

缺氧环境通过HIF-1 α /YAP信号促进大鼠生长板软骨细胞表型维持

李晓娟¹ 李浩² 马永壮² 闫吉元² 张俊² 马天² 刘朝旭² 杨勇² 任晔² 吴华²

【摘要】 目的 研究缺氧条件下缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)和Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)蛋白在软骨细胞表型维持中的作用。方法 生长板软骨细胞取自7日龄的SD大鼠,并通过氯化钴干预以模拟体外缺氧微环境。通过检测细胞外基质水平和II型胶原(Collagen 2, Col2)蛋白水平表达变化来确定软骨细胞在氯化钴刺激下软骨表型变化。通过Western blotting方法检测HIF-1 α 、YAP蛋白水平在氯化钴刺激后的表达变化。结果 氯化钴于体外实验中模拟的缺氧环境能够促进软骨细胞细胞外基质的表达水平,并且能够上调Col2蛋白表达,同时上调HIF-1 α 和YAP蛋白水平的表达。抑制HIF-1 α 的表达可以下调缺氧环境所致的YAP蛋白表达水平的上调,而抑制YAP的表达并不能影响HIF-1 α 蛋白表达水平。结论 氯化钴于体外实验中模拟的缺氧环境可能通过HIF-1 α /YAP信号促进大鼠生长板软骨细胞软骨表型的维持。

【关键词】 氯化钴;缺氧诱导因子-1 α ;YAP;软骨表型

Hypoxia promotes the maintenance of chondrogenic phenotype in rat growth plate chondrocytes through the HIF-1 α /YAP signaling. Li Xiao-juan¹, Li Hao², Ma Yong-zhuang², Yan Ji-yuan², Zhang Jun², Ma Tian², Liu Chao-xu², Yang Yong², Ren Ye², Wu Hua². ¹Departments of Nephrology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; ²Departments of Orthopaedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: WU Hua, E-mail: wuhua360@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and Yes-associated protein (YAP) in chondrogenic phenotype maintenance of hypoxia-induced growth plate chondrocytes *in vitro*. **Methods** The growth plate chondrocytes were harvested from 7-day-old SD rats and cultured with cobalt chloride for hypoxia simulation. The phenotype changes of chondrocytes stimulated by cobalt chloride were determined by measuring the changes of extracellular matrix levels and the expression levels of Col2 protein. The expression levels of HIF-1 α and YAP were detected by Western blotting. **Results** The hypoxia simulated by cobalt chloride could promote the expression level of extracellular matrix of chondrocytes and up-regulate Col2 protein expression. At the same time, cobalt chloride could up-regulate the expression levels of HIF-1 α and YAP proteins. Inhibition of HIF-1 α expression could down-regulate the up-regulation of YAP protein expression by cobalt chloride, while inhibition of YAP expression did not affect HIF-1 α protein expression. **Conclusion** Under the hypoxia environment simulated by cobalt chloride, the HIF-1 α /YAP signaling may play an important role in controlling the maintenance of the chondrogenic phenotype in growth plate chondrocytes.

【Key words】 Cobalt chloride; HIF-1 α ; YAP; Chondrogenic phenotype

软骨组织是一种特殊形式的结缔组织,不含神经纤维、血管及淋巴管,并受各种内分泌、旁分泌激素及复杂的局部信号环路的调控^[1]。氧是细胞新陈

代谢的重要能量来源,组织中所需要的氧主要依靠血管运输。由于软骨组织无血管,因此在软骨组织中氧分压较其他组织低,在生理条件下软骨细胞对低氧表现出良好的适应能力。然而在体外细胞实验中,软骨细胞在培养过程中难以保持其表型的稳定性而出现包括成纤维样改变、细胞外基质成分的大量丢失等^[2],从而给软骨细胞的研究带来了很大的

DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2019.02.011

基金项目:国家自然科学基金(51537004)

