

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2023.09.002

· 基础研究 ·

低氧环境下 EphrinB2/EphB4 调控 MC3T3-E1 细胞成骨分化的实验研究

刘紫杉, 王一鑫, 李永明

上海牙组织修复与再生工程技术研究中心, 同济大学口腔医学院, 同济大学附属口腔医院正畸科, 上海(200072)

【摘要】 目的 探讨低氧环境下促红细胞生成素肝细胞激酶受体配体 B2/促红细胞生成素肝细胞激酶受体 B4 (erythropoietin producing hepatocyte kinase receptor ligand B2/erythropoietin producing hepatocyte kinase receptor B4, EphrinB2/EphB4) 对 MC3T3-E1 细胞成骨分化的影响, 为低氧调控成骨细胞分化提供实验依据。方法 设置对照组与氯化钴诱导的低氧组, 对 MC3T3-E1 细胞进行分组培养, 应用 qRT-PCR 检测细胞成骨标志物碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、runt 相关转录因子 2 (runt related transcription factor 2, RUNX2)、I 型胶原 (collagen-1, COL 1)、骨钙素 (osteocalcin, OCN) 的 mRNA 表达变化, ALP 染色检测细胞成骨诱导 7 d 后 ALP 活性。同时通过 qRT-PCR 与 Western blot 检测两组 MC3T3-E1 细胞缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、EphrinB2、EphB4 的 mRNA 和蛋白表达。然后增设氯化钴+EphB4 磷酸化抑制剂组 (加入 EphB4 磷酸化抑制剂 NVP-BHG712) 阻止 EphrinB2 与 EphB4 结合, 通过 qRT-PCR 与 Western blot 检测三组成骨标志物 ALP、RUNX2、COL 1、OCN 的 mRNA 与蛋白表达, ALP 染色、茜素红染色检测细胞成骨诱导后 ALP 活性及矿化情况。结果 与对照组相比, 在氯化钴诱导的体外细胞低氧环境下, MC3T3-E1 成骨标志物 ALP、RUNX2、COL 1、OCN mRNA 表达增加, ALP 活性增强, 矿化增强 ($P < 0.05$)。同时, 在氯化钴诱导的低氧环境下, HIF-1 α 、EphrinB2、EphB4 的 mRNA 和蛋白水平表达增加 ($P < 0.05$)。使用 NVP-BHG712 阻止 EphrinB2 和 EphB4 的结合后, 细胞的成骨标志物表达下降, ALP 活性及矿化能力降低 ($P < 0.05$)。结论 低氧环境可通过 EphrinB2/EphB4 信号通路促进 MC3T3-E1 细胞的成骨分化, 增加成骨标志物的表达及组织矿化。

【关键词】 低氧诱导因子-1 α ; 促红细胞生成素肝细胞激酶受体配体 B2; 促红细胞生成素肝细胞激酶受体 B4; 成骨分化; 低氧; 骨代谢; 碱性磷酸酶; 骨钙素

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2023)09-0618-07

【引用著录格式】 刘紫杉, 王一鑫, 李永明. 低氧环境下 EphrinB2/EphB4 调控 MC3T3-E1 细胞成骨分化的实验研究[J]. 口腔疾病防治, 2023, 31(9): 618-624. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2023.09.002.

Regulation of osteogenic differentiation under hypoxia by EphrinB2/EphB4 in MC3T3-E1 cells LIU Zishan, WANG Yixin, LI Yongming. Shanghai Engineering Research Center of Tooth Restoration and Regeneration, Department of Orthodontic, School & Hospital of Stomatology, Tongji University, Shanghai 200072, China.

Corresponding author: LI Yongming, Email: 1727039279@qq.com, Tel: 86-21-66313775

【Abstract】 Objective To investigate the effect of erythropoietin producing hepatocyte kinase receptor ligand B2-erythropoietin producing hepatocyte kinase receptor B4 (EphrinB2/EphB4) on the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells in a hypoxic environment to provide experimental evidence for hypoxia regulation of osteoblast differentiation. **Methods** Control groups and cobalt chloride (CoCl₂)-induced hypoxia groups were set up first. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of the osteogenic markers alkaline phosphatase (ALP), collagen1 (COL 1), runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and osteocalcin (OCN). ALP staining was used to detect the activity of cell alkaline phosphatase after osteogenic induction. The mRNA and protein expression levels of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), Eph-



微信公众号

【收稿日期】 2022-10-17; **【修回日期】** 2023-02-13

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81970921); 上海市卫生健康委员会科研项目(20214Y0354)

