

文章编号:1004-7220(2011)03-0217-08

ERK 信号分子介导周期机械拉伸诱导的 骨髓间充质干细胞增殖

袁琳, 宋关斌, 罗庆, 秦建, 石轶松, 杨力

(重庆大学 生物工程学院, 重庆 400044)

摘要:目的 研究周期机械拉伸加载对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响及其相关力信号转导分子。方法 应用周期机械拉伸加载装置研究不同参数的周期机械拉伸加载对大鼠骨髓间充质干细胞生长的影响。RT-PCR 法检测 c-fos mRNA 表达的变化, Western blotting 分析细胞外信号调节激酶(ERK1/2)磷酸化水平及 c-fos 蛋白表达的变化。结果 适宜的机械拉伸加载可以明显促进大鼠骨髓间充质干细胞增殖, 在频率 1 Hz、形变量 10%、拉伸 15 min 且静止 6 h 的条件下可以使细胞数量增加到对照组的 1.4 倍, c-fos mRNA 和蛋白的表达显著增加。Western blotting 检测证实, 周期性机械拉伸加载明显促进 ERK1/2 磷酸化, 却不影响 ERK1/2 总蛋白(t-ERK1/2)的表达水平。抑制剂 PD98059 显著抑制了机械拉伸对细胞增殖的促进作用, 同时抑制拉伸诱导的 ERK1/2 磷酸化及 c-fos 基因和蛋白的表达水平。结论 ERK1/2 信号分子的活化在周期性机械拉伸加载调控大鼠骨髓间充质干细胞增殖的过程中起着重要作用, 且该通路可能通过转录因子的调节促进 rBMSCs 的增殖。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 机械刺激; 细胞增殖; 细胞生长; 信号转导

中图分类号: Q 66 文献标志码: A

Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by cyclic mechanical stretch mediated with ERK signal molecules

YUAN Lin, SONG Guan-bin, LUO Qing, QIN Jian, SHI Yi-song, YANG Li (College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To investigate effects of the cyclic stretch on rat bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs) proliferation and the related signal molecules. **Methods** The cyclic mechanical stretching apparatus was used to study the effects of the cyclic stretch on the growth of rBMSCs with different parameters. The expression of c-fos was measured by RT-PCR at mRNA level and the levels of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2), total ERK1/2 (t-ERK1/2) and c-fos proteins were detected by Western blotting. **Results** The proliferation of rBMSCs could be stimulated by the cyclic stretch, and the number of cells was increased to 1.4 times compared with that of the control group at 1 Hz, 10% strain for 15 min and then being static for 6 h. Moreover, the expressions of c-fos mRNA and protein levels were increased significantly after the stimulation of the stretch. On the other hand, it was found that the cyclic stretch could remarkably enhance the phosphorylation of ERK1/2, but did not influence the level of t-ERK1/2. After treated with PD98059, the proliferation of rBMSCs stimulated by the cyclic stretch was inhibited prominently in a dose-dependent manner and the expressions of p-ERK1/2, as well as c-fos at gene and protein levels were sharply down-regulated. **Conclusions** ERK1/2 signal molecules play an important role in regulating the cyclic stretch on the proliferation of rBMSCs and transcription factors may take part in the regulations during this progress.

收稿日期:2011-03-28; 修回日期:2011-04-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770530, 11032012), 重庆市科自然科学基金(2009bb5040), 中央高校基本科研业务费项目(CDJXS11232243)。

通讯作者:宋关斌, Tel: (023) 65102507; E-mail: song@cqu.edu.cn。

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs); Mechanical stimulation; Cell proliferation; Cell growth; Signal transduction

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是来源于胚胎发育早期中胚层的一类多能干细胞。该类细胞不仅具有自我更新能力,在适宜的分化条件下还可以分化为成骨细胞、软骨细胞、肌肉细胞、内皮细胞等^[1-2]。由于BMSCs易于外源基因转染、可作为携带治疗基因的载体迁移到肿瘤及组织受损部位参与组织修复等优点,已成为一种理想的基因治疗的靶细胞^[3]。然而, BMSCs在体内的含量很少,且随着年龄的增长,其数量、分化、增殖能力都显著下降^[4-5],如何在体外扩增得到大量的BMSCs便成为临床应用亟待解决的问题之一。

近年来许多研究证明张应力作为一种重要的机械应力,参与调节细胞的多种生理功能。然而,由于采用的力学加载装置以及所选用的细胞种类不同,拉伸刺激促进细胞增殖的结果也并不一致^[6-8]。如何在不同加载参数(如频率、形变量、加载时间)之间进行有效组合,找到促进细胞增殖的最佳条件还有待进一步探索。

