

## 成骨细胞-软骨细胞共培养通过MAPK信号 上调软骨细胞HIF-1通路的研究\*

李家驰, 张德茂, 谢静, 周学东<sup>△</sup>

口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院 牙体牙髓病科(成都 610041)

**【摘要】目的** 研究与成骨细胞共培养对软骨细胞低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1通路的影响及其机制。**方法** 采用胰酶消化法从新生小鼠膝关节及颅骨处分别提取软骨细胞和成骨细胞。使用6孔板(培养软骨细胞)和Transwell小室(培养成骨细胞)构建两种细胞的共培养体系。使用qRT-PCR分析共培养24 h后软骨细胞中HIFs及其靶基因丙酮酸脱氢酶激酶1(pyruvate dehydrogenase kinase 1, PDK1)的mRNA表达变化; Western blot用于检测共培养48 h后软骨细胞中HIFs、PDK1蛋白表达以及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路的改变; 活性氧(reactive oxygen species, ROS)染色以显示共培养48 h后软骨细胞ROS生成变化。**结果** qRT-PCR和Western blot结果表明, 软骨细胞和成骨细胞共培养后软骨细胞中HIF-1 $\alpha$ 的基因和蛋白表达水平上升( $P<0.05$ ); HIF-1靶基因PDK1的基因和蛋白水平同样上调( $P<0.05$ ); ROS染色显示与成骨细胞共培养使软骨细胞ROS生成减少; Western blot检测到共培养软骨细胞的细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)1/2和p38信号增强( $P<0.05$ )。**结论** 与成骨细胞共培养增强了软骨细胞ERK1/2和p38信号, 上调了软骨细胞的HIF-1通路。

**【关键词】** 共培养 软骨细胞 HIF-1 $\alpha$  ROS

### Co-Culturing of Osteoblasts and Chondrocytes Upregulates HIF-1 Pathway of Chondrocytes via MAPK Signaling

LI Jia-chi, ZHANG De-mao, XIE Jing, ZHOU Xue-dong<sup>△</sup>. State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, and Department of Dental and Endodontic Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: zhouxd@scu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To study the effect of co-culturing chondrocytes with osteoblasts on hypoxia-inducible factor (HIF)-1 pathway of chondrocytes and its mechanism. **Methods** Chondrocytes and osteoblasts were separately extracted from the knee joint and skull of newborn mice by trypsin digestion. The co-culturing system of osteoblasts and chondrocytes was constructed by using Transwell inserts to culture the osteoblasts and 6-well plate to culture the chondrocytes. We used qRT-PCR to examine changes in the mRNA expression of HIFs and its target gene pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) in chondrocytes co-cultured for 24 h. Western blot was used to analyze changes in the protein expression of HIFs and PDK1 and the changes in the activation of mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway after the cells were co-cultured for 48 h. Reactive oxygen species (ROS) staining was done to show the changes of ROS production in chondrocytes co-cultured for 48 h. **Results** The results of qRT-PCR and Western blot showed upregulated levels of HIF-1 $\alpha$  gene and protein expression ( $P<0.05$ ) in the chondrocytes after they were co-cultured with osteoblasts. The gene and protein expression levels of PDK1, the target gene of HIF-1, were also upregulated ( $P<0.05$ ). ROS staining showed that co-culturing of chondrocytes with osteoblasts decreased ROS production in chondrocytes. Western blot revealed that extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 and p38 signaling of co-cultured chondrocytes were enhanced ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Co-culturing with osteoblasts enhanced the ERK1/2 and p38 signaling of chondrocytes and upregulated the HIF-1 pathway of chondrocytes.

**【Key words】** Co-culture Chondrocyte HIF-1 $\alpha$  ROS

近年来,骨关节炎(osteoarthritis, OA)的发病率一直居高不下,而其发病机制尚未可知<sup>[1]</sup>。在生理状态下,软骨细胞处于相对缺氧的环境中,保持稳定的表型和较低的代谢活性。然而,OA的软骨细胞代谢表型会发生一系列改变。低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)系统存在于所有哺乳动物细胞中,是细胞和机体在低氧适应性反应中至关重要的调控因子<sup>[2-3]</sup>,由一个 $\alpha$ 亚基

