

模型^[11], 考察 PSORI-CM01 方对全血黏度、血浆黏度和红细胞压积的影响。结果显示, 该方具有良好的活血作用。综合其抗银屑病效果, 提示该方可用于血瘀型银屑病的治疗。

REFERENCES

- [1] YAN Y H, ZHAO R Z, LU C J. Optimization of Yinxieling Capsule with orthogonal design [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2014, 25(11): 2673-2675.
- [2] YAN Y H, LU C J. Optimized Yinxieling for treatment of psoriasis vulgaris: an exploratory clinical trial [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharm(中药新药与临床药理), 2011, 22(6): 691-693.
- [3] 王学军, 王伟明, 李继昌, 等. 消屑灵软膏对实验性银屑病病理模型影响的实验研究[J]. 中国中医药科技. 2005, 12(2): 83-85.
- [4] WANG Y N, FANG H, ZHANG X G, et al. Therapeutic effects of paclitaxel solution on psoriasis-like pathological Changes of guinea pig [J]. Chin J Dermatol(中华皮肤科杂志), 2004, 37(3): 156-158.
- [5] LIU Y G, FENG K, ZHANG L J. Study on the drug concentration in making animal model of blood-stasis [J]. Chin J Hemorheol(中华血液流变学杂志), 2002, 12(1): 60-64.
- [6] MAHFOOZOR R, KAMAT A, MOHAMMAD Z A, et al. Classical to current approach for treatment of psoriasis: A-review [J]. Endocrine, Metab Immun Disorders-Drug Target, 2012(12): 287-302.
- [7] 黄敏, 张淑芝, 孙令. 心得安涂药造成豚鼠耳部银屑病样病理变化[J]. 中华皮肤科杂志, 1991, 24(2): 96.
- [8] CEN J P, ZHU K J, JIN N, et al. Effects of drugs known to trigger psoriasis on HaCaT keratinocytes [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2007, 42(10): 1041-1044.
- [9] LU C J, ZENG Z, XIE X L, et al. Distribution of Chinese medical syndrome in ordinary psoriasis: literature from 1979 to 2010 [J]. J Tradit Chin Med, 2012, 53(11): 959-961.
- [10] YAN Y H, LU C J, XUAN G W. Investigation of the most fundamental TCM pathogenesis of psoriasis vulgaris [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2012, 39(6): 1013-1015.
- [11] QIU R X, LUO Z Q, ZHU Y Y, et al. Study on correlativity of blood physical and chemical properties with TCM syndrome types in the patient of coronary heart disease with blood stasis syndrome [J]. J Tradit Chin Med(中医杂志), 2002, 43(4): 378-379.

收稿日期: 2015-07-09

低氧激活自噬促进人间充质干细胞成骨分化的研究

刘宇佳¹, 楼斯悦¹, 章燕棋^{1,2}, 曹戟¹, 楼剑书¹, 应美丹¹, 何俏军^{1*} (1.浙江大学药学院药理毒理研究所, 浙江省抗肿瘤药物临床前研究重点实验室, 杭州 310058; 2.杭州市中医院药剂科, 杭州 310007)

摘要: 目的 探讨低氧对人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)成骨分化的效应及分子机制。方法 在正常氧压(20% O₂)和低氧(5% O₂)条件下培养 hMSCs; 采用成骨分化诱导液(BDM)诱导 hMSCs 成骨分化; 利用茜素红染色法考察细胞钙沉积情况; 通过 Western blotting 检测细胞自噬相关蛋白的表达水平以及 MAPK、PI3K-AKT-mTOR 信号通路的激活情况。**结果** 低氧条件下, hMSCs 钙沉积较常氧条件增强; BDM 诱导 hMSCs 成骨分化过程伴随着 LC3 表达增加, 抑制细胞自噬可以明显减弱低氧促进的细胞钙沉积; 低氧促进的细胞发生钙沉积伴随着 MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的失活; 抑制 MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路有利于细胞自噬发生, 进而促进 hMSCs 钙沉积。**结论** 低氧下可以通过激活细胞自噬来促进 hMSCs 成骨分化, 抑制 MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路可以进一步促进细胞自噬的发生, 从而协同促进 hMSCs 成骨分化。

