

巨噬细胞迁移抑制因子对人胚胎干细胞存活、增殖和分化的影响

黄婷^{1, 2, 3}, 郑晓晗^{1, 2, 3}, 钟远吉^{1, 2, 3}, 魏艳召^{1, 2, 3}, 魏绪芳², 曹旭东⁴, 冯晓丽^{1, 2, 3}, 赵振强^{1, 2, 3}

<https://doi.org/10.12307/2025.020>

投稿日期: 2023-11-13

采用日期: 2023-12-28

修回日期: 2024-02-05

在线日期: 2024-03-01

中图分类号:

R459.9; R318; R394.2

文章编号:

2095-4344(2025)07-01380-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 巨噬细胞迁移抑制因子对人胚胎干细胞存活、增殖和分化的调控

- 人胚胎干细胞培养
- CCK-8 法检测并绘制人胚胎干细胞生长曲线
 - 酶联免疫吸附法检测人胚胎干细胞自分泌巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)水平
 - 分为对照组、外源性 MIF(30, 100, 300 ng/mL)组、MIF 抑制剂 ISO-1(2, 7, 21 μmol/L)组、MIF(100 ng/mL)+ISO-1(2, 7, 21 μmol/L)组, CCK-8 法检测各组细胞的增殖活性
 - CRISPR/Cas9 双载体慢病毒质粒系统敲除人胚胎干细胞 MIF 基因, RT-qPCR 检测敲除效率, CCK-8 检测敲除 MIF 后细胞的增殖活性, 光镜下观察细胞生长情况
 - RT-qPCR、免疫荧光、蛋白质印迹法检测分别添加外源性 MIF(100 ng/mL)和 CXCR4 中和抗体(100 ng/mL)后自我更新因子(KLF4、c-MYC、NANOG、OCT4、SOX2)和分化转录因子(FOXA2、OTX2)的表达

结论:

△人胚胎干细胞自分泌 MIF, 质量浓度约为 20 ng/mL。
△生理浓度的 MIF 不促进人胚胎干细胞的增殖, 但对其存活至关重要。
△高于生理浓度的 MIF 对人胚胎干细胞的初步分化有一定作用。

文题释义:

胚胎干细胞: 来源于囊胚内部的细胞团, 具有在体外无限增殖(自我更新)的能力, 并且可以分化成所有3个胚层的细胞(多能性), 这些特性使得胚胎干细胞在细胞替代疗法、药物研发、再生医学等基础科学和临床研究中具有极其重要的价值。

巨噬细胞迁移抑制因子: 是一种多效性细胞因子, 广泛表达于多种组织和细胞中, 可调控多种细胞的增殖、存活、分化和迁移等生物学过程。

摘要

背景: 巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种具有多效性作用的细胞因子, 可以在不同类型干细胞中自分泌并且能调控细胞的增殖、分化和迁移。课题组前期研究证实人胚胎干细胞自分泌MIF, 且在培养液中浓度基本固定。然而, MIF是否参与了人胚胎干细胞的存活、增殖和分化尚不清楚。

目的: 探究MIF对人胚胎干细胞存活、增殖和分化的作用。

方法: ①培养人胚胎干细胞H9, CCK-8法检测并绘制细胞生长曲线, 采用酶联免疫吸附法定量检测培养基中MIF水平。②为了明确外源性MIF对人胚胎干细胞存活、增殖的影响, 分为: 对照组, 细胞在干细胞培养基中正常培养; 外源性MIF组, 在干细胞培养基中分别添加30, 100, 300 ng/mL的MIF; MIF抑制剂ISO-1组, 在干细胞培养基中分别添加2, 7, 21 μmol/L的ISO-1; MIF+ISO-1组, 在不同浓度ISO-1组中分别添加100 ng/mL MIF, 采用CCK-8法检测上述各组细胞活力。③为进一步阐明MIF基因对人胚胎干细胞存活、增殖的影响, 采用CRISPR-Cas9技术构建MIF敲除的H9细胞系, 观察建系情况。④为了明确高浓度MIF对人胚胎干细胞初步分化是否有影响, 在培养基中分别添加100 ng/mL MIF和100 ng/mL CXCR4中和抗体, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)、免疫细胞荧光、蛋白质印迹法(Western blot)检测干细胞自我更新因子(KLF4、c-MYC、NANOG、OCT4、SOX2)及分化转录因子(FOXA2、OTX2)的表达水平。

结果与结论: ①人胚胎干细胞H9的对数生长期为3~6 d, 正常生长的情况下自分泌MIF水平约为20 ng/mL, 与细胞量无关; ②与对照组相比, 添加不同质量浓度MIF对人胚胎干细胞的增殖无影响($P > 0.05$); ISO-1明显抑制人胚胎干细胞的增殖, ISO-1浓度越大, 抑制越明显($P < 0.05$); ISO-1中添加MIF可以减少ISO-1的抑制作用($P < 0.05$); ③RT-qPCR检测MIF基因敲除约50%后, 人胚胎干细胞生长活力显著降低并且无法建系成功; ④在培养基中添加100 ng/mL外源性MIF, 自我更新转录因子KLF4的mRNA、蛋白及荧光表达水平均下降; 分化因子FOXA2的mRNA、蛋白及荧光表达水平均上升; ⑤在培养基中添加100 ng/mL CXCR4中和抗体, KLF4的mRNA及蛋白表达水平均上升; FOXA2的mRNA及蛋白表达水平均下降, 与MIF组表达趋势相反。综上所述, 人胚胎干细胞自分泌的MIF是其存活所必需的; 培养基中额外添加MIF并不能促进人胚胎干细胞增殖, 但可以使自我更新因子KLF4表达下降, 转录因子FOXA2表达上升, 为下一步探明MIF对人胚胎干细胞分化的影响及机制提供了线索, MIF-CXCR4轴在其中起到一定的调控作用。

关键词: 巨噬细胞迁移抑制因子; 人胚胎干细胞; 自分泌; 存活; 分化; CXCR4; KLF4; FOXA2

Effects of macrophage migration inhibitory factor on survival, proliferation, and differentiation of human embryonic stem cells

Huang Ting^{1, 2, 3}, Zheng Xiaohan^{1, 2, 3}, Zhong Yuanji^{1, 2, 3}, Wei Yanzhao^{1, 2, 3}, Wei Xufang², Cao Xudong⁴, Feng Xiaoli^{1, 2, 3}, Zhao Zhenqiang^{1, 2, 3}

¹海南医学院第一附属医院神经内科, 海南省海口市 570100; ²海南医学院, 海南省海口市 570100; ³海南省热带脑科学研究与转化重点实验室, 海南省海口市 570100; ⁴渥太华大学, 加拿大渥太华 K1N6N5

第一作者: 黄婷, 女, 1993年生, 江苏省连云港市人, 汉族, 海南医学院在读硕士, 主要从事干细胞移植与神经系统疾病的研究。

通讯作者: 赵振强, 博士, 主任医师, 海南医学院第一附属医院神经内科, 海南省海口市 570100; 海南医学院, 海南省海口市 570100; 海南省热带脑科学研究与转化重点实验室, 海南省海口市 570100

共同通讯作者: 冯晓丽, 硕士, 主治医师, 海南医学院第一附属医院神经内科, 海南省海口市 570100; 海南医学院, 海南省海口市 570100; 海南省热带脑科学研究与转化重点实验室, 海南省海口市 570100

<https://orcid.org/0000-0001-5264-2265> (黄婷)

基金资助: 国家自然科学基金(81860238), 项目负责人: 赵振强; 海南省重点研发计划(ZDYF2018233), 项目负责人: 赵振强; 海南省科技厅高层次人才项目(821RC694), 项目负责人: 赵振强; 海南省国际科技合作人才与交流项目(G20241024014E), 项目负责人: 赵振强; 海南省临床医学中心建设项目(琼卫医函[2021]276号); 海南省卫生健康行业科研项目(21A200354), 项目负责人: 冯晓丽

引用本文: 黄婷, 郑晓晗, 钟远吉, 魏艳召, 魏绪芳, 曹旭东, 冯晓丽, 赵振强. 巨噬细胞迁移抑制因子对人胚胎干细胞存活、增殖和分化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(7):1380-1387.



