

[文章编号] 1674-8115(2011)07-0913-05

· 论著 ·

低氧通路对骨髓间充质干细胞多向分化能力的影响

曾文¹, 张伟¹, 王君¹, 邓若妍², 周琦¹, 魏立¹, 齐进¹, 邓廉夫¹

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院 上海市伤骨科研究所 上海市中西医结合防治骨与关节病损重点实验室, 上海 200025; 2. 上海理工大学 医疗器械与食品学院, 上海 200093)

[摘要] 探讨低氧通路中低氧诱导因子 1α(HIF-1α)对骨髓间充质干细胞(MSCs)多向分化能力的影响。方法 以腺病毒载体 Ad-Cre 对转基因鼠 MSCs 的 VHL 基因进行基因敲除(基因敲除组), 设立对照组(感染腺病毒载体 Ad-GPF 的转基因鼠 MSCs), 采用 Real-Time PCR 技术检测 HIF-1α mRNA 表达。两组 MSCs 分别经成脂肪和成软骨诱导分化培养 14 d, 成骨诱导分化培养 21 d; 其中基因敲除组 MSCs 于 5% O₂条件下培养, 对照组 MSCs 于 20% O₂条件下培养。采用 Real-Time PCR 技术检测软骨细胞标志物Ⅱ型胶原(Col II)、脂肪细胞标志物过氧化物酶增殖激活受体 γ(PPARγ)及成骨细胞标志物骨钙素(OC)和碱性磷酸酶(ALP)的 mRNA 表达; Col II 染色和 ALP 染色光学显微镜观察两组 Col II 和 ALP 染色阳性细胞的分布情况。结果 基因敲除组 HIF-1α mRNA 表达显著高于对照组($P < 0.05$)。5% O₂条件下培养的基因敲除组 Col II、PPARγ、OC、ALP mRNA 表达均显著高于 20% O₂条件下培养的对照组($P < 0.05$)。与对照组比较, 基因敲除组 Col II 染色和 ALP 染色阳性细胞数量较多且染色较深。结论 在 5% O₂条件下, HIF-1α 具有促进 MSCs 向软骨细胞、脂肪细胞和成骨细胞分化的作用。

[关键词] 低氧诱导因子 1α; 骨髓间充质干细胞; 基因敲除; 诱导分化

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.07.010

[中国分类号] Q813; R68

[文献标志码] A

Effects of hypoxia pathway on multipotential differentiation of bone marrow stromal stem cells

ZENG Wen¹, ZHANG Wei¹, WANG Jun¹, DENG Ruo-xian², ZHOU Qi¹, WEI Li¹, QI Jin¹, DENG Lian-fu¹

(1. Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai Institute of Traumatology and Orthopedics, Shanghai Key Laboratory of Combination of Traditional Chinese and Western Medicine in Prevention and Therapy of Osteoarthritis, Shanghai 200025, China; 2. School of Medical Devices and Food Sciences, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) on the multipotential differentiation of bone marrow stromal stem cells (MSCs) in the hypoxia pathway. **Methods** Conditional gene knockout of VHL gene of MSCs from transgenic mice was performed with Ad-Cre (gene knockout group), and control group was established (MSCs from transgenic mice infected with Ad-GPF). The expression of HIF-1α mRNA was detected by Real-Time PCR. Chondrogenic culture and osteogenic culture of MSCs were conducted for 14 d in two groups, and osteogenic culture of MSCs was conducted for 21 d in two groups, with culture of MSCs under 5% O₂ in gene knockout group and culture of MSCs under 20% O₂ in control group. The expression of chondrocyte marker of type II collagen (Col II), adipocyte marker of peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPARγ) and osteoblast markers of osteocalcin (OC) and alkaline phosphatase (ALP) mRNA was detected by Real-Time PCR. The distributions of positive cells with Col II staining and ALP staining were observed by light microscopy in two groups. **Results** The expression of HIF-1α mRNA in gene knockout group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The expression of Col II, PPARγ, OC and ALP mRNA in gene knockout group cultured under 5% O₂ was significantly higher than that in control group cultured under

