

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002774

FGF21 对人胰腺癌细胞炎症环境中星状细胞活化的抑制及机制

郑磐淳, 肖 维, 刘健萍, 杨雅莹

(重庆医科大学分子医学诊断中心病理教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨成纤维细胞生长因子 21(fibroblast growth factors 21, FGF21)对胰腺癌细胞炎症环境中星状细胞增殖和活化的影响及机制。**方法:**RT-qPCR 检测胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)作用于人胰腺癌细胞(pancreatic cancer cells, PCC)后白细胞介素(interleukin, IL)-6 及 IL-8 mRNA 的表达水平变化,确立适宜的时间建立炎症微环境。将 PCC(Capan-1 和 MIA PaCa-2)CCK 上清液和 PCC(Capan-1 和 MIA PaCa-2)CCK+FGF21 上清液作用于人胰腺星状细胞(pancreatic stellate cells, PSC)。用 CCK-8 和 Western blot 分别检测各组上清液对胰腺星状细胞活性及其活化标志物 α -平滑肌蛋白(α -smooth muscle protein, α -SMA)表达水平的影响。RT-qPCR 和 Western blot 检测 FGF21 对 CCK 处理后的 PCC EGR1 和 PDGFB mRNA 及蛋白表达的影响。Western blot 进一步检测 AMPK 抑制剂(compound C)加入 PCC CCK 组和 PCC CCK+FGF21 组后对 AMPK- κ B 信号通路中 p-AMPK 和 EGR1 蛋白表达的影响。**结果:**CCK 处理 Capan-1 6 h 与处理 MIA PaCa-2 24 h 的 IL-8 mRNA 表达量明显高于其他组($P<0.05$)。PCC CCK+FGF21 上清液组与 PCC CCK 上清液组相比,其 PSC 细胞增殖明显受抑制($P<0.05$), α -SMA 蛋白表达明显降低($P<0.001$)。FGF21 干预 PCC CCK 后 EGR1 和 PDGFB mRNA 和蛋白表达均明显低于 CCK 组($P<0.05$)。Compound C 加入 PCC CCK+FGF21 组后, p-AMPK 蛋白表达水平平均降低($P<0.01$), EGR1 蛋白表达水平平均增高($P<0.05$)。**结论:**FGF21 可能通过抑制胰腺癌细胞炎症环境中星状细胞的增殖和活化来实现其对肿瘤的抑制作用,其机制可能与其激活炎症环境下胰腺癌细胞 AMPK 通路并下调 EGR1 的表达及减少 PDGFB 的表达有关。

【关键词】成纤维生长因子 21; 胰腺癌; 炎症; 星状细胞; 活化

【中图分类号】R735.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-08-24

Inhibition and mechanism of FGF21 on activation of stellate cells in inflammatory environment of pancreatic cancer cells

Zheng Panchun, Xiao Wei, Liu Jianping, Yang Yaying

(Teaching and Research Section of Pathology, Center for Molecular Diagnostics, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect and mechanism of fibroblast growth factor 21 (FGF21) on the proliferation and activation of stellate cells in the inflammatory environment of pancreatic cancer cells. **Methods:** The appropriate time to establish an inflammatory microenvironment was determined by RT-qPCR to detect interleukin (IL)-6 and IL-8 mRNA expression level of cholecystokinin (CCK) on human pancreatic cancer cells (PCC) such as Capan-1 and MIA PaCa-2. PCC (Capan-1, MIA PaCa-2) CCK supernatant and PCC (Capan-1, MIA PaCa-2) CCK+FGF21 supernatant were acted on human pancreatic stellate cells (PSC). CCK-8 and Western blot were used to detect the effect of each group's supernatant on the activity of pancreatic stellate cells and the expression of α -smooth muscle protein (α -SMA), a marker of activation. RT-qPCR and Western blot were used to detect the effect of FGF21 on the expression of PCC EGR1 and PDGFB mRNA and protein after CCK treatment. Western blot further detected the effect of AMPK inhibitor (compound C) added to PCC CCK group and PCC CCK+FGF21 group on the expression of p-AMPK and EGR1 protein in AMPK- κ B signaling pathway. **Results:** The relative expressions of IL-8 mRNA in Capan-1 6 h group and in MIA PaCa-2 24 h group treated with CCK were significantly higher than those in other groups ($P<0.05$). Compared with the PCC CCK supernatant group, the

作者介绍: 郑磐淳, Email: zhengpanchun@126.com,

研究方向: 炎症环境下胰腺癌的研究和治疗。

通信作者: 杨雅莹, Email: yangyaying2003@163.com。

基金项目: 重庆市教委科学技术研究资助项目 (编号: KJ1702016)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210412.1723.002.html>

(2021-04-13)

PCC CCK+FGF21 supernatant group had significantly inhibited the proliferation of PSC cells ($P<0.05$), the expression of α -SMA protein was significantly reduced ($P<0.001$). Intervention with FGF21, EGR1, PDGFB mRNA and protein expressions were significantly lower than those in CCK group ($P<0.05$). After com-

pound C was added to the PCC CCK+FGF21 group, the expression level of p-AMPK protein decreased ($P<0.01$), and the expression level of EGR1 protein expression increased ($P<0.05$). **Conclusion:** FGF21 may prevent tumor by inhibiting the proliferation and activation of stellate cells in the inflammatory environment of pancreatic cancer cells and the mechanism may be related to its activation of the AMPK pathway of pancreatic cancer cells in the inflammatory environment, down-regulation of EGR1 expression and reduction of PDGFB expression.

[Key words] fibroblast growth factor 21; pancreatic cancer; inflammation; stellate cell; activation

胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDA)是一种极其致命的消化系统常见恶性肿瘤。其 5 年生存率目前仅为 9% 左右, 中位生存时间不到 6 个月^[1]。PDA 在欧美等国家的发病率居高不下, 而在我国, 随着国民生活水平的提高和饮食结构的改变, 其发病率和病死率也呈上升趋势并且有年轻化倾向^[2-3]。研究指出, 到 2030 年, PDA 极有可能成为癌症相关死亡的第二大原因^[4]。因此, 寻找早期预防和治疗手段具有重要的理论和临床价值。

前期研究发现, 成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factors, FGF21) 在 PDA 组织中表达水平较正常胰腺组织明显下调^[5-6]。给予小鼠 FGF21 补充后, 胰腺癌细胞的生长受到抑制, 肝转移明显减少, 生存期延长^[5]。这提示 FGF21 对胰腺癌的生长和转移有抑制作用, 但其中的作用机制并不清楚。

