

文章编号:1004-7220(2016)03-0227-08

# 力生长因子 E 肽对前交叉韧带成纤维 细胞活力、迁移与侵袭的影响

沙永强<sup>a,b</sup>, 吕永钢<sup>a,b</sup>

(重庆大学 生物工程学院 a. 国家“111 计划”基地, b. 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044)

**摘要:** **目的** 研究力生长因子(mechano-growth factor, MGF)E 肽对前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)成纤维细胞活力、迁移与侵袭的影响。**方法** 以 ACL 成纤维细胞为研究对象:(1)经不同浓度(0、10 和 100  $\mu\text{g/L}$ ) MGF E 肽处理细胞 24 h 后,去除培养基,换成 1% 血清浓度 DMEM 低糖培养基培养 6 和 30 h 后,检测细胞活力、DNA 含量、细胞凋亡、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)活性变化及 I 型胶原(COL I)、III 型胶原(COL III)mRNA 表达;(2)使用不同浓度(0.5、10、20、50 和 100  $\mu\text{g/L}$ ) MGF E 肽处理 ACL 成纤维细胞 48 h 后,检测细胞活力与 MMP-2 活性,并利用划痕实验与 Transwell 实验分别检测细胞迁移与侵袭能力。**结果** (1)6 h 时,10  $\mu\text{g/L}$  浓度 MGF E 肽显著促进 MMP-2、MMP-9 活性,对细胞活力、增殖、凋亡及 COL I、COL III mRNA 表达无影响。100  $\mu\text{g/L}$  浓度 MGF E 肽显著促进 MMP-2、MMP-9 活性,并提高了 COL I、COL III mRNA 表达,但对细胞活力、增殖、凋亡无影响。30 h 时,10  $\mu\text{g/L}$  浓度 MGF E 肽显著促进 MMP-9 活性及 COL I、COL III mRNA 表达,对细胞活力、增殖、MMP-2 活性及细胞凋亡无影响。100  $\mu\text{g/L}$  浓度 MGF E 肽显著促进 MMP-9 活性及 COL III mRNA 表达,但对细胞活力、增殖、MMP-2 活性、细胞凋亡、COL I mRNA 表达无显著性调控作用。(2)MGF E 肽显著促进 ACL 成纤维细胞的迁移与侵袭,且呈一定程度浓度依赖性;迁移与侵袭过程可能依赖于 MMP-2 活性。**结论** MGF E 肽能够促进 ACL 成纤维细胞胞外基质的合成与降解,进一步提高了细胞的迁移与侵袭,有助于组织损伤修复过程中成纤维细胞向损伤部位迁移,对 ACL 组织修复再生与术后康复具有积极的调控作用。

**关键词:** 力生长因子; 细胞活力; 细胞迁移; 细胞侵袭; 前交叉韧带

**中图分类号:** R318.01 **文献标志码:** A

**DOI:** 10.3871/j.1004-7220.2016.03.227

## Effects of MGF E peptide on cell viability, migration and invasion of ACL fibroblasts

SHA Yong-qiang<sup>a,b</sup>, LV Yong-gang<sup>a,b</sup> (a. '111' Project Laboratory of Biomechanics and Tissue Repair, b. Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

**Abstract: Objective** To explore the effects of mechano-growth factor (MGF) E peptide on cell viability, migration and invasion of anterior cruciate ligament (ACL) fibroblasts. **Methods** ACL fibroblasts were used in this study and (1) were treated with MGF E peptide (0, 10 and 100  $\mu\text{g/L}$ ) for 24 h. Then, the medium was changed by 1% fetal bovine serum (FBS)-low glucose DMEM medium. Cell activity, DNA content, cell apoptosis, matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and MMP-9 activity, type I collagen (COL I) and type III collagen (COL III) mRNA expression were measured after continued culture for 6 and 30 h; (2) were treated with MGF E peptide (0, 5, 10, 20, 50 and 100  $\mu\text{g/L}$ ) for 48 h. Then, cell activity and MMP-2 activity were verified. Cell migration and

收稿日期:2016-01-20; 修回日期:2016-03-06

基金项目:国家自然科学基金项目(11172338), 中央高校基本科研业务费(106112016CDJXY23001)。

通信作者:吕永钢,教授,Tel:(023)65102507; E-mail: yglv@cqu.edu.cn。

invasion of ACL fibroblasts were further tested by cell scratch test and transwell assay, respectively. **Results** (1) At 6 h, 10  $\mu\text{g/L}$  MGF E peptide significantly promoted MMP-2 and MMP-9 activities, but had no effect on cell viability, proliferation, apoptosis and mRNA expression of COL I and COL III. 100  $\mu\text{g/L}$  MGF E peptide also significantly promoted MMP-2 and MMP-9 activities, as well as mRNA expression of COL I and COL III. However, it had no effect on the cell viability, proliferation and apoptosis. At 30 h, 10  $\mu\text{g/L}$  MGF E peptide significantly promoted MMP-9 activity and mRNA expression of COL I and COL II, but had no effect on cell viability, proliferation, MMP-2 activity and apoptosis. 100  $\mu\text{g/L}$  MGF E peptide also significantly promoted MMP-9 activity and mRNA expression of COL III, but had no effect on the cell viability, proliferation, MMP-2 activity, cell apoptosis and mRNA expression of type I collagen. (2) MGF E peptide significantly promoted migration and invasion of ACL fibroblasts with dose-dependent manner in a certain degree, which might depend on the increase of MMP-2 activity. **Conclusions** MGF E peptide can actively accelerate synthesis and degradation of the extracellular matrix, further promote migration and invasion of ACL fibroblasts, help ACL fibroblasts to move to the injurious site during repair process, which plays an important role in ACL tissue repair, regeneration and recovery after surgery.

