

# 抑制 *Hmga2* 促进小鼠脂肪间充质干细胞成骨分化并加速骨缺损修复

柯志勇<sup>1</sup>, 黄子城<sup>1</sup>, 何若琳<sup>1</sup>, 张倩<sup>1</sup>, 陈思旭<sup>1</sup>, 崔忠凯<sup>1</sup>, 丁晶<sup>2</sup>

<sup>1</sup>南方医科大学基础医学院细胞生物学教研室, 广东 广州 510515; <sup>2</sup>上海交通大学医学院附属新华医院儿科, 上海 200092

**摘要:**目的 探讨高迁移率族蛋白 A2(HMGA2)在脂肪间充质干细胞(ADSCs)成骨分化进程中的作用及其在骨缺损修复中的应用。方法 通过GEO数据库和Rstudio软件,挖掘出在ADSCs“成脂-成骨”分化平衡中的关键节点因子 *HMGA2*,并通过在线蛋白质互作网络分析工具 String 和绘图软件 Cytoscape,绘制HMGA2在成骨分化中的互作关系网络,预测其下游作用靶点。设计 *Hmga2* siRNA 并转染小鼠原代脂肪间充质干细胞(mADSCs),诱导其体外成骨分化,在不同时间点(Day 3, Day 7, Day 14)收集样本,通过碱性磷酸酶染色和茜素红染色评估成骨分化能力,并通过RT-qPCR和Western blotting检测成骨特异性标志物 Runt 相关转录因子2(RUNX2)、骨桥蛋白(OPN)和骨钙素(OCN)的表达。将敲低 *Hmga2* 的mADSCs移植至小鼠不可自愈颅骨缺损处,术后6周通过 $\mu$ CT扫描、骨组织学染色检测成骨标志物,评价骨缺损修复效果。结果 GEO数据库分析结果显示 *HMGA2*在ADSCs成脂分化进程中表达上调。蛋白互作网络分析提示在ADSCs成骨分化中, HMGA2的潜在作用靶点包括 SMAD7、CDH1、CDH2、SNAI1、SMAD9、IGF2BP3、ALDH1A1。抑制 *Hmga2* 后, mADSCs 中成骨分化相关标志物 RUNX2、OPN 和 OCN 的表达显著上调,且碱性磷酸酶的表达和钙结节的形成增加( $P<0.05$ )。在小鼠颅骨缺损模型中,敲低 *Hmga2* 促进了骨缺损部位的新骨形成( $P<0.05$ )。结论 HMGA2是调控ADSCs成骨分化的重要因子,抑制 *Hmga2*能显著促进ADSCs成骨分化,并加速体内骨缺损的修复。

**关键词:**脂肪间充质干细胞;高迁移率族蛋白 A2;成骨分化;骨缺损修复

## *Hmga2* knockdown enhances osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells and accelerates bone defect healing in mice

KE Zhiyong<sup>1</sup>, HUANG Zicheng<sup>1</sup>, HE Ruolin<sup>1</sup>, ZHANG Qian<sup>1</sup>, CHEN Sixu<sup>1</sup>, Zhong-Kai CUI<sup>1</sup>, DING Jing<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515 China; <sup>2</sup>Department of Pediatric Orthopedics, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China

**Abstract: Objective** To investigate the role of high-mobility group AT-hook 2 (HMGA2) in osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) and the effect of *Hmga2* knockdown for promoting bone defect repair. **Methods** Bioinformatics studies using the GEO database and Rstudio software identified HMGA2 as a key factor in adipogenic-osteogenic differentiation balance of ADSCs. The protein-protein interaction network of HMGA2 in osteogenic differentiation was mapped using String and visualized with Cytoscape to predict the downstream targets of HMGA2. Primary mouse ADSCs (mADSCs) were transfected with *Hmga2* siRNA, and the changes in osteogenic differentiation of the cells were evaluated using alkaline phosphatase staining and Alizarin red S staining. The expressions of osteogenic markers Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteopontin (OPN), and osteocalcin (OCN) in the transfected cells were detected using RT-qPCR and Western blotting. In a mouse model of critical-sized calvarial defects, mADSCs with *Hmga2*-knockdown were transplanted into the defect, and bone repair was evaluated 6 weeks later using micro-CT scanning and histological staining. **Results** GEO database analysis showed that *HMGA2* expression was upregulated during adipogenic differentiation of ADSCs. Protein-protein interaction network analysis suggested that the potential HMGA2 targets in osteogenic differentiation of ADSCs included SMAD7, CDH1, CDH2, SNAI1, SMAD9, IGF2BP3, and ALDH1A1. In mADSCs, *Hmga2* knockdown significantly upregulated the expressions of RUNX2, OPN, and OCN and increased cellular alkaline phosphatase activity and calcium deposition. In a critical-sized calvarial defect model, transplantation of mADSCs with *Hmga2* knockdown significantly promoted new bone formation. **Conclusion** HMGA2 is a crucial regulator of osteogenic differentiation in ADSCs, and *Hmga2* knockdown significantly promotes osteogenic differentiation of ADSCs and accelerates ADSCs-mediated bone defect repair in mice.

**Keywords:** adipose-derived mesenchymal stem cells; high-mobility group AT-hook 2; osteogenic differentiation; bone defect healing

收稿日期:2024-05-31

基金项目:国家自然科学基金(32270792);上海交通大学医工交叉“多学科交叉项目培育(转化)”(YQ2021QN48)

Supported by National Natural Science Foundation of China (32270792).

作者简介:柯志勇,硕士,高级实验师, E-mail: kezhy@smu.edu.cn; 黄子城,在读硕士研究生, E-mail: huangzicheng2@qq.com。柯志勇、黄子城共同为第一作者

通信作者:丁晶,博士,副主任医师, E-mail: doctor2049@sina.com;

崔忠凯,博士,教授, E-mail: zhongkaicui@smu.edu.cn

骨缺损是由创伤、感染、骨质疏松或骨肿瘤切除等原因引起的骨科常见疾病<sup>[1-3]</sup>。自体骨移植是临床治疗的金标准<sup>[3,4]</sup>,其具有良好的骨传导和骨诱导特性,但自体骨的来源有限,且骨的质量具有可变性,例如,部分骨质疏松患者的骨质量难以达到骨缺损填充的标准<sup>[5,6]</sup>,此外,取骨可能延长手术时间,并且术后供体部位易出现严重疼痛和并发症<sup>[4,7]</sup>。因此,迫切需要寻求能达到

自体骨移植效果的替代治疗方案。骨组织工程<sup>[8-10]</sup>作为一种有前景的替代疗法,通过将具有良好骨诱导性及骨传导性的复合生物材料和干细胞植入骨缺损部位,利用支架材料支持细胞生长和细胞外基质沉积<sup>[11]</sup>,从而加速新骨再生。

间充质干细胞(MSCs)是一类中胚层来源的多能干细胞,主要存在于骨髓、脂肪等结缔组织和器官间质中。它们具有自我更新和多向分化潜能,即能够分化为多种间质组织,如骨、软骨、脂肪、骨髓造血组织等。因其来源广泛且成骨能力优异,MSCs成为骨组织工程研究的“宠儿”<sup>[12]</sup>。脂肪间充质干细胞(ADSCs)作为MSCs的重要成员之一,相较于骨髓间充质干细胞,其具有易获取且数量丰富的特点,因此ADSCs被认为是骨组织工程中最适合使用的细胞<sup>[13]</sup>。