FGF21 是 FGF 家族非典型成员之一, 无明显的促有丝分裂作用^[7]。新近文献报道, 在急性慢性胰腺炎中, FGF21 发挥着抑制炎症反应、胰腺星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSC) 活化和间质纤维化等各种作用。研究表明, FGF21 能抑制小鼠胰腺腺泡组织中早期生长反应蛋白 1 (early growth response, EGR1) 的表达^[8-10]。EGR1 作为一种促炎性核转录因子, 直接激活血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 的表达^[11], 从而促进 PSC 的增殖和活化。那么, FGF21 通过抑制 EGR1 的表达, 就可能实现其对炎症和星状细胞活化的抑制作用^[8]。

炎症反应是胰腺癌组织中常见的伴随病理现象^[12], 炎症不仅可以通过激活 STAT3 和核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 等信号通路直接促进胰腺癌的发生发展^[13-14], 还可以增强胰腺癌细胞 (pancreatic cancer cell, PCC) 产生生长因子如 PDGF 等对 PSC 的激活效应^[15-16]。目前的研究表明, 活化的 PSC 反过来又能通过促进 PCC 增殖、迁移、血管生成、免疫逃逸、上皮-间质转化并抑制其凋亡等途径进一步促进胰腺癌的进展并对化疗产生抵抗作用。因此, 抑制 PSC 的增殖和活化也是胰腺癌潜在

的治疗靶点^[17-19]。

FGF21 能明显抑制急性慢性胰腺炎中胰腺星状细胞的活化。在胰腺癌组织中, FGF21 也可能通过抑制胰腺癌细胞炎症环境中 PSC 的增殖和活化来实现其对胰腺癌组织中胰腺星状细胞活化标志物 α -平滑肌蛋白的表达, 这提示 FGF21 可能参与了胰腺癌组织中星状细胞的调控。为此, 本研究拟进一步在体外实验中观察 FGF21 对胰腺癌炎症微环境中 PSC 增殖和活化的影响, 并探讨相关机制, 为推进 FGF21 在胰腺癌治疗中的应用提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 胰腺癌细胞 Capan-1、MIA PaCa-2 及胰腺星状细胞 PSC 冻存于重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心。

1.1.2 实验试剂 RNA 提取、逆转录试剂盒和引物均购自日本 Takara 公司。CCK(26-33)(non-sulfated) 购自美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司。FGF21 购自以色列 PROSPEC 公司。兔多抗 α -SMA 由中国万类生物公司提供, 兔多抗 GAPDH 购自美国 Affbiotech 公司, 兔单抗 EGR1 和 p-AMPK 购自美国 Bimake 公司, 兔多抗 PDGFB 购自中国诺禾致源公司, 鼠单抗 β -actin 购自美国 ABclonal 公司。山羊抗小鼠 IgG HRP 和山羊抗兔 IgG HRP 购自美国 Biosharp 公司。AMPK 抑制剂 Compound C 购自美国 MCE 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养、传代及冻存 Capan-1 细胞用 RPMI 1640 完全培养基培养, MIA PaCa-2 和 PSC 细胞株均用 DMEM 完全培养基培养, 胎牛血清浓度为 10%。在 37 °C、5%CO₂ 的细胞孵箱内培养, 每 2~3 d 更换细胞培养基, 待细胞融合度达 80%~90% 时进行传代。

1.2.2 PCC 炎症环境的建立及上清液的制备 当 PCC 细胞融合度达 80% 时, 采用 1 nmol/L CCK 诱导 Capan-1 及 MIA PaCa-2 0 h、0.5 h、6 h、12 h 和 24 h, 通过 RT-qPCR 检测白细胞介素 (interleukin, IL)-6 或 IL-8 mRNA 的相对表达量, 筛选 CCK 的最佳作用时间并建立炎症环境。将 PCC 分为 CCK 组和 CCK+FGF21 组。1 nmol/L CCK 和 1 μ g/mL FGF21 作用相应时间后收集培养基, 以 1 000 r/min 离心 10 min, 收

集上清, -80 °C 冻存待用。

1.2.3 RT-qPCR 检测 mRNA 水平 按照 RNA 提取试剂盒说明书从细胞中获得总 RNA, 将 RNA 逆转录成 cDNA, 分别进行 IL-6、IL-8、EGR1 和 PDGFB 的基因扩增。IL-6 上游引物: 5'-ATGAGGAGACTTGCCTGGTGAA-3', 下游引物 5'-GTTGGGTCAGGGGTGCTTATT-3', 长度为 190 bp; IL-8 上游引物: 5'-TTGGCAGCCTTCCTGATTTTC-3', 下游引物: 5'-GG-TGGAAAGGTTTGGAGTATGTCT-3', 长度为 109 bp; EGR1 上游引物: 5'-CCTTCGCTAACCCTCTGTCT-3', 下游引物: 5'-ACTCCACTGGGCAAGCGTAA-3', 长度为 181 bp; PDGFB 上游引物: 5'-CTTTGATGATCTCCAACGCCTGC-3', 下游引物: 5'-GTGGGAGCGGGTCATGTTCA-3', 长度为 85 bp; β -actin 上游引物: 5'-CCTGGCACCCAGCACAAAT-3', 下游引物: 5'-GGGCCGGACTCGTCATAC-3', 长度为 144 bp。结果以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算。

1.2.4 CCK-8 检测星状细胞增殖情况 将 PSC 细胞分成对照组、PCC CCK 上清液组和 PCC CCK+FGF21 上清液组。收集对数期细胞, 将细胞密度调整为 4×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板, 同时设置空白组, 每组设 6 个平行孔, 每孔 100 μ L, 放入细胞培养箱, 细胞密度达 80% 时移去培养基。空白组及对照组用无血清培养基培养, PCC 上清液组每孔各自加入 100 μ L 对应的上清液放入细胞培养箱培养 24 h。到时间点后, 吸出培养液, 加入新鲜的含 10% CCK-8 的无血清培养基, 放入孵箱中静置 1 h, 用酶标仪测 450 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值。细胞存活率 = [(上清液组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)] $\times 100\%$, 并于 Graph-Pad Prism 5 中绘制细胞存活率柱状图。

1.2.5 Western blot 实验 提取总蛋白, BCA 法测蛋白浓度, 每孔按 30~60 μ g 上样量进行 SDS-PAGE 电泳分离, 然后 250 mA 恒流转至 PVDF 膜上。5% 脱脂乳封闭条带 60 min, α -SMA 一抗 (1:500)、GAPDH 一抗 (1:1 000)、EGR1 一抗 (1:1 000)、PDGFB 一抗 (1:1 000) 和 p-AMPK 一抗 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜, 二抗 (1:5 000) 恒温孵育 50 min, 通过 ECL 显影。数据用 Quantity One 软件分析。