作者单位:华中科技大学同济医学院附属同济医院(1. 肾内科; 2. 骨科),武汉 430030

通信作者:吴华, E-mail: wuhua360@aliyun.com

困难,这也是软骨组织工程中自体软骨移植应用的主要缺点之一。其中生长板软骨细胞在缺氧微环境中如何维持正常的生理功能,及其涉及信号通路尚未完全明了。

缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是由氧调节性的 α 亚基和恒定表达的 β 亚基组成的转录因子。HIF-1 α 是软骨细胞对缺氧反应中重要的介导因子,并可上调一系列细胞因子从而介导软骨细胞分化、增殖、迁徙等,其中包括血管内皮细胞生长因子,对维持软骨细胞的稳态和功能具有重要意义^[3]。

Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)是组织稳态、器官发育和肿瘤形成的核心调控因子。当经典的 Hippo 信号被激活,哺乳动物 Ste20 类似蛋白激酶 1/2 (mammalian Ste20 like protein kinase1/2, MST1/2)被磷酸化并与 salvador 相互作用磷酸化大肿瘤抑制同源体(large tumor suppressor homologue, LATS1/2)激酶,磷酸化的 LATS1/2 激酶被激活,激活后的 LATS1/2 激酶磷酸化下游的 YAP 致使 YAP 失活。磷酸化 Yes 相关蛋白(p-Yes-associated protein, P-YAP)与 14-3-3 结合并被蛋白酶体泛素化降解。去磷酸化的 YAP 入核并主要与 TEA 结构域转录因子(TEAD)家族转录因子相互作用而诱导目标基因的表达^[4,5]。YAP1 是软骨祖细胞增殖和维持所必须的,并能够促进早期软骨细胞的增殖^[6]。YAP1 可通过抑制 X 型胶原 α 链(Collagen10 α 1, Col10 α 1)表达和与 Runt 相关转录因子 2(runt-related transcription factor 2, Runx2)相互作用从而抑制软骨细胞肥大。但是,YAP 在生长板软骨细胞缺氧条件中的作用尚有争议。

考虑到 YAP 参与软骨细胞的发育、分化,我们猜测 YAP 可能通过与 HIF-1 α 相互作用从而参与缺氧条件下软骨细胞的分化。在此研究中,我们利用氯化钴干预以模拟体外缺氧微环境,探索在体外实验中氯化钴模拟的缺氧微环境是否能够促进 YAP 的激活,并且是否能够促进软骨表型的维持。进一步探索体外实验中氯化钴模拟的缺氧微环境对软骨细胞的影响作用中 YAP 与 HIF-1 α 之间的关系。

材料与方法

一、主要实验试剂、材料和设备

磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS, 武汉博士德公司,中国),胰酶(Gibco,美国),二型胶原酶(Invitrogen,美国),胎牛血清(fetal bovine serum,

FBS, Gibco, 美国),青链霉素(100 U/ml penicillin G sodium, 100 μ g/ml streptomycinsulfate, Gibco, 美国), Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12 (DMEM/F-12, HyClone, 美国),细胞计数试剂盒-8 (CCK-8, 武汉博士德公司,中国),氯化钴(Thermo Fisher, 美国),成软骨培养基(赛业公司,美国),HIF-1 α siRNA(广州锐博公司,中国),lipo2000(Thermo Fisher, 美国),Opti-MEM 培养基(Gibco, 美国),蛋白酶抑制剂(武汉博士德公司,中国),磷酸酶抑制剂(武汉博士德公司,中国),RIPA 裂解液(武汉博士德公司,中国),硝酸纤维素薄膜(polyvinylidene fluoride, PVDF, Millipore, Billerica, 美国),ECL 发光液(Thermo Pierce, 美国),培养箱(21% O₂, 74% N₂, 5% CO₂, 饱和湿度, Thormo 公司, 美国),Bio-Rad 曝光机(Hercules, 美国),酶标仪(Eppendorf 公司, 德国),抗体:YAP(#14074, Cell Signaling Technology, 美国),II 型胶原(Collagen 2, Col2)(ab34712, Abcam, 英国),HIF-1 α (ab2185, Abcam, 英国), β -actin(BM5180, 武汉博士德公司,中国)。

