

Paxillin对骨髓间充质干细胞向 类髓核细胞分化的影响

刘汝银¹, 岳宗进¹, 彭晓艳², 王新立¹, 冯仲锴¹

(1 河南省中医院脊柱科; 2 护理部 450002 郑州市)

【摘要】目的:探讨 Paxillin 对骨髓间充质干细胞(BMSCs)向类髓核细胞分化的影响。**方法:**取 3 周龄健康 SD 大鼠骨髓, 采用全骨髓贴壁法培养 BMSCs, 传至第 3 代, 用流式细胞仪对其表面标志分子进行鉴定。利用 pcDNA3.1(-)/Myc-His B 质粒构建真核表达载体 pcDNA3.1-Paxillin。取第 3 代 BMSCs 分为 3 组: 实验组, 转染 pcDNA3.1-Paxillin; 阴性对照组, 转染 pcDNA3.1(-)/Myc-His B; 空白对照组, 不转染质粒。分别培养 36h 后, 实验组和阴性对照经 G418 筛选, 取 3 组 BMSCs 采用实时荧光定量 PCR 方法(qRT-PCR)检测各组 Paxillin、蛋白多糖(Aggrecan)、II 型胶原 $\alpha 1$ (collagen type II $\alpha 1$, COL2 $\alpha 1$)、性别决定区 Y 框蛋白 9(sex determining region Y box protein 9, SOX9)、角蛋白 19(keratin19, KRT19)、配对盒 1(paired box 1, PAX1)和叉头蛋白(forkhead box F1, FOXF1)的 mRNA 表达量; 免疫印迹法(Western blot)检测 Paxillin、KRT19、PAX1 和 FOXF1 蛋白表达水平。**结果:**BMSCs 原代培养至第 3 代的细胞形态大体一致, 呈长梭形, 细胞连接紧密且均匀分布, CD44、CD90 呈现高表达(95.6%和 96.8%), CD45、CD11 则呈现低表达(1.82%和 2.16%)。实验组中 Paxillin 的 mRNA 和蛋白表达量较阴性对照组和空白对照组升高, 差异具有显著性($P < 0.05$); 经 G418 筛选后的 BMSCs 和髓核细胞形态相似。实验组中 COL2 $\alpha 1$ 、SOX9、Aggrecan、KRT19、PAX1、FOXF1 的 mRNA 表达量较阴性对照组和空白对照组显著性升高($P < 0.05$); 实验组 KRT19、PAX1 和 FOXF1 的蛋白表达量显著性高于阴性对照组和空白对照组($P < 0.05$)。**结论:**Paxillin 可以促进 BMSCs 向类髓核细胞分化, 为椎间盘退变性疾病细胞移植治疗提供基础。

【关键词】骨髓间充质干细胞; Paxillin; 类髓核细胞; 真核表达载体

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.05.12

中图分类号: R681.5, Q254 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2016)-05-0453-06

Effect of Paxillin gene on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to nucleus pulposus-like cells/LIU Ruyin, YUE Zongjin, PENG Xiaoyan, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2016, 26(5): 453-458

【Abstract】Objectives: To investigate the effect of Paxillin on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) to nucleus pulposus-like cells. **Methods:** BMSCs from 3-week-old rat bone marrow were cultured by whole bone marrow adherent method until the third generation. Then, BMSCs surface markers were identified by flow cytometry. The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-Paxillin was constructed by using pcDNA3.1(-)/Myc-His B vector. The third generation BMSCs were divided into three groups: experimental group, transfected with pcDNA3.1-Paxillin; the negative control group, transfected with pcDNA3.1(-)/Myc-His B; the control group, no transfection. The experimental group and negative control group were screened by using G418 following cultured for 36h. The mRNA expression levels of Paxillin, aggrecan, collagen type II $\alpha 1$ (COL2 $\alpha 1$), sex determining region Y box protein 9(SOX9), keratin19(KRT19), paired box 1(PAX1) and forkhead box F1 (FOXF1) in the three BMSCs groups and NP group were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR). The protein expression levels of Paxillin, KRT19, PAX1 and FOXF1 were measured by Western blot. **Results:** The 3rd generation of primary culturing BMSCs was fusiform, connected tightly, evenly distributed with high expressions of CD44(95.6%) and CD90(96.8%), and distributed with low expressions of CD11(2.16%) and CD45(1.82%). The mRNA and protein expressions of Paxillin in the