另一方面,为了深入了解细胞感受力学刺激,进而将力学信号转化成化学信号传递到细胞核中引起相应生物学效应的分子机制,力信号转导途径成为该领域研究的热点和前沿。已有研究表明有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)介导了细胞的多种生物学过程,如细胞增殖、分裂、迁移、分化等^[9]。在MAPK家族中,细胞外信号调节激酶(ERK1/2)是广泛存在于真核细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在力^[10-12]、化学因素^[13-14]调节细胞增殖的过程中起着重要作用。本研究主要考察周期机械拉伸加载对大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响以及ERK1/2信号分子是否介导拉伸诱导骨髓间充质干细胞的增殖过程。

1 材料和方法

1.1 大鼠骨髓间充质干细胞(rBMSCs)分离和培养

选用2月龄、体重100~150g的雄性SD(Sprague-Dawley)大鼠,断颈处死后于无菌条件下分离双侧股骨和胫骨。取10mL注射器,用不含血清的

DMEM培养基冲出骨髓,吹打成细胞悬液后加入到预先装有5mL 1.073g/mL Percoll液(Hyclone公司)的离心管中,2500r/min离心30min。取界面单核细胞层,PBS漂洗2次后加入LG-DMEM完全培养基(Gibico公司,10% FBS、100U/mL青霉素、100mg/mL硫酸链霉素)置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。24h首次换液,去除未贴壁的漂浮细胞并记为P₀代。以后每3d换液1次,待贴壁细胞达到80%~90%融合后,用0.25%的胰蛋白酶-0.02% EDTA消化并以1:2的比例传代培养,记为P₁代。倒置显微镜观察细胞的生长情况。

1.2 rBMSCs的鉴定

取第3代rBMSCs细胞,用0.25%的胰蛋白酶~0.02% EDTA消化吹打制成单细胞悬液,1000r/min离心5min,去除上清液,PBS漂洗后分别加入小鼠抗大鼠CD44、CD90及CD34抗体,FITC标记羊抗小鼠二抗,常规流式细胞仪检测细胞表面抗原的表达。

1.3 周期拉伸加载实验

将rBMSCs以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种到裱衬有collagen I的硅胶chamber中,待长至80%汇合后更换为0.5%的低血清培养基同步处理24h,之后施加频率为1Hz、形变量5%~15%、15~60min的周期性机械拉伸加载,卸载后继续培养6h,并以不施加张应力的静态培养细胞为对照组。

1.4 增殖率检测

1.4.1 细胞计数 拉伸加载结束继续培养6h后,用0.25%的胰蛋白酶-0.02% EDTA消化细胞制成细胞悬液。加入0.4%台盼蓝染液染色2~3min,显微镜下计数。

$$\text{细胞增殖率} = [(\text{实验组活细胞数} - \text{对照组活细胞数}) / \text{对照组活细胞数}] \times 100\%$$

1.4.2 MTT法 拉伸加载结束继续培养6h后,每个chamber中加入200μL体积的5mg/mL MTT反应液继续孵育4h,弃上清液。随即加入600μL二甲亚砜(DMSO),轻轻震荡30min使结晶紫充分溶解。吸取150μL加入到96孔板中,每组设置3

个平行孔,酶标仪 490 nm 波长处测定各孔吸光度值(OD 值)。

细胞增殖率 = [(实验组 OD 值 - 对照组 OD 值) / 对照组 OD 值] × 100%

1.5 RT-PCR 检测 c-fos 基因的表达变化

拉伸加载结束后立即用 0.25% 的胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化细胞,离心且用 PBS 漂洗后收集细胞。通过 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 提取细胞总 RNA,取总 RNA 2 μg 作 20 μL 反应体系逆转录。反应引物通过 Primer Premier 5.0 软件自行设计且由 Invitrogen 公司合成。

c-fos 上游引物: 5'-ATCCGAAGGGAAAG-GAATAAGA-3',

下游引物: 5'-CAAGTCCAGGGAGGTCACAGA-3';

β-actin 上游引物: 5'-CTGCCGCATCTCTTC-CTC-3',

下游引物: 5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'。

反应体系首先 94 °C 预变性 5 min,接着 94 °C、30 s,58 °C、45 s,72 °C、45 s,30 个循环,最后 72 °C、10 min。扩增得到的 cDNA 片段在 1.5% 琼脂凝胶上电泳且通过 Gel Doc™ XR 凝胶成像系统分析目的条带的吸光度值,以 β-actin 基因条带的吸光度值作为内参。