[基金项目] 国家自然科学基金(30872641); 上海市科委研发基地(09DZ2200500, 10DZ2211500); 上海交通大学医学院科技基金项目(YZ1029) (National Natural Science Foundation of China, 30872641; Shanghai Science and Technology Committee Foundation, 09DZ2200500, 10DZ2211500; Technology Fund of Shanghai Jiaotong University School of Medicine, YZ1029)。

[作者简介] 曾文(1982—), 男, 硕士生; 电子信箱: safeng123@163.com。

[通信作者] 邓廉夫, 电子信箱: lianfudeng@126.com。

20% O₂ ($P < 0.05$)。Compared with control group, the numbers of positive cells with Col II staining and ALP staining were larger. **Conclusion** HIF-1 α can promote the differentiation of MSCs into chondrocytes, adipocytes and osteoblasts under 5% O₂.

[Key words] hypoxia-inducible factor 1 α ; bone marrow stromal stem cells; gene knockout; differentiation

研究^[1]表明,骨髓腔在生长发育过程中长期处于低氧状态,其氧浓度约为4%~7%,骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal stem cells, MSCs)长期处于该微环境下;因此,低氧通路在MSCs的生长发育过程中起着重要的作用。低氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是介导低氧通路的核心因子,在低氧条件下,通过VHL基因介导的泛素化途径降解减少,HIF-1 α 转入核内与HIF-1 β 形成异二聚体并与DNA中的低氧反应元件结合,启动下游低氧相关基因的表达,调节细胞组织生长发育以适应低氧微环境^[2]。

本研究利用腺病毒载体Ad-Cre敲除转基因鼠MSCs的VHL基因,观察低氧通路中HIF-1 α 过表达对MSCs向软骨细胞、脂肪细胞和成骨细胞分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 3~4周龄VHL基因标记鼠(VHL^{loxP/loxP}),品系FVB/N,体质量20~25 g,雌雄不限,由美国Alabama大学Clemens TL教授惠赠;动物使用许可证号码:SYXK(沪)2010-0020。

1.1.2 主要试剂和仪器 MSCs培养基:为含20%胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司)的DMEM-LG(Gibco)+MCDB-201(Sigma)培养基(DMEM-LG与MCDB-201按体积比3:2配制)。成软骨分化培养基、成骨分化培养基和成脂肪分化培养基A、B液(Cyagen);0.25%胰蛋白酶(Gibco),腺病毒载体(Ad-Cre、Ad-GFP)(BioLabs);反转录试剂盒(Promega);TRIzol试剂(Invitrogen);采用Primer Premier 6.0软件设计PCR引物,并由Invitrogen公司合成;二甲基甲酰胺和固紫B(Sigma);生物素标记的二抗(武汉博士德生物公司)。3110型低氧培养箱和BNA-311型CO₂培养箱(Thermo);RG-3000型定量PCR扩增仪(Corbett Research);Allegra 64R高速冷冻离心机(Beckman Couter)。

1.2 MSCs的分离培养、VHL基因条件性敲除及鉴定

1.2.1 MSCs的分离培养

取股骨和胫骨,用1 mL注射器吸取培养液冲洗出骨髓,并制成细胞悬液,接种至直径为10 cm的培养皿中,加入约10 mL的MSCs培养基,48 h后弃去未黏附的细胞悬液,PBS冲洗1~2次,隔天换液。待细胞长满90%后,用0.25%胰蛋白酶消化,按1:3传代培养,选择第2代细胞进行后续实验^[3]。

1.2.2 VHL基因条件性敲除及相关检测 ①基因敲除和分组:将MSCs(5×10^5 个/cm²)接种于6孔板中,待细胞融合达90%时,弃去培养液,PBS冲洗2~3次,每孔中加入200 μ L PBS。以加入1 μ L Ad-Cre(感染复数=100)的MSCs作为基因敲除组,以加入1 μ L Ad-GFP(感染复数=100)的MSCs作为对照组,细胞置于CO₂培养箱中,于37 °C、5% CO₂条件下培养,每隔15 min轻轻摇晃1次,使病毒与细胞充分接触,1 h后每孔加入MSCs培养基2 mL,置CO₂培养箱中继续培养。②HIF-1 α mRNA表达检测:Ad-Cre和Ad-GFP感染MSCs48 h后,TRIzol试剂裂解MSCs并提取总RNA,反转录合成cDNA,Real-Time PCR检测HIF-1 α mRNA表达。PCR引物序列见表1。

