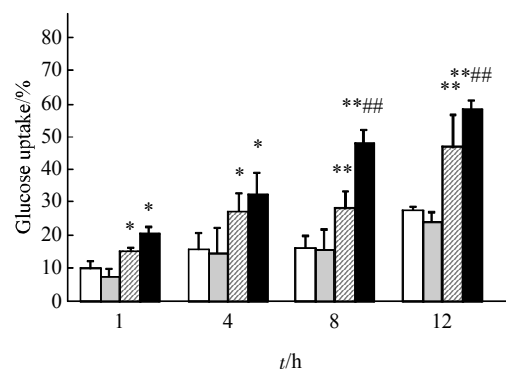


Fig. 10 The glucose uptake of 3T3-L1 adipocytes treated with 1 000 nmol/L BSA, 1 000 nmol/L human recombinant insulin and 1 000 nmol/L mFGF-21 respectively for different length of times (h)

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, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.001$ compared with human recombinant insulin treated cells. □: Control; ▤: 1 000 nmol/L BSA; ▨: 1 000 nmol/L Insulin; ■: 1 000 nmol/L mFGF-21.

3 讨 论

随着人类疾病谱的变化, 2 型糖尿病的发病率致残性和致死性日益突出, 而现有的治疗药物(包括胰岛素增敏剂)的临床综合(或总体)治疗效果并不十分理想^[18, 19]. 2005 年 Kharitononkov 等^[1]首次报道 FGF-21 具有调节血糖的功能. 动物实验表明, FGF-21 作为一种新的血糖调节因子, 可以不依赖胰岛素调节血糖. FGF-21 调节血糖的作用与胰岛素不同, 其作用缓慢且持久. 此外, FGF-21 还有降低血液中甘油三酯和胆固醇的功效. 在调节血脂方面, FGF-21 可选择性地降低低密度脂蛋白胆固醇含量, 升高高密度脂蛋白胆固醇含量. 与其他治疗糖尿病的药物(如促分泌剂或噻唑烷二酮类药物)不同^[20, 21], 用 FGF-21 长期处理的动物模型体重不仅不增加, 而且明显减少, 并且减少的主要是腹部脂肪. 与其他 FGF 家族成员不同, FGF-21 不与肝素结合且没有促进细胞分裂的作用, 长期应用对动物无副作用. 这些结果表明 FGF-21 可能是治疗 2 型糖尿病的理想药物.

为深入研究 FGF-21 的生物学特性, 本文对鼠源 FGF-21 进行了克隆、表达、纯化, 并对其糖代谢的生物活性进行了初步鉴定. 目的是为了明确鼠源 FGF-21 是否与人源 FGF-21 一样具有促进脂肪细胞糖代谢的作用, 是否可以作为人 FGF-21 的模型进一步研究其生物学特性. Kharitononkov 等证明人 FGF-21 具有调节脂肪细胞体内的糖代谢作

用。最近国内有文献报道,在分化后的 3T3-L1 脂肪细胞中,FGF-21 与其功能受体 FGFR-2 结合,参与 FGF-21 诱导的糖代谢活动^[22]。因此本实验以 3T3-L1 脂肪细胞为模型来研究鼠源 FGF-21 的生物活性,运用 GOD-POD 微量法检测鼠源 FGF-21 对 3T3-L1 脂肪细胞吸收葡萄糖的影响。本文首次证明鼠源 FGF-21 与人 FGF-21 一样,可促进脂肪细胞对葡萄糖的吸收作用。而且,这种作用呈剂量依赖性,表明结果的可靠性。鼠源 FGF-21 对脂肪细胞的代谢作用与人重组胰岛素相比,短时间作用(1 和 4 h)效果相似,但是长时间作用(8 和 12 h)明显优于胰岛素。这些结果表明鼠源 FGF-21 可作为模型深入研究 FGF-21 的生物学特性。最近已有一篇文献报道了鼠源 FGF-21 具有促进 3T3-L1 脂肪细胞的脂解作用,但 FGF-21 却不影响甘油三酯的释放^[23]。人们对于 FGF-21 调节脂类代谢的复杂作用尚不清楚,期待进一步研究。