1.6 Western blotting 检测 ERK 磷酸化及 c-fos 蛋白表达的变化

拉伸加载结束后立即用 0.25% 的胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化细胞,离心且用 PBS 漂洗后收集细胞。加入裂解液(62 mM Tris-HCl pH 6.8,10% 甘油,2% SDS,2% β-巯基乙醇,0.02% 溴酚蓝)、蛋白酶抑制剂 cocktail (Roche, South San Francisco, CA, USA) 及磷酸酶抑制剂 cocktails I and II (Sigma-Aldrich, MO, 美国)。冰上裂解 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清,水中煮沸 5 min,8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,湿转移方法转 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入一抗 p-ERK1/2,t-ERK1/2,c-fos (Cell Signaling Technology, MA, 美国),β-actin (Santa Cruz, CA, 美国),水平摇床缓慢摇动 4 °C 过夜孵育。之后用 0.1% Tween-20 Tris 盐酸缓冲液(TBST)漂洗 3 次后加入二抗室温孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次,加入化学发光试

剂 ECL,X 光片曝光,显影定影后 Gel Doc™ XR 凝胶成像系统分析目的条带。

1.7 数据分析

数据以均数 ± 标准偏差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 GraphPad Prism (version 5.0a) 统计软件进行分析。当只有 2 组数据比较时,采用 *t* 检测分析;多组数据比较时采用 one-way ANOVA 分析方法且通过 Bonferroni 对结果进行校正。检验水准为 $P = 0.05$ 。

2 结果

2.1 rBMSCs 的形态特征及其鉴定

体外培养的 rBMSCs 呈长梭形/纺锤形,细胞融合时呈漩涡状分布(见图 1)。流式细胞术检测结果发现 rBMSCs 高表达 CD44、CD90,不表达 CD34(见图 2)。

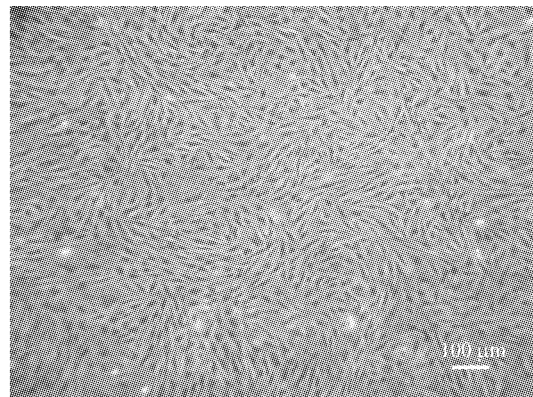


图 1 倒置显微镜观察第 3 代 rBMSCs 的形态图(标尺:100 μm)

Fig.1 Morphology of rBMSCs at passage 3 observed by inverted phase contrast microscope (Scale bar: 100 μm)

2.2 机械拉伸对 rBMSCs 增殖的影响

为了筛选出周期性机械拉伸促进 rBMSCs 增殖的最佳条件,在频率为 1 Hz 的条件下分别对细胞加载形变量 5%、10%、15%,作用 15、30 和 60 min 的机械刺激。由图 3 可以看出,在形变量为 5% 的条件下,拉伸 15 min 和 30 min 细胞数量均有所上升,但只有 30 min 加载组与对照组相比具有统计学差异($P < 0.05$);增加形变量至 10% 后,加载 15 min 和 30 min 后,增殖率分别为 0.37 ± 0.06 ($P < 0.01$) 和 0.21 ± 0.04 ($P < 0.05$);在 15% 形变量的条件下,3 个时间点的机械刺激均抑制了细胞增殖,其中

