

低氧对成骨生长肽诱导的小鼠间充质干细胞成骨分化的影响

张磊¹ 龚跃昆² 赵学凌² 周厚俊^{3*}

1. 云南省第一人民医院康复医学科, 昆明 650032

2. 昆明医科大学第一附属医院骨科, 昆明 650032

3. 昆明医科大学第一附属医院神经外科, 昆明 650032

中图分类号: R683; R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 11-1380-06

摘要: 目的 探讨低氧对成骨生长肽 (osteogenic growth peptide, OGP) 诱导的小鼠骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 增殖与成骨分化的影响。方法 将第三代小鼠 BMSCs 随机分为四组: 对照组 (A 组, 常氧条件下培养); 1% O₂ 组 (B 组, 1% O₂ 条件下培养); OGP 组 (C 组, 常氧条件下添加 OGP 培养); 1% O₂ 联合 OGP 组 (D 组, 1% O₂ 条件下添加 OGP)。分别于培养后 1 天、2 天、3 天、4 天收集细胞, 噻唑蓝 (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 比色法观察 BMSCs 增殖能力; 培养 7、14 天后收集细胞, 可见光比色法检测细胞碱性磷酸酶活性 (alkaline phosphatase, ALP); 培养 1 天后收集细胞, ELISA 法检测低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor, HIF-1 α) 表达, 培养 3、7 天后收集细胞, 实时荧光定量 PCR 检测 RUNX2、Osterix 表达。结果 MTT 结果显示, 与 C 组相比, 在培养第 2、3、4 天 D 组能明显促进 BMSCs 增殖 ($P < 0.05$)。与 C 组相比, 在培养第 7、14 天 D 组能明显上调 ALP 表达 ($P < 0.05$)。与 C 组相比, 在培养第 3、7 天 D 组能明显上调 RUNX2、Osterix 信使 RNA 表达 ($P < 0.05$)。在培养后 1 天, A 组及 C 组未能检测到 HIF-1 α 蛋白, B 组与 D 组 HIF-1 α 表达明显增加 ($P < 0.001$)。结论 低氧明显增强了 OGP 促进 BMSCs 增殖及成骨分化的作用。

关键词: 低氧; 成骨生长肽; 骨髓间充质干细胞; 成骨分化

Effect of hypoxia on the osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells induced by osteogenic growth peptide

ZHANG Lei¹, GONG Yuekun², ZHAO Xueling², ZHUO Houjun^{3*}

1. Department of Rehabilitation Medicine, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032

2. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032

3. Department of Neurosurgery 2, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China

Corresponding author: ZHOU Houjun, Email: zhouhj1231@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of hypoxia on the proliferation and osteogenesis of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) induced by osteogenic growth peptide (OGP). **Methods** The third passage BMSCs were randomly divided into 4 groups: control group (group A, under normal oxygen condition), 1% O₂ group (group B, under 1% O₂ condition), OGP group (group C, addition of OGP under normal oxygen condition), 1% O₂ combined with OGP group (group D, addition of OGP under 1% O₂ condition). The proliferation of BMSCs was detected with methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay at 1d, 2d, 3d, and 4d. ALP expression was determined with visible light photocolometric method at 7d and 14d after osteogenic induction. ELISA was employed for detecting hypoxia inducible factor (HIF-1 α) at 1d. qPCR was employed for detecting the mRNA of runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and Osterix at 3d and 7d. **Results** MTT assay showed that compared with that in group C, BMSCs proliferation was promoted obviously in group D ($P < 0.05$). Compared with that in group C, ALP expression was up-regulated obviously in group D ($P < 0.05$). Compared with that in group C, mRNA expression of RUNX2 and Osterix increased obviously in group D. HIF-1 α protein was not detected in group A and group C, while the expression of HIF-1 α

基金项目: 云南省卫计委科研基金(2011WS0033)

* 通讯作者: 周厚俊, Email: zhouhj1231@qq.com

was up-regulated obviously in group B and group D ($P < 0.001$). **Conclusion** Hypoxia promotes OGP-induced BMSCs proliferation and osteogenesis.

