

文章编号:1004-7220(2012)01-0065-07

## 力生长因子 E 肽与应力刺激对 成骨细胞基因表达的影响

林福春<sup>a,b</sup>, 张兵兵<sup>a,b</sup>, 辛娟<sup>a,b</sup>, 向燕<sup>a,b</sup>, 鲜成玉<sup>a,b</sup>, 邓墨渊<sup>a,b</sup>, 彭琴<sup>a,b</sup>, 王远亮<sup>a,b</sup>  
(重庆大学 a. 生物流变科学与技术教育部重点实验室; b. 生物工程学院 国家“985 工程”生物材料与仿生工程研究中心, 重庆 400030)

**摘要:** 目的 应用基因芯片技术分析在力生长因子 E 肽(MGF-Ct24E)和应力作用下成骨细胞基因表达的差异。方法 体外培养原代成骨细胞,分别对细胞施加周期性拉伸刺激(应变 12%,频率 0.5 Hz)和 MGF-Ct24E(50 mg/L)直接作用,基因芯片技术分析力学刺激和 MGF-Ct24E 作用对原代成骨细胞基因表达谱的影响,并用定量 PCR 验证基因芯片实验结果。结果 与对照组相比,力学加载组共发现差异表达基因 1 866 个,其中上调基因 1 113 个,下调基因 753 个;MGF-Ct24E 处理组共发现差异表达基因 1 178 个,其中上调基因 796 个,下调基因 382 个。GO 分析发现两者的差异基因表达谱具有一致性,并且差异表达基因主要涉及细胞增殖与分化调节、细胞对应力刺激的响应和力学转导通路等。定量 PCR 实验结果验证的差异表达基因与芯片实验结果一致。结论 基因表达谱分析显示应力刺激和 MGF-Ct24E 作用对成骨细胞的基因表达具有类似的调控效应,为后续使用 MGF-Ct24E 治疗骨修复以弥补应力刺激不足的研究提供了新的思路。

**关键词:** 成骨细胞; 力生长因子; 应力刺激; 基因芯片; 基因表达; 细胞培养

**中图分类号:** Q 291, R 68 **文献标志码:** A

## Effect of MGF-Ct24E and mechanical stimulation on gene expression of osteoblasts

LIN Fu-Chun<sup>a,b</sup>, ZHANG Bing-Bing<sup>a,b</sup>, XIN Juan<sup>a,b</sup>, XIANG Yan<sup>a,b</sup>, XIAN Cheng-Yu<sup>a,b</sup>, DENG Mo-Yuan<sup>a,b</sup>, PENG Qin<sup>a,b</sup>, WANG Yuan-Liang<sup>a,b</sup> (a. Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education; b. Research Center of Bioinspired Materials Science and Engineering of National “985 Project Program” of China, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract: Objective** To identify the differentially expressed genes of osteoblasts under the stimulation of mechano growth factor E peptide( MGF-Ct24E) and mechanical stress by microarray analysis. **Methods** Primary osteoblasts were cultured *in vitro*, which were subjected to mechanical stimulation (with the mechanical strain of 12% and frequency of 0.5 Hz) and MGF-Ct24E treatment(50 mg/L), respectively. The gene expression profiles were analysed by cDNA microarrays and quantitative PCR was used to validate the microarray data. **Results** Compared with the control group, 1 866 genes were found to have differentially expressed in the mechanical loading group, in which 1 113 genes were up-regulated, while 753 genes were down-regulated. 1 178 genes were found to have differentially expressed in the MGF-Ct24E group, in which 796 genes were up-regulated and 382 genes were down-regulated. GO analysis suggested that the gene expression profile of MGF-Ct24E group was consistent with that of the mechanical loading group and differentially expressed genes were mainly involved in cell proliferation and differentiation, response to mechanical stress and mechaotransduction. **Conclusions** The mi-

收稿日期:2011-04-27; 修回日期:2011-05-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(11032012, 30870609), 重庆市自然科学基金资助项目(2009BB4382, 2010BB5225)。

通讯作者:王远亮, 博士研究生导师, Tel:(023)65102509; E-mail:wyl@cqu.edu.cn。

croarray analysis showed that MGF-Ct24E treatment had similar effects with the mechanical loading on the gene expression of osteoblasts, which might provide a novel approach to study the usage of MGF-Ct24E for treating bone repair in the absence of mechanical stimulation.

