

·综述·

## 缺氧对于间充质干细胞分化的影响

江琛, 向娟娟\*

(中南大学 肿瘤研究所, 中国湖南 长沙 410078)

**摘要:** 间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC), 是来源于中胚层的具有自我更新能力和多向分化潜能干细胞, 在体内外可以分化成骨、软骨、脂肪、肌腱和肌细胞等。由于其强大的分化潜能, MSC 在组织工程与再生医学方面具有广泛的应用前景。MSC 存在于高度受调控的被称为“壁龛”的微环境中。干细胞壁龛处于一个缺氧的环境中, 氧分压可以低至 7.2 mmHg。同时 MSC 是肿瘤微环境的重要的细胞组成成分, 肿瘤微环境也是存在于一个缺氧的环境中。了解 MSC 在缺氧状态下的分化能力, 对于组织工程、再生医学和肿瘤的发生发展研究具有重要的意义。缺氧相关的信号转导参与 MSC 定向分化能力的过程。目前 MSC 在缺氧状态下的成脂和成骨分化的研究存在着差异, 这些研究结果的差异可能是由于 MSC 的异质性以及实验操作不同所引起。

**关键词:** 缺氧; 间充质干细胞; 分化

中图分类号: Q28

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2012)06-0531-08

## Effects of Hypoxia on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells

JIANG Chen, XIANG Juan-juan\*

(Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China)

**Abstract:** Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells derived from mesoderm, which are able to self-renew and differentiate into osteocyte, chondrocyte, adipocyte, myocyte and tendon *in vitro* and *in vivo*. Because of their potential to differentiate into other types of cells, MSCs are expected to be widely applied in tissue engineering and regenerative medicine. MSCs reside in specialized regulatory microenvironment named “niche”. MSC niche is in hypoxic condition where the oxygen pressure is as low as 7.2 mmHg. Meanwhile, MSCs are the major cellular component of tumor microenvironment. Hypoxia within the tumor microenvironment is now widely recognized as a major factor that influences the progression of cancer. Understanding the behavior of MSCs under hypoxic conditions will not only help elucidate the molecular mechanisms of cancer progression, but also advance MSCs toward tissue engineering, regenerative medicine. Hypoxia associated signaling pathways are involved in the process of the oriented differentiation of MSCs. It is surprising to find the conflicting literatures on roles of hypoxia on the osteogenic and adipogenic differentiation of MSCs, these conflicting results may be attributable to the heterogeneity of MSCs and different experimental procedures between labs.

**Key words:** hypoxia; mesenchymal stem cells; differentiation

(*Life Science Research*, 2012, 16(6): 531~538)

收稿日期: 2012-09-20; 修回日期: 2012-11-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81272255; 30971497); 湖南省自然科学基金资助项目(10JJ7003); 中南大学研究生学位论文创新基金资助项目(2011ssxt259)

作者简介: 江琛(1989-), 女, 湖南岳阳人, 硕士研究生, 主要从事间充质干细胞研究, E-mail: jiangchen3701@gmail.com; \* 通讯作者: 向娟娟(1973-), 女, 湖南株洲人, 中南大学副研究员, 博士, 主要从事恶性肿瘤的分子治疗和干细胞方面的研究, Tel/Fax: 0731-82355401, E-mail: xiangjj@csu.edu.cn.

缺氧是指身体或者身体的一部分(组织)缺乏足够氧供给的一种病理状态. 血液循环携带氧气到身体的各组织, 通过各组织屏障, 氧气逐级消耗, 达到各组织的生理状态下的氧气浓度分布<sup>[1]</sup>. 吸入的氧气大约为 160 mmHg, 通过肺泡进入肺动脉后, 动脉血氧分压降至 104 mmHg. 在各组织的生理性的氧分压各有不同 (14.4~64.8 mmHg)<sup>[1]</sup>, 因此有学者认为这个氧气浓度区间应该被称为“生理性常氧”. 在某些组织, 比如甲状腺、骨髓质、骨髓壁龛的氧分压可降至 7.2 mmHg (1%), 甚至更低<sup>[2]</sup>. 储存和传递化学能的三磷酸腺苷在线粒体中的产生过程需要氧气的参与<sup>[3]</sup>. 当细胞遭遇缺氧条件时, 细胞激活一系列缺氧相关通路, 进入“缺氧模式”, 在代谢上体现为从三羧酸循环和氧化磷酸化中获取能量转为通过糖酵解获取 ATP. 缺氧与组织缺血、炎症和肿瘤的病理过程密切相关<sup>[2, 4]</sup>. 缺氧环境对实体瘤的发生发展以及肿瘤细胞对放疗、化疗的耐受有着重要的意义. 缺氧与肿瘤发生发展的关系已有广泛的报道. 然而, 作为肿瘤微环境的重要细胞成分 MSC 与缺氧的关系还知之甚少. 造血干细胞和 MSC 壁龛所处的骨髓腔和脂肪组织, 以及神经干细胞壁龛所处的室管膜下腔, 在正常生理条件下都属于缺氧环境<sup>[5]</sup>. 干细胞具备自我更新和多向分化潜能. 缺氧状态对整个干细胞壁龛的平衡以及干细胞干性和分化能力的维持起着至关重要的作用. 缺氧状态下的干细胞激活不同的分子机制以适应壁龛的缺氧环境<sup>[2, 3]</sup>. 在本文中, 我们将综述缺氧相关的信号转导通路以及缺氧对于 MSC 定向分化能力的影响.