Key words: Hypoxia; Osteogenic growth peptide; Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenesis

成骨生长肽是最初从血清中分离得到的 14 肽,其经过水解后产生活性形式的羧基端五肽 OGP^[10-14]。活化后的 OGP 进而激活 MAPK/ERK 信号通路及 Rho/ROCK 信号通路强力促进间充质干细胞增殖及成骨分化^[1,2]。OGP 在体外能强力促进间充质干细胞增殖、成骨分化^[3,4,5]。与 OGP 复合后的可降解高分子复合物能明显促进成骨及再生^[6,7],显示出在骨组织工程中良好的应用前景。近年,低氧对干细胞增殖及分化影响逐渐引起了学者重视。低氧适应性反应由低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)所介导,其可调控一系列下游基因如血管内皮生长因子、血小板源性生长因子、胎盘生长因子、红细胞生成素、乳酸脱氢酶、葡萄糖转运蛋白等的表达,在机体的能量代谢、新生血管形成、红细胞生成、细胞凋亡调控等方面发挥重要调控作用^[8]并且越来越多的研究表明低氧在干细胞的成骨分化中发挥重要的调控作用^[9,10,11]。关于低氧对 OGP 的成骨效应有何影响罕有报道,本文拟探讨低氧环境对 OGP 诱导的间充质干细胞成骨分化的影响,以期为后期动物实验及临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

健康 3-4 周龄昆明小鼠(体重约 18-20 g,雌雄不限)购于昆明医科大学实验动物中心。OGP 购自北京博奥森生物技术有限责任公司,兔 RUNX2、Osterix 单克隆抗体购自 Santa cruz 公司,GAPDH 单克隆抗体购自 abmart 公司,HIF-1 α ELISA 试剂盒购自 R&D 公司,低糖 DMEM 培养基、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、胰岛素、转化生长因子 β 1、甲苯胺蓝、油红 O、吡嗪美辛、维生素 C、 β -甘油磷酸钠、地塞米松购自 Sigma 公司,ALP 定量检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR 试剂盒(Invitrogen 公司),Golden Taq PCR 试剂盒(北京天根生化公司),Superscript III cDNA 合成试剂盒(Invitrogen 公司),Trizol 裂解液(Invitrogen 公司)。

1.2 骨髓间充质干细胞分离、培养与鉴定

自小鼠股骨及胫骨髓腔分离培养小鼠骨髓单

个核细胞,通过反复换液去除非贴壁细胞,贴壁细胞达到 80%~90% 融合时消化传代^[12]。通过流式细胞术对细胞表面标志进行检测及细胞成骨、成脂肪、成软骨三系分化鉴定小鼠骨髓间充质干细胞,具体方依照我们课题组既往实验步骤进行^[12]

1.3 实验分组

实验共分为 4 组:对照组(A 组)、1% O₂ 组(B 组)、OGP 组(C 组)、1% O₂ 联合 OGP 组(D 组)。A 组于常氧条件下培养,B 组于 1% 低氧条件下培养,C 组于常氧条件下 + OGP 培养,D 组于 1% 低氧条件下 + OGP 培养。根据既往实验^[10,13,14,15],我们选择 1% O₂ 作为低氧干预浓度,10⁻⁹ mol/L OGP 作为实验浓度。MTT 细胞增殖实验中采用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 常规细胞培养基,其余实验均采用成骨诱导细胞培养基(10% 胎牛血清的低糖 DMEM + 50 μ g/ml 维生素 C + 10 mmol/L β -甘油磷酸钠 + 10⁻⁸ mol/L 地塞米松)。

1.4 MTT 检测 BMSCs 增殖

以 1 $\times$ 10⁴ 个/ml 的密度将第三代 BMSCs 接种于 96 孔板内,每孔 200 μ l。分别于培养后的 1 d、2 d、3 d 及 4 d,弃上清,每孔加入含 5 mg/ml MTT 的培养液 150 μ l,继续孵育 4 h,小心吸弃孔内上清液,每孔加入 150 μ l DMSO 溶液震荡,待充分溶解后,在酶联免疫检测仪上测量吸收值 OD,测量波长为 490 nm,每组设 6 个复孔,计算其平均 OD 值。

