

力生长因子及其 E 肽对成骨细胞分化的影响 *

张兵兵^{1,2)**} 王远亮^{1,2)} 杨 力^{1,2)} 潘长江^{1,2)} 傅 亚^{1,2)} 邓墨渊^{1,2)} 李玉筱^{1,2)}

(¹重庆大学生物工程学院生物材料与仿生工程研究中心, 重庆 400044; ²生物流变科学与技术教育部重点实验室(重庆大学), 重庆 400044)

摘要 力生长因子(mechano growth factor, MGF)是新近发现的一种生长因子, 由 *Igf-1* 基因剪接变异产生, 拉伸刺激会促使成骨细胞表达力生长因子. 比较分析了 MGF 及其羧基端 E 肽(MGF-Ct24E)对成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 分化的影响. 结果显示: MGF 和 MGF-Ct24E 具有显著激活胞外信号调节激酶 1/2(Erk1/2)的作用, 并降低了成骨细胞碱性磷酸酶、I 型胶原的表达, 促进了骨桥蛋白(OPN)的表达, 减少了核心结合因子(core binding factor 1, Cbfa-1)的核转运量, 对成骨细胞的分化具有延迟效应, 这种效应通过抑制剂 PD98059 抑制 Erk1/2 的活化得到逆转; MGF 还能显著激活磷脂酰肌醇 3- 激酶信号通路中的蛋白激酶 B(Akt), 该活化作用对成骨细胞分化是必需的, 钙沉积分析显示长期培养下的细胞 MGF 促进了矿化节结的形成. 这些结果说明, MGF-Ct24E 对成骨细胞的分化具有抑制作用, 这种作用与 Erk1/2 的活化有关, MGF 因为包含 E 肽和 IGF-1 部分, 能分别激活 Erk1/2 和 Akt, 因此对成骨细胞分化表现出双重效用, 在成骨细胞分化早期, 具有一定的延迟效应, 而在分化晚期对成骨细胞分化表现出促进作用.

关键词 力生长因子, 胰岛素样生长因子 -1, 成骨细胞, 分化

学科分类号 Q254, R68

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00614

应力刺激是骨骼构建和重塑的基本动因, 成骨细胞是骨组织中主要的力效应细胞, 能对剪切、拉伸等各种形式的应力刺激产生响应, 进而调节细胞行为, 其中在分子水平的基因表达调控是对应力刺激产生响应的一个重要方面. 我们以往的研究中发现流体剪切力能够调节成骨细胞中 OPG、ODF 等与骨重建密切相关的基因表达^[1]. 最近我们通过拉伸刺激成骨细胞发现, 拉伸刺激能够促进成骨细胞表达一种新的生长因子——力生长因子(MGF)^[2-3].

MGF 是一种 IGF-1 变体, 由 *Igf-1* 基因剪接变异产生, 其特征是比 IGF-1 的羧基端多出延伸肽(extention peptide, E 肽), 并因为来自外显子 5 的 49 bp (啮齿类动物是 52 bp)的插入序列, 导致外显子 6 的翻译发生移码突变, 产生特异的 C 端 24 个氨基酸的 E 肽序列(MGF-Ct24E). MGF 最初在拉伸刺激的骨骼肌中被发现, 与锻炼引起的肌肉肥大有关. 进一步的研究发现, MGF 及 MGF-Ct24E 能够激活肌肉卫星细胞, 促进组织再生^[4-5]. 我们的研究提示, MGF 还可能在成骨细胞或骨组织对应力刺激的响应中发挥作用, 为了深入研究 MGF 的功能, 通过基因重组在大肠杆菌中表达制备了

MGF 及 MGF-Ct24E, 获得的重组蛋白具有促进成骨细胞前体 MC3T3-E1 增殖和迁移的作用^[6], 本工作进一步研究了两种多肽对成骨细胞分化的影响.

1 材料和方法

1.1 试剂

MC3T3-E1 细胞购自中国科学院上海细胞库; 人碱性磷酸酶(ALP)活性检测试剂盒购自北京中生物生物工程公司; MTT、DMSO、维生素 C、 β -磷酸甘油、PD98059、LY294002、Kit 587 钙检测试剂盒、茜素红 S 均为 Sigma 公司产品; RT-PCR 试剂盒为大连 TaKaRa 公司产品; RT-PCR 所需引物如表 1 所示, 由上海英俊基因公司合成; leupeptin、pepstatin、PMSF 为上海西唐生物科技公司产品; Trizol Reagent Kit 为 Invitrogen 公司产品; BCA 蛋白质定量试剂盒为 Pierce 公司产品; HRP 标记羊

* 国家自然科学基金资助项目(30870609).

** 通讯联系人.

Tel: 023-65102509, E-mail: zbb@cqu.edu.cn

收稿日期: 2009-10-20, 接受日期: 2010-01-05

抗兔二抗、抗 Erk1/2、p-Erk1/2、Akt、p-Akt 特异性抗体均购自武汉博士德生物公司；Col1、OPN 和 Cbfa-1 抗体为 Abcam 公司产品；ECL kit 为 Amersham-Pharmacia Biotech 公司产品； α -MEM、胎牛血清(FBS)为 Gibco 公司产品。其他所需化学试剂均为分析纯级。

Table 1 Primers used for RT-PCR

Gene product	Primers (F=forward, R=reverse)	Accession No. Amplicon size
Col1	F: 5' CGG AGG TGG CTA TGA CTT T 3'	NM_007743
	R: 5' GGC TGT ATG AGT TCT TCG CT 3'	328 bp
OPN	F: 5' ACACTTTCACCTCAATCGTCC 3'	NM_009263
	R: 5' TGCCCTTCCGTTGTGTGCC 3'	247 bp
Cbfa-1	F: 5' CCG CAC GAC AAC CGC ACC AT 3'	AF010284
	R: 5' CGC TCC GGC CCA CAA ATC TC 3'	289 bp
β -Actin	F: 5' ATA TCG CTG CGC TGG TCG TC 3'	NM_007393
	R: 5' AGG ATG GCG TGA GGG AGA GC 3'	517 bp