1.2.6 CCK-8 细胞毒性实验筛选 收集对数期的胰腺癌细胞, Capan-1 和 MIA PaCa-2 分别按 5×10^4 个/mL 和 8×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中, 同时设置空白组, 每组设 3 个平行孔, 每孔 100 μ L, 放入细胞培养箱, 细胞密度达 80% 时移去培养基。药物梯度为: 0 μ mol/L、1 μ mol/L、2 μ mol/L、4 μ mol/L、8 μ mol/L 及 16 μ mol/L, 作用 24 h 后吸出培养液, 加入新鲜的含 10% CCK-8 的培养基, 放入孵箱中静置 1 h, 用酶标仪测 OD₄₅₀。细胞抑制率 = [(0 加药组 OD 值 - 加药组 OD 值) / (0 加药组 OD 值 - 空白组 OD 值)] $\times 100\%$, 采用 GraphPad Prism 5 计算 IC₅₀。

1.3 统计学处理

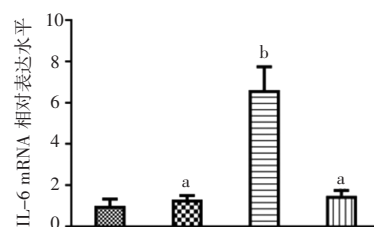
所有数据采用 Graph-Pad Prism 5 软件绘制统计结果图。实验结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。RT-qPCR 检测 mRNA 水平实验重复 3 次, CCK-8 检测星状细胞增殖情况实验重复 6 次, Western blot 实验重复 3 次, CCK-8 细胞毒性实

验筛选实验重复 3 次。2 组之间采用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行单因素方差分析, 3 组或以上采用 IBM SPSS Statistics 19 软件进行单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

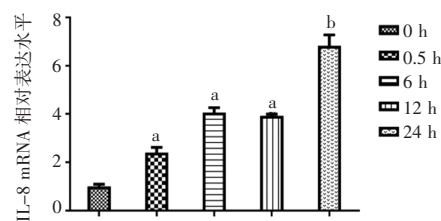
2 结果

2.1 Capan-1 及 MIA PaCa-2 炎症环境的建立

用 CCK 处理 Capan-1 0 h、30 min、6 h、12 h 后检测 IL-6 mRNA 的表达情况。结果显示处理 6 h 时 IL-6 mRNA 表达量明显高于其他组, 差异具有统计学意义 ($P=0.000$) (图 1A, 表 1)。用 CCK 处理 MIA PaCa-2 0 h、30 min、6 h、12 h 和 24 h 后检测 IL-8 mRNA 的表达情况, 结果显示处理 24 h 时 IL-8 mRNA 表达量明显高于其他组, 差异具有统计学意义 ($P=0.001$) (图 1B, 表 2)。因此, 拟采用相应的作用时间建立 Capan-1 和 MIA PaCa-2 的炎症环境进行后续实验。



A. CCK 处理 Capan-1 不同时间 IL-6 mRNA 的表达情况



B. CCK 处理 MIA PaCa-2 不同时间 IL-8 mRNA 的表达情况

注: a, 与 0 h 组相比较, $P=1.000$; b, 与 0 h 组相比较, $P=0.000$

图 1 CCK 分别处理 Capan-1、MIA PaCa-2 不同时间 IL-6、IL-8 mRNA 表达情况 ($n=3$)

2.2 FGF21 对胰腺癌炎症环境中星状细胞增殖的影响

与空白对照组相比, PCC (Capan-1 和 MIA PaCa-2) CCK 上清液处理 PSC 24 h 后, PSC 细胞的增殖明显增加 ($P=0.000$), 然而 PCC (Capan-1 和 MIA PaCa-2) CCK+FGF21 上清液组与 PCC (Capan-1 和 MIA PaCa-2) CCK 上清液组相比, 其 PSC 细胞增殖却受到明显抑制差异有统计学意义 ($P=0.031, 0.000$) (图 2A、B, 表 3、表 4)。

2.3 FGF21 对胰腺癌炎症环境中星状细胞活化的影响

通过 Western blot 检测 PSC 活化指标 α -SMA 的表达情况。结果显示, 与空白对照组相比, PCC CCK 上清液组 PSC 活化指标 α -SMA 蛋白表达明显增高 (Capan-1: $P=0.000$; MIA PaCa-2: $P=0.002$), 而 PCC CCK+FGF21 上清液组与 PCC CCK 上清液组相比, α -SMA 蛋白表达明显降低 ($P=0.000$), 差异均有统计学意义 (图 3A、B、C, 表 5、表 6)。这表明 FGF21 作用于胰腺癌细胞后能抑制癌细胞对于 PSC 的活化作用。

2.4 RT-qPCR 和 Western blot 分别检测 FGF21 对胰腺癌细胞 EGR1 和 PDGFB mRNA 和蛋白表达的影响

FGF21 加入 CCK 处理后的 Capan-1 和 MIA PaCa-2 细胞,通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测,其结果显示 2 株细

胞的 EGR1 和 PDGFB mRNA (图 4A、B,表 7、表 8)和蛋白 (图 5A、B、C,表 9、表 10)的相对表达量均明显低于 CCK 处理组,差异有统计学意义($P<0.05$)。这一结果提示 FGF21 能明显抑制胰腺癌细胞 EGR1 和 PDGFB 的表达。

表 1 CCK 作用于 Capan-1 不同时间下的 IL-6 mRNA 表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

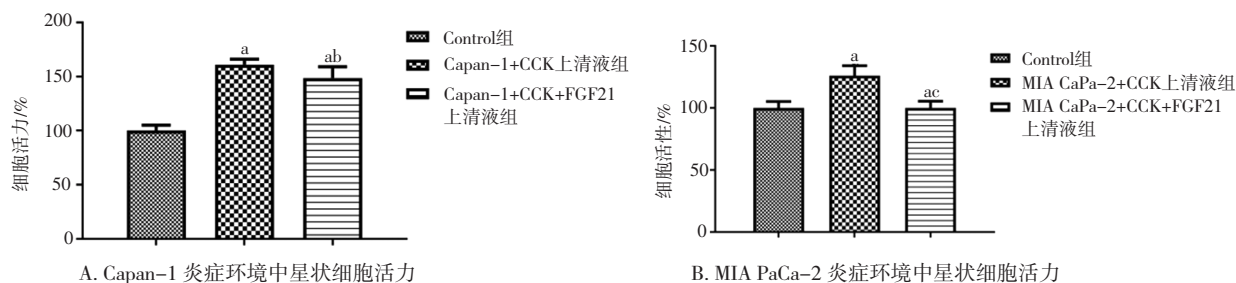
组别	IL-6 mRNA	P_a	P_b	P_c	P_d
0 h 组	1.000 ± 0.330	—	1.000	0.000	1.000
0.5 h 组	1.306 ± 0.039	1.000	—	0.000	1.000
6 h 组	6.612 ± 1.125	0.000	0.000	—	0.000
12 h 组	1.145 ± 0.061	1.000	1.000	0.000	—