【作者简介】 刘紫杉, 医师, 硕士研究生, Email: 1933291@tongji.edu.cn

【通信作者】 李永明, 教授, 博士, Email: 1727039279@qq.com, Tel: 86-21-66313775

rinB2 and EphB4 in the two groups were detected via qRT-PCR and Western blot. Then, the CoCl_2 + inhibitor group was established. NVP-BHG712, an EphB4 phosphorylation inhibitor, was added to this group to prevent EphrinB2 from binding to EphB4 and producing signals. qRT-PCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of osteogenic markers, including ALP, RUNX2, COL I, and OCN. ALP staining and Alizarin red S staining were used to measure osteoblast differentiation and mineralization. **Results** Compared with the control group, the mRNA expression of the osteogenic differentiation markers ALP, RUNX2, COL-1, and OCN in MC3T3-E1 cells increased, and ALP activity and mineralization were enhanced under CoCl_2 -induced hypoxia *in vitro* ($P < 0.05$). Additionally, the expression of HIF-1 α , EphrinB2 and EphB4 was upregulated at the mRNA and protein levels under hypoxia ($P < 0.05$). When NVP-BHG712 was used to block the connection between EphrinB2 and EphB4, the expression of osteogenic markers and ALP activity and mineralization were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** EphrinB2/EphB4 can promote osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells and increase the expression of osteogenic markers and tissue mineralization in a hypoxic environment.

【Key words】 hypoxia inducible factor-1 α ; erythropoietin producing hepatocyte kinase receptor ligand B2; erythropoietin producing hepatocyte kinase receptor B4; osteogenic differentiation; hypoxia; bone metabolism; alkaline phosphatase; osteocalcin

J Prev Treat Stomatol Dis, 2023, 31(9): 618-624.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from Natural Science Foundation of China (No. 81970921) and Program of Shanghai Municipal Commission of Health (No. 20214Y0354).

牙槽骨是牙齿的重要支持部分,在正畸牙移动及牙周炎发展及治疗的过程中,涉及到骨稳态的平衡及骨改建。牙槽骨血供丰富,在受到机械应力、炎症刺激时,由于骨组织内血流中断,部分区域组织无法正常供氧及营养物质,常常处于低氧环境^[1]。低氧参与并影响机体正常生理过程,氯化钴是已经被广泛应用的低氧模拟物,通过增加缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor, HIF-1 α) 的表达水平影响下游的低氧反应元件,从而使细胞达到化学低氧状态,可用于体外研究模拟细胞低氧状态^[2-3]。研究表明, HIF-1 α 参与调控低氧环境下机体的反应,是骨组织在低氧环境下调节骨代谢的核心分子^[4]。HIF-1 α 的激活刺激多个缺氧反应基因的转录,可通过多种通路参与调节骨的形成与恢复^[5-6]。研究发现,破骨细胞表达的促红细胞生成素肝细胞激酶受体配体 B2 (erythropoietin producing hepatocyte kinase receptor ligand B2, EphrinB2) 和成骨细胞表达的促红细胞生成素肝细胞激酶受体 B4 (erythropoietin producing hepatocyte kinase receptor B4, EphB4) 通过相互作用产生双向信号,影响成骨细胞和破骨细胞功能,参与骨稳态的调控^[7-8]。在成骨细胞谱系中, EphrinB2 与 EphB4 均有表达,通过相互作用,可以抑制成骨细胞的凋亡来支持成骨细胞谱系的持续分化,从而维持促

进新的类骨质基质矿化^[9]。但在低氧条件下,缺氧对成骨细胞 EphrinB2/EphB4 的表达及成骨分化的影响目前尚不清楚。

本研究通过使用氯化钴 (CoCl_2) 模拟低氧环境,观察低氧环境下 MC3T3-E1 细胞 HIF-1 α 、EphrinB2 及 EphB4 的表达变化及成骨分化情况,了解低氧是否通过 EphrinB2/EphB4 信号通路调控 MC3T3-E1 细胞的成骨分化,为低氧环境下骨代谢机制的研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

小鼠胚胎成骨细胞前体细胞系 MC3T3-E1 (上海研生生化试剂有限公司,中国), PBS (Hyclone, 美国), 胎牛血清 (BI, 以色列), DMEM 培养基 (Gibco, 美国), 50 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸 (Sigma, 美国), 10 mmol/L β -磷酸甘油 (Sigma, 美国), 100 nmol/L 地塞米松 (Sigma, 美国), 1% 青-链霉素 (Hyclone, 美国), 胰蛋白酶 (Gibco, 美国), RNA 逆转录试剂盒 (Takara, 日本), TRIZOL 试剂 (Thermo Fish, 美国), 茜素红工作染液 (Solarbio, 中国), BCIP/NBT 免疫组织化学显色试剂盒 (上海生工生物公司, 中国), 氯化钴 (Sigma, 美国), EphB4 激酶自身磷酸化抑制剂 NVP-BHG712 (MCE, 美国)。

