

P7 抑制 bFGF 诱导的 3T3 细胞增殖的作用机制

王 聪^{1,2}, 林绍强^{2,3}, 李校堃³, 吴晓萍^{1,3*}

(1. 暨南大学组织移植与免疫实验中心, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学医学院, 广东 广州 510632;
3. 温州医学院药学院, 浙江 温州 325035)

摘要: 研究从噬菌体随机七肽库中筛选得到的新型 bFGF 拮抗肽 (P7) 抑制 bFGF 诱导的 Balb/c 3T3 细胞增殖的作用机制。采用倒置显微镜观察不同浓度 P7 对细胞形态的影响; 流式细胞术分析 P7 对细胞周期的影响; Western blotting 检测 P7 对 bFGF 刺激的 Balb/c 3T3 细胞中 MAPK 通路的 MEK、Erk1/2 信号分子活化水平的影响。结果显示, 在检测的浓度范围内, P7 对 Balb/c 3T3 细胞形态无显著影响; P7 可改变 bFGF 刺激下 Balb/c 3T3 的细胞周期, 减少 S 期细胞比率, 使细胞阻滞在 G₀/G₁ 期; 并以剂量依赖的方式下调 bFGF 激活的 MEK、Erk1/2 信号分子的磷酸化水平。P7 可能通过阻滞细胞在 G₀/G₁ 期, 下调 MAPK 通路信号分子的活化水平, 从而抑制 bFGF 诱导的 Balb/c 3T3 细胞增殖。

关键词: bFGF; 拮抗肽; 细胞周期; MAPK 通路

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 03-0314-04

Mechanism of inhibitory effect of P7 on 3T3 cell proliferation induced by basic fibroblast growth factor

WANG Cong^{1,2}, LIN Shao-qiang^{2,3}, LI Xiao-kun³, WU Xiao-ping^{1,3*}

(1. Institute of Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. School of Pharmaceutical Science, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract: To investigate the mechanism of inhibitory effect of a novel bFGF antagonist peptide isolated from the phage display random heptapeptide library on cell proliferation induced by basic fibroblast growth factor. The effect of P7 on cell morphology was observed under an inverted microscope. Flow cytometry was applied to analyze the effect of P7 on cell cycle progress of bFGF-stimulated cells. The effect of P7 on bFGF-induced activation of MEK and Erk1/2 in MAPK pathway was detected by Western blotting. The results showed that no significant cell morphology change was observed in the range of detected concentrations of P7. Cell cycle analysis showed that P7 decreased S-phase cell population and arrested cell cycle at the G₀/G₁ phase of bFGF-stimulated cells. The results of MAP kinase activation assay indicated that P7 decreased bFGF-induced MEK and Erk1/2 phosphorylation in a dose-dependent manner. P7 inhibited proliferation of bFGF-stimulated Balb/c 3T3 cells possibly via cell cycle arrest at the G₀/G₁ phase and down-regulation of signal molecular activation in MAPK pathway.

Key words: bFGF; antagonist peptide; cell cycle; MAPK pathway

碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast

growth factor, bFGF) 属于肝素结合生长因子家族, 最初由 Gospodarowicz 于 1974 年从牛脑垂体中提取, 是一种对多种源自间质细胞和神经外胚层细胞具有明显促增殖作用的多肽因子^[1,2]。bFGF 在体内分布广泛且具有多种重要的生物学功能, 其时空表达及表达水平受到精密的调控。研究表明, bFGF 表达的异常上调与肿瘤等多种疾病密切相关, bFGF 被视为与

收稿日期: 2009-09-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973671); 广东省自然科学基金资助项目 (9151064001000031); 温州市科技计划资助项目 (Y20090244); 生物化学与分子生物学广东省重点学科资助项目.