根据既往研究报道,间充质干细胞成骨和成脂分化命运的决定取决于多种转录因子和信号通路的调控<sup>[14, 15]</sup>,而成脂分化和成骨分化之间存在负相关关系<sup>[16]</sup>,即“成脂-成骨”平衡。找到促进“成脂-成骨”平衡向成骨分化倾斜的关键节点因子,能够帮助ADSCs在适宜的培养环境中实现定向的成骨分化。找到推动ADSCs向成骨谱系分化的关键因素,并利用骨组织工程为ADSCs提供适宜的微环境,确保移植至骨缺损部位的ADSCs能向成骨谱系分化并促进骨缺损修复,是本研究的核心及关键。

高迁移率族蛋白A2(HMGA2)是具有109个氨基酸的非组蛋白染色体蛋白。由于包含AT-hook结构域, HMGA2能够结合富含腺嘌呤和胸腺嘧啶的核苷酸序列,从而调控靶基因的转录活性。此外, HMGA2可以通过别构效应促进转录因子与靶区域的结合,间接影响基因表达<sup>[17, 18]</sup>。通常认为HMGA2只是调控干细胞成脂分化的重要因子<sup>[19-22]</sup>,然而,部分研究表明HMGA2也参与了MSCs的成骨分化<sup>[23-25]</sup>。我们在前期实验中也发现, *Hmga2*在mADSCs成骨分化进程中出现了差异性表达。然而, *Hmga2*在ADSCs成骨分化进程中的作用机制尚不明确。

*Hmga2*的表达水平与干细胞分化命运决定息息相关,目前对于HMGA2在成骨分化中的作用仍存有较大争议。研究指出, LncRNA LOXL1-AS1/miR-196a-5p/*HMGA2*信号轴通过调节C/EBP $\beta$ 介导的PPAR $\gamma$ 的表达促进间质/间充质干细胞的成骨分化<sup>[23]</sup>; miR-664a-5p<sup>[24]</sup>, let-7<sup>[25]</sup>, mirR-98<sup>[26]</sup>均可直接靶向*Hmga2*促进骨髓间充质干细胞或成骨前体细胞的成骨分化;而miR-497-5p<sup>[27]</sup>则通过靶向*Hmga2*并激活下游的JNK信号通路加速成骨前体细胞的成骨分化进程,以上研究结果均表明, *Hmga2*的下调直接或间接地促进成骨分化。但也有研究得出相反的结论,即*Hmga2*的下调抑制成骨

细胞谱系的成骨分化<sup>[28-30]</sup>。本研究通过生物信息学分析和文献调研,结合前期实验结果,提出如下科学假设: HMGA2不仅参与了ADSCs的成脂分化,也参与了其成骨分化,并在ADSCs“成脂-成骨”分化平衡中起关键作用,决定其分化命运。因此,阐明HMGA2对ADSCs的调控作用及其分子机制,有助于完善ADSCs的成骨分化机制,找到推动ADSCs向成骨谱系分化的关键因子,并有望为ADSCs治疗骨缺损的骨组织工程应用提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

I型胶原酶(Worthington Biochemical),间充质干细胞专用胎牛血清(Vivacell), $\beta$ -甘油磷酸(Sigma),维生素C(Sigma),地塞米松(Sigma),DMEM低糖培养基及Opti-MEM减血清培养基(Gibco),青霉素-链霉素溶液(Invitrogen),碱性磷酸酶染液及定量检测试剂盒(碧云天),茜素红溶液(赛维尔生物),全细胞蛋白裂解液及BCA定量试剂盒(凯基生物),Masson三色染色液(索莱宝),苏木素伊红(HE)染色试剂盒(雷根生物),Epson Perfection V600扫描仪(EPSON),化学发光(ECL)发光液(爱必胜生物),Lipofectamine 3000脂质体(Invitrogen),逆转录及实时定量PCR检测试剂盒(诺唯赞生物),Runt相关转录因子2(RUNX2)抗体(CST, 12556S),骨桥蛋白(OPN)抗体(CST),骨钙素(OCN)抗体(Sigma),快速RNA提取试剂盒(EZB),siRNA合成及qPCR引物合成(北京擎科生物科技股份有限公司)。SPF级6周龄雄性Balb/c小鼠及4周龄雄性C57BL/6J小鼠均购自南方医科大学动物实验中心,动物的使用方案获得南方医科大学动物医学伦理委员会审查批准(审批号:L2020005),并严格遵循美国NIH有关实验动物照料及使用的指南。

### 1.2 方法

1.2.1 GEO数据库以及Rstudio软件分析 使用GEOquery程序包获取GEO(GSE175624, GSE125331, GSE63754)数据集,以 $P < 0.05$ 且 $|\log_2FC| > 1$ 为标准,筛选ADSCs成脂或成骨分化后显著上调和下调的基因。使用Venn图进行差异基因交叉富集,使用pheatmap程序包根据标准化后的表达矩阵exp绘制热图。使用clusterProfiler程序包对表达矩阵进行GO富集分析。差异基因表达谱数据DEG使用limma包t检验和经验贝叶斯方法进行统计学分析;GO富集分析使用clusterProfiler包超几何检验或Fisher精确检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.2.2 mADSCs提取、培养、成骨诱导分化 选用4周龄雄性C57BL/6J小鼠( $n=3$ ),剪开小鼠下腹部至颈部皮

肤,钝性分离皮肤以暴露腹股沟及腋窝处的白色脂肪组织。用剪刀镊子取下完整的大块组织并置于PBS中备用,漂洗血污及毛发后,将组织转移至干净的细胞皿中,用洁净的眼科剪将脂肪组织剪碎至糜状。转移组织至50 mL无菌离心管中,添加约10倍组织体积分量的0.1% I型胶原酶,置于37 °C恒温摇床内,85 r/min震荡消化。待脂肪组织完全消化后,将消化液转移至15 mL离心管中,离心弃上清,用含10%胎牛血清的L-DMEM重悬细胞,并以 $2 \times 10^6$ 细胞接种于25 cm<sup>2</sup>培养瓶中,在培养箱中孵育(37 °C,5% CO<sub>2</sub>),全换液2~3 d/次,细胞贴壁融合至80%左右进行传代培养。将第3代细胞接种于12孔板,1×10<sup>4</sup>/孔,进行成骨诱导分化培养(L-DMEM,50 μg/mL维生素C,10 nmol/L地塞米松和10 mmol/L β-甘油磷酸),3 d/次换液。

**1.2.3 碱性磷酸酶(ALP)染色及定量** 室温下用4%多聚甲醛固定细胞10 min,按说明书配制碱性磷酸酶染液(碧云天),弃固定液,PBS清洗细胞3遍,24孔板每孔加入染液300 μL覆盖细胞,避光染色1 h,弃染液,去离子水洗2遍终止染色,晾干,扫描仪扫描,光学显微镜下拍照比较ALP染色的程度。向24孔板中加入全细胞裂解溶液(不含磷酸酶抑制剂),以50 μL/孔收集蛋白质,并使用BCA蛋白定量检测试剂盒和碱性磷酸酶检测试剂盒定量总蛋白和碱性磷酸酶含量。

