

## 研究报告

# 力生长因子在大肠杆菌中的表达及活性分析

张兵兵<sup>1,2</sup>, 江鹏<sup>1,2</sup>, 鲜成玉<sup>1,2</sup>, 李玉筱<sup>1,2</sup>, 李大军<sup>1,2</sup>, 唐丽灵<sup>1,2</sup>, 王远亮<sup>1,2</sup>

1 重庆大学生物工程学院, 重庆 400030

2 重庆大学国家“985工程”生物材料与仿生工程研究中心, 重庆 400030

**摘要:** MGF(Mechano-growth factor)是一种 IGF-1 变体形式, 研究发现该因子具有应力敏感性, 并且具有促进肌肉肥大、再生以及神经损伤修复的功能。通过 RT-PCR 从拉伸刺激的人成骨细胞中克隆 MGF cDNA 序列, 并去除 5'端 9 bp 的序列, 使 N 端缺少对肠激酶(Enterokinase, EK)具有抑制作用的脯氨酸, 将截短型 MGF (des(1-3) MGF) cDNA 序列克隆入 pET32a(+)质粒, 构建重组表达质粒。重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 在 30°C 培养下以可溶形式表达融合蛋白 Trx/des(1-3)MGF, 采用离子交换层析和 Ni<sup>2+</sup>金属亲和层析, 获得纯度 95%以上的融合蛋白。再对融合蛋白 EK 酶切, rpHPLC 分离获得纯度达 98%的 des(1-3)MGF, SDS-PAGE 及质谱分析蛋白分子量与理论值相符。生物活性实验显示, 所制备的 des(1-3)MGF 比 des(1-3)IGF-1 更显著的促进 MC3T3-E1 细胞的增值和迁移。

**关键词:** 胰岛素样生长因子-1, 力生长因子, 原核表达, 增殖, 迁移

## Expression of Mechano-growth Factor in *Escherichia coli* and Activity Analysis

Bingbing Zhang<sup>1,2</sup>, Peng Jiang<sup>1,2</sup>, Chengyu Xian<sup>1,2</sup>, Yuxiao Li<sup>1,2</sup>, Dajun Li<sup>1,2</sup>, Liling Tang<sup>1,2</sup>, and Yuanliang Wang<sup>1,2</sup>

1 Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, China

2 National “985 Project Programme” Research Center of Bioinspired Materials Science and Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China

**Abstract:** Mechano-growth factor (MGF) is one of IGF-1 isoforms. MGF is mechanosensitive and has important functions in muscle hypertrophy, regeneration and nerve injury recovery. In this study, MGF cDNA (330 bp) was cloned from stretched osteoblasts by RT-PCR. In order to avoid proline residue inhibiting enterokinase cleavage, 9bp of MGF cDNA 5' end sequence was truncated by primer, then the obtained truncated MGF (des(1-3)MGF) cDNA (321 bp) was subcloned in pET32a(+) vector to construct a prokaryotic recombination expression plasmid. Trx/des(1-3)MGF fusion protein, existing in forms of solution, was expressed in transformed *Escherichia coli* strain BL21(DE3) by IPTG induction at 30°C. The supernatant of cell lysates was subjected to ion exchange chromatography and Ni<sup>2+</sup> metal affinity chromatography, and the fusion protein was obtained with the purity over 95%. After the fusion protein was cleaved by enterokinase, Trx and des(1-3)MGF was isolated by reverse-phase HPLC. Through these procedures, des(1-3) MGF was obtained with the purity of 98%. The protein molecular mass was conformity to the theoretical value by SDS-PAGE and mass spectrometry analysis. The purified des(1-3)MGF was incubated with MC3T3-E1 for cell proliferation and migration assays. The results show that des(1-3)MGF exhibited more facilitative effects on proliferation and migration of MC3T3-E1 than that of des(1-3)IGF-1.

**Keywords:** insulin-like growth factor-1(IGF-1), mechano-growth factor (MGF), prokaryotic expression, proliferation, migration

**Received:** November 8, 2007; **Accepted:** January 18, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 30600130).

