文章编号:1000-5404(2014)12-1243-06

论著

低氧诱导因子-1α对骨形态发生蛋白2诱导的干细胞成软骨、成骨分化的影响

周 年[1],黄 伟[1],廖军义[1],胡 宁[1],陈筱蓉[2],梁 熙[1],司维柯[3],杨 忠[3],易世雄[1],凡廷旭[1],赵 辰[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:骨科[1],神经外科[2];400038 重庆,第三军医大学医学检验系临床血液学教研室[3])

[摘要] **目的** 探讨低氧通路中关键转录调控因子低氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor -1α,HIF-1α)对骨形态发生蛋白2(bone morpho-genetic protein 2,BMP2)诱导干细胞骨、软骨分化的影响,阐明HIF-1α在干细胞成骨、软骨分化中的作用。**方法** 构建相应腺病毒AdBMP2、AdHIF-1α、AdGFP,单独或共同感染干细胞,Western blot法检测成软骨、成骨分化关键转录调控因子Sox9、Runx2的表达,Real-time PCR法检测成软骨、成骨分化标志物COL2A1、aggrecan、COL1A1和ALP mRNA表达,Alcian blue、ALP及Alizarin red S染色检测软骨细胞外基质及骨基质钙盐沉积情况。进行干细胞裸鼠皮下移植,观察不同处理组形成骨块的组织结构情况,探讨HIF-1α对BMP2诱导干细胞成骨、软骨分化的影响。**结果** 诱导分化后第1、3天,BMP2+HIF-1α组Sox9蛋白表达明显高于BMP2单独处理组,而BMP2+HIF-1α组Runx2蛋白表达明显低于BMP2单独处理组。诱导分化后第7、9天,BMP2+HIF-1α组COL2A1、aggrecan mRNA相对表达明显高于BMP2单独处理组($P<0.05$),而BMP2+HIF-1α组COL1A1、ALP mRNA相对表达明显低于BMP2单独处理组($P<0.05$)。Alcian blue染色发现BMP2+HIF-1α组软骨细胞外基质分泌多于BMP2单独处理组,染色更深;ALP染色发现BMP2+HIF-1α组ALP的活性弱于BMP2单独处理组;茜素红染色发现BMP2+HIF-1α组较BMP2单独处理组骨基质钙盐沉积更少;体内试验组织学观察见BMP2+HIF-1α组软骨成分更多,骨化不明显,BMP2单独处理组软骨成分少,软骨内骨化更明显。**结论** HIF-1α明显增强了BMP2诱导的干细胞成软骨分化,抑制了成骨分化及软骨内骨化,维持了软骨分化表型。

[关键词] 低氧诱导因子-1α;骨形态发生蛋白2;干细胞;软骨分化;成骨分化
[中图法分类号] R322.71;R329-33;R329.26 [文献标志码] A

HIF-1α potentiates BMP2-induced chondrogenic differentiation but inhibits osteogenic differentiation in stem cells

Zhou Nian[1], Huang Wei[1], Liao Junyi[1], Hu Ning[1], Chen Xiaorong[2], Liang Xi[1], Si Weike[3], Yang Zhong[3], Yi Shixiong[1], Fan Tingxu[1], Zhao Chen[1] ([1]Department of Orthopedics, [2]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400042; [3]Department of Clinical Haematology, Faculty of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) on bone morphogenetic protein 2 (BMP2)-induced chondrogenic and osteogenic differentiation in stem cells. **Methods** Recombinant adenoviruses AdBMP2, AdHIF-1α and AdGFP were generated to transfect mouse stem cell line C3H10T1/2. We detected the protein levels of Sox9 and Runx2 (chondrogenic and osteogenic differentiation critical regulatory factors) by Western blotting and the mRNA levels of COL2A1, aggrecan, COL1A1 and ALP (chondrogenic and osteogenic differentiation markers) by real-time PCR. Alcian blue staining, ALP staining and Alizarin red S staining were used to detect the secretion of cartilaginous matrix, ALP activity and bone matrix mineralization, respectively. We further demonstrated the role of HIF-1α in BMP2-induced chondrogenic and osteogenic differentiation by subcutaneous stem cell implantation in nude mice. **Results** On day 1 and day 3, the BMP2+HIF-1α group (stem cells treated with AdBMP2 and AdHIF-1α) showed significantly higher protein level of Sox9 and significantly lower protein level of Runx2 than the BMP2 group (stem cells treated with AdBMP2). On day 7 and day 9, the BMP2+HIF-1α group showed significantly higher mRNA level of COL2A1 and aggrecan ($P<0.05$) and significantly lower mRNA levels of COL1A1 and ALP ($P<0.05$) than

