

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.05.003

· 基础研究 ·

沉默HIF-1 α 基因对大鼠BMMSCs在牵张力作用下表达BSP和Osterix的影响

刘颖¹, 杨晶¹, 李亚祯¹, 阎潇², 张强², 任大鹏², 杨芳^{1,4}, 袁晓^{1,2}, 郭庆圆^{1,3,4}

1. 青岛大学口腔医学院, 山东 青岛(266071); 2. 青岛大学附属医院口腔正畸二科, 山东 青岛(266003); 3. 中国人民解放军总医院口腔基础医学研究所, 北京(100853); 4. 青岛市市立医院口腔科, 山东 青岛(266071)

【摘要】 目的 探究机械牵张力作用下沉默大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)的低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)基因对骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)和Osterix表达的影响,为利用BMMSCs修复骨缺损提供新的思路。方法 根据大鼠HIF-1 α 基因设计shRNA序列,PCR扩增后克隆入pGMLV-SC1RNAi慢病毒载体。转化感受态细胞筛选阳性克隆并测序鉴定后,由293T细胞进行包装和滴度测定。转染体外培养的大鼠BMMSCs,倒置荧光显微镜观察荧光,筛选稳定沉默HIF-1 α 的细胞株。RNA干扰回复实验分为空白对照组、HIF-1 α shRNA基因沉默组、阴性对照组、回复组4组,Western blot检测4组HIF-1 α 蛋白表达情况,以验证靶基因的回复效果,排除脱靶效应;使用FlexcellFX-5000T细胞应力加载系统对细胞进行机械牵张力干预,分为空白对照组、HIF-1 α shRNA基因沉默组、阴性对照组,qRT-PCR和Western blot检测各组BSP和Osterix的mRNA和蛋白表达水平。结果 HIF-1 α shRNA慢病毒干扰载体构建成功, RNA干扰回复实验结果显示,回复组与空白细胞组HIF-1 α 蛋白表达量差异无统计学意义($P > 0.05$),重组慢病毒能有效沉默BMMSCs中HIF-1 α 。机械牵张力作用BMMSCs后,相对于空白对照组和阴性对照组,HIF-1 α shRNA基因沉默组成骨相关因子BSP和Osterix的mRNA、蛋白表达均增强,差异具有统计学意义($P < 0.05$);空白对照组与阴性对照组间BSP和Osterix的mRNA和蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 机械牵张力作用下沉默BMMSCs中的HIF-1 α 可促进BSP和Osterix的表达。

【关键词】 低氧诱导因子-1 α ; 慢病毒载体; 基因沉默; 骨髓间充质干细胞; 机械牵张力; 骨涎蛋白; Osterix

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)05-0287-06

【引用著录格式】 刘颖, 杨晶, 李亚祯, 等. 沉默HIF-1 α 基因对大鼠BMMSCs在牵张力作用下表达BSP和Osterix的影响[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(5): 287-292.

Effects of silencing the HIF-1 α gene on the expression of BSP and osterix in rat BMMSCs under tension

LIU Ying¹, YANG Jing¹, LI Yazhen¹, YAN Xiao², ZHANG Qiang², REN Dapeng², YANG Fang^{1,4}, YUAN Xiao^{1,2}, GUO Qingyuan^{1,3,4}. 1. Stomatology College of Qingdao University, Qingdao 266071, China; 2. No.2 Department of Orthodontics, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China; 3. Institute of Stomatology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 4. Department of Stomatology, The Affiliated Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, China

Corresponding author: GUO Qingyuan, Email: guoqingyuanqd@163.com, Tel: 0086-17685506690

【Abstract】 Objective To explore the effect of hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) gene silencing in rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) under mechanical distraction on the expression of bone sialoprotein (BSP) and osterix and to provide a new idea for repairing bone defects with BMMSCs. **Methods** The shRNA sequence was de-

【收稿日期】 2018-10-19; **【修回日期】** 2018-11-06

【基金项目】 国家自然科学基金项目(11602122); 中国博士后科学基金项目(2017M623396); 青岛市市立医院(集团)博士科研启动基金项目(博201631)

