

· 研究论文 ·

筛选糖尿病候选药物 FGF-21 受体激动剂的新型细胞模型的建立

高红梅¹, 王文飞¹, 张巧¹, 韩阳¹, 王琪¹, 任桂萍^{1*},
付云威², 李德山¹

(1. 东北农业大学生命科学学院, 2. 东北农业大学医院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 建立以成纤维细胞生长因子-21 (fibroblast growth factor-21, FGF-21) 信号通路为靶点的药物筛选细胞模型, 用于筛选 FGF-21 受体激动剂类的新型治疗糖尿病药物。FGF-21 的生理功能主要是通过细胞表面的 FGFR 及辅助受体 β klotho 传递信号, 从而激活细胞内相关调控的一系列信号通路以及基因转录来实现的。本实验将 β klotho 基因构建到逆转录病毒表达载体 pBMN-IRES-EGFP。将该载体导入包装细胞, 收集病毒上清液并感染 3T3-L1 细胞, 筛选到稳定表达 β klotho 细胞系。该细胞模型在 FGF-21 作用下可以促进细胞葡萄糖转运蛋白-1 表达及转运水平升高, 从而提高细胞糖吸收能力。构建该细胞系可以方便对 FGF-21 及类似药物进行高通量筛选, 为糖尿病药物的研究提供了一种新方法。

关键词: FGF-21; β klotho; 药物筛选; 糖尿病药物

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 08-0904-06

Establishment of a novel cell model targeted on FGF-21 receptor for screening anti-diabetic drug candidates

GAO Hong-mei¹, WANG Wen-fei¹, ZHANG Qiao¹, HAN Yang¹, WANG Qi¹,
REN Gui-ping^{1*}, FU Yun-wei², LI De-shan¹

(1. College of Life Science of Northeast Agricultural University,
2. Hospital of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The aim of this project is to establish a fibroblast growth factor-21 (FGF-21) signaling pathway targeted cell model, for screening a class of FGF-21 receptor agonists as anti-diabetic candidates. FGF-21 requires β klotho transmembrane proteins as co-receptor for the activation of tyrosine kinase FGF receptor (FGFR) signaling, thereby activating a series of intracellular signaling pathways and regulating gene transcription for glucose metabolism. Firstly a recombinant plasmid expressing co-receptor β klotho and EGFP reporter genes was constructed. After introducing the recombinant plasmid into package cells, the cell culture supernatant was used to infect 3T3-L1 cells, which were then screened for stably expressing β klotho gene. Administration of FGF-21 increased the expression of GLUT1 and stimulated GLUT1-mediated glucose uptake. This novel cell model can be conveniently used in high-throughput drug screening of FGF-21 or FGF-21 analogues.

Key words: FGF-21; β klotho; drug screening; diabetic drug

收稿日期: 2011-01-17.

基金项目: 黑龙江省科技厅重点攻关项目 (2006G0461-00); 黑龙江省博士后科研启动资助金资助; 黑龙江省教育厅项目 (11521022).