**1.2.4 茜素红(ARS)染色及定量** 将细胞固定在4%多聚甲醛中,并在2% ARS溶液中染色。沉积的钙被染成红色。扫描仪扫描,光学显微镜下拍照比较着色钙结节数量。并用10%的乙酸萃取和10%的氨水中和对沉积的钙进行半定量。

**1.2.5 免疫印迹实验** 收集细胞,提取总蛋白,采用BCA蛋白定量试剂盒测定总蛋白质浓度,每孔上样30 μg,进行SDS-PAGE电泳,转膜,5%脱脂牛奶液封闭1 h。以β-actin为内参,加抗RUNX2(CST,1:1000)、抗OPN(CST,1:1500)、抗OCN(Sigma,1:1000),4 °C摇床孵育过夜,TBST洗3次,10 min/次,加入相应二抗,室温孵育1 h,化学发光液染色后进行观察和图像分析。

**1.2.6 RT-qPCR法** 通过RT-qPCR检测相关基因的表达水平。PrimerBank上查找目的基因引物(表1),通过RNA快速提取试剂盒提取细胞mRNA,进行RNA纯度和完整性检测,最后进行逆转录反应,选择*Gapdh*作为内参。

**1.2.7 小鼠不可自愈合颅骨缺损模型** 用戊巴比妥钠麻醉6周龄的雄性Balb/c小鼠( $n=16$ ),在右侧颅骨上钻取全层骨缺损(直径3 mm)。Blank组缺损未做任何处理,MeGC<sup>[31]</sup>(甲基丙烯酸酯壳聚糖水凝胶)组只加入水凝胶进行填充,si-NC组和si-*Hmga2*组分别加入MeGC包裹了转染si-NC或si-*Hmga2*的ADSCs。术后6周,断颈处死小鼠并取材其颅骨组织。然后进行μCT扫描、组织

表1 RT-qPCR 所用引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene		Sequence
<i>Hmga2</i>	Forward	CCGGTAGAGGCAGTGGTAGC
	Reverse	GGTTGTCCCTGGGCTGATGT
<i>Alp</i>	Forward	GAGCAGGAACAGAAGTTTGC
	Reverse	GTTGCAGGGTCTGGAGAGTA
<i>Osx</i>	Forward	GCCGCTTTGTGCCTTTGAAATG
	Reverse	CGTTATGCTCTTCCAGACTCC
<i>Runx2</i>	Forward	CCGCACGACAACCGCACCAT
	Reverse	CGCTCCGGCCCAAATCTC
<i>Opn</i>	Forward	CCCTCGATGTCATCCCTGTT
	Reverse	CCCTTCCGTTGTTGTCCTG
<i>Ocn</i>	Forward	AGCTCAACCCAAATTGTGAC
	Reverse	AGCTGTGCCGTCCATACTTT
<i>Dlk1</i>	Forward	GCGGGAACGCAACAACATC
	Reverse	GTCCTGGTCAACTCCAGCAC
<i>Pparγ</i>	Forward	GTGATGGAAGACCACTCGCATT
	Reverse	CCATGAGGGAGTTAGAAGGTTTC

学HE和Masson三色染色,染色步骤参照试剂盒说明书,蔡司显微镜拍照采集染色结果并进行骨缺损修复评估。

**1.2.8 μCT扫描** 将取材的颅骨固定在4%多聚甲醛溶液中48 h。然后对所有样本均使用Viva CT40(Scanco Medical AG, Bassersdorf)进行高分辨率μCT图像采集。采用55 kVp的电压值和15 μm的分辨率曝光50 min扫描。使用ImageJ测定所有样品的新骨表面积,并将其归一化为原始缺损表面积(直径3 mm)。使用SkyScan CT-Analyzer程序提取骨体积密度、骨小梁数、骨小梁厚度和骨小梁分离度。

### 1.3 统计学分析

本文实验均至少独立重复3次,实验结果统计学分析以及图表制作使用GraphPad Prism 8.0软件,统计结果以均数±标准差表示。两组单因素组间统计采用Student's *t*-test分析;两组以上的单因素组间统计采用One-way ANOVA分析,并使用Tukey进行多重比较检验。当 $P < 0.05$ 时,认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *Hmga2*基因在成脂分化中显著高表达

根据“成脂-成骨”平衡理论(图1A),通过Venn图对两个数据集中所有与成脂分化相关的基因进行交叉富集分析,共有504个基因在两个数据集中表达显著上调(图1B)。进一步对DEG进行GO分析( $P < 0.05$ ,图1C)。本研究对“fat cell differentiation”下的26个基因进行了可视化处理,并发现在成脂分化过程中稳定上调表达的转录调控因子*HMGA2*(图1D,E)。

