

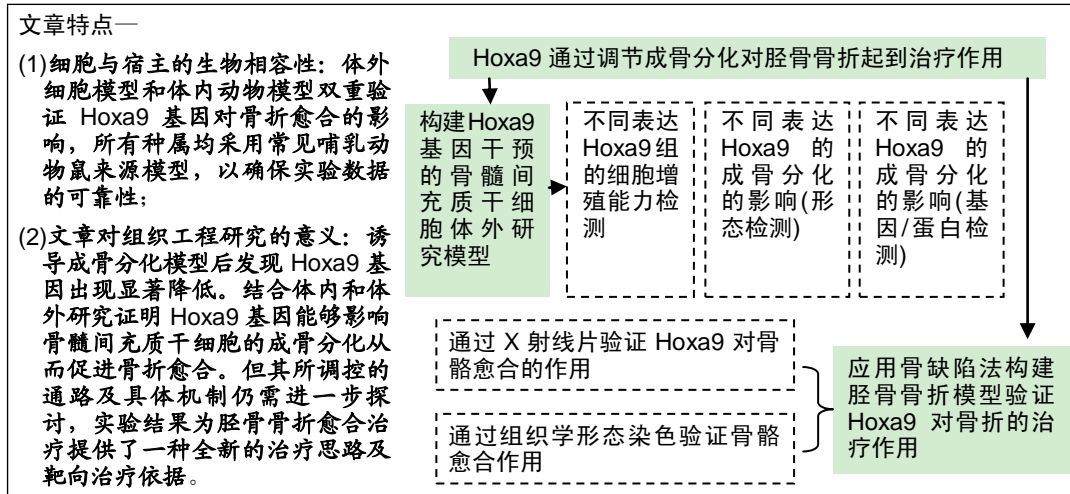
# 沉默Hoxa9基因可促进胫骨骨折后的成骨分化及骨折愈合

张超, 李兴勇, 马贵福, 普星宇, 骆文远(甘肃省人民医院骨科, 甘肃省兰州市 730000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2919

ORCID: 0000-0002-1150-6184(张超)

文章快速阅读:



## 文章特点一

- (1)细胞与宿主的生物相容性: 体外细胞模型和体内动物模型双重验证 Hoxa9 基因对骨折愈合的影响, 所有种属均采用常见哺乳动物鼠来源模型, 以确保实验数据的可靠性;
- (2)文章对组织工程研究的意义: 诱导成骨分化模型后发现 Hoxa9 基因出现显著降低。结合体内和体外研究证明 Hoxa9 基因能够影响骨髓间充质干细胞的成骨分化从而促进骨折愈合。但其所调控的通路及具体机制仍需进一步探讨, 实验结果为胫骨骨折愈合治疗提供了一种全新的治疗思路及靶向治疗依据。

张超, 男, 1983 年生, 硕士, 甘肃省人, 汉族, 主治医师, 主要从事骨科临床方向工作。

通讯作者: 骆文远, 主任医师, 甘肃省人民医院骨科, 甘肃省兰州市 730000

文献标识码:A

投稿日期: 2019-11-19

送审日期: 2019-11-22

采用日期: 2020-02-12

在线日期: 2020-06-20



## 文题释义:

**同源盒基因:** 是一类控制胚胎发育和调节细胞分化的高度保守基因。同源盒 A9 基因位于同源盒 A 簇的 5' 端, 其异常高表达与包括白血病、骨折损伤等疾病相关。

**骨髓间充质干细胞:** 间充质干细胞是骨髓基质干细胞, 是人们在哺乳动物的骨髓基质中发现的一种具有分化形成骨、软骨、脂肪、神经及成肌细胞的多种分化潜能的细胞亚群。

## 摘要

**背景:** 研究表明, Hoxa10 基因受到 miRNA 的调节后与成骨分化存在一定的关联性, 但有关 Hoxa9 在成骨分化和胫骨骨折愈合中的表达和功能尚未见报道。

**目的:** 初步探讨 Hoxa9 对外周骨髓间充质干细胞成骨分化的影响及其体内模型的骨折损伤的治疗作用。

**方法:** ①体外实验: 在成骨诱导培养基中培养小鼠骨髓间充质干细胞, 分别进行 Hoxa9 基因被 shHoxa9 沉默或被 MSCV-Hoxa9 过表达处理; ②体内实验: 构建胫骨骨折模型大鼠, 分别用 Hoxa9 和 shHoxa9 干预。

**结果与结论:** ①体外实验 qRT-PCR 及 Western blot 检测显示, Hoxa9 的过表达能够明显抑制骨髓间充质干细胞的成骨分化( $P < 0.05$ ), 细胞中成骨相关基因标记骨钙素、骨桥蛋白、Runx2 和胶原蛋白 I 的 mRNA 及蛋白均下调( $P < 0.05$ ), 细胞中钙化结节的数量、成骨分化能力及碱性磷酸酶活性显著降低( $P < 0.05$ ), 而沉默 Hoxa9 的表达可逆转上述现象; ②体内实验组织学染色结果表明, 经 Hoxa9 干预的大鼠组织中骨性损伤明显增加, 未发现组织间胶原纤维和愈合损伤组织内的软骨; shHoxa9 干预大鼠显示骨的大小和数量明显增加, 检测到组织间胶原纤维和愈合损伤组织内的软骨; ③体内实验 qRT-PCR 及 Western blot 检测发现, Hoxa9 干预的大鼠骨折损伤组织中成骨相关基因标记骨钙素、骨桥蛋白、Runx2 和胶原蛋白 I 的 mRNA 及蛋白均下调( $P < 0.05$ ); 而 shHoxa9 组大鼠骨折损伤组织中成骨相关基因标记骨钙素、骨桥蛋白、Runx2 和胶原蛋白 I 的 mRNA 及蛋白均上调( $P < 0.05$ ); ④上述数据说明, 沉默 Hoxa9 基因可促进骨髓间充质干细胞的成骨分化, 进而促进骨折愈合。

## 关键词:

Hoxa9; 成骨分化; 胫骨骨折; 骨折愈合; 细胞增殖; 骨髓间充质干细胞; 成骨细胞; 成骨分化; 动物模型  
中图分类号: R453; R36; R363

## Hoxa9 silencing promotes tibial fracture healing by regulating osteogenic differentiation

Zhang Chao, Li Xingyong, Ma Guifu, Pu Xingyu, Luo Wenyuan (Department of Orthopedics, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Studies have shown that Hoxa10 gene has a certain correlation with osteogenic differentiation after microRNA regulation. However, the expression and function of Hoxa9 in osteogenic differentiation and tibial fracture healing have not been reported.

