

HOXA10 基因修饰骨髓间充质干细胞促进骨再生

葛霄^{1, 2, 3}, 赵状状^{1, 2, 3}, 郭舒瑜^{2, 3, 4}, 徐荣耀^{1, 2, 3}<https://doi.org/10.12307/2025.559>

投稿日期: 2024-07-15

采用日期: 2024-09-25

修回日期: 2024-11-06

在线日期: 2024-11-26

中图分类号:

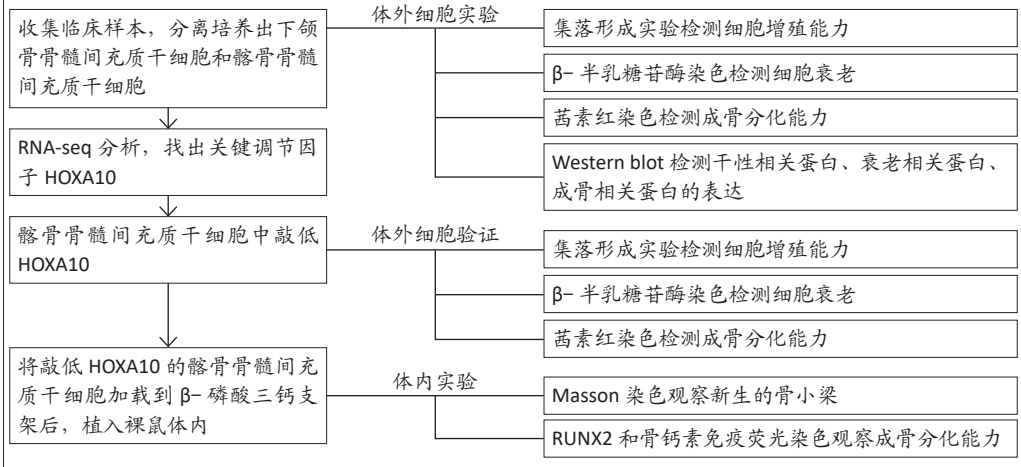
R459.9; R318; R782

文章编号:

2095-4344(2025)36-07701-08

文献标识码: A

文章快速阅读: HOXA10 基因修饰骨髓间充质干细胞促进骨再生的作用



文题释义:

HOXA10基因: 是一种同源框基因(homeobox gene), 属于HOX基因家族, 在调控胚胎发育和细胞分化过程中起关键作用。

骨髓间充质干细胞: 是存在于骨髓中的一种多能干细胞, 具有自我更新和多向分化能力, 在组织修复和再生医学中具有重要作用。

骨再生修复: 目前临床上主要通过自体骨移植、人工骨移植、干细胞疗法和生长因子疗法等促进骨缺损的再生和修复, 以恢复缺损骨骼的结构和功能。

摘要

背景: 自体骨或人工骨移植在临床上已广泛应用于颌面骨缺损修复, 但这些方法仍存在成骨效果不佳等问题。骨髓间充质干细胞在骨形成过程中发挥关键作用, 其中, 外胚层来源的颌骨骨髓间充质干细胞与中胚层来源的髌骨骨髓间充质干细胞相比, 具有更强的增殖和成骨分化能力, 阐明其中的关键机制, 有望为颌颌面骨缺损修复提供新策略。

目的: 比较人颌骨骨髓间充质干细胞与髌骨骨髓间充质干细胞的生物学差异, 并找出其中的关键调节基因。

方法: ①收集3例牙槽突裂患者的颌骨和髌骨, 分离培养出原代骨髓间充质干细胞, 通过集落形成实验检测细胞增殖能力, β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老情况, Western blot检测衰老和成骨相关蛋白表达, 成骨诱导液处理后茜素红染色检测成骨能力; ②对颌骨骨髓间充质干细胞和髌骨骨髓间充质干细胞进行转录组和差异基因表达分析, 找到差异表达最大的20个基因, 鉴定出关键调控因子; ③在髌骨骨髓间充质干细胞中敲低HOXA10基因, 比较分析髌骨骨髓间充质干细胞自我更新、抗衰老和成骨能力变化; ④将基因编辑的髌骨骨髓间充质干细胞装入 β -磷酸三钙支架中, 并植入裸鼠背部皮下, 8周后对植入物进行Masson染色和免疫荧光染色, 观察成骨能力差异。结果与结论: ①与髌骨骨髓间充质干细胞相比, 颌骨骨髓间充质干细胞具有更强的增殖、抗衰老和成骨分化能力; ②通过转录组分析, 鉴定出HOXA10是髌骨骨髓间充质干细胞中高度上调的核心转录因子; ③在髌骨骨髓间充质干细胞中敲低HOXA10后, 细胞增殖、抗衰老和成骨分化能力显著增强; ④HOXA10敲低的髌骨骨髓间充质干细胞/ β -磷酸三钙植入裸鼠背部皮下后, 成骨形成能力更强; ⑤上述结果表明, HOXA10是决定骨髓间充质干细胞增殖、抗衰老和成骨分化能力的关键调节基因。HOXA10基因修饰的髌骨骨髓间充质干细胞移植可作为颌颌面骨缺损修复的潜在应用策略。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 颌骨; 髌骨; 成骨分化; HOXA10; 颌颌面骨修复; 生物支架; 工程化干细胞

HOXA10 gene-modified bone marrow mesenchymal stem cells promote bone regeneration

Ge Xiao^{1, 2, 3}, Zhao Zhuangzhuang^{1, 2, 3}, Guo Shuyu^{2, 3, 4}, Xu Rongyao^{1, 2, 3}¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China;²State Key Laboratory Cultivation Base of Research, Prevention and Treatment for Oral Diseases, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; ³Jiangsu ProvinceEngineering Research Center of Stomatological Translational Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; ⁴Department of Orthodontics, Affiliated

Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

南京医科大学附属口腔医院, ¹口腔颌面外科, ⁴口腔正畸科, 江苏省南京市 210029; ²口腔疾病研究与防治国家级重点实验室培育建设点, 江苏省南京市 210029; ³江苏省口腔转化医学工程研究中心, 江苏省南京市 210029

第一作者: 葛霄, 男, 1999年生, 汉族, 江苏省南京市人, 南京医科大学在读硕士, 主要从事颌面部发育的研究。

通讯作者: 徐荣耀, 博士, 副教授, 硕士生导师, 南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科, 江苏省南京市 210029; 口腔疾病研究与防治国家级重点实验室培育建设点, 江苏省南京市 210029; 江苏省口腔转化医学工程研究中心, 江苏省南京市 210029

<https://orcid.org/0009-0005-8241-9992> (葛霄)

基金资助: 国家自然科学基金项目(82270943), 项目负责人: 郭舒瑜

引用本文: 葛霄, 赵状状, 郭舒瑜, 徐荣耀. HOXA10 基因修饰骨髓间充质干细胞促进骨再生 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(36):7701-7708.



Ge Xiao, Master candidate, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; State Key Laboratory Cultivation Base of Research, Prevention and Treatment for Oral Diseases, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; Jiangsu Province Engineering Research Center of Stomatological Translational Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Xu Rongyao, PhD, Associate professor, Master's supervisor, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Affiliated Stomatological Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; State Key Laboratory Cultivation Base of Research, Prevention and Treatment for Oral Diseases, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China; Jiangsu Province Engineering Research Center of Stomatological Translational Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Autologous or artificial bone grafts have been widely used to repair maxillofacial bone defects clinically, but these methods still suffer from insufficient osteogenesis. Bone marrow mesenchymal stem cells play a key role in the bone formation. Notably, ectoderm-derived jaw bone marrow mesenchymal stem cells have stronger proliferation and osteogenic differentiation capacity compared with mesoderm-derived iliac bone marrow mesenchymal stem cells, elucidating the key mechanisms involved. It is expected to provide a new strategy for the repair of craniomaxillofacial bone defects.