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31070875,81371972)
[通信作者] 黄 伟,E-mail: huangwei68@263.net
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140115.1549.020.html(2014-01-15)

the BMP2 group. We also found that the secretion of cartilaginous matrix in the BMP2 + HIF-1α group was more than that in the BMP2 group, proven by Alcian blue staining. Bone matrix mineralization was not obvious in the BMP2 + HIF-1α group as compared to the BMP2 group. *In vivo*, the BMP2 + HIF-1α group formed more cartilage structures, but the BMP2 group formed more bone structures. **Conclusion** HIF-1α promotes BMP2-induced stem cell chondrogenic differentiation but inhibits osteogenic differentiation and endochondral ossification and maintains chondrogenic phenotype.

[**Key words**] hypoxia inducible factor-1α; bone morphogenetic protein 2; stem cells; chondrogenic differentiation; osteogenic differentiation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31070875;81371972). Corresponding author: Huang Wei, E-mail: huangwei68@263.net

近年,干细胞在骨、软骨的再生领域的研究受到了广泛的关注[1]。目前生长因子在干细胞成骨、成软骨分化中的作用已经被广泛、深入地探讨[2-3]。骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein 2, BMP2)在体内是一种多功能蛋白,属于转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)超家族成员[4],在胚胎发育过程中调节干细胞增殖分化方面有着重要的作用,且在体外能够诱导干细胞成骨、成软骨分化[5-6]。它主要通过经典的Smads信号以及非经典的MAPK等下游信号通路调节成软骨分化关键转录调控因子Sox9,以及成骨分化关键转录调控因子Runx2等的表达,进而转导成软骨、成骨信号,最终促进干细胞的分化[4-5]。

目前在干细胞生物学以及细胞生长因子对干细胞成骨、成软骨分化的影响方面的研究取得了进展,但对干细胞定向分化的控制仍然比较困难[2-3]。环境因子包括氧张力等对干细胞生物学的影响逐渐引起学者的重视[7]。低氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α,HIF-1α)是细胞低氧应答下产生的关键转录调控因子[8],可能在低氧调节干细胞成骨、成软骨分化的过程中发挥了重要作用[9,10]。HIF-1α在常氧条件下很容易被降解,不能发挥其生理功能,但在低氧条件下能够稳定存在,并转入细胞核,与细胞核内恒定表达的HIF-1β结合,并共同结合到DNA上,调节下游基因的转录[8]。本实验构建了HIF-1α的重组腺病毒,感染干细胞,使其在常氧条件下稳定表达HIF-1α,探讨HIF-1α对BMP2诱导的干细胞成软骨、成骨分化的影响,进一步阐述低氧通路在干细胞骨、软骨分化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与腺病毒的构建

C3H10T1/2、HEK-293细胞购自美国ATCC公司,用含10%的胎牛血清的完全培养基,于5% CO_2孵箱中培养(H-DMEM、胎牛血清购自HyClone公司)。应用AdEasy系统构建腺病毒。鼠的BMP2基因序列和人源性的HIF-1α基因序列经PCR扩增,然后连接到穿梭载体,在大肠杆菌中进行同源重组,得到重组腺病毒质粒,最后在包装细胞系HEK-293中进行基因表达腺病毒包装[11],得到AdBMP2、AdHIF-1α、AdGFP等腺病毒(由美国芝加哥大学医学部骨科分子肿瘤实验室何通川提供),进行腺病毒的扩增。

1.2 腺病毒感染干细胞并鉴定目的基因的表达

C3H10T1/2为小鼠来源的间充质干细胞株,在常规培养条件下不容易自发分化,需要添加其他生长因子(如BMP等),有利于本实验探讨BMP2、HIF-1α等对成软骨、成骨分化的影响[12]。AdBMP2、AdHIF-1α和AdGFP感染C3H10T1/2细胞24 h后,通过荧光显微镜观察腺病毒携带的荧光蛋白基因的表达,了解感染效率;感染30 h后,用TRIzol试剂(购自lnvitrogen公司)裂解干细胞并提取总RNA,反转录合成cDNA,RT-PCR检测HIF-1α、BMP2的mRNA表达情况。BMP2引物序列:上游引物:5′-ACCAGACTATTGGACACAG-3′,下游引物:5′-AATCCTCACATGTCTCTTGG-3′扩增片段长度174 bp;HIF-1α引物序列:5′-TGCATCTCCATCTCCTACCC-3′,下游引物:5′-CGTTAGGGCTTCTTGGATGA-3′扩增片段长度152 bp。上游引物:5′-CTACACTGAGGACCAGGTTGTCT-3′,下游引物:5′-TTGTCATACCAGGAAATGAGCTT-3′扩增片段长度123 bp。RT-PCR扩增条件:BMP2:95 ℃,4 min,进入循环,95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共35个循环,72 ℃ 7 min,4 ℃保存;HIF-1α:95 ℃,4 min,进入循环,95 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,共35个循环,72 ℃ 7 min,4 ℃保存;扩增产物采用琼脂糖凝胶电泳,Tanon 2 500凝胶图像分析系统曝光分析,采集图像,并作图。