【作者简介】 刘颖, 医师, 硕士研究生在读, Email: 1107549819@qq.com

【通信作者】 郭庆圆, 讲师, 博士, Email: guoqingyuanqd@163.com, Tel: 0086-17685506690

signed according to the rat HIF-1 α gene, and the pGMLV-SC1RNAi lentiviral vector was cloned after PCR amplification. After screening positive clones and identifying competent transformed cells by sequencing, 293T cells were packaged and titered, rat BMMSCs were transfected and cultured *in vitro*. Clones with stably silenced HIF-1 α expression were screened by inverted fluorescence microscopy. The RNAi response experiment was divided into four groups: the blank control group, the HIF-1 α shRNA group, the negative control group, and the response group. Western blot was used to detect the expression of HIF-1 α protein in the four groups to verify the response of the target genes and exclude off-target effects. A Flexcell FX-5000T cell stress loading system was used to intervene in the mechanical stretch of the cells. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of BSP and osterix in the blank control group, HIF-1 α shRNA group, and negative control group. **Results** The HIF-1 α shRNA lentiviral vector was successfully constructed. The results of the RNAi response showed no significant difference in the expression of HIF-1 α between the response and the blank control group ($P > 0.05$). The recombinant lentivirus could effectively silence HIF-1 α in BMMSCs. After mechanical distraction of the BMMSCs, compared with the blank and negative control groups, the HIF-1 α shRNA group showed significantly increased mRNA and protein expression of the bone-related factors BSP and osterix ($P < 0.05$); there was no significant difference in the mRNA and protein expression of BSP or osterix between the blank and negative control groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Silencing HIF-1 α in BMMSCs under mechanical distraction can promote the expression of BSP and osterix.

【Key words】 Hypoxia-inducible factor-1 α ; Lentivirus vector; Gene silencing; Bone marrow mesenchymal stem cells; Mechanical stretch; Bone sialoprotein; Osterix

在正畸治疗牙槽骨改建中,成骨细胞被认为是张力侧骨再生的关键因素,成骨细胞及其前体细胞起源于多能的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)。最近研究表明,骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)在成骨晚期开始表达,可刺激成骨细胞增殖,并促进其分化为骨细胞^[1]。低氧环境下培养大鼠颅骨骨膜细胞,低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的表达明显增强,随着HIF-1 α 表达增加BSP的表达也显著升高,骨膜细胞的成骨能力活化^[2]。低氧环境激活HIF-1 α ,使成骨细胞的成骨能力明显增强,其机制可能是HIF-1 α 通过BMP-2诱导Runx2和Osterix的合成^[3]。研究证明,非炎症环境中的机械拉伸促进人颌骨BMMSCs的成骨^[4]。在正畸过程中,矫治力刺激BMMSCs分化,最终引起牙槽骨改建、牙齿移动。但是,在这个过程中,HIF-1 α 在调节BMMSCs向成骨细胞分化的作用机理尚不明确。本实验通过构建沉默表达HIF-1 α 基因的慢病毒载体,转染大鼠BMMSCs并获得稳定株,研究机械牵张力作用下以shRNA沉默大鼠BMMSCs中的HIF-1 α 基因后对成骨相关因子BSP和Osterix表达的影响,为利用BMMSCs修复骨缺损提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和材料

FX-5000T 细胞应力加载系统、BioFlex 柔性细

胞六孔加力板(Flexcell,美国),定量PCR仪(ABI StepOne,美国),荧光显微镜(Olympus,日本),恒温CO₂细胞培养箱(Heraeus,德国),水平电泳槽、PAC-300型电泳仪(BIO-RAD,美国)。

pGMLV-SC1 RNAi 慢病毒载体(载体结构:CMV-eGFP-U6-MCS-PGK-Puromycin)、嘌呤霉素(puromycin, PM)(上海吉满生物科技有限公司),HIF-1 α 过表达质粒(pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-HIF1 α)(由上海交通大学邹多宏博士惠赠),病毒包装细胞系293T(山东省口腔生物医学重点实验室),大肠杆菌菌株DH5 α (北京全式金生物技术有限公司),质粒抽提试剂盒(Qiagen,德国),HG transgene reagent(Healthgenebio,美国),TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒(离心柱型)(天根生化科技有限公司),Thermo Scientific FastDigestXba I、BamH I、Xho I、EcoR I(Thermo,美国),T4 DNA 连接酶(Fermentas,美国),胎牛血清、DMEM(Gibico,美国),HIF-1 α 、BSP、Osterix一抗(Abcam,美国),PrimeScript[®]RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time)、SYBR[®]Premix Ex Taq[™](TliR-NaseH Plus)(Takara,日本)。