关键词: 人间充质干细胞; 低氧; 自噬; 钙沉积; 成骨分化

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)03-0284-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.03.006

Study of Hypoxia Induced Autophagy on Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation

LIU Yujia¹, LOU Siyue¹, ZHANG Yanqi^{1,2}, CAO Ji¹, LOU Jianshu¹, YING Meidan¹, HE Qiaojun^{1*} (1. Institute of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Zhejiang Province Key Laboratory of Anti-cancer Drug Research, Hangzhou 310058, China; 2. Department of Pharmacy, Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY13H310002); 浙江省教育厅项目(Y201430401)

作者简介: 刘宇佳, 女, 硕士生 Tel: (0571)88206915 E-mail: vae1476@163.com

***通信作者:** 何俏军, 男, 博士, 教授 Tel:

(0571)88208400 E-mail: qiaojunhe@zju.edu.cn

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects and molecular mechanisms of hypoxia on hMSCs differentiation. **METHODS** hMSCs were cultured under normoxic or hypoxic conditions; hMSCs differentiation were obtained by treated with BDM(bone differentiation medium); Calcium deposit was assessed by Alizarin Red S dye; The protein levels were analyzed by western blotting. **RESULTS** Hypoxia can significantly promoted calcium deposit in hMSCs; The expression of LC3 was increased in hMSCs, hypoxia induced calcium deposit was inhibited by autophagy inhibitor 3MA; Hypoxia induced hMSCs calcium deposit was accompanied by inactivation of MAPK and PI3K-AKT-mTOR pathway, inhibition of these pathway could mediate hMSCs calcium deposit by promoted autophagy. **CONCLUSION** Hypoxia can significantly trigger hMSCs differentiation by induced autophagy, inhibition of MAPK and PI3K-AKT-mTOR pathway could contribute to autophagy which could mediate hMSCs differentiation.

KEY WORDS: human mesenchymal stem cells; hypoxia; autophagy; calcium deposit; osteoblastic differentiation

人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSCs)是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞^[1],在体内经特定的条件诱导,可以分化成脂肪、骨、肌肉等多种组织细胞,对于正常的骨发育以及维持骨代谢平衡都具有十分重要的作用^[2]。在体外培养条件下,须经过特定诱导条件才可以使 hMSCs 分化发育为成骨细胞^[3]。通常将 hMSCs 分化过程划分为细胞增殖期、分化早期、分化中晚期 3 个阶段。hMSCs 在贴壁后即开始进入细胞增殖阶段,以 DNA 复制和组蛋白合成为特征;分化早期则以碱性磷酸酶活性升高、I 型胶原分泌为特征,同时还伴随着细胞增殖抑制;分化中晚期主要以钙离子的沉积为特征。hMSCs 在分化为成骨细胞的过程中伴随着多条信号通路的激活,其协同作用保证了骨组织的正常发育。

氧是细胞生理功能的重要调节因子,参与包括细胞黏附、增殖、凋亡和分化等重要的生命过程^[4-5]。研究认为,低氧参与许多疾病的发生、发展^[6]。在骨发育过程中,组织和细胞缺氧是经常存在的。在骨髓内氧分压为 2%~7%,在骨折处、伤口等组织里,氧分压更低,甚至<1%。研究表明,hMSCs 特征会受到氧分压的影响^[7]。

自噬是一种广泛存在于真核生物中的生命过程,大量研究认为,自噬在细胞和生物体的发育和分化过程中均起到非常重要的作用^[8]。有文献报道,自噬参与血细胞、肝细胞、胰岛 β 细胞等多种终末分化细胞的发育和分化^[9]。本研究中笔者考察了 hMSCs 的自噬活性,同时检测了当细胞自噬活性发生变化时,其对于 hMSCs 成骨分化潜能的影响。

本试验就骨的正常发育机制开展研究,考察 hMSCs 成骨分化的控制条件及其分子机制,希望从分子水平了解骨发育的变化规律。从而为进一步认识骨分化的分子机理提供实验基础和理论数据。实现 hMSCs 高效定向分化,为揭示骨肉瘤的