注: P_a 值,与 0 h 组比较; P_b 值:与 0.5 h 组比较; P_c 值:与 6 h 组比较; P_d 值:与 12 h 组比较;—:无有效值

表 2 CCK 作用于 MIA PaCa-2 不同时间下的 IL-6 mRNA 表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-8 mRNA	P_a 值	P_b 值	P_c 值	P_d 值	P_e 值
0 h 组	1.000 ± 0.969	—	0.000	0.000	0.000	0.000
0.5 h 组	2.411 ± 0.214	0.000	—	0.000	0.000	0.000
6 h 组	4.065 ± 0.200	0.000	0.000	—	1.000	0.000
12 h 组	3.924 ± 0.071	0.000	0.000	1.000	—	0.000
24 h 组	6.826 ± 0.449	0.000	0.000	0.000	0.000	—

注: P_a 值,与 0 h 组比较; P_b 值:与 0.5 h 组比较; P_c 值:与 6 h 组比较; P_d 值:与 12 h 组比较; P_e 值:与 24 h 组比较;—:无有效值



注:a,与 Control 组比较, $P=0.000$;b:与 Capan-1+CCK 上清液组比较, $P=0.031$;c:与 MIA CaPa-2+CCK 上清液组比较, $P=0.000$

图 2 不同处理的 PCC 上清液作用 PSC 24 h 对其活性的影响

表 3 胰腺癌细胞 Capan-1 各组 PSC 细胞活性 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	PSC 活性	P_a 值	P_b 值	P_c 值
Control 组	100.000 ± 5.140	—	0.000	0.000
Capan-1+CCK 上清液组	161.050 ± 5.001	0.000	—	0.031
Capan-1+CCK+FGF21 上清液组	148.700 ± 10.425	0.000	0.031	—

注: P_a 值,与 Control 组相比较; P_b 值:与 Capan-1+CCK 上清液组相比较; P_c 值:与 Capan-1+CCK+FGF21 上清液组相比较

表 4 胰腺癌细胞 MIA PaCa-2 各组 PSC 细胞活性 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	PSC 活性	P_a 值	P_b 值	P_c 值
Control 组	100.000 ± 5.140	—	0.000	1.000
MIA CaPa-2+CCK 上清液组	125.877 ± 8.240	0.000	—	0.000
MIA CaPa-2+CCK+FGF21 上清液组	99.961 ± 5.521	1.000	0.000	—

注: P_a 值,与 Control 组相比较; P_b 值:与 MIA CaPa-2+CCK 上清液组相比较; P_c 值:与 MIA CaPa-2+CCK+FGF21 上清液组相比较

表 5 胰腺癌炎症 Capan-1 环境下 PSC 活化指标 α -SMA 蛋白表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

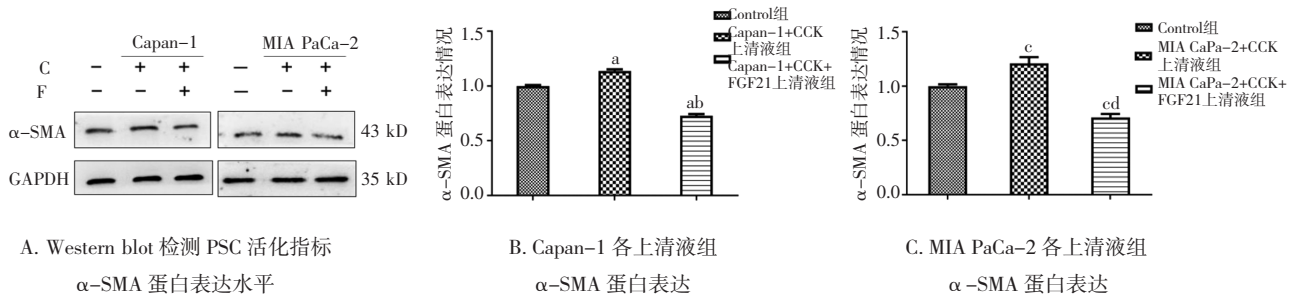
组别	α -SMA	P_a 值	P_b 值	P_c 值
Control 组	1.000 ± 0.010	—	0.000	0.000
Capan-1 + CCK 上清液组	1.137 ± 0.017	0.000	—	0.000
Capan-1+CCK+FGF21 上清液组	0.730 ± 0.015	0.000	0.000	—

注: P_a 值,与 Control 组比较; P_b 值:与 Capan-1+CCK 上清液组相比较; P_c 值:与 Capan-1+CCK+FGF21 上清液组相比较;—:无对应值

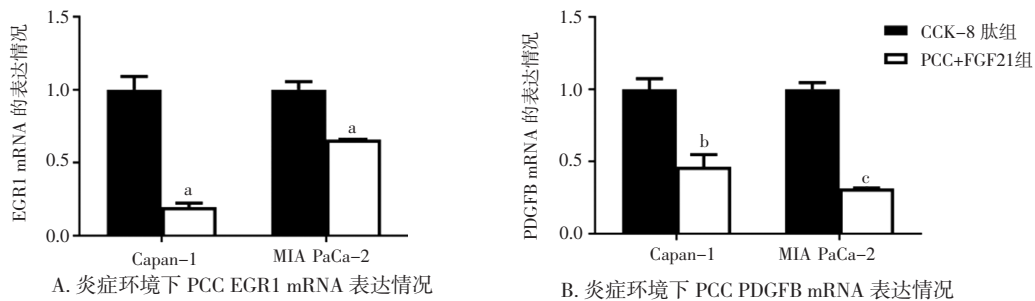
表 6 胰腺癌炎症 MIA PaCa-2 环境下 PSC 活化指标 α -SMA 蛋白表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	α -SMA	P_a 值	P_b 值	P_c 值
Control 组	1.000 $\pm$ 0.154	—	0.002	0.000
MIA PaCa-2+CCK 上清液组	1.210 $\pm$ 0.056	0.002	—	0.000
MIA PaCa-2+CCK+FGF21 上清液组	0.710 $\pm$ 0.032	0.000	0.000	—

注: P_a 值, 与 Control 组比较; P_b 值, 与 MIA PaCa-2+CCK 上清液组相比较; P_c 值, 与 MIA PaCa-2+CCK+FGF21 上清液组相比较; —: 无对应值