**Key words:** Osteoblasts; Mechano-growth factor (MGF); Mechanical stimulation; Microarray; Gene expression; Cell culture

成骨细胞是响应机械应力的效应细胞之一,该细胞在骨重建的过程中处于中心调控地位,是力学信号转导过程中对应力应变信号进行感知的主要力学敏感性细胞。因此,研究应力刺激对成骨细胞生物学行为的影响,对深入阐明应力作用下骨组织的改建具有重要的价值。研究表明,应力刺激能够调控成骨细胞的增殖分化以及与骨重建相关基因的表达<sup>[1-3]</sup>。本实验室研究发现,拉伸刺激能够促进成骨细胞增殖,并且能够促进成骨细胞表达一种新的生长因子——力生长因子(mechano-growth factor, MGF)<sup>[4-5]</sup>。而体外研究发现,MGF及其活性肽段E肽(羧基端E结构域24个氨基酸组成的肽段,MGF-Ct24E)能促进成骨前体细胞MC3T3-E1增殖和迁移,延迟其分化<sup>[6-7]</sup>;体内实验发现,MGF-Ct24E能够促进兔桡骨缺损修复<sup>[8]</sup>。细胞内部的生理活动变化可在一定程度上表现为其基因水平上的变化。那么,MGF作为应力刺激下的细胞响应产物对成骨细胞基因表达的影响是否具有与应力刺激类似的效应呢?本文着重从基因表达水平分析周期性拉伸刺激和MGF-Ct24E直接作用对成骨细胞的影响,通过基因表达谱分析MGF-Ct24E作用和应力刺激作用的异同。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

DMEM培养液(Gibco,美国);优级胎牛血清(TBD,中国);TRIzol试剂(Invitrogen,美国);RNA纯化试剂盒(Qiagen,美国);定量PCR试剂(天根生化);SYBRGreen(TOYOBO,日本);Flexcell 4 000周期性力学加载系统(Flexercell,美国);大鼠全基因组表达谱芯片(Agilent,美国);芯片杂交试剂盒(Agilent,美国);引物由上海英骏公司合成;MGF-Ct24E由本实验室合成<sup>[6]</sup>。

### 1.2 细胞培养

取出生1~3d的SD大鼠,按组织块培养法从

大鼠颅盖骨顶骨中分离培养原代成骨细胞<sup>[9]</sup>。待细胞长满瓶底,用0.25%胰酶(含EDTA)消化,并传代培养。实验采用第3代成骨细胞。

### 1.3 细胞处理

本实验采用Flexcell 4 000周期性力学加载系统(Flexcell 4 000 cell stretching unit)对细胞进行周期性拉伸刺激。将第3代成骨细胞按 $1 \times 10^5$ 个/孔接种到6孔弹性膜培养板上培养2d,待细胞在弹性膜底贴壁牢固生长状态稳定后,换含2%的胎牛血清的培养液继续培养12h。将6孔弹性膜培养板随机分为力学加载组、MGF-Ct24E处理组和对照组3组。力学加载组换含2%胎牛血清的DMEM培养液以12%的拉伸应变在0.5 Hz频率下加载8h;MGF-Ct24E处理组换含2%的胎牛血清及50 mg/L MGF-Ct24E的培养液与对照组静态培养8h。

### 1.4 总RNA提取及芯片杂交

收集上述实验中的细胞,用TRIzol试剂一步法抽提细胞总RNA,以总RNA为模板逆转录后采用单色荧光Cy3标记cDNA,然后与Agilent 4 × 44K大鼠全基因组表达谱芯片杂交。按照Agilent芯片杂交试剂盒说明在芯片上点样后65℃杂交17h。冲洗玻片,晾干后用Agilent DNA Microarray Scanner扫描杂交芯片,提取荧光扫描信号。