1.3 干细胞成软骨、成骨分化

1.3.1 Western blot检测成软骨、成骨分化关键转录调控因子Sox9、Runx2的表达 C3H10T1/2常规铺于6孔板,腺病毒感染处理分组:AdBMP2感染组、AdHIF-1α感染组、AdBMP2和AdHIF-1α共同感染组以及AdGFP感染组。于诱导分化后第1、3天,裂解液(购自碧云天公司)裂解细胞,收集总蛋白,调节蛋白浓度,加上样缓冲液,热变性;电泳分离,电转至PVDF膜(购自Bio-Rad公司),5%脱脂奶粉室温封闭1 h,4 ℃孵育一抗[anti-Sox9、anti-Runx2和anti-β-actin(购自美国Santa Cruz Biotechnology公司)]过夜,TBST洗涤,室温孵育二抗(兔抗鼠二抗:1∶2 000;山羊抗兔二抗:1∶2 000)2 h,TBST洗涤,化学发光法显色,并拍照,记录分析结果。

1.3.2 Real-time PCR检测成软骨分化标志物COL2A1、agger-

can 以及成骨分化标志物 COL1A1、ALP 的表达　于诱导分化后第 7、9 天，TRIzol 提取 RAN，逆转录成 cDNA，通过 Real-time PCR（Real-time PCR 试剂盒购自 Bio-Rad 公司）检测各处理组成软骨分化标志物 COL2A1、aggercan 以及成骨分化标志物 COL1A1、ALP 的表达（具体分组同 1.3.1）。GAPDH 上游引物：5′-CTACACTGAGGACCAGGTTGTCT-3′，下游引物：5′-TTGTCATACCAGGAAATGAGCTT-3′，扩增片段长度 123 bp；COL2A1 上游引物：5′-CAACACAATCCATTGCGAAC-3′，下游引物：5′-TCTGCCCAGTTCAGGTCTCT-3′，扩增片段长度 159 bp；aggrecan 上游引物：5′-TGGCTTCTGGAGACAGGACT-3′，下游引物：5′-TTCT-GCTGTCTGGGTCTCCT-3′，扩增片段长度 188 bp；COL1A1 上游引物：5′-GAGCGGAGAGTACTGGATCG-3′，下游引物：5′-GCTTCTTTTCCTTGGGGTTC-3′，扩增片段长度 158 bp；ALP 上游引物：5′-GCTCTCCGAGATGGTGGA-3′，下游引物：5′-AGCCTGCTTGGCCTTACC-3′，扩增片段长度 121 bp。Real-time PCR 反应条件：95 ℃ 3 min，进入循环 95 ℃ 10 s，58 ℃ 5 s，共循环 39 次，58 ℃ 5 s，95 ℃，生成扩增曲线及熔解曲线，得出 Ct 值，各目的基因的表达量与内参基因 GAPDH 进行标准化，得到各基因的相对表达量。

1.3.3　Alcian blue 染色观察干细胞诱导成软骨分化后细胞外基质的表达　C3H10T1/2 常规铺 24 孔板，腺病毒感染处理分组同 1.3.1，于诱导分化后第 7、9 天，进行细胞外基质染色，Alcian blue 染料购自 Sigma-Aldrich 公司。细胞培养孔板经 PBS 常规清洗后用 4% 多聚甲醛固定 15 min，Alcian blue 染料室温染色 30 min，蒸馏水冲洗，采集图片。

1.3.4　碱性磷酸酶活性（alkaline phosphatase，ALP）染色　C3H10T1/2 常规细胞铺 24 孔板、腺病毒感染处理分组同 1.3.1，于诱导分化第 7、9 天，进行早期成骨标志物 ALP 的活性检测。室温下，样本用 PBS 清洗后首先经过柠檬酸盐和丙酮固定约 30 s，ALP 染料（购自 Sigma-Aldrich 公司）染色 10～60 min，每 5 分钟镜下观察着色情况，采集图片。

1.3.5　Alizarin red S 染色细胞外基质钙盐沉积情况　C3H10T1/2 常规铺 24 孔板、腺病毒感染处理分组同 1.3.1，感染腺病毒后 24 h，更换成骨诱导培养基继续培养，培养基成分包括抗坏血酸（50 μg/mL）、β-甘油磷酸酯（10 mmol/L）。于成骨诱导培养后第 7、9 天进行 Alizarin red S 染色，检测骨基质钙盐沉积情况。具体方法参考文献[13]。