## 1 缺氧涉及的通路

### 1.1 HIF dependent 通路

真核细胞应对缺氧牵涉到多条信号转导通路, 其中缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 介导的通路是影响面最广, 也是研究最深入的分子通路. HIF 是一个由  $\alpha$  和  $\beta$  亚单位组成的二聚体复合物, 是一个活性核转录因子, 能转录激活许多靶基因. 其中  $\alpha$  亚单位包括 HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  和 HIF-3 $\alpha$ ;  $\beta$  亚单位包括 HIF-1 $\beta$  和 HIF-2 $\beta$ .  $\alpha$  亚单位的表达受氧调控, 而  $\beta$  亚单位不受氧浓度影响而持续表达. 对 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-2 $\alpha$  的研究又更为深刻. HIF-1 $\alpha$  在各种组织中都有表达, 而 HIF-2 $\alpha$  仅在肾小球血管内皮细胞、肝细胞以及

海马区内皮细胞等少数种类的细胞中表达<sup>[6]</sup>. HIF $\alpha$  的调控由氧依赖型降解域 (oxygen-dependent degradation domain, ODDD) 的脯氨酰羟化来介导; 当氧浓度足够高时, 脯氨酰羟化酶 (prolyl hydroxylase domain proteins, PHDs) 对 HIF $\alpha$  进行脯氨酰羟化, 羟化后的 HIF $\alpha$  被泛素连接酶 VHL(von hippel-lindau) 复合体捕获, 将其泛素化, 并进入蛋白酶体中降解. 缺氧下 PHDs 失活, HIF $\alpha$  的泛素化和降解被终止, 因此 HIF $\alpha$  得以累积并进入细胞核中, 与 HIF $\beta$  形成二聚体, 结合在 DNA 的缺氧反应元件 (hypoxia responsive element, HRE, 经典序列 ACGTG) 上<sup>[7]</sup>, 启动下游基因的转录. 受 HIF 调节的基因包括 *VEGF*、*EPO*、*OCT4*、*MMPs*、*NOS*、糖酵解相关基因等. 此外在神经干细胞和鼠胚胎干细胞中, HIF-1 $\alpha$  能与  $\beta$ -catenin 作用并下调  $\beta$ -catenin 的表达, 从而抑制 wnt 信号通路<sup>[2]</sup>.

### 1.2 HIF independent 通路

除了 HIF 通路之外, 缺氧状态下还有其他的信号通路被激活, 比如内质网应激、氧敏感离子通道、NF- $\kappa$ B 通路、mTOR 通路和 ROS 相关通路等.

#### 1.2.1 内质网应激

内质网是分泌性和膜结合蛋白合成和蛋白折叠的场所. 当不能正确折叠的突变蛋白质表达, 或细胞暴露在缺氧、缺乏能量供应、钙离子减少、病毒感染等内质网压力下时, 未折叠蛋白和错误折叠蛋白积累增加, 未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 被激活, 引发一系列下游反应以保证蛋白质质量或导致细胞死亡. UPR 介导的下级反应分别由 3 个内质网跨膜压力感受器介导, IRE1、ATF6 和 PERK 支配. 通常情况下 GRP78 结合在 IRE1、ATF6 和 PERK 上以防止其激活; 然而在缺氧等情况下导致的内质网压力下, 未折叠蛋白积累, 导致 GRP78 释放出 IRE1、ATF6 和 PERK, 使其被激活. 释放后的 IRE1 发生寡聚化和自身磷酸化, 使 XBP1 活化, 激活压力诱导基因的表达. 这些基因主要在蛋白质折叠和蛋白质降解过程中发挥作用. ATF6 从与 GRP78 结合状态下释放出来之后, 在高尔基体中转变成活化模式并进入细胞核中, 诱导启动子中含有内质网应激元件的基因表达. 受调控的基因包括 *CHOP*、*XBP1* 等. PERK 被 GRP78 释放后, PERK 二聚化并自身磷酸化以得到激活. 激活的 PERK 将 eIF2 $\alpha$  磷酸化使其灭活, 导致帽依赖性翻译被抑制, 但允许含内部核糖体进入位点 (internal riboso-

mal entry sites, IRES) 的 mRNA 如 CHOP 的翻译<sup>[8]</sup>. 在结肠癌细胞中, 缺氧通过内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress)使  $\beta$ -catenin 变得不稳定, 并抑制 Wnt 的表达和分泌, 从而抑制 Wnt 通路<sup>[9]</sup>.

### 1.2.2 氧敏感离子通道

离子通道在许多生命进程的调节过程中扮演着关键角色, 包括神经冲动的传递, 心肌、骨骼肌、平滑肌的收缩, 营养成分和离子的跨内皮细胞的运输, 以及糖代谢等等. 到目前为止, 已有 300 多种离子通道被发现, 它们在激活模式、允许通过的离子等方面各不相同. 自从 1988 年第一个对氧敏感的钾离子通道被发现之后<sup>[10]</sup>, 大量的研究表明不同的离子通道中, 分布着各种各样的对氧敏感的离子通道. 这些氧敏感离子通道(oxygen sensitive ion channels) 在短期的急性缺氧环境下其通道活性发生变化, 持续缺氧挑战下其数量也将发生变化. 一些生理或病理条件下, 组织可能暴露在缺氧环境中, 缺氧持续的时间可能很短, 比如局部缺血; 也可能很长, 比如慢性疾病和居住在高纬度. 两种情况下细胞都迅速调整自身以适应缺氧环境并保证关键器官如大脑和心脏的供氧. 这些过程大部分的依赖于离子通道活性的调整, 当缺氧刺激时间足够长的情况下, 氧敏感离子通道的表达量发生变化, 以调节各种细胞功能, 包括细胞分泌、收缩、兴奋, 甚至于细胞生存<sup>[11]</sup>.

