

# 用 In Cell 1000 定量研究 PPAR $\gamma$ /TGF $\beta$ /Smad2 信号通路中, 调控 CHO 细胞内 EGFP-Smad2 质 - 核转运的 15-脱氧-Delta (12,14)-前列腺素 J<sub>2</sub>

Fei Ye, Tao Sun, Haibin Luo, Hong Ding, Kaixian Chen, Xu Shen and Huiliang Jiang  
中科院上海药物所新药筛选中心

关键词: 15d-PGJ<sub>2</sub> • EGFP-Smad2 • 转运 • IN Cell Analyzer • 荧光 • GW9662

在TGF $\beta$ /Smad2信号通路中, Smad2是一个非常重要的细胞因子, 起着信号传播的关键作用。在TGF $\beta$ 受体介导的磷酸化作用以后, Smad2 会从细胞质转移到细胞核中。最近有研究表明, 15-脱氧-delta (12, 14)-前列腺素 J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) 作为过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 在自然界中的天然激动剂, 在 Smad2 的活性调节方面起作用。然而, 至今并未有定量的数据被报道, 而且, 15d-PGJ<sub>2</sub> 对于 Smad2 的调控是否必须通过 PPAR $\gamma$  在一个类似于 PPAR $\gamma$ /TGF $\beta$ /Smad2 的信号通路中实现也不得而知。

在本研究中, 使用 GE Healthcare 的 IN Cell Analyzer 1000 活细胞分析平台配合专门的核转运分析软件, 分析了EGFP-Smad2在CHO细胞中的定位变化, 并对TGF $\beta$ 激活的、受到 15d-PGJ<sub>2</sub> 调控的 EGFP-Smad2 转运进行了定量研究。实验结果表明: TGF $\beta$ 促进 EGFP-Smad2 从细胞质向细胞核转运的 EC<sub>50</sub> 浓度为 8.83 pM; 当 15d-PGJ<sub>2</sub> 遏制该转运过程的 IC<sub>50</sub> 浓度为 0.68 M。而且, GW9662, 一种 PPAR $\gamma$  的拮抗剂, 能够将 15d-PGJ<sub>2</sub> 的遏制水平削弱一个数量级。该结果表明 15d-PGJ<sub>2</sub> 可能是通过 PPAR $\gamma$ /TGF $\beta$ /Smad2 信号通路对于 Smad2 的转运进行抑制的。

## 实验方法和材料

仪器和分析软件:

IN Cell Analyzer 1000	25-8051-28
IN Cell Analysis Workstation 3.3	28-4089-71

(包含了核转运分析软件模块)

其它需要的材料:

- 15d-PGJ<sub>2</sub> (Biomol)
- GW9662 (Merck)
- 带有 Glutamax 的培养基 F-12 Ham medium, Fetal Bovine Serum (FBS), 青霉素 - 链霉素 (P/S), Trypsin-EDTA, Lipofectamine 2000™ 和 1M HEPES 缓冲液 (Invitrogen)
- Geneticin (G418), Bovine serum albumin (BSA), Dimethylsulfoxide (DMSO), Transforming Growth Factor-1 (TGF-1) 和 Hoechst 33342 (Sigma)

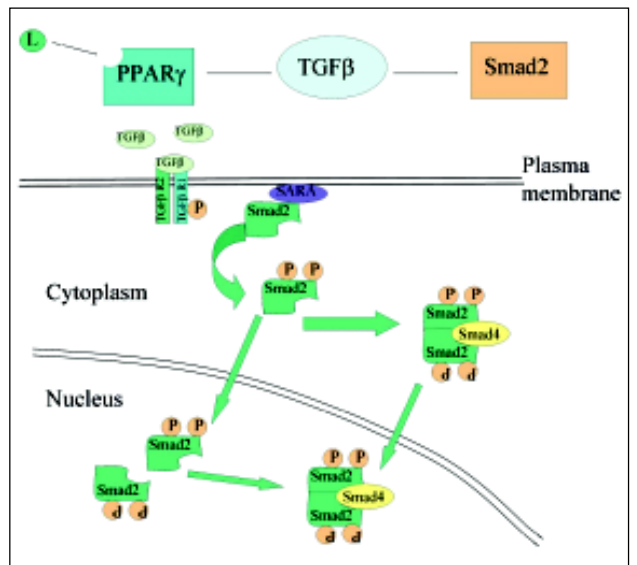


图 1. PPAR $\gamma$ /TGF $\beta$ /Smad2 信号通路。

PPAR $\gamma$  的活性被其受体所调控, PPAR $\gamma$  本身调节着 TGF $\beta$  的活性, 而 TGF $\beta$  激活 Smad2 的转运。当 Smad2 被激活后, 其 C 端的两个丝氨酸会被磷酸化, 并从细胞质转移至细胞膜中。这种转移分两种途径进行: 1. Smad2 直接进入细胞核; 2. Smad2 和 Smad4 共同形成 3 分子聚合物再转移进入细胞核。L: PPAR $\gamma$  的受体, P: 磷酸基

