

# 低氧条件下HIF对间充质干细胞成骨分化影响的研究

王进, 王军, 宫明智\*

山东大学第二医院创伤骨科, 山东 济南

收稿日期: 2024年1月21日; 录用日期: 2024年2月14日; 发布日期: 2024年2月21日

## 摘要

骨不连和骨缺损是创伤骨科的重要问题。通过干细胞成骨分化来修复骨缺损及骨不连, 将彻底改变传统的通过创伤较大的手术方式修复骨缺损的现状, 迈入无创伤修复的新阶段。研究表明, 氧环境切换可能会影响干细胞分化潜能, 本文综述了近年来关于缺氧诱导因子(HIF)对于缺氧条件下的细胞调控, 得出了HIF-2 $\alpha$ 可能是MSCs成骨分化的新解决方案这一结论。HIF-2 $\alpha$ 作为与慢性低氧环境调节相关的核心转录因子, 在间充质干细胞增殖和分化中发挥重要作用。

## 关键词

HIF, 间充质干细胞, 低氧, 综述

## Research on the Effect of HIF on Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells under Low-Oxygen Conditions

Jin Wang, Jun Wang, Mingzhi Gong\*

Department of Traumatic Orthopedics, The Second Hospital of Shandong University, Jinan Shandong

Received: Jan. 21<sup>st</sup>, 2024; accepted: Feb. 14<sup>th</sup>, 2024; published: Feb. 21<sup>st</sup>, 2024

## Abstract

Bone nonunion and bone defect are important problems in traumatic orthopedics. Osteogenic differentiation of stem cells to repair bone defects and bone nonunion will completely change the traditional situation of repairing bone defects through more traumatic surgery, and enter a new

\*通讯作者。

stage of non-traumatic repair. Studies have shown that oxygen environment switching may affect the differentiation potential of stem cells. In this paper, we reviewed the recent studies on hypoxia-inducing factor (HIF) regulation of cells under hypoxia conditions, and concluded that HIF-2 $\alpha$  may be a new solution for osteogenic differentiation of MSCs. HIF-2 $\alpha$ , as a core transcription factor related to the regulation of chronic hypoxic environment, plays an important role in the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells.

## Keywords

HIF, Mesenchymal Stem Cells, Hypoxia, Review

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

骨不连、骨缺损是创伤骨科的重要难题。严重创伤、开放性骨折、不当手术操作常会导致骨不连、骨缺损。以往对于这一类的病人的治疗，需要通过自体骨植骨、人工骨植骨、更换内固定装置等外科手术手段处理，手术创伤大，手术风险高，且有时需多次手术处理，给病人带来了极大的痛苦，也带来了巨大的医疗资源的消耗。如果能通过组织工程学的方法，通过干细胞成骨分化来修复骨缺损及骨不连，将彻底改变传统的通过创伤较大的手术方式修复骨缺损的现状，迈入无创伤修复的新阶段，这势必将会大大减少病人的痛苦，也将极大地节约医疗资源。

目前，干细胞成骨分化的研究面临诸多难题，其中一个重要的难题是在组织缺氧条件下对干细胞成骨分化的影响。目前的研究仍然集中在如何绕过肺驻留的问题和减少低氧导致的 MSCs 损失，包括改变注射方式，低氧预诱导等，但是对于其中机制并没有足够的解析。

与低氧耐受相关的氧感知通路中 HIF-2A 对 MSC/iPSC 成骨分化的影响尚不清楚。如果能通过对 MSC/iPSC 诱导成骨分化中 HIF-2A 的功能分析解析 HIF-2A 及其下游通路对分化效率，并根据其规律改进低氧预处理 MSC/iPSC 在成功分化中对干细胞的保护方法，将会很大程度上提高组织低氧条件下干细胞成骨分化效率，对最终实现组织工程学治疗骨缺损、骨不连有较大意义。