(氧不稳定)和一个 $\beta$ 亚基(氧稳定)异源二聚构成。常氧时,肿瘤抑制蛋白VHL(pVHL)通过泛素-蛋白酶体途径靶向水解HIF- $\alpha$ ;而低氧时,pVHL功能受到抑制,HIF- $\alpha$ 免于被水解并入核与HIF- $\beta$ 二聚化,激活靶基因的转录表达<sup>[4]</sup>。哺乳动物的HIF- $\alpha$ 有3种亚型,HIF-1 $\alpha$ 和HIF-2 $\alpha$ 在结构和功能上最为相似,而HIF-3 $\alpha$ 存在许多剪接变体,其中一些以显性-负性方式抑制HIF-1 $\alpha$ 和HIF-2 $\alpha$ 的活性<sup>[5]</sup>。丙酮酸脱氢酶激酶1(pyruvate dehydrogenase kinase1, PDK1)由HIF-1通过上述途径靶向诱导表达<sup>[6]</sup>,使线粒体中的丙

\* 国家自然科学基金(No. 81870754)资助

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: zhouxd@scu.edu.cn

酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)的E1 $\alpha$ 亚基失活,抑制三羧酸循环<sup>[7]</sup>。PDK1可以通过这种方式减少线粒体中氧化磷酸化的通量。线粒体有氧呼吸是产生细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的最主要途径<sup>[8]</sup>。ROS包括自由基超氧化物(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、羟基(OH<sup>-</sup>)、非自由基过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)以及氧负离子(O<sup>-</sup>)等<sup>[9]</sup>。持续、过量的ROS会导致线粒体膜电位降低、结构破坏,细胞氧化损伤甚至凋亡<sup>[10-11]</sup>。

目前普遍认为,OA波及患者关节中的所有组织结构,并最终引起关节软骨的退化<sup>[12]</sup>。关节软骨中仅存在软骨细胞一种细胞类型,而软骨下骨中有成骨细胞、破骨细胞及骨细胞等多种细胞类型,它们可以通过软骨和软骨下骨间的微裂缝、血管通道等结构与软骨细胞进行信息交流和物质交换<sup>[12]</sup>。许多体内和体外研究已经证实,成骨细胞可以通过直接接触或旁分泌途径调节软骨细胞的代谢方式<sup>[13-14]</sup>,然而,我们对成骨细胞对软骨细胞HIFs及氧稳态的调控知之甚少。因此,本实验构建了小鼠原代成骨细胞和软骨细胞的体外共培养系统,以研究成骨细胞对软骨细胞HIFs的影响及调控机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂及仪器

6孔板、0.4  $\mu$ m Transwell小室购自美国康宁公司;玻底培养皿购自无锡耐思生命科技股份有限公司;胎牛血清、DMEM培养基、 $\alpha$ -MEM培养基、I型胶原酶、II型胶原酶购自美国Gibco公司;青链霉素、含EDTA的胰蛋白酶、4',6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI; D9542)购自美国Sigma公司;高纯总RNA快速提取试剂盒购自无锡百泰克生物技术有限公司; cDNA合成试剂盒、qRT-PCR试剂盒购自美国MBI公司; qRT-PCR引物由北京擎科生物科技有限公司设计及提供; ROS检测试剂盒、RIPA裂解液(强)、BCA蛋白浓度测定试剂盒、Western一抗稀释液、SDS-PAGE凝胶配置试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; HRP化学发光剂、PVDF电转移膜购自美国Millipore公司; 一抗HIF-1 $\alpha$ (#ab2185)、HIF-2 $\alpha$ (#ab199)、HIF-3 $\alpha$ (#ab2165)、PDK1(#ab110025)、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1/2(#184699)、p-ERK1/2(#201015)购自英国Abcam公司; 一抗 $\beta$ -actin(#200068-8F10)、p38(#340697)、p-p38(#310091)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)(#380556)、p-JNK(#381100)、二抗(#511103、#511203)购自成都正能生物科技有限责任公司; 激光共聚焦显微镜、体视显微镜、倒置显微镜购自日