*通讯作者 Tel: 86-20-85220732, Fax: 86-20-85221337,
E-mail: xp_wu2@yahoo.com.cn

bFGF 表达异常上调相关的疾病治疗的靶标之一^[3-5]。作者前期采用噬菌体展示技术,以 bFGF 为靶标,从噬菌体随机七肽库中筛选获得一种可抑制 bFGF 诱导的 Balb/c 3T3 细胞增殖的 bFGF 拮抗肽 (P7)^[6]。本文在此基础上,进一步深入探讨 P7 抑制 bFGF 诱导的 Balb/c 3T3 细胞增殖的作用机制。

材料与方法

细胞株、试剂和仪器 Balb/c 3T3 细胞株为本实验室保存。DMEM 培养基和胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司;P7 由北京赛百盛公司合成 (纯度大于 98%);bFGF 为 Peprotech 公司产品;兔抗人 (鼠) pErk1/2、pMEK 抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体均购自 CST。SDS-PAGE 电泳仪及转膜仪购自 Bio-Rad 公司;Milli-Q 超纯水系统为 Millipore 公司产品;流式细胞仪 (FACSCalibur) 购自美国 Becton Dickinson 公司。

P7 对细胞形态的影响 将 Balb/c 3T3 细胞悬液 100 μL 接种于 96 孔板 (细胞数 5 000/孔),24 h 后每孔加入用 DMEM 完全培养基系列稀释的 bFGF 拮抗肽 P7 100 μL , 设 4 个稀释度 (0.25、1、4 及 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 每个稀释度各 3 个复孔,以 DMEM 完全培养基作空白对照。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中进行培养,每天观察细胞形态。

流式细胞术分析细胞周期 将细胞悬液 (细胞数 $4\times 10^5/\text{mL}$) 1 mL 接种于 6 孔板,24 h 后换为含 0.4% 血清的培养基,饥饿培养 24 h。设置对照组、bFGF 组、P7 (0.25、1、4 及 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + bFGF 组 (P7 与 bFGF 同时加入), 分组加药, bFGF 作用浓度为 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。48 h 后收集细胞,用 75% 冰乙醇于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固

定 30 min。PBS 洗涤 3 次,加入碘化丙啶溶液 (PI, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 300 μL 染色。用 400 目筛网过滤,采用流式细胞仪进行 DNA 含量检测,并用 ModFit LT 细胞周期分析软件分析实验结果。

Western blotting 检测信号分子的活化 将细胞悬液 (细胞数 $4\times 10^5/\text{mL}$) 1 mL 接种于 6 孔板,24 h 后换为含 0.4% 血清的培养基,饥饿培养 24 h。设置空白组、bFGF 组、P7 (0.25、1、4 及 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + bFGF 组及 P7 (0.25、1、4 及 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 单独作用组, 分组加药, bFGF 作用浓度为 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。P7+bFGF 组中,先加入相应浓度的 P7 作用 5 min 后,再加入 bFGF 作用 20 min。PBS 洗涤 3 次,每孔加入 1 \times SDS 上样缓冲液 100 μL , 收集裂解样品,沸水煮 5 min 使蛋白变性,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min (12 000 $\times g$)。取上清液进行 SDS-PAGE 和转膜;转膜完成后,5% 脱脂奶常温封闭 1 h, TBST 洗涤 3 次,抗体孵育后 ECL 试剂显影。以 β -actin 作为内参。

统计学分析 所有实验至少独立重复 3 次。采用 SPSS13.0 医学统计软件的 One-Way ANOVA 法进行 *t* 检验。

结果

1 P7 对细胞形态的影响

倒置显微镜下观察不同浓度 P7 对细胞形态的影响,可见对照组细胞形态正常,生长良好,P7 (0.25~16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对细胞形态没有明显影响,与对照组相比无显著差异 (图 1)。