第一作者简介: 男(1973-), 副主任医师, 医学硕士, 研究方向: 脊柱科

电话: (0371)60905533 E-mail: shidasda@163.com

通讯作者: 岳宗进 E-mail: shidasda@163.com

experimental group were higher than those in the negative control group and the control group, the difference was significant ($P < 0.05$). The morphologies of the BMSCs selected for 18d by G418 was similar to the nucleus pulposus cells. The mRNA expression levels of COL2 α 1, SOX9, Aggrecan, KRT19, PAX1 and FOXF1 in the experimental were significantly up-regulated compared with negative control group and control group ($P < 0.05$). The protein levels of KRT19, PAX1 and FOXF1 were also obviously increased contrasted with negative control group and control group ($P < 0.05$). **Conclusions:** Paxillin can promote the differentiation of BMSCs to nucleus pulposus-like cells, providing a novel reference for the treatment by using cell transplantation therapy in degenerative disc degeneration disease.

[Key words] Bone marrow mesenchymal stem cells; Paxillin; Nucleus pulposus-like cells; Eukaryotic expression vector

[Author's address] Department of Spine, Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, 450002, China

椎间盘退变性疾病的发病率呈上升趋势,手术治疗只能缓解症状,无法逆转椎间盘退变^[1]。生物技术即细胞移植技术为治疗椎间盘退变提供了可能^[2]。骨髓间充质干细胞(BMSCs)取材方便,有很强的多向分化能力且分泌多种因子^[3]。诱导 BMSCs 分化为类髓核细胞可为椎间盘突出的生物学治疗提供细胞来源^[4]。Paxillin 又称桩蛋白,主要定位于黏着斑^[5]。有研究显示,Paxillin 的磷酸化是整合素信号传导的关键,而整合素与细胞的粘附性、分化和生长有关^[6];Paxillin 与少突胶质前体细胞、前列腺上皮细胞和内皮屏障细胞等的分化过程有关^[7];Paxillin 表达量的上调还可促进前列腺癌细胞分化^[8]。然而,Paxillin 是否参与类髓核细胞的分化尚无相关研究报道。本研究拟通过上调 Paxillin 表达量探讨其对 BMSCs 向类髓核细胞分化的影响,为椎间盘退变的生物学治疗提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与器材

5 周龄 SD 大鼠,雌雄不限,由郑州大学实验动物中心提供。本实验严格遵守国家卫生和医学研究委员会对实验用动物护理和使用制定的相关指南。

胎牛血清、胰蛋白酶 (Trypsin)、遗传霉素 (G418)、DMEM 和 DMEM/F12(美国 Gibco 公司); Xho I、EcoR I、Turbofect 和反转录试剂盒(赛默飞世尔科技公司);质粒小提试剂盒、TRIZOL 和 SYBR Premix Ex Taq II (大连宝生物工程有限公司);CD11/CD44 单克隆抗体和配对盒 1 (PAX1)、Paxillin、角蛋白 19(KRT19)、叉头蛋白 (FOXF1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔多

克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);单克隆抗体 CD45、CD90 和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz 公司);兔抗大鼠 II 型胶原多克隆抗体,鼠 Aggrecan 单克隆抗体(英国 Abcam 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 的分离、培养 用 3%戊巴比妥钠 (30mg/kg) 静脉注射麻醉 SD 大鼠,然后浸泡于 75%的酒精中消毒 20min,于无菌环境下将组织分离,取出股骨和胫骨,剪去骨骺端,用 DMEM/F12 培养基冲洗骨髓腔,收集骨髓液。采用全骨髓贴壁法分离培养 BMSCs:离心骨髓液留沉淀,并用含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 吹打细胞团直至成为单个细胞,于 5% CO₂、37℃的恒温培养箱中培养。细胞融合度达到 80%后,用含 0.25% Trypsin 的消化液消化细胞进行传代培养,传代后的细胞为第一代。待细胞融合达到 80%后传代,到第 3 代进行下一步实验。

1.2.2 BMSCs 的鉴定 待第 3 代细胞培养至 90%的融合度时,消化细胞,PBS 漂洗 3 次,并以 $1.0 \times 10^5/L$ 的密度重悬 BMSCs,分装至各 EP 管中,各管中加入单克隆抗体 CD11、CD44、CD45、CD90 (稀释比例 1:100),各管设立同型阴性对照。冰上孵育 40min,PBS 洗去未结合的抗体,用 PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测。

1.2.3 pcDNA3.1-Paxillin 真核表达载体的构建 胰酶消化生长状态良好的 BMSCs,TRIZOL 法提取 6×10^6 个细胞的总 RNA,以其为模板,参考反转录试剂盒操作说明将其反转成 cDNA。PCR 扩增 Paxillin 的全长,引物由深圳华大基因科技有限公司合成,其引物如下:P1:5'-CGTACCTC-

GAGGC-CATGGACGACCTCGACGC-3' (下划线为 Xho I 酶切位点); P2: 5'-GGAATTCATTTGTCGTCGTCG-TCC-TTG-TAGTCGCAGAAGAGCTTGAGGAAGC-3' (下划线为 EcoR I 酶切位点)。PCR 扩增反应条件: 94℃ 5min, 94℃ 30s, 56℃ 30s, 72℃ 1min, 35 个循环; 72℃ 5min。将得到的 PCR 扩增产物 25μl 加到浓度为 1% 的琼脂糖凝胶中电泳, 回收 DNA。XhoI 和 EcoR I 双酶切回收的产物和 pcDNA3.1(-)/Myc-His B 质粒, 并且将酶切后的 DNA 片段和质粒连接, 将连接产物转化至 DH5a 细胞中, 挑选阳性克隆增殖培养, 按照质粒 DNA 小量纯化试剂盒说明书提取质粒且 Xho I 和 EcoR I 双酶切鉴定, 鉴定正确的质粒送深圳华大基因科技有限公司合成测序鉴定。

1.2.4 G418 抗性实验和重组质粒的转染 将生长状态良好的 BMSCs 消化制备成细胞悬液, 以 1.0×10^9 个/L 的数量接种于 24 孔板中, 培养基为含 10% FBS 的 DMEM/F12, 于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中培养 36h。更换新鲜的培养基后每孔加入浓度分别为 300、400、500、600、700mg/L 的 G418, 每 2d 更换含有相对应浓度 G418 的新鲜培养基, 直至第 7 天。将在 7d 内杀死全部细胞的最低浓度 G418 定位为细胞筛选时的浓度。将状态良好的 BMSCs 接种于 6 孔板中, 37℃、5%CO₂ 的环境下培养 24h, 细胞融合达到 70% 时, 参照转染试剂 Turbofect 的操作说明, 将重组质粒 pcDNA3.1-Paxillin (4μg) 和 pcDNA3.1(-)/Myc-His B (4μg) 分别与含有 6μl Turbofect 的 200μl 不含血清的 DMEM/F12 混合, 分别加入实验组和阴性对照组。转染 24h 后, 用含 10% FBS 的新鲜 DMEM/F12 换掉旧培养基, 12h 后加入 400mg/L 的 G418 继续培养, 7d 后 G418 浓度换成 200mg/L 维持筛选, 筛选 18d 后细胞用于后续实验。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 收获各组细胞, Trizol 试剂裂解细胞并提取总 RNA, 依照反转录试剂盒说明书反转成 cDNA, 进行 qRT-PCR 反应。GAPDH 为内参对照基因, 反应程序: 94℃、2min, 变形 94℃、30s, 退火 61℃ (KRT19、PAX1 和 COL2α1)、62℃ (GAPDH、SOX9 和 Aggrecan) 或 63℃ (FOXF1) 1min, 延伸 72℃、1min, 35 个 (GAPDH、SOX9、Aggrecan 和 COL2α1) 或 39 个 (KRT19、PAX1 和 FOXF1) 循环, 延伸 72℃、

10min。20μl 的反应体系含有 10μl SYBR Premix Ex Taq II。基因相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。每一个样品设置 3 个重复。引物见表 1。

1.2.6 蛋白免疫印记 (Western Blot) 检测 收获各组细胞, 裂解细胞, 4℃、13000r/min 离心 15min, 取上清, 与上样 buffer 混匀煮沸 5min, 加 25μg 样品于 10% 的 SDS-PAGE 上电泳, 电泳分离后将蛋白电转移至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2h, PBS 洗去封闭液, 加 PAX1/Paxillin/KRT19/FOXF1/GAPDH 兔多克隆抗体 (稀释比例均为 1:500), 4℃ 过夜, PBS 洗 3 次, 室温孵育辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:1000) 2h, 利用凝胶成像系统观察结果。GAPDH 为内参对照基因, 利用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定条带灰度值, 与对应 GAPDH 的灰度值相比来计算相对蛋白表达量。进行 3 次重复实验。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析,

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Table 1 The primers of qRT-PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequences
Paxillin	正向 Sense primer 5'-GGAGCAGAACGACAAGCC-3'
	反向 Anti-sense primer 5'-GCACAGAGCCCAGGAGA-3'
SOX9	正向 Sense primer 5'-AGGAAGCTGGCAGACCAGTA-3'
	反向 Anti-sense primer 5'-CGGCAGCTATTGGTCAAAC-3'
Aggrecan	正向 Sense primer 5'-AGCCGGAGACGACAGAAGTA-3'
	反向 Anti-sense primer 5'-AGTCTCCCACTCCAGAAGCA-3'
COL2α1	正向 Sense primer 5'-CGAGGTGACAAAGGAGAAGC-3'
	反向 Anti-sense primer 5'-CTGCTTGTTCAGCGACTTGA-3'
KRT19	正向 Sense primer 5'-GACTTCCGGACCAAGTTTGA-3'
	反向 Anti-sense primer 5'-GTGTCAGCACGCACGTTACT-3'
FOXF1	正向 Sense primer 5'-AGGAGCTGTTGAGGCTGCTA-3'
	反向 Anti-sense primer 5'-CGCTAGTCTCCCCTCTCCTT-3'
PAX1	正向 Sense primer 5'-GACTCGAGAAACCTGCCTTG-3
	反向 Anti-sense primer 5'-CTGGGGTGTGTTGAAGGTCAT-3
GAPDH	正向 Sense primer 5'-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3'
	反向 Anti-sense primer 5'-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3'

计量资料以均数±标准差表示,两组之间采用 *t* 检验,多组之间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的培养及鉴定

SD 大鼠的 BMSCs 原代培养 4d 后细胞贴壁生长,形态不一(图 1a)。随着时间的推移,细胞连接紧密且呈现长梭形和不规则形。经过传代至第 3 代,细胞形态大体一致,呈长梭形,细胞连接紧密且均匀分布(图 1b)。通过流式细胞仪检测 BMSCs 的表面标志分子,结果显示 CD44 和 CD90 表达量为 95.6% 和 96.8%,而 CD45 和 CD11 呈低表达,分别为 1.82% 和 2.16%。

2.2 Paxillin 在 BMSCs 中的表达

实验组(pcDNA3.1-Paxillin)中 Paxillin mRNA 和蛋白的表达量明显高于阴性对照组和空白对照组($P < 0.05$),阴性对照组与空白对照组无显著性差异($P > 0.05$)(表 2)。说明载体构建成功,并且成功转染进入细胞,Paxillin 成功过表达。

2.3 BMSCs 向类髓核细胞分化结果

含有 400~700mg/L G418 的 DMEM/F12 培养基均可在 7d 内杀死全部细胞,因此 G418 的最适浓度选择为 400mg/L。转染过的 BMSCs 经 G418 筛选 18d 后,细胞形态发生变化,由原来的长梭形变为多角形或圆形,胞浆丰富,细胞核位于细胞中央且清晰(图 2)。

通过 qRT-PCR 检测,实验组 Aggrecan、COL2 α 1、SOX9、FOXF1、PAX1、KRT19 的 mRNA

表达量显著性高于阴性对照组和空白对照组($P < 0.05$, 表 3)。Western blot 检测结果表明实验组 FOXF1、PAX1 和 KRT19 在蛋白水平表达量显著性高于阴性对照组和空白对照组($P < 0.05$, 表 4)。

表 2 三组 BMSCs 的 Paxillin 表达水平

Table 2 Detections of Paxillin expression

	mRNA	蛋白 protein
空白对照组 Control group	1.02±0.21	1.13±0.62
实验组 Experimental group	5.71±1.12 ^①	5.12±1.31 ^①
阴性对照组 Negative control group	1.50±0.49	1.25±0.51
<i>P</i> 值 <i>P</i> Value	0.004	0.009

注:①与阴性对照组和空白对照组比较 $P < 0.01$

Note: ① Compared with negative control group or control group, $P < 0.01$

表 3 过表达 Paxillin 18d 后相关基因的 mRNA 表达参数

Table 3 The mRNA expression parameters of related genes in 18 days after up-regulation of Paxillin

	空白对照组 Control group	实验组 Experimental group	阴性对照组 Negative control group
SOX9	0.12±0.05	2.10±0.37 ^①	0.13±0.04
Aggrecan	0.22±0.01	4.67±0.30 ^①	0.33±0.18
COL2 α 1	0.83±0.05	3.17±0.38 ^①	1.27±0.27
KRT19	0.03±0.001	0.13±0.03 ^①	0.03±0.01
FOXF1	0.02±0.001	0.08±0.02 ^①	0.04±0.01
PAX1	0.03±0.003	0.17±0.04 ^①	0.04±0.01

注:①与空白对照组和阴性对照组比较 $P < 0.05$

Note: ① Compared with control group and negative control group, $P < 0.05$



图 1 鼠 BMSCs 形态学观察(×100) a 原代培养 4d 后的 BMSCs 形态不一 b 第 3 代 BMSCs 呈长梭形,细胞连接紧密且均匀分布 图 2 BMSCs 向类髓核细胞分化,细胞由长梭形变为多角形或圆形(×100)

Figure 1 Morphology observation of rat BMSCs(×100) a represents BMSCs primary cultured for 4 days, and the cells appeared different forms b The third generation of BMSCs cultured for 3 days, the cells were fusiform, connecting tightly and evenly distributing Figure 2 The morphology observation of the differentiation of BMSCs to nucleus pulposus-like cells became polygonal or circular(×100)

表 4 过表达 Paxillin 18d 后相关基因的蛋白表达量**Table 4** The protein expression of related genes in 18 days after up-regulation of Paxillin

	空白对照组 Control group	实验组 Experimental group	阴性对照组 Negative control group
KRT19	0.04±0.002	0.08±0.02 ^①	0.02±0.001
FOXF1	0.03±0.002	0.07±0.02 ^①	0.02±0.01
PAX1	0.02±0.003	0.23±0.05 ^①	0.04±0.01

注:①与空白对照组和阴性对照组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with control group and negative control group, $P<0.05$

说明 Paxillin 的过表达促进了 BMSCs 向类髓核细胞分化。

3 讨论

椎间盘突出症的发病机理主要是椎间盘的退行性变^[9]。退变后的椎间盘髓核水分减少并且伴随着髓核细胞的凋亡^[10,11],因此作为髓核细胞主要基质的蛋白多糖和Ⅱ型胶原也随之减少,椎间盘的功能减弱并发生形态学的变化,引发腰痛,影响人们的正常生活^[12]。近年来,针对椎间盘的退行性改变,作为一种生物学修复方法的细胞移植治疗技术被普遍关注,为椎间盘退行性变化的治疗提供了新的方法和理论基础。

BMSCs的增殖能力强,是一类具有多向分化能力的干细胞,可以分化成为脂肪细胞、心肌细胞、成骨细胞、软骨细胞、神经细胞等,另外易于取材和分离且有免疫原性低的特性^[13,14]。有研究表明,GDF-5联合地塞米松可诱导 BMSCs 向类髓核样细胞分化^[15]。另外,上调 SOX9 和 TGF- β 1 的表达量可促进 BMSCs 向类髓核细胞分化^[16]。因此,BMSCs 成为理想的向类髓核细胞分化的细胞,同时引导其向类髓核细胞分化成为治疗椎间盘突出热点。本研究中,我们采用全脊髓贴壁法分离 BMSCs,并通过第 3 代细胞形态观察和细胞表面标志分子 CD44、CD90、CD11 和 CD45 的流式细胞仪检测,鉴定 BMSCs 分离及培养成功。

多结构域的蛋白能够与多种信号蛋白和结构蛋白结合,从而起到对信号的收集和传递作用^[17]。Paxillin 的丝氨酸/苏氨酸磷酸化和 FAK 及 Src 家族介导的酪氨酸磷酸化有利于其与多种蛋白质的结合,作为信号传递的“中转站”;Paxillin 参与多种细胞生命活动,包括细胞粘附、细胞分化、细胞生长(如神经细胞轴突生长)、细胞成熟(淋巴细

胞)、细胞迁移等^[18,19]。有文献报道,Paxillin 在神经细胞分化的时候表达量上升,说明其与神经细胞的分化有关^[20]。除参与神经细胞(如 NCS)的分化过程,Paxillin 还与脂肪细胞、淋巴母细胞和食管癌等癌细胞的分化有关^[21-23]。而关于 Paxillin 是否可以对 BMSCs 向类髓核细胞分化的过程起作用,还没有相关研究报道。我们利用 pcDNA3.1 (-)/Myc-His B 质粒构建了 pcDNA-3.1-Paxillin 真核表达载体,并成功转染 BMSCs,过表达 Paxillin,检测 BMSCs 是否向类髓核细胞分化。结果表明,在倒置相差显微镜下,细胞形态类似髓核细胞;qRT-PCR 检测结果表明,实验组中与髓核细胞相关的基因 Aggrecan、COL2 α 1、SOX9、PAX1、KRT19 和 FOXF1 的 mRNA 表达量升高;Western blot 检测证实,实验组中 PAX1、KRT19、FOXF1 的蛋白表达量同样升高。Zhang 等^[16]的研究表明,转染 SOX9 也可促进 BMSCs 向髓核细胞分化,通过判定 COL2 α 1、SOX9 表达量上调说明 BMSCs 向髓核细胞分化。本研究还检测了三种髓核细胞的阳性基因 PAX1、KRT19、FOXF1 的 mRNA 和蛋白表达量,使 BMSCs 向髓核细胞分化的结果更有说服力。

综上所述,我们构建 Paxillin 的真核细胞过表达载体并转染培养的原代 BMSCs,过表达 Paxillin 可以显著促进 BMSCs 向类髓核细胞分化,为细胞移植治疗椎间盘突出提供了新的理论依据。

4 参考文献

1. Ji S, Shao Q, Wang Y, et al. Efficacy comparison between minimally invasive and conventional surgery for lumbar disc herniation in Chinese Han population: a meta-analysis [J]. Spinal Cord, 2014, 52(10): 734-739.
2. Benneker LM, Andersson G, Iatridis JC, et al. Cell therapy for intervertebral disc repair: advancing cell therapy from bench to clinics[J]. Eur Cell Mater, 2014, 27: 5-11.
3. Ma H, Yang Q, Li D, et al. Validation of suitable reference genes for quantitative polymerase chain reaction analysis in rabbit bone marrow mesenchymal stem cell differentiation [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2961-2968.
4. Vadala G, Sowa G, Hubert M, et al. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6(5): 348-355.
5. Janosiak R, Brabek J, Auernheimer V, et al. CAS directly interacts with vinculin to control mechanosensing and focal

- adhesion dynamics[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(4): 727–744.
6. Liu S, Thomas SM, Woodside DG, et al. Binding of paxillin to $\alpha 4$ integrins modifies integrin-dependent biological responses[J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 676–681.
7. Birukova AA, Cokic I, Moldobaeva N, et al. Paxillin is involved in the differential regulation of endothelial barrier by HGF and VEGF[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 40(1): 99–107.
8. Mestayer C, Blanchere M, Jaubert F, et al. Expression of androgen receptor coactivators in normal and cancer prostate tissues and cultured cell lines[J]. *Prostate*, 2003, 56(3): 192–200.
9. Rajasekaran S, Babu JN, Arun R, et al. ISSLS prize winner: a study of diffusion in human lumbar discs: a serial magnetic resonance imaging study documenting the influence of the endplate on diffusion in normal and degenerate discs [J]. *Spine*, 2004, 29(23): 2654–2667.
10. Jiang L, Zhang X, Zheng X, et al. Apoptosis, senescence, and autophagy in rat nucleus pulposus cells: Implications for diabetic intervertebral disc degeneration [J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(5): 692–702.
11. Ma X, Lin Y, Yang K, et al. Effect of lentivirus-mediated survivin transfection on the morphology and apoptosis of nucleus pulposus cells derived from degenerative human disc in vitro[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(1): 186–194.
12. Reitmaier S, Shirazi-Adl A, Bashkuev M, et al. In vitro and in silico investigations of disc nucleus replacement [J]. *J R Soc Interface*, 2012, 9(73): 1869–1879.
13. Fu S, Shi ZY, Fan WJ, et al. [Microenvironments induce iPSCs and BMSCs into neuron-like cells: Reelin's regulative role in cell differentiation and polarization][J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2015, 67(4): 357–369.
14. Hu N, Feng C, Jiang Y, et al. Regulative effect of mir-205 on osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMSCs): possible role of SATB2/Runx2 and ERK/MAPK pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 10491–10506.
15. 魏强强, 殷娣娣, 殷明, 等. GDF-5 联合地塞米松诱导大鼠 BMSCs 向类髓核样细胞分化[J]. *基础医学与临床*, 2014, 34(8): 1037–1043.
16. Zhang Q, Qian J, Wen Y, et al. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into nucleus pulposus-like cells transfected by SOX9 eukaryotic expression vector in vitro[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2010, 24(7): 811–816.
17. Kim YS, Kim J, Kim KM, et al. Myricetin inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced migration of retinal pericytes through phosphorylation of ERK1/2, FAK-1, and paxillin in vitro and in vivo[J]. *Biochem Pharmacol*, 2015, 93(4): 496–505.
18. German AE, Mammoto T, Jiang E, et al. Paxillin controls endothelial cell migration and tumor angiogenesis by altering neuropilin 2 expression [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127 (Pt 8): 1672–1683.
19. Deramautd TB, Dujardin D, Noulet F, et al. Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92059.
20. Leventhal PS, Feldman EL. Tyrosine phosphorylation and enhanced expression of paxillin during neuronal differentiation in vitro[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(11): 5957–60.
21. Cai HX, Yang LC, Song XH, et al. Expression of paxillin and FAK mRNA and the related clinical significance in esophageal carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(2): 469–72.
22. Deakin NO, Turner CE. Distinct roles for paxillin and Hic-5 in regulating breast cancer cell morphology, invasion, and metastasis[J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(3): 327–41.
23. Romanova LY, Mushinski JF. Central role of paxillin phosphorylation in regulation of LFA-1 integrins activity and lymphocyte migration[J]. *Cell Adh Migr*, 2011, 5(6): 457–62.
- (收稿日期:2015-11-09 末次修回日期:2016-03-03)
(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)
(本文编辑 卢庆霞)