1.2 细胞培养及处理

含 10%FBS 的 α -MEM 培养液制备 MC3T3-E1 细胞悬液， 2×10^5 /孔接种 24 孔板，37℃、5% CO₂ 环境下培养 24 h，细胞贴壁生长，更换无 FBS 含 1 nmol/L 多肽 (MGF 或 MGF-Ct24E)、50 mg/L 维生素 C (AA)和 10 mmol/L β -甘油磷酸(β -GP)的 α -MEM 培养液，每组复孔 6 个，培养液 2 天更换一次，保持多肽、AA 和 β -GP 的剂量不变，在特定的培养时间进行各种分化指标检测。另有两组细胞在每次更换含多肽的培养液前用 100 μ mol/L PD98059 或 50 μ mol/L LY294002 预处理 30 min，用于检验 Erk1/2 和 Akt 抑制对细胞分化的影响。

1.3 ALP 活性检测

多肽刺激下培养 1 天、2 天、3 天的细胞 PBS 清洗 3 次，胰酶消化收集所有细胞到 PBS 溶液中，缓慢吹打至细胞完全分散，显微镜下对细胞计数，转移 2×10^5 个细胞到微量离心管中，2 000 r/min 离心 1 min，弃上清，细胞沉淀用 100 μ l 0.05% Triton X-100 反复冲洗、吹打，使细胞完全裂解，再补加 100 μ l PBS 溶液，然后利用 ALP 活性检测试剂盒检测各组细胞的 ALP 活性单位。

1.4 RT-PCR 分析 mRNA 转录

细胞在含多肽和 AA、 β -GP 的 α -MEM 培养液中培养 3 天，按照 Trizol Reagent Kit 介绍的方法提取细胞总 mRNA 并定量，mRNA 反转录成 cDNA 后通过表 1 中的引物 PCR 扩增 1 型胶原(Col1)，骨桥蛋白(OPN)，核心转录因子(Cbfa-1)以及 β -actin 的 mRNA，PCR 循环数控制在扩增平台期以内。

PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳，EB 显色后，Bio-Rad Quantity One 成像系统对电泳条带进行摄像并计算吸光度，以 β -actin 作内参进行半定量分析。

1.5 Western blot 分析

对上述提取 mRNA 的样品继续提取总蛋白并定量。核蛋白的提取采用改进后的 Andrews 法。细胞总蛋白和核提取蛋白分别经 10%非变性 SDS-PAGE，电转移至 NC 膜，特异性抗体杂交反应后，ECL 显色，以 β -actin 作内参进行半定量分析。

1.6 矿化沉淀及钙分泌检测

分别对培养 3 天和 7 天的细胞进行茜素红染色，检测细胞矿化程度。培养 3 天和 7 天的细胞用 PBS 洗涤 2 次，加入 1 ml 0.1 mol/L 的 HCl，反复吹打裂解，然后收集所有裂解液至 EP 管，4 000 r/min 离心弃细胞碎片，通过钙检测试剂盒测定上清液中的钙含量。

2 结 果

2.1 MGF 及其 E 肽对 Erk1/2、Akt 活化磷酸化的影响

含 1 nmol/L 多肽的 α -MEM 培养液孵育细胞 3 h，提取细胞总蛋白，Western blot 检测 3 种生长因子对 MC3T3-E1 细胞中 Erk1/2 和 Akt 表达及其活化磷酸化的影响。图 1 所示，多肽处理对 Erk1/2 蛋白的表达总量没有显著影响，但 MGF 和 MGF-Ct24E(图中以 E 表示)显著提高了 Erk1/2 的磷酸化。两种多肽均没有显著提高 Akt 的表达量，但

MGF 显著提高了 Akt 磷酸化, MGF-Ct24E 对 Akt 磷酸化具有促进作用但不如 MGF 显著. 抑制剂 PD98059 和 LY294002(图 1 中分别以 PD、LY 表示)处理后的细胞, Erk 和 Akt 的磷酸化几乎被完全抑制.

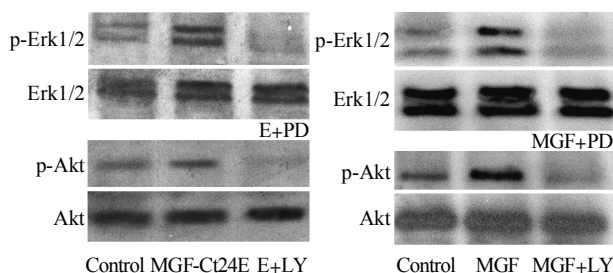


Fig. 1 Western blot analysis of Erk1/2, p-Erk1/2, Akt and p-Akt in MC3T3-E1

Cells were treated with growth factors (1 nmol/L).