## 2. 干细胞移植在骨伤愈合中具有重要地位

较小的骨伤可以自发痊愈，而创伤、感染、先天性疾病或肿瘤切除导致的大骨缺损仍是骨科手术面临的主要挑战。在世界范围内，每年有超过 450 万例重建外科手术，以应对事故，癌症手术或美容需求[1]。以长骨骨折为例，术后常出现愈合困难、骨不连等情况。不愈合或骨不连的症状发生率大约在 5%~10%，并且如不进行适当干预，病情将会持续[2]。在这种情况下，骨移植和组织工程学手段是主要考虑的干预手段。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种具有高增殖能力和成骨分化潜能的激活周细胞(pericytes)；由于其易于体外培养和连续传代的特点，使其广泛用于骨组织治疗[3]。利用种植在骨传导支架上的祖细胞与骨诱导生长因子相结合的骨组织工程技术是目前治疗大型骨缺损的首选策略之一[4]。但其中尚有许多技术瓶颈亟待解决以应对疗效和安全性的需求。

## 3. 自体干细胞移植治疗骨不连/骨缺损的特点及现存问题

正常情况下周细胞保持静息状态；组织损伤后因其的局部微环境变化会诱导周细胞激活并进一步增

殖、分化和行使组织修复的功能[5]。这一过程伴随水肿形成、炎症反应等因素。骨祖细胞在造血细胞分泌的生长因子辅助下聚集于患处，在 BMPs 等生长调节和细胞因子的刺激下开始增殖，进而逐步分化为软骨细胞和成骨细胞，进而修复骨损伤[6]。成骨微环境对 MSCs 的成骨分化能力影响很大。

尽管目前已有利用血管基质组分混合 MSCs 进行移植治疗的尝试并且揭示了其中抑制炎症、促进组织修复的报道[7]，然而，干细胞移植在临床中还面临巨大挑战。其中肺首过效应和细胞无序分化是影响治疗效果的重要原因[8]。移植的 MSCs 的成骨潜能常常受到损害，这可能与 MSCs 的传代次数以及 MSCs 对微环境切换的适应力有关[9]；不同组织来源的间充质干细胞以及不同移植方式对 MSCs 移植的疗效影响较大，目前也有较多模拟组织环境的尝试[10]，尽管分化效率有所提升，但仍未真正解决问题。总体而言，目前对模拟骨愈合生理条件从而提高 MSCs 成骨分化效率及其机制仍知之甚少，有待深入研究。

#### 4. 氧环境切换对干细胞分化潜能的影响

与含有丰富血管的组织不同，骨损伤后在损伤和临近区域的氧气张力较低，会形成局部缺血缺氧环境。组织干细胞在骨的自然愈合过程中即在这样的环境下促进血管新生和进行成骨分化。研究发现 MSCs 移植后存活率很低，而低氧预处理后可以缓解这一现象[11]。因此近年来研究者常使用低氧(1%~7%)预处理令细胞在模拟低氧环境中进行初步适应来提高移植后的分化效率[10]。然而 MSCs 移植到缺血组织中的成活率仍不能令人满意，暗示对其中机制的把握还有提升空间。

一般来说，细胞在缺氧条件下的细胞状态受到氧感知通路中缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)调控。HIF 是一种异二聚体，由两个主要的氧敏感的  $\alpha$  亚基(HIF-1 $\alpha$  和 HIF-2 $\alpha$ )和氧不敏感的 HIF-1 $\beta$  亚基组成[12]。在有氧条件下，HIF- $\alpha$  被 pVHL (von Hippel Lindau protein)蛋白泛素化并靶向蛋白酶体降解；在缺氧过程中，pVHL 结合能力减弱，HIF- $\alpha$  入核与 HIF-1 $\beta$  结合，激活多种缺氧反应性基因表达[13]。氧浓度的转换会一定程度改变 MSCs 的增殖和细胞活力，当 MSCs 迁移到损伤部位时，低氧环境可一定程度激活 HIF-1 $\alpha$  的表达和下游通路从而调节成骨分化[11]。然而，不同的低氧预处理方法会改变干细胞干性与分化潜能之间的平衡：低氧培养可促进 MSCs 的增殖和克隆形成能力即 MSCs 在创面的存活能力，但一定程度上降低了其分化潜能[14]。既往研究认为 HIF-1 $\alpha$  在对急性缺氧的反应中起主要作用，而 HIF-2 $\alpha$  则驱动慢性低氧应答[15]。因此我们认为在 MSCs 成骨分化的研究中是否对 MSCs 的分化环境及其调控机制的理解可能存在偏离。