### 1.5 芯片数据分析

采用Agilent Feature Extraction软件提取分析实验组和对照组荧光信号的强度,以GeneSpring GX软件标准化处理后的荧光强度比值(实验组/对照组) > 2作为判断显著性差异的标准筛选出差异表达基因。应用Gene Ontology(GO)数据库(<http://www.geneontology.org>)对筛选出的差异表达基因进行基因本体论(GO)分析。EASE软件统计学分析GO分类中差异表达的P值,并用假阳性率FPR(Benjamini false discovery rate)对P值检验结果进行校正。

### 1.6 定量 PCR 验证

对基因芯片结果中部分差异表达基因进行定量 PCR 验证,引物序列见表 1。分别提取力学加载组, MGF-Ct24E 处理组和对照组总 RNA,取 2 μg 总 RNA 反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行定量 PCR 扩增,扩增条件为 94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环。

表 1 qPCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for qPCR

基因	引物序列
Fgf2	上游: F5'ACCCGTCACATTCGCCTTGCTC 3'
	下游: R5'ACCCTGGGCTTTCACATTTCTCC 3'
I11m	上游: F5'CTGCATTGCGAACTGTTG 3'
	下游: R5'GTTTGGGCTTGACAGAGGAATAC 3'
Igf1p5	上游: F5'CGCGGAGAACACTGCCACC 3'
	下游: R5'CGGCAGCTTCATCCATACTT 3'
Figf	上游: F5'GGTGCCGGTTGAAGCTTAAAAG 3'
	下游: R5'TTGAGATGTAGGAGGTGCTTCT 3'
β-actin	上游: F5'ACCCCGTCTGCTGACCGAG 3'
	下游: R5'TCCCGCCAGCCAGCTCCA 3'

## 2 结果

### 2.1 力学加载组与 MGF-Ct24E 处理组的基因表达谱

与对照组相比,在力学加载组的芯片分析中共发现了 1 866 个差异表达基因,其中上调 1 113 个,下调 753 个;MGF-Ct24E 处理组中共发现差异表达基因 1 178 个,其中上调基因 796 个,下调基因 382 个。根据 GO 功能分析原则,将这些差异基因分成了 3 大类:生物学过程 (biological process),细胞组分 (cellular component),分子功能 (molecular function)。以  $P < 0.01$ , FPR  $< 0.01$  作为筛选显著性差异表达的标准,得出力学加载组和 MGF-Ct24E 处理组的 GO 功能基因表达谱(见图 1)。从功能基因表达谱分析发现,力学加载组和 MGF-Ct24E 处理组的差异基因参与调控的 GO 类型有众多相同之处;两者的差异表达基因均参与了细胞增殖及细胞周期、骨发育和骨化的调节、细胞迁移、对应力刺激的响应、细胞外基质、肌动蛋白结合、酶结合等方面的调节(见表 2)。

表 2 力学加载组和 MGF-Ct24E 组的差异表达 GO 类型(与对照组相比)

Tab.2 Differentially expressed GO terms in mechanical loading group and MGF-Ct24E group (compared with the control group)