1.3 VHL基因敲除MSCs的诱导分化及相关检测

1.3.1 MSCs的诱导分化 将基因敲除组和对照组MSCs接种于6孔板(5×10^5 个/cm²)。成软骨诱导时,每孔加1 mL成软骨分化培养基^[4];成脂肪诱导时,待MSCs融合至100%,每孔加入2 mL成脂肪分化培养基A液,3 d后弃去全部A液,加入B液维持24 h,共3个循环;成骨诱导时,每孔加入2 mL成骨分化培养基,置培养箱中,基因敲除组MSCs在5%O₂(低氧)条件下培养,对照组MSCs在20%O₂条件下培养。

1.3.2 Real-Time PCR检测 分别于成脂肪、成软骨诱导分化培养后14 d和成骨诱导分化培养后21 d,取出6孔板收集细胞,TRIzol试剂提取总RNA,用2 μ g RNA行反转录,Real-Time PCR检测软骨细胞标志物II型胶原(collagen II, Col II)、脂肪细胞标志物过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptors gamma, PPAR γ)及成骨细胞标志物骨钙素(osteocalcin, OC)和碱性磷酸酶

(alkaline phosphatase, ALP) 的 mRNA 表达。PCR 引物序列见表 1。

表 1 定量 RT-PCR 引物序列
Tab 1 Primer sequences for quantitative RT-PCR

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
β-actin	CATGTACGGTGCTATCCAGGC(上游) CTGCTTAATGTCACGGACGGAT(下游)	250
HIF-1α	CCTATTATTCACCACCGAC(上游) GAGGGAAACATTACATCA(下游)	284
Col II	GCTTACCCCACACACACAAGC(上游) AGTGGACACTAGACACGGAGGAAA(下游)	476
PPARγ	TCGCTCATGGACTGGCTATG(上游) GAGAGGTCCACAGAGCTGATT(下游)	103
OC	ACCCCTGGCTGGCTCTCTCT(上游) AGGTAGGGGGAGTCTGTTCAC(下游)	160
ALP	GGTAGATTACGGCTCACACAA(上游) AGGCATACGCCATCACAT(下游)	164

1.3.3 组织学观察 ① Col II 染色: MSCs 爬片, 成软骨诱导液培养 14 d, 4% 多聚甲醛固定, 3% H₂O₂ 去离子水孵育 5~10 min, 蒸馏水冲洗, 羊血清封闭非特异性抗体后滴加 1:400 稀释的一抗, 37 °C 孵育后滴加生物素标记的二抗, 显色后苏木精复染, 透明、封固, 显微镜下观察两组 Col II 染色阳性细胞的分布情况。② ALP 染色: MSCs 爬片, 成骨诱导液培养 21 d, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 冲洗, 置二甲基甲酰胺与固紫 B 混合物中浸泡 45 min, 流水冲洗, 甲基绿复染, 透明、封固, 显微镜下观察两组 ALP 染色阳性细胞的分布情况。

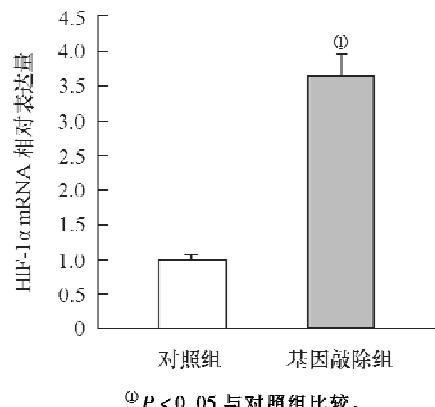
1.4 统计学方法

采用 SPSS 15.0 软件包进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 Student-t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs VHL 基因敲除后 HIF-1α mRNA 表达