1.5 ALP 定量检测

细胞以 1 $\times$ 10⁵/孔密度接种于 6 孔板中,分别再分组换液培养 7 d、14 d 后收集细胞。培养细胞先用 4% 多聚甲醛液处理 2 min,然后使用 RIPA buffer 裂解液裂解细胞,按照碱性磷酸酶测定试剂盒说明操作,酶标仪设定在 520 nm 波长处进行比色,碱性磷酸酶 ALP 测定结果以金氏 U/100 ml 表示。每组设 6 个复孔计算平均值。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测

分别于培养 3 天、7 天后使用 TRIzol 提取总 RNA,OD260/OD280 比值检测 RNA 纯度与浓度;使用 RT-PCR 的 superscript 第一链合成系统合成 cDNA。RUNX2 引物序列为上游 5'-TTC AAC GAT CTG AGA TTT GTG GG-3',下游 5'-GGA TGA GGA ATG CGC CCT A-3';Osterix 引物序列为上游 5'-

ATGGCGTCCTCTCTGCTTG-3', 下游 5'-TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT-3'; β -actin 引物序列为上游 5'-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA-3', 下游 5'-GCCGGACTCATCGTACTCC-3' 最后使用 SYBR Green qPCR 荧光染料于 ABI prism 7000 型实时荧光定量仪进行扩增。反应条件为 95 °C 变性 2 分钟, 40 个循环 (95 °C 15 s, 54 °C 30 s, 65 °C 20 s)。 β -actin 作为内参, 目的基因表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析, 将 A 组各基因表达量设定为 1。

1.7 ELISA 法检测 HIF-1 α 的表达

细胞培养 24 h 收集细胞用于检测 HIF-1 α 蛋白, PBS 洗涤细胞后裂解液进行裂解, 2 000 g 离心 5 分钟, 收集上清液 BCA 法测定蛋白浓度。采用双抗体夹心法检测 HIF, 先将捕获抗体包被于固相载体上, 然后加入含有待测抗原的样本与捕获抗体结合, 孵育 2 小时; 随后再加入检测抗体孵育 2 小时, 随后加入辣根过氧化物酶标记链霉亲和素孵育 20 分钟, 底物溶液孵育 20 分钟, 最后加入终止液。在 450 nm 处检测光密度值, 最后通过绘制标准曲线计算出 HIF-1 α 浓度。HIF-1 α 测定结果以 pg/mg 总蛋白表示。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 检验; 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞增殖检测

MTT 结果表明在培养后的第 1 天, B 组、C 组及 D 组细胞增殖率与 A 组相比均无明显差异 ($P > 0.05$)。在培养后的第 2、3、4 天, 与 A 组相比, B 组 (2 天: 122%; 3 天: 142%; 4 天: 145%; 均 $P < 0.05$)、C 组 (2 天: 141%; 3 天: 162%; 4 天: 163%; 均 $P < 0.05$) 及 D 组 (2 天: 173%; 3 天: 192%; 4 天: 213%; 均 $P < 0.001$) 均能明显促进 BMSCs 增殖。与 C 组相比, D 组 (2 天: 123%; 3 天: 118%; 4 天: 131%; 均 $P < 0.05$); 与 B 组相比, D 组 (2 天: 141%; 3 天: 135%; 4 天: 147%; 均 $P < 0.05$)。与 B 组相比, C 组 (2 天: 115%; 3 天: 114%; 4 天: 112%; 均 $P < 0.05$)

2.2 ALP 定量检测

培养 7 天 A、B、C、D 组 ALP 含量分别为 1.753 ± 0.077 、 7.222 ± 0.175 、 9.125 ± 0.582 、 12.587 ± 0.808 金氏单位/100 ml, 14 天分别为 $3.412 \pm$