OBJECTIVE: To compare the biological differences between human jaw bone marrow mesenchymal stem cells and iliac bone marrow mesenchymal stem cells and identify the key regulatory genes.

METHODS: (1) Jaw bone and iliac bone were collected from three patients with alveolar cleft. Primary bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured. Cell proliferation ability was detected by colony formation assay. Cell senescence was detected by β -galactosidase staining assay. Senescence and osteogenesis-related protein expression levels were detected by western blot assay. Osteogenic ability was detected by alizarin red staining after osteogenic induction solution treatment. (2) Jaw bone marrow mesenchymal stem cells and iliac bone marrow mesenchymal stem cells were subjected to transcriptome and differential gene expression analysis to find the 20 genes with the largest differential expression and identify the key regulatory factors. (3) The gene in iliac bone marrow mesenchymal stem cells were knocked down to comparatively analyze the changes in self-renewal, anti-aging and osteogenic capacity of iliac bone marrow mesenchymal stem cells. (4) The gene-edited iliac bone marrow mesenchymal stem cells were loaded into β -tricalcium phosphate scaffolds and implant into nude mice for 8 weeks. The scaffolds were stained with Masson staining and immunofluorescence staining to observe the difference in osteogenic capacity.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Jaw bone marrow mesenchymal stem cells have stronger proliferation, anti-aging and osteogenic differentiation abilities compared to iliac bone marrow mesenchymal stem cells. (2) By transcriptome analysis, we identified HOXA10 as a highly up-regulated core transcription factor in iliac bone marrow mesenchymal stem cells. (3) After knocking down HOXA10 in iliac bone marrow mesenchymal stem cells, we observed a significant increase in proliferation, anti-aging, and osteogenic differentiation abilities. (4) After HOXA10 knocked-down iliac bone marrow mesenchymal stem cells/ β -tricalcium phosphate was implanted subcutaneously on the back of nude mice, and their bone formation ability was stronger. (5) The above results suggest that HOXA10 is a key regulatory gene that determines the proliferative, anti-aging and osteogenic differentiation abilities of bone marrow mesenchymal stem cells. HOXA10 gene-modified iliac bone marrow mesenchymal stem cell transplantation can be used as a potential application strategy for repairing maxillofacial bone defects.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cell; jaw bone; iliac bone; osteogenic differentiation; HOXA10; cranio-maxillofacial bone repair; biological scaffold; engineered stem cell

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 82270943 (to GSY)

How to cite this article: GE X, ZHAO ZZ, GUO SY, XU RY. HOXA10 gene-modified bone marrow mesenchymal stem cells promote bone regeneration. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(36):7701-7708.

0 引言 Introduction

颌面部骨缺损是临床上常见的严重疾病，通常由创伤、先天畸形、肿瘤和感染引起^[1]。颌面部骨缺损患者通常表现为咀嚼功能障碍和外观异常，严重影响社交和心理健康^[2]。目前，自体骨以及人工骨被广泛应用于颌面骨缺损的重建^[3]。在自体骨移植中，髂骨因免疫排斥小且获取方便的优点，常用于修复颌面术中的颌骨缺损，如牙槽突裂或种植手术^[4-5]。然而，髂骨移植通常表现出明显的骨吸收和成骨能力不足^[6]。因此，提高髂骨移植后的成骨能力有利于实现更好的颌骨缺损治疗效果。

在胚胎发育过程中，颌骨源自外胚层的颅神经嵴，而躯干和四肢骨骼则起源于中胚层，这导致了颌骨和髂骨之间在骨结构和生物功能上存在显著差异^[6-7]。来自颌骨的骨髓间充质干细胞 (jaw bone marrow mesenchymal stem cells, J-BMSCs) 比来源于髂骨的骨髓间充质干细胞 (ilium bone marrow mesenchymal stem cells, I-BMSCs) 具有更强的干性表达、抗衰老能力和成骨分化潜能^[8]。先前的研究表明，通过激活关键转录因子不仅可以上调骨髓间充质干细胞的干性表达和成骨能力，而且可以抑制衰老标志物的表达^[9]。因此，鉴别出促进 I-BMSCs 干性表达、抗衰老和成骨分化潜能的关键转录因子，可能是改善髂骨成骨能力的关键。

在人体中，HOX 基因是广泛编码含有同源结构域的

转录因子家族，广泛参与成骨的分化过程^[10-11]。人体共有 39 个 HOX 基因，分为 HOXA、HOXB、HOXC 和 HOXD 4 个家族^[12-13]。在这些 HOX 基因中，HOXA10 能够有效抑制血干细胞的异常增殖和分化，并通过直接调节间充质细胞中的成骨基因表达来控制成骨分化^[11, 14]。此研究通过分析 J-BMSCs 和 I-BMSCs 在干性、抗衰老和成骨分化等生物学功能方面的差异，并鉴定出 HOXA10 是造成 J-BMSCs 和 I-BMSCs 特性差异的关键转录因子，为进一步通过 HOXA10 基因编辑的方式改善骨缺损修复效果提供新的治疗策略。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验和体内动物实验，多组比较采用方差分析，组间比较采用独立样本 *t* 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 12 月至 2024 年 2 月在南京医科大学五台校区江苏省口腔疾病研究重点实验室 (口腔疾病研究与防治国家级重点实验室培育建设点) 完成。

1.3 材料

1.3.1 临床样本 从南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科选择 3 例接受二期牙槽骨移植手术的牙槽突裂患者，临床信息见表 1。颌骨取自牙槽裂区，髂骨取自髂嵴区。所有实验均经南京医科大学伦理委员会批准进行，审查编号：南医大伦审 (2020)182 号，参与试验的患病个体及

表 1 | 患者的临床信息

Table 1 | Clinical information of patients

案例编号	性别	年龄(岁)	诊断
1	男	11	双侧牙槽突裂
2	男	11	双侧牙槽突裂
3	男	9	右侧牙槽突裂

其监护人对试验过程完全知情同意, 均签署知情同意书。

1.3.2 主要仪器及试剂 正置荧光显微镜(德国, Leica); 倒置光学显微镜(德国, Carl Zeiss); 凝胶成像仪(中国, Tanon5800); si-HOXA10(中国, 锐博公司); 转染试剂(美国, 赛默飞 Lipofectamine 2000); 0.25% 水杨酸甲酯染液(美国, Sigma); β -半乳糖苷酶染色试剂盒(中国, GenMed Scientifics Inc.); 维生素 C(美国, Sigma); 2% 茜素红 S 染液(美国, Sigma); NANOG 抗体(美国, Santa Cruz); SOX2 抗体(英国, Abcam); OCT4 抗体(英国, Abcam); P53 抗体(美国, Proteintech); RUNX2 抗体(美国, Cell Signaling Technology); 骨钙素抗体(中国, Bioss); β -actin 抗体(中国, Boster Biological Technology); 绵羊抗兔二抗(中国, 中山金桥生物技术); ECL 检测试剂盒(美国, Millipore)。