2.2 ALP 活性分析

ALP 是成骨细胞分化的早期标志性蛋白, 其活性高低反映出成骨细胞的分化程度. 如图 2 所示, 在细胞培养过程中的第 1、2、3 天, 分别检测

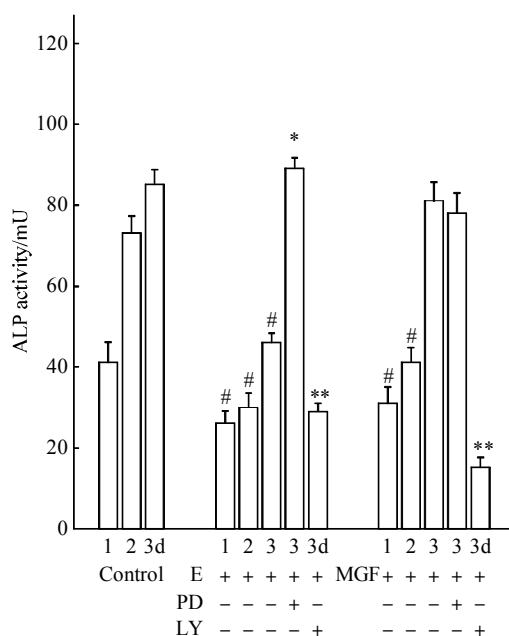


Fig. 2 Effects of MGF-Ct24E and MGF on the alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells

The cells were pretreated with or without inhibitor of Erk1/2 or Akt for 30 min, then stimulated by 1 nmol/L growth factors. Bars represent $\bar{x} \pm s$ ($n=6$), $^{\#}P < 0.01$, versus control, $^*P < 0.01$, $^{**}P < 0.001$ versus growth factor alone.

等量的细胞裂解液中 ALP 活性单位. 对照组细胞随着培养时间的延长, ALP 活性显著增加. 1 nmol/L MGF-Ct24E 的作用下, 在培养的第 1、2 天, ALP 活性分别是对照组的 63%和 41%, 且第 2 天与第 1 天相比没有显著增加, 培养到第 3 天, ALP 活性才有所增加, 是对照组的 54%. 通过 PD98059 抑制 Erk1/2 活化, 使得 MGF-Ct24E 对 ALP 活性的抑制效应被逆转, 而 LY294002 抑制 Akt 活化, 使得 MGF-Ct24E 对 ALP 活性的抑制效应进一步加强. MGF 对 ALP 活性的影响与 MGF-Ct24E 作用效果部分类似, 在作用的第 1 天表现出 ALP 活性抑制, 培养到第 2 天, ALP 的活性已开始明显上升, 但仍显著低于对照组, 第 3 天对 ALP 活性的抑制作用基本消除. 通过抑制剂的作用发现, PD98059 对 MGF 作用下 ALP 活性没有显著影响, 但 LY294002 的作用显著降低了 ALP 活性.

2.3 基质蛋白 Col1、OPN 的表达

Col1、OPN 等骨基质蛋白的表达水平是评价成骨细胞分化的另一标志. 在 MGF 和 E 肽处理 MC3T3-E1 细胞 3 天后, 进一步检测 Col1 和 OPN 的 mRNA 转录水平和蛋白质表达水平. RT-PCR 分析显示, MGF-Ct24E 单独作用下调了 Col1 的 mRNA 转录, 经 PD98059 和 LY294002 处理, 前者削弱了 MGF-Ct24E 对 Col1 转录的抑制, 后者加强了这种抑制作用(图 3a, c). 相反, MGF-Ct24E 上调了 OPN mRNA 的转录, 而 PD98059 和 LY294002 处理均降低了 OPN mRNA 的转录, 其中 LY294002 的抑制作用更加明显(图 3a, d). 在 MGF 处理的细胞中, MGF 对 Col1 mRNA 的转录没有显著影响, 而 PD98059 处理促进了 Col1 转录, LY294002 表现出抑制效应(图 3a, c). 与 MGF-Ct24E 一样, MGF 促进了 OPN 的转录, 另外在相同的多肽处理下 PD98059 和 LY294002 会抑制 OPN 转录, 并且 LY294002 的抑制作用更加明显(图 3a, d). Western blot 结果显示, 蛋白质表达和 mRNA 转录的变化趋势基本一致, 即 MGF-Ct24E 抑制了 Col1 的表达, PD98059 逆转了抑制作用. 在 MGF 作用下, PD98059 也表现出对 Col1 表达的促进作用. 在两种多肽作用下, LY294002 处理均显著抑制了 Col1 的转录和翻译. 对于 OPN 的表达, MGF-Ct24E 和 MGF 均表现出促进作用, 但 PD98059 和 LY294002 处理消除了这种促进作用, 并表现出抑制, 其中 LY294002 的抑制效果更为明显(图 3b, d).