1.2 HIF-1 α shRNA 慢病毒载体的构建

针对大鼠HIF-1 α (NM_024359)的基因序列设计RNA干扰靶点(GCAGACCCAGTTACAGAAACC),根据干扰靶点序列信息设计合成shRNA引物、PCR扩增序列片段。HIF-1 α shRNA序列信息和阴性对

照(HIF-1 α Negative Control, HIF-1 α NC)序列信息如表1所示。合成的引物退火形成双链DNAoligo,使用BamH I (GGATTC)、EcoR I (GAATTC)进行双酶切处理,琼脂糖电泳回收。回收产物用T4

DNA连接酶连接到经BamH I、EcoR I酶切后的pGMLV-SC1 RNAi慢病毒载体上。连接产物转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,挑选阳性克隆测序鉴定后进行摇菌培养,提取阳性克隆质粒备用。

表1 HIF-1 α shRNA及阴性对照(HIF-1 α NC)序列信息
Table 1 Nucleotide sequences of HIF-1 α shRNA and HIF-1 α NC

引物	序列(5'→3')
shRNA-F	5'-GATCCGACACCCAGTTACAGAAACCTTCAAGAGAGGTTTCTGTAAGTGGTCTGCTTTTTTG-3'
shRNA-R	5'-AATTCAAAAAAGCAGACCCAGTTACAGAAACCTCTCTTGAAGGTTTCTGTAAGTGGTCTGCG-3'
NC-F	5'-GATCCGTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAACTTTTTACCGGTG-3'
NC-R	5'-AATTCACCGTAAAAAAGTTCTCCGAACGTGTCACGTTCTTGAACGTGACACGTTCCGAGAACG-3'

1.3 重组质粒的包装和滴度测定

将构建的HIF-1 α shRNA慢病毒载体和包装质粒共转染进293T细胞,经促转染、换液、培养等处理后,收集细胞上清液,进一步离心获得病毒浓缩液。使用有限稀释法稀释病毒浓缩液,用不同浓度梯度感染HEK 293T细胞,荧光显微镜下观察各孔荧光细胞数量,结合稀释倍数计算病毒滴度。

1.4 HIF-1 α 基因沉默稳定株的构建

取生长状态好、处于对数生长期的P3代BMMSCs接种于培养皿中,分为HIF-1 α 基因沉默组(shRNA)和阴性对照组(NC)。用含有5 μ g/mL Polybrene的新鲜培养基以感染复数(multiplicity of infection, MOI)值=100稀释病毒原液,慢病毒阴性对照稀释液加到阴性对照组细胞中,HIF-1 α shRNA慢病毒液稀释液加到HIF-1 α 基因沉默组中,在感染24 h后将含有慢病毒的培养液更换成正常培养液。倒置荧光显微镜观察荧光,估算慢病毒感染目的细胞的效率。48 h后用含最优浓度嘌呤霉素(puromycin, PM)的培养基筛选稳定细胞株。阳性克隆扩大培养,一部分保种,一部分收集细胞样品进行Western blot检测,在蛋白水平鉴定HIF-1 α 基因沉默效果。

1.5 RNA干扰回复实验

用以说明本研究所获得的实验结果,不是由于Off-target效应产生的,而是真正的沉默了BMMSCs的HIF-1 α 基因。

应用Lipofectamine 2000向沉默表达HIF-1 α 的大鼠BMMSCs稳定株再次转染pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP-HIF-1 α 过表达质粒(回复组),造成目的基因的过表达,再通过Western blot检测空白对照组(WT)、HIF-1 α 基因沉默组(shRNA)、阴性对照组(NC)、回复组(Reverse)4组HIF-1 α 蛋白表达情况,