1.4　干细胞裸鼠皮下移植

C3H10T1/2 感染 AdBMP2、AdHIF-1α、AdBMP2 + AdHIF-1α 和 AdGFP 后 24 h，收集细胞用 PBS 制成细胞悬液，约 5×10^6/部位，皮下注射。4 周雄性裸鼠，体质量约 15g/只，4 只/组（购自第三军医大学实验动物中心）。注射后饲养 5 周处死裸鼠，取出移植部位长出的组织包块。实验遵守动物实验伦理相关规定。

1.5　HE 染色、番红“O”固绿染色和 Masson 染色观察骨、软骨组织结构

组织包块用 4% 多聚甲醛固定，经脱钙、石蜡包埋处理，行石蜡切片。切片进行 HE 染色、番红“O”固绿染色和 Masson 染色等组织学染色，具体参考文献[13]。镜下观察骨与软骨组织结构，比较各处理组结构的不同，并采集图像。

1.6　统计学分析

采用 IBM SPSS Statistics 19 统计软件，计量资料中比较 4 组组间差异采用单因素方差分析，并使用 t 检验进行两两组间比较。

2　结果

2.1　腺病毒感染 C3H10T1/2 细胞后荧光蛋白表达与 RT-PCR 检测结果

腺病毒感染 C310T1/2 细胞后 24 h，细胞状态（白光），各处理组都可见荧光蛋白表达，AdBMP2、AdGFP 都携带绿色荧光蛋白基因，AdHIF-1α 携带红色荧光蛋白基因（图 1），荧光蛋白的表达证实腺病毒成功感染干细胞；在感染后 30 h，提取 RAN 并逆转录，RT-PCR 结果证实 AdBMP2、AdHIF-1α 对应目的基因 BMP2（图 2A）、HIF-1α（图 2B）在 C3H10T1/2 细胞内获得高表达。