2 P7 对细胞周期进程的影响

流式细胞术检测不同浓度 P7 对 bFGF 刺激的 Balb/c 3T3 细胞周期分布的影响。结果显示,外源 bFGF

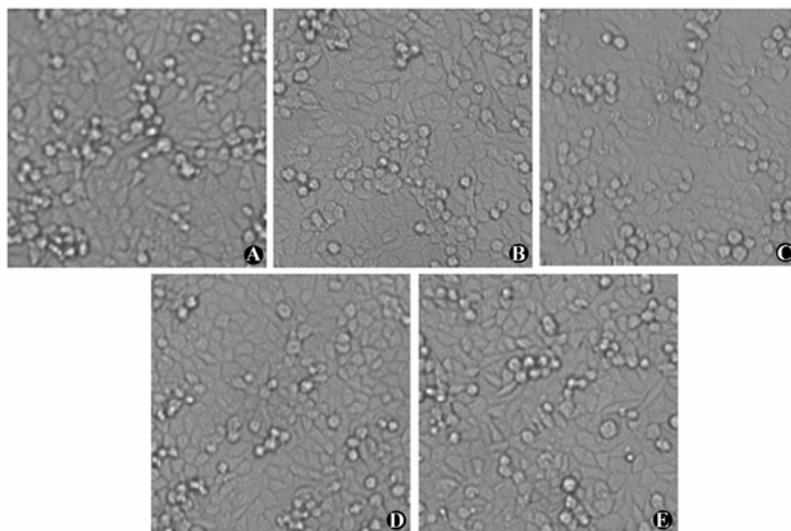


Figure 1 Effect of various concentrations of P7 on cell morphology. A: Control; B: P7 (0.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group; C: P7 (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group; D: P7 (4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group; E: P7 (16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group

刺激可增加S期细胞比率 [从对照组的 (31.62±1.03)% 增加到 (54.56±1.23)%], 与 bFGF 组相比, 加入 P7 可剂量依赖性地减少 S 期细胞比率, 使细胞阻滞在 G₀/G₁ 期 (图 2)。

3 P7 阻断 bFGF 诱导的 MAPK 信号通路

MAPK 信号通路是 bFGF 发挥促细胞增殖活性的主要信号通路。通过 Western blotting 检测 P7 对 bFGF 刺激的 Balb/c 3T3 细胞中 MAPK 通路的信号分子