以验证靶基因的回复效果。

1.6 机械牵张力作用下BMMSCs成骨相关基因的表达

将目的细胞分为空白对照组(WT)、HIF-1 α 基因沉默组(shRNA)、阴性对照组(NC)。以 2×10^5 个/mL的细胞密度将P3代BMMSCs接种于I型鼠尾胶原包被的BioFlex柔性六孔培养板。细胞融合达到80%~90%后,使用FX-5000T细胞应力加载系统对各组细胞施加频率为1 Hz,拉伸幅度5%,持续时间6 h的机械牵张力(该加力条件为前期实验筛选出的最适力值)。在加力结束后立即收集细胞,Western blot、qRT-PCR分别检测HIF-1 α 及成骨相关基因BSP和Osterix的蛋白表达及mRNA相对表达量,引物信息见表2。

表2 qRT-PCR引物序列
Table 2 Nucleotide sequences of the primers used for qRT-PCR

引物	序列(5'→3')	片段大小(bp)
BSP-F	5'-ATGGAGACGGCGATAGTTCC-3'	148
BSP-R	5'-CTAGCTGTTACACCCGAGAGT-3'	148
Osterix-F	5'-ACCCCAAGATGTCTATAAGCCC-3'	168
Osterix-R	5'-CGCTCTAGCTCCTGACAGTTG-3'	168
GAPDH-F	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3'	123
GAPDH-R	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	123

1.7 统计学分析

采用SPSS17.0软件进行数据分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单因素方差分析进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