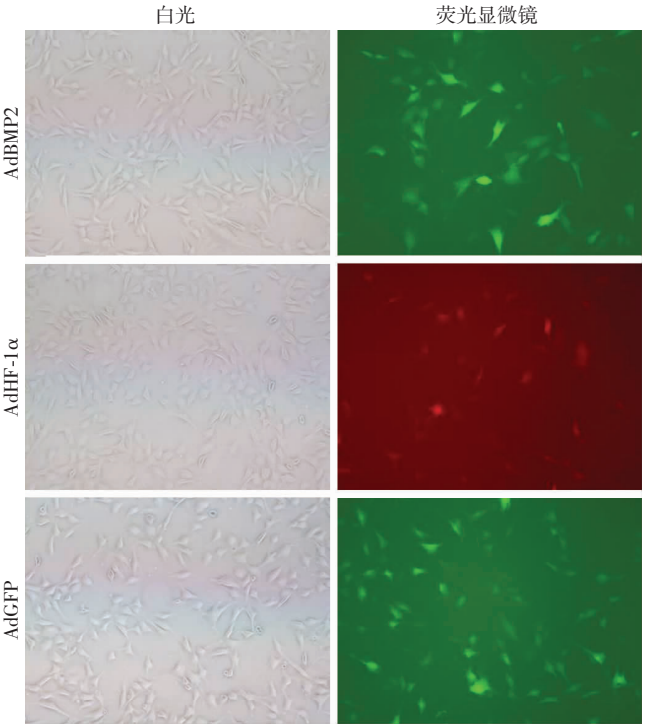


图 1　AdBMP2、AdHIF-1α、AdGFP 感染 C3H10T1/2 后细胞形态及荧光蛋白表达　（×100）

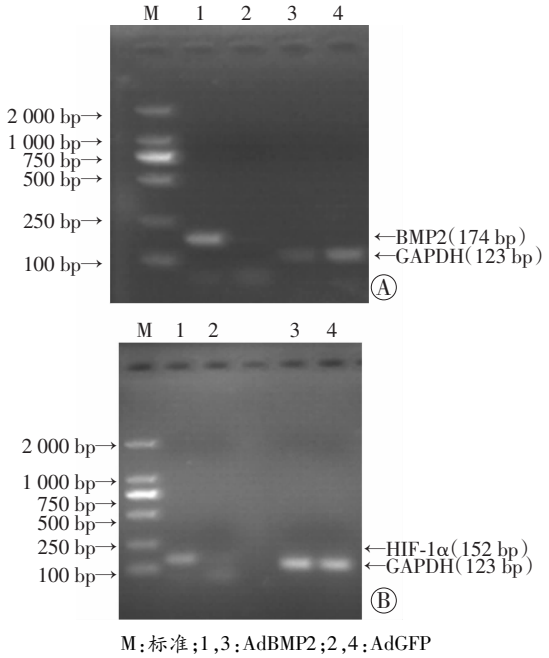
2.2　Western blot 检测 Sox9、Runx2 蛋白的表达

Western blot 检测结果显示处理后 1 d（图 3A）、3 d（图 3B），BMP2 + HIF-1α 组 Sox9 蛋白水平表达明显高于 BMP2 单独处理组，而 BMP2 + HIF-1α 组 Runx2 蛋白水平表达明显低于 BMP2 单独处理组。

2.3　Real-time PCR 检测 COL2A1、aggrecan mRNA 的表达

诱导分化后第 7、9 天，BMP2 + HIF-1α 组 COL2A1 mRNA 相对表达明显高于 BMP2 单独处理组[7d，BMP2 + HIF-1α 组（19.0 ± 2.0）*vs* BMP2（8.4 ± 3.9）组，（$P<0.05$）；9 d，BMP2 + HIF-1α 组（17.9 ± 4.7）*vs* BMP2 组（3.9 ± 0.9），（$P<0.05$）]；

BMP2 + HIF-1α 组 aggrecan mRNA 相对表达明显高于 BMP2 单独处理组[7 d,BMP2 + HIF-1α 组(22.9 ± 2.8)*vs* BMP2(6.3 ± 1.3)组,($P < 0.05$);9 d, BMP2 + HIF-1α 组(12.4 ± 1.0) *vs* BMP2 组(4.2 ± 0.32),($P < 0.05$)]。诱导分化后第 7、9 天,BMP2 + HIF-1α 组 COL1A1 mRNA 相对表达明显低于 BMP2 单独处理组[7 d, BMP2 + HIF-1α 组(1.6 ± 0.1)*vs* BMP2 组(3.7 ± 0.2),($P < 0.05$);9 d, BMP2 + HIF-1α 组(2.1 ± 0.1)*vs* BMP2 组(5.0 ± 0.5),($P < 0.05$)];BMP2 + HIF-1α 组 ALP mRNA 相对表达明显低于 BMP2 单独处理组[7 d,BMP2 + HIF-1α 组(8.8 ± 1.3)*vs* BMP2 组(13.6 ± 2.4),($P < 0.05$);9 d, BMP2 + HIF-1α 组(9.9 ± 2.0)*vs* BMP2 组(13.6 ± 1.6),($P < 0.05$)]。见图 4。

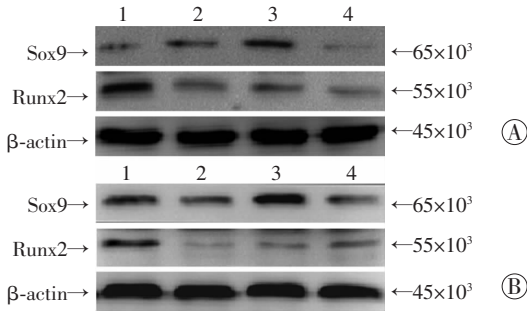


M:标准;1,3:AdBMP2;2,4:AdGFP

图 2 RT-PCR 检测 AdBMP2、AdHIF-1α、AdGFP 感染腺病毒后 BMP2(A)、HIF-1α(B)的表达

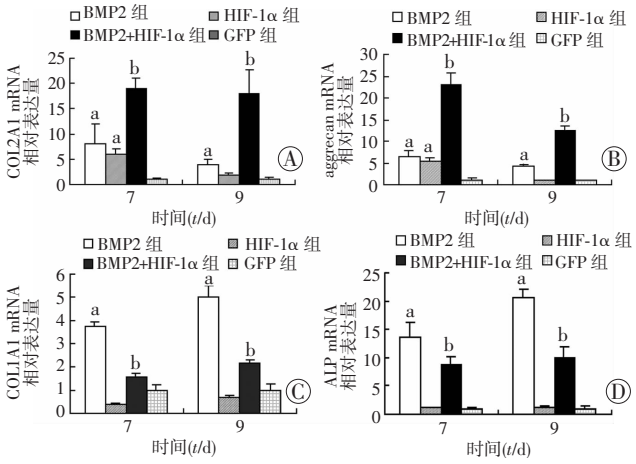
2.4 HIF-1α 对 BMP2 诱导干细胞成软骨分化的细胞外基质的分泌的影响