*通讯作者 Tel: 86-451-55190645, E-mail: renguiping@126.com

糖尿病是严重危害人类健康的代谢疾病, 目前全球糖尿病患者已达 2.85 亿^[1], 其中 2 型糖尿病约占糖尿病病例的 90% 以上。2 型糖尿病发病机制复杂, 目前临床上主要通过促进胰岛 β 细胞分泌胰岛素或改善靶组织对胰岛素的敏感性进行治疗^[2]。目前, 已有多种类型的治疗 2 型糖尿病药物在临床上应用, 但存在疗效低、副作用大等问题。因此, 开发具有新作用机制或新结构类型的治疗 2 型糖尿病药物已成为新药研发的重点。FGF-21 具有与血糖控制和能量调节有关的重要作用, 发现初期就引起轰动, 普遍认为它将是一个极具潜力的治疗糖尿病新药。与胰岛素相比, FGF-21 不会引起低血糖等副作用; 更能有效促进胰岛 β 细胞合成胰岛素, 促进胰岛 β 细胞的再生和修复, 特别适合于用传统药物治疗不理想的 2 型糖尿病患者, 并可以改善胰岛功能, 延缓疾病的发生发展, 因此 FGF-21 是有巨大研究潜力的新型降糖药物。尤其是该因子可不依赖于胰岛素独立调节机体糖代谢, 为糖尿病药物的研发提供了新的研究方向^[3]。研究发现, FGF-21 的作用机制不同于传统 FGF 家族信号转导, 大多数的 FGF 是在肝素存在的情况下, 通过与具有高亲和力的 FGFR 特异性结合而发挥功能。而 FGF-21 不能直接与 FGFR 发生特异性结合, FGF-21 需要 β *klotho* 转膜蛋白作为复合受体激活 FGFR 信号通路, 促进脂肪细胞吸收葡萄糖^[4, 5]。 β *klotho* 基因编码一种 130 kD I 型跨膜蛋白, 包括 1 个较短的胞内区和 2 个与 β -葡萄糖苷酶有 20%~40% 同源性的内部重复片段的胞外区^[6, 7], 其主要在肝脏、胰脏和脂肪组织中表达, 肠道上皮组织中低量表达, 其他组织中不表达^[8]。本实验以 FGF-21 信号通路为研究靶点, 建立药物高通量筛选细胞模型, 用于筛选新型 FGF-21 激动剂类的治疗糖尿病药物。

材料与方法

质粒、受体菌和细胞株 质粒 pMD18-T 和逆转录病毒真核表达载体 pBMN-IRES-EGFP、带有 β *klotho* 基因的质粒 A 以及受体菌 *E. coli* DH5 α 由本实验室提供; 小鼠成纤维细胞系 3T3-L1、NIH3T3、293E 包装细胞购自 ATCC。

酶和主要生化试剂 T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Sac*II 和 *Eco*RI、dNTPs、rTag 酶、DNA Marker、pMD18-T 载体试剂盒、氨苄霉素 (Amp) 及 Oligo (dT) 15 均购自 TaKaRa 公司; 质粒 DNA 小量提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒 DNA 去内毒素大提试剂盒均购自上海华舜生物工程有限公司; 阳

离子脂质体 Lipofectamine 2000、高糖 DMEM 培养基、新生牛血清 (NCS)、优质胎牛血清 (FBS)、RNA 酶抑制剂 (RNase inhibitor)、逆转录酶 (M-MuLV) 和 RNA 提取试剂 Trizol 均购自 Invitrogen 公司; 重组人胰岛素和 polybrene 购自 Sigma 公司; 人 FGF-21 由本实验室纯化获得; 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。实时荧光定量 PCR 引物由 Invitrogen 公司合成。

重组载体 pBMN- β *klotho*-IRES-EGFP 的构建 以本实验室保存的质粒为模板, PCR 方法扩增 β *klotho* 基因, 反应体系为 25 μ L。设计 β *klotho* 基因读码框两端的引物, 上游引物: 5'-CCGGAATTCATGAA GACAGGCTGTGCAGCAGGG-3', 下游引物: 5'-TC CCGCGGTTAGCTGAAA ACTCTGCTGTGGCCT-3', 设计引物引入 *Sac*II 和 *Eco*RI 酶切位点及保护碱基 (下划线为酶切位点), 产物长度 3 132 bp。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 25 次, 72 $^{\circ}$ C 终末延伸 10 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。将 pBMN-IRES-EGFP 载体与 PCR 产物分别用 *Sac*II 和 *Eco*RI 双酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接这两个片段得到 pBMN- β *klotho*-IRES-EGFP 载体。将连接产物转化 DH5 α 感受态细菌并接种至含氨苄西林的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12~16 h, 挑取单克隆扩增后用质粒小提试剂盒提取质粒进行酶切鉴定, 重组质粒最终经测序鉴定正确后, 用去内毒素质粒大提试剂盒提取无内毒素的重组质粒。

