

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.202550038

· 基础研究 ·

促进 Hedgehog 信号通路对 I 型糖尿病小鼠颅骨缺损愈合的影响

吴英彰, 刘立楠, 刘士博, 胡沛, 罗恩

口腔疾病防治全国重点实验室 国家口腔医学中心 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院正颌及关节外科, 四川 成都(610044)

【摘要】 目的 通过研究 Hedgehog(Hh)信号通路在 I 型糖尿病导致的颅骨缺损愈合受损中的作用,揭示 I 型糖尿病骨愈合能力下降的机制。方法 本研究已获医院实验动物伦理委员会批准。利用自发型 I 型糖尿病 Akita 转基因小鼠建立颅骨缺损模型,通过显微 CT(micro CT)扫描分析骨体积分数和骨密度,免疫组化染色定量分析骨钙蛋白(osteocalcin, Ocn)、印猪因子(Indian Hedgehog, Ihh)、补丁蛋白 1(Patched 1, Ptch1)以及 GLI 家族锌指蛋白 1(Zinc finger protein GLI1, Gli1)的表达,探讨 I 型糖尿病对颅骨缺损愈合中成骨分化和 Hh 信号通路的影响。使用 Smo 受体激动剂(Smoothed agonist, SAG)(10 mg/kg, 灌胃)激活 Hh 信号通路,观察其是否通过促进成骨分化改善 I 型糖尿病颅骨缺损愈合,检测方法为 MicroCT 和免疫组化染色。最后,通过细胞实验探究 SAG(1 000 nmol/L)是否能改善高糖环境(25 mol/L)对小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化的抑制,检测方法包括碱性磷酸酶和茜素红染色,以及对成骨分化相关基因 Alp、Spp1、Bglap 及 Sp7 进行实时荧光定量检测(quantitative Real-time PCR, qPCR)。结果 Akita 小鼠表现出早期、稳定且显著的自发性 I 型糖尿病特征。颅骨缺损造模后 21 d, Akita 小鼠颅骨缺损区域新形成的骨体积分数、体积骨密度及 Ocn 表达显著降低($P < 0.05$), Ihh、Ptch1 和 Gli1 表达也显著降低($P < 0.05$)。SAG 激活 Hh 信号通路可显著改善 I 型糖尿病对 Akita 小鼠颅骨缺损愈合的负面影响($P < 0.05$)。此外, SAG 处理后,高糖环境对 BMSCs 的碱性磷酸酶活性及体外矿化能力的抑制作用显著降低($P < 0.05$),成骨分化相关基因表达水平也显著提高($P < 0.05$)。结论 I 型糖尿病通过抑制 Akita 小鼠的 Hh 信号通路表达抑制颅骨缺损愈合,而激活 Hh 信号通路可促进成骨并改善 I 型糖尿病对骨愈合的抑制。

【关键词】 I 型糖尿病; 高糖环境; Akita 转基因小鼠; 颅骨缺损; Hedgehog 信号通路; Smo 受体激动剂; 骨钙蛋白; 成骨分化

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2025)07-0542-12

【引用著录格式】 吴英彰,刘立楠,刘士博,等. 促进 Hedgehog 信号通路对 I 型糖尿病小鼠颅骨缺损愈合的影响[J]. 口腔疾病防治, 2025, 33(7): 542-553. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.202550038.

Influence of Hedgehog signaling pathway activation on calvarial defect healing in type I diabetic mice WU Yingzhang, LIU Linan, LIU Shibo, HU Pei, LUO En. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Department of Orthognathic and TMJ Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Corresponding author: HU Pei, Email: hp2572@163.com; LUO En, Email: luo521125@sina.com

【Abstract】 Objective This study aimed to elucidate the mechanisms underlying the impaired bone healing capacity in type 1 diabetes (T1DM) by investigating the role of the Hedgehog (Hh) signaling pathway in the impaired healing of cranial defects caused by T1DM. **Methods** This study was approved by the experimental animal ethics committee



微信公众号

【收稿日期】 2025-02-01; **【修回日期】** 2025-03-31

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(82370932); 国家自然科学基金青年科学项目(82001018); 四川省科技厅重点研发项目(2024YFFK0204)

【作者简介】 吴英彰, 医师, 硕士研究生在读, Email: 2240483467@qq.com

【通信作者】 胡沛, 主治医师, 博士, Email: hp2572@163.com; 共同通信作者: 罗恩, 主任医师, 博士, Email: luo521125@sina.com

of our hospital. A cranial defect model was established using Akita transgenic mice with spontaneous type I diabetes. The impact of T1DM on osteogenic differentiation and the Hh signaling pathway during cranial defect healing was explored by MicroCT scanning and immunohistochemical (IHC) analysis of osteocalcin (Ocn), Indian Hedgehog (Ihh), Patched1 (Ptch1), and zinc finger protein GLI1 (Gli1). Subsequently, the Hh signaling pathway was activated using smoothened agonist (SAG) (10 mg/kg, gavage), and its potential to improve cranial defect healing in T1DM was assessed by MicroCT and IHC staining. Finally, the ability of SAG (1 000 nmol/L) to counteract the inhibitory effects of a high-glucose environment (25 mol/L) on osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) was investigated through *in vitro* experiments. Detection methods included Alkaline Phosphatase and Alizarin Red staining, as well as quantitative real-time PCR (qPCR) analysis of the osteogenesis-related genes *Alp*, *Spp1*, *Bglap*, and *Sp7*.

Results Akita mice exhibited early, stable, and significant spontaneous T1DM characteristics. On postoperative day 21, the newly formed bone in the cranial defect area of Akita mice showed significant decreases in the bone volume-to-tissue volume ratio, volumetric bone mineral density, and Ocn expression ($P < 0.05$), with significant downregulation of *Ihh*, *Ptch1*, and *Gli1* ($P < 0.05$). Activation of the Hh signaling pathway by SAG significantly mitigated the negative impact of T1DM on cranial defect healing in Akita mice ($P < 0.05$). Moreover, after SAG treatment, the inhibitory effects of the high-glucose environment on the alkaline phosphatase activity and *in vitro* mineralization capacity of BMSCs were significantly alleviated ($P < 0.05$), and the expression levels of osteogenic differentiation-related genes were significantly upregulated ($P < 0.05$). **Conclusion** T1DM inhibits cranial defect healing in Akita mice by suppressing the expression of the Hh signaling pathway, whereas activation of the Hh signaling pathway promotes osteogenesis and ameliorates the inhibitory effects of T1DM on bone healing.

【Key words】 type I diabetes; high-glucose environment; Akita mouse model; cranial defects; Hedgehog signaling pathway; Smoothened agonist; osteocalcin; osteogenic differentiation

J Prev Treat Stomatol Dis, 2025, 33(7): 542-553.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from National Natural Science Foundation of China (No. 82370932); National Natural Science Foundation of China (No. 82001018); Key Research and Development Project of Science and Technology Department of Sichuan Province (No. 2024YFFK0204).

I型糖尿病,又名胰岛素依赖型糖尿病(type 1 diabetes, T1DM),是以胰岛素缺乏及严重的高血糖水平为代表特征的糖尿病^[1]。I型糖尿病占有糖尿病病例的5%~10%,其一般于儿童和青壮年开始发病,据统计,每年大约有8万名儿童患上I型糖尿病^[2]。I型糖尿病的病因目前仍不明确,但其发病的共同病理机制是免疫系统对胰岛 β 细胞的破坏^[3-4]。

I型糖尿病会导致患者骨愈合过程的损害和延迟,影响骨手术的预后。目前研究主要关注于糖尿病对骨表型及骨愈合的影响。从病理学上来说,相比于在骨密度改变上仍存在争议的II型糖尿病,I型糖尿病已明确与骨质流失和成骨抑制有关,所以I型糖尿病是了解胰岛素分泌相关信号通路、高血糖和代谢异常等糖尿病因素对骨的调节作用更直观的系统^[5-7]。

I型糖尿病会导致患者骨愈合过程的损害和延迟,影响颅颌面骨手术的预后,其并发症包括延迟

愈合、不愈合、再脱位或假关节等^[8]。胰岛素不足、高血糖和氧化应激等因素均会影响糖尿病骨愈合,但现今I型糖尿病如何引起骨病理学变化的机制尚不清楚^[9]。

因此,探索I型糖尿病骨愈合能力下降的原因,寻找改善骨愈合能力的方法,将对未来提升糖尿病患者骨手术的成功率及降低手术并发症提供有效的依据。

Hedgehog(Hh)信号通路是调控细胞分化的重要信号通路,其对骨缺损修复有着至关重要的作用^[10]。总结近年的相关研究结果表明,Hh信号通路在膜内成骨及软骨内成骨过程中通过调节成骨分化来促进成骨,在早期骨生长发育的调节中发挥重大作用^[11-12]。