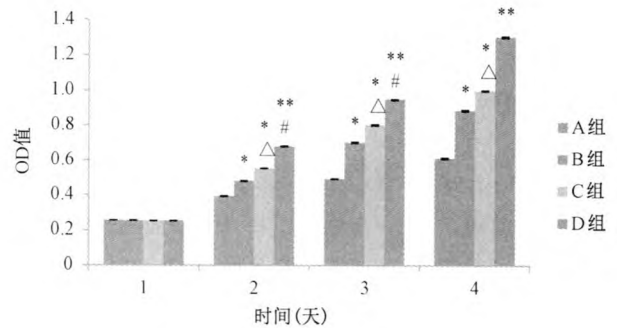


图 1 MTT 检测各组细胞增殖率

与 A 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; 与 B 组及 C 组相比, # $P < 0.05$, 与 B 组相比, $\Delta P < 0.05$

Fig. 1 BMSCs proliferation ratio detected by MTT.

Compared with group A, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; compared with group B and group C, # $P < 0.05$; compared with group B, $\Delta P < 0.05$.

0.131 、 10.562 ± 0.618 、 13.012 ± 0.779 、 17.897 ± 1.826 金氏单位/100 ml。B、C、D 组 ALP 含量明显高于 A 组 ($P < 0.05$), D 组明显高于 B、C 组 ($P < 0.05$), C 组明显高于 B 组 ($P < 0.05$)。

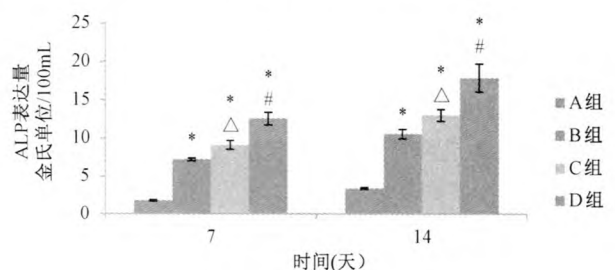


图 2 各组细胞 ALP 表达量

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 B 组及 C 组相比, # $P < 0.05$; 与 B 组相比, $\Delta P < 0.05$

Fig. 2 The expression of ALP in each group.

Compared with group A, * $P < 0.05$; compared with group B and group C, # $P < 0.05$; compared with group B, $\Delta P < 0.05$.

2.3 实时荧光定量 PCR 检测

培养 3 d, A、B、C、D 组 RUNX2 基因相对表达量分别为 1、 3.82 ± 0.126 、 7.556 ± 0.221 、 9.821 ± 0.286 , Osterix 基因相对表达量分别为 1.856 ± 0.062 、 2.965 ± 0.286 、 4.057 ± 0.297 ; 培养 7 d, A、B、C、D 组 RUNX2 基因相对表达量分别为 1、 4.051 ± 0.132 、 8.982 ± 0.245 、 11.115 ± 0.301 , Osterix 基因相对表达量分别为 1、 2.259 ± 0.062 、 3.688 ± 0.286 、 5.101 ± 0.27 。B、C、D 组 RUNX2 与 Osterix 相对表达量均高于 A 组, D 组 RUNX2 与 Osterix 相对表达量高于 B、C 组, C 组 RUNX2 与 Osterix 相对

表达量高于 B 组, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

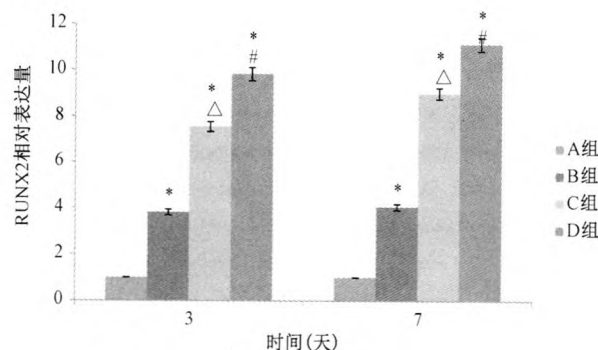


图3 各组细胞 RUNX2 mRNA 相对表达量

与 A 组相比, * $P < 0.05$; 与 B 组及 C 组相比, # $P < 0.05$; 与 B 组相比, Δ $P < 0.05$

Fig. 3 The mRNA expression of RUNX2 detected with qPCR.