1.3.3 实验动物 SPF 级无胸腺 BALB/c 裸鼠 10 只, 雄性, 6 周龄, 体质量 (15 \pm 5) g, 购于南京医科大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(苏)2021-0001。裸鼠饲养环境为屏蔽环境, 自然昼夜条件, 明暗周期 12 h, 温度 (25 \pm 2) $^{\circ}$ C, 自由饮水, 湿度 40%–50%。所有动物操作经南京医科大学实验动物福利伦理委员会审查, 按照南京医科大学动物护理委员会的指导方针进行。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养与处理 通过组织块培养法提取骨髓间充质干细胞^[15]。将颌骨和髂骨样本切成直径约 0.5 mm 的小块, 然后黏附在培养板上, 约 0.5 h 后, 用含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 3 d, 每 3 d 更换 1 次培养基, 去除非贴壁细胞。为了确保表型的一致性, 在随后的实验中, 均使用原代培养第 3–5 代骨髓间充质干细胞。

1.4.2 细胞集落形成实验 采用集落形成实验来评估骨髓间充质干细胞的增殖能力。将骨髓间充质干细胞分为 2 组: J-BMSCs 组和 I-BMSCs 组, 每组 3 个 60 mm 无菌培养皿, 每皿接种 1 \times 10³ 个细胞, 细胞在 DMEM 完全培养基中培养 12 d 后, 在 40 g/L 多聚甲醛中固定 30–60 min, PBS 洗涤 1 次, 然后用 0.25% 水杨酸甲酯染液染色 10–20 min, PBS 洗涤细胞数次, 晾干, 拍照, 对包含 50 个或更多细胞的聚集体进行计数。

1.4.3 细胞 β -半乳糖苷酶染色 使用 β -半乳糖苷酶染色试剂盒, 按照说明书对 J-BMSCs 和 I-BMSCs 进行 β -半乳糖苷酶染色, 倒置显微镜观察。

1.4.4 成骨诱导和茜素红染色 将 J-BMSCs 和 I-BMSCs 在含有 50 μ g/mL 维生素 C、10 nmol/L 地塞米松和 10 mmol/L β -甘油磷酸酯的成骨诱导培养基中进行培养, 每 3 d 换液 1 次, 培养 14 d 后通过茜素红染色评估骨髓间充质干细胞的矿化能力。茜素红染色步骤如下: 首先将细胞在体积分数 70% 无水乙醇中固定 30 min, 然后在室温下用 2% 茜素红染液染色 10 min, 在光学显微镜下观察, 钙化结节用 0.5 mol/L HCl/5% 十二烷基硫酸钠洗脱, 然后将 570 nm 处的吸光度值与标准曲线比较进行定量。

1.4.5 蛋白印迹分析 将 T25 培养瓶中成骨分化 14 d 的 J-BMSCs 和 I-BMSCs 用细胞裂解液进行裂解, 使用 BCA 试剂盒测定细胞蛋白质浓度。蛋白提取物经过 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后转移到 PVDF 膜上, 将膜在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 随后在 4 $^{\circ}$ C 与不同的一抗孵育过夜。抗体及稀释浓度如下: NANOG、SOX2、OCT4、P53、RUNX2、骨钙素的稀释浓度为 1 : 250, β -actin 的稀释浓度为 1 : 1 000, 用绵羊抗兔二抗室温孵育 1 h, 使用 ECL 检测试剂盒在 ABI 系统上进行增强化学发光并可视化。使用 Image J 软件进行 Western blot 的定量分析, β -actin 蛋白水平作为内参来量化相对蛋白水平。

1.4.6 RNA 测序分析 从 J-BMSCs 和 I-BMSCs 中提取和分离总 RNA, 按照既往文献描述的方法构建了链特异性 cDNA 文库^[16]。使用 Illumina HiSeq2000 测序仪(LC Biotech, 杭州, 中国)进行测序, 读长为 100 bp, 双端读取。从原始读取数据中去除接头、低质量标签和污染物。使用 TopHat 2.0.9 软件对经过质量控制的序列与 GENCODE Release 19 中的人类基因组序列进行比对。转录本通过 Cufflinks 软件包进行归一化和注释^[17]。使用 edgeR 软件包进行差异表达分析。筛选出 J-BMSCs 和 I-BMSCs 之间 $P < 0.05$ 和 $FC \geq 1.5$ 的 mRNA, 并确定为差异表达 RNA。基于分析结果构建聚类分析和热图, 京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集通路分析潜在功能。

1.4.7 细胞转染 I-BMSCs 在含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。在转染前, 第 3 代 I-BMSCs 以 5 \times 10⁴ 个/孔密度接种到 12 孔培养板中。根据 Lipofectamine 2000 说明, 将 siRNA(si-HOXA10) 及其阴性对照转染到 I-BMSCs 中, 每孔加入 5 μ L 脂质体和 5 μ L siRNA(浓度为 100 pmol/L, 用 OPTI-MEM 稀释)。6 h 后, 将转染培养基更换为 DMEM 完全培养基。将转染后的 si-HOXA10 组及阴性对照组 I-BMSCs 分别按上述实验方法进行集落形成实验、 β -半乳糖苷酶染色、成骨诱导后茜素红染色和蛋白印迹分析。

1.4.8 si-HOXA10-BMSCs/ β -TCP 支架复合物的制备 将 β -磷酸三钙支架 (上海伊普瑞生物科技有限公司, EPRUI-NTCP-02) 制成直径 5 mm、高 4 mm 大小, 于无菌 10% 多聚赖氨酸中浸泡 20 min, 室温自然晾干, 然后高压蒸汽消毒。取第 5 代经 si-HOXA10 及阴性对照处理的 I-BMSCs, 用不含血清的 DMEM 培养基重悬至细胞浓度为 $2 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$, 使用 1 mL 注射器将 100 μL 细胞悬液滴入无菌 β -磷酸三钙支架上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱孵育 4 h, 使细胞与支架结合, 然后加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 让支架完全浸没在上述培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱培养 48–72 h。

1.5 动物实验 BALB/c 裸鼠按完全随机化方法, 随机分为 si-HOXA10 组和空白对照组, 每组 5 只, 分别将 si-HOXA10-BMSCs/ β -磷酸三钙, NC-BMSCs/ β -磷酸三钙支架复合物植入裸鼠背部皮下。在整个实验期间, 动物均常规饮食。植入 8 周后, 取出支架复合物进行组织学染色, 用 40 g/L 多聚甲醛固定 24–48 h, 用 10% 乙二胺四乙酸脱钙, 然后包埋在石蜡中, 切成 4 μm 厚的切片, 通过 Masson 染色观察小梁骨生成情况, 免疫荧光染色观察成骨分化情况, 分别以 RUNX2 阳性细胞数量及骨钙素阳性区域平均吸光度为量化指标。上述量化指标均用 Image J 1.8.0 软件进行分析。

1.6 主要观察指标 J-BMSCs 和 I-BMSCs 的增殖、抗衰老、成骨分化能力差异; I-BMSCs 和 J-BMSCs 的转录组分析; HOXA10 敲低对 I-BMSCs 增殖、抗衰老和成骨潜能的影响

1.7 统计学分析 实验所有数据均使用 SPSS 24.0 统计软件进行统计学处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过南京医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 J-BMSCs 和 I-BMSCs 的增殖、抗衰老和成骨分化能力差异

2.1.1 细胞学染色观察结果 集落形成实验观察到 J-BMSCs 比 I-BMSCs 具有更多的集落形成单位 (图 1A), 表明 J-BMSCs 具有更强的增殖能力。 β -半乳糖苷酶染色发现 J-BMSCs 比 I-BMSCs 具有更强的抗衰老能力 (图 1B)。此外, 茜素红染色观察发现 J-BMSCs 比 I-BMSCs 形成更多的钙沉积 (图 1C)。