RIPA 裂解液(Thermo Fisher, 美国), 兔抗鼠多克隆 HIF-1 α 抗体(1:1 000, Affinity, 美国), 兔抗鼠多克隆 β -actin 抗体(1:3 000, Affinity, 美国), 兔抗鼠多克隆 EphB4 抗体(1:1 000, Proteintech, 美国), 兔抗鼠多克隆 runt 相关转录因子 2(runt related transcription factor 2, RUNX2) 抗体(1:1 000, Affinity, 美国), 兔抗鼠多克隆 I 型胶原(collogen-1, COL I) 抗体(1:1 000, Affinity, 美国), 兔抗鼠多克隆碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 抗体(1:1 000, 博士德, 中国), 鼠单克隆骨钙素(osteocalcin, OCN) 抗体(1:1 000, 博士德, 中国), 羊抗兔荧光二抗(IR Dye 800CW, Abcam, 英国)、羊抗鼠荧光二抗(IR Dye 680RD, Abcam, 英国), 实时荧光定量 PCR 仪(Lightcyler96, Roche, 瑞士), Western 激光成像系统(Odyssey clx, LICOR, 美国)。

1.2 细胞培养与低氧诱导

在 DMEM 培养基中加入 10% 胎牛血清, 1% 青链霉素配制完全培养基用于培养 MC3T3-E1 细胞, 在 5% 体积分数 CO₂、37 °C 的环境中培养。氯化钴组培养基中加入 125 μ mol/L 的氯化钴, 对照组使用正常培养基, 氯化钴 + 抑制剂组在培养基中加入 125 μ mol/L 的氯化钴和 50 nmol/L 的 NVP-BHG712, NVP-BHG712 是 EphB4 激酶自身磷酸化的抑制剂, 阻止 EphB4 与 EphrinB2 的接触反应。在 48 h 后对细胞进行 RNA 和蛋白质的提取。在完全培养基中加入 50 μ mol/L 抗坏血酸、10 mmol/L β -磷酸甘油、100 nmol/L 地塞米松, 对细胞进行成骨诱导, 每 48 h 更换培养基。

1.3 细胞增殖测定

以 2×10^4 个/mL 接种 MC3T3-E1 细胞于 96 孔板, 按照分组处理培养 48 h 后, PBS 洗涤, 每孔加入 CC-K8 溶液 10 μ L 与 90 μ L 完全培养基, 于 37 °C CO₂ 培养箱孵育 2 h 后, 酶标仪波长 450 nm 检测吸光度, 根据公式: 细胞活力 = (实验组的吸光度 - 空白组的吸光度) / (对照组的吸光度 - 空白组的吸光度), 计算细胞活力。

1.4 qRT-PCR

按分组处理细胞 48 h, 使用 TRIZOL 对各组细胞进行裂解, 提取总 RNA, 使用逆转录试剂盒进行逆转录, qRT-PCR 检测成骨标志物 ALP、RUNX2、COL 1、OCN 的变化情况, 以及信号分子 HIF-1 α 、EphrinB2、EphB4 的变化。以 β -actin 作为内参, 引物序列见表 1。

1.5 Western blot

按分组处理 MC3T3-E1 细胞 48 h 后, 弃培养

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primers sequences

Genes	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
β -actin	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAA	ATGGAGCCACCGATCCACA
ALP	GCACCTGCCTTACCAACTCT	GGACCTGAGCGTTGGTGTTA
RUNX2	GCACAAACATGGCCAGATTCA	AAGCCATGGTGCCCGTTAG
COL 1	TTCTGCTCACTCTGTGACC	GGCGGTCTTCAAGCCATACT
OCN	AGCACGTCTGCTTTGGAGAG	GCTGTAGGTGAAGCCACTGT
HIF-1 α	ACTTGGCAACCTTGGATTGGA	GCACCAAGCAGGTCATAGGT
EphrinB2	ACGGTCCAACAAGACGTCCA	GCTGTTGCCATCGGTGCTA
EphB4	AGTGGCTTCGAGCCATCAAGA	CTCCTGCCTTAGCTTGGGACTTC

ALP: alkaline phosphatase. RUNX2: runt related transcription factor 2. COL 1: collogen-1. OCN: osteocalcin. HIF-1 α : hypoxia inducible factor-1 α . EphrinB2: erythropoietin producing hepatocyte kinase receptor ligand B2. EphB4: erythropoietin producing hepatocyte kinase receptor B4

基, PBS 洗涤 3 次, 使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解细胞, 进行蛋白的抽提及定量。取等量总蛋白 100 °C 加热 5 min, 10% 及 12.5% SDS-PAGE 电泳分离后, 转至 NC 膜, 使用 5% BSA 封闭 1 h, 封闭后分别与兔抗鼠多克隆 HIF-1 α 抗体(1:1 000), 兔抗鼠多克隆 β -actin 抗体(1:3 000), 兔抗鼠多克隆 EphB4 抗体(1:1 000), 兔抗鼠多克隆 Ephrinb2 抗体(1:1 000), 兔抗鼠多克隆 ALP 抗体(1:1 000), 兔抗鼠多克隆 RUNX2 抗体(1:1 000), 兔抗鼠多克隆 COL I 抗体(1:1 000), 鼠单克隆 OCN 抗体(1:1 000) 4 °C 孵育过夜, 使用羊抗兔荧光二抗或羊抗鼠荧光二抗孵育, 使用 Odyssey clx 激光成像系统显色。