Compared with group A, * $P < 0.05$; compared with group B and group C, # $P < 0.05$; compared with group B, Δ $P < 0.05$.

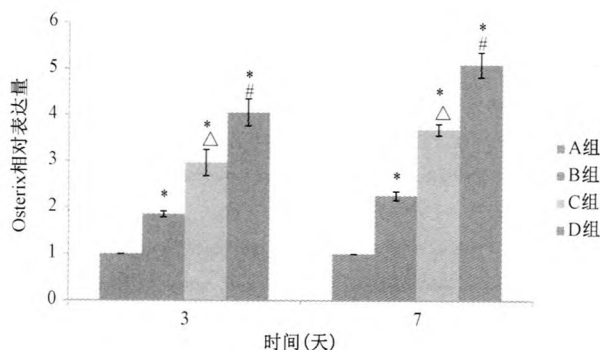


图4 各组细胞 Osterix mRNA 相对表达量

与 A 组相比, * $P < 0.05$; 与 B 组及 C 组相比, # $P < 0.05$; 与 B 组相比, Δ $P < 0.05$

Fig. 4 The mRNA expression of Osterix detected with qPCR.

Compared with group A, * $P < 0.05$; compared with group B and group C, # $P < 0.05$; compared with group B, Δ $P < 0.05$

2.4 ELISA 检测

细胞培养 24 h 后取各组细胞 ELISA 法检测 HIF-1 α 蛋白表达。结果显示 A 组与 C 组几乎未能检测到 HIF-1 α 蛋白, 与 A 组相比, B 组与 D 组能明显上调 HIF-1 α 蛋白表达 ($P < 0.001$); B 组与 D 组 HIF-1 α 蛋白表达量相当, 无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

OGP 是最初从血清中分离得到的 14 肽, 以微摩尔浓度存在于血清中的内源性多肽^[1,16]。已经有

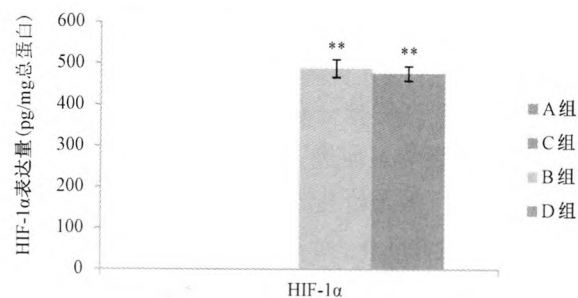


图5 各组细胞 HIF-1 α 蛋白表达

与对照组相比, ** $P < 0.001$

Fig. 5 The expression of HIF-1 α protein in each group.

Compared with control group, ** $P < 0.001$

大量的体外研究证实其能促进成骨系细胞(包括间充质干细胞)增殖、成骨分化^[3,4,15]。且其能通过静脉给药促进骨组织修复或者是与各种支架材料复合后增强生物材料的骨诱导性能^[6,7,17,18], 在骨组织工程研究显示出良好的应用前景。但是目前关于 OGP 促进成骨系细胞成骨分化的最适浓度是有争议的。Fei^[15] 等人及卞洒善^[14] 等人研究发现 10^{-9} mol/L 的 OGP 促进间充质干细胞成骨分化作用最强; Li^[4] 等人研究表明 10^{-8} mol/L 的 OGP 能明显促进大鼠 BMSCs 成骨分化; 刘俊丽^[19] 等人研究发现 10^{-12} mol/L 的 OGP 促进小鼠成骨系细胞 MC3T3-E1 活性最强。我们在前期研究中发现处于 10^{-11} mol/L 与 10^{-7} mol/L 之间浓度的 OGP 均能促进间充质干细胞成骨分化, 但是 10^{-9} mol/L OGP 具有最强的促成骨活性。综合其他研究及我们前期研究, 所以我们在实验中选择 10^{-9} mol/L 作为 OGP 实验浓度。