本Olympus公司; 酶标仪购自美国Thermo Fisher公司; 凝胶成像仪购自英国Bio-rad公司。

### 1.2 原代成骨细胞、原代软骨细胞的纯化和培养

动物实验按照我国《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35892-2018)》要求,规范落实实验动物福利伦理。从新生C57小鼠(2~3日龄,购自四川大学实验动物中心)分离原代关节软骨细胞和颅骨成骨细胞。处死小鼠,消毒,然后用眼科剪从暴露的膝关节表面除去膝关节表皮,剥离软骨组织。用同样的方法从小鼠头骨分离原代成骨细胞的组织片。将两种组织用PBS洗涤4次并切成小块,在0.25%胰蛋白酶溶液中消化30 min。然后除去含有胰蛋白酶的上清液,用0.15% II型胶原酶处理软骨组织,0.25% I型胶原酶处理成骨组织,消化过夜。然后将两种胶原酶处理溶液与含10%胎牛血清的DMEM(高葡萄糖DMEM, 0.1 mmol/L非必需氨基酸, 4 mmol/L L-谷氨酰胺, 1%青霉素-链霉素溶液)1:1混合,将混合物1000 r/min离心5 min。除去上清液,并将两种细胞与完全培养基混合(含10%胎牛血清的DMEM用于软骨细胞,含10%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM用于成骨细胞)。将获得的细胞悬浮液接种在培养瓶中,37  $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>环境下培养。

### 1.3 构建共培养体系

本研究采用非接触式共培养方法。成骨细胞被接种在孔径为0.4  $\mu$ m的Transwell小室中,软骨细胞被接种在6孔板中。用含2%胎牛血清的DMEM和 $\alpha$ -MEM替换原培养基饥饿16 h,然后将培养基替换为含1%胎牛血清的DMEM和 $\alpha$ -MEM培养基。同时,将有成骨细胞的Transwell小室放入有软骨细胞的6孔板中进行非接触共培养(Co-culture group)。将仅加入含1%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM培养基的Transwell小室放入有软骨细胞的6孔板中作为对照组(Mono-culture group)。

### 1.4 qRT-PCR检测mRNA表达

共培养24 h后用高纯总RNA快速提取试剂盒提取软骨细胞RNA并纯化、定量,之后用cDNA纯化试剂盒将RNA逆转录获得cDNA。使用实时荧光定量PCR仪进行qRT-PCR,以 $\beta$ -actin作为内参,检测软骨细胞HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、HIF-3 $\alpha$ 和PDK1的mRNA表达。各基因的引物序列见表1。qRT-PCR反应体系为25  $\mu$ L,含有1  $\mu$ L cDNA。每次循环包括变性94  $^{\circ}$ C 30 s,退火55~65  $^{\circ}$ C 30 s,延长72  $^{\circ}$ C 30 s,循环次数25~28次。采用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法进行基因表达的相对定量。

### 1.5 Western blot检测蛋白表达

共培养48 h后,使用RIPA裂解液提取软骨细胞总蛋白,用BCA试剂盒进行蛋白浓度定量后100  $^{\circ}$ C水浴加热

表 1 本实验中qRT-PCR的引物序列  
Table 1 Primer pairs for qRT-PCR used in the study

mRNA	Primer sequence	Product length/bp
<i>HIF-1α</i> (NM_001313920.1)	Forward: 5'-CGTTCCTTGCTCTTTGTGG-3' Reverse: 5'-TAAACGTAAGCGCTGACCCA-3'	106
<i>HIF-2α</i> (NM_010137.3)	Forward: 5'-GCCTGACTAACCGCCACAGA-3' Reverse: 5'-ACACCGCTGCCATATCACAAA-3'	74
<i>HIF-3α</i> (NM_001162950.1)	Forward: 5'-CAGCGCGTGAGGTCGAA-3' Reverse: 5'-ATTGTGAGGCGCATGATGGA-3'	167
<i>PDK1</i> (NM_001360002.1)	Forward: 5'-TCTGCGACAAGAGTTGCCTG-3' Reverse: 5'-TGGATATACCAACTTGCACCA-3'	114
$\beta$ -actin (NM_007393.5)	Forward: 5'-TGAGCTGCGTTTTACACCCT-3' Reverse: 5'-GCCTTACCAGTTCCAGTTTT-3'	198

5 min使蛋白变性。使用SDS-PAGE凝胶将蛋白电泳分离后转移至PVDF膜上, 4 °C条件下—抗(HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ , PDK1, ERK1/2, p-ERK1/2, p38, p-p38, JNK, p-JNK, 1 : 1 000)孵育过夜。然后加入相应的二抗(山羊抗兔IgG-HRP, 1 : 5 000; 山羊抗鼠IgG-HRP, 1 : 5 000), 以 $\beta$ -actin (1 : 1 000)作为内参, 室温孵育2 h后用TBST洗涤, 最后用HRP化学发光液曝光显影。用Image J软件(美国NIH公司)对条带进行定量分析。以目的蛋白与内参蛋白条带光密度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