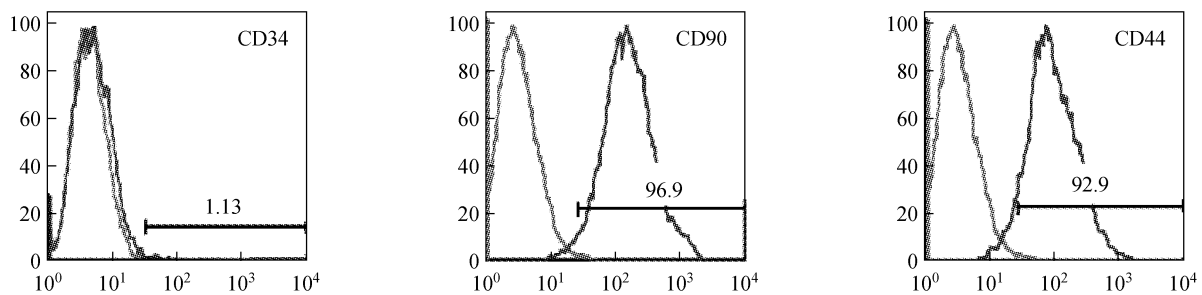


图2 流式细胞术检测 rBMSCs 表面抗原 CD34、CD44 及 CD90 的表达

Fig.2 Flow cytometry determination of rBMSCs surface markers in CD34, CD90 and CD44

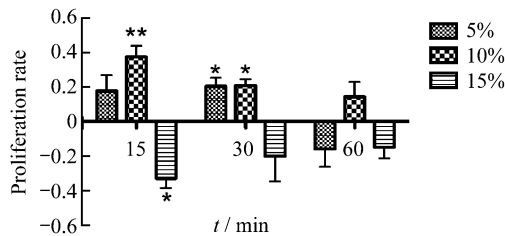
图3 MTT 法检测在频率为 1 Hz、不同形变量及加载时间的周期性机械拉伸对 rBMSCs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.3 Effects of cyclic stretch on the proliferation of rBMSCs subjected to 1 Hz, 5% ~ 15% strain for 15 ~ 60 min by MTT assay

($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

15 min 实验组与对照组相比具有统计学差异。由此可见,在该拉伸加载系统中,频率为 1 Hz、形变量 10%、拉伸刺激 15 min 且静止 6 h 是促进 rBMSCs 增殖的最佳条件。为了进一步验证该结果,采用直接细胞计数法分析细胞增殖的变化,得到的结果与 MTT 检测结果一致(见图 4)。

2.3 机械拉伸对 ERK1/2 信号分子表达的影响

为了考察机械拉伸是否活化 ERK1/2 信号分子,在频率为 1 Hz、形变量为 10% 的条件下对细胞施加 5、10、15、30、60 min 的机械刺激,以不拉伸组作为对照。结果发现机械拉伸加载可以使 ERK1/2 迅速磷酸化,10 min 刺激后与对照组相比即具有显著性差异,在 15 min 时达到最高值 0.91 ± 0.01 ,为对照组 0.27 ± 0.03 的 3.6 倍($P < 0.01$)。拉伸 60 min 后,ERK1/2 的磷酸化程度虽然有小幅回落,但与对照组相比仍然具有显著性差异($P < 0.05$)。周期性机械拉伸并不影响 ERK1/2 总蛋白的表达水平(见图 5)。

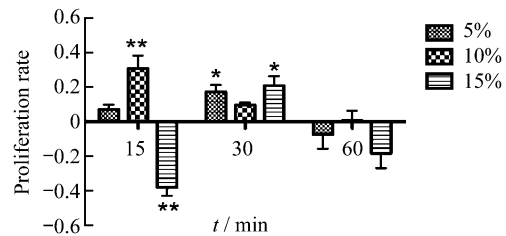
图4 细胞计数法检测在频率为 1 Hz、不同形变量及加载时间的周期性机械拉伸对 rBMSCs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.4 Effects of cyclic stretch on the proliferation of rBMSCs subjected to 1 Hz, 5% ~ 15% strain for 15 ~ 60 min by cell counting

($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

2.4 机械拉伸对 c-fos 基因和蛋白表达水平的调控

c-fos 属于即刻早期基因家族,可与 c-Jun 形成转录因子活化蛋白-1 (AP-1) 从而介导细胞的增殖过程。由图 6、7 可以看出周期性机械拉伸可以显著上调 c-fos 基因和蛋白的表达水平,分别在施加刺激 10 min 和 15 min 后达到峰值,分别为 0.69 ± 0.06 和 0.96 ± 0.04 ($P < 0.05$)。

2.5 PD98059 抑制 ERK1/2 活化且阻断拉伸加载诱导的 rBMSCs 增殖

为了进一步探究 ERK1/2 信号分子的活化与机械拉伸诱导 rBMSCs 增殖之间的关系,在拉伸前 1 h 分别加入不同浓度的抑制剂 PD98059,以只添加 DMSO 的处理组为空白对照组。图 8 显示 ERK1/2 的抑制剂可以抑制机械拉伸诱导的 rBMSCs 增殖,且随着浓度增高,抑制作用明显加剧。在 $50 \mu\text{mol/L}$ 浓度的作用下,已完全抑制了机械拉伸对细胞增殖的促进效应。同时该浓度的 PD98059 显著抑制了机械拉伸诱导的 ERK1/2 信号分子的活化水平。抑