细胞低氧反应由低氧诱导因子 (hypoxia inducible factor, HIF) 介导, HIF 是一个由 α 和 β 亚基组成的异源二聚体, HIF- β 是结构亚基, 在细胞内维持在恒定水平持续表达。HIF- α 由 HIF-1 α 和 HIF-2 α 组成。HIF-3 也已经被证实, 但目前研究较少。HIF-1 α 在机体组织内普遍表达, 而 HIF-2 α 仅在特定组织中表达^[20]。 α 亚基是功能亚基, 对氧分压改变极为敏感, 其本身半衰期仅为 5 分钟, 在常氧条件下迅速被降解, 因此常氧条件下细胞内很难检测出^[21]。我们实验中对照组与单纯 OGP 组也几乎未能检测 HIF-1 α , 而在 1% 低氧组与 1% 低氧 + OGP 组 HIF-1 α 表达明显上调, 两组之间表达并无明显差异。到越来越多的研究表明低氧在间充质干细胞成骨分化中发挥重要调控作用, 但是有关低氧对细胞成骨分化是促进还是抑制目前是有分歧的。Ma^[22]

等人研究表明 2% 低氧环境抑制大鼠成骨细胞的成骨分化;Tsang^[23] 等人研究也表明 2% 低氧环境抑制人脐带干细胞的成骨分化;Fotia^[24] 等人研究表明 2% 低氧环境能明显促进人脂肪间充质干细胞的成骨分化;Hsu^[25] 等人研究表明 1% O₂ 抑制人骨髓间充质干细胞成骨分化,而 Ding^[10] 等人研究证实 1% O₂ 在成骨分化起始阶段能促进大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化。我们的研究表明 1% 低氧环境能明显上调 BMSCs 的 ALP、RUNX2、Osterix 等成骨标志性基因的表达,促进其成骨分化。我们推测出现以上差异结果可能有以下几点:不同的低氧浓度可能有不同作用;不同来源的干细胞可能对低氧有不同的反应;低氧环境作用于细胞成骨分化不同的时间段可能导致结果不同。但这需要我们下一步实验进行验证。

同时我们的研究也表明相比单纯 OGP 组而言,1% 低氧联合 OGP 组的 ALP、RUNX2 及 Osterix 表达明显上调,表明 1% 低氧与 OGP 对于 BMSCs 的成骨分化具有协同效应。目前关于低氧与 OGP 促进 BMSCs 成骨分化的机制不甚明确。有研究表明^[5] OGP 可能是通过激活 Rho/ROCK 信号通路,改变细胞骨架蛋白而促进干细胞成骨分化;Walker^[26] 等人研究表明 1% 低氧培养是通过激活 Rho/ROCK 通路而促进肺动脉平滑肌细胞迁移与增殖;Choi^[27] 等人研究也发现 1% 低氧环境培养通过上调激活 Rho/ROCK 信号通路而促进胎盘来源间充质干细胞迁移。我们推测 1% 低氧与 OGP 促进 BMSCs 成骨分化的协同效应有可能是通过激活 Rho/ROCK 信号通路实现,这个需要我们进一步的实验进行验证。