¹Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570100, Hainan Province, China; ²Hainan Medical University, Haikou 570100, Hainan Province, China; ³Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Brain Research and Translation, Haikou 570100, Hainan Province, China;

⁴University of Ottawa, Ottawa K1N6N5, Ontario, Canada

Huang Ting, Master candidate, Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570100, Hainan Province, China; Hainan Medical University, Haikou 570100, Hainan Province, China; Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Brain Research and Translation, Haikou 570100, Hainan Province, China

Corresponding author: Zhao Zhenqiang, MD, Chief physician, Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570100, Hainan Province, China; Hainan Medical University, Haikou 570100, Hainan Province, China; Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Brain Research and Translation, Haikou 570100, Hainan Province, China

Co-corresponding author: Feng Xiaoli, Master, Attending physician, Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570100, Hainan Province, China; Hainan Medical University, Haikou 570100, Hainan Province, China; Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Brain Research and Translation, Haikou 570100, Hainan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a pleiotropic cytokine, which is secreted in different types of stem cells and can regulate the proliferation, differentiation and migration of various types of stem cells. Our previous research has confirmed that human embryonic stem cells secrete MIF and that its concentration in the culture medium is relatively stable. However, whether MIF is involved in the survival, proliferation and differentiation of human embryonic stem cells remains unclear.

OBJECTIVE: To investigate the effects of MIF on survival, proliferation, and differentiation of human embryonic stem cells.

METHODS: (1) Human embryonic stem cells H9 were cultured. The growth curve of cells was detected and plotted by CCK-8 assay. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the level of MIF in the medium. (2) To determine the effects of exogenous MIF on the survival and proliferation of human embryonic stem cells, different groups were established: the control group, which was cultured in stem cell medium without any modifications; the exogenous MIF group, which was treated with different concentrations (30, 100, 300 ng/mL) of MIF in the stem cell medium; the MIF inhibitor ISO-1 group, which was treated with different concentrations (2, 7, 21 μ mol/L) of ISO-1 in the stem cell medium; and the MIF+ISO-1 group, which was treated with different concentrations of ISO-1 along with 100 ng/mL of MIF. Cell viability was assessed using the CCK-8 assay. (3) To further elucidate the effect of MIF gene on survival and proliferation of human embryonic stem cell, the MIF knockout H9 cell line was constructed by CRISPR-Cas 9 technology to observe the lineage establishment. (4) To determine the effect of high concentrations of MIF on human embryonic stem cell differentiation, 100 ng/mL MIF and 100 ng/mL of CXCR4 neutralizing antibody were separately added to the normal stem cell culture medium. The expression levels of self-renewal factors (KLF4, c-MYC, NANOG, OCT4, and SOX2) and differentiation transcription factors (FOXA2, OTX2) were measured using real-time quantitative polymerase chain reaction, immunofluorescence staining, and western blot analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The logarithmic growth phase of H9 cells was between 3–6 days. Under normal growth conditions, human embryonic stem cells secreted MIF at a concentration of approximately 20 ng/mL, independent of cell quantity. (2) Compared to the control group, the addition of different concentrations of MIF had no effect on the proliferation of human embryonic stem cells ($P > 0.05$). ISO-1 significantly inhibited the proliferation of human embryonic stem cells, with a stronger inhibition observed at higher concentrations of ISO-1 ($P < 0.05$). The addition of MIF in the presence of ISO-1 reduced the inhibitory effect of ISO-1 ($P < 0.05$). (3) Real-time quantitative polymerase chain reaction showed that knocking out 50% of the MIF gene resulted in a significant decrease in the growth vitality of human embryonic stem cells and failure to establish cell lines. (4) Adding 100 ng/mL exogenous MIF to the culture medium resulted in a decrease in the mRNA, protein, and fluorescence expression levels of the self-renewal transcription factor KLF4, while the mRNA, protein, and fluorescence expression levels of the differentiation factor FOXA2 increased. (5) When 100 ng/mL CXCR4 neutralizing antibody was added to the culture medium, the mRNA and protein expression levels of KLF4 increased, while the mRNA and protein expression levels of FOXA2 decreased, contrary to the expression trend observed in the MIF group. In conclusion, the endogenous secretion of MIF by human embryonic stem cells is essential for their survival. The addition of MIF to the culture medium does not promote the proliferation of human embryonic stem cells. However, it can lead to a decrease in the expression of the self-renewal factor KLF4 and an increase in the expression of the transcription factor FOXA2. This provides a clue for further investigation into the effects and mechanisms of MIF on the differentiation of human embryonic stem cells. The MIF-CXCR4 axis plays a regulatory role in this process.

Key words: macrophage migration inhibitory factor; human embryonic stem cell; autocrine; survival; differentiation; CXCR4; KLF4; FOXA2

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 81860238 (to ZQZ); Hainan Key Research & Development Program, No. ZDYF2018233 (to ZQZ); High-Level Talent Project of Hainan Provincial Science and Technology Department, No. 821RC694 (to ZQZ); Hainan International Science and Technology Cooperation Talent and Exchange Project, No. G20241024014E (to ZQZ); Hainan Clinical Medical Center Construction Project, No. QWYH[2021]276; Hainan Health Industry Scientific Research Project, No. 21A200354 (to FXL)

How to cite this article: HUANG T, ZHENG XH, ZHONG YI, WEI YZ, WEI XF, CAO XD, FENG XL, ZHAO ZQ. Effects of macrophage migration inhibitory factor on survival, proliferation, and differentiation of human embryonic stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(7):1380-1387.