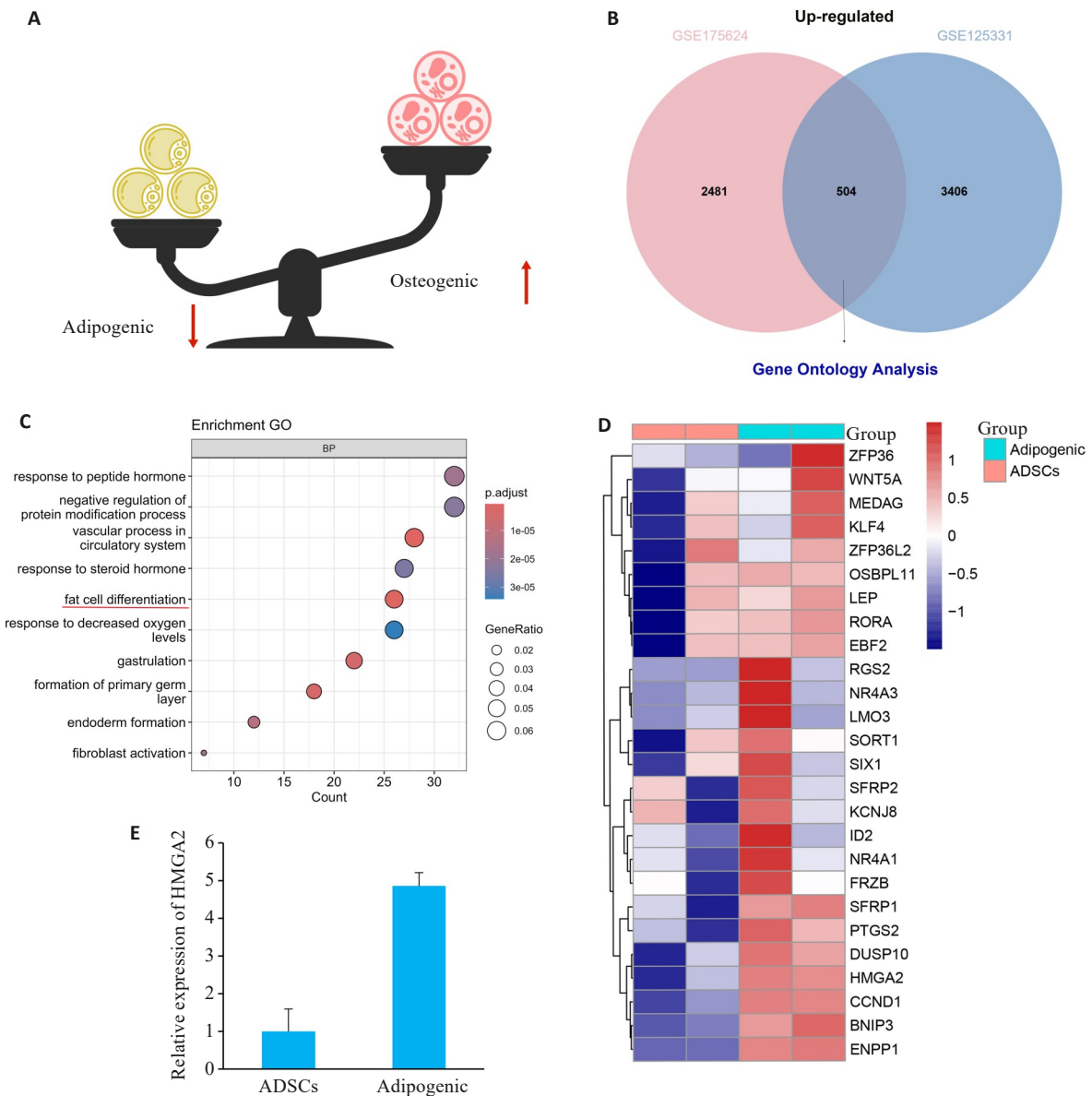


图1 hADSCs成脂分化进程中的差异基因表达情况

Fig.1 Differential gene expression profile during adipogenic differentiation of human ADSCs. A: Schematic illustration of the balance between adipogenic and osteogenic differentiation. B: Venn plot of up-regulated genes in the GSE175624 and GSE125331 datasets. C: Bubble chart of GO pathway enrichment analysis of the differentially expressed genes. D: Heatmap of the differentially expressed genes under the "fat cell differentiation" term. E: Expression of *HMGA2* in GSE175614 dataset.

### 2.2 抑制 *Hmga2* 促进 mADSCs 中 ALP 表达和矿化结节形成

RT-qPCR 结果显示,与 NC 组相比,转染 si-*Hmga2* 后, mADSCs 细胞中 *Hmga2* 的 mRNA 水平显著降低,其中 si-*Hmga2*-2 的敲低效率最高 ( $P < 0.05$ , 图 2A)。后续的功能实验选用 si-*Hmga2*-2 进行。分别在成骨诱导的第 3 天和第 7 天使用 ALP 染色及定量评估 mADSCs 的成骨能力,结果显示,抑制 *Hmga2* 的表达后 mADSCs 的 ALP 染色显著增强,ALP 活性相较于对照组分别提高至 1.2 倍和 1.3 倍 ( $P < 0.001$ , 图 2C、E)。成骨诱导 14 d 进行 ARS 染色, si-*Hmga2* 组相较于对照组红染矿化结

节显著增多,定量结果显示钙结节数量为对照组的 1.4 倍,差异具有统计学意义 ( $P < 0.001$ , 图 2G)。

### 2.3 抑制 *Hmga2* 促进成骨分化标志物的表达,降低成脂分化标志物的表达

在成骨诱导的第 3 天, si-*Hmga2* 组 *Osterix* (*Osx*) 基因的表达水平显著高于对照组,同时,成脂分化转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (*Ppar $\gamma$* ) 表达下调,成脂分化抑制因子 delta 样非典型 Notch 配体 1 (*Dlk1*) 表达上调,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 3A-C);成骨诱导的第 7 天, si-*Hmga2* 组 Runt 相关转录因子 2 (*Runx2*) 和骨桥蛋白 (*Opn*) 的基因 ( $P < 0.01$ , 图 3D-E) 和

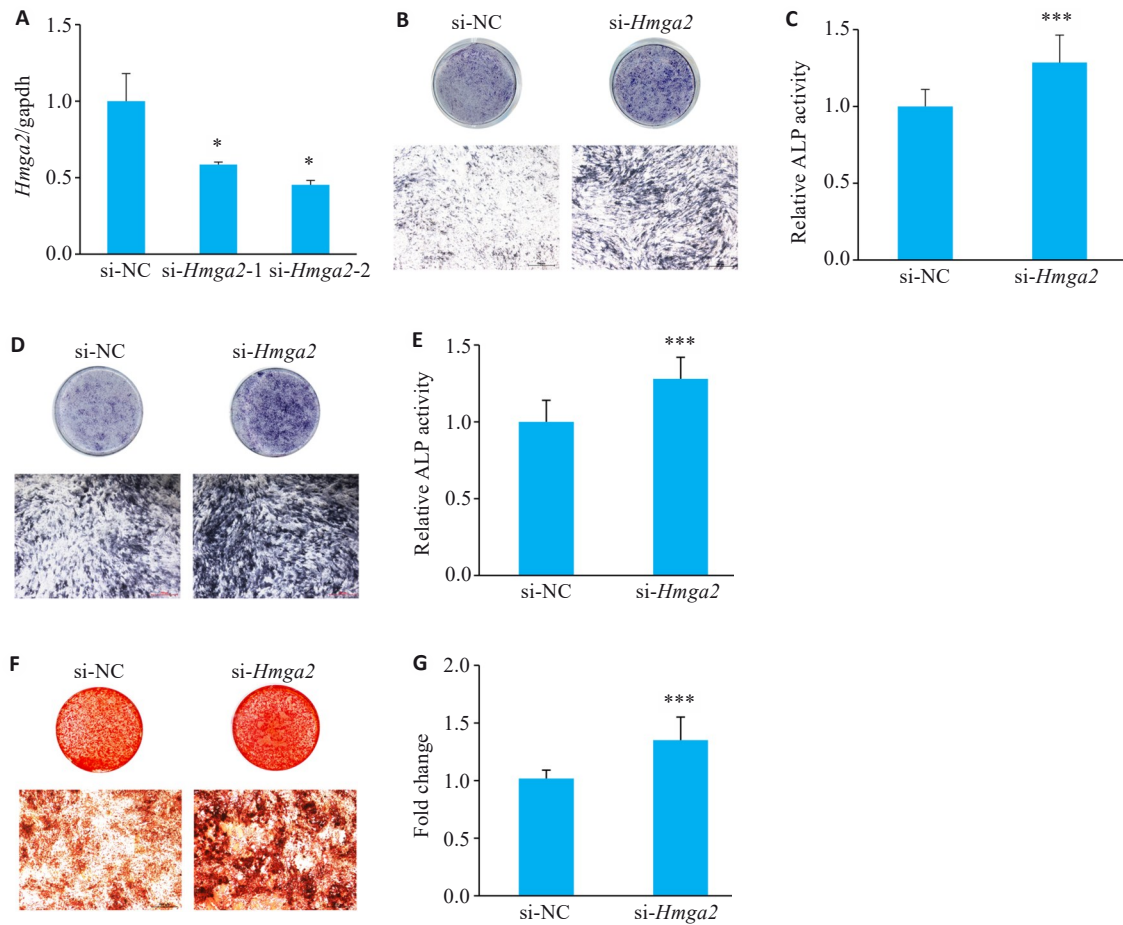


图2 抑制 *Hmga2* 在体外促进 ADSCs 成骨分化

Fig.2 *Hmga2* knockdown promotes osteogenic differentiation of mouse ADSCs *in vitro*. A: si-*Hmga2* inhibits *Hmga2* mRNA expression in ADSCs. B-E: ALP staining and activity assay of mouse ADSCs on day 3 (B, C) and 7 (D, E) of osteogenic induction. F, G: ARS staining and quantification of calcium deposition in ADSCs on day 14 of osteogenic induction. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs si-NC group. Scale bar: 500  $\mu\text{m}$ .