**Key words:** Mechano-growth factor (MGF); Cell viability; Cell migration; Cell invasion; Anterior cruciate ligament (ACL)

前交叉韧带 (anterior cruciate ligament, ACL) 是调控膝关节稳定性的重要组织结构,能够避免胫骨过度前移或股骨过度后移<sup>[1]</sup>。ACL 损伤几率日益增高,尤其常见于活跃的年轻舞蹈工作者<sup>[2]</sup>、足球运动员<sup>[3]</sup>等职业,且往往会引起继发性的疾病,如软骨退化<sup>[4]</sup>、半月板损伤<sup>[5]</sup>等。与关节外组织不同,受关节内微环境及血供不足、生长因子响应不足、增殖与迁移能力过低等影响<sup>[6-7]</sup>,ACL 撕裂损伤后自我修复与再生困难。目前的临床手术修复手段主要是利用移植物进行 ACL 重建,主要包括髌韧带、腓腱、异体移植组织及合成材料等<sup>[8]</sup>。无论是何种移植材料以及单、双束 ACL 重建方法,都不能完全地维持 ACL 撕裂修复后长期的功能。此外,ACL 撕裂修复手术都不可避免地具有高诱发骨关节炎及二次损伤的风险<sup>[9]</sup>。临床亟需寻求一种有效的修复手段,以进一步帮助修复 ACL 撕裂,降低术后继发性风险。

现阶段,生长因子常被用以韧带与肌腱修复研究,包括血小板源生长因子、转化生长因子  $\beta$  及血管内皮生长因子等<sup>[10]</sup>。力生长因子 (mechano-growth factor, MGF) 是由 igf-1 基因的剪接变体编码合成,在组织或细胞受到应力刺激、低氧应激或其他生理生化刺激时会出现高表达现象<sup>[11]</sup>,但半衰期较短<sup>[12]</sup>。功能性研究显示,MGF 能够促进局部组织修复<sup>[12]</sup>,加速干细胞迁移<sup>[13]</sup>与分化<sup>[14]</sup>,并且对肌腱成纤维细胞胶原酶活性、侵袭等具有良好的促进作用<sup>[15]</sup>。其 C 端 E 肽 (MGF E 肽) 往往被认为是重要

的功能结构域<sup>[16]</sup>,常用以替代 MGF 进行相关的功能性验证。但 MGF E 肽是否能够调控 ACL 成纤维细胞迁移、侵袭以及是否促进 ACL 损伤修复仍未可知,同时 MGF E 肽的有效作用时间未见有详细报道。基于此,本文对以下两点进行验证:① MGF E 肽能够有效调控 ACL 成纤维细胞活力,促进 ACL 成纤维细胞增殖、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinases-2, MMP-2)、MMP-9 活性与 I 型胶原 (COL I)、III 型胶原 (COL III) mRNA 合成等,并对其有效作用时间进行初步验证;② MGF E 肽能够促进 ACL 成纤维细胞的迁移与侵袭,并进行相关检测,为 MGF E 肽临床应用于 ACL 损伤修复提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 ACL 成纤维细胞的获取与培养

ACL 成纤维细胞由重庆大学生物工程学院国际合作实验室提供,组织供体为重庆医科大学第一附属医院 4 位接受截肢手术的患者 (年龄 23 ~ 56 岁),均无任何疾病。在手术之前,所有患者签署同意书。后期相关操作完全按照重庆大学及重庆医科大学伦理准则及标准进行。不同来源的 ACL 成纤维细胞分别培养、操作,实验过程中无交叉污染,且所有实验以第 3 ~ 5 代细胞进行。

