

## · 基础研究 ·

低氧诱导因子-1 $\alpha$  在长骨发育中的表达研究朱勋兵<sup>1</sup>, 周建生<sup>1</sup>, 肖玉周<sup>1</sup>, 邓廉夫<sup>2</sup>

(1.蚌埠医学院第一附属医院骨科组织移植安徽省重点实验室, 安徽 蚌埠 233003; 2.上海市伤骨科研究所)

**【摘要】** 目的: 通过动态观察小鼠长骨发育的演变过程, 检测各发育时段中低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 表达及分布状况, 探讨 HIF-1 $\alpha$  在小鼠长骨发育过程中的时空表达特点与作用。方法: 分别剖腹取得胎龄 12.5、13.5、14.5、15.5、16.5、17.5 d 的 C57BL6 小鼠的胎鼠, 解剖显微镜下观察肢芽长骨的软骨形成及其软骨内骨化的动态形态演变过程。通过免疫组织化学方法观察 HIF-1 $\alpha$  蛋白在初级骨化中心形成中的表达与分布, 进一步应用 RT-PCR 检测 HIF-1 $\alpha$  mRNA 在胎鼠长骨各发育时段的表达状况及与骨标记基因骨钙素(OC)表达的关系。结果: 胚胎第 13.5 d (E13.5) 时, 软骨性肢体形成, 关节轮廓出现; E14.5 时, 软骨性长骨内形成小的骨化核, 初级骨化中心刚刚出现, 显现不透光骨化影, 其后逐渐增大并向头尾两端延伸。免疫组化检测到 E14.5 时初级骨化中心内的软骨细胞核内见大量 HIF-1 $\alpha$  阳性黄色颗粒, 之后很快消失。HIF-1 $\alpha$  mRNA 自 E13.5 至 E15.5 均大量表达, 其后很快下降, 维持低水平表达。结论: 长骨发育表现为软骨内成骨过程, 存在低氧环境, 伴随 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的规律性表达, 这可能与长骨软骨内骨化过程的启动有关。

**【关键词】** 低氧诱导因子; 骨生成; 小鼠

**Expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in long bone development** ZHU Xun-bing, ZHOU Jian-sheng, XIAO Yu-zhou, DENG Lian-fu\*. \*Shanghai Institute of Traumatology and Orthopedics, Shanghai 200025, China

**ABSTRACT** **Objective:** To observe dynamically the development of fetal long bone and detect the expression and distribution of HIF-1 $\alpha$ , to investigate the expression pattern and possible effects of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in fetal long bone development of mouse. **Methods:** E12.5, E13.5, E14.5, E15.5, E16.5 and E17.5 pregnant C57BL6 mice were sacrificed. After sacrifice, the embryos were delivered by caesarean section. The development of fetal long bone was dynamically observed by stereoscopic microscope, and the distributional expression of HIF-1 $\alpha$  protein was detected by using method of immunohistochemistry. The expression of HIF-1 $\alpha$  mRNA and osteoblast marker gene at various stage were also detected by using methods of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** The cartilaginous long bone began to form and joints outline arised at E13.5, then the primary ossification center was observed at E14.5, showing opaque ossification under stereoscopic microscope, and then the osteogenesis expanded and extended to both sides. Immunohistochemistry demonstrated lots of HIF-1 $\alpha$  protein positive chondrocytes in the center of primary ossification at E14.5, then they decreased dramatically. HIF-1 $\alpha$  mRNA expressed at high level from E13.5 to E15.5, and then decreased to low level. **Conclusion:** Fetal long bone development pattern appeared to be endochondral osteogenesis process, existing hypoxia microenvironment may increase HIF-1 $\alpha$  mRNA expression and thus initiate the cascade of endochondral osteogenesis.