0 引言 Introduction

胚胎干细胞是一类具有特殊潜能的细胞, 来源于囊胚期胚胎的内部细胞团, 能够在体外无限扩增(自我更新), 同时具有分化为任何类型体细胞的潜能(多能性)^[1]。人胚胎干细胞自我更新和多能性的维持需要多种转录因子的参与, 包括 OCT4、KLF4、SOX2、NANOG、c-MYC 等, 抑制转录因子的表达将会导致自我更新能力和多能性丧失^[2]。胚胎干细胞作为一种多能性细胞, 在药物研发、体外发育模型的构建及干细胞治疗等方面具有巨大的潜力和广阔的应用前景^[3-4]。

巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)作为一种多效性细胞因子, 广泛表达于各种类型细胞和组织中, 包括免疫和神经系统细胞、垂体前叶细胞、上皮细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、滑膜成纤

维细胞以及间充质细胞等, 参与了多种生理和病理过程, 例如: 白细胞募集、炎症、免疫反应、细胞增殖、细胞分化、肿瘤发生和糖皮质激素反调节等^[5-6]。MIF 是一种蛋白三聚体, 由 114 个氨基酸组成, 分子质量为 12.5 kD, 其基因位于 22 号染色体(22q11.23)上^[7]。MIF 催化位点位于 pro-1、Lys-32、Ile-64、Tyr-95 和 Asn-97 附近, (S, R)-3-(4-羟基苯基)-4, 5-二氢-5-异噻唑乙酸甲酯(ISO-1)能够与该位点结合从而抑制 MIF 活性^[7]。大多数研究表明 MIF 主要位于细胞质, 储存在囊泡样结构中, 并在某些因素刺激下分泌出来, 有研究报道分泌体和细胞核中也有 MIF 的定位^[8]。MIF 以自分泌和旁分泌方式通过与受体 CD74、CD44、CXCR2、CXCR4 和 CXCR7 形成复合体发挥其生物学功能^[9]。早期的研究认为受体 CD74 在 MIF 的信号转导中起到不可或缺的作用, 后期研究表明 MIF 可以与

CXCR2、CXCR4 和 CXCR7 直接结合发挥作用^[10-11]。

课题组前期研究已经证实,人胚胎干细胞可以自分泌 MIF,且在培养基中浓度基本固定^[12],但其对人胚胎干细胞存活、增殖、分化的影响及机制仍然不清楚,该研究旨在揭示 MIF 对人胚胎干细胞存活、增殖和分化的作用,为人胚胎干细胞研究提供新理论。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞分子生物学体外实验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 9 月至 2023 年 3 月在海南省热带脑科学研究与转化重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验细胞、试剂 人胚胎干细胞系 H9 购自上海中乔新舟生物科技有限公司(ZQ0692);293T 细胞购自中科院细胞库(SCSP-502)。mTeSR™1 Basal Medium、mTeSR™1 5×Supplement、Y-27632(STEMCELL,加拿大);Matrigel® Matrix(Corning,美国);人 MIF 酶联免疫吸附测定试剂盒(江莱生物,中国);Lipofectamine 2000、Trizol(Invitrogen,美国);Lenti-Easy Packaging Mix(吉凯基因,中国);DMEM/F12、Accutase、Opti-MEM(Gibco,美国);氯喹、嘌呤霉素(MCE,美国);Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for RT-qPCR、Hieff® RT-qPCR SYBR Green Master Mix(翌圣生物,中国);CCK-8 试剂盒(白鲨,中国);抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠(碧云天,中国);抗 SOX2、抗 KLF4、抗 NANOG、抗 c-MYC、抗 OCT4、抗 FOXA2、抗 OTX2(Proteintech,美国);488 荧光标记的驴抗兔、488 荧光标记的驴抗鼠(Abcam,英国)。

1.3.2 实验仪器 CO₂ 培养箱(ESCO,新加坡);BDS400 倒置生物显微镜(重庆奥特光学,中国);半排式细胞超净台(青岛海尔特种电器有限公司,中国);SC-3612 低速离心机(安徽中科中佳,中国);酶标仪(Bio Tek,美国);实时荧光定量 PCR 仪、基因扩增仪(Eppendorf,德国);超微量紫外可见分光光度计(杭州遂真生物技术有限公司,中国);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司,中国);荧光倒置显微镜(Olympus,日本);SDS-PAGE 电泳仪(Bio-Rad,美国);激光共聚焦显微镜(Zeiss 德国)。

1.4 实验方法

1.4.1 人胚胎干细胞培养 人胚胎干细胞系 H9 在 mTeSR™1 培养基中,放置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 和饱和湿度的培养箱常规培养,取对数生长期且状态良好的细胞用于后续实验。

1.4.2 MIF 酶联免疫吸附实验 收集处于对数生长期的 H9 细胞,以 5×10⁴ 个/孔密度接种于 12 孔板,设置 3 个复孔,每天换液,培养 72 h,取离心后的人胚胎干细胞培养上清液,使用 MIF ELISA 试剂盒测定上清液中 MIF 水平。

1.4.3 CRISPR/Cas9 技术敲除人胚胎干细胞中的 MIF 基因 根据 MIF 序列(NCBI:NM002415)设计 3 条 sgRNA,序列分别如下:sgRNA-1:5'-GAG GAA CCC GTC CGG CAC GG-3',sgRNA-2:5'-GAC CAG CTC ATG GCC TTC GG-3',sgRNA-3:5'-TTG GTG TTT ACG ATG AAC AT-3',阴性对照 NC-sgRNA 序列为 5'-CGC TTC CGC GGC CCG TTC AA-3'。根据 sgRNA 序列的不同,分为 1-sgRNA 组、2-sgRNA 组、3-sgRNA 组、阴性对照 NC-sgRNA 组以及对照组,对照组不做处理,将其余各组 sgRNA 序列克隆至 lenti-sgRNA-EGFP 质粒中,同时构建 Lenti-CAS9-puro 质粒。靶向 sgRNA 的设计与载体构建委托南京英瀚斯生物科技有限公司完成。将 lenti-sgRNA-EGFP 质粒 DNA 溶液、Lenti-Easy Packaging Mix、Opti-MEM 的混合液体系与 Lipofectamine 2000、Opti-MEM 的混合液体系进行混合,形成 DNA 与 Lipofectamine 2000 的转染复合物,转移至添加 Opti-MEM 培养基的 293T 细胞中,培养 8 h 后更换含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h,收集含慢病毒的细胞上清液,进行过滤、浓缩、纯化、分装。H9 细胞加入 Lenti-CAS9 慢病毒,感染 3 d 后进行嘌呤霉素筛选,然后感染上述包装好的各组 sgRNA 慢病毒,在荧光显微镜下观察 GFP 表达,当荧光率达 80% 以上时收集细胞,接种后进行单克隆筛选及鉴定。

1.4.4 RNA 提取和实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 收集 1-sgRNA 组、2-sgRNA 组、3-sgRNA 组、阴性对照 NC-sgRNA 组的单克隆细胞以及对照组 H9 细胞,使用 Trizol 从各组细胞中提取总 RNA,使用 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 将总 RNA 反转录成 cDNA,使用 Hieff® RT-qPCR SYBR Green Master Mix 配制扩增体系放到实时荧光 PCR 定量检测仪内进行 RT-qPCR 分析,检测 MIF 的 mRNA 表达。

收集外源性添加 MIF(100 ng/mL)或 CXCR4 中和性抗体(100 ng/mL)培养 48 h 后的 H9 细胞以及对照 H9 细胞,使用 Trizol 从各组细胞中提取总 RNA,使用 Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 将总 RNA 反转录成 cDNA,使用 Hieff® RT-qPCR SYBR Green Master Mix 配制扩增体系放到实时荧光 PCR 定量检测仪内进行 RT-qPCR 分析,检测 KLF4、c-MYC、NANOG、OCT4、SOX2、FOXA2 和 OTX2 的 mRNA 表达。RT-qPCR 使用以下热循环条件:在 95℃ 下预变性 5 min;然后进行 40 个循环(即在 95℃ 下变性 10 s,在 55℃ 下退火 20 s,在 72℃ 下延伸 20 s)。引物序列见表 1。每个 RT-qPCR 实验均重复 3 次。采用 2^{-ΔΔCt}

