



分类号 S857.1

学号 2019207052

南京農業大學

专业学位博士学位论文

Notch-RBPJ-Col5a1 通路对股骨头坏死肉鸡骨髓间充质干  
细胞分化的影响及调控机制研究

刘康平

第一导师 周振雷 教授

第二导师 赵艳兵 高级兽医师

学位类别 兽医博士

领域名称 \_\_\_\_\_

研究方向 动物疾病诊疗

答辩日期 二〇二三年 五月 二十六日

**The Effect and Regulatory Mechanism of Notch-RBPJ-Col5a1  
Pathway on the Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal  
Stem Cells in Broilers With Femoral Head Necrosis**

**By**

**LIU KANGPING**

**A Dissertation**

**Presented to the Nanjing Agricultural University**

**in Partial Fulfillment of the Requirements**

**for the Doctor of Professional Degree in Veterinary Medicine**

**Supervised by**

**Professor ZHOU ZHENLEI**

**Nanjing Agricultural University**

**Nanjing, China**

**May 2023**

## 学位论文答辩委员会成员名单

姓名	职称	博导/硕导	所在单位	成员类别
李宏全	教授	博导	山西农业大学	主席
李建基	教授	博导	扬州大学	委员
丁明星	教授	博导	华中农业大学	委员
沈向真	教授	博导	南京农业大学	委员
刘金鑫	教授	博导	南京农业大学	委员

本研究由

国家自然科学基金 (No. 32072936, 32273080)

资助

This study was supported by National Natural Science  
Foundation of China (No. 32072936 and 32273080)

# 目 录

第一章 文献综述 .....	1
1 国内外研究进展 .....	1
1.1 肉鸡股骨头坏死的研究进展 .....	2
1.2 骨髓间充质干细胞分化与骨代谢的研究进展 .....	8
1.3 Notch 信号通路调控 BMSCs 分化的研究进展 .....	13
1.4 Col5a1 研究进展 .....	15
2 本研究目的和意义 .....	16
3 技术路线 .....	17
第二章 股骨头坏死肉鸡血脂水平、骨代谢标志物及关节软骨稳态研究 .....	19
1 材料与方法 .....	20
1.1 仪器与试剂 .....	20
1.2 样品采集 .....	22
1.3 血清生化指标分析 .....	22
1.4 ELISA 检测 .....	22
1.5 骨密度检测 .....	23
1.6 骨强度检测 .....	23
1.7 股骨头关节软骨及肝脏组织形态学观察 .....	23
1.8 股骨头关节软骨组织总 RNA 提取与 qRT-PCR 检测 .....	24
1.9 TUNEL 染色 .....	26
1.10 数据统计分析 .....	26
2 结果与分析 .....	26
2.1 FHN 肉鸡的临床表现 .....	26
2.2 FHN 肉鸡的血清生化学指标变化 .....	27
2.3 FHN 肉鸡的肝脏形态、血脂水平及血清促炎因子变化 .....	29
2.4 FHN 肉鸡的骨参数及骨代谢标志物水平变化 .....	30
2.5 FHN 肉鸡股骨头关节软骨稳态变化 .....	32
2.6 FHN 肉鸡的股骨头关节软骨中内质网应激相关基因表达水平变化 .....	34
2.7 FHN 肉鸡的股骨头关节软骨中细胞自噬相关基因表达水平变化 .....	35
2.8 FHN 肉鸡的股骨头关节软骨中细胞凋亡水平变化 .....	36
2.9 FHN 肉鸡关节软骨抗氧化水平变化 .....	39
3 讨论 .....	40

第三章 FHN 肉鸡 BMSCs 分化水平变化及甲泼尼龙对肉鸡 BMSCs 的影响 .....	43
1 材料与方法.....	43
1.1 仪器与试剂.....	43
1.2 自发性 FHN 及正常肉鸡 BMSCs 的分离及纯化培养.....	46
1.3 细胞生长曲线绘制.....	46
1.4 细胞活力检测.....	46
1.5 成骨诱导分化.....	47
1.6 成软骨诱导分化.....	47
1.7 成脂诱导分化.....	47
1.8 茜素红 S 染色.....	47
1.9 ALP 检测 .....	47
1.10 阿利新蓝染色.....	47
1.11 油红 O 染色.....	47
1.12 总 RNA 的提取及 qRT-PCR 检测.....	48
1.13 Western blotting 蛋白表达检测 .....	48
1.14 流式细胞术检测.....	49
1.15 数据统计分析.....	50
2 结果与分析.....	50
2.1 肉鸡 BMSCs 的分离与鉴定 .....	50
2.2 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 分化水平变化.....	54
2.3 FHN 肉鸡的股骨头组织中成骨和软骨代谢水平变化 .....	55
2.4 MP 处理浓度及时间筛选.....	56
2.5 MP 对 BMSCs 分化水平的影响 .....	57
2.6 MP 对 BMSCs 成骨及软骨代谢水平的影响 .....	58
3 讨论.....	60
第四章 Notch 通路对 FHN 肉鸡中 BMSCs 分化的调控作用.....	63
1 材料与方法.....	64
1.1 仪器与试剂.....	64
1.2 细胞培养.....	64
1.3 细胞活力检测.....	64
1.4 成骨诱导分化.....	64
1.5 成软骨诱导分化.....	64
1.6 成脂诱导分化.....	64
1.7 茜素红 S 染色.....	64
1.8 阿利新蓝染色.....	65
1.9 油红 O 染色.....	65
1.10 FHN 肉鸡股骨头组织及 BMSCs 中总 RNA 的提取及 qRT-	

PCR 检测.....	65
1.11 间接免疫荧光.....	66
1.12 FHN 肉鸡股骨头组织及 BMSCs 中 Western blotting 蛋白表达检测.....	66
1.13 数据统计分析.....	66
2 结果与分析.....	67
2.1 FHN 肉鸡股骨头组织中 Notch 通路相关因子水平变化.....	67
2.2 MP 处理 BMSCs 引起 Notch 通路激活.....	68
2.3 JAG-1 激活 Notch 通路对 MP 引起的细胞分化的调节作用.....	69
2.4 DAPT 抑制 Notch 通路对 MP 引起的细胞分化的调节作用.....	71
3 讨论.....	74
第五章 Notch-RBPJ 通路通过 Col5a1 调控肉鸡 BMSCs 分化.....	77
1 材料与方法.....	78
1.1 仪器与试剂.....	78
1.2 细胞培养.....	78
1.3 细胞活力检测.....	78
1.4 成骨诱导分化.....	78
1.5 成软骨诱导分化.....	78
1.6 成脂诱导分化.....	78
1.7 茜素红 S 染色.....	78
1.8 阿利新蓝染色.....	78
1.9 油红 O 染色.....	79
1.10 RNA 干扰.....	79
1.11 FHN 肉鸡股骨头组织及 BMSCs 中总 RNA 的提取及 qRT-PCR 检测.....	79
1.12 FHN 肉鸡股骨头组织及 BMSCs 中 Western blotting 蛋白表达检测.....	79
1.13 间接免疫荧光.....	79
1.14 数据统计分析.....	80
2 结果与分析.....	80
2.1 FHN 肉鸡转录组学关键基因的筛选.....	80
2.2 FHN 肉鸡股骨头组织中 Col5a1 基因及蛋白水平变化.....	82
2.3 MP 处理的 BMSCs 中 Col5a1 基因及蛋白水平变化.....	83
2.4 Col5a1 对 MP 处理的 BMSCs 分化水平的调节作用.....	84
2.5 Notch 通路调控 Col5a1 的表达.....	88
2.6 RBPJ 对 MP 处理的 BMSCs 成骨及软骨代谢的影响.....	91

3 讨论.....	93
全文讨论与结论、创新点及研究展望 .....	97
1 全文讨论.....	97
2 全文结论.....	99
2.1 自发性股骨头坏死肉鸡发生血脂水平与骨代谢标志物水平异常、关节软骨稳态失衡 .....	99
2.2 股骨头坏死肉鸡中,Notch-RBPJ 通路调控 BMSCs 成骨及成软骨分化 .....	99
2.3 股骨头坏死肉鸡中 BMSCs 分化受 Notch-RBPJ-Col5a1 调控 .....	99
3 创新点.....	100
3.1 报道了 Col5a1 对肉鸡 BMSCs 分化的调控 .....	100
3.2 明确了 Notch-RBPJ 通路对 BMSCs 分化的调控作用 .....	100
3.3 揭示了 Notch-RBPJ-Col5a1 通路在肉鸡 FHN 发生发展中的调控作用 .....	100
4 研究展望.....	100
参考文献.....	101

# Notch-RBPJ-Col5a1 通路对股骨头坏死肉鸡骨髓间充质干细胞分化的影响及调控机制研究

## 摘要

在肉鸡集约化养殖模式下,快速生长品系肉鸡腿病发病率持续上升,严重影响肉鸡生产性能和动物福利。股骨头坏死(FHN)是集约化肉鸡养殖过程中最常见、最重要的腿病之一。FHN 常见于 4~6 周龄肉鸡,临床特征主要表现为病鸡不能正常站立和行走,跛行严重,关节软骨损伤,生产性能下降,对养殖业造成较大经济损失,因此深入研究其发病机制及致病机理对该病的有效防控具有重要意义。研究表明,FHN 的发生与骨髓间充质干细胞(BMSCs)活性降低、数量减少、成脂及成骨分化失衡等密切相关。BMSCs 是起源于中胚层的成体干细胞,能够向组织损伤部位迁移和分化,从而在组织愈合中发挥重要作用,是组织工程和细胞治疗中最常用的干细胞。然而,在 FHN 中,BMSCs 分化方向改变机制仍不甚明了。BMSCs 受多种信号通路的调节,其中 Notch 信号通路参与调节 BMSCs 的增殖和分化,决定细胞命运。Notch 通路下游转录因子 J-Kappa 的重组信号结合蛋白 1(RBPJ)可与 V 型胶原(Col5a1)的增强子结合调控其转录从而调节干细胞的生态位。因此本试验首先明确了 FHN 肉鸡的血脂水平、骨代谢标志物及软骨稳态的变化,发现 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 分化方向改变,并采用甲泼尼龙(MP)处理肉鸡 BMSCs 以探究 Notch-RBPJ-Col5a1 信号通路对 BMSCs 分化的调控作用机制。

### 试验 I 股骨头坏死肉鸡血脂水平、骨代谢标志物及关节软骨稳态研究

为了研究 FHN 肉鸡的病因和机制,本试验采集了第 4、5 和 6 周龄肉鸡血液及骨组织样本,并对其血脂水平、骨代谢标志物及关节软骨稳态的相关指标进行检测。结果显示,与正常肉鸡相比,自发性 FHN 肉鸡的肝功能(丙氨酸氨基转移酶和天冬氨酸氨基转移酶)和血脂水平(高密度脂蛋白和甘油三酯)显著改变,并且肝脏中出现脂滴积聚,胫骨和股骨参数显示骨密度和骨强度发生显著变化。同时,骨代谢标志物(骨钙素和骨碱性磷酸酶)发生显著变化。FHN 肉鸡关节软骨中软骨细胞分布不规则,出现空泡,提示软骨稳态被破坏。TUNEL 染色显示,FHN 肉鸡关节软骨细胞凋亡率显著高于正常肉鸡。qRT-PCR 检测结果显示 FHN 肉鸡关节软骨中蛋白聚糖和 II 型胶原的 mRNA 水平降低,且苏木精和伊红(H&E)、甲苯胺蓝、阿利新蓝和番红 O-固绿染色结果中观察到相同的变化。同时,FHN 肉鸡中蛋白激酶 RNA 样内质网激酶(PERK)

激活核因子-红细胞 2 相关因子 2 (Nrf2) /抗氧化响应元件 (ARE) 途径, 导致内质网应激。自噬通过 PERK 激活转录激活因子-4 (ATF4), 也可通过 CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) 激活凋亡。综上所述, 自发性 FHN 肉鸡发生骨代谢及血脂水平紊乱, 关节软骨稳态失衡, 并发生由内质网应激介导的氧化应激及细胞凋亡。

### 试验 II FHN 肉鸡 BMSCs 分化水平变化及甲泼尼龙对肉鸡 BMSCs 的影响

FHN 发生与 BMSCs 数量的减少和分化方向的改变密切相关。为进一步探究 FHN 的发病机理, 本试验分离培养了肉鸡 BMSCs, 并使用 MP 对其进行处理。首先通过流式细胞术对 BMSCs 表面标志物进行检测, 并采用多种染色方法对其进行鉴定。对来源于 FHN 肉鸡和正常肉鸡的 BMSCs 进行成骨、成软骨及成脂诱导分化, 然后进行茜素红 S、阿利新蓝及油红 O 染色以评估分化水平的变化。结果显示来源于 FHN 肉鸡的 BMSCs 成骨及成软骨分化能力较正常肉鸡减弱, 而成脂分化能力增强。Western blotting 结果显示来源于 FHN 肉鸡的 BMSCs 成骨及软骨代谢相关蛋白 Col2a1、蛋白聚糖及骨形态发生蛋白-2 (BMP2) 的蛋白表达水平较正常肉鸡显著下调, 而基质金属蛋白酶 (MMP13) 的蛋白水平显著升高, 表明 FHN 肉鸡的股骨头组织中成骨及软骨代谢水平较正常肉鸡显著下降。本试验通过 CCK-8 法筛选 MP 处理的最佳浓度及时间, 对 MP 处理的 BMSCs 进行成骨、成软骨及成脂诱导分化和染色观察, 结果显示 MP 处理引起 BMSCs 成骨及成软骨分化能力降低, 而成脂分化能力增强。qRT-PCR 检测到成骨及软骨代谢的相关基因, 如 Col2a1、蛋白聚糖、BMP2 和 Runt 相关转录因子 2 (Runx2) 的 mRNA 表达水平在 MP 处理时显著下调, 而 MMP9 则极显著增加。此外, Col2a1、蛋白聚糖、BMP2 和 Runx2 的蛋白表达水平也显著下降。上述结果表明 MP 处理可降低 BMSCs 的成骨及成软骨分化能力, 而提高其成脂分化能力, 这与 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 分化水平变化一致。

### 试验 III Notch 通路对 FHN 肉鸡中 BMSCs 分化的调控作用

由于 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 成骨及成软骨分化水平下降, 成脂分化能力提高, 因此本试验旨在探讨 FHN 发生发展过程中 Notch-RBPJ 信号通路对 BMSCs 分化的调节作用, 并用 Notch 通路激活剂齿状蛋白 1 (JAG-1)/抑制剂 ( $\gamma$  分泌酶抑制剂, DAPT) 对 BMSCs 进行处理。qRT-PCR、Western blotting 检测 FHN 肉鸡的股骨头组织及 MP 处理的 BMSCs 中 Notch 通路相关基因及蛋白表达情况, 发现 FHN 肉鸡的股骨头组织及 MP 处理的 BMSCs 中均出现 Notch 通路的激活。JAG-1 可加剧 MP 所引起的 BMSCs 成骨及成软骨能力的下降, 而 DAPT 可逆转暴露于 MP 所造成的 BMSCs 成骨及成软骨能力减弱。表明 FHN 肉鸡的股骨头组织中 Notch 通路被激活, 导致 BMSCs 成骨及成软骨能力减弱, 同时 Notch 通路能够调控 MP 对 BMSCs 的分化的作用。

#### 试验 IV Notch-RBPJ 通路通过 Col5a1 调控肉鸡 BMSCs 分化

为探究肉鸡 FHN 的发病机制,本试验通过对发病肉鸡股骨头组织进行 RNA 测序 (RNA-seq) 分析筛选差异表达基因,设计并转染 si-Col5a1、si-RBPJ 以及使用 Notch 通路激活剂 (JAG-1) /抑制剂 (DAPT) 处理肉鸡 BMSCs。首先通过 Cytoscape 软件及在线网站 String 筛选 RNA-seq 数据中差异表达基因,并通过韦恩图交叉选出关键基因 Col5a1。通过 qRT-PCR、Western blotting 及间接免疫荧光染色试验检测发病肉鸡的股骨头组织及 MP 处理的 BMSCs 中 Col5a1 的 mRNA 及蛋白表达情况。结果显示,发病肉鸡及 MP 处理的 BMSCs 中 Col5a1 表达水平均发生显著变化。为探究 Col5a1 对 BMSCs 成骨及软骨代谢的调控作用,转染 si-Col5a1 并检测相关蛋白表达情况,结果显示干扰 Col5a1 表达后,能够缓解 MP 引起的成骨能力下降,但对 Notch 通路相关蛋白表达水平无显著影响。而采用 JAG-1/DAPT 处理 BMSCs 后,能够分别提高/降低 Col5a1 的蛋白表达水平,转染 si-RBPJ 能显著降低 Col5a1 的蛋白水平及免疫荧光强度。同时,转染 si-RBPJ 能够缓解 MP 导致的细胞分化水平变化,转染 si-Col5a1 也能够发挥缓解作用。综上所述,FHN 肉鸡的股骨头组织中 Col5a1 发生显著变化,并且 Col5a1 能够调节 MP 对肉鸡 BMSCs 分化的影响,而这一过程受 Notch-RBPJ 通路调控。

**关键词:** 股骨头坏死; Notch-RBPJ-Col5a1 通路; 骨髓间充质干细胞; 分化; 肉鸡

**THE EFFECT AND REGULATORY MECHANISM OF  
NOTCH-RBPJ-COL5A1 PATHWAY ON THE  
DIFFERENTIATION OF BONE MARROW MESENCHYMAL  
STEM CELLS IN BROILERS WITH FEMORAL HEAD  
NECROSIS**

**ABSTRACT**

The incidence of leg disease in fast-growing broiler strains has increased under intensive broiler farming, which seriously affects broiler performance and animal welfare. Femoral head necrosis (FHN) is one of the most common and important leg diseases in the process of intensive broiler farming. FHN is particularly in from 4~6 weeks of age broilers, and its clinical characteristics are mainly characterized by the inability of the diseased broilers to stand and walk normally, severe lameness, damage to joint cartilage, and reduced production performance, which causes large economic losses to the breeding industry. Therefore, the in-depth study of its pathogenesis and pathogenic mechanism is of great significance for the effective prevention and control of the disease. Studies have shown that the development of FHN is closely related to the reduced activity, decreased number of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), and the imbalance of lipogenesis and osteogenic differentiation, which are adult stem cells of mesodermal origin that can migrate and differentiate to the site of tissue injury, thus playing an important role in tissue healing. And BMSCs are the most commonly used stem cells in tissue engineering and cell therapy. However, the mechanisms involved in the altered direction of differentiation of BMSCs in FHN are still poorly understood. BMSCs are regulated by multiple signaling pathways, among which the Notch signaling pathway is involved in regulating the proliferation and differentiation of BMSCs, determining cell fate. The recombination signal-binding protein 1 for J-Kappa (RBPJ), a transcription factor downstream of the Notch pathway, binds to the enhancer of type V collagen (Col5a1) to regulates its transcription, thus regulating the stem cell ecological niche. Therefore, in this experiment, we first clarified the changes of lipid

levels, bone metabolic markers and cartilage homeostasis in FHN broilers, found that the differentiation direction of BMSCs from FHN broiler origin was altered. Methylprednisolone (MP) was used to treat broiler BMSCs to explore the regulatory mechanism of the Notch-RBPJ-Col5a1 pathway on BMSCs differentiation.

### **Experiment I Study on serum lipid levels, bone metabolic markers and articular cartilage homeostasis in femoral head necrosis broilers**

To investigate the etiology and mechanism of FHN in broilers, blood and bone tissue samples were collected from 4th, 5th and 6th week old broilers and tested for lipid levels, bone metabolic markers and related indicators of articular cartilage homeostasis. The results showed that liver function (alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase) and lipid levels (high-density lipoprotein and triglycerides) were significantly altered in FHN broilers compared to the normal broilers, and lipid droplet accumulation was observed in the liver, while tibia and femur parameters showed significant changes in bone mineral density and bone strength. At the same time, significant changes in bone metabolism markers (osteocalcin and bone alkaline phosphatase) occurred. Chondrocytes in the articular cartilage of FHN broilers were irregularly distributed and vacuolated, indicating a disruption of cartilage homeostasis. TUNEL staining showed that the apoptosis rate of articular chondrocytes in FHN broilers was significantly higher than that in normal broilers. The qRT-PCR assay showed reduced mRNA levels of Aggrecan and type II collagen in the articular cartilage of FHN broilers, and the same changes were observed in hematoxylin and eosin (H&E), toluidine blue, alcian blue and safranin O-solid green staining results. Meanwhile, protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in FHN broilers activates the nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) pathway, leading to ER stress. Autophagy activates transcription factor-4 (activated transcription factor-4, ATF4) through PERK, and can also activate apoptosis through CCCAT-enhancer binding protein homologous protein (CHOP). In conclusion, spontaneous FHN broilers have disturbed bone metabolism and lipid levels, imbalanced articular cartilage homeostasis, and endoplasmic reticulum stress-mediated oxidative stress and apoptosis.

**Experiment II Changes in the differentiation level of BMSCs in FHN broilers and the effect of methylprednisolone on broiler BMSCs**

The occurrence of FHN is closely related to the reduction in the number of BMSCs and the change in the direction of differentiation. To further investigate the pathogenesis of FHN, broiler BMSCs were isolated and cultured in this experiment, and MP was performed on them. The surface markers of BMSCs were first detected by flow cytometry and identified by multiple staining methods. BMSCs from spontaneous FHN broilers and normal healthy broilers were subjected to osteogenic, chondrogenic and lipogenic induction of differentiation, and then stained with alizarin red S, alcian blue and oil red O to assess the changes in differentiation levels. The results showed that the osteogenic and chondrogenic differentiation ability of BMSCs from FHN broilers was weaker than that of normal broilers, while the lipogenic differentiation ability was enhanced. The results of Western blotting showed that the protein expression levels of Col2a1, Aggrecan and bone morphogenetic protein-2 (BMP2) were significantly down-regulated and matrix metalloproteinase (MMP13) was significantly increased, indicating that the osteogenic and chondrogenic metabolism levels in femoral head tissues of FHN broilers were significantly decreased compared with those of normal broilers. The optimal concentration and time of MP treatment were screened by CCK-8 method. Osteogenic, chondrogenic and lipogenic differentiation was induced in BMSCs exposed to MP and observed by staining. The results showed that MP treatment caused a decrease in osteogenic and chondrogenic differentiation and an increase in lipogenic differentiation in BMSCs. The mRNA levels of genes related to osteogenesis and chondrogenesis, such as Col2a1, Aggrecan, BMP2 and runt-related transcription factor 2 (Runx2), were significantly down-regulated by MP treatment, while MMP9 was highly significantly increased, as detected by qRT-PCR. In addition, the protein levels of Col2a1, Aggrecan, BMP2 and Runx2 were also significantly decreased. The above results indicated that MP treatment reduced the osteogenic and chondrogenic differentiation ability of BMSCs and increased their lipogenic differentiation ability, which was consistent with the changes in differentiation levels of FHN broiler-derived BMSCs.

### **Experiment III Regulatory effect of Notch pathway on the differentiation of BMSCs in FHN broilers**

Since spontaneous FHN broiler-derived BMSCs have decreased levels of osteogenic and chondrogenic differentiation and increased lipogenic differentiation, this experiment aimed to investigate the role of the Notch-RBPJ pathway in regulating the differentiation of BMSCs during the development of FHN. The BMSCs were treated with Notch pathway activator dentin 1 (Jagged-1, JAG-1)/inhibitor ( $\gamma$ -secretase inhibitor, DAPT). qRT-PCR, Western blotting were used to detect Notch pathway-related genes and proteins expression in femoral head tissues of FHN broilers and BMSCs exposed to MP, and found that activation of Notch pathway occurred in femoral head tissues of FHN broilers and MP treated-BMSCs. JAG-1 exacerbated the decrease in osteogenic and chondrogenic capacity of BMSCs induced by MP, whereas DAPT reversed the reduced osteogenic and chondrogenic capacity of BMSCs treated by MP exposure. It was shown that the Notch pathway was activated in the femoral head tissue of FHN broilers, resulting in reduced osteogenic and chondrogenic capacity of BMSCs, while the Notch pathway was able to regulate the role of MP on the differentiation of BMSCs.

### **Experiment IV Notch-RBPJ pathway regulates the differentiation of broiler BMSCs through Col5a1**

To explore the pathogenesis of FHN in broilers, this experiment screened differentially expressed genes by RNA-sequencing (RNA-seq) analysis of femoral tissues of affected broiler chickens, designed and transfected with si-Col5a1, si-RBPJ and treated broiler BMSCs with Notch pathway activator (JAG-1)/inhibitor (DAPT). The key gene, Col5a1, was firstly screened by Cytoscape software and online website String, and selected by Venn diagram crossover. qRT-PCR, Western blotting and immunofluorescence staining assays were used to detect Col5a1 in femoral tissues of FHN broilers and MP-treated BMSCs. The results showed that the expression levels of Col5a1 were significantly altered in both diseased broilers and MP-treated BMSCs. To explore the regulation of Col5a1 on osteogenesis and cartilage metabolism in BMSCs, si-Col5a1 was transfected to detect the expression of related proteins. The results showed that interference with Col5a1 expression could alleviate the MP-induced decrease in osteogenic ability, but had no significant effect on the expression level of Notch pathway-related proteins. In contrast, treatment with JAG-1/DAPT was able to increase/decrease the protein expression level of Col5a1, respectively, and transfection with

si-RBPJ significantly decreased the protein level and immunofluorescence intensity of Col5a1. Meanwhile, transfection with si-RBPJ was able to alleviate the changes in cell differentiation levels caused by MP, and transfection with si-Col5a1 was also able to exert alleviating effects. In conclusion, Col5a1 was significantly altered in femoral tissues of FHN broilers, and Col5a1 was able to regulate the effect of MP on the differentiation of broiler BMSCs, which was regulated by the Notch-RBPJ pathway.

**KEY WORDS:** Femoral head necrosis; Notch-RBPJ-Col5a1 pathway; Bone marrow mesenchymal stem cells; Differentiation; Broiler

## 符号及缩略语的说明

英文缩写	英文全称	中文全称
ALB	albumin	白蛋白
ALP	alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
BALP	bone alkaline phosphatase	骨特异性碱性磷酸酶
BCO	bacterial chondronecrosis osteomyelitis	细菌性软骨坏死性骨髓炎
BGP	bone glaprotein	骨钙素
BMD	bone mineral density	骨密度
BMP2	bone morphogenetic protein-2	骨形态发生蛋白-2
BMSCs	bone marrow mesenchymal stem cells	骨髓间充质干细胞
Col5	type V collagen	V 型胶原
CTX	type I collagen carboxy-terminal peptide	I 型胶原蛋白羧基末端肽
DLL	delta like ligand	Delta 样配体
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
FAS	fatty acid synthase	脂肪酸合酶
FHN	femoral head necrosis	股骨头坏死
FHS	femoral head separation	股骨头分离
FHSL	femoral head separation with growth plate lacerations	股骨头分离伴生长板撕裂
GRP78	glucose-regulated protein 78	葡萄糖调节蛋白 78
GSH-Px	glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
HDL	high-density lipoprotein	高密度脂蛋白
Hes	hairy and enhancer of split	发状分裂增强子
HEY	hairy/enhancer-of -split related	发状分裂相关增强子

英文缩写	英文全称	中文全称
JAG-1	Jagged-1	齿状蛋白 1
IRE-1 $\alpha$	inositol-requiring enzyme-1 $\alpha$	肌醇激酶-1 $\alpha$
LDLR	low-density lipoprotein receptor	低密度脂蛋白受体
MMP	matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
MP	methylprednisolone	甲泼尼龙
mTOR	mammalian target of rapamycin	哺乳动物雷帕霉素靶蛋白
NICD	notch intracellular domain	Notch 胞内结构域
PS	presenilin	早老素
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction	实时荧光定量 PCR
RBPJ	recombination signal-binding protein 1 for j-kappa	J-Kappa 的重组信号结合蛋白 1
RNA-seq	RNA-sequencing	RNA 测序
Runx2	runt-related transcription factor 2	Runt 相关转录因子 2
si-RNA	small interference RNA	小干扰 RNA
TGF $\beta$ 1	transforming growth factor beta 1	转化生长因子 $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$	肿瘤坏死因子- $\alpha$
TP	total protein	总蛋白
TRACP-5b	tartrate resistant acid phosphatase	抗酒石酸磷酸酶 5b
$\mu$ M	micromole per liter	微摩尔每升

# 第一章 文献综述

## 1 国内外研究进展

随着禽类肉制品需求的不断增加,肉鸡养殖模式发生了根本变化(Dinev et al., 2019; Kuttappan et al., 2016)。集约化养殖模式极大提高了肉鸡的饲料利用率和生产性能,与20世纪60年代相比,当前肉鸡的生长速度提高了300%(Dinev et al., 2019)。这虽然极大地提高了肉鸡养殖生产效率及经济效益,但由于高强度的快速生长,肉鸡腿病的发病率也逐年增加,对肉鸡行业的经济效益及动物福利产生了较大的影响(李鹏飞, 2015; Olkowski et al., 2011; Sanchez-Rodriguez et al., 2019)。基于此,骨骼疾病成为当前家禽养殖业关注的主要疾病之一(Li et al., 2015)。肌肉及骨骼疾病是导致肉鸡腿病的主要诱因(Packialakshmi et al., 2015)。股骨头坏死(femoral head necrosis, FHN)是肉鸡最常见的腿病之一,严重影响肉鸡的生长发育。研究表明,在集约化肉鸡养殖场,腿病的发生率约为2%,而其中FHN的检出率高达13.33%(Li et al., 2015)。该病常影响4~6周龄肉鸡(Yu et al., 2020),其典型临床症状主要表现为病鸡常呈蹲卧姿势,很少站立和行走,跛行严重,采食减少和生产性能显著下降。FHN的发生为多种因素相互作用的结果,包括脂代谢紊乱、骨髓细胞肥大、血管内凝血、骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)活性及数量减少等(Li et al., 2015; Packialakshmi et al., 2015; Seamon et al., 2012; Wideman et al., 2012)。

BMSCs可向成脂细胞、成骨细胞和成软骨细胞分化,是多种疾病细胞疗法和基因疗法的重要工具细胞。骨骼作为一种动态组织,通过成骨细胞及破骨细胞的相互作用不断重塑(Palumbo et al., 2021)。BMSCs向成骨细胞和脂肪细胞的分化与维持正常的骨稳态密切相关,其向脂肪细胞分化优于成骨细胞分化可直接导致骨形成/吸收失衡,并最终导致骨质流失,引发骨坏死(Duque, 2008; Lee et al., 2006)。由于BMSCs良好的增殖及分化能力,使其成为了研究FHN发病机制的常用细胞之一(Miyaki et al., 2018)。

Notch通路是多细胞生物体内一类高度保守的信号通路,通过参与细胞间相互作用介导外界环境对细胞的影响和调控,在生物体的早期发育中程序性地操控细胞命运和组织的分化(Chiba, 2006; Hilton et al., 2008)。Notch通路在膜内成骨及软骨内骨化中起着重要的调控作用(Chia et al., 2020; Dong et al., 2014; Sprinzak et al., 2021),能够通过促进间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MSCs)的成骨分化从而调节膜内成骨。研究表明,肌肉干细胞中敲除V型胶原(type V collagen, Col5)基因可导

致细胞异常进入细胞周期及干细胞库的减少，这一过程受 Notch-RBPJ 通路调控，此外，Notch-RBPJ 通过控制 Col5 进而调控干细胞生态位 (Baghdadi et al., 2018)。

## 1.1 肉鸡股骨头坏死的研究进展

### 1.1.1 肉鸡 FHN

以快速增重为目标的集约化养殖模式增加了肉鸡营养代谢病的发病率，如肺动脉高压、脂肪肝综合征和腿病等，给肉鸡养殖的经济效益和动物福利带来重大影响 (Ytrehus et al., 2007)。肉鸡体重快速增长显著改变了身体重心，使股骨近端易受到剧烈运动的影响 (Paxton et al., 2014)，同时伴随着骨骼过度生长和发育代谢紊乱，增加了骨骼疾病的发病率 (Julian, 2005; Sanchez-Rodriguez et al., 2019; Williams et al., 2004)。

FHN 是肉鸡最常见的腿病之一。剖检特征为骨骺和关节软骨分离，小梁骨坏死，最后发生软骨下骨折。根据严重程度，可分为股骨头分离 (femoral head separation, FHS) 或股骨头分离伴生长板撕裂 (femoral head separation with growth plate lacerations, FHSL) (Durairaj et al., 2009; Li et al., 2015; Liu et al., 2021; Liu et al., 2021)。

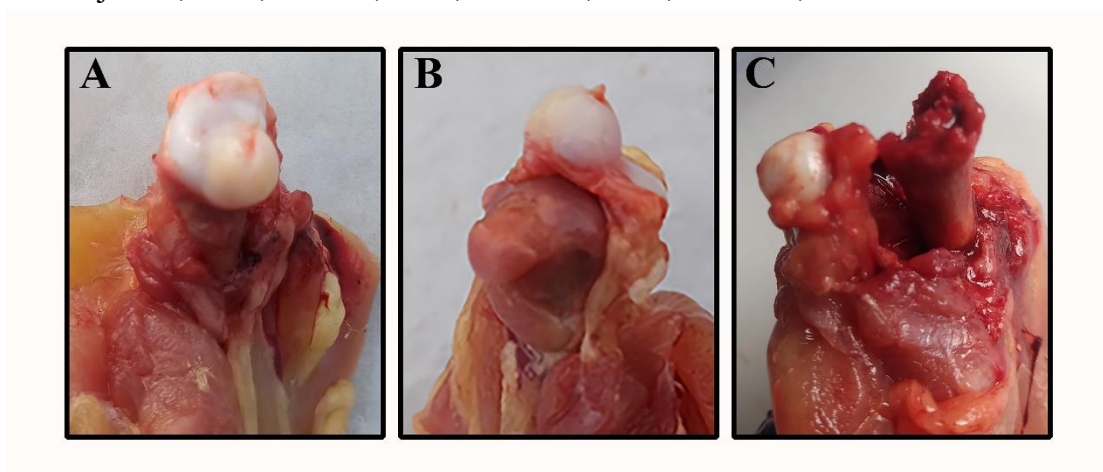


图 1-1 自发性 FHN 及正常肉鸡股骨头解剖学结果 (Liu et al., 2021)

Fig. 1-1 The anatomical manifestations between spontaneous FHN and normal broilers

A. 正常股骨头; B. 股骨头关节软骨与生长板未完全分离; C. 骨骺完全断裂

A. Normal femoral head; B. Femoral head Incomplete separation of articular cartilage and growth plate; C. Fracture of the epiphysis

### 1.1.2 肉鸡 FHN 病因

FHN 病因包括创伤性及非创伤性因素，创伤导致的 FHN 由笼养条件、抓捕、搬运等因素所致 (Packialakshmi et al., 2015); 而非创伤因素包括血管内凝血、环境因素、遗传因素或代谢紊乱等 (Li et al., 2015; Paludo et al., 2017; Seamon et al., 2012; Tullo et

al., 2017; Wideman et al., 2012; Yu et al., 2020; Zhang et al., 2017), 其中营养状况、饲养管理、养殖密度、遗传选育(快速生长的肉鸡品系)、感染(病原微生物感染)等与肉鸡腿病发生密切相关(Herzog et al., 2011; Huang et al., 2017; Kense et al., 2011; Shahzad et al., 2014; Tullo et al., 2017)。

### 1.1.2.1 感染因素

肉鸡 FHN 可继发于细菌性软骨坏死性骨髓炎(bacterial chondronecrosis osteomyelitis, BCO)(Wideman, 2016)。引发肉鸡 FHN 的致病菌主要包括葡萄球菌、盲肠球菌和大肠杆菌(周振雷等, 2019; Marie et al., 2011)。由于肉鸡身体结构的特殊性, 长期施加的机械应力使软骨层之间和软骨层内产生骨软骨裂隙或微骨折(Szafraniec et al., 2022)。骨软骨裂隙常横断局部血管, 同时软骨层受压引起的血流缓慢、血栓形成和局部血液循环不足引起局灶性缺血性坏死(Dinev, 2009; Ytrehus et al., 2007)。细菌可以通过皮肤、黏膜伤口进入肉鸡体内, 由血液循环到达生长板端血管(Dinev, 2012; Wideman, 2016), 这一过程常发生于机体非特异性免疫力受损薄弱时(Huff et al., 2000; McNamee et al., 2000; Wideman et al., 2012)(图 1-2)。

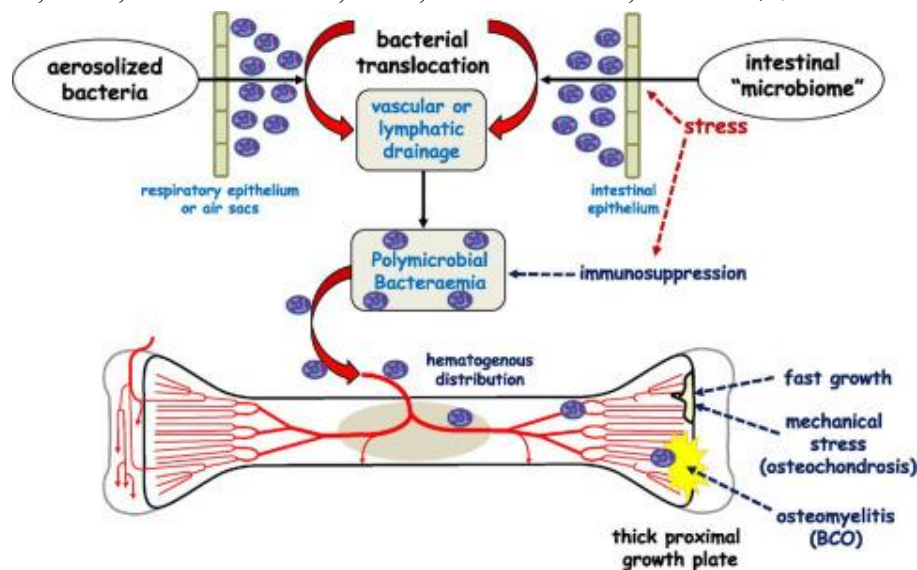


图 1-2 细菌通过机械应力过大产生的骨软骨裂隙引发 BCO 机制图 (Wideman, 2016)

Fig. 1-2 Mechanism diagram of BCO caused by bacteria through osteochondral cracks caused by excessive mechanical stress

葡萄球菌是禽舍常见致病微生物, 存在于垫料、灰尘、空气及养殖场设备中, 可能污染饲料、孵化器等(Arufa et al., 2017; Rodgers et al., 2003; Szafraniec et al., 2022)。相关研究显示蛋壳表面金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的感染率分别为 10.45%和 20.45%(Pondit et al., 2018)。这些微生物是粪便微生物及环境微生物的混合体(Maki et al., 2020; Trudeau et al., 2020), 葡萄球菌约占 1.09%。Just 等从空气中分离出最常见

的细菌是葡萄球菌 (Just et al., 2012)。在家禽中, 葡萄球菌通常引起局部和慢性感染, 极少导致全身性和急性感染 (Director, 2017)。

葡萄球菌具有广泛的毒力因子 (Wright et al., 2010), 通过粘附素附着在宿主细胞的细胞外基质上 (Chavakis et al., 2005), 从而定殖于骨骼和关节, 这是细菌成功感染的第一步。除了将细菌粘附到细胞外基质外, 一些粘附素还能够操纵宿主的免疫反应, 并促进细胞内化作用 (Clarke et al., 2006)。纤连蛋白能够结合胶原蛋白、纤维蛋白、弹性蛋白等多种组分, 这在细菌与宿主细胞的粘附过程中至关重要, 且能够触发细胞内化 (Hauck et al., 2006), 而其与 I 型胶原的结合是导致金黄色葡萄球菌血源性传播的重要原因 (Xu et al., 2004)。

肠球菌属是兼性厌氧、革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性球菌, 它是哺乳动物及禽类胃肠道菌群的成员之一 (Kense et al., 2011; Laurentie et al., 2023)。盲肠肠球菌是一种新出现的禽类致病菌, 可导致骨髓炎、脊柱炎和股骨头坏死, 严重时可导致动物死亡 (Herdt et al., 2009)。大肠杆菌也是引起肉鸡 FHN 的主要致病菌 (Wijesurendra et al., 2017), 它们能进入机体循环系统并定殖, 从而引起肉鸡 BCO 或继发性 FHN。

同样, 肉鸡病毒感染也会导致其死于股骨继发性细菌感染或 FHN (Jones et al., 1993)。肉鸡合并感染支原体与造成免疫抑制的病毒时, 可导致其发生跛行 (Ley et al., 2010); 滑膜支原体可通过诱导软骨细胞凋亡增加肉鸡的 FHN 易感性。最近有研究称, 股骨近端的微生物群与肉鸡 FHN 发展有重要关联 (Wijesurendra et al., 2017)。

#### 1.1.2.2 非感染性因素

集约化肉鸡养殖提高了饲料转化率和生长速度 (Havenstein et al., 2003)。然而, 肉鸡大幅增重会使腿部受到的压力增加, 从而导致各种腿部问题 (Packialakshmi et al., 2015)。缺乏运动和过度负重是集约化肉鸡养殖常见的、影响骨骼健康发育的主要因素。体重的线性增加、股骨损伤、步态不稳和损伤也可导致肉鸡腿病的发生。

##### 1.1.2.2.1 营养因素

禽类日粮中含有 6 种氨基酸和蛋白质以及 8 种维生素能够直接影响机体的骨骼发育与腿病的发生 (Edwards, 2000)。集约化养殖下肉鸡日粮中含有高水平的蛋白质、脂肪及能量, 而钙磷比例有所下降 (Williams et al., 2000)。相关研究报道饲喂高水平维生素 D 可以缓解腿部疾病的发生 (Fleming, 2008; Whitehead et al., 2004; Whitehead et al., 2004)。生物素、叶酸、维生素、烟酸、胆碱和某些微量元素的缺乏, 也常诱发腿病。营养摄入不足或失衡, 不利于骨骼的健康发育, 引起软骨发育不良和腿病。

##### 1.1.2.2.2 生长因素

在现代化集约养殖模式中, 肉鸡体重迅速增加, 主要特点为胸肌增长迅速, 从而改变了肉鸡的重心, 使其腿部压力过大 (Corr et al., 2003)。肉鸡腿骨生长主要通过骨

干两侧生长板不断生长延长以及皮质骨的高度动态重塑增加骨直径 (Wideman et al., 2012)。在 5 周龄后, 由于肉鸡进入快速生长期, 股骨的增长速度无法与体重的增长成比例增加 (Applegate et al., 2002; Paxton et al., 2010; Paxton et al., 2013), 从而引起股骨头承载压力增大 (Prisby et al., 2014; Wideman et al., 2012), 最终导致股骨头血流及动力学发生改变, 生物力学结构遭到破坏并发生骨代谢紊乱 (Liu et al., 2021) 引发 FHN。