发生机制及其治疗策略提供全新的思路,从而达到预防和治疗骨相关疾病的目的。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

PD98059(Calbiochem 公司, #513000); Bez235 (Selleck 公司, #S1009); 细胞培养基 α MEM (Invitrogen 公司, #12561-056); 进口胎牛血清 (Atlanta Biologicals 公司, #S11550); 3MA、地塞米松、 β -甘油磷酸钠、抗坏血酸磷酸盐和茜素红购于 Sigma 公司(#m9281, #D2915, #G9891, #A8960, #A5533); LC3、p-JNK、Atg12、Atg7、p-mTOR、p-mTOR 抗体为 Cell Signaling Technology 公司产品(#5, #2, #2, #2, #17, #9); p-ERK、p-AKT 和 GAPDH 抗体为 Santa Cruz Biotechnology 公司产品(#G2009, #F2009, #C2415)。

PD98059 和 3MA 用 DMSO 配置成 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮备液,于 -20°C 避光保存。所有实验中,DMSO 的浓度均 $\leq 0.1\%$ 。

1.2 细胞株及培养条件

第 1 代 hMSCs 购自杜兰大学基因治疗中心(TUCGT, 编号: 7032R),捐赠者为男性高加索人(编号: 220R)。

hMSCs 常规培养采用 CCM 培养基(16.5% FBS、 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-谷氨酰胺、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素的 α MEM 培养基)于 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养。低氧条件培养则置于 37°C 、5% O_2 的缺氧细胞培养箱中培养。

1.3 hMSCs 定向诱导成骨分化

将 hMSCs 以 $10^4 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种于 6 孔板中,待细胞密度达到 70%~80%,换用含成骨诱导体系的 BDM 培养基(CCM 培养基中加入 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -甘油磷酸钠、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抗坏血酸磷酸盐)继续培养 7~21 d,每 2~3 d 换液 1 次。

1.4 茜素红染色

茜素红染液的配制:将1 g 茜素红溶于100 mL 双蒸水中,调节pH为4.1~4.3,用 $0.45\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 滤膜过滤后于室温保存。

吸去hMSCs的培养液,用PBS缓冲液冲洗1遍,然后加入10%的福尔马林固定1 h。吸去固定液并用双蒸水冲洗1遍,加入茜素红染液染色20 min,再用双蒸水冲洗3~5遍直到去除残留的染色液,加入双蒸水润湿,镜检并采集图片。

1.5 Western Blotting 检测相关蛋白

收集hMSCs,提取蛋白并定量。取20 μg 总蛋白与上样缓冲液混合,于100 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min使蛋白变性,通过10% SDS-PAGE胶分离,使蛋白条带转到PVDF膜,用5%脱脂牛奶封闭,一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的相应二抗孵育,ECL显影,感光胶片冲印成像。

2 结果

2.1 低氧条件对hMSCs成骨分化能力的影响

在正常氧压(20% O_2)和低氧(5% O_2)条件下分别采用正常培养液(CMM)和成骨分化诱导液(BDM)培养hMSCs 11 d。采用茜素红染色观察细胞钙沉积,采用Leica显微镜进行图片采集,结果显示,在常氧和低氧条件下,运用BDM培养的hMSCs均会出现明显的钙化沉积,而采用CMM培养的hMSCs均未出现明显的染色。进一步比较常氧与低氧条件下的茜素红染色结果,可以看出