蛋白表达水平( $P < 0.05$ ,图3F)相较于对照组均显著增加。到了成骨诱导的第14天,si-*Hmga2*组的骨钙素(OCN)蛋白表达也显著高于对照组( $P < 0.05$ ,图3G)。上述实验结果与ALP及ARS染色结果相互印证,说明在mADSCs的分化进程中,*Hmga2*的敲低会抑制mADSCs的成脂分化,推动mADSCs向成骨谱系分化(图4)。

#### 2.4 抑制 *Hmga2* 的表达促进体内骨缺损修复

术后6周取材, $\mu\text{CT}$ 扫描三维重建图像显示 si-*Hmga2*组ADSCs的骨缺损修复效果最佳,可见大量新骨形成,si-NC组和MeGC组在骨缺损孔中央亦有少量新骨形成,而Blank组只观察到新生骨从边缘处生长(图5A)。通过骨计量学分析新生骨面积、骨体积分数(BV/TV%)、骨小梁数目(Tb.N)等,抑制 *Hmga2* 后ADSCs促进骨缺损修复效果( $P < 0.01$ ,图5B)。组织切片HE和Masson染色显示si-*Hmga2*组有更丰富的胶原覆盖,且有较大面积新生骨形成(图6)。

#### 2.5 HMGA2在成骨分化过程中的蛋白互作网络分析及靶点预测

HMGA2归属于其中一个拥有54份蛋白质的聚类类别中(图7A),对该聚类下的蛋白网络进行了进一步分析,并围绕HMGA2的可能互作关系绘制了卫星图(图7B)。在聚类分析后,各节点的相互作用蛋白数目决定了它们在网络图中的位置分布,节点之间连线颜色的深浅表示相互作用的可能性大小,而HMGA2则位于网络图的第2圈。网络图的中心节点是由CDH1编码的钙粘蛋白-1,该蛋白参与调节细胞间粘附、迁移和增殖功能,与HMGA2作为转录因子,调控细胞周期和增殖功能密切相关。HMGA2预测的可能互作蛋白包括SMAD7、CDH1、CDH2、SNAI1、SMAD9、IGF2BP3、ALDH1A1(表2)。在预测结果中,IGF2BP3被认为是HMGA2下游靶点的可能性最高,同时,GO及KEGG分析提示HMGA2可能通过激活TGF- $\beta$ 信号通路来调节成骨分化。

### 3 讨论

治疗骨不连和大量骨缺损,并有效增强骨组织修

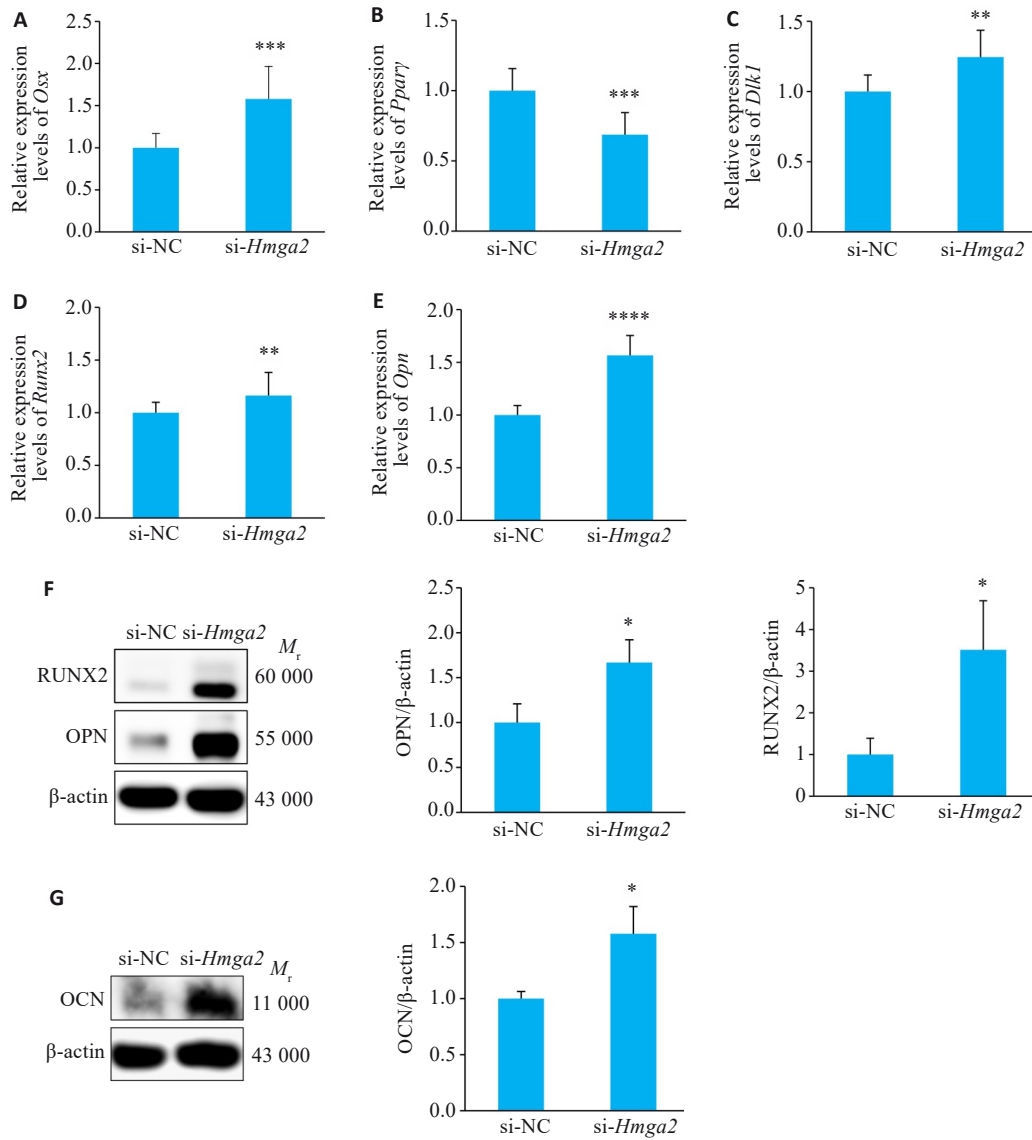


图3 抑制 *Hmga2* 对 ADSCs 成骨成脂分化标志的影响

Fig.3 Effects of *Hmga2* knockdown on expressions of osteogenic and adipogenic markers of ADSCs. **A-C**: Relative expression levels of *Osx*, *Pparγ*, and *Dlk1* mRNAs in ADSCs on day 3 of osteogenic induction. **D-F**: Expressions of *Runx2* and *Opn* mRNA and proteins on day 7. **G**: Expressions of OCN protein on day 7. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs si-NC group.