二、分离和培养软骨细胞

生长板软骨细胞取自 7 日龄的 SD 大鼠。所有动物规程遵从我院伦理委员会相关规定。SD 大鼠麻醉后颈椎脱臼法处死,软骨取自股骨远端及胫骨近端生长板软骨组织,用 PBS 漂洗后切碎至 1~3 mm³ 大小,用 0.25% 胰酶消化 30 min,随后用 0.1% 二型胶原酶 37 $^{\circ}$ C 消化 8 h。PBS 漂洗后离心收集细胞,并用含 10% FBS 和 1% 青链霉素的 DMEM/F-12 培养基重悬细胞后种入细胞培养瓶中。将细胞置于培养箱中培养,每 2 天更换培养基。当细胞达到 80% 融合时,胰酶消化传代,第 3 代细胞用于本实验。

三、氯化钴干预形成缺氧环境

首先将软骨细胞(5 000 细胞/孔)接种到 96 孔板中。细胞黏附 24 h 后,用不同浓度的氯化钴培养基(0、50、100、150、200 μ mol/L)处理细胞 24 h。

(一)细胞活性实验

通过使用 CCK-8 细胞计数试剂盒分析细胞活力。细胞干预完成后,在每孔中加入 100 μ l 培养基和 10 μ l 的 CCK-8 溶液。在 37 $^{\circ}$ C 下再温育 1 h 后,酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度。

(二)阿利新蓝染色

将 2 \times 10⁶ 个大鼠生长板软骨细胞重悬于 10 μ l 的培养基中,随后将其种入 6 孔板中,放置培养箱中稍稍干燥后按分组加入 2 ml 培养基:①对照组:普通培养基;②成软骨培养基组:成软骨培养基;③氯化钴

干预组:氯化钴浓度为 10^{-5} mol/L的普通培养基;④成软骨培养基+氯化钴组:含 10^{-5} mol/L氯化钴的成软骨培养基。细胞培养干预7 d后进行阿利新蓝染色。

(三)Western blotting

1. 浓度梯度实验 细胞干预完成后进行 Western blotting 实验,检测 Col2、YAP 和 HIF-1 α 蛋白的表达。干预后的细胞用预冷的 PBS 漂洗后,用含 1% 的蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解软骨细胞 30 min, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心,收集上清后用 BCA 法进行蛋白定量。取 20 μ g 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后将分离的蛋白转至硝酸纤维素薄膜上。将膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后用相应抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。三乙醇胺缓冲盐+Tweenzo 溶液 (tris-buffered saline and tween 20, TBST) 洗漂洗后室温下孵育辣根过氧化物酶结合的二抗 1 h,再次 TBST 漂洗后应用 ECL 发光液, Bio-Rad 曝光机下曝光。 β -actin 作为内参。

2. 时间梯度实验 根据浓度梯度的实验结果,选取最佳浓度的氯化钴培养基干预软骨细胞不同的时间梯度 (0、12、24、36 和 48 h), 然后进行 Western blotting 实验,测量 Col2、YAP 和 HIF-1 α 蛋白的表达,方法同上。

3. siRNA 干预 当生长板软骨细胞融合达 50% 左右时弃原培养基,加入 2 ml 含 50 nmol/L HIF-1 α siRNA (或 50 nmol/L YAP siRNA) 和 lipo2000 的 Opti-MEM 培养基进行转染 6 h。转染完成后,用

100 μ mol/L 氯化钴干预 24 h, 测量 Col2、YAP 和 HIF-1 α 蛋白的表达。

四、统计学分析

所有实验重复 3 次,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。统计学分析采用 SPSS 19.0 统计软件(IBM 公司,美国),两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用检验 One-way ANOVA, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