在低氧条件下,对于BDM引起的hMSCs发生钙沉积有明显的促进作用。以上数据提示,低氧可以促进hMSCs发生钙沉积。结果见图1。

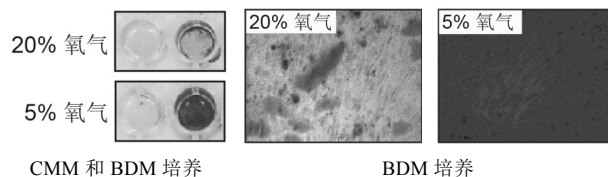


图1 低氧条件对hMSCs成骨分化能力的影响

Fig. 1 Effect of hypoxia on hMSCs differentiation

2.2 自噬对于hMSCs成骨分化能力的影响

在正常氧压(20% O_2)和低氧(5% O_2)条件下分别采用CMM和BDM培养hMSCs。在第1, 2, 3, 5, 7天通过Western blotting检测了细胞自噬标记蛋白LC3的变化,结果显示,在常氧、BDM培养条件下,hMSCs中LC3 II蛋白表达随时间有一定程度的增加,LC3 II/I比值也有一定比例的升高。而在低氧条件下,细胞LC3 II蛋白水平以及LC3 II/I比值均有明显的增高现象。上述结果提示,低氧促进成骨分化可能与细胞自噬的发生密切相关。结果见图2A。

在体系中引入了细胞自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3MA),进一步考察自噬在hMSCs成骨分化过程中的作用。在低氧条件下,分别采用CMM和BDM培养hMSCs。经 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的细胞自噬抑制剂3MA处理hMSCs后,通过茜素红染色考察自

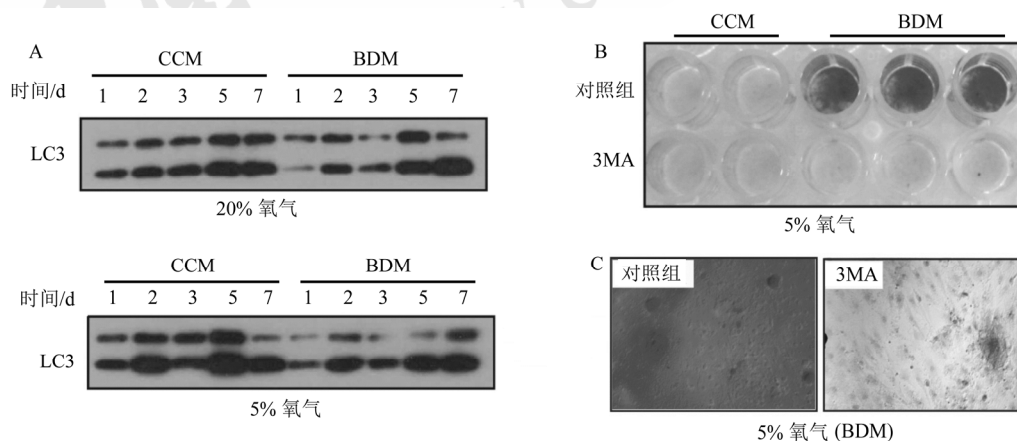


图2 自噬对于hMSCs成骨分化能力的影响

A-在正常氧压(20% O_2)和低氧(5% O_2)条件下分别采用CMM和BDM培养hMSCs,第1, 2, 3, 5, 7天通过Western blotting检测LC3蛋白表达; B-采用CMM和BDM培养11 d; C-BDM培养11 d。低氧条件下,3MA作用于hMSCs,采用茜素红染色观察细胞钙沉积。采用Leica显微镜进行图片采集。

Fig. 2 Effect of autophagy on hMSCs differentiation

A-hMSCs was cultured in CMM or treated with BDM for 1, 2, 3, 5, 7 d under normoxic or hypoxic conditions, the protein level of LC3 was detected by Western-blot; B-hMSCs was cultured in CMM or treated with BDM for 11 d; C-hMSCs was treated with BDM for 11 d. hMSCs was treated with 3MA, then stained with Alizarin Red S dye. Images were acquired with Leica microscope.

噬对于细胞钙沉积的影响。结果见图 2B~C, 经 3MA 处理后, BDM 诱导组的茜素红染色明显被抑制, 几乎与 CMM 对照组染色一致, 这提示 3MA 可以明显抑制 hMSCs 的钙沉积。上述结果说明, 低氧条件下, 细胞自噬的发生可明显促进 hMSCs 的成骨分化。

2.3 MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路对 hMSCs 成骨分化能力的影响

据文献报道, MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路广泛参与细胞生长发育、凋亡、分化等生命进程。在正常氧压(20% O₂)和低氧(5% O₂)条件下, 采用 BDM 培养 hMSCs, 通过 Western blotting 检测 MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的蛋白表达。结果见图 3A。与常氧条件相比, hMSCs 经低氧下 BDM 培养液处理后, ERK、JNK、AKT 蛋白的磷酸化水平均有明显下调。以上数据提示,

MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路对于 hMSCs 的成骨分化进程可能起到负性调控的作用。

采用 MEK/ERK 抑制剂 PD98059 以及 PI3K/m-TOR 抑制剂 Bez235 作用于 hMSCs, 通过茜素红染色观察细胞钙沉积情况。结果见图 3B~C, 在常氧条件下, hMSCs 经 BDM 处理后, 随时间延长钙沉积水平逐渐增加。而经 PD98059 和 Bez235 处理 11 d 后, 与未给药的对照组相比, MEK/ERK 抑制剂 PD98059 以及 PI3K/m-TOR 抑制剂 Bez235 可以明显促进 hMSCs 的钙沉积, 使常氧下 hMSCs 钙沉积水平达到与低氧条件下类似的程度。低氧下, MAPK 和 PI3K-AKT-mTOR 信号通路对成骨分化的调控作用不明显(图 3D~E)。综上所述, 抑制 MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路可明显促进 hMSCs 的正常成骨分化进程。

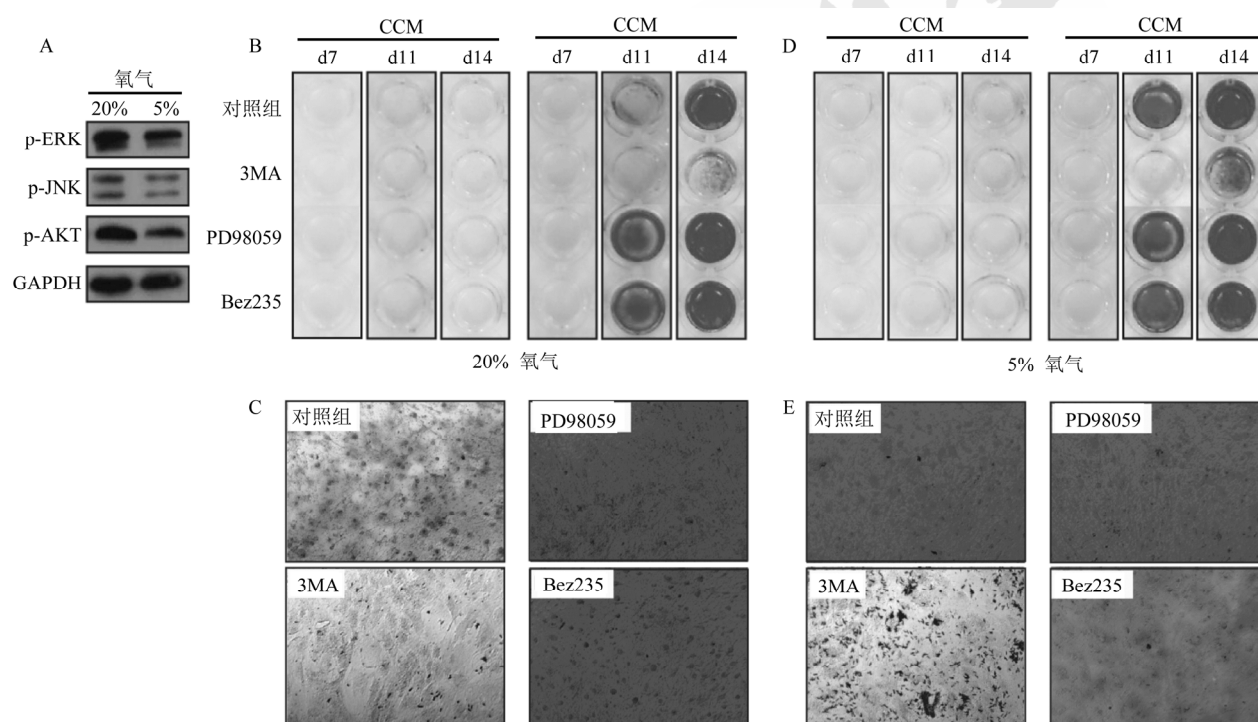


图 3 MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路对于 hMSCs 成骨分化能力的影响

A-在正常氧压(20% O₂)和低氧(5% O₂)条件下通过 Western blotting 检测 p-ERK、p-JNK、p-AKT 蛋白表达; B, D-采用 CMM 和 BDM 培养 7, 11, 14 d; C, E-BDM 培养 7, 11, 14 d。常氧和低氧条件下, 3MA、PD98059 和 Bez235 作用于 hMSCs, 采用茜素红染色观察细胞钙沉积。采用 Leica 显微镜进行图片采集。