### 1.6 ROS检测

将软骨细胞接种在激光共聚焦显微镜专用的玻底培养皿中培养12 h, 再按1.3所述方法与成骨细胞共培养48 h。对照组Transwell小室中仅加入含1%胎牛血清的 $\alpha$ -MEM培养基。根据ROS检测试剂盒使用说明书配制染

液, 对软骨细胞进行荧光染色45 min后用PBS洗涤3次, 用DAPI将细胞核染色10 min。染色结束后用PBS洗涤3次, 立即用激光共聚焦显微镜观察软骨细胞绿色荧光的分布和强度。用Image J软件统计单个细胞平均荧光强度。

### 1.7 统计学方法

以上实验均重复3次, 每次重复实验均设置3组平行对照。组间差异使用单因素方差分析(ANOVA)进行比较, 两两差异采用*t*检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 与成骨细胞共培养上调软骨细胞HIF-1 $\alpha$ 表达

本实验构建了一种共培养体系, 软骨细胞被接种于6孔板中, 成骨细胞被接种于0.4  $\mu$ m Transwell小室中, 置于6孔板上方, 进行非接触式共培养(图1A)。

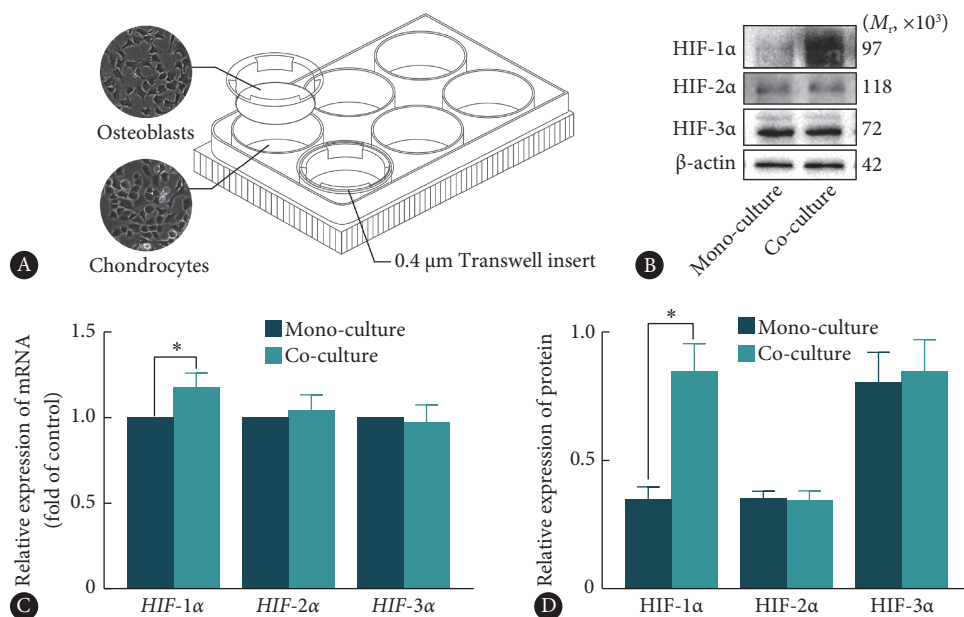


图 1 与成骨细胞共培养上调软骨细胞HIF-1 $\alpha$ 表达

Fig 1 Co-culturing with osteoblasts upregulated HIF-1 $\alpha$  expression in chondrocytes

A: Schematic diagram of non-contact coculture system; B: Western blot; C: qRT-PCR ( $n=3$ ,  $*P < 0.05$ ); D: Quantitative analysis was performed to confirm the variation of proteins in B ( $n=3$ ,  $*P < 0.05$ ).

见图1B~1D。qRT-PCR结果显示,与成骨细胞共培养24 h后,软骨细胞HIF-1 $\alpha$  mRNA表达增加( $P<0.05$ ),而HIF-2 $\alpha$ 和HIF-3 $\alpha$  mRNA表达无明显变化。Western blot结果显示,与成骨细胞共培养48 h后,共培养组软骨细胞HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达量高于对照组( $P<0.05$ ),而两组间HIF-2 $\alpha$ 和HIF-3 $\alpha$ 蛋白表达水平无明显差异。以上结果表明,HIF-1 $\alpha$ 在共培养软骨细胞中表达增加。