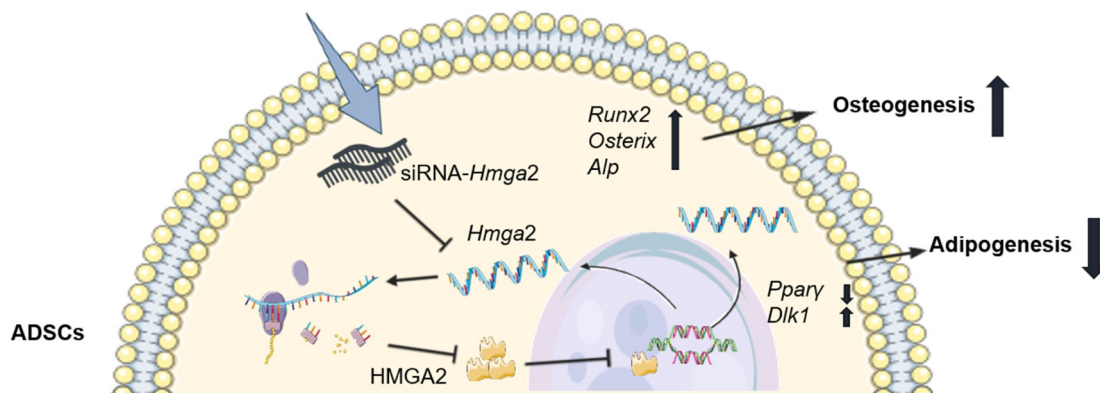


图4 HMGA2 影响 ADSCs 成骨分化的作用机制图

Fig.4 Mechanistic illustration of the role of HMGA2 in osteogenic differentiation of ADSCs.

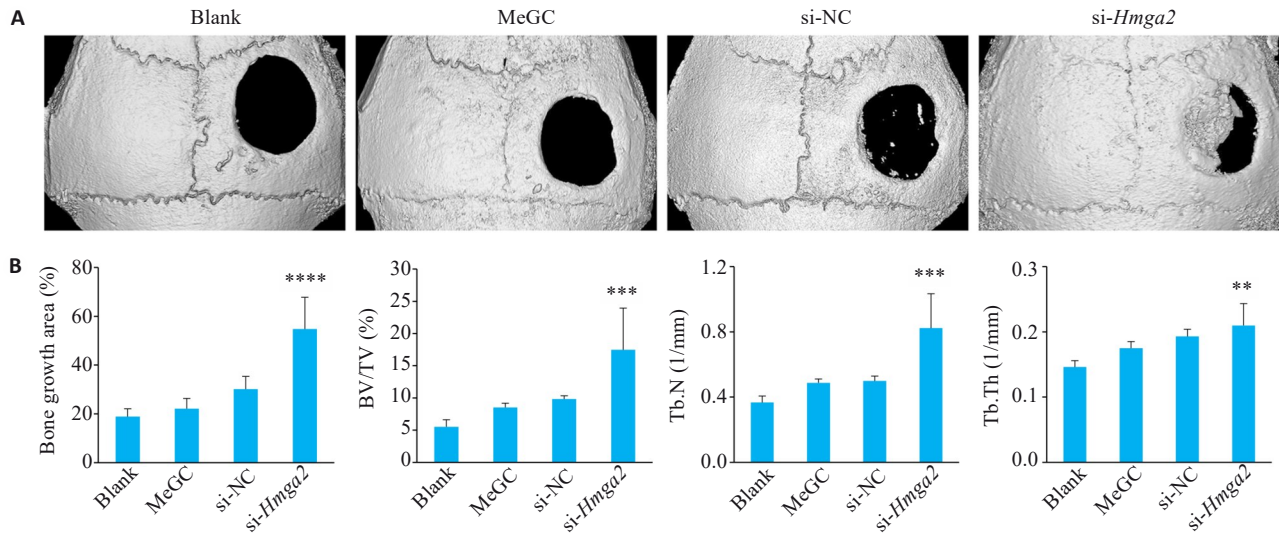


图5 术后6周小鼠颅骨μCT三维重建图及骨计量学分析

Fig.5 Three-dimensional micro-CT reconstruction and histomorphometric analysis bone defect repair in mice at 6 weeks after surgery. A: Reconstructed micro-CT images. B: Morphometric analyses of bone regeneration in calvarial defects by assessing relative bone growth surface area, bone volume/tissue volume (BV/TV%), trabecular number (Tb.N) and trabecular thickness (Tb.Th). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs Blank group.