## 基于 EGFP-Smad2 的实验方法

在该研究中, EGFP-Smad2 被稳定转染至 CHO 细胞中 (GE Healthcare), 置于生长培养基 (Ham's Nutrient Mixture F-12 medium, 10% FBS, 1% Penicillinstreptomycin 和 0.5 mg/ml Genetin) 中培养, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>。在研究前 1 天, 于 96 孔板中植入每孔 1.0 × 10<sup>4</sup> 个细胞, 在生长培养基中孵育过夜。将需要检测的化合物在测定培养基 (Ham's Nutrient Mixture F-12 medium with Glutamax, 10 mM HEPES 和 10 μM Hoechst 33342) 中以不同浓度稀释。倒出 96 孔板中的生长培养基, 用 PBS 和测定培养基分别洗两次, 在每孔中加入 100 μl 的待检测化合物。在第 1 个孔内的细胞孵育 1 小时后, 取出细胞板使用 IN Cell Analyzer 1000 成像, 并使用核转运分析模块对图像数据进行分析。

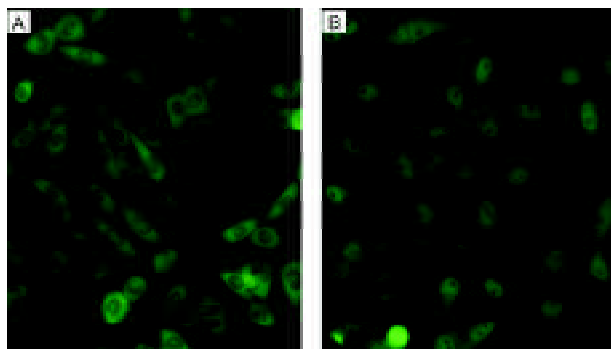


图 2. 稳定转染了 EGFP-Smad2 的 CHO 细胞的绿色荧光影像。加入 TGF 前，几乎所有 EGFP-Smad2 都定位于细胞质中，呈未激活状态 (A)；加入 TGF 后，几乎所有 EGFP-Smad2 都转移至细胞核中 (B)。

## 使用核转运分析模块对图像数据进行分析

使用 GE Healthcare 的 IN Cell Analyzer 1000 活细胞分析平台配合专门的核转运分析软件对于 EGFP-Smad2 从细胞质到细胞核的转运进行定量。全部分析方法根据仪器的操作说明书进行。在当前的分析中，将最小的细胞核面积设为  $50 \mu\text{m}^2$ ，最小的细胞面积设为  $300 \mu\text{m}^2$ 。细胞核和细胞质中的荧光强度比例通过软件的定量计算获得。核转运模块可自动对于成像视野中的每个细胞分别计算核 / 质荧光强度比 (N/C)，以下列出使用的数据是每个视野中所有细胞核 / 质荧光强度比的平均值。

## 实验结果和讨论

### 定量分析 TGF $\beta$ 和 15d-PGJ $_2$ 在 PPAR $\gamma$ /TGF $\beta$ /Smad2 信号通路的效应

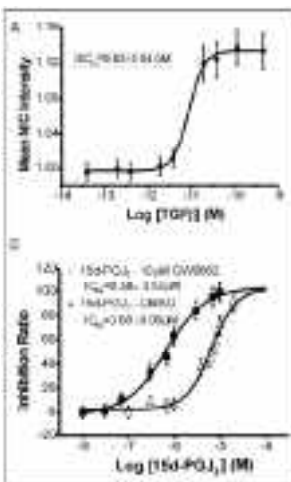
TGF 是细胞生长、分化、凋亡、繁殖中的调控因子。15d-PGJ $_2$  可以促进脂肪生成，在某些炎症的调控中起作用。最近有报道表明，15d-PGJ $_2$  可以通过抑制 Smad2 从细胞质到细胞核的转运，阻断 TGF 的活化作用。不过尚未有特别的论证。在本实验中，就通过 GE Healthcare 的 IN Cell Analyzer 1000 活细胞分析平台配合专门的核转运分析软件对 TGF 和 15d-PGJ $_2$  对于 Smad2 转运的调控进行定量分析。

由于 Smad2 融合了绿荧光蛋白 EGFP 的标签，可以通过对于荧光定位位置的变化测定 Smad2 的位置转运。由于未被激活的 Smad2 蛋白定位在细胞质，活化后的 Smad2 蛋白定位于细胞核，则计算核 / 质荧光强度比就可以反映活化的 Smad2 蛋白的效应。因此，在加入不同浓度的 TGF 和 15d-PGJ $_2$  后，通过测定核 / 质荧光强度比就能定量计算这两者对于 Smad2 的调控作用。

如图 2A，大多数 EGFP-Smad2 定位于细胞质中，表明此时 Smad2 还处于未激活阶段，没有受到 TGF 的调控。当使用 TGF 处理细胞 1 小时后，EGFP-Smad2 开始从细胞质转移至细胞核中，其转移量和 TGF 的浓度成正比。最终，大多数 EGFP-Smad2 定位到了细胞核中，如图 2B 所示。这表明了 TGF 对于 Smad2 的激活作用是跟剂量相关的。