采用 ALP 染色检测 ALP 的表达及活性,通过 Alizarin red S 染色检测经成骨诱导培养基培养后,各处理组骨基质钙盐沉积情况。结果发现 HIF-1α 明显促进了 BMP2 诱导干细胞成软骨分化的细胞外基质的分泌(图 5A),并且抑制了 ALP 的表达及活性(图 5B)以及骨钙盐沉积(图 5C)。进一步证实 HIF-1α 对 BMP2 诱导成软骨分化的促进作用以及成骨分化的抑制作用。



1:BMP2 组;2:HIF-1α 组;3:BMP2 + HIF-1α 组;4:GFP 组;A: 诱导分化后 1 d;B: 诱导分化后 3 d

图 3 Western blot 检测各组 Sox9、Runx2 蛋白的表达



A:COL2A1 mRNA; B: aggrecan mRNA; C: COL1A1 mRNA; D: ALP mRNA;a: $P < 0.05$,与 GFP 组比较;b: $P < 0.05$,与 BMP2 组比较

图 4 Real-time PCR 检测 COL2A1、aggrecan mRNA 的表达

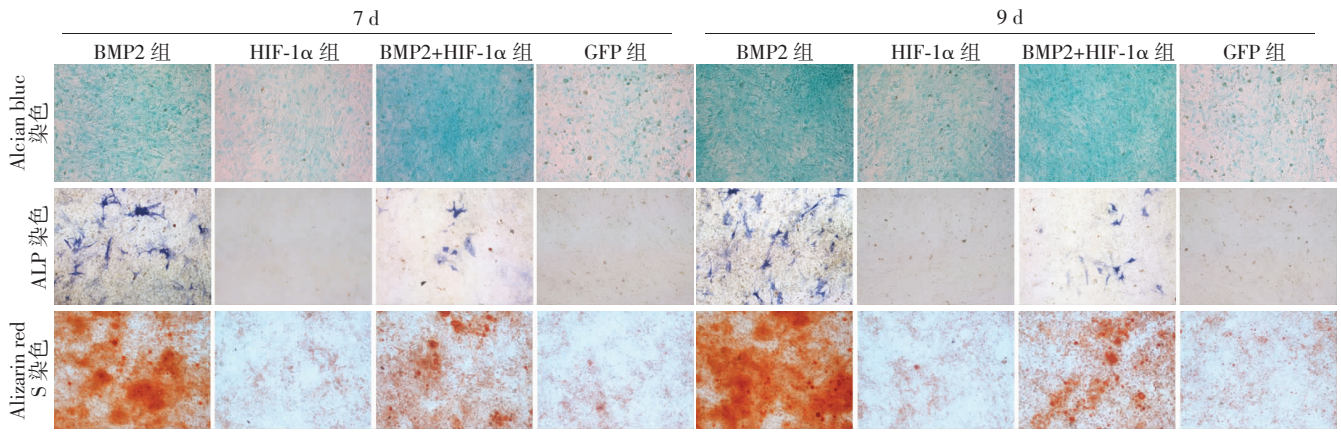


图 5 不同染色方法观察成软骨、成骨分化结果 (LM ×100)

2.5　HIF-1α 对 BMP2 诱导的干细胞分化的影响

HE 染色、番红“O”固绿染色和 Masson 染色发现，BMP2 + HIF-1α 处理组骨结构中见大量软骨成分包括软骨细胞、细胞外基质等；BMP2 处理组发现大量骨性成分，包括骨小梁结构和少量肥大的软骨细胞。体内实验进一步证实 HIF-1α 能够增强 BMP2 诱导的干细胞成软骨分化，抑制成骨分化及软骨内骨化，维持软骨表型（图 6）。