方法计算 mRNA 表达量，内参为 GAPDH。

表 1 | RT-qPCR 引物序列
Table 1 | RT-qPCR primer sequences

基因名称	引物序列 (5'-3')
H-MIF-F	ACA GCA TCG GCA AGA TCG G
H-MIF-R	GCC GCG TTC ATG TCG TAA TAG
H-OCT4-F	CAA AGC AGA AAC CCT CGT GC
H-OCT4-R	AAC CAC ACT CGG ACC ACA TC
H-KLF4-F	ATG CTC ACC CCA CCT TCT TC
H-KLF4-R	TTC TCA CCT GTG TGG GTT CG
H-NANOG-F	GGA TCC AGC TTG TCC CCA AA
H-NANOG-R	TGT TTG CCT TTG GGA CTG GT
H-SOX2-F	GAC AGT TAC GCG CAC ATG AA
H-SOX2-R	TAG GTC TGC GAG CTG GTC AT
H-c-MYC-F	CCC TCC ACT CGG AAG GAC TA
H-c-MYC-R	GCT GGT GCA TTT TCG GTT GT
H-FOXA2-F	ACT CCT CCG TGA GCA ACA TG
H-FOXA2-R	CTC AGG CTG GGA CTC AAG TG
H-OTX2-F	GCA GTC AAT GGG CTG AGT CT
H-OTX2-R	AAA CCA TAC CTG CAC CCT CG
H-GAPDH-F	GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT
H-GAPDH-R	GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG

表注：MIF 为巨噬细胞迁移抑制因子。

1.4.5 CCK-8 法检测细胞活性 将 H9 细胞以 6 000 个 / 孔密度接种于 96 孔板，每组设置 3 个复孔，培养 24，48，72 h，每孔加入 10 μ L CCK-8，在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h，用酶标仪检测 450 nm 波长的吸光度值。

将 H9 细胞以 6 000 个 / 孔密度接种于 96 孔板，每组设置 3 个复孔，然后加入不同质量浓度的 MIF(30，100，300 ng/mL)、不同浓度 MIF 抑制剂 ISO-1(2，7，21 μ mol/L) 或 MIF(100 ng/mL)+ISO-1(2，7，21 μ mol/L)，分别培养 24，48，72 h，每孔加入 10 μ L CCK-8，在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h，用酶标仪检测 450 nm 波长的吸光度值。

将 H9 细胞、敲减 MIF 后的 H9 细胞以 6 000 个 / 孔密度接种于 96 孔板，每组设置 3 个复孔，每天换液，培养 72 h，每孔加入 10 μ L CCK-8，在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 h，用酶标仪检测 450 nm 波长的吸光度值。

1.4.6 免疫荧光实验 收集处于对数生长期的 H9 细胞，以 2×10^4 个 / 孔密度接种于放有细胞爬片的 24 孔板，将细胞分为对照组和 MIF 组，对照组加入正常 mTeSR1 培养基，MIF 组加入含 MIF(100 ng/mL) 的 mTeSR1 培养基。培养 48 h 后用 PBS 清洗，加入 40 g/L 多聚甲醛冰上孵育 15 min，再用预冷的 PBS 清洗，加入 1 mL 封闭液孵育 30 min，分别与抗 SOX2、抗 KLF4、抗 NANOG、抗 c-MYC、抗 OCT4、抗 FOXA2、抗 OTX2(稀释度为 1 : 100) 在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，PBS 清洗，避光孵育 488 荧光标记的驴抗兔和驴抗鼠二抗 (稀释度为 1 : 400)1 h，PBS 清洗，加入 DAPI 染色液覆盖细胞，孵育 5 min，封固、晾干后，使用蔡司共焦激光扫描显微镜获取图像。

1.4.7 Western blot 实验 收集处于对数生长期的 H9 细胞，以 3×10^5 个 / 孔密度接种于 6 孔板，将细胞分为对照组、

MIF 组和 CXCR4 中和抗体组，对照组加入正常 mTeSR1 培养基，MIF 组加入含 MIF(100 ng/mL) 的 mTeSR1 培养基，CXCR4 中和抗体组加入含 CXCR4 中和抗体 (100 ng/mL) 的 mTeSR1 培养基。培养 48 h 后用 PBS 清洗，使用 RIPA 高效裂解液提取各组细胞中的总蛋白，使用 BCA 法测量蛋白浓度。加样后根据不同蛋白分子质量大小确定电压和电流条件，120 V 电压分离一段时间，转移至 PVDF 膜上，以 250 mA 恒定电流转膜 90 min，转膜完成后的 PVDF 膜用 Western 快速封闭液封闭 10 min，分别与抗 SOX2、抗 KLF4、抗 NANOG、抗 c-MYC、抗 OCT4、抗 FOXA2、抗 OTX2(稀释度为 1 : 1 000) 在 4 $^{\circ}$ C 摇床上孵育过夜，第 2 天回收一抗，TBST 清洗，加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔和山羊抗小鼠的二抗 (稀释度为 1 : 5 000) 室温慢摇孵育 2 h，移去二抗，TBST 清洗，最后滴加 ECL 发光液显影曝光，应用 Image J 软件分析各组蛋白相对表达。

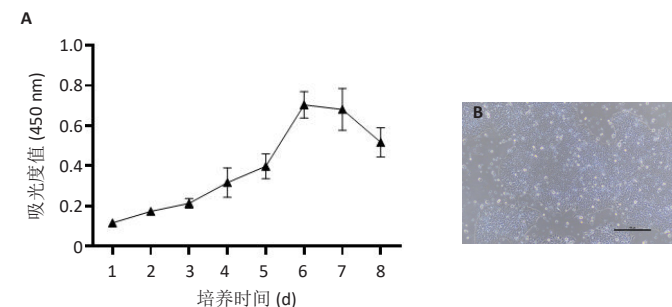
1.5 主要观察指标 ①人胚胎干细胞系 H9 在正常培养基中 MIF 分泌水平；②外源性 MIF、MIF 抑制剂 ISO-1、MIF+ISO-1 以及敲除 MIF 基因对人胚胎干细胞存活、增殖的影响；③外源性 MIF(100 ng/mL) 对人胚胎干细胞自我更新因子 KLF4、c-MYC、NANOG、OCT4、SOX2，干细胞分化因子 FOXA2、OTX2 mRNA、蛋白表达以及荧光强度的影响；④外源性 CXCR4 中和抗体 (100 ng/mL) 对人胚胎干细胞自我更新因子 KLF4、c-MYC、NANOG、OCT4、SOX2，干细胞分化因子 FOXA2、OTX2 mRNA 以及蛋白表达的影响。