注: a, 与 Control 组相比较, $P=0.000$; b, 与 Capan-1+CCK 上清液组比较, $P=0.000$; c, 与 Control 组相比较, $P=0.002$; d, 与 MIA PaCa-2+CCK 上清液组相比较, $P=0.000$

图 3 FGF21 对 PCC 炎症环境中 PSC 活化指标 α -SMA 蛋白表达的影响

注: a, 与 CCK 组相比较, $P<0.001$; b, 与 CCK 组相比较, $P<0.01$; c, 与 CCK 组相比较, $P<0.001$

图 4 FGF21 对炎症环境下人胰腺癌细胞 Capan-1 及 MIA PaCa-2 EGR1 和 PDGFB mRNA 转录情况的影响

表 7 胰腺癌炎症 Capan-1 环境下 EGR1 和 PDGFB mRNA 表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

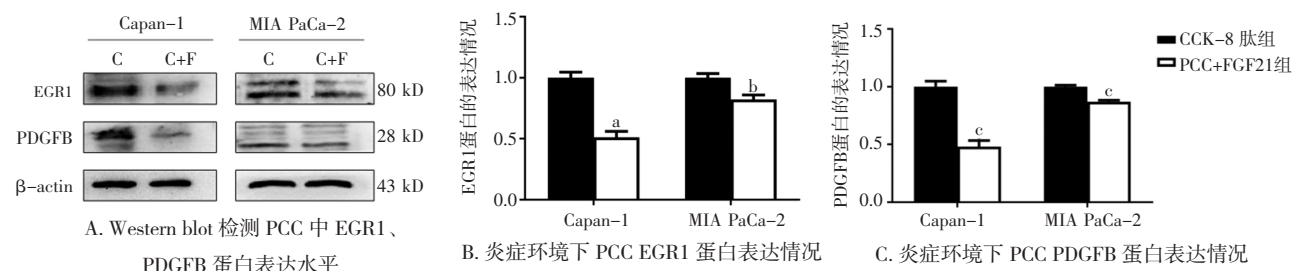
组别	EGR1 mRNA	PDGFB mRNA
Capan-1+CCK 上清液组	1.000 $\pm$ 0.090	1.000 $\pm$ 0.073
Capan-1+CCK+FGF21 上清液组	0.197 $\pm$ 0.028 ^a	0.463 $\pm$ 0.085 ^b

注: a, 与 Capan-1+CCK 组比较, $P=0.000$; b, 与 Capan-1+CCK 上清液组比较, $P=0.001$

表 8 胰腺癌炎症 MIA PaCa-2 环境下 EGR1 和 PDGFB mRNA 表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	EGR1 mRNA	PDGFB mRNA
MIA PaCa-2+CCK 上清液组	1.000 $\pm$ 0.056	1.000 $\pm$ 0.045
MIA PaCa-2+CCK+FGF21 上清液组	0.658 $\pm$ 0.007 ^a	0.315 $\pm$ 0.002 ^a

注: a, 与 MIA PaCa-2+CCK 上清液组比较, $P=0.000$



注: a, 与 CCK 组相比较, $P<0.001$; b, 与 CCK 组相比较, $P<0.01$; c, 与 CCK 组相比较, $P<0.001$

图 5 FGF21 对炎症环境下人胰腺癌细胞 Capan-1 及 MIA PaCa-2 EGR1 和 PDGFB 蛋白表达的影响

2.5 CCK-8 细胞毒性实验筛选 compound C(AMPK 抑制剂) IC_{50}

随着药物浓度的增加,细胞抑制率增加。Capan-1 compound C IC_{50} 为 8.532 $\mu\text{mol/L}$,MIA PaCa-2 compound C IC_{50} 为 7.973 $\mu\text{mol/L}$,确定药物终浓度为 8 $\mu\text{mol/L}$ (图 6A、B)。

2.6 Western blot 检测加入 compound C 后各组细胞 p-AMPK 和 EGR1 蛋白的表达情况

与 PCC CCK 组相比,PCC CCK+FGF21 组 p-AMPK 蛋白

表达水平均提高(Capan-1: $P=0.046$;MIA PaCa-2: $P=0.000$),EGR1 蛋白表达水平均降低,差异均具有统计学意义($P=0.000$),而 PCC CCK+FGF21+compound C 组与 PCC CCK+FGF21 组相比 p-AMPK 蛋白表达水平均降低(Capan-1: $P=0.001$;MIA PaCa-2: $P=0.000$)EGR1 蛋白表达水平均增高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)(图 7A、B、C,表 11~表 14)。

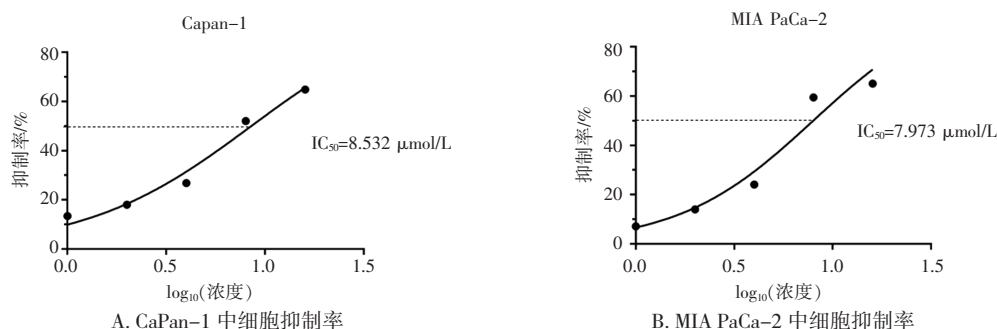
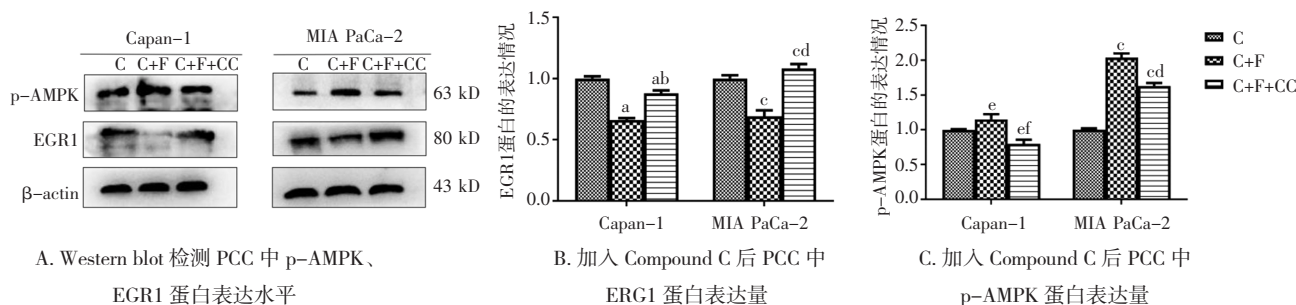