**OBJECTIVE:** To preliminarily investigate the effects of Hoxa9 on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* and on fracture healing in an *in vivo* model.

Zhang Chao, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Corresponding author: Luo Wenyuan, Chief physician, Department of Orthopedics, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

**METHODS:** *In vitro* experiment: In bone marrow mesenchymal stem cells cultured in osteogenic induction medium, Hoxa9 was inhibited by shHoxa9 or overexpressed by MSCV-Hoxa9. *In vivo* experiment: A tibial fracture model was constructed in rats, followed by intervention with Hoxa9 and shHoxa9.

**RESULTS AND CONCLUSION:** In the *in vitro* test, qRT-PCR and western blot results indicated that Hoxa9 overexpression could significantly inhibit the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells ( $P < 0.05$ ), downregulate osteogenesis-related gene markers osteocalcin, osteopontin, Runx2 and collagen type I at mRNA and protein levels ( $P < 0.05$ ), and reduce the number of calcified nodules, osteogenic differentiation ability and alkaline phosphatase activity ( $P < 0.05$ ). In contrast, transfection of BMSCs with silenced Hoxa9 gene could reverse the above indicators. In the *in vivo* test, histological staining results showed that Hoxa9 intervention significantly aggravated bone damage in rats, and no interstitial collagen fibers and cartilage in the callus were found. The rats intervened by shHoxa9 showed a significant increase in bone size and number, and inter-tissue collagen fibers and cartilage in callus were detected. Findings from qRT-PCR and western blot in the *in vivo* test showed that the mRNA and protein expression of osteocalcin, osteopontin, Runx2 and collagen type I were significantly down-regulated in the Hoxa9 group ( $P < 0.05$ ), and up-regulated in the shHoxa9 group ( $P < 0.05$ ). In summary, Hoxa9 silencing may promote osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells and thereby promote fracture healing.

**Key words:** Hoxa9; osteogenic differentiation; tibial fracture; fracture healing; cell proliferation; bone marrow mesenchymal stem cells; osteoblasts; osteogenic differentiation; animal model

## 0 引言 Introduction

有研究显示,在西方国家骨折的总发生率为每10万人中有300-400例的比例存在<sup>[1]</sup>。高能创伤是胫骨骨折的主要原因,其中包括机动车辆事故和其他日常危险事件<sup>[2]</sup>。严重的胫骨骨折伴有较高的延迟愈合或不愈合率,绝大多数会造成患者出现残疾及预后不良等后遗症<sup>[3]</sup>。也有研究发现骨髓间充质干细胞的成骨分化有助于代谢和骨折愈合<sup>[4]</sup>。近年来,基因治疗在成骨分化和骨折愈合中的应用已备受各界学者的青睐。

人类疾病中已发现有39种HOX基因异常表达,其中许多基因能够影响细胞进程,包括细胞增殖、侵袭和凋亡<sup>[5-7]</sup>。同源盒蛋白是果蝇中描述的含同源域的转录因子家族,其在细胞发育过程中产生同源转化,影响细胞的增殖与分化<sup>[8]</sup>。Hoxa9又称为含同源结构域的转录因子,在人类急性白血病<sup>[9]</sup>、胶质母细胞瘤<sup>[10]</sup>、非小细胞肺癌和骨髓增生异常综合征等疾病中均发挥调节作用<sup>[11-12]</sup>。近期研究发现Hoxa9通过转录调节EPHB4表达来调节子痫前期发病过程中滋养细胞的迁移和侵袭<sup>[13]</sup>,也可促进人类胚胎干细胞的造血作用<sup>[14]</sup>。且Hoxa9在原始造血细胞中优先表达,而在分化过程中被下调<sup>[15]</sup>。同时,最近有研究显示Hoxa10基因受到miRNA的调节后与成骨分化存在一定关联性<sup>[16]</sup>。然而,有关Hoxa9在成骨分化和大鼠胫骨骨折愈合中的表达和功能尚未见报道,这也是实验进行创新性探索的一个关键点。

基于此,实验旨在通过构建Hoxa9过表达细胞模型及大鼠胫骨骨折动物模型探讨Hoxa9在成骨分化和大鼠胫骨骨折愈合过程中的作用,为骨折损伤的治疗提供理论依据。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 细胞学实验及动物体内实验。

1.2 时间及地点 实验于2018年6月至2019年10月在甘肃省人民医院SPF级动物实验实验室完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验细胞 小鼠骨髓间充质干细胞系(C3H10T1/2)购自于ATCC细胞库(马纳萨斯,弗吉尼亚州,美国),并根据ATCC推荐的培养环境培养。

1.3.2 实验动物 健康6-8周龄40只SPF级(无特定病原菌)SD大鼠,体质量250-280 g,购自北京维通利华生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006。动物放置于SPF级动物房进行饲养,自由进食与饮水。

### 1.4 实验方法

#### 1.4.1 体外实验

**细胞培养:**将小鼠骨髓间充质干细胞置于含有体积分数10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素(Life Technologies公司,美国)的DMEM完全培养基,于37℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行实验。

**分组及转染:**用克隆Hoxa9 cDNA的MSCVneo载体反转录病毒转染小鼠骨髓间充质干细胞系,以获得含Hoxa9过表达的稳定骨髓间充质干细胞系。对于Hoxa9沉默,采用含有Hoxa9特异性shRNA的pGFP-V-RS载体转染骨髓间充质干细胞。并将非特异性shRNA载体转染骨髓间充质干细胞作为阴性对照。通过Lipo2000转染试剂进行细胞转染,转染48 h后,向细胞添加质量浓度1 g/L嘌呤霉素以去除未转染的细胞。