一、氯化钴对软骨细胞的毒性检测

如图 1 所示, CCK-8 结果显示不同浓度的氯化钴 (50、100、150、200 μ mol/L) 对软骨细胞活性并没有明显的影响。

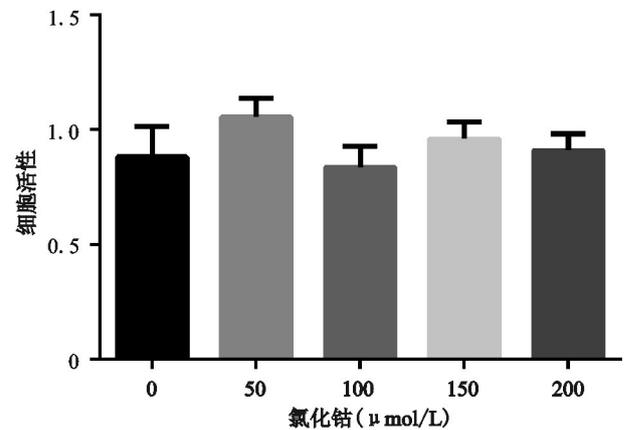


图 1 氯化钴对软骨细胞细胞活性作用

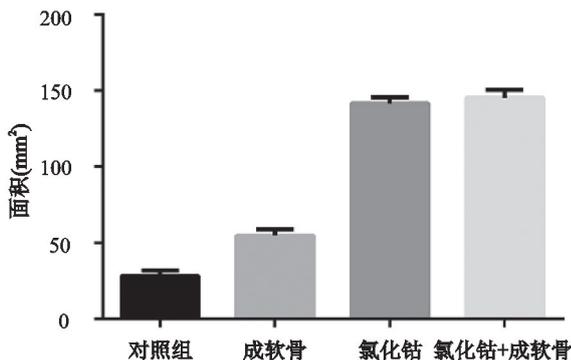
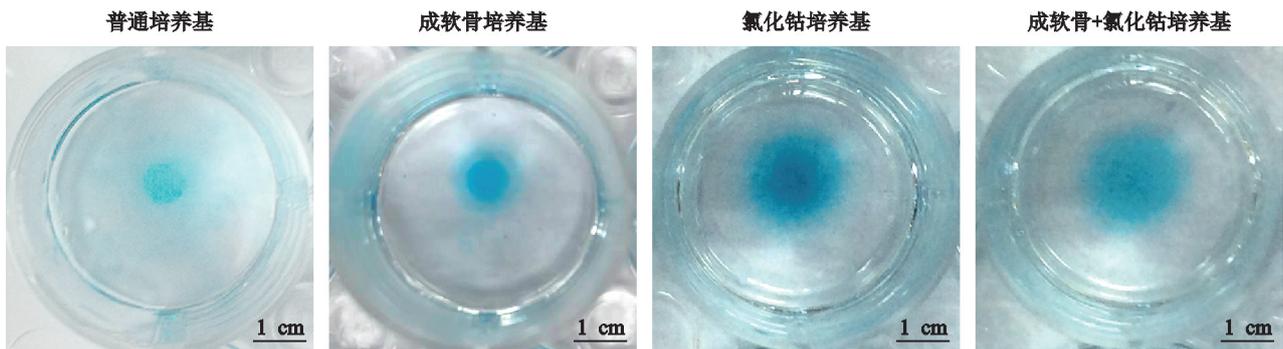


图 2 氯化钴促进大鼠生长板软骨细胞细胞外基质表达

二、软骨细胞细胞外基质的合成

如图2所示,根据软骨细胞微团大小可以发现,各组中软骨细胞微团均被染成蓝色;氯化钴培养基微团大小较对照组明显增加。结果提示,氯化钴模拟的体外缺氧环境能够促进大鼠生长板软骨细胞细胞外基质的合成。

三、成软骨特异性标志物的表达

图3的Western blotting结果显示,氯化钴能够明显上调软骨细胞中Col2蛋白水平的表达,且浓度为100 μmol/L时效果最为明显。因此我们随后应用浓度为100 μmol/L的氯化钴刺激软骨细胞不同的时间长度(0、12、24、36、48 h),并用Western blotting方法再次检测Col2的表达变化。结果显示,100 μmol/L的氯化钴能够有效促进软骨细胞中Col2蛋白水平表达,并且呈时间依耐性。

四、大鼠生长板软骨细胞HIF-1α和YAP的表达

图3的Western blotting结果显示,在应用不同浓度的氯化钴刺激后,YAP蛋白表达水平明显上调,且在100 μmol/L浓度时最为明显,但是当氯化钴浓度达200 μmol/L时YAP的表达出现了下调。HIF-1α的表达水平变化同YAP一致。