## 2.2 与成骨细胞共培养增加软骨细胞PDK1表达

qRT-PCR结果表明(图2),与成骨细胞共培养24 h后,软骨细胞PDK1 mRNA表达量增加( $P<0.01$ )。Western blot结果显示,与成骨细胞共培养48 h后,共培养组软骨细胞PDK1蛋白水平高于对照组软骨细胞( $P<0.05$ )。以上结果表明,共培养软骨细胞的PDK1表达增加。

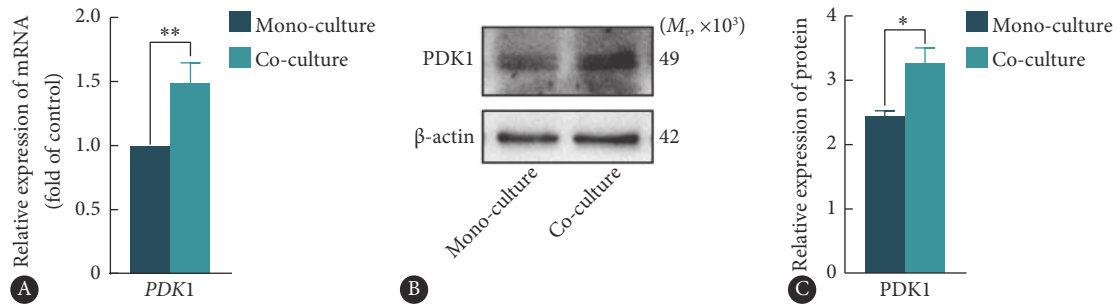


图2 与成骨细胞共培养增加软骨细胞PDK1表达

Fig 2 Co-culturing with osteoblasts increased the expression of PDK1 in chondrocytes

A: qRT-PCR ( $n=3$ , \*\* $P<0.01$ ); B: Western blot; C: Quantitative analysis was performed to confirm the variation of proteins in B ( $n=3$ , \* $P<0.05$ ).

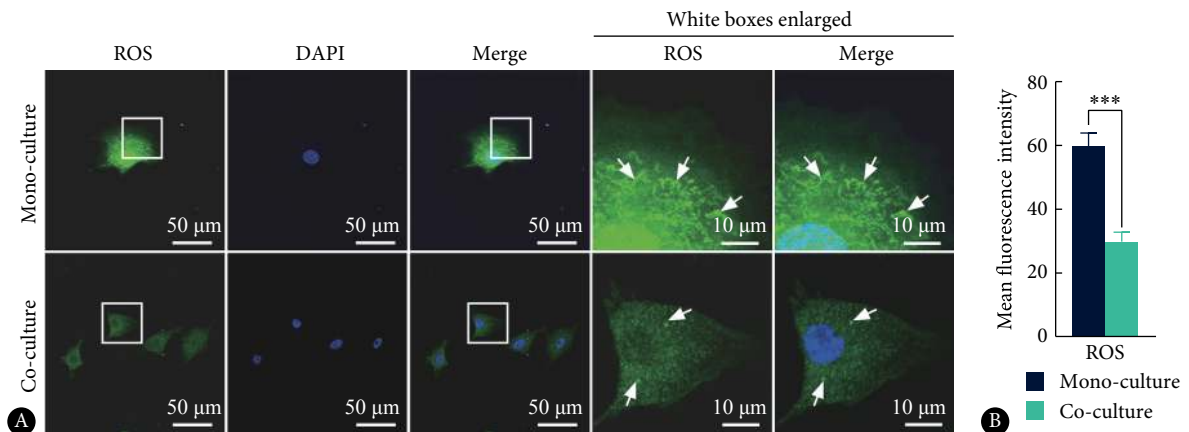


图3 与成骨细胞共培养减少软骨细胞ROS生成

Fig 3 Co-culturing with osteoblasts reduced ROS production of chondrocytes

A: Representative immunofluorescence images by CLSM showing the ROS production of chondrocytes (ROS: arrows; nucleus: blue); B: Quantitative analysis was performed to confirm the variation of proteins in A ( $n=3$ , \*\*\* $P<0.001$ ).