1.6 统计学分析 使用 Image J 软件处理 Western blot 实验记录的蛋白条带，得到相应灰度值，全文实验数据使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件统计分析，所有实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析法 (One-way ANOVA)，所有数据至少来自 3 个独立实验，*P* < 0.05 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过海南医学院第一附属医院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 人胚胎干细胞在正常培养基中的生长情况及自分泌 MIF 水平 为了解人胚胎干细胞的生长状况，用 CCK-8 实验检测并绘制人胚胎干细胞的生长曲线，其对数生长期在 3–6 d，后续实验均用此期细胞 (图 1A)。正常生长的细胞为大小相对均一、胞质较为透明的形态，似铺路石样，细胞排列紧密，呈集落状生长 (图 1B)。在细胞正常生长情况下，取培养液进行 ELISA 实验，实验结果表明生理情况下分泌 MIF 为 (20.42 $\pm$ 0.62) ng/mL。

2.2 正常培养基中添加外源性 MIF、MIF 抑制剂 ISO-1 及敲除 MIF 对人胚胎干细胞存活、增殖的影响 添加不同质量浓度 MIF(30，100，300 ng/mL) 到正常培养基中，CCK-8



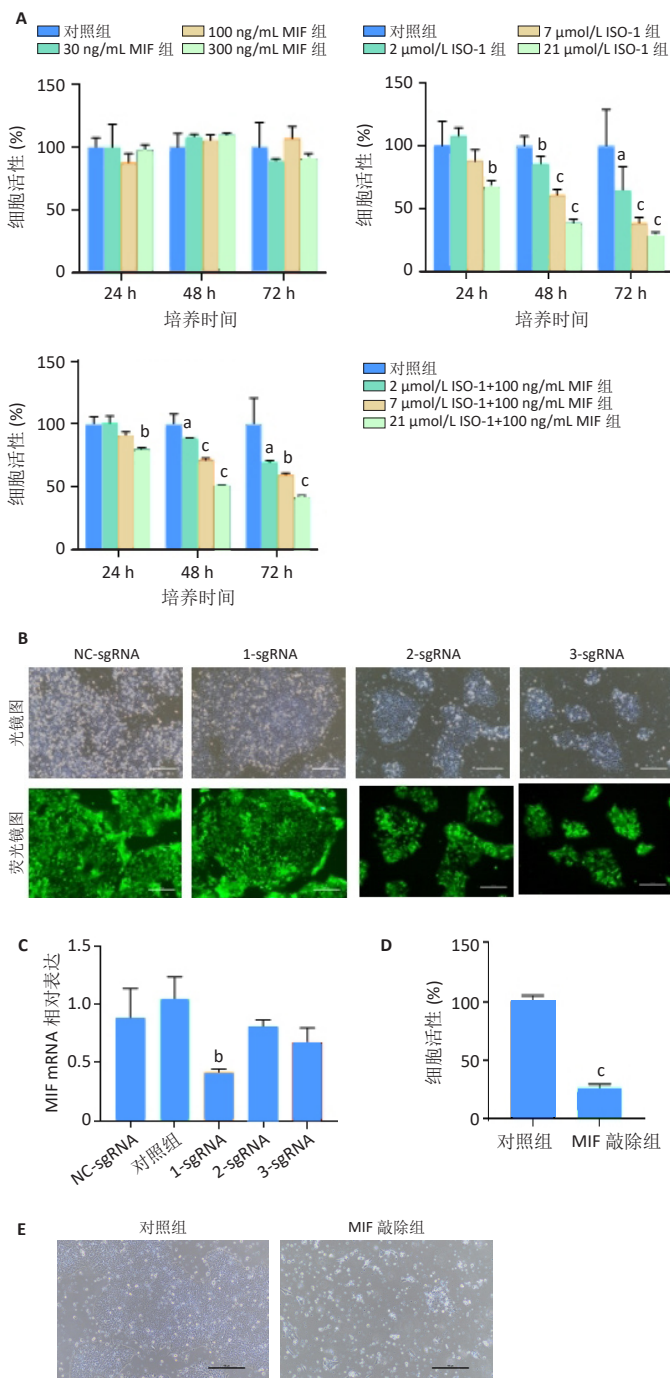
图注：图 A 为人胚胎干细胞 (P16) 生长曲线；B 为人胚胎干细胞光镜下表现 (比例尺：100 μm)。

图 1 | 人胚胎干细胞在正常培养基中的生长情况

Figure 1 | Growth of human embryonic stem cells (H9) in normal medium

检测显示不同质量浓度 MIF 对人胚胎干细胞的增殖并无影响。添加不同浓度 MIF 抑制剂 ISO-1(2, 7, 21 μmol/L) 到正常培养基中, CCK-8 检测显示 ISO-1 能够抑制人胚胎干细胞的存活, 细胞数量明显下降, 且浓度越大, 抑制越明显。添加不同浓度 ISO-1(2, 7, 21 μmol/L)+MIF(100 ng/mL) 到正常培养基中, CCK-8 检测显示 MIF 可以减少 ISO-1 的抑制作用, 但无法逆转 ISO-1 对细胞存活的作用 (图 2A)。使用 CRISPR/Cas9 双载体慢病毒质粒系统对人胚胎干细胞进行 MIF 基因的敲除, 通过向人胚胎干细胞内导入 Cas9 和 sgRNA 序列表达框, 进而实现对 MIF 基因的敲除。从图中可以看出慢病毒成功感染各组细胞 (图 2B)。RT-qPCR 检测显示, 1-sgRNA 成功地对细胞进行效率约为 50% 的 MIF 基因敲除 (图 2C)。敲除 MIF 基因之后的人胚胎干细胞生长活力显著降低 (图 2D), 光镜下观察可见细胞稀少, 难以继续存活 (图 2E)。

2.3 外源性 MIF 对人胚胎干细胞初步分化的影响 为进一步明确额外添加 MIF 对人胚胎干细胞初步分化的影响, 在培养基中分别添加 100 ng/mL MIF 和 100 ng/mL CXCR4 中和抗体, 与细胞共培养 48 h 后, 检测自我更新转录因子 KLF4、c-MYC、NANOG、OCT4、SOX2 以及分化转录因子 FOXA2 和 OTX2 的表达情况。RT-qPCR 以及 Western blot 显示, 与对照组相比, MIF 组的 KLF4 mRNA 以及蛋白表达显著下调, CXCR4 中和抗体组的 KLF4 mRNA 以及蛋白表达显著上调, 而 c-MYC、NANOG、OCT4 和 SOX2 的 mRNA 以及蛋白表达无显著变化; MIF 组的 FOXA2 mRNA 以及蛋白表达显著上调, CXCR4 中和抗体组的 FOXA2 mRNA 以及蛋白表达显著下调, OTX2 的 mRNA 以及蛋白表达无显著变化 (图 3A, B)。免疫荧光显示 MIF 组 KLF4 的绿色荧光强度呈现下调的趋势, 而 c-MYC、NANOG、OCT4 和 SOX2 则无明显差异; FOXA2 的绿色荧光表达强度显著高于对照组, OTX2 的荧光表达强度无明显差异 (图 3C)。上述结果显示, 高于生理浓度 (20 ng/mL) 的 MIF 可以通过下调 KLF4 的表达以及提高 FOXA2 的表达对人胚胎干细胞初步分化有一定作用, MIF-CXCR4 轴在其中起到一定的调控作用。