逆转录病毒的收集及病毒滴度的测定 293E 包装细胞用含 10% 优质胎牛血清的 DMEM 培养液在生长条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的条件下常规培养, 取生长状况良好的 293E 包装细胞接种于 6 孔板, 待生长在 6 孔板的细胞汇合度达 80% 左右, 用 Lipofectamine 2000 转染试剂将 pBMN- β *klotho*-IRES-EGFP 载体导入 293E 包装细胞, 连续转入 2 次, 具体转染步骤按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书进行, 转染 12 h 后换新鲜培养基, 48 h 后收获培养基上清液, 0.45 μ m 滤膜过滤后得到病毒上清液。将 NIH3T3 细胞 (细胞数 1×10^6) 接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后弃去培养上清液, 加入逆转录病毒上清液 1 mL, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养; 48 h 后加胰酶消化 NIH3T3 细胞, 同时以未感染病毒的 NIH3T3 细胞作为对照, 用 PBS 洗 2 遍, 将细胞重悬于 PBS 300 μ L 中; 用流式细胞术检测阳性细胞的百分率, 并计算病毒的滴度, 病毒滴度 = $2 \times$ (病毒感染时 NIH3T3 细胞的

个数×阳性细胞的百分率)/病毒体积。

3T3-L1 前体脂肪细胞的病毒感染及稳定细胞系的筛选 在具有有效滴度的新鲜病毒上清液中, 添加 polybrene 至终质量浓度为 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 感染 6 孔板中处于对数生长期的 3T3-L1 前体脂肪细胞, $2\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 室温离心 1 h, 再放入培养箱中继续培养, 每天 1 次, 连续感染 3 天^[9, 10]。感染后的 3T3-L1 前体脂肪细胞胰酶消化后悬浮于 PBS 中, 进行流式细胞仪无菌分选。为了获得稳定表达 β *klotho* 的 3T3-L1 前体脂肪细胞, 实行连续流式细胞仪无菌分选, 每次筛选间隔 5 天, 直至筛选到 3T3-L1- β *klotho* 稳定细胞系。

葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法 (GOD-POD) 检测葡萄糖消耗率 将 3T3-L1- β *klotho* 细胞用无血清培养基饥饿 12 h, 用细胞培养基分别稀释真核表达的人 FGF-21 和人重组胰岛素, 使其终浓度都分别为 1、10、100 及 1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别处理细胞 24 h, 取培养基上清液 2 μL 放入葡萄糖检测液 200 μL 中测定葡萄糖的含量, 每个浓度至少重复 3 次; 3T3-L1- β *klotho* 细胞用无血清培养基饥饿 12 h, 用 1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 人重组胰岛素和 1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 真核表达的人 FGF-21 分别处理细胞, 在 2、4、6、8、12 和 24 h 分别取培养基上清液 2 μL 放入葡萄糖检测液 200 μL 中测定葡萄糖的含量^[11], 每个浓度至少重复 3 次。

实时荧光定量 PCR (real time PCR) 检测 GLUT1 与 GLUT4 mRNA 表达水平 3T3-L1- β *klotho* 细胞用无血清培养基饥饿 12 h 后, 分别用 1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰岛素和 1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 真核表达的人 FGF-21 处理细胞, 以未经任何处理的细胞为对照, 培养 12 h 后收获细胞, 用 Trizol 法提取细胞总 RNA, 以不同处理的细胞总 RNA 为模板、Oligo (dT) 15 为引物反转录成 cDNA。利用实时荧光定量 PCR 方法^[12]检测 3T3-L1- β *klotho* 细胞内 GLUT1 与 GLUT4 mRNA 表达变化。选用 3T3-L1 前体脂肪细胞中稳定表达的 β -actin 作为内参。按照 Thermal Cycler DiceTM Real Time PCR (TaKaRa Code: TP800) 的使用说明书要求进行实验操作, 同时扩增内参及 GLUT1 目的基因。内参 β -actin 的上游引物为 5'-GAGACCTTCAACACCCC-3', 下游引物为 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'; GLUT1 目的基因扩增上游引物为 5'-CATCAATGCCCCAGAA-3', 下游引物为 5'-AAGCGGCCAGGATCAG-3'; GLUT4 目的基因扩增上游引物为 5'-CCTTTGAGATTGGCCCTGG-3', 下游引物为 5'-AGGTGAAGATGAA GAAGCCAAGC-3'。反应体系为 20 μL : cDNA 模板