1.6 ALP 染色及定量分析

对 3 组细胞成骨诱导 7 d, 弃培养基, 使用 PBS 清洗细胞 3 次, 使用 4% 的多聚甲醛固定液固定, 按照 BCIP/NBT 免疫组织化学显色试剂盒说明书配置 ALP 染色液, 染色 5 min 后洗涤, 拍照。使用 Image J 对染色结果进行分析。

1.7 茜素红染色

不同条件处理下的细胞成骨诱导 21 d 后, 首先使用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 轻柔冲洗 3 次, 加入茜素红工作染液室温染色 5 ~ 10 min, 吸取染色液, 使用 PBS 轻柔洗涤, 显微镜下拍摄, 使用 Image J 对染色结果进行分析。

1.8 统计学分析

所有实验设置 3 个重复进行并独立进行 3 次。使用 SPSS20.0、GraphPad Prism8.0、Image J 软件进行分析与绘图, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 氯化钴及 EphB4 磷酸化抑制剂 NVP-BHG712 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

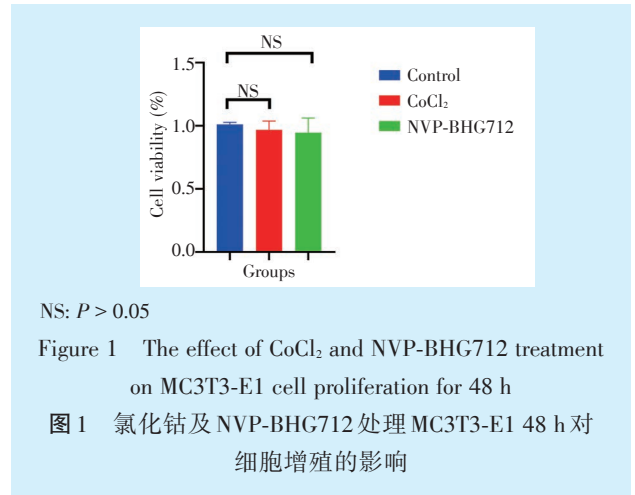
分别使用 125 μmol/L 的氯化钴, 50 nmol/L 的 NVP-BHG712 处理 MC3T3-E1 细胞 48 h 后, 与对照组比较, 细胞增殖率无明显差异(图 1)($P > 0.05$), 说明在细胞培养基中加入氯化钴和抑制剂 NVP-BHG712 不影响细胞的增殖与凋亡。

2.2 氯化钴低氧诱导对 MC3T3-E1 成骨分化的影响

两组 MC3T3-E1 细胞培养 48 h 后成骨标记物 mRNA 的检测结果示: 相比对照组, MC3T3-E1 经过 125 μmol/L 氯化钴刺激 48 h 后, ALP($t = 3.215, P = 0.0324$)、RUNX2($t = 5.332, P = 0.006$)、COL I($t = 12.41, P = 0.0002$)、OCN($t = 6.175, P = 0.0035$) 等成骨标志物 mRNA 表达明显上升, 差异具有统计学意义(图 2a)。两组细胞成骨诱导 7 d 后 ALP 染色结果如图 2b, Image J 定量分析结果显示, 氯化钴组细胞成骨分化明显高于对照组($t = 8.023, P = 0.0152$), 差异具有统计学意义(图 2c)。

2.3 低氧诱导使 MC3T3-E1 中 HIF-1α 表达上调, 并上调 EphrinB2 及 EphB4 的表达

在 MC3T3-E1 的培养基中加入氯化钴可以上调 HIF-1α 的表达, 实现模拟低氧环境, 其中 mRNA 上调 120 倍($t = 9.406, P = 0.0007$), HIF-1α/β-actin 蛋白比值增加 1.5 倍($t = 17.49, P < 0.0001$)。通过对氯化钴诱导 48 h 后的细胞进行 qRT-PCR 检测, 发现 EphrinB2($t = 15.82, P < 0.0001$)和 EphB4($t = 23.40, P < 0.0001$)表达上调(图 3a)。经 Western blot 检测, EphrinB2/β-actin 蛋白比值($t = 16.44, P < 0.0001$)增加, EphB4/β-actin 蛋白比值($t = 14.87, P = 0.0001$)也增加, 差异具有统计学意义(图 3b、3c)。