### 1.2.3 NF- $\kappa$ B 信号通路

核因子  $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B pathway, NF- $\kappa$ B) 信号通路在免疫、炎症、凋亡相关基因的表达过程中起着重要的调控作用. 通常情况下 I $\kappa$ B 与胞浆内游离的 NF- $\kappa$ B 二聚体结合以抑制其活性, 缺氧或其他配体-受体反应激活 IKK 复合物(包括 IKK1 $\alpha$ 、IKK $\beta$  和 NEMO), IKK 复合物是 I $\kappa$ B 的激酶, 将 I $\kappa$ B 磷酸化后, I $\kappa$ B 被降解, NF- $\kappa$ B 进入核中, 调节相关基因的表达. NF- $\kappa$ B 在体内和体外均能被缺氧激活, 通路中被缺氧所调控的成分是 IKK 复合物. 有数据支持, 暴露在缺氧中会导致 IKK $\beta$  激活<sup>[12]</sup>. IKK $\alpha$  和 IKK $\beta$  都含有与 HIF 一致的能被 PHD 羟化的结构域<sup>[13]</sup>, 缺氧下 PHD 失活, IKK $\beta$  的抑制作用被去除. 与能被缺氧强烈活化的 HIF 通路不同, 缺氧对 NF- $\kappa$ B 通路的激活作用较为温和, 主要是起到了放大的作用. 此外, NF- $\kappa$ B 和 HIF 通路有着一定的交集和相互影响. NF- $\kappa$ B 不但能通过提高转录来上调 HIF-1 $\alpha$ , 而且是 HIF-1 $\alpha$

基本表达的先决条件<sup>[12]</sup>. HIF-1 $\alpha$  的启动子的转录起始位点包含着 NF- $\kappa$ B 的经典结合位点, 缺失这段序列将使缺氧条件下 HIF-1 $\alpha$  的表达增高现象消失<sup>[14]</sup>. 新的证据表明, HIF 在嗜中性粒细胞中能通过上调 p65 和 IKK $\alpha$  来影响 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[15]</sup>.

### 1.2.4 mTOR 通路

细胞的生长与细胞的营养获取、生长因子和能量状态紧密相关, 而哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路通过调节细胞营养水平调节细胞生长, 该通路整合了多条生长信号以控制细胞生长, 是发育、衰老, 以及应对缺氧等生长相关过程的调控因素<sup>[16]</sup>. mTOR 活性受到胞内氨基酸水平的调节. AMPK、PI3K 信号通路通过 TSC1/TSC2 复合物对 mTOR 加以调控. 当蛋白合成减少时, TSC1/TSC2 复合物对于 Rheb 的抑制解除, 从而激活 mTOR; 生长因子信号通过胰岛素信号通路传递至 TSC2; 能量供应不足的状态通过 AMPK 传递至 TSC2. 以 mTOR 为中心能构成两种功能不同的复合体, mTORC1 和 mTORC2. mTORC1 磷酸化 S60 激酶和 4E-BP, 他们在缺氧时通过抑制核糖体生成和帽依赖翻译来抑制蛋白质翻译. 缺氧对 mTOR 活性有抑制作用, 缺氧快速而可逆性地促使 mTOR 和下游效应分子 4E-BP1、p70<sup>S6K</sup>、rpS6, 真核启动因子 4G 的去磷酸化. 该抑制作用是通过缺氧诱导基因 REDD1 来调节 mTOR 抑制物 TSC1-TSC2 的活性而达到的<sup>[17]</sup>, 而且不依赖于 Akt/PKB、AMP 活化的蛋白激酶磷酸化, ATP 水平以及 HIF-1 的影响<sup>[18]</sup>. 此外, mTOR 抑制剂雷帕霉素能抑制缺氧下 HIF 的积累及其下游基因的转录<sup>[19]</sup>, 提示 mTOR 在缺氧条件下是 HIF 的上游激活因子.

### 1.2.5 ROS

活性氧类(reactive oxygen species, ROS)是包含氧的活性氧分子, 包括氧离子、过氧化物和自由基等, 它们含有未配对的自由电子, 因而具有很强的化学活性. ROS 作为正常氧代谢的副产物, 在细胞信号传导中起着很大作用. 在一些外部压力如加热和紫外线下, ROS 会急剧增加, 造成细胞损伤. ROS 主要在线粒体膜上的电子传递复合物 I 和 III 上产生<sup>[20]</sup>. 缺氧能降低线粒体内膜跨膜电位, 从而增加 ROS 的生成<sup>[21]</sup>. ROS 能诱导细胞凋亡, 招募血小板和白细胞增强宿主防御反应和动员离子转运系统<sup>[22, 23]</sup>. 同时有文献报道过量的 ROS 损伤 DNA, 氧化不饱和脂肪酸和氨基酸, 使

某些酶失活<sup>[24, 25]</sup>. ROS 水平的增加能维持 HIF-1 $\alpha$  的稳定<sup>[26, 27]</sup>. 与 mTOR 类似, HIF 和 ROS 同样是相互促进的关系.

## 2 缺氧对于 MSC 分化的影响

干细胞是一群具有自我更新和多向分化潜能的细胞, 在机体的各组织中维持组织稳态. MSC 是来源于中胚层的具有多向分化潜能的干细胞, 最早在 1966 年被 Friedenstein 等发现并描述<sup>[28]</sup>, 可从骨髓、脂肪组织、胎盘、脐带等组织器官中分离而来, 具有分化成骨、软骨、脂肪、肌腱、肌细胞的能力<sup>[29]</sup>, 由于其强大的分化潜能, MSC 在组织工程与再生医学方面具有广泛的应用前景.

多项研究表明, MSC 在缺氧的骨髓壁龛中保持多向分化潜能, MSC 的干性分子 Oct4、Nanog、ZFP42 等在缺氧环境下表达升高<sup>[30-32]</sup>, 且端粒酶逆转录酶的活性也增强<sup>[32]</sup>. 综述目前的文献结果, 我们发现缺氧对于 MSC 多向分化能力的研究结果各不相同. 缺氧处理或缺氧状态下的 MSC 向各个方向的分化能力相比常氧状态下亦有差别.