### 1.2 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞活力、明胶酶活性及胶原合成的影响

#### 1.2.1 ACL 成纤维细胞处理 将 ACL 成纤维细胞

消化收集后,用 10% 血清浓度 DMEM 低糖培养基(下文实验中均使用此培养基)稀释至适宜密度:  
 ① 以  $1 \times 10^4/\text{cm}^2$  密度种于 96 孔板中,并补加 10% 血清浓度培养基至 200  $\mu\text{L}$ ,24 h 后换成 200  $\mu\text{L}$  2% 血清浓度培养基,饥饿 12 h,然后去除培养基,加入 200  $\mu\text{L}$  含不同浓度(0、10 和 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) MGF E 肽的 1% 血清浓度培养基,每个 MGF E 肽浓度设 4 个平行孔,持续处理 24 h,最后去除培养基,用无菌 PBS 清洗 3 次,再次加入 1% 血清浓度培养基培养 6 与 30 h 后,用于检测细胞活力;  
 ② 将 ACL 成纤维细胞以  $1 \times 10^4/\text{cm}^2$  密度种于 6 孔板中,并补加 10% 血清浓度培养基至 2 mL,24 h 后换成 2 mL 2% 血清浓度培养基,饥饿 12 h,然后去除培养基,加入 2 mL 含不同浓度(0、10 和 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) MGF E 肽的 1% 血清浓度培养基,再培养 6 与 30 h 后,用于检测细胞增殖、凋亡、MMP-2 与 MMP-9 活性、COL I 和 COL III mRNA 表达。所有实验重复 4 次,以无 MGF E 肽处理组为对照组进行分析。

**1.2.2 细胞活力与 DNA 含量** 分别利用 MTS 分析与 DNA 含量分析检测 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞活力与增殖能力的影响。MTS 分析:6 和 30 h 时,去除 96 孔板中培养基,添加 100  $\mu\text{L}$  1% 血清浓度培养液,然后分别加入 20  $\mu\text{L}$  MTS [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium] 反应液。将孔板置于 37  $^{\circ}\text{C}$  及 5%  $\text{CO}_2$  孵箱中避光孵育 2 h 后,使用 Bio-Rad 酶标仪在 490 nm 处进行吸光度值检测。DNA 含量分析:通过 DNA 结合荧光染料 Hoechst 33258 进行 DNA 定量检测。各样品经胰酶消化后,均取  $10^5$  个细胞并提取 DNA。然后,在平底 96 孔板内加入 90  $\mu\text{L}$  TNE(10 mmol/L Tris, 2 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4),并在各孔加入 10  $\mu\text{L}$  DNA 样品。最后,各孔加入 100  $\mu\text{L}$  Hoechst 33258 染液(20 mg/L),避光孵育 5 min 后使用多功能酶标仪进行检测。

**1.2.3 MMP-2、MMP-9 活性** 在 6 和 30 h 时分别提取 200  $\mu\text{L}$  上清液用以检测 MMP-2 与 MMP-9 活性。首先,所有蛋白样品进行蛋白浓度测定,并分别吸取相同总蛋白量样品进行明胶酶谱电泳。电泳结束后,常温下用 2.5% Triton-X-100 清洗胶 3 次,每次 20 min,然后加入蛋白水解液(50 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ,

0.5 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, pH 7.8)并置于 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下轻微摇晃孵育 15 h。接着常温下用 2.5% Triton-X-100 清洗 20 min 后用考马斯亮蓝(45% 甲醇,45%  $\text{H}_2\text{O}$ ,10% 冰醋酸,2.5 g/L 考马斯亮蓝 R-250)染色 1 h,染色过程置于摇床上缓慢摇动。染色结束后加入脱色液(40% 甲醇,7.5% 冰醋酸,52.5%  $\text{H}_2\text{O}$ )脱色至条带清晰。实验结束后用 Bio-Rad GS-800 进行条带扫描。

**1.2.4 细胞凋亡** 通过 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)双染细胞流式分析与 Hoechst 33258 染色分析进行细胞凋亡检测。细胞流式分析检测时,细胞收集后用预冷 PBS 清洗两次并分别 300  $g \times 5$  min 离心。去除上清液后加入 195  $\mu\text{L}$  结合缓冲液,进行细胞重悬,然后加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 并静置 3 min,再加入 10  $\mu\text{L}$  PI 后避光孵育 10 min。最后,各样品中分别加入 300  $\mu\text{L}$  结合缓冲液,混匀后进行检测分析。Hoechst 33258 染色分析时,去除培养液并用预冷 PBS 清洗 1 次,各样品中加入 1 mL 4% 多聚甲醛于室温条件下固定 30 min。然后用预冷 PBS 清洗 3 次  $\times 5$  min,接着加入 1 mL Hoechst 33258 (5 mg/L)于室温下避光染色 15 min。最后去除染色液并用 PBS 清洗 3 次  $\times 5$  min,使用荧光显微镜进行拍照分析。

**1.2.5 COL I、COL III mRNA 表达** 利用实时荧光定量分析进行 COL I、COL III mRNA 表达检测。6 和 30 h 后,收集各样品并提取 RNA 后使用分光光度计将样品在 260 nm 处进行浓度检测并进行 cDNA 反转录。实时定量实验使用 Bio-Rad CFX 实时 PCR 系统进行检测分析,GAPDH 以及 COL I、COL III 引物序列如表 1 所示,GAPDH 作为内参进行数据分析。

表 1 RT-PCR 实验中所用引物序列

Tab.1 Primer sequences used for real-time PCR

基因	产物大小/bp	引物序列
COL I	143	前:5'-CTGGAAGAGTGGAGACTACTG-3'
		后:5'-TGCTGATGTACCAGTCTCTCTG-3'
COL III	236	前:5'-CAGTGGACCTCCTGGCAAAGA-3'
		后:5'-TCATCTCCATAATACGGGGCA-3'
GAPDH	218	前:5'-GGATTTGCTCGTATTGGG-3'
		后:5'-GCTCCTGGAAGATGCTGAT-3'