综上,本研究通过检测 1% O₂ 对 OGP 诱导的 BMSCs 成骨分化的影响,发现 1% O₂ 能明显增强 OGP 诱导的 BMSCs 成骨分化。虽然我们初步低氧培养对 BMSCs 成骨分化的促进作用,但下一步还需要对低氧及 OGP 对 BMSCs 成骨分化相关分子机制进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Policastro GM, Becker ML. Osteogenic growth peptide and its use as a bio-conjugate in regenerative medicine applications. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2016, 8(3):449-464.
- [2] Gabarin N, Gavish H, Muhirad A, et al. Mitogenic G(i) protein-MAP kinase signaling cascade in MC3T3-E1 osteogenic cells: activation by C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10-14)] and attenuation of activation by cAMP. J Cell Biochem. 2001, 81(4):594-603.
- [3] An G, Xue Z, Zhang B, et al. Expressing osteogenic growth peptide in the rabbit bone mesenchymal stem cells increased alkaline phosphatase activity and enhanced the collagen accumulation. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014, 18(11):1618-1624.
- [4] Li H, Zhang Z, Chen Z, et al. Osteogenic growth peptide promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells mediated by lncRNA AK141205-induced upregulation of CXCL13. Biochem Biophys Res Commun. 2015, 466(1):82-88.
- [5] Chen Z, Wang X, Shao Y, et al. Synthetic osteogenic growth peptide promotes differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to osteoblasts via RhoA/ROCK pathway. Mol Cell Biochem. 2011, 358(1-2):221-227.
- [6] Pigossi SC, de Oliveira GJ, Finoti LS, et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. J Biomed Mater Res A. 2015, 103(10):3397-3406.
- [7] Policastro GM, Becker ML. Osteogenic growth peptide and its use as a bio-conjugate in regenerative medicine applications. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2015, 10. 1002/wnan. 1376.
- [8] Zagorska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. Acta Biochim. Pol. 2004, 51:563-585.
- [9] Vanacker J, Viswanath A, De Berdt P, et al. Hypoxia modulates the differentiation potential of stem cells of the apical papilla. J Endod. 2014, 40(9):1410-1418.
- [10] Ding H, Chen S, Yin JH, et al. Continuous hypoxia regulates the osteogenic potential of mesenchymal stem cells in a time-dependent manner. Mol Med Rep. 2014, 10(4):2184-2190.
- [11] Binder BY, Sagun JE, Leach JK. Reduced serum and hypoxic culture conditions enhance the osteogenic potential of human mesenchymal stem cells. Stem Cell Rev. 2015, 11(3):387-393.
- [12] 张磊, 赵学凌, 李彪, 等. 二甲基乙二酰基甘氨酸对小鼠骨髓间充质干细胞缺血凋亡及 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(1):21-25.
Zhang L, Zhao XL, Li B, et al. Effects of dimethylalglycine on the apoptosis induced by serum deprivation and expression of Bcl-2/Bax in mouse bone marrow mesenchymal stem cells. Chinese Journal of Osteoporosis. 2013, 19(1):21-25.
- [13] Vanacker J, Viswanath A, De Berdt P, et al. Hypoxia modulates the differentiation potential of stem cells of the apical papilla. J Endod. 2014, 40(9):1410-1418.
- [14] 卞泗善, 苏庆红, 肖毅, 等. FBS 对成骨生长肽促进 BMSCs 增殖分化的影响. 中国修复重建外科杂志, 2015, 29(2):221-226.
Bian SS, Su QH, Xiao Y, et al. Effect of fetal bovine serum on osteogenic growth peptide promoting bone marrow mesenchymal stem cells proliferation and differentiation. Chinese Journal of Reparative and Reconstruction surgery. 2015, 29(2):2221-2226.
- [15] Fei Q, Guo C, Xu X, et al. Osteogenic growth peptide enhances the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells from