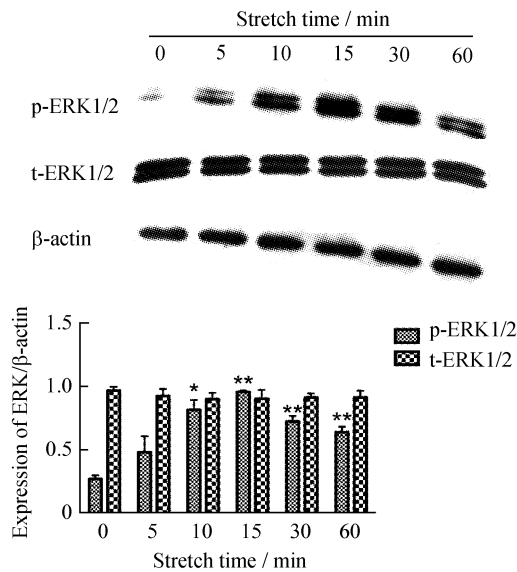


图5 Western blotting 法检测频率 1 Hz、10% 形变量、0~60 min 周期性机械拉伸后 p-ERK1/2 及 t-ERK1/2 的表达变化 (a) 条带图, (b) Gel Doc™ XR 凝胶成像系统分析且以 β-actin 的表达量为内参所作的柱状图 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.5 Expression changes of p-ERK1/2 and t-ERK1/2 in rBMSCs subjected to 1 Hz, 10% strain for 0~60 min by Western blotting (a) Typical blots, (b) Densitometric analysis ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

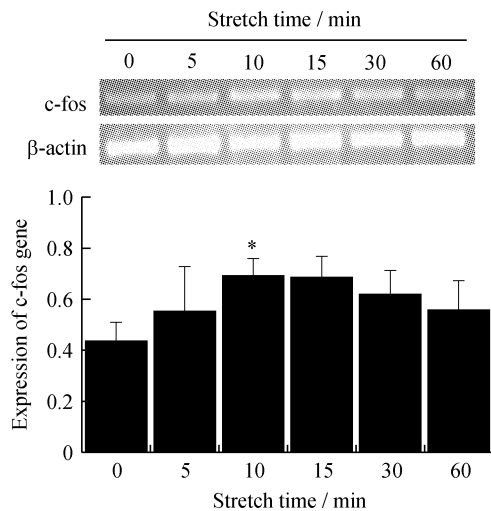


图6 RT-PCR 法检测频率 1 Hz、10% 形变量、0~60 min 周期性机械拉伸后 c-fos 基因的表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$)

Fig.6 Expression changes of c-fos mRNA in rBMSCs subjected to 1 Hz, 10% strain for 0~60 min by RT-PCR ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$)

制剂处理后,即使施加机械刺激,ERK1/2 的磷酸化程度在各检测时间点间也无明显差异(见图9)。

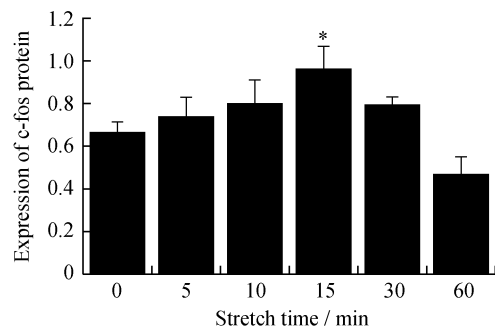


图7 Western blotting 法检测频率 1 Hz、10% 形变量、0~60 min 周期性机械拉伸后 c-fos 蛋白的表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$)

Fig.7 Expression changes of c-fos protein in rBMSCs subjected to 1 Hz, 10% strain for 0~60 min by Western blotting ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$)

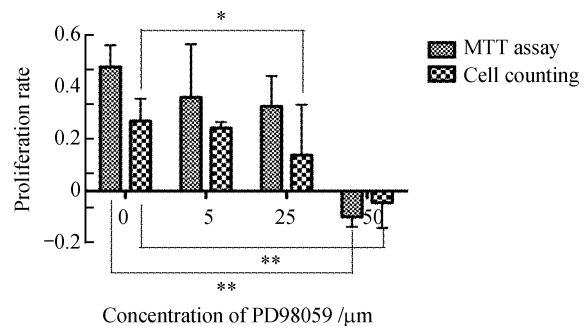


图8 MTT 及细胞计数法检测不同浓度 PD98059 对机械拉伸加载诱导 rBMSCs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.8 Effects of PD98059 with different concentrations on the cyclic stretch-induced rBMSCs proliferation by MTT assay and cell counting ($\bar{x} \pm s$, $n=3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