Fig. 3 Effect of MAPK and PI3K-AKT-mTOR pathway on hMSCs differentiation

A-hMSCs was treated with BDM for 1, 2, 3, 5, 7 d under normoxic or hypoxic conditions, the protein levels of p-ERK, p-JNK, p-AKT were detected by Western-blot; B, D-hMSCs was cultured in CMM or treated with BDM for 7, 11, 14 d; C, E-hMSCs was treated with BDM for 7, 11, 14 d. hMSCs was treated with 3MA, PD98059 and Bez235, then stained with Alizarin Red S dye. Images were acquired with Leica microscope.

2.4 MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路对细胞自噬的调控作用

通过 Western blotting 考察了加入细胞自噬抑

制剂 3MA、MEK/ERK 抑制剂 PD98059 以及 PI3K/m-TOR 抑制剂 Bez235 第 7, 11, 14 天以后, 细胞自噬相关蛋白表达情况以及对于 MAPK 以及

PI3K-AKT-mTOR 信号通路蛋白的激活情况。在加入细胞自噬抑制剂 3MA 后,自噬相关蛋白 LC3 表达明显下调,LC3 II/I 比值也明显下降,Atg5-Atg12 和 Atg7 蛋白表达水平几乎不变。而加入 MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路抑制剂

PD98059 和 Bez235 后,不仅抑制了信号通路相关蛋白的磷酸化水平,同时还明显上调了 LC3 II/I 蛋白比例。上述结果显示,抑制 MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路可能有利于细胞自噬发生,进而可以调控 hMSCs 成骨分化进程。结果见图 4。

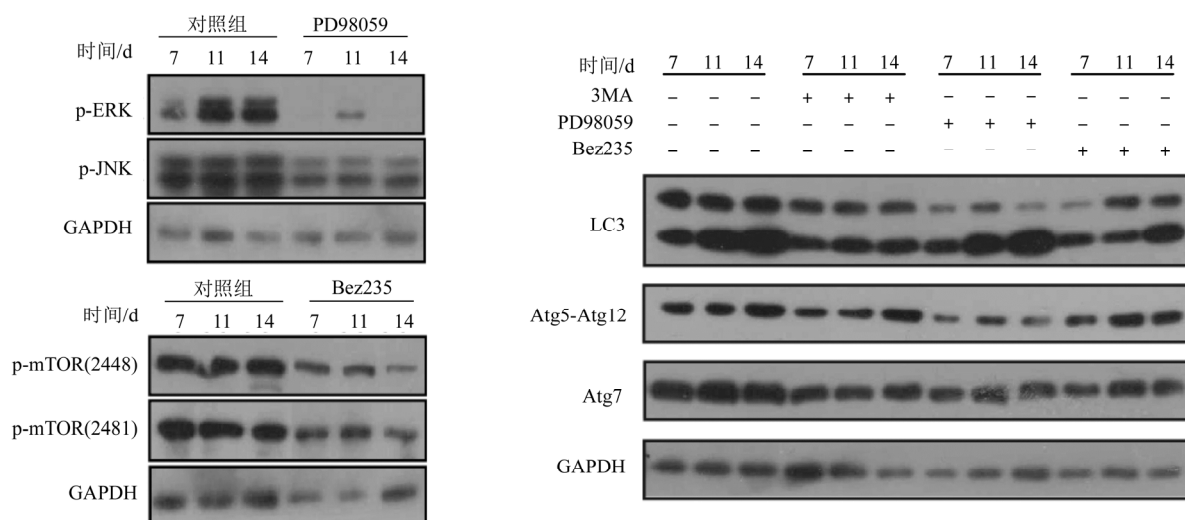


图 4 自噬与 MAPK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路在 hMSCs 成骨分化过程中的相互影响