应用100 μmol/L氯化钴刺激后,YAP蛋白上调

明显,于24 h时到达顶峰,随后表达出现了下调。HIF-1α蛋白表达变化与YAP保持高度一致。

五、HIF-1/YAP信号参与促进软骨细胞表型维持

应用siRNA下调氯化钴刺激下大鼠生长板软骨细胞中HIF-1α表达后,图4 Western blotting结果显示,下调HIF-1α后,YAP表达也出现下调,并且Col2表达水平同样出现了下调。随后我们应用siRNA下调YAP表达后检测HIF-1α蛋白水平变化发现,下调YAP的表达对HIF-1α蛋白水平的表达并无明显影响。结果说明,缺氧促进的大鼠生长板软骨细胞表型维持中,HIF-1α可能位于YAP的上游。

讨 论

软骨组织中只含有软骨细胞这一种组织细胞类型,其所需的氧主要来源于滑液。软骨细胞可以产生维持软骨细胞外基质平衡所需的物质,包括胶原(主要为Col2)和蛋白多糖(主要为聚集蛋白多糖)。研究表明,在体内软骨细胞长期处于低氧微环境中,于体外培养时多处于相对于其生理状态下的高氧环境中,多次传代后软骨细胞形态会出现改变,同时丢失软骨特性型标记物。因此,研究软骨细胞在缺氧