2.1.2 Western blot 实验检测相关蛋白表达 I-BMSCs 中 NANOG、SOX2 和 OCT4 干性蛋白表达水平低于 J-BMSCs (图 2A)。然而, I-BMSCs 中衰老相关蛋白 P53 表达水平远高于 J-BMSCs (图 2A)。同时, I-BMSCs 中成骨相关蛋白 RUNX2、骨钙素表达水平低于 J-BMSCs (图 2B)。综上, 与 I-BMSCs 相比, J-BMSCs 表现出更强的增殖、抗衰老和成骨分化能力。

2.2 I-BMSCs 和 J-BMSCs 的转录组分析 对 I-BMSCs 和 J-BMSCs 进行了转录组和差异基因表达分析。在 J-BMSCs 和 I-BMSCs 之间鉴定出了 15 276 个差异表达基因 ($\text{FDR} < 0.05$, $\text{FC} > 1.5$)。为进一步分析差异表达基因的潜在功能, 采用 KEGG 通路分析识别这些基因的生物通路。下调差异表达基因中富集了 19 条通路和 7 种疾病, 而上调差异表达基因中富集了 38 条通路和 6 种疾病 (图 3A, B)。细胞外基质-受体相互作用通路 (KEGG 条目: hsa04512) 在下调差异表达基因显著富集, 有研究表明该通路参与调节细胞衰老^[18]。还发现胰岛素分泌 (KEGG 条目: hsa04911) 和 PI3K-Akt 信号通路 (KEGG 条目: hsa04151) 也在其中富集。研究表明, 由胰岛素介导的 PI3K/AKT 信号通路是支持人类胚胎干细胞自我更新的中心通路, 该实验验证了这个结果, 即 J-BMSCs 具有比 I-BMSCs 更高的增殖能力^[19]。还有证据显示, PI3K-Akt 通路参与抗衰老过程, 也和上述实验结果相符 (图 1)^[20]。另外, 其他抑制成骨分化相关的通路包括肿瘤坏死因子信号通路 (KEGG 条目: hsa04668)、核因子 κB 信号通路 (KEGG 条目: hsa04064) 和 PPAR 信号通路 (KEGG 条目: hsa03320)。有研究表明肿瘤坏死因子 α 对软骨形成的抑制作用由核因子 κB 通路控制^[21–22], 而 PPAR γ 作为脂肪生成的转录因子直接促进了脂肪生成, 抑制了骨髓间充质干细胞的成骨过程^[23]。为进一步探索 J-BMSCs 和 I-BMSCs 之间差异的潜在机制, 选择了差异表达最大的前 20 个基因, 鉴定出 HOXA10 基因作为潜在关键因子并进行后续研究 (图 3C)。

2.3 HOXA10 敲低增强了 I-BMSCs 的增殖、抗衰老和成骨潜能

2.3.1 体外细胞实验 经过上述的转录组分析, 鉴别出 HOXA10 基因可能在骨髓间充质干细胞差异特性中起重要作用。通过 siRNA 干扰技术将 I-BMSCs 中的 HOXA10 基因敲低, 集落形成实验显示 si-HOXA10 组 I-BMSCs 比阴性对照组形成更多的集落形成单位, 表明 si-HOXA10 处理的 I-BMSCs 具有更强的增殖能力 (图 4A)。 β -半乳糖苷酶染色显示 si-HOXA10 组老化细胞数量明显减少 (图 4B)。此外, si-HOXA10 组 I-BMSCs 中钙结节显著增加 (图 4C)。

2.3.2 Western blot 检测相关蛋白表达 si-HOXA10 组 I-BMSCs 的干性指标 NANOG、SOX2 和 OCT4 表达增加, 衰老指标 P53 表达减少 (图 5A)。同时, 在 I-BMSCs 中敲低 HOXA10 促使成骨相关指标 RUNX2 和骨钙素表达增加 (图 5B)。上述数据表明敲低 HOXA10 能够增强 I-BMSCs 的增殖、抗衰老和成骨分化能力。

2.4 在 I-BMSCs 中敲低 HOXA10 促进体内成骨

2.4.1 组织学染色观察体内成骨能力 为探索 HOXA10 敲低 I-BMSCs 的治疗潜力, 将 si-HOXA10 或阴性对照处理的 I-BMSCs 滴入 β -磷酸三钙支架中, 体外孵育 4 h 后植入裸

鼠背部皮肤, 培养 8 周后, 取出体内支架复合物并进行组织学分析 (图 6A)。Masson 染色显示, si-HOXA10 组支架周围观察到更多的胶原纤维 (图 6B) 和骨小梁 (图 6C)。

2.4.2 免疫荧光染色观察成骨分化 使用免疫荧光技术检测 HOXA10 敲低对 I-BMSCs 体内成骨分化的影响, 结果显示 si-HOXA10 组比阴性对照组有更高的 RUNX2 和骨钙素表达 (图 7A, B)。

3 讨论 Discussion

因创伤、肿瘤切除或先天畸形而导致的颌面骨缺损的重建和修复一直是临床医生面临的重大难题。尽管髂骨具有骨量充足、无排斥反应以及与颌骨类似的自然曲度和厚度等明显优势, 但在移植髂骨后发现骨形成不足的问题, 这可能导致二次骨塌陷并造成面部畸形^[24]。为了探索 I-BMSCs 移植后骨生成不足的原因, 鉴别出了 HOXA10 是最有潜力的差异表达基因。通过下调 I-BMSCs 中的 HOXA10 表达, 发现 I-BMSCs 的成骨分化能力在体内和体外均显著提高, 因此 HOXA10 修饰的基因治疗有望应用于临床提高髂骨移植修复的治疗效果。

骨髓间充质干细胞的多能性、免疫调节以及释放营养因子等特性被广泛应用在许多疾病治疗中。早期研究表明, 与颅颌面部来源骨髓间充质干细胞相比, 来自大鼠四肢的骨髓间充质干细胞表现出较低的成骨潜能、自噬能力、抗凋亡能力和细胞招募能力^[6, 25-26]。此研究发现 I-BMSCs 与 J-BMSCs 相比, 增殖、抗衰老和成骨能力明显减弱, 与上述研究一致。目前已确定干性基因如 NANOG、SOX2 和 OCT4 作为特定的胚胎干细胞标记物, 对干细胞的自我更新和增殖调节至关重要^[26]。作为肿瘤抑制蛋白, P53 在应对 DNA 损伤中发挥着诱导细胞周期停滞作用, 被认为是参与衰老过程的关键因子^[27-28]。与 J-BMSCs 相比, I-BMSCs 的 NANOG、SOX2 和 OCT4 表达水平较低, 但 P53 表达水平较高。RUNX2 和骨钙素作为成骨的关键调节因子^[29-30], 在 I-BMSCs 中显示出较低水平。以上结果说明, 髂骨移植后的成骨能力下降可能源于 I-BMSCs 自我更新、抗衰老和成骨分化能力的不足。