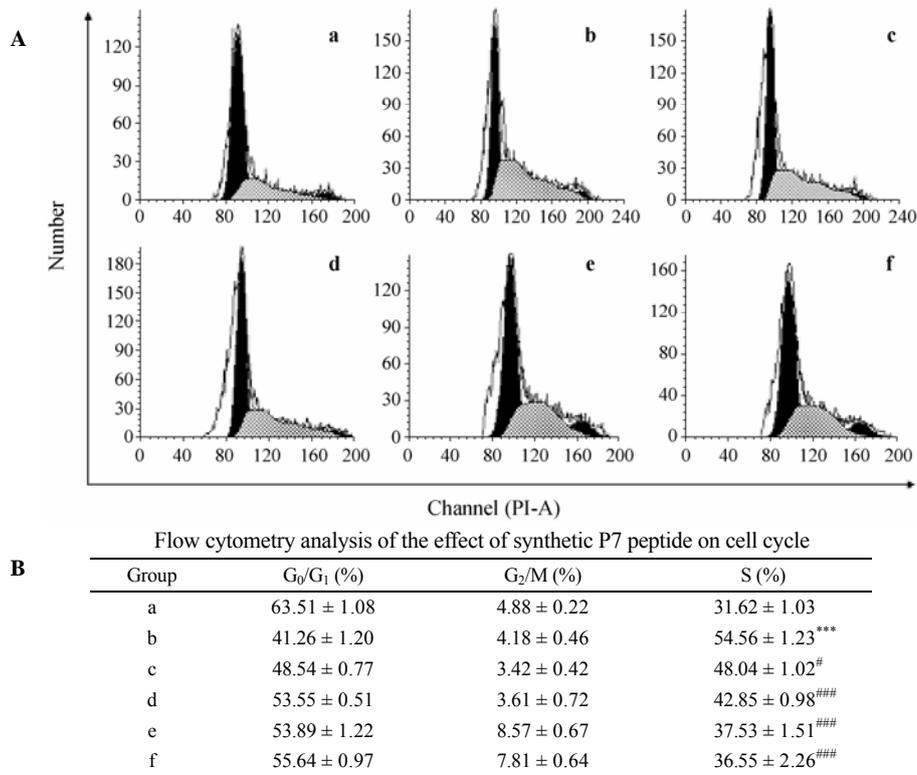


Figure 2 Effect of synthetic P7 peptide on cell cycle distribution of bFGF-stimulated cells by flow cytometry analysis. A: Cells were starved for 24 h and then treated with (b) 10 ng·mL⁻¹ bFGF, (c) 10 ng·mL⁻¹ bFGF plus 0.25 μmol·L⁻¹ P7, (d) 10 ng·mL⁻¹ bFGF plus 1 μmol·L⁻¹ P7, (e) 10 ng·mL⁻¹ bFGF plus 4 μmol·L⁻¹ P7, or (f) 10 ng·mL⁻¹ bFGF plus 16 μmol·L⁻¹ P7 for 48 h; (a) control cells without treatment of bFGF or P7. Data shown are the representative pictures of three independent experiments. B: Cell cycle distribution of the control and treated cells. n = 3, $\bar{x} \pm s$. ^{***}P < 0.001 vs control group (a); [#]P < 0.05, ^{###}P < 0.001 vs bFGF group (b)

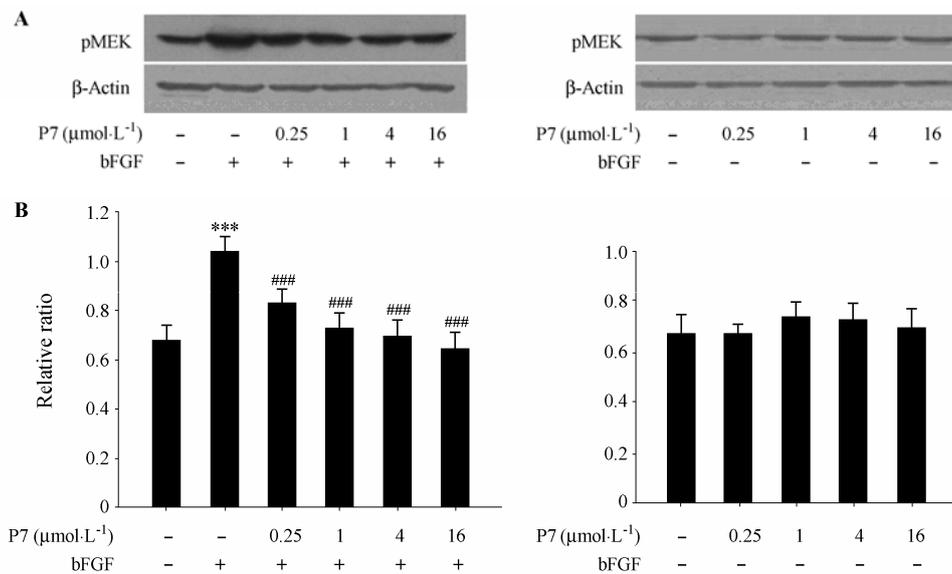


Figure 3 Effect of synthetic P7 peptide on the activation of MEK induced by bFGF. A: The starved cells were pretreated with P7 at the indicated concentrations for 5 min and then stimulated with 10 ng·mL⁻¹ bFGF for 20 min (left), or treated with P7 alone at the indicated concentrations (right). The activation levels of MEK were detected by Western blotting; B: Density ratios of pMEK to β-actin. n = 3, $\bar{x} \pm s$. ^{***}P < 0.001 vs control group; ^{###}P < 0.001 vs bFGF group

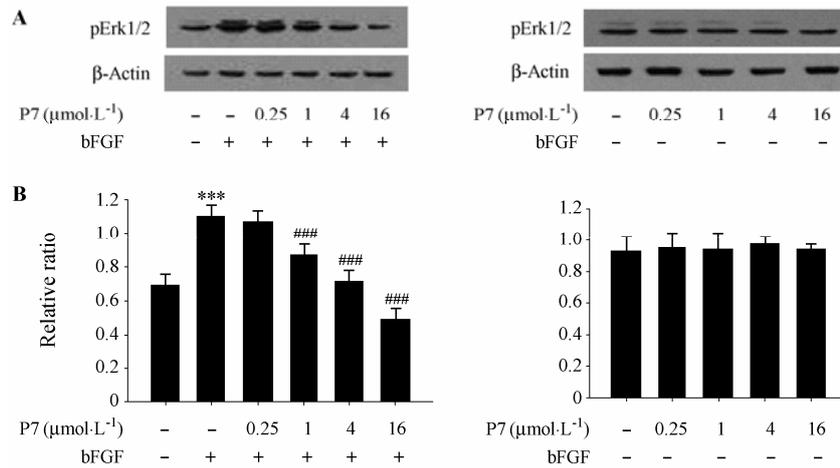


Figure 4 Effect of synthetic P7 peptide on the activation of Erk1/2 induced by bFGF. A: The starved cells were pretreated with P7 at the indicated concentrations for 5 min and then stimulated with 10 ng·mL⁻¹ bFGF for 20 min (left), or treated with P7 alone at the indicated concentrations (right). The activation levels of Erk1/2 were detected by Western blotting; B: Density ratios of pErk1/2 to β -actin. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs bFGF group