GO 编号	GO 术语	力学加载组			MGF-Ct24E 组		
		基因数	$P \times 10^6$	FPR $\times 10^4$	基因数	$P \times 10^8$	FPR $\times 10^4$
生物学过程							
GO:0000910	胞质分裂	14	10	4	12	400	1
GO:0007059	染色体分离	20	10	3	18	30	0.2
GO:0030278	骨化调节	23	20	6	18	2 000	4.3
GO:0009612	机械刺激响应	24	20	6	18	5 000	10
GO:0060348	骨发育	48	0.02	0.02	37	2	0.01
GO:0000278	有丝分裂细胞周期	36	2.5	0.9	34	0	0.000 6
GO:0001525	血管发生	44	0.3	0.2	33	60	0.2
GO:0001501	骨骼系统发育	69	0.05	0.04	56	0	0.000 6
GO:0016477	细胞迁移	73	20	5	64	0.2	0.002
GO:0042127	细胞增殖调控	121	0.6	0.3	107	0	0
细胞组分							
GO:0000777	染色体着丝点	13	30	4	13	20	0.06
GO:0005819	纺锤体	34	0.01	0.005	32	0	0
GO:0030016	肌原纤维	26	30	4	24	10	0.03
GO:0031012	细胞外基质	51	5	0.8	40	50	0.1
分子功能							
GO:0003779	肌动蛋白结合	48	2	2	39	6	0.06
GO:0019899	酶结合	98	0.02	0.04	76	0	0.001