**Key words** Hypoxia inducible factor, HIF; Osteogenesis; Mice

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(8): 599-601 www.zggszz.com

人体骨骼形成有两种方式: 膜内成骨和软骨内成骨。其中胚胎长管状骨的发育是软骨内成骨过程的典型代表, 在胚胎发育早期, 由间充质细胞形成的肢芽构成了肢体的雏形结构。软骨内成骨是脊椎动物骨发育的主要模式, 对长骨及其生长板的骨形成过程和调控机制已有较多认识<sup>[1]</sup>。在骨的发生发育过程中, 由于生理和病理因素, 组织和细胞缺氧是经常存在的, 对低氧及其主要适应性调节因子低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hy-

poxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 在骨发育中的作用只是在近年才逐渐得以认识<sup>[2]</sup>。朱勋兵等<sup>[3]</sup>发现椎体发育伴随有 HIF-1 $\alpha$  mRNA 及蛋白量的增加及其下游基因血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达, 这可能与 HIF-1 $\alpha$  激活下游基因启动椎体软骨内骨化过程有关。对长骨发育各时段中 HIF-1 $\alpha$  的表达及作用还有待深入研究。由此, 本文拟探讨 HIF-1 $\alpha$  在长骨发育过程中的时空表达特点及可能作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物与取材** 选用 8 周龄 C57BL6 小鼠 (由上海市伤骨科研究所提供)。晚 10 时以雌、雄 2:1 的比例合笼, 次日晨查

基金项目: 安徽省自然科学基金资助 (编号: 070413097)

通讯作者: 邓廉夫 E-mail: lfdeng@msn.com

见阴栓者记为胚胎孕龄 0.5 d(E 0.5)。自孕 12.5 d(E12.5)开始, 分别剖腹取得不同发育时段直至出生前 1 d(E17.5)的胎鼠。

**1.2 主要仪器与试剂** 高速冷冻离心机 (Allegra 64R Centrifuge, Beckman Coulter), DU7400 分光光度仪 (Beckman, 美国), PCR 扩增仪 (GeneAmp9600, 美国), 天能凝胶成像和分析系统 (天能公司, 上海), 解剖显微镜 (Nikon, SMZ800, 日本)。一抗为 HIF-1 $\alpha$  兔抗小鼠多克隆抗体 (ZYMED LABORATORIES 公司)。TRIZOL 核酸提取试剂盒 (Invitrogen), Taq 酶 (上海生工)。

**1.3 观测指标及方法**

**1.3.1 长骨发育过程的大体形态观察** 在立体解剖显微镜下, 解剖分离小鼠胚胎肢芽, 分离去除骨骼周围软组织, 观察肢芽长骨的软骨形成及其软骨内骨化的动态形态演变过程, 并拍照记录。

**1.3.2 HIF-1 $\alpha$  蛋白免疫组织化学检测** 包埋有小鼠胚胎肢体组织的石蜡切片, 采用 SABC 免疫组织化学方法, 检测不同发育阶段胚胎肢体组织中 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达和分布状况, 操作流程参照试剂盒使用说明。一抗为 HIF-1 $\alpha$  兔抗小鼠多克隆抗体, 工作浓度 1:100; 二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG, DAB 显色后以胞核或胞浆出现棕黄色颗粒为阳性。

**1.3.3 不同发育时段肢体长骨部位 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达** 在解剖镜下剪下不同孕龄小鼠胚胎肢芽, 解剖分离去除周围软组织, 置于冰上 Eppendorf 管中剪碎。按 TRIZOL 试剂盒说明的步骤和方法, 抽提肢体标本的总 RNA, 测定 RNA 浓度及纯度。以 GAPDH (由上海生物工程有限公司合成) 作为内参照, 采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术分别检测 HIF-1 $\alpha$  表达情况: 各取总 RNA 2  $\mu$ g, 在终体积为 20  $\mu$ l 反应条件下, 42  $^{\circ}$ C 逆转录 1 h, 72  $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 获单链 cDNA 模板; 取模板 2  $\mu$ l, 根据 GenBank 中小鼠 HIF-1 $\alpha$  基因设计上游引物 (5'-TCAAGTCAGCAACGTGGAAG-3') 和下游引物 (5'-TATCGAGGCTGTCTCGACTG-3'), 扩增产物全长 198 bp; 小鼠 OC 上游引物 (5'-gcgctctgtctctgacct-3') 和下游引物 (5'-ttgttagcggtcttcaagc-3'), 扩增产物全长 225 bp; 以小鼠 GAPDH 片段 (223 bp) 作内参照, PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下照相, 以条带大小及深浅判定 HIF-1 $\alpha$  和 OC mRNA 的水平。