### 1.3 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞迁移与侵袭的影响

**1.3.1 细胞划痕实验与 MMP-2 活性** 以  $1 \times 10^4/\text{cm}^2$  密度将 ACL 成纤维细胞种于 6 孔板中,待其生长至 80% ~ 90% 融合度时,使用蓝色枪头沿直线刮 ACL 成纤维细胞,建立一个长宽约为  $10 \text{ mm} \times 1.4 \text{ mm}$  的线性创伤模型。随后,使用无菌 PBS 清洗,直至无明显悬浮细胞存在。去除 PBS 后,加入 2 mL 1% 血清浓度 DMEM 低糖培养基并于各孔添加不同浓度(0、5、10、20、50 和  $100 \mu\text{g/L}$ ) MGF E 肽处理,分别培养 0 和 48 h 后进行拍照,分析创伤修复效率,同时提取 200  $\mu\text{L}$  上清液进行 MMP-2 活性检测。

**1.3.2 细胞侵袭** 使用 Transwell 小室进行 ACL 成纤维细胞侵袭分析,其聚碳酸脂膜的孔径为  $8 \mu\text{m}$ ,实验之前 Transwell 小室中加入基质胶(Matrigel),并置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  及 5%  $\text{CO}_2$  孵箱中 4 h 至凝固成胶,随后加入 50  $\mu\text{L}$  无血清培养基静置 15 min。然后,各小室内加入 150  $\mu\text{L}$  无血清培养基(含  $6 \times 10^4$  个细胞),并放置于提前加入 600  $\mu\text{L}$  含 10% 血清浓度培养基的 24 孔板内。小室内分别加入不同浓度(0、5、10、20、50 和  $100 \mu\text{g/L}$ ) MGF E 肽,将孔板置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  及 5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养 48 h。此时取出 Transwell 小室并轻轻擦拭去除小室内部未侵袭的细胞。最后,小室下层侵袭的细胞进行结晶紫染色、拍照,进行细胞侵袭分析。

**1.3.3 细胞活力** 将 ACL 成纤维细胞以  $1 \times 10^4/\text{cm}^2$  密度种于 96 孔板内,分别加入不同浓度(0、5、10、20、50 和  $100 \mu\text{g/L}$ ) MGF E 肽,每个 MGF E 肽浓度设 4 个平行孔,置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  及 5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养 48 h 后进行 MTS 分析。

#### 1.4 统计学分析

所有数据以均数  $\pm$  标准差形式进行表示。以单因素方差分析(ANOVA)进行统计学分析,检验各组之间是否存在差异。 $P < 0.05$  时认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞增殖能力的影响

ACL 成纤维细胞在其损伤后的快速增殖对于损伤修复至关重要。通过检测细胞活力及 DNA 含

量进行细胞增殖分析发现,MGF E 肽处理 ACL 成纤维细胞后,6 和 30 h 时细胞活力无明显变化[见图 1 (a)、(b)]。细胞 DNA 含量变化能够更加直接地显示细胞增殖过程。应用 Hoechst 33258 荧光染料进行细胞 DNA 含量分析。结果显示,MGF E 肽处理后,ACL 成纤维细胞 DNA 含量在 6 和 30 h 未发生显著性变化[见图 1 (c)、(d)]。该结果与 MTS 结果相似,提示 MGF E 肽对于 ACL 成纤维细胞的增殖无明显影响。

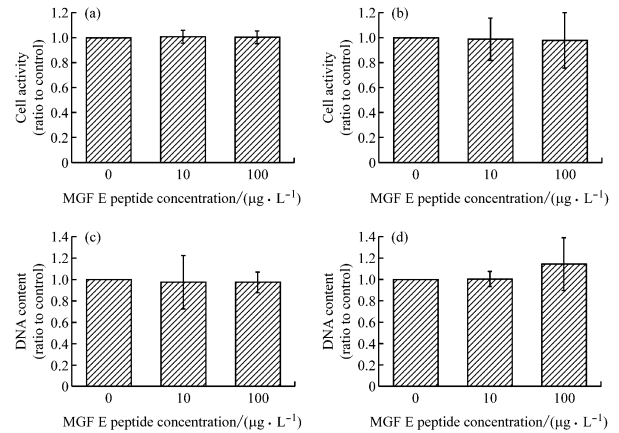


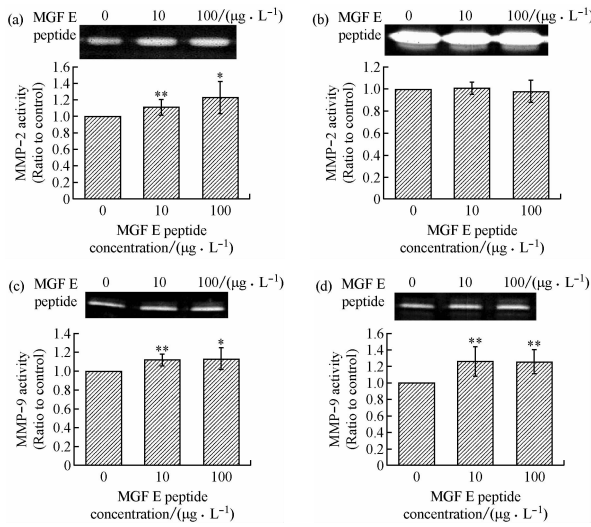
图1 MGF E 肽处理对 ACL 成纤维细胞增殖的影响 (a) 培养 6 h 时细胞活力,(b) 培养 30 h 时细胞活力,(c) 培养 6 h 时细胞 DNA 含量,(d) 培养 30 h 时细胞 DNA 含量