目前I型糖尿病与Hh信号通路相关的研究极少,但几乎所有的证据都指向I型糖尿病及其并发症可能抑制了Hh信号通路的表达^[7]。

本研究通过使用自发型I型糖尿病模型——

Akita (Ins2^{+/-}) 转基因小鼠及其同窝对照组野生型小鼠 (Wildtype, WT) 建立颅骨缺损模型, 探究在颅骨缺损愈合过程中 I 型糖尿病对 Hh 信号通路的表达的影响, 然后使用 Hh 信号通路激动剂 SAG 探究促进 Hh 信号通路表达能否改善 I 型糖尿病小鼠骨缺损愈合, 最后从体外细胞学角度进行验证。

本研究通过探究 Hh 通路在 I 型糖尿病导致的骨缺损愈合受损中发挥的作用, 阐明 I 型糖尿病骨愈合能力下降的机制, 进而找到增强 I 型糖尿病患者骨愈合能力的新方向。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

作为实验繁育鼠的雄性 Ins2^{+/-} (Akita, No.003548, Jackson Laboratory, 美国) 小鼠与雌性 C57Bl/6J (Wildtype, No.000664, Jackson Laboratory, 美国) 小鼠由 Jackson Laboratory 购买获得。

材料与试剂: 微量离心管 (615001, NEST 生物耗材, 中国), 小鼠胰岛素 (INS) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (E-EL-M1382, Elabscience, 中国), 异氟烷 (R510-22-10, 瑞沃德, 中国), 4% PFA 固定液 (BL539A, 白鲨, 中国), 15 mL 离心管 (601052, NEST 生物耗材, 中国), 50 mL 离心管 (602052, NEST 生物耗材, 中国), 15% EDTA 脱钙液 (G1105-500ML 塞维尔, 中国), PBS 缓冲液 (C10010500BT, Gibco, 美国), 二甲苯 (247642, Sigma, 美国), 改良苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒 (G1121, Solarbio, 中国), 印猬因子 (Indian Hedgehog, Ihh) 抗体 (ER65400, 兔抗鼠, 华安生物, 中国), GLI 家族锌指蛋白 1 (Zinc finger protein GLI1, Gli1) 抗体 (ET1702-85, 兔抗鼠, 华安生物, 中国), 补丁蛋白 1 (Patched1, Ptch1) 抗体 (ER64526, 兔抗鼠, 华安生物, 中国), 骨钙素 (osteocalcin, Ocn) 抗体 (ER1919-20, 兔抗鼠, 华安生物, 中国), 细胞培养皿 (704001, NEST 生物耗材, 中国), MEM Alpha 培养基 (C12571500BT, Gibco, 美国), 胎牛血清 (11011-8611, 四季青, 中国), 维生素 C (A8101, 索莱宝, 中国), β 甘油磷酸钠 (G8100, 索莱宝, 中国), 茜素红 S 染色液 (1%, pH4.2) (G1452, 索莱宝, 中国), BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒 (C3206, 碧云天, 中国), Trizol (15596-026, 赛默飞, 美国), SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒 (AG11733, 艾科瑞生物, 中国), Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒 (AG11728, 艾科瑞生物, 中国), 血糖仪 (鱼跃

660, 鱼跃公司, 中国), 平滑激动剂 (Smoothened Agonist, SAG) (HY-12848MCE, 中国), 吐温 80 (HY-Y1891, MCE, 中国), 盐酸利多卡因注射液 (H14024045, 石药公司, 中国)。

仪器: 离心机 (LEGENDMICRO17R, ThermoScientific, 美国); 超微量分光光度计 (NanoPhotometerN60, Implen, 德国); 研磨仪 (KZ-II, Servicebio, 中国); 实时荧光定量 PCR 仪 (QuantStudio7Flex, ThermoScientific, 美国); 多光谱扫描系统 (VS200, Olympus, 日本); PCR 热循环仪 (MastercyclerNexus, Eppendorf, 德国); 血糖仪及其配套试纸 (鱼跃 660, 鱼跃, 中国); Micro-CT 系统 (μ CT50, ScancoMedical, 瑞士); 电子天平 (TXB622L, Shimadzu, 日本); 组织脱水机 (ASP300S, LEICA, 德国); 石蜡包埋机 (HistoCoreArcadiaH, LEICA, 德国); 石蜡切片机 (HistoCoreBIOCUT, LEICA, 德国); 组织展片机与组织烤片机 (H1210, LEICA, 德国)。

1.2 实验方法

本研究所有实验均经由四川大学华西医院实验动物伦理委员会批准 (伦理学审批号: 20221019003)。

1.2.1 6 h 空腹血糖检测 在 6 周龄及 18 周龄时, 通过尾部静脉法检测所有小鼠饥饿 6 h 空腹血糖 (WT 小鼠 12 只, Akita 小鼠 18 只)。空腹血糖高于 11.1 mmol/L 则判定为糖尿病。6 周龄空腹血糖测试用于判定小鼠糖尿病发病情况并以此再次确定小鼠基因型, 18 周龄空腹血糖测试用于 2 次确定小鼠糖尿病发病及进展。

1.2.2 实验动物分组及颅骨缺损造模 本研究仅使用同窝出生的雄性 Akita (Ins2^{+/-}) 和 WT (Wildtype) 后代小鼠作为实验对象。

在探究 I 型糖尿病对 Akita 小鼠颅骨缺损愈合及 Hedgehog 通路表达部分中将同窝出生的 Akita 小鼠、WT 小鼠各 6 只分别分配为 Akita 组和 WT 组。在随后探究促进 Hedgehog 通路表达对 Akita 小鼠颅骨缺损愈合的作用部分中随机将 12 只 Akita 小鼠分为 2 组, 每组 6 只, 分别为 SAG 组 (Akita 小鼠, 口饲 Hh 信号通路激动剂 SAG) 和 Akita 组 (Akita 小鼠, 口饲等量 PBS), 另外随机选取 6 只 WT 小鼠作为 WT 组, 口饲等量的 PBS。在 18 周龄时对小鼠进行右侧颅骨缺损建模手术。术前 15 min, 给予所有小鼠盐酸利多卡因术区皮下注射进行疼痛管理。手术使用 2% ~ 4% 异氟烷吸入麻醉镇静。具体手术实施过程如下: 备皮后使用碘伏擦拭双侧颅顶

骨区进行消毒,使用15号手术刀片于双侧颅顶骨中线位置做皮肤切口,掀开骨膜暴露骨面,利用牙科手机和车针沿垂直方向在右侧颅顶骨正中钻一直径1.0 mm的圆形缺损,生理盐水冲洗后复位骨膜并缝合皮肤切口。被随机抽取为SAG组的Akita小鼠在术后每2 d灌胃SAG(10 mg/kg,溶于PBS)。

1.2.3 Micro-CT观察并定量分析Akita及WT小鼠颅骨缺损愈合情况 Micro-CT扫描参数如下:电压70 kV,电流114 μ A,扫描精度10 μ m,扫描时间300 ms。利用Micro-CT相关分析软件进行三维重建及骨质、骨量分析,检测指标包括骨体积分数(bone volume to tissue volume ratio, BV/TV)及体积骨密度(volumetric bone mineral density, vBMD)。

1.2.4 形态学观察及免疫组化染色观察 苏木精-伊红染色:获取石蜡切片,烤片、脱蜡后进行梯度乙醇复水。苏木素染色和伊红染色,烘干,中性树胶封片。免疫组织化学染色:获取石蜡切片,烤片、脱蜡后进行梯度乙醇复水与抗原修复,4 $^{\circ}$ C孵育一抗过夜。次日免疫组织化学染色后苏木素染色,脱水,透明处理,封片剂封片。