转录组分析表明, I-BMSCs 和 J-BMSCs 的基因表达确实存在显著差异。I-BMSCs 与 J-BMSCs 相比, 肿瘤坏死因子和核因子 κ B 信号通路活性明显增强。研究表明, 刺激肿瘤坏死因子信号通路显著抑制骨形态发生蛋白 2 诱导的成骨细胞分化, 并通过促进核因子 κ B 的磷酸化导致碱性磷酸酶活性降低^[31]。KEGG 分析显示, I-BMSCs 中 PPAR 信号通路的激活, 提示 I-BMSCs 更倾向于分化为脂肪细胞而不是成骨细胞。另外, 除了 HOXA10 外, 还发现 RIMS1 在 I-BMSCs 中的表达显著高于 J-BMSCs。RIMS1 作为调节突触传递的 Ras 超家族成员^[32-33], 已有报道参与调

节神经功能^[34], 表明 I-BMSCs 在骨内神经调节方面可能比 J-BMSCs 具有更强的作用。值得注意的是, 最近的病例报告还揭示了 RIMS1 在多发性纤维性骨发育不良中的突变^[35]。然而, RIMS1 是否参与骨髓间充质干细胞的成骨分化或多发性纤维性骨发育不良的病理过程, 仍需要进一步研究以探索潜在机制。

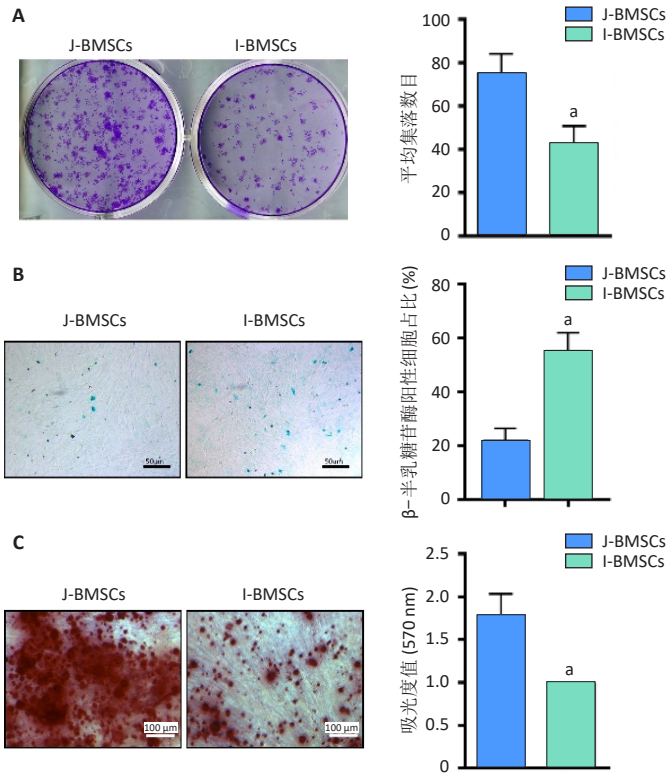
研究表明, HOXA10 介导了四肢的发育^[36], 并通过调控 β -连环蛋白的定位和 DKK1 的表达抑制成骨分化^[37-38]。因此, 作者推测 HOXA10 可能是调节 J-BMSCs 和 I-BMSCs 差异特性的关键因子。通过在 I-BMSCs 中敲低 HOXA10, 观察到 I-BMSCs 在体外显示出了较强的增殖、抗衰老和成骨分化能力。此外, 通过构建负载 I-BMSCs 的 β -磷酸三钙支架, 观察到在 si-HOXA10-I-BMSCs/ β -磷酸三钙组有更多的骨形成, 表明 HOXA10 敲低的 I-BMSCs 可能有望应用于修复颌面骨缺损。

目前, 基因治疗已经应用于一些临床疾病, 包括骨质疏松症、骨溶解症、成骨不全症等^[39]。已经发现了许多靶向骨愈合途径的基因, 如骨形态发生蛋白、血小板源性生长因子、血管内皮生长因子和 RUNX2^[40]。与未经基因修饰的传统自体骨移植治疗颌面骨缺损相比, 在 I-BMSCs 中敲低 HOXA10 表达可以减少骨吸收并提高成骨效率^[41]。此外, 髂骨具有容易获取和缺乏免疫排斥的特性, 进一步赋予 HOXA10 修饰治疗在骨缺损移植中的安全性和有效性。然而, 有较早的研究报告了 HOXA10 基因通过激活与成骨相关的基因如 RUNX2、碱性磷酸酶、骨唾液蛋白和骨钙素来促进成骨细胞分化^[14, 42]。因此, 需要进一步研究以探索 HOXA10 在不同胚层来源骨髓间充质干细胞中的潜在机制。

该研究的局限性主要体现在两个方面: 其一, 缺乏对 HOXA10 调控机制的探索, 有关 HOXA10 如何调节骨髓间充质干细胞增殖、衰老和成骨分化的分子机制, 有待于后续进一步研究; 其二, 干细胞负载支架移植体内的治疗方式, BMSCs 的存活率如何尚不能明确。此外, 基因编辑的治疗策略可能有致畸致癌等风险, 体内治疗的安全性仍有待进一步评估。总的来说, 实验证实了 HOXA10 在 I-BMSCs 和 J-BMSCs 中的差异表达, 抑制 I-BMSCs 中 HOXA10 表达可增强细胞增殖、抗衰老和成骨分化能力。采用敲低 HOXA10 以强化 I-BMSCs 干细胞特性来促进骨再生的治疗策略, 或是重建颌面骨缺损的有效方法。

作者贡献: 葛霄负责实验操作、分析数据并撰写论文; 赵状协助葛霄进行动物研究和组织学研究; 郭舒瑜进行生物信息学和统计分析; 徐荣耀和郭舒瑜负责构思实验、分析数据并修订论文。所有作者都阅读并批准了最终的论文。

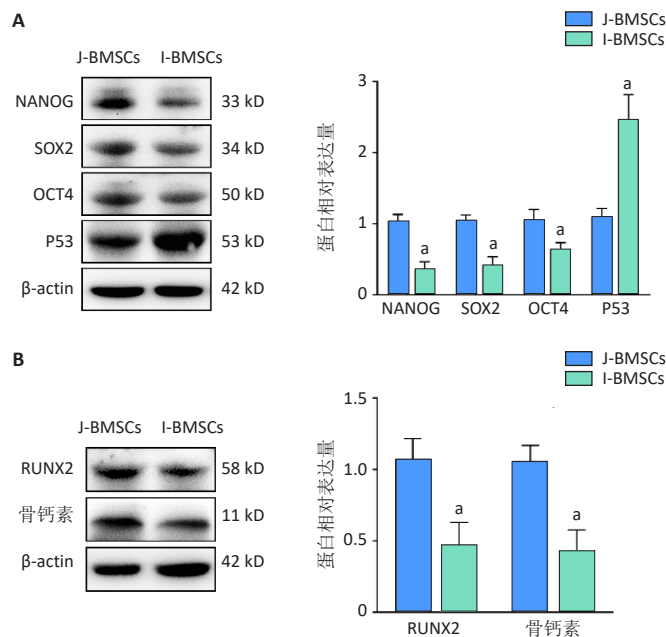
利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。



图注：图 A 为 J-BMSCs 和 I-BMSCs 形成的集落及计数；B 为 J-BMSCs 和 I-BMSCs 的 β-半乳糖苷酶染色及阳性细胞数；C 为诱导成骨分化 14 d 后，茜素红染色及定量结果。与 J-BMSCs 相比，^a*P* < 0.05。