**Fig. 1 Effects of MGF E peptide on cell proliferation of ACL fibroblasts** (a) Cell activity of ACL fibroblasts at 6 h after treated with MGF E peptide, (b) Cell activity of ACL fibroblasts at 30 h after treated with MGF E peptide, (c) DNA content of ACL fibroblasts at 6 h after treated with MGF E peptide, (d) DNA content of ACL fibroblasts at 30 h after treated with MGF E peptide

### 2.2 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞明胶酶活性的影响

MMP-2、MMP-9 能够有效降解 ACL 成纤维细胞胞外基底膜及基质成分,介导调控 ACL 成纤维细胞的迁移、侵袭等,是影响 ACL 损伤修复的重要因素。通过明胶酶谱实验分析可知,MGF E 肽处理 ACL 成纤维细胞后,6 h 内 MMP-2、MMP-9 活性显著性上升。10  $\mu\text{g/L}$  MGF E 肽分别提高 ACL 成纤维细胞 MMP-2、MMP-9 活性 11.3%、22.8% [见图 2 (a)],而 100  $\mu\text{g/L}$  MGF E 肽则分别提升 ACL 成纤维细胞 MMP-2、MMP-9 活性 11.8%、12.9% [见图 2 (c)]。继续培养后,6 ~ 30 h 内,ACL 细胞 MMP-2 活性与对照组相比无差异[见图 2 (b)],但 MGF E 肽在 30 h

时仍然显著性促进 ACL 细胞 MMP-9 活性, 10、100  $\mu\text{g/L}$  MGF E 肽分别提高 ACL 成纤维细胞 MMP-9 活性 25.9%、25.6% [见图 2(d)]。



**图 2 MGF E 肽处理对 ACL 成纤维细胞 MMP-2 和 MMP-9 活性的影响** (a) 培养 6 h 时细胞 MMP-2 活性, (b) 培养 30 h 时细胞 MMP-2 活性, (c) 培养 6 h 时细胞 MMP-9 活性, (d) 培养 30 h 时细胞 MMP-9 活性 (与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

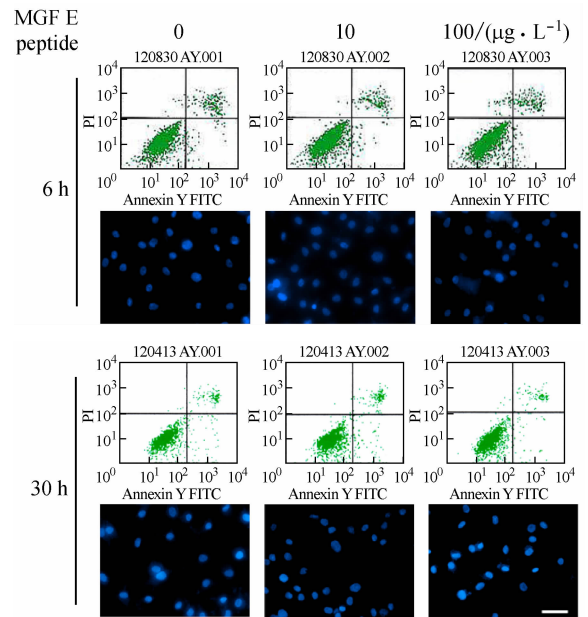
**Fig. 2 Effects of MGF E peptide on the MMP-2 and MMP-9 activities of ACL fibroblasts** (a) MMP-2 activity of ACL fibroblasts at 6 h after treated with MGF E peptide, (b) MMP-2 activity of ACL fibroblasts at 30 h after treated with MGF E peptide, (c) MMP-9 activity of ACL fibroblasts at 6 h after treated with MGF E peptide, (d) MMP-9 activity of ACL fibroblasts at 30 h after treated with MGF E peptide

### 2.3 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC 与 PI 能够分别检测细胞早期凋亡、晚期凋亡及凋亡继发性细胞死亡。通过 Annexin V-FITC 与 PI 双染的细胞流式分析可知, MGF E 肽处理后, 30 h 内无明显细胞凋亡发生。Hoechst 33258 染色分析结果同样验证了 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞凋亡无明显影响 (见图 3)。