实验共分5组,分别为未转染对照组、过表达对照组(MSCV组)、过表达组(MSCV-Hoxa9组)、阴性对照组(sh-对照组)、敲低Hoxa9组(sh-Hoxa9组)。取对数生长期的小鼠骨髓间充质干细胞,以 $2 \times 10^8 L^{-1}$ 的细胞浓度接种于6孔板中,用完全DMEM培养液于37℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,待其细胞融合度约为80%时,弃去原培养液,换成2 mL含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基(不含抗生素),向MSCV组、MSCV-Hoxa9组、sh-对照组、sh-Hoxa9组6孔板中分别依次加入含5 mg/L MSCVneo、Hoxa9 cDNA的MSCVneo、Hoxa9特异性shRNA的pGFP-V-RS、非特异性shRNA载体Lipo2000混合液250 μL,用移液枪轻轻吹打混匀,于37℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养继续培养48 h,向细胞添加质量浓度1 g/L嘌呤霉素以去除未转染的细胞。对照组细胞用完全DMEM培养液随培养48 h。构建稳定的细胞系用于下一步实验。

将细胞(转染和未转染)接种在培养皿中,常规培养基培养3 d,每隔1日换液1次。待细胞浓度达80%时,弃去原培养基,用含有5 mmol/L的β-甘油磷酸酯,100 nmol/L地

塞米松和50 mg/L抗坏血酸的成骨分化培养液培养,上述试剂均购自美国Sigma-Aldrich公司。分别诱导0, 7, 14 d后,将细胞用于增殖和成骨分化相关实验。

#### 1.4.2 体内实验

**建模:**大鼠适应性饲养1周后,采用骨缺损法制造胫骨骨折模型。具体手术方法为:采用氯胺酮和甲苯噻嗪的混合物(腹腔注射)麻醉大鼠。用三点弯曲法制造胫骨中段骨折,手术切口采用4 mm皮肤切口,用解剖刀片(#15)在膝关节处进行手术切除。暴露胫骨,并通过胫骨至前交叉韧带的附着和半月板前角之间手动引入尖锐探头,以确定髓内针入口的面积。25 G针插入到胫骨远端,针的穿透深度约为22 mm。髓内钉完全穿过胫骨后,用骨切割器将多余的近端针头切断。切口用尼龙缝线闭合。为了改变大鼠胫骨的骨折,构造了3点弯曲钳,尺寸为10.0 mm×0.1 mm。将3点弯曲钳的2个支撑爪设定为7 mm。使用钳子后,目视控制位置,钳子闭合,直到听到裂纹声,钳子的阻力突然下降。此后立即释放了压力。应用上述原理建立大鼠胫骨骨折模型<sup>[17]</sup>。通过X射线片检查确认骨折。大鼠皮下注射丁丙诺啡(0.5 mg/kg)镇痛。

#### 组织工程实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	观察 Hoxa9 基因对胫骨骨折愈合的影响
选择动物的条件:	①SD 大鼠 20 只; ②鼠龄 2 个月; ③体质量 250-280 g; ④雌雄不限
模型与所研究疾病的关系:	前期研究证实三点弯曲法能够构建胫骨骨折模型 <sup>[17]</sup>
动物来源及品系:	SD 大鼠购自北京维通利华生物技术有限公司
造模技术描述:	用解剖刀刀片(#15)在膝关节处进行手术切除。用不锈钢暴露胫骨,并通过胫骨至前交叉韧带的附着和半月板前角之间手动引入尖锐探头,以确定髓内针入口的面积。为了改变大鼠胫骨的骨折,构造了 3 点弯曲钳,尺寸为 10.0 mm×0.1 mm。将 3 点弯曲钳的 2 个支撑爪设定为 7 mm。使用钳子后,目视控制位置,钳子闭合,直到听到裂纹声,钳子的阻力突然下降。此后立即释放压力
动物数量及分组方法:	40 只骨折大鼠随机分为 5 组,对照组、pNGVL-1 组、pNGVL-1-Hoxa9 组、pCMV5.0 组、pCMV5.0-shHoxa9 组
造模成功评价指标:	术中能够明显听到骨头断裂的裂纹声且术后经过 X 射线片检测后经 2 名以上的影像学专家确认骨折
造模后观察指标:	①骨痂组织苏木精-伊红染色观察; ②骨痂组织 Masson 染色; ③骨痂组织碱性磷酸酶染色; ④胫骨 X 射线片检测骨折愈合情况; ⑤骨痂组织检测成骨基因的 mRNA 及蛋白质表达
造模后动物处理:	各处理组治疗剂量均为 5 mg/kg, 于局部骨折部位注射
伦理委员会批准:	实验方案经甘肃省人民医院动物实验伦理委员会批准(批准号: LL20180502)

**分组及干预:**将40只骨折大鼠随机分为5组,每组8只:①对照组(无处理);②pNGVL-1组(空载体注射);③pNGVL-1-Hoxa9组(过表达Hoxa9注射处理);④Sh-对照组(敲低空载体注射处理);⑤shHoxa9组(敲低Hoxa9注射

处理)。待大鼠胫骨骨折模型构建成功后,向各组大鼠局部骨折部位按照5 mg/kg治疗剂量依次注射含pNGVL-1, pNGVL-1-Hoxa9, pCMV5.0及pCMV5.0-shHoxa9转染混合物,对照组大鼠于相同部位注射不含任何质粒的转染试剂。4周后,颈椎分离处死所有接受治疗的大鼠,收集各组组织样本,进行组织和分子学相关分析;收集骨样品,采用Faxitron X射线系统(美国Faxitron公司)进行检查,由2名专业影像学专家评估骨折愈合情况。

