DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.008
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)13-1137-03

论著

p38及PI3K的激活在IGF-1促进MSCs成肌分化中的作用

王 劲,罗成基,郭朝华,冉新泽,徐 辉,粟永萍,程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胰岛素样生长因子-1(Insulin-like growth factor-1, IGF-1)体外对5-氮杂胞苷(5-Aza-CRcytidine, 5-Aza-CR)所诱导的骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)成肌分化的影响及p38和磷脂酰肌醇-3激酶(Phosphoinositide-3 kinases, PI3K)的激活在此过程中的作用。方法 以10 μmol/L 5-Aza-CR体外诱导MSCs成肌分化,加用1 nmol/L IGF-1作用,不同时相以逆转录聚合酶链反应(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)鉴定成肌素(Myogenin)的表达;免疫印迹(Western-blot)测定p38及PI3K的变化。结果 10 μmol/L 5-Aza-CR诱导后24 h,MSCS开始表达myogenin,加用IGF-1后,myogenin所表达的时相无改变,但至72 h后其表达量明显升高;磷酸化p38及磷酸化Akt在5-Aza-CR诱导后,其蛋白含量随时相增加而逐渐增强,加用IGF-1后,与作用前同时相比较,二者明显升高。结论 IGF-1体外可增强5-Aza-CR所诱导的成肌调节因子的表达,同时可增强与分化相关的信号转导。

关键词:间充质干细胞;5-氮杂胞苷;胰岛素样生长因子-1;p38;磷脂酰肌醇-3激酶
中图法分类号:R329.2;R347;R394.3 文献标识码:A

Effect of activated p38 and PI3K on myogenic differentiation of MSCs promoted by IGF-1 *in vitro*

WANG Jin, LUO Cheng-ji, GUO Chao-hua, RAN Xin-ze, XU Hui, SU Yong-ping, CHENG Tian-min (Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on the myogenic differentiation of cultured mesenchymal stem cells (MSCs) by 5-azacytidine (5-Aza-CR) and the activation of p38 and phosphoinositide-3 kinases (PI3K) in this course *in vitro*. Methods Mesenchymal stem cells were induced to differentiate into myoblasts with 5-Aza-CR. After adding insulin-like growth factor-1, the changes of myogenin expression were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method and proteins of phosphorylated p38 and PI3K at different time points by Western blot method. Results MSCs began to express myogenin at 24 h after being induced by 10 μmol/L 5-Aza-CR. No change of time points was found, but the expression increased at 72 h after the treatment of IGF-1. After phosphorylated p38 and PI3K were induced by 5-Aza-CR, their protein levels enhanced in a time-dependent manner and increased markedly after the treatment of IGF-1. Conclusion IGF-1 can increase the expression of myogenic regulator factors induced by 5-Aza-CR as well as the signal transduction related to the myogenic differentiation *in vitro*.

Key words: mesenchymal stem cells; 5-Aza-CR; insulin-like growth factor-1; p38; phosphoinositide-3 kinases

自Freidenstein等[1]发现成体骨髓中存在间充质干细胞的近20余年以来,其相关研究已证实其具有向成骨细胞、成脂细胞、成肌细胞、成软骨细胞及神经细胞在内的多种细胞的分化潜能,目前认为MSCs可能是能替代胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ES)的最理想的成体干细胞[2]。1995年,Wakitan等[3]首次利用5-Aza-CR体外诱导MSCs分化为肌细胞,之后相继实验都证实,MSCs移植可向骨骼肌及心肌细胞分化[4]。在正常肌细胞的成熟过程的研究中发现,IGF-1具有促进成肌细胞(Myoblast)成熟、分化的功能,但在MSCs向成肌细胞分化的过程中,IGF-1的作用及机制尚不明确。本实验通过信号转导的研究,着重探讨IGF-1在MSCs成肌分化中的作用及与相关信号转导通路之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

BALB/c纯系小鼠(本校实验动物中心提供),2~4周龄;IMDM培养基、新鲜特等优质胎牛血清(FBS)、马血清(HS)(Hyclone公司);5-Aza-CR(Sigma公司);磷酸化Akt(p-Akt)、磷酸化