**2 结果**

**2.1 长骨发育过程的形态学演变** 在 E12.5 时, 肢芽变长, 趾线开始形成, 但趾蹼间隙仍为连续性结构。E13.5 时, 前趾蹼间已有 2/3 分隔开, 足趾蹼间 1/3 也分隔开, 关节轮廓出现。E14.5 时, 见趾分开, 趾形清楚, 初级骨化中心开始发生, 在下肢长骨中心呈现不透光骨化影 (见图 1)。E15.5 见初级骨化中心仍较短, 呈暗的不透光影, 两侧为透光的软骨。E16.5 之后骨化中心向两端延伸。

**2.2 HIF-1 $\alpha$  在肢芽长骨发育中的蛋白表达** HIF-1 $\alpha$  蛋白免疫组化显示: E14.5 时肢芽长骨中心软骨内的软骨细胞开始增殖并肥大, 其胞核内见大量 HIF-1 $\alpha$  阳性黄色颗粒 (见图 2)。随着肢体初级骨化中心的扩大并向两端延伸, E16.5 时 HIF1 $\alpha$  蛋白主要表达于骨化中心边缘的胞核内, 其后仍有蛋白持续少量表达。



图 1 解剖镜下观察不同时段长骨发育过程, E14.5 时见小鼠后肢长骨内初级骨化中心出现 (x30)

Fig.1 Observation of long bone development in limb bud under stereo microscope, primary ossification center appeared in long bone of back limb at E14.5 (x30)

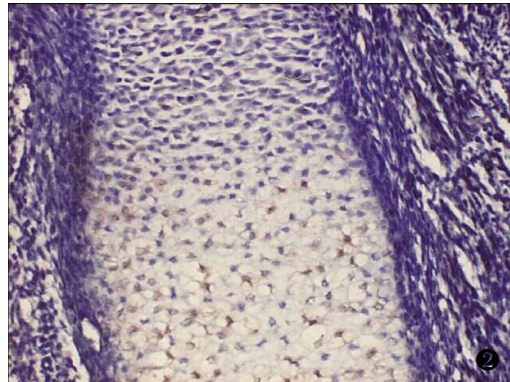


图 2 肢芽长骨内 HIF-1 $\alpha$  免疫组织化学染色检测 (DABx100): E14.5 时见软骨中心细胞核内大量黄染颗粒

Fig.2 HIF-1 $\alpha$  immunohistochemistry staining in limb bud: lots of positive chondrocyte were seen at E14.5 (DABx100)

**2.3 长骨发育过程中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达特征** 伴随肢体长骨发育过程的形态和组织学演变, 可检测到长骨组织细胞 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的表达: E12.5 时, 肢体雏形处聚集的间充质细胞开始向软骨细胞分化, 已能检测到 HIF-1 $\alpha$  的表达; E13.5 时软骨细胞增殖肥大, 部分开始凋亡, 伴随 HIF-1 $\alpha$  大量表达; E14.5 时, 肥大软骨细胞凋亡, 血管侵入, 初级骨化中心成骨开始, HIF-1 $\alpha$  仍较高表达; 自 E15.5 至出生前, 随骨化中心向两端延伸, HIF-1 $\alpha$  持续少量表达。对成骨细胞标记基因骨钙素 (OC) 表达进行 RT-PCR 测定显示 E14.5-E17.5 时有较高的 OC 表达, 提示初级骨化中心形成, 成骨逐渐增多 (见图 3)。