Real-Time PCR 检测结果显示: 基因敲除组 HIF-1α mRNA 表达显著高于对照组, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1)。



① $P < 0.05$ 与对照组比较。

图 1 RT-PCR 检测 VHL 基因敲除后 HIF-1α mRNA 的表达

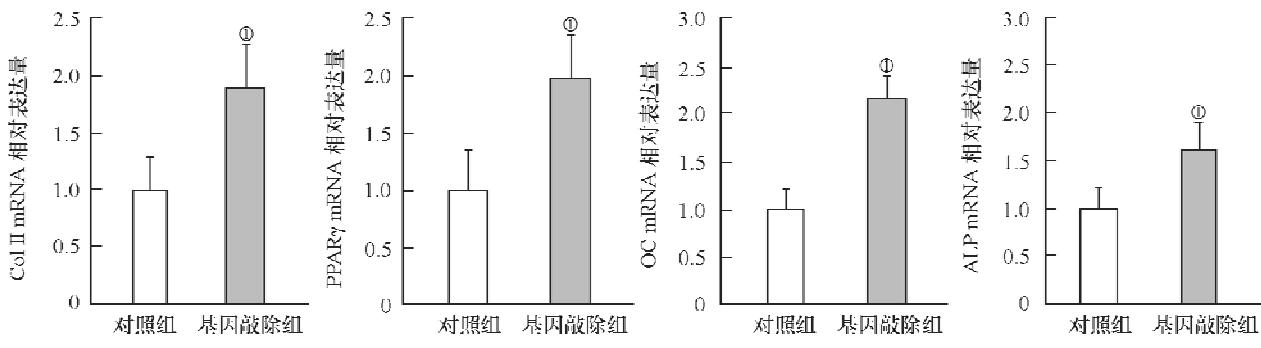
Fig 1 Expression of HIF-1α mRNA after VHL gene knockout detected by RT-PCR

2.2 Col II、PPARγ、OC、ALP mRNA 表达

成软骨和成脂肪诱导分化培养后 14 d, 基因敲除组 Col II、PPARγ mRNA 表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 成骨诱导分化培养后 21 d, 基因敲除组 OC、ALP mRNA 表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 组织学观察

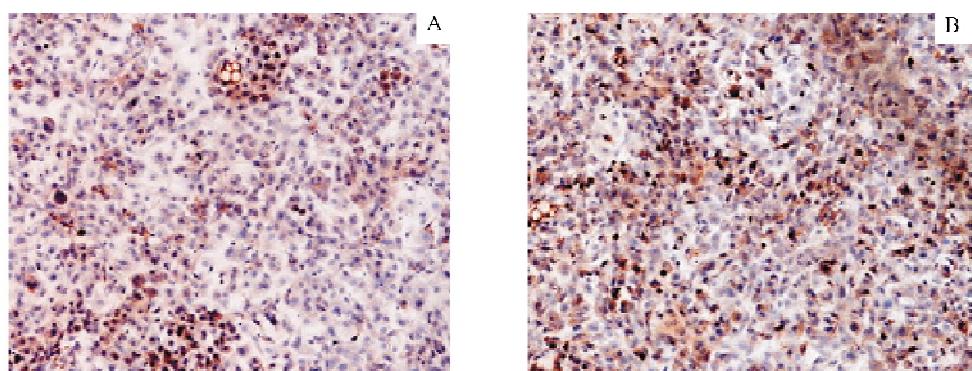
Col II 染色光学显微镜观察显示: 成软骨诱导分化培养后 14 d, 与对照组比较, 基因敲除组 Col II 染色阳性细胞数量较多且染色较深(图 3)。ALP 染色光学显微镜观察显示: 成骨诱导分化培养后 21 d, 与对照组比较, 基因敲除组 ALP 染色阳性细胞数量较多且染色较深(图 4)。