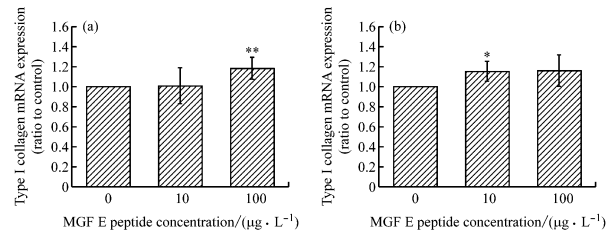
### 2.4 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞 COL I 表达的影响

COL I 是 ACL 最主要的胞外基质成分, 与 ACL 耐拉伸能力相关, 同时介导 ACL 修复过程中瘢痕组织形成, 在 ACL 功能与修复中都起到至关重要的作用。通过 RT-PCR 分析可知, 10  $\mu\text{g/L}$  MGF E 肽在 6 h 时对 ACL 成纤维细胞 COL I mRNA 表达无影



**图 3 MGF E 肽处理对 ACL 成纤维细胞凋亡的影响 (标尺: 50  $\mu\text{m}$ )**  
**Fig. 3 Effects of MGF E peptide on cell apoptosis of ACL fibroblasts**

响, 而 100  $\mu\text{g/L}$  MGF E 肽在 6 h 时显著促进 COL I mRNA 的表达 [见图 4 (a)]。在 30 h 时, 10  $\mu\text{g/L}$  MGF E 肽显著提高 ACL 成纤维细胞中 COL I mRNA 表达, 而 100  $\mu\text{g/L}$  MGF E 肽对其无明显作用 [见图 4 (b)]。



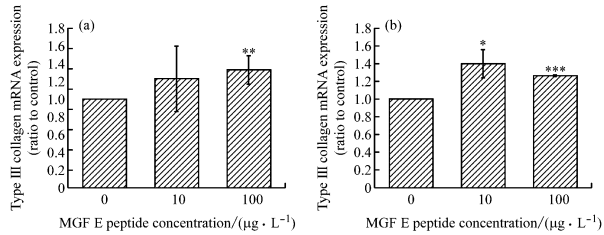
**图 4 MGF E 肽处理对 ACL 成纤维细胞 COL I mRNA 表达影响** (a) 培养 6 h 时细胞 COL I mRNA 表达; (b) 培养 30 h 时细胞 COL I mRNA 表达 (与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

**Fig. 4 Effects of MGF E peptide on COL I expression of ACL fibroblasts** (a) COL I mRNA expression of ACL fibroblasts at 6 h after treated with MGF E peptide, (b) COL I mRNA expression of ACL fibroblasts at 30 h after treated with MGF E peptide

### 2.5 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞 COL III 表达的影响

COL III 是 ACL 主要的胞外基质成分之一, 因其特殊的螺旋结构与 ACL 成纤维细胞迁移、侵袭能

力相关。通过 RT-PCR 分析可知, MGF E 肽处理后, 10  $\mu\text{g}/\text{L}$  MGF E 肽在 6 h 时对 COL III mRNA 表达无影响, 但 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  MGF E 肽显著促进 COL III mRNA 表达 [见图 5 (a)]。在 30 h 时, 10 与 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  MGF E 肽均显著促进 COL III mRNA 的高表达 [见图 5 (b)]。



**图 5** MGF E 肽处理对 ACL 成纤维细胞 COL III mRNA 表达的影响 (a) 培养 6 h 时细胞 COL III mRNA 表达, (b) 培养 30 h 时细胞 COL III mRNA 表达 (与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

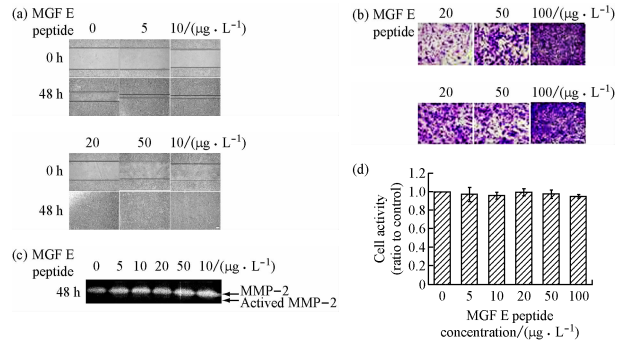
**Fig. 5** Effects of MGF E peptide on COL III expression of ACL fibroblasts (a) COL III mRNA expression of ACL fibroblasts at 6 h after treated with MGF E peptide, (b) COL III mRNA expression of ACL fibroblasts at 30 h after treated with MGF E peptide

## 2.6 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞迁移与侵袭的影响

ACL 损伤修复需要正常细胞向损伤位点的迁移, 故细胞迁移与侵袭是 ACL 损伤修复的重要影响因素。经不同浓度 MGF E 肽处理 48 h 后, ACL 成纤维细胞的迁移能力显著性上调, 20、50 与 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  MGF E 肽处理的细胞划痕完全愈合 [见图 6 (a)]。同时, ACL 成纤维细胞侵袭能力也得到明显的提高 [见图 6 (b)], 过程中伴随着 MMP-2 活性的增加 [见图 6 (c)], 且具有一定浓度的浓度依赖性。进一步通过 MTS 检测可知, MGF E 肽促进 ACL 成纤维细胞迁移与侵袭过程中不涉及细胞增殖 [见图 6 (d)], 这与图 1 的研究结果一致。