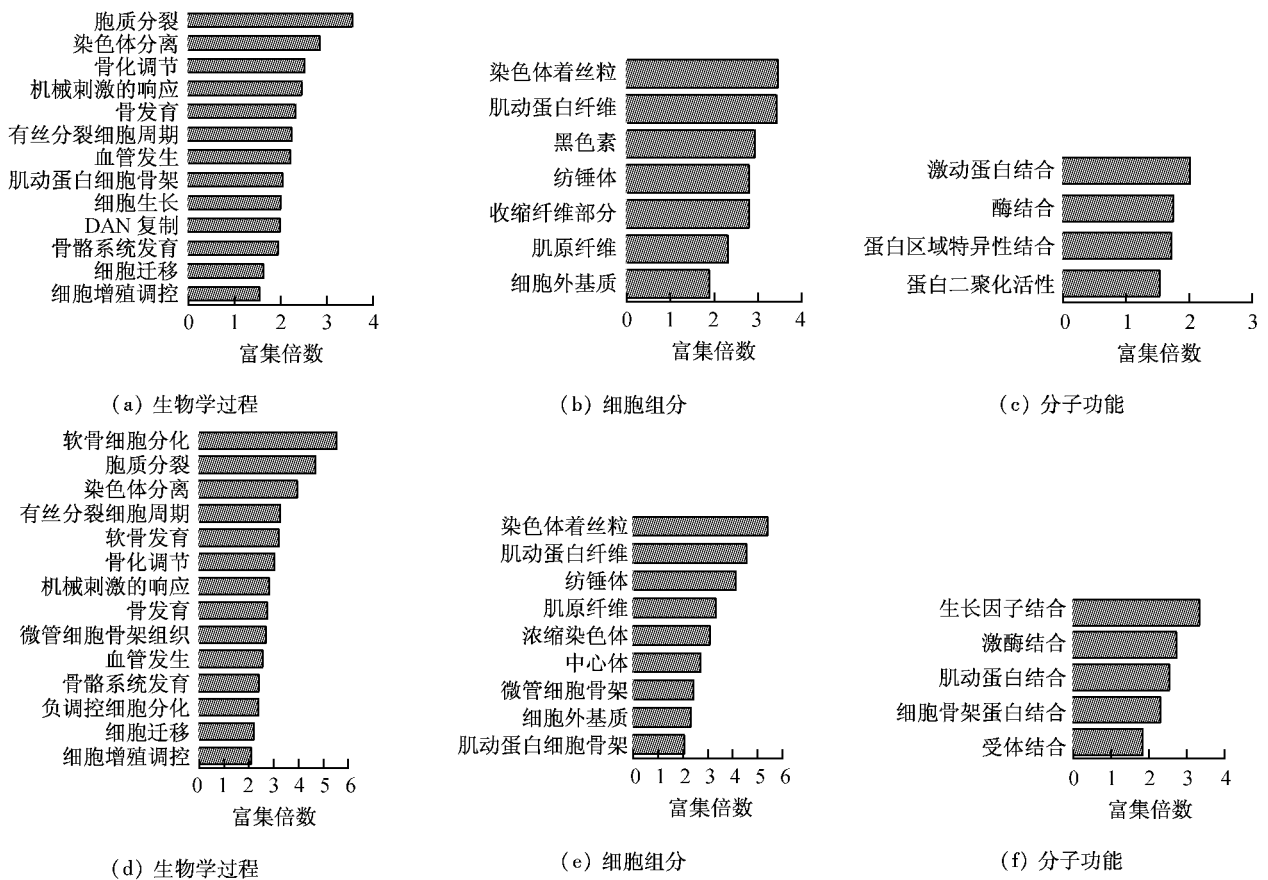


图1 力学加载组和 MGF-Ct24E 组中的 GO 类型的基因表达谱(与对照组相比) (a)~(c) 力学加载组的 GO 类型,(d)~(f) MGF-Ct24E 组的 GO 类型

Fig. 1 Gene expression profiles of GO term in mechanical loading group and MGF-Ct24E group (compared with the control group)

(a)~(c) GO terms in mechanical loading group, (d)~(f) GO terms in MGF-Ct24E group

## 2.2 力学加载组与 MGF-Ct24E 处理组中与细胞增殖、分化相关基因的差异表达

分析发现:MGF-Ct24E 处理组与力学加载组的差异表达基因在调控成骨细胞的增殖和分化方面具有很高的相似性(见表3),其差异基因表达的变化趋势也基本一致。在应力刺激和 MGF-Ct24E 作用下,成骨细胞中与细胞增殖及细胞周期相关的基因表达均上调。部分与细胞分化及细胞外基质相关基因表达则显著下调,如金属基质蛋白酶(Mmp9, Mmp13)、胶原蛋白(Col2a1, Col11a2)、软骨基质相关蛋白(Comp, Uema)等。

## 2.3 力学加载组与 MGF-Ct24E 处理组中与力学转导相关基因的差异表达

力学加载组和 MGF-Ct24E 组中与细胞对应力刺激响应相关的基因均发生了显著性差异表达,但

MGF-Ct24E 组中基因的差异表达倍数相对低于力学加载组(见表4)。应力刺激显著调控了 Wnt 信号通路和 TGF- $\beta$  信号通路的表达。MGF-Ct24E 组中 Wnt 信号通路同样发生显著性差异表达,但 TGF- $\beta$  信号通路未见显著性表达,仅部分相关基因发生差异表达。

## 2.4 qPCR 验证结果

根据基因的差异表达水平和其在骨形成中所发挥的不同功能挑选 Igfbp5、Fgfr2、I11m、Figf 等4个基因进行定量 PCR 分析以验证基因芯片检查结果。4个基因中,Figf 和 Fgfr2 的差异表达倍数和变化趋势与芯片结果完全一致,但两组实验中 qPCR 检测的 I11m 基因差异表达倍数均比芯片结果低,力学加载组的 Igfbp5 基因差异表达倍数也低于芯片结果。总体上4个基因的差异表达趋势和差异表达倍数与芯片结果基本一致,说明芯片实验结果可信。

表 3 与细胞增殖、分化相关基因的差异表达

Tab.3 Differentially expressed genes associated with cell proliferation and differentiation