**Corresponding author:** Yuanliang Wang. Tel: +86-23-65102509; E-mail: cqjgzb@163.com

国家自然科学基金(No. 30600130)资助。

IGF-1 是一种重要的生理调控因子, 在胚胎期和出生后的发育过程中具有重要作用, 同时在整个生命过程中它都通过调节细胞的增殖、分化、凋亡来影响各种组织的动态平衡以及组织功能。在以往对 IGF-1 的研究中, 认为它由肝脏产生, 是一种通过循环系统发挥功能的内分泌型生长因子<sup>[1]</sup>。最近, 在受应力刺激的肌肉、骨骼, 以及损伤的肌肉、神经组织中发现一种 IGF-1 变体在局部组织中高表达, 该变体除了包含成熟 IGF-1 的全部序列外, 在羧基端(C 端)多出 40 个氨基酸(Amino acid, aa)的延伸肽(E 肽), 因为这种因子在肌肉中具有应力刺激敏感性, 故命名为力生长因子(Mechano-growth factor, MGF)<sup>[2-5]</sup>。MGF 以自分泌/旁分泌的方式发挥功能, 与锻炼引起的肌肉肥大相关, 具有治疗肌肉萎缩或神经损伤的潜在价值, 因此受到广泛关注<sup>[6,7]</sup>。MGF 主要由发生应激反应的局部组织表达, 在体内的半衰期短<sup>[8]</sup>, 直接从动物体内获取该因子较困难。通过基因工程制备重组蛋白, 是大量获得该因子的有效途径。长期以来, 胰岛素和 IGF-1 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的表达有大量研究, 并获得成功<sup>[9,10]</sup>。本研究以 pET32a(+) 质粒作载体, 利用它提供的 T7 启动子, 以及 Trx 蛋白, 采用融合蛋白的表达策略获得 MGF 类似物 des(1-3)MGF。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pET32a(+)质粒、*E. coli* 菌株 BL21(DE3)均为 Novagen (Madison, WI, USA)产品。质粒提取试剂盒、PCR 试剂、内切酶、连接酶均购自 TaKaRa (Dalian, China)。所有蛋白层析操作在 AKTA explorer 100 上进行, 层析柱填料为 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden)产品。HPLC 分析在 Waters 600 (Waters, USA)上进行, 质谱分析用 Agilent 1100 MSD SL (USA)型质谱仪。Des(1-3)IGF-1 和 Enterokinase 分别为 Peninsula Laboratories 和 Sigma 公司产品。MC3T3-E1 购置中国科学院上海细胞库, Millicell-PCF 培养小室为 Millicell 公司产品。

### 1.2 重组质粒的构建

MGF cDNA 序列 (GenBank Accession No. AX147742)通过 RT-PCR 从拉伸刺激的成骨细胞中扩增获得<sup>[5]</sup>。再次通过 PCR 去除 cDNA 5'端 9 bp 的序列, 获得 des(1-3)MGF cDNA, 同时引入 *Bam*H I

位点以及肠激酶 (Enterokinase, EK) 酶切位点 [(Asp)4-Lys], 在 3' 端引入翻译终止密码以及 *Eco*R I 位点。将构建好的序列插入 pET32a(+)的 *Bam*H I 与 *Eco*R I 之间, 获得 N 端连接 Trx 融合配体的 pET32a(+)/des(1-3)MGF 重组质粒, Trx 与 des(1-3)MGF 之间有 6His、EK 酶切位点等序列连接。将构建好的重组质粒, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 进行扩增, 并通过酶切和测序鉴定。

### 1.3 重组蛋白的表达

鉴定正确的重组质粒转化 BL21(DE3)菌株, 挑取阳性克隆接种到含 100 u/mL Amp 的 LB 培养基 (LA)中, 30°C, 150 r/min 培养过夜作为种子液。摇瓶表达条件: 种子液 1:20 (V/V)转接到 LA 培养基, 培养物在 37°C, 250 r/min 的条件下培养, 通过检测 *OD*<sub>600</sub> 值控制细菌在对数生长期内进行诱导。发酵条件: 种子液 1:20 (V/V) 转接到 M9CA 培养基中, 37°C 培养, 低温诱导, 溶氧 50%, 氨水调节 pH 7.0。补料流加液: 30% 葡萄糖、5%胰蛋白胍、3%酵母提取物、50%甘油。对不同诱导温度、诱导时间和 IPTG 浓度进行优化实验。