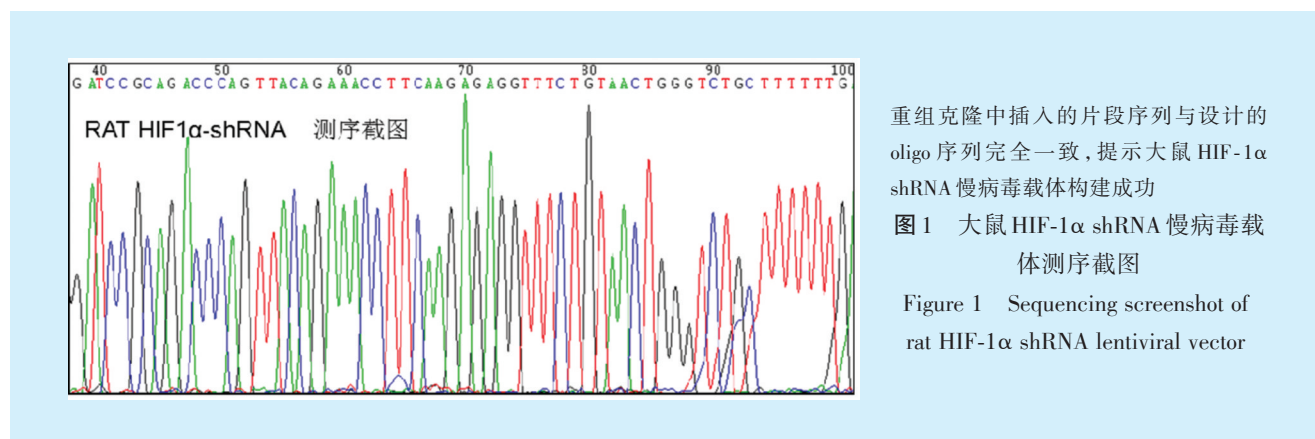
2 结果

2.1 HIF-1 α shRNA慢病毒载体的测序结果

HIF-1 α shRNA慢病毒载体的测序截图见图1。

经过比对,重组克隆中插入的片段序列与设计的 oligo 序列完全一致,因此大鼠 HIF-1 α shRNA 慢病

毒载体构建成功。



重组克隆中插入的片段序列与设计的 oligo 序列完全一致,提示大鼠 HIF-1 α shRNA 慢病毒载体构建成功

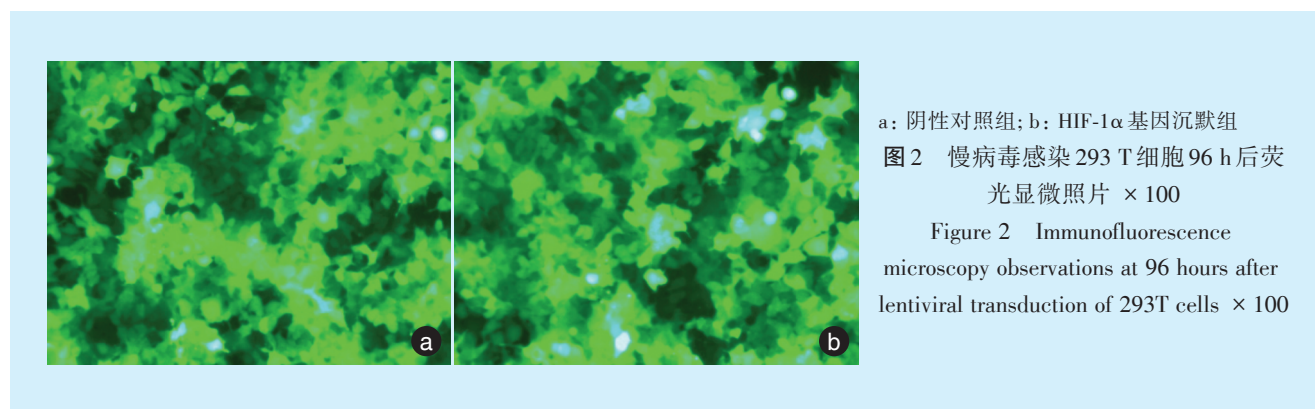
图1 大鼠 HIF-1 α shRNA 慢病毒载体测序截图

Figure 1 Sequencing screenshot of rat HIF-1 α shRNA lentiviral vector

2.2 慢病毒原液滴度测定结果

慢病毒感染在 293T 细胞中包装 96 h 后通过倒置荧光显微镜观察,所见如图 2。HIF-1 α shRNA 重

组慢病毒的滴度为 5×10^9 TU/mL,阴性对照慢病毒 HIF-1 α NC 的滴度为 5×10^9 TU/mL。



a: 阴性对照组; b: HIF-1 α 基因沉默组

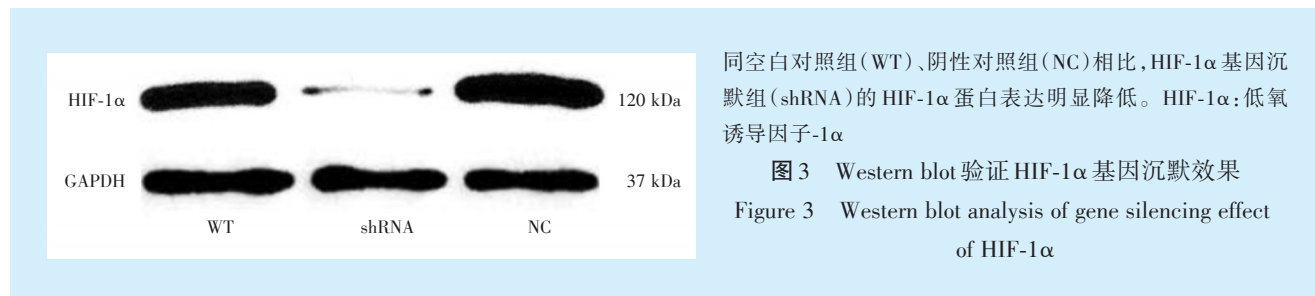
图2 慢病毒感染 293 T 细胞 96 h 后荧光显微照片 $\times 100$

Figure 2 Immunofluorescence microscopy observations at 96 hours after lentiviral transduction of 293T cells $\times 100$

2.3 HIF-1 α 沉默效果

Western blot 检测空白对照组 (WT)、HIF-1 α 基因沉默组 (shRNA)、阴性对照组 (NC) 中 HIF-1 α 的蛋白表达见图 3。结果显示感染 HIF-1 α shRNA 重