MEK 和 Erk1/2 的磷酸化水平变化, 探讨 P7 抑制 bFGF 刺激的细胞增殖是否通过下调促增殖信号分子的活化来实现。结果表明, 外源 bFGF 刺激下胞内 MEK 和 Erk1/2 的磷酸化水平增强, P7 可呈剂量依赖性降低两种信号分子的活化水平, 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ P7 可将 bFGF 刺激的信号分子活化水平降低到与对照组相当, 而 P7 单独作用对两种信号分子的活化水平无显著影响 (图 3 和图 4), 表明 P7 可能通过下调 MAPK 通路的信号分子活化而抑制 bFGF 刺激的细胞增殖。

讨论

前期研究工作表明^[6], bFGF 拮抗肽 P7 在检测的浓度范围 (0.25~16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 内可剂量依赖性地抑制 bFGF 诱导的 Balb/c 3T3 细胞增殖, 本文在此基础上深入探讨其作用机制。首先观察了 P7 对 Balb/c 3T3 细胞形态的影响, 结果显示 P7 (0.25~16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对细胞形态没有明显影响, 排除了 P7 抑制细胞增殖由其细胞毒性引起的可能性。随后的流式细胞术分析细胞周期结果表明, P7 可剂量依赖性地减少 bFGF 刺激的 Balb/c 3T3 细胞的 S 期细胞比率, 使细胞阻滞在 G₀/G₁ 期。此外, 由于 bFGF 通过结合和活化细胞表面受体 FGFRs 而激活胞内信号转导通路, 介导细胞增殖等生物反应^[7]。MAPK 信号通路是 bFGF 发挥促细胞增殖活性的主要信号通路, 因此进一步通过 Western blotting 检测 P7 对 bFGF 刺激的 Balb/c 3T3 细胞中 MAPK 通路的信号分子 MEK 和 Erk1/2 的磷酸化水平变化, 探讨 P7 抑制 bFGF 刺激的细胞增殖是否通过下调促增殖信号分子的活化来实现, 结果显

示 P7 可剂量依赖性地降低 bFGF 激活的胞内 MEK 和 Erk1/2 的活化水平。

综上所述, bFGF 拮抗肽 P7 可能一方面通过改变细胞周期, 使细胞阻滞在 G₀/G₁ 期; 另一方面通过结合 bFGF, 阻挠 bFGF 与受体之间的相互作用, 使 Balb/c 3T3 细胞 MAPK 途径上的信号分子 MEK、Erk1/2 等的磷酸化水平降低, 从而抑制 bFGF 诱导的 Balb/c 3T3 细胞增殖。

References

- [1] Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, et al. Biological roles of fibroblast growth factor-2 [J]. *Endocr Rev*, 1997, 18: 26-45.
- [2] Nugent MA, Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32: 115-120.
- [3] Rusnati M, Presta M. Fibroblast growth factors/fibroblast growth factor receptors as targets for the development of anti-angiogenesis strategies [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13: 2025-2044.
- [4] Cronauer MV, Schulz WA, Seifert HH, et al. Fibroblast growth factors and their receptors in urological cancers: basic research and clinical implications [J]. *Eur Urol*, 2003, 43: 309-319.
- [5] Gross JL, Herblin WF, Dusak BA, et al. Effects of modulation of basic fibroblast growth factor on tumor growth *in vivo* [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85: 121-131.
- [6] Wu XP, Yan QX, Huang YD, et al. Isolation of a novel basic FGF-binding peptide with potent antiangiogenic activity [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 10.1111/j.1582-4934.2008.00506.x (DOI).
- [7] Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, et al. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16: 233-247.