- osteoprotegerin-deficient mice by CDK2/cyclin A. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*. 2010,42(11):801-806.
- [16] Brager MA, Patterson MJ, Connolly JF, et al. Osteogenic growth peptide normally stimulated by blood loss and marrow ablation has local and systemic effects on fracture healing in rats. *J Orthop Res*. 2000,18(1):133-139.
- [17] Zhao ZY, Shao L, Zhao HM, et al. Osteogenic growth peptide accelerates bone healing during distraction osteogenesis in rabbit tibia. *J Int Med Res*. 2011,39(2):456-463.
- [18] Chen C, Li H, Kong X, et al. Immobilizing osteogenic growth peptide with and without fibronectin on a titanium surface: effects of loading methods on mesenchymal stem cell differentiation. *Int J Nanomedicine*. 2014,10:283-295.
- [19] 刘俊丽,周学慧,张军,等. 成骨生长肽(OGP₁₀₋₁₄)在不同微重力条件下生物学活性研究. *中国骨质疏松杂志*,2012,18(7):596-599.
- Liu JL, Zhou XH, Zhang J, et al. Biological activity of osteogenic growth peptide (OGP₁₀₋₁₄) under different microgravities. *Chinese Journal of Osteoporosis*. 2012,18(7):596-599.
- [20] Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, et al. Widespread hypoxia inducible expression of HIF-2 lpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J*. 2003,17:271-273.
- [21] Huang LE, Arany Z, Livingston DM, et al. Activation of hypoxia inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive Stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*. 1996, 271:32253-32259.
- [22] Ma HP, Ma XN, Ge BF, et al. Icaritin attenuates hypoxia-induced oxidative stress and apoptosis in osteoblasts and preserves their osteogenic differentiation potential in vitro. *Cell proliferation*. 2014,47(6):527-539.
- [23] Tsang WP, Shu Y, Kwok PL, et al. CD146 + human umbilical cord perivascular cells maintain stemness under hypoxia and as a cell source for skeletal regeneration. *PLoS One*. 2013,8(10):e76153.
- [24] Fotia C, Massa A, Boriani F, et al. Prolonged exposure to hypoxic milieu improves the osteogenic potential of adipose derived stem cells. *J Cell Biochem*. 2015,116(7):1442-1453.
- [25] Hsu SH, Chen CT, Wei YH. Inhibitory effects of hypoxia on metabolic switch and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2013,31(12):2779-2788.
- [26] Walker J, Udem C, Yun X, et al. Role of Rho kinase and Na⁺/H⁺ exchange in hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and migration. *Physiol Rep*. 2016,4(6):e12702.
- [27] Choi JH, Lim SM, Yoo YI, et al. Microenvironmental Interaction Between Hypoxia and Endothelial Cells Controls the Migration Ability of Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells via α 4 Integrin and Rho Signaling. *J Cell Biochem*. 2016,117(5):1145-1157.

(收稿日期:2016-04-21;修回日期:2016-05-30)

(上接第 1379 页)

- [14] 郭伟雄,魏波. 炎症细胞因子及通路在骨关节炎中的研究进展. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(15): 2240-2241.
- Guo WX, Wei B. The research progress of inflammatory cytokines and pathways in osteoarthritis. *Int J Lab Med*, 2015, 36(15): 2240-2241. (in Chinese)
- [15] 王红权,詹杰. 白芍总苷治疗类风湿关节炎药理作用及机制. *医药导报*, 2015, 34(2): 199-201.
- Wang HQ, Zhan J. The pharmacological mechanism of total glucosides of paeony in the treatment of rheumatoid arthritis. *Herald of Medicine*, 2015, 34(2): 199-201. (in Chinese)
- [16] 应俊,张元斌,罗程,等. 核转录因子- κ B 在骨关节炎炎症反应中的作用. *中医正骨*, 2015, 27(7): 40-47.
- Ying S, Zhang YB, Luo C, et al. The role of nuclear factor- κ B in inflammation of osteoarthritis. *J Trad Chin Orthop Trauma*, 2015, 27(7): 40-47. (in Chinese)
- [17] 周庄,张柳. NF- κ B 信号通路在骨性关节炎发生发展中作用机制的研究. *中国骨质疏松杂志*, 2012, 18(1): 78-82.
- Zhou Z, Zhang L. The research of mechanism of NF- κ B signaling pathway in the initiation and development of osteoarthritis. *Chin J Osteoporos*, 2012, 18(1): 78-82. (in Chinese)
- [18] 谢长江,谢富华,张珊珊,等. 白芍总苷对大鼠脓毒症的抗炎作用及机制研究. *现代医药卫生*, 2012, 28(16): 2417-2418.
- Xie CZ, Xie FH, Zhang SS, et al. Study on anti inflammatory action of total glucosides of paeony on rat sepsis and its mechanism. *J Mod Med Health*, 2012, 28(16): 2417-2418. (in Chinese)
- [19] 刘国玲,张玉霞,芦琨,等. 白芍总苷对大鼠佐剂关节炎抗炎作用及机制研究. *现代预防医学*, 2012, 39(20): 5348-5352.
- Liu GL, Zhang YX, Lu K, et al. The anti-inflammatory effects and mechanisms study of TGP on rat adjuvant arthritis. *Modern Preventive Medicine*, 2012, 39(20): 5348-5352. (in Chinese)

(收稿日期:2016-05-07;修回日期:2016-06-27)