## 3 讨论

OA常常累及骨关节中的所有组织,其中包括关节软骨和软骨下骨。软骨下骨中的成骨细胞、破骨细胞和骨

## 2.3 与成骨细胞共培养减少软骨细胞ROS生成

结果显示(图3),在与成骨细胞共培养48 h后,软骨细胞的ROS生成显著减少。单独培养的软骨细胞中可以观察到成簇的点状绿色荧光,而共培养的软骨细胞只有均匀分布的弥散状绿色荧光。定量分析显示共培养组单个软骨细胞的平均荧光强度显著降低( $P<0.001$ )。

## 2.4 与成骨细胞共培养上调软骨细胞ERK1/2和p38信号通路

使用Western blot分别检测ERK1/2、p38和JNK的表达变化,结果显示(图4)共培养软骨细胞p-ERK和p-p38的表达增加( $P<0.05$ ),而对于JNK信号通路,只检测到JNK表达的增加( $P<0.05$ ),p-JNK并未观察到明显差异。以上结果表明,与成骨细胞共培养48 h后,软骨细胞的ERK1/2和p38信号通路上调,JNK信号通路无明显变化。

细胞等通过微裂缝、血管通道等结构与关节软骨中的软骨细胞进行物质交换和信息交流。许多研究已经证实,成骨细胞可以调控软骨细胞的代谢方式<sup>[12]</sup>。在本实验中,我们使用Transwell小室实现了成骨细胞和软骨细胞

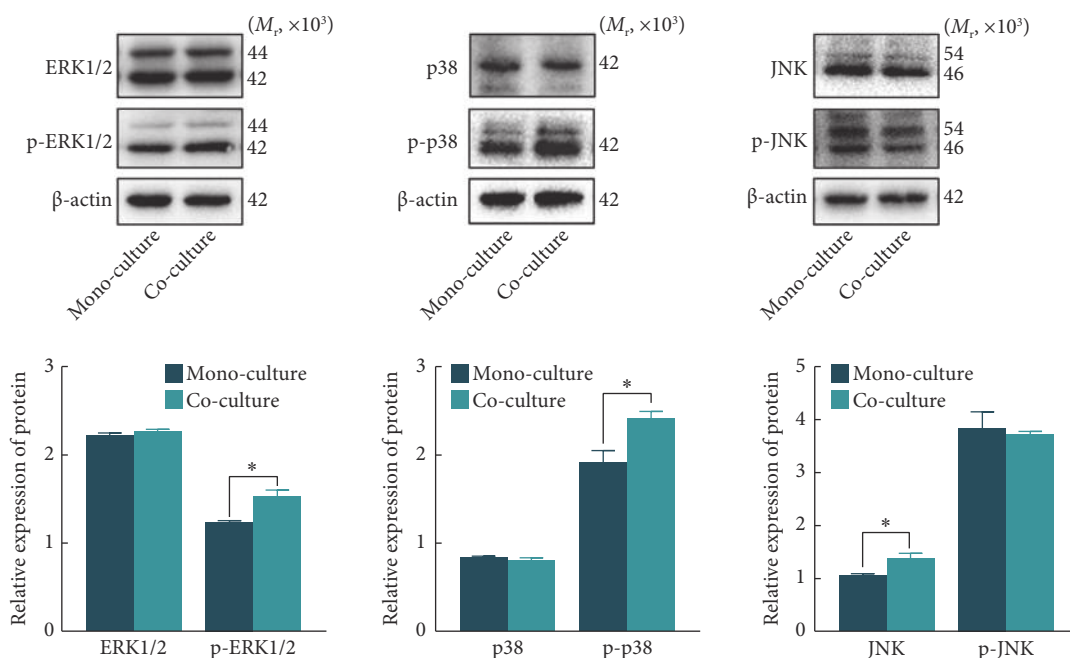


图 4 与成骨细胞共培养上调软骨细胞ERK1/2和p38信号

Fig 4 Co-culturing with osteoblasts activated ERK1/2 and p38 signaling in chondrocytes

\* $P < 0.05$ ,  $n = 3$ .

的共培养,以研究成骨细胞对软骨细胞的影响。

软骨细胞作为关节软骨中唯一的细胞类型,生活在缺乏血管与淋巴管的相对低氧的环境中,所以维持细胞内的氧稳态对软骨细胞正常存活和发挥生理功能至关重要。有研究表明,HIF-1是软骨细胞应对低氧的适应性反应中不可或缺的调节因子<sup>[15-16]</sup>。在低氧状态下,HIF-1 $\alpha$ 稳定表达,并进入细胞核与HIF-1 $\beta$ 形成异源二聚体,诱导靶基因转录表达,从而调节细胞的氧稳态。PDK1可以通过这种方式被HIF-1靶向调控,其蛋白翻译表达后定位于线粒体内膜,通过失活PDH阻断了丙酮酸进入线粒体呼吸链,从而抑制有氧呼吸<sup>[17-18]</sup>。ROS是线粒体有氧呼吸的副产物,在持续低氧状态下,由于缺少O<sub>2</sub>作为电子传递链最终的电子载体,ROS将会大量累积,严重危害线粒体功能及细胞存活。