图 1 | 颌骨骨髓间充质干细胞 (J-BMSCs) 和髂骨骨髓间充质干细胞 (I-BMSCs) 的细胞学染色

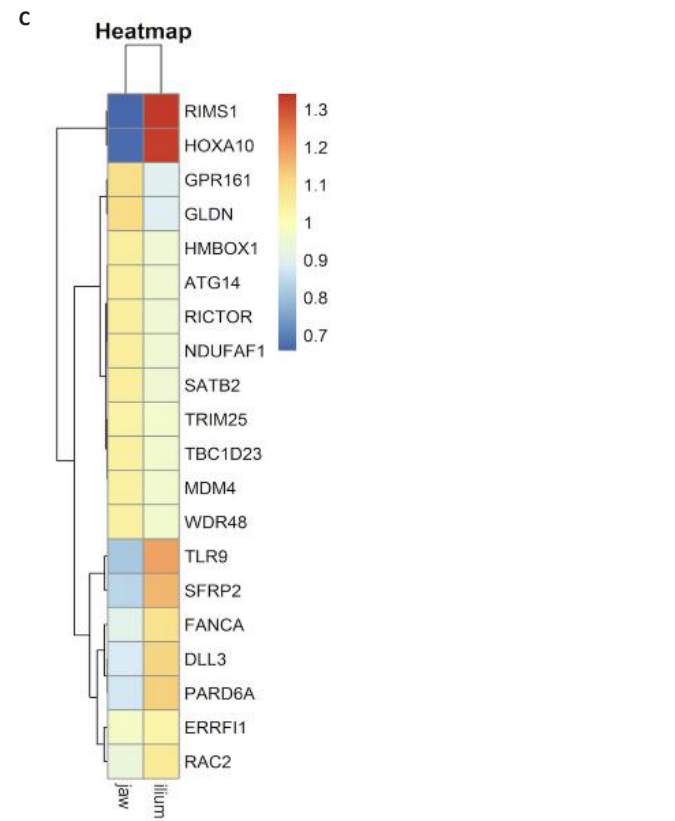
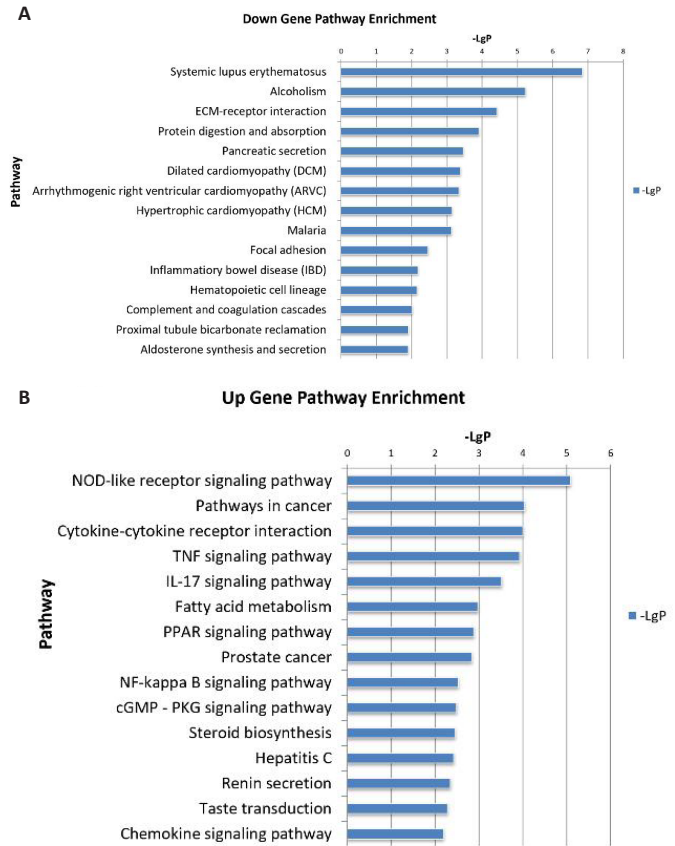
Figure 1 | Cytological staining of jaw bone marrow mesenchymal stem cells (J-BMSCs) and iliac bone marrow mesenchymal stem cells (I-BMSCs)



图注：图 A 为 I-BMSCs 和 J-BMSCs 中 NANOG、SOX2、OCT4、P53 的蛋白表达水平；B 为 I-BMSCs 和 J-BMSCs 中 RUNX2、骨钙素的蛋白表达水平。与 J-BMSCs 相比，^a*P* < 0.05。

图 2 | 颌骨骨髓间充质干细胞 (J-BMSCs) 和髂骨骨髓间充质干细胞 (I-BMSCs) 的蛋白印迹分析

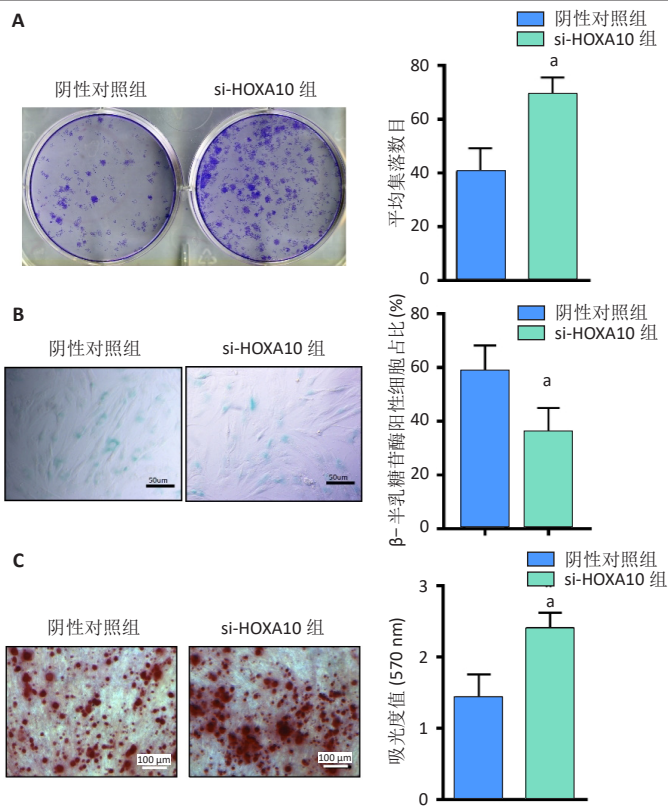
Figure 2 | Western blot analysis of jaw bone marrow mesenchymal stem cells (J-BMSCs) and iliac bone marrow mesenchymal stem cells (I-BMSCs)



图注：图 A 为下调差异表达基因的 KEGG 通路分析；B 为上调差异表达基因的 KEGG 通路分析；C 为 J-BMSCs 和 I-BMSCs 差异表达最大的前 20 个基因的热图。

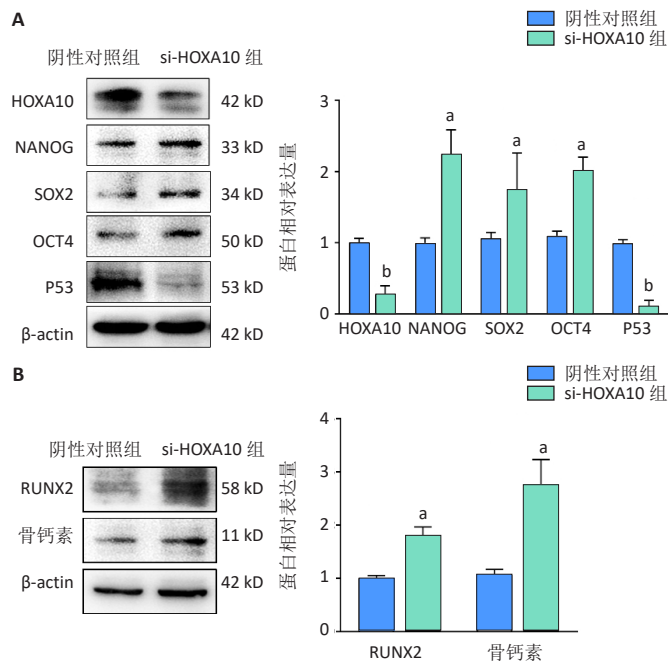
图 3 | 颌骨骨髓间充质干细胞 (J-BMSCs) 和髂骨骨髓间充质干细胞 (I-BMSCs) 的转录组分析