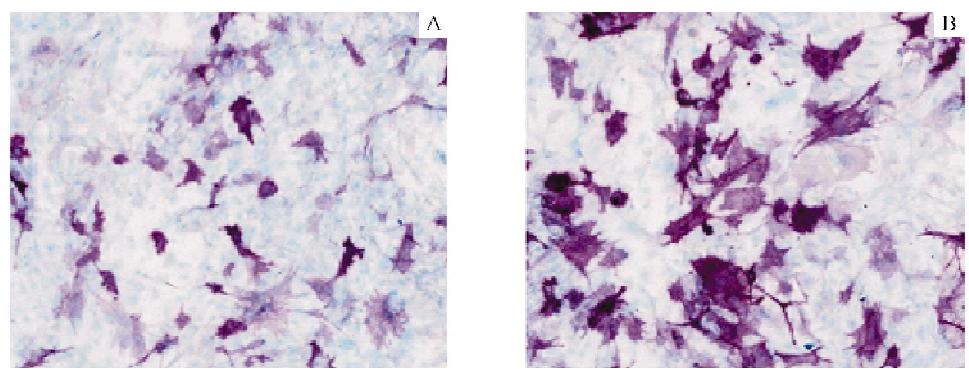
① $P < 0.05$ 与对照组比较。

图 2 两组 MSCs 的 Col II、PPARγ、OC、ALP mRNA 表达

Fig 2 Expression of Col II, PPARγ, OC and ALP mRNA of MSCs in two groups



A. 对照组；B. 基因敲除组。

图 3 两组 Col II 染色阳性细胞分布情况 $\times 100$
Fig 3 Distributions of positive cells with Col II staining in two groups $\times 100$ 

A. 对照组；B. 基因敲除组。

图 4 两组 ALP 染色阳性细胞分布情况 $\times 50$
Fig 4 Distributions of positive cells with ALP staining in two groups $\times 50$

3 讨 论

HIF-1 包含两个亚型, 分别为 HIF-1 α 和 HIF-1 β , 其中 HIF-1 α 是氧依赖性亚基, 位于细胞质中, 是介导低氧反应的核心因子; HIF-1 β 为稳定表达因子, 位于细胞核中, 不受氧浓度调节。在常氧条件下, HIF-1 α 亚基被脯氨酸羟化酶羟化之后与 VHL 蛋白结合形成 VBC 复合物, 该复合物通过泛素化途径降解。当氧浓度降低时($2\% \sim 5\% O_2$), 脯氨酸羟化酶受到抑制^[5], HIF-1 α 亚基降解减少, 导致 HIF-1 α 亚基在细胞质中大量聚集。HIF-1 α 亚基转入细胞核内与 HIF-1 β 亚基结合, 形成异二聚体, 并与 DNA 中的低氧反应元件的 5'-RCGTG-3' 序列^[6]结合, 启动其下游的低氧相关基因转录, 如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和糖酵解相关基因等^[2], 介导细胞、组织适应低氧环境。

MSCs 为来源于中胚层细胞的一类具有自我更新及多向分化能力的干细胞^[7], 在骨发育过程中, 最终分化为软骨、成骨、脂肪细胞等。骨髓腔在发育生

长过程中处于低氧状态, 其氧浓度约为 4% ~ 7%, 软骨中氧浓度从表层的 7% 一直降低到深层的 1% 左右^[8, 9], 因此低氧微环境在 MSCs 成软骨分化过程中起着重要的作用。在我们前期的研究^[10]中也发现, 体内条件性敲除 VHL 基因的转基因小鼠, 在生长至第 6 周时, 其 MicroCT 结果显示骨髓腔完全被骨组织替代。为此我们在体外采用腺病毒介导的基因敲除技术敲除 MSCs 的 VHL 基因, 研究 HIF 介导的低氧通路是否参与了 MSCs 成骨分化。另外, 随着年龄的增长, 人体长骨骨髓腔中的红骨髓逐渐被黄骨髓(脂肪组织)替代, 只有在长骨两端血运丰富的地方及扁平骨骨髓腔中有红骨髓存在, 保持着造血功能, 因此我们也探讨了低氧($5\% O_2$)是否参与了 MSCs 的成脂分化^[11, 12]。