在本实验中,为了探究共培养对软骨细胞低氧适应性反应的作用,我们检测了软骨细胞HIFs家族的基因表达变化。qRT-PCR结果表明,共培养软骨细胞HIF-1 $\alpha$  mRNA水平升高,而HIF-2 $\alpha$ 和HIF-3 $\alpha$ 没有明显差异,提示共培养可能通过HIF-1通路调控软骨细胞的氧稳态。Western blot结果同样表明共培养增强了HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达,初步印证了这一假设。

为了进一步验证共培养软骨细胞中HIF-1通路的变化并检验上调的HIF-1 $\alpha$ 是否参与了靶基因的调控,我们检测了PDK1 mRNA水平变化,发现与成骨细胞共培养后

软骨细胞PDK1 mRNA表达量明显提升,证明共培养软骨细胞中HIF-1的反式激活活性增强。而Western blot的结果则证明共培养软骨细胞的PDK1蛋白表达量同样增加,再一次证实了我们的假设。

本实验通过对软骨细胞的ROS荧光染色,观察到与成骨细胞共培养后,软骨细胞生成的ROS显著减少,提示线粒体功能被抑制,导致有氧呼吸减弱。这与PDK1的检测结果相吻合,即共培养软骨细胞PDK1表达量增加,抑制了线粒体的有氧呼吸,使ROS生成减少。综上所述,可以认为共培养通过HIF-1通路调控软骨细胞氧稳态这一假设成立。

接下来,为了阐明激活HIF-1通路的上游信号,我们重点研究了丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路<sup>[19]</sup>。其中,ERK1/2信号被认为是调控HIF-1的潜在信号通路,因为它被证实通过控制HIF-1 $\alpha$ 的反式激活结构域上调HIF-1的反式激活活性<sup>[20-21]</sup>。因此,我们首先检测了软骨细胞ERK1/2信号的蛋白变化。Western blot检测结果证实共培养的软骨细胞中p-ERK1/2的表达量明显高于单独培养的软骨细胞,表明ERK1/2信号通路被上调。除了ERK1/2,p38/MAPK也是激活软骨细胞中HIF-1的潜在信号通路<sup>[22-23]</sup>。研究表明,p38参与了小鼠胚胎成纤维细胞和前列腺癌细胞中HIF-1通路的激活<sup>[24-25]</sup>。因此,我们用Western blot检测了软骨细胞中p38的表达。结果显示,共培养软骨细胞中p-

p38的表达增加,提示p38信号的激活。作为经典MAPK信号通路的另一个成员,JNK信号也被报道调控HIF-1通路<sup>[23]</sup>。而Western blot显示虽然共培养软骨细胞JNK的蛋白表达略高于对照组,但p-JNK的水平差异并无统计学意义。

综上所述,本实验通过构建小鼠原代成骨细胞和软骨细胞的共培养体系,研究了成骨细胞与软骨细胞共培养对软骨细胞HIF-1通路的调控及其机制。研究发现,共培养激活了软骨细胞的ERK1/2和p38信号,从而上调了HIF-1 $\alpha$ 的表达,靶向增强了PDK1的表达,减少ROS生成。即共培养通过调控HIF-1通路维持软骨细胞的氧稳态。然而关于共培养调控软骨细胞HIF-1通路对软骨细胞代谢表型(有氧呼吸、无氧呼吸等)的具体调控机制仍有待进一步研究。