诱导结束后, 将所有培养物收集, 4°C, 10 000 r/min 离心 10 min, 获细胞沉淀。将细胞沉淀在 -20°C 和 37°C 反复冻融两次, 然后 1:10 (W/V) 重悬在 Buffer A (50 mmol/L Tris-HCL, pH 9.5, 5 mmol/L EDTA, 0.2 mg/mL Lysozyme)中, 37°C 缓慢搅动 30 min, 再将获得的粘稠物置于冰上分批进行超声破菌, 每次 500 mL, 超声功率 50 W, 脉冲 15 s, 间歇 5 s, 共进行 50 次。超声至破菌溶液不再粘稠, 将溶液在 4°C, 12 000 r/min 离心 15 min, 沉淀和上清分别进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.4 重组蛋白的纯化

将离心获得的含 Trx/des(1-3)MGF 的上清溶液, 进行阴离子交换层析, 层析柱 Q Sepharose FF 先用 Buffer B (25 mmol/L Tris-HCL, pH 8.0)平衡, 上样结束, 继续用 Buffer B 复平衡去除非特异性结合蛋白, 结合蛋白用补加了 0.3 mol/L NaCl 的 Buffer B 洗脱。接着, 在蛋白洗脱液中补加 30 mmol/L 的咪唑, 加载 Ni<sup>2+</sup> Chelating Sepharose FF 层析柱, 上样前柱体经 Buffer C (25 mmol/L Tris-HCL, pH 8.0, 30 mmol/L Imidazole, 0.3 mol/L NaCl)平衡, 上样结束, 柱体用 Buffer C 再次平衡。牢固结合在层析柱上的目的蛋

白用含咪唑的 Buffer C 梯度洗脱。含融合蛋白的洗脱液, 在 Buffer C 中, 4°C, 透析 12 h, 去除咪唑。

纯化得到的 Trx/des(1-3)MGF 冻干浓缩至浓度 5 mg/mL, 然后以下述条件进行 EK 酶切: 2.5 mg 融合蛋白, 用酶 0.1 u, 37°C, 缓慢搅动, 反应 3 h。反应混合物 HCL 调节 pH 到 3.0, 通过 rpHPLC 进一步分离, 层析柱填料为 Source 15 RPC。流动相组成如下: H<sub>2</sub>O-0.1% CF<sub>3</sub>COOH (流动相 A), 80% CH<sub>3</sub>CN-0.1% CF<sub>3</sub>COOH (流动相 B)。rpHPLC 制备获得的 des(1-3)MGF 经质谱鉴定。

### 1.5 生物活性分析

MTT 法比较分析 des(1-3)MGF 和 des(1-3)IGF-1 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响<sup>[11]</sup>。细胞制成 3×10<sup>5</sup> 个/mL 的 α-MEM (含 10% 胎牛血清) 悬液, 100 μL/孔接种到 96 孔板, 培养 12 h, 更换无血清的新鲜 α-MEM, 进行血清饥饿 12 h 后加入含不同浓度 des(1-3)MGF 和 des(1-3)IGF-1 (10、20、50、100 ng/mL) 的 α-MEM, 继续培养 24 h, MTT 法分析细胞量。

通过 Milicell-PCF 迁移小室分析 des(1-3)MGF 对细胞迁移的影响<sup>[11,12]</sup>。在 24 孔板中加入含 25 ng/mL des(1-3)MGF 或 des(1-3)IGF-1 的无血清 α-MEM 300 μL/孔, 然后将 Milicell-PCF 小室置于其中, 再将无血清的 200 μL 细胞悬液接种在 Milicell-PCF 小室, 培养 24 h 后去除培养液, 棉签清除滤膜上表面未迁移细胞, 迁移到下表面的细胞经苏木素染色, 显微镜下对每组实验取 10 个视野计数, 然后取平均值, 比较细胞的迁移能力。