## 3 讨论

ACL 成纤维细胞活力与其损伤修复密切相关, 尤其在 ACL 术后康复过程中起到至关重要的作用 [17]。通过细胞新陈代谢活性、细胞 DNA 含量与细胞凋亡方面的检测可知, MGF E 肽对于 ACL 成纤维细胞的增殖、凋亡无影响, 即不存在细胞毒性作



**图 6** 不同浓度 MGF E 肽处理对 ACL 成纤维细胞迁移与侵袭的影响 (标尺: 200  $\mu\text{m}$ ) (a) 48 h 后细胞迁移变化, (b) 48 h 后细胞侵袭变化, (c) 48 h 后 MMP-2 活性变化, (d) 48 h 后细胞活力变化

**Fig. 6** Effects of MGF E peptide with different concentration on cell migration and invasion of ACL fibroblasts (a) Cell migration of ACL fibroblasts after treated with MGF E peptide for 48 h, (b) Cell invasion of ACL fibroblasts after treated with MGF E peptide for 48 h, (c) MMP-2 activity of ACL fibroblasts after treated with MGF E peptide for 48 h, (d) Cell activity of ACL fibroblasts after treated with MGF E peptide for 48 h

用。然而, MGF E 肽能够在 30 h 内显著性上调 ACL 成纤维细胞胞外基质 COL I、COL III mRNA 的表达, 同时对于 MMP-2 (6 h 内)、MMP-9 活性 (6 和 30 h 内) 也具有积极的上调作用。由于 COL I、COL III mRNA 表达以及 MMP-2、MMP-9 活性上调, 即胞外基质代谢加快, 有利于细胞的迁移与侵袭。本文基于以上结果, 进一步检测了 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞迁移与侵袭的影响。结果显示, 随着浓度上升, MGF E 肽显著性上调了 ACL 成纤维细胞的迁移与侵袭能力, 但对细胞增殖能力无影响, 而且过程中伴随着 MMP-2 活性的升高, 这意味着 MGF E 肽可能通过上调 MMP-2 活性进一步增加了 ACL 成纤维细胞迁移与侵袭能力, 从而促进 ACL 损伤修复的进程。

ACL 损伤后, 其修复过程可分为 4 个阶段: 炎症阶段、韧带外周修复阶段、增殖阶段和组织重构阶段 [18]。MMPs 活性在 ACL 损伤修复中起到一个双刃剑的作用。由于 MMPs 对胶原的降解作用, ACL 撕裂损伤后与内侧副韧带不同, 难以最终形成功能性的瘢痕组织。虽然损伤修复早期阶段 MMPs 阻碍了 ACL 损伤残端的修复, 但其在损伤修复炎症阶段后期、增殖阶段与组织重构阶段均起到至关重要的

作用。炎症阶段中,损伤部位的细菌、组织碎片等被清理后,成纤维细胞开始向损伤部位迁移。在 ACL<sup>[19]</sup>、肌腱<sup>[15]</sup>的相关研究中,活化的 MMP-2 都被证明在促细胞迁移或侵袭中起到重要的作用,该过程可能涉及到 FAK-Erk1/2 途径。本研究证明 MGF E 肽能够显著性上调 MMP-2、MMP-9 活性(见图 2),两者是生物体中重要的胶原酶,能够有效降解胞外基质胶原。因此,MGF E 肽能够促进 ACL 成纤维细胞迁移与侵袭,其潜在可能机制是 MGF E 肽通过提升 MMP-2 及 MMP-9 活性,进一步地降解胞外胶原(解脲作用),从而有助于 ACL 成纤维细胞向损伤位点迁移、侵袭(见图 6),促进 ACL 修复。

随着越来越多的成纤维细胞迁移至损伤位点后,损伤修复进入增殖阶段。成纤维细胞增殖同时,开始大量分泌胶原与纤连蛋白。研究表明,在创伤修复过程中,成纤维细胞通过分泌的胶原与纤连蛋白会形成一个临时、无定向的胞外基质,其成分与正常胞外基质不同,具有更好的水合性,从而利于细胞的附着、迁移;然而随着修复进程不断完成会再次被降解<sup>[20]</sup>,并在组织重构阶段重新分泌胶原与纤连蛋白,通过力学刺激等形成有序、定向的新的胞外基质,具有功能性的力学效应<sup>[21]</sup>。虽然 MGF E 肽对于 ACL 成纤维细胞增殖无明显影响(见图 1),但对于 COL I、COL III mRNA 均表现出积极的促表达作用,并且与 MGF E 肽浓度及时间具有相关性(见图 4、5)。因此,考虑到胶原在 ACL 修复过程中不同时间段的作用,选择高或低浓度的 MGF E 肽调控胶原的累积或降解将更加有利于 ACL 修复进程。

本文研究结果表明,MGF E 肽能够有效促进 ACL 成纤维细胞 MMP-2、MMP-9 活性与 COL I、COL III mRNA 的合成,并进一步调控 ACL 成纤维细胞的迁移与侵袭,故对于 ACL 损伤修复具有十分重要的调控作用。但是相关的分子机制未知,仍需进一步的探索阐述。本文通过研究 MGF E 肽对 ACL 成纤维细胞活力、迁移与侵袭,为 ACL 损伤修复揭示了一种新的潜在性研究策略,对其有效作用时间进行了初步摸索,为推广其临床应用提供了初步的实验基础。

## 参考文献:

[1] Rachmat HH, Janssen D, Verkerke GJ, *et al.* *In-situ*

mechanical behavior and slackness of the anterior cruciate ligament at multiple knee flexion angles [J]. *Med Eng Phys*, 2015, 2016, 38(3): 209-215.