#### 1.5 主要观察指标

**1.5.1 细胞增殖情况检测** 取对数生长期的不同组骨髓间充质干细胞以 $1.5 \times 10^7 L^{-1}$ 细胞浓度接种至96孔板,每组6个复孔。待其贴壁后换无血清培养液,施加相应处理后,以CCK-8法检测细胞活力。每孔加入含CCK-8试剂100  $\mu L$ 无血清DMEM培养基,于37  $^{\circ}C$ 、体积分数5%  $CO_2$ 培养箱内继续培养1.5 h,在紫外线450 nm波长用酶标仪检测各组的吸光度值。计算细胞的存活率=(实验组吸光度值/对照组吸光度值) $\times 100\%$ ,实验重复3次。

**1.5.2 总RNA提取和实时定量PCR(qRT-PCR)检测** 按照Trizol试剂盒说明书,提取C3H10T1/2细胞和胫骨中的总RNA,借助Nano核酸分析仪测量提取的RNA的浓度和纯度,将反转录获得的DNA(cDNA)进行qRT-PCR,各组样本设3个复孔。qRT-PCR条件:94  $^{\circ}C$ 下4 min预变性,94  $^{\circ}C$ 下30 s变性,60  $^{\circ}C$ 下30 s退火和延伸,然后进行40个循环。根据相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法评价实验中Hoxa9、骨桥蛋白、骨钙素、Runx2及胶原蛋白 I mRNA的相对表达量。表1列出了实验中所有特异性引物。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列  
Table 1 PCR primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
Hoxa9	上游: TTG TCC CTG ACT GAC TTG CT-3'	228
	下游: GTC CCT GGT GAG GTA CAT GTT-3'	
胶原蛋白 I	上游: CTG CCC CTC GCA GGG GTT TG-3'	191
	下游: GCC TGC ACA TGT GTG GCC GA-3'	
骨桥蛋白	上游: GAT GAT GAT GAC GAT GGA GAC C-3'	204
	下游: CGA CTG TAG GGA CGA TTG GAG-3'	
骨钙素	上游: GGC AGG TGC AAA GCC CAG CG-3'	178
	下游: GGG CTG GGG CTC CAA GTC CAT-3'	
Runx2	上游: TCA CAA ATC CTC CCC AAG TGG-3'	162
	下游: GAA TGC GCC CTA AAT CAC TGA-3'	
GAPDH	上游: TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3'	132
	下游: GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'	

**1.5.3 蛋白质印迹分析检测** 将骨髓间充质干细胞以 $2 \times 10^8 L^{-1}$ 细胞浓度接种在6孔板中,用含成骨分化培养基培养以诱导成骨分化。培养14 d后收集各组细胞。采用含有体积分数1%蛋白酶抑制剂PMSF的RIPA缓冲液在冰浴下裂解骨髓间充质干细胞30 min,于4  $^{\circ}C$ , 15 000 $\times g$ 离心10 min,收集各组蛋白质。利用BCA试剂盒测定各组蛋白质含量。每组样品以40  $\mu g$ 总蛋白质置于SDS-PAGE凝胶上进行电泳。

待电泳结束后,将凝胶中的蛋白质转移到PVDF膜上。体积分数5%脱脂奶粉室温封闭1.5 h,随后在4 °C孵育含下列抗体:Hoxa9(1:500),骨桥蛋白(1:500),骨钙素(1:500),Runx2(1:800),胶原蛋白I(1:1000)和 $\beta$ -Actin(1:1200)的一抗稀释液过夜,所有抗体均为小鼠种属的多克隆抗体,购自美国Abcam公司。次日用TBST漂洗3次,每次10 min。采用辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗(1:7000)稀释液在室温下孵育1 h。最后应用增强的化学发光试剂盒ECL进行显影曝光。采用Image-J软件分析Hoxa9、骨桥蛋白和骨钙素等蛋白的灰度值相对表达情况。

**1.5.4 细胞免疫组织化学染色检测** 用PBS洗涤诱导14 d的骨髓间充质干细胞3~5次,在体积分数70%乙醇中固定1 h,用PBS冲洗两三次。随后将细胞用茜素红S于37 °C孵育10 min,用超纯水轻轻冲洗去除多余的染料。使用光学显微镜鉴定钙沉积物。借助微孔板读数器(Bio-Rad公司,美国)定量与钙沉积物相互作用的茜素红S染色的吸光度。对于碱性磷酸酶染色,用光学显微镜拍摄图像。

**1.5.5 组织染色检测** 用体积分数10%甲醛溶液固定骨痂组织约24 h,用体积分数5%乙二胺四乙酸(EDTA-2Na)脱矿3个月。骨痂组织经脱水、清洗后,石蜡包埋。石蜡包埋标本被切成5  $\mu$ m厚度放在载玻片上。用苏木精-伊红、Masson或碱性磷酸酶染色,具体步骤严格按照试剂盒说明书进行操作,测定愈合损伤组织中胶原基质和软骨的含量,可用于评价成骨细胞和骨小梁的形态变化。

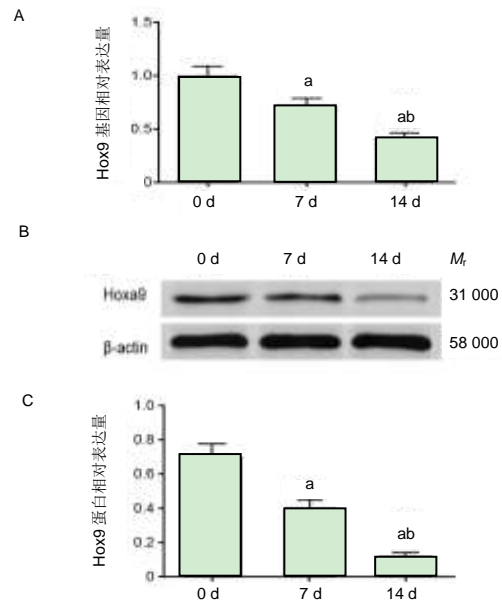
**1.6 统计学分析** 应用SPSS 22.0软件进行统计学分析。计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间数据差异比较采用单因素方差分析和Dunnett法分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果 Results