### 2.1 缺氧与 MSC 的成脂分化

脂肪组织不仅是能量贮存器官, 而且在调节机体胰岛素敏感性和维持能量代谢平衡中发挥重要的作用<sup>[33]</sup>. 目前, 研究已证实白色脂肪组织的过度沉积与肥胖症、II 型糖尿病、高血脂、脂肪肝、心血管疾病以及乳腺癌等疾病的发生密切相关<sup>[33]</sup>. 脂肪细胞的起源目前还不明确. MSC 分化成前体脂肪细胞, 并进一步分化成为成熟脂肪细胞可能是脂肪细胞的来源之一. 激活 MSC 成脂分化通路的关键因子有 3 个, 分别是过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferation-activated receptor  $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ ), CCAAT-增强子结合蛋白 (CCAAT-enhancer-binding protein, C/EBP), 固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory-element binding protein, SREBP)<sup>[34]</sup>; 早期标志分子包括 LPL、a2Col6, 晚期标志分子包括 aP2、脂联素等; 体外诱导 MSC 成脂分化主要通过添加地塞米松、胰岛素、3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤 (3-isobutyl-1-methyl-xanthine, IBMX)、吡啶美辛等因子实现<sup>[35]</sup>.

Zhou 等发现缺氧能抑制人和小鼠骨髓 MSC 的成脂分化, 而这种抑制作用是通过 TGF- $\beta$ /Smad3 信号通路实现<sup>[36]</sup>. Fehrer 和 Holzwarth 都发现缺氧抑制人 MSC 成脂和成骨, 但是实验结果有

波动, 可能与细胞供体的年龄、性别有关<sup>[31, 37]</sup>. 而 Grayson 与 Mylotte 的文章<sup>[30, 38]</sup>却表明, 缺氧对大鼠和人类的骨髓 MSC 的成脂能力并无影响, Grayson 同时发现缺氧下 Oct4 和 Hif-2 $\alpha$  表达升高. Valorani 在 2010 年和 2012 年的研究文章中分别指出, 小鼠<sup>[39]</sup>和人类<sup>[40]</sup>的脂肪来源 MSC 2% O<sub>2</sub> 浓度处理分别为 10 和 7 d 之后再转入常氧使用成脂培养基诱导, 成脂分化比一直在常氧中培养的细胞大幅度增强. 缺氧处理后的小鼠脂肪来源 MSC、Sca-1 阳性和 Sca-1/CD44 双阳性细胞的数目增加. Ren<sup>[41]</sup>等注意到, 8% O<sub>2</sub> 和成脂诱导培养基作用下, 小鼠骨髓来源 MSC 中形成的脂滴数目是常氧对照的 5~6 倍之多. 在成脂诱导剂存在下, 随氧气浓度降低, PPAR- $\gamma$ 2 表达升高. Grayson 将人骨髓来源 MSC 在 2% O<sub>2</sub> 环境下接种至 3D 骨架上 30 d 后, 细胞成脂标记分子 LPL 表达升高<sup>[42]</sup>. 2004 年, Fink 在试验中就发现 1% O<sub>2</sub> 处理永生化的人骨髓 MSC (hMSC-TERT) 24 h 之后, 油红染色就发现有脂滴出现, 一直到处理 72 h, 脂滴的数目仍在增长<sup>[43]</sup>, 而 2% O<sub>2</sub> 的状态下 MSC 没有脂滴出现. 进一步应用 RT-PCR 手段检测了很多脂肪细胞特异分子, 发现 PPAR- $\gamma$ 2 和 ADD1/SREBP1c 这两个成脂关键调控分子都没有表达; 缺氧对成脂早期标志分子 LPL 和晚期标志分子 aP2 也没有任何影响; 成熟脂肪细胞特异基因瘦素和 Adipophilin 的表达也对缺氧处理毫无反应, 只有 PPAR- $\gamma$  诱导成血管相关基因(PGAR)在缺氧下得到高表达. Fink 推测, 尽管缺氧下出现了脂滴的积累, 但是 MSC 并没有发生真正的脂肪分化, 缺氧下 MSC 中脂滴的积累是通过 PPAR- $\gamma$  非依赖途径生成的. 作者还指出, 细胞周围氧气浓度往往比培养环境氧气浓度还要低, 直接影响细胞的细胞周围氧气浓度这一指标比环境氧气浓度更能直观反映细胞的缺氧状态.

鉴于目前缺氧对于 MSC 成脂分化的研究结果的差异, 我们认为, 在缺氧条件下的 MSC 的成脂分化受到多条信号通路的复杂调控. 其中至少有一条为 HIF-1 $\alpha$  所控制, 缺氧下 HIF-1 $\alpha$  在细胞中积累; HIF-1 $\alpha$  通过抑制 PPAR- $\gamma$ 2 和 C/EBP $\alpha$  来抑制成脂<sup>[44, 45]</sup>; 其次, 缺氧还能通过增加磷酸化 Smad2/3 来激活 TGF- $\beta$ /Smad3 信号通路, 从而抑制成脂. 此外, 诱导 MSC 成脂分化过程中所用到的胰岛素, 是通过 Akt-TSC2-mTORC1 通路激活成脂分化的<sup>[46]</sup>, 提示缺氧对 mTOR 的抑制也可能

影响 MSC 的成脂分化. 此外, 鉴于 Wnt 通路抑制 MSC 成脂分化, 促进 MSC 成骨分化<sup>[47]</sup>, 而缺氧又能分别通过 Hif 和 ER stress 抑制 Wnt 通路, 提示缺氧能解除 wnt 通路对 MSC 成脂分化的抑制. 而另有结果表明, 在缺氧条件下 HIF-1 与 HIG2 (缺氧诱导蛋白 2) 的启动子结合, 上调 HIG2 的表达, 而 HIG2 本身就是一个可以激活 Wnt 通路的脂蛋白<sup>[48]</sup>. 实验结果的不一致可能归因于细胞来源、实验环境、处理方式的差异导致的信号通路的不平衡. 寻找使 MSC 在缺氧中稳定走向成脂分化的平衡点, 还需要更多的研究和探索.