图 6 不同浓度的 compound C 处理 Capan-1 和 MIA PaCa-2 24 h 后细胞抑制率的变化



A. Western blot 检测 PCC 中 p-AMPK、EGR1 蛋白表达水平

B. 加入 Compound C 后 PCC 中 EGR1 蛋白表达量

C. 加入 Compound C 后 PCC 中 p-AMPK 蛋白表达量

注:a,与 Capan-1 CCK 组相比较, $P=0.046$;b,与 Capan-1 CCK+FGF21 组相比较, $P=0.001$;c,与 MIA PaCa-2 CCK 组相比较, $P=0.000$;d,与 MIA PaCa-2 CCK+FGF21 组相比较, $P=0.000$;e,与 Capan-1 CCK 组相比较, $P=0.000$;f,与 Capan-1 CCK+FGF21 组相比较, $P=0.000$;C:PCC CCK;C+F:PCC CCK+FGF21;C+CC:PCC CCK+FGF21+compound C

图 7 加入 compound C 后 Capan-1 和 MIA PaCa-2 各组细胞 p-AMPK 和 EGR1 蛋白的表达情况

表 9 胰腺癌炎症 Capan-1 环境下 EGR1 和 PDGFB 蛋白表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	EGR1	PDGFB
Capan-1+CCK 组	1.000 ± 0.046	1.000 ± 0.048
Capan-1+CCK+FGF21 组	0.511 ± 0.050^a	0.482 ± 0.052^a

注:a,与 Capan-1+CCK 组比较, $P=0.000$

表 10 胰腺癌炎症 MIA PaCa-2 环境下 EGR1 和 PDGFB 蛋白表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	EGR1	PDGFB
MIA PaCa-2+CCK 组	1.000 ± 0.340	1.000 ± 0.040
MIA PaCa-2+CCK+FGF21 组	0.822 ± 0.376^a	0.835 ± 0.006^b

注:a,与 MIA PaCa-2+CCK 组比较, $P=0.004$;b,与 MIA PaCa-2+CCK 组比较, $P=0.000$

表 11 加入 AMPK 抑制剂后,胰腺癌炎症 MIA PaCa-2 环境下 EGR1 蛋白表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	EGR1	P_a 值	P_b 值	P_c 值
MIA PaCa-2+CCK 组	1.000 ± 0.262	—	0.000	0.108
MIA PaCa-2+CCK+FGF21 组	0.692 ± 0.048	0.000	—	0.000
MIA PaCa-2+CCK+FGF21+compound C 组	1.083 ± 0.036	0.108	0.000	—

注: P_a 值, MIA PaCa-2+CCK 组相比较; P_b 值:与 MIA PaCa-2+CCK+FGF21 组相比较; P_c 值:与 MIA PaCa-2+CCK+FGF21+compound C 组相比较;—:无对应值

表 12 加入 AMPK 抑制剂后,胰腺癌炎症 MIA PaCa-2 环境下 P-AMPK 蛋白表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	EGR1	P_a 值	P_b 值	P_c 值
MIA PaCa-2+CCK 组	1.000 ± 0.218	—	0.000	0.000
MIA PaCa-2+CCK+FGF21 组	2.040 ± 0.060	0.000	—	0.000
MIA PaCa-2+CCK+FGF21+compound C 组	1.630 ± 0.414	0.000	0.000	—

注: P_a 值, MIA PaCa-2+CCK 组相比较; P_b 值:与 MIA PaCa-2+CCK+FGF21 组相比较; P_c 值:与 MIA PaCa-2+CCK+FGF21+compound C 组相比较;—:无对应值

表 13 加入 AMPK 抑制剂后,胰腺癌炎症 Capan-1 环境下 EGR1 蛋白表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	EGR1	P_a 值	P_b 值	P_c 值
Capan-1+CCK组	1.000 ± 0.018	—	0.000	0.001
Capan-1+CCK+FGF21组	0.661 ± 0.015	0.000	—	0.000
Capan-1+CCK+FGF21+compound C 组	0.080 ± 0.024	0.001	0.000	0.000

注: P_a 值, Capan-1+CCK 组相比较; P_b 值:与 Capan-1+CCK+FGF21 组相比较; P_c 值:与 Capan-1+CCK+FGF21+compound C 组相比较;—:无对应值

表 14 加入 AMPK 抑制剂后,胰腺癌炎症 Capan-1 环境下 pAMPK 蛋白表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	pAMPK	P_a 值	P_b 值	P_c 值
Capan-1+CCK组	1.000 ± 0.010	—	0.046	0.013
Capan-1+CCK+FGF21组	1.151 ± 0.074	0.046	—	0.001
Capan-1+CCK+FGF21+compound C 组	0.799 ± 0.059	0.013	0.001	—

注: P_a 值, Capan-1+CCK 组相比较; P_b 值:与 Capan-1+CCK+FGF21 组相比较; P_c 值:与 Capan-1+CCK+FGF21+compound C 组相比较;—:无对应值

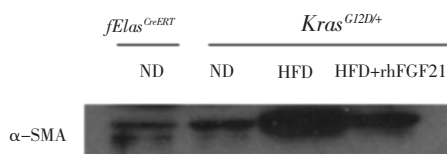


图 8 加入 FGF21 后,胰腺星状细胞活化指标 α -SMA 蛋白表达受到抑制

3 讨论

PDAC因进展快、转移早和对化放疗不敏感,是最具侵袭性的实体肿瘤之一^[20]。其中炎症作为PDAC 常见病理现象^[12],在胰腺癌的发生发展中发挥重要促进作用^[13]。炎症促进癌组织中生成丰富的纤维结缔组织^[20-22],占肿瘤体积的 90%。这种致密的基质形成的压力和低微血管密度充当了肿瘤机械和功能的屏障,导致抗癌药传递和免疫细胞浸润减少,引发药物抵抗^[23-26]。

越来越多的证据表明,活化的PSC在胰腺癌组织的纤维化过程中起着关键作用^[4,27-30]。在正常胰腺中,静止的PSC胞质中含维生素A脂滴^[29,31]。当胰腺受损害时,静止的PSC变成表达 α -SMA的肌成纤维样细胞,称为“激活”^[27]。胰腺癌细胞通过分泌PDGF、TGF和结缔组织生长因子IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子等,并通过Smad信号转导、过氧化物酶增殖受体 γ 等细胞内蛋白调节PSC的活化。活化的