2.0 μL , SYBR Premix Ex TaqTM (2 \times) 10.0 μL , PCR 正反引物 ($10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.4 μL , ROX Reference Dye II (50 \times) 0.4 μL , 灭菌三蒸水补足 20 μL (内参和目的片段同批扩增)。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 31 s, 40 个循环。每次扩增均设由三蒸水代替模板的空白对照, 每个样品至少重复 3 次。使用相对定量分析方法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法) 对目的基因进行相对定量。

结果

1 β *klotho* 基因片段的扩增及重组载体 pBMN- β *klotho*-IRES-EGFP 的鉴定

设计 β *klotho* 基因两端的引物, 以带有 β *klotho* 基因的质粒 A 为模板进行 PCR 扩增, 获得 β *klotho* 基因的片段, 1% 琼脂糖凝胶电泳显示其分子大小与预期值一致 (图 1)。将 pBMN-IRES-EGFP 载体与 PCR 产物分别经 *Sac*II 和 *Eco*RI 双酶切, 酶切产物经回收、纯化, 用 T4 DNA 连接酶将其连接, 将连接产物转化 DH5 α 感受态细菌后, 挑取单克隆扩增, 提取质粒进行 PCR 鉴定。结果显示, 阳性克隆扩增出 3 000 bp 左右的特异条带。将提取的质粒经 *Sac*II 和 *Eco*RI 酶切鉴定后, 电泳结果证实重组质粒中插入的 β *klotho* 基因片段大小及方向均正确 (图 1)。将测序结果与 GenBank 中提交的 β *klotho* 序列 (登录号: NM_031180.2) 进行比对, 其同源率为 100%。

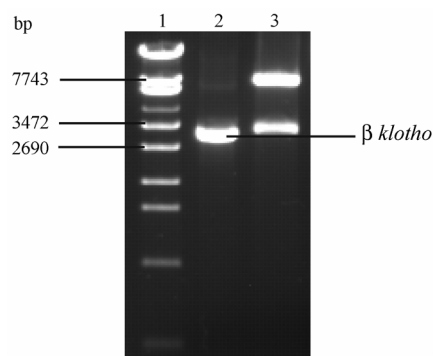


Figure 1 Gene identification. 1: DNA marker; 2: PCR product of human β *klotho* gene fragment; 3: Restriction enzyme digestion of recombinant plasmid pBMN- β *klotho*-IRES-EGFP

2 病毒滴度的测定

将逆转录病毒上清液 1 mL 感染 NIH3T3 细胞, 48 h 后收集细胞, 用流式细胞仪检测 EGFP 的表达, 并计算病毒的滴度^[13]。结果显示, pBMN- β *klotho*-IRES-EGFP 载体在 293E 包装细胞中包装后, 病毒的滴度为 $8\times 10^8 \text{ VP}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 2)。

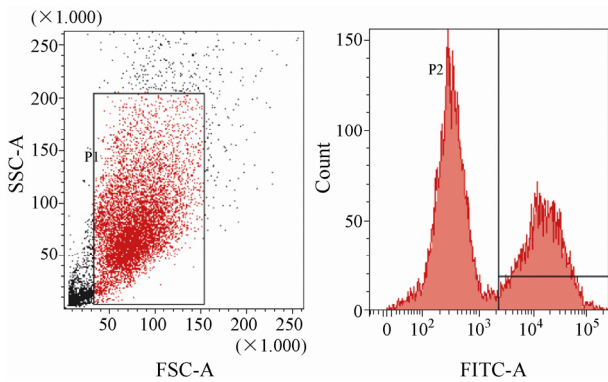


Figure 2 Analysis of EGFP expression of virus-infected NIH3T3 cells by flow cytometry