## 2.2 缺氧与 MSC 的成骨分化

MSC 的成骨向分化能力对于使用 MSC 进行骨组织修复的临床应用有着重要意义. 氧气浓度这个重要的生理因子对 MSC 的成骨分化起着重要影响作用. 氧气浓度的控制与缺氧因素的合理利用, 在利用 MSC 修复骨组织这一方向蕴藏着巨大的潜力. 成骨分化的关键转录因子是 Runt-相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor-2, Runx2), 早期标志有 Runx2、碱性磷酸酶、胶原蛋白 1- $\alpha$ 1、TGF- $\beta$ 1、骨粘连蛋白、BMP-2; 晚期标志分子有骨钙蛋白、骨桥蛋白等<sup>[34]</sup>; 诱导 MSC 向成骨分化的主要手段是在培养基中添加适量浓度的地塞米松、 $\beta$ -甘油磷酸钠、抗坏血酸<sup>[49]</sup>. Potier 在 48 h 的缺氧处理之后发现 3D 骨架上的人骨髓 MSC 的成骨标记分子 cbfa-1/Runx2、骨钙蛋白和 I 型胶原在此后的两周内都持续下调<sup>[50]</sup>, D'Ippolito 使用 3% O<sub>2</sub> 持续处理人骨髓 MSC, 发现缺氧下骨钙蛋白、骨唾液酸糖蛋白、Runx2、Osterix 和碱性磷酸酶活性都下调<sup>[32]</sup>. Chung 在犬科的脂肪组织来源和骨髓来源的 MSC<sup>[51]</sup>, Meceron 在人脂肪来源 MSC<sup>[52]</sup> 中都得到了类似结果. Yang 的研究表明, HIF-1 $\alpha$  诱导 TWIST 的表达, TWIST 通过结合到 I 型 Runx2 启动子的 E-box 上从而抑制 I 型 Runx2 的表达, BMP2、II 型 Runx2 也被更进一步抑制<sup>[53]</sup>. 然而 Huang 却证明了兔骨髓 MSC 缺氧 12 h 后碱性磷酸酶活性、I/III 型胶原和 cbfa-1/Runx2 的表达都增强, 但是敲除 HIF-1 $\alpha$  后, Runx2 也得到显著增强<sup>[54]</sup>, 提示还有其他缺氧相关通路的作用. Hung、Baciano 分别使用 1% 和 5% O<sub>2</sub> 处理人骨髓 MSC 4 周之后, 尽管在缺氧促进还是抑制 MSC 成脂方向出现了分歧, 但是在成骨方向的实验结果上, 无论是成骨标志分子还是其他形态学指标如碱性磷酸酶活性和钙结节染色等, 两人的结果都支持

缺氧对 MSC 成骨分化有促进作用<sup>[55, 56]</sup>. Lennon 曾对大鼠骨髓 MSC 进行缺氧/常氧、常氧/缺氧、常氧/常氧、缺氧/缺氧两阶段处理, 发现只要后期为缺氧处理的情况下, MSC 的成骨活动都得到了增强<sup>[57]</sup>. 同一篇文章中, Lennon 还使用多孔陶瓷作为载体, 将 MSC 移植到实验动物体内, 发现缺氧处理组的 MSC 比常氧对照组 MSC 在体内成骨量更大. 这项体内实验对于将来缺氧处理的 MSC 在临床上用于骨修复有重要的指导意义.

由此推测, 缺氧下 HIF-1 $\alpha$  对 MSC 成骨关键因子 Runx2 的表达没有直接促进作用, 反而能通过 TWIST 抑制 Runx2 和 BMP2; 此外缺氧下的 ER stress 和 HIF-1 $\alpha$  对 Wnt 的抑制间接抑制了 MSC 的成骨分化. 然而大量的缺氧促进 MSC 成骨分化的实验结论提示, 除了 HIF-1 $\alpha$  和 ER stress 之外还有其他缺氧相关通路在对立的方向上促进 MSC 的成骨作用. 为了寻找参与缺氧对 MSC 的成骨分化调节作用的其他细胞信号传导通路, 还需要更加深入的研究.

## 2.3 缺氧与 MSC 的成软骨分化

软骨在生理状况下没有血管生成, 软骨细胞生存于高度缺氧环境, 只能通过关节滑液获得养分和氧气. MSCs 向软骨方向分化潜能对于软骨损伤等疾病具有重要的意义. 成软骨化的关键转录因子是 Sox9 (SRY-related high-mobility group box 9), 相关分子标志有 2、9、10、11 型胶原蛋白, 聚蛋白聚糖等<sup>[34]</sup>. 诱导 MSC 向成软骨方向分化的方法是在培养基中添加适量浓度的地塞米松、抗坏血酸、TGF- $\beta$  等因子, 并必须使细胞聚集成团块生长<sup>[58]</sup>.

Hung 和 Malladi<sup>[55, 59]</sup> 分别在人骨髓 MSC 和小鼠脂肪 MSC 中得到了缺氧抑制成软骨分化的结果. 然而更多的学者报道了缺氧对 MSC 成软骨分化的促进作用<sup>[40, 52, 60-62]</sup>. 其中, Markway 使用 MSC 微团块沉积法, Müller 同时利用沉积和水凝胶支架的方式, 都证明了缺氧下 MSC 的成软骨指标包括硫酸粘多糖(sGAG)、II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 等的表达大幅提高. Müller 将 MSC 分增殖和分化两阶段用 4% 缺氧/21% 常氧先后处理, 发现 MSC 无论是在沉积团块中和还是水凝胶支架中分化时, 两阶段全部为缺氧处理时, 分化效果最佳<sup>[61]</sup>. Kanichai 对缺氧促进成脂分化的通路进行了研究, 发现 Akt 和 p38 的抑制剂能阻断缺氧下 HIF-1 $\alpha$  的稳定性, 而使用 siRNA 手段敲除 HIF-1 $\alpha$  之

后,成软骨指标 II 型胶原、蛋白聚糖和 Sox9 在缺氧下高表达的现象消失了<sup>[62]</sup>. 这项实验结果提示,缺氧下, Akt 和 p38 的磷酸化致使 HIF-1 $\alpha$  的总量上调,从而入核启动 Sox9 等一系列成软骨关键基因的表达.