我们先前的实验证明,FGF-21 在大肠杆菌中难以获得非融合蛋白的高效稳定表达,用小泛素相关修饰物蛋白融合表达系统可获得融合蛋白的高效表达,经过小泛素相关修饰物蛋白酶切割可获得天然有活性的目的蛋白^[24, 25]。但由于该酶价格昂贵,给大量获取活性蛋白带来困难,因此我们在原来研究的基础上,改变了融合蛋白的切割方式,在小泛素相关修饰物蛋白与 FGF-21 之间引入了羟胺切割位点。小泛素相关修饰物表达的融合蛋白经过羟胺切割后释放 FGF-21,由于小泛素相关修饰物蛋白加入了多聚组氨酸可以与 Ni-NTA 琼脂糖颗粒结合,而目的蛋白则没有此位点,因此将羟胺切割液用 20 mmol/L Tris-HCl pH8.0 透析后,可以利用亲和层析分离出 FGF-21。成熟鼠源 FGF-21 预测分子质量为 20 ku,但在 SDS-PAGE 中其分子质量约为 24 ku。本研究采取的羟胺切割只引入了一个小分子的中性氨基酸甘氨酸(Gly),通过葡萄糖吸收实验检测其对 FGF-21 的生物活性无影响。本研究将为 FGF-21 的下一步研究工作奠定基础。

参 考 文 献

- 李延兵,翁建平,陈小华,等. 短期持续胰岛素输注治疗对初诊 2 型糖尿病患者胰岛 β 细胞功能的影响. 中国糖尿病杂志, 2003, **11**(1): 10~15
Li Y B, Weng J P, Chen X H, *et al.* Chin J Diabetes, 2003, **11**(1): 10~15
- 李华珠,王 敏,刘湘华,等. 短期胰岛素强化治疗初诊 2 型糖尿病对胰岛素 β 细胞功能影响的观察. 中国医师杂志, 2004, **6**(1): 82~83
Li H Z, Wang M, Liu X H, *et al.* J Chin Physician, 2004, **6**(1): 82~83
- Uusitupa M I, Niskanen L K, Siitonen O, *et al.* Ten-year cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipo-protein composition in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic and non-diabetic subjects. Diabetologia, 1993, **36** (11): 1175~1184
- Clark C M Jr. How should we respond to the worldwide diabetes epidemic. Diabetes Care, 1998, **21**(4): 475~476
- Aiello L P, Gardner T W, King G L, *et al.* Diabetic retinopathy. Diabetes Care, 1998, **21**(1): 143~156
- 李 鸿,苏本利. 糖尿病基因治疗的新进展. 生物化学与生物物理进展, 2003, **30**(1): 24~26
Li H, Su B L. Prog Biochem Biophys, 2003, **30**(1): 24~26
- Mooradian A D. Drug therapy of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the elderly. Drugs, 1996, **51**(6): 931~941
- Scheen A J. Drug treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the 1990s. Achievements and future developments. Drugs, 1997, **54**(3): 355~368
- Wente W, Efanov A M, Brenner M, *et al.* Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and akt signaling pathways. Diabetes, 2006, **55**(9): 2470~2478
- 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
- Kharitonov A, Shivanova T L, Koester A, *et al.* FGF-21 as a novel metabolic regulator. J Clin Invest, 2005, **115**(6): 1627~1635
- Marblestone J G, Edavettal S C, Lim Y, *et al.* Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: Enhanced expression and solubility with SUMO. Protein Science, **15**(1): 182~189
- Bornstein P, Balian G. Cleavage at Asn-Gly bonds with hydroxylamine. Meth Enzy-Mol, 1997, **47**(Part E): 132~145
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 9880~9898
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* Short Protocols in Molecular Biology, 3rd. Boston: John Wiley & Sons, Inc, 1992. 652~658
- Butt T R, Edavettal S C, Hall J P, *et al.* SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. Protein Expr Purif, **43**(1): 1~9
- Zuo X, Li S, Hall J, *et al.* Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli*. J Struct Funct Gen, 2005, **6**(2-3): 103~111
- Sparano N, Seaton T L. Troglitazone in type II diabetes mellitus. Pharmacotherapy, 1998, **18**(3): 539~548
- Inzucchi S E, Maggs D G, Spollett G R, *et al.* Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. N Engl J Med, 1998, **338**(13): 867~872
- Melchior W R, Jaber L A. Metformin: an antihyperglycemic agent for treatment of type II diabetes. Ann Pharmacother, 1996, **30**(2): 158~164
- Campbell L K, White J R, Campbell R K. Acarbose: its role in the treatment of diabetes mellitus. Ann Pharmacother, 1996, **30**(11): 1255~1262
- 任桂萍,李 璐,孙国鹏,等. 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. 生物化学与生物物理进展, 2009, **36**(2): 165~174
Ren G P, Li L, Sun G P, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2009, **36**(2):