组慢病毒后, BMMSCs 的 HIF-1 α 表达受到明显抑制,而阴性对照组 HIF-1 α 的表达未受到影响,提示成功构建了有效沉默 HIF-1 α shRNA 的稳定细胞株。



同空白对照组 (WT)、阴性对照组 (NC) 相比, HIF-1 α 基因沉默组 (shRNA) 的 HIF-1 α 蛋白表达明显降低。HIF-1 α : 低氧诱导因子-1 α

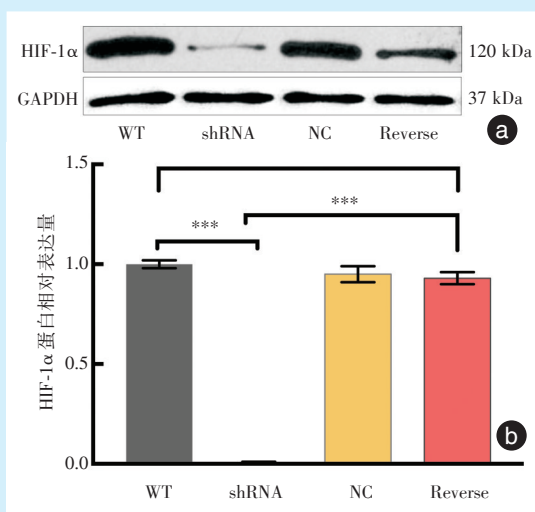
图3 Western blot 验证 HIF-1 α 基因沉默效果

Figure 3 Western blot analysis of gene silencing effect of HIF-1 α

2.4 Western blot 方法检测 HIF-1 α shRNA 慢病毒载体对目的细胞靶基因沉默的脱靶效应

回复组 HIF-1 α 与空白对照组蛋白表达量差异

无统计学意义,表明本实验所获得的结果,不是由于 Off-target 效应产生的,而是沉默了靶细胞上的靶基因的表达(图 4)。



Western blot 检测 HIF-1 α 蛋白表达情况(a), 并进行灰度值分析(b)。4组 HIF-1 α 蛋白表达差异具有统计学意义 ($F = 862.0, P < 0.05$)。回复组(Reverse)与空白对照组(WT)相比, HIF-1 α 的蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。***为 $P < 0.001$ 。HIF-1 α : 低氧诱导因子-1 α