### 3 MSC 的异质性

由于 MSC 具有低免疫原性、对损伤部位聚集的趋向性、多向分化潜能、易于提取、可以进行体外扩增等巨大的优势,将来有望广泛用于骨/软骨组织修复、整形手术中的组织填充、缺血性脑损

伤和急性心肌梗死等的临床治疗. 这些应用对用于移植的 MSC 的数量和分化能力有着很高的要求. 由于体内生理环境较接近缺氧, 研究者们使用缺氧环境预处理或全程处理 MSC, 发现缺氧对 MSC 的增殖和分化意义重大. 本文分类汇总了近年来的研究中缺氧对 MSC 成脂/骨/软骨分化的影响, 并讨论了其分子机理, 得出了 HIF-1 $\alpha$ 、Akt、Wnt 等通路在这些过程中起着不可或缺的作用的结论. 缺氧与 MSC 分化研究文章的总结整理见表 1, 缺氧对 MSC 作用涉及的通路关系见图 1.

表 1 缺氧对 MSC 成脂、成骨、成软骨以及干性分子表达的影响汇总表

Table 1 Summary sheet of the effects of hypoxia on MSC's adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation and the expression of stemness markers

Author	Year	Refer- ence	Cell type	Cell source	O <sub>2</sub> tension /(%)	Duration	Adipo- genesis	Osteo- genesis	Chondro- genesis	Stem cell markers	Substrate
VALORANI M G	2010	[39]	Mice	AT	2	10 d (H)/21 d (N)	↑	↓			
VALORANI M G	2012	[40]	Human	AT	2	7 d (H)/Variety days (N)	↑	↑	↑		
GRAYSON W L	2006	[42]	Human	BM	2	30 d (H)	↑	↑		↑	3D constructs
REN H	2006	[41]	Mice	BM	8	9 d (H)	↑	↑			
FINK T	2004	[43]	Human	BM	1	3 d (H)	↑				
MYLOTTE L A	2008	[38]	Rat	BM	0.5	48 h (H)	→	→	→		
GRAYSON W L	2007	[30]	Human	BM	2	7 d (H)	→	↑		↑	
HOLZWARTH C	2010	[37]	Human	BM	1	14 d (H)	↓	↓			
FEHRER C	2007	[31]	Human	BM	3	21 d (H)	↓	↓			
ZHOU S	2005	[36]	Mice	BM	2	7 d (H)	↓				
HUANG J	2011	[54]	Rabbit	BM	0	12 h (H)		↑			
HUNG S P	2012	[55]	Human	BM	1	28 d (H)	↓	↑	↓	↑	
BASCIANO L	2011	[56]	Human	BM	5	21 d (H)	↑	↑			
LENNON D P	2001	[57]	Rabbit	BM	5	21 d, H and N interchange		↑			Porous ceramic vehicles
POTIER E	2007	[50]	Human	BM	≤1	2 d (H)		↓			Scaffold substrate
D'IPPOLITO G	2006	[32]	Human	BM	3	3-28 d (H)		↓		↑	
CHUNG D J	2010	[51]	Canine	BM&AT	5, 1	1-14 d (H)		↓			
YANG D C	2011	[53]	Human	BM	1	1-21 d (H)		↓			
MERCERON C	2010	[52]	Human	AT	5	28 d (H)		↓	↑		
MARKWAY B D	2010	[60]	Human	BM	2	14 d (H)			↑		
MÜLLER J	2011	[61]	Human	BM	4	14 d H and N interchange			↑		Solidifying gelatin hydrogels
KANICHAH M	2008	[62]	Rat	BM	2	7 d (H)/14 d (N)			↑		
MALLADI P	2006	[59]	Mice	AT	2	12 d (H)		↓	↓		

注: BM: 骨髓来源; AT: 脂肪组织来源; ↑: 促进; ↓: 抑制; →: 维持稳定; H: 缺氧; N: 常氧; d: 天; h: 小时.

Notes: BM: Bone marrow derived; AT: Adipose tissue derived; ↑: Means up-regulated; ↓: Means down-regulated; →: Means maintain stable; H: Hypoxia; N: Normoxia; d: Days; h: Hours.

目前采用贴壁法或者流式细胞分选法来分离 MSC. 用这些方法得到的 MSC 是一群在形态、表面分子以及功能上具有高度异质性的细胞群. 目前在 MSC 的特性上, 包括分化潜能、自我更新能力以及与肿瘤细胞的相互关系等研究方面存在着诸多差异. 有研究表明 MSC 中的不同亚群其功能是有差异的. 在异质性的 MSC 细胞群中只有小部分具有多向分化潜能. 流式细胞分选技术的发展使得分选 MSC 亚群更为方便. 有研究表明脂肪组

织来源的 CD71、CD73 和 CD105 阳性的细胞亚群成软骨分化能力较弱<sup>[63]</sup>, 而滑膜来源的 CD105 阳性的细胞亚群成软骨分化能力很强<sup>[64]</sup>. 小鼠 CD73 阳性的 MSC 的成骨分化的能力强于成脂分化能力<sup>[65]</sup>. 而 CD133 阳性的 MSC 亚群具有广泛的分化潜能, 包括分化成外胚层的神经细胞<sup>[66]</sup>.