**3 讨论**

构成肢体的大部分骨骼是经软骨内骨化的方式发生的。间充质细胞先分化为软骨细胞, 软骨细胞中极少数终身保持软骨细胞特性, 构成关节软骨细胞, 其余部分经一系列分化演变过程, 最终成熟、肥大、凋亡, 继之血管侵入、骨基质代替软骨基质, 逐步形成成熟的骨组织<sup>[4]</sup>。对骨与关节病损的有效防治, 依赖于对产生骨与关节细胞的分子生物学行为调控机制的深刻理解。这就需要更深入细致地认识其发育过程, 深入了解影响骨骼系统形成的主要调控因素及其作用机制。

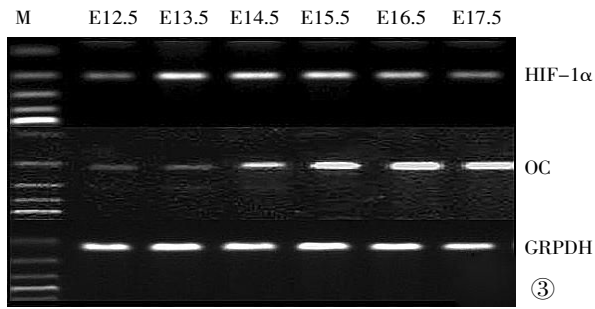


图 3 不同胎龄肢体长骨 HIF-1 $\alpha$  及 OC mRNA 表达 RT-PCR 电泳图 (GAPDH 为内参基因)

Fig.3 Detection of HIF-1 $\alpha$  and OC mRNA expression by RT-PCR in gel electrophoresis(GAPDH as internal control gene)

为大体观察小鼠肢芽长骨发育中的形态学改变,我们在解剖显微镜下分离去除肢芽周围软组织后,调节解剖显微镜的光亮度,就可以区分出透光度好的软骨及不透光显示为暗黄色的骨组织。类似于 X 线的透射原理,骨性部分密度高,透光性差,镜下呈暗黑色,因软骨具有光通透性,可容易与骨性部分区分开,可以整体地观察到胚胎肢芽成骨发育变化,结合组织切片显微观察,更有利于研究胚胎骨发育过程。本实验观察到 E12.5 时见肢芽雏形出现;E13.5 时软骨性肢芽出现, E14.5 时大体形态观察到长骨中心内很小的不透光骨化核出现,组织学观察显示软骨细胞肥大、凋亡,成骨细胞伴随血管的侵入而长入椎体初级骨化部位;其后骨化中心不断膨大,并向两端延伸,随钙盐沉积的增多,骨组织在解剖镜下颜色加深;证实长骨成骨过程是先长骨内形成初级骨化中心,进一步骨化后代替软骨的软骨内成骨过程。

在生理或病理条件下,机体局部存在低氧状态,生物进化过程通过增加细胞无氧代谢和血管形成而形成了对缺氧的适应机制,其中 HIF-1 $\alpha$  是一种主要在缺氧条件下表达的转录因子,包括 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  两个亚基,两者在形成异二聚体后发挥作用,识别低氧反应靶基因启动子上的低氧反应元件(HREs),使有关靶基因表达增高<sup>[5]</sup>。张俐等<sup>[6]</sup>的实验发现,缺血再灌注损伤时组织的缺氧会调动 HIF-1 $\alpha$  的合成与激活,丹参能改善骨骼肌缺血再灌注损伤时组织的缺氧状况,对缺血再灌注损伤起到积极的防治作用。