- 165~174
- 23 Arnera P, Pettersson A, Mitchell P J, *et al.* FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes-A possible link to improved insulin sensitivity. *FEBS Letters*, 2008, **582**: 1725~1730
- 24 Zuo X, Mattern M R, Tan R, *et al.* Expression and purification of SARS coronavirus proteins using SUMO fusions. *Protein Expr Purif*, **42**(1): 100~110
- 25 Malakhov M P, Mattern M R, Malakhov O A, *et al.* SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Gen*, 2004, **5**(1-2): 75~86

Cloning, Expression and Purification of Mouse Fibroblast Growth Factor-21 and Its Function in Adipocyte Glucose Metabolism*

JIANG Yuan-Yuan^{1)**}, LIU Ming-Yao^{1)**}, REN Gui-Ping¹⁾, WANG Wen-Fei¹⁾, LIU Xiao-Min²⁾, LI De-Shan^{1)***}

¹⁾Northeast Agricultural University, College of Life Science, Harbin 150030, China;

²⁾The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Department of Endocrinology, Harbin 150001, China)

Abstract Fibroblast growth factor (FGF)-21 is a new member of FGF family. Recently, it is discovered as a potent glucose regulator and a potential drug candidate for treatment of type 2 diabetes mellitus. However the mechanism of action is not known. Mouse FGF-21 (mFGF-21) is the best model for study of the mechanism of action of human counterpart, but function of mFGF-21 has not been reported. The aim of this paper is to study the function of mFGF-21 for glucose regulation. For efficiently production of bioactive FGF-21, a Sumo-His expression vector for efficient expression of soluble recombinant proteins was constructed. A hydroxylamine cleavage site was used to substitute the Sumo protease cleavage site for economic purpose. The mFGF-21 cDNA was cloned from mouse liver and sub-cloned into the Sumo-His expression vector. The mFGF-21 was stably expressed in Rosetta host cells, the expressed products were water-soluble. The Sumo-His-mFGF fusion protein was purified by Ni-NTA Column and subsequently subjected to cleavage with hydroxylamine solution to remove the Sumo-His tag; the mature mFGF-21 was dialyzed against 20 mmol/L Tris buffer (pH 8.0) for re-nature. The mature protein with high purity was obtained. The sequencing result indicated that the mature protein consisted of 182 amino acids. SDS-PAGE gel analysis showed that the protein molecular mass was 24 ku, which was recognized by the polyclonal antibody against FGF-21. The amino acid sequence of mFGF-21 had 80% homology with that of human counterpart which was consistent with the published sequence. To examine the glucose regulation activity of mFGF-21, 3T3-L1 pre-adipocytes were differentiated into adipocytes, glucose up-take activity of mFGF-21 was examined by Glucose Oxidase and Peroxidase (GOD-POD) assay at the 14th day after differentiation when 90% of preadipocytes were differentiated into adipocytes. To validate the glucose uptake assay system commercial available human insulin was used to test the assay system. The result showed that insulin could stimulate glucose uptake of 3T3L1 adipocytes in dose-dependent manner, suggesting the glucose-uptake assay system is valid. mFGF-21 was subsequently tested in this system, the result showed that like human FGF-21 and insulin, mouse FGF-21 could also stimulate glucose uptake of 3T3-L1 adipocytes in dose-dependent manner. To examine time of action of mFGF-21, 1000 nmol/L of mFGF-21 were used to treat differentiated adipocytes for 1, 4, 8 and 12 h respectively, together with the same concentration of insulin and BSA as a positive and negative control. Glucose consumption of the medium was examined. The result showed that both insulin and mFGF-21 had tendency to increase glucose up-take of adipocytes with increment of action time. However, mFGF-21 was more potent and showed stronger time-dependent action, which was in agreement with the function of human FGF-21 as reported previously. BSA did not show any glucose uptake activity as expected. It was conclude that mouse FGF-21 is similar to human FGF-21 and possesses strong bioactivity for glucose homeostasis in 3T3-L1 adipocytes, and therefore can be used as a model for study mechanism of action of human FGF-21. The function of mFGF-21 in glucose metabolism at animal level is remained to be studied.

Key words fibroblast growth factor, diabetes, glucose metabolism, 3T3-L1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00311

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

JIANG Yuan-Yuan and LIU Ming-Yao contributed equally to this work. *Corresponding author.

Tel: 86-451-55190645, E-mail: deshanli@163.com Received: April 29, 2008 Accepted: June 30, 2008