#### 5. HIF-2 $\alpha$ 可能是 MSCs 成骨分化的新解决方案

HIF-2 $\alpha$  与 HIF-1 $\alpha$  总体上具有 48%的氨基酸序列同源性，并且具有相似的结构域排列，都具有与 HIF-1 $\beta$  结合的能力；细胞在急性缺氧下主要受到 HIF-1 $\alpha$  调控，从而在伤口重塑以及组织损伤修复过程中发挥功能[13]。而在如高原环境等长期低氧条件中，HIF-2 $\alpha$  则会被激活，并伴随着 HIF-2 $\alpha$  与 HIF-1 $\alpha$  相对含量的转换[16]，最终转变为一种以 HIF-2 $\alpha$  为主导的慢性低氧应答机制。在组织损伤修复研究中发现，HIF-2 $\alpha$  能够改善具备 MSCs 多能性的迷你胚胎间充质干细胞的增殖和分化能力[17]；在骨骼肌再生方面，卫星细胞向肌细胞的分化也依赖于 HIF-2 $\alpha$  介导的调控机制[18]；胶质瘤研究中也发现敲低敲低 HIF-2 $\alpha$  有助于降低肿瘤细胞的干细胞潜能[19]。这些研究提示，HIF-2 $\alpha$  在低氧环境中的组织干细胞分化中可能起重要作用，而这一所用尚未被系统揭示。