1.2.5 骨髓间充质干细胞提取及体外矿化诱导检测 选用3周龄C57/B6J小鼠,二氧化碳吸入法处死后于75%酒精中浸泡消毒,机械分离小鼠股骨和胫骨,尽量去除骨表面软组织,剪去长骨两端以暴露骨髓腔,采用离心法收集骨髓内细胞。加入MEM α 完全培养基(含10%胎牛血清,1%青-链霉素抗生素)1 mL重悬至细胞悬液,将细胞悬液接种于10 cm²培养皿中,使用MEM α 完全培养基培养,放置于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱中培养并传代。本实验使用体外培养至第三代的小鼠骨髓间充质干细胞。将小鼠骨髓间充质干细胞接种至12孔板及24孔板中,当细胞汇合到达90%时进行矿化诱导,矿化诱导培养基为MEM α 完全培养基(10%FBS+1%青-链霉素抗生素)+5 mol/L β 甘油磷酸钠+50 μ g/mL维生素C。实验分为空白对照组(Control),高糖组(HG)及SAG组(HG+SAG)(各4孔)。SAG组加入1 000 ng/mL SAG及25 mol/L葡萄糖,高糖组加入25 mol/L葡萄糖及与SAG组等量的药物载体(PBS),对照组加入与前两组等量的PBS。在孔板中分别加入适量诱导培养基,隔天换液,培养至对应时间点,进行固定染色或提取mRNA。

1.2.6 碱性磷酸酶染色及茜素红染色检测体外矿化诱导水平 碱性磷酸酶染色:将细胞接种至24孔板中,诱导培养至7 d进行碱性磷酸酶染色,根

据试剂盒的说明进行下述染色:吸尽培养基,PBS清洗5 min $\times$ 3次;4%PFA室温固定10 min后,弃固定液,加入PBS进行清洗;加入适量碱性磷酸酶染液染色30 min,去离子水清洗,显微镜下观察采图。茜素红染色:将细胞接种至24孔板中,诱导培养至14 d进行茜素红染色,根据试剂盒的说明进行下述染色:吸尽培养基,PBS清洗5 min $\times$ 3次;4%PFA室温固定10 min后,弃固定液,加入超纯水进行清洗;加入适量茜素红染液染色30 min,超纯水清洗,显微镜下观察采图。

1.2.7 实时荧光定量PCR(quantitative Real-time PCR, qPCR)检测Hh通路及成骨分化相关基因mRNA的表达水平 将细胞接种至12孔板中并诱导培养至6 h及7 d,PBS漂洗,Trizol冰上裂解,加入氯仿振荡混匀,静置,离心,吸取上层清亮液体,加入等体积异丙醇,振荡混匀后再次离心,70%(v/v)乙醇漂洗,无酶水溶解沉淀并检测浓度。逆转录获得cDNA,配置反应体系后上机。相应引物如表1。

表1 PCR引物序列(小鼠)

Table 1 Primer sequences used for PCR (mice)

Gene	Primer sequence(5' $\rightarrow$ 3')
β -actin	F: TCACTATTGGCAACGAGCG
	R: AAAAGAGCCTCAGGGCATCGGAA
Ptch1	F: CTAAGCTTCGGGAGACCAATG
	R: AAGAGTGGCACAAGCACCAACG
Gli1	F: GCCTCTCCACATACTAGAAATC
	R: CATTGGATTGAACATGGCGTC
Spp1	F: CAGGGAGGCAGTGACTCTTC
	R: AGTGTGGAAGTGTGGCGTT
Sp7	F: ATGGCGTCTCTCTGCTTG
	R: TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT
Alp	F: ACTGATGTGGAATACGAAGTGG
	R: AGTGGGAATGCTTGTGTCTGGGT
Bglap	F: CTGACCTCACAGATCCCAAGC
	R: TGGTCTGATAGCTCGTCACAAG

Ptch1: patched 1; Gli1: glioma-associated oncogene homolog 1; Spp1: secreted phosphoprotein 1; Sp7: specificity protein 7; Alp: alkaline phosphatase; Bglap: bone gamma-carboxylglutamate protein

1.3 统计学方法

每组实验独立检测3次,计量资料结果均以均数 $\pm$ 标准差表示。使用GraphPad Prism 7.0软件进行数据分析。对于两组独立样本间的比较,采用独立样本 t 检验;对于3组及以上独立样本间的比

较,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间分析。以 $P < 0.05$ 为组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Akita小鼠表现出早期稳定显著的自发型糖尿病

经过空腹血糖测试,实验发现Akita组小鼠在6周时全部出现了自发性糖尿病,相对于WT组小鼠表现为严重的高血糖(平均20.04 mmol/L)($P < 0.001$)。在无任何治疗及干预条件下,让糖尿病继续影响Akita小鼠12周。到18周时,Akita空腹血糖水平持续存在且有所增加(平均25.44 mmol/L),WT组小鼠无糖尿病症状(图1a)($P < 0.001$)。

2.2 I型糖尿病造成Akita小鼠颅骨缺损愈合损害及成骨分化的明显抑制

在I型糖尿病的影响下,Akita小鼠颅骨缺损愈合明显出现了损害。术后第21天(21 d)Micro CT扫描结果显示Akita组小鼠颅骨缺损愈合明显受抑制,相对于WT组其BV/TV及vBMD参数的明显下降(图1b&1c)($P < 0.01$),而这种差异在愈合早期即术后第10天(10 d)并不明显,在术后第10天二组的BV/TV及vBMD参数无统计学差异。实验对两组小鼠颅骨缺损愈合21 d进行成骨分化相关蛋白Ocn免疫组化染色结果进行观察及定量分析后发现,相对于WT组,Akita组小鼠的成骨分化受到明显的抑制(图1d&e)($P < 0.05$)。

2.3 Akita小鼠颅骨缺损愈合过程中Hh信号通路表达受到明显抑制

为进一步探究I型糖尿病抑制成骨分化损害颅骨缺损愈合的具体机制,课题组在颅骨缺损愈合第21天对Akita与WT组小鼠缺损区域进行了Hh信号通路相关蛋白免疫组化染色(图2a&2b)。定量分析结果表明,相对于WT组,Akita组小鼠Gli1、Ptch1及Ihh的表达均受到明显抑制(图2c)(Gli1、Ptch1: $P < 0.01$;Ihh: $P < 0.05$)。通过高糖环境模拟I型糖尿病环境的体外研究同样表明,相对于葡萄糖浓度5.5 mmol/L的空白对照组,在高糖环境中体外矿化诱导6 h后,高糖组小鼠BMSCs的Hedgehog通路相关基因Gli1与Ptch1表达显著降低(图2d)(Gli1: $P < 0.05$;Ptch1: $P < 0.01$)。

2.4 促进Hh信号通路表达可以明显改善I型糖尿病对Akita小鼠颅骨缺损愈合的损害

在明确I型糖尿病抑制Hh信号通路表达后,课题组使用了Hh信号通路激动剂SAG开展了进

一步实验。对比3组小鼠颅骨缺损愈合MicroCT扫描结果(图3a)及定量分析结果(图3b),在缺损愈合的早期(D10),SAG组小鼠表现出了显著高于另外两组小鼠的BV/TV及vBMD参数($P < 0.05$),在颅骨缺损造模术后21 d(D21),SAG组小鼠中受I型糖尿病抑制的骨缺损愈合情况得到了明显的改善,其BV/TV及vBMD参数显著高于Akita组($P < 0.01$),与WT组的结果无统计学差异。这提示了Hh信号通路在颅骨愈合的各个时期均有作用。SAG、Akita与WT组小鼠颅骨缺损愈合21 d的Ocn免疫组化染色及Ocn定量分析结果显示SAG组小鼠骨愈合区域内Ocn阳性面积显著高于WT组($P < 0.01$)及Akita小鼠($P < 0.05$)。结合3组同一时间点的HE染色,这些结果证明了促进Hh信号通路表达可以显著促进成骨分化,从而改善I型糖尿病对颅骨缺损愈合的损害(图4)。

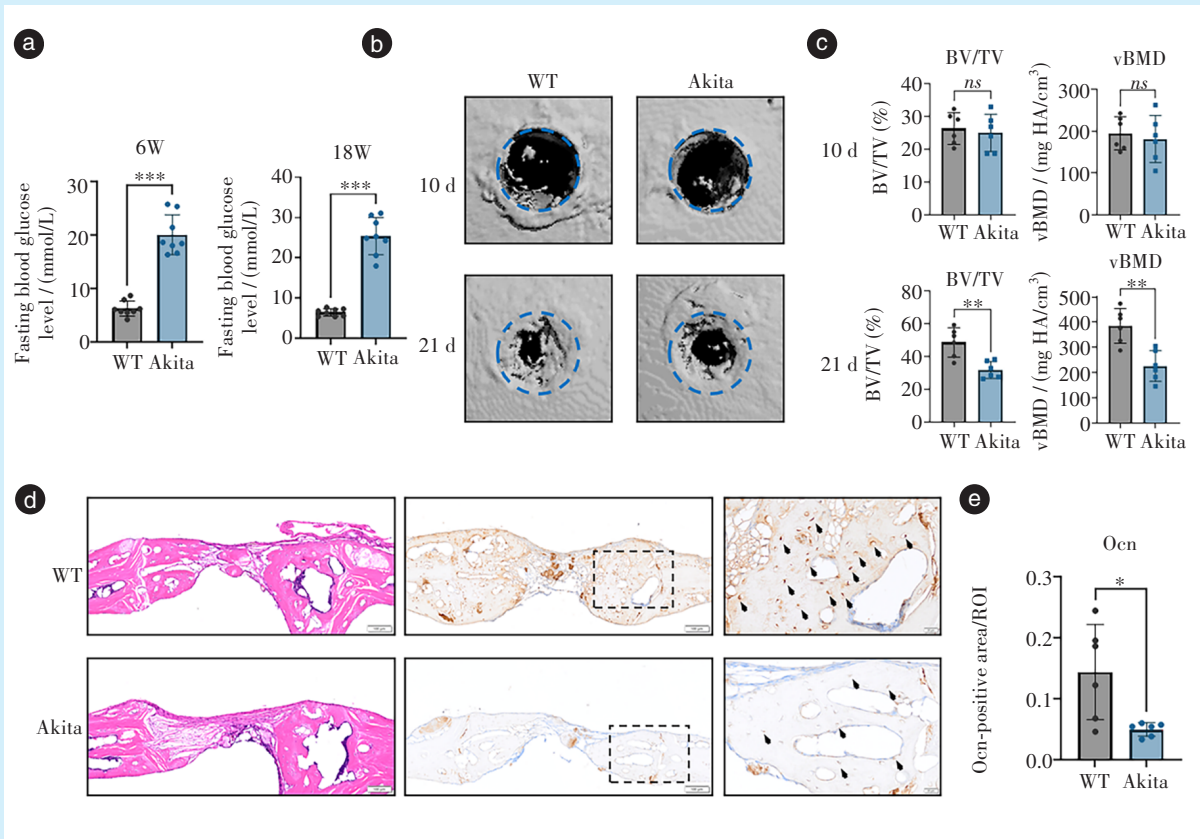
2.5 促进Hh信号通路表达可以明显改善高糖环境对BMSCs成骨分化的抑制

在对高糖组(HG)及空白对照组(Control)BMSCs成骨分化过程碱性磷酸酶染色和茜素红染色结果进行观察(图5a)及定量分析(图5b)后,课题组发现高糖对成骨分化显著抑制($P < 0.001$),这与其成骨分化相关基因表达受抑制的结果一致(图5c)($P < 0.01$)。而在使用SAG后(HG+SAG组),成骨分化相关基因(Alp、Sppl、Bglap、Sp7)的表达水平与HG组相比显著上升($P < 0.001$)。

3 讨论

I型糖尿病会导致骨质流失,增加骨折风险,并且延迟骨愈合,而目前I型糖尿病引起骨表型改变的作用机制不明^[13-15]。Hh信号通路在骨发育和骨形成过程中有着非常重要的作用,更好地理解Hh信号通路可能对阐明I型糖尿病引起骨愈合损害的作用机制具有重要意义^[16-18]。虽然目前I型糖尿病与Hh信号通路相关的研究极少,且Hh信号通路与I型糖尿病中的骨表型改变是否相关的研究仍是空白,但几乎所有的证据都指向I型糖尿病及其并发症可能抑制了Hh信号通路的表达^[6, 19-21]。本课题组前期的实验中发现I型糖尿病导致Akita小鼠产生了严重的骨质流失并明显降低了小鼠骨愈合能力,而这一过程主要体现在成骨及成软骨过程的受抑制,在此过程中Hh通路也明显受到了抑制,两者可能密切相关^[7]。

Akita转基因小鼠由Masato等于1997年在日本



This study only used male Akita (Ins2^{+/-}) and wild-type (WT) offspring mice born in the same litter as experimental subjects. The 6-hour fasting blood glucose levels of 6-week-old and 18-week-old WT and Akita mice from the same litter were measured ($n=8$). Subsequently, 18-week-old mice were subjected to cranial defect modeling and underwent MicroCT scanning and immunohistochemical (IHC) staining at designated time points ($n=6$). a: detection levels of blood glucose in Akita and WT mice; Akita mice showed early stable and significant spontaneous diabetes. b - c: Micro CT reconstruction images at 10 days and 21 days post cranial defect, and quantitative analysis; the blue circles in Figure b delineate the region of the calvarial defect model. d - e: HE staining and Ocn IHC staining at 21 days post cranial defect, and quantitative analysis of Ocn. The black square brackets in Figure d (10×) demarcate the regions corresponding to the magnified images (40×) on the right. The black arrowheads in Figure d denote cells positive for Ocn. BV/TV: bone volume-to-tissue volume ratio. vBMD: volumetric bone mineral density. Ocn: osteocalcin. ns: no significance. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 1 Comparison of blood glucose levels in Akita and WT mice, along with Micro CT assessments and osteogenesis-related proteins IHC outcomes post cranial defect

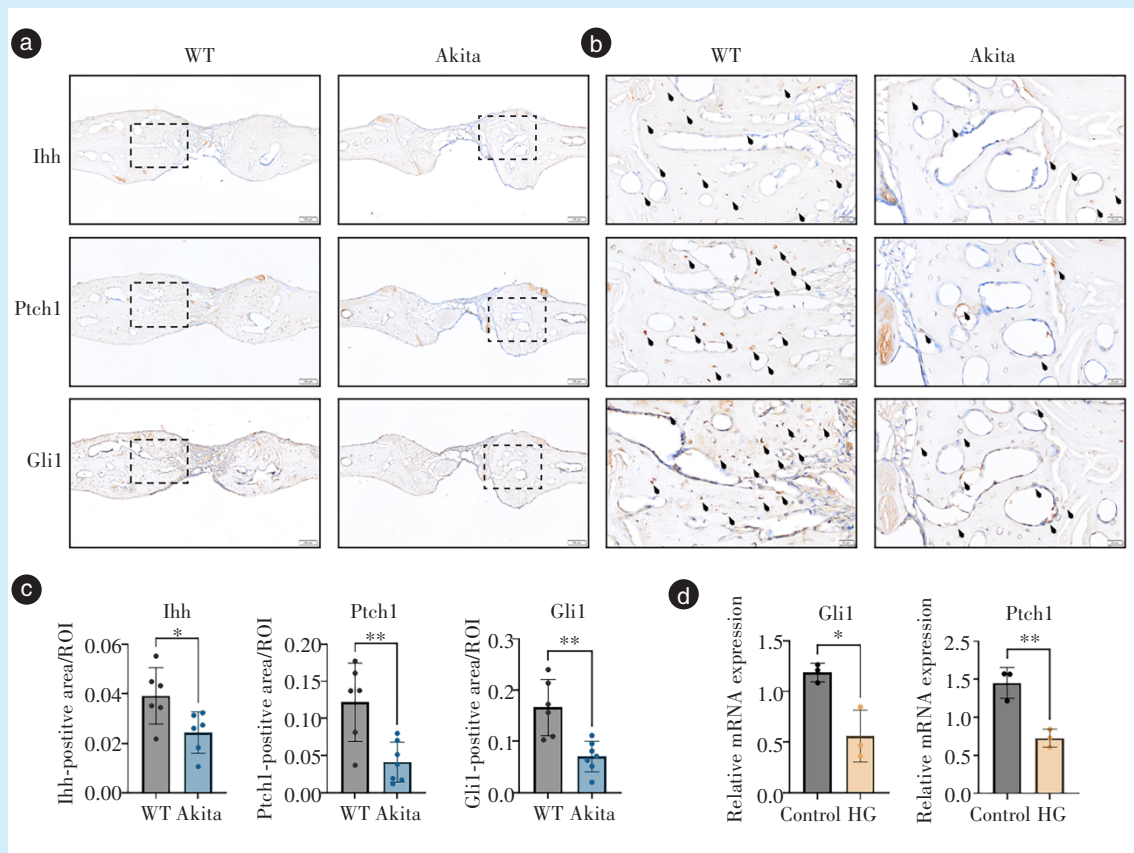
图1 Akita与WT组小鼠血糖水平、颅骨缺损术后Micro CT与成骨相关蛋白免疫组化结果

培育成功,该模型不会导致肥胖或胰腺炎,但伴有显著的胰岛 β 细胞功能障碍^[22]。5周左右,雄性Akita鼠胰岛素-2(Ins2)基因的一个等位基因发生错义突变(Ins2^{+/-}),自发形成I型糖尿病,血糖升高^[23-24]。在本次实验中,经过空腹血糖测试,发现Akita组小鼠在6周时全部出现了自发型糖尿病,表现为严重的高血糖,在无任何治疗及干预条件下,让糖尿病影响Akita小鼠12周后,Akita空腹血糖水平稳定存在且持续增高。

在12周的连续高血糖状态影响下,Akita小鼠表现出了明显的颅骨缺损愈合能力的损害,表现

为术后21 d的BV/TV及vBMD明显下降,但这种差异在愈合早期即术后10 d并不明显;而术后21 d成骨分化相关蛋白Ocn免疫组化染色结果进一步证实了这种损害主要来自对成骨分化的抑制。

本研究结果共同表明I型糖尿病主要通过影响成骨分化损害颅骨缺损愈合。而对颅骨缺损愈合第21天对Akita与WT组小鼠缺损区域Hh信号通路相关蛋白免疫组化染色定量分析结果表明I型糖尿病可能通过影响Hh信号通路表达,进而引起成骨分化抑制,导致颅骨缺损愈合损害。这一结果与课题组体外实验观察到的高糖环境对



For animal experiments, 18-week-old WT and Akita mice from the same litter were subjected to cranial defect modeling and underwent IHC staining at 21 days ($n=6$). For cell experiments, BMSCs expanded to the third generation (P3) were subjected to mineralization induction in vitro for 6 hours in the control group and high glucose (HG) group, followed by qPCR detection ($n=3$). a - c: immunohistochemical (IHC) staining of Hh signaling pathway-related proteins in the cranial defect healing area of Akita and WT mice at 21 days (a: 10 $\times$; b: 40 $\times$), and quantitative analysis. The black square brackets in Figure a demarcate the regions corresponding to the magnified images (40 $\times$) in Figure b. The black arrowheads in Figure b denote cells positive for Ihh, Ptch1, and Gli1. d: inhibition of Hh signaling pathway gene expression during the osteogenic differentiation of BMSCs under high-glucose conditions. Ihh: Indian Hh. Ptch1: Patched1. Gli1: zinc finger protein GLI 1. Control group: mineralization-inducing media with 5.5 mmol/L glucose. HG: mineralization-inducing media with 25 mmol/L glucose. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Figure 2 IHC detection of the Hh signaling pathway in Akita and WT mice post cranial defect, with *in vitro* validation under high-glucose conditions

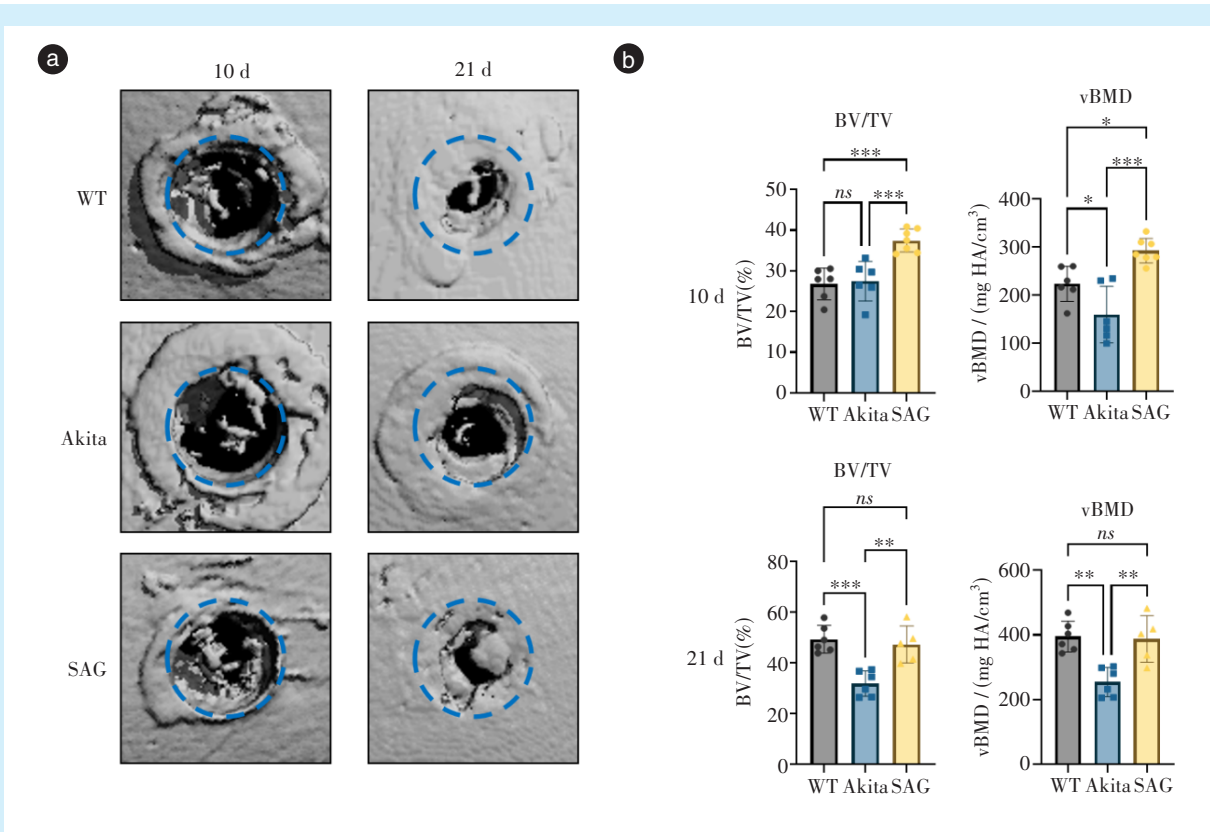
图2 Akita与WT组小鼠颅骨缺损术后Hh信号通路免疫组化检测结果及高糖环境下的体外验证

BMSCs成骨分化过程Hh信号通路基因表达抑制的结果一致。

目前研究普遍认为,在颅骨缺损修复过程中发挥关键成骨作用的细胞为颅缝间充质干细胞(suture mesenchymal stem cells, SuSCs)。这类干细胞主要定位于颅缝间充质生态位,并通过Gli1、轴抑制蛋白2(Axis inhibition protein 2, Axin2)等特异性标记物进行鉴定^[25-27]。在颅骨缺损修复阶段, SuSCs可定向迁移至骨缺损区域,通过成骨分化实现骨组织再生^[25, 28]。值得注意的是, Gli1阳性SuSCs(Gli1⁺ SuSCs)作为Hh信号通路的关键效应细胞,其特异性清除已被证实会导致颅骨缺损愈

合显著受损,提示该类细胞在骨修复中具有不可替代的生物学功能^[27, 29]。

本研究观察到Akita小鼠颅骨缺损区域新生骨组织内Gli1表达显著下调。结合文献报道的Gli1⁺ SuSCs对骨稳态维持的核心作用,该现象可能反映两种潜在机制:①糖尿病病理状态下颅缝生态位中SuSCs池的储存量减少;②SuSCs从颅缝至损伤部位的迁移能力受损。但现有数据尚不足以明确区分这两种可能性,需通过细胞示踪等实验进一步验证。从分子机制层面分析, Hh信号通路(特别是Ihh亚型)对Gli1⁺ SuSCs的激活具有双重调控作用:一方面通过维持干细胞自我更新能力确保细



a - b: Micro CT reconstruction images at 10 days and 21 days post cranial defect, and quantitative analysis ($n=6$). The blue circles in Figure a delineate the region of the calvarial defect model. Cranial defect modeling was performed on 18-week-old wild-type and Akita mice from the same litter. After surgery, Akita mice were randomly selected for gavage with 10 mg/kg of SAG (SAG group) or the vehicle (Akita group), while wild-type mice were given only the vehicle (WT group). SAG: Hh signaling pathway agonist. BV/TV: bone volume-to-tissue volume ratio. vBMD: volumetric bone mineral density. ns: no significance. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