2.6 PD98059 抑制机械拉伸诱导的 c-fos 表达

50 μmol/L 浓度的 PD98059 处理 1 h 后,对细胞施加 0~60 min 的机械刺激,以不拉伸组作为对照组。分别通过半定量 PCR 及 Western blotting 检测各个时间点 c-fos 基因和蛋白的表达变化。如图 10、11 所示,在用 ERK1/2 的抑制剂处理后,完全抑制了周期性机械拉伸对 c-fos 基因和蛋白表达的上调作用。提示 ERK1/2 信号分子可能通过对转录因子的调节介导 rBMSCs 增殖。

3 讨论

已有许多文献报道,周期性机械拉伸加载在调节细胞多种生物学过程中均起到重要作用。然而由

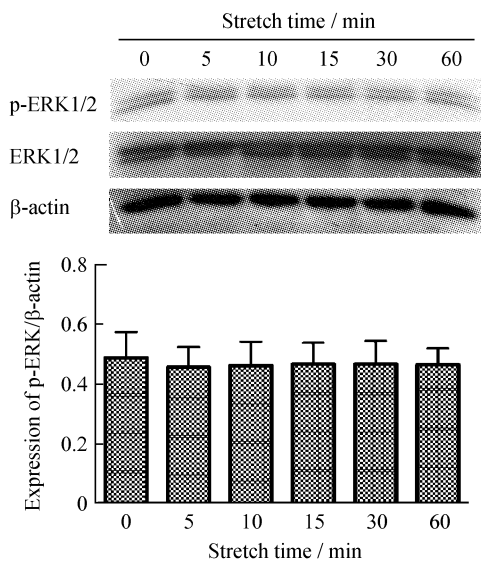


图9 Western blotting 检测 PD98059 处理后 ERK1/2 分子的活化水平 (a) 条带图, (b) Gel Doc™ XR 凝胶成像系统分析且以 β -actin 的表达量为内参所作的柱状图 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.9 Effects of PD98059 on the cyclic stretch-induced ERK1/2 activation by Western blotting (a) Typical blots, (b) Densitometric analysis ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

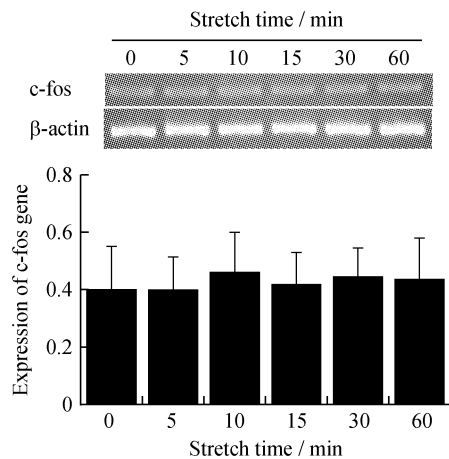


图10 RT-PCR 检测 PD98059 处理后在 1 Hz、10% 形变量、0 ~ 60 min 周期性机械拉伸下 c-fos mRNA 表达的变化 (a) 条带图, (b) Gel Doc™ XR 凝胶成像系统分析且以 β -actin 的表达量为内参所作的柱状图 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.10 Expression changes of c-fos mRNA in rBMSCs pretreated with PD98059 and subjected to 1 Hz, 10% strain for 0 ~ 60 min by RT-PCR (a) Typical blots, (b) Densitometric analysis ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