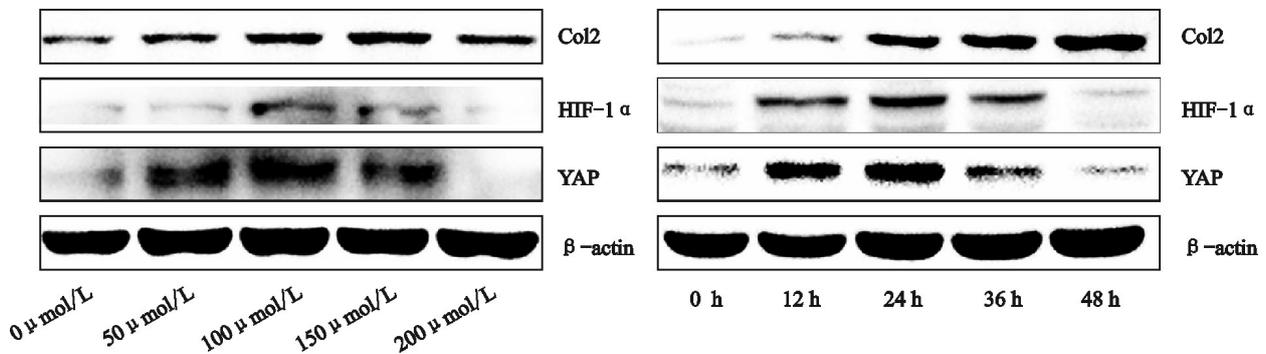


图3 氯化钴上调软骨细胞Col2、HIF-1α和YAP蛋白的表达

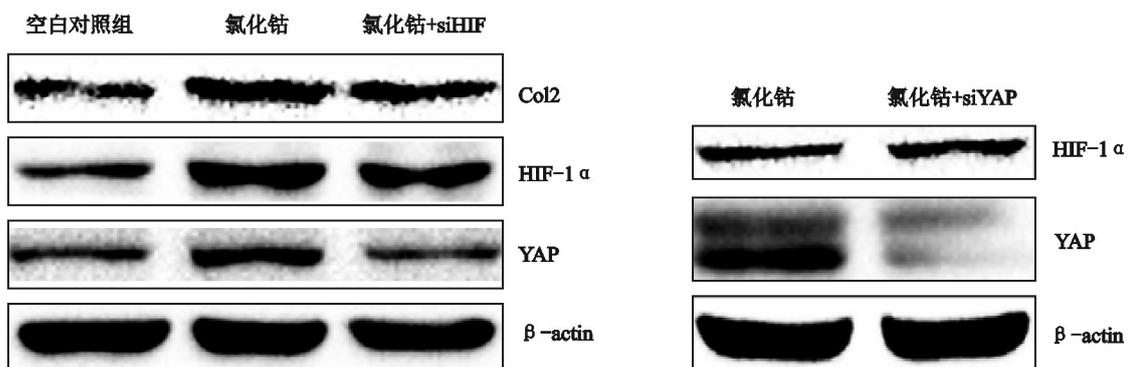


图4 氯化钴通过HIF-1α/YAP信号促进软骨细胞表型维持

微环境中的细胞反应对研究软骨细胞的生理功能至关重要。本实验中我们利用氯化钴干预软骨细胞以模拟体外的缺氧微环境。

HIF是存在于哺乳动物细胞中一类介导低氧适应反应的转录因子,是一种异源二聚体转录因子,由氧调节性的 α 亚基和恒定表达的 β 亚基组成的转录因子。HIF- α 为功能性亚基,决定HIF的活性,受细胞内氧浓度的调节^[3]。HIF- β 为结构性亚基,在细胞内稳定表达,不受氧浓度的影响和调节。在常氧条件下,HIF- α 与VHL(Von Hippel-Lindau)蛋白结合,并被泛素连接酶E3受体识别,形成E3泛素连接酶复合物从而被泛素化降解。当氧浓度降低时,HIF- α 通过抑制HIF抑制因子或与脯氨酸羟化酶作用增加稳定性和转录活性,并与HIF- β 形成二聚体结构,转移至细胞核中调节下游基因的表达^[3]。HIF-1在软骨正常生长发育、能量代谢、存活过程中都发挥了重要作用^[7-9]。常氧条件下 Co^{2+} 能够稳定HIF-1 α 活性并诱导下游基因的表达^[10]。在此研究中我们应用不同浓度的氯化钴干预生长板软骨细胞24 h后发现,HIF-1 α 蛋白表达水平上调。且100 $\mu\text{mol/L}$ 氯化钴刺激软骨细胞不同的时间长度后发现,HIF-1 α 蛋白表达水平明显上调。说明了常氧条件下 Co^{2+} 除了能够有效地稳定HIF-1 α 活性,并且呈剂量和时间依赖性。细胞缺氧状态下,HIF-1 α 在能量供应、红细胞生成、血管再生及细胞存活等方面发挥重要作用。体外的病理性缺氧能够促进神经干细胞(neural stem cell, NSC)的增殖,并上调HIF-1 α 表达,激活Wnt信号通路。沉默HIF-1 α 可降低 β -catenin的核转位和cyclinD1的表达,并抑制NSC的增殖^[11]。于体外培养中敲除生长板软骨细胞HIF-1 α 基因时,软骨细胞增殖能力明显减弱并出现大量死亡^[12,13]。于体内实验中特异性敲除软骨细胞内HIF-1 α 基因时,软骨细胞不能维持正常的代谢功能,胎鼠因为支气管塌陷和肋骨发育畸形出现呼吸功能障碍而于出生前死亡^[14]。当肢芽间充质干细胞缺乏HIF-1 α 可导致软骨组织形成延迟^[13,15]。HIF-1 α 能够抑制缺氧环境下终板软骨细胞的凋亡,从而对终板软骨细胞起到保护作用。缺氧环境能通过HIF-1 α 促进Col2、蛋白多糖的表达从而促进软骨细胞的合成代谢^[16]。在此实验中,当我们利用氯化钴上调常氧条件下HIF-1 α 的表达时,Col2的表达也相应的出现了上调。这似乎表明缺氧所致Col2的上调与缺氧条件下HIF-1 α 的激活有关。且有研究表明,体外培养的人间充质干细胞予以缺氧或者HIF-1 α 刺激时,Col2、蛋白多

糖表达增加,Col10合成减少。当去除HIF-1 α 刺激时Col2、蛋白多糖表达下降,Col10合成增加^[17]。并且在软骨炎中,HIF-1 α 能够保护软骨细胞免受炎症因子的攻击^[18]。