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205)
作者简介:王 劲(1968-),男,四川省内江市人,博士,主治医师,讲师,主要从事临床血液病诊治和干细胞分化调控及信号转导方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68752355
收稿日期:2002-12-16;修回日期:2003-02-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

p38(p-p38)单克隆抗体(New England Biolabs); RT-PCR 试剂盒(Takara)。myogenin 引物序列:上游:5′-AGGAGAGAAAGATGGAGTCCAGAG-3′,下游:5′-TAACAAAAGAA GTCACCCCA AGAG-3′,引物预计为430 bp;内参照β-actin 引物序列,上游:5′-TAAA GACCTCTATGC CAACACAGT-3′,下游:5′-CACGATGGAGGGGCCGG ACTCATC-3′,引物扩增片段250 bp;M-Per™(Mammalian protein extraction reagent,哺乳动物蛋白提取液)(Pierce 公司);IGF-1(Gibco)。

1.2 MSCs 的体外分离培养及扩增

根据本所实验方法进行[5],其中完全培养基含 IMDM、10% FBS 及青、链霉素各 100 U/ml,培养条件为 5%CO_2、37 ℃及完全饱和湿度;24 h 后首次换液,去除非贴壁细胞,以后 3~4 d 换液,14 d 左右细胞融合,传代。

1.3 IGF-1 对MSCs 成肌分化的影响

参照文献[3]方案,正常组在 MSCs 传至第二代后,去除完全培养基,加入诱导培养基,含 IMDM、5% HS、5% FBS、10 μmol/L 5-Aza-CR 及青、链霉素各 100 U/ml 行诱导实验,作用 24 h 后去除诱导培养基,PBS 洗涤 2 次后改用完全培养基及继续培养。IGF-1 作用组除加用 IGF-1 1 nmol/L 外,余成分同正常组。

1.4 RT-PCR

在 5-Aza-CR 诱导 MSCs 后 0、9、12、24、48、72 h 提取 RNA,测定浓度,以 RT-PCR 一步法检测 myogenin 表达。程序 50 ℃,30 min;94 ℃,2 min;94 ℃,1 min;54 ℃,1 5 min;72 ℃,3 min;72 ℃,7 min;共 34 循环。PCR 产物在 2%的琼脂糖凝胶上电泳,紫外透射仪下观察,以凝胶成像分析系统扫描,测定电泳带的光密度值(*A* 值),以 myogenin 的 *A* 值与β-actin 的 *A* 值的比值作为 myogenin 的 mRNA 相对表达水平,以 *A* 值×面积(Int×mm^2)表示。

1.5 Western-blot

在 5-Aza-CR 诱导 MSCs 后 0、3、6、9、12、24 h 及 48 h 收集细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 M-Per™ 40 μl,冰浴裂解 15 min,4 ℃,12 000× *g* 离心 20 min,收集上清液,Bradford 法测定蛋白含量。每个样本取 50 μg 蛋白,SDS-PAGE 电泳后,PVDF 膜转印 4 h,以 5%脱脂奶粉 4 ℃封闭过夜,行 Western 免疫印迹。二抗为山羊抗兔(1∶800),三抗为辣根过氧化物标记的生物素化抗体(1∶500),采用硫酸镍铵增强的 DAB 显色法显色;凝胶成像系统上扫描分析,蛋白含量以条带的 *A* 值×面积(Int×mm^2)表示,实验重复 2 次。

1.6 统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 IGF-1 对myogenin 表达的影响

RT-PCR 结果显示,10 μmol/L 5-Aza-CR 诱导后 24 h,MSCS 开始表达 myogenin;加用 1 nmol/L IGF-1 作用后,其开始表达 myogenin 的时相与作用前无改变,但其表达量在 72 h 明显高于作用前,见图 1、2。

2.2 IGF-1 对 p38、PI3K 信号转导通路的作用

2.2.1 IGF-1 对 p38 信号转导的影响 Western-blot 结果显示,10 μmol/L 5-Aza-CR 诱导后,磷酸化 p38 随时相而逐渐增强,加用 1 nmol/L IGF-1 作用后,磷酸化 p38 与作用前同时相比较明显增强,见图 3、4。