于细胞种类、加载装置及参数不同等多种原因,导致拉伸刺激促进细胞增殖的条件也不尽相同。通过筛

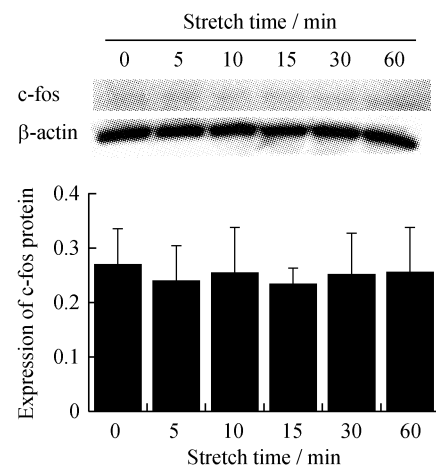


图11 Western blotting 检测 PD98059 处理后在 1 Hz、10% 形变量、0 ~ 60 min 机械拉伸下 c-fos 蛋白表达的变化 (a) 条带图; (b) Gel Doc™ XR 凝胶成像系统分析且以 β -actin 的表达量为内参所作的柱状图 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.11 Expression changes of c-fos protein in rBMSCs pretreated with PD98059 and subjected to 1 Hz, 10% strain for 0 ~ 60 min by Western blotting (a) Typical blots, (b) Densitometric analysis ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

选多种加载参数,发现在本拉伸系统中,频率 1 Hz、10% 形变量刺激 15 min 且静止 6 h 的加载条件可以有效地促进 rBMSCs 增殖。Kaspar 等^[15]也发现在单轴周期性机械拉伸调节成骨样细胞增殖的过程中,循环数及频率均起到重要作用,其中 1 Hz 是促进细胞增殖的最佳频率。Park 等^[16]研究组报道 10% 形变量是研究 BMSCs 响应拉伸加载的理想生理学条件,本文的研究同样发现 rBMSCs 增殖对低形变量 (5%) 拉伸的响应较弱,而过高形变量 (15%) 的机械刺激又抑制了细胞增殖。由此再次证明适宜的周期性拉伸加载可以有效促进 rBMSCs 增殖。

细胞感受力学刺激后,将力学信号转换成化学信号从而引起相应的生物学响应。已有研究表明,存在于细胞质中的 ERK1/2 可以被多种刺激原激活进而转移到细胞核中调控细胞的增殖行为。Choi 等^[14]的研究证明,成纤维细胞生长因子-2 和 4 (FGF-2, FGF-4) 促进 BMSCs 增殖是通过活化 ERK1/2 及 PI3K-AKT 信号转导途径实现的。同样,在机械张力和压力促进肺内皮细胞、软骨细胞增殖的过程中,ERK1/2 磷酸化也起到十分重要的作用^[10-12]。本研究发现,周期性机械拉伸刺激后,ERK1/2 信号分子在 10 min 内迅速活化,60 min 后

其活化程度仍维持在较高水平。由此可见,ERK1/2 在传递力学因素刺激 rBMSCs 增殖的过程中扮演着重要的角色。然而细胞内各种信号通路相互影响、交互对话(crosstalk),是否有其他信号通路参与机械拉伸加载调节 rBMSCs 的增殖过程目前还不明确。

ERK1 和 ERK2 的氨基酸序列享有 83% 的同源性^[17],Liu 等^[18] 证明在调节细胞增殖的过程中, ERK1 和 ERK2 同样重要。当抑制 ERK1 或者 ERK2 的表达后均使细胞周期停留在 G2 期。然而 Frémin 等^[19] 发现只有 ERK2 在肝细胞增殖过程中起着不可替代的作用。也有研究^[20] 表明从 ERK1 缺陷小鼠中提取的角质细胞,其增殖能力显著下降,且过表达 ERK2 并不能恢复该角质细胞对有丝分裂原的增殖响应。本文的研究发现,周期性机械拉伸刺激后, ERK1 和 ERK2 均迅速活化,但活化水平有所不同,两者在拉伸加载促进 rBMSCs 增殖过程中的贡献还需进一步确认。

有文献报道^[21],有丝分裂原促进细胞增殖取决于对即刻早期基因转录的调控。早在 1988 年, Riabowol 等^[22] 就证明 c-fos 的表达在细胞周期进入 DNA 合成期的进程中起着重要作用。近期 Eto 等^[23] 的研究也表明 MAPK 的活化及 c-fos 基因的表达介导了神经调节素 1 对细胞周期进程的促进作用。本研究发现,机械拉伸刺激后,rBMSCs 中 c-fos 基因和蛋白的表达迅速增加,分别在 10 和 15 min 时达到峰值,但随后出现下调。Parrales 等^[24] 在研究凝血酶促进视网膜上皮细胞增殖的过程中发现 c-fos 基因的表达分别在 15 和 110 min 时出现 2 个峰值。这些结果提示由于细胞种类不同,刺激方式不同,对即刻早期基因转录的调控也不尽相同。本研究发现在加入 ERK1/2 的抑制剂 PD98059 后,不仅抑制了 rBMSCs 增殖,c-fos 基因和蛋白的表达也显著下调,进一步表明周期性机械拉伸加载促进 rBMSCs 增殖的过程是通过活化 ERK1/2 信号分子,调节 c-fos 基因、蛋白的表达,进而通过转录因子的调控来实现的。