NS: $P > 0.05$

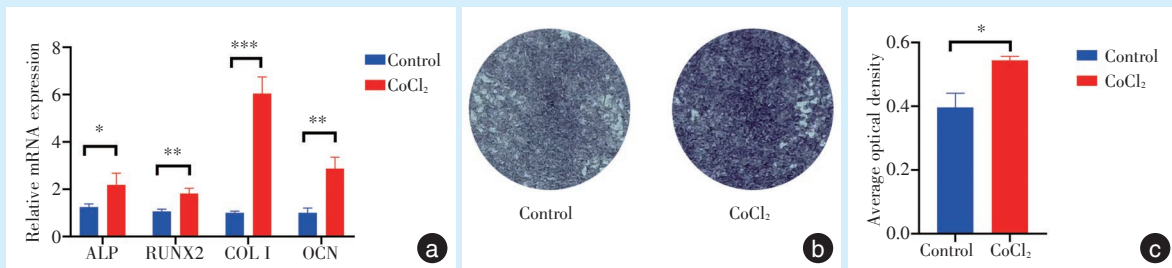
Figure 1 The effect of CoCl₂ and NVP-BHG712 treatment on MC3T3-E1 cell proliferation for 48 h

图 1 氯化钴及 NVP-BHG712 处理 MC3T3-E1 48 h 对细胞增殖的影响

2.4 抑制低氧诱导下 EphrinB2 与 EphB4 的结合可抑制细胞成骨分化及矿化

相比氯化钴组, 添加抑制剂组 ALP($t = 5.324, P = 0.006$)、RUNX2($t = 13.38, P = 0.0002$)、COL I($t = 7.435, P = 0.0017$)、OCN($t = 2.385, P = 0.0755$) 成骨标记物 mRNA 表达下调, 差异具有统计学意义(图 4a)。

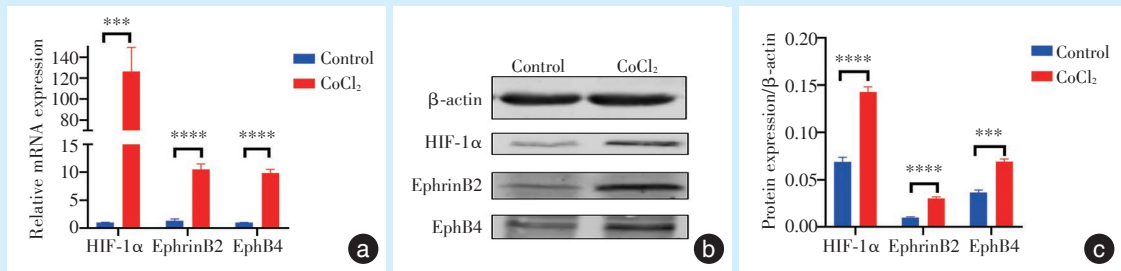
三组成骨诱导 7 d ALP 染色结果见图 4b, Image J 定量分析结果显示, 使用 EphB4 激酶自身磷酸化抑制剂后, 细胞的成骨分化明显减少($t = 57.69, P = 0.0003$), 差异具有统计学意义(图 4c)。成骨诱导 21 d 茜素红染色结果见图 4d, Image J 定量分析结果显示, 使用 EphB4 激酶自身磷酸化抑制剂后, 细胞的矿化明显减少($t = 14.24, P = 0.0049$), 差异具有统计学意义(图 4e)。另外, Western blot 检测结果显示, 添加抑制剂组中成骨标志物 ALP、OCN、Runx2、COL I 蛋白水平也低于氯化钴组, 差异具有统计学意义(图 4f、4g)。



a: mRNA expression of ALP, RUNX2, COL I and OCN. b: alkaline phosphatase staining results. c: quantitative analysis of ALP staining results. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.01$. ***: $P < 0.001$. ALP: alkaline phosphatase. RUNX2: runt related transcription factor 2. COL I: collagen-1. OCN: osteocalcin

Figure 2 Effects of hypoxia caused by CoCl₂ on osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells

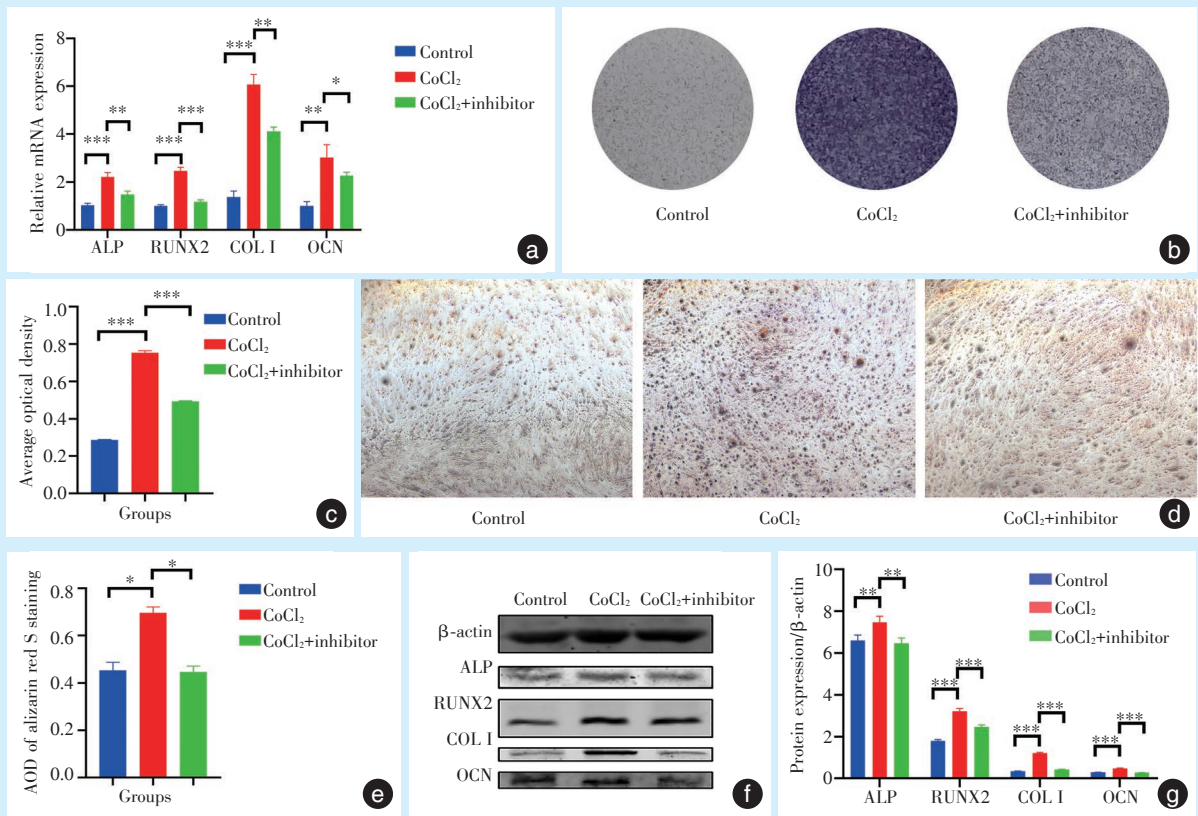
图 2 氯化钴低氧诱导对 MC3T3-E1 细胞成骨分化影响



a: mRNA expression of HIF-1 α , EphrinB2, EphB4 detected by qRT-PCR. b: protein expression of HIF-1 α , EphrinB2, EphB4 detected by Western blot. c: quantitative analysis of Western blot results. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.01$. ***: $P < 0.001$. HIF-1 α : hypoxia inducible factor 1 α . EphrinB2: ephrin ligand B2. EphB4: erythropoietin producing hepatocyte kinase receptor B4

Figure 3 Expression of HIF-1 α , EphrinB2, and EphB4 in MC3T3-E1 cells under hypoxia caused by CoCl₂

图3 MC3T3-E1细胞在氯化钴低氧诱导下HIF-1 α , EphrinB2, EphB4基因及蛋白表达变化



a: mRNA expression of ALP, RUNX2, COL I and OCN after 48 h of cell culture. b: ALP staining results after 7-day osteogenic induction. c: quantitative analysis of ALP staining results. d: alizarin red S staining results after 21-day osteogenic induction ($\times 40$). e: quantitative analysis of alizarin red S staining results. f: protein expression of ALP, RUNX2, COL I, OCN after 21-day osteogenic induction detected by Western blot. g: quantitative analysis of Western blot results. *: $P < 0.05$. **: $P < 0.01$. ***: $P < 0.001$. ALP: alkaline phosphatase. RUNX2: runt related transcription factor 2. COL I: collagen-1. OCN: osteocalcin. AOD: average optical density

Figure 4 Effects of restraining the combination of EphB4 and EphrinB2 under hypoxia caused by CoCl₂ on osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cells

图4 抑制EphB4与EphrinB2结合对氯化钴低氧诱导下MC3T3-E1细胞成骨分化影响

3 讨论

研究低氧环境下骨代谢的调节机制,对了解

牙槽骨在机械应力、炎症刺激下维持骨稳态平衡、进行骨改建具有重要意义。目前研究表明低氧对

骨代谢起到调节作用,参与骨稳态的维持^[10-12]。作为细胞处于低氧环境的标志物,HIF-1 α 在低氧环境下被激活,调节氧诱导基因的表达。以往研究发现,低氧会诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)转录增加,刺激局部血管的形成,输送营养物质,从而增强骨生成^[13-17];同时低氧环境可通过HIF-1 α -GRP78-Akt信号通路促进间充质干细胞的存活、增殖,从而抑制骨髓间充质干细胞的凋亡^[18];通过STAT3信号促进骨髓间充质干细胞的成骨分化,促进成骨^[19]。本研究发现,在氯化钴诱导细胞低氧环境下HIF-1 α 表达升高,成骨标志物(ALP、RUNX2、COL I、OCN)在mRNA水平的表达升高,细胞成骨分化能力增强,与以往研究结果一致。但也有研究报道持续的缺氧会抑制成骨分化^[20-21]。本研究结果显示,48 h的低氧诱导增强了MC3T3-E1的成骨分化,提示低氧暴露时间可影响成骨细胞的分化,适宜的低氧暴露可以有效诱导前体细胞成骨分化。