基因序列号	基因名称	描述	差异表达倍数	
			力学加载组	MGF-Ct24E 组
细胞增殖调控				
NM_001033883	CXCL12	趋化因子配体 12	10.66	9.08
NM_001047843	RPA1	复制蛋白 A1	6.99	5.55
NM_031761	FIGF	c-fos 诱导的生长因子	13.679	13.15
NM_053683	NOX1	NADPH 氧化酶 1	9.689	7.78
NM_022194	Il1rn	白介素 1 受体拮抗剂	16.89	20.24
细胞分化调控				
NM_012712	FGFR2	成纤维细胞生长因子受体 2	-3.13	-2.98
NM_012943	DLX5	同源盒转录因子 5	-4.46	-2.45
NM_053554	PICALM	磷酸基醇结合网格蛋白装配蛋白	4.87	2.16
NM_021691	Twist2	twist 转录因子 2	3.37	4.90
NM_012588	IGFBP3	胰岛素样生长因子结合蛋白 3	-17.62	-6.10
AF139830	IGFBP5	胰岛素样生长因子结合蛋白 5	-10.64	-8.43
细胞周期				
NM_171991	Ccnb1	细胞周期蛋白 B1	4.38	3.72
XM_342494	Bub1b	细胞周期关卡蛋白激酶 Bub1 片段	3.41	3.07
NM_171993	Cdc20	细胞分裂周期 20 同源	3.30	3.75
NM_001024801	Zw10	ZW10, 着丝粒相关	3.20	3.71
细胞外基质				
NM_031055	Mmp9	金属基质蛋白酶 9	-4.64	-3.28
NM_133530	Mmp13	金属基质蛋白酶 13	-8.23	-3.37
NM_001106121	Ucma	生长板和软骨基质相关的上游区域	-11.34	-7.51
NM_212528	Col11a2	胶原, 类型 XI, $\alpha 2$	-13.52	-15.09
NM_012929	Col2a1	胶原, 类型 II, $\alpha 1$	-15.78	-15.63
NM_012834	Comp	软骨寡聚基质蛋白	-17.42	-17.86

注:“-”表示表达下调的基因, MGF-Ct24E 组中与细胞增殖分化相关的基因的差异表达趋势与力学加载组一致

### 3 讨论

大量研究表明,适当的应力刺激可以促进成骨细胞增殖,进而促进骨形成<sup>[4,10]</sup>。体外实验发现细胞受不同大小应力作用后,其增殖能力均增强,但以 12% 拉伸应变的促增殖作用最为显著<sup>[11]</sup>。目前较普遍的观点认为:体外研究中,机械力作用 8 h,成骨细胞的增殖活动最强<sup>[12]</sup>。本文的力学加载实验采用 12% 的应力刺激成骨细胞 8 h,分析应力对其基因表达谱的影响。细胞的生长过程中,其增殖和分化的调节是一个动态平衡的过程,当细胞增殖活性增强时,其分化活性受到抑制。应力刺激和 MGF-Ct24E 作用均能促进成骨细胞增殖,在基因水平上

则表现为与增殖相关的基因表达的上调,而与分化相关的基因表达则下调。本实验选用的 Agilent 大鼠全基因组表达谱芯片对力学加载组和 MGF-Ct24E 处理组的成骨细胞进行基因表达谱分析,结果显示应力刺激和 MGF-Ct24E 作用的两组细胞中,其差异基因表达谱极为类似,尤其是与骨代谢相关的基因差异表达结果基本一致。

对差异表达基因的分析,本文发现在应力刺激和 MGF-Ct24E 作用下,成骨细胞中与细胞周期 DNA 合成相关及与细胞增殖相关的基因表达显著上调,而与分化相关的细胞外基质基因表达则显著下调,进一步为两者对成骨细胞的增殖分化调控提供了佐证。实际上,原代培养的成骨细胞中含有部分的成

表 4 与力学转导相关基因的差异表达

Tab.4 Differentially expressed genes associated with mechanotransduction

基因序列号	基因名称	描述	差异表达倍数	
			力学加载组	MGF-Ct24E 组
机械刺激的响应				
NM_133530	Mmp13	金属基质蛋白酶 13	-8.23	-3.37
NM_001033883	CXCL12	趋化因子配体 12	10.66	9.08
NM_022190	ACAN	蛋白多糖	-3.77	-2.71
NM_031055	Mmp9	金属基质蛋白酶 9	-4.64	-3.28
Wnt 信号通路				
NM_024139	CHP	钙结合蛋白 p22	4.62	2.39
AF167308	SFRP1	分泌型卷曲相关蛋白 1	-7.06	-5.93
NM_001100700	SFRP2	分泌型卷曲相关蛋白 2	-2.31	-3.30
NM_053738	WIF1	Wnt 抑制因子 1	2.34	3.08
TGF- $\beta$ 信号通路				
NM_001013038	GDF6	生长分化因子 6	3.20	2.82
NM_001025718	MGC112830	转录因子类似	4.89	3.23
NM_031132	TGFBR2	转化生长因子, $\beta$ 受体 II	2.06	-
NM_001013062	THBS1	血小板 1	3.13	-