参考文献:

- [1] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cell derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-49.
- [2] Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells [J]. *Injury Int J Care Injured*, 2005, 36S: 8-12.
- [3] Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, *et al.* Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2005, 5(12): 1571-1584.
- [4] Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges [J]. *J Cell Biochem*, 2001, 82(4): 583-590.
- [5] Stenderup K, Justesen J, Clausen C, *et al.* Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells [J]. *Bone*, 2003, 33(6): 919-926.
- [6] Koike M, Shimokawa H, Kanno Z, *et al.* Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2 [J]. *J Bone Miner Metab*, 2005, 23(3): 219-225.
- [7] Simmons CA, Matlis S, Thornton AJ, *et al.* Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway [J]. *J Biomech*, 2003, 36(8): 1087-1096.
- [8] 李菲菲,丁寅,冯雪,等.机械牵张应力刺激成骨细胞的差异蛋白质组学研究[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(6): 406-411. Li FF, Ding Y, Fen X, *et al.* Differential proteomic analysis on osteoblasts stimulated by mechanical strain [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(6): 406-411.
- [9] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades [J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 37-40.
- [10] Chaturvedi LS, Marsh HM, Basson MD. Src and focal adhesion kinase mediate mechanical strain-induced proliferation and ERK1/2 phosphorylation in human H441 pulmonary epithelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(5): C1701-1713.
- [11] Ryan JA, Eisner EA, DuRaine G, *et al.* Mechanical compression of articular cartilage induces chondrocyte proliferation and inhibits proteoglycan synthesis by activation of the ERK pathway: Implications for tissue engineering and regenerative medicine [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2009, 3: 107-116.
- [12] 韩悦,潘劲松,陈丹鹏,等. ERK 信号通路参与调控周期性张应变诱导的人牙周膜细胞增殖[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(3): 211-215. Han Y, Pan JS, Chen DP, *et al.* Proliferation of human periodontal ligament cells promoted by cyclic strain via ERK signaling pathway [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(3): 211-

- 215.
- [13] Cárcamo-Orive I, Tejados N, Delgado J, *et al.* ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stem cells without affecting their mobilization and differentiation potential [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(8): 1777-1788.
- [14] Choi SC, Kim SJ, Choi JH, *et al.* Fibroblast growth factor-2 and -4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways [J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17: 725-736.
- [15] Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, *et al.* Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain [J]. *J Biomech*, 2002, 35(7): 873-880.
- [16] Park JS, Chu JS, Cheng C, *et al.* Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88(3): 359-368.
- [17] Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition [J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3227-3239.
- [18] Liu X, Yan S, Zhou T, *et al.* The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival [J]. *Oncogene*, 2004, 23(3):763-776.
- [19] Frémin C, Ezan F, Boisselier P, *et al.* ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: An RNAi-mediated ERK2 knockdown approach in wild-type and ERK1 null hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2007, 45(4): 1035-1045.
- [20] Bourcier C, Jacquel A, Hess J, *et al.* p44 mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1)-dependent signaling contributes to epithelial skin carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2700-2707.
- [21] Kondoh K, Torii S, Nishida E. Control of MAP kinase signaling to the nuclear [J]. *Chromosoma*, 2005, 114(2):86-91.
- [22] Riabowol KT, Vosatka RJ, Ziff EB, *et al.* Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells [J]. *Mol Cell Biol*, 1988, 8(4): 1670-1676.
- [23] Eto K, Hommyo A, Yonemitsu R, *et al.* ErbB4 signals Neuregulin1-stimulated cell proliferation and c-fos gene expression through phosphorylation of serum response factor by mitogen-activated protein kinase cascade [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 339(1-2):119-125.
- [24] Parrales A, Palma-Nicolós JP, López E, *et al.* Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting c-Fos-mediated cyclin D1 expression [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 222(2):302-312.

• 致读者 •

关于缩略语使用的要求

摘要及正文中首次出现缩略语时应先写出其中文全称,再在括号内注明其英文全称及缩略语,二者之间以逗号隔开。缩略语的使用需规范、准确、避免出现缩略语相同的词语。公知公用的缩略语可不写出其全称,如“DNA”。缩略语不得拆开移行。

本刊编辑部
2011-06-20