除了上述 MSC 固有的异质性, 实验者、实验室、实验对象的不一致, 原代 MSC 的取材位置、种属、年龄、性别, 实验培养条件包括氧气浓度、缺

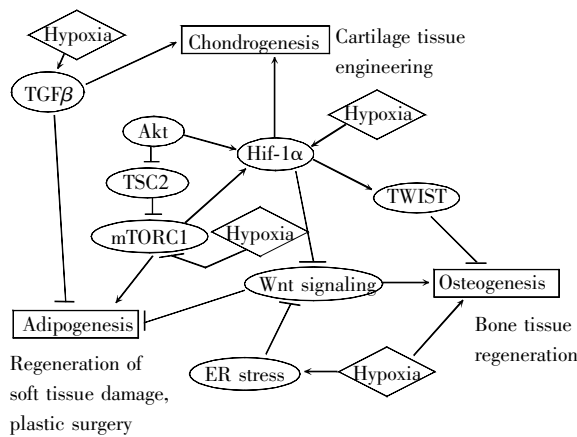


图 1 缺氧对于 MSC 分化影响的示意图

Fig.1 Schematic figure of roles of hypoxia in MSC differentiation

氧预处理或全程缺氧处理、细胞生长方式(平铺或在 3D 支架上生长)、细胞周围氧浓度等因素都会对实验结果造成程度不一的影响. 还有指标检测方法的不一致也可能导致实验结果的不一致. 举例说明, RT-PCR 检测的是指标分子的 mRNA 的转录水平, 而免疫印迹检测的是分子的蛋白质水平, 绝大多数研究者只是随意选择了一种来评估指标, 可信度显然不够. 考虑到 HIF-1 $\alpha$  是在蛋白水平调控的, 检测该指标必然是免疫印迹法更为可靠. 另外进行缺氧下的分化实验对实验者的操作要求也非常高, 比如缺氧-常氧的切换会对细胞产生缺氧再灌注损伤, 对实验结果可能造成未知的的影响, 这就要求在缺氧环境中持续处理的细胞一直处于缺氧状态, 常规处理包括细胞换液、传代都在缺氧中进行, 然而大多数实验室的缺氧设备无法满足无菌操作环境, 这就对长时间的缺氧处理提出了挑战.

缺氧与 MSC 行为的研究, 因为其广泛的临床应用前景而成为 MSC 相关研究中的热点, 在今后很长时间内仍将进行下去. 实验条件的统一成为其必然的趋势. 我们期待在不久的将来, 更高效率的、结果稳定性更强的配套研究方案将得到普遍应用, 而这研究方案仍需要研究者们付出大量的工作来确定.

### 参考文献(References):

[1] BRAHIMI-HORN M C, POUYSSEUR J. Oxygen, a source of life and stress[J]. FEBS Letters, 2007, 581(19): 3582-3591.  
[2] SIMON M C, KEITH B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9(4): 285-296.

[3] TAKUBO K, SUDA T. Roles of the hypoxia response system in hematopoietic and leukemic stem cells[J]. International Journal of Hematology, 2012, 95(5): 478-483.  
[4] SEMENZA G L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology[J]. Trends in Molecular Medicine, 2001, 7(8): 345-350.  
[5] 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.  
[6] WIESENER M S, JURGENSEN J S, ROSENBERGER C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs[J]. Federation of American Societies for Experimental Biology, 2003, 17 (2): 271-273.  
[7] HARRIS A L. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth[J]. Nature Review Cancer, 2002, 2(1): 38-47.  
[8] HEALY S J, GORMAN A M, MOUSAVI-SHAFAEI P, et al. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy[J]. European Journal of Pharmacology, 2009, 625(1-3): 234-246.  
[9] VERRAS M, PAPANDREOU I, LIM A L, et al. Tumor hypoxia blocks Wnt processing and secretion through the induction of endoplasmic reticulum stress[J]. Molecular and Cellular Biology, 2008, 28(23): 7212-7224.  
[10] LAHIRI S, ROY A, ROZANOV C, et al. K<sup>+</sup>-current modulated by PO<sub>2</sub> in type I cells in rat carotid body is not a chemosensor[J]. Brain Research, 1998, 794(1): 162-165.  
[11] SHIMODA L A, POLAK J. Hypoxia. 4. Hypoxia and ion channel function[J]. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 2011, 300(5): C951-967.  
[12] RIUS J, GUMA M, SCHACHTRUP C, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 $\alpha$ [J]. Nature, 2008, 453(7196): 807-811.  
[13] CUMMINS E P, BERRA E, COMERFORD K M, et al. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2006, 103(48): 18154-18159.  
[14] BELAIBA R S, BONELLO S, ZAHNINGER C, et al. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. Molecular Biology of the Cell, 2007, 18(12): 4691-4697.  
[15] WALMSLEY S R, PRINT C, FARAHI N, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 $\alpha$ -dependent NF-kappaB activity[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2005, 201(1): 105-115.  
[16] MARTIN D E, HALL M N. The expanding TOR signaling network[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2005, 17(2): 158-166.  
[17] BRUGAROLAS J, LEI K, HURLEY R L, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex[J]. Genes & Development, 2004, 18(23): 2893-2904.  
[18] ARSHAM A M, HOWELL J J, SIMON M C. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(32): 29655-29660.  
[19] HUDSON C C, LIU M, CHIANG G G, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression and function by the mammalian target of rapamycin[J]. Molecular and Cellular Biology, 2002, 22(20): 7004-7014.  
[20] LENZA G, BARACCA A, FATO R, et al. New insights into structure and function of mitochondria and their role in aging and disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(3-4): 417-437.  
[21] SOLAINI G, BARACCA A, LENZA G, et al. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2010, 1797(6-7): 1171-1177.