Hippo信号通路在许多的器官中起到控制器官的大小和组织再生的作用,并具有调控细胞的增殖分化等作用^[4,19]。YAP被证实参与调节各种细胞过程,包括机械力传导^[20],干细胞分化^[21]等。但Hippo信号通路在软骨细胞分化和骨修复中的作用仍然不甚明了。YAP1作为Hippo信号通路中的核心转录调控因子能够直接调节性别决定区Y型高迁移率族蛋白6(sex-determining region Y-type high mobility group box protein6, SOX6)的表达而促进软骨细胞增殖,Teads是YAP1结合DNA所必须的转录因子,YAP1/Teads复合体直接诱导SOX6的表达,并且Teads与YAP1的结合是YAP1调控SOX6表达所必须的,从而YAP1介导的软骨细胞增殖其中一部分是通过SOX6传导的^[6],并通过与Runx2的相互作用抑制Col10 α 1的表达而抑制软骨细胞成熟^[22]。在胎鼠的生长板软骨中YAP1在静息层和增殖层表达明显,而P-YAP1在肥大层表达明显,并且肥大层中Col10 α 1和Runx2表达明显。YAP1可抑制骨骼发育和生长过程中的软骨细胞成熟及软骨内成骨。YAP1是软骨祖细胞增殖和维持所必须的。YAP1的过表达能够增强软骨细胞增殖能力但是会抑制其分化,并且YAP1过表达能够激活Wnt/ β -catenin信号通路,Dickkopf-1和 β -catenin siRNA可部分减弱YAP1过表达对软骨细胞系ATDC5细胞分化的影响,因此YAP1在间充质干细胞(mesenchyma stem cell, MSCs)成软骨分化过程中起负性调节作用,下调YAP的表达有助于MSCs成软骨分化^[23]。但关于缺氧与YAP之间相互作用的研究较少,尤其是关于在软骨细胞中缺氧与YAP之间相互作用的报道尚未见到。有研究表明缺氧能够诱导肿瘤细胞系HEK293T, HeLa和MDA-MB-231中YAP磷酸化并下调总YAP的表达^[24]。而在另外一份研究中表明缺氧能够使Hippo信号失活,YAP表达上调并与HIF-1 α 形成复合物,从而稳定HIF-1 α 在体内肿瘤中的表达^[25]。在肝窦内皮细胞中干扰YAP显著下调HIF-1蛋白质表达^[26]。在前列腺癌中缺氧可通过增减细胞核中YAP表达和抑制P-YAP水平来提高YAP的活性^[27]。

在此研究中,我们利用HIF-1 α 的激动剂氯化钴于常氧条件下刺激软骨细胞后发现,氯化钴能够有

效促进软骨细胞细胞外基质表达。并且利用不同浓度氯化钴刺激软骨细胞时发现软骨细胞内 Col2 表达明显上调,并且这种上调呈时间和浓度依赖性。氯化钴同时能够上调软骨细胞中 YAP 的表达,且具有浓度和时间依赖性。当氯化钴浓度超过一定值或者干预超过一定时间长度时,这种促进作用出现了明显的下调。与此同时,当下调 HIF-1 α 的表达后氯化钴促进 YAP 表达的上调出现减弱。因此我们推测氯化钴模拟的缺氧环境能够通过 HIF-1 α /YAP 信号促进软骨细胞软骨表型的维持。但具体为哪种亚型软骨细胞在此过程中起到主导作用有待进一步细胞及动物实验研究。

氯化钴能够促进 YAP 的激活,并且是 HIF-1 α 依赖性的,下调 HIF-1 α 的表达能够抑制氯化钴所致的 YAP 的激活和软骨细胞表型的维持。最重要的是,我们的研究表明缺氧环境通过 HIF-1 α 和 YAP 之间相互作用从而最终影响软骨细胞表型的维持。这也许可为软骨组织工程中软骨细胞制备提供一个新的思路或靶点。但本实验存在缺乏对 HIF-1 α 和 YAP 结合位点研究,及缺乏体内实验部分等众多不足。