3 3T3-L1- β klotho 细胞的构建

将 pNMN- β klotho-IRES-EGFP 载体导入 293E 包装细胞, 包装成复制缺陷性的逆转录病毒, 再将新鲜的病毒上清液感染 3T3-L1 前体脂肪细胞, 经流式细胞仪筛选 (图 3, 4) 获得稳定表达 β klotho 的 3T3-L1 前体脂肪细胞 (图 5)。

4 FGF-21 与人重组胰岛素介导 3T3-L1- β klotho 细胞的活性检测

用不同浓度的 FGF-21 与人重组胰岛素处理鼠的 3T3-L1 前体脂肪细胞和 3T3-L1- β klotho 细胞 24 h 后, 检测葡萄糖消耗率; 以及用同一浓度 FGF-21 与人重组胰岛素处理鼠的 3T3-L1 前体脂肪细胞和 3T3-L1- β klotho 细胞后, 在不同时间取样检测葡萄糖消耗率。统计学分析结果显示, FGF-21 和人重组胰岛素对前体脂肪细胞不起作用, 但能促进稳定表达 β klotho 的 3T3-L1 前体细胞消耗葡萄糖。与未经任何处理的 3T3-L1- β klotho 细胞对照组相比, 经 FGF-21 与人重组胰岛素处理后 3T3-L1- β klotho 细胞对葡萄糖的摄取量显著增加, 呈剂量依赖关系, 在浓度为 $1\ 000\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时消耗率最高 (两样本比较的 t 检验), 且随着作用时间的延长, 细胞利用葡萄糖效率越高 (图 6~8)。

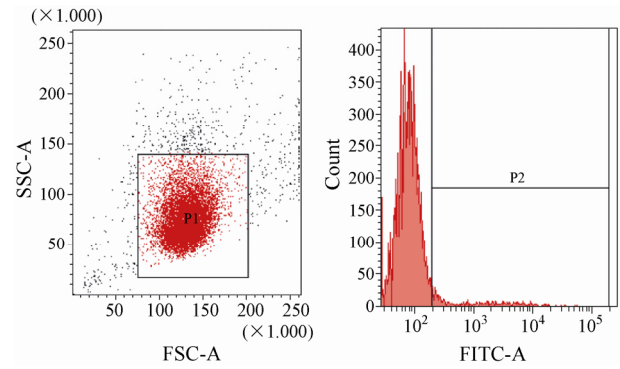


Figure 3 Infected 3T3-L1 preadipocytes before the flow of sterile screening

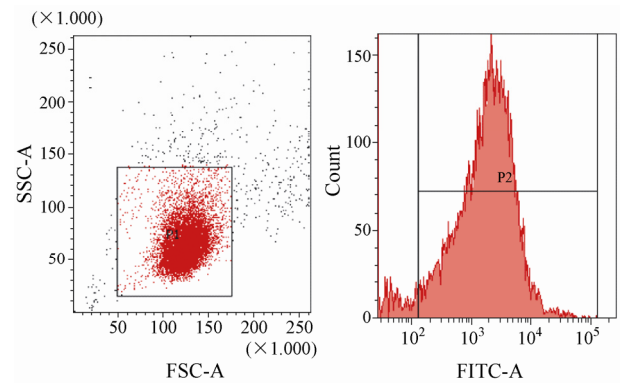


Figure 4 Infected 3T3-L1 preadipocytes after the flow of sterile screening

5 3T3-L1- β klotho 细胞 GLUT1 与 GLUT4 mRNA 表达的变化

葡萄糖在哺乳动物细胞内外的跨膜转运方式为协助扩散作用, 这一作用依赖于葡萄糖转运蛋白 (GLUTs) 的介导。本实验用 $1\ 000\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰岛素处理 3T3-L1- β klotho 细胞, GLUT4 显著增加; $1\ 000\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ FGF-21 处理 3T3-L1- β klotho 细胞, GLUT1 显著增加。结果表明, 3T3-L1- β klotho 细胞与 3T3-L1 脂肪细胞在经 FGF-21 与胰岛素处理后 GLUT1 和 GLUT4 变化是一致的^[14] (图 9, 10)。