#### 1.1.2.2.3 环境因素

在家禽养殖场中, 孵化过程、饲养密度、光照周期、垫料质量、环境卫生、温度和运输等因素都能够导致肉鸡发生应激反应 (Mitchell et al., 1986; Packialakshmi et al., 2015), 影响肉鸡生长速度, 并对骨骼发育产生不利影响。常规饲养时, 肉鸡身体重量分散于整个肢体, 而铁丝网地板饲养会影响肉鸡站立姿势 (Wideman et al., 2012), 且饲养密度过大会限制肉鸡的运动, 从而增加肉鸡腿病的发病率 (Hall, 2001)。

#### 1.1.3 肉鸡 FHN 的致病机制

FHN 是一种进行性骨病, 特征为骨细胞和骨髓细胞坏死、软骨下骨微骨折及严重时发生股骨头塌陷, 最终导致髋关节功能障碍 (Guerado et al., 2016; Marciniak et al., 2005; Mont et al., 2020)。创伤能够破坏血液流动并导致骨细胞死亡 (Assouline-Dayane et al., 2002), 因此是 FHN 的常见因素。此外, 在搬运、捕捉等过程中, 肉鸡受到外力的冲撞而引起骨骼损伤, 从而继发 FHN。微循环栓塞引起股骨头缺血是导致非创伤性 FHN 发生的重要因素, 而血管灌注的恢复及坏死骨组织被新生骨组织替换的速度决定了是否发生 FHN (Jones, 2001; Seamon et al., 2012)。目前, 这一病理生理级联反应 (图 1-3) 发生顺序依次为脂肪细胞肥大化、骨内高血压、血管压迫和血栓形成、缺血、骨髓和骨坏死、软骨下骨折, 最终导致股骨头塌陷 (Cui et al., 2021)。

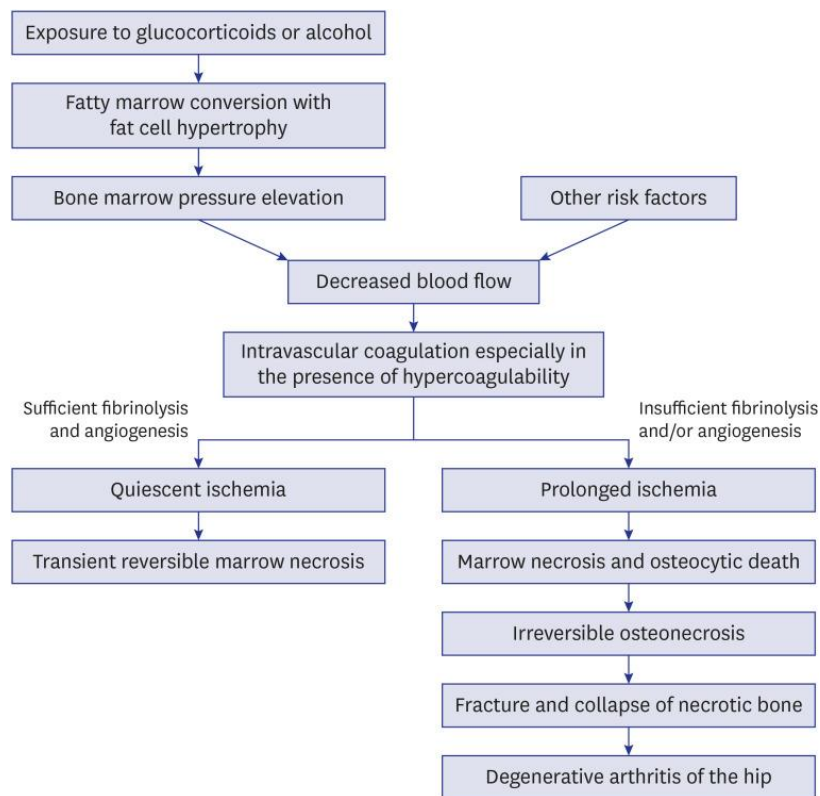


图 1-3 非创伤性 FHN 和短暂性骨髓坏死的发病机制 (Cui et al., 2021)

Fig. 1-3 Pathogenesis of non-traumatic osteonecrosis and transient marrow necrosis

### 1.1.3.1 骨髓脂肪细胞肥大和骨内高压

皮质类固醇通过激活过氧化物酶体增殖物  $\gamma$  受体 (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ ) 及抑制相关转录因子 2 (run-related transcription factor 2, Runx-2) 运行, 从而促进前脂肪细胞和 MSCs 分化为成熟脂肪细胞 (Cui et al., 2006; Miyanishi et al., 2002; Motomura et al., 2005; Peckett et al., 2011; Wang et al., 1977)。皮质类固醇 (甲泼尼龙/地塞米松) 通过增加骨髓脂肪细胞的脂质合成, 诱导脂肪细胞肥大 (Cui et al., 2006; Miyanishi et al., 2002; Motomura et al., 2005; Peckett et al., 2011; Wang et al., 1977), 而骨髓脂肪细胞体积的增加和/或脂肪细胞数量的增加能够诱发股骨近端骨内压力升高, 继而压迫骨内静脉窦, 导致静脉微血管内凝血, 最终造成股骨头血管受损、血流缓慢 (Koo et al., 1998)。Kerachian 等人发现泼尼松龙能够导致血管栓塞, 并引起机体发生高脂血症, 进而影响 FHN 的发生 (Kerachian et al., 2009)。大量研究表明, 过量使用糖皮质激素会导致股骨头髓内组织发生高脂血症、脂肪沉积并引起脂肪栓塞, 这可能会导致 FHN 的发生并影响其发展 (Kitajima et al., 2007; Song et al., 2017; Yin et al., 2006; Zhang et al., 2018)。

### 1.1.3.2 骨髓坏死

血管内凝血导致股骨头内骨髓急性缺血。正常的骨髓腔内主要充满两种类型的细胞，即骨髓脂肪细胞和造血细胞。骨髓脂肪细胞约占成人骨髓体积的 70%，而造血细胞的数量随着年龄的增长而逐渐减少。骨髓细胞及造血细胞对缺血的耐受性不同（Fondi et al., 2007）。造血细胞对缺血敏感，大多数会在缺血事件发生后 12 h 内死亡（Fondi et al., 2007）。而骨髓脂肪细胞在造血细胞之后才会发生死亡，其细胞核约在完全缺血后 48 h 消失。因此，骨缺血的初始微观迹象出现在骨髓，首先引起造血细胞消失，随后发生脂肪细胞坏死。Fondi 等研究发现，当发生血管内凝血/血管生成受损时，长时间缺血会造成骨细胞在 24~72 h 内死亡，并导致局灶性骨坏死（Fondi et al., 2007）。

### 1.1.3.3 血管内凝血及血管生成受损

股骨头内发生的血管内凝血会引发纤维蛋白溶解。这种血管内凝血导致局部缺氧、营养缺乏和骨髓坏死，最终激活血管生成。血管生成受损被认为是 FHN 发展的重要因素。作为血管扩张剂的一氧化氮能够促进血管生成和骨形成，且内皮一氧化氮合酶基因的多态性与 FHN 的发生相关（Glueck et al., 2008, Koo et al., 2006）。Kabata 等报道发现皮质类固醇能够通过抑制血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）的产生，抑制血管生成（Kabata et al., 2008）。相关研究表明 VEGF 作为一种血管生成蛋白能够促进软骨生成和骨形成过程，其遗传多态性与皮质类固醇相关的 FHN 发生发展有关（Kim et al., 2008; Lee et al., 2012）。因此，糖皮质激素或其他因素能够引起骨髓内脂肪细胞肥大或数量增多导致骨内高压，继发骨髓坏死、血管内凝血及血管生成受损，最终导致 FHN 的发生。

### 1.1.4 肉鸡 FHN 的防控

目前肉鸡 FHN 的防控措施包括保持禽舍洁净的环境，减少病原菌的累积，设置合理的饲养密度、光照条件、营养条件等，不仅能够减少腿病的发生，而且对生产性能有重要影响（Bizeray et al., 2002）。高密度饲养对肉鸡足垫健康和腿部行走不对称有负面影响，减低饲养密度，平地放养可保持足垫和飞节健康，减少腿部行走不对称，并提高肉鸡福利。此外，在刨花垫料上饲养的肉鸡跛行的发生率低于在铁丝网上饲养的肉鸡腿病发生率（Wideman et al., 2012）。近年来，益生菌作为一种天然、安全、便捷的微生态制剂（Al-Khalaifa et al., 2019），已用于家禽腿病的防治。预防性提供益生菌，可以减少 BCO 的发生率（Wideman et al., 2015）。胃肠道是细菌侵入的主要途径，可以在饮用水中添加抗生素如恩诺沙星等（Wideman et al., 2015）用于治疗。同时，加强饮水卫生、种蛋卫生，孵化场卫生和肠道健康等卫生措施，也有助于减少腿病的发

生 (Weimer et al., 2021)。此外, 在饲料中添加适量多不饱和脂肪酸或有机酸, 可以改善骨骼的骨量和骨密度 (Hafeez et al., 2014; O'Connor-Robison et al., 2014)。

## 1.2 骨髓间充质干细胞分化与骨代谢的研究进展

### 1.2.1 骨髓间充质干细胞成骨作用

骨髓间充质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一种存在于骨髓组织中的具有免疫原性低、多向分化潜力的干细胞 (Fu et al., 2019; Kuang et al., 2019; Lee et al., 2021), 其自我更新及增殖能力极强, 能够分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、神经细胞等多种细胞 (图 1-4) (Chrostek et al., 2019; Liao et al., 2021; Qi et al., 2017)。BMSCs 易于体外分离和扩增, 具有旁分泌和免疫调节功能, 其能够迁移到损伤组织部位, 并在某些因素的诱导下分化成组织中的特定细胞类型, 重建局部微环境 (Raeth et al., 2014)。此外 BMSCs 在骨形成中也发挥重要作用 (Lu et al., 2020; Qiu et al., 2021), 其受长非编码 RNA (Li et al., 2021; Li et al., 2021; Lian et al., 2012; Qiu et al., 2021; Wang et al., 2022)、小非编码 RNA (microRNA, miRNA) (Lian et al., 2012)、外泌体 (Yang et al., 2019; Zhou et al., 2022)、Wnt/ $\beta$ -Catenin 通路 (Maeda et al., 2019)、BMP/Smad 通路 (Lowery et al., 2018)、Notch 通路 (Zamurovic et al., 2004)、血管生成 (Filipowska et al., 2017)、RNA 甲基化修饰及蛋白修饰 (Feng et al., 2021) 等介导调控, 并在治疗骨代谢相关疾病方面具有巨大潜力。

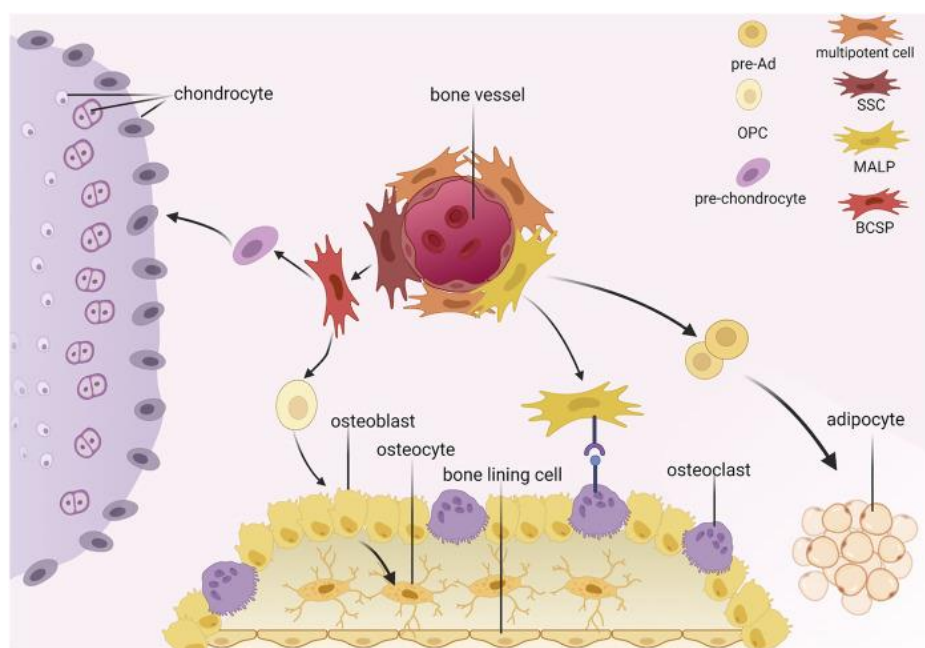


图 1-4 BMSCs 的分级 (Gao et al., 2021)

Fig. 1-4 Hierarchy of bone marrow mesenchymal stromal cells

SSC, 骨骼干细胞; MALP, 骨髓成脂谱系前体细胞; BCSP, 骨、软骨及基质干细胞; pre-Ad, 前脂肪细胞; OPC, 骨祖细胞

SSC, skeletal stem cell; MALP, marrow adipogenic lineage precursors; BCSP, bone, cartilage and stromal progenitor; pre-Ad, pre-adipocyte; OPC, osteo progenitor cell

### 1.2.2 BMSCs 与骨代谢

骨骼系统由紧密相连但功能不同的组织组成, 如骨骼、软骨和肌腱。骨骼由于矿化基质的存在, 结构坚固且坚硬, 但其作用不仅限于保护重要器官或支撑身体, 还作为韧带、肌腱和肌肉的附着点以维持机体运动, 并为骨髓中的造血组织提供场所 (Méndez-Ferrer et al., 2010; Zaidi, 2007)。骨骼由大约 10%细胞、60%无机基质及 30%有机基质组成, 其中无机基质主要包括羟基磷灰石, 有机基质主要为 I 型胶原蛋白 (Arthur et al., 2020; Boskey et al., 2013; Feng et al., 2011; Pasteris et al., 2014)。骨骼内微环境复杂, 其中来源于造血谱系的破骨细胞, 能够分解骨组织以移除陈旧和受损的骨或释放钙以维持机体钙稳态; 来源于间充质谱系的软骨细胞、成纤维细胞及成骨细胞在塑形和重建骨组织的过程中发挥重要作用 (Jiang et al., 2002)。骨髓腔内含有大量造血细胞, 并且具有分泌调节碳水化合物和矿物离子代谢的相关激素, 提供大量的钙和磷酸盐, 调节全身矿物离子稳态等作用 (Ono et al., 2019)。骨骼具有许多功能, 这些功能需要由多种不同类型的高度活跃分化细胞共同实现 (Abeynayake et al., 2021;

Antebi et al., 2016; Carina et al., 2020; Herrmann et al., 2019; Shiu et al., 2018)。机体中,骨通过塑形和重建过程维持动态平衡,以适应各种生理及病理刺激(Carina et al., 2020; Feng et al., 2011; Kimmel, 1993)。骨吸收和骨形成分别由破骨细胞和成骨细胞进行,其活动由骨细胞协调并维持动态平衡(Palumbo et al., 2021)。骨骼在其生命周期经历许多生物学上重要的步骤,如形态发生和发育,爆发性生长和功能成熟,适当的结构和功能的维护及修复等。在周期的每一个步骤都需要不断分化的细胞,这样骨骼才能变得更强大,同时维持其强度和功能。

骨折愈合的生理过程主要包括初始炎症期,随后单核细胞衍生的单核破骨细胞前体进入损伤部位。单核破骨细胞前体成熟后形成多核破骨细胞,能够吸收骨基质。随后 BMSCs 和前成骨细胞被隔离、定位、整合并经历成骨分化和矿化等过程(Okada et al., 2020; Sivaraj et al., 2021)。骨形成包括三个阶段:增殖、分化和基质矿化(An et al., 2016)。成骨细胞主要来源于具有强成骨分化潜力的 BMSCs (Marie et al., 2011)。在骨重塑过程中(Palumbo et al., 2021),陈旧或受损骨组织被破骨细胞清除,随后生长因子从骨基质中释放出来,诱导 BMSCs 向特定部位的募集、迁移并分化为成骨细胞,最终在特定部位形成新骨以修复受损骨组织(Liu et al., 2018; Zhou et al., 2020)。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是一种骨特异性酶类,被认为是早期骨形成的标志物,其表达与成骨细胞分化水平呈正相关。相关研究表明,ALP 的活性越高,成骨细胞活性越强(Ching et al., 2017)。骨钙素(bone gla protein, BGP)是骨组织的一种特定蛋白质,其由成骨细胞合成和分泌,并大部分沉积与骨基质中,被认为是骨形成晚期的标志物(Whyte, 1994)。

骨折后坏死组织被去除,血管开始生成,随后 BMSCs 的浸润,促进软骨内骨化,通过形成钙化软骨基质来稳定骨折部位。骨重建阶段利用破骨细胞分泌酸性物质吸收未成熟的编织骨,形成骨吸收陷窝,随后成骨细胞移行至被吸收部位,分泌骨基质并矿化形成新骨(Einhorn et al., 2015; Ghiasi et al., 2017; Schindeler et al., 2008)。在雌激素缺乏、机械应力异常和药物副作用等条件下,骨形成和骨吸收的动态稳定性被破坏,导致骨质疏松、骨折或骨不愈合等(Iqbal et al., 2018)。BMSCs 是成骨细胞的主要来源(Lu et al., 2020; Qiu et al., 2021),不仅能够通过细胞增殖和分化直接替代和修复受损组织,还通过旁分泌作用间接促进受损组织修复(Li et al., 2021; Richardson et al., 2016)。因此, BMSCs 的细胞疗法被认为在治疗骨代谢相关疾病方面具有巨大潜力(Xiao, 2017)。

### 1.2.3 BMSCs 成骨及成脂分化的调控因素

由于 BMSCs 在骨形成、修复及软骨内骨化等方面能够通过定向迁移及分化发挥重要作用，因此明确其分化的影响因素对治疗骨代谢疾病至关重要。BMSCs 分化由细胞内转录因子 (transcription factors, TFs)、信号通路和 microRNA 等因素调节。此外，缺氧和机械刺激等也参与这一过程 (图 1-5) (Gao et al., 2021)。

对于成骨，TFs 通过增加成骨相关基因的表达来调节 BMSCs 的分化。Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2) 和成骨细胞特异基因 (osterix) 是促进成骨细胞分化的两个关键 TFs (Augello et al., 2010)。由核心结合因子  $\beta$  增强的 Runx2 表达能够促进成骨细胞分化 (Yoshida et al., 2002)，而干扰 PPAR $\gamma$  的活性能够抑制 BMSCs 分化为脂肪细胞 (Komori, 2006)。Wang 等研究发现 Runx2 的意外上调会导致异位骨化 (Wang et al., 2019)。同时，BMP2 是靶向 Runx2 / Cbfa1 的关键信号通路，并对成骨具有重要影响 (Javed et al., 2008)。Osterix 是 BMSC 成骨的另一个主要 TFs，其在 Runx2 下游发挥作用，并且可以被 Runx2 激活 (Nakashima et al., 2002)，从而发挥促进成骨的作用。

对于脂肪生成，PPAR $\gamma$  通过调节脂肪代谢相关基因的表达发挥作用，并具有促进脂肪细胞生成而抑制成骨细胞分化的作用 (Zhuang et al., 2016)。Kim 等研究发现 PPAR $\gamma$  激动剂通过调节下游 Lipin-1 的表达诱导脂肪细胞分化 (Kim et al., 2016)，而 PPAR $\gamma$  是一种分泌性 BMP 抑制剂 (Gustafson et al., 2015)。Tang 等研究表明高浓度的 BMP2 加速成骨细胞分化，而低浓度的 BMP2 促进 C3H10T1/2 间充质细胞系中的脂肪细胞形成 (Tang et al., 2004)。

此外，运动和振动等机械因素可以调节 BMSCs 的分化。研究表明攀岩运动显著增加骨体积和成骨细胞数量，同时减少骨髓脂肪含量和脂肪细胞数量 (Menuki et al., 2008; Mori et al., 2003)。体内研究表明，低幅度机械振动能够上调 Runx2 并下调 PPAR $\gamma$  (Luu et al., 2009)，从而促进成骨。低幅度高频振动可能通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路、雌激素受体  $\alpha$  信号通路和细胞骨架重塑提高 MSCs 的成骨分化水平 (Haffner-Luntzer et al., 2018; Wang et al., 2020; Yi et al., 2020)。

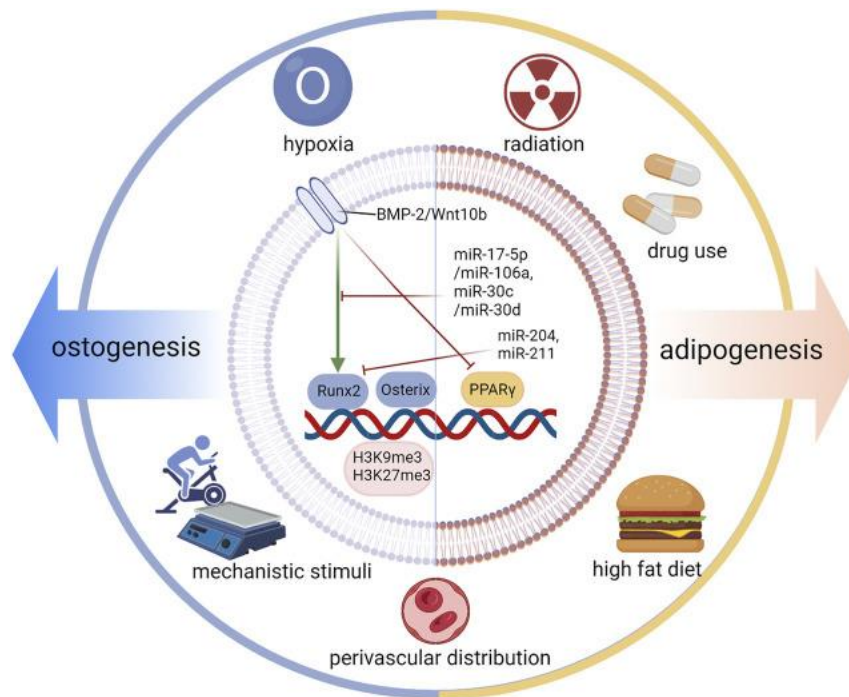


图 1-5 BMSCs 分化调控机制图 (Gao et al., 2021)

Fig. 1-5 Differentiation regulation mechanism diagram of BMSCs

#### 1.2.4 BMSCs 与 FHN

在过去 30 年, BMSCs 在组织工程和再生医学领域被广泛研究, 如骨和软骨重建以及伤口愈合等 (Takam Kamga et al., 2020)。目前, BMSCs 是心血管、骨科和关节退行性疾病的一种非常有前途的治疗选择 (Chen et al., 2004; Horwitz et al., 2002; Horwitz et al., 1999; Koç et al., 2002; Shen et al., 2015; Strauer et al., 2002)。相关研究发现 BMSCs 具有改善骨形成和预防骨质流失和坏死的能力, 以及改善先天性骨缺损和骨质疏松症的能力 (Ming et al., 2013; Mok et al., 2010)。骨坏死发生时, BMSCs 在骨修复中发挥了重要作用。在生理条件下, BMSCs 的成骨和成脂分化之间存在动态平衡 (Justesen et al., 2001; Kokabu et al., 2016; Yang et al., 2018), 主要由 Runx2 和 PPAR $\gamma$  调节 (Fan et al., 2011; Miller et al., 2003)。Runx2 受 BMP2 调控, 而 PPAR $\gamma$  促进脂肪生成并抑制成骨 (James, 2013; Peng et al., 2009; Tontonoz et al., 1994; Valenti et al., 2011)。两种信号通路同时调节不同的细胞因子, 以调控 BMSCs 的分化水平 (Li et al., 2003; Valenti et al., 2011)。FHN 是一种骨代谢异常疾病, 其发病与 BMSCs 的活性及数量减少密切相关 (Hernigou et al., 1997; Hernigou et al., 1999; Shapiro et al., 2009)。同时也有研究发现 BMSCs 脂肪生成与成骨之间的不平衡是 FHN 发生的原因之一 (Li et al., 2005)。因此, BMSCs 的增殖活性及细胞数量下降、成骨及成脂分化水平失衡等与 FHN 的发生密切相关。

## 1.3 Notch 信号通路调控 BMSCs 分化的研究进展

### 1.3.1 Notch 通路概述

Notch 通路介导相邻细胞间的信号传导，能够决定细胞命运和功能（Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Chiba, 2006; Zhou et al., 2022）。在经典的 Notch 信号通路中（图 1-6），Notch 基因编码的单次跨膜蛋白—Notch 受体（哺乳动物中的 Notch1~4，禽类中的 Notch1~2）在结合相邻细胞表面的配体（哺乳动物中的 Jagged1, 2 和 Delta 样配体（Delta like ligand, DLL）1, 3, 4；禽类中的 Jagged1, 2 以及 DLL1, 4）时经历连续的蛋白水解切割（Schroeter et al., 1998），形成具有转录调节活性的 Notch 胞内结构域（Notch intracellular domain, NICD）并从质膜释放，随后转移至细胞核，与 CSL 家族的转录因子（哺乳动物中的 RBP-J $\kappa$ /CBF-1）相互作用并激活靶基因的转录（图 1-6）（Dorsam et al., 2007; Kopan et al., 2009; Lemmon et al., 2010; Majumder et al., 2021; Siebel et al., 2017）。NICD 跨膜结构域的切割和释放由  $\gamma$  分泌酶复合物介导，该复合物在哺乳动物中含有早老素 1（presenilin 1, PS1）或 2（PS2）共两种催化亚基（Kopan et al., 2000），研究发现移除 PS1 和 PS2 可完全消除 NICD 的产生及活性（Donoviel et al., 1999; Herreman et al., 1999）。Notch 信号作为保守且经典的通路，能够参与调控细胞分化（Siebel et al., 2017）。

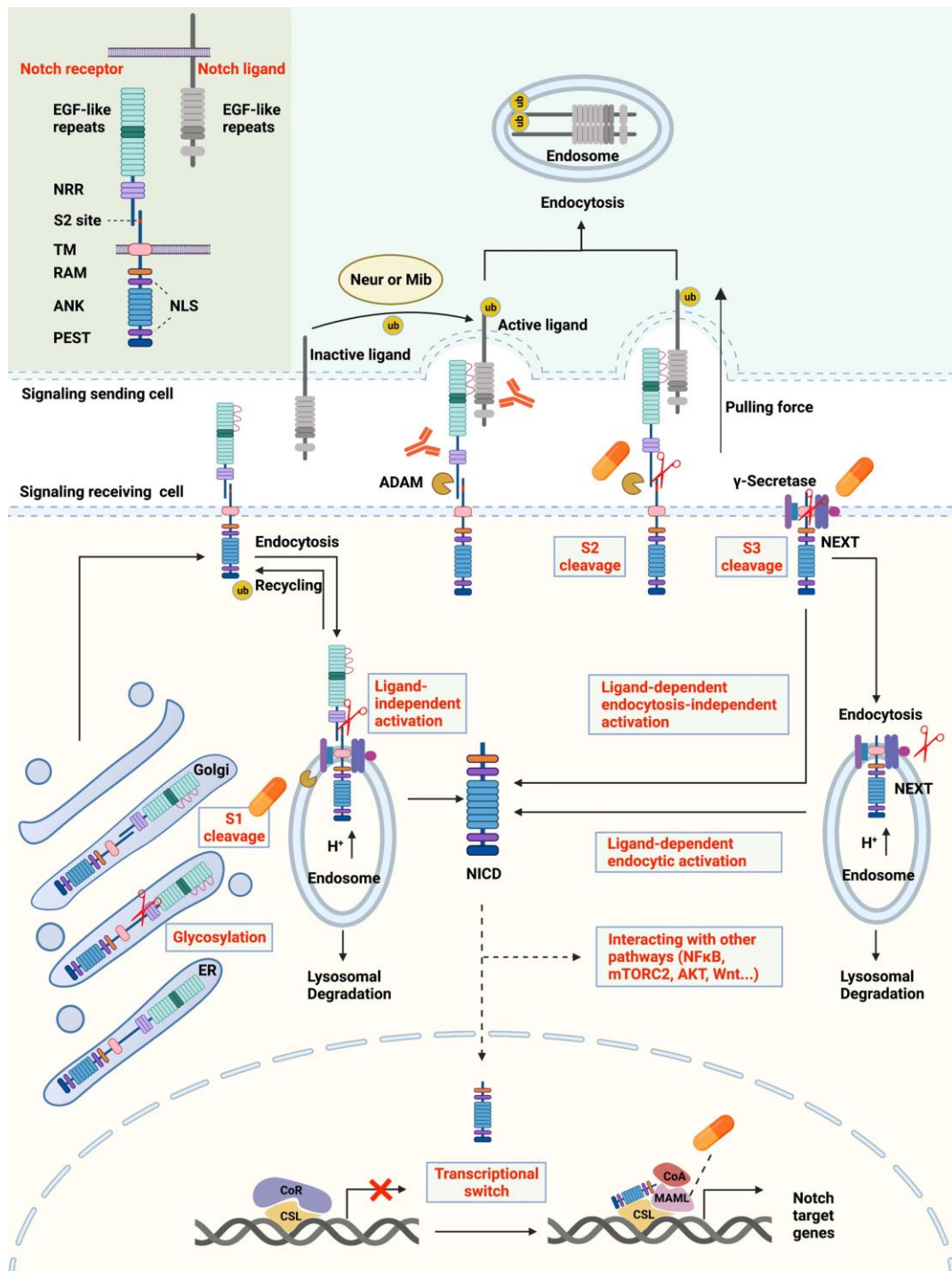


图 1-6 Notch 信号通路和治疗靶点 (Zhou et al., 2022)

Fig. 1-6 The Notch signaling pathway and therapeutic targets

### 1.3.2 Notch 通路调控 BMSCs 分化

Notch 信号通路能够调节 BMSCs 细胞的增殖和分化, 影响骨组织的发育 (Chia et al., 2020; Dong et al., 2014; Sprinzak et al., 2021)。在膜内骨化中, Notch 通路通过控制

BMSCs 向成骨细胞的分化来调节这一过程 (Hilton et al., 2008)。Notch 信号通过发状分裂增强子 (hairy and enhancer of split, Hes) 或发状分裂相关增强子(hairy/enhancer-of-split related, HEY)蛋白降低 Runx2 的转录活性, 进而抑制成骨细胞分化 (Deregowski et al., 2006; Hilton et al., 2008; Sciaudone et al., 2003)。研究发现体内或体外过表达 NICD 时, 成骨细胞分化及骨形成过程被抑制 (Zanotti et al., 2016), 表明 Notch 信号通路能够抑制骨形成及成骨细胞分化。

Notch 是一种转录激活剂, 但 NICD/RBPJ 复合物与 Sox9 启动子结合则对 Sox9 转录产生直接抑制作用 (Canalis, 2005), 这种作用也可能继发于 Notch 通路下游转录抑制因子 Hes 和 HEY 的诱导。Notch 抑制体内软骨生成, 其配体 DLL1 抑制鸡胚中的软骨细胞分化, 并抑制生长板中肥大区的形成 (Crowe et al., 1999)。相关研究发现肢芽间充质细胞中 Notch1 和 Notch2 共同缺失或 RBPJ 缺失时, 能够导致松质骨的体积增加, 这可能继发于生长板中软骨细胞增殖及基质产生增加及间充质细胞向成骨细胞分化的水平提高 (Hilton et al., 2008; Tu et al., 2012)。同时研究表明 Notch 通路能够干预小鼠软骨形成, 其发现 Notch1 的 NICD 在肢芽间充质细胞中过度表达能够抑制小鼠附肢骨骼中透明软骨的形成, 且这种影响在 RBPJ 缺失小鼠中消除 (Dong et al., 2010; Kohn et al., 2012), 表明激活 Notch-RBPJ 经典通路能够抑制软骨细胞增殖和分化 (Chen et al., 2013; Kohn et al., 2012; Mead et al., 2009)。

#### 1.4 Col5a1 研究进展

胶原蛋白是细胞外基质中最丰富的蛋白, 为长圆柱状, 由 3 条多肽链彼此以超螺旋的形式缠绕而成 (van Kuppevelt et al., 1995), 能够维持组织的结构完整性并调节各种生物过程 (Cescon et al., 2015)。V 型胶原 (type V collagen, Col5) 的亚型是由  $\alpha 1$  (V)、 $\alpha 2$  (V) 和  $\alpha 3$  (V) 三条多肽链组成的异源三聚体 (Sumpter et al., 2004; van Kuppevelt et al., 1995)。其主要亚型包含两条  $\alpha 1$  (V) 链和一个  $\alpha 2$  (V) 链, 分别由 Col5a1 和 Col5a2 基因编码。Col5 是一种次要胶原纤维, 其丰富度低于经典胶原蛋白, 但其作为 I 型胶原 (type I collagen, Col1) 的关键结构成分 (Cescon et al., 2015), 在调节胶原纤维组装和横向生长 (纤维生成) 中起着关键作用, 也是肌腱、韧带等组织的主要成分 (Collins et al., 2011; Wenstrup et al., 2004)。

在体内, Col5 作为启动 Col1 形成原纤维的成核剂 (Wenstrup et al., 2004), 其部分 N 端前肽突出于原纤维表面, 能够限制异常的原纤维横向生长 (Linsenmayer et al., 1993)。在皮肤 (Fan et al., 2021)、肌腱 (Connizzo et al., 2016) 和角膜 (Sun et al., 2011) 等张力纤维组织中, Col5 的减少导致胶原纤维异常增厚, 原纤维数量减少及机械性能损伤。在 Col5a1 基因缺失小鼠中, 由于 Col1 纤维生成能力不足, Col5a1 完全缺失会

导致小鼠胚胎死亡 (Wenstrup et al., 2004)。Chandrasekaran 等报道 Col5 的缺失导致纤维层中细胞增殖和  $\beta$ -catenin 表达减少, 表明了 Col5 在维持髌突软骨祖细胞生态位中的重要作用 (Chandrasekaran et al., 2021)。Bi 等人通过分析去细胞化胰腺基质的蛋白组学, 确定了 Col5 能够诱导人多能干细胞分化为胰岛类器官 (Bi et al., 2020)。Baghdadi 等人的研究发现小鼠卫星细胞中敲除 Col5a1 基因可引起细胞异常进入细胞周期并导致干细胞库的减少, 提示 Col5 是小鼠卫星细胞生态位的关键组成部分 (Baghdadi et al., 2018), 并且 Notch-RBPJ 可通过控制 Col5a1 转录调控肌肉干细胞的生态位。

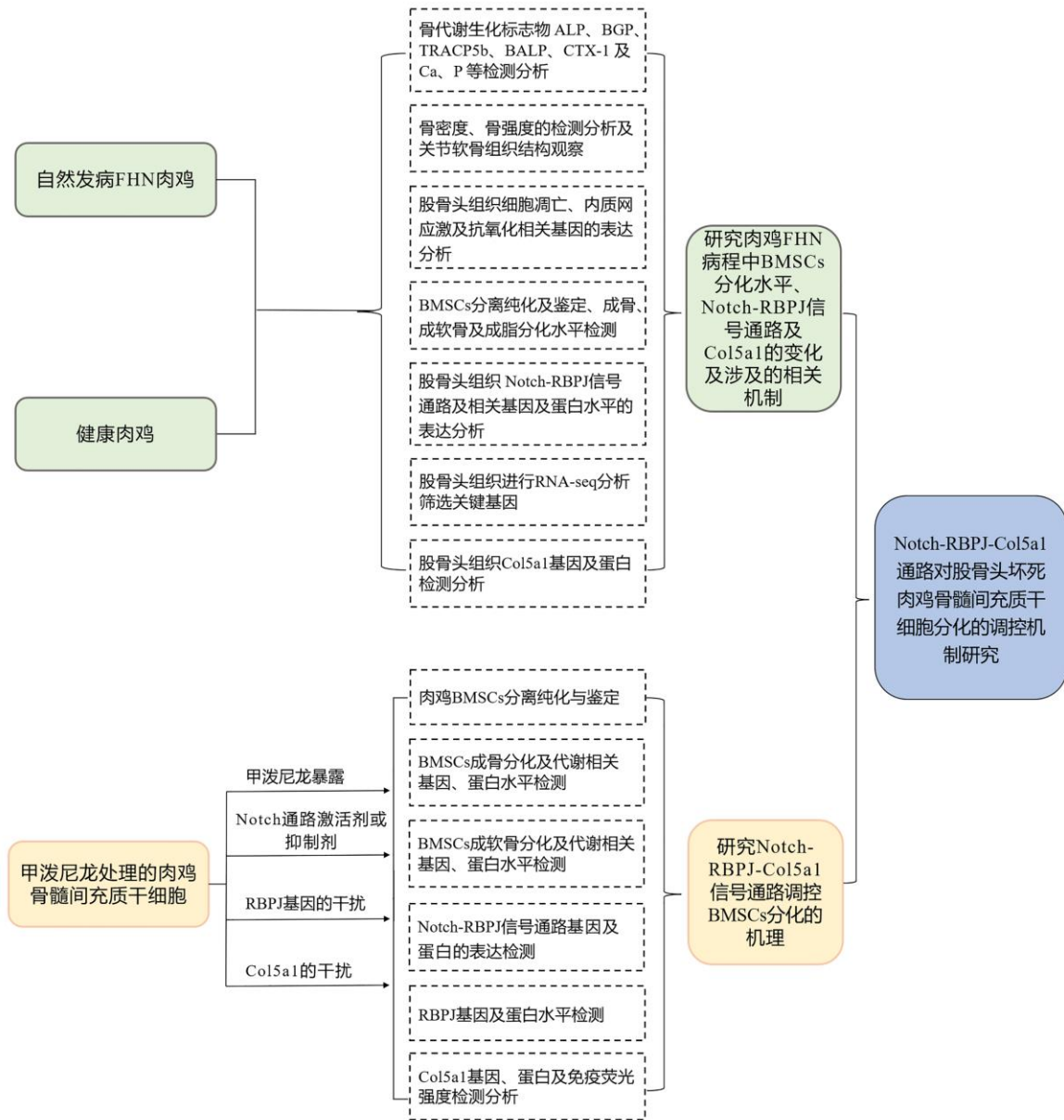
## 2 本研究目的和意义

股骨头坏死 (FHN) 是肉鸡养殖业中最常见、最重要的腿病之一, 在世界各地均有报道, 其不仅显著降低生产性能, 危害动物福利, 同时严重影响肉鸡养殖经济效益。骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 是一种存在于骨髓组织中具有多项分化潜能的干细胞, 具有极强的生物学作用, 能够改善骨形成、先天性骨缺损和骨质疏松症, 并具有预防骨质流失和坏死的功能。骨坏死发生时, BMSCs 在骨修复中发挥了重要作用, 不仅能够通过增殖及分化直接替代和修复受损组织, 还能够通过旁分泌作用间接促进组织修复。在生理条件下, BMSCs 成骨和成脂分化存在动态平衡, 而二者失衡则导致 FHN 的发生。然而关于肉鸡 FHN 中 BMSCs 成骨及成脂分化失衡的机制仍不清楚, 需要进行深入研究。

BMSCs 受多种信号通路调节, 其中 Notch 信号通路能够调控其增殖及分化, 决定细胞命运。Notch 信号通路是进化中高度保守的信号传导途径, 参与骨发育及稳态的调节, 在膜内成骨和软骨内骨化的过程中发挥着至关重要的调控作用。Notch 通路下游转录因子 RBPJ 能够通过调节 V 型胶原 (Col5a1) 的表达进而调控干细胞分化。然而, Notch-RBPJ 通路调控 Col5a1, 影响 BMSCs 分化, 继而干预肉鸡 FHN 发生的相关作用机制尚不明确。

因此, 本试验以 FHN 肉鸡及甲泼尼龙 (methylprednisolone, MP) 处理的肉鸡 BMSCs 为研究对象, 探究 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 分化水平变化及潜在机制, 挖掘肉鸡 FHN 发生发展中的重要调控因子, 明确 Notch-RBPJ-Col5a1 通路对肉鸡 FHN 中 BMSCs 分化的调控机制。本研究结果将为肉鸡 FHN 发病机理与诊断防控研究提供新的理论和科学依据。

### 3 技术路线





## 第二章 股骨头坏死肉鸡血脂水平、骨代谢标志物及关节软骨稳态研究

随着市场对禽类肉制品需求的不断增加,肉鸡养殖已逐步从传统饲养转变为集约化模式 (Dinev et al., 2019; Kuttappan et al., 2016)。集约化养殖极大地提高了肉鸡生产性能,但同时增加了肉鸡腿病的发病率 (Julian, 2005; Olkowski et al., 2011; Sanchez-Rodriguez et al., 2019)。股骨头坏死 (FHN) 是快速生长肉鸡最常见的腿病之一,4~6 周龄时发病率最高 (Durairaj et al., 2009; Li et al., 2015; Liu et al., 2020; Yu et al., 2020)。Zhang 等人报告 FHN 发生与软骨细胞的凋亡和内质网应激有关 (Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2019)。内质网由囊状、泡状和管状结构组成,可以不断地重新排列 (Marchi et al., 2014; Rowland et al., 2012)。内质网应激由三个上游信号蛋白感知:肌醇需求酶-1 $\alpha$  (inositol requiring enzyme-1 $\alpha$ , IRE1- $\alpha$ )、激活转录因子-6 (activating transcription factor-6, ATF6) 和 PERK。在生理条件下,这些跨膜蛋白与内质网中的伴侣葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78)/免疫球蛋白结合蛋白 (immunoglobulin binding protein, BiP) 结合。当未折叠或错误折叠蛋白质在内质网中积累时,PERK、IRE1 $\alpha$  和 ATF6 从 GRP78/BiP 中释放出来,激活未折叠蛋白反应 (UPR) 以协助折叠积累的蛋白质 (Gardner et al., 2011),这三个信号通路的过度激活诱导了细胞凋亡 (Morishima et al., 2011; Tabas et al., 2011)。由 PERK-真核启动因子 2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ )-ATF4 途径介导的内质网应激反应调节凋亡关键靶基因的表达,如 CHOP (Brewer, 2014; Su et al., 2008)。在长期或过度的内质网应激反应下,内质网无法恢复正常功能,最终导致细胞功能紊乱及凋亡 (Ayaub et al., 2016; Hu et al., 2018)。PERK/ATF4/CHOP 信号通路是诱导细胞凋亡的关键通路 (Cao et al., 2012; Chen et al., 2014; Liu et al., 2016)。细胞凋亡是生理或病理条件下细胞死亡的一种主动模式 (Hou et al., 2020; Zhai et al., 2019),其典型特征是核分裂, DNA 降解,以及凋亡体的形成 (Dong et al., 2019)。