参 考 文 献

- [1] Villemure I, Stokes IA. Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding [J]. J Biomech, 2009, 42(12): 1793-1803.
- [2] Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations [J]. J Orthop Res, 2005, 23(2): 425-432.
- [3] Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 versus HIF-2—Is one more important than the other? [J]. Vasc Pharmacol, 2012, 56(5): 245-251.
- [4] Ramos A, Camargo FD. The Hippo signaling pathway and stem cell biology [J]. Trends Cell Biol, 2012, 22(7): 339-346.
- [5] Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(8): 877-883.
- [6] Deng Y, Wu A, Li P, et al. Yap1 regulates multiple steps of chondrocyte differentiation during skeletal development and bone repair [J]. Cell Rep, 2016, 14(9): 2224-2237.
- [7] Zhang C, Li Y, Cornelia R, et al. Regulation of VEGF expression by HIF-1 α in the femoral head cartilage following ischemia osteonecrosis [J]. Sci Rep, 2012, 2: 650.
- [8] Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, et al. Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival [J]. Gene Dev, 2001, 15(21): 2865-2876.
- [9] Lefebvre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation [J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2005, 75(3): 200-212.
- [10] Bergeron M, Giddy JM, Yu AY, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain [J]. Ann Neurol, 2000, 48(3): 285-296.
- [11] Qi C, Zhang J, Chen X, et al. Hypoxia stimulates neural stem cell proliferation by increasing HIF1 α expression and activating Wnt/ β -catenin signaling [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2017, 63(7): 12-19.
- [12] Saito T, Fukai A, Mabuchi A, et al. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development [J]. Nat Med, 2010, 16(6): 678-686.
- [13] Amarilio R, Viukov SV, Sharir A, et al. HIF1 α regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis [J]. Development, 2007, 134(21): 3917-3928.
- [14] Pelletier J, Dayan F, Durivault J, et al. The asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting HIF is essential for tumor growth through suppression of the p53-p21 axis [J]. Oncogene, 2012, 31(24): 2989-3001.
- [15] Provot S, Zinyk D, Gunes Y, et al. Hif-1 α regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development [J]. J Cell Biol, 2007, 177(3): 451-464.
- [16] Markway BD, Cho H, Johnstone B. Hypoxia promotes redifferentiation and suppresses markers of hypertrophy and degeneration in both healthy and osteoarthritic chondrocytes [J]. Arthritis Res Ther, 2013, 15(4): R92.
- [17] Duval E, Baug C, Andriamanalijaona R, et al. Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in *in vivo* cartilage tissue engineering [J]. Biomaterials, 2012, 33(26): 6042-6051.
- [18] Morais-Faria K, Menegussi G, Marta G, et al. Dosimetric distribution to the teeth of patients with head and neck cancer who underwent radiotherapy [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2015, 120(3): 416-419.
- [19] Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer [J]. Cell, 2015, 163(4): 811-828.
- [20] Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction [J]. Nature, 2011, 474(7350): 178-183.
- [21] Azzolin L, Zanconato F, Bresolin S, et al. Role of TAZ as mediator of Wnt signaling [J]. Cell, 2012, 151(7): 1443-1456.
- [22] Ying J, Wang P, Zhang S, et al. Transforming growth factor- β 1 promotes articular cartilage repair through canonical Smad and Hippo pathways in bone mesenchymal stem cells [J]. Life Sci, 2018, 192: 84-90.
- [23] Yang B, Sun H, Song F, et al. YAP1 negatively regulates chondrocyte differentiation partly by activating the β -catenin signaling pathway [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2017, 87: 104-113.
- [24] Ma B, Chen Y, Chen L, et al. Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase [J]. Nat Cell Biol, 2014, 17(1): 95-103.
- [25] Yan L, Cai Q, Xu Y. Hypoxic conditions differentially regulate TAZ and YAP in cancer cells [J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 562: 31-36.
- [26] Zhang C, Bian M, Chen X, et al. Oroxlylin A prevents angiogenesis of LSECs in liver fibrosis via inhibition of YAP/HIF-1 α signaling [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(2): 2258-2268.
- [27] Chen H, Chen Q, Luo Q. Expression of netrin-1 by hypoxia contributes to the invasion and migration of prostate carcinoma cells by regulating YAP activity [J]. Exp Cell Res, 2016, 349(2): 302-309.

(收稿日期: 2019-01-21)

(本文编辑: 龚哲妮)