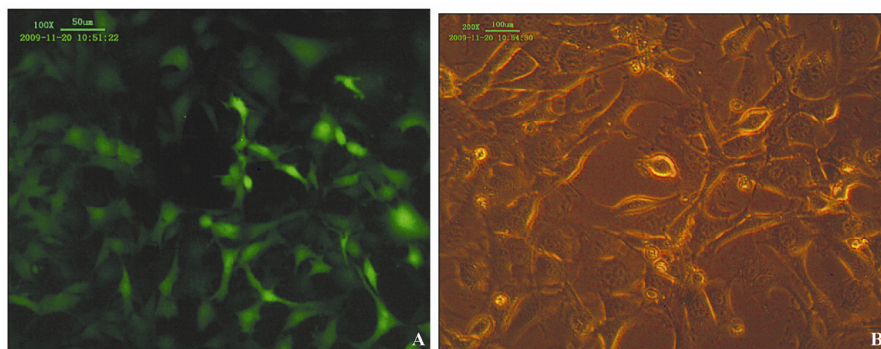


Figure 5 3T3-L1 cells observed with fluorescence microscope. A: 3T3-L1- β klotho cells; B: 3T3-L1 cells

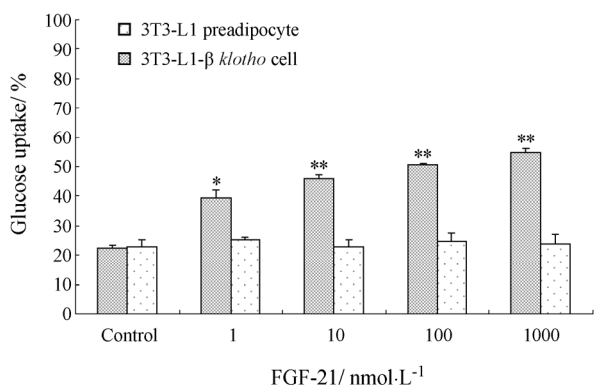


Figure 6 Analysis of the glucose uptake of 3T3-L1 preadipocyte and 3T3-L1- β *klotho* cells by FGF-21 stimulation. The values showed are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

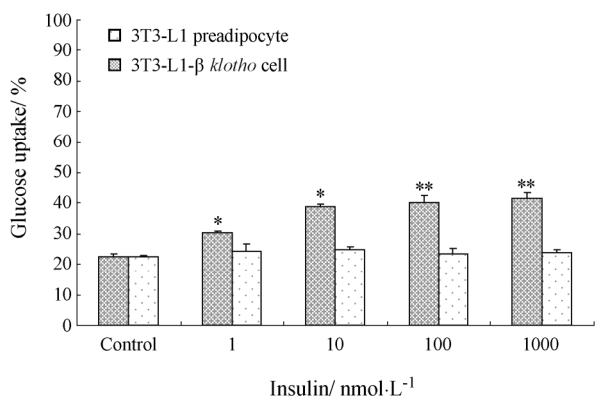


Figure 7 Analysis of the glucose uptake of 3T3-L1 preadipocyte and 3T3-L1- β *klotho* cells by insulin stimulation. The values showed are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

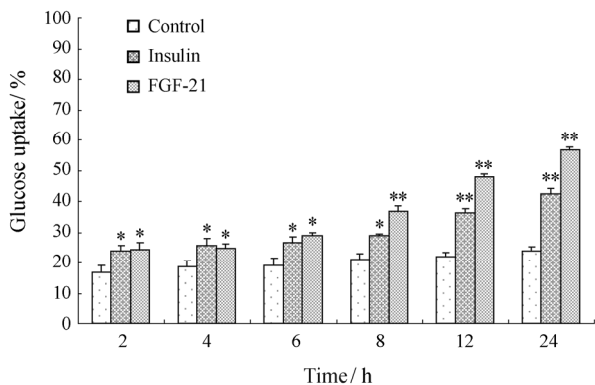


Figure 8 The glucose uptake of 3T3-L1- β *klotho* cells treated with 1 000 nmol·L⁻¹ insulin and 1 000 nmol·L⁻¹ FGF-21, separately for different length of times. The values showed are the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