## 2 结果

### 2.1 pET32a(+)/des(1-3)MGF 重组质粒的构建

从拉伸刺激后的人成骨细胞中 RT-PCR 扩增 MGF cDNA (330 bp) 序列<sup>[5]</sup>, 再次设计引物, 在 MGF 基因序列的 N 端引入 *EcoR* I 位点和 EK 酶切位点, 为了避免第 2 位脯氨酸对 EK 酶切的抑制作用 [pET System Manual], 去除 5' 端 9 bp 的序列, 在 3' 端引入翻译终止密码, 以及 *BamH* I 位点, 重组序列共计 348 bp。构建好的 des(1-3)MGF 重组序列克隆入 pET32a(+) 质粒的 *BamH* I 与 *EcoR* I 之间, 使得 des(1-3)MGF 位于 Trx 蛋白的阅读框内, 实现 Trx/des(1-3)MGF 融合表达, 在 des(1-3)MGF 的 N 端引入 EK 酶切位点, 便于将 Trx 与 des(1-3)MGF 分离

(Fig. 1)。重组质粒在 DH-5α 菌株中扩增, 提取质粒经过酶切和测序鉴定(结果未显示)。

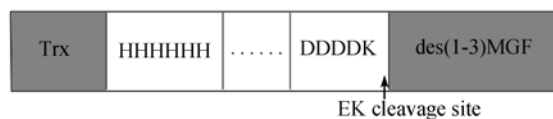


图 1 重组结构示意图

**Fig. 1 Schematic diagram of recombination construction**  
Des(1-3)MGF was expressed as fusions to the C-terminus of Trx. The fusion construction has six histidines, an enterokinase recognition, cleavage site positioned at the N-terminus of des(1-3)MGF

### 2.2 重组蛋白的表达

通过 OD 监测, 控制诱导时间点位于细菌的对数生长期。结果显示, IPTG 诱导后, 细胞的生长率明显降低, 摇瓶表达, 温控 30°C 诱导培养 4 h, 收获菌体湿重约 20 g/L, 破菌溶液经 SDS-PAGE 分析, 在分子量标准 31 kD 附近有明显的特异条带产生, Trx/des(1-3)MGF 融合蛋白的理论分子量为 33 kD, 可初步确定该特异条带即为融合蛋白, 约占细菌总蛋白的 15%, 融合蛋白主要位于上清液中 (Fig. 2, Lane S)。发酵罐发酵, 菌体产量约为 120 g/L, 融合蛋白表达可溶, 约占细菌总蛋白的 12%。通过对诱导起始时间、IPTG 浓度、温度、诱导持续培养时间的优化, 确定最佳表达条件是: 菌种以 1:20 (V/V) 的密度接种, 37°C 培养, 摇瓶培养 OD<sub>600</sub> 达到 0.6, 发酵罐 OD<sub>600</sub> 达到 3 开始诱导, IPTG 浓度为 0.2 mmol/L, 诱导过程中温度降低至 30°C, 继续培养 4 h。

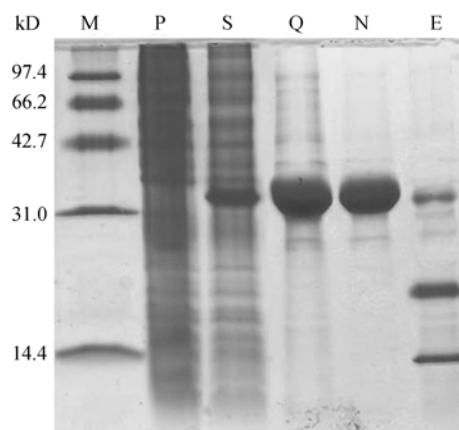


图 2 重组蛋白表达、纯化与酶切结果的 SDS-PAGE 分析

**Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expression, purification and EK cleavage**

M: molecular weight marker; P: pellet sample from the cell lysates; S: supernatant sample from the cell lysates; Q: fusion protein eluted from Q Sepharose FF column; N, fusion protein purified by Ni<sup>2+</sup> chelating Sepharose FF column; E: fusion protein cleaved by enterokinase