通过核转运软件模块进行定量分析，如图 3A，对于 TGF 浓度的对数值和核 / 质绿荧光强度的比值作图，则 TGF 活性的 EC $_{50}$  值为 8.83 pM，因此可以证明 TGF 是 Smad2 的激活剂之一。同时，为了定量 15d-PGJ $_2$  对于 Smad2 的调控，在细胞中加入不同浓度的 15d-PGJ $_2$  连同 1 ng/ml TGF，发现 TGF 对于 Smad2 转运的激活作用因为 15d-PGJ $_2$  的加入受到了削弱，削弱程度随 15d-PGJ $_2$  的浓度增加而增强，如图 3B。其阻遏比例可以定义为下面公式：

$$I_s = (R_1 - R_2) / (R_1 - R_0) \times 100\%$$



$I_s$ ：不同浓度 15d-PGJ $_2$  的阻遏比例  
 $R_1$  和  $R_0$ ：加入 1 ng/ml TGF 和仅有 DMSO 的细胞中相对核 / 质绿荧光强度的比值

$R_2$ ：加入 1 ng/ml TGF 和不同浓度 15d-PGJ $_2$  后的核 / 质绿荧光强度的比值

如图 3B 所示，根据 15d-PGJ $_2$  浓度的对数值和 15d-PGJ $_2$  的阻遏比例作图，得到 15d-PGJ $_2$  的 IC $_{50}$  值为 0.68  $\mu\text{M}$

图 3. TGF 和 15d-PGJ $_2$  的剂量对于转运的影响 (A) 为不同浓度的 TGF，(B) 为带有 1 ng/ml TGF 的不同浓度的 15d-PGJ $_2$ ，其中 ( ) 为测定培养基中加入 10  $\mu\text{M}$  GW9662，而 ( ) 并不加入 GW9662。对于 TGF 浓度的对数值和核 / 质绿荧光强度的比值作图，计算得到 TGF 活性的 EC $_{50}$  值为 8.83 pM；对于 15d-PGJ $_2$  浓度的对数值和 15d-PGJ $_2$  的阻遏比例作图，得到 15d-PGJ $_2$  的 IC $_{50}$  值为 0.68  $\mu\text{M}$ 。

## GW9662 对于 15d-PGJ<sub>2</sub> 的 Smad2 转运遏制效应的削弱作用

GW9662 是 PPAR 的不可逆拮抗剂，能够和 PPAR 共价结合，阻断 PPAR 的活性。由于我们已经证实 PPAR 在稳定转染 Smad2 的 CHO 细胞中的存在，因此，可以使用 GW9662 来检测 15d-PGJ<sub>2</sub> 对于 Smad2 转运的遏制是否依赖于 PPAR。假设 15d-PGJ<sub>2</sub> 对于 Smad2 转运的遏制是否依赖于 PPAR 的话，其活性应该随着 GW9662 的加入而降低。事先已经通过实验证实 GW9662 本身和 Smad2 的转运以及 TGF 对于 Smad2 的激活并没有影响，而且，我们还发现尽管 GW9662 可以阻断 PPAR 的活性，但它和 PPAR /TGF /Smad2 信号通路中的 TGF 和 Smad2 的活性没有任何关系。因此，可以使用 GW9662 作为参照来研究 15d-PGJ<sub>2</sub> 对于 Smad2 转运的遏止是否依赖于 PPAR。使用不同浓度的 15d-PGJ<sub>2</sub> 配合 10  $\mu$ m 的 GW9662 处理细胞，同时也使用 1 ng/ml 的 TGF 处理细胞。在第 1 个孔内的细胞孵育 1 小时后，取出细胞板使用 IN Cell Analyzer 1000 成像，并使用核转运分析模块对图像数据进行分析。结果表明，加入 GW9662 后，15d-PGJ<sub>2</sub> 的 IC<sub>50</sub> 值从 0.68  $\mu$ m 增高到 6.58  $\mu$ m (图 3B)。当 GW9662 阻断了 PPAR 的活性后，15d-PGJ<sub>2</sub> 对 Smad2 转运的遏制作用同时被削弱。因此，说明 15d-PGJ<sub>2</sub> 对于 Smad2 转运的遏制是依赖于 PPAR 的。

## 结论

在本研究中，使用 IN Cell Analyzer 1000 活细胞分析平台和核转运分析软件，定量分析了 EGFP-Smad2 在其稳定转染的 CHO 细胞中的转运变化，结果表明：TGF 促进 EGFP-Smad2 从细胞质向细胞核的转运的 EC<sub>50</sub> 为 8.83 pM；15d-PGJ<sub>2</sub> 作为 PPAR 天然的激动剂，能够遏制 TGF 促进 EGFP-Smad2 转运的促进作用，其遏制过程的 IC<sub>50</sub> 为 0.68  $\mu$ m。GW9662，一种 PPAR 的拮抗剂，能够削弱 15d-PGJ<sub>2</sub> 的遏制水平，这表明了 15d-PGJ<sub>2</sub> 对于 Smad2 转运的遏制是依赖于 PPAR 的。我们希望通过该研究，能够在复杂的药理学信号转导通路中找到关于 PPAR 的增效作用。