讨论

FGF-21 是一种由哺乳动物肝脏细胞分泌的多肽, 可以不依赖于胰岛素而独立促进糖吸收。目前, 国内

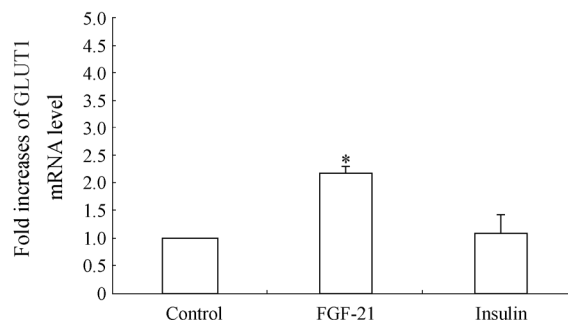


Figure 9 FGF-21 enhances GLUT1 mRNA expression in 3T3-L1- β *klotho* cells. 3T3-L1- β *klotho* cells were treated with 1 000 nmol·L⁻¹ insulin or FGF-21 for 12 h. The expression of GLUT1 in 3T3-L1- β *klotho* cells was measured by real time PCR. The values showed the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$ vs control group

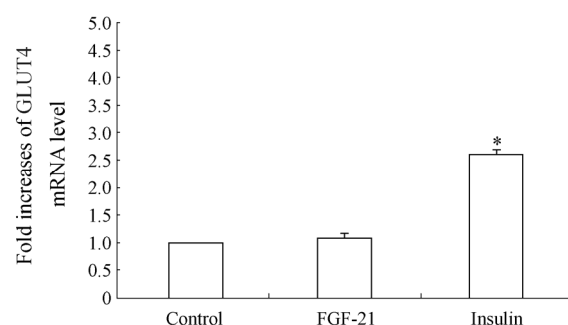


Figure 10 Insulin enhances GLUT4 mRNA expression in 3T3-L1- β *klotho* cells. 3T3-L1- β *klotho* cells were treated with 1 000 nmol·L⁻¹ insulin or FGF-21 for 12 h. The expression of GLUT4 in 3T3-L1- β *klotho* cells was measured by real time PCR. The values showed the average of at least 3 independent measurements. * $P < 0.05$ vs control group

外对 FGF-21 的分子机制了解还很少, 其在生理和病理情况下的作用机制尚不明确, 但已有研究结果表明该蛋白具有独立调节血糖的作用^[15]; 其信号传导途径包括受体及糖吸收的终末执行单位, 不仅与胰岛素完全不同, 而且与传统的 FGF 家族成员也有显著差异, 主要表现为 FGF-21 的信号传递除了需要已知的 FGFR 外, 还需要一种特殊的辅助受体 β *klotho* 的参与, 目前尚没有以 FGF-21 信号通路为靶点的药物筛选研究报道。

脂肪是 FGF-21 发挥作用的靶组织, 3T3-L1 细胞是前体脂肪细胞, 可以分化为脂肪细胞, 但是分化过程费时费力, 成本较高, 分化成熟的脂肪细胞不方便应用于高通量的药物筛选。虽然 3T3-L1 前体脂肪细胞 (成纤维细胞) 培养简单, 适用于大规模培养和筛选, 但是该细胞不能对 FGF-21 做出应答。前期研究表明^[15], 3T3-L1 细胞与分化成熟的脂肪细胞均表达 FGFR, 但未分化的 3T3-L1 细胞对 FGF-21 信号没有