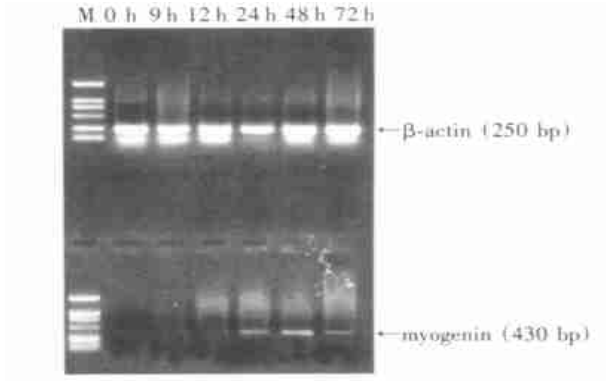


图 1 10 μmol/L 5-Aza-CR 诱导后 myogenin 在 MSCs 中的表达

Fig 1 Expression of myogenin in MSCs after the induction of 10 μmol/L 5-Aza-CR

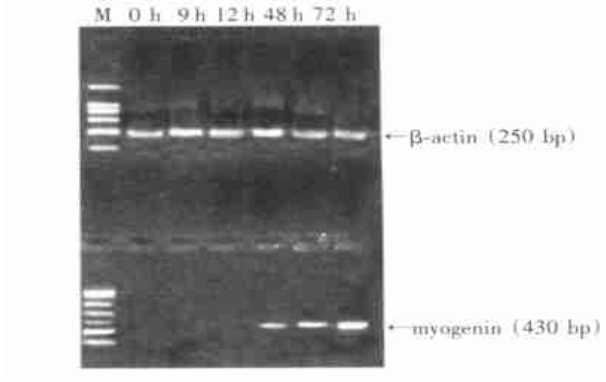


图 2 10 μmol/L 5-Aza-CR 及 1 nmol/L IGF-1 作用后 myogenin 在 MSCs 中的表达

Fig 2 Expression of myogenin in MSCs after the action of 10 μmol/L 5-Aza-CR and 1 nmol/L IGF-1

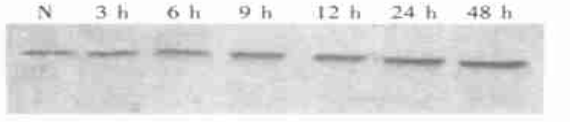


图 3 10 μmol/L 5-Aza-CR 诱导后不同时相磷酸化 p38 的变化

Fig 3 Changes of p-p38 at different time points after the induction of 10 μmo/L 5-Aza-CR

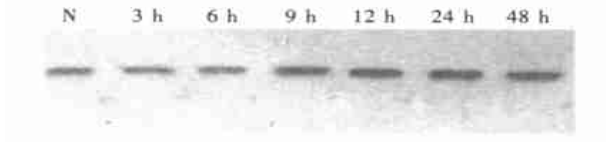


图 4 10 μmol/L 5-Aza-CR 及 1 nmol/L IGF-1 作用后不同时相磷酸化 p38 的变化

Fig 4 Changes of p-p38 at different time points after the action of 10 μmo/L 5-Aza-CR and 1 nmol/L IGF-1

2.2.2 IGF-I 对 PI3K 信号转导通路的影响 Western-blot 结果显示,10 μmol/L 5-Aza-CR 诱导作用后,磷酸化 Akt 随时相而逐渐增强;加用 1 nmol/L IGF-1 作用后磷酸化 Akt 与作用前同时相比较明显增强,见图 5、6。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

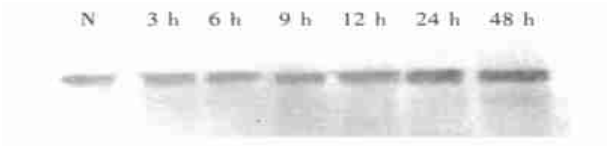


图 5　10 μmol/L 5-Aza-CR 诱导后不同时相磷酸化 Akt 的变化

Fig 5　Changes of p-Akt at different time points after the induction of 10 μmol/L 5-Aza-CR

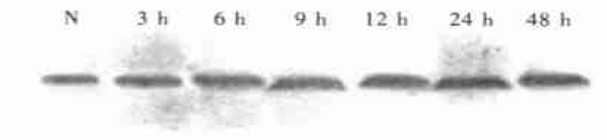


图 6　10 μmol/L 5-Aza-CR 及 1 nmol/L IGF-1 作用后不同时相磷酸化 Akt 的变化

Fig 6　Changes of p-Akt at different time points after the action of 10 μmo/L 5-Aza-CR and 1 nmol/L IGF