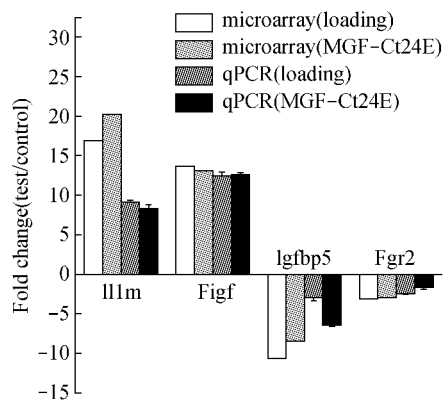


图 3 定量 PCR 结果

Fig.3 Results of quantitative PCR analysis

骨细胞前体, 软骨细胞和成骨细胞来自同一前体细胞。实验中应力刺激和 MGF-Ct24E 作用细胞后, 与软骨相关的细胞外基质 (Ucma, Comp, Col2a1 等) 表达均显著下调, 但研究较多的成骨分化的标志性基因 (Opg, Opn, Bsp 等) 未发生差异表达, 唯有成骨细胞早期分化标志碱性磷酸酶基因 (ALP) 表达显著下调。软骨相关基因的下调抑制细胞的软骨性分化, 促进成骨细胞的成骨作用, 而成骨分化的标志性基因未见差异表达可能是由于应力刺激和 MGF-Ct24E 作用后, 细胞处于增殖阶段, 此阶段大量表达与增殖和细胞周期相关基因, 差异表达结果中与成

骨细胞增殖及细胞周期相关基因 (Cxcl12, Cdc20, Ccnb1, Zw10 等) 表达显著上调证实了这一观点。Ucma 是一种软骨基质蛋白相关基因, 在软骨细胞分化中与 Col2a1 同时表达, 可作为一个软骨衍生的旁分泌因子调节骨细胞发育。重组的 Ucma 并不影响软骨特异基因的表达和软骨细胞的增殖, 但能抑制原代成骨细胞的成骨性分化<sup>[13]</sup>, 应力刺激使得其表达显著下调, 有利于成骨细胞的骨形成, 而在 MGF-Ct24E 作用的细胞中也发现了同样的结果。在骨骼系统发育中, Twist2 基因决定了成骨细胞分化的起始阶段, 成骨细胞分化仅在 Twist2 表达下调后发生<sup>[14]</sup>。因此, 本实验中成骨细胞分化基因表达的下调可能是由于 Twist2 基因的抑制作用产生, 应力和 MGF-Ct24E 的作用均显著上调了 Twist2 基因的表达, 从而使成骨细胞分化基因的表达受到抑制。

在机体发育过程中, 趋化因子可参与调节发育, 免疫功能, 创伤修复等多种生物学功能, 成骨细胞能产生多种趋化因子及其受体调控成骨和破骨细胞的免疫系统<sup>[15]</sup>。Lisignoli 等<sup>[16]</sup>的研究显示趋化因子 Cxcl12 可显著促进成骨细胞的增殖, 诱导 I 型胶原的表达。应力作用促进了 Cxcl12 基因的表达, 在 MGF-Ct24E 组中其表达同样上调, 但两组中均未发现 Col1 存在差异表达。大量的生长因子在调控骨

形成过程中同样具有重要的作用。IGFs (IGF-1, IGF-2) 和 IGFBPs 是成骨细胞中含量最为丰富的生长调节因子,对成骨细胞的功能有着重要的调节作用<sup>[17]</sup>。IGFBP-5 能与细胞外基质蛋白结合,刺激成骨细胞分化和碱性磷酸酶活性<sup>[18]</sup>,而 IGFBP-3 的过表达则增加了破骨细胞数量及骨吸收作用<sup>[19]</sup>。应力和 MGF-C124E 作用均使得 IGFBP-5 和 IGFBP-3 基因的表达显著下调,从而抑制成骨细胞的分化和破骨细胞形成,促进成骨细胞的增殖作用。