### 2.3 重组蛋白的纯化与分子量鉴定

对破菌上清液中的融合蛋白进行三步层析操作。首先通过离子交换层析, Trx/ des(1-3)MGF 融合蛋白的理论等电点(pI)为 5.9, 蛋白溶液 pH 8.0 能使融合蛋白净带负电荷, 通过 Q Sepharose FF 强阴离子交换层析使目的蛋白的浓度提高到 80% (Fig. 2 Lane Q)。第二步, 将第一步中的洗脱液加载  $\text{Ni}^{2+}$  Chelating Sepharose FF 亲和层析柱, 咪唑梯度洗脱,

融合蛋白主要在 80 至 120 mmol/L 咪唑浓度之间被充分洗脱, 洗脱的蛋白纯度可达 95% (Fig. 2 Lane N)。纯度达 95% 的融合蛋白透析除去咪唑, 按上述方法进行 EK 酶切, 3 h 即可将融合蛋白充分酶切, 酶切比例达到 80% (Fig. 2 Lane E)。rpHPLC 分离酶切混合物, 获纯度达到 98% 的 des(1-3)MGF (Fig. 3a)。质谱鉴定 des(1-3)MGF 的分子量为 12123.25, 在误差范围内与理论计算值 12123.77 一致 (Fig. 3b)。

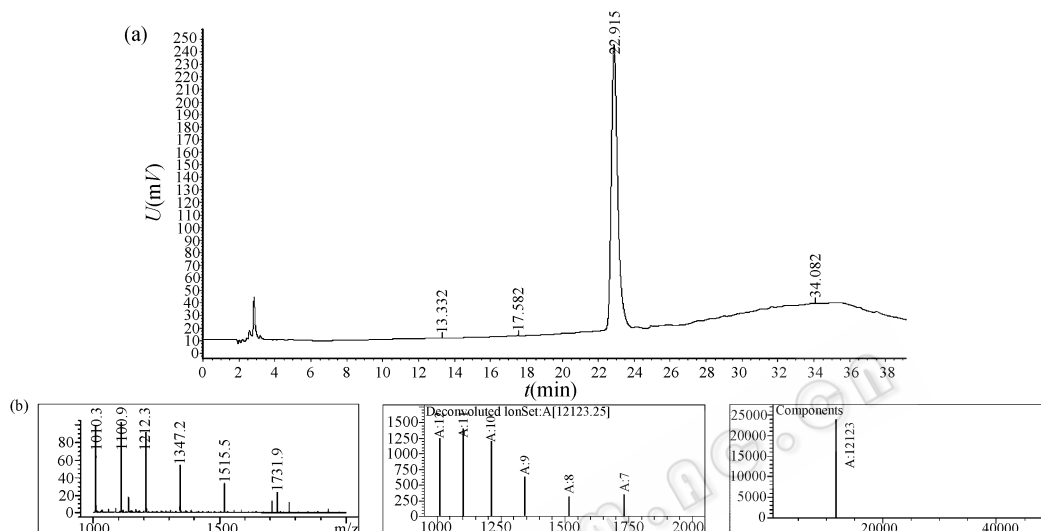


图 3 纯化蛋白的 HPLC 与质谱分析

Fig. 3 HPLC and Mass spectrometry analysis of purified des(1-3)MGF

(a) loading sample is the eluted fraction from Source 15 RPC column, 20  $\mu\text{L}$  sample be analyzed, the absorbance was monitored at  $\lambda_{214\text{nm}}$ , des(1-3)MGF absorbance peak were detected about 22.9 min, purity is 98%. (b) mass spectrometry analysis of purified des(1-3)MGF. Mw=12123

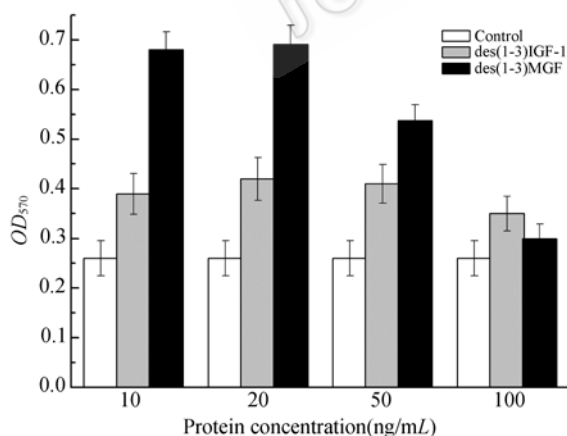


图 4 des(1-3)MGF 和 des(1-3)IGF-1 对 MC3T3-E1 增殖的影响

Fig. 4 Effect of des(1-3)MGF and des(1-3)IGF-1 on MC3T3-E1 proliferation

The result of MTT had shown, des(1-3)MGF significantly promoted MC3T3-E1 proliferation at concentrations 10, 20 and 50 ng/mL, but not 100 ng/mL. ( $P < 0.01$ , comparisons were made between des(1-3)MGF and control (or des(1-3)IGF-1))