- [22] MANSFIELD K D, GUZY R D, PAN Y, *et al.* Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- $\alpha$  activation[J]. *Cell Metabolism*, 2005, 1(6): 393-399.
- [23] CONNER G E, SALATHE M, FORTEZA R. Lactoperoxidase and hydrogen peroxide metabolism in the airway[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2002, 166 (12 Pt 2): S57-61.
- [24] CHARITOU P, BURGERING B M. FOXOs in control of ROS and genomic stability to ensure healthy lifespan[EB/OL]. <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2012.4921>, 2012-09-16.
- [25] LI De-yuan, XUE Mao-yun, GENG Zhi-rong, *et al.* The suppressive effects of Bursopentine (BP5) on oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-activated murine peritoneal macrophages[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 2012, 29(1-2): 9-20.
- [26] MANSFIELD K D, GUZY R D, PAN Y, *et al.* Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- $\alpha$  activation[J]. *Cell Metabolism*, 2005, 1(6): 393-399.
- [27] BELL E L, KLIMOVA T A, EISENBART J, *et al.* The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2007, 177(6): 1029-1036.
- [28] FRIEDENSTEIN A J, PIATETZKY S, PETRAKOVA K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells[J]. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 1966, 16 (3): 381-390.
- [29] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C, *et al.* Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [30] GRAYSON W L, ZHAO F, BUNNELL B, *et al.* Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 358(3): 948-953.
- [31] FEHRER C, BRUNAUER R, LASCHOBBER G, *et al.* Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan[J]. *Aging Cell*, 2007, 6(6): 745-757.
- [32] D'IPPOLITO G, DIABIRA S, HOWARD G A, *et al.* Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells[J]. *Bone*, 2006, 39(3): 513-522.
- [33] 鞠大鹏, 詹丽杏. 脂肪细胞分化及其调控的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报* (JU Da-peng, ZHAN Li-xing. Developments in regulation of adipocytes differentiation[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2010, 32(5): 690-695.
- [34] VATER C, KASTEN P, STIEHLER M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells[J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(2): 463-477.
- [35] PYTLIK R, STEHLIK D, SOUKUP T, *et al.* The cultivation of human multipotent mesenchymal stromal cells in clinical grade medium for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (20): 3415-3427.
- [36] ZHOU Shuan-hu, LECHPAMMER S, GREENBERGER J S, *et al.* Hypoxia inhibition of adipocytogenesis in human bone marrow stromal cells requires transforming growth factor- $\beta$ /Smad3 signaling[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(24): 22688-22696.
- [37] HOLZSWARTH C, VAEGLER M, GIESEKE F, *et al.* Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells[J]. *BMC Cell Biology*, 2010, 11: 11.
- [38] MYLOTTE L A, DUFFY A M, MURPHY M, *et al.* Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(5): 1325-1336.
- [39] VALORANI M G, GERMANI A, OTTO W R, *et al.* Hypoxia increases Sca-1/CD44 co-expression in murine mesenchymal stem cells and enhances their adipogenic differentiation potential[J]. *Cell Tissue Research*, 2010, 341(1): 111-120.
- [40] VALORANI M G, MONTELATICI E, GERMANI A, *et al.* Pre-culturing human adipose tissue mesenchymal stem cells under hypoxia increases their adipogenic and osteogenic differentiation potentials[J]. *Cell Proliferation*, 2012, 45(3): 225-238.
- [41] REN Hong-ying, CAO Ying, ZHAO Qin-jun, *et al.* Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 347(1): 12-21.
- [42] GRAYSON W L, ZHAO F, IZADPANAH R, *et al.* Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2006, 207(2): 331-339.
- [43] FINK T, ABILDTRUP L, FOGD K, *et al.* Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1346-1355.
- [44] LIN Qun, LEE Yi-jiang, ZHONG Yun. Differentiation arrest by hypoxia[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 (41): 30678-30683.
- [45] ZHONG Yun, MAECKER H L, JOHNSON R S, *et al.* Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DECI1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia[J]. *Developmental Cell*, 2002, 2(3): 331-341.
- [46] ZHANG Hui-he, HUANG Jing-xiang, DUVEL K, *et al.* Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway[J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6189.
- [47] TAKADA I, KOUZMENKO AP, KATO S. Wnt and PPAR $\gamma$  signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis[J]. *Nature Reviews. Rheumatology*, 2009, 5(8): 442-447.
- [48] GIMM T, WIESE M, TESCHEMACHER B, *et al.* Hypoxia-inducible protein 2 is a novel lipid droplet protein and a specific target gene of hypoxia-inducible factor-1[J]. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2010, 24 (11): 4443-4458.
- [49] CHEN Ming-yang, LIE Pu-chang, LI Zhi-ling, *et al.* Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Experimental Hematology*, 2009, 37(5): 629-640.
- [50] POTIER E, FERREIRA E, MEUNIER A, *et al.* Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death[J]. *Tissue Engineering*, 2007, 13(6): 1325-1331.
- [51] CHUNG D J, HAYASHI K, TOUPADAKIS C A, *et al.* Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia[J]. *Research in Veterinary Science*, 2012, 92(1): 66-75.
- [52] MERCERON C, VINATIER C, PORTRON S, *et al.* Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells[J]. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 2010, 298(2): C355-364.
- [53] YANG Der-chih, YANG Muh-hwa, TSAI Chih-chien, *et al.* Hypoxia inhibits osteogenesis in human mesenchymal stem cells through direct regulation of RUNX2 by TWIST[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e23965.
- [54] HUANG Jiao, DENG Feng, WANG Lu, *et al.* Hypoxia induces osteogenesis-related activities and expression of core binding factor alpha1 in mesenchymal stem cells [J]. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2011, 224(1): 7-12.
- [55] HUNG Shun-pei, HO J H, SHIH Y R, *et al.* Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2012, 30(2): 260-266.