HIF-1 $\alpha$  在胚胎正常发育中的作用早已引起重视,近年开展的 Cre-loxP 技术通过组织特异性地敲除 HIF-1 $\alpha$  基因,保证了胚胎存活。实验证实胚胎生长板是高度缺氧的,生长板中心已检测到 HIF-1 $\alpha$  存在,特异性敲除 HIF-1 $\alpha$  后引起生长板中心软骨细胞坏死及生长板生长停滞;小鼠多在出生后数小时内死亡,生长板中心的软骨细胞出现大量凋亡,提示 HIF-1 $\alpha$  有可能是软骨细胞等无血供细胞、组织存活和增生的重要调节因子。因此,对 HIF-1 $\alpha$  及其受其调控的目的基因与软骨内

成骨的关系进行研究就有十分重要的意义。

本实验中,检测到 HIF-1 $\alpha$  mRNA 在 E13.5 时已较高表达, E14.5 时表达最高, E15.5 开始回落;骨标记基因 OC 在 E14.5 至 E17.5 时有较高的 OC 表达,提示初级骨化中心形成,成骨逐渐增多。免疫组织化学切片显示这些时段正是软骨细胞增殖、肥大,凋亡后血管侵入从而启动软骨内成骨的时期,伴有 HIF-1 $\alpha$  蛋白阳性标记细胞出现于初级骨化中心,说明肢芽软骨中心可能存在缺氧环境,低氧可导致组织细胞内的 HIF-1 $\alpha$  转录增多,为 HIF-1 $\alpha$  蛋白的翻译提供更多的 mRNA 模板,以进一步高效地激活目的基因的转录。因此,缺氧组织细胞中 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的增加也是 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达量增加的重要原因。根据这些结果推测,长骨内聚集的间充质细胞向软骨细胞分化增殖,体积不断增大,产生局部组织低氧状态,诱导 HIF-1 $\alpha$  mRNA 出现高表达及其蛋白稳定性的增加,促进肥大软骨细胞的凋亡,激活其下游基因的高表达。低氧适应性地诱导血管侵入带来了成骨细胞,激发软骨内成骨的级联效应,随着骨化的进行,血管长入增多,缺氧状态得到改善, HIF-1 $\alpha$  表达回落到正常的低水平表达。对其下游基因 VEGF 等和其表达的时空关系还需进一步实验探讨, Cramer 等<sup>[7]</sup>研究发现,生长板软骨细胞在低氧条件下通过 HIF-1 $\alpha$  合成 VEGF。HIF-1 $\alpha$  是骨髓在低氧条件下表达 VEGF 的重要前提条件,在长骨发育中有助于血管形成和侵入,抑制 HIF-1 $\alpha$  表达完全阻止了低氧诱导软骨细胞表达 VEGF。对软骨中心肥大软骨细胞凋亡及血管侵入的软骨内骨化过程是否由低氧诱发的 HIF-1 $\alpha$  表达调控及机制尚有待深入研究。

#### 参考文献

- [1] Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, 2003, 423(6937): 332-336.
- [2] 朱勋兵, 邓廉夫. 骨发育中的低氧感应及低氧诱导因子-1 的调节作用. *国外医学:骨科学分册*, 2005, 26(4): 237-239.
- [3] 朱勋兵, 邓廉夫. 低氧诱导因子-1 $\alpha$  在小鼠椎体发育中的表达及其意义. *中华医学杂志*, 2006, 86(23): 1638-1643.
- [4] Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*, 2002, 2(4): 389-406.
- [5] Bruick RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Gene Dev*, 2003, 17(21): 2614-2623.
- [6] 张俐, 鲁力, 李楠, 等. 丹参对骨骼肌缺血再灌注损伤低氧诱导因子-1 $\alpha$  mRNA 表达和血液流变学的影响. *中国骨伤*, 2007, 20(5): 298-301.
- [7] Cramer T, Schipani E, Johnson RS, et al. Expression of VEGF isoforms by epiphyseal chondrocytes during low-oxygen tension is HIF-1 $\alpha$  dependent. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(6): 433-439.

(收稿日期:2009-03-31 本文编辑:连智华)