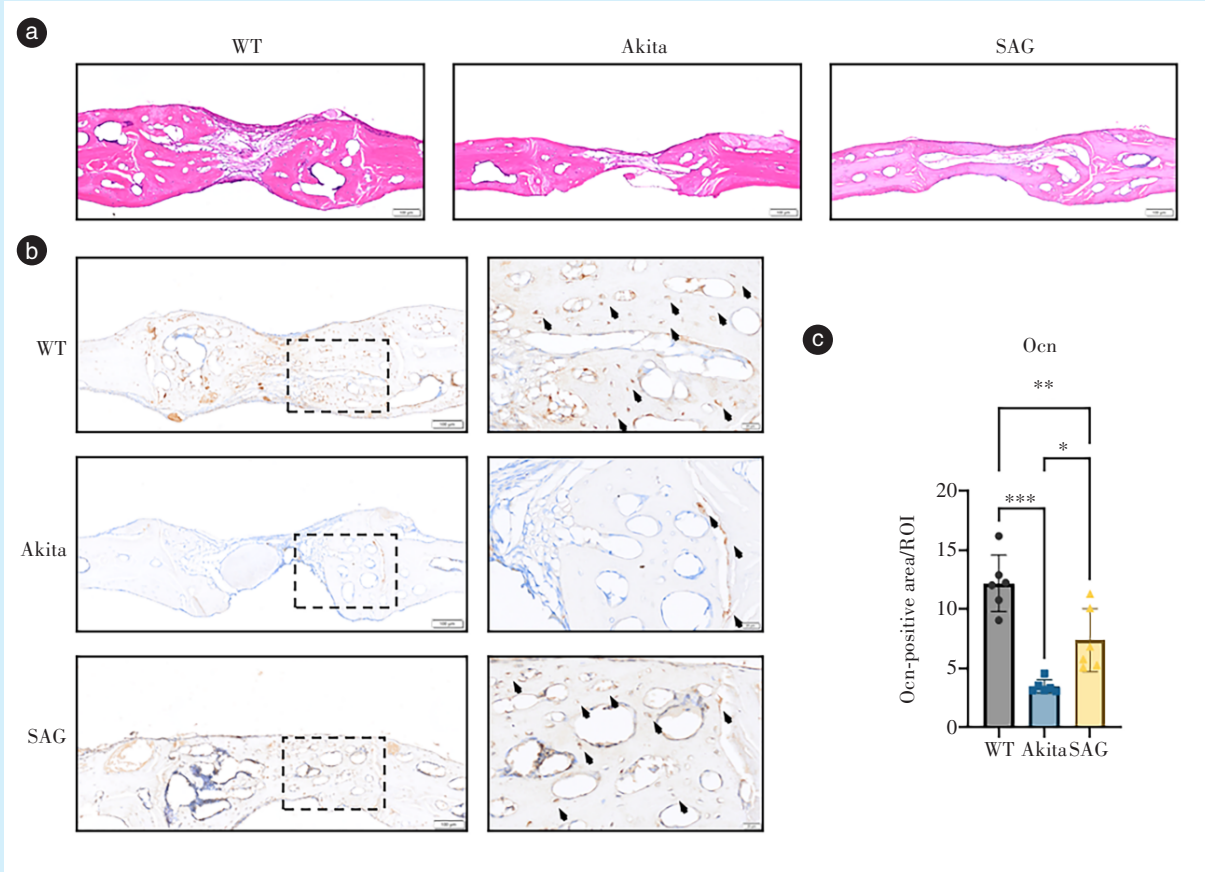
Figure 3 Micro CT scanning outcomes and quantitative analysis post cranial defect in SAG, Akita, and WT mice

图3 SAG、Akita与WT组小鼠颅骨缺损术后Micro CT扫描结果及定量分析

胞储备,另一方面通过上调 Spp1、Sp7 等成骨关键转录因子促进成骨分化^[26, 30]。本研究发现 Akita 小鼠新生骨组织中 Hh 通路关键分子 (Ihh、Ptch1、Gli1) 表达均受显著抑制,这与 Ocn 等成骨标志物的同步下降具有病理一致性。这些证据共同支持以下结论: Hh 通路抑制导致的 Gli1⁺ SuSCs 激活障碍是 Akita 小鼠骨修复受损的重要机制^[31]。本研究观察到 Akita 与 WT 小鼠在颅骨缺损术后 10 d 的新骨形成量未呈现显著差异,但在术后 21 d 出现显著差异,可能与颅骨缺损愈合涉及的细胞种类及糖尿病对骨缺损局部微环境慢性且长期的影响有关。颅骨缺损愈合早期(术后 7~14 d)主要表现为纤维性骨痂形成,此阶段骨膜来源的成骨前体细胞(如骨膜干细胞)通过膜内成骨方式贡献新骨生成。此时糖尿病导致的代谢紊乱尚未显著影响局部微环境,因此两组间骨量差异不明显。而

在术后 21 d, Gli1⁺ SuSCs 的迁移与分化可能为此时骨缺损修复的主导机制。Akita 小鼠中 Hh 信号通路受抑导致 Gli1⁺ SuSCs 激活或迁移能力受损,因此表现为颅骨缺损愈合能力的损害。此外,相关研究指出,在颅骨缺损修复时,血管新生活动与成骨活动在时空上紧密重叠,此外, Hh 信号通路可通过调控血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和血管生成素-1 (angiopoietin-1) 等关键因子,显著促进损伤区域的血管新生^[18, 32-34]。因此, SAG 组在术后 10 d 表现出相对良好的颅骨缺损愈合效果,这不仅可能归因于 Hh 通路激活后对骨膜干细胞或 SuSCs 的迁移和分化具有促进作用, Hh 通路对血管新生的调节作用也可能是影响颅骨愈合的重要因素之一。

SAG 近期被广泛应用于 Hh 信号通路细胞学实验和体内实验中,通过直接结合 Hh 信号通路中的



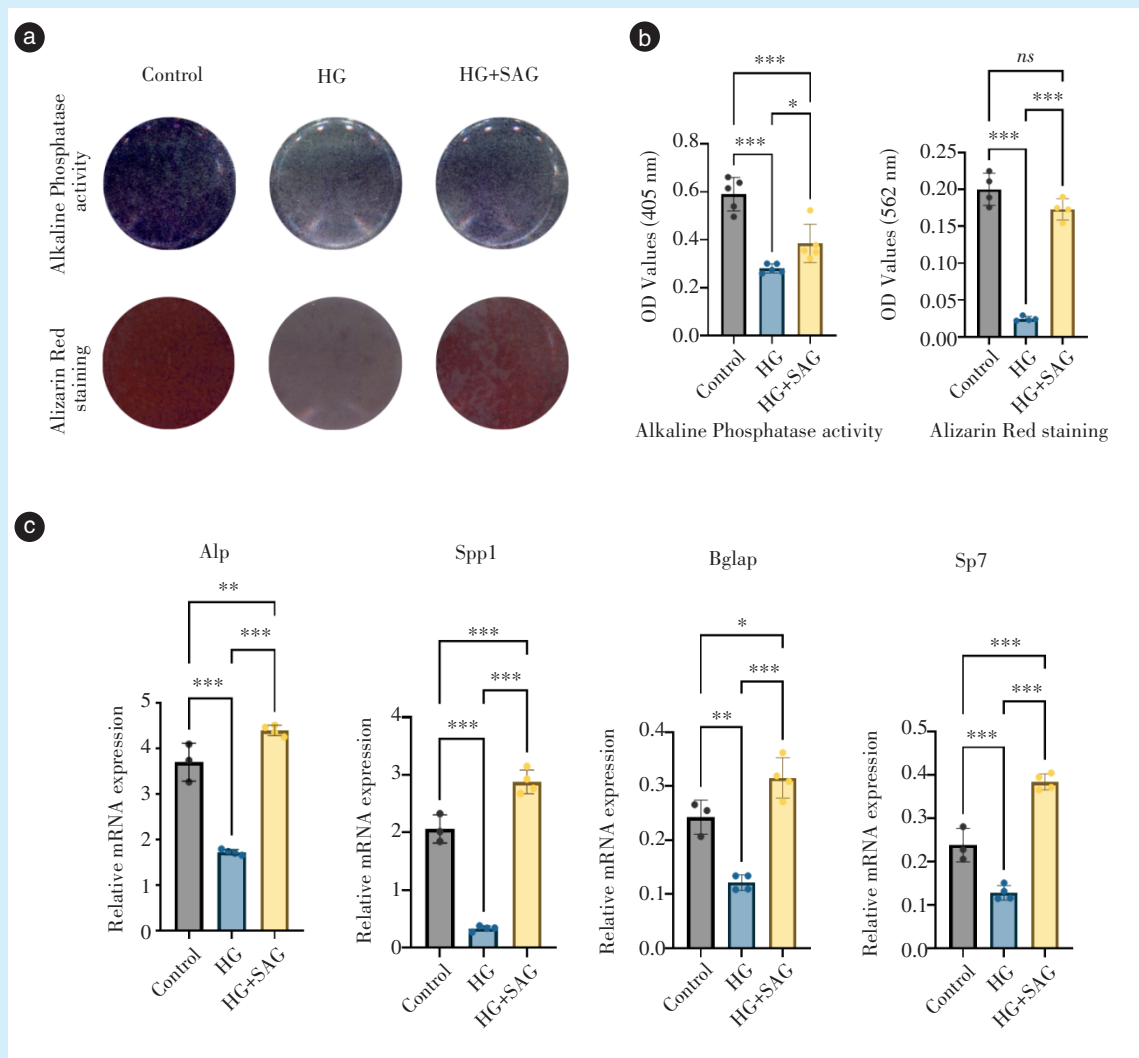
a - c: HE staining and Ocn immunohistochemical staining of the cranial defect healing area in WT, Akita, and SAG mice at 21 days, and quantitative analysis of Ocn ($n=6$). Cranial defect modeling was performed on 18-week-old wild-type and Akita mice from the same litter. After surgery, Akita mice were randomly selected for gavage with SAG (10 mg/kg) (SAG group) and vehicle (Akita group), while wild-type mice were given only the vehicle (WT group). The black square brackets in Figure b (10 $\times$) demarcate the regions corresponding to the magnified images (40 $\times$) on the right; the black arrowheads denote cells positive for Ocn. SAG: Hh signaling pathway agonist. Ocn: osteocalcin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 4 Histological examination and quantitative analysis at 21 days post cranial defect in SAG, Akita, and WT mice