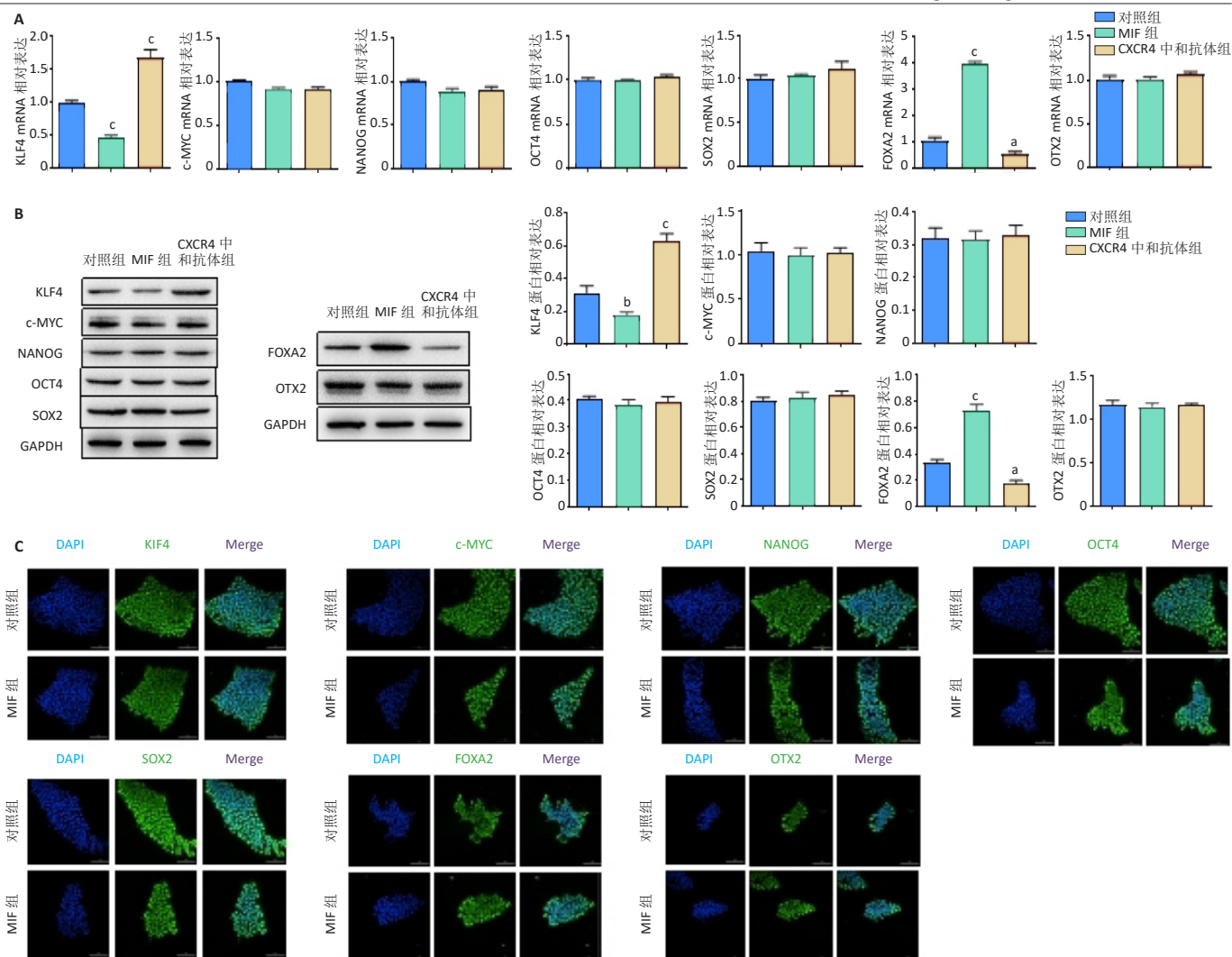
图注：图 A 为 CCK-8 检测不同浓度 MIF、ISO-1 以及 MIF+ISO-1 对人胚胎干细胞增殖的影响；B 为不同 sgRNA 慢病毒成功感染人胚胎干细胞后的光镜和荧光镜下表现 (比例尺：100 μm)；C 为 RT-qPCR 检测各组 sgRNA 中 MIF 的 mRNA 表达；D 为 CCK-8 检测敲除 MIF 后人胚胎干细胞的增殖情况；E 为光镜下观察敲除 MIF 前后人胚胎干细胞的增殖情况 (比例尺：100 μm)。与对照组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ 。MIF: 巨噬细胞迁移抑制因子。

图 2 | 正常培养基中添加外源性 MIF 及 MIF 抑制剂 ISO-1 对人胚胎干细胞存活、增殖的影响

Figure 2 | Effects of adding exogenous MIF and MIF inhibitor ISO-1 on survival and proliferation of human embryonic stem cells in normal medium

3 讨论 Discussion

MIF 是一种多功能蛋白质, 具有细胞因子、酶、内分泌因子和类似分子伴侣蛋白样特征, 在多种干细胞类型中



图注：图 A 为 RT-qPCR 检测分别添加 MIF(100 ng/mL) 和 CXCR4 中和抗体 (100 ng/mL) 后自我更新转录因子 KLF4、c-MYC、NANOG、OCT4、SOX2 以及分化转录因子 FOXA2 和 OTX2 的 mRNA 表达；B 为 Western blot 检测分别添加 MIF(100 ng/mL) 和 CXCR4 中和抗体 (100 ng/mL) 后自我更新转录因子 KLF4、c-MYC、NANOG、OCT4、SOX2 以及分化转录因子 FOXA2 和 OTX2 的蛋白表达；C 为免疫荧光检测添加 MIF(100 ng/mL) 后自我更新转录因子 KLF4、c-MYC、NANOG、OCT4、SOX2 以及分化转录因子 FOXA2 和 OTX2 的荧光表达 (比例尺: 100 μm)。与对照组相比, ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, ^cP < 0.001。
图 3 | 外源性巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF) 对人胚胎干细胞自我更新及分化标志物的影响

Figure 3 | Effects of exogenous migration inhibitory factor (MIF) on self-renewal and differentiation marker of human embryonic stem cells

表达, 包括神经干细胞、心脏干细胞、内皮细胞、间充质干细胞、软骨终板干细胞、脂肪来源干细胞和肿瘤干细胞, 参与多种生物学过程^[13-14]。MIF 通过受体以自分泌和旁分泌方式调控细胞增殖、分化、凋亡、迁移和细胞周期进程等生物学功能^[9, 14]。尽管先前已有人胚胎干细胞自分泌 MIF 的相关研究, 然而 MIF 对人胚胎干细胞存活、增殖和分化方面的具体作用及调控机制还尚未清楚。因此, 这是首次研究 MIF 对人胚胎干细胞的具体作用及初步探讨调控机制, 对深入了解人胚胎干细胞的生理调控及潜在应用具有重要意义。

MIF 基因高度保守, 在哺乳动物、鱼类、线虫、原生动物甚至细菌和植物中都有发现。不同物种 MIF 蛋白同源物的序列同源性在 20%~100% 之间, 人与鼠 MIF 序列同源性高达 90%^[15]。MIF 缺乏转运至内质网 (ER)/ 高尔基