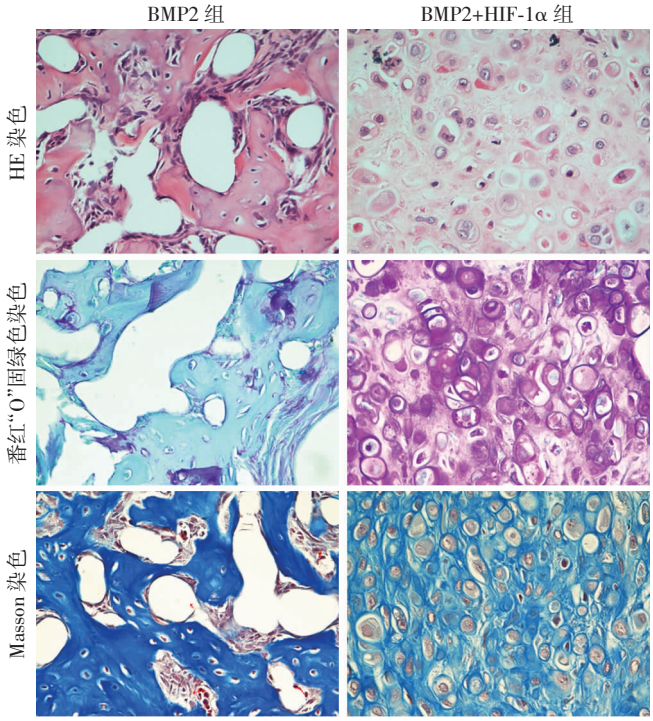


图 6　不同染色方法观察干细胞裸鼠皮下移植后骨块形成后组织形态变化　（LM　×400）

3　讨论

近年来，基于干细胞的再生治疗策略是软骨缺损治疗等领域研究的热点[14]。尽管大量生长因子包括 BMP 等在促进干细胞骨、软骨分化方面的作用，已被广泛、深入地研究[4]，但干细胞的定向分化的控制仍然充满了挑战[15]。局部的低氧环境被认为是调节干细胞表型的关键调控因素之一[16]，近年来引起了学术界广泛关注。本实验系统地探讨了低氧条件下细胞应答产生的关键转录调控因子 HIF-1α 对 BMP2 诱导干细胞成软骨、成骨分化过程中的影响，进一步明确了低氧通路在调节干细胞骨、软骨分化过程中的作用。

本研究发现在 C3H10T1/2 细胞中，BMP2 能够明显上调 Sox9 的表达，并且明显促进其下游基因 COL2A1、aggrecan 的表达。Sox9 是机体软骨形成及体外诱导干细胞成软骨分化过程的中关键转录调控因子，当 Sox9 基因被敲除后，胚胎发育过程中出现明显的软骨发育畸形[17]。在 C3H10T1/2 细胞中，Sox9 的表达与 BMP2 存在明显的量效关系，且在 Sox9 的启动子上还发现了 BMP2 信号激活其表达的作用位点[18]，Sox9 能够进一步调节下游软骨分化相关基因 COL2A1 等的表达[19]。这些都证实了 BMP2 能够通过调控 Sox9 的表达，调节干细胞的成软骨分化。

同时本实验在体外诱导干细胞分化的过程中发现，HIF-1α 能够明显增强 BMP2 诱导的干细胞的 Sox9 的表达，同样 Sox9 的下游基因 COL2A1、aggrecan 的表达明显增加。Zhang 等[20]在股骨头缺血坏死的模型中也发现，HIF-1α 能够明显激活 Sox9 的表达，并增强 Sox9 介导的转录调控活性，并认为 HIF-1α 上调 Sox9 的作用对软骨存在保护效应。Duval 等[10]同样发现在低氧诱导的软骨形成模型中，HIF-1α 能够结合 Sox9 的启动子并上调其表达。我们通过 Alcian blue 染色发现 HIF-1α 能够明显增加软骨细胞外基质的分泌。正如 Amarilio 等[21]所得出的结果，在软骨形成过程中，HIF-1α 增强了软骨细胞外基质的分泌，进而驱使细胞向软骨细胞分化，而 HIF-1α 表达的降低，则明显使干细胞向软骨细胞分化延迟。因此，我们认为 HIF-1α 是成软骨过程中的重要调节因子，并且 Sox9 在其中发挥了重要作用，并且可能是 HIF-1α 发挥其调控作用的靶点。

BMP2 不但通过调节 Sox9 促进软骨形成，而且还观察到 BMP2 能够调节 Runx2 及其下游基因 ALP、COL1A1 的表达。Runx2 是胚胎时期骨形成及体外诱导成骨分化的重要调节因子[22]。Runx2 基因突变后，小鼠出现完全的骨化障碍，干细胞分化为表达少量 ALP 且几乎不表达其他骨性成分的幼稚成骨细胞[23]。这些结果都证实了 BMP2 能够通过调控 Runx2 的表达，调节干细胞的成骨分化。

本实验在 BMP2 诱导的干细胞分化过程中，发现 HIF-1α 能够明显抑制 Runx2 的表达。同时其下游的成骨分化标志物 ALP、COL1A1 的表达被明显下调。有学者认为低氧可能主要是通过脱乙酰化酶 4（histone deacetylase 4，HADC-4）下调了 Runx2 的表达，进而抑制了软骨细胞的终末期分化及成骨分化[24]。目前 HIF 家族对成骨分化的调节机制尚未完全阐明，需要进一步探讨。我们的体外细胞实验结果证实，HIF-1α 能够通过抑制 Runx2 的表达，明显抑制 BMP2 诱导的成骨分化，此外通过体内动物实验进行了进一步验证。组织学对比发现 HIF-1α 能够明显增强 BMP2 诱导的干细胞的成软骨分化及软骨结构的形成，抑制成