### 2.4 des(1-3)MGF 对 MC3T3-E1 增殖和迁移的影响

MTT 法分析细胞增殖, 结果显示, 在 10、20、50 ng/mL 的浓度范围内, 与对照组相比 des(1-3)MGF 和 des(1-3)IGF-1 均能显著促进细胞增殖 ( $P < 0.01$ ), des(1-3)MGF 作用组与 des(1-3)IGF-1 作用组 OD 值相比较, 在 3 种浓度下前者分别是后者的 1.6、1.7、1.3 倍。在 100 ng/mL 的浓度下, 两种生长因子对细胞的增殖作用均减弱, 其中 des(1-3)MGF 组与对照组间没有显著差异 (Fig. 4)。

对细胞迁移能力的影响通过穿过 Milicell-PCF 小室底部有孔膜的细胞数目来评价 (Fig. 5a)。实验中生长因子的浓度采用 25 ng/mL 是因为文献报道该浓度的 IGF-1 具有明显的促细胞迁移能力<sup>[18]</sup>。每组实验取 10 个不同的视野细胞计数, 取平均值得: 对照组 33 个, MGF 组 216 个, IGF-1 组 96 个 (Fig. 5b)。因此 des(1-3)MGF 组细胞迁移数分别是对照组的 6.5

倍,是相同浓度 des(1-3)IGF-1 处理组的 2.5 倍。

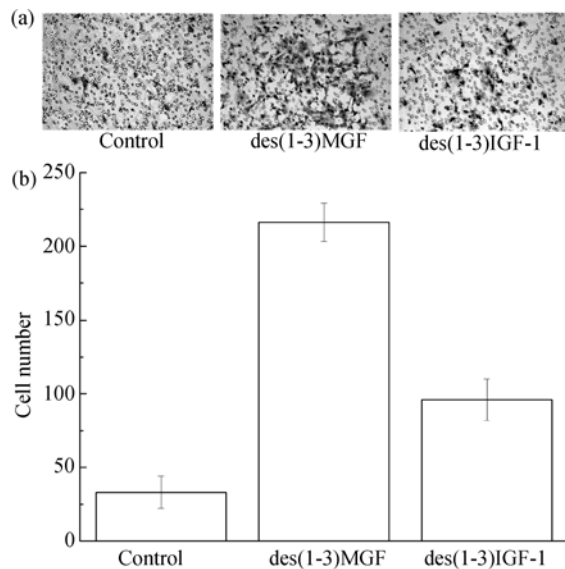


图 5 des(1-3)MGF 和 des(1-3)IGF-1 对 MC3T3-E1 细胞迁移的影响

Fig. 5 Effect of des(1-3)MGF and des(1-3)IGF-1 on MC3T3-E1 migration

(a) migrated cells in one random microscopic field ( $\times 200$ ), (b) average of 10 microscopic fields in each group