PSC分泌大量基质蛋白,促进胰腺组织纤维化,同时分泌大量细胞因子、趋化因子,构建出胰腺癌的病理微环境,促进癌细胞的增殖和迁移、药物抵抗和免疫逃逸等^[19]。因此,靶向PSC已经成为治疗胰腺癌的新型策略。

FGF21是诱导型蛋白,在炎症刺激下表达迅速升高^[8,32-34],并具有抗炎作用^[8,34-36]。从雨蛙肽建立的小鼠急性胰腺炎模型中观察到,FGF21在胰腺组织中表达增加,使得炎症减轻,PSC活化减少,纤维化程度随之减轻^[8]。如果外源性加入FGF21,也能观察到同样的现象^[10]。另有文献报道,FGF21能减轻小鼠肝纤维化模型中肝脏和血清炎症细胞因子的表达并抑制TGF- β /p-Smad2/3和NF- κ B通路对肝脏星状细胞的活化,发挥其抗纤维化潜力^[37-38]。因此,目前的研究已经证实FGF21对胰腺炎症中PSC的活化产生明显抑制作用。

在胰腺癌组织中,FGF21是否对间质中的PSC产生抑制作用呢?目前的文献中未见有此报道。既往研究发现,在人和小鼠胰腺癌组织中FGF21的表达明显降低,而如果外源性地给予FGF21后,小鼠胰腺癌组织的生长和转移均受到明显抑制,同时观察到胰腺癌组织中PSC的活化指标 α -平滑肌蛋白的表达水平明显降低。为进一步证实FGF21对PSC的抑制作用,本研究首先通过胆囊收缩素CCK建立Capan-1和MIA PaCa-2两株胰腺癌细胞的炎性环

境,采用 CCK-8 细胞活力实验观察空白对照组、炎性胰腺癌细胞上清液组和 FGF21 干预后炎性胰腺癌细胞上清液组 PSC 的增殖和活化情况。实验结果提示,炎性胰腺癌细胞上清液组 PSC 增殖和活化较对照组增强,而 FGF21 干预后的上清液组能抑制前者的作用。这表明 FGF21 作用于炎性环境中的胰腺癌细胞后,明显抑制了胰腺癌细胞对 PSC 的激活作用。

为了进一步揭示 FGF21 对胰腺癌炎症微环境中 PSC 增殖和活化的抑制作用机制,根据文献报道中 FGF21 在小鼠胰腺炎模型中对腺泡细胞 EGR1 和 PDGF 的抑制作用,本研究证实了 FGF21 能明显抑制胰腺癌细胞 EGR1 和 PDGF 的表达。EGR1 是一种具有锌指结构的核转录因子,通过调节参与炎症、基质形成、血栓形成、凋亡和重塑的一系列下游基因的转录发挥作用,包括 PDGF A 链和 B 链及纤维连接蛋白等^[39]。同时,它可以直接刺激肌成纤维细胞的转分化和 α -SMA 的表达^[40],以及多种与纤维化相关 ECM 组分(包括胶原、纤维连接蛋白^[41-42]和黏附分子^[43])的转录。因此,EGR1 是调节炎症和纤维化的关键因子。本实验结果证实 FGF21 下调炎症环境下胰腺癌细胞 EGR1 和 PDGF 的表达,因此推测 FGF21 通过调控胰腺癌细胞 EGR1 和 PDGF 的表达参与 FGF21 对 PSC 增殖和活化的抑制作用。

AMPK 磷酸化的丧失在胰腺癌中普遍存在且与其纤维化和不良预后正相关^[44]。文献报道 FGF21 能通过激活 AMPK 抑制小鼠肝脏星状细胞的激活,起到抗纤维化的作用,AMPK/PGC1 α 通路参与棕色脂肪组织源性 FGF21 减轻高血压心脏重构^[37,45,47]。另外,FGF21 还能通过激活 AMPK 通路下调炎症因子的表达,发挥抗炎作用^[47-48]。为此,本研究推测 FGF21 可能通过激活炎症环境中胰腺癌细胞 AMPK 通路下调 EGR1 的表达而发挥抗纤维化作用。为证实这一推测,研究中加入 AMPK 抑制剂 compound C,观察加入后胰腺癌细胞 EGR1 的蛋白水平表达,发现 AMPK 的抑制剂加入后,FGF21 对 EGR1 表达的抑制作用明显减弱。这一结果提示激活 AMPK 信号是 FGF21 抑制 EGR1 表达的重要途径之一。

综上所述,本研究表明 FGF21 可能通过抑制胰腺癌细胞炎症环境中星状细胞的增殖和活化实现其对肿瘤的抑制。其机制可能与 FGF21 激活炎症环境下胰腺癌细胞 AMPK 通路并下调 EGR1 的表达及减少 PDGFB 的表达有关。此研究为 FGF21 通过抑制胰腺星状细胞治疗胰腺癌提供了依据。但是,

由于胰腺癌组织微环境的复杂性,FGF21 是否通过作用于其他细胞(如炎症环境中的巨噬细胞)来发挥其对 PSC 活化和纤维化的抑制作用,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Adamska A, Domenichini A, Falasca M. Pancreatic ductal adenocarcinoma: current and evolving therapies[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1338.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30.
- [3] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(11): 2913-2921.
- [4] Van Loenhout J, Flieswasser T, Freire Boullosa L, et al. Cold atmospheric plasma-treated PBS eliminates immunosuppressive pancreatic stellate cells and induces immunogenic cell death of pancreatic cancer cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(10): 1597.
- [5] Luo Y, Yang Y, Liu M, et al. Oncogenic KRAS reduces expression of FGF21 in acinar cells to promote pancreatic tumorigenesis in mice on a high-fat diet[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(5): 1413-1428.e11.
- [6] 朱莎莎. FGF21 对炎症环境下人胰腺癌细胞迁移侵袭的影响及其机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019.
- [7] Kharitonov A, Adams AC. Inventing new medicines: the FGF21 story[J]. *Mol Metab*, 2014, 3(3): 221-229.
- [8] Johnson CL, Weston JY, Chadi SA, et al. Fibroblast growth factor 21 reduces the severity of cerulein-induced pancreatitis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(5): 1795-1804.
- [9] Hernandez G, Luo T, Javed TA, et al. Pancreatitis is an FGF21-deficient state that is corrected by replacement therapy[J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(525): eaay5186.
- [10] Wang N, Zhao TT, Li SM, et al. Fibroblast growth factor 21 ameliorates pancreatic fibrogenesis via regulating polarization of macrophages[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 382(1): 111457.
- [11] Midgley VC, Khachigian LM. Fibroblast growth factor-2 induction of platelet-derived growth factor-C chain transcription in vascular smooth muscle cells is ERK-dependent but not JNK-dependent and mediated by Egr-1[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(39): 40289-40295.
- [12] Komura T, Sakai Y, Harada K, et al. Inflammatory features of pancreatic cancer highlighted by monocytes/macrophages and CD4⁺ T cells with clinical impact[J]. *Cancer Science*, 2015, 106(6): 672-686.
- [13] Deschênes-Simard X, Mizukami Y, Bardeesy N. Macrophages in pancreatic cancer: starting things off on the wrong track[J]. *J Cell Biol*, 2013, 202(3): 403-405.
- [14] Lesina M, Wörmann SM, Neuhofer P, et al. Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(1): 80-87.
- [15] 张志文, 吴焕文, 梁小龙, 等. 胰腺导管腺癌中胰腺星形细胞的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(9): 1971-1977.