\* \* \*

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] 覃文聘, 闫舰飞, 焦凯. 线粒体结构及功能异常在骨关节炎软骨退变中的作用研究进展. *医学研究杂志*, 2020, 49(5): 177-181.
- [2] 张丹, 任利玲. 缺氧诱导因子1 $\alpha$ 在组织工程成骨和成血管中的作用. *中国修复重建外科杂志*, 2016, 30(4): 504-508.
- [3] 黄志刚, 王耀, 马克. 低氧诱导因子1 $\alpha$ 基因在大鼠终板软骨细胞中的表达及意义研究. *中国修复重建外科杂志*, 2017, 31(3): 103-108.
- [4] 李福祥, 全燕, 夏前明. 低氧诱导因子-1 $\alpha$ 低氧表达调控研究进展. *国际呼吸杂志*, 2005, 25(3): 197-200.
- [5] GU X X, TANG Z Z, HE Y L, *et al.* A functional polymorphism in HIF-3 $\alpha$  is related to an increased risk of ischemic stroke. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(5): 1061-1069.
- [6] SEMBA H, TAKEDA N, ISAGAWA T, *et al.* HIF-1 $\alpha$ -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nat Commun*, 2016, 7: 11635[2021-10-09]. <https://www.nature.com/articles/ncomms11635>. doi: 10.1038/ncomms11635.
- [7] 王秋月, 贾方, 王菊勇. 丙酮酸脱氢酶激酶在恶性肿瘤中的研究进展. *肿瘤预防与治疗*, 2019, 32(10): 93-98.
- [8] JAKUBCZYK K, DEC K, KAŁDUŃSKA J, *et al.* Reactive oxygen species—Sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkuri Lekarski*, 2020, 48(284): 124-127.
- [9] MOLONEY J N, COTTER T G. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 80: 50-64.
- [10] 郑安财, 李菊香. 线粒体ROS与心房颤动. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(10): 1917-1920.
- [11] YANG S, LIAN G. ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply. *Mol Cell Biochem*, 2020, 467(1/2): 1-12.
- [12] FINDLAY D M, ATKINS G J. Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis. *Curr Osteoporos Rep*, 2014, 12(1): 127-134.
- [13] NAKAOKA R, HSIONG S X, MOONEY D J. Regulation of chondrocyte differentiation level via co-culture with osteoblasts. *Tissue Eng*, 2006, 12(9): 2425-2433.
- [14] JIANG J, NICOLL S B, LU H H. Co-culture of osteoblasts and chondrocytes modulates cellular differentiation *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338(2): 762-770.
- [15] 张士花, 元宇, 邹军. 低氧诱导因子1 $\alpha$ 调控骨代谢和骨微环境血管生成的研究进展. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(8): 1201-1206.
- [16] 夏艳, 胡江天, 高国杰, 等. 低氧诱导因子1对软骨作用的研究进展. *医学综述*, 2018, 24(6): 33-37.
- [17] PENG F, WANG J H, FAN W J, *et al.* Glycolysis gatekeeper PDK1 reprograms breast cancer stem cells under hypoxia. *Oncogene*, 2018, 37(8): 1062-1074.
- [18] XU W N, ZHENG H L, YANG R Z, *et al.* HIF-1 $\alpha$  regulates glucocorticoid-induced osteoporosis through PDK1/AKT/mTOR signaling pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 922[2021-10-09]. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00922>.
- [19] MASOUD G N, LI W. HIF-1 $\alpha$  pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(5): 378-389.
- [20] KARAGIOTA A, KOURTI M, SIMOS G, *et al.* HIF-1 $\alpha$ -derived cell-penetrating peptides inhibit ERK-dependent activation of HIF-1 and trigger apoptosis of cancer cells under hypoxia. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(4): 809-825.
- [21] FREDE S, STOCKMANN C, FREITAG P, *et al.* Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- $\kappa$ B. *Biochem J*, 2006, 396(3): 517-527.
- [22] YAN L, CAO X, ZENG S, *et al.* Associations of proteins relevant to MAPK signaling pathway (p38MAPK-1, HIF-1 and HO-1) with coronary lesion characteristics and prognosis of peri-menopausal women. *Lipids Health Dis*, 2016, 15(1): 187.
- [23] GAO W, HE R, REN J, *et al.* Exosomal HMGB1 derived from hypoxia-conditioned bone marrow mesenchymal stem cells increases angiogenesis via the JNK/HIF-1 $\alpha$  pathway. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(5): 1364-1373.
- [24] EMERLING B M, PLATANIAS L C, BLACK E, *et al.* Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(12): 4853-4862.
- [25] KHANDRIKA L, LIEBERMAN R, KOUL S, *et al.* Hypoxia-associated p38 mitogen-activated protein kinase-mediated androgen receptor activation and increased HIF-1 $\alpha$  levels contribute to emergence of an aggressive phenotype in prostate cancer. *Oncogene*, 2009, 28(9): 1248-1260.

(2021-09-29收稿, 2021-10-12修回)

编辑 余琳