本研究用转基因小鼠, 抽取其 MSCs, 用携带 Cre 的腺病毒载体感染体外传代培养至第 2 代的 MSCs, 达到敲除 VHL 基因的目的。由于 VHL 基因通过泛素化途径介导 HIF-1 α 亚基的降解, 当 VHL 基因被敲除之后, 其表达降低, HIF-1 α 亚基降解减少。由于

HIF-1蛋白需在低氧的条件下起作用,本实验选择5% O₂作为维持HIF-1α表达并发挥作用的条件,以研究HIF-1α在MSCs分化过程中的作用。本研究结果显示:5% O₂条件下的基因敲除组在向软骨细胞分化的过程中,软骨细胞的标志物Col II mRNA表达明显高于20% O₂条件下培养的对照组,Col II免疫组织化学染色结果也证实了上述结果;提示VHL基因敲除后, MSCs高表达HIF-1α,有利于MSCs向软骨方向分化^[13]。本实验中,5% O₂条件下的基因敲除组在向脂肪细胞分化的过程中,脂肪细胞的特异标志物PPARγ mRNA表达明显高于20% O₂条件下培养的对照组;其机制可能与低氧情况下细胞代谢水平较低,脂肪转运障碍,导致脂肪组织在细胞内积聚有关^[14]。本研究结果显示:5% O₂条件下的基因敲除组在向成骨细胞分化的过程中,成骨细胞早期和晚期标志物ALP和OC的mRNA表达也明显高于20% O₂条件下培养的对照组,ALP染色结果也证实了上述结果;提示在5% O₂条件下,HIF-1α具有促进MSCs向成骨细胞分化的作用^[15]。

综上所述,在5% O₂条件下,HIF-1α具有促进MSCs向软骨细胞、脂肪细胞和成骨细胞分化的作用。我们将在此实验的基础上,进一步探讨不同低氧条件下HIF-1α介导的低氧通路对MSCs多向分化能力的影响及其作用机制。

[参考文献]

- [1] Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on *in vitro* and *in vivo* osteochondrogenesis [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 187(3): 345–355.
- [2] Brahimi-Horn MC, Pouysségur J. HIF at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 8): 1055–1057.
- [3] Lennon DP, Haynesworth SE, Young RG, et al. A chemically defined medium supports *in vitro* proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Exp Cell Res*, 1995, 219(1): 211–222.
- [4] Worster AA, Nixon AJ, Brower-Toland BD, et al. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells [J]. *Am J Vet Res*, 2000, 61(9): 1003–1010.
- [5] Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing [J]. *Science*, 2001, 292(5516): 464–468.
- [6] Brnck RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(21): 2614–2623.
- [7] Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals [J]. *Arthritis Res*, 2000, 2(6): 477–488.
- [8] Murphy CL, Sambanis A. Effect of oxygen tension and alginate encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes [J]. *Tissue Eng*, 2001, 7(6): 791–803.
- [9] Domm C, Sehünke M, Christesen K, et al. Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002, 10(1): 13–22.
- [10] Wang Y, Wan C, Deng L, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(6): 1616–1626.
- [11] Taccone A, Oddone M, Dell'Acqua AD, et al. MRI "road-map" of normal age-related bone marrow. II. Thorax, pelvis and extremities [J]. *Pediatr Radiol*, 1995, 25(8): 596–606.
- [12] Taccone A, Oddone M, Occhi M, et al. MRI "road-map" of normal age-related bone marrow. I. Cranial bone and spine [J]. *Pediatr Radiol*, 1995, 25(8): 588–595.
- [13] Krinner A, Zscharnack M, Bader A, et al. Impact of oxygen environment on mesenchymal stem cell expansion and chondrogenic differentiation [J]. *Cell Prolif*, 2009, 42(4): 471–484.
- [14] Ren H, Cao Y, Zhao Q, et al. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 347(1): 12–21.
- [15] 刘晓东, 邓廉夫, 王君, 等. 低氧诱导因子-1α在骨形成过程中对成骨细胞功能的调控 [J]. 中华医学杂志, 2007, 87(47): 3357–3361.

[收稿日期] 2011-03-21

[本文编辑] 刘晓华