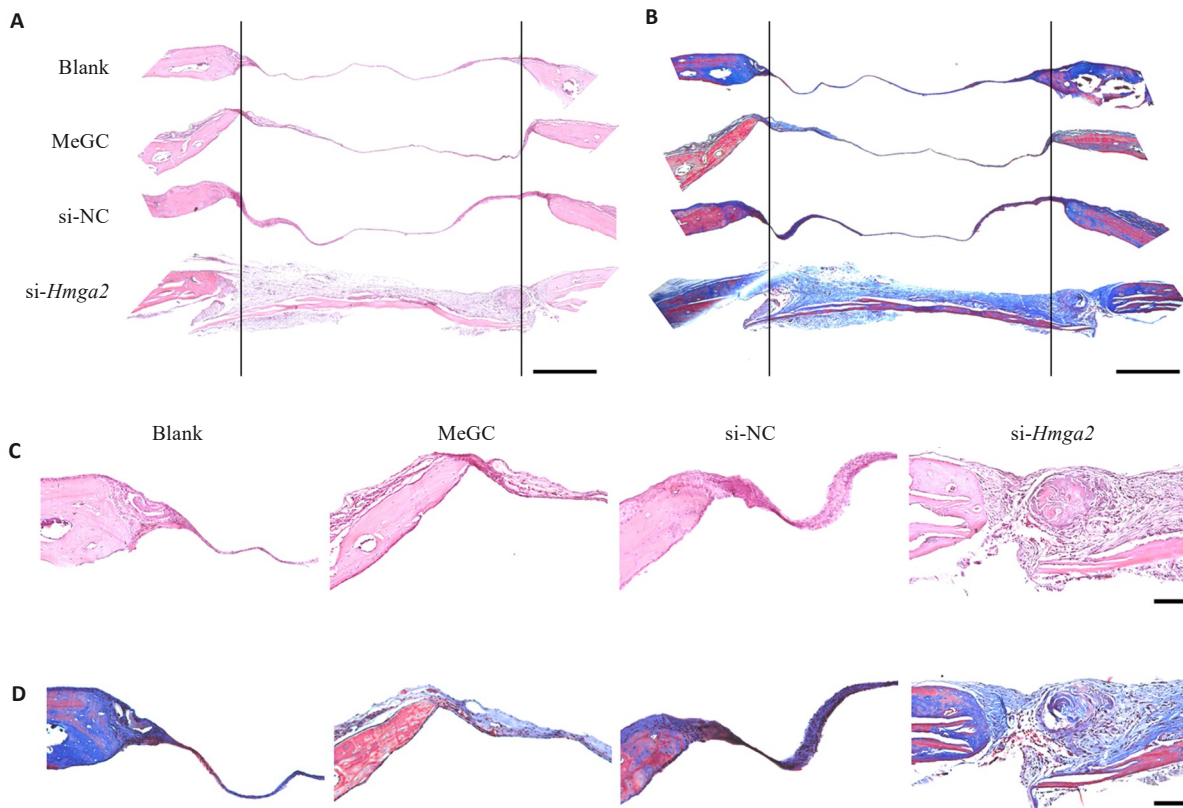


图6 术后6周小鼠颅骨缺损骨再生的组织学HE和Masson染色

Fig.6 HE and Masson's trichrome staining of bone regeneration in the calvarial defects at 6 weeks after surgery. A, C: HE staining overview image (scale bar: 500  $\mu\text{m}$ ) and magnified image (scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ). B, D: Masson's trichrome staining overview image (scale bar: 500  $\mu\text{m}$ ) and magnified image (scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ).

复仍然是临床实践中的重大挑战<sup>[32]</sup>。传统手术方法如假体植入和骨移植虽然具有一定临床疗效,但存在感染、疼痛、高手术成本以及需要额外手术等缺点<sup>[4]</sup>,限制了其应用。因此,迫切需要新的策略或改进现有治疗方

法,以提供个性化诊治并加快患者康复。ADSCs作为骨组织工程的“宠儿”,探索其成骨分化的机制并实现在骨组织工程应用中的定向分化,能够有力地推动ADSCs在骨缺损修复中的应用<sup>[13]</sup>。本研究从公开数据

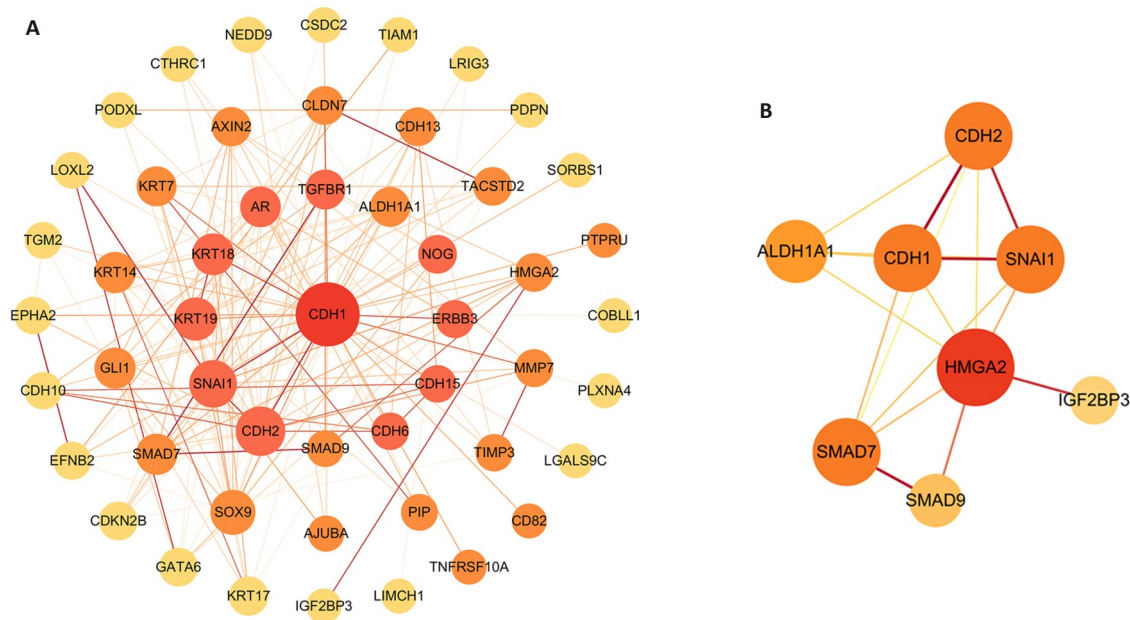


图7 HMGA2的蛋白互作网络分析

Fig.7 Protein-protein interaction (PPI) network analysis of HMGA2. A: PPI networks after cluster analyses. B: Predicted HMGA2 direct interacting proteins.

表2 HMGA2互作蛋白评分

Tab.2 HMGA2-interacting protein possibility score

Gene	Combined score	Experimentally determined interaction	Coexpression
IGF2BP3	0.909	0.292	0.257
SMAD9	0.816	0.294	0.067
SNAI1	0.728	0	0.042
SMAD7	0.68	0.045	0.055
CDH1	0.593	0.059	0
ALDH1A1	0.569	0	0
CDH2	0.538	0.095	0.097

库 GEO 收集并筛选了 hADSCs 成脂分化前后的 RNA-seq 数据集进行分析,结果表明 hADSCs 成脂分化前后存在大量差异表达基因。“成脂-成骨”分化存在此消彼长的平衡,因此明确促进成骨分化,同时抑制成脂分化的关键节点分子具有重要的意义。众多研究指出 *Hmga2* 在成骨分化进程中尤其是在 MSCs 的成骨分化中发挥着十分重要的作用,然而,目前尚未有研究指出 *Hmga2* 与“成脂-成骨”平衡存在直接相关关系,同时,不同研究报道的 *Hmga2* 在成骨分化中的作用存在分歧。

本研究明确了敲低 *Hmga2* 能够促进 ADSCs 成脂分化并抑制成骨分化,具有调控其“成脂-成骨”分化平衡的能力。在体外细胞和体内骨缺损模型中均证实了抑制 *Hmga2* 的表达能够促进 mADSCs 向成骨谱系分化,促进骨再生修复,明确了 *Hmga2* 的抑制促进 ADSCs

成骨分化这一结论。结合上述实验结果,我们认为 *Hmga2* 在 ADSCs 成骨分化命运决定中发挥着关键节点分子的作用,调控“成脂-成骨”平衡,这也是本研究的核心及创新点。本研究通过数据库及 PPI 蛋白互作网络分析,预测出 HMGA2 的下游潜在靶点 IGF2BP3 及 TGF- $\beta$  信号通路。遗憾的是,本研究通过生物信息学预测找到的靶点和通路未能进一步探索和验证,目前尚停留在理论预测阶段。在后续研究中,将会重点完成 HMGA2 对成骨分化影响的调控网络构建和机制的研究,以阐明 HMGA2 影响“成脂-成骨”分化平衡过程中的信号通路。