### 2.1 体外实验结果

**2.1.1 不同诱导时相骨髓间充质干细胞中Hoxa9基因表达情况** 实验分别对成骨诱导后0, 7及14 d骨髓间充质干细胞中Hoxa9 mRNA及蛋白水平进行检测。结果发现:随着诱导时间的延长Hoxa9 mRNA相对表达在降低,且各个诱导时相的差异有显著性意义( $P < 0.01$ ); Western Blot结果显示Hoxa9蛋白相对表达也随着诱导时间的延长呈明显的降低,且各个诱导时相的差异也有显著性意义( $P < 0.01$ ),见图1。

**2.1.2 不同转染组骨髓间充质干细胞中Hoxa9 mRNA相对表达及细胞增殖变化** qRT-PCR结果发现:与对照组及MSCV阴性转染组相比较, MSCV-Hoxa9转染组中细胞内Hoxa9 mRNA水平显著上调( $P < 0.01$ );与对照组及sh-对照组相比较,用shHoxa9转染的骨髓间充质干细胞中Hoxa9的表达明显降低( $P < 0.01$ )。CCK8检测结果表明:与对照组相比较, MSCV-Hoxa9组骨髓间充质干细胞的增殖显著增高( $P < 0.01$ );相反, shHoxa9组骨髓间充质干细胞的增殖明显被抑制( $P < 0.01$ ),见图2。



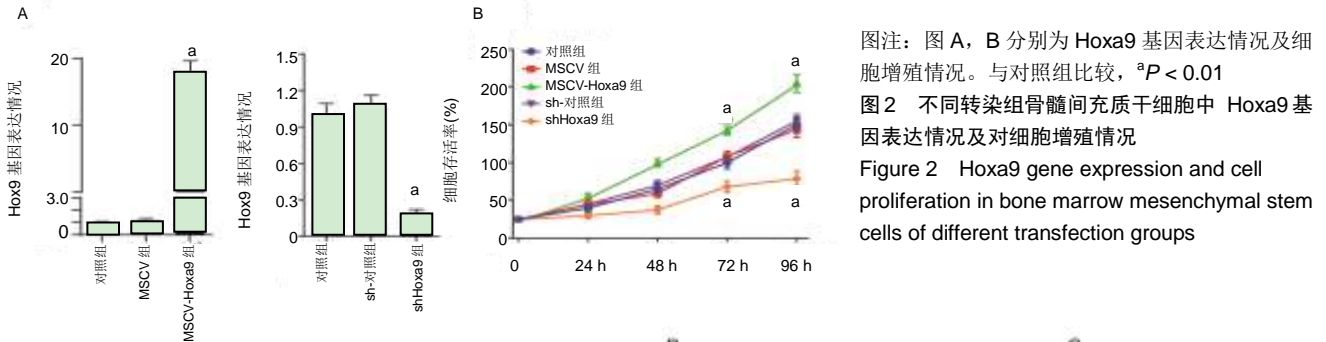
图注:图A-C分别为Hoxa9 mRNA(A)和蛋白(B, C)在骨髓间充质干细胞中的表达。与诱导0 d比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与诱导7 d比较,<sup>b</sup> $P < 0.001$   
图1 经不同时间诱导后Hoxa9在骨髓间充质干细胞中的表达情况  
Figure 1 Hoxa9 expression in bone marrow mesenchymal stem cells at different times after induction

**2.1.3 Hoxa9对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响** 骨髓间充质干细胞分组及处理情况同1.4.1,成骨诱导分化培养基诱导培养14 d,茜素红染色检测骨髓间充质干细胞矿化程度,碱性磷酸酶染色检测两组细胞成骨分化能力。结果发现:MSCV-Hoxa9组骨髓间充质干细胞中钙化结节的数量显著低于对照组及各阴性转染组( $P < 0.01$ );碱性磷酸酶染色结果显示MSCV-Hoxa9组成骨分化能力低于对照组及各阴性转染组,碱性磷酸酶活性定量分析结果显示, MSCV-Hoxa9组成骨分化能力明显低于对照组及各阴性转染组( $P < 0.01$ )。而shHoxa9组骨髓间充质干细胞的钙化结节数、成骨分化能力及碱性磷酸酶活性显著高于对照组及各阴性转染组( $P < 0.01$ )。表明Hoxa9对骨髓间充质干细胞的钙化和碱性磷酸酶表达均具有调节作用,见图3。

**2.1.4 不同转染组骨髓间充质干细胞中成骨分化相关基因及蛋白表达情况** qRT-PCR检测结果显示,与对照组及各阴性转染组相比较, MSCV-Hoxa9组细胞中骨桥蛋白、骨钙素、Runx2和胶原蛋白I基因的mRNA相对表达显著下调( $P < 0.05$ );而shHoxa9组骨髓间充质干细胞骨桥蛋白、骨钙素、Runx2和胶原蛋白I基因的mRNA相对表达明显高于对照组及各阴性转染组,且差异也具有显著性意义( $P < 0.05$ ),见图4。

Western blot检测结果显示:在成骨分化过程中,与对照组及各阴性转染细胞相比, shHoxa9转染的骨髓间充质干细胞中成骨相关蛋白骨桥蛋白、骨钙素、Runx2及胶原蛋白I的相对表达显著上调( $P < 0.05$ ),而MSCV-Hoxa9组细胞中骨桥蛋白、骨钙素、Runx2和胶原蛋白I蛋白的相对表达显著下调( $P < 0.05$ ),见图5。