图4 SAG、Akita与WT组小鼠颅骨缺损术后21 d组织学检测结果及定量分析

Smo受体以解除Smo的受抑制状态,刺激下游基因表达,以此显著促进Hh通路表达^[35-36]。Hh通路最主要的下游基因包括Ptc1、Gli1和Hhip1,其中Ptc1的激活参与形成了Hh信号通路的负反馈调节系统^[37-38]。在本次实验中,在发现了Akita小鼠骨缺损愈合受损与Hh信号通路表达降低相关后,本研究对Akita小鼠使用SAG促进Hh信号通路表达。结果表明,在对Akita小鼠使用SAG后,SAG组小鼠中受I型糖尿病抑制的骨缺损愈合情况得到了明显的改善,BV/TV及vBMD均达到了WT对照组水平(D21)。而在缺损愈合的早期(D10),SAG组小鼠也表现出了显著高于另外两组小鼠的骨愈合水平,这提示了Hh信号通路在颅骨愈合的各个时期均有作用。颅骨缺损愈合21 d,促进Hh信号

通路表达可以显著促进成骨分化,从而改善I型糖尿病对颅骨缺损愈合的损害。但SAG组和WT组的结果对比仍然存在一定差异,这表明Hh信号通路表达受抑制不是I型糖尿病唯一可能影响成骨分化的途径。除Hh信号通路外,胰岛素缺乏、长期的高血糖刺激、糖基化终末产物、炎症因子、氧化应激、血管生成因子等其他可能参与调控成骨分化的因素可能存在相互促进相互交联的可能性,需要进一步实验证明^[9]。这个结果也在体外细胞学实验过程中得到了验证。在使用SAG后,高糖对成骨分化的抑制得到明显的改善,成骨分化相关基因的表达水平也有显著提升,这种促进同时影响了成骨早期和成骨晚期相关基因的表达,这也与体内实验结果共同证明了Hh信号通路在



Alkaline Phosphatase staining and qPCR detection were performed after 7 days of osteogenic induction, and Alizarin Red staining was conducted after 14 days of induction. a & b: results of Alkaline Phosphatase and Alizarin Red staining during the osteogenic differentiation of BMSCs ($n=4$). c: comparison of osteogenesis-related gene expression levels ($n=4$). Control group: mineralization-inducing media with 5.5 mmol/L glucose. HG: mineralization-inducing media with 25 mmol/L glucose. HG + SAG group: mineralization-inducing media with 25 mmol/L glucose + 1 000 nmol/L SAG (diluted in PBS). SAG: Hh signaling pathway agonist. Ocn: osteocalcin. Spp1: secreted phosphoprotein 1. Sp7: specificity protein 7. Alp: alkaline phosphatase. Bglap: bone gamma-carboxyglutamate protein. BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells. ns: no significance. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

Figure 5 Effect of promoting Hh signaling pathway expression on osteogenic differentiation of BMSCs *in vitro* under high-glucose conditions

图5 促进Hh信号通路表达对高糖环境下体外BMSCs成骨分化的影响

成骨分化各个时期均有作用。

本研究证明了促进Hh信号通路改善I型糖尿病病颅骨缺损愈合,这一结果存在可能的临床应用前景,包括开发基于Hh信号通路的局部药物,如凝胶或贴片,直接应用于颅骨缺损部位,以促进愈合;利用基因编辑技术,如CRISPR-Cas9,靶向激活Hh信号通路的关键基因,以增强骨愈合能力;或结合干细胞技术,将经过改造过度表达Hh信号分子

的干细胞移植到缺损部位,促进骨组织再生。除了Hh通路外,鉴于胰岛素缺乏、长期的高血糖刺激、糖基化终末产物、炎症因子、氧化应激、血管生成因子对糖尿病环境下的受损的骨愈合也施加了重要影响,因此开发具有激活Hh通路及抑制或缓解糖尿病损害因子的可植入材料或针对性治疗可能获得更好的治疗效果。但激活Hh信号通路可能引发不良反应,如可能促进肿瘤形成,因此需要

进一步探索如何精确靶向调控相关基因,减少治疗潜在的风险,这也是课题组下一步实验的方向^[10, 18, 39-40]。此外,由于糖尿病环境影响Hh通路的具体机制尚不明确,因此研究糖尿病损害因子作用于Hh通路的机制,以及基于此进行的病因治疗及对应药物与材料的开发也具有一定的研究意义。

综上所述,本实验证实了I型糖尿病抑制了Akita小鼠Hh信号通路的表达,进而抑制了颅骨缺损愈合能力,而激活Hh信号通路可以通过促进成骨的方式改善I型糖尿病抑制的骨愈合能力。本研究为理解I型糖尿病骨愈合能力下降机制提供了新的思路,也为未来促进I型糖尿病患者骨愈合能力提供了新的方向。