本研究的另一个创新点在于将抑制 *Hmga2* 促进 ADSCs 成骨分化的机制应用于动物模型。在免疫缺陷小鼠的颅骨缺损不可自愈模型中<sup>[33]</sup>,利用 MeGC 光敏水凝胶包裹抑制 *Hmga2* 表达的 mADSCs 制备的组织工程系统展现出了卓越的骨再生修复效果,这一实验结果有力地支持了 *Hmga2* 作为间充质干细胞分化命运调节因子的证据,更重要的是,这为解决大面积骨缺损、衰老或肥胖伴随骨质疏松等骨骼疾病提供了新的基因治疗靶点。

综上所述, HMGA2 作为 ADSCs 成骨分化命运决定的关键节点分子,通过抑制 *Hmga2* 可以改变“成脂-成骨”平衡,抑制 ADSCs 的成脂分化,促进其成骨分化。在此过程中,成骨标记物 RUNX2、OPN 和 OCN 表达显著上调,矿化钙结节显著增加;此外,抑制 *Hmga2* 还能够加速小鼠体内骨缺损修复,在骨组织工程修复骨缺损的应用中展现出巨大的潜力。



## 参考文献:

- [1] Karalashvili L, Kakabadze A, Uhryn M, et al. Bone grafts for reconstruction of bone defects (review) [J]. Georgian Med News, 2018(282): 44-9.
- [2] Marx RE. Bone and bone graft healing[J]. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2007, 19(4): 455-66, v.
- [3] Bläsius F, Delbrück H, Hildebrand F, et al. Surgical treatment of bone sarcoma[J]. Cancers, 2022, 14(11): 2694.
- [4] Myeroff C, Archdeacon M. Autogenous bone graft: donor sites and techniques[J]. J Bone Joint Surg Am, 2011, 93(23): 2227-36.
- [5] Tabrizi R, Shafiei S, Moslemi H, et al. Impact of osteoporosis on autogenous bone graft resorption[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2024, [Online ahead of print].
- [6] Shimada Y, Ishikawa T, Endo J, et al. Treatment of atypical ulnar fractures associated with long-term bisphosphonate therapy for osteoporosis: autogenous bone graft with internal fixation[J]. Case Rep Orthop, 2017, 2017: 8602573.
- [7] Chou LB, Mann RA, Coughlin MJ, et al. Stress fracture as a complication of autogenous bone graft harvest from the distal tibia [J]. Foot Ankle Int, 2007, 28(2): 199-201.
- [8] Bharadwaz A, Jayasuriya AC. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020, 110: 110698.
- [9] Moghaddam A, Bahrami M, Mirzadeh M, et al. Recent trends in bone tissue engineering: a review of materials, methods, and structures[J]. Biomed Mater, 2024, 19(4): 1088.
- [10] 茹江英, 牛云飞, 刘雅克, 等. 骨不连、骨缺损治疗新材料、新技术的基础研究及临床应用[Z]. 2016.
- [11] El-Rashidy AA, Roether JA, Harhaus L, et al. Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: a review of *in vivo* studies in bone defect models[J]. Acta Biomater, 2017, 62: 1-28.
- [12] 吴展羽, 叶川. 干细胞在骨科多种疾病治疗中的应用: 问题及前景[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(17): 2775-82.
- [13] Gou YN, Huang YR, Luo WP, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) are a superior cell source for bone tissue engineering[J]. Bioact Mater, 2024, 34: 51-63.
- [14] Gaur S, Agnihotri R. Application of adipose tissue stem cells in regenerative dentistry: a systematic review[J]. J Int Soc Prev Community Dent, 2021, 11(3): 266-71.
- [15] Dzedzic DSM, Mogharbel BF, Ferreira PE, et al. Transplantation of adipose-derived cells for periodontal regeneration: a systematic review[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2019, 14(6): 504-18.
- [16] James AW. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation[J]. Scientifica, 2013, 2013: 684736.
- [17] Hammond SM, Sharpless NE. HMGA2, microRNAs, and stem cell aging[J]. Cell, 2008, 135(6): 1013-6.
- [18] West RC, McWhorter ES, Ali A, et al. HMGA2 is regulated by LIN28 and BRCA1 in human placental cells[J]. Biol Reprod, 2019, 100(1): 227-38.
- [19] Yan JJ, Yang YL, Liu YR, et al. MicroRNA let-7g links foam cell formation and adipogenic differentiation: a key regulator of Paeonol treating atherosclerosis-osteoporosis[J]. Phytomedicine, 2024, 126: 155447.
- [20] Ligon AH, Moore SD, Parisi MA, et al. Constitutional rearrangement of the architectural factor HMGA2: a novel human phenotype including overgrowth and lipomas[J]. Am J Hum Genet, 2005, 76(2): 340-8.
- [21] Erickson-Johnson MR, Seys AR, Roth CW, et al. Carboxypeptidase M: a biomarker for the discrimination of well-differentiated liposarcoma from lipoma[J]. Mod Pathol, 2009, 22(12): 1541-7.
- [22] Kalomoiris S, Cicchetto AC, Lakatos K, et al. Fibroblast growth factor 2 regulates high mobility group A2 expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. J Cell Biochem, 2016, 117(9): 2128-37.
- [23] Zhang L, Xie HQ, Li SL. LncRNA LOXL1-AS1 controls osteogenic and adipocytic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in postmenopausal osteoporosis through regulating the miR-196a-5p/Hmga2 axis[J]. J Bone Miner Metab, 2020, 38(6): 794-805.
- [24] Zhang Y, Liu Y, Wu M, et al. MicroRNA-664a-5p promotes osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by directly downregulating HMGA2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521(1): 9-14.
- [25] Wei JF, Li HL, Wang SH, et al. Let-7 enhances osteogenesis and bone formation while repressing adipogenesis of human stromal/mesenchymal stem cells by regulating HMGA2[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(13): 1452-63.
- [26] Gao XL, Cao MG, Ai GG, et al. MiR-98 reduces the expression of HMGA2 and promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(11): 3311-7.
- [27] Zhao HQ, Yang YX, Wang Y, et al. MicroRNA-497-5p stimulates osteoblast differentiation through HMGA2-mediated JNK signaling pathway[J]. J Orthop Surg Res, 2020, 15(1): 515.
- [28] 曹振宇, 冶怡, 马建武, 等. MiR-98-5p靶向HMGA2通过PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ 通路调控骨再生的机制研究[J]. 解放军医药杂志, 2021, 33(8): 40-4, 61.
- [29] Tian Z, Zhou HZ, Xu YB, et al. MicroRNA-495 inhibits new bone regeneration via targeting high mobility group AT-hook 2 (HMGA2) [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 4689-98.
- [30] Negishi T, Mihara N, Chiba T, et al. High mobility group AT-hook 2 regulates osteoblast differentiation and facial bone development[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 590: 68-74.
- [31] Cui ZK, Kim S, Baljon JJ, et al. Microporous methacrylated glycol chitosan-montmorillonite nanocomposite hydrogel for bone tissue engineering[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3523.
- [32] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, et al. Bone regeneration: current concepts and future directions[J]. BMC Med, 2011, 9: 66.
- [33] Nauth A, Schemitsch E, Norris B, et al. Critical-size bone defects: is there a consensus for diagnosis and treatment[J]? J Orthop Trauma, 2018, 32(Suppl 1): S7-S11.

(编辑: 经媛)