破骨细胞表面的EphrinB2与成骨细胞表面表达的EphB4结合产生双向信号传递,其中正向信号通过刺激EphB4增强Rho蛋白的活性可诱导成骨分化。在成骨细胞中,特异性抑制EphrinB2和EphB4磷酸化可明显降低成骨细胞分化,表明成骨细胞谱系中EphrinB2/EphB4相互作用在成骨细胞分化中起到关键作用^[22]。研究报道,缺氧可上调小鼠皮肤中的Eph受体和Ephrin配体的表达^[23],也有研究显示缺氧可上调血管内皮细胞中EphrinB2表达^[24]。然而有关成骨细胞分化过程中缺氧和EphrinB2/EphB4之间的关系目前尚未见报道。本研究发现,氯化钴处理MC3T3-E1细胞后,HIF-1 α mRNA和蛋白表达升高,缺氧诱导成功;MC3T3-E1细胞EphrinB2、EphB4 mRNA和蛋白的表达上调,表明低氧可以促进MC3T3-E1细胞表达EphrinB2和EphB4。通过对低氧诱导的MC3T3-E1细胞使用EphB4磷酸化抑制剂NVP-BHG712,阻止EphrinB2与EphB4结合产生信号后,MC3T3-E1的成骨标志物表达明显下降,对细胞进行成骨诱导,ALP染色及茜素红染色结果进一步表明细胞的成骨分化及矿化能力下降。实验初步证明低氧可以通过上调EphrinB2、EphB4在MC3T3-E1细胞表面的表达,调节其成骨分化能力。

低氧环境中,HIF-1 α 被激活,成为90~100个基因转录的缺氧反应元件,促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是其中重要基因之一^[7],EPO可通

过与间充质干细胞和造血干细胞的直接相互作用来刺激成骨细胞分化,促进成骨^[25-26]。EPO可通过促进骨髓间充质干细胞表面EphB4过表达,与EphrinB2结合,驱动成骨细胞分化^[27-28]。因此,推测低氧可能通过HIF-1 α -EPO-EphrinB2/EphB4对MC3T3-E1细胞的成骨分化做出调控。具体机制需进一步深入研究。

综上所述,本研究发现氯化钴诱导的体外细胞低氧环境,MC3T3-E1的成骨分化增加,同时,细胞低氧环境上调了HIF-1 α 、EphrinB2、EphB4的表达,而阻止EphrinB2和EphB4的结合后,细胞的成骨分化下降,表明缺氧和EphrinB2/EphB4之间的信号转导在促进前体细胞成骨分化过程中具有重要作用。EphrinB2/EphB4可在低氧环境下促进MC3T3-E1细胞的成骨分化,增加成骨标志物的表达及基质矿化,为低氧调控骨代谢机制的研究提供了新的参考依据。

【Author contributions】 Liu ZS performed the experiments, analyzed the data, and wrote the article. Wang YX revised the article. Li YM designed the study and guided the writing of the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Li Z, You Q, Zhang X. Small-molecule modulators of the hypoxia-inducible factor pathway: development and therapeutic applications[J]. *J Med Chem*, 2019, 62(12): 5725-5749. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01596.
- [2] Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model[J]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(4): 556-570. doi: 10.1002/jat.3749.
- [3] Zheng J, Zhu X, He Y, et al. CircCDK8 regulates osteogenic differentiation and apoptosis of PDLSCs by inducing ER stress/autophagy during hypoxia[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2021, 1485(1): 56-70. doi: 10.1111/nyas.14483.
- [4] Yellowley CE, Genetos DC. Hypoxia signaling in the skeleton: implications for bone health[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2019, 17(1): 26-35. doi: 10.1007/s11914-019-00500-6.
- [5] Bai H, Wang Y, Zhao Y, et al. HIF signaling: a new propellant in bone regeneration[J]. *Biomater Adv*, 2022, 138: 212874. doi: 10.1016/j.bioadv.2022.212874.
- [6] Chen W, Wu P, Yu F, et al. HIF-1 α regulates bone homeostasis and angiogenesis, participating in the occurrence of bone metabolic diseases[J]. *Cells*, 2022, 11(22): 3552. doi: 10.3390/cells11223552.
- [7] Schödel J, Ratcliffe PJ. Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(10): 641-659. doi: 10.1038/s41581-019-0182-z.
- [8] Chen Y, Wang H, Yang Q, et al. Single-cell RNA landscape of the osteoimmunology microenvironment in periodontitis[J]. *Theranostics*, 2022, 12(3): 1074-1096. doi: 10.7150/thno.65694.