体 (Golgi) 的 N 端信号肽序列, 因此, MIF 的分泌被认为是通过非经典分泌途径发生的^[15]。研究表明, 正常情况下, 健康个体的血清 MIF 水平在 0.2~8.3 ng/mL 之间^[6]。该研究结果显示, 正常生长的人胚胎干细胞能够自分泌 MIF 大约 20 ng/mL, 且保持在恒定水平, 这种现象表明 MIF 的分泌受到生理性调节机制的调控, 确保 MIF 在细胞中维持在适当的水平, 以发挥其对细胞的正常功能。既往有研究报道 MIF mRNA 在小鼠排卵的卵母细胞、受精卵、双细胞胚胎、八细胞胚胎和囊胚中均有表达^[16]。MIF 在人胚胎着床和早期胚胎发育过程中显著表达, 孕妇血清 MIF 水平在整个生理妊娠期间没有发生变化, 但高于未妊娠女性, 妊娠早期母体血清 MIF 水平降低与复发性流产有关^[8, 17]。以上研究说明了高浓度 MIF 在胚胎发育过程中起着重要的作用, 而人胚胎干细胞源

自囊胚的内细胞团,该研究发现人胚胎干细胞自分泌 MIF 水平远远高于正常健康血清中 MIF 浓度范畴,说明人胚胎干细胞自分泌的高水平 MIF 对人胚胎干细胞的正常发育至关重要,通过检测 MIF 水平的异常变化,可以为妊娠相关疾病的早期诊断和治疗提供一定的参考。然而, MIF 分泌的确切机制尚不清楚,研究表明高尔基体囊泡转运蛋白 P115 以及 ATP 结合盒转运蛋白亚家族 1(ABC1) 与 MIF 的分泌有关^[18]。

研究表明 MIF 可以通过自分泌和 / 或旁分泌途径增加 Akt、Erk、AMPK 和 Stat3 的磷酸化以及 Hes3 和 Egfr 的表达,从而促进神经干细胞的增殖和 / 或存活以及自我更新^[19]。另有研究报道 MIF 通过激活 Wnt/ β -连环蛋白信号通路,促进神经干细胞增殖及其向神经元谱系分化^[20]。还有研究表明, MIF 作用于衰老的骨髓间充质干细胞能够促使其恢复“年轻化”,减少缺氧 / 缺血诱导的细胞凋亡^[21-22]。虽然研究发现多种成体干细胞表达 MIF 并且参与多种重要的细胞功能,但是鲜有研究报道 MIF 对于人胚胎干细胞的确切作用。该研究外源性添加不同质量浓度 MIF 与人胚胎干细胞共孵育,观察到其对入人胚胎干细胞的增殖无影响,添加 MIF 抑制剂 ISO-1 后人胚胎干细胞的存活受到严重抑制,敲除 MIF 基因后的人胚胎干细胞甚至无法存活。MIF 与其他因子的不同之处在于, MIF 是半组成型表达,并且是预先从储存池中分泌到体内循环,以维持细胞的正常生理功能^[23]。以上研究充分说明 MIF 参与干细胞的正常生理功能维持,生理浓度的 MIF 对于人胚胎干细胞的存活必不可少。

KLF4 也称为胃肠富集 Krüppel 样因子或表皮锌指因子,是一种进化保守的真核生物锌指蛋白转录因子,在细胞增殖、分化及胚胎发育等生命过程中发挥重要作用^[24]。有研究认为 KLF4 是分化过程中第一个从转录相关复合体中移除的多能性转录因子。KLF4 的核输出是脱离多能状态并致力于分化的关键第一步^[25]。该研究外源性添加 100 ng/mL MIF 与细胞共培养 48 h,发现 KLF4 在基因层面、蛋白层面和荧光表达强度方面都出现显著性下调, c-MYC、OCT4、SOX2 和 NANOG 等因子无明显变化。KLF4 是连接外部转录因子和核心多能性网络 (c-MYC、NANOG、OCT4 和 SOX2) 的关键因子^[26]。因此, KLF4 下调意味着人胚胎干细胞自我更新与分化之间的稳态被打破,转而进入分化。

叉头转录因子家族成员 FOXA2 在胚胎干细胞分化的早期阶段上调,是代表谱系分化的原始调节因子^[27]。FOXA2 作为“先锋因子”,能够结合到核小体 DNA 的特定序列上,并募集到封闭的染色质,通过多种机制诱导局部染色质打开,允许其他特殊的调节性蛋白质进入

到 DNA 中,激活沉默基因网络开始进入分化命运的程序^[28-29]。OTX2 是编码大脑、小脑、松果体和眼睛正常发育所必需的转录因子^[30]。该研究外源性添加 100 ng/mL MIF 与细胞共培养 48 h,发现 FOXA2 在基因层面、蛋白层面和荧光表达强度方面均显著上调,而 OTX2 的表达无显著性差异。以上结果充分说明高于生理浓度的 MIF 作用于人胚胎干细胞,导致 KLF4 下调,打破了维持人胚胎干细胞多能性的调控网络,使人胚胎干细胞退出了多能性状态,同时上调 FOXA2 开启人胚胎干细胞分化的第一步。

趋化因子受体 CXCR4 是一种 7 跨膜 G 蛋白偶联受体,在大多数细胞中表达,包括造血细胞、内皮细胞、神经元和干细胞(胚胎和成体),在胚胎发育、造血和定向趋化中起着至关重要的作用^[31]。CXCR4 被 CXCL12 激活后可促进人胚胎干细胞向神经干细胞分化,并有助于维持其干性^[31]。MIF 的 Arg-Leu-Arg(RLR) 序列区域 87-89 与 CXCR4 的位点 -1 结合, N- 环样基序与 CXCR4 位点 -2 结合^[32]。以上结果为 MIF-CXCR4 轴的存在提供了直接依据。研究表明 MIF 直接与 CXCR2/4 结合,通过诱导 G 蛋白偶联受体相关信号传导,导致磷脂酶 C 活化,引发胞内钙离子释放,进而激活 MAPK、PI3K-AKT 等细胞内信号通路^[14, 33-34]。CD74 和 CXCR4 都在 MIF 的网格蛋白依赖性内吞作用中发挥作用, CXCR4 可以独立于 CD74 介导 MIF 的内吞作用,而 CD74 的存在会加速 MIF 的内吞作用^[35]。MIF 诱导 ERK 磷酸化和 B 细胞的趋化性可由单独的 CXCR4 和 CXCR7 途径、CXCR4/CXCR7 异二聚体复合物途径或两者共同介导^[10]。课题组的前期研究表明,人胚胎干细胞不表达 MIF 的经典受体 CD74 和 CD44, CXCR2、CXCR7 受体高表达, CXCR4 弱表达^[12]。该研究添加 100 ng/mL CXCR4 中和抗体后,发现 KLF4 在基因和蛋白层面上表达明显增加, FOXA2 在基因和蛋白层面上表达均明显下降,与 MIF 组表达趋势相反,由此作者推测,高于生理浓度的 MIF 可能通过 MIF-CXCR4 轴对人胚胎干细胞的初步分化起到一定的调控作用,其深入机制还尚未明确,仍需进一步探索。