应答, 原因是该细胞不表达 FGF-21 的辅助受体 β *klotho*, 而分化成熟的脂肪细胞大量表达 β *klotho*, 由此推测如果让 3T3-L1 前体细胞高效表达 β *klotho*, 3T3-L1 成纤维细胞就可能对 FGF-21 做出应答, 从而可以应用到 FGF-21 及其类似物的生物活性筛选。因此, 作者以 3T3-L1 细胞为基础, 通过逆转录病毒载体将 FGF-21 的辅助受体 β *klotho* 整合到该细胞的染色体上, 通过筛选最终获得了稳定表达 β *klotho* 的细胞株。FGF-21 与胰岛素处理 3T3-L1- β *klotho* 细胞后, 经糖吸收检测, 该细胞能够对 FGF-21 蛋白和胰岛素都做出应答, 且效果呈剂量依赖性。实时荧光定量 PCR 结果表明, 经 FGF-21 处理后糖吸收的效应因子 GLUT1 表达量显著提高, 经胰岛素处理后糖吸收的效应因子 GLUT4 表达量显著提高。由此证明, 该细胞能够保证 FGF-21 作用的正确靶向。因此该细胞可以作为以 FGF-21 信号通路为靶点的治疗糖尿病药物的评价工具。胰岛素能够促进 3T3-L1- β *klotho* 细胞糖吸收并且促进 GLUT4 的表达, 推测 β *klotho* 可能促进胰岛素受体的表达或促进胰岛素功能的改善, 而截至目前尚未见胰岛素与 β *klotho* 存在必然联系报道, β *klotho* 与胰岛素的联系还有待于进一步的研究。

高通量药物筛选是目前世界上最流行的药物研发手段。可以从浩瀚的小分子化合物库中高效、快速地寻找药物前体, 拥有高通量药物筛选平台是评价药物研发水平的一个重要指标, 而高通量药物筛选平台的建立依靠高通量筛选模型的建立。本实验通过建立稳定表达 β *klotho* 的细胞株, 为实现 FGF-21 类似物的筛选提供了可能性。稳定表达 β *klotho* 的细胞株, 性质均一, 对阳性药物的反应灵敏、特异、稳定, 可以定性定量, 且该细胞培养成本低廉, 是高通量药物筛选的良好工具。本实验为今后开发以 FGF-21 信号通路为靶点的治疗糖尿病药物提供了最具潜力的平台。

References

- [1] International Diabetes Federation. Latest diabetes figures paint grim global picture. Montreal, Canada, 19 October 2009 [EB/OL]. <http://www.idf.org/latest-diabetes-figures-paint-grim-global-picture>.
- [2] Girard J. Insulin resistance: role in type 2 diabetes [J]. *Diabete Metab*, 1994, 20: 330-336.
- [3] Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 1627-1635.
- [4] Yie J, Hecht R, Patel J, et al. FGF21 N- and C-termini play different roles in receptor interaction and activation [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583: 19-24.
- [5] Tomiyama K, Maeda R, Urakawa I, et al. Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 1666-1671.
- [6] Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, et al. β Klotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 7432-7437.
- [7] Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, et al. Tissue-specific expression of β Klotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 26687-26695.
- [8] Ito S, Kinoshita S, Shiraishi N, et al. Molecular cloning and expression analyses of mouse β klotho, which encodes a novel Klotho family protein [J]. *Mech Dev*, 2000, 98: 115-119.
- [9] Bahnon AB, Dunigan JT, Baysal BE, et al. Centrifugal enhancement of retroviral mediated gene transfer [J]. *J Virol Methods*, 1995, 54: 131-143.
- [10] Bunnell BA, Muul LM, Donahue RE, et al. High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 7739-7743.
- [11] Liu MY, Wang WF, Yu YX, et al. FGF-21 improves glucose uptake and glycogen synthesis of insulin-resistant liver [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2009, 36: 1327-1333.
- [12] Li H, Fang Q, Gao F, et al. Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride [J]. *J Hepatol*, 2010, 53: 934-940.
- [13] Zang RP, Yun L, Peng L, et al. Construction and application of retroviral vector system useful for high-efficiency transfection into human T cells [J]. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2006, 22: 420-422.
- [14] Jiang YY, Liu MY, Ren GP, et al. Cloning, expression and purification of mouse fibroblast growth factor-21 and its function in adipocyte glucose metabolism [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2009, 36: 157-164.
- [15] Ren GP, Hou YT, et al. Efficient expression of soluble human FGF-21 and its glucose regulation activity [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2009, 44: 548-552.