[2] Orishimo KF, Liederbach M, Kremenic IJ, *et al.* Comparison of landing biomechanics between male and female dancers and athletes, part 1: Influence of sex on risk of anterior cruciate ligament injury [J]. *Am J Sports Med*, 2014, 42(5): 1082-1088.

[3] Howard JS, Lembach ML, Metzler AV, *et al.* Rates and determinants of return to play after anterior cruciate ligament reconstruction in national collegiate athletic association division I soccer athletes: A study of the southeastern conference [J]. *Am J Sports Med*, 2016, 44(2): 433-439.

[4] Du G, Zhan H, Ding D, *et al.* Abnormal mechanical loading induces cartilage degeneration by accelerating meniscus hypertrophy and mineralization after ACL injuries *in vivo* [J]. *Am J Sports Med*, 2016, 44(3): 652-663.

[5] Yan F, Xie F, Gong X, *et al.* Effect of anterior cruciate ligament rupture on secondary damage to meniscus and articular cartilage [J]. *Knee*, 2016, 23(1): 102-105.

[6] Zhang J, Pan T, Im HJ, *et al.* Differential properties of human ACL and MCL stem cells may be responsible for their differential healing capacity [J]. *BMC Med*, 2011, 9, doi: 10.1186/1741-7015-9-68.

[7] Date H, Furumatsu T, Sakoma Y, *et al.* GDF-5/7 and bFGF activate integrin alpha2-mediated cellular migration in rabbit ligament fibroblasts [J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(2): 225-231.

[8] Papachristou G, Nikolaou V, Efstathiopoulos N, *et al.* ACL reconstruction with semitendinosus tendon autograft without detachment of its tibial insertion: A histologic study in a rabbit model [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2007, 15(10): 1175-1180.

[9] Sasaki S, Tsuda E, Hiraga, *et al.* Prospective randomized study of objective and subjective clinical results between double-bundle and single-bundle anterior cruciate ligament reconstruction [J]. *Am J Sports Med*, 2016, 44(4): 855-864.

[10] Woo SL, Abramowitch SD, Kilger R, *et al.* Biomechanics of knee ligaments: Injury, healing, and repair [J]. *J Biomech*, 2006, 39(1): 1-20.

[11] Dai Z, Wu F, Yeung EW, *et al.* IGF-IEc expression, regulation and biological function in different tissues [J]. *Growth Horm IGF Res*, 2010, 20(4): 275-281.

[12] Schlegel W, Raimann A, Halbauer D, *et al.* Insulin-like growth factor I (IGF-I) Ec/Mechano Growth factor—A splice variant of IGF-I within the growth plate [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76133.

[13] Wu J, Wu K, Lin F, *et al.* Mechano-growth factor induces

- migration of rat mesenchymal stem cells by altering its mechanical properties and activating ERK pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(1): 202-207.
- [14] Li H, Lei M, Luo Z, *et al.* Mechano-growth factor enhances differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(11): 2341-2348.
- [15] Zhang B, Luo Q, Sun J, *et al.* MGF enhances tenocyte invasion through MMP-2 activity via FAK-ERK1/2 pathway [J]. *Wound Repair Regen*, 2015, 23(3): 394-402.
- [16] Lv Y, Hao X, Sha Y, *et al.* Pretreatment with mechano-growth factor E peptide protects bone marrow mesenchymal cells against damage by fluid shear stress [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(12): 2559-2569.
- [17] Fallouh L, Nakagawa K, Sasho T, *et al.* Effects of autologous platelet-rich plasma on cell viability and collagen synthesis in injured human anterior cruciate ligament [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2010, 92(18): 2909-2916.
- [18] Murray MM, Martin SD, Martin TL, *et al.* Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2000, 82A(10): 1387-1397.
- [19] Wang Y, Tang Z, Xue R, *et al.* TGF- $\beta$ 1 promoted MMP-2 mediated wound healing of anterior cruciate ligament fibroblasts through NF- $\kappa$ B [J]. *Connect Tissue Res*, 2011, 52(3): 218-225.
- [20] Lorenz HP, Longaker MT. *Wounds: Biology, pathology, and management* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 2008: 191-208.
- [21] Joshi SM, Mastrangelo AN, Magarian EM, *et al.* Collagen-platelet composite enhances biomechanical and histologic healing of the porcine anterior cruciate ligament [J]. *Am J Sports Med*, 2009, 37(12): 2401-2410.