图4 Western blot 验证 shRNA 脱靶效应

Figure 4 Western blot analysis of off-target effects of shRNA

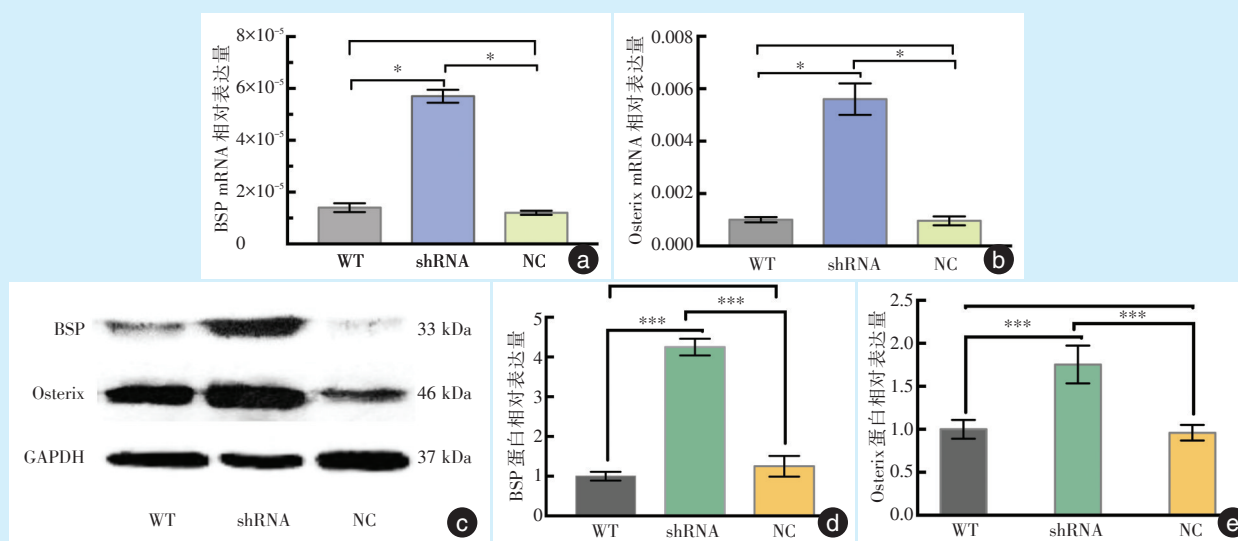
2.5 机械牵张力作用下大鼠BMMSCs成骨分化

qRT-PCR 结果显示空白对照组受力后有 Osterix 的 mRNA 表达, 有少量 BSP 的 mRNA 表达; 相较空白对照组和阴性对照组, HIF-1 α 基因沉默组 BSP 和 Osterix 的 mRNA 表达均有明显增强 ($P < 0.05$); 但相较空白对照组, 阴性对照组成骨相关基因的 mRNA 表达变化不明显(图 5a、图 5b)。Western blot 检测结果显示: 相较空白对照组和阴性对照组, HIF-1 α 基因沉默组 BSP、Osterix 的蛋白表达增强; 但空白对照组和阴性对照组间成骨相关基因的蛋白表达变化不明显(图 5c ~ 5e)。

3 讨论

临床上, 正畸矫治力作用于牙齿引起牙周组织微循环变化, 血流减少造成局部组织缺氧。缺氧微环境促使细胞分泌多种活性因子, 调节机体产生适应性反应。

研究表明, 在机体适应缺氧环境的过程中, HIF-1 α 发挥着关键作用^[5]。正畸矫治力作用于牙齿引起 BMMSCs 分化为成骨细胞、破骨细胞、成纤维细胞等, 造成牙槽骨改建^[6]。在这个过程中,



a 和 b: 4组 BSP ($F = 594.8$)、Osterix ($F = 160.5$) mRNA 相对表达量的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。相较空白对照组(WT)和阴性对照组(NC), HIF-1 α 基因沉默组(shRNA) BSP 和 Osterix 的 mRNA 表达均有明显增强 ($P < 0.05$); 阴性对照组与空白对照组以上成骨相关基因 mRNA 的表达差异无统计学意义。c ~ e: 4组 BSP ($F = 237.8$)、Osterix ($F = 126.5$) 蛋白表达差异具有统计学意义。相较空白对照组和阴性对照组, HIF-1 α 基因沉默组 BSP 和 Osterix 的蛋白表达均增强, $P < 0.001$; 阴性对照组(NC)与空白对照组以上成骨相关基因的蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。*为 $P < 0.05$, ***为 $P < 0.001$

图5 机械牵张力作用下各组大鼠BMMSCs成骨相关基因的mRNA和蛋白水平表达变化

Figure 5 mRNA and protein expression of osteogenic related genes in rat BMMSCs of 3 groups under mechanical tension

BMMSCs通过多向分化维持组织平衡、修复损伤,在骨改建中处于“中心调控地位”。

目前有部分实验显示,通过低氧诱导因子脯氨酰羟化酶(hypoxia inducible factor proline hydroxylase, HIF-PH)抑制剂植入、基因干预、中医药干预等方式激活HIF-1 α 通路促进骨修复^[7],另有体外实验表明,通过抑制希佩尔-林道病肿瘤抑制蛋白(protein von Hippel-Lindau, pVHL)造成的HIFs过表达不会影响成骨细胞的功能^[8]。还有研究报道低氧通过TWIST调节成骨主控基因Runx2的表达而抑制人间充质干细胞的成骨分化^[9]。综合上述文献发现,HIF-1 α 可以参与调节BMMSCs的成骨分化过程,但它在该过程中的作用尚存在争议,其作用机制也未明确。