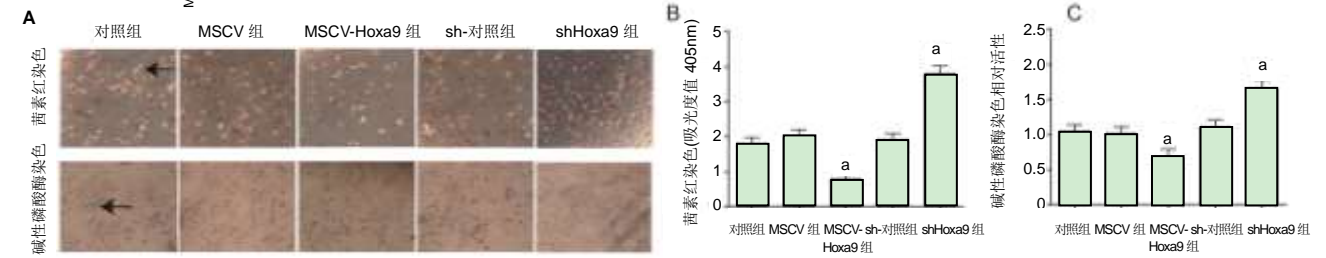




图注: 图 A, B 分别为 Hoxa9 基因表达情况及细胞增殖情况。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$

图 2 不同转染组骨髓间充质干细胞中 Hoxa9 基因表达情况及对细胞增殖情况

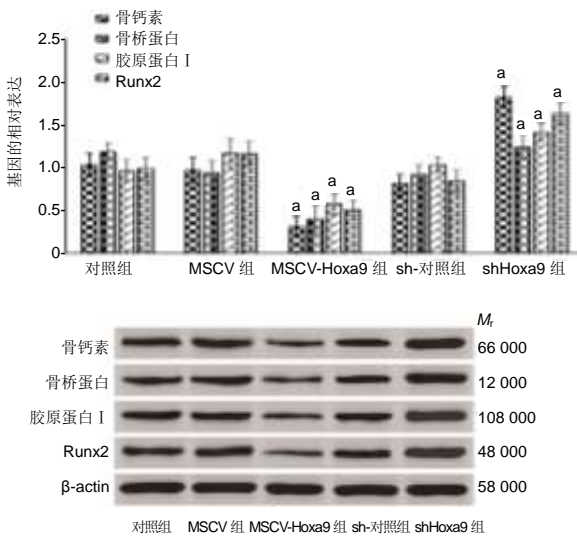
Figure 2 Hoxa9 gene expression and cell proliferation in bone marrow mesenchymal stem cells of different transfection groups



图注: 图 A 为各组细胞组织学染色形态( $\times 40$ ), 箭头表示阳性染色细胞; B, C 为茜素红染色检测骨髓间充质干细胞矿化程度, 碱性磷酸酶染色检测两组细胞成骨分化能力。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$

图 3 茜素红 S 和碱性磷酸酶染色分析各组骨髓间充质干细胞成骨分化及碱性磷酸酶活性情况

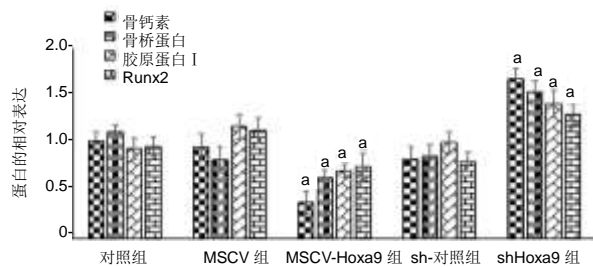
Figure 3 Alizarin red S and alkaline phosphatase staining analysis of osteogenic differentiation and alkaline phosphatase activity in bone marrow mesenchymal stem cells



图注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

图 4 不同转染组骨髓间充质干细胞中成骨相关基因表达情况

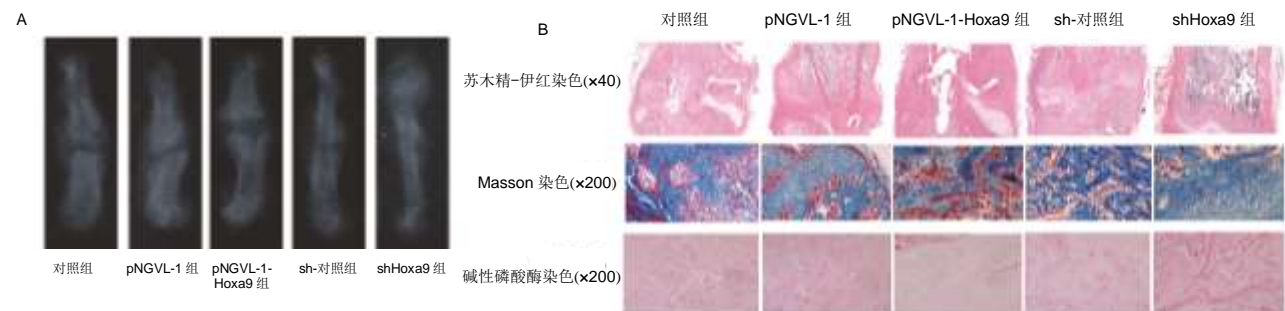
Figure 4 Expression of osteoblast-related genes in bone marrow mesenchymal stem cells of different transfection groups



图注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

图 5 不同转染组骨髓间充质干细胞中成骨相关蛋白表达情况( $n=3$ )

Figure 5 Expression of osteogenesis-related proteins in bone marrow mesenchymal stem cells of different transfection groups



图注: 图 A 为治疗 4 周后各组损伤处 X 射线片; B 为治疗 4 周后各组骨组织学愈合情况

图 6 大鼠骨折模型形态学图片及免疫组织化学染色检

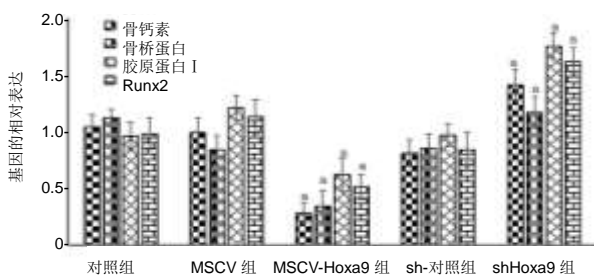
Figure 6 Morphological and immunohistochemical detection in a rat fracture model