Figure 3 | Transcriptome analysis of jaw bone marrow mesenchymal stem cells (J-BMSCs) and iliac bone marrow mesenchymal stem cells (I-BMSCs)



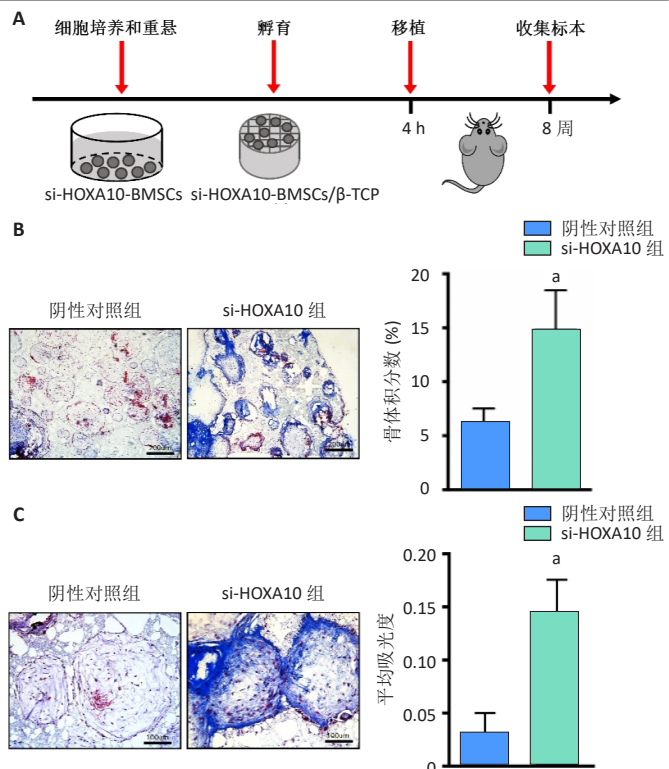
图注：图 A 为 si-HOX10 组和阴性对照组 I-BMSCs 的集落形成能力；B 为 si-HOX10 组和阴性对照组 I-BMSCs 的 β-半乳糖苷酶染色及阳性细胞数；C 为 si-HOX10 组和阴性对照组 I-BMSCs 茜素红染色。与阴性对照组相比，^a $P < 0.05$ 。

图 4 | 敲低 HOX10 后髌骨骨髓间充质干细胞 (I-BMSCs) 的细胞学染色
Figure 4 | Cytological staining of iliac bone marrow mesenchymal stem cells (I-BMSCs) after knockdown of HOX10



图注：图 A 为 si-HOX10 组和阴性对照组 I-BMSCs 中 NANOG、SOX2、OCT4、P53 蛋白表达水平；B 为 si-HOX10 组和阴性对照组 I-BMSCs 中 RUNX2、骨钙素蛋白表达水平。与阴性对照组相比，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。

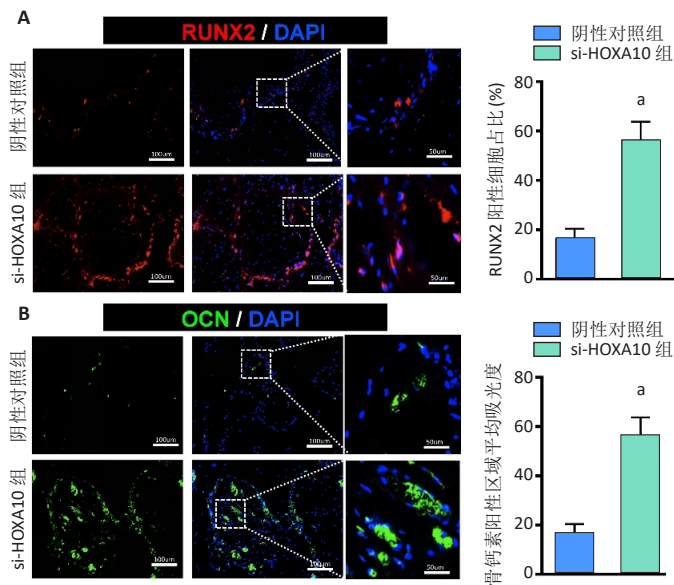
图 5 | 敲低 HOX10 后髌骨骨髓间充质干细胞 (I-BMSCs) 的蛋白印迹分析
Figure 5 | Western blot analysis of iliac bone marrow mesenchymal stem cells (I-BMSCs) after HOX10 knockdown



图注：图 A 为实验流程图；B 为 Masson 染色的代表性低倍视野图像，显示 si-HOX10 处理的 I-BMSCs 周围有更多的骨形成，右侧为骨体积 (BV) 与总体积 (TV) 比值的定量分析；C 为部分放大的 Masson 染色图像显示新形成的小梁骨，并通过平均吸光度量化小梁骨。与阴性对照组相比，^a $P < 0.05$ 。β-TCP：β-磷酸三钙。

图 6 | 敲低 HOX10 后髌骨骨髓间充质干细胞 (I-BMSCs) 在体内成骨的 Masson 染色

Figure 6 | Masson staining of *in vivo* osteogenesis of iliac bone marrow mesenchymal stem cells (I-BMSCs) after knockdown of HOX10



图注：图 A 为免疫荧光染色显示 RUNX2 阳性的成骨前体细胞，并计算每个视野中前成骨细胞数量；B 为骨钙素 (OCN) 免疫荧光染色，并通过平均吸光度量化。与阴性对照组相比，^a $P < 0.01$ 。

图 7 | 敲低 HOX10 后髌骨骨髓间充质干细胞 (I-BMSCs) 在体内成骨的免疫荧光染色

Figure 7 | Immunofluorescence staining of iliac bone marrow mesenchymal stem cells (I-BMSCs) *in vivo* osteogenesis after knockdown of HOX10