内质网应激也能够诱导自噬的发生 (Chen et al., 2019; Liu et al., 2020; Yorimitsu et al., 2006)。相关研究表明 ATF4 通过对自噬相关基因 (autophagy related gene, ATG) 如 ATG5、ATG7 和 ATG10 的转录调节从而诱导细胞自噬 (B'Chir et al., 2013)。自噬是一个细胞降解过程,通过分解聚集的蛋白质、未折叠/错误折叠蛋白或受损的亚细胞器恢复代谢平衡 (Glick et al., 2010)。在自噬启动阶段,Beclin1 是其关键蛋白,能够促进自噬蛋白定位到自噬泡;在自噬的成熟阶段,LC3 通过与磷脂酰乙醇胺结合,并经过

蛋白质泛素化的酶促反应形成自噬泡，从而发挥 LC3-II 的作用 (Yang et al., 2015)。

在发生内质网应激时，Nrf-2 被 PERK 激活，从而促进与氧化应激有关的基因的表达 (Brewer, 2014)。Nrf-2 蛋白与细胞质蛋白结合进入细胞核，导致相关基因的表达，如抗氧化酶，超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 及药物代谢酶等 (Ma, 2013; Suzuki et al., 2013)。SOD 和 GSH-Px 是这一途径中最重要的酶，能够提高机体抗氧化能力，减少活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的毒害作用 (Afshari-Kaveh et al., 2021; Ighodaro et al., 2017)。本试验旨在比较研究 FHN 肉鸡与正常肉鸡中血脂水平、骨代谢标志物及软骨稳态相关指标的变化，以期为肉鸡 FHN 的发病机理研究提供数据资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

#### 1.1.1 主要仪器设备

本章试验主要仪器设备及品牌信息见表 2-1。

表 2-1 主要仪器设备

Table 2-1 Main instrumentation

设备名称	型号	公司
Instrumentation	Product model	Company
全波长酶标仪	BioTek	美国 Epoch 公司
生化检测仪	BS-300	深圳迈瑞生物医药有限公司
双能 X 射线骨密度仪	InAluzer	韩国 MEDIKORS 公司
骨强度仪	Lloyd Instruments	英国 AMETEK 公司
正置荧光显微镜	Nikon DS-Ri2	日本 Nikon 公司
倒置显微镜	NikonECLIPSE50i	日本 Nikon 公司
高速冷冻离心机	Legend Micro 17R	美国 Thermo Scientific 公司
分光光度计	NanoDrop2000	美国 Thermo Scientific 公司
PCR 仪	Mastercycler nexus X2	德国 Eppendorf 公司
荧光定量 PCR 仪	ABI 7300	美国 ABI 公司
微量移液枪	Eppendorf	德国 Eppendorf 公司
超低温冰箱	Thermo scientific	美国 Thermo scientific 公司
精密电子天平	XB124	上海精科实业有限公司

## 1.1.2 主要试剂

本章试验主要试剂及品牌信息见表 2-2。

表 2-2 主要试剂

Table 2-2 Main reagents

试剂名称 Reagents	公司 Company
鸡白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) ELISA 试剂盒	上海酶联生物科技有限公司
鸡白介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒	上海酶联生物科技有限公司
鸡肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒	上海酶联生物科技有限公司
鸡骨特异性碱性磷酸酶 (BALP) ELISA 试剂盒	南京奥青生物技术有限公司
鸡骨钙素 (BGP) ELISA 试剂盒	南京奥青生物技术有限公司
鸡 I 型胶原蛋白羧基末端肽 (CTX) ELISA 试剂	南京奥青生物技术有限公司
鸡抗酒石酸磷酸酶 5b (TRACP-5b) ELISA 试剂	南京奥青生物技术有限公司
Trizol	南京奥青生物技术有限公司
总蛋白 (TP) 生化检测试剂盒	深圳迈瑞生物股份有限公司
白蛋白 (ALB) 生化检测试剂盒	深圳迈瑞生物股份有限公司
丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 生化检测试剂盒	深圳迈瑞生物股份有限公司
天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 生化检测试剂盒	深圳迈瑞生物股份有限公司
碱性磷酸酶 (ALP) 生化检测试剂盒	深圳迈瑞生物股份有限公司
钙 (Ca) 生化检测试剂盒	深圳迈瑞生物股份有限公司
磷 (P) 生化检测试剂盒	深圳迈瑞生物股份有限公司
甘油三酯 (TG) 生化检测试剂盒	深圳迈瑞生物股份有限公司
总胆固醇 (TC) 生化检测试剂盒	深圳迈瑞生物股份有限公司
高密度脂蛋白 (HDL) 生化检测试剂盒	深圳迈瑞生物股份有限公司
低密度脂蛋白 (LDL) 生化检测试剂盒	深圳迈瑞生物股份有限公司
HiScript II QRT Super Mix	南京诺唯赞生物有限公司
ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	南京诺唯赞生物有限公司
4%多聚甲醛	武汉赛维尔生物有限公司
TUNEL 检测试剂盒	武汉赛维尔生物有限公司
中性树胶	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司

试剂名称	公司
Reagents	Company
石蜡	国药集团化学试剂有限公司
EDTA 脱钙液	北京索莱宝科技有限公司
三氯甲烷	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司
苏木精&伊红染色试剂盒	武汉赛维尔生物有限公司
阿利新蓝-核固红染色试剂盒	碧云天生物技术有限公司
甲苯胺蓝染色试剂盒	北京索莱宝科技有限公司
改良番红 O-固绿软骨染色试剂盒	北京索莱宝科技有限公司

## 1.2 样品采集

本试验按照科技部《实验动物指南》进行，并经南京农业大学动物管理与利用委员会批准。采集江苏连云港某肉鸡养殖场的 4、5、6 周龄正常（Normal）肉鸡及自发性股骨头坏死（FHS 及 FHSL）肉鸡（Ross 308），记录其临床症状，并于翅下静脉采集血样，分离血清以进行生化分析及骨代谢水平检测。

将肉鸡处死后，仰卧保定，分离腹股沟处皮肤和肌肉，随后使用手术刀切开关节囊以完全暴露股骨头，观察并记录股骨头状态。根据 FHN 评分标准，将肉鸡分为正常（Normal）组、FHS 组和 FHSL 组（Durairaj et al., 2009），其中 4~6 周龄肉鸡每组分别采集 8 只以进行试验。

## 1.3 血清生化指标分析

使用迈瑞 BS-300 全自动生化分析仪测定健康肉鸡及 FHN 肉鸡血清中总蛋白（total protein, TP）、白蛋白（albumin, ALB）、丙氨酸氨基转移酶（alanine transaminase, ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase, AST）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, ALP）、钙（calcium, Ca）、磷（phosphorus, P）、甘油三酯（triglyceride, TG）、总胆固醇（total cholesterol, TC）、高密度脂蛋白（high-density lipoprotein, HDL）及低密度脂蛋白（low-density lipoprotein, LDL）的生化水平。

## 1.4 ELISA 检测

使用 ELISA 试剂盒检测血清中骨特异性碱性磷酸酶（bone alkaline phosphatase, BALP）、骨钙素（bone gla protein, BGP）、I 型胶原蛋白羧基末端肽（type I collagen carboxy-terminal peptide, CTX）和抗酒石酸磷酸酶 5b（tartrate resistant acid phosphatase,

TRACP-5b) 水平, 以反映肉鸡骨代谢水平; 检测白介素-1 $\beta$  (interleukin, IL-1 $\beta$ )、IL-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 水平反映机体炎症水平。

### 1.5 骨密度检测

使用双能 X 射线骨密度仪对肉鸡胫骨和股骨进行快速扫描, 其中高能参数设置为 80kVp/1.0mA, 低能参数设置为 55 kVp/1.25mA, 并通过 InAlyzer 1.0 图像处理系统对采集的图像进行分析以确定骨密度 (bone mineral density, BMD) 水平。

### 1.6 骨强度检测

使用骨强度仪通过三点弯曲试验测量肉鸡胫骨和股骨的骨强度。将骨骼样本置于工作平台上, 并将仪器参数设置为预加载 5 N, 垂直载荷以恒定 15 mm/min 的速率施加, 直至骨骼折断时停止测试。通过 NEXYGEN Plus 软件获得骨强度曲线, 所获曲线的最高点即为骨强度值 (N)。

### 1.7 股骨头关节软骨及肝脏组织形态学观察

经 4%多聚甲醛固定完全的股骨头关节软骨组织置于流水中冲洗过夜, 使用 10% EDTA 脱钙液对其进行脱钙处理 (2 周)。脱钙完成的软骨组织及 4%多聚甲醛固定完全的肝脏组织均在梯度乙醇中进行脱水, 脱水完成后将组织置于二甲苯中进行透明操作, 最后将其包埋于石蜡。包埋后的组织蜡块通过切片机获得厚度为 5  $\mu$ m 的切片后, 对肝脏组织切片进行苏木精和伊红 (hematoxylin & eosin, H&E) 染色, 软骨组织切片进行 H&E、阿利辛蓝、甲苯胺蓝和番红 O-固绿染色, 用于组织学观察。

#### 1.7.1 H&E 染色

将制作好的关节软骨及肝脏组织切片放入苏木精中染色 10~30 min, 染色结束后使用流水冲洗 15 min, 直至切片颜色变蓝。之后将切片放入 1%盐酸乙醇液中褪色至切片变为浅红色, 再进行流水冲洗使其恢复蓝色。将切片依次放入 50%、70%、80% 乙醇中脱水 5 min, 再使用 0.5%伊红乙醇液对比染色 1~3 min, 再将切片进行二次脱水, 然后放入二甲苯中透明, 最后使用中性树脂胶封片保存。

#### 1.7.2 阿利新蓝染色

关节软骨组织切片置于阿利新蓝酸化液中浸泡 3 min, 然后用染色液染色 30 min 后冲洗干净, 再使用核固红染色液染色 5 min, 最后使用中性树脂封片, 并使用尼康全自动正置显微观察。

### 1.7.3 甲苯胺蓝染色

关节软骨组织切片浸入 50~60°C 温箱预热的甲苯胺蓝染色液浸染 20~40 min，之后使用 95% 乙醇迅速分化 3~5 s。无水乙醇脱水、二甲苯透明，中性树胶封固后即可使用显微镜观察。

### 1.7.4 番红 O-固绿染色

关节软骨组织切片浸入新鲜配制的 Weigert 染液染色 3 min，水洗。之后浸入酸化分化液 15 s，蒸馏水洗 10 min 后，在固绿染色液中浸染 5 min，迅速使用弱酸溶液洗片 10~15 s，以除去残留固绿染液，晾干。浸入番红染色液浸染 5 min，再按照 95% 乙醇 2~3 s、无水乙醇 2~3 s 脱水，无水乙醇 1 min 脱水，最后二甲苯透明，中性树脂封固。

## 1.8 股骨头关节软骨组织总 RNA 提取与 qRT-PCR 检测

在液氮低温条件下，将保存于 -80°C 的正常肉鸡及自发性 FHN 肉鸡的股骨头组织研磨为粉末状。随后称取 50 mg 组织粉末，并加入 1 mL 的 RNA 提取液 Trizol，按照试剂说明进行操作，最终获得股骨头组织的总 RNA 样品。使用分光光度计 Nano Drop 2000 检测其浓度及纯度 ( $1.8 < A_{260}/A_{280} > 2.1$ ,  $A_{260}/A_{230} > 2.0$ )，并使用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。将质量合格的总 RNA 吸取 500 ng，并使用 Prime Script RT Master Mix Kit 试剂盒反转录为 cDNA，-20°C 保存备用。本试验所用引物由 Premier 6.0 软件设计，详见表 2-3。使用 SYBR Premix Ex Taq Kit 试剂盒在 ABI 7300 Fast Real-time PCR 系统上运行实时荧光定量 PCR (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 程序，具体操作及程序设置参照试剂盒说明书进行。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行数据分析。本试验使用持家基因 GAPDH 校正目的基因的表达。

表 2-3 目的基因引物序列

Table 2-3 Target gene primer sequence

目的基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
Target gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>mTOR</i>	AACCACTGCTCGCCACAATGC	GATCGCCACACGGATTAGCTCTTC
<i>PERK</i>	TCGAGCTGCTTTACCCTTTC	CTCATTGTCCGTGACCTCTG
<i>ATF4</i>	GAGGAGAACCAATCCGATGA	CACCTTTGCTGACGCTACCT
<i>ATF6</i>	GTCCCTTCTCCGTCCTCTG	CGCCCACAATCGGTTTC

目的基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
Target gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>IRE1-α</i>	CCCAAAGCATCAAACCATTC	CAACGTTCGCGTTATCAAAT
<i>GRP78</i>	TGCCAATGACCAGGGGAACC	GAGGGGTCATTCCAGGTGCG
<i>CHOP</i>	CAGGAAGAAGAGCTGGCCCCACT	TGCTGTGCTCGCCGTGCTGT
<i>Bcl-2</i>	CGACTGGGATGACAGGAAAG	GGAGCGCACAGGTGAGACA
<i>Caspase-3</i>	AAGGCTCCTGGTTTATTCA	TCTGCCACTCTGCGATTT
<i>Caspase-8</i>	CCTCTTGGGCATGGCTA	TGCTGCTCACCTCTTGATT
<i>Caspase-9</i>	CGAAGGAGCAAGCACGAC	CGCAGCCCTCATCTAGCAT
<i>Bid</i>	GCCTGACCCTGAGGTAAATG	ACAGGCACCGTGTTATCTCC
<i>LC3-I</i>	GCTGCCAGTGCTGGACAAGAC	TCCTCATCCTTCTCCTGCTCGTAG
<i>LC3-II</i>	CCTGGTGCCAGATCACGTCAAC	AAGCCGTCCTCGTCCTTCTCG
<i>Beclin1</i>	ACCGCAAGATTGTGGCTGAAGAC	TGAGCATAACGCATCTGGTTCTCC
<i>ATG5</i>	GGCACCGACCGATTTAGT	GCTGATGGGTTTGCTTTT
<i>Akt</i>	GGCTACAAGGAACGACCGCAAG	TACTGTGGTCCACTGGAGGCATC
<i>mTOR</i>	AACCACTGCTCGCCACAATGC	GATCGCCACACGGATTAGCTCTTC
<i>Collagen-2</i>	ACCTACAGCGTCTTGGAGGA	ATATCCACGCCAAACTCCTG
<i>Collagen-10</i>	GCCTTCCAGGTCAGCCAGGTAT	TTGCCGATGCCAACTTCTCCAG
<i>Aggrecan</i>	TGCAAGGCAAAGTCTTCTACG	GGCAGGGTTCAGGTAAACG
<i>HIF-1α</i>	CAGCCAGGTGCCGAAGAAGC	ATGGTCAGCCTCATAATGGATGCC
<i>HIF-2α</i>	CTGTTGACGATGAGCAGTGCCT	CCAGGTGTTGGAGCCAGTTGTG
<i>Nrf-2</i>	CTGCTAGTGGATGGCGAGAC	CTCCGAGTTCTCCCCGAAAG
<i>Keap-1</i>	ACTTCGCTGAGGTCTCCAAG	CAGTCGTACTIONGCACCCAGTT
<i>HO-1</i>	AGCTTCGCACAAGGAGTGTT	GGAGAGGTGGTCAGCATGTC
<i>NQO-1</i>	CTCCGAGTGCTTTGTCTACGA	ATGGCTGGCATCTCAAACC
<i>CAT</i>	GTTGGCGGTAGGAGTCTGGTCT	GTGGTCAAGGCATCTGGCTTCTG

目的基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
Target gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>SOD-1</i>	TTGTCTGATGGAGATCATGGCTTC	TGCTTGCCTTCAGGATTAAGTGAG
<i>SOD-2</i>	CAGATAGCAGCCTGTGCAAATCA	GCATGTTCCCATACATCGATTCC
<i>SOD-3</i>	TTTTCTCCTAAAGATGGCAAG	CTTCCTGCTCATGGATCACAA
<i>GSH-Px1</i>	TCACCATGTTTCGAGAAGTGC	ATGTACTGCGGGTTGGTCAT
<i>GSH-Px2</i>	AGGGGGAGAAGGTGGACTT	TCCTGGTAGCCGAACTGGT
<i>GSH-Px7</i>	TTGCAATTACAGCACTCCTGCTC	TGCAACGTTGACAACCTAACGACA
<i>GAPDH</i>	GAACATCATCCCAGCGTCCA	CGGCAGGTCAGGTCAACAAC

## 1.9 TUNEL 染色

根据 TUNEL 染色试剂盒说明书处理关节软骨组织切片, 试验过程中应注意避光, 防止荧光淬灭。染色后用正置荧光显微镜观察, 并使用 Image J 软件进行数据分析, 计算细胞凋亡率。

## 1.10 数据统计分析

使用 SPSS 25.0 软件进行数据分析, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 比较分析正常肉鸡和自发性股骨头坏死(FHS 及 FHSL)肉鸡之间的差异, 其中 FHS/FHSL 组较正常组差异显著即记为 FHN 肉鸡相关指标发生显著变化。所有数据以均值±标准差 (mean±SD) 表示, 使用 Graphpad Prism 7.0 绘制图表。对于所有分析, \* $P < 0.05$  表示差异显著, \*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 FHN 肉鸡的临床表现

本研究观察并记录了自发性 FHN 肉鸡的临床症状。正常肉鸡下肢健康(图 2-1A), 而 FHN 肉鸡则处于蹲卧状态(图 2-1B), 部分可发展为单侧偏瘫甚至双侧瘫痪(图 2-1C~E)。跛行的肉鸡由于难以获得食物和水, 常被人工淘汰或自身脱水而亡。根据 FHN 评分标准对采集到的股骨头进行评分 (Durairaj et al., 2009)。如图 2-1G~H 所示, 股骨头关节软骨与下层生长板分离, 但生长板未出现明显病变, 命名为 FHS, 如生长板受损, 甚至骨骺断裂, 则命名为 FHSL (图 2-1I~J), 其中 FHS 及 FHSL 统称为 FHN。

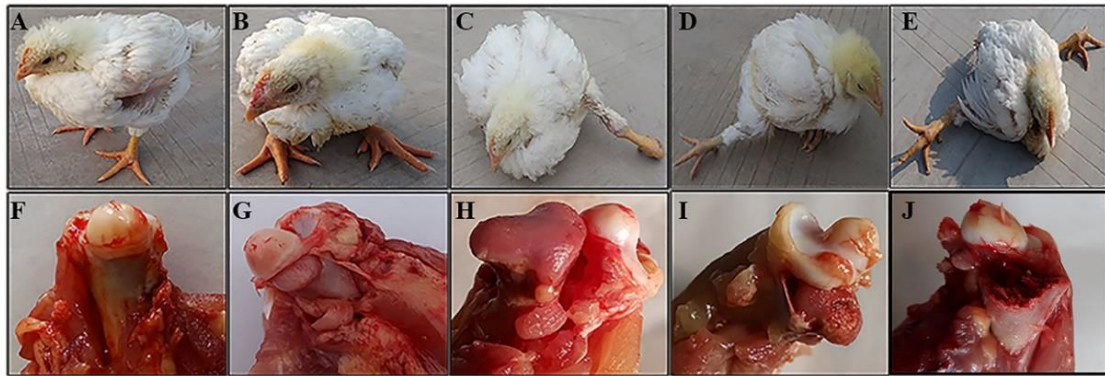


图 2-1 4 周龄 FHN 肉鸡的临床及解剖学特征

Fig. 2-1 Clinical and anatomical manifestations of FHN broilers at 4 weeks of age

A. 正常肉鸡; B. 蹲卧肉鸡; C. 左侧偏瘫肉鸡; D. 右侧偏瘫肉鸡; E. 双侧瘫痪肉鸡; F. 正常股骨头; G. 股骨头关节软骨与生长板不完全分离; H. 股骨头关节软骨与生长板完全分离; I. 生长板受损; J. 骨骺断裂。

A. Normal broiler; B. Crouching broiler; C. Left hemiplegic broiler; D. Right hemiplegic broiler; E. Bilateral paralyzed broiler; F. Normal femoral head; G. Femoral head Incomplete separation of articular cartilage and growth plate; H. Complete separation of the articular cartilage of the femoral head from the growth plate; I. Damage to the growth plate; J. Fracture of the epiphysis.

## 2.2 FHN 肉鸡的血清生化学指标变化

检测 4、5、6 周龄的正常、FHS 及 FHSL 肉鸡血清生化学指标，结果显示 6 周龄 FHS 组肉鸡血清中 ALP、P 及 Ca（图 2-2E~G）水平较正常肉鸡显著下降（ $P<0.05$ ），且 ALP 水平在 4、5 周龄 FHS/FHSL 组肉鸡均发生显著降低（图 2-2E， $P<0.05$ ），而肝功能相关指标 ALT 及 AST 的含量在 6 周龄 FHSL 组中显著升高（图 2-2B~C， $P<0.05$ ），提示 FHN 肉鸡（FHS 及 FHSL）发生骨代谢水平下降及肝脏实质受损。

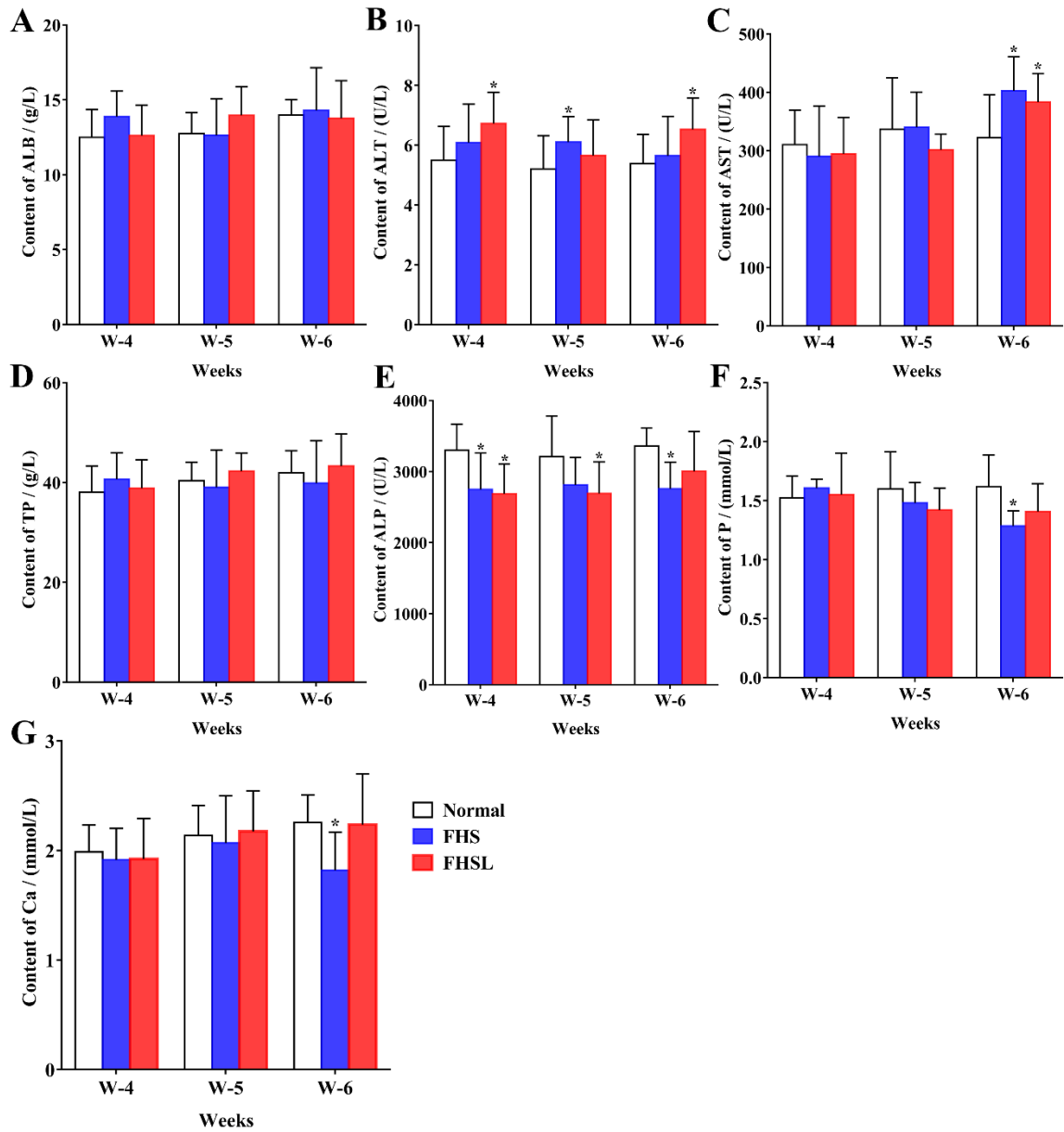


图 2-2 4~6 周龄 FHN 肉鸡和正常肉鸡的血清生化指标变化

Fig. 2-2 Changes in serum biochemical indices of FHN and normal broilers from 4 to 6 weeks of age

A. 血清中 ALB 水平; B. 血清中 ALT 水平; C. 血清中 AST 水平; D. 血清中 TP 水平; E. 血清中 ALP 水平; F. 血清中 P 水平; G. 血清中 Ca 水平。所有结果以 mean±SD 表示 (n=8)。与对照组相比, \*P<0.05 表示差异显著。

A. Serum level of ALB ; B. Serum level of ALT; C. Serum level of AST; D. Serum level of TP; E. Serum level of ALP; F. Serum level of P; G. Serum level of Ca. Data were presented as mean±SD (n=8). \*P<0.05, compared with control.

### 2.3 FHN 肉鸡的肝脏形态、血脂水平及血清促炎因子变化

本试验评估了肝脏组织形态和脂质代谢情况，以确定肝脏和脂质代谢是否发生变化。结果如图 2-3 所示，FHS 及 FHSL 肉鸡的肝脏组织中肝索结构紊乱，出现大量脂肪空泡，并且 4 周龄 FHS 肉鸡血清中 HDL 水平较正常肉鸡显著降低 ( $P<0.05$ )，TG 及促炎因子 IL-6 水平显著升高 ( $P<0.05$ )，提示 FHN 肉鸡的肝脏实质受损，且 FHN 的发生发展可能与脂质代谢紊乱有关。

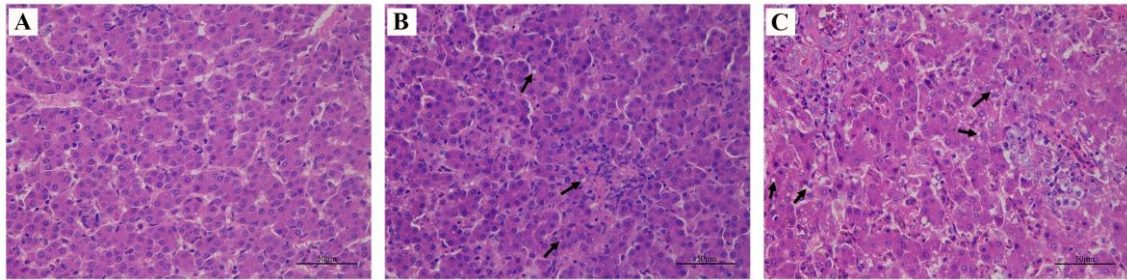


图 2-3 正常、FHS 及 FHSL 肉鸡的肝脏组织形态学

Fig. 2-3 Histomorphology of the liver in normal, FHS and FHSL broilers

6 周龄正常 (A)、FHS (B) 和 FHSL (C) 肉鸡的肝脏 H&E 染色。比例尺：50  $\mu\text{m}$ 。箭头所指的区域为脂肪空泡。  
H&E staining of the liver from 6-week-old normal (A), FHS (B) and FHSL (C) broilers. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ . The area where the arrow points are fat vacuoles.

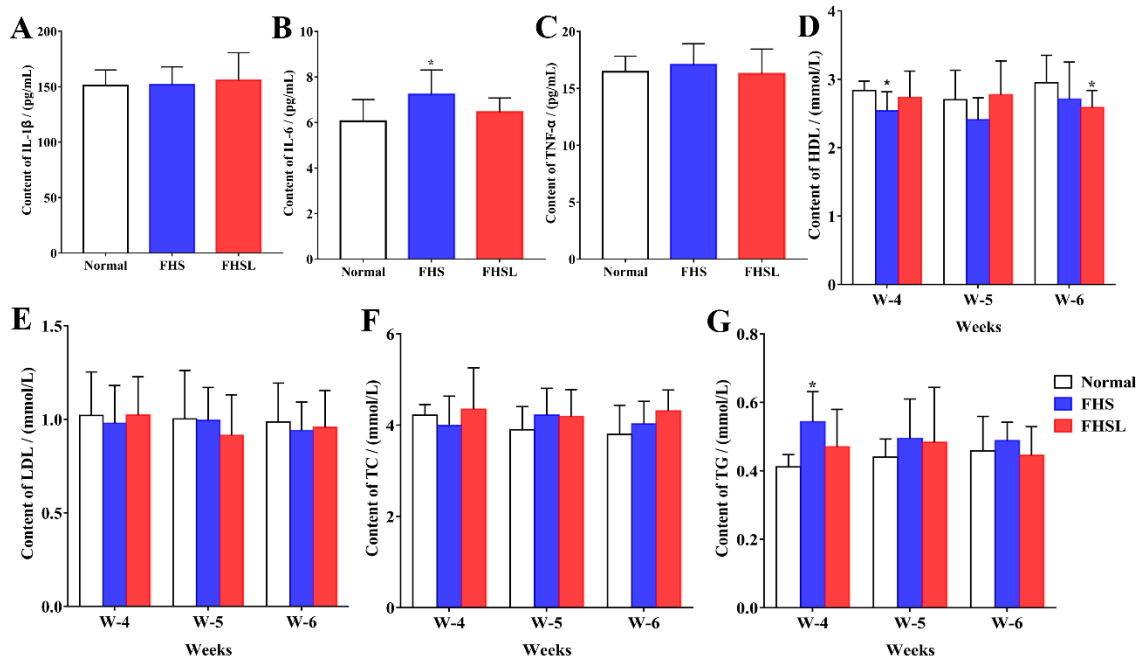


图 2-4 4~6 周龄 FHN 肉鸡及正常肉鸡的血脂水平和促炎因子水平变化

Fig. 2-4 Changes in the levels of serum lipid and pro-inflammatory factors in FHN and normal broilers from 4 to 6 weeks of age

6 周龄肉鸡肝脏中促炎因子 IL-1β (A)、IL-6 (B) 和 TNF-α (C) 的水平; D. 血清中 HDL 含量; E. 血清中 LDL 含量; F. 血清中 TC 含量; G. 血清中 TG 含量。所有结果以 mean±SD 表示 (n=8)。与对照组相比, \*P<0.05 表示差异显著。

Levels of IL-1β (A), IL-6 (B) and TNF-α (C) in liver of 6-week-old broilers. D. The content of HDL in serum; E. The content of LDL in serum; F. The content of TC in serum; G. The content of TG in serum. Data were presented as mean±SD (n=8). \*P<0.05, compared with control.

## 2.4 FHN 肉鸡的骨参数及骨代谢标志物水平变化

为明确 FHN 肉鸡长骨(胫骨和股骨)的骨参数变化,本试验检测了 4、5、6 周龄正常、FHS 及 FHSL 肉鸡长骨的骨长(图 2-5A, E)、骨指数(图 2-5B, F)、BMD(图 2-5C, G)和骨强度(图 2-5D, H)。BMD 及骨强度检测结果显示,与正常肉鸡相比, FHN 肉鸡的胫骨(图 2-5C-D)和股骨(图 2-5G-H)的 BMD 和骨强度发生显著变化 ( $P<0.05$ ),提示 FHN 影响了肉鸡长骨的 BMD 和骨强度。同时,骨代谢关键标志物 BGP(图 2-6C)和 BALP(图 2-6D)的水平显著降低 ( $P<0.05$ ),且血清中 ALP、Ca 及 P 水平也发生显著下降(图 2-2,  $P<0.05$ ),提示 FHN 肉鸡骨形成受阻。

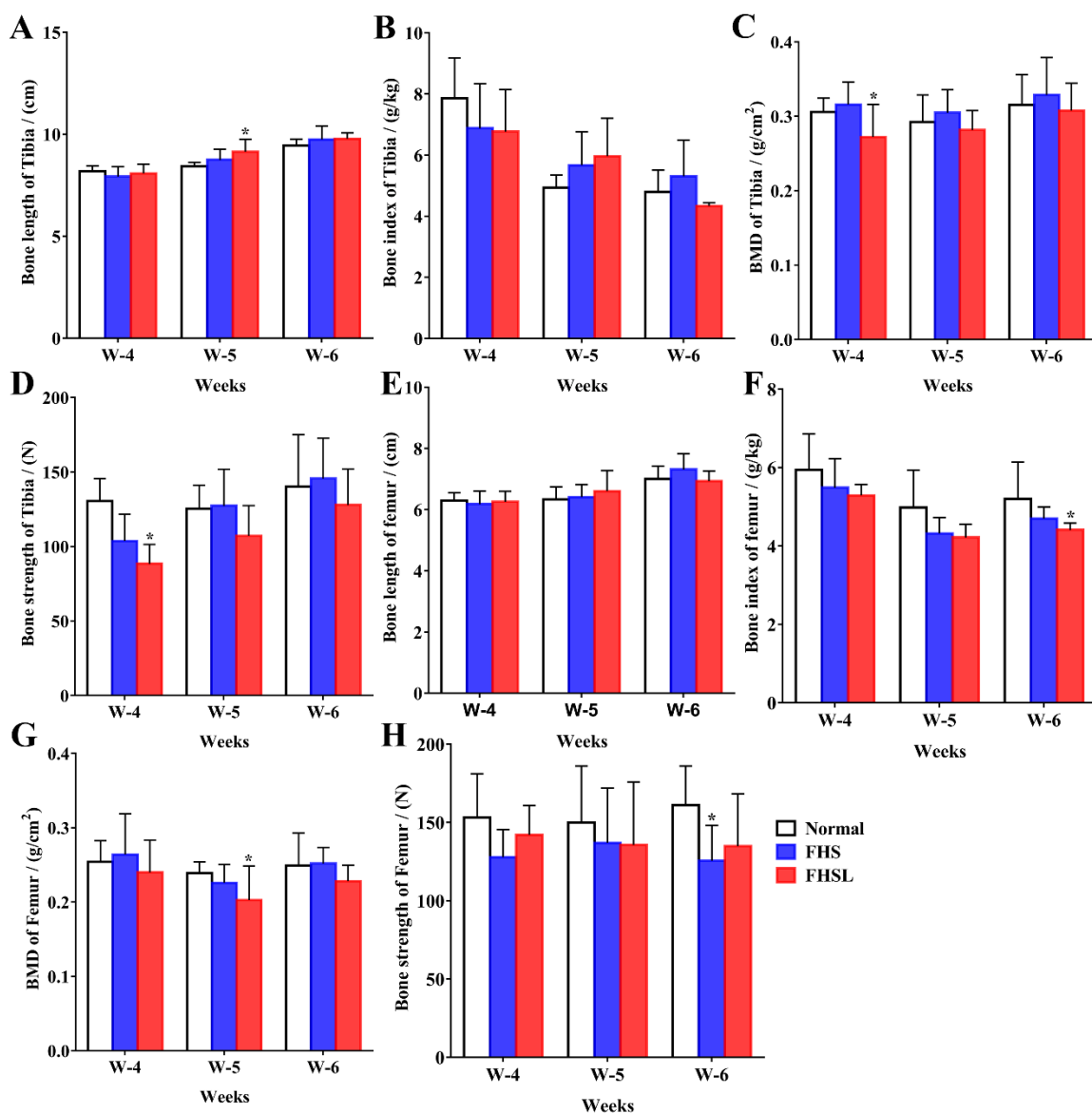


图 2-5 4~6 周龄 FHN 肉鸡及正常肉鸡胫骨和股骨的骨参数水平变化

Fig. 2-5 Changes in the levels of bone parameters in the tibia and femur of FHN and normal broilers from 4 to 6 weeks of age

A. 胫骨长度; B. 胫骨的骨指数; C. 胫骨的 BMD; D. 胫骨的骨强度; E. 股骨长度; F. 股骨的骨指数; G. 股骨的 BMD; H. 股骨的骨强度。所有结果以 mean±SD 表示 (n=8)。与对照组相比, \* $P < 0.05$  表示差异显著。

A. Bone length of tibia; B. Bone index of the tibia; C. BMD of the tibia; D. Bone strength of tibia; E. Bone length of the femur; F. Bone index of the femur; G. BMD of the femur; H. Bone strength of femur. Data were presented as mean±SD (n=8). \* $P < 0.05$ , compared with control.

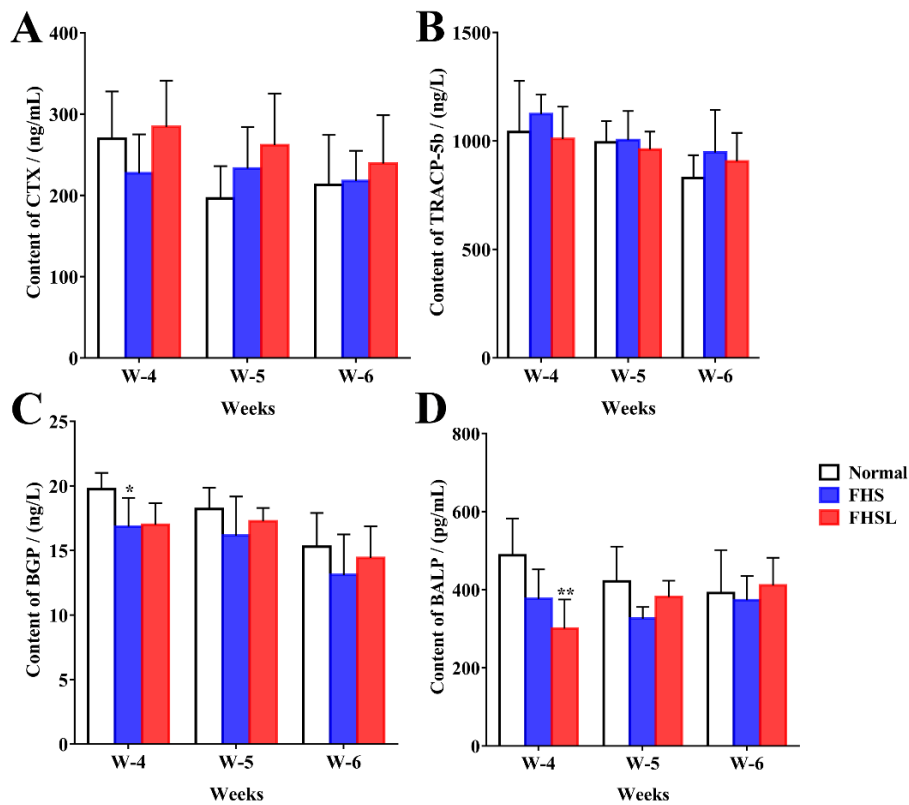


图 2-6 4~6 周龄 FHN 肉鸡和正常肉鸡血清中骨代谢标志物水平变化

Fig. 2-6 Changes of serum bone metabolism markers in FHN and normal broilers from 4 to 6 weeks of age

A. 血清中 CTX 含量; B. 血清中 TRACP-5b 含量; C. 血清中 BGP 含量; D. 血清中 BALP 含量。所有结果以 mean±SD 表示 (n=8)。与对照组相比, \* $P<0.05$  表示差异显著, \*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

A. Content of CTX in serum; B. Content of TRACP-5b in serum; C. Content of BGP in serum; D. Content of BALP in serum. Data were presented as mean±SD (n=8). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with control.

## 2.5 FHN 肉鸡股骨头关节软骨稳态变化

软骨细胞是股骨头关节软骨中唯一的细胞成分, 并参与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 合成。而软骨稳态需要 ECM 的充分合成, 以实现其生物力学功能。Aggrecan 和 II 型胶原 (Col-2) 是软骨细胞的特异性标记物。本试验中 FHS 肉鸡的 Aggrecan 的 mRNA 水平显著低于正常肉鸡 ( $P<0.05$ ), Col-2 的 mRNA 水平也极显著降低 ( $P<0.01$ )。FHSL 肉鸡软骨组织中 Col-2 的 mRNA 水平也显著下降 ( $P<0.05$ )。同时, FHS 组与 FHSL 组中 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-2 $\alpha$  的 mRNA 水平较正常肉鸡显著上调 (图 2-8,  $P<0.05$ ), 提示 FHN 肉鸡 (FHS 及 FHSL) 的股骨头关节软骨稳态失衡。此外, 软骨组织形态学结果 (图 2-7) 显示软骨基质被破坏。

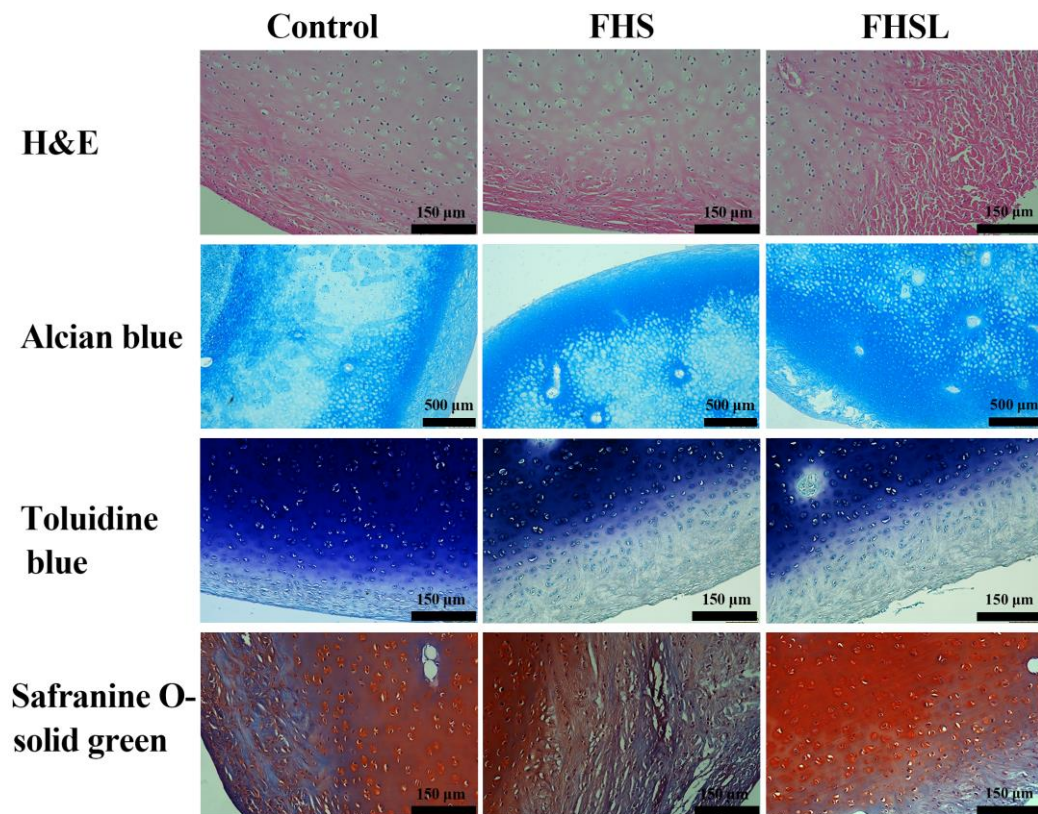


图 2-7 FHN 肉鸡和正常肉鸡股骨头关节软骨组织学检查

Fig. 2-7 Histological examination of articular cartilage of the femoral head in FHN and normal broilers

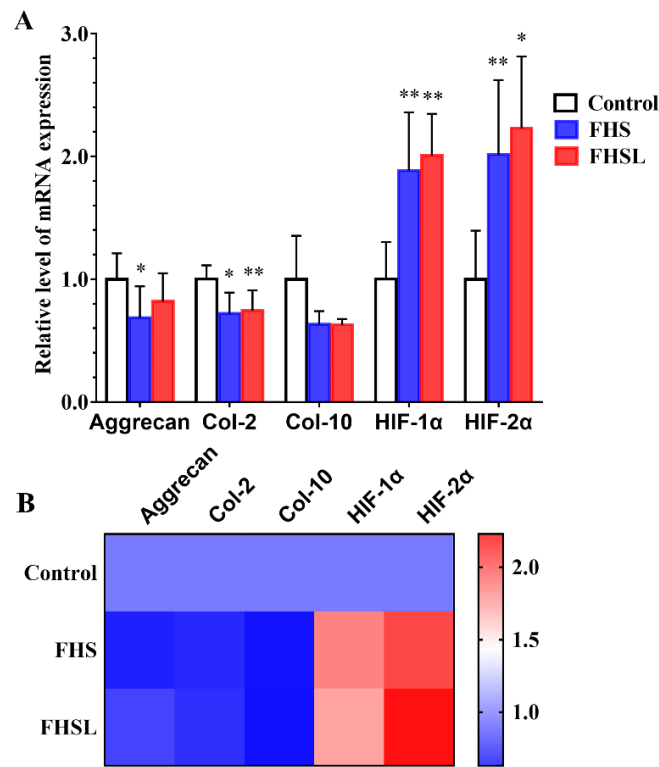


图 2-8 FHN 肉鸡和正常肉鸡的股骨头关节软骨稳态相关基因表达水平的变化

Fig. 2-8 Changes in the expression levels of genes related to femoral articular cartilage homeostasis in FHN and normal broilers

A. 软骨稳态相关基因的 mRNA 水平; B. 软骨稳态相关基因 mRNA 水平的热图。所有结果以 mean±SD 表示(n=8)。与对照组相比, \* $P<0.05$  表示差异显著, \*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

A. The mRNA level of genes related to cartilage homeostasis; B. Heatmap of cartilage homeostasis-related genes mRNA level. Data were presented as mean±SD (n=8). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with control.

## 2.6 FHN 肉鸡的股骨头关节软骨中内质网应激相关基因表达水平变化

内质网应激可以增加软骨细胞中 GRP78/BiP 的表达,并通过三种经典途径(PERK、ATF-6、IRE1- $\alpha$ )调节内质网中未折叠蛋白反应。在本研究中(图 2-9),与对照组相比, FHSL 组中 PERK 和 ATF-6 的 mRNA 水平显著升高( $P<0.05$ ), IRE1- $\alpha$  的 mRNA 水平极显著升高( $P<0.01$ ); FHS 组的 IRE1- $\alpha$  和 GRP78/Bip 的 mRNA 水平极显著升高( $P<0.01$ )。此外,相关研究表明,内质网应激可通过 PERK-ATF4-CHOP 途径调节细胞凋亡,而 FHS 组和 FHSL 组 CHOP 的 mRNA 水平较对照组显著升高(图 2-9,  $P<0.05$ ),提示软骨可能发生细胞凋亡。因此,本试验接下来检测了自噬和细胞凋亡相关的指标。

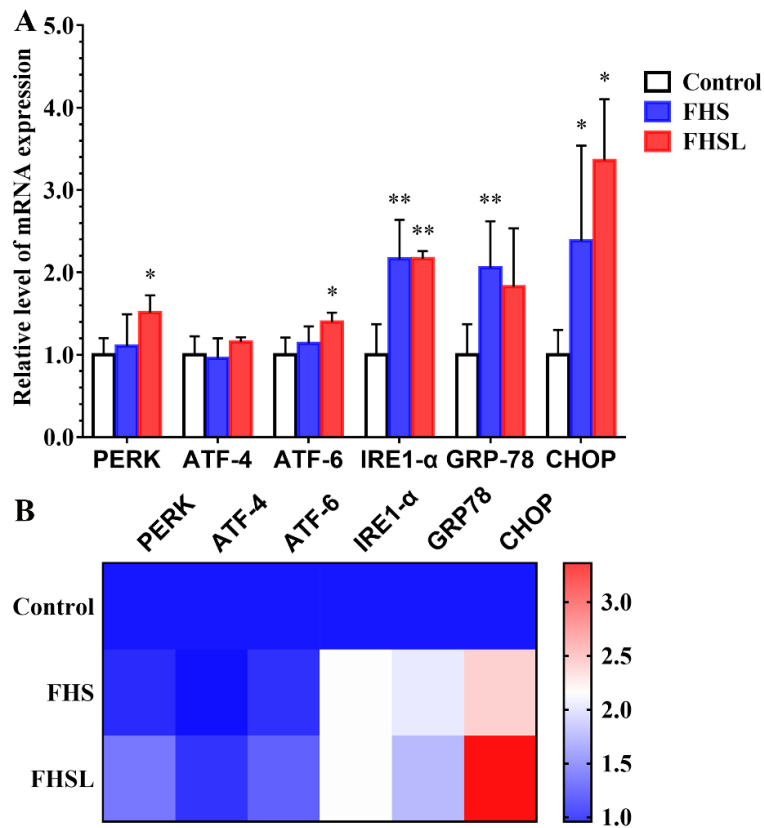


图 2-9 FHN 肉鸡和正常肉鸡的股骨头关节软骨中内质网应激相关基因的 mRNA 水平变化

Fig. 2-9 Changes in mRNA levels of endoplasmic reticulum stress-related genes in femoral articular cartilage of FHN and normal broilers

A. 内质网应激相关基因的 mRNA 水平; B. 内质网应激相关基因 mRNA 水平的热图。所有结果以 mean±SD 表示 (n=8)。与对照组相比, \* $P<0.05$  表示差异显著, \*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

A. Endoplasmic reticulum stress-related genes level of mRNA expression. (B) Heatmap of ER stress related genes mRNA level. Data were presented as mean±SD (n=8). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with control.

## 2.7 FHN 肉鸡的股骨头关节软骨中细胞自噬相关基因表达水平变化

如图 2-10 所示, FHSL 组中自噬相关基因 LC3-II/I 和 Atg-5 的 mRNA 水平显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 而 Beclin1 的 mRNA 水平虽无显著变化 ( $P>0.05$ ), 但呈上升趋势, 提示自发性 FHN 肉鸡的股骨头关节软骨细胞发生自噬。

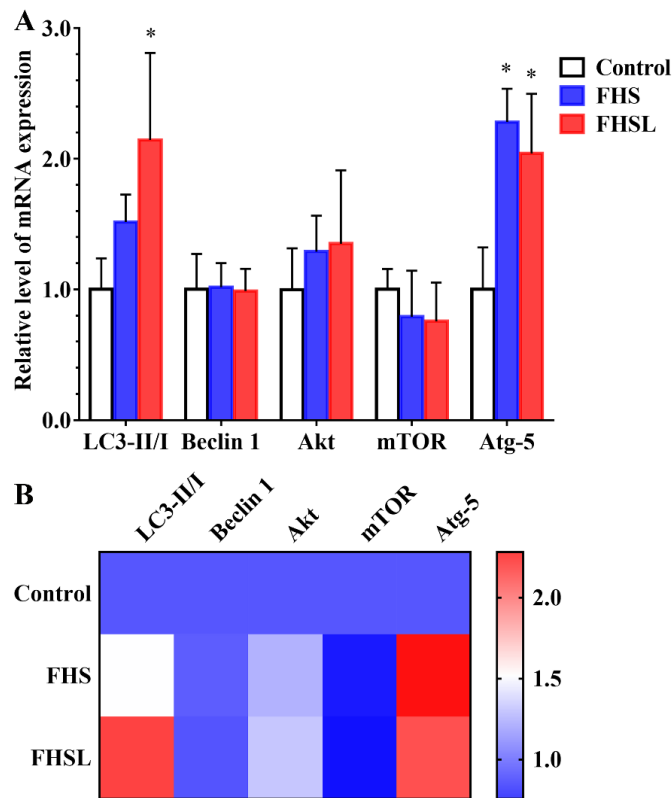


图 2-10 FHN 肉鸡和正常肉鸡的关节软骨中自噬相关基因的 mRNA 水平变化

Fig. 2-10 Changes in mRNA levels of autophagy-related genes in articular cartilage of FHN and normal broilers

A. 自噬相关基因的 mRNA 水平; B. 自噬相关基因 mRNA 水平的热图。所有结果以 mean±SD 表示 (n=8)。与对照组相比, \* $P<0.05$  表示差异显著, \*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

A. Autophagy-related genes level of mRNA expression; B. Heatmap of autophagy related genes mRNA level. Data were presented as mean±SD (n=8). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with control.

## 2.8 FHN 肉鸡的股骨头关节软骨中细胞凋亡水平变化

图 2-11 显示了关节软骨组织中凋亡相关基因 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 和 Bcl-2 同源相互作用结构域死亡激动剂 (Bcl-2 homology interacting-domain death agonist, Bid) 的基因水平变化。与对照组相比, FHSL 组的抗凋亡基因 Bcl-2 的 mRNA 水平极显著下降 ( $P<0.01$ )。此外, 与对照组相比, FHS 组中 Bcl-2 和 Caspase-9 的 mRNA 水平显著增加 ( $P<0.05$ ), Bid 的 mRNA 水平极显著增加 ( $P<0.01$ )。同时 FHS 组及 FHSL 组的 TUNEL 染色结果显示, FHN 肉鸡的凋亡率显著高于正常肉鸡 (图 2-12,  $P<0.05$ ), 这提示自发性 FHN 肉鸡的股骨头关节软骨细胞发生了凋亡。

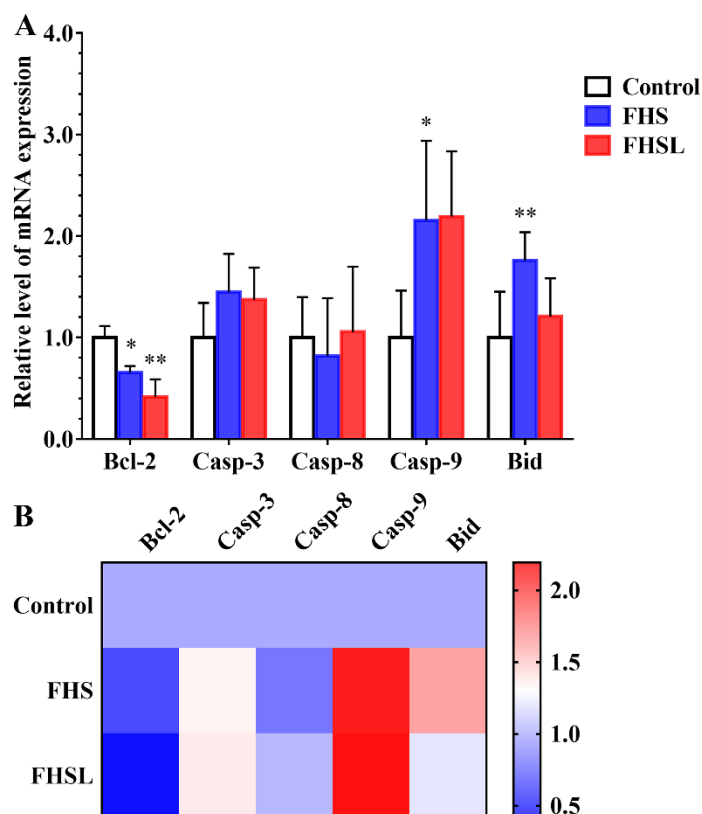


图 2-11 FHN 肉鸡和正常肉鸡的股骨头关节软骨中凋亡相关基因的 mRNA 水平变化

Fig. 2-11 Changes in mRNA levels of apoptosis-related genes in femoral articular cartilage of FHN and normal broilers

A. 细胞凋亡相关基因的 mRNA 水平; B. 细胞凋亡相关基因 mRNA 水平的热图。所有结果以 mean±SD 表示(n=8)。

\* $P < 0.05$  表示差异显著, \*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。

A. Apoptosis-related genes level of mRNA expression. B. Heatmap of apoptosis related genes mRNA level. Data were presented as mean±SD (n=8). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with control.

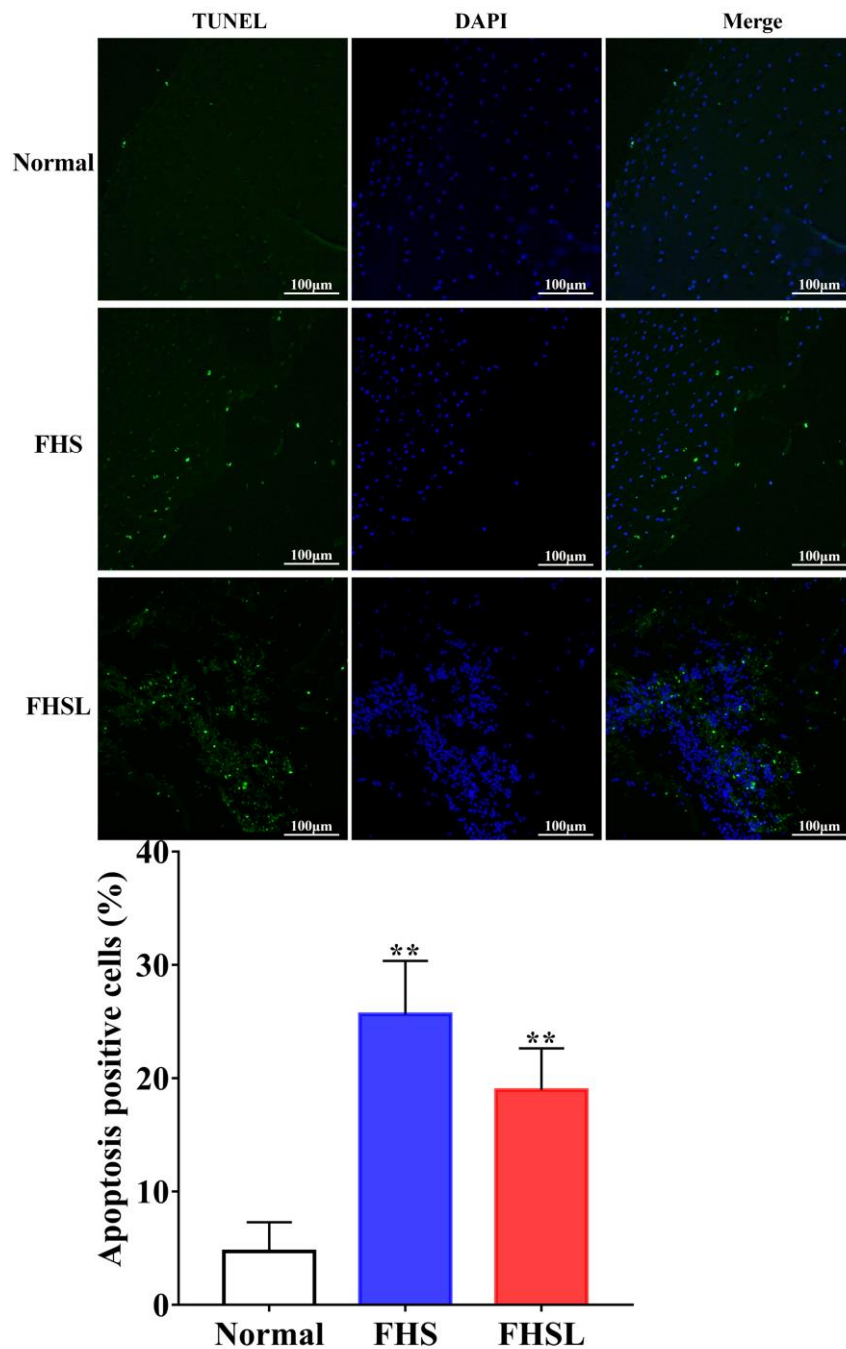


图 2-12 FHN 肉鸡及正常肉鸡股骨头关节软骨 TUNEL 染色及凋亡细胞阳性率

Fig. 2-12 TUNEL staining and positive rate of apoptotic cells in FHN and normal broiler femoral head articular cartilage

所有结果以 mean±SD 表示 (n=8)。\* $P < 0.05$  表示差异显著, \*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。比例尺: 100  $\mu\text{m}$ 。

Data were presented as mean±SD (n=8). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared with control. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

## 2.9 FHN 肉鸡关节软骨抗氧化水平变化

相关研究表明, PERK 能够通过激活 Nrf-2 途径调节机体的抗氧化水平。因此, 本研究对氧化应激的相关指标进行了测定。抗氧化相关基因检测结果(图 2-13)显示, 与对照组相比, FHS 组中 Nrf-2 和 NQO-1 的 mRNA 水平显著增加 ( $P<0.05$ ), HO-1 的水平也极显著增加 ( $P<0.01$ ); FHSL 组中 Nrf-2 和 HO-1 的 mRNA 水平显著增加 ( $P<0.05$ )。同时, FHSL 组的 CAT 和 GSH-Px7 的水平也显著增加 ( $P<0.05$ )。此外, FHS 和 FHSL 组的 GSH-Px1 的 mRNA 水平也有极显著提高 ( $P<0.01$ )。抗氧化基因的检测结果说明自发性 FHN 肉鸡发生了氧化应激, 从而激活机体抗氧化系统, 提高抗氧化水平。

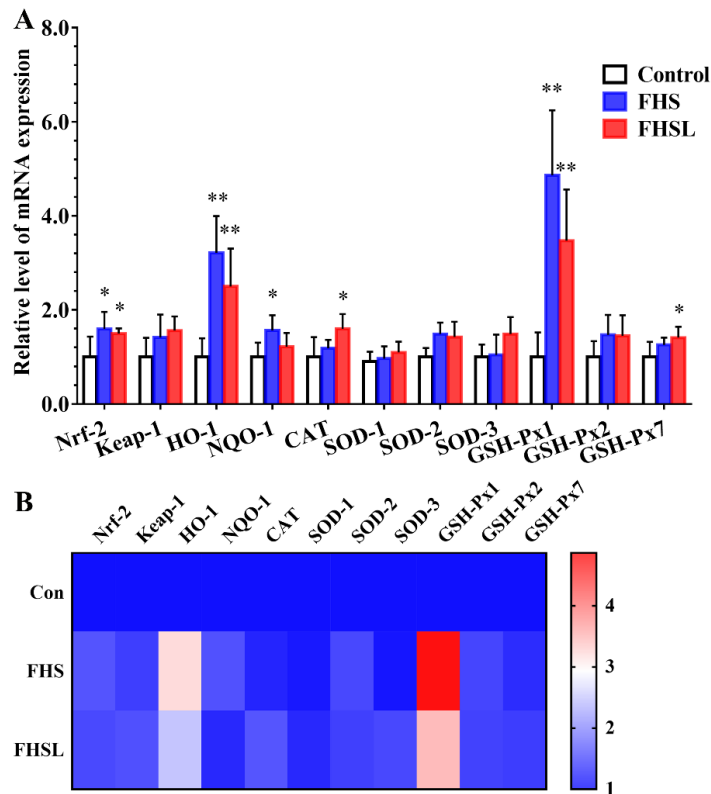


图 2-13 FHN 肉鸡和正常肉鸡关节软骨中抗氧化相关基因的 mRNA 水平变化

Fig. 2-13 Changes in mRNA levels of antioxidant-related genes in articular cartilage of spontaneous FHN and normal broilers

A. 抗氧化相关基因的 mRNA 水平; B. 抗氧化相关基因 mRNA 水平的热图。所有结果以  $\text{mean}\pm\text{SD}$  表示 ( $n=8$ )。与对照组相比,  $*P<0.05$  表示差异显著,  $**P<0.01$  表示差异极显著。

A. Antioxidant-related genes level of mRNA expression. B. Heatmap of oxidative stress related genes mRNA level. Data were presented as  $\text{mean}\pm\text{SD}$  ( $n=8$ ).  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , compared with control.

### 3 讨论

FHN 是导致肉鸡跛行的主要腿病之一 (Dinev et al., 2019; Kincaid, 1993; McNamee et al., 1998; Mcnamee et al., 1999), 严重影响肉鸡生产性能及动物福利, 为肉鸡养殖业带来巨大经济损失。肉鸡 FHN 的研究常采用糖皮质激素 (甲泼尼龙, MP) 建立动物模型 (Yu et al., 2020; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2019), 而本试验采集自发性 FHN 肉鸡的样本, 检测了 4~6 周龄 FHN 肉鸡的骨骼、血清及肝脏样本相关指标。本研究发现 FHN 肉鸡血清中 ALT 和 AST 水平显著高于正常肉鸡, 提示 FHN 肉鸡的肝实质受损。IL-1 $\beta$  是一种典型的炎症因子, 可以促进炎症反应, 也反映了细胞损伤和炎症的程度 (He et al., 2019; Libby, 2017; Szekely et al., 2018)。IL-6 和 TNF- $\alpha$  是临床常用的炎症标志物 (Lu et al., 2019; Wang et al., 2020)。Wang 等人曾报道, IL-6 作为早期炎性因子, 可以促进其他炎性因子的分泌 (Wang et al., 2015)。在本研究中, FHN 肉鸡的炎性因子水平均显著升高, 表明 FHN 肉鸡发生了系统性炎症。

研究表明, 脂质代谢异常与腿病发生密切相关 (Packialakshmi et al., 2015; Packialakshmi et al., 2016; Wang et al., 2018)。Guo 等人认为, 腿病与生长、骨量、骨结构和脂质代谢受损有关 (Guo et al., 2019)。Packialakshmi 等人发现体重和血脂的变化可以作为 FHN 的非侵入性的生物学指标 (Packialakshmi et al., 2015; Packialakshmi et al., 2016)。本研究结果显示, FHN 肉鸡 HDL 含量显著下降, TG 水平显著上调, 肝脏组织中的脂滴堆积, 提示 FHN 肉鸡的脂质代谢处于紊乱状态, 这与相关的研究结果一致。

骨代谢的血清学标志物包括骨形成和骨吸收的标志物。BGP 和 BALP 是典型的骨形成标志物。BGP 参与调节骨形成, 参与基质的矿化过程和成骨细胞的分化, 能够维持骨的正常矿化速率, 抑制软骨的矿化速率 (Chopin et al., 2012; Niimi et al., 2014)。BALP 参与骨形成的过程, 在血清中稳定, 是骨形成标志物之一 (Galliera et al., 2012; Sarvari et al., 2015)。BALP 的水平反映了骨组织中的骨形成率 (Sarvari et al., 2015), 可以用于评估骨生长和骨转移的程度 (Heidenreich et al., 2019; Schindler et al., 2008)。在本研究中, FHN 肉鸡的 BGP 和 BALP 的水平与正常肉鸡相比显著下降, 表明 FHN 肉鸡的骨形成能力明显降低。TRACP-5b 主要来源于破骨细胞, 是一种特异性的、高度敏感的骨吸收指标 (Morisawa et al., 2017; Wu et al., 2017)。CTX 的水平反映了破骨细胞的骨吸收活性, 也是反映骨吸收的重要骨代谢指标 (Jung et al., 2004; Zhao et al., 2011)。虽然 TRACP-5b 和 CTX 的改变没有显著变化, 但与正常肉鸡相比仍呈上升趋势, 且 FHN 肉鸡的 P 和 Ca 水平明显低于正常肉鸡。骨代谢指标说明 FHN 肉鸡的骨形成能力下降且骨吸收增加, 导致骨代谢失衡, 形成骨的能力下降, 进而导致骨的各

类生物力学指标下降。

相关研究报道, 软骨内稳态的失衡可能在肉鸡 FHN 的发生和发展中起重要作用 (Yu et al., 2020; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2019)。关节软骨中细胞外基质 (ECM) 的主要成分是 II 型胶原和蛋白聚糖 (Aggrecan), 由软骨细胞合成和分泌 (Qi et al., 2000), 因此软骨细胞的死亡与软骨的破坏有关 (Lires-Deán et al., 2008; Mobasheri, 2002; Tang et al., 2017)。II 型胶原是非增殖性软骨细胞的典型标志 (Mendler et al., 1989)。Aggrecan 提供渗透阻力, 使软骨能够抵御外部压力 (McDevitt, 1973)。ECM 的表达决定了细胞的生理功能是否异常 (McDevitt, 1973; Mendler et al., 1989)。Yu 等人报道, MP 可以促进分解代谢因子的水平, 并抑制了合成代谢因子, 这破坏了 ECM 稳态, 进而诱导肉鸡 FHN 的发生发展 (Yu et al., 2020)。糖皮质激素处理还影响了关节软骨细胞的增殖、分化、内质网应激和凋亡等生命活动 (Li et al., 2015; Yu et al., 2020; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2019)。本研究结果表明, FHN 肉鸡 II 型胶原和蛋白聚糖的表达显著下降, 表明细胞的分泌活动受到严重破坏, 这一发现与 Zhang 等人的研究结果一致 (Zhang et al., 2019)。

内质网应激也与 FHN 的发生有关 (Hurtado et al., 2019; Tao et al., 2017)。Sato 等报道, 糖皮质激素诱导的成骨细胞/骨细胞凋亡是由内质网应激和 ROS 介导的 (Sato et al., 2015)。Gao 等发现糖皮质激素上调了内质网应激相关蛋白的表达, 表明内质网应激在 FHN 的发生中起重要作用, 这与本试验中自发性 FHN 肉鸡的结果一致 (Gao et al., 2020)。然而, ATF-4 的 mRNA 水平并没有明显增加, 这可能是由于 ATF-4 和 Nrf-2 的结合, 激活了抗氧化机制有关 (Brewer, 2014)。Nrf-2 是一个典型的抗氧化调节器, Nrf-2/ARE 途径在体内的抗氧化防御中起着重要作用 (Ma, 2013; Suzuki et al., 2013)。氧化应激发生时, Nrf-2 被激活并从细胞质进入细胞核, 增加抗氧化酶的转录水平, 如 SOD、GSH-Px 和 CAT (Afshari-Kaveh et al., 2021), 这与本试验结果一致。

自噬是具有适应功能的自我降解过程 (Lee et al., 2015), 是一种细胞保护机制 (Zhou et al., 2020)。Zhang 等人发现, 间充质干细胞在缺氧和无血清条件下可以通过提高自噬水平来促进其生存 (Zhang et al., 2012)。本研究发现 LC3-II/I 和 Atg-5 的 mRNA 明显高于正常肉鸡, 表明自噬被激活。

当内质网应激持续时间或程度达到包括自噬在内的细胞适应极限时, 细胞程序性死亡被激活。长期应激条件下, CHOP 通过激活 BIM 和死亡受体 5, 并减少 Bcl-2 抗凋亡蛋白来启动凋亡反应 (McCullough et al., 2001; Puthalakath et al., 2007; Zou et al., 2008)。Caspase-8 是外源性凋亡途径的主要启动者 (Mandal et al., 2020)。Procaspase-8 通过死亡诱导信号复合物中的两个裂解事件被激活 (Chang et al., 2003)。被激活的 Caspase-8 将促凋亡的 Bid 裂解为截短的 Bid (tBid), 它促进细胞凋亡体的形成并激活

Caspase-9，随后激活 Caspase-3 (Baliga et al., 2003)。与正常肉鸡相比，FHN 肉鸡抗凋亡蛋白 Bcl-2 的 mRNA 水平明显下降，而 Caspase-9 和 Bid 的 mRNA 水平则明显上升，同时 TUNEL 结果也显示软骨组织发生细胞凋亡。

本研究结果表明，自发性 FHN 肉鸡出现了肝实质损伤、骨代谢标志物及血脂水平异常、软骨细胞异常凋亡表现，而这与股骨头组织中细胞发生内质网应激，自噬及 PERK 激活 Nrf-2/ARE 氧化应激信号途径有关 (图 2-14)。

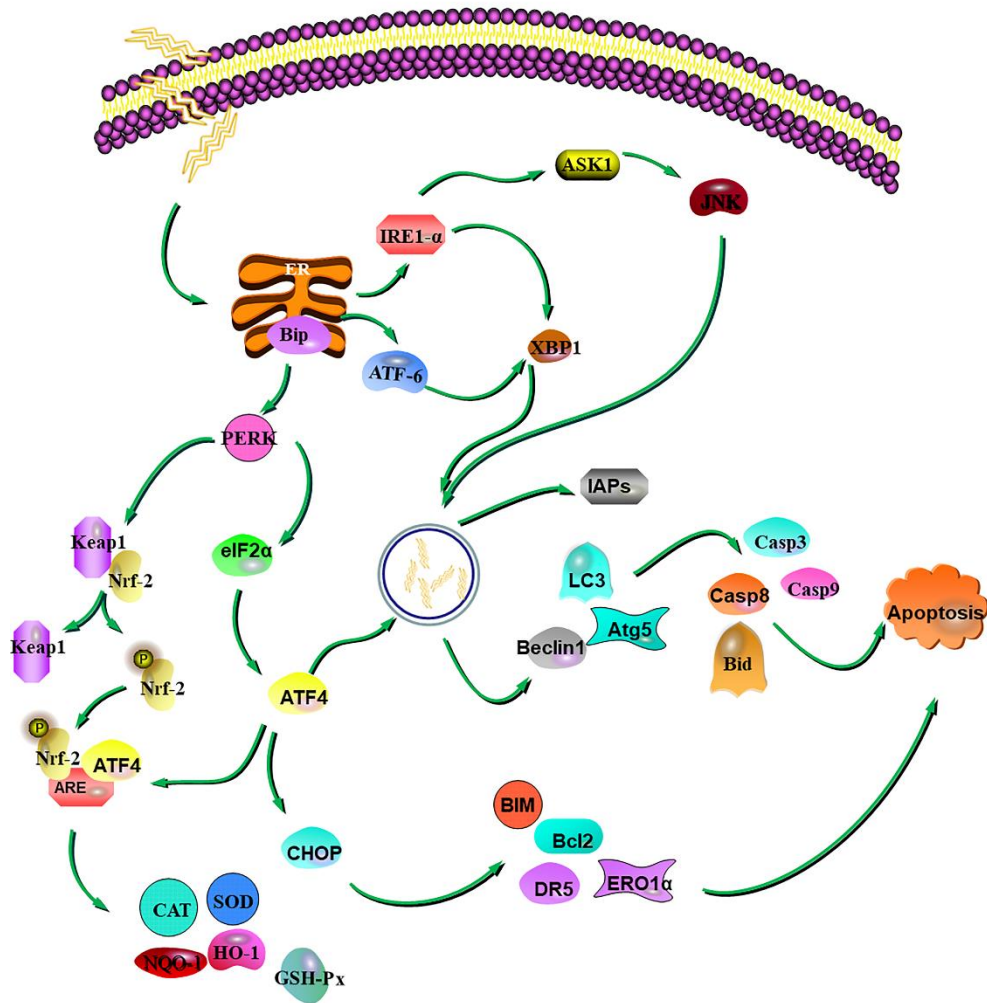


图 2-14 FHN 肉鸡关节软骨中内质网应激、细胞凋亡和氧化应激的调节机制

Fig. 2-14 Regulatory mechanism of ER stress, apoptosis and oxidative stress in articular cartilage of broilers with spontaneous FHN

## 第三章 FHN 肉鸡 BMSCs 分化水平变化及甲泼尼龙对肉鸡 BMSCs 的影响

骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 是骨髓组织中不具有造血潜能的干细胞, 具有多项分化潜能及分泌营养因子的能力, 且获取方便, 因此具有良好的临床应用前景 (Kuang et al., 2019; Liao et al., 2021)。目前, 组织工程和再生医学领域对 BMSCs 展开了骨和软骨重建以及伤口愈合等方面的广泛研究 (Takam Kamga et al., 2020)。研究发现 BMSCs 在骨修复时发挥重要作用, 能够侵入骨坏死区并通过增殖分化形成新骨, 完成骨修复 (Lee et al., 2006)。股骨头坏死 (FHN) 是一种骨代谢异常疾病, 其特点为关节中成骨崩解和软骨变性 (Bruderer et al., 2014)。相关研究表明 FHN 的发生与 BMSCs 的活性及数量减少密切相关 (Hernigou et al., 1997; Hernigou et al., 1999; Shapiro et al., 2009)。本文前期研究发现自发性 FHN 肉鸡中成骨标志因子 BGP 及 BALP 水平较正常肉鸡显著下降, 且骨骼参数、软骨组织结构及相关代谢因子均发生显著变化, 表明 FHN 肉鸡的成骨能力下降及软骨生成受阻。

糖皮质激素 (甲泼尼龙、地塞米松、氢化可的松等) 作为强效抗炎药及免疫抑制剂广泛应用于临床治疗, 而其长期、大剂量使用会产生多种并发症, 其中 FHN 是最常见的并发症之一 (Marston et al., 2002; Weinstein et al., 2017; Yao et al., 2020)。大量研究表明在类固醇引发的 FHN 患者中, 其 BMSCs 增殖及成骨能力下降, 脂肪分化能力提高 (Houdek et al., 2016; Wang et al., 2008; Zhang et al., 2008; Zhou et al., 2014)。然而, 在 FHN 中, BMSCs 分化改变的机制仍不甚明了。因此本试验分离纯化了肉鸡 BMSCs, 明确了来源于 FHN 肉鸡的 BMSCs 分化水平变化, 并将健康肉鸡来源的 BMSCs 暴露于甲泼尼龙 (methylprednisolone, MP), 以期探究 MP 对肉鸡 BMSCs 的影响及发病机理。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与试剂

##### 1.1.1 主要仪器设备

本章试验主要仪器设备及品牌信息见表 3-1。

表 3-1 主要仪器设备

Table 3-1 Main instrumentation

仪器名称	型号	公司
Instrumentation	Product model	Company
恒温细胞培养箱	DNP-9022	中国上海精宏实验设备有限公司
倒置显微镜	Nikon ECLIPSE50i	日本 Nikon 公司
正置荧光显微镜	Nikon DS-Ri2	日本 Nikon 公司
激光共聚焦显微镜	LSM 710	德国 Zeiss 公司
流式细胞仪	BD FACS Verse TM 273	美国 BD 公司
全波长酶标仪	BioTek	美国 Epoch 公司
蛋白电泳仪	Bio-rad	美国 Bio-rad 公司
凝胶成像系统	Bio-rad	美国 Bio-rad 公司
高速冷冻离心机	Legend Micro 17R	美国 Thermo Scientific 公司
超净工作台	VD-650	苏州净化设备有限公司
精密电子天平	XB124	上海精科实业有限公司
手持组织匀浆仪	Tissue-Tearor	美国 BioSpec 公司
涡旋仪	IKA	德国 IKA 公司

### 1.1.2 主要试剂

本章试验主要试剂及品牌信息见表 3-2。

表 3-2 主要试剂

Table 3-2 Main reagents

试剂名称	公司
Reagents	Company
胎牛血清	美国 Gibco 公司
青霉素/链霉素	北京索莱宝科技有限公司
胰蛋白酶/EDTA	北京索莱宝科技有限公司
茜素红 S 染色液	北京索莱宝科技有限公司
油红 O 染色液	北京索莱宝科技有限公司
地塞米松	北京索莱宝科技有限公司
$\beta$ -甘油磷酸钠	北京索莱宝科技有限公司
抗坏血酸	北京索莱宝科技有限公司

试剂名称 Reagents	公司 Company
吲哚美辛	北京索莱宝科技有限公司
阿利新蓝-核固红染色试剂盒	碧云天生物技术有限公司
碱性磷酸酶 (ALP) 检测试剂盒	碧云天生物技术有限公司
IBMX	碧云天生物技术有限公司
DMEM/F12 培养基	源培生物技术有限公司
PBS	源培生物技术有限公司
CCK-8 试剂盒	兰杰柯科技有限公司
RIPA 蛋白裂解液	碧云天生物技术有限公司
蛋白酶抑制剂 (PMSF)	北京索莱宝科技有限公司
BCA 蛋白测定试剂盒	上海雅酶生物医药科技有限公司
5×Loading Buffer	上海雅酶生物医药科技有限公司
牛血清白蛋白	北京索莱宝科技有限公司
Tris base	北京索莱宝科技有限公司
甘氨酸	北京索莱宝科技有限公司
蛋白胶预混液	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
anti-CD29 (Cat No. AF0207)	碧云天生物技术有限公司
anti-CD34 (Cat No. AF0102)	碧云天生物技术有限公司
anti-CD44 (Cat No. AF1858)	碧云天生物技术有限公司
anti-HLA-DR (Cat No. AF2065)	碧云天生物技术有限公司
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Fluor488-conjugated (Cat No. S0018)	江苏亲科生物研究中心有限公司
anti-Notch1 (Cat No. WL01991)	沈阳万类生物科技有限公司
anti-p-Notch1 (Cat No. WL03732)	沈阳万类生物科技有限公司
anti-Notch2 (Cat No. WL02429)	沈阳万类生物科技有限公司
anti-RBPJ (Cat No. AF7881)	碧云天生物技术有限公司
anti-Runx2 (Cat No. 20700-1-AP)	武汉三鹰生物技术有限公司
anti-BMP2 (Cat No. AF0075)	碧云天生物技术有限公司
anti-Col2a1 (Cat No. AF6528)	碧云天生物技术有限公司
anti-Aggrecan (Cat No. AF6126)	碧云天生物技术有限公司
anti-MMP9 (Cat No. WL03096)	沈阳万类生物科技有限公司

试剂名称 Reagents	公司 Company
anti-MMP13 (Cat No. WL04694)	沈阳万类生物科技有限公司
anti-GAPDH (Cat No. 10494-1-AP)	武汉三鹰生物技术有限公司
辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (Cat No. SA00001-2)	武汉三鹰生物技术有限公司
蛋白预染 Marker	上海雅酶生物医药科技有限公司
ECL 发光液	上海雅酶生物医药科技有限公司
HiScript II QRT Super Mix	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
DAPI	碧云天生物技术有限公司
Triton X-100	碧云天生物技术有限公司
抗荧光淬灭封片液	碧云天生物技术有限公司
脱脂奶粉	北京索莱宝科技有限公司

## 1.2 自发性 FHN 及正常肉鸡 BMSCs 的分离及纯化培养

采用全骨髓差速贴壁培养法分离培养肉鸡 BMSCs (范如彬, 2022)。选取 10~20 日龄自发性 FHN 及健康肉鸡, 颈椎脱臼处死后, 暴露髋关节, 切断圆韧带并分离跗关节。在无菌操作台将胫骨及股骨表面附着肌肉组织剔除, 使用预先配置的含有 1% 双抗的 DMEM/F12 培养基冲洗髓腔, 直至骨髓颜色发白。使用 70  $\mu\text{m}$  滤器过滤收集的冲洗液, 之后 1000 rpm 离心 10 min, 弃上清, 使用含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM/F12 培养基重悬细胞, 并按  $2 \times 10^5/\text{mL}$  的细胞密度接种至培养瓶中, 37°C、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h 后首次换液, 之后每 2 d 更换培养液, 当细胞密度达到 80% 时, 进行传代培养, 记为 P<sub>1</sub>。

## 1.3 细胞生长曲线绘制

选取第 1、3、5 代时期的 BMSCs, 经 0.25% 胰蛋白酶/EDTA 消化处理后, 以每孔  $1 \times 10^4$  个接种于 24 孔板, 每天进行一次细胞计数, 持续 7 d, 按照细胞计数结果绘制细胞生长曲线。

## 1.4 细胞活力检测

将 P<sub>3</sub>~P<sub>5</sub> 代 BMSCs 接种于 96 孔细胞培养板。BMSCs 分别暴露于浓度为 0、200、400、800、1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 MP 中培养 6、12、24、48 h, 处理完成后, 按照 CCK-8 检

测说明进行细胞活力检测，并使用酶标仪检测 450 nm 波长处 OD 值并计算细胞存活率。

### 1.5 成骨诱导分化

将 10 mM  $\beta$ -甘油磷酸钠，10 nM 地塞米松，5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗坏血酸，10% FBS 及 1% 青霉素/链霉素溶解于 DMEM/F12，待细胞密度达到 70% 时进行诱导分化，每 2 d 进行一次换液。

### 1.6 成软骨诱导分化

将 100 ng/mL 转化生长因子  $\beta$ 1、10 nM 地塞米松、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  抗坏血酸、6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  牛胰岛素、6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  转铁蛋白及 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  牛血清白蛋白溶解于 DMEM/F12，待细胞密度达到 70% 时进行诱导分化，每 2 d 更换一次培养液。

### 1.7 成脂诱导分化

将 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  牛胰岛素，1  $\mu\text{M}$  地塞米松，0.5 mM IBMX，0.1 mM 吲哚美辛，10% FBS，1% 青霉素/链霉素溶解至 DMEM/F12。待细胞汇合至 70% 时进行诱导分化，每 2 d 换液一次。

### 1.8 茜素红 S 染色

将进行成骨诱导分化第 1、7、21 d 的细胞进行茜素红 S 染色，并利用倒置显微镜观察染色结果并拍照。

### 1.9 ALP 检测

成骨诱导第 1、7、21 d 收集细胞上清，进行 ALP 检测。

### 1.10 阿利新蓝染色

BMSCs 经软骨诱导分化液诱导 21 d 后，使用 4% 多聚甲醛固定细胞，后续操作同第二章 1.7。

### 1.11 油红 O 染色

使用 0.3% 油红 O 染色液对成脂诱导第 1、7、14、21 d 的细胞避光染色 30 min，磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS）润洗 3 次，并用丙醇处理 15 s，最后使用中性树脂进行封片，并使用倒置显微镜观察染色结果并拍照。

## 1.12 总 RNA 的提取及 qRT-PCR 检测

### 1.12.1 组织总 RNA 的提取及 qRT-PCR 检测

自发性 FHN 及正常肉鸡股骨头组织提取方法同第二章 1.8。

### 1.12.2 细胞总 RNA 的提取及 qRT-PCR 检测

将接种于 12 孔细胞培养板的 BMSCs 暴露于 MP 中 24 h, 之后吸除培养基, 每孔加入 500  $\mu$ L 预冷的 Trizol, 4 $^{\circ}$ C 静置 5 min, 吹打裂解细胞后, 转移至 1.5 mL 离心管中, 并向每管中加入 100  $\mu$ L 预冷的氯仿, 涡旋混匀, 后续操作同第二章 1.8。相关基因的引物序列合成由生工生物工程有限公司提供, 引物序列见表 3-3。

表 3-3 qRT-PCR 引物序列

Table 3-3 Primers sequences for qRT-PCR

目的基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
Target gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Runx2</i>	TGTCCGCAACCACTCACTAC	CTGGTACGATCCCGACGAAG
<i>BMP2</i>	TCAGCTCAGGCCGTTGTTAG	GTCATTCCACCCACGTCAT
<i>COL1A1</i>	GTCATTCCACCCACGTCAT	GTCATTCCACCCACGTCAT
<i>LDLR</i>	TTCGAGGACTCCGTGTTCTG	CTCACAGCCCCATTGGAC
<i>FAS</i>	TTTGGTGGTTCGAGGTGGTA	CAAAGGTTGTATTTTCGGGAGC
<i>ATGL</i>	TCCTAGGGGCCTACCACATC	CCAGGAACCTCTTTCGTGCT
<i>PPAR</i>	GTGCAATCAAAATGGAGCC	CTTACAACCTTCACATGCAT
<i>GAPDH</i>	GAACATCATCCCAGCGTCCA	CGGCAGGTCAGGTCAACAAC

## 1.13 Western blotting 蛋白表达检测

### 1.13.1 股骨头组织总蛋白提取

取出-80 $^{\circ}$ C保存的股骨头组织, 在液氮低温条件下将其研磨为粉末状。称取 10 mg 组织粉末, 置于 2 mL 离心管内, 加入含有 1% PMSF 的 RIPA 蛋白裂解液 200  $\mu$ L, 并使用匀浆仪进行匀浆裂解, 4%裂解 15 min 后, 1200 rpm、4 $^{\circ}$ C离心 15 min, 收集上清至新的离心管。使用 BCA 蛋白检测试剂盒进行蛋白浓度检测, 然后使用 5 $\times$ Loading Buffer 对蛋白进行变性处理, 保存于-20 $^{\circ}$ C备用。

### 1.13.2 细胞总蛋白提取

BMSCs 接种于 6 孔细胞培养板中培养 24 h, 使用 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MP 处理 24 h。处理完成后, PBS 清洗三次, 并将 PBS 完全弃去, 每孔加入含有 1% PMSF 的 RIPA 裂解液 80  $\mu\text{L}$ , 裂解 15 min 后, 使用细胞刮刀刮取细胞并移至 1.5 mL 离心管中, 1200 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 收集上清至新的离心管。使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度, 随后进行蛋白变性操作, 保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

### 1.13.3 SDS-PAGE 电泳

根据蛋白分子量大小配制相应浓度的凝胶。按照等质量上样的原则进行蛋白上样, 加入蛋白预染 Marker 作为参考, 进行电泳。电泳完成后, 使用甲醇激活 PVDF 膜并进行转印。

### 1.13.4 抗体孵育

转膜完成后, 使用 Tris-HCl 缓冲盐溶液 (Tris-HCl buffered saline solution, TBST) 洗涤三次, 再用 5%脱脂奶粉/牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 室温封闭 2 h。封闭结束后, 使用预先配置的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。孵育完成后, TBST 洗涤三次, 之后使用相应的二抗室温孵育 1 h。TBST 洗涤三次后, 使用超灵敏 ECL 发光液进行化学发光检测, 并用 Image-Pro Plus 软件分析蛋白相对灰度。

## 1.14 流式细胞术检测

将分离培养至细胞密度为 80%的原代 BMSCs 使用 0.25%胰蛋白酶/EDTA 消化处理后, 离心收集细胞, 弃上清并用 PBS 清洗 2 次。将  $1 \times 10^6$  细胞重悬于含有 2%多聚甲醛 (无甲醇) 的 PBS 中, 室温固定 10 min。固定完成后, 向每管中加入 2 mL PBS, 200g 离心 5 min, 2 次后回收细胞。将 anti-CD29 (Cat No. AF0207)、anti-CD44 (Cat No. AF1858)、anti-CD34 (Cat No. AF0102) 及 anti-HLA-DR (Cat No. AF2065) 抗体以 1: 50 的浓度加入检测管, 室温孵育 30 min。孵育完成后, 使用孵育缓冲液 (含有 2%BSA 的 PBS) 洗涤细胞 2 次, 加入 200  $\mu\text{L}$  的 10%山羊血清稀释液或 5% BSA 室温封闭 15 min。封闭完成后加入 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Fluor488-conjugated 荧光二抗 (Cat No. S0018), 室温避光孵育 40 min, PBS 处理为空白对照。最后洗涤细胞 2 次并重悬于 500  $\mu\text{L}$  的 PBS, 使用 BD FACS Verse TM 273 流式细胞仪进行检测。

## 1.15 数据统计分析

使用 SPSS 25.0 进行统计分析, 比较分析两组数据时使用独立样本  $t$  检验。使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 比较分析多组数据。试验数据以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, \* $P$ <0.05 表示差异显著, \*\* $P$ <0.01 表示差异极显著。使用 Graphpad Prism 7.0 进行制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 肉鸡 BMSCs 的分离与鉴定

#### 2.1.1 细胞形态学特征

采用全骨髓差速贴壁培养法分离 BMSCs, 并对其进行纯化培养。如图 3-1 所示,  $P_1$  时期存在形态各异的细胞, 但随着培养时间及传代次数的增加细胞形态逐渐统一,  $P_3$  时期的 BMSCs 细胞形态稳定, 体积大, 边缘光亮, 呈典型的成纤维状。

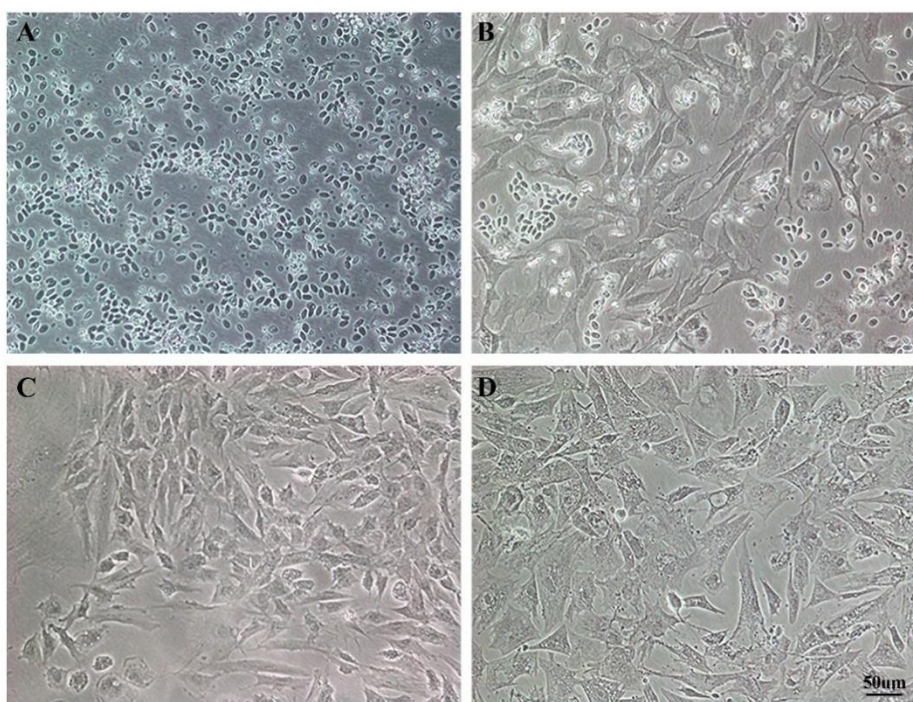


图 3-1 不同时期 BMSCs 的细胞形态

Fig. 3-1 Cell morphology of BMSCs at different periods

A. 24 h 换液后; B.  $P_1$  代; C.  $P_3$  代; D.  $P_5$  代。比例尺: 50  $\mu$ m。

A. After 24 h fluid exchange; B.  $P_1$ ; C.  $P_3$ ; D.  $P_5$ . Scale bar: 50  $\mu$ m.

### 2.1.2 细胞生长曲线绘制

本试验通过对 P<sub>1</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>5</sub> 时期的 BMSCs 绘制生长曲线以验证细胞生长状态。结果（图 3-2）显示 P<sub>1</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>5</sub> 时期的细胞生长曲线呈典型的“S”型，即开始生长时存在 2 d 潜伏期，之后进入对数生长期，当细胞量达到最大值时则进入生长平台期。通过本试验方法分离培养的 BMSCs 具有良好的生长状况，达到了预期的增殖活性。

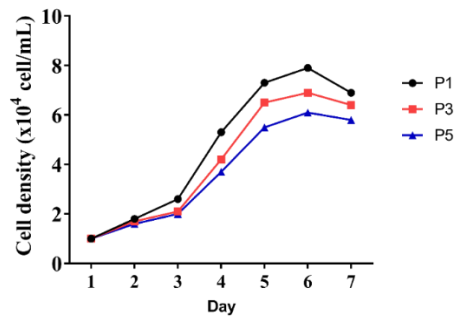


图 3-2 细胞生长曲线

Fig. 3-2 Cell growth curve

### 2.1.3 成骨诱导分化及其标志物检测

对分离纯化的 BMSCs 进行成骨诱导分化并采用茜素红 S 染色，结果显示在诱导分化 21 d 后，茜素红 S 染色的阳性细胞较第 1 d 显著聚集（图 3-1A~C），且 ALP 含量显著升高（图 3-3D， $P < 0.05$ ）。随着成骨诱导时间的增加，成骨相关基因 Runx2、BMP2 及 COL1A1 的 mRNA 水平显著升高（图 3-3E， $P < 0.05$ ），表明本试验分离培养的 BMSCs 保持良好的成骨分化潜能。

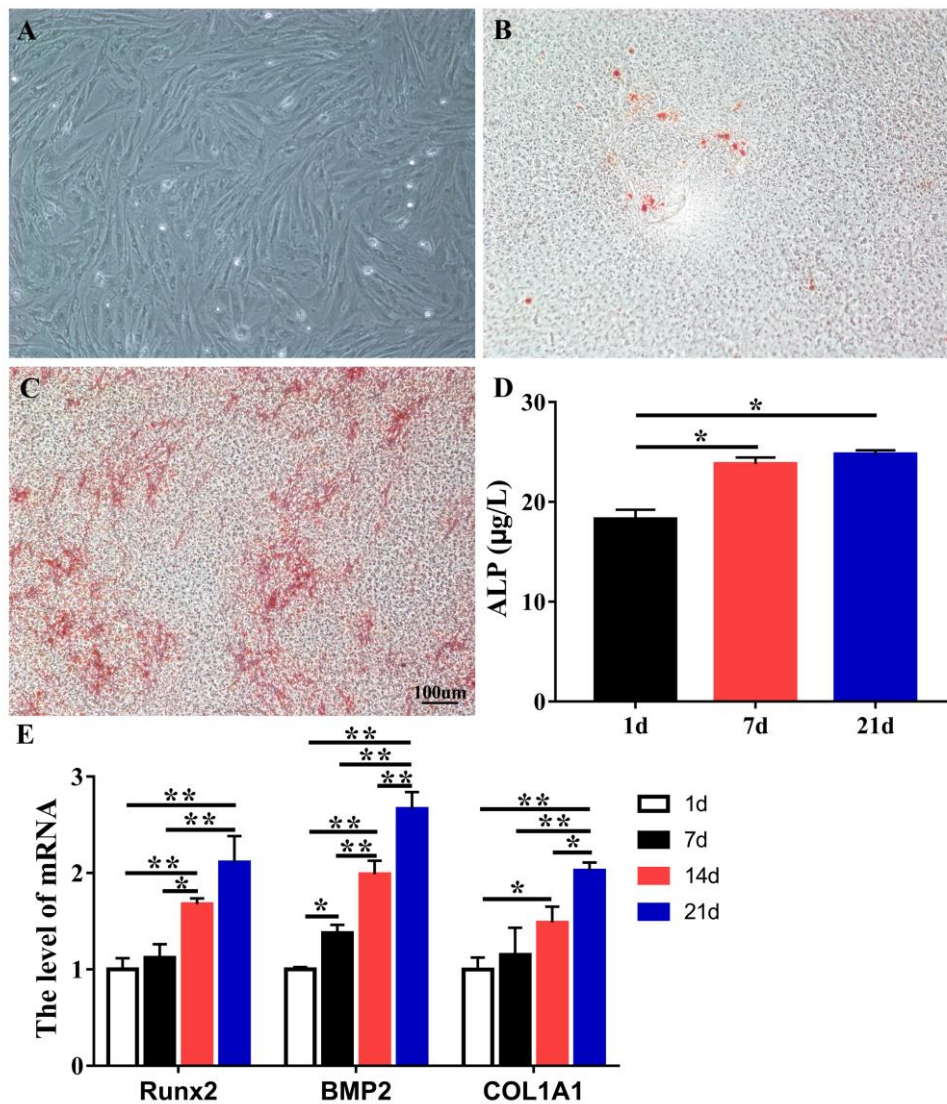


图 3-3 BMSCs 成骨诱导分化第 1 d (A)、7 d (B)、21 d (C) 时茜素红染色、ALP (D) 及成骨相关基因的 mRNA 水平 (E) 变化

Fig. 3-3 Changes in the levels of alizarin red staining, ALP (D) and osteogenesis-related genes (E) at the 1st (A), 7 (B) and 21 d (C) of osteogenic-induced differentiation of BMSCs

比例尺: 100 µm。所有结果以 mean±SD 表示。\* $P < 0.05$  表示差异显著, \*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。

Scale bar: 100 µm. Data were presented as mean±SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

#### 2.1.4 成脂诱导分化及其标志物检测

通过油红 O 染色鉴定 BMSCs 成脂分化水平, 如图 3-4 所示, 在成脂诱导第 7 d、第 14 d、第 21 d 脂滴形成随时间增加, 同时随着诱导时间的延长, 脂肪合成相关基因: 脂肪酸合酶 (fatty acid synthase, FAS)、低密度脂蛋白受体 (low-density lipoprotein receptor, LDLR) 及过氧化物酶体增植物激活受体 (PPAR $\gamma$ ) 的 mRNA 水平显著升高,

而脂肪分解代谢基因脂肪甘油三酯脂肪酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL) 的 mRNA 水平显著下降 (图 3-4E), 提示 BMSCs 在 P<sub>3</sub> 时期保持良好的成脂分化潜能。

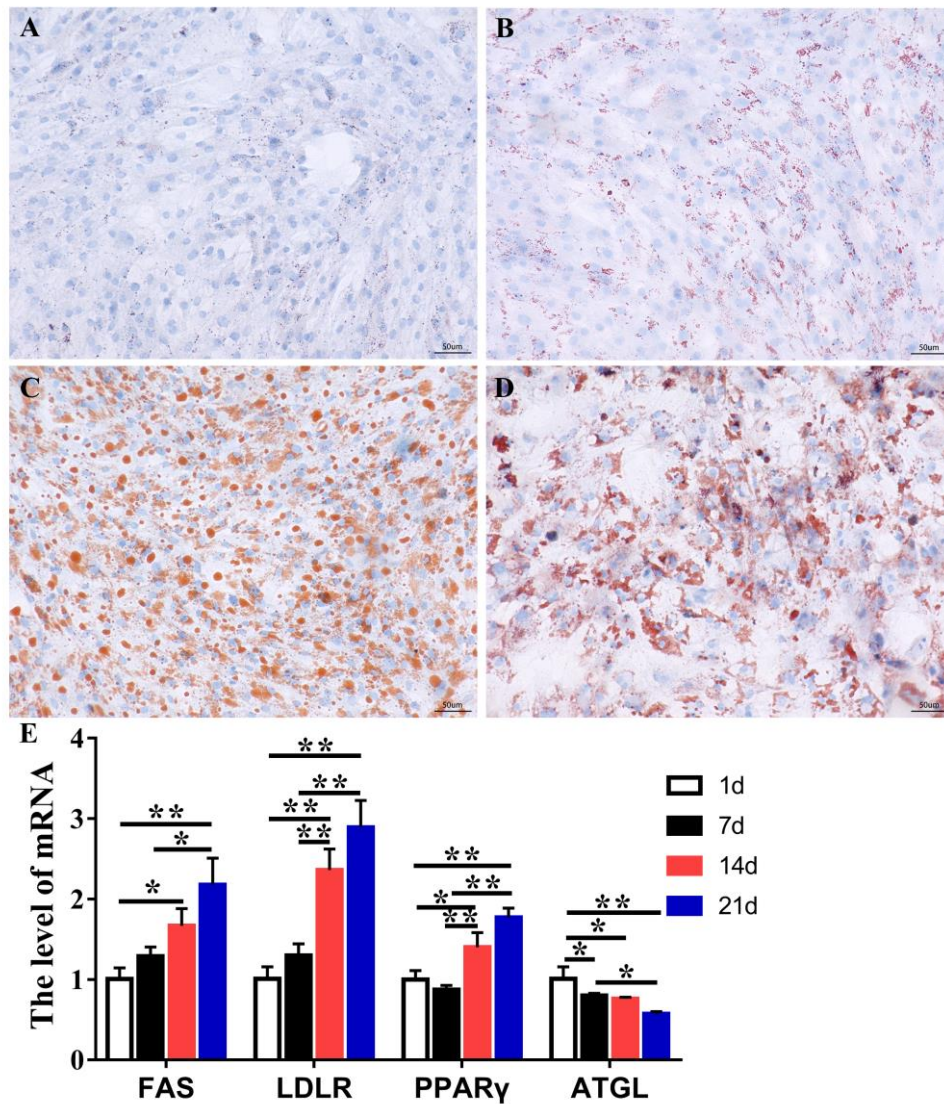


图 3-4 BMSCs 成脂诱导分化第 1 (A)、7 (B)、14 (C) 及 21 d (D) 时油红 O 染色及成脂相关基因 (E) 水平变化

Fig. 3-4 Changes in oil-red O staining and lipogenesis-related gene (E) levels at 1 (A), 7 (B), 14 (C) and 21 d (D) of lipogenesis-induced differentiation in BMSCs

比例尺: 50  $\mu$ m。所有结果以 mean $\pm$ SD 表示。\* $P$ <0.05 表示差异显著, \*\* $P$ <0.01 表示差异极显著。

Scale bar: 50  $\mu$ m. Data were presented as mean $\pm$ SD. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01.

### 2.1.5 肉鸡 BMSCs 表面标记物的鉴定

相关文献表明, 不同来源的 MSCs 能够共同表达 CD29 及 CD44, 低表达/不表达 CD34 和 HLA-DR, 因此为进一步验证分离所得细胞的种类, 本试验采用流式细胞术

检测了 MSCs 表面标志物的表达情况。结果如图 3-5 所示, CD29 及 CD44 的阳性率分别为 94.2%、92.6%, 而 CD34 和 HLA-DR 阳性率分别为 5.47%、2.98%, 提示本试验所分离培养的细胞符合 BMSCs 的鉴定标准。综上所述, 本试验分离培养的 BMSCs 具有良好的增殖活性及分化潜能, 且符合干细胞鉴定标准, 因此可用于接下来的试验。

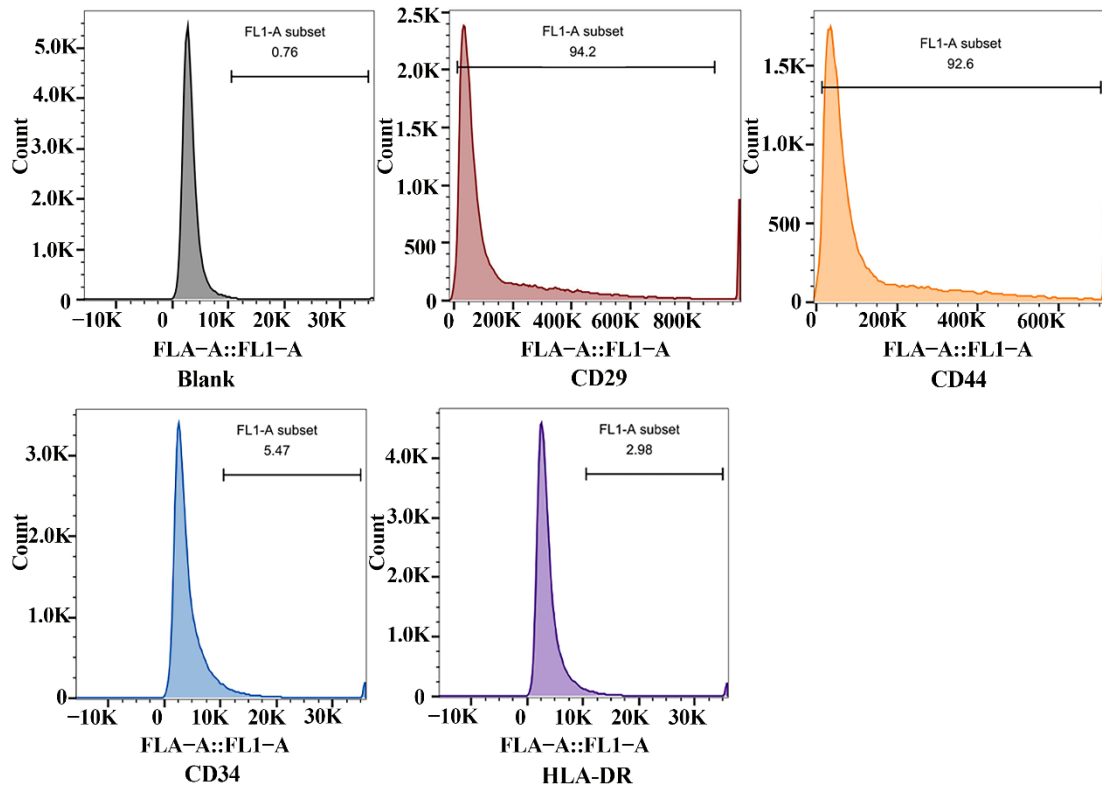


图 3-5 BMSCs 表面标志物表达水平

Fig. 3-5 Surface marker expression levels of BMSCs

阳性率: Blank: 0.76%, CD29<sup>+</sup>: 94.2%, CD44<sup>+</sup>: 92.6%, CD34<sup>+</sup>: 5.47%, HLA-DR<sup>+</sup>: 2.98%。

Positive rate: Blank: 0.76%, CD29<sup>+</sup>: 94.2%, CD44<sup>+</sup>: 92.6%, CD34<sup>+</sup>: 5.47%, HLA-DR<sup>+</sup>: 2.98%.

## 2.2 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 分化水平变化

本试验通过茜素红 S、阿利新蓝及油红 O 染色对 FHN 肉鸡和正常肉鸡来源的 BMSCs 分化水平进行了检测。染色结果(图 3-6)显示, 来源于健康肉鸡的 BMSCs 表现出正常的成骨(茜素红 S 染色)、成软骨(阿利新蓝染色)及成脂(油红 O 染色)分化水平, 而自发性 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 经过分化诱导后, 表现为细胞矿化水平及阳性软骨细胞数量显著下降, 而油性脂滴的数量显著增加, 提示 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 成骨、成软骨及成脂分化功能失调。

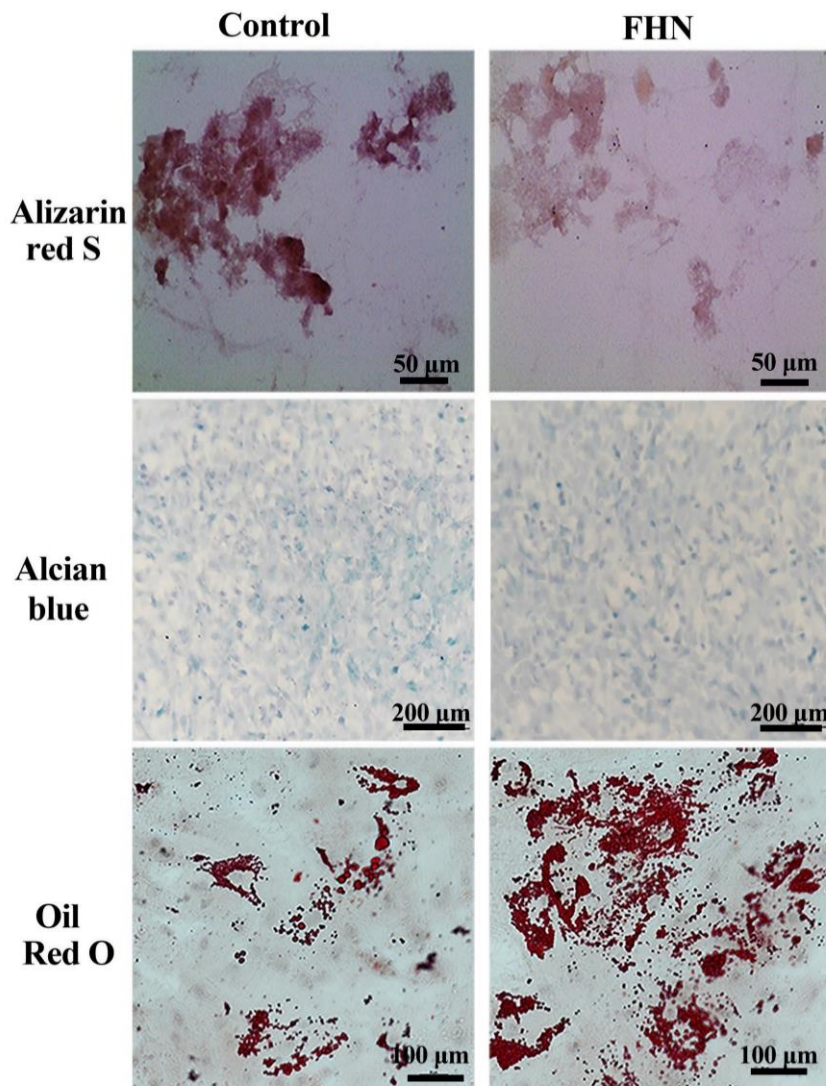


图 3-6 自发性 FHN 及正常肉鸡（21 日龄）来源的 BMSCs 成骨、成软骨及成脂分化情况

Fig. 3-6 Osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation of spontaneous FHN and normal broilers-derived BMSCs (21 days old)

比例尺：茜素红 S 染色：50  $\mu\text{m}$ ；阿利新蓝染色：200  $\mu\text{m}$ ；油红 O 染色：100  $\mu\text{m}$ 。

Scale bar: Alizarin red S staining: 50  $\mu\text{m}$ ; Alcian blue staining: 200  $\mu\text{m}$ ; Oil red O staining: 100  $\mu\text{m}$ .

### 2.3 FHN 肉鸡的股骨头组织中成骨和软骨代谢水平变化

本试验中，FHN 肉鸡的股骨头组织中成骨及软骨代谢相关蛋白水平变化趋势与 BMSCs 分化水平变化结果一致，即 FHN 肉鸡的股骨头组织中软骨代谢关键标志物 Col2a1 及 Aggrecan 的 mRNA（图 2-8）及蛋白（图 3-7）表达水平较正常肉鸡显著下降（ $P < 0.05$ ），且成骨相关标志物 BMP2（图 3-8， $P < 0.05$ ）的蛋白水平极显著下调（ $P < 0.01$ ），而基质金属蛋白水解酶（MMP13，图 3-8）的蛋白水平显著升高（ $P < 0.05$ ）。

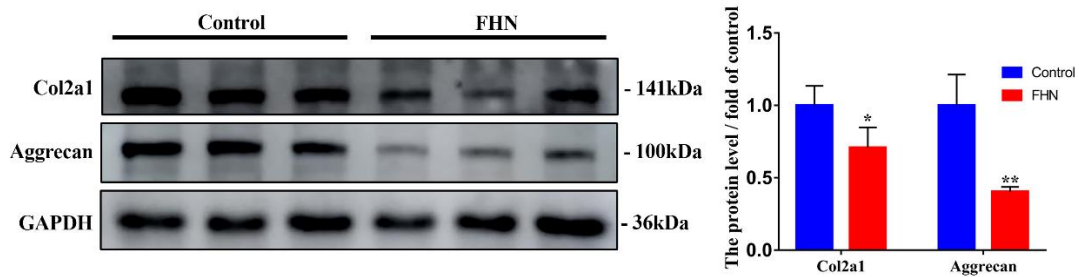


图 3-7 FHN 肉鸡和正常肉鸡（21 日龄）股骨头组织中软骨代谢相关蛋白水平

Fig. 3-7 The level of cartilage metabolism-related proteins in femoral head tissues of FHN and normal broilers in 21 days

所有结果以 mean±SD 表示。与对照组相比，\* $P<0.05$  表示差异显著，\*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

Data were presented as mean±SD. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

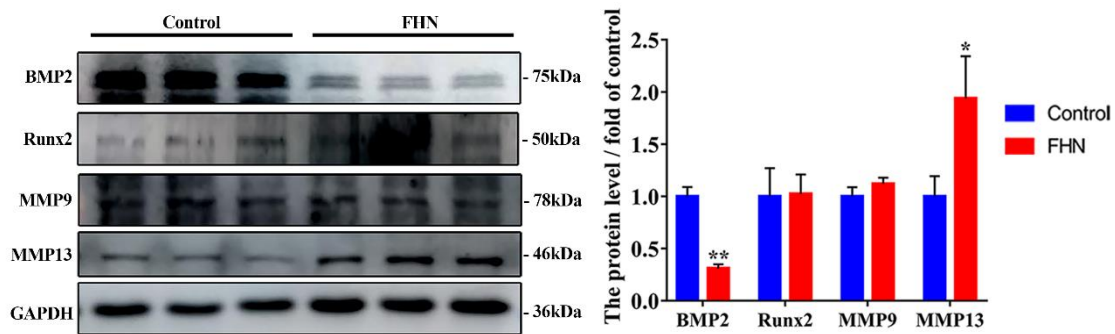


图 3-8 FHN 肉鸡和正常肉鸡（21 日龄）股骨头组织中成骨相关蛋白水平

Figure 3-8 The level of osteogenesis-related proteins in femoral head tissues of FHN and normal broilers in 21 days

所有结果以 mean±SD 表示。与对照组相比，\* $P<0.05$  表示差异显著，\*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

Data were presented as mean±SD. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

## 2.4 MP 处理浓度及时间筛选

为确定 MP 处理 BMSCs 的最佳浓度及时间，本试验采用了 CCK-8 法评估细胞活性，同时通过 qRT-PCR 法检测细胞凋亡相关基因转录水平。将 BMSCs 暴露于不同剂量的 MP（200、400、800 和 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），分别处理 6、12、24 和 48 h，评估 MP 对细胞活性的影响。如图 3-9 所示，与对照组相比，当 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MP 处理细胞 24 h 时，BMSCs 的细胞活力下降了约 30%。细胞凋亡相关基因表达水平的结果（图 3-10）显示，MP 处理 24 h 后 Caspase-3 及 Caspase-9 的 mRNA 水平显著高于对照组 ( $P<0.05$ )，而抗凋亡基因 Bcl-2 的 mRNA 水平显著低于对照组 ( $P<0.05$ )，表明 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MP 处理细胞 24 h 可引起 BMSCs 发生凋亡，该处理条件选择合理。

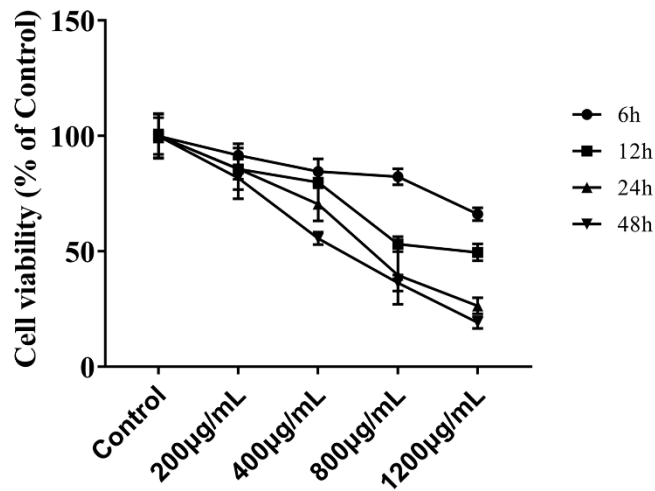


图 3-9 不同浓度 (200、400、800 和 1200 µg/mL) MP 分别处理 BMSCs 不同时间 (6、12、24 及 48 h) 的细胞存活率

Fig. 3-9 The cell viability of BMSCs treated with 200, 400, 800 and 1200 µg/mL for 6, 12, 24 and 48 h

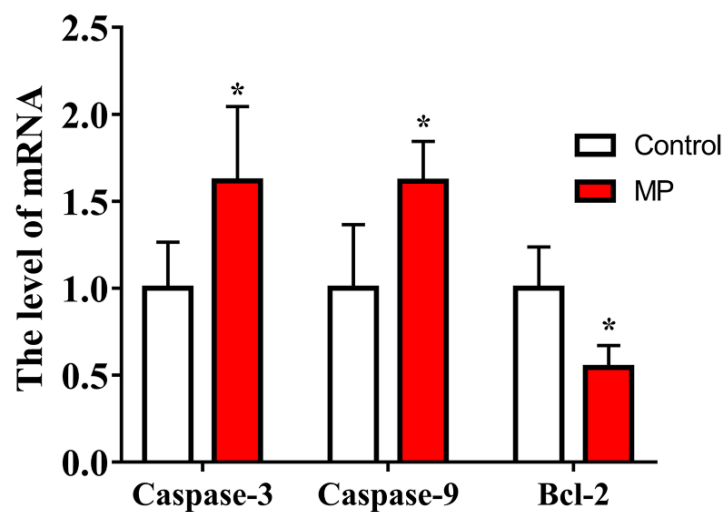


图 3-10 400 µg/mL MP 处理 BMSCs 24 h 改变了凋亡相关基因的转录水平

Fig. 3-10 Treatment of BMSCs at 400 µg/mL MP for 24 h altered the transcription levels of apoptosis-associated genes

所有结果以 mean±SD 表示。与对照组相比, \* $P < 0.05$  表示差异显著。

Data were presented as mean±SD. \* $P < 0.05$ .

## 2.5 MP 对 BMSCs 分化水平的影响

为验证 MP 对肉鸡 BMSCs 分化能力的影响, 本试验对暴露于 MP 的 BMSCs 进行了成骨、成软骨及成脂诱导分化, 并分别通过茜素红 S 染色、阿利新蓝染色及油红 O

染色检测其分化水平。结果显示，MP 处理减轻了成骨矿化程度并减少了软骨细胞数量，但增加了脂滴形成数量，MP 处理 BMSCs 后，减弱了其成骨及成软骨分化能力，而提高了成脂分化能力（图 3-11），这一结果与来源于 FHN 肉鸡的 BMSCs 分化水平变化一致。

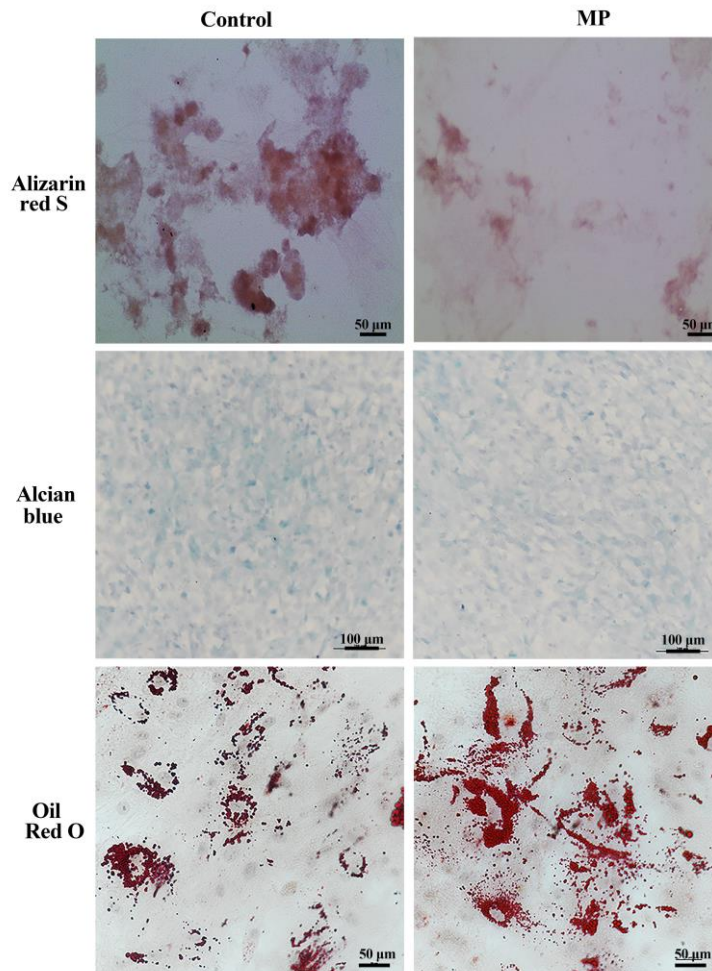


图 3-11 MP 对 BMSCs 成骨、成软骨和成脂分化水平的影响

Fig. 3-11 Effect of MP on the level of osteogenesis, chondrogenic and adipogenesis differentiation in BMSCs

比例尺：茜素红 S 染色：50 μm；阿利新蓝染色：100 μm；油红 O 染色：50 μm。

Scale bar: Alizarin red S staining: 50 μm; Alcian blue staining: 100 μm; Oil red O staining: 50 μm.

## 2.6 MP 对 BMSCs 成骨及软骨代谢水平的影响

MP 处理引起了 BMSCs 分化水平变化，为明确 MP 对细胞成骨及软骨代谢水平的影响，本试验采用了 qRT-PCR 及 Western blotting 检测方法进一步进行探究。其中 qRT-PCR 检测结果显示 MP 处理下调了 BMSCs 成骨及软骨代谢相关基因 Col2a1、

Aggrecan、BMP2 和 Runx2 的 mRNA 水平 ( $P<0.05$ ), 而 MMP9 的 mRNA 水平较对照组极显著增加 (图 3-12A~B,  $P<0.01$ )。此外, MP 暴露显著降低 BMSCs 的 Col2a1、Aggrecan、BMP2 和 Runx2 的蛋白水平 (图 3-12C~D,  $P<0.05$ ), 而显著提高了 MMP9 的蛋白水平 ( $P<0.05$ ), 这与 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 中成骨及软骨代谢水平变化一致。上述结果表明 MP 处理 BMSCs 能够显著降低其成骨及软骨代谢水平, 与 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 变化一致。

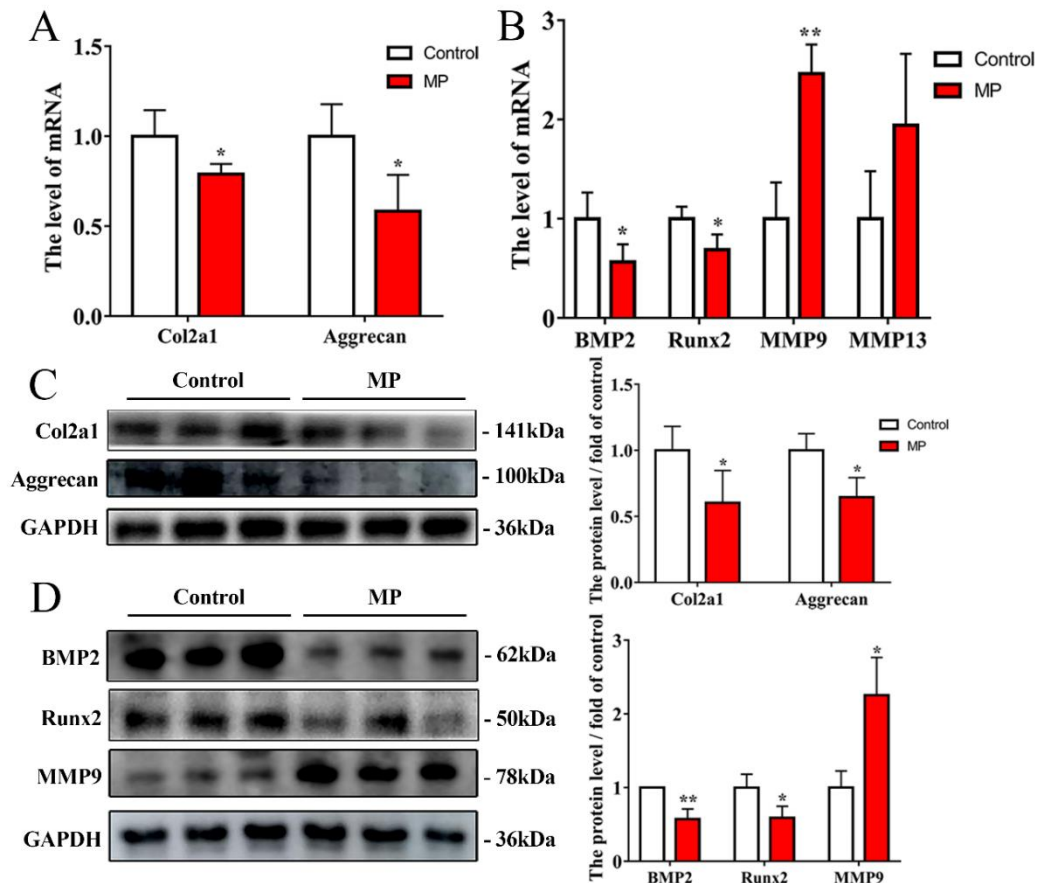


图 3-12 MP 对 BMSCs 成骨及软骨代谢相关基因和蛋白表达水平的影响

Fig. 3-12 Effect of MP on the expression levels of genes and eggs related to bone metabolism and cartilage metabolism in BMSCs

软骨代谢相关基因 (A) 及蛋白水平 (C); 骨代谢相关基因 (B) 及蛋白水平 (D)。所有结果以 mean±SD 表示。与对照组相比, \* $P<0.05$  表示差异显著, \*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

Cartilage metabolism-related genes (A) and protein levels (C); bone metabolism-related genes (B) and protein levels (D). Data were presented as mean±SD. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with control.

### 3 讨论

BMSCs 具有强大的增殖、分化及自我更新能力,同时其还具有多效性和免疫调节特性,因此在损伤修复、临床治疗以及组织工程领域受到广泛关注(Chrostek et al., 2019; Fu et al., 2019; Liao et al., 2021; Liu et al., 2021)。而 BMSCs 的分离培养是开展研究必不可少的一个环节,在现有 BMSCs 分离纯化方法中,密度梯度离心法及差速离心法在一定程度上损伤细胞,而全骨髓血液贴壁培养法能够最大程度保留细胞的增殖活性及分化能力,且能够减少血细胞的干扰(肖艳宇, 2021; Zhang et al., 2014)。因此本研究采用全骨髓血液贴壁培养法分离纯化肉鸡 BMSCs。经检验,本试验分离培养所得细胞具有良好的增殖活性并保持良好的成骨及成脂分化能力,同时细胞表面标志物的检测结果显示其符合 MSCs 鉴定标准,因此可用于试验研究。

FHN 是一种进行性退化的骨代谢疾病,对人类健康及畜禽养殖业带来了极大的影响,因此明确 FHN 的发病机理并对其进行早期诊断及干预至关重要。相关研究表明 FHN 患者的 BMSCs 数量减少,细胞活性及增殖能力下降(Al-Khalaifa et al., 2019; Gangji et al., 2003; Li et al., 2005; Wang et al., 2008; Wang et al., 2003)。而 BMSCs 作为成骨细胞的主要来源,能够影响成骨细胞的生成及骨形成过程(Lu et al., 2020; Qiu et al., 2021)。Runx2 作为成骨特异性转录因子,能够调节 MSCs 中骨桥蛋白(OPN)、骨钙素(BGP)等基质蛋白的表达(Noël et al., 2004),并在成骨细胞分化过程中维持 OPN 和 BGP 的产生(Pittayapruek et al., 2016)。另一种重要的骨形成蛋白 BMP2 能够显著提高 BGP 的表达水平(Xu et al., 2017),并且能够诱导 BMSCs 向成骨细胞定向分化(Zeng et al., 2016)。而基质金属蛋白酶(MMP9 和 MMP13)能够降解基底膜及细胞外基质(Wagley et al., 2020),严重影响成骨的发生。相关研究报道,在 FHN 发病早期,患者的股骨头软骨中出现软骨变性,且 Aggrecan 和 Col2a1 的表达量下降(Novak et al., 2020)。本试验对来源于自发性 FHN 肉鸡的 BMSCs 进行了茜素红 S 染色及阿利新蓝染色,结果显示成骨细胞及软骨细胞数量较正常肉鸡显著减少。此外,qPCR 及 Western blotting 结果也显示,成骨及软骨生成相关因子 BMP2、Runx2、Col2a1 和 Aggrecan 的蛋白水平显著下降,而基质降解酶 MMP9 的蛋白水平显著升高,相关基因检测结果与染色结果一致。因此,本试验提示 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 成骨及成软骨分化水平明显降低。

FHN 动物模型包括兔、小鼠、大鼠及鸡(Liao et al., 2019; Zhang et al., 2019; Zhu et al., 2020)。与其他小型四足动物相比,鸡作为 FHN 动物模型的优势在于其双足运动对髋关节和股骨头产生的压力与人类相似(Xu et al., 2018)。皮质类固醇(地塞米松/甲泼尼龙)导致的 FHN 患者的 BMSCs 数量及活性降低(Zhou et al., 2021),且成骨

活性减弱 (Houdek et al., 2016), 成脂水平提高, 因此本试验将 BMSCs 暴露于 MP 以进一步探究其成骨及成软骨分化能力下降的相关调控机制。本试验发现暴露于 MP 的 BMSCs 表现与来源于 FHN 肉鸡的细胞相似的结果, 即 BMSCs 的成骨及成软骨分化水平降低, 且成骨及软骨代谢关键标志物 BMP2、Runx2、Col2a1 和 Aggrecan 的蛋白水平也发生显著下降, 这一结果与 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 分化水平变化一致 (图 3-13)。

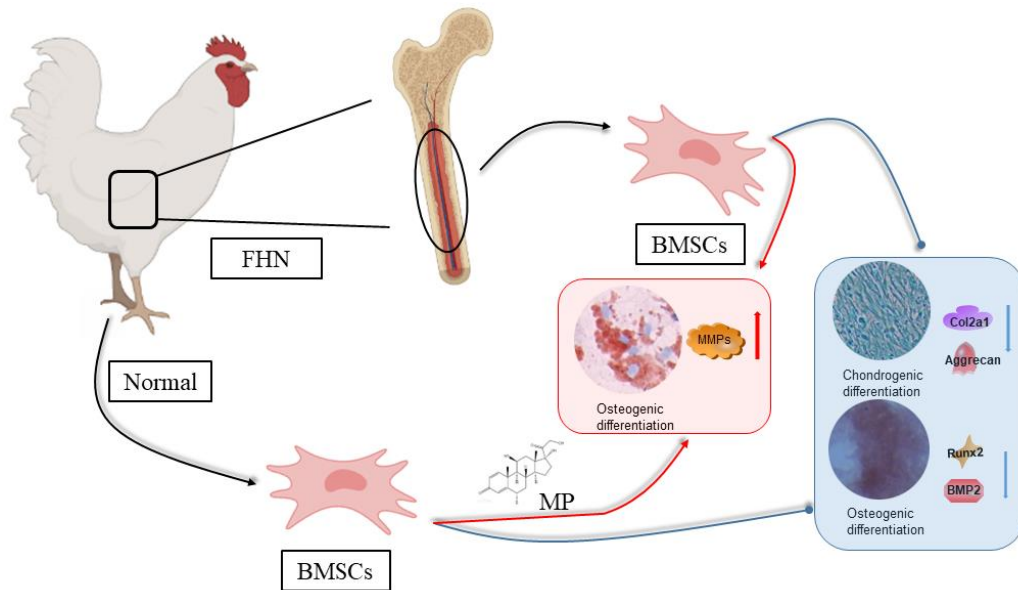


图 3-13 FHN 肉鸡来源及 MP 处理的 BMSCs 成骨及成软骨分化水平变化

Fig. 3-13 Osteogenic and chondrogenic differentiation level changes in BMSCs of FHN broilers sources and MP treatment



## 第四章 Notch 通路对 FHN 肉鸡中 BMSCs 分化的调控作用

相关研究发现 FHN 患者的股骨近端分离所得干细胞数量减少 (Hernigou et al., 1999; Wang et al., 2003)、成骨分化能力降低 (Wang et al., 2003), 且成骨细胞增殖能力减弱 (Gangji et al., 2003)。本实验室研究发现, 来源于 FHN 肉鸡的 BMSCs 成骨及成软骨分化能力下降, 且成骨及软骨生成能力减弱, 表明 BMSCs 的分化水平与 FHN 密切相关。Notch 通路是高度保守的信号转导途径, 在细胞增殖、分化及程序性死亡等过程中有重要调控作用 (Enders et al., 2012; Meurette et al., 2018; Siebel et al., 2017)。经典的 Notch 信号由细胞膜表面的受体与相邻细胞膜上的配体结合后激活, 受体蛋白经金属蛋白酶—肿瘤坏死因子  $\alpha$  转化酶 (TNF  $\alpha$  converting enzyme, TACE) 和  $\gamma$  分泌酶复合物剪切, 释放具有转录调节活性的胞内结构域 (NICD) (Liu et al., 2021; Sprinzak et al., 2021; Takam Kanga et al., 2020; van Tetering et al., 2011), 随后 NICD 转移进入细胞核, 与转录因子 RBPJ 结合, 形成转录复合物, 启动下游靶因子 Hes 及 HEY 家族基因的转录, 发挥生物学作用 (徐沛然, 2018; Szafraniec et al., 2022; Zanotti et al., 2016)。

Notch 信号对 MSCs 成骨分化的调控存在两种不同的观点。有学者认为 Notch 信号传导能够促进骨源性细胞的矿化 (Díaz-Tocados et al., 2017; Osathanon et al., 2019), 也有学者认为 Notch-RBPJ 对 MSCs 成骨分化存在负面作用 (Engin et al., 2008; Hilton et al., 2008; Shang et al., 2015)。研究发现, 抑制 Notch 信号能增强人类 MSCs 的成骨潜能 (Jung et al., 2013; Shang et al., 2015; Shu et al., 2017; Xu et al., 2013)。Liu 等人发现细胞内 miR-29b 增强表达, 并下调 DNA 甲基转移酶 1 的表达, 能够引起 Notch1 启动子的甲基化水平降低及 Notch 信号的激活, 最终导致 MSCs 成骨分化受损 (Liu et al., 2015)。这些研究表明 Notch-RBPJ 通路参与调控 BMSCs 的成骨分化过程。

Notch 通路能够抑制体内软骨生成, 通过 DLL1 抑制鸡胚中软骨细胞分化及生长板中肥大软骨细胞的增殖 (Crowe et al., 1999)。Notch1 的 NICD 在肢芽间充质细胞中的过度表达能够抑制小鼠附肢骨骼中透明软骨的形成, 且 RBPJ 介导了这一过程 (Dong et al., 2010; Kohn et al., 2012), 这与激活 Notch-RBPJ 经典通路会抑制软骨细胞增殖和分化 (Chen et al., 2013; Kohn et al., 2012; Mead et al., 2009) 的结论一致。本研究前期发现 MP 处理后的 BMSCs 成骨及成软骨分化水平降低, 而成脂分化能力增强, 这与来源于 FHN 肉鸡的 BMSCs 分化趋势相同, 因此本试验进一步探究了 Notch 通路激活剂 JAG-1/抑制剂 DAPT 对 MP 处理的 BMSCs 细胞分化改变的调控作用及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

本章试验主要仪器与试剂见第三章 1.1，其中间接免疫荧光所用抗体信息如表 4-1 所示。

表 4-1 间接免疫荧光抗体信息

Table 4-1 Antibody information for indirect immunofluorescence

试剂名称 Reagents	公司 Company
anti-RBPJ (Cat No. AF7881)	碧云天生物技术有限公司
Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG(H+L) (Cat No. P0176)	碧云天生物技术有限公司

### 1.2 细胞培养

BMSCs 来源于健康肉鸡，在含有 10%FBS、1%青霉素/链霉素的 DMEM/F12 培养基中，使用 CO<sub>2</sub> 浓度为 5%，温度为 37°C 培养箱中进行细胞培养。

### 1.3 细胞活力检测

使用 CCK-8 法检测细胞活力，具体操作同第三章 1.4。

### 1.4 成骨诱导分化

肉鸡 BMSCs 进行成骨诱导分化 21 d，具体操作同第三章 1.5。

### 1.5 成软骨诱导分化

肉鸡 BMSCs 进行成软骨诱导分化 21 d，具体操作同第三章 1.6。

### 1.6 成脂诱导分化

肉鸡 BMSCs 进行成脂诱导分化 21 d，具体操作同第三章 1.7。

### 1.7 茜素红 S 染色

使用茜素红 S 染色液对成骨诱导分化 21 d 的 BMSCs 进行染色，具体操作同第三章 1.8。

## 1.8 阿利新蓝染色

使用阿利新蓝染色液对成软骨诱导分化 21 d 的 BMSCs 进行染色, 具体操作同第三章 1.10。

## 1.9 油红 O 染色

使用油红 O 染色液对成脂诱导分化 21 d 的细胞进行染色, 具体操作同第三章 1.11。

## 1.10 FHN 肉鸡股骨头组织及 BMSCs 中总 RNA 的提取及 qRT-PCR 检测

常规提取自发性 FHN 及正常肉鸡的股骨头组织、BMSCs 中总 RNA, 并使用 qRT-PCR 检测其 mRNA 表达水平, 具体试验操作见第二章 1.8, 第三章 1.12。相关基因的引物序列合成由生工生物工程有限公司提供, 引物序列见表 4-2。

表 4-2 qRT-PCR 引物序列

Table 4-2 Primers sequences for qRT-PCR

目的基因 Target gene	上游引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>Aggrecan</i>	TGCAAGGCAAAGTCTTCTACG	GGCAGGGTTCAGGTAAACG
<i>Col2a1</i>	ACCTACAGCGTCTTGGAGGA	ATATCCACGCCAAACTCCTG
<i>BMP2</i>	CTCAGCTCAGGCCGTTGTTA	GTCATTCCACCCACGTCAT
<i>Runx2</i>	TTCACAAGCATTTCATCCCTC	TTGCGGACATACCCAGTGACA
<i>MMP9</i>	GCCATCACTGAGATCAATGGAG	GATAGAGAAGGCGCCCTGAGT
<i>MMP13</i>	AGAGACCCTGGAGCACTGATGT	GGGATCTCTGTCTCCAGCACCA
<i>Notch1</i>	AGAGGAACTCAAGGGGAGCG	CGGCACTCGCATTTGTAGTC
<i>Notch2</i>	CACACCCGAGTGCTTGTTTG	ATTACAGCCCTGGTCACAGC
<i>JAG1</i>	AACTGGTACCGCTGTGAGTG	GCAAGGCCTCCCTGTAACCT
<i>JAG2</i>	CAAGTGGCTGGGAAGGAGAA	TGCATCGGCCACCATTATGA
<i>DLL1</i>	TGAACTACTGCACTCACCACAA	TCGTTGATTTCAATCTCGCAGC
<i>DLL4</i>	CAGCAGGTAACGGTCGGAG	TTGACGAACTCGTGCAGCTT
<i>RBPJ</i>	GCAGATGATCCGGTATCGCAG	TTTGGGCATGGAGTGGCTTGA
<i>Hes1</i>	CAGCGAGTGCATGAACGAAG	TGATGGCGTTGATCTGGGTC

目的基因 Target gene	上游引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>Hes4</i>	CCCATCATGGAGAAGCGACG	GAGTGCCGAGAGCTGTCTTTT
<i>Hes5</i>	TGAAATACAGCCGAGCTTTTGC	GCAGAAGGAGAACCGGAGTC
<i>Hes6</i>	CGCATTCCACTTGGATCAGTCTA	AGGCCCACTTTGGAATCAGC
<i>HEY1</i>	GGCCGGAGGGAAAGGTTATTT	GTGATGTCCAAAGGCGTTGC
<i>HEY2</i>	TATTTCTCTTTGCCCCACGCC	TATGGCTTTGCCCGCAGTA
<i>HEYL</i>	TCAGGATGAAGCGTCTGTGC	GCCGCTTCTCAATGATCCCT
<i>Caspase-3</i>	TGCTCCAGGCTACTACTCC	CCACTCTGCGATTTACACGA
<i>Caspase-9</i>	CGAAGGAGCAAGCACGAC	CGCAGCCCTCATCTAGCAT
<i>Bcl-2</i>	CGACTGGGATGACAGGAAAG	GGAGCGCACAGGTGAGACA
<i>GAPDH</i>	GAACATCATCCCAGCGTCCA	CGGCAGGTCAGGTCAACAAC

### 1.11 间接免疫荧光

BMSCs 接种于有 20 mm 圆形细胞爬片的 12 孔细胞培养板内培养 24 h, 待细胞浓度达到 80%, 用 MP 处理 24 h。处理完成后, PBS 洗涤三次, 使用 4% 多聚甲醛于 4℃ 固定 20 min, 使用 3% Triton X-100 通透液室温通透 15 min, 随后使用磷酸盐吐温缓冲液 (phosphate buffered saline, PBST) 洗涤三次, 将预先配置的 5% BSA 封闭液于 37℃ 封闭细胞 30 min。封闭完成后, 使用一抗 4℃ 孵育过夜。一抗孵育完成后, PBST 洗涤三次并室温避光孵育荧光二抗 1 h。孵育完成后, PBST 洗涤三次, 使用 DAPI 染色 5 min, 洗去多余染色液, 使用荧光防淬灭液封片, 置于共聚焦显微镜下进行观察并拍照。

### 1.12 FHN 肉鸡股骨头组织及 BMSCs 中 Western blotting 蛋白表达检测

常规提取自发性 FHN 及正常肉鸡的股骨头组织、BMSCs 中总蛋白, 并使用 Western blotting 检测其蛋白水平, 具体操作同第三章 1.13。

### 1.13 数据统计分析

使用 SPSS 25.0 对所有试验数据进行统计分析。比较分析两组数据时使用独立样本 *t* 检验。使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 比较分析多组数据, 数值采用平

均值±标准差 (mean±SD) 的形式表示。使用 Graph Pad Prism 7.0 软件进行制图。对于所有分析, \* $P<0.05$  表示差异显著, 具有统计学意义, \*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 FHN 肉鸡股骨头组织中 Notch 通路相关因子水平变化

本试验对 FHN 肉鸡的股骨头组织进行了 Notch 通路相关基因及蛋白水平的检测。结果如图 4-1 所示, FHN 肉鸡的股骨头组织中 Notch 受体 (Notch1 及 Notch2)、配体 DLL4 及转录因子 RBPJ、下游靶基因 Hes4 及 HEY2 的转录水平较正常肉鸡发生显著上调 ( $P<0.05$ ), JAG2、Hes1 及 HEYL 的 mRNA 水平极显著升高 ( $P<0.01$ ), 同时 Notch1、Notch2 及转录因子 RBPJ 的蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.05$ )。

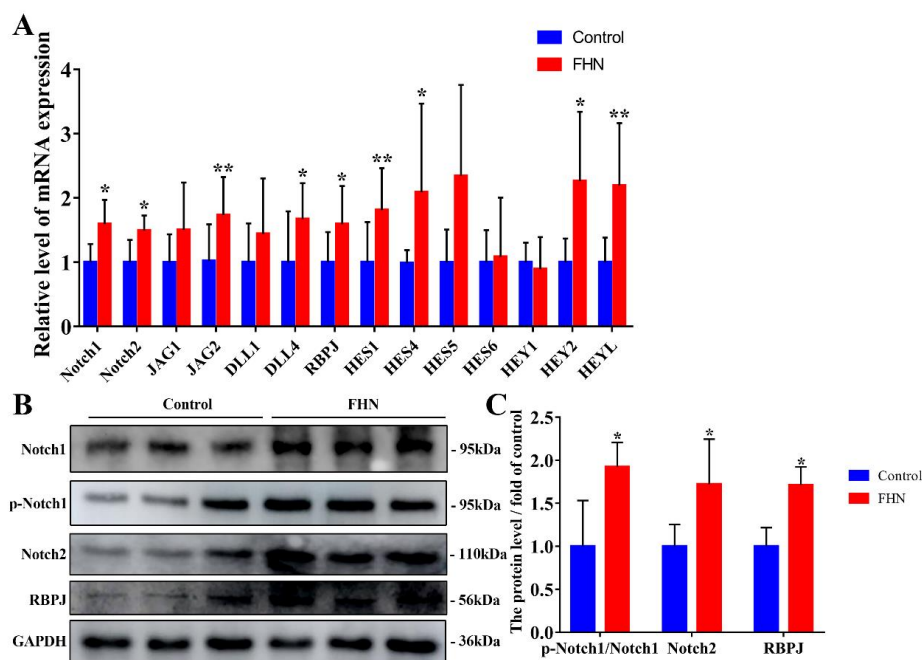


图 4-1 FHN 肉鸡股骨头组织中 Notch 通路相关因子的基因及蛋白水平变化

Fig. 4-1 Changes in genes and protein levels of Notch pathway-related factors in femoral head tissues of FHN broilers

A. 自发性 FHN 肉鸡与正常肉鸡股骨头组织中 Notch 通路相关基因 mRNA 表达水平; B~C. Notch 通路相关蛋白水平。所有结果以 mean±SD 表示。与对照组相比, \* $P<0.05$  表示差异显著, \*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

A. mRNA expression levels of Notch pathway-related genes in femoral head tissues of spontaneous FHN broilers and normal broilers; B~C. Notch signaling pathway-related protein levels. Data were presented as mean±SD. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , compared with control.

## 2.2 MP 处理 BMSCs 引起 Notch 通路激活

本研究检测了 MP 处理的 BMSCs 中 Notch 通路相关基因及蛋白的表达。结果与 FHN 肉鸡的股骨头组织 Notch 通路相关因子检测结果一致，MP 处理 BMSCs 后引起 Notch 信号通路激活。MP 处理引起 Notch 受体 (Notch1 和 Notch2)、配体 JAG-1、转录因子 RBPJ 及靶基因 Hes1 的 mRNA 水平较对照组显著升高 ( $P<0.05$ )，JAG-2 的 mRNA 水平极显著升高 (图 4-2A,  $P<0.01$ )。与对照组相比，MP 处理组中 BMSCs 的 Notch2 蛋白水平显著上调 (图 4-2B~C,  $P<0.05$ )，RBPJ 蛋白水平极显著升高 ( $P<0.01$ )，同时 RBPJ 的免疫荧光水平增强 (图 4-3)。

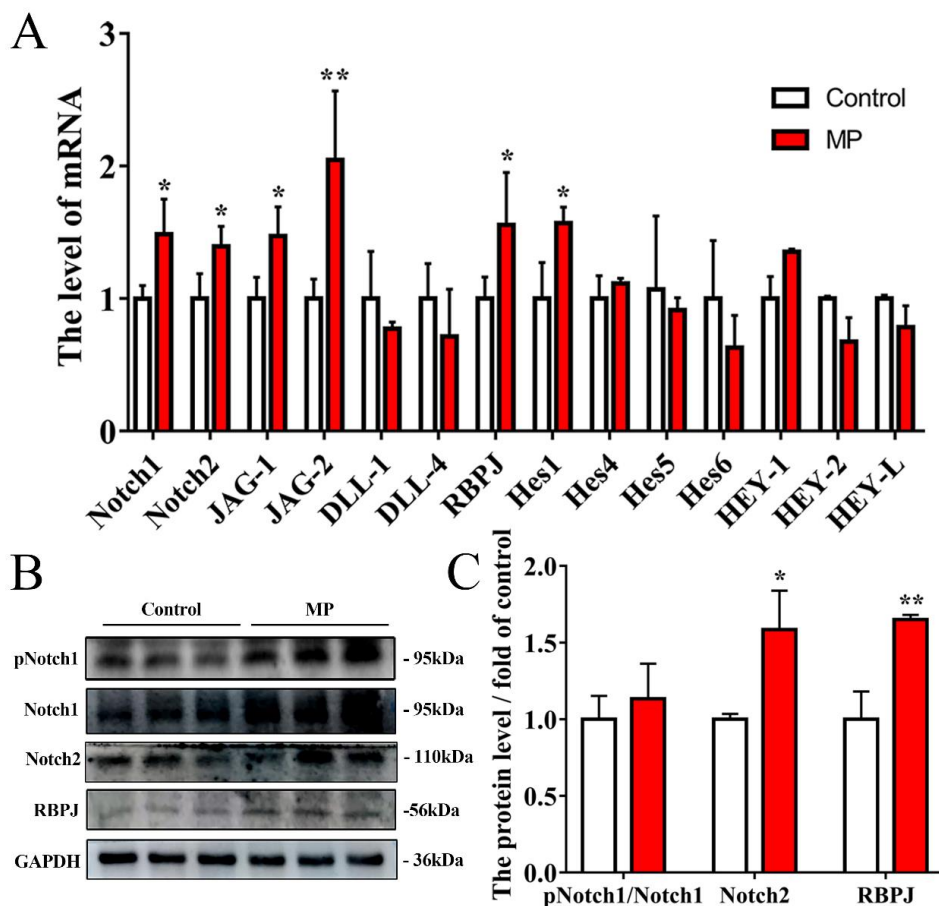


图 4-2 MP 处理 BMSCs 对 Notch 通路相关因子水平的影响

Fig. 4-2 MP treatment activates the effect of BMSCs on the levels of Notch pathway-related factors. MP 对 BMSCs 中 Notch 通路相关基因 (A) 和蛋白 (B~C) 表达水平的影响。所有结果以  $\text{mean}\pm\text{SD}$  表示。与对照组相比，\* $P<0.05$  表示差异显著，\*\* $P<0.01$  表示差异极其显著。

Effect of MP on Notch-related genes (A) and protein (B~C) expression levels in BMSCs. Data were presented as  $\text{mean}\pm\text{SD}$ . \* $P<0.05$  were considered statistically significant and \*\* $P<0.01$  means extremely significant, compared with control.

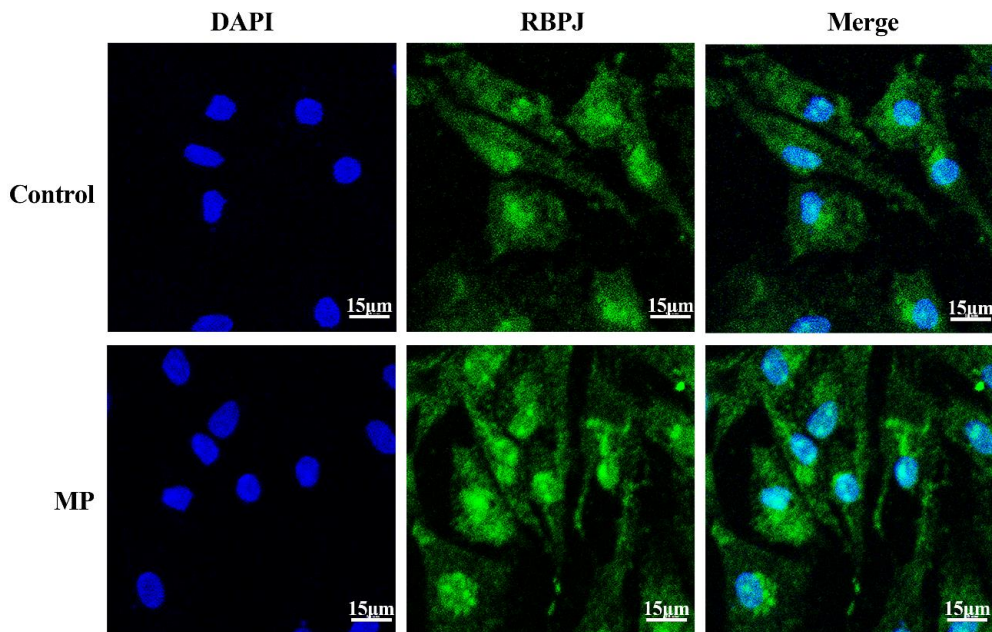


图 4-3 MP 对 BMSCs 中 RBPJ 免疫荧光强度的影响

Fig. 4-3 Effect of MP on the immunofluorescence intensity of RBPJ in BMSCs

用间接免疫荧光法观察 BMSCs 中 RBPJ 的表达水平，其中 Alexa Fluor 488 荧光（绿色）对 RBPJ 进行免疫荧光可视化展示，细胞核用 DAPI（蓝色）进行染色。比例尺：15  $\mu\text{m}$ 。

The expression level of RBPJ in BMSCs was observed by indirect immunofluorescence, where Alexa Fluor 488 fluorescence (green) was used to visualize RBPJ by immunofluorescence and the nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar: 15  $\mu\text{m}$ .

## 2.3 JAG-1 激活 Notch 通路对 MP 引起的细胞分化的调节作用

### 2.3.1 JAG-1 处理激活 BMSCs 中 Notch 通路

本研究发现 MP 处理能够激活 BMSCs 的 Notch 通路（图 4-2~3），为探究机制，随后采用 Notch 通路激活剂 Jagged-1（JAG-1）处理，观察其对 BMSCs 分化的调控作用。CCK-8 细胞活力检测结果（图 4-4A）显示 6.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 JAG-1 处理 24 h 对细胞增殖无显著影响（ $P>0.05$ ），而随着浓度的增加细胞存活率逐渐降低，因此本试验选用浓度为 6.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 JAG-1 用于接下来的试验。

BMSCs 暴露于 JAG-1 24 h 后，qRT-PCR 检测结果显示 Notch 配体（JAG-1、JAG-2 和 DLL-1）和 RBPJ 的 mRNA 水平较对照组显著上调（ $P<0.05$ ），且 Hes1 的 mRNA 水平极显著升高（图 4-4B， $P<0.01$ ）。此外，与对照组相比，JAG-1 组的 p-Notch1/Notch1 和 RBPJ 的蛋白水平也显著增加（图 4-4C~D， $P<0.05$ ），同时 MP 与 JAG-1 共处理与对照组相比能够显著增加 p-Notch1/Notch1 和 RBPJ 的蛋白表达水平（ $P<0.05$ ）。

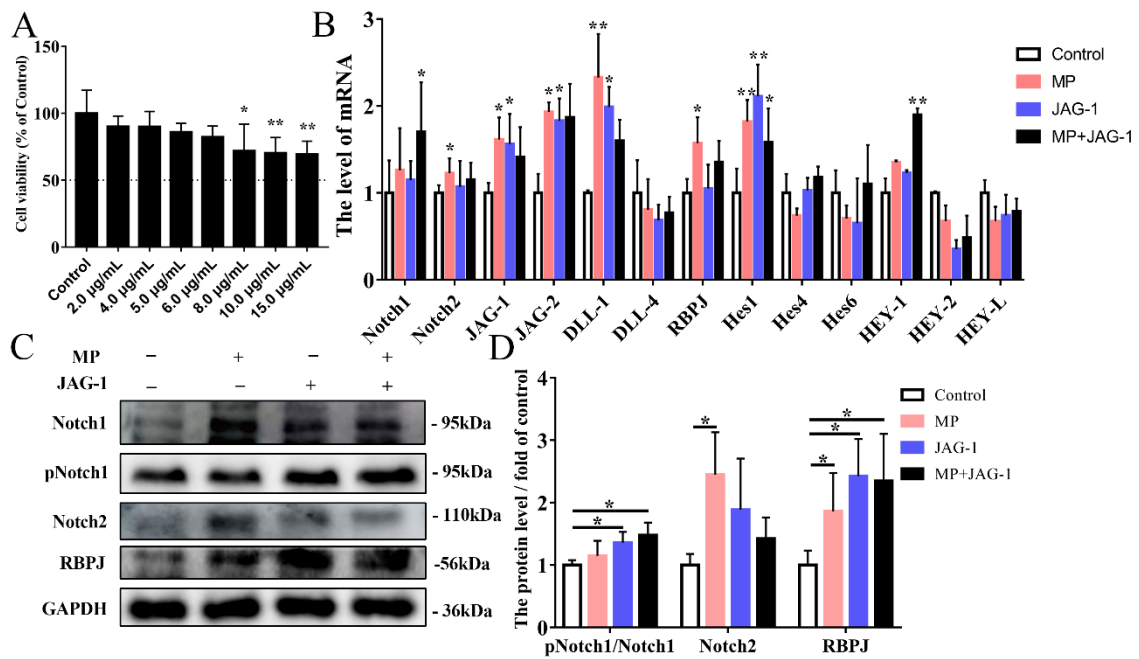


图 4-4 JAG-1 对 BMSCs 中 Notch 通路相关因子表达水平的影响

Fig. 4-4 Effect of JAG-1 on the expression levels of Notch pathway-related factors in BMSCs

A. 不同浓度 JAG-1 处理 24 h 后细胞活力; B. JAG-1 对 BMSCs 中 Notch 相关基因表达水平的影响; C~D. 通过 Western blotting 分析检测 p-Notch1、Notch1、Notch2 和 RBPJ 的蛋白表达。所有结果以 mean±SD 表示。\* $P<0.05$  表示差异显著, \*\* $P<0.01$  表示差异极其显著。

A. Cell viability under different JAG-1 concentrations in 24 h; B. Effect of JAG-1 on Notch-related gene expression levels in BMSCs; C~D. The protein expressions of p-Notch1, Notch1, Notch2 and RBPJ were detected by western blotting analysis. Data were presented as mean±SD. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

### 2.3.2 JAG-1 对 MP 处理的 BMSCs 成骨及软骨代谢水平的影响

qRT-PCR 检测结果显示, 与对照组相比, JAG-1 组 Aggrecan 的 mRNA 水平显著下降 (图 4-5A,  $P<0.05$ ), MP+JAG-1 组中 Aggrecan 和 Runx2 的蛋白水平显著下降 ( $P<0.05$ ), 而 MMP9 和 MMP13 的蛋白水平则显著升高 (图 4-5C~F,  $P<0.05$ )。

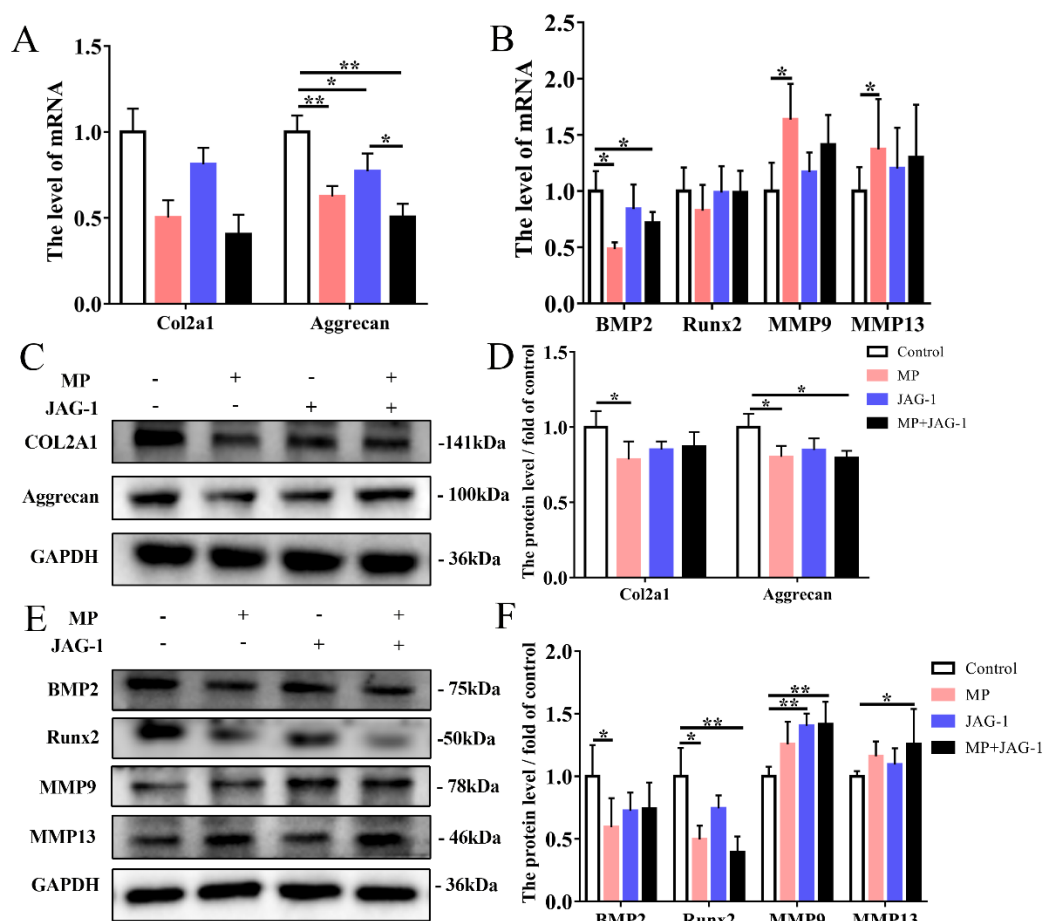


图 4-5 JAG-1 激活 Notch 通路对 MP 诱导的细胞分化的调节

Fig. 4-5 Regulation of MP-induced cell differentiation by JAG-1 activation of the Notch pathway

A, C~D. 通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测暴露于 MP 和 JAG-1 的 BMSCs 中 Col2a1 和 Aggrecan 的表达水平; B, E~F. 通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 JAG-1 对 BMSCs 中 BMP2、Runx2、MMP9 和 MMP13 的 mRNA 和蛋白水平的影响。所有结果以 mean±SD 表示。\* $P$ <0.05 表示差异显著, \*\* $P$ <0.01 表示差异极显著。

A, C~D. The expression levels of Col2a1 and Aggrecan in BMSCs exposed to MP and JAG-1 were determined by qRT-PCR and western blotting; B, E~F. Effects of JAG-1 on the mRNA and protein levels of BMP2, Runx2, MMP9 and MMP13 in BMSCs tested by qRT-PCR and western blotting. Data were presented as mean±SD. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01.

## 2.4 DAPT 抑制 Notch 通路对 MP 引起的细胞分化的调节作用

### 2.4.1 DAPT 对 MP 处理的 BMSCs 中 Notch 通路相关因子的影响

作为  $\gamma$  分泌酶抑制剂, DAPT 能够通过抑制  $\gamma$  分泌酶复合物对 Notch 受体的切割, 从而抑制 Notch 通路的激活。本试验采用 DAPT 抑制 Notch 信号通路的激活以探究其调控暴露于 MP 的 BMSCs 分化水平的相关机制。首先通过 CCK-8 法筛选出 DAPT 最

佳处理条件为 2.0  $\mu\text{M}$  处理 24 h, 将此处理条件用于接下来的试验。结果显示, 与对照组相比, 暴露于 DAPT 能够显著降低 BMSCs 中 Notch1 的 mRNA 水平 (图 4-6B,  $P<0.05$ )。与暴露于 MP 的 BMSCs 相比, MP 及 DAPT 共处理时, p-Notch1/Notch1 的蛋白水平极显著下降 ( $P<0.01$ )。同时暴露于 DAPT 与 MP 时, Notch 下游因子 RBPJ 的蛋白表达水平较对照组显著降低 (图 4-6C,  $P<0.05$ ), 提示 MP 处理激活的 Notch 通路被 DAPT 逆转。

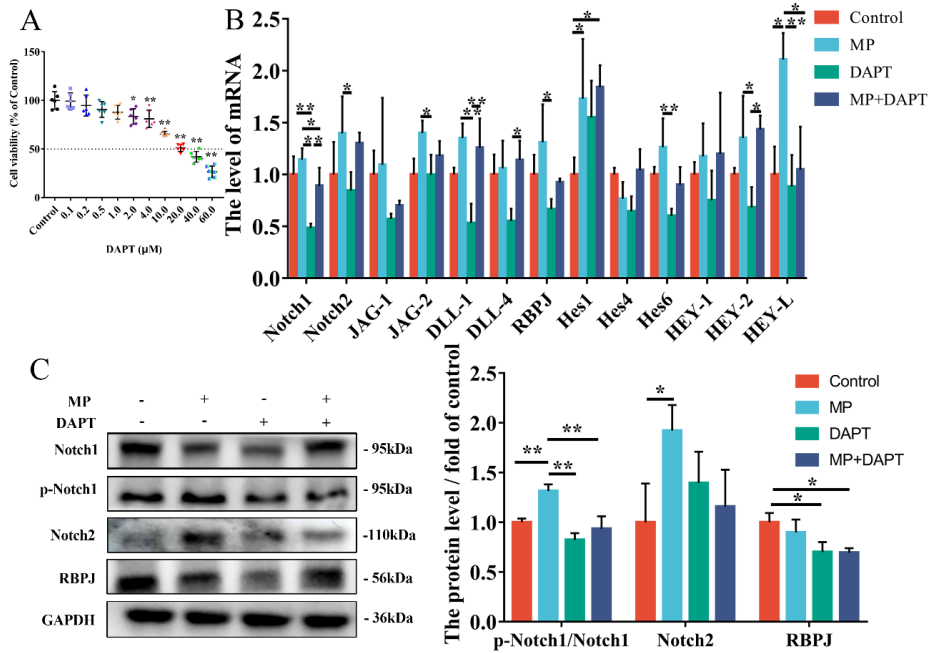


图 4-6 DAPT 对 BMSCs 中 Notch 通路相关因子表达水平的影响

Fig. 4-6 Effect of DAPT on the expression levels of Notch pathway-related factors in BMSCs

A. 不同浓度 DAPT 处理 24 h 后细胞存活率; B. DAPT 对 BMSCs 中 Notch 相关基因表达水平的影响; C. 通过 Western blotting 分析检测 p-Notch1、Notch1、Notch2 和 RBPJ 的蛋白表达。所有结果以  $\text{mean}\pm\text{SD}$  表示。 $*P<0.05$  表示差异显著,  $**P<0.01$  表示差异极其显著。

A. Cell viability under different DAPT concentrations in 24 h; B. Effect of DAPT on Notch-related genes expression levels in BMSCs; C. The protein expressions of p-Notch1, Notch1, Notch2 and RBPJ were detected by western blotting analysis. Data were presented as  $\text{mean}\pm\text{SD}$ .  $*P<0.05$  were considered statistically significant and  $**P<0.01$  means extremely significant.

#### 2.4.2 DAPT 能够缓解 MP 引起的 BMSCs 成骨及成软骨分化水平变化

本试验检测了 DAPT 对 MP 暴露引起的 BMSCs 成骨及软骨代谢水平。qRT-PCR 检测结果显示, MP+DAPT 组与 MP 组相比, Col2a1 及 Runx2 的 mRNA 水平极显著升高 ( $P<0.01$ )、Aggrecan 及 BMP2 的 mRNA 水平显著上调 (图 4-7A~B,  $P<0.05$ ),

而 MMP9 的转录水平显著下降 ( $P<0.05$ ), MMP13 的 mRNA 水平极显著下降 (图 4-7B,  $P<0.01$ )。Western blotting 检测结果显示成骨关键蛋白 BMP2 和 MMP13 的蛋白表达水平与转录水平变化一致, 即 DAPT 与 MP 共处理组 BMP2 蛋白水平较 MP 单独处理组显著升高 ( $P<0.05$ ), 而 MMP13 蛋白表达水平极显著下降 (图 4-7E~F,  $P<0.01$ )。这一结果提示 DAPT 能够缓解 MP 暴露引起的 BMSCs 成骨代谢水平变化。

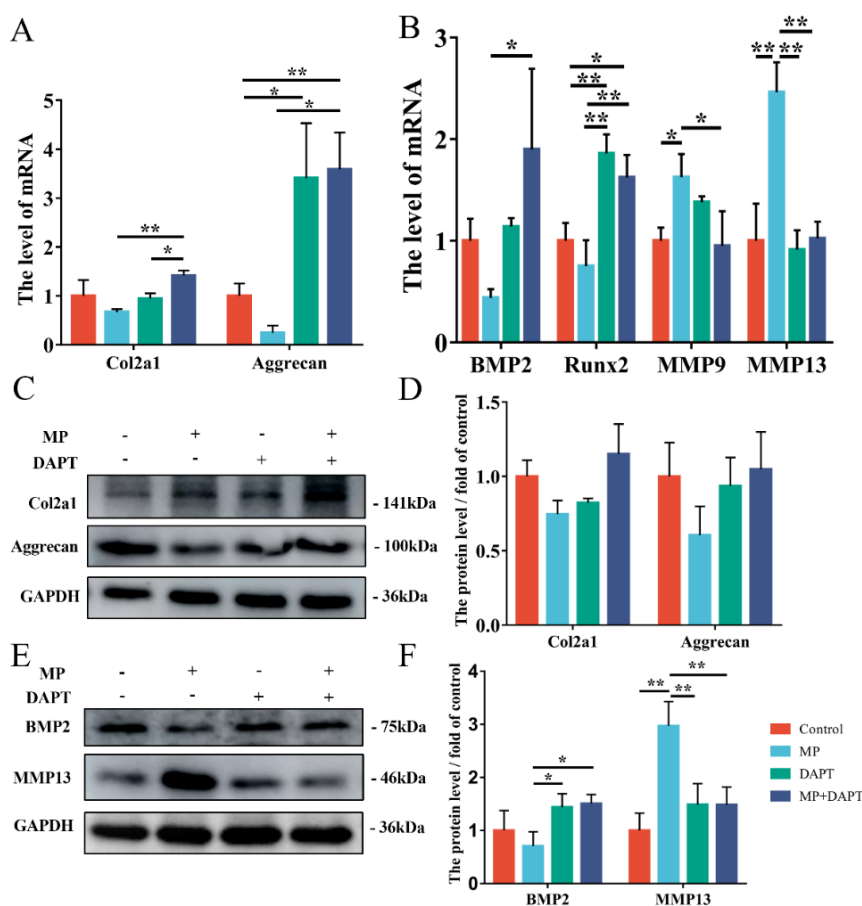


图 4-7 DAPT 通过抑制 Notch 通路调节 MP 诱导的 BMSCs 分化水平变化

Fig. 4-7 DAPT regulates MP-induced cell differentiation by inhibiting the Notch pathway

A, C~D. 通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测暴露于 MP 和 DAPT 的 BMSCs 中 Col2a1 和 Aggrecan 的表达水平; B. 通过 qRT-PCR 检测 DAPT 对 BMSCs 中 BMP2、Runx2、MMP9 和 MMP13 的 mRNA 水平的影响; E~F. BMSCs 中 BMP2 及 MMP13 的蛋白水平。所有结果以 mean±SD 表示。\* $P<0.05$  表示差异显著, \*\* $P<0.01$  表示差异极显著。A, C~D. The expression levels of Col2a1 and Aggrecan in BMSCs were determined by qRT-PCR and western blotting; B. Effects of DAPT on the expression levels of BMP2, Runx2, MMP9 and MMP13 in BMSCs tested by qRT-PCR; E~F. The protein levels of BMP2 and MMP13 in BMSCs. Data were presented as mean±SD. \* $P<0.05$  were considered statistically significant and \*\* $P<0.01$  means extremely significant.

### 3 讨论

BMSCs 在骨代谢稳态中的作用与其成骨和成脂分化的平衡密切相关 (Hernigou et al., 1999; Li et al., 2005)。FHN 特征是关节组成骨的破坏和软骨变性 (Bruderer et al., 2014)。FHN 的发病机制尚不完全清楚, FHN 患者可观察到股骨头近端 BMSCs 或其他祖细胞的减少或分化方向改变 (Aldahmash et al., 2012; Feng et al., 2010; Jin et al., 2016; Jones et al., 2008; Lee et al., 2006; Maruyama et al., 2019)。本课题组前期研究发现自发性 FHN 肉鸡发生脂质代谢紊乱, 软骨稳态失衡, 细胞外基质 (ECM) 形成减少、软骨细胞异常凋亡 (Fan et al., 2021; Huang et al., 2010)。成骨细胞数量的减少和软骨的退化可能是 FHN 发生的主要原因 (Hernigou et al., 1997)。

本试验探究了 FHN 肉鸡中 Notch 通路对 BMSCs 分化的调控机制。Notch 通路是一个高度保守的信号传导途径, 通过 Notch 受体和邻近细胞上的配体之间的直接关联进行信号传导 (Oldershaw et al., 2008)。本研究发现自发性 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 的 Notch 通路被激活, 同时体外 MP 处理的 BMSCs 细胞显示了同样的结果。Notch 信号通路对 MSCs 分化的调节有两种途径 (Ongaro et al., 2016)。Notch 信号通路促进骨源细胞矿化 (Díaz-Tocados et al., 2017; Osathanon et al., 2019)。Díaz 等研究发现激活 Notch 通路能够促进 MSCs 的成骨分化 (Díaz-Tocados et al., 2017)。Notch 下游靶基因 Hes/HEY1 过表达能够通过调节 Runx2, 从而促进 MSCs 的成骨分化 (Sharff et al., 2009), 说明 Notch 信号在骨形成中的积极作用。另外, Notch-RBPJ 对 BMP 诱导的 MSCs 分化有抑制作用 (Engin et al., 2008; Hilton et al., 2008; Shang et al., 2015)。衰老素-2 (PS-2) 敲除小鼠中小梁骨量显著增加, 并且 HEY1 能够抑制小鼠 MC2T3 和 C3C2 细胞中的 Runx2 转录活性, 这表明 Notch 信号对成骨的抑制作用 (Zamurovic et al., 2004)。Notch 信号传导影响骨折后的骨再生和重塑 (Feng et al., 2019; Hurtado et al., 2019)。Notch 受体在骨折愈合过程中上调, 抑制 Notch 受体延缓骨折愈合 (Hurtado et al., 2019), 同时 Notch 配体 JAG-1 也有类似作用 (Feng et al., 2019)。Osathanon 等人发现 JAG-1 能够促进人 MSCs 的成骨分化 (Osathanon et al., 2019)。本研究中 JAG-1 处理促进了 MP 诱导的 BMSCs 成骨功能减弱, 这一结果与 Oldershaw 等人的报道相一致, 即 JAG-1 处理引起 BMSCs 的 Notch 通路持续激活会抑制软骨分化 (Oldershaw et al., 2008)。由于  $\gamma$  分泌酶介导的切割是启动 Notch 信号传导的限速步骤, 因此  $\gamma$  分泌酶抑制剂 DAPT 是揭示 Notch 信号传导新功能的有效研究工具。Notch 信号传导被  $\gamma$  分泌酶抑制剂 (DAPT) 阻断, 可抑制下游靶基因的表达, 影响细胞生长和增殖 (Feng et al., 2019)。在本研究中, DAPT 通过抑制  $\gamma$  分泌酶的活性减弱 MP 处理诱导的 Notch 信号通路的激活水平, 同时通过提高成骨及软骨代谢相关因子 Col2a1、BMP2 及 Runx2 的蛋白及

mRNA 水平，降低基质金属蛋白酶（MMP9 及 MMP13）的表达，从而缓解 MP 诱导的 BMSCs 成骨和成软骨能力的下降。本研究揭示了 Notch 通路参与调控了 BMSCs 的成骨及成软骨分化（图 4-8）。

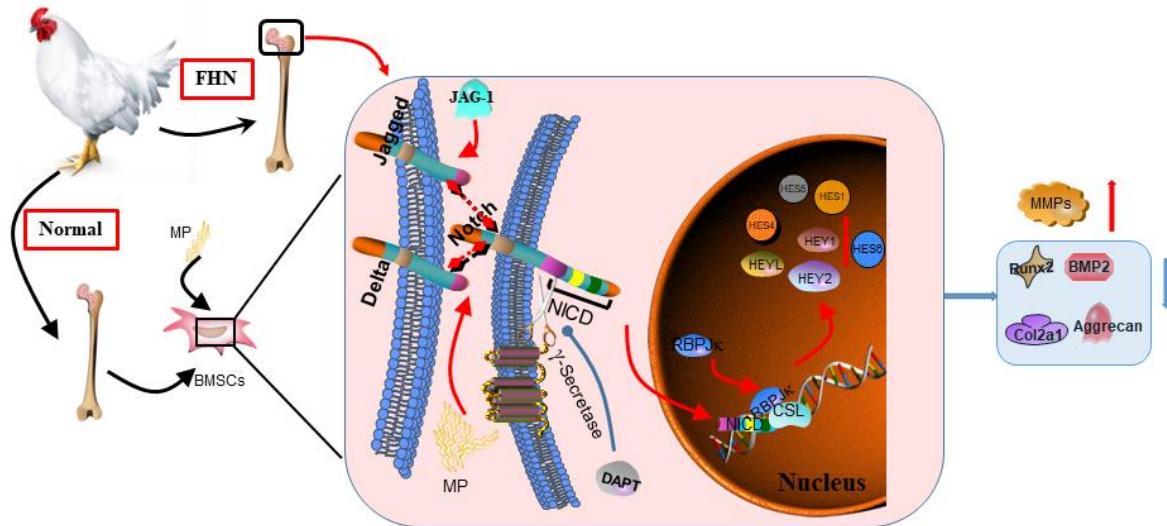


图 4-8 Notch-RBPJ 在 BMSCs 中对成骨和软骨生成代谢的调节示意图

Fig. 4-8 Schematic representation of the regulation of osteogenesis and chondrogenesis metabolism by Notch-RBPJ in BMSCs



## 第五章 Notch-RBPJ 通路通过 Col5a1 调控肉鸡 BMSCs 分化

V 型胶原 (Col5) 是一种调节原纤维形成的次要胶原蛋白 (Birk et al., 2011), 其亚型是由  $\alpha 1$  (V)、 $\alpha 2$  (V) 和  $\alpha 3$  (V) 链组合成的异源三聚体 (Sumpter et al., 2004; van Kuppevelt et al., 1995)。Col5 的主要亚型包含两条  $\alpha 1$  (V) 链和一个  $\alpha 2$  (V) 链, 分别由 Col5a1 和 Col5a2 基因编码。Col5 存在于多数结缔组织基质中, 具有多功能性 (Mak et al., 2016)。它在肺脏、皮肤、肾脏、脂肪组织及肝脏等纤维化疾病中研究较广。在肺病中, Col5 是存在于血管和支气管周围结缔组织中次要胶原蛋白, 是肺同种异体移植排斥期间免疫反应的靶标 (Haque et al., 2002; Mares et al., 2000; Yasufuku et al., 2002; Yasufuku et al., 2001)。在皮肤 (Wenstrup et al., 2004)、肌腱 (Connizzo et al., 2016) 和角膜 (Sun et al., 2011) 等组织中, Col5 的减少会导致组织机械性能下降。敲除小鼠肌肉干细胞的 Col5a1 能够导致细胞异常进入细胞周期并减少干细胞库 (Baghdadi et al., 2018)。然而, 关于 Col5 对骨代谢疾病的调控作用研究报道较少。

Notch 通路是一种进化上高度保守的细胞间信号传导机制, 决定细胞命运, 在维持机体发育平衡中起重要作用 (Bray, 2006; Hori et al., 2013)。由于 Notch 受体及配体是跨膜蛋白, 因此需要相邻细胞间的相互作用, 以激活通路 (Chen et al., 2014)。Notch 下游转录因子 Hes 和 HEY 家族作为转录抑制因子能够调节肌肉、神经、骨骼等多种组织中干细胞的功能 (Engin et al., 2010; Zanotti et al., 2012)。本研究发现自发性 FHN 肉鸡的 Notch 通路激活, 且 BMSCs 的成骨及成软骨分化水平下降, 而成脂分化能力提高。Notch 通路激活剂/抑制剂可改变 MP 暴露所引起的 BMSCs 成骨及成脂分化水平的变化, 提示 Notch 通路能够调控 BMSCs 的分化从而参与 FHN 的发生。相关研究表明 Notch-RBPJ 可调控 Col5a1 转录从而使卫星细胞异常进入细胞周期并维持其生态位 (Baghdadi et al., 2018)。同时还有研究表明肌腱干细胞中 Notch 通路的激活导致 Col5 在 mRNA 和蛋白质水平上的表达增加。因此为探究 Notch 通路对 BMSCs 分化调控的相关机制, 本文对自发性 FHN 肉鸡的股骨头组织进行了 RNA-seq 数据分析, 对筛选出的重要调控因子 Col5a1 的作用进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

主要仪器与试剂见第三章 1.1 及第四章 1.1, 其中用于转染 si-Col5a1 及 si-RBPJ 的试剂为购自常州百代生物科技有限公司的 RFect<sup>PM</sup> 原代细胞小核酸转染试剂, 间接免疫荧光试验所用抗体 anti-Col5a1 (Cat No. WLH4136) 来自沈阳万类生物科技有限公司, Western blotting 所用抗体 anti-Col5a1 (Cat No. AF6537) 购于碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 细胞培养

BMSCs 来源于健康肉鸡, 在含有 10%FBS、1%青霉素/链霉素的 DMEM/F12 培养基中, 使用 CO<sub>2</sub> 浓度为 5%, 温度为 37°C 培养箱中进行细胞培养。

### 1.3 细胞活力检测

使用 CCK-8 法检测细胞活力, 具体试验操作同第三章 1.4。

### 1.4 成骨诱导分化

对来源于 FHN 及健康肉鸡的 BMSCs 进行成骨诱导分化 21 d, 具体试验操作同第三章 1.5。

### 1.5 成软骨诱导分化

对来源于 FHN 及健康肉鸡的 BMSCs 进行成软骨诱导分化 21 d, 具体试验操作同第三章 1.6。

### 1.6 成脂诱导分化

对来源于 FHN 及健康肉鸡的 BMSCs 进行成脂诱导分化 21 d, 具体试验操作同第三章 1.7。

### 1.7 茜素红 S 染色

对成骨分化 21 d 的 BMSCs 进行茜素红 S 染色, 具体试验操作同第三章 1.8。

### 1.8 阿利新蓝染色

对成软骨分化 21 d 的 BMSCs 进行阿利新蓝染色, 具体试验操作同第三章 1.10。

## 1.9 油红 O 染色

对成脂分化 21 d 的 BMSCs 进行油红 O 染色，具体试验操作同第三章 1.11。

## 1.10 RNA 干扰

本试验通过 GenePharma 公司设计合成 RBPJ 的特异性 siRNA，其中 si-RBPJ 的序列为 5'-AUUUCACUCCAAAUUUACGTT-3'，si-Col5a1 的序列为 5'-UGGUAUCACAAGAACAACATT-3'，Negative control siRNA (NC) 的序列为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。BMSCs 分别以不同的密度接种于相应的细胞培养板内培养 24 h，培养至细胞密度达到 30%~50%时，参照 RFect<sup>PM</sup> 原代细胞小核酸转染试剂说明进行操作，其配置体系如表 5-1 所示。

表 5-1 RFect<sup>PM</sup> 原代细胞小核酸转染试剂配制表

Table 5-1 RFect<sup>PM</sup> primary cell small nucleic acid transfection reagent formulation system

Culture vessel (well)	Vol. of growth medium ( $\mu$ L)	Vol. Dilution ( $\mu$ L)	siRNA (pmol)	RFect <sup>PM</sup> ( $\mu$ L)
96-well	100	2 $\times$ 10	1.2	0.4
48-well	250	2 $\times$ 25	3.0	1.0
24-well	500	2 $\times$ 50	6.0	2.0
12-well	1000	2 $\times$ 100	12.0	4.0
6-well	2500	2 $\times$ 250	30.0	10.0

## 1.11 FHN 肉鸡股骨头组织及 BMSCs 中总 RNA 的提取及 qRT-PCR 检测

提取 FHN 及正常肉鸡股骨头组织及 BMSCs 中总 RNA，并使用 qRT-PCR 检测其 mRNA 水平，具体试验操作步骤见第二章 1.8，第三章 1.12。其中 Col5a1 的引物序列为 Forward : 5'-TGCTTATGTTGCCTTCCGC-3'，Reverse : 5'-CTTCGCCCTTCAATCCTCCA-3'。

## 1.12 FHN 肉鸡股骨头组织及 BMSCs 中 Western blotting 蛋白表达检测

提取 FHN 及正常肉鸡股骨头组织及 BMSCs 中总蛋白，并使用 Western blotting 检测蛋白水平，具体试验操作同第四章 1.14。

## 1.13 间接免疫荧光

对转染 si-Col5a1/si-RBPJ 的细胞进行间接免疫荧光染色，具体操作同第四章 1.11。

## 1.14 数据统计分析

SPSS 25.0 对所有试验数据进行统计分析。比较分析两组数据时使用独立样本  $t$  检验。使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 比较分析多组数据, 数值采用平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 的形式表示。使用 Graph Pad Prism 7.0 软件进行图片制作。对于所有分析, \* $P$ <0.05 表示差异显著, 具有统计学意义, \*\* $P$ <0.01 表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 FHN 肉鸡转录组学关键基因的筛选

#### 2.1.1 蛋白互作网络图的绘制

为探究 Notch 通路调控 MP 处理引起的 BMSCs 分化水平改变的相关机制, 对本课题组获得的自发性 FHN 肉鸡股骨头组织的 RNA-seq 数据 (范如彬, 2022) 进行整理分析。首先通过在线网站 String 对 RNA-seq 数据进行分析, 并进行蛋白互作网络图的绘制, 结果如图 5-1 所示, 本次分析共涉及 865 个差异表达基因, 其中上调基因 246 个, 下调基因 619 个。

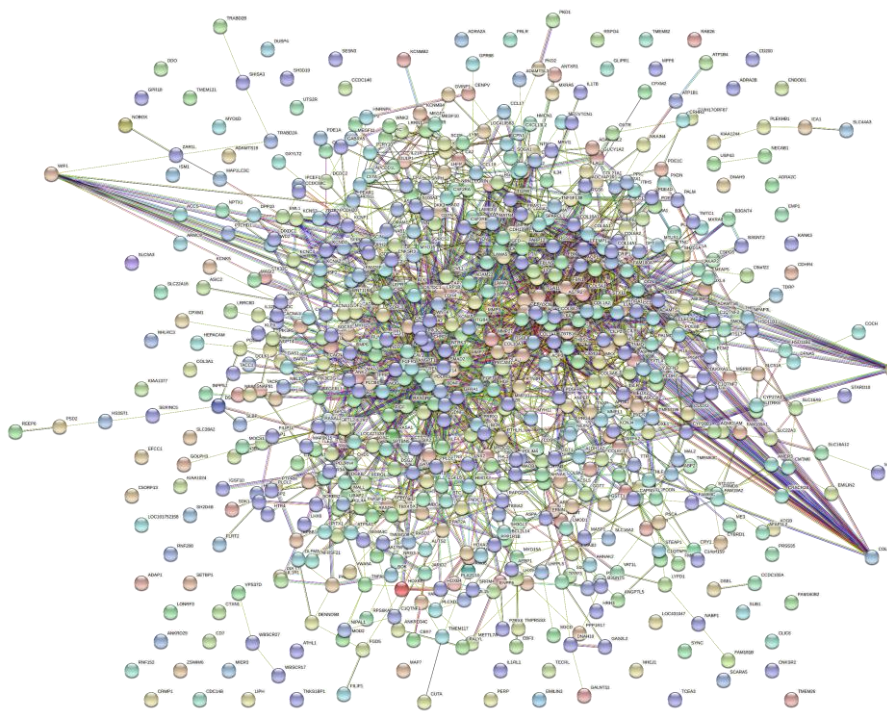


图 5-1 蛋白互作网络图

Fig. 5-1 Protein interactions network diagram

2.1.2 关键基因的筛选

通过 Cytoscape 3.7.2 软件进行 RNA-seq 数据分析，从中选取前 10 位差异表达基因（图 5-2A），分别为 BDNF、BMP4、SMAD2、DCN、FBN1、COL1A1、COL1A1、Col5a1、COL6A1 及 COL6A3。同时通过 Mcode 模块筛选出前两个功能模块（图 5-2B~C），所包含基因分别为 COL1A1、BMP4、COL6A3、SMAD2、BDNF、COL1A2、DCN、COL6A1、FBN1、LOX、FSTL1、SPARC、COL6A2、COL1A2、THBS2、COL16A1、COL8A1、POSTN、FBN2、ITGA11、LAMA5、LAMA3、LAMB、LAMB3、ITGB4、LAMA2、Col5a1 及 Col5a2，并通过韦恩图交叉筛选出关键基因 Col5a1（图 5-3）。

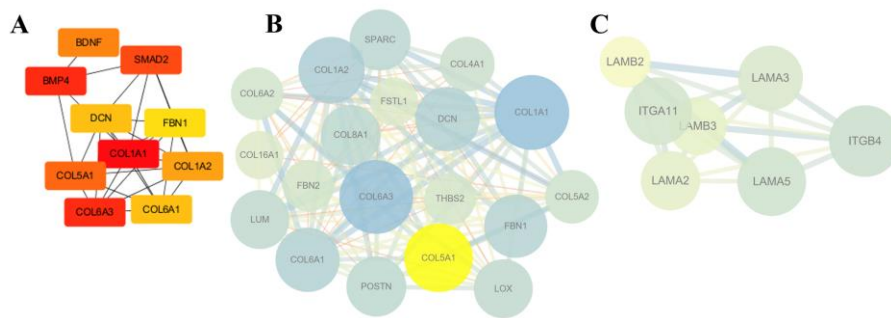


图 5-2 通过 Cytoscape 筛选关键基因

Fig. 5-2 Key genes were screened by Cytoscape

A. 通过 Cytoscape-cytoHubba 筛选出前十位关键基因；B~C. 通过 Cytoscape-Mcode 选出前两个功能模块。  
 A. The top ten key genes were screened by Cytoscape-cytoHubba; (B~C) the top two functional modules were selected by Cytoscape-Mcode.

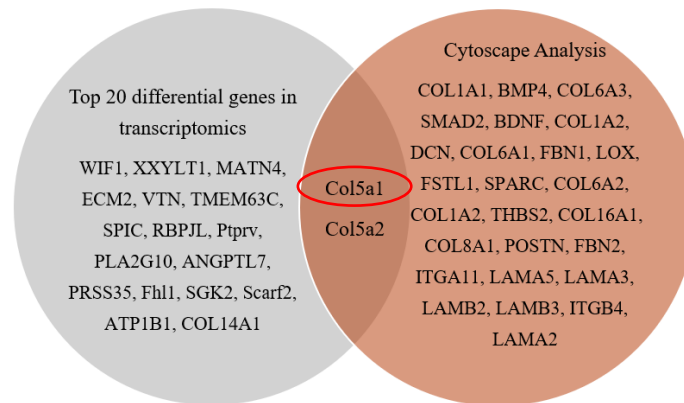


图 5-3 转录组筛选的前 20 位基因与 Cytoscape 筛选出的功能模块的韦恩图

Fig. 5-3 Venn diagram of the top 20 genes of the transcriptome screen with the functional modules screened by Cytoscape

## 2.2 FHN 肉鸡股骨头组织中 Col5a1 基因及蛋白水平变化

Col5a1 与多种脏器疾病相关。本试验检测 FHN 肉鸡股骨头组织中 Col5a1 的 mRNA 及蛋白水平变化 (图 5-4), 发现在来源于 FHN 肉鸡的股骨头组织中 Col5a1 的 mRNA 表达水平显著下降 ( $P<0.05$ ), 而蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.05$ )。这可能是由于转录后降解、翻译后修饰等多种因素影响了 mRNA 翻译为蛋白的过程, 从而造成 Col5a1 的基因转录及蛋白翻译水平不一致。由于 FHN 肉鸡股骨头组织中 Col5a1 表达发生了显著变化, 因此对 RNA-seq 分析获得的差异表达基因进行了 Col5a1 的关联基因筛选。结果如图 5-5 所示, Col5a1 与 Notch 信号通路下游转录因子 RBPJ 具有强关联性, 且本文之前的研究显示 RBPJ 上游的 Notch 通路对 BMSCs 的分化作用有关键调控作用, 因此本试验进一步探究了 Notch-RBPJ 通路对 Col5a1 的调节及 Col5a1 对 BMSCs 分化的影响。

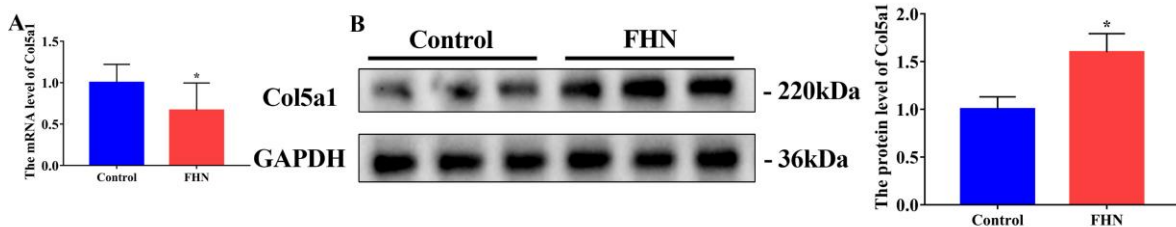


图 5-4 FHN 肉鸡及正常肉鸡股骨头组织 Col5a1 的 mRNA (A) 及蛋白 (B) 水平

Fig. 6-4 The mRNA (A) and protein (B) levels of Col5a1 in femoral head tissues of FHN broilers and normal broilers

所有结果以 mean±SD 表示。与对照组相比, \* $P<0.05$  表示差异显著, \*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

Data were presented as mean±SD. \* $P<0.05$  were considered statistically significant and \*\* $P<0.01$  means extremely significant, compared with control.

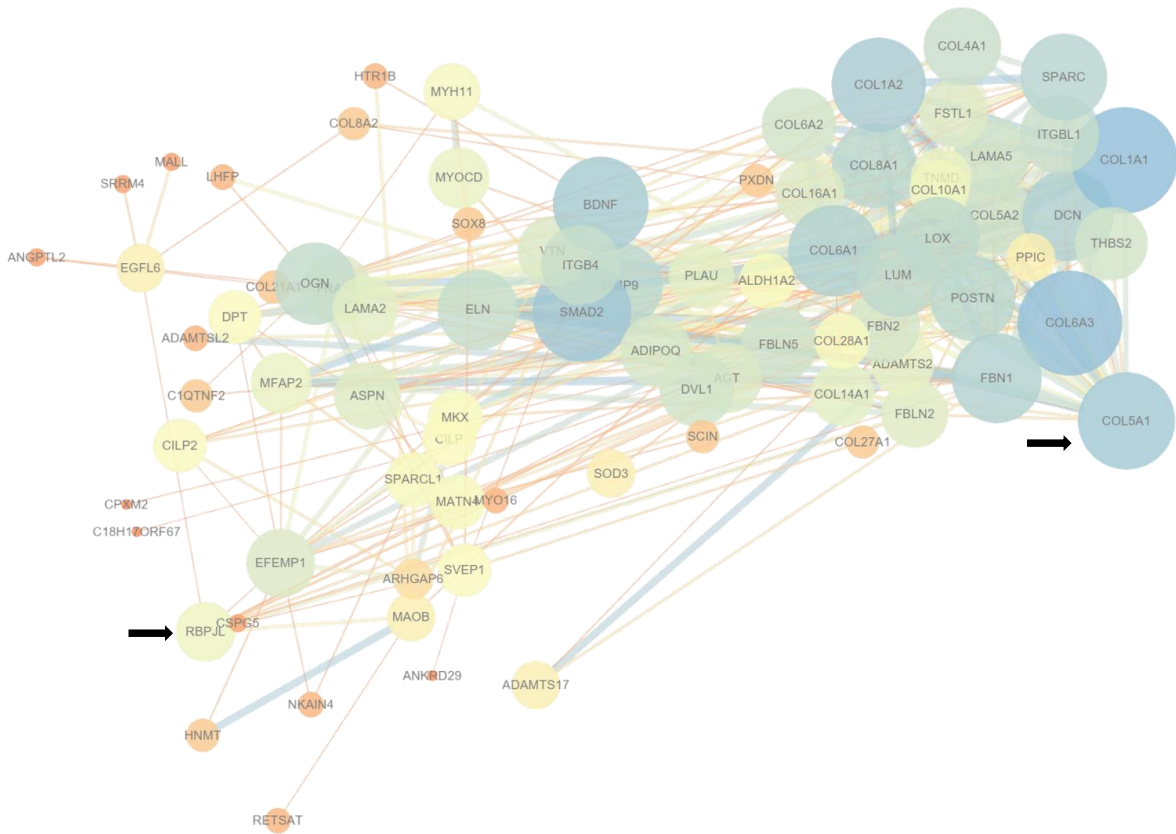


图 5-5 Col5a1 的关联基因

Fig. 5-5 Genes associated with Col5a1

### 2.3 MP 处理的 BMSCs 中 Col5a1 基因及蛋白水平变化

由于 FHN 肉鸡的股骨头组织中 Col5a1 发生了显著变化，因此本试验检测了 MP 处理的 BMSCs 中 Col5a1 的表达水平。结果显示，MP 处理后的 BMSCs 中 Col5a1 的 mRNA 及蛋白表达水平与 FHN 肉鸡的股骨头组织中的变化一致（图 5-6A~B），MP 处理增强 Col5a1 的免疫荧光强度（图 5-6C），说明 MP 处理的 BMSCs 与 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 呈现了相同的 Col5a1 表达变化。

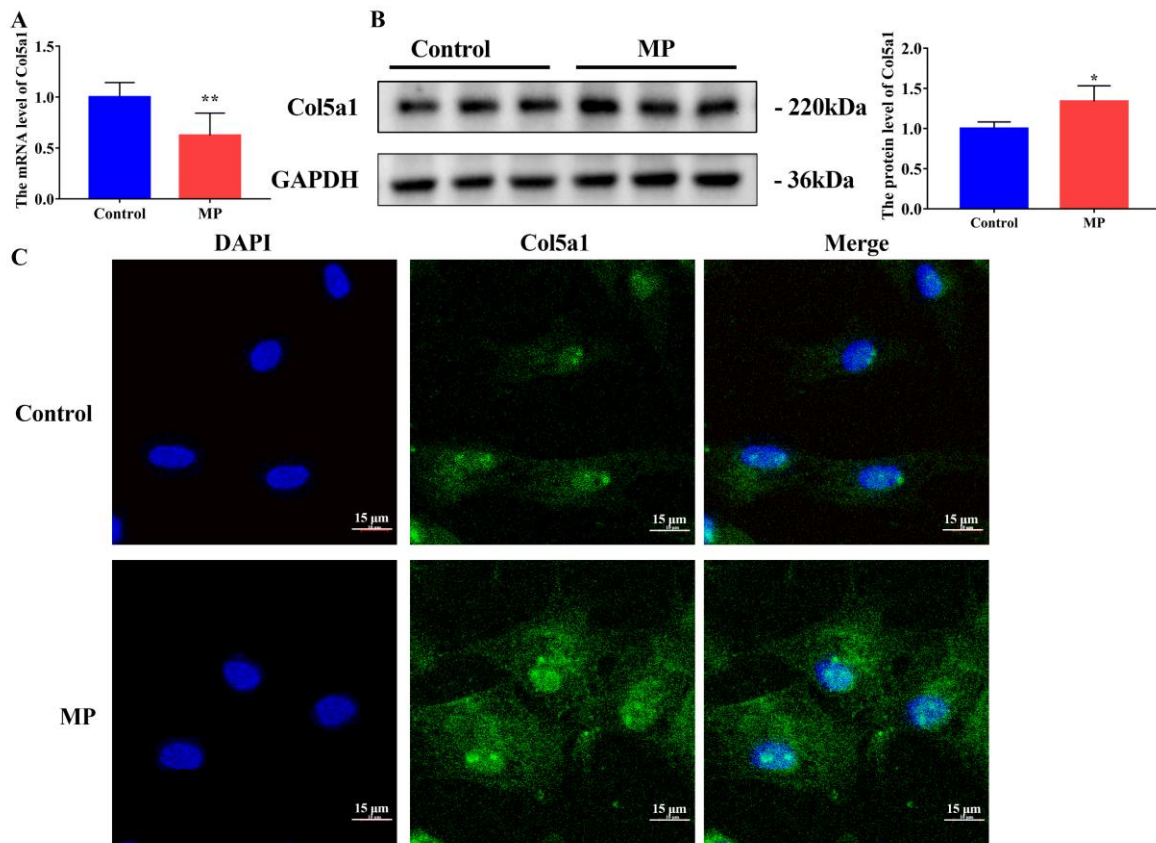


图 5-6 MP 处理的 BMSCs 中 Col5a1 水平变化

Fig. 5-6 Changes in Col5a1 levels in BMSCs exposed to MP

A~B. 通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测暴露于 MP 的 BMSCs 中 Col5a1 的表达水平；C. 使用间接免疫荧光法观察 MP 处理的 BMSCs 中 Col5a1 的表达水平，其中 Alexa Fluor 488 荧光（绿色）对 Col5a1 进行免疫荧光可视化展示，细胞核用 DAPI（蓝色）进行染色，扫描并拍照。比例尺：15 μm。所有结果以 mean±SD 表示。与对照组相比，\* $P<0.05$  表示差异显著，\*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

A~B. The expression level of Col5a1 in BMSCs exposed to MP were detected by qRT-PCR and Western blotting; C. The expression level of Col5a1 in MP-treated BMSCs were observed by indirect immunofluorescence, where Alexa Fluor 488 fluorescence (green) was used to visualize Col5a1 by immunofluorescence, and the nuclei were stained with DAPI (blue), scanned and photographed. Scale bar: 15 μm. All results are expressed as mean±SD. Compared with the control, \* $P<0.05$  indicates significant difference and \*\* $P<0.01$  indicates extremely significant.

## 2.4 Col5a1 对 MP 处理的 BMSCs 分化水平的调节作用

### 2.4.1 si-Col5a1 转染效率

为明确 Col5a1 对 BMSCs 分化水平的影响，本试验设计并合成了 Col5a1 的小干扰 RNA (si-Col5a1)。为验证 si-Col5a1 的转染效率，首先通过 qRT-PCR 检测转染

si-Col5a1 后 BMSCs 中 Col5a1 转录水平, 结果 (图 5-7A) 显示 si-Col5a1 的转染效率为 58.81%。Western blotting 及免疫荧光实验检测 si-Col5a1 对蛋白表达的干扰程度, 结果显示转染 si-Col5a1 能够极显著降低 Col5a1 蛋白表达水平 ( $P<0.01$ ) 并能够减弱其免疫荧光强度 (图 5-7B~C)。

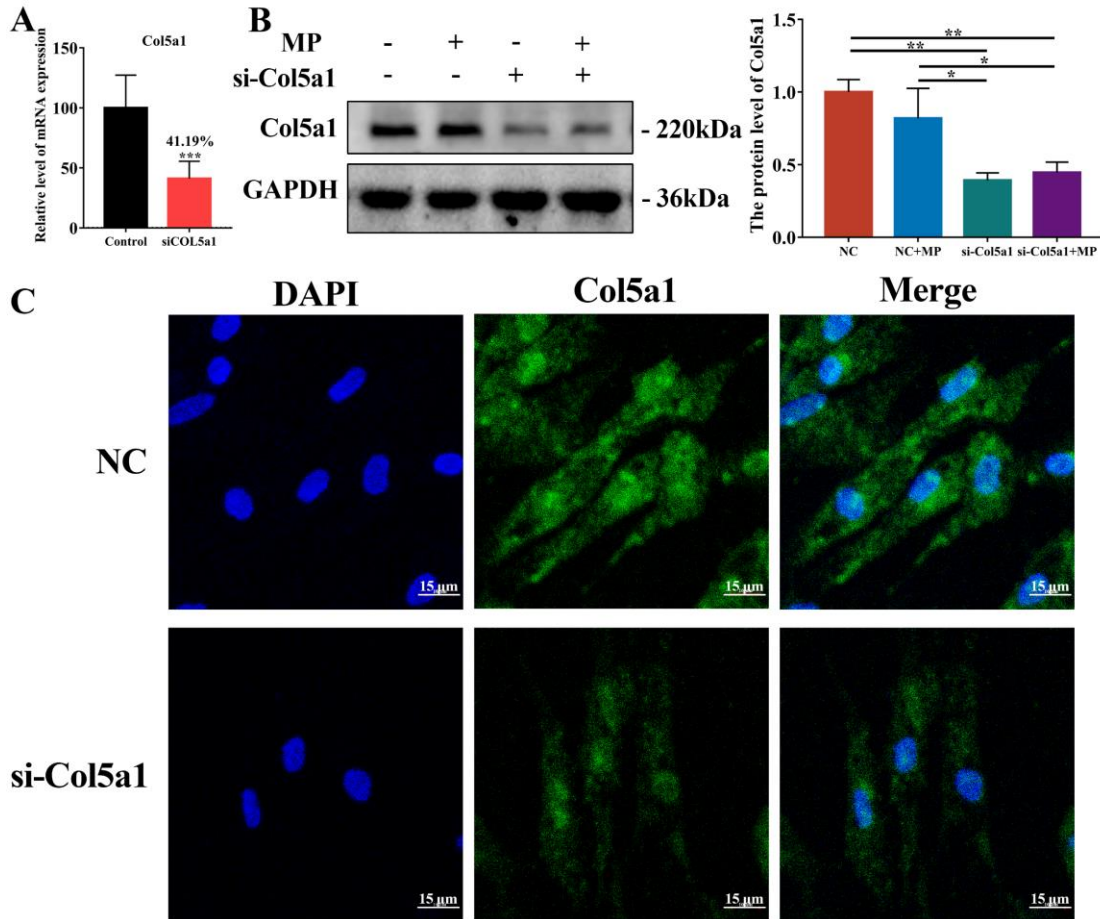


图 5-7 si-col5a1 转染效率

Fig. 5-7 The transfection efficiency of si-Col5a1

A. si-Col5a1 转染效率; B. si-RBPJ 对 BMSCs 中 RBPJ 蛋白表达水平的影响; C. 转染 si-Col5a1 后, 用间接免疫荧光法观察细胞 Col5a1 的表达水平, 其中 Alexa Fluor 488 荧光 (绿色) 对 Col5a1 进行免疫荧光可视化展示, 细胞核用 DAPI (蓝色) 进行染色, 扫描并拍照。比例尺: 15  $\mu\text{m}$ 。所有结果以 mean $\pm$ SD 表示。\* $P<0.05$  表示差异显著, \*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

A. Transfection efficiency of si-Col5a1; B. Effect of si-RBPJ on the expression level of RBPJ protein in BMSCs; C. After transfection of si-Col5a1, the expression level of cellular Col5a1 was observed by indirect immunofluorescence, in which Alexa Fluor 488 fluorescence (green) was used to visualize Col5a1 by immunofluorescence, and the nuclei were stained with DAPI (blue), scanned and photographed. Scale bar: 15  $\mu\text{m}$ . All results are expressed as mean $\pm$ SD. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

## 2.4.2 Col5a1 对 BMSCs 中 Notch 通路相关蛋白的调控作用

RNA-seq 分析结果显示 Col5a1 与 RBPJ 具有强关联性 (图 5-5), 因此本试验通过转染 si-Col5a1 干扰 BMSCs 中 Col5a1 的表达以探究其对 Notch 通路的调控及细胞分化的影响。如图 5-8 所示, 转染 si-Col5a1 后, 并未改变 MP 所引起 BMSCs 中 Notch 受体 Notch2 及下游转录因子 RBPJ 蛋白水平升高的变化 ( $P>0.05$ ), 并且未对 RBPJ 的免疫荧光强度产生影响 (图 5-9), 提示 Col5a1 对 Notch-RBPJ 通路无显著的调控作用, 因此推测其可能位于 Notch-RBPJ 通路下游。

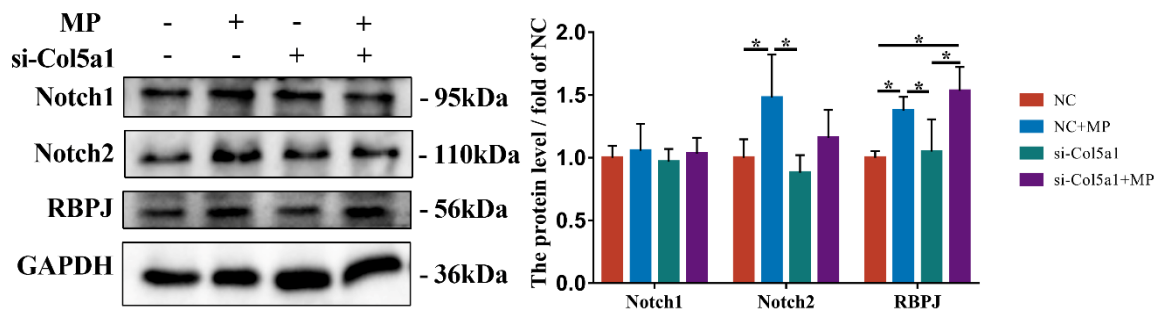


图 5-8 转染 si-Col5a1 对 Notch 通路相关蛋白水平的影响

Fig. 5-8 Effect of transfection of si-Col5a1 on Notch pathway-related protein levels

所有结果以 mean±SD 表示。\* $P<0.05$  表示差异显著。

All results are expressed as mean±SD. \* $P<0.05$  indicates significant difference.

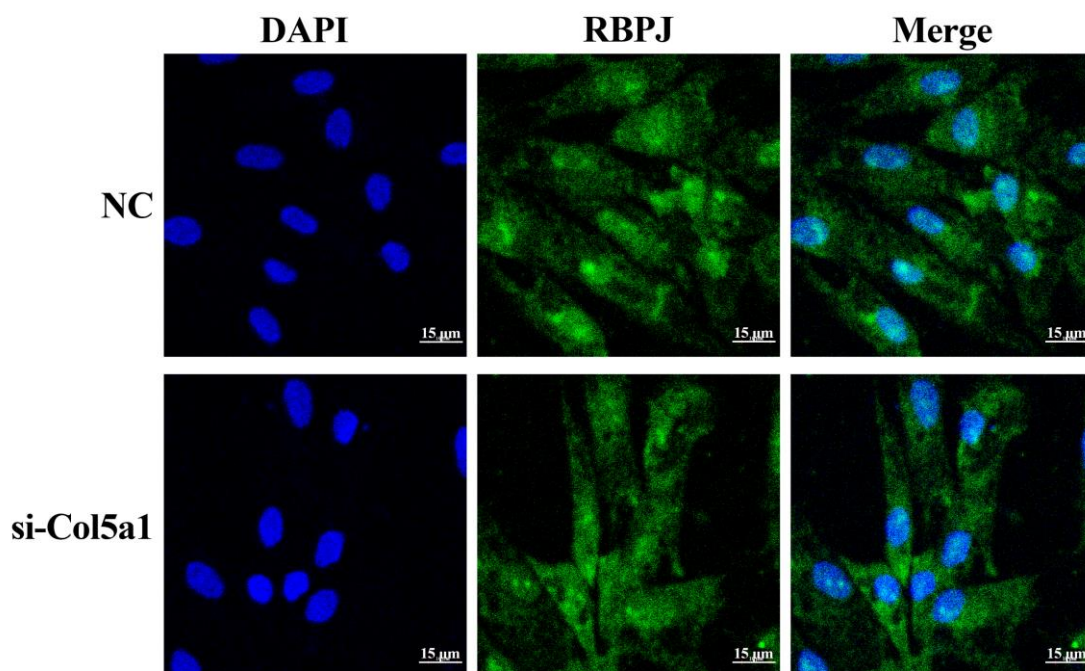


图 5-9 转染 si-Col5a1 对 RBPJ 免疫荧光强度的影响

Fig. 5-9 Effect of transfection with si-Col5a1 on the immunofluorescence intensity of RBPJ

转染 si-Col5a1 后,用间接免疫荧光法观察 BMSCs 中 RBPJ 的表达水平,其中 Alexa Fluor 488 荧光(绿色)对 RBPJ 进行免疫荧光可视化展示,细胞核用 DAPI(蓝色)进行染色,扫描并拍照。比例尺:15  $\mu\text{m}$ 。

After transfection with si-Col5a1, the expression level of RBPJ in BMSCs was observed by indirect immunofluorescence, in which Alexa Fluor 488 fluorescence (green) was used to visualize RBPJ by immunofluorescence, and cell nuclei were stained with DAPI (blue), scanned and photographed. Scale bar: 15  $\mu\text{m}$ .

#### 2.4.3 Col5a1 对 MP 处理的 BMSCs 分化水平的影响

由于 Col5a1 是 FHN 肉鸡的股骨头组织 RNA-seq 数据分析后筛选出的关键基因,因此通过转染 si-Col5a1 检测 BMSCs 成骨及软骨代谢相关蛋白水平的变化,可明确 Col5a1 对 BMSCs 分化的影响。相关结果(图 5-10~11)表明,干扰 Col5a1 基因表达能够逆转 MP 处理造成的成骨代谢水平降低的结果,即 si-Col5a1 能够逆转 MP 所造成的细胞中 BMP2 蛋白水平下降及 MMP9 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ ),恢复 BMSCs 的成骨能力。

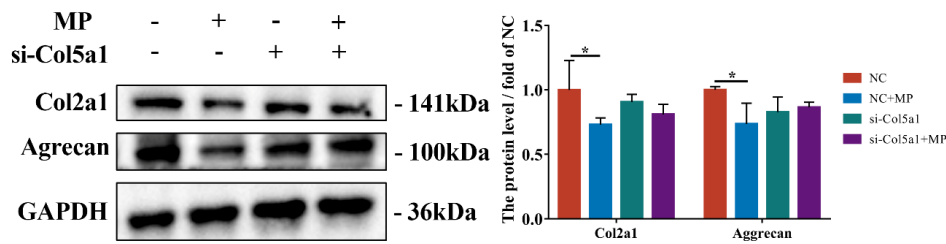


图 5-10 Col5a1 对 MP 引起的 BMSCs 软骨代谢相关蛋白水平的影响

Fig. 5-10 Effect of Col5a1 on the levels of MP-induced cartilage metabolism-related proteins in BMSCs

所有结果以 mean±SD 表示。\* $P < 0.05$  表示差异显著。

All results are expressed as mean±SD. \* $P < 0.05$  indicates significant difference.

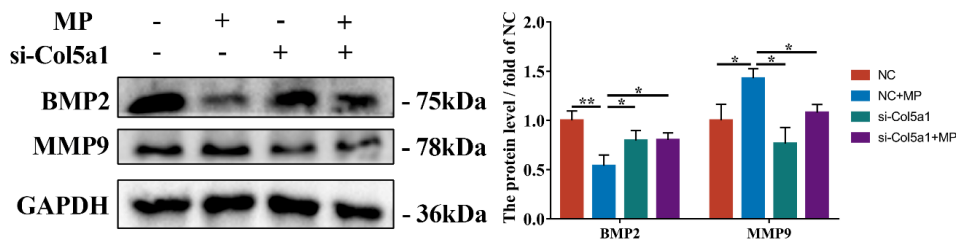


图 5-11 Col5a1 对 MP 引起的 BMSCs 成骨相关蛋白水平的影响

Fig. 5-11 Effect of Col5a1 on MP-induced osteogenic-related protein levels in BMSCs

所有结果以 mean±SD 表示。\* $P < 0.05$  表示差异显著，\*\* $P < 0.01$  表示差异极显著。

All results are expressed as mean±SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

## 2.5 Notch 通路调控 Col5a1 的表达

本试验研究发现干扰 Col5a1 的表达能够逆转 MP 引起的 BMSCs 成骨能力下降，虽然图 5-8~9 结果显示 Col5a1 可能对 Notch 通路无调控作用，但推测其可能位于通路的下游。因此本试验进一步探究 JAG-1/DAPT/转染 si-RBPJ，多途径调控 Notch 通路以探究 Notch 通路与 col5a1 的调控作用及在 BMSCs 分化的影响机制。

### 2.5.1 JAG-1 及 DAPT 对 BMSCs 中 Col5a1 蛋白水平的影响

采用 Notch 通路激活剂 JAG-1 或抑制剂 DAPT 处理细胞，检测 Col5a1 的蛋白水平变化。结果表明，JAG-1 处理的 BMSCs 中 Col5a1 的蛋白水平较对照组显著升高(图 5-12,  $P < 0.05$ )，而 DAPT 处理的细胞中 Col5a1 的蛋白水平虽无显著变化，但呈下降趋势(图 5-13,  $P > 0.05$ )，说明 Notch 通路能够调控 Col5a1 的表达，但相关途径仍需继续探究。

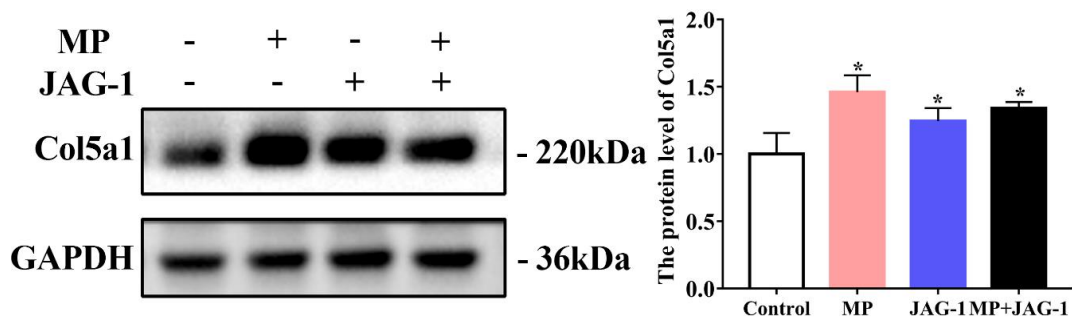


图 5-12 JAG-1 对 Col5a1 蛋白水平的影响

Fig. 5-12 Effect of JAG-1 on Col5a1 protein level

所有结果以 mean±SD 表示。\* $P<0.05$  表示差异显著。

All results are expressed as mean±SD. \* $P<0.05$  indicates significant difference.

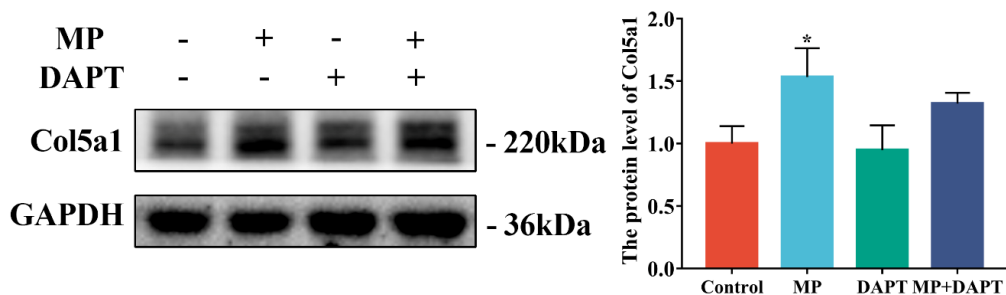


图 5-13 DAPT 对 Col5a1 蛋白水平的影响

Fig. 5-13 Effect of DAPT on Col5a1 protein level

所有结果以 mean±SD 表示。\* $P<0.05$  表示差异显著。

All results are expressed as mean±SD. \* $P<0.05$  indicates significant difference.

### 2.5.2 RBPJ 对 BMSCs 中 Col5a1 蛋白水平的调控作用

本试验通过转染 si-RBPJ 干扰 RBPJ 表达, 并采用 qRT-PCR、Western blotting 及免疫荧光染色等方法检测了 Col5a1 表达水平、细胞成骨及软骨代谢水平的变化。

qRT-PCR、Western blotting 及免疫荧光实验检测 si-RBPJ 的转染效率, 结果显示 si-RBPJ 的转染效率达到了 69.62% (图 5-14A), 转染 si-RBPJ 后显著抑制了 RBPJ 的蛋白水平 (图 5-14B~C,  $P<0.05$ ) 及免疫荧光强度 (图 5-15), 说明转染 si-RBPJ 能够显著干扰 RBPJ 的表达。检测转染 si-RBPJ 后对 Col5a1 蛋白水平的影响, 发现干扰 RBPJ 表达后, si-RBPJ+MP 组中 Col5a1 蛋白水平较 MP 组极显著减低 ( $P<0.01$ ), 转染 si-RBPJ 能够逆转 MP 处理引起的 BMSCs 中 Col5a1 蛋白水平升高的变化, 同时降低 BMSCs 中 Col5a1 的免疫荧光强度 (图 5-16), 提示 RBPJ 调控 Col5a1 的表达。

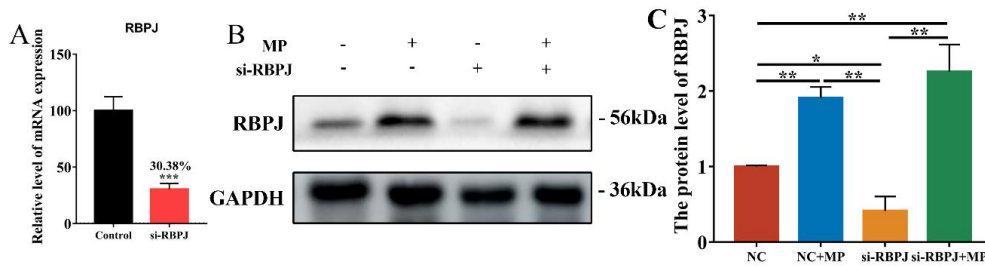


图 5-14 si-RBPJ 对 BMSCs 中 RBPJ 水平的影响

Fig. 5-14 Effect of si-RBPJ on RBPJ level in BMSCs

A. si-RBPJ 转染效率; B~C. si-RBPJ 对 BMSCs 中 RBPJ 蛋白表达水平的影响。所有结果以 mean±SD 表示。\* $P<0.05$  表示差异显著, \*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

A. The transfection efficiency of si-RBPJ. B~C. Effect of si-RBPJ on RBPJ protein expression level in BMSCs. All results are expressed as mean±SD. \* $P<0.05$  indicates significant difference and \*\* $P<0.01$  indicates highly significant difference.

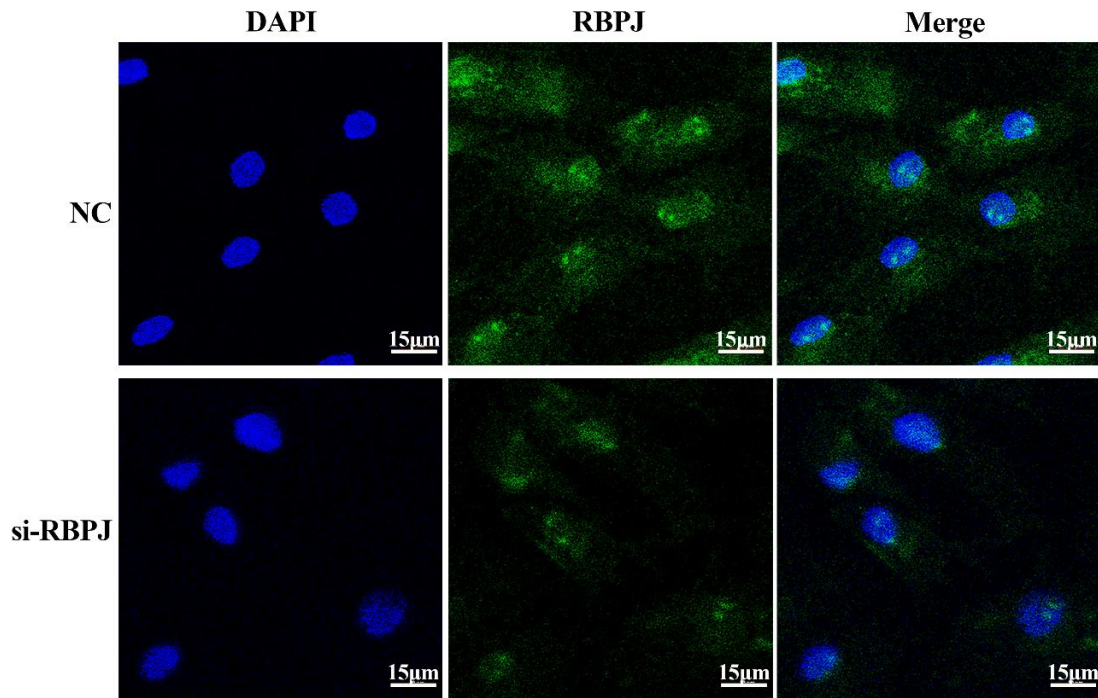


图 5-15 转染 si-RBPJ 对 BMSCs 中 RBPJ 免疫荧光强度的影响

Fig. 5-15 Effect of transfection with si-RBPJ on the immunofluorescence intensity of RBPJ in BMSCs  
转染 si-RBPJ 后, 用间接免疫荧光法观察 BMSCs 中 RBPJ 的表达水平, 其中 Alexa Fluor 488 荧光 (绿色) 对 RBPJ 进行免疫荧光可视化展示, 细胞核用 DAPI (蓝色) 进行染色, 扫描并拍照。比例尺: 15  $\mu\text{m}$ 。

After transfection with si-RBPJ, the expression level of RBPJ in BMSCs was observed by indirect immunofluorescence, in which Alexa Fluor 488 fluorescence (green) was used to visualize RBPJ by immunofluorescence, and cell nuclei were stained with DAPI (blue), scanned and photographed. Scale bar: 15  $\mu\text{m}$ .

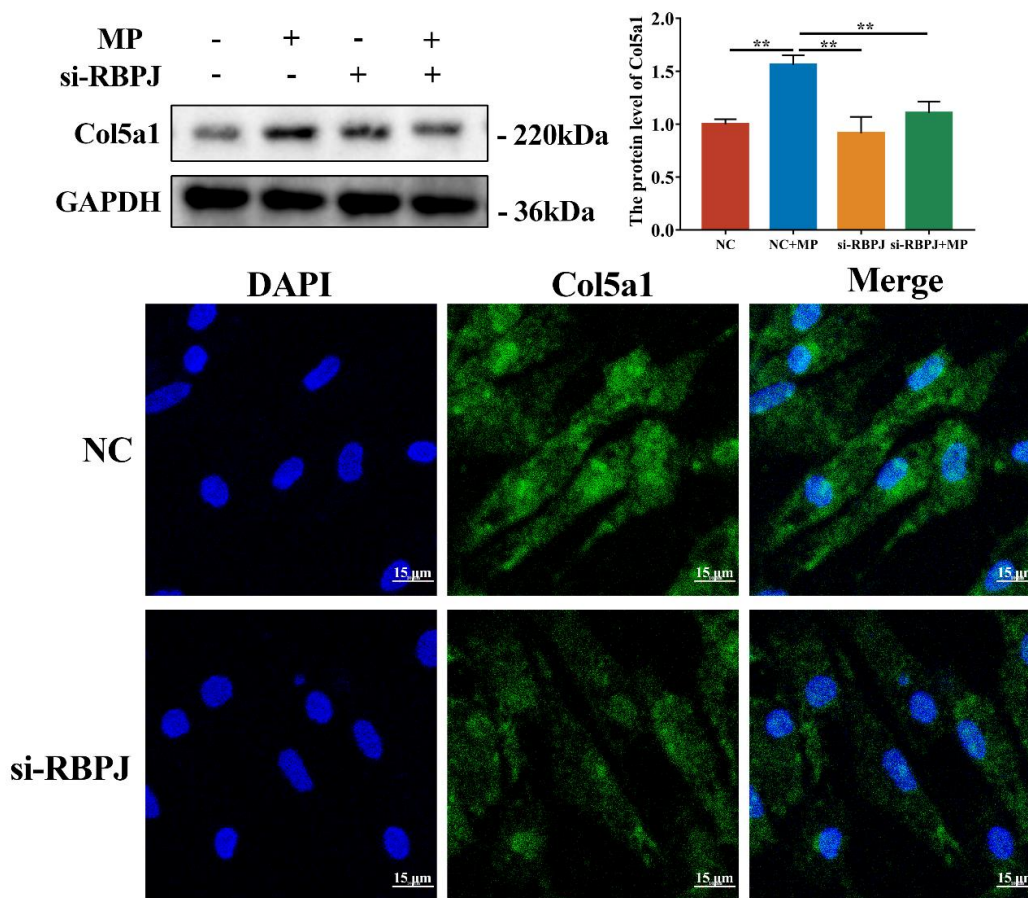


图 5-16 RBPJ 对 Col5a1 蛋白水平的影响

Fig. 5-16 Effect of RBPJ on Col5a1 protein level

通过 Western blotting 检测转染 si-RBPJ 后 BMSCs 中 Col5a1 的蛋白水平，并通过间接免疫荧光法观察细胞 Col5a1 的表达水平，扫描并拍照。比例尺：15 μm。所有结果以 mean±SD 表示。\*\* $P<0.01$  表示差异极显著。

The protein levels of Col5a1 in BMSCs after transfection with si-RBPJ were detected by Western blotting, and the expression levels of cellular Col5a1 were observed by indirect immunofluorescence, scanned and photographed. Scale bar: 15 μm. All results are expressed as mean±SD. \*\* $P<0.01$  indicates a highly significant difference.

## 2.6 RBPJ 对 MP 处理的 BMSCs 成骨及软骨代谢的影响

结果（图 5-17）显示 si-RBPJ+MP 组中 BMP2 的 mRNA 水平及蛋白表达水平较 MP 组显著提升（ $P<0.05$ ），而 MMP13 的 mRNA 水平显著下降（ $P<0.05$ ），提示 si-RBPJ 能够缓解 MP 引起的 BMSCs 成骨相关因子的变化。为明确 RBPJ 对 BMSCs 软骨代谢的影响，本研究检测了 Col2a1 及 Aggrecan 的 mRNA 及蛋白水平进行了检测。结果（图 5-18）显示转染 si-RBPJ 后，能显著缓解 MP 处理所引起的 Col2a1 蛋白及 mRNA 水平的降低（ $P<0.05$ ），提示 RBPJ 参与调控 MP 引起的 BMSCs 成骨及软骨代谢水平的变化。

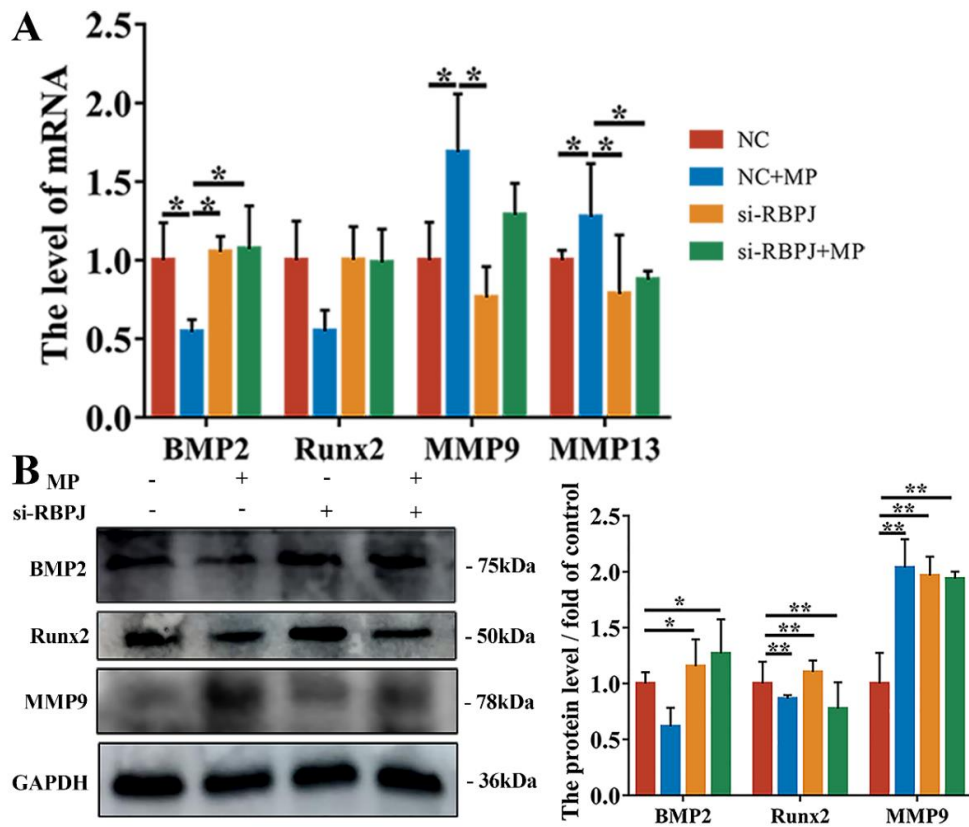


图 5-17 si-RBPJ 对 BMSCs 成骨代谢相关因子表达水平的影响

Fig. 5-17 Effect of si-RBPJ on the expression levels of osteogenic metabolism-related factors in BMSCs

通过 qRT-PCR 及 Western blotting 检测转染 si-RBPJ 后 BMSCs 中成骨相关因子的 mRNA (A) 及蛋白 (B) 水平。所有结果以 mean±SD 表示。\* $P$ <0.05 表示差异显著，\*\* $P$ <0.01 表示差异极显著。

The mRNA (A) and protein (B) levels of osteogenesis-related factors in BMSCs after transfection with si-RBPJ were detected by qRT-PCR and Western blotting. All results are expressed as mean±SD. \* $P$ <0.05 indicates significant difference, \*\* $P$ <0.01 indicates highly significant difference.

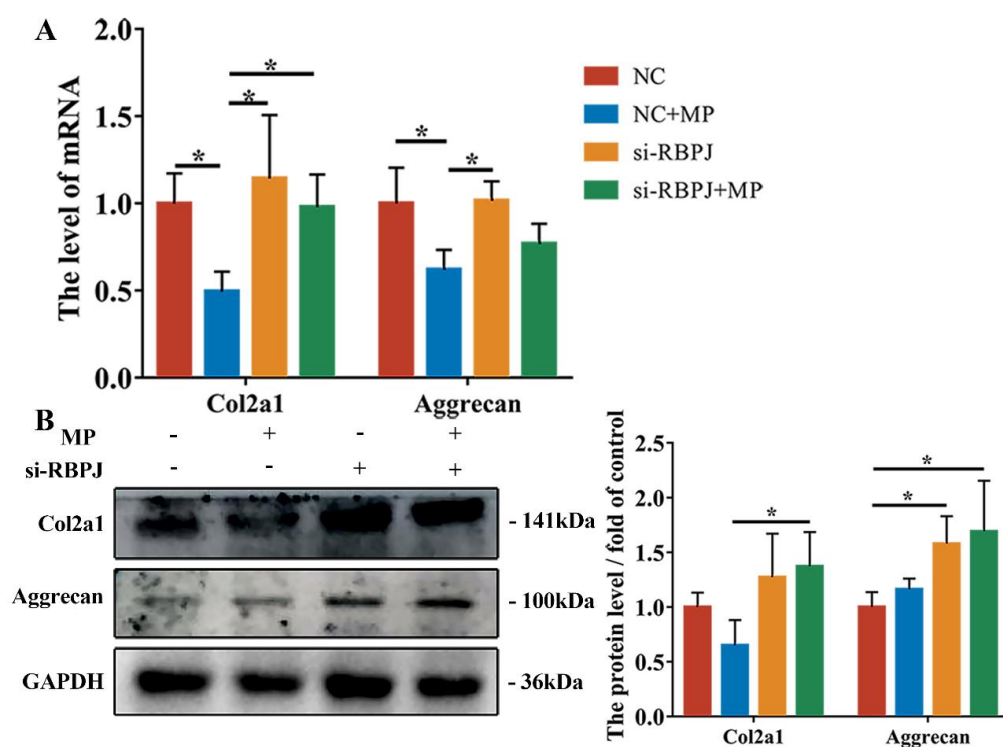


图 5-18 si-RBPJ 对 BMSCs 软骨代谢相关因子表达水平的影响

Fig. 5-18 Effect of si-RBPJ on the expression levels of cartilage metabolism-related factors in BMSCs through qRT-PCR and Western blotting. Detection of mRNA (A) and protein (B) levels of cartilage metabolism-related factors in BMSCs after transfection with si-RBPJ. All results are expressed as mean±SD. \* $P < 0.05$  indicates significant difference.

The mRNA (A) and protein (B) levels of r-chondrogenesis-related factors in BMSCs after transfection with si-RBPJ were detected by qRT-PCR and Western blotting. All results are expressed as mean±SD. \* $P < 0.05$  indicates significant difference.

### 3 讨论

FHN 影响肉鸡的生长发育和肉鸡养殖经济效益及动物福利 (Olkowski et al., 2011; Sanchez-Rodriguez et al., 2019)。FHN 的特征为骨细胞、骨髓细胞坏死、软骨下骨微骨折及严重时股骨头塌陷，最终导致髋关节功能障碍 (Guerado et al., 2016; Marciniak et al., 2005; Mont et al., 2020)。FHN 的发病是多种因素相互影响的结果。相关研究表明 FHN 的发生与 BMSCs 的活性、数量下降或者成脂与成骨分化失衡相关。本文前期研究发现 FHN 肉鸡的 Notch 通路激活，且 BMSCs 的成骨及成软骨分化水平下降，而成脂分化能力提高，MP 处理的 BMSCs 表现出相同的结果。Notch 通路激活剂 JAG-1 或抑制剂 DAPT 可改变 MP 处理所引起的 BMSCs 成骨及成脂分化水平的变化，并减轻 MP 对 BMSCs 成骨及软骨代谢相关基因及蛋白表达水平的影响。

为探究 Notch 通路对 BMSCs 分化调节从而调控 FHN 发生的相关机制,本试验对 FHN 肉鸡的股骨头组织进行了 RNA-seq 数据分析,筛选出关键基因 Col5a1,同时对 Col5a1 的直接关联模块进行筛选,发现转录因子 RBPJ 与 Col5a1 具有强关联性。作为一种次要胶原蛋白,Col5 存在于大多数结缔组织基质中 (Mak et al., 2016; Sumpter et al., 2004; van Kuppevelt et al., 1995), Col5a1 基因编码 Col5 的  $\alpha 1$  链 ( $\alpha 1$  (V) 链) (Collins et al., 2011; Wenstrup et al., 2004)。Col5a1 敲除小鼠胚胎大约在 10 日龄左右死亡,表明 Col5a1 对胚胎的形成至关重要。Bi 等通过分析去细胞化胰腺基质的蛋白组学,确定了 Col5 诱导人多能干细胞分化为胰岛类器官 (Bi et al., 2020)。在本文中, FHN 肉鸡的 Col5a1 转录水平与蛋白表达水平不同,可能是由于在 FHN 发病后期,骨损伤严重,机体需要提高 BMSCs 成骨及成软骨分化能力以修复受损部位,从而下调了 Col5a1 的转录,而蛋白表达由于转录后调控、翻译及翻译后调控等因素较 mRNA 水平滞后,因此二者水平不同。本试验发现转染 si-Col5a1 能够缓解 MP 造成的 BMSCs 成骨及成软骨分化水平的下降,这表明 Col5a1 能够调控 BMSCs 的分化。

Notch 通路参与骨发育及稳态的调节,在膜内成骨及软骨内骨化过程中起重要的调控作用。BMSCs 具有极高的成骨分化潜力,其增殖和成骨需要 Notch 信号传导 (Jin et al., 2018; Long, 2011)。Notch 配体 DLL1 激活 Notch 信号,抑制了成骨细胞分化为完全成熟的功能性成骨细胞,从而显著减少了骨形成 (Muguruma et al., 2017)。关联基因的筛选发现 RBPJ 与 Col5a1 具有强关联性,且其上游 Notch 通路能够调控 BMSCs 分化,因此本文对 Notch-RBPJ、Col5a1 对 BMSCs 分化的调控作用进行了研究。干扰 Col5a1 对 Notch 受体 (Notch1 及 Notch2) 及下游转录因子 RBPJ 的蛋白水平及免疫荧光强度无显著影响,提示 Col5a1 信号对 Notch 通路没有调控作用,可能是位于 Notch-RBPJ 通路的下游信号因子。为验证 Col5a1 与 Notch 通路的上下游位置,本试验通过采用激活剂 JAG-1、抑制剂 DAPT 或转染 si-RBPJ 调控 Notch 通路,检测 Col5a1 及暴露于 MP 的 BMSCs 成骨及软骨代谢水平变化。结果发现,激活或抑制 Notch 通路能够分别增强或减弱 Col5a1 的蛋白表达水平,干扰 RBPJ 的表达会减弱 Col5a1 的蛋白水平及免疫荧光强度,并且能够改变 MP 引起的 BMSCs 成骨及软骨代谢水平变化。虽然转染 si-Col5a1 未对 Notch 通路产生显著影响,但能够减弱 MP 处理造成的 BMSCs 成骨及软骨代谢相关蛋白表达水平下降的趋势,表明 Col5a1 对 BMSCs 分化具有与 Notch 通路相同的调节作用,同时 Col5a1 位于 Notch 通路的下游,并与 Notch 通路共同调控 BMSCs 成骨及软骨代谢。

由于干扰 RBPJ 的表达能够降低 Col5a1 的蛋白水平及免疫荧光强度,因此推断 Col5a1 是转录因子 RBPJ 的下游靶基因。Baghdadi 等人研究发现 Notch-RBPJ 能够与 Col5a1 的增强子结合,从而调控肌肉干细胞 (卫星细胞) 的生态位 (Baghdadi et al.,

2018)。这与本试验的结论相一致，即 Notch-RBPJ 能够调控 Col5a1 的表达，且 Col5a1 是 RBPJ 的下游靶基因。Col5a1 作为 FHN 肉鸡的股骨头组织中差异表达基因，能够调控 BMSCs 的分化水平及 MP 引起的细胞成骨及成软骨分化水平的改变。

本试验通过 RNA-seq 分析发现 Col5a1 于自发性 FHN 肉鸡的股骨头组织中发生显著变化，并采用干扰 Col5a1 表达的方法明确其在 MP 处理的 BMSCs 中的变化与 FHN 肉鸡股骨头组织中变化相同。干预 Notch 信号通路揭示了 Notch-RBPJ 通路对 Col5a1 的调控作用及其对细胞成骨及成软骨分化水平的影响，在肉鸡 FHN 的发生中的重要生物学作用（图 5-19）。

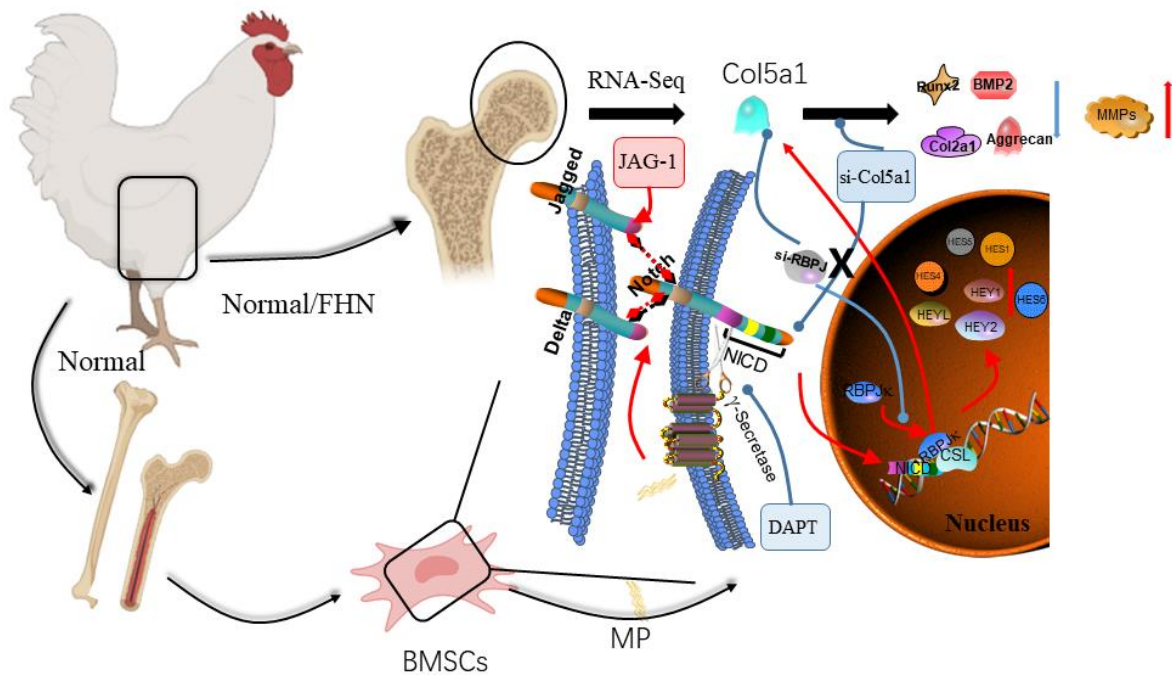


图 5-19 Notch-RBPJ 通路通过调节 Col5a1 调控肉鸡 BMSCs 分化的机制

Fig. 5-19 Mechanism of Notch-RBPJ pathway regulates the differentiation of broiler BMSCs through regulation of Col5a1



# 全文讨论与结论、创新点及研究展望

## 1 全文讨论

集约化养殖模式增加了快速生长品系肉鸡的腿病发病率,严重影响其生产性能和动物福利(李鹏飞, 2015; Olkowski et al., 2011; Sanchez-Rodriguez et al., 2019)。股骨头坏死(femoral head necrosis, FHN)是肉鸡最常见的腿病之一(Dinev et al., 2019; Kincaid, 1993; McNamee et al., 1998; Mcnamee et al., 1999),其病因复杂,是多种因素相互作用的结果。为进一步探索肉鸡 FHN 发病机理,本文对自发性 FHN 肉鸡的血脂水平、骨代谢标志物及软骨稳态进行了研究。

骨通过塑建和重塑维持动态平衡,以适应各种生理及病理刺激(Carina et al., 2020; Feng et al., 2011; Kimmel, 1993),骨代谢稳态是骨形成和骨吸收的动态平衡。BGP 和 BALP 是典型的骨形成标志物。BGP 参与基质的矿化过程和成骨细胞的分化,并与骨转换有关(Chopin et al., 2012; Niimi et al., 2014)。BALP 参与骨形成的过程,能够反映骨组织中的骨形成率(Sarvari et al., 2015)。在本研究中, FHN 肉鸡的 BGP 和 BALP 的水平较正常肉鸡显著下降,提示 FHN 肉鸡的骨形成水平下降。脂质代谢与腿病之间存在密切联系(Packialakshmi et al., 2015; Packialakshmi et al., 2016; Wang et al., 2018)。Guo 等认为,腿病与生长、骨量、骨结构和脂质代谢受损有关(Guo et al., 2019)。Packialakshmi 等发现体重和血脂的变化可以作为 FHN 的非侵入性生物标志物(Packialakshmi et al., 2015; Packialakshmi et al., 2016)。本研究结果显示, FHN 肉鸡 HDL 含量显著下降, TG 水平显著上升,肝组织中的脂滴堆积变大,提示 FHN 肉鸡的脂质代谢处于紊乱状态,这与以往研究结果一致。软骨稳态的失衡可能在肉鸡 FHN 的发生和发展中起重要作用(Yu et al., 2020; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2019)。Yu 等报道,由甲泼尼龙(MP)诱导的 FHN 肉鸡显示出更显著的分解代谢因子的产生和合成代谢因子的抑制(Yu et al., 2020)。FHN 肉鸡中 Col2a1 和蛋白聚糖的表达水平较正常肉鸡显著下降,表明软骨细胞的分泌活动受到严重影响,这与 Zhang 等人的研究结果一致(Zhang et al., 2019)。

本研究发现自发性 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 成骨及成软骨分化水平下降,而成脂分化能力提高,表明 FHN 的发生与 BMSCs 分化水平的改变密切相关(Al-Khalaifa et al., 2019; Gangji et al., 2003; Li et al., 2005; Wang et al., 2008; Wang et al., 2003)。相关研究表明地塞米松/甲泼尼龙诱导的 FHN 患者的 BMSCs 数量及活性降低(Zhou et al., 2021),且成骨活性减弱(Houdek et al., 2016),成脂水平提高,因此本文使用 MP 处

理的 BMSCs 进行了相关研究, 发现 MP 处理的 BMSCs 分化水平改变与 FHN 肉鸡来源的 BMSCs 变化相一致。

BMSCs 受多种信号通路的调节, 其中 Notch 信号通路调节 BMSCs 细胞的增殖和分化 (Chia et al., 2020; Dong et al., 2014; Sprinzak et al., 2021)。Notch 通路是进化上高度保守的信号转导途径, 能够调制细胞的增殖、分化、程序性死亡等过程, 也与多种组织器官的生长发育密切相关, 如骨组织 (Enders et al., 2012; Meurette et al., 2018; Siebel et al., 2017)。在本研究中, FHN 肉鸡的股骨头组织及 MP 处理的 BMSCs 中 Notch 通路激活, 表现为 Notch 通路受体、配体及下游靶基因转录水平及蛋白水平发生显著变化, 并表明 BMSCs 分化水平受 Notch 通路调控。

Notch 信号对 MSCs 成骨分化的调控作用仍存在争议。Notch 信号传导能够促进人类骨源性细胞的矿化 (Díaz-Tocados et al., 2017; Osathanon et al., 2019)。而 Notch-RBPJ 对 BMP 诱导的 MSCs 分化也存在负面影响 (Engin et al., 2008; Hilton et al., 2008; Shang et al., 2015)。本研究通过 Notch 通路激活剂 JAG-1 及抑制剂 DAPT/si-RBPJ, 分别从激活配体、抑制  $\gamma$  分泌酶复合物切割 Notch 受体及干扰下游转录因子 RBPJ 三个不同位点干预 Notch 通路的表达, 以系统探究 Notch 通路对 BMSCs 分化的调控作用, 及其对 MP 引起 BMSCs 分化水平变化的介导作用。结果发现 JAG-1 处理促进了 MP 诱导的 BMSCs 成骨功能减弱, 这一结果与 Oldershaw 等报道相一致, 即 JAG-1 处理引起 BMSCs 的 Notch 通路持续激活会抑制软骨分化 (Oldershaw et al., 2008)。DAPT 通过抑制  $\gamma$  分泌酶活性, 抑制 Notch 通路的激活和细胞生长、增殖 (Feng et al., 2019)。DAPT 处理后逆转了 MP 引起的 BMSCs 成骨及成软骨分化水平的下降, 其通过抑制 MP 处理激活的 Notch 通路, 并提高成骨及软骨生成关键蛋白 Col2a1、BMP2 及 Runx2 的表达水平, 降低基质金属蛋白酶 MMP9 及 MMP13 的蛋白表达。干扰 RBPJ 表达时, 也能够逆转 MP 引起的 BMSCs 分化水平的改变。这与 Hilton 等人报道的肢芽间充质细胞中 RBPJ 缺失引起生长板中软骨细胞增殖、基质产生增加及间充质细胞向成骨细胞分化的水平提高从而导致附肢中松质骨体积增加的结果一致 (Hilton et al., 2008; Tu et al., 2012)。因此, 本研究表明 Notch-RBPJ 信号通路能够调控 BMSCs 成骨及成软骨分化水平从而参与 FHN 的发生。

本研究对 FHN 肉鸡的股骨头组织进行了 RNA-seq 分析, 发现 Col5a1 为显著变化的关键基因, 且与 RBPJ 具有强关联性。检测结果显示 FHN 肉鸡及 MP 处理的 BMSCs 中 Col5a1 表达水平发生显著变化。研究表明 Col5a1<sup>-/-</sup>小鼠胚胎约在 10 日龄死亡, 表明 Col5a1 对胚胎的形成至关重要 (Wenstrup et al., 2004)。本研究中, 干扰 Col5a1 的表达对 Notch 通路无显著影响, 而干预 Notch 通路后, Col5a1 的蛋白表达水平发生显著变化, 表明 Notch-RBPJ 通路能够调控 Col5a1 的表达, 且 Col5a1 位于通路下游, 这

与 Baghdadi 等人 (Baghdadi et al., 2018) 发现相同。si-Col5a1 能够逆转 MP 处理的 BMSCs 中成骨及成软骨水平变化, si-RBPJ 能够通过干预 Col5a1 的表达调控 BMSCs 分化。

总之, FHN 肉鸡发生了血脂水平、骨代谢标志物水平异常和关节软骨稳态失衡, BMSCs 成骨及成软骨分化能力降低, 而成脂分化能力提高, Notch 通路激活。Notch-RBPJ 通路通过 Col5a1 调控 BMSCs 分化参与肉鸡 FHN 的发生, 这为肉鸡 FHN 发病机理与诊断防控研究提供了新的理论和科学依据。

## 2 全文结论

### 2.1 自发性股骨头坏死肉鸡发生血脂水平与骨代谢标志物水平异常、关节软骨稳态失衡

自发性股骨头坏死 (FHN) 肉鸡发生血脂水平与骨代谢标志物水平异常, 软骨稳态失衡, 股骨头关节软骨细胞发生了内质网应激。内质网应激通过 IRE1- $\alpha$ 、ATF-6 和 PERK 途径维持细胞内环境稳定, 而 PERK 激活 Nrf-2/ARE 途径发挥抗氧化功能。FHN 肉鸡软骨细胞凋亡与内质网应激增强, CHOP 激活途径有关。

### 2.2 股骨头坏死肉鸡中, Notch-RBPJ 通路调控 BMSCs 成骨及成软骨分化

FHN 肉鸡的股骨头组织中, Notch-RBPJ 信号通路激活, 甲泼尼龙处理的 BMSCs 中 Notch 通路相关因子发生相似变化。JAG-1/DAPT、转染 si-RBPJ 干预 Notch-RBPJ 通路能够调节甲泼尼龙对 BMSCs 分化的影响, 提示 Notch-RBPJ 通路介导甲泼尼龙对 BMSCs 成骨及成软骨分化水平的作用。

### 2.3 股骨头坏死肉鸡中 BMSCs 分化受 Notch-RBPJ-Col5a1 调控

Col5a1 作为 FHN 肉鸡的差异表达基因, 能调控 BMSCs 的分化, 加剧甲泼尼龙处理的 BMSCs 中成骨及成软骨分化能力减弱的变化, 且 RBPJ 通过 Col5a1 调控肉鸡 BMSCs 分化。

### 3 创新点

#### 3.1 报道了 Col5a1 对肉鸡 BMSCs 分化的调控

本研究发现并验证了 Col5a1 在 FHN 肉鸡的股骨头组织中显著差异表达, 在 FHN 病程中 Col5a1 高表达能够下调 BMSCs 成骨及成软骨分化水平。

#### 3.2 明确了 Notch-RBPJ 通路对 BMSCs 分化的调控作用

本研究明确了 Notch-RBPJ 通路对甲泼尼龙处理的 BMSCs 分化的调控作用, 即 Notch-RBPJ 通路介导甲泼尼龙对 BMSCs 成骨及成软骨分化的抑制作用。

#### 3.3 揭示了 Notch-RBPJ-Col5a1 通路在肉鸡 FHN 发生发展中的调控作用

本文揭示了 Notch-RBPJ 通路对 Col5a1 的调控作用, 通过