在正常氧压(20% O₂) 条件下,经 3MA、PD98059 和 Bez235 处理,采用 BDM 培养 hMSCs 7, 11, 14 d,通过 Western blotting 检测 LC3、Atg5-Atg12、Atg7、p-ERK、p-JNK、p-mTOR(2448)以及 p-mTOR(2481)的蛋白表达。

Fig. 4 Interaction of autophagy with MAPK and PI3K-AKT-mTOR pathway on hMSCs differentiation

hMSCs was treated with 3MA, PD98059 and Bez235 for 7, 11, 14 days under normoxic conditions, the protein levels of LC3, Atg5-Atg12, Atg7, p-ERK, p-JNK, p-mTOR(2448) and p-mTOR(2481) were detected by Western-blotting.

3 讨论

hMSCs 对于机体正常的骨发育以及维持骨代谢平衡都起到关键的作用^[2]。hMSCs 在体内经过多种调控因素的调节,发育为成骨细胞,因此,hMSCs 的成骨分化过程是一个机体精密调控的程序化进程^[10]。本研究中通过考察 hMSCs 成骨分化进程的影响因素和调控机制,认为低氧可以通过激活自噬效应,调控 hMSCs 的成骨分化进程。这对于实现 hMSCs 高效定向分化,预防和治疗骨相关的疾病具有十分重要的意义。

氧在细胞生命活动中扮演着重要角色,其作为线粒体氧化磷酸化级联反应中的电子受体,参与生产细胞活动所需能量^[11]。因此氧分压可以作为刺激信号,调控多种类型细胞的增殖、分化、生长过程^[12]。有研究认为,低氧可以影响干细胞的分化进程。hMSCs 也是一种干细胞,低氧同样是 hMSCs 微生态环境的重要组成部分。本研究通过控制氧分压,比较正常氧压(20% O₂)与低氧(5% O₂)条件下 hMSCs 的钙沉积情况发现,低氧可以明显促进 hMSCs 骨分化。

近些年来,自噬作为生物体内一种保守的生命现象,其在细胞和组织的发育、分化过程中起到的作用引起广泛关注。有研究发现,通过抑制细胞自噬的发生,可阻断胶质瘤干细胞的分化进程^[13]。此外也有文献报道,脂肪细胞分化和发育也与自噬有十分密切的关系^[14]。在本研究中笔者发现,在低氧促进 hMSCs 发生钙沉积的过程中,细胞自噬相关蛋白 LC3 也有明显的表达上调现象,而通过向体系引入细胞自噬抑制剂 3MA,则可以明显抑制 hMSCs 的成骨分化进程。因此可以推测,低氧条件下,可能通过激活自噬来促进 hMSCs 成骨分化。

MAPK 与 PI3K-AKT-mTOR 信号通路对于细胞的生长、发育、增殖、分化等过程均有十分广泛的调控作用^[15-16]。目前关于 MAPK 信号通路在间充质细胞成骨细胞分化的过程中起的调控作用有着不同的研究报道。其中一些研究认为,抑制 Erk 信号通路可以促进间充质干细胞成骨分化进程^[17],而另外一些研究则发现,Erk 信号通路的激活会诱导间充质干细胞发生成骨分化^[18-19]。造成

研究结果存在争议性的原因可能是在细胞生长不同阶段中, 信号通路相关基因表达存在差异。笔者研究中发现, 低氧在促进 hMSCs 成骨分化的同时, 会抑制 ERK、JNK 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的激活, 而通过抑制 MAPK 和 PI3K-AKT-mTOR 信号通路反过来可以明显促进 hMSCs 发生成骨分化。

PI3K/mTOR 信号通路是目前研究比较清楚的调控自噬的信号通路。PI3K 对于自噬早期吞噬泡的形成至关重要^[20], 而 mTOR 则可以抑制吞噬泡的形成和成熟^[21]。文献报道^[22], MAPK 信号通路同样在调控细胞自噬的过程中发挥了调控作用。进一步考察 MAPK 信号通路 with 细胞自噬之间的关系发现, MAPK 信号通路的失活可能促进了细胞自噬的发生, 进而调控了 hMSCs 成骨分化。