【Author contributions】 Wu YZ and Liu LN performed the experiments, analyzed the data and wrote the article. Liu SB analyzed the data and assisted the experiments. Luo E and Hu P designed the study and revised the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Deng C, Xie Y, Li J, et al. Care, control and complications of hospitalised patients with type 1 diabetes in China: a nationwide-based registry study[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2024, 40(3): e3796. doi: 10.1002/dmrr.3796.
- [2] Liu C, Yuan YC, Guo MN, et al. Incidence of type 1 diabetes may be underestimated in the Chinese population: evidence from 21.7 million people between 2007 and 2017[J]. *Diabetes Care*, 2021, 44(11): 2503-2509. doi: 10.2337/dc21-0342.
- [3] Robertson CC, Elgarn RM, Henry-Kanarek BA, et al. Untangling the genetics of beta cell dysfunction and death in type 1 diabetes [J]. *Mol Metab*, 2024, 86: 101973. doi: 10.1016/j.molmet.2024.101973.
- [4] 余雪梅, 田沛文, 孙喜明, 等. I型糖尿病患者各发病年龄段胰岛功能短暂缓解期特征及对远期预后的影响[J]. *中国糖尿病杂志*, 2024, 32(6): 432-436. doi: 10.3969/j.issn.1006-6187.2024.06.007.
She XM, Tian PW, Sun XM, et al. Characteristics of transient remission of islet function and its influence on long-term prognosis in different onset age patients with type 1 diabetes mellitus[J]. *Chin J Diabetes*, 2024, 32(6): 432-436. doi: 10.3969/j.issn.1006-6187.2024.06.007.
- [5] Leungsuwan DS, Chandran M. Bone fragility in diabetes and its management: a narrative review[J]. *Drugs*, 2024, 84(9): 1111-1134. doi: 10.1007/s40265-024-02078-5.
- [6] Chinipardaz Z, Liu M, Graves D, et al. Diabetes impairs fracture healing through disruption of cilia formation in osteoblasts[J]. *Bone*, 2021, 153: 116176. doi: 10.1016/j.bone.2021.116176.
- [7] Hu P, McKenzie JA, Buettmann EG, et al. Type 1 diabetic Akita mice have low bone mass and impaired fracture healing[J]. *Bone*, 2021, 147: 115906. doi: 10.1016/j.bone.2021.115906.
- [8] Hernandez RK, Do TP, Critchlow CW, et al. Patient-related risk factors for fracture-healing complications in the United Kingdom general practice research database[J]. *Acta Orthop*, 2012, 83(6): 653-660. doi: 10.3109/17453674.2012.747054.
- [9] Tanios M, Brickman B, Cage E, et al. Diabetes and impaired fracture healing: a narrative review of recent literature[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2022, 20(5): 229-239. doi: 10.1007/s11914-022-00740-z.
- [10] Kuwahara ST, Liu S, Chareunsouk A, et al. On the horizon: Hedgehog signaling to heal broken bones[J]. *Bone Res*, 2022, 10(1): 13. doi: 10.1038/s41413-021-00184-8.
- [11] Zhu S, Chen W, Masson A, et al. Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis[J]. *Cell Discov*, 2024, 10(1): 71. doi: 10.1038/s41421-024-00689-6.
- [12] Ze Y, Wu Y, Tan Z, et al. Signaling pathway mechanisms of circadian clock gene *bmal1* regulating bone and cartilage metabolism: a review[J]. *Bone Res*, 2025, 13(1): 19. doi: 10.1038/s41413-025-00403-6.
- [13] Aleksova J, Ebeling P, Elder G. The effects of type 1 and type 2 diabetes mellitus on bone health in chronic kidney disease[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2025, 21(5): 301-313. doi: 10.1038/s41574-024-01083-8.
- [14] Psachna S, Chondrogianni ME, Stathopoulos K, et al. The effect of antidiabetic drugs on bone metabolism: a concise review[J]. *Endocrine*, 2025, 87(3): 907-919. doi: 10.1007/s12020-024-04070-1.
- [15] Dragoun Kolibová S, Wölfl EM, Hemmatian H, et al. Osteocyte apoptosis and cellular micropetrosis signify skeletal aging in type 1 diabetes[J]. *Acta Biomater*, 2023, 162: 254-265. doi: 10.1016/j.actbio.2023.02.037.
- [16] Takahashi Y, Ishida Y, Yoshida S, et al. Counterregulatory roles of GLI2 and GLI3 in osteogenic differentiation *via* Gli1 expression [J]. *J Cell Sci*, 2025, 138(3): jcs263556. doi: 10.1242/jcs.263556.
- [17] He K, Jiang H, Li W, et al. Primary cilia mediate skeletogenic BMP and Hedgehog signaling in heterotopic ossification[J]. *Sci Transl Med*, 2024, 16(757): eabn3486. doi: 10.1126/scitranslmed.abn3486.
- [18] Rundle CH, Gomez GA, Pourteymoor S, et al. Sequential application of small molecule therapy enhances chondrogenesis and angiogenesis in murine segmental defect bone repair[J]. *J Orthop Res*, 2023, 41(7): 1471-1481. doi: 10.1002/jor.25493.
- [19] Chinipardaz Z, Yuan G, Liu M, et al. Diabetes impairs fracture healing through FoxO1 mediated disruption of ciliogenesis[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 299. doi: 10.1038/s41420-023-01562-3.
- [20] Idevall-Hagren O, Incedal Nilsson C, Sanchez G. Keeping pace: the primary cilium as the conducting baton of the islet[J]. *Diabetologia*, 2024, 67(5): 773-782. doi: 10.1007/s00125-024-06096-6.
- [21] Garg C, Khan H, Kaur A, et al. Therapeutic implications of sonic hedgehog pathway in metabolic disorders: novel target for effective treatment[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 179: 106194. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106194.
- [22] Mattocks DAL, Ommi NB, Malloy VL, et al. An antireductant ap-

- proach ameliorates misfolded proinsulin-induced hyperglycemia and glucose intolerance in male Akita mice[J]. *Geroscience*, 2025, 47(2): 1653-1668. doi: 10.1007/s11357-024-01326-6.
- [23] Jin Z, Lee B. Boosting glycolysis to combat fragile bone in type 1 diabetes[J]. *Cell Chem Biol*, 2023, 30(9): 1002-1003. doi: 10.1016/j.chembiol.2023.08.009.
- [24] Kalaitzoglou E, Fowlkes JL, Thrailkill KM. Mouse models of type 1 diabetes and their use in skeletal research[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2022, 29(4): 318-325. doi: 10.1097/MED.0000000000000737.
- [25] Maruyama T, Jeong J, Sheu TJ, et al. Stem cells of the suture mesenchyme in craniofacial bone development, repair and regeneration[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10526. doi: 10.1038/ncomms10526.
- [26] Zhao H, Feng J, Ho TV, et al. The suture provides a niche for mesenchymal stem cells of craniofacial bones[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(4): 386-396. doi: 10.1038/ncb3139.
- [27] Li B, Ding Z, Ouchi T, et al. Deciphering the spatial distribution of Gli1-lineage cells in dental, oral, and craniofacial regions[J]. *J Bone Miner Res*, 2024, 39(12): 1809-1820. doi: 10.1093/jbmr/zjae152.
- [28] Li B, Li J, Fan Y, et al. Dissecting calvarial bones and sutures at single-cell resolution[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2023, 98(5): 1749-1767. doi: 10.1111/brv.12975.
- [29] Jing D, Chen Z, Men Y, et al. Response of Gli1⁺ suture stem cells to mechanical force upon suture expansion[J]. *J Bone Miner Res*, 2022, 37(7): 1307-1320. doi: 10.1002/jbmr.4561.
- [30] Xu R, Sheng R, Lin W, et al. METTL3 modulates ctsk⁺ lineage supporting cranial osteogenesis *via* hedgehog[J]. *J Dent Res*, 2024, 103(7): 734-744. doi: 10.1177/00220345241245033.
- [31] Sun Q, Huang J, Tian J, et al. Key roles of Gli1 and ihh signaling in craniofacial development[J]. *Stem Cells Dev*, 2024, 33(11/12): 251-261. doi: 10.1089/scd.2024.0036.
- [32] Rindone AN, Liu X, Farhat S, et al. Quantitative 3D imaging of the cranial microvascular environment at single-cell resolution[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6219. doi: 10.1038/s41467-021-26455-w.
- [33] Dong J, Cui J, Shi X, et al. Itraconazole inhibits proliferation, induces apoptosis, and reduces angiogenesis of hemangioma endothelial cells by downregulating the hedgehog signaling pathway[J]. *Heliyon*, 2023, 9(9): e19244. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e19244.
- [34] Paredes I, Vieira JR, Shah B, et al. Oligodendrocyte precursor cell specification is regulated by bidirectional neural progenitor-endothelial cell crosstalk[J]. *Nat Neurosci*, 2021, 24(4): 478-488. doi: 10.1038/s41593-020-00788-z.
- [35] Zong R, Zheng Y, Yan Y, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis by targeting Hedgehog/SMO signaling[J]. *Hepatol Int*, 2024, 18(6): 1781-1791. doi: 10.1007/s12072-024-10717-y.
- [36] Zhang Z, Hu H, Xu Z, et al. A chemically defined culture for tooth reconstitution[J]. *Adv Sci(Weinh)*, 2025, 12(3): e2404345. doi: 10.1002/advs.202404345.
- [37] Ohba S. Hedgehog signaling in skeletal development: roles of Indian hedgehog and the mode of its action[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6665. doi: 10.3390/ijms21186665.
- [38] Pei Y, Liu F, Zhao Y, et al. Role of hedgehog signaling in the pathogenesis and therapy of heterotopic ossification[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1454058. doi: 10.3389/fcell.2024.1454058.
- [39] Chen W, Lai F, Xu J. Synthesis and evaluation of aromatic A-ring 23-oxavitamin D₃ analogues as hedgehog pathway inhibitors[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(4): 1631. doi: 10.3390/ijms26041631.
- [40] Ahmadi A, Mazloomnejad R, Kasravi M, et al. Recent advances on small molecules in osteogenic differentiation of stem cells and the underlying signaling pathways[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 518. doi: 10.1186/s13287-022-03204-4.

(编辑 周春华)



Open Access

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Copyright © 2025 by Editorial Department of Journal of Prevention and Treatment for Stomatological Diseases



官网