## 2.2 体内实验结果

**2.2.1 Hoxa9基因对大鼠胫骨骨折愈合的影响** 为研究Hoxa9在体内的功效,将大鼠胫骨骨折模型用于实验。X射线片检查显示:对照组大鼠骨折线清晰;与对照组相比,pNGVL-1-Hoxa9组骨折线更明显;shHoxa9组的骨折线在治疗4周后几乎消失,见图6A。

苏木精-伊红染色显示:对照组中纤维性愈合损伤组织和骨性愈合损伤组织增加,而pNGVL-1-Hoxa9组中骨性愈合损伤组织较对照组更加明显,见图6B。治疗4周后,经shHoxa9组大鼠显示骨的大小和数量明显增加,见图6B。用Masson和碱性磷酸酶染色检测组织间胶原纤维和愈合损伤组织内的软骨。如图6B所示,在骨折治疗后28 d,shHoxa9组的胶原纤维面积较大,而软骨面积明显小于对照组,与苏木精-伊红染色结果一致。

**2.2.2 各组体内成骨相关基因表达情况** 实验进一步评估了治疗4周后Hoxa9对愈合损伤组织中成骨相关基因mRNA的影响。由愈合损伤组织的RT-PCR结果表明:与对照组及各阴性组相比较,shHoxa9组骨桥蛋白、骨钙素、Runx2和胶原蛋白I基因的mRNA相对表达明显上调( $P < 0.05$ );而MSCV-Hoxa9组骨桥蛋白、骨钙素、Runx2和胶原蛋白I基因的mRNA相对表达显著下调( $P < 0.05$ ),见图7。



图注:与对照组比较,  $^aP < 0.05$

图7 大鼠胫骨骨折模型成骨相关基因 mRNA 相对表达情况

Figure 7 Relative expression of osteogenesis-related genes in a rat tibial fracture model

## 3 讨论 Discussion

目前骨折是临床常见病和突发病,多见于交通事故、跌倒和高处跌落等意外事故,且骨折发生类型较多、部位不确定<sup>[18-20]</sup>,而股骨骨折和胫骨骨折在骨折损伤中较为常见。目前,对骨折的治疗多采用外科手术等疗法进行矫正治疗,但因为手法或年纪等因素存在部分预后不良等问题。因此,探讨骨折治疗的机制及新兴的靶向治疗药物已迫在眉睫。实验通过构建诱导成骨分化模型及大鼠体内胫骨骨折损伤模型探讨Hoxa9基因在骨折损伤治疗中的作用,为骨折的靶向治疗提供理论依据。

骨折损伤研究中关于Hoxa9基因调控作用的研究较少。研究发现骨髓间充质干细胞在体外的成骨分化包括细胞增殖、细胞外基质的成熟和基质的矿化3个阶段<sup>[21]</sup>,且

在这些阶段中涉及到多种重要转录因子的调控及蛋白的参与,如胶原蛋白I、骨钙素、碱性磷酸酶及Runx2等一些关键的转录因子<sup>[22-23]</sup>。在成骨分化过程中碱性磷酸酶高表达是钙结节形成的基础,在调节骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化与成熟的过程中Runx2发挥着至关重要的作用,有研究报道Runx2基因敲除的小鼠完全失去成骨分化能力<sup>[24]</sup>,骨桥蛋白可以促进钙和羟基磷灰石结合并沉积于胞外基质中,是成骨分化晚期的重要标志,可诱导钙结节的形成<sup>[25]</sup>。研究报道Hoxa9基因可能是导致白血病的靶基因<sup>[26]</sup>,而有关骨折损伤中Hoxa9对上述转录因子的调节的相关报道较少。

实验探讨Hoxa9基因对体外成骨分化模型及大鼠体内胫骨骨折损伤模型中相关转录因子的影响。结果发现不管是在体外诱导成骨分化模型还是大鼠体内胫骨骨折模型中,过表达的Hoxa9基因可抑制骨髓间充质干细胞及骨组织中胶原蛋白I、骨钙素、骨桥蛋白及Runx2等转录因子的mRNA及蛋白的相对表达,而沉默Hoxa9基因可促进骨髓间充质干细胞及骨组织中胶原蛋白I、骨钙素、骨桥蛋白及Runx2等转录因子的基因及蛋白的相对表达,可以促进骨髓间充质干细胞的成骨分化。此外,在体内形态学及免疫组织化学染色结果发现,Hoxa9基因过表达不利于大鼠胫骨骨折伤口的愈合,而敲低Hoxa9基因后有利于大鼠胫骨骨折愈合。这表明抑制Hoxa9基因的表达可明显促进了体内骨折损伤的愈合及骨髓间充质干细胞的成骨分化,这部分结果与鲍冲等<sup>[24]</sup>研究者的结论是一致的。

Hoxa9基因在控制发育模式中起关键作用,并以严格调控的时间和组织特异性方式表达。有研究显示,Hoxa9介导的转录信号促进人胶质母细胞瘤中的细胞增殖,侵袭,生存力和对替莫唑胺的抗性<sup>[27]</sup>。KO等<sup>[28]</sup>也发现Hoxa9对上皮性卵巢癌的恶化会产生不同程度的影响,部分原因是通过诱导钙沉积蛋白促进腹膜内扩散导致这种现象。在实验中,作者发现在不同诱导的成骨模型中随着时间的延长Hoxa9基因相对表达量在递减,表明Hoxa9基因的表达与骨髓间充质干细胞的成骨分化呈负向调控的作用。进一步研究结果表明敲低Hoxa9基因后可以促进骨髓间充质干细胞的增殖并促进成骨分化。这与以往研究中发现的Hoxa9基因与造血功能存在相关性的现象可能存在联系,但其具体机制仍需进一步探讨<sup>[29-30]</sup>。

综上所述,实验通过诱导成骨分化模型后发现Hoxa9基因出现显著降低。结合体内和体外研究进一步证明沉默Hoxa9基因能够影响骨髓间充质干细胞的成骨分化从而促进骨折愈合,但其所调控的通路及具体机制仍需进一步探讨。实验为胫骨骨折愈合治疗提供了一种全新的治疗思路及靶向治疗依据。