总之,该研究证实,人胚胎干细胞自分泌 MIF 且在培养基中浓度基本固定,与细胞数量无关, MIF 不促进人胚胎干细胞的增殖,但对入人胚胎干细胞的存活至关重要。外源性 MIF 通过降低 KLF4 的表达并且促进 FOXA2 的表达,对人胚胎干细胞的初步分化有一定作用。MIF 可能通过 MIF-CXCR4 轴对人胚胎干细胞的信号传导起到一定的调控作用。

作者贡献:实验设计为赵振强、冯晓丽、黄婷;实验实施为黄婷、郑晓晗;实验评估为钟远吉、魏艳召、曹旭东;资料收集为黄婷、魏绪芳。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] CHEN G, YIN S, ZENG H, et al. Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Life (Basel)*. 2022;12(8):1151.
- [2] VARZIDEH F, GAMBARDELLA J, KANSAKAR U, et al. Molecular Mechanisms Underlying Pluripotency and Self-Renewal of Embryonic Stem Cells. *Int J Mol Sci*. 2023;24(9):8386.
- [3] GOLCHIN A, CHATZIPARASIDOU A, RANJBARVAN P, et al. Embryonic Stem Cells in Clinical Trials: Current Overview of Developments and Challenges. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1312:19-37.
- [4] KUMAR D, BALIGAR P, SRIVASTAV R, et al. Stem Cell Based Preclinical Drug Development and Toxicity Prediction. *Curr Pharm Des*. 2021;27(19):2237-2251.
- [5] FANG T, LIU L, SONG D, et al. The role of MIF in periodontitis: A potential pathogenic driver, biomarker, and therapeutic target. *Oral Dis*. 2023. doi: 10.1111/odi.14558.
- [6] SUMAIYA K, LANGFORD D, NATARAJASEENIVASAN K, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): A multifaceted cytokine regulated by genetic and physiological strategies. *Pharmacol Ther*. 2022;233:108024.
- [7] 郑晓晗, 冯晓丽, 胡兰, 等. 巨噬细胞迁移抑制因子促进人胚胎干细胞分化为腹侧中脑多巴胺能神经祖细胞 [J]. *中国组织工程研究*, 2023,27(33):5348-5356.
- [8] JOVANOVIĆ KRIVOKUĆA M, VILOTIĆ A, STEFANOSKA I, et al. Macrophage migration inhibitory factor in human early pregnancy events and association with placental pathologies. *Placenta*. 2021;116:51-57.
- [9] WEI Y, ZHENG X, HUANG T, et al. Human embryonic stem cells secrete macrophage migration inhibitory factor: A novel finding. *PLoS One*. 2023;18(8):e0288281.
- [10] ALAMPOUR-RAJABI S, EL BOUNKARI O, ROT A, et al. MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB J*. 2015;29(11):4497-4511.
- [11] BERNHAGEN J, KROHN R, LUE H, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*. 2007;13(5):587-596.
- [12] 魏艳召, 郑晓晗, 高仕君, 等. 人胚胎干细胞自分泌巨噬细胞迁移抑制因子及受体表达 [J]. *中国组织工程研究*, 2023,27(1):34-41.
- [13] GÜNTHER S, FAGONE P, JALCE G, et al. Role of MIF and D-DT in immune-inflammatory, autoimmune, and chronic respiratory diseases: from pathogenic factors to therapeutic targets. *Drug Discov Today*. 2019;24(2):428-439.
- [14] 郑晓晗, 魏艳召, 黄婷, 等. 巨噬细胞迁移抑制因子对干细胞的作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2023,27(15):2395-2403.
- [15] SONG S, XIAO Z, DEKKER FJ, et al. Macrophage migration inhibitory factor family proteins are multitasking cytokines in tissue injury. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(2):105.
- [16] NISHIHARA J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *J Interferon Cytokine Res*. 2000;20(9):751-762.
- [17] FARIA MR, HOSHIDA MS, FERRO EA, et al. Spatiotemporal patterns of macrophage migration inhibitory factor (Mif) expression in the mouse placenta. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:95.
- [18] MORA BARTHELMMESS R, STIJLEMANS B, VAN GINDERACHTER JA. Hallmarks of Cancer Affected by the MIF Cytokine Family. *Cancers (Basel)*. 2023;15(2):395.
- [19] OHTA S, MISAWA A, FUKAYA R, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival and proliferation of neural stem/progenitor cells. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 13):3210-3220.
- [20] ZHANG X, CHEN L, WANG Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem/precursor cells through Wnt/ β -catenin signal pathway. *Int J Biol Sci*. 2013;9(10):1108-1120.
- [21] XIA W, ZHANG F, XIE C, et al. Macrophage migration inhibitory factor confers resistance to senescence through CD74-dependent AMPK-FOXO3a signaling in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):82.
- [22] BAI Z, HU K, YU J, et al. Macrophage migration inhibitory factor protects bone marrow mesenchymal stem cells from hypoxia/ischemia-induced apoptosis by regulating lncRNA MEG3. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2022;23(12):989-1001.
- [23] SCHINDLER L, DICKERHOF N, HAMPTON MB, et al. Post-translational regulation of macrophage migration inhibitory factor: Basis for functional fine-tuning. *Redox Biol*. 2018;15:135-142.
- [24] HE Z, HE J, XIE K. KLF4 transcription factor in tumorigenesis. *Cell Death Discov*. 2023;9(1):118.
- [25] DHALIWAL NK, MIRI K, DAVIDSON S, et al. KLF4 Nuclear Export Requires ERK Activation and Initiates Exit from Naive Pluripotency. *Stem Cell Reports*. 2018;10(4):1308-1323.
- [26] BOURILLOT PY, SAVATIER P. Krüppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biol*. 2010;8:125.
- [27] MADEDDU P. FoxA2 hunting research identifies the early trail of mesenchymal differentiation. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(2):40.
- [28] BALSALOBRE A, DROUIN J. Pioneer factors as master regulators of the epigenome and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(7):449-464.
- [29] IWAFUCHI M, CUESTA I, DONAHUE G, et al. Gene network transitions in embryos depend upon interactions between a pioneer transcription factor and core histones. *Nat Genet*. 2020;52(4):418-427.
- [30] BEBY F, LAMONERIE T. The homeobox gene Otx2 in development and disease. *Exp Eye Res*. 2013;111:9-16.
- [31] BIANCHI ME, MEZZAPELLE R. The Chemokine Receptor CXCR4 in Cell Proliferation and Tissue Regeneration. *Front Immunol*. 2020;11:2109.
- [32] LACY M, KONTOS C, BRANDHOFER M, et al. Identification of an Arg-Leu-Arg tripeptide that contributes to the binding interface between the cytokine MIF and the chemokine receptor CXCR4. *Sci Rep*. 2018;8(1):5171.
- [33] DAYAWANSA NH, GAO XM, WHITE DA, et al. Role of MIF in myocardial ischaemia and infarction: insight from recent clinical and experimental findings. *Clin Sci (Lond)*. 2014;127(3):149-161.
- [34] VAN DER VORST EP, DÖRING Y, WEBER C. Chemokines and their receptors in Atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)*. 2015;93(9):963-971.
- [35] SCHWARTZ V, KRÜTTGEN A, WEIS J, et al. Role for CD74 and CXCR4 in clathrin-dependent endocytosis of the cytokine MIF. *Eur J Cell Biol*. 2012;91(6-7):435-449.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)