骨分化及骨小梁等骨性结构的形成,维持了软骨表型。因此,我们推断 HIF-1α 所引起的 Sox9 的上调与 Runx2 的下调正是发挥这些效应的关键。正如在正常的关节软骨中,低氧环境促进了 HIF-1α 的表达,进而促进了软骨基质的合成,维持关节软骨的表型,抑制软骨内骨化[21]。

我们的结果揭示了低氧通路中的关键转录调控因子 HIF-1α 能够增强 BMP2 诱导干细胞成软骨分化,并抑制成骨分化及软骨内骨化,维持了软骨表型。同时,我们推断低氧通路中的 HIF-1α 在促进干细胞定向成软骨分化及促进软骨组织的再生的过程中发挥着重要的作用。

参考文献:

[1] Ghone N V, Grayson W L. Recapitulation of mesenchymal condensation enhances *in vitro* chondrogenesis of human mesenchymal stem cells [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(11): 3701 – 3708.

[2] Estes B T, Diekman B O, Gimble J M, *et al*. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype[J]. Nat Protoc, 2010, 5(7): 1294 – 1311.

[3] Weiss S, Hennig T, Bock R, *et al*. Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. J Cell Physiol, 2010, 223(1): 84 – 93.

[4] Rosen V. BMP2 signaling in bone development and repair[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(5/6): 475 – 480.

[5] Nishimura R, Hata K, Matsubara T, *et al*. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors[J]. J Biochem, 2012, 151(3): 247 – 254.

[6] Yoon B S, Lyons K M. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis [J]. J Cell Biochem, 2004, 93(1): 93 – 103.

[7] Sheehy E J, Buckley C T, Kelly D J. Oxygen tension regulates the osteogenic, chondrogenic and endochondral phenotype of bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(1): 305 – 310.

[8] Keith B, Simon M C. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer[J]. Cell, 2007, 129(3): 465 – 472.

[9] Kanichai M, Ferguson D, Prendergast P J, *et al*. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha[J]. J Cell Physiol, 2008, 216 (3): 708 – 715.

[10] Duval E, Bauge C, Andriamanalijaona R, *et al*. Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in *in vivo* cartilage tissue engineering [J]. Biomaterials, 2012, 33 (26): 6042 – 6051.

[11] Luo J, Deng Z L, Luo X, *et al*. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1236 – 1247.

[12] Takacs R, Matta C, Somogyi C, *et al*. Comparative analysis of osteogenic/chondrogenic differentiation potential in primary limb bud-derived and C3H10T1/2 cell line-based mouse micromass cultures[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(8): 16141 – 16167.

[13] Chen L, Jiang W, Huang J, *et al*. Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) potentiates BMP-9-induced osteogenic differentiation and bone formation[J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(11): 2447 – 2459.

[14] Portron S, Merceron C, Gauthier O, *et al*. Effects of *in vitro* low oxygen tension preconditioning of adipose stromal cells on their *in vivo* chondrogenic potential: application in cartilage tissue repair [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62368.

[15] Dickhut A, Pelttari K, Janicki P, *et al*. Calcification or Dedifferentiation: requirement to lock mesenchymal stem cells in a desired differentiation stage[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(1): 219 – 226.

[16] Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(2): 150 – 161.

[17] Akiyama H, Chaboissier M C, Martin J F, *et al*. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6 [J]. Genes Dev, 2002, 16(21): 2813 – 2828.

[18] Pan Q, Yu Y, Chen Q, *et al*. Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter[J]. J Cell Physiol, 2008, 217(1): 228 – 241.

[19] Zehentner B K, Dony C, Burtscher H. The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling[J]. J Bone Miner Res, 1999, 14 (10): 1734 – 1741.

[20] Zhang C, Yang F, Cornelia R, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1 is a positive regulator of Sox9 activity in femoral head osteonecrosis[J]. Bone, 2011,48(3): 507 – 513.

[21] Amarilio R, Viukov S V, Sharir A, *et al*. HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis [J]. Development, 2007, 134 (21): 3917 – 3928.

[22] Bae J S, Gutierrez S, Narla R, *et al*. Reconstitution of Runx2/Cbfa1-null cells identifies a requirement for BMP2 signaling through a Runx2 functional domain during osteoblast differentiation [J]. J Cell Biochem, 2007, 100(2): 434 – 449.

[23] Komori T, Yagi H, Nomura S, *et al*. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts[J]. Cell, 1997, 89(5): 755 – 764.

[24] Hirao M, Tamai N, Tsumaki N, *et al*. Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification [J]. J Biol Chem, 2006, 281(41): 31079 – 31092.

(**收稿**:2013-10-16;**修回**:2013-11-18)

(编辑 龙 亮)