3　讨论

多种创伤后常伴发肌组织损伤, 其修复依赖于体内的肌卫星细胞(Satellite cells, SC), 但它仅占肌细胞数量的 3%～6%, 因此许多严重肌损伤的修复十分困难, 创面常被成纤维细胞等结缔组织所替代而成为瘢痕组织[6]。合理利用细胞工程解决难愈肌损伤修复是创伤医学研究的重课题。SC 分化成熟为正常肌细胞是由成肌调节因子(Myogenic regulator factors, MRFs)所调控的一个多步骤的过程(Multi-step process), MRFs 主要由 Myf5/MyoD、myogenin 及 MRF4 四个基因组成, 其中 Myf5/MyoD 为初级分化调控基因, myogenin 和 MRF4 为次级分化调控基因[7]。我们研究发现, 在 MSCs 向成肌细胞分化的过程中, 亦顺序表达上述基因, 与 SC 的成肌分化的调控程序一致。多种生长因子可促进成肌细胞的增殖, 但对其分化起着抑制作用, 而过度的增殖的结果是导致肌肥大症, 目前仅确定 IGF-1 在胚胎及成体中的正常肌细胞的分化成熟中有着重要作用[8]。因此, 研究 IGF-1 在 MSCs 成肌细胞分化中的作用的相关机制对更为合理、有效地利用 MSCs 促进肌损伤修复有着重要意义。

有关 MSCs 分化过程中的信号转导通路的研究尚不多见, Jaiswal 等[9] 发现, p38 可促进 MSCs 向成骨细胞分化, 如果抑制该通路可使 MSCs 向成骨分化受抑而改向成脂细胞分化。成肌转录因子所调控的肌细胞的分化成熟需要与信号转导通路之间的相互作用来完成, 成肌细胞的分化与 MAPK、PKC、PI3K 等多种信号通路有关[10], 但有关 MSCs 向成肌分化的信号转导机制未见报道。

在我们已完成的研究中发现, 5-Aza-CR 可诱导 MSCs 表达 MRFs, 从而使其定向成肌分化[11]。本研究证实, IGF-1 体外作用后, 对 5-Aza-CR 诱导 MSCs 表达的 MRFs 中的 myogenin 基因表达时相并无明显影响, 即 IGF-1 本身似并无诱导 MSCs 向成肌细胞分化的作用。p38 是丝裂素活化蛋白激酶(Mitogen activated protein kinase, MAPK)中的一条重要信号转导通路, PI3K 是一种重要的细胞调控蛋白, 具有脂酶及蛋白酶的双重活性, 二者在细胞分化、生长的多方面都有作用。由于 PI3K 的催化作用是在磷脂酰肌醇(Phosphatidylinositol, PtdIns)的磷酸化产物与磷酸化 Akt 形成复合物后所激活, 因此目前对其活性的研究以磷酸化 Akt 的活性所反应[12]。实验显示, 5-Aza-CR 诱导 MSCs 向成肌分化过程中, 磷酸化 p38 及磷酸化 Akt 的活性均逐渐增高, 提示二者在分化中具有正向调控作用; 加用 IGF-1 后作用明显增强, 因此, IGF-1 在促进 MSCs 的成肌分化中, 具有显著增强效果, 能促进相关调控基因的表达增强, 从而促进分化, 在此过程中, p38 及 PI3K 两条信号转导通路增强分化进程中的相关基因表达及调控是一重要因素。本研究为 MSCs 用于体内移植时加用相关生长因子以促进肌损伤修复打下了理论基础。

参考文献:

[1] Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradicated mouse hematopoietic organs[J]. Exp Hematol, 1976, 4(5): 267－274.

[2] Minguell J J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells[J]. Exp Biol Med, 2001, 226(6): 507－520.

[3] Wakitani S, Saito T, Caplan A I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-aza cytidine[J]. Muscle Nerve, 1995, 18(12): 1417－1426.

[4] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering[J]. Artif Organs, 2001, 25(3): 187－193.

[5] 周进明, 邹仲敏, 郭朝华, 等. 小鼠骨髓间充质干细胞的生物学特点及分化潜能鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2002, 20(1): 58－61.

[6] Hawke T J, Garry D J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology[J]. J Appl Physiol, 2001, 91(2): 534－551.

[7] Perry R L, Rudnick M A. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation[J]. Front Biosci, 2000, 1(5): 750－767.

[8] Engert J C, Berglund E R, Rosenthal N. Proliferation precedes differentiation in IGF-Ⅰ-stimulated myogenesis[J]. J Cell Biol, 1996, 135(2): 431－440.

[9] Jaiswal R K, Jaiswal N, Bruder S P, *et al*. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase[J]. J Biol Chem, 2000, 275(13): 9645－9652.

[10] 王　劲, 郭朝华, 罗成基. 成肌细胞增殖/分化的信号转导研究[J]. 生命的化学, 2002, 22(1): 18－20.

[11] 王　劲, 郭朝华, 李　军, 等. 5-Aza-CR 诱导间充质干细胞成肌分化的实验研究[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19(4): 207－211.

[12] Krasilnikov M A. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation[J]. Biochemistry, 2000, 65(1): 59－67.

（编辑　薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net