机械负荷在骨重塑中起重要作用,合适的机械刺激可以维持正常的骨量^[10]。在正畸过程中,牙齿受到温和持续的机械力后,牙槽骨中的BMMSCs收到生物力学信息的刺激分化为成骨细胞,参与牙槽骨改建^[11]。本课题组前期实验动物实验发现,在正畸牙移动过程中,牙周组织中HIF-1 α 的表达增强,确定了HIF-1 α 参与了大鼠牙移动过程中牙周组织的改建。HIF-1 α 参与调控了多种基因的表达,在这些基因的启动子、增强子或其他调控区均含有HIF-1 α 的特异结合序列。低氧环境下培养大鼠颅骨骨膜细胞可以激活HIF-1 α ,随着HIF-1 α 活化BSP的表达显著升高,骨膜细胞的成骨能力增强^[2]。HIF-1 α 作为BSP的上游基因调控成骨后期的BSP表达。在低强度激光作用于体外培养的成骨细胞时,HIF-1 α 表达增加可明显增强成骨细胞的成骨能力,其机制可能是HIF-1 α 通过活化BMP-2诱导Runx2和Osterix的蛋白合成^[3]。

本实验通过shRNA干扰技术方法,成功构建了大鼠HIF-1 α 慢病毒载体,从基因水平抑制HIF-1 α 在细胞内的表达。HIF-1 α shRNA重组慢病毒载体转染体外培养大鼠的BMMSCs获得稳定株。通过qRT-PCR和Western blot检测机械牵张力作用下沉默BMMSCs中的HIF-1 α 基因对成骨相关因子BSP和Osterix表达的影响,结果显示大鼠

BMMSCs沉默表达HIF-1 α 后,机械牵张力促进了BSP和Osterix的表达,提示HIF-1 α 可能对张应力诱导的BMMSCs成骨分化起一定的抑制作用。本实验为后续进一步研究HIF-1 α 影响成骨分化的机制奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Hu N, Feng C, Jiang Y, et al. Regulative effect of Mir-205 on osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells (BMMSCs): possible role of SATB2/Runx2 and ERK/MAPK pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 10491-10506.
- [2] Ichijima T, Matsuzaka K, Tonogi M, et al. Osteogenic differences in cultured rat periosteal cells under hypoxic and normal conditions[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 3(2): 165-170.
- [3] Heo JH, Choi JH, Kim IR, et al. Combined treatment with low-level laser and rhBMP-2 promotes differentiation and mineralization of osteoblastic cells under hypoxic stress[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2018, 5(6): 793-801.
- [4] Chen XY, Liu Y, Ding WH, et al. Mechanical stretch-induced osteogenic differentiation of human jaw bone marrow mesenchymal stem cells (hJBMMSCs) via inhibition of the NF-kappa B pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 207.
- [5] Yao Q, Liu Y, Selvaratnam B, et al. Mesoporous silicate nanoparticles/3D nanofibrous scaffold-mediated dual-drug delivery for bone tissue engineering[J]. *J Control Release*, 2018, 279: 69-78.
- [6] Will LA. Orthodontic tooth movement: a historic prospective[J]. *Front Oral Biol*, 2016, 18: 46-55.
- [7] 邓正炜, 张亚东, 赵世昌. 组织工程骨激活低氧诱导因子HIF-1 α 促进骨修复[J]. *实用骨科杂志*, 2018, 24(10): 917-921.
- [8] Wang Y, Wan C, Deng L, et al. The hypoxia-inducible factor α pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development[J]. *J Clin Investig*, 2007, 117(6): 1616-1626.
- [9] Yang DC, Yang MH, Tsai CC, et al. Hypoxia inhibits osteogenesis in human mesenchymal stem cells through direct regulation of RUNX2 by TWIST[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e23965.
- [10] Carroll SF, Buckley CT, Kelly DJ. Cyclic tensile strain can play a role in directing both intramembranous and endochondral ossification of mesenchymal stem cells[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2017, 5: 73.
- [11] Boink MA, Van Den Broek LJ, Roffel SA, et al. Different wound healing properties of dermis, adipose, and gingiva mesenchymal stromal cells[J]. *Wound Repair Regen*, 2016, 24(1): 100-109.

(编辑 张琳, 曾曙光)