**作者贡献:** 文章全部作者均参与了实验设计、实施及评估。

**经费支持:** 该文章没有接受任何经费支持。

**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, 没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道, 不存在利益冲突。

**机构伦理问题:** 实验方案经甘肃省人民医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 LL20180502。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。

**知情同意问题:** 参与实验的患病个体及其家属为自愿参加, 所有供者、受者均对试验过程完全知情同意, 在充分了解本治疗方案的前提下签署了“知情同意书”。

**写作指南:** 该研究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》。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过甘肃省人民医院生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**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。

#### 4 参考文献 References

[1] MELING T, HARBOE K, SØREIDE K. Incidence of traumatic long-bone fractures requiring in-hospital management: a prospective age- and gender-specific analysis of 4890 fractures. *Injury*. 2009;40(11):1212-1219.

[2] DUAN X, AL-QWBANI M, ZENG Y, et al. Intramedullary nailing for tibial shaft fractures in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;1(1):CD008241.

[3] DAI J, LI L, JIANG C, et al. Bone Morphogenetic Protein for the Healing of Tibial Fracture: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One*. 2015;10(10):e0141670.

[4] 徐磊, 夏江. 胫骨平台后侧骨折的诊断及手术治疗进展[J]. 沈阳医学院学报, 2016, 18(6):494-497.

[5] CARÈ A, FELICETTI F, MECCIA E, et al. HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. *Cancer Res*. 2001; 61(17):6532-6539.

[6] SHAH N, SUKUMAR S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(5):361-371.

[7] ABDEL-FATTAH R, XIAO A, BOMGARDNER D, et al. Differential expression of HOX genes in neoplastic and non-neoplastic human astrocytes. *J Pathol*. 2006;209(1): 15-24.

[8] GOODMAN FR. Limb malformations and the human HOX genes. *Am J Med Genet*. 2002;112(3):256-265.

[9] COLLINS C, WANG J, MIAO H, et al. C/EBP $\alpha$  is an essential collaborator in Hoxa9/Meis1-mediated leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(27):9899-9904.

[10] POJO M, GONÇALVES CS, XAVIER-MAGALHÃES A, et al. A transcriptomic signature mediated by HOXA9 promotes human glioblastoma initiation, aggressiveness and resistance to temozolomide. *Oncotarget*. 2015;6(10):7657-7674.

[11] HWANG JA, LEE BB, KIM Y, et al. HOXA9 inhibits migration of lung cancer cells and its hypermethylation is associated with recurrence in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog*. 2015;54(11):E72-E80.

[12] XU PP, ZHOU D, YAN GJ, et al. Correlation of miR-181a and three HOXA genes as useful biomarkers in acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2019;42(4):16-22.

[13] LIU X, LIU X, LIU W, et al. HOXA9 transcriptionally regulates the EPHB4 receptor to modulate trophoblast migration and invasion. *Placenta*. 2017;51:38-48.

[14] 马明月. 应用胚胎干细胞模型研究环境内分泌干扰物胚胎毒性的展望[J]. 沈阳医学院学报, 2016, 18(2):65-67, 73.

[15] MOHR S, DOEBELE C, COMOGLIO F, et al. Hoxa9 and Meis1 Cooperatively Induce Addiction to Syk Signaling by Suppressing miR-146a in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*. 2017;31(4):549-562.

[16] 杨晓红. miR-705对绝经后骨质疏松小鼠的骨髓间充质干细胞分化功能异常的调控作用[D]. 西安:第四军医大学, 2013.

[17] HANDOOL KO, IBRAHIM SM, KAKA U, et al. Optimization of a closed rat tibial fracture model. *J Exp Orthop*. 2018;5(1):13.

[18] 席梦莹, 李汶洋, 张琳, 等. 鸢尾素促进大鼠胫骨骨折愈合的研究[J/OL]. 重庆医科大学学报, 2019:1-7.

[19] 黄弘轩, 张姝江, 白波. 调控骨髓间充质干细胞成软骨分化的研究进展[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2017, 11(6):655-660.

[20] 赵成礼. 人工关节置换治疗老年股骨转子间骨折的优势与不足[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(24):3868-3874.

[21] 陈海涛, 安玉光. 桡骨骨折模型兔骨折愈合: 特异性环氧化酶2抑制剂与非特异性环氧化酶抑制剂的比较[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(15):2385-2390.

[22] 胡博森. 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷经MAPK信号通路调节成骨细胞增殖和分化的作用研究[D]. 沈阳: 沈阳医学院, 2019.

[23] 姜文涛, 梅伟, 王庆德, 等. 淫羊藿苷对成骨细胞增殖、分化及矿化的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(3):446-448.

[24] 鲍冲, 朱扬, 邓洲铭, 等. 成纤维生长因子受体2对小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(3): 502-505.

[25] 杨礼庆, 董成建, 朱姝. 成骨分化与修复调控转录因子Runx2在股骨头坏死组织中的表达: 非随机平行对照临床观察试验方案[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(17):2569-2574.

[26] VIJAY N, BANDANA AV, SU C, et al. Hoxa9 and Hoxa10 induce CML myeloid blast crisis development through activation of Myb expression. *Oncotarget*. 2017;8(58): 98853-98864.

[27] HUANG Y, SITWALA K, BRONSTEIN J, et al. Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells. *Blood*. 2012;119(2):388-398.

[28] KO SY, NAORA H. HOXA9 promotes homotypic and heterotypic cell interactions that facilitate ovarian cancer dissemination via its induction of P-cadherin. *Mol Cancer*. 2014;13:170.

[29] 李琳. HOXB4、PRDM16及HOXA9基因在急性髓系白血病中的表达及其临床意义[D]. 青岛: 青岛大学, 2016.

[30] 何慧慧. 斑马鱼造血系统发育过程中Hox基因的表达模式研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.