### 3 讨论

MGF 和 IGF-1 属于胰岛素家族成员,原核表达胰岛素取得了巨大成功,已经在临床上广泛用于糖尿病的治疗,IGF-1 与前胰岛素有 62%的同源性,也是一种具有重要临床价值的生长因子,并有 *E. coli* 表达 IGF-1 成功的报道<sup>[9,10]</sup>。MGF 是 IGF-1 的一种前体形式,因其有望成为治疗肌肉萎缩和损伤修复的新型药物而倍受关注<sup>[6-8,13,14]</sup>。MGF 包含 IGF-1 的全部序列,具有与 IGF-1 相同的二硫键配对方式,区别在于 MGF 具有 C 端 40 个 aa 的 E 肽。IGF-1 含有三对二硫键,在 *E. coli* 的胞质环境中很难形成正确的配对,因为错配几率高,体外复性 IGF-1 包含体较困难,以往的研究显示包含体 IGF-1 的复性率最多只有 50%<sup>[10,15]</sup>。因为 MGF 与 IGF-1 有 70 个 aa 一致的序列,我们推测 MGF 也面临 *E. coli* 表达无活性的问题。将目的蛋白与可溶性好的蛋白融合表达是提高蛋白可溶性的有效策略,我们分别采用 pMAL-c2x 和 pET32a(+)两种质粒构建 des(1-3)MGF 融合表达系统,前者实现麦芽糖结合蛋白(MBP)和 des(1-3)MGF 的融合表达,后者是硫氧还蛋白(Trx)

与 des(1-3)MGF 融合表达。MBP/des(1-3)MGF 能实现高表达,但产物仍以包含体为主(数据未显示)。Trx/des(1-3)MGF 融合蛋白的表达,通过改变诱导温度来调节蛋白的表达速度,改变蛋白折叠的热力学环境,实现了融合蛋白可溶表达。

pET32a(+)质粒中,在 Trx 序列之后有紧接着的 6His 标签,利用 His 与  $\text{Ni}^{2+}$  间的配位亲和作用,使得融合蛋白得到了有效纯化。为了从融合蛋白中分离出目标蛋白,在 des(1-3)MGF 的 N 端设计 EK 酶切位点,酶切位点邻近的氨基酸残基会对酶切效率产生影响,尤其是紧随其后的脯氨酸对酶切具有抑制作用。完整 MGF 的第二位脯氨酸可能表现出这种抑制作用,因此有必要去除或突变。在哺乳动物中存在一种 N 端缺少 3 个 aa 的截短型 IGF-1 (des(1-3)IGF-1),研究发现 des(1-3)IGF-1 具有比完整 IGF-1 更高的活性<sup>[16,17]</sup>。受到该现象的启发,我们截去 MGF N 端 3 个 aa,在不降低 MGF 活性的前提下提高了酶切效率,后续活性实验显示这种截短型 MGF 具有非常高的促进细胞增殖和迁移的活性。

目前对 MGF 功能的研究显示,MGF 能够明显的促进应力损伤后的肌肉再生,并认为这种功能是由于 MGF 激活了肌肉内处于静息状态的肌卫星细胞增殖,并且促进细胞迁移,从而参与肌纤维融合完成再生修复<sup>[8,18]</sup>。体外实验证实了这一点,比较 MGF 和 IGF-1 转染的 C2C12 成肌细胞发现,MGF 能促进该细胞增殖抑制分化,而 IGF-1 具有促进分化的作用<sup>[19]</sup>,同时 Philippe 等的实验显示 MGF 的 C 端 E 肽具有促进 C2C12 细胞迁移的功能<sup>[12]</sup>。以往的实验使我们认为 MGF 也可能与应力刺激下骨密质的增加有关<sup>[5]</sup>,本实验中利用成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1,研究所制备的 des(1-3)MGF 可能的生物活性。增殖实验显示,我们所制备的 des(1-3)MGF 在一定的浓度范围内比 des(1-3)IGF-1 具有更高的促进 MC3T3-E1 增殖的作用,其中 10、20 ng/mL 的促进作用最大,在 50、100 ng/mL 的浓度下对细胞的增殖促进作用减弱,造成这种现象的原因,一方面可能存在促细胞增殖的浓度阈值,另一方面可能与样品中存在某些细胞毒性物质的浓度相应提高有关。细胞迁移实验显示,25 ng/mL 的 des(1-3)MGF 要比同浓度的 des(1-3)IGF-1 对细胞迁移的促进作用更为明显。目前对于 MGF 与 IGF-1 表现出来的功能差异,

主要认为是由于 MGF 的 C 端 E 肽所致, 并认为细胞表面存在一种 E 肽的特殊受体, 因此 MGF 可能不通过 IGF-1R 进行信号转导, 而是存在独立的信号转导通路, 并且 MGF 通过调节细胞中纤维蛋白溶解系统和基质金属蛋白酶系统的表达促进细胞迁移<sup>[12,19]</sup>。上述实验表明, 我们通过原核表达的 MGF 类似物 des(1-3)MGF 具备相应的生物活性, 这将有助于对 MGF 进行更深入的结构和功能研究。