综上所述, 本研究通过比较常氧与低氧条件下, hMSCs 钙沉积情况, 发现低氧可以促进 hMSCs 成骨分化。进一步考察其作用机制发现, 低氧可能是通过激活细胞自噬进而促进 hMSCs 分化进程。MAPK 和 PI3K-AKT-mTOR 信号通路在这一过程中去磷酸化失活, 抑制 MAPK 和 PI3K-AKT-mTOR 信号通路有利于细胞自噬的发生, 因此可以促进 hMSCs 发生细胞成骨分化。以上研究结果不仅从分子水平上丰富了对 hMSCs 的正常成骨分化分子机制的认识, 也为 hMSCs 的临床应用提供了前期实验基础。

REFERENCES

- [1] PROCKOP D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. *Science*, 1997, 276(5309): 71-74.
- [2] BIELBY R, JONES E, MCGONAGLE D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone [J]. *Injury*, 2007, 38(Suppl 1): S26-S32.
- [3] TANG N, SONG W X, LUO J, et al. Osteosarcoma development and stem cell differentiation [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2008, 466(9): 2114-2130.
- [4] LOIKE J D, CAO L, BRETT J, et al. Hypoxia induces glucose transporter expression in endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1992, 263(2 Pt 1): C326-333.
- [5] CARMELIET P, DOR Y, HERBERT J M, et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis [J]. *Nature*, 1998, 394(6692): 485-490.
- [6] MAJUMDAR A J, WONG W J, SIMON M C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress [J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 294-309.
- [7] IYER N V, KOTCH L E, AGANI F, et al. Cellular and

developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(2): 149-162.

- [8] BRONIETZKI A W, SCHUSTER M, SCHMITZ I. Autophagy in T-cell development, activation and differentiation [J]. *Immunol Cell Biol*, 2014, 93(1): 25-34.
- [9] MIZUSHIMA N, LEVINE B. Autophagy in mammalian development and differentiation [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(9): 823-830.
- [10] TAKADA I, KOUZMENKO A P, KATO S. Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13(5): 593-603.
- [11] CONDE S V, MONTEIRO E C. Profiles for ATP and adenosine release at the carotid body in response to O₂ concentrations [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 580(179): 179-184.
- [12] PLAS D R, THOMPSON C B. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, 13(2): 75-78.
- [13] ZHAO Y, HUANG Q, YANG J, et al. Autophagy impairment inhibits differentiation of glioma stem/progenitor cells [J]. *Brain Res*, 2009(1313): 250-258.
- [14] MASIERO E, AGATEA L, MAMMUCARI C. et al. Autophagy is required to maintain muscle mass [J]. *Cell Metab*, 2009, 10(6): 507-515.
- [15] SUN Y, LIU W Z, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
- [16] SONG B Q, CHI Y, LI X, et al. Inhibition of notch signaling promotes the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells through autophagy activation and PTEN-PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(5): 1991-2002.
- [17] TWIGG S R, VORGIA E, MCGOWAN S J, et al. Reduced dosage of ERF causes complex craniosynostosis in humans and mice and links ERK1/2 signaling to regulation of osteogenesis [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(3): 308-313.
- [18] XU C, ZHENG Z, FANG L. et al. Phosphatidylserine enhances osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells via ERK signal pathways [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33(3): 1783-1788.
- [19] ZHANG P, WU Y, JIANG Z, et al. Osteogenic response of mesenchymal stem cells to continuous mechanical strain is dependent on ERK1/2-Runx2 signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(6): 1083-1089.
- [20] Neri L M, Borgatti P, Capitani S, et al. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1584(2/3): 73-80.
- [21] KAMADA Y, FUNAKOSHI T, SHINTANI T, et al. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex [J]. *J Cell Biol*, 2000, 150(4): 1507-1513.
- [22] WONG C H, ISKANDAR K B, YADAV S K, et al. Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e9996.

收稿日期: 2015-10-08