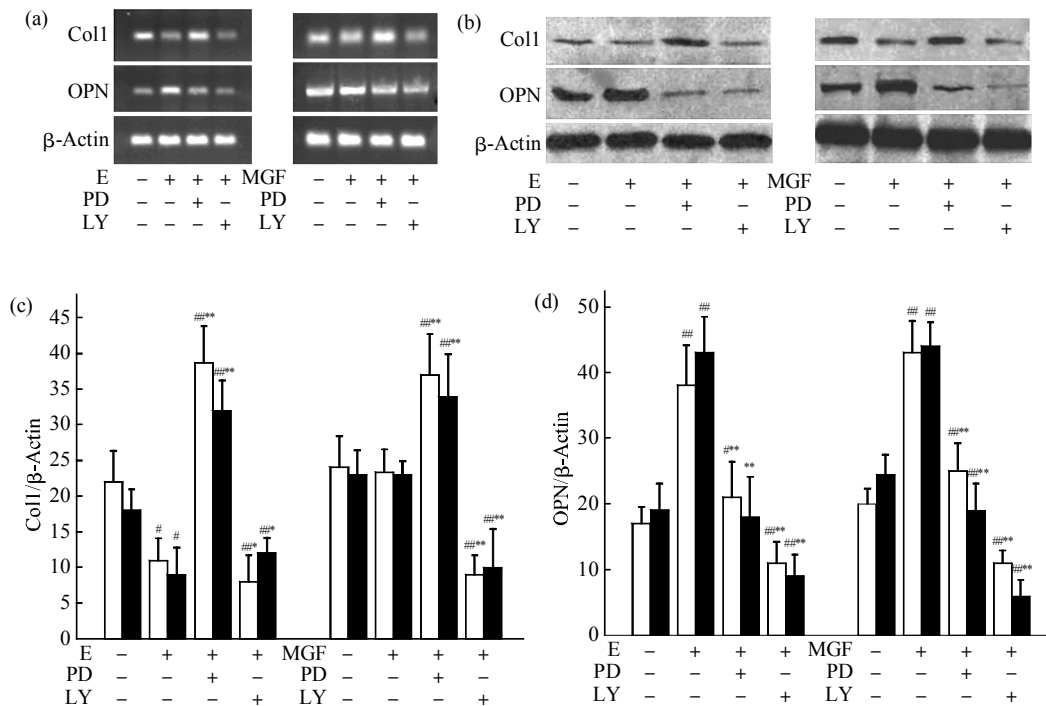


Fig. 3 Effect of MGF and MGF-Ct24E on expression of ECM proteins

(a) The mRNA expression of Col1 and OPN was examined by RT-PCR analysis. (b) The protein expression level was examined by Western blot analysis. (c)(d) Quantitative data. Col1 and OPN were normalized to the β-actin. Bars represent $\bar{x} \pm s$ ($n=3$), $^{\#}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ versus blank control; $^{*}P < 0.01$, $^{**}P < 0.001$ versus MGF or MGF-Ct24E alone. (c) □: Col1/β-Actin mRNA; ■: Col1/β-Actin protein. (d) □: OPN/β-Actin mRNA; ■: OPN/β-Actin protein.

2.4 转录因子 Cbfa-1 的表达及活化

转录因子 Cbfa-1 是 Col1、OPN、ALP 等蛋白质表达的调控因素。通过 RT-PCR 和 Western blot 检测多肽和激酶抑制剂作用下, Cbfa-1 基因的转录水平以及总蛋白表达和核转运量的变化。RT-PCR 结果显示, MGF-Ct24E 和 MGF 均提高了 Cbfa-1 mRNA 的转录水平, 并且 PD98059 抑制 Erk1/2 活化削弱了促进效果, LY294002 抑制 Akt 活性也减少了转录(图 4a, c)。分析蛋白质表达显示, MGF 和 MGF-Ct24E 对 Cbfa-1 的表达总量没有显著影响, 但核内转运量被显著减少, PD98059 和 LY294002 的使用没有对蛋白质表达和核转运产生显著影响(图 4b, c, d)。

2.5 矿化染色和钙沉淀定量分析

分化成熟的成骨细胞进一步培养会产生矿化骨节(bone nodules), 茜素红能与骨节中的钙盐结合显现红色, 从而显示细胞的矿化程度。如图 5a 所示, 在 AA 和 β-GP 的诱导下培养 3 天, 细胞整体着色较弱, 说明细胞矿化程度较低, MGF-Ct24E 和

MGF 处理减少了钙沉积, PD98059 处理对矿化有促进作用, 而 LY294002 进一步抑制了矿化。培养至第 7 天细胞矿化程度明显提高, 各组间对比显示, MGF 组以及对照组的细胞矿化程度高, 而 MGF-Ct24E 处理组的细胞矿化作用被显著降低。在处理细胞 7 天后, 抑制剂 PD98059 与 MGF-Ct24E 连用有利于细胞矿化, 但与 MGF 连用对矿化有轻微的抑制作用; 抑制剂 LY294002 与两种生长因子连用均显著降低了细胞矿化。

进一步对各组细胞的钙沉淀量进行定量分析(图 5b), 结果与茜素红染色反映出来的细胞矿化程度基本一致。细胞培养到第 3 天, MGF-Ct24E 和 MGF 减少了钙沉积量, 且 MGF-Ct24E 的效果更显著, PD98059 处理提高了钙沉积量, 而 LY294002 处理进一步减少了钙沉积量。培养到第 7 天, MGF-Ct24E 对钙沉积的抑制效应依然存在, 但 MGF 对钙沉积表现出一定的促进作用, PD98059 和 LY294002 处理均减少了钙沉积量。