#### 6. 小结

综上所述，MSCs 成骨分化中调控机制的研究是干细胞移植治疗骨缺损/骨不连的重要科学问题。

HIF-2 $\alpha$  作为与慢性低氧环境调节相关的核心转录因子，在间充质干细胞增殖和分化中可能发挥重要作用 [20]。

## 基金项目

山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MH091)。

## 参考文献

- [1] Guerado, E. and Caso, E. (2017) Challenges of Bone Tissue Engineering in Orthopaedic Patients. *World Journal of Orthopedics*, **8**, 87-98. <https://doi.org/10.5312/wjo.v8.i2.87>
- [2] Toosi, S., Behravan, N. and Behravan, J. (2018) Nonunion Fractures, Mesenchymal Stem Cells and Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, **106**, 2552-2562. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36433>
- [3] Farre-Guasch, E., Bravenboer, N., Helder, M.N., *et al.* (2018) Blood Vessel Formation and Bone Regeneration Potential of the Stromal Vascular Fraction Seeded on a Calcium Phosphate Scaffold in the Human Maxillary Sinus Floor Elevation Model. *Materials (Basel)*, **11**, 161. <https://doi.org/10.3390/ma11010161>
- [4] Ho-Shui-Ling, A., Bolander, J., Rustom, L.E., *et al.* (2018) Bone Regeneration Strategies: Engineered Scaffolds, Bioactive Molecules and Stem Cells Current Stage and Future Perspectives. *Biomaterials*, **180**, 143-162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>
- [5] Colombini, A., Orfei, C.P., Kouroupis, D., *et al.* (2019) Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Articular Cartilage Degeneration: New Biological Insights for an Old-Timer Cell. *Cytotherapy*, **21**, 1179-1197. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.10.004>
- [6] Kostenuik, P. and Mirza, F.M. (2017) Fracture Healing Physiology and the Quest for Therapies for Delayed Healing and Nonunion. *Journal of Orthopaedic Research*, **35**, 213-223. <https://doi.org/10.1002/jor.23460>
- [7] Saxer, F., Scherberich, A., Todorov, A., *et al.* (2016) Implantation of Stromal Vascular Fraction Progenitors at Bone Fracture Sites: From a Rat Model to a First-in-Man Study. *Stem Cells*, **34**, 2956-2966. <https://doi.org/10.1002/stem.2478>
- [8] Zhai, M., Zhu, Y., Yang, M.Y., *et al.* (2020) Human Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Enhance Cell-Free Bone Regeneration by Altering Their miRNAs Profiles. *Advanced Science (Weinh)*, **7**, Article ID: 2001334. <https://doi.org/10.1002/advs.202001334>
- [9] Jiang, Y., Zhang, P., Zhang, X., *et al.* (2021) Advances in Mesenchymal Stem Cell Transplantation for the Treatment of Osteoporosis. *Cell Proliferation*, **54**, e12956. <https://doi.org/10.1111/cpr.12956>
- [10] Bastidas-Coral, A.P., Hogervorst, J.M.A., Forouzanfar, T., *et al.* (2019) IL-6 Counteracts the Inhibitory Effect of IL-4 on Osteogenic Differentiation of Human Adipose Stem Cells. *Journal of Cellular Physiology*, **234**, 20520-20532. <https://doi.org/10.1002/jcp.28652>
- [11] Hu, C. and Li, L. (2018) Preconditioning Influences Mesenchymal Stem Cell Properties *in Vitro* and *in Vivo*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **22**, 1428-1442. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13492>
- [12] Albadari, N., Deng, S. and Li, W. (2019) The Transcriptional Factors HIF-1 and HIF-2 and Their Novel Inhibitors in Cancer Therapy. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **14**, 667-682. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1613370>
- [13] Shu, S.Q., Wang, Y., Zheng, M.L., *et al.* (2019) Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair. *Cells*, **8**, 207. <https://doi.org/10.3390/cells8030207>
- [14] Boyette, L.B., Creasey, O.A., Guzik, L., *et al.* (2014) Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Display Enhanced Clonogenicity but Impaired Differentiation with Hypoxic Preconditioning. *Stem Cells Translational Medicine*, **3**, 241-254. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0079>
- [15] Koh, M.Y., Lemos Jr., R., Liu, X.P., *et al.* (2011) The Hypoxia-Associated Factor Switches Cells from HIF-1 $\alpha$ - to HIF-2 $\alpha$ -Dependent Signaling Promoting Stem Cell Characteristics, Aggressive Tumor Growth and Invasion. *Cancer Research*, **71**, 4015-4027. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4142>
- [16] Bartoszewski, R., Moszyńska, A., Serocki, M., *et al.* (2019) Primary Endothelial Cell-Specific Regulation of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 and HIF-2 and Their Target Gene Expression Profiles during Hypoxia. *FASEB Journal*, **33**, 7929-7941. <https://doi.org/10.1096/fj.201802650RR>
- [17] Zhang, S., Zhao, L., Wang, J.H., *et al.* (2017) HIF-2 $\alpha$  and Oct4 Have Synergistic Effects on Survival and Myocardial Repair of Very Small Embryonic-Like Mesenchymal Stem Cells in Infarcted Hearts. *Cell Death & Disease*, **8**, e2548. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.480>

- [18] Xie, L., *et al.* (2018) Transient HIF2A Inhibition Promotes Satellite Cell Proliferation and Muscle Regeneration. *Journal of Clinical Investigation*, **128**, 2339-2355. <https://doi.org/10.1172/JCI96208>
- [19] Nusblat, L.M., Tanna, S. and Roth, C.M. (2020) Gene Silencing of HIF-2alpha Disrupts Glioblastoma Stem Cell Phenotype. *Cancer Drug Resistance*, **3**, 199-208. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.96>
- [20] 冯国丹, 钟细妹, 廖小花, 等. HIF-2 $\alpha$  在子宫内膜异位症缺氧微环境中的作用及机制研究[J]. 系统医学, 2022, 7(16): 191-194.