- [9] Tonna S, Takyar FM, Vrahnas C, et al. EphrinB2 signaling in osteoblasts promotes bone mineralization by preventing apoptosis[J]. *FASEB J*, 2014, 28(10): 4482-4496. doi: 10.1096/fj.14-254300.
- [10] Wang T, Zhang X, Bikle DD. Osteogenic differentiation of periosteal cells during fracture healing[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(5): 913-921. doi: 10.1002/jcp.25641.
- [11] Camacho-Cardenosa M, Camacho-Cardenosa A, Timón R, et al. Can hypoxic conditioning improve bone metabolism? A systematic review[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(10): 1799. doi: 10.3390/ijerph16101799.
- [12] Tao J, Miao R, Liu G, et al. Spatiotemporal correlation between HIF-1 α and bone regeneration[J]. *FASEB J*, 2022, 36(10): e22520. doi: 10.1096/fj.202200329RR.
- [13] Stegen S, Carmeliet G. The skeletal vascular system - Breathing life into bone tissue[J]. *Bone*, 2018, 115: 50-58. doi: 10.1016/j.bone.2017.08.022.
- [14] Daly AC, Sathy BN, Kelly DJ. Engineering large cartilage tissues using dynamic bioreactor culture at defined oxygen conditions[J]. *J Tissue Eng*, 2018, 9: 2041731417753718. doi: 10.1177/2041731417753718.
- [15] Zhuang Y, Cheng M, Li M, et al. Small extracellular vesicles derived from hypoxic mesenchymal stem cells promote vascularized bone regeneration through the miR-210-3p/EFNA3/PI3K pathway [J]. *Acta Biomater*, 2022, 150: 413 - 426. doi: 10.1016/j.actbio.2022.07.015.
- [16] Sun J, Shen H, Shao L, et al. HIF-1 α overexpression in mesenchymal stem cell-derived exosomes mediates cardioprotection in myocardial infarction by enhanced angiogenesis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 373. doi: 10.1186/s13287-020-01881-7.
- [17] Peng Y, Wu S, Li Y, et al. Type H blood vessels in bone modeling and remodeling[J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 426 - 436. doi: 10.7150/thno.34126.
- [18] Lee JH, Yoon YM, Lee SH. Hypoxic preconditioning promotes the bioactivities of mesenchymal stem cells *via* the HIF-1 α -GRP78-Akt axis[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6): 1320. doi: 10.3390/ijms18061320.
- [19] Yu X, Wan Q, Ye X, et al. Cellular hypoxia promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and bone defect healing *via* STAT3 signaling[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 64. doi: 10.1186/s11658-019-0191-8.
- [20] Ma Z, Yu R, Zhao J, et al. Constant hypoxia inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by regulating phosphorylation of JNK and I κ B α [J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(2): 157 - 166. doi: 10.1007/s00011-018-1209-9.
- [21] Sha Y, Lv Y, Xu Z, et al. MGF E peptide pretreatment improves the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs *via* MEK-ERK1/2 and PI3K-Akt pathway under severe hypoxia[J]. *Life Sci*, 2017, 189: 52-62. doi: 10.1016/j.lfs.2017.09.017.
- [22] Arthur A, Gronthos S. Eph-ephrin signaling mediates cross-talk within the bone microenvironment[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 598612. doi: 10.3389/fcell.2021.598612.
- [23] Vihanto MM, Plock J, Erni D, et al. Hypoxia up-regulates expression of Eph receptors and ephrins in mouse skin[J]. *FASEB J*, 2005, 19(12): 1689-1691. doi: 10.1096/fj.04-3647fj.
- [24] Shang T, Li S, Zhang Y, et al. Hypoxia promotes differentiation of adipose-derived stem cells into endothelial cells through demethylation of ephrinB2[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 133. doi: 10.1186/s13287-019-1233-x.
- [25] Hiram-Bab S, Neumann D, Gabet Y. Erythropoietin in bone--Controversies and consensus[J]. *Cytokine*, 2017, 89: 155 - 159. doi: 10.1016/j.cyto.2016.01.008.
- [26] Rauner M, Murray M, Thiele S, et al. Epo/EpoR signaling in osteoprogenitor cells is essential for bone homeostasis and Epo-induced bone loss[J]. *Bone Res*, 2021, 9(1): 42. doi: 10.1038/s41413-021-00157-x.
- [27] Li C, Shi C, Kim J, et al. Erythropoietin promotes bone formation through EphrinB2/EphB4 signaling[J]. *J Dent Res*, 2015, 94(3): 455-463. doi: 10.1177/0022034514566431.
- [28] Wang Y, Wang P, Wu Q, et al. Loading of erythropoietin on biphasic calcium phosphate bioceramics promotes osteogenesis and angiogenesis by regulating EphB4/EphrinB2 molecules[J]. *J Mater Sci: Mater Med*, 2022, 33(2): 19. doi: 10.1007/s10856-022-06644-9.

(编辑 张琳,曾曙光)



官网