## REFERENCES

- [1] Le Roith D, Bondy C, Yakar S, *et al.* The somatomedin hypothesis. *Endocrine Reviews*, 2001, **22**(1): 53–74.
- [2] Yang S, Alnaqeeb M, Simpson H, *et al.* Cloning and characterization of an IGF-1 isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *J Muscle Res Cell Motil*, 1996, **17**(4): 487–495.
- [3] Dłuzniewska J, Sarnowska A, Beresewicz M, *et al.* A strong neuroprotective effect of the autonomous C-terminal peptide of IGF-1 Ec (MGF) in brain ischemia. *FASEB J*, 2005, **19**(13): 1896–1898.
- [4] Tang LL, Li DJ, Wang YL. Mechanical signals induced gene alternative splicing and the expression of mechano growth factor. *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(5): 454–459.  
唐丽灵, 李大军, 王远亮. 外力作为信号诱导基因的选择性剪接与力生长因子表达. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(5): 454–459.
- [5] Xian CY, Wang YL, Zhang BB, *et al.* Alternative splicing and expression of the insulin-like growth factor gene (IGF-1) in osteoblasts under mechanical stretch. *Chin Sci Bull*, 2006, **51**(22): 2731–2736.
- [6] Goldspink G, Goldspink P. US patent, 20050048028A1. 2005-03-03.
- [7] Goldspink G, Terenghi G. US patent, 20020083477A1. 2002-06-27.
- [8] Goldspink G. Mechanical signals, IGF-I gene splicing, and muscle adaptation. *Physiology(Bethesda)*, 2005, **20**: 232–238.
- [9] Kim SO, Lee YI. High-level expression and simple purification of recombinant human insulin-like growth factor I. *J Biotechnol*, 1996, **48**(1-2): 97–105.
- [10] Moriyama S, Duguay SJ, Conlon JM, *et al.* Recombinant coho salmon insulin-like growth factor I. Expression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Eur J Biochem*, 1993, **218**(1): 205–211.
- [11] Zou YF, Chen YH, Jiang YQ, *et al.* Targeting matrix metalloproteinases and endothelial cells with a fusion peptide against tumor. *Cancer Res*, 2007, **67**(15): 7295–7300.
- [12] Mills P, Lafreniere JF, Benabdallah BF, *et al.* A new pro-migratory activity on human myogenic precursor cells for a synthetic peptide within the E domain of the mechano growth factor. *Exp Cell Res*, 2007, **313**(3): 527–537.
- [13] Ates K, Yang SY, Orrell RW, *et al.* The IGF-I splice variant MGF increases progenitor cells in ALS, dystrophic, and normal muscle. *FEBS Lett*, 2007, **581**(14): 2727–2732.
- [14] Gorecki DC, Beresewicz M, Zablocka B. Neuroprotective effects of short peptides derived from the Insulin-like growth factor 1. *Neurochem Int*, 2007, **51**(8): 451–458.
- [15] Milner SJ, Carver JA, Ballard FJ, *et al.* Probing the disulfide folding pathway of insulin-like growth factor-I. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **62**(6): 693–703.
- [16] Carlsson-Skwirut C, Lake M, Hartmanis M, *et al.* A comparison of the biological activity of the recombinant intact and truncated insulin-like growth factor 1 (IGF-1). *Biochim Biophys Acta*, 1989, **1011**(2-3): 192–197.
- [17] Bagley CJ, May BL, Szabo L, *et al.* A key functional role for the insulin-like growth factor 1 N-terminal pentapeptide. *Biochem J*, 1989, **259**(3): 665–671.
- [18] Musaro A, Giacinti C, Borsellino G, *et al.* Stem cell-mediated muscle regeneration is enhanced by local isoform of insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(5): 1206–1210.
- [19] Yang SY, Goldspink G. Different roles of the IGF-I Ec peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation. *FEBS Lett*, 2002, **522**(1-3): 156–160.