- [16] Bachem MG, Schünemann M, Ramadani M, et al. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(4): 907–921.
- [17] Omary MB, Lugea A, Lowe AW, et al. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 50–59.
- [18] Pothula SP, Xu Z, Goldstein D, et al. Key role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer[J]. *Cancer Lett*, 2016, 381(1): 194–200.
- [19] Masamune A, Shimosegawa T. Pancreatic stellate cells: a dynamic player of the intercellular communication in pancreatic cancer[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015, 39S: S98–S103.
- [20] Vincent A, Herman J, Schulick R, et al. Pancreatic cancer[J]. *Lancet*, 2011, 378(9791): 607–620.
- [21] Erkan M, Michalski CW, Rieder S, et al. The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008, 6(10): 1155–1161.
- [22] Neeße A, Bauer CA, Öhlund D, et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: ready for clinical translation?[J]. *Gut*, 2019, 68(1): 159–171.
- [23] Watt J, Kocher HM. The desmoplastic stroma of pancreatic cancer is a barrier to immune cell infiltration[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(12): e26788.
- [24] Heinemann V, Reni M, Ychou M, et al. Tumour–stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma: rationale and current evidence for new therapeutic strategies[J]. *Cancer Treat Rev*, 2014, 40(1): 118–128.
- [25] Lunardi S, Muschel RJ, Brunner TB. The stromal compartments in pancreatic cancer: are there any therapeutic targets?[J]. *Cancer Lett*, 2014, 343(2): 147–155.
- [26] Dougan SK. The pancreas cancer microenvironment[J]. *Cancer J*, 2017, 23(6): 321–325.
- [27] Masamune A, Shimosegawa T. Signal transduction in pancreatic stellate cells[J]. *J Gastroenterol*, 2009, 44(4): 249–260.
- [28] Masamune A, Watanabe T, Kikuta K, et al. Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2009, 7(11S): S48–S54.
- [29] Erkan M, Adler G, Apte MV, et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research[J]. *Gut*, 2012, 61(2): 172–178.
- [30] Apte MV, Wilson JS, Lugea A, et al. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(6): 1210–1219.
- [31] Apte MV, Haber PS, Applegate TL, et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture[J]. *Gut*, 1998, 43(1): 128–133.
- [32] Shenoy VK, Beaver KM, Fisher FM, et al. Elevated serum fibroblast growth factor 21 in humans with acute pancreatitis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e164351.
- [33] Gariani K, Drifte G, Dunn-Siegrist I, et al. Increased FGF21 plasma levels in humans with sepsis and SIRS[J]. *Endocr Connect*, 2013, 2(3): 146–153.
- [34] Feingold KR, Grunfeld C, Heuer JC, et al. FGF21 is increased by inflammatory stimuli and protects leptin-deficient ob/ob mice from the toxicity of sepsis[J]. *Endocrinology*, 2012, 153(6): 2689–2700.
- [35] Yu Y, He J, Li S, et al. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) inhibits macrophage-mediated inflammation by activating Nrf2 and suppressing the NF- κ B signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 38: 144–152.
- [36] Wang WF, Li SM, Ren GP, et al. Recombinant murine fibroblast growth factor 21 ameliorates obesity-related inflammation in monosodium glutamate-induced obesity rats[J]. *Endocrine*, 2015, 49(1): 119–129.
- [37] Le CT, Nguyen G, Park SY, et al. LY2405319, an analog of fibroblast growth factor 21 ameliorates α -smooth muscle actin production through inhibition of the succinate-G-protein coupled receptor 91 (GPR91) pathway in mice[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e192146.
- [38] Xu P, Zhang Y, Liu Y, et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates hepatic fibrogenesis through TGF- β /smad2/3 and NF- κ B signaling pathways[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 290: 43–53.
- [39] Cho SJ, Kang MJ, Homer RJ, et al. Role of early growth response-1 (Egr-1) in interleukin-13-induced inflammation and remodeling[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(12): 8161–8168.
- [40] Nakamura H, Isaka Y, Tsujie M, et al. Introduction of DNA enzyme for Egr-1 into tubulointerstitial fibroblasts by electroporation reduced interstitial α -smooth muscle actin expression and fibrosis in unilateral ureteral obstruction (UUO) rats[J]. *Gene Ther*, 2002, 9(8): 495–502.
- [41] Gaggioli C, Deckert M, Robert G, et al. HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1[J]. *Oncogene*, 2005, 24(8): 1423–1433.
- [42] Liu C, Yao J, Mercola D, et al. The transcription factor EGR-1 directly transactivates the fibronectin gene and enhances attachment of human glioblastoma cell line U251[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(27): 20315–20323.
- [43] Maltzman JS, Carmen JA, Monroe JG. Transcriptional regulation of the *Icam-1* gene in antigen receptor- and phorbol ester-stimulated B lymphocytes: role for transcription factor EGR1[J]. *J Exp Med*, 1996, 183(4): 1747–1759.
- [44] Duan W, Chen K, Jiang Z, et al. Desmoplasia suppression by metformin-mediated AMPK activation inhibits pancreatic cancer progression[J]. *Cancer Lett*, 2017, 385: 225–233.
- [45] Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase[J]. *Hepatology*, 2008, 47(2): 677–685.
- [46] Ruan CC, Kong LR, Chen XH, et al. A2A receptor activation attenuates hypertensive cardiac remodeling via promoting brown adipose tissue-derived FGF21[J]. *Cell Metab*, 2018, 28(3): 476–489.e5.
- [47] Kim C, Joe Y, Choi H, et al. Deficiency of fibroblast growth factor 21 aggravates obesity-induced atrophic responses in skeletal muscle[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2019, 16: 17.
- [48] Wang S, Wang Y, Zhang Z, et al. Cardioprotective effects of fibroblast growth factor 21 against doxorubicin-induced toxicity via the SIRT1/LKB1/AMPK pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e3018.

(责任编辑:唐秋姗)