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] SANGKERT S, KAMONMATTAYAKUL S, CHAI WL, et al. Modified porous scaffolds of silk fibroin with mimicked microenvironment based on decellularized pulp/fibronectin for designed performance biomaterials in maxillofacial bone defect. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(6):1624-1636.
- [2] DAS A, SEGAR CE, HUGHLEY BB, et al. The promotion of mandibular defect healing by the targeting of S1P receptors and the recruitment of alternatively activated macrophages. *Biomaterials*. 2013;34(38):9853-9862.
- [3] ZHANG Y, MA W, ZHAN Y, et al. Nucleic acids and analogs for bone regeneration. *Bone Res*. 2018;6:37.
- [4] PALANISAMY N, YANG J, SHEPHERD PDA, et al. The MD Anderson Prostate Cancer Patient-derived Xenograft Series (MDA PCa PDX) Captures the Molecular Landscape of Prostate Cancer and Facilitates Marker-driven Therapy Development. *Clin Cancer Res*. 2020;26(18):4933-4946.
- [5] LIU W, ZHANG L, XUAN K, et al. Alpl prevents bone ageing sensitivity by specifically regulating senescence and differentiation in mesenchymal stem cells. *Bone Res*. 2018;6:27.
- [6] DONG W, GE J, ZHANG P, et al. Phenotypic characterization of craniofacial bone marrow stromal cells: unique properties of enhanced osteogenesis, cell recruitment, autophagy, and apoptosis resistance. *Cell Tissue Res*. 2014;358(1):165-175.
- [7] GROENEVELDT LC, HERPELINCX T, MARÉCHAL M, et al. The Bone-Forming Properties of Periosteum-Derived Cells Differ Between Harvest Sites. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:554984.
- [8] AGHALOO TL, CHAICHANASAKUL T, BEZOUGLAIA O, et al. Osteogenic potential of mandibular vs. long-bone marrow stromal cells. *J Dent Res*. 2010;89(11):1293-1298.
- [9] ZHANG P, MEN J, FU Y, et al. Contribution of SATB2 to the stronger osteogenic potential of bone marrow stromal cells from craniofacial bones. *Cell Tissue Res*. 2012;350(3):425-437.
- [10] HRYCAJ SM, WELLIK DM. Hox genes and evolution. *F1000Res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-859.
- [11] BHATLEKAR S, FIELDS JZ, BOMAN BM. Role of HOX Genes in Stem Cell Differentiation and Cancer. *Stem Cells Int*. 2018;2018:3569493.
- [12] YE L, FAN Z, YU B, et al. Histone Demethylases KDM4B and KDM6B Promote Osteogenic Differentiation of Human MSCs. *Cell Stem Cell*. 2018;23(6):898-899.
- [13] QUINONEZ SC, INNIS JW. Human HOX gene disorders. *Mol Genet Metab*. 2014;111(1):4-15.
- [14] HASSAN MQ, TARE R, LEE SH, et al. HOXA10 controls osteoblastogenesis by directly activating bone regulatory and phenotypic genes. *Mol Cell Biol*. 2007;27(9):3337-3352.
- [15] ZHOU P, WU G, ZHANG P, et al. SATB2-Nanog axis links age-related intrinsic changes of mesenchymal stem cells from craniofacial bone. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(9):2006-2011.
- [16] BORODINA T, ADJAYE J, SULTAN M. A strand-specific library preparation protocol for RNA sequencing. *Methods Enzymol*. 2011;500:79-98.
- [17] TRAPNELL C, ROBERTS A, GOFF L, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc*. 2012;7(3):562-578.
- [18] CHO E, PARK J, KIM K, et al. Reelin Alleviates Mesenchymal Stem Cell Senescence and Reduces Pathological α -Synuclein Expression in an In Vitro Model of Parkinson's Disease. *Genes (Basel)*. 2021;12(7):1066.
- [19] MATHEW S, SUNDARARAJ S, MAMIYA H, et al. Regulatory interactions maintaining self-renewal of human embryonic stem cells as revealed through a systems analysis of PI3K/AKT pathway. *Bioinformatics*. 2014;30(16):2334-2342.
- [20] XIA W, HOU M. Macrophage migration inhibitory factor rescues mesenchymal stem cells from doxorubicin-induced senescence through the PI3K-Akt signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2018;41(2):1127-1137.
- [21] SULLIVAN CB, PORTER RM, EVANS CH, et al. TNF α and IL-1 β influence the differentiation and migration of murine MSCs independently of the NF- κ B pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(4):104.
- [22] LI X, REN G, CAI C, et al. TNF- α regulates the osteogenic differentiation of bone morphogenetic factor 9 adenovirus-transduced rat follicle stem cells via Wnt signaling. *Mol Med Rep*. 2020;22(4):3141-3150.
- [23] CHEN SC, BROOKS R, HOUSKEEPER J, et al. Metformin suppresses adipogenesis through both AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent mechanisms. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;440:57-68.
- [24] LI X, ZHENG Y, HOU L, et al. Exosomes derived from maxillary BMSCs enhanced the osteogenesis in iliac BMSCs. *Oral Dis*. 2020;26(1):131-144.
- [25] WANG F, ZHOU Y, ZHOU J, et al. Comparison of Intraoral Bone Regeneration with Iliac and Alveolar BMSCs. *J Dent Res*. 2018;97(11):1229-1235.
- [26] DONG W, ZHANG P, FU Y, et al. Roles of SATB2 in site-specific stemness, autophagy and senescence of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2015;230(3):680-690.
- [27] LI H, HU P, WANG Z, et al. Mitotic catastrophe and p53-dependent senescence induction in T-cell malignancies exposed to nonlethal dosage of GL-V9. *Arch Toxicol*. 2020;94(1):305-323.
- [28] KRENNING L, FERINGA FM, SHALTIEL IA, et al. Transient activation of p53 in G2 phase is sufficient to induce senescence. *Mol Cell*. 2014;55(1):59-72.
- [29] OURY F, KHRIMIAN L, DENNY CA, et al. Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell*. 2013;155(1):228-241.
- [30] MATSUMOTO Y, LA ROSE J, KENT OA, et al. Reciprocal stabilization of ABL and TAZ regulates osteoblastogenesis through transcription factor RUNX2. *J Clin Invest*. 2016;126(12):4482-4496.
- [31] LIU SP, WANG GD, DU XJ, et al. Triptolide inhibits the function of TNF- α in osteoblast differentiation by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2017;14(3):2235-2240.
- [32] PINTO D, DELABY E, MERICO D, et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet*. 2014;94(5):677-694.
- [33] DONG S, WALKER MF, CARRIERO NJ, et al. De novo insertions and deletions of predominantly paternal origin are associated with autism spectrum disorder. *Cell Rep*. 2014;9(1):16-23.
- [34] CHOE A, PHUN HQ, TIEU DD, et al. Expression patterns of Hox10 paralogous genes during lumbar spinal cord development. *Gene Expr Patterns*. 2006;6(7):730-737.
- [35] LIN T, LI XY, ZOU CY, et al. Discontinuous polyostotic fibrous dysplasia with multiple systemic disorders and unique genetic mutations: A case report. *World J Clin Cases*. 2020;8(23):6197-6205.
- [36] VILLAVICENCIO-LORINI P, KUSS P, FRIEDRICH J, et al. Homeobox genes d11-d13 and a13 control mouse autopod cortical bone and joint formation. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1994-2004.
- [37] WANG C, LI Y, YU K, et al. HOXA10 inhibit the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by regulating β -catenin localization and DKK1 expression. *Connect Tissue Res*. 2021;62(4):393-401.
- [38] SUN J, ERMANN J, NIU N, et al. Histone demethylase LSD1 regulates bone mass by controlling WNT7B and BMP2 signaling in osteoblasts. *Bone Res*. 2018;6:14.
- [39] ATASOY-ZEYBEK A, KOSE GT. Gene Therapy Strategies in Bone Tissue Engineering and Current Clinical Applications. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1119:85-101.
- [40] COLLON K, GALLO MC, LIEBERMAN JR. Musculoskeletal tissue engineering: Regional gene therapy for bone repair. *Biomaterials*. 2021;275:120901.
- [41] ZHANG S, ZHANG X, LI Y, et al. Clinical Reference Strategy for the Selection of Treatment Materials for Maxillofacial Bone Transplantation: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Tissue Eng Regen Med*. 2022;19(3):437-450.
- [42] YERGES LM, KLEI L, CAULEY JA, et al. High-density association study of 383 candidate genes for volumetric BMD at the femoral neck and lumbar spine among older men. *J Bone Miner Res*. 2009;24(12):2039-2049.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZLJ)