

MGF对人软骨终板干细胞增殖和迁移的影响

李元靖 刘欢 樊欣 周跃*

(第三军医大学附属新桥医院骨科, 重庆 400037)

摘要 力生长因子(mechano growth factor, MGF)在多种组织均有表达,能促进力效应细胞的增殖和迁移。为研究MGF对人软骨终板干细胞(cartilage endplate derived stem cells, CESC)s增殖和迁移的影响,该研究采用CCK-8检测法、Transwell实验、蛋白免疫印迹法(Western blot)分别对CESCs的增殖、迁移以及Erk磷酸化表达水平进行检测。结果显示,MGF能促进CESCs的增殖和迁移,且效应具有剂量依赖性,当浓度为4.5 ng/mL时MGF促增殖和迁移的效应最大($P<0.05$)。给予细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, Erk)抑制剂PD98059时,MGF促增殖效应显著下降($P<0.001$);给予胰岛素样生长因子-1受体(insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R)抑制剂PQ401时,MGF促迁移效应也显著下降($P<0.001$)。Western blot检测结果显示,给予MGF后,CESC)s的Erk磷酸化表达水平显著升高($P<0.001$),但IGF-1R抑制剂PQ401能抑制Erk磷酸化的表达($P<0.001$)。该研究表明,MGF具有促CESCs增殖和迁移的效应,该效应依赖于Erk的磷酸化表达,且IGF-1R在MGF促迁移的效应中扮演重要角色。

关键词 软骨终板干细胞; 力生长因子; 增殖; 迁移; Erk; IGF-1R

Mechano Growth Factor Promotes Proliferation and Migration of Human Cartilage Endplate Derived Stem Cells

Li Yuanjing, Liu Huan, Fan Xin, Zhou Yue*

(Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Mechano growth factor (MGF), which expresses in a wide variety of tissues, can improve proliferation and migration of mechanocytes. To investigate the effects of MGF on proliferation and migration in human cartilage endplate derived stem cells (CESCs), several assays including CCK-8, Transwell and Western blot were conducted. The results showed that MGF could improve CESC)s proliferation and migration at a dose-dependent manner, and the most remarkable effects appeared at concentration of 4.5 ng/mL ($P<0.05$). When CESC)s were pretreated with Erk inhibitor PD98059, the proliferation effect was decreased obviously ($P<0.001$). Pretreated with IGF-1R inhibitor PQ401, the effect on migration was highly reduced ($P<0.001$). Western blot analysis indicated that the phosphorylation level of Erk was higher after CESC)s treated with MGF ($P<0.001$). Pretreated with IGF-1R inhibitor PQ401, the phosphorylation level of Erk was highly declined ($P<0.001$). These results confirm that MGF improves proliferation and migration of CESC)s through the phosphorylation of Erk, and IGF-1R may play an important role in MGF promoting the migration of CESC)s.

Keywords CESC)s; MGF; proliferation; migration; Erk; IGF-1R

收稿日期: 2014-11-06

接受日期: 2014-12-16

国家自然科学基金(批准号: 81472076、81401801)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68755608, E-mail: happyzhou@vip.163.com

Received: November 6, 2014

Accepted: December 16, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81472076, 81401801)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68755608, E-mail: happyzhou@vip.163.com

网络出版时间: 2015-03-04 10:39

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150304.1039.005.html>

下腰痛(low back pain, LBP)是人类社会的一类重大疾病,发病率高,是导致劳动力丧失的主要原因之一^[1]。而椎间盘退变(degenerative disc disease, DDD)是导致下腰痛的常见原因^[2]。早期学界一直将椎间盘退变的研究方向聚焦在髓核退变,但最近的研究显示,软骨终板(cartilage end plate, CEP)的变化也是导致椎间盘发生退变的重要因素之一^[3]。椎间盘中, CEP由透明软骨组成,是供应成熟椎间盘营养物质的主要通道^[4]。 CEP的钙化或硬化会减少椎间盘营养物质的供应,最终导致DDD的发生^[5-6]。有文献报道, CEP中软骨细胞的减少是导致DDD发生的另一重要因素^[7]。因此有学者认为, CEP的变化在椎间盘退变的发生和发展中起着决定性作用^[8]。如何保持软骨终板组织正常的生理功能以及预防和治疗 CEP退变将是防治DDD的关键之一。我们团队一直从事椎间盘退变的研究,认为 CEP可能存在原位干细胞。2011年,团队首次证实软骨终板组织中存在软骨终板干细胞(cartilage endplate derived stem cells, CESC_s)^[9]。我们的研究显示, CESC_s具有较强的克隆形成能力和多向分化潜能,与人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchyme stem cells, BMSC_s)^[9]在生物学特性上有一定的相似性,但在分化方面更有优势。因此, CESC_s可能成为治疗DDD以及组织工程应用中更好的细胞来源。有证据显示,软骨终板细胞能向髓核组织迁移并最终转化为髓核细胞^[10],如果能刺激CESCs活化、增殖,保持 CEP的良好状态,并刺激CESCs向髓核组织迁移,将会给椎间盘退变的治疗带来重大突破。

力生长因子(mechano growth factor, MGF)于1996年由Yang等^[11]发现,是胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)的一类剪接变异体,在人体也被称作IGF-1Ec。研究显示, MGF存在于骨骼、骨骼肌等多种组织,对成骨细胞、成肌细胞等力效应细胞具有促增殖、迁移、抑制成骨分化以及抗凋

亡的效应^[12],其中促增殖和迁移的效应主要依赖于Erk的磷酸化表达。最新的研究证实, MGF具有促BMSC_s迁移的作用^[13]。鉴于CESCs与BMSC_s具有相似的生物学特性^[9],我们推测MGF可能对CESCs具有促增殖和迁移的作用。但目前关于MGF在CESCs的作用及其可能调控机制的研究鲜有报道。本研究通过体外细胞实验,检测MGF对CESCs增殖和迁移的影响,并对其调控机制进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料获取

本实验选取了5例腰椎间盘突出变的患者,在其行融合术后收集腰椎间盘突出组织。所有患者均已签署知情同意书。本研究获得第三军医大学附属新桥医院伦理委员会批准。收集的组织详细信息见表1。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12培养液、胰酶、双抗(青霉素-链霉素)购自Hyclone公司;胎牛血清(FBS)购自Gibco公司; II型胶原酶购自Sigma公司;琼脂糖购自Invitrogen公司; MGF购自Phoenix公司; CCK-8购自Dojindo公司;成软骨分化诱导培养液、成骨分化诱导培养液、成脂分化诱导培养液购自Cyagen公司; CD73-FITC、CD14-FITC、CD19-FITC、CD90-FITC、CD34-FITC、CD45-FITC、CD105-PE、HLA-DR-PerCP购自eBioscience公司; p44/42 MAPK抗体、Phospho-p44/42 MAPK抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)购自Beyotime公司。

美国Costar公司6孔和96孔细胞培养板;美国Thermo公司CO₂细胞培养箱和酶标仪;德国Leica公司倒置相差显微镜;美国BD公司流式细胞仪;美国GE公司凝胶成像系统。

1.3 细胞获取及培养

在无菌操作台上清理标本,去除周围组织,用

表1 标本采集详细信息
Table 1 The details of the specimens

序号 No.	诊断 Diagnosis	节段 Segment	Modic分级 Modic type	性别 Sex	年龄 Age
1	Lumbar disc herniation	L5-S1	II	Male	46
2	Lumbar spondylolisthesis	L4	II	Male	51
3	Lumbar spondylolisthesis	L5-S1	I	Female	53
4	Lumbar spinal stenosis	L4-L5	I	Male	49
5	Lumbar spondylolisthesis	L4-L5	II	Female	57

磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗, 将标本放入无菌玻璃皿中, 用组织剪在无菌实验台上将其修剪成 $1\times 1\times 1\text{ mm}^3$ 大小的碎块, 加入0.15% II型胶原酶4 mL。放置到 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中消化12 h后, 加入含10% FBS的DMEM/F12培养液4 mL终止消化。用 $79\text{ }\mu\text{m}$ 的网筛过滤消化悬液, 收集悬液, $1\text{ }000\text{ r/min}$ 离心5 min。弃上清, 加入含有10% FBS、1%双抗的DMEM/F12培养液4 mL, 重悬细胞。将细胞悬液转移到细胞培养瓶中, 放置到 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱培养, 每3 d换液一次。

1.4 琼脂糖筛选系统筛选CESCs

根据Liu等^[9]使用的琼脂糖筛选方法, 将2%低熔点琼脂糖高压灭菌, 调节温度到 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 然后用2%低熔点琼脂糖与2×DMEM/F12培养液以1:1的体积比混合配制成1%的底层琼脂, 并用此均匀包被直径60 mm的培养皿。软骨终板细胞被消化后, 用含20% FBS的DMEM/F12培养液重悬, 细胞计数板计数, 将1.5 mL密度为 $5\times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液与0.75 mL DMEM/F12培养液以及0.75 mL 2%低熔点琼脂糖混匀, 平铺到预处理的培养皿中。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置15 min使混有细胞的琼脂糖凝固。加入含有10% FBS的DMEM/F12培养液, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 每周换液两次, 培养6周。6周后将细胞集落转移到6孔板中, 继续培养。

1.5 CESC体外鉴定

1.5.1 流式细胞术表型检测 选取融合度达到80%的CESCs, PBS漂洗两次, 加入胰酶消化, 离心收集细胞。细胞计数后, 制成 $1\times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液, 分装于EP管中, 每管200 μL , 分别加入FITC、PE、PerCP标记的鼠抗人单克隆抗体CD73-FITC、CD14-FITC、CD19-FITC、CD90-FITC、CD34-FITC、CD45-FITC、CD105-PE和HLA-DR-PerCP各10 μL , 并设立同型对照组。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min, 离心弃上清, PBS漂洗, 再离心弃上清, 加入200 μL PBS, 将处理过的细胞用流式细胞术进行检测分析。

1.5.2 三系诱导分化 (1)成骨诱导: 收集CESCs, 将细胞密度调整至 $2\times 10^5/\text{mL}$, 接种到6孔板, 放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养24 h, 然后更换为成骨分化诱导液, 每3 d换液一次。诱导21 d后, 用4%多聚甲醛固定15 min, 蒸馏水冲洗三次, 茜素红染色15 min, 用蒸馏水冲洗残留染液。光学显微镜下观察并拍照。

(2)成软骨诱导: 收集CESCs, 将细胞密度调整至 $3\times 10^5/\text{mL}$ 细胞, 转移到15 mL的离心管中, $1\text{ }000\text{ r/min}$ 离心5 min, 弃上清, 用PBS漂洗一次, 再次离心弃上清, 加入成软骨分化诱导培养液, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 每3 d换液一次。诱导21 d后, 将细胞团块用4%多聚甲醛固定20 min, 梯度乙醇脱水, 然后石蜡包埋、切片、阿利新蓝染色。光学显微镜下观察并拍照。

(3)成脂诱导: 收集CESCs, 将细胞密度调整至 $2\times 10^5/\text{mL}$, 接种到6孔板, 放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养, 待细胞融合度达80%以上时, 将培养液更换为成脂诱导液A, 诱导3 d后, 更换为成脂诱导液B, 维持1 d, 然后再次更换为成脂诱导液A。如此循环四次后, 用4%多聚甲醛固定15 min, 蒸馏水冲洗, 油红O染色20 min, 用蒸馏水冲洗残留染液。光学显微镜下观察并拍照。

1.6 CESC增殖实验

选取细胞融合度达到80%左右的CESCs, 消化细胞并制备密度为 $1\times 10^4/\text{mL}$ 的细胞悬液。为了同步验证Erk磷酸化抑制剂PD98059和IGF-1R抑制剂PQ401对MGF增殖效应的影响, 实验分为0, 1.5, 3, 4.5, 6 ng/mL MGF组、4.5 ng/mL MGF+PD98059($50\text{ }\mu\text{mol/L}$)组及4.5 ng/mL MGF+PQ401($10\text{ }\mu\text{g/mL}$)组。96孔板按分组每孔加入200 μL 细胞悬液, 12 h后更换为含不同浓度MGF的培养液(其中, 含抑制剂组的细胞需提前用PD98059、PQ401处理30 min)。培养24, 48, 72 h后每孔加入20 μL CCK-8, 用酶标仪(BioRad公司)在450 nm波长下检测各孔光密度(optical density, D)值。实验重复三次以上。

1.7 迁移实验

选取细胞融合度达到80%左右的CESCs, 消化细胞并用无血清DMEM/F12培养液调整细胞密度为 $3\times 10^5/\text{mL}$ 。为研究IGF-1R抑制剂PQ401对MGF迁移效应的影响, 实验分为0, 1.5, 3, 4.5, 6 ng/mL MGF组及4.5 ng/mL MGF+PQ401组, Transwell下室按分组每孔添加600 μL 含不同浓度MGF的培养液, 上层小室每孔加入100 μL 细胞悬液(其中, PQ401组细胞在加入上层小室前用PQ401处理30 min)。迁移12 h, 细胞从小室上层穿孔聚集到下层。取出小室, 用棉签擦拭小室上层和内壁的细胞, PBS冲洗后用4%多聚甲醛固定30 min, 1%结晶紫染色15 min, 用PBS冲洗残留染液。在室温下风干后, 用倒置相差显微镜

观察小室下层细胞迁移情况。随机选取4个视野,计数染色细胞。每个小室用300 μ L 33%醋酸溶液洗脱结晶紫,每孔取100 μ L在酶标仪570 nm波长下检测 D 值。实验重复三次以上。

1.8 Western blot检测Erk的磷酸化表达

选取融合度达到80%的CESCs,按MGF的浓度分为0 ng/mL MGF组、4.5 ng/mL MGF组及4.5 ng/mL MGF+PD98059组。按组添加含不同浓度MGF的培养液,48 h后收集细胞,PBS洗涤三次,加入200 μ L蛋白裂解液,置于冰上30 min,收集裂解液12 000 r/min离心5 min。吸取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度并均一化。加入5 $\times$ 的蛋白上样缓冲液,沸水浴5 min。等量蛋白上样(约40 μ g),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离,电转移至硝酸纤维素膜(PVDF),5%脱脂奶粉封闭1 h。4 $^{\circ}$ C孵育p-Erk(1:

1 000)、t-Erk(1:1 000)、actin(1:1 000)一抗过夜,洗膜,室温下孵育辣根过氧化物酶标记的二抗(山羊抗兔IgG、山羊抗小鼠IgG)(1:1 000) 2 h后,化学发光法(ECL)检测p-Erk、t-Erk的表达,使用Quantity One软件进行灰度值分析。

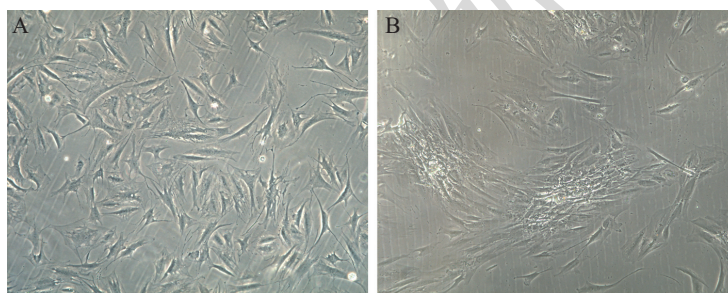
1.9 统计学处理

所有数据均采用SPSS 13.0统计软件进行分析,增殖实验采用多因素方差分析,迁移实验采用单因素方差分析。其他实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 筛选前后的CESCs形态

未筛选的软骨终板细胞呈三角形或多角形,形状不规则(图1A)。经过琼脂糖筛选系统筛选的细胞,

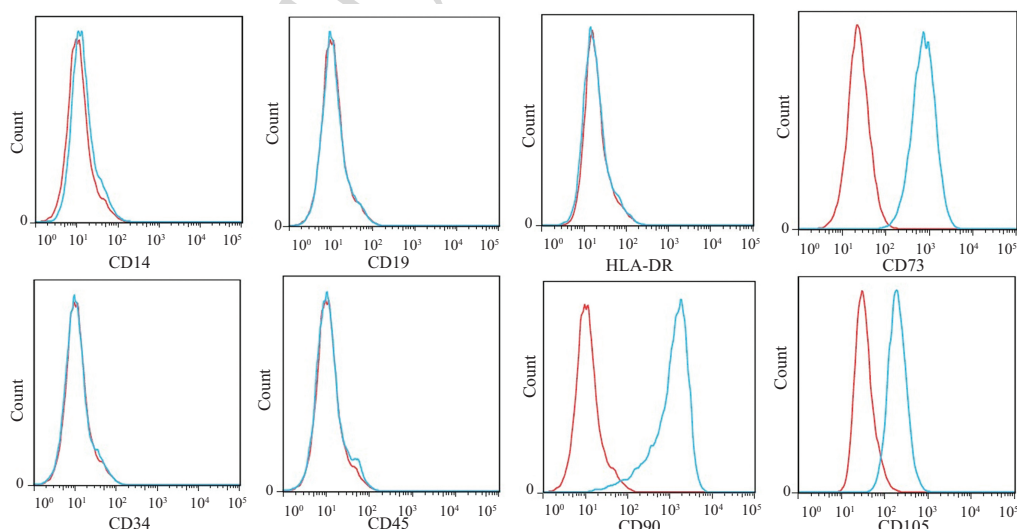


A: 筛选前的细胞形态(100 $\times$); B: 筛选后的细胞形态(100 $\times$)。

A: cells morphology before screening (100 $\times$); B: cells morphology after screening (100 $\times$).

图1 琼脂糖筛选系统筛选前后细胞形态对比

Fig.1 Comparison of cells morphology before and after screened by agarose suspensions



蓝线代表被荧光标记抗体染色的阳性细胞,红线代表阴性对照细胞,使用同型对照抗体染色。

The blue lines represented the fluorescence intensity of cells stained with the indicated antibodies and the red lines represented the negative control cells, which were stained with a nonimmunoreactive isotype control antibody.

图2 流式细胞术分析CESCs表面标志物

Fig.2 Surface markers of CESCs analyzed by FACS

表2 表面标志物表达量($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)Table 2 The values of surface markers ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

表面标志物 Markers	表达量 The values
CD14	0.84±0.61
CD19	0.68±0.28
CD34	0.92±0.16
CD45	0.62±0.56
HLA-DR	0.44±0.43
CD73	98.97±0.86
CD90	98.87±1.96
CD105	94.50±8.14

进一步用含10% FBS的DMEM/F12培养液培养后, 细胞呈集落生长, 成簇分布, 旋涡状外观(图1B)。

2.2 CESC体外鉴定证明筛选后的细胞为CESCs

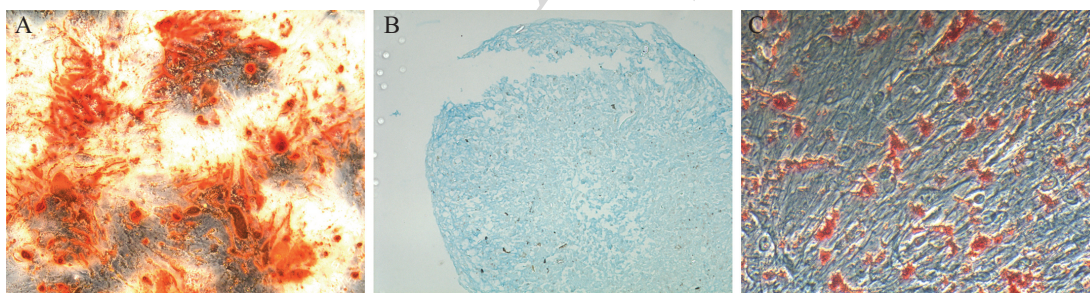
2.2.1 流式细胞术表型检测 根据国际细胞治疗学会制定的干细胞标准^[14], 干细胞表面标志物CD73、CD90、CD105表达率高于95%, CD14、CD19、CD34、CD45和HLA-DR的表达量低于2%。实验结果显示, 筛选细胞的CD73、CD90表达量均

大于95%, CD105表达量为94.50%; CD14、CD19、CD34、CD45和HLA-DR的表达量均小于2%(图2和表2)。结果证实, 筛选的细胞免疫表型的表达符合干细胞绝大部分标准, 即经琼脂糖筛选系统筛选出来的细胞具有干细胞特性。

2.2.2 三系分化诱导 CESC分别经过成骨、成软骨、成脂诱导21 d后, 用茜素红、阿利新蓝、油红O染色均成功(图3), 说明经琼脂糖筛选系统筛选出来的细胞呈现向成软骨、成骨及成脂三系分化的能力, 具有干细胞特性。

2.3 MGF促进CESCs的增殖

为了证实MGF对CESCs的增殖效应, 本文设置了不同浓度的MGF对CESCs进行处理, 0 ng/mL组作为对照组。在作用24, 48, 72 h后用CCK-8检测增殖情况。结果显示, MGF对CESCs具有促增殖效应, 且具有剂量依赖性。当浓度达到4.5 ng/mL时, MGF促增殖效应最显著($P<0.05$)。另外, 4.5 ng/mL MGF+PD98059组与4.5 ng/mL MGF组相比较, MGF

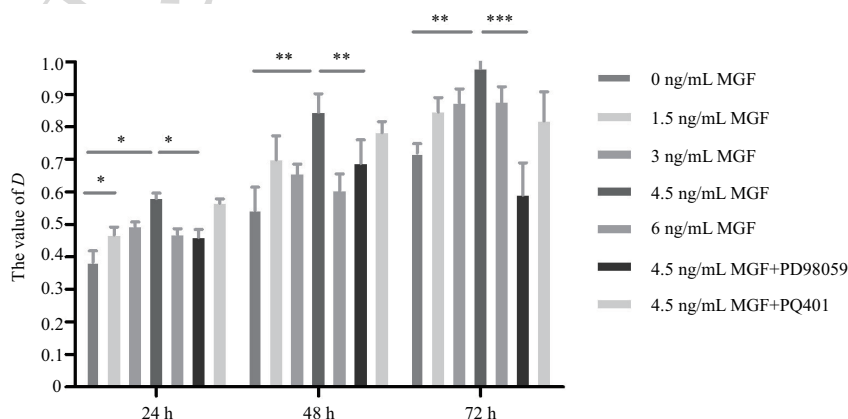


A: 成骨分化诱导(100×); B: 成软骨分化诱导(200×); C: 成脂分化诱导(200×)。

A: osteogenic differentiation (100×); B: chondrogenic differentiation (200×); C: adipogenic differentiation (200×)。

图3 CESC的分化

Fig.3 Differentiation of CESC

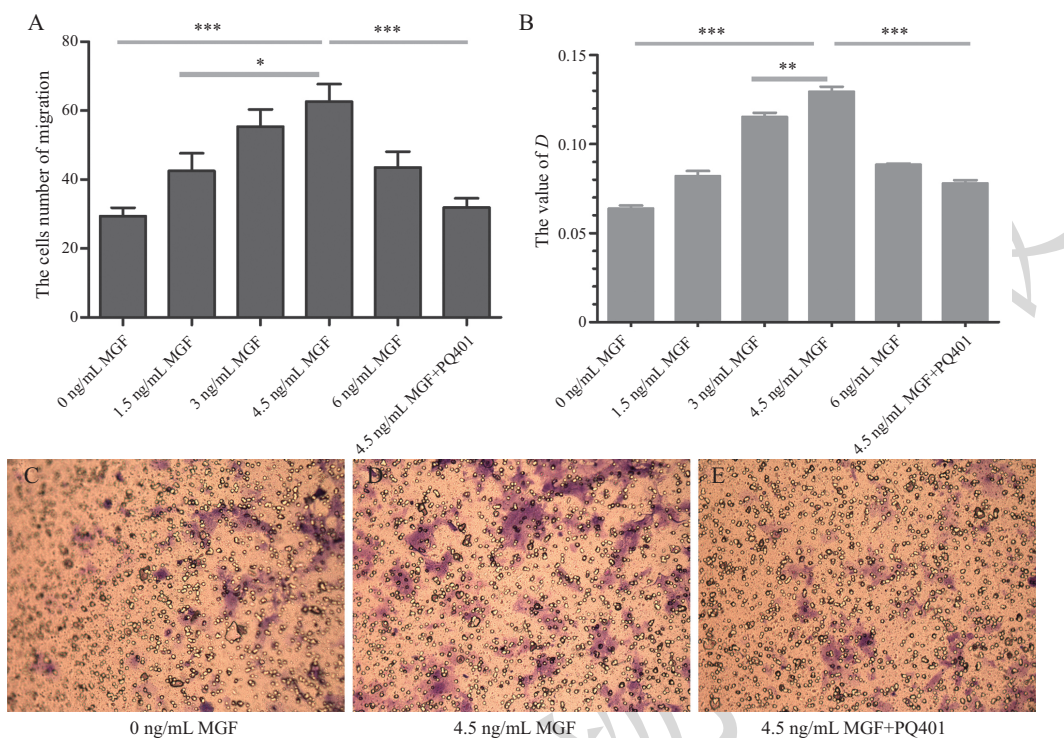


* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 各组间比较。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared between groups.

图4 不同浓度MGF对CESCs增殖的影响

Fig.4 The proliferation of CESC under different concentrations of MGF

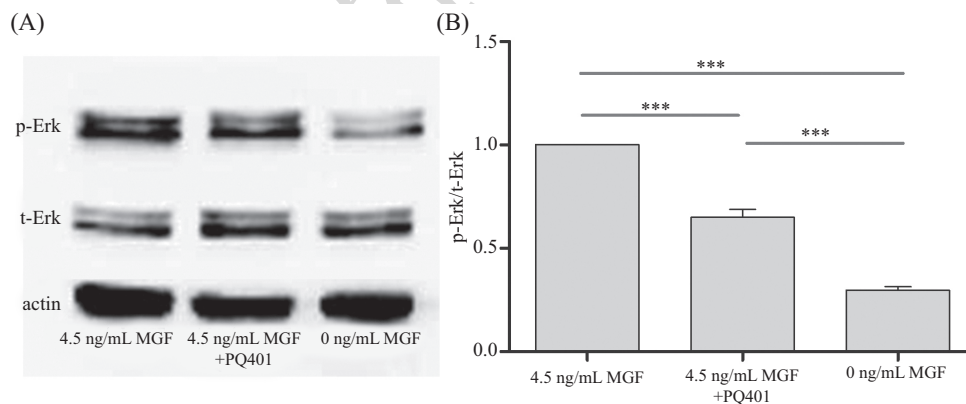


A: 不同浓度MGF作用于CESCs 12 h后迁移的细胞数量; B: 迁移细胞洗脱液在酶标仪570 nm波长下测量的吸光度值; C~E: 各组细胞迁移染色后倒置相差显微镜下观察图(200×)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: the cells number of migration under different concentrations of MGF for 12 h; B: the absorbance of eluant at 570 nm by a microplate absorbance reader; C~E: the pictures of migration cells by an invert microscope (200×). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图5 不同浓度MGF对CESCs迁移的影响

Fig.5 The migration of CESC cells under different concentrations of MGF



A: MGF作用于CESCs 48 h后各组p-Erk、t-Erk的表达情况; B: 各组p-Erk/t-Erk比值。*** $P<0.001$ 。

A: the phosphorylation level of Erk after CESC cells treated with MGF for 48 h; B: the p-Erk/t-Erk ratio of each group. *** $P<0.001$.

图6 MGF作用于CESCs 48 h后Erk的磷酸化水平表达

Fig.6 The phosphorylation level of Erk after MGF affected on CESC cells for 48 h

促增殖效应显著下降($P<0.001$), 而PD98059作为Erk磷酸化的抑制剂, 说明MGF促增殖效应依赖于Erk的磷酸化表达。4.5 ng/mL MGF+PQ401组促增殖效应的下降无统计学差异, 显示IGF-1R在此效应中的作用不显著(图4)。

2.4 MGF促进CESCs的迁移

迁移实验中, 我们按MGF的浓度设置了0, 1.5, 3, 4.5, 6 ng/mL MGF组及4.5 ng/mL MGF+PQ401组, 0 ng/mL MGF组作为对照组。结果显示, MGF对CESCs有促迁移效应, 且具有剂量依赖性。当浓度

达到4.5 ng/mL时, 迁移细胞数量最多($P<0.001$), D 值最大($P<0.001$)。另外, 4.5 ng/mL MGF+PQ401组迁移细胞数量显著下降($P<0.001$), 其 D 值也大幅降低($P<0.001$)(图5)。这一系列结果证明, MGF具有剂量依赖性地促进CESCs迁移的效应, IGF-1R在此效应中扮演关键角色。

2.5 MGF作用CESCs后Erk磷酸化表达水平升高

经不同浓度MGF处理CESCs 48 h后, Western blot检测各组细胞Erk的磷酸化表达水平。结果显示, 4.5 ng/mL MGF组Erk的磷酸化表达水平显著高于4.5 ng/mL MGF+PQ401组和0 ng/mL MGF组。显示4.5 ng/mL MGF组p-Erk/t-Erk的比值最高($P<0.001$)(图6)。结果说明, MGF促CESCs增殖和迁移的作用依赖于Erk的磷酸化表达。其中, PQ401通过抑制IGF-1R的活性导致Erk的磷酸化表达水平降低, 证明IGF-1R在MGF促CESCs迁移的效应中发挥关键作用。

3 讨论

软骨终板细胞在DDD的发生和发展中扮演至关键的角色。早前的研究显示, 软骨终板细胞的减少^[3]、硬化或钙化^[5-6]是导致DDD发生的重要因素。最近, 我们团队从软骨细胞中分离出CESCs, 发现其具有较强的克隆形成能力和多向分化潜能^[9], 这一发现为研究椎间盘退变提供了一条新途径。因此, 对CESCs特性的研究, 有助于我们了解DDD的发生机制, 为DDD的防治提供新的有效手段。

目前的研究显示, MGF能促进多种细胞的增殖和迁移, 其效应主要依赖于Erk的磷酸化表达^[12]。但在不同组织、种属细胞中MGF促增殖或迁移效应的作用浓度并不相同。研究显示, MGF在50 ng/mL时能显著促进人前列腺癌PC-3细胞的增殖^[15]。在动物细胞实验中, MGF对小鼠MC3T3-E1成骨细胞^[16]和猪卫星细胞(porcine satellite cells, PSCs)^[17]分别在1 nmol/L(约2.9 ng/mL)和1.5 ng/mL浓度下具有最大的促增殖效应。在兔BMSCs(rBMSCs)实验中, MGF在0~50 ng/mL浓度范围内对rBMSCs均无促增殖效应, 但在30 ng/mL时, 可显著促进rBMSCs的迁移^[13]。在本研究中, 我们首次通过增殖实验和迁移实验对MGF在CESCs上的效应做了部分探索, 发现MGF对CESCs具有促增殖和迁移的作用, 且具有剂量依赖性。当浓度达到4.5 ng/mL时, MGF促增殖和迁移效

应最显著($P<0.05$)。对上述结果的差异, 我们推测可能与组织特异性以及MGF的种属差异有关。

为了研究MGF的调控机制, 我们在增殖实验中加入了Erk磷酸化抑制剂PD98059, 发现CESCs的增殖效应大幅下降($P<0.001$), 说明MGF促CESCs增殖效应依赖于Erk的磷酸化表达。但Erk通路被阻断后, MGF的促增殖效应并未完全消失, 提示MGF促增殖效应还依赖于其他途径, 需要进一步研究。有研究认为, IGF-1R对MGF效应的发挥无明显作用^[12]。但近期有学者发现, MGF发挥作用依赖于IGF-1R的表达^[18], 当使用PQ401阻断IGF-1R时, MGF的促迁移效应显著下降^[13]。鉴于这两种不同的观点, 本研究对IGF-1R在其中所扮演的角色也进行了相应的探索。为了证实IGF-1R是否是MGF作用中的关键因子, 我们在增殖和迁移实验中均加入了IGF-1R抑制剂PQ401。结果显示, 抑制IGF-1R的活性后, MGF促增殖效应无显著变化, 但其促迁移效应被抑制, 迁移细胞数量显著减少($P<0.001$)。实验结果证实了Cui等^[13]的研究结论, 说明IGF-1R与MGF的促迁移效应密切相关。在Erk磷酸化表达水平检测中, 我们在加入MGF前预先用PQ401处理CESCs 30 min, 检测结果显示, Erk磷酸化表达水平大幅下降($P<0.001$), 推测IGF-1R通过影响Erk磷酸化的表达来调控MGF的迁移效应。但PQ401抑制IGF-1R后Erk磷酸化表达水平的降低并未影响MGF的促增殖效应, 说明MGF对CESCs促增殖和迁移的途径可能不同, 其具体的机制需进一步探索。

MGF的作用不仅限于此, 它还具有抑制增殖、延缓钙化和保护细胞的效应。有文献报道, 高浓度的MGF能抑制猪卫星细胞的增殖^[17]。本研究显示, MGF促CESCs增殖的作用具有剂量依赖性, MGF浓度越高, 促增殖效应越低, 因此高浓度的MGF可能会抑制CESCs增殖, 这一推测与高浓度的MGF抑制PSCs增殖的研究结论相吻合。另外, 不同浓度的MGF能抑制不同种属细胞的成骨分化。浓度为1 nmol/L(约2.9 ng/mL)时, MGF能抑制小鼠MC3T3-E1成骨细胞的成骨分化, 降低胞内钙离子浓度, 延缓钙化^[17,19]; 浓度为50 ng/mL时, MGF抑制rBMSCs成骨相关基因的表达^[13]。如果MGF对CESCs有同样的作用, 将为CEP硬化和钙化的研究提供新的方向。在细胞保护方面, MGF能有效防止神经元细胞遭受损伤^[20-22]。研究发现, MGF能诱导血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)表达的增加, 从而减轻

6-羟多巴胺对SHSY5Y细胞的毒性作用^[22]。研究人员在动物实验中证实, MGF能抑制心肌缺血后坏死, 对控制心肌梗死区域、提高心肌功能有一定的作用^[23-26], 此作用可能与MGF减少半胱氨酸蛋白酶-3介导的细胞凋亡有关^[25]。据此我们推测, MGF对CESCs可能具有抑制成骨分化和抗凋亡的作用。然而, MGF对CESCs的作用我们仅仅探索了一小部分, MGF对CESCs的其他作用如调控分化、抗凋亡、延缓钙化等目前仍不清楚, 尚需进一步研究。

本文证实了MGF对CESCs具有促增殖和迁移的效应, 且效应依赖于Erk的磷酸化表达, 其中IGF-1R与MGF的促迁移效应有关。这一研究结果为MGF对CESCs作用的相关研究打下基础, 也为椎间盘退变的研究提供了一个可能的方向。

参考文献 (References)

- Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain. *Lancet* 1999; 354(9178): 581-5.
- Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology* 2009; 48(1): 5-10.
- Li FC, Zhang N, Chen WS, Chen QX. Endplate degeneration may be the origination of the vacuum phenomenon in intervertebral discs. *Med Hypotheses* 2010; 75(2): 169-71.
- Holm S, Maroudas A, Urban JP, Selstam G, Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disc: Solute transport and metabolism. *Connect Tissue Res* 1981; 8(2): 101-19.
- Peng B, Hou S, Shi Q, Jia L. The relationship between cartilage end-plate calcification and disc degeneration: An experimental study. *Chin Med J* 2001; 114(3): 308-12.
- Benneker LM, Heini PF, Alini M, Anderson SE, Ito K. 2004 Young Investigator Award Winner: Vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration. *Spine* 2005; 30(2): 167-73.
- Ariga K, Miyamoto S, Nakase T, Okuda S, Meng W, Yonenobu K, *et al.* The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc. *Spine* 2001; 26(22): 2414-20.
- Rajasekaran S, Venkatadass K, Naresh BJ, Ganesh K, Shetty AP. Pharmacological enhancement of disc diffusion and differentiation of healthy, ageing and degenerated discs: Results from *in-vivo* serial post-contrast MRI studies in 365 human lumbar discs. *Eur Spine J* 2008; 17(5): 626-43.
- Liu LT, Huang B, Li CQ, Zhuang Y, Wang J, Zhou Y. Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate. *PLoS One* 2011; 6(10): e26285.
- Kim KW, Lim TH, Kim JG, Jeong ST, Masuda K, An HS. The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and histologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs. *Spine* 2003; 28(10): 982-90.
- Yang SY, Alnaqeb M, Simpson H, Goldspink G. Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *J Muscle Res Cell Motil* 1996; 17(4): 487-95.
- Dai Z, Wu F, Yeung EW, Li Y. IGF-IEc expression, regulation and biological function in different tissues. *Growth Horm IGF Res* 2010; 20(4): 278-81.
- Cui H, Yi Q, Feng J, Yang L, Tang L. Mechano growth factor E peptide regulates migration and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Mol Endocrinol* 2014; 52(2): 111-2.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- Armakolas A, Philippou A, Panteleakou Z, Nezos A, Sourla A, Petraki C, *et al.* Preferential expression of IGF-1Ec (MGF) transcript in cancerous tissues of human prostate: Evidence for a novel and autonomous growth factor activity of MGF E peptide in human prostate cancer cells. *Prostate* 2010; 70(11): 1233-42.
- Deng M, Zhang B, Wang K, Liu F, Xiao H, Zhao J, *et al.* Mechano growth factor E peptide promotes osteoblasts proliferation and bone-defect healing in rabbits. *Int Orthop* 2011; 35(7): 1099-106.
- Qin LL, Li XK, Xu J, Mo DL, Tong X, Pan ZC, *et al.* Mechano growth factor (MGF) promotes proliferation and inhibits differentiation of porcine satellite cells (PSCs) by down-regulation of key myogenic transcriptional factors. *Mol Cell Biochem* 2012; 370(1/2): 221-30.
- Brisson BK, Barton ER. Insulin-like growth factor-I E-peptide activity is dependent on the IGF-1 receptor. *PLoS One* 2012; 7(9): e45588.
- Chen X, Zhang BB, Wang YL, Xian CY, Yang L, Deng MY, *et al.* Mechano-growth factor E peptide inhibits the differentiation and mineralization of osteoblasts. *Arch Oral Biol* 2012; 57(6): 720-7.
- Dluzniewska J, Sarnowska A, Beresewicz M, Johnson I, Srai SK, Ramesh B *et al.* A strong neuroprotective effect of the autonomous C-terminal peptide of IGF-1Ec (MGF) in brain ischemia. *FASEB J* 2005; 19(13): 1896-8.
- Riddoch-Contreras J, Yang SY, Dick JR, Goldspink G, Orrell RW, Greensmith L. Mechano-growth factor, an IGF-I splice variant, rescues motoneurons and improves muscle function in SOD1(G93A) mice. *Exp Neurol* 2009; 215(2): 281-9.
- Quesada A, Micevych P, Handforth A. C-terminal mechano growth factor protects dopa mine neurons: A novel peptide that induces heme oxygenase-1. *Exp Neurol* 2009; 220(2): 255-66.
- McMahon CD, Devlin GP, Matthews KG, Goldspink PH, Yang SY, Conaglen JV, *et al.* Mechano-growth factor reduces ischaemic injury after myocardial infarction. *Eur Heart J* 2004; 25: 497.
- Shioura KM, Los T, Geenen DL, Goldspink G, Goldspink P. The unique e-domain of an IGF-I isoform expressed in muscle preserves cardiac function and prevents apoptosis following myocardial infarction. *Circulation* 2006; 114 (18): 232-3.
- Carpenter V, Matthews K, Devlin G, Stuart S, Jensen J, Conaglen J, *et al.* Mechano-growth factor reduces loss of cardiac function in acute myocardial infarction. *Heart Lung Circ* 2008; 17(1): 33-9.
- Mavrommatis E, Shioura KM, Los T, Goldspink PH. The E-domain region of mechano-growth factor inhibits cellular apoptosis and preserves cardiac function during myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2013; 381(1/2): 69-83.