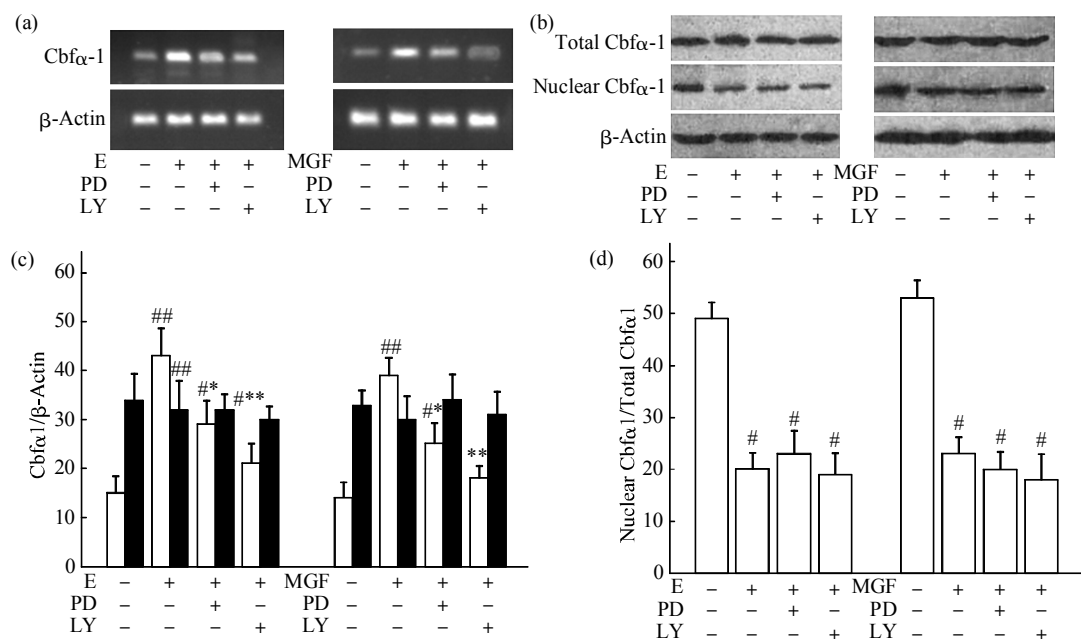


Fig. 4 Effect of MGF and MGF-Ct24E on Cbfa-1 expression and nuclear translocation

(a) The mRNA expression of Cbfa-1 was examined by RT-PCR analysis. (b) Western blot analysis. (c) Quantitative data of Cbfa-1 expression. □: Cbfa-1/β-Actin mRNA; ■: Cbfa-1/β-Actin protein. (d) Percentage of nuclear translocation fraction. Bars represent $\bar{x} \pm s$ ($n=3$), $^{\#}P < 0.01$, $^{\#\#}P < 0.001$ versus blank control; $^{*}P < 0.01$, $^{**}P < 0.001$ versus MGF or MGF-Ct24E alone.

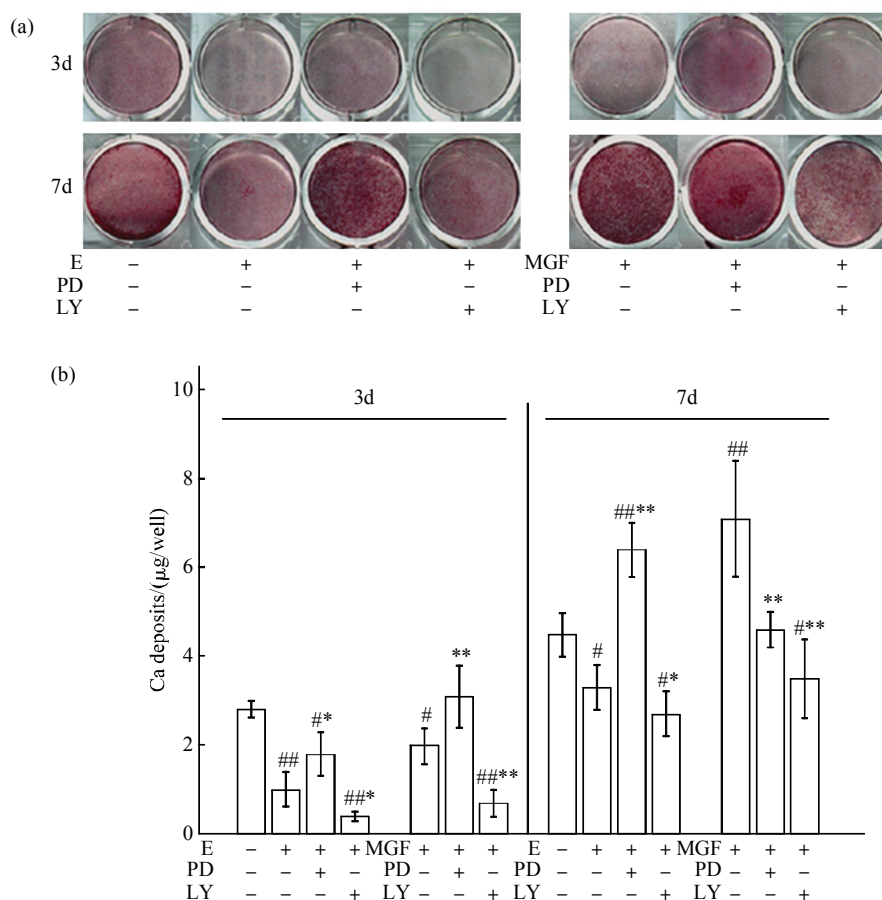


Fig. 5 Effects of MGF and MGF-Ct24E on the mineralization of MC3T3-E1 cells

(a) Alizarin Red staining. (b) Quantitative analysis of Ca deposit in MC3T3-E1 cells. Bars represent $\bar{x} \pm s$ ($n=6$), $^{\#}P < 0.01$, $^{\#\#}P < 0.001$ versus blank control; $^{*}P < 0.01$, $^{**}P < 0.001$ versus MGF or MGF-Ct24E alone.

3 讨 论

众多的生长 / 细胞因子在成骨细胞的分化过程中起到调控作用, 如 TGF- β 、BMP、IGF-1(-2)、FGF、EGF 等, 这些因子通过各自的受体激活胞内信号转导通路, 调节成骨细胞内关键的分化控制基因和标记基因的表达, 如骨基质蛋白 Col1、OPN、BSA, 转录因子 Cbfa1、Osterix 等, 促进或延迟成骨细胞的分化^[7-10]. IGF-1 在骨的生长和代谢中具有重要作用, 也是骨折修复所必需的^[11]. 在成骨细胞的研究中发现, IGF-1 对成骨细胞的早期分化和晚期矿化均有重要作用. 在细胞分化早期, IGF-1 虽然不能决定骨髓基质干细胞的分化方向, 但能促进前成骨细胞的分化, 并且能够提高成骨细胞 ALP 活性、基质蛋白表达以及矿化作用^[7], 在这些作用中 PI3K-Akt 和 MAPK-Erk1/2 信号途径参与了 IGF-1R 介导的胞内信号转导^[7, 12-13]. 本研究考察了新发现的 IGF-1 变体 MGF 及其 E 肽在成骨细胞分化中的作用, 结果显示 MGF 和 E 肽对成骨细胞前体 MC3T3-E1 的分化表现出不同程度的延迟作用.

ALP 是成骨细胞分化的重要标志, 从成骨细胞前体一直到矿化基质形成均有 ALP 的表达, ALP 缺乏将延迟或阻碍矿化基质的形成^[14]. 比较 MGF 和 MGF-Ct24E 处理对 MC3T3-E1 中 ALP 活性的影响发现, 在多肽刺激早期(1~2 天), MGF 和 MGF-Ct24E 显著抑制了 ALP 活性. 有研究显示, IGF-1 和 BMP 等通过激活 PI3K-Akt, 提高了 MC3T3-E1 细胞中 ALP 的活性^[12, 15], 而 FGF、EGF 等通过激活 Erk1/2 降低了 ALP 活性^[13, 16]. Radcliff 等^[13]发现, IGF-1 激活 Erk1/2 也有抑制血管内皮细胞 ALP 活性、降低血管钙化的作用. 这些结果说明两条信号通路对成骨细胞的分化具有不同的调控作用. 我们分别通过激酶抑制剂 PD98059 和 LY294002 抑制 Erk1/2 和 Akt 活化, 结果显示, 抑制 Erk1/2 逆转了 MGF-Ct24E 对 ALP 活性的抑制效应, 而抑制 Akt 活化会显著降低 ALP 活性, 可见 MGF-Ct24E 因为显著激活 Erk1/2, 对成骨细胞分化起到了抑制作用. 但有一些矛盾的结果被发现, Erk1/2 抑制没有提高 MGF 作用下 ALP 活性, 甚至表现出一定的抑制作用, 因此不能认为 Erk 活化对成骨细胞分化完全起负调节作用. 通过 dnErk (dominant negative isoform of Erk) 转染, 成骨细胞分化会受到抑制, 说明 Erk 信号在成骨细胞的分化中也发挥作用^[17]. 我们的实验结果也许说明,

Erk1/2 和 Akt 的活化应该保持在一个合理的水平才能最有效地促进细胞分化, 在 MGF-Ct24E 处理下仅仅只有 Erk1/2 的活化抑制成骨细胞的分化, MGF 具有显著激活 Erk1/2 和 Akt 的能力, Erk1/2 和 Akt 活化对细胞分化影响的权重可能最终决定了 MGF 对成骨细胞功能的影响.

在众多的骨基质蛋白中, Col1 最丰富, 占骨基质总量的 90%, Col1 在前体成骨细胞中只有微量的表达, 但在成熟的成骨细胞中具有非常高的表达量, 另一种基质蛋白 OPN 包含 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列, 介导了成骨细胞与胞外基质的黏附. 最近有研究显示, IGF-1 能诱导 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性提高, 但对 Col1、OPN、Cbfa-1 等标记基因的表达没有影响^[18]. 本实验结果显示, MGF-Ct24E 和 MGF 作用下 Col1 的表达和 ALP 的活性变化类似, 两种因子均抑制了 Col1 的表达, 这种抑制作用在 PD98059 处理后的细胞中被逆转, 但 LY294002 处理进一步抑制了 Col1 的表达. Col1 的表达受到抑制进一步证明, MGF-Ct24E 和 MGF 对成骨细胞的分化具有延迟作用, 并且这种分化延迟与 Erk1/2 活化有关, 而 Akt 的活化是 Col1 表达所需要的.

OPN 的表达分析发现, MGF 和 MGF-Ct24E 对 OPN 表达的影响具有与 Col1 完全相反的效应, 二者均提高了 OPN 的表达, 但 PD98059 和 LY294002 的处理均削弱了 OPN 的表达. 该结果可能与检测时间点有关, 因为细胞分化是一个随时间变化的过程, 在分化过程中各种标记基因也是按照一定时序表达, 在特定的阶段发挥功能. 在其他的一些研究中也有分化标记蛋白在成骨细胞中变化不一致的报道, 如体外 PDGF 刺激 MC3T3-E1 激活了 Erk1/2 途径, 并且提高 OPN 的表达, 同时抑制了 ALP、Col1、BSP 等表达, 因此表现出对矿化的抑制作用^[19]. 在体内实验中 IGF-1 提高了 Col1、ALP、OPN 的表达, 但不影响到骨钙蛋白(osteocalcin, OC) 的表达^[20]. 由此推测, 这些标记蛋白在骨的形成中具有不同的作用, 因此在成骨细胞的分化过程中并不是一致变化, 甚至出现相反的变化, 这可能与生长因子的作用时间和细胞的分化阶段有关. 虽然我们不能由 OPN 的表达进一步得出 MGF 抑制成骨细胞分化的结论, 但推测 MGF 促进 OPN 表达的原因可能与 OPN 在骨重建中的作用有关. 在骨的发育过程中 OPN 作为基质蛋白被成骨细胞大量表达, 但有关 OPN 功能的研究更多地显示它与骨吸

收的关系密切, OPN 缺乏的小鼠不会影响骨结构的正常形成却表现出对骨吸收的抑制, OPN 缺乏会减少局部骨组织中破骨细胞数量, 因此认为 OPN 可能与骨重建中破骨细胞的形成和聚集有关^[21]. 应力刺激是骨重建的基本动因之一, 应力过载导致骨组织发生损伤, 损伤修复是成骨细胞和破骨细胞共同参与的过程, 因此我们推测应力导致损伤部位的成骨细胞表达 MGF, 同时由 MGF 刺激 OPN 的表达, OPN 的作用是招募破骨细胞到损伤部位进行骨吸收, 并且 MGF 还能促进成骨细胞的增殖和迁移, 在骨吸收部位形成新的矿化骨基质^[6]. OPN 在骨组织的分布特性或许能印证这种假设, 虽然 OPN 普遍分布在所有矿化的骨和软骨基质中, 但在一些基质的交接面会有更集中的分布, 这种分布可能有助于招募成骨细胞和破骨细胞完成重建填补这些交接面的缝隙^[22-23].

转录因子 Cbfa-1 是成骨细胞形成所必需的, Cbfa-1^{-/-}鼠会因为缺乏成骨细胞导致骨组织不能产生^[9]. 生长因子或其他刺激调节成骨细胞分化的一系列级联反应中, 转录因子 Cbfa-1 处于关键位置. 生长因子能够通过调节 Cbfa-1 的表达和活化影响成骨细胞的分化, 因为 Col1、ALP、OPN 等众多成骨细胞分化所需蛋白质的表达均受到 Cbfa-1 的调控, Cbfa-1 与这些基因启动子中特有的 Ose2 绑定位点结合启动转录^[10]. 实验中发现, MGF 和 MGF-Ct24E 对 Cbfa-1 的 mRNA 转录有促进作用, 但蛋白质总量没有发生显著变化, 同时检测细胞核中的 Cbfa-1, 发现 MGF 和 MGF-Ct24E 减少了 Cbfa-1 的核转运. Cbfa-1 需要被活化磷酸化并转移到细胞核中才能发挥转录调控作用^[9-10], 因此 MGF 可能通过减少 Cbfa-1 的活化磷酸化和核转运, 从而减少了 Cbfa-1 与 DNA 的绑定作用, 进而影响 ALP、Col1 等成骨细胞标记蛋白的表达. 使用 PD98059 抑制了 mRNA 的转录, 但没有对 Cbfa-1 的蛋白质和核转运产生显著的抑制作用, 说明还存在其他信号途径参与了 MGF 对 Cbfa-1 核转运的调控. 有研究显示, Erk 活化是 Cbfa-1 的表达和活化必需的, 并且 IGF-1、EGF 等生长因子通过 Erk1/2 活化上调 Cbfa-1 的表达^[24-25], 我们的结果提示, MGF 和 MGF-Ct24E 激活 Erk1/2 对 Cbfa-1 的转录有一定的促进作用, 可能由于转录和表达不一致的原因, 使得蛋白质的表达水平没有显著变化. 另外, LY294002 抑制 PI3K-Akt 的活化减少了 Cbfa-1 的 mRNA 转录, 说明该信号途径与

Cbfa-1 的表达相关联.

成骨细胞最终分化为骨细胞并被包埋在矿化的骨基质中, 在 AA 和 β -GP 的诱导下 MC3T3-E1 细胞能够发生明显的矿化. 因为在细胞分化的不同阶段, 对刺激因素的响应不同, 通过对细胞矿化程度的分析, 可以判断刺激因素对成骨细胞分化的抑制作用是否只是发生在分化早期. 实验结果显示, 培养到第 7 天 MGF-Ct24E 仍然对细胞的矿化表现出抑制, 而 MGF 表现出显著的促进作用, 该结果提示, MGF 对成骨细胞的分化表现出双重效应, 在细胞分化的早期表现出抑制/延迟分化作用, 这种作用可能主要由于 E 肽的效应, 而在细胞分化的后期 MGF 可以促进细胞分化, 这种作用可能主要由于 IGF-1 效应. 该结果也进一步说明, MGF 作为 IGF-1 的前体, 被酶解后会产生两种功能不同的功能因子, 这两种因子发挥功能的关联性还需要进一步的研究, 也许如同对成肌细胞的作用所提示的, E 肽促进细胞的增殖随后 IGF-1 促进分化, 二者协作完成组织修复^[26].

关于 MGF 及其 E 肽在体内对骨骼发育和骨折修复的作用如何, 还需要进一步作体内研究, 动物实验发现 MGF-Ct24E 用药能够促进兔桡骨缺损修复(廖宝强等, 待发表). MGF 与 IGF-1 相比具有更显著的促进成骨细胞增殖和对细胞迁移的趋化作用^[6], 对细胞的分化只是表现出早期的延迟作用而不是最终抑制细胞分化, 因此将其用于骨折修复可能具有临床价值.

参 考 文 献

- [1] 张兵兵, 潘 君, 王远亮, 等. 流体剪切力对成骨细胞 OPG 和 ODF 表达的影响. 生物化学与生物物理进展, 2007, **34**(3): 326-332
Zhang B B, Pan J, Wang Y L, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2007, **34**(3): 326-332
- [2] Xian C Y, Wang Y L, Zhang B B, *et al.* Alternative splicing and expression of the insulin-like growth factor (IGF-1) gene in osteoblasts under mechanical stretch. Chin Sci Bull, 2006, **51**(22): 2731-2736
- [3] Zhang B B, Xian C Y, Luo Y F, *et al.* Expression and subcellular localization of mechano-growth factor in osteoblasts under mechanical stretch. Sci China Ser C-Life Sci, 2009, **52**(10): 928-934
- [4] 唐丽灵, 李大军, 王远亮. 外力作为信号诱导基因的选择性剪接与力生长因子表达. 生物化学与生物物理进展, 2007, **34**(5): 454-459
Tang L L, Li D J, Wang Y L. Prog Biochem Biophys, 2007, **34**(5): 454-459

- [5] Goldspink G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology (Bethesda)*, 2005, **20**: 232-238
- [6] 张兵兵, 江 鹏, 鲜成玉, 等. 力生长因子在大肠杆菌中的表达及活性分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(7): 1180-1185
Zhang B B, Jiang P, Xian C Y, *et al.* *Chin J Biotech*, 2008, **24**(7): 1180-1185
- [7] Niu T, Rosen C J. The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: A critical appraisal. *Gene*, 2005, **361**: 38-56
- [8] Hughes F J, Turner W, Belibasakis G, *et al.* Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol* 2000, 2006, **41**: 48-72
- [9] Komori T, Yagi H, Nomura S, *et al.* Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 1997, **89**(5): 755-764
- [10] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, *et al.* *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, **89**(5): 747-754
- [11] Trippel S B. Potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, 1998, **355**: S301-313
- [12] Noda T, Tokuda H, Yoshida M, *et al.* Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in insulin-like growth factor-I-induced alkaline phosphatase activity in osteoblasts. *Horm Metab Res*, 2005, **37**(5): 270-274
- [13] Radcliff K, Tang T B, Lim J, *et al.* Insulin-like growth factor-I regulates proliferation and osteoblastic differentiation of calcifying vascular cells *via* extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circ Res*, 2005, **96** (4): 398-400
- [14] Wennberg C, Hessel L, Lundberg P, *et al.* Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res*, 2000, **15**(10): 1879-1888
- [15] Ghosh-Choudhury N, Abboud S L, Nishimura R, *et al.* Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. *J Biol Chem*, 2002, **277** (36): 33361-33368
- [16] Franceschi R T, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem*, 2003, **88**(3): 446-454
- [17] Schindeler A, Little D G. Ras-MAPK signaling in osteogenic differentiation: friend or foe?. *J Bone Miner Res*, 2006, **21** (9): 1331-1338
- [18] Grey A, Chen Q, Xu X, *et al.* Parallel phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways subserve the mitogenic and antiapoptotic actions of insulin-like growth factor I in osteoblastic cells. *Endocrinology*, 2003, **144**(11): 4886-4893
- [19] Kono S J, Oshima Y, Hoshi K, *et al.* Erk pathways negatively regulate matrix mineralization. *Bone*, 2007, **40**(1): 68-74
- [20] Tanaka H, Wakisaka A, Ogasa H, *et al.* Effect of IGF-I and PDGF administered *in vivo* on the expression of osteoblast-related genes in old rats. *J Endocrinol*, 2002, **174**(1): 63-70
- [21] Huang W, Carlsen B, Rudkin G, *et al.* Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. *Bone*, 2004, **34**(5): 799-808
- [22] Ishijima M, Tsuji K, Rittling S R, *et al.* Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res*, 2002, **17**(4): 661-667
- [23] McKee M D, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech*, 1996, **33**(2): 141-164
- [24] Xiao G, Jiang D, Thomas P, *et al.* MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, *Cbfa1*. *J Biol Chem*, 2000, **275**(6): 4453-4459
- [25] Pei Y, Meng X W, Zhou X Y, *et al.* Expression of core binding factor $\alpha 1$ up-regulated by IGF-I, GM-CSF, and EGF through MAPK pathway in MC3T3-E1 and C2C12 cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, **24**(10): 975-984
- [26] Yang S Y, Goldspink G. Different roles of the IGF-I E_c peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation. *FEBS Lett*, 2002, **522**(1-3): 156-160

The Effects of MGF and E Peptide on The Differentiation of Osteoblasts*

ZHANG Bing-Bing^{1,2)**}, WANG Yuan-Liang^{1,2)}, YANG Li^{1,2)}, PAN Chang-Jiang^{1,2)},
FU Ya^{1,2)}, DENG Mo-Yuan^{1,2)}, LI Yu-Xiao^{1,2)}

⁽¹⁾ Research Center of Bioinspired Materials Science and Engineering, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

⁽²⁾ Key Laboratory of Biorheological Science and Technology (Chongqing University), Ministry of Education, Chongqing 400044, China)

Abstract The mechano growth factor (MGF) is originated from alternative splicing of *Igf-1* gene, which is mainly expressed in stretched osteoblasts. The main purpose of this study is to examine the effects of MGF and E peptide (the C-terminal 24 amino acids peptide in the E domain of MGF, MGF-Ct24E) on differentiation of osteoblast MC3T3-E1 cells. The results indicate that the MGF and MGF-Ct24E activated the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk1/2) and affected the expression of osteoblast-associated genes, including the reduced expression of alkaline phosphatase (ALP) and type 1 collagen (Col1), the increased product of osteopontin (OPN) and the decreased nuclear levels of activated Cbfa-1. These effects could be abolished by the blockade of Erk1/2 activation by inhibitor PD98059. In addition, the MGF could preferably activate the PI3K-Akt pathway, which is essential for the differentiation of osteoblasts, so the osteoblast has higher expression of ALP, type 1 Col1, and the formation of bone mineralization nodule under the treatment of MGF than that under the treatment of MGF-Ct24E. These advantages could be inhibited after blocking of Akt by inhibitor LY294002. It was concluded that the MGF-Ct24E could inhibit osteoblasts differentiation through the activated Erk1/2 cascade, while the MGF can induce differentiation through the activated PI3K-Akt. The MGF consists of MGF-Ct24E and IGF-1, which could activate Erk1/2 and PI3K-Akt respectively. Therefore, the MGF possess double effects on differentiation of osteoblasts, which presented as that inhibitory effect at the early differentiation, and promoting effect at the later differentiation.

Key words mechano growth factor, insulin-like growth factor 1, osteoblasts, differentiation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00614

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30870609).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-65102509, E-mail: zbb@cqu.edu.cn

Received: October 20, 2009 Accepted: January 5, 2010