综上所述,应力刺激和力生长因子作用对成骨细胞基因表达方面有着诸多类似的调控效应,两者作用后的细胞基因表达谱也基本一致。MGF 在调控骨代谢相关基因方面所表现出的与应力刺激类似的效应,无疑是为骨修复过程中应力刺激不足的问题提供了一个新的解决方向。当然,MGF 究竟能否代替应力刺激促进骨修复的问题还需要进一步研究证明,本文仅从基因表达谱方面整体分析其基因表达效应,为后续的研究提供一个新思路。

#### 参考文献:

- [1] 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, Feng X, *et al.* Differential proteomic analysis on osteoblasts stimulated by mechanical strain [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(6): 406-411.
- [2] Kanno T, Takahashi T, Ariyoshi W, *et al.* Tensile mechanical strain up regulates Runx2 and osteogenic factor expression in human periosteal cells implications for distraction osteogenesis [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2005, 63(4): 499-504.
- [3] 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[J], 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(3): 326-332.
- [4] Tang LL, Xian CY, Wang YL. The MGF expression of osteoblasts in response to mechanical overload [J]. *Arch Oral Biol*, 2006, 51(12): 1080-1085.
- [5] Zhang BB, Xian CY, Luo YF, *et al.* Expression and sub-cellular localization of mechano growth factor in osteoblasts under mechanical stretch [J]. *Sci China Ser C-Life Sci*, 2009, 52(10): 928-934.
- [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[J]. 生物工程学报, 2008, 24(7): 1180-1185.
- [7] 张兵兵,王远亮,杨力,等. 力生长因子及其 E 肽对成骨细胞分化的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(3): 304-312.
- [8] Deng M, Zhang B, Wang K, *et al.* Mechano growth factor E peptide promotes osteoblasts proliferation and bone-defect healing in rabbits [J]. *Int Orthop*, 2011, 35(7): 1099-1106.
- [9] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2007: 67-68.
- [10] Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, *et al.* Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity [J]. *J Biomech*, 2002, 33(1): 45-51.
- [11] Yang YQ, Li XT, Rabie AB, *et al.* Human periodontal ligament cells express osteoblastic phenotypes under intermittent force loading *in vitro* [J]. *Front Biosci*, 2006, 11: 776-781.
- [12] 杨雁,钱玉芬. 机械牵张力对成骨细胞的影响[J]. 口腔颌面外科杂志, 2008, 18(2): 135-138.
- [13] Surmann-Schmitt C, Dietz U, Kireva T, *et al.* Ucnl, a novel secreted cartilage-specific protein with implications in osteogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(11): 7082-7093.
- [14] Bialek P, Kern B, Yang XL. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(3): 423-435.
- [15] Tonnarelli B, Manferdini C, Piacentini A, *et al.* Surface-dependent modulation of proliferation, bone matrix molecules, and inflammatory factors in human osteoblasts [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2009, 89(3): 687-696.
- [16] Lisignoli G, Toneguzzi S, Piacentini A. CXCL12 (SDF-1) and CXCL13 (BCA-1) chemokines significantly induce proliferation and collagen type I expression in osteoblasts from osteoarthritis patients [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 206(1): 78-85.
- [17] Govoni KE, Baylink DJ. The multi-functional role of insulin-like growth factor binding proteins in bone [J]. *Pediatr Nephrol*, 2005, 20(3): 261-268.
- [18] Mohan S, Baylink DJ. IGF binding proteins are multi-functional and act via IGF-dependent and IGF-independent mechanisms [J]. *J Endocrinol*, 2002, 175(1): 19-31.
- [19] Silha JV, Mishra S, Rosen CJ, *et al.* Perturbations in bone formation and resorption in insulin-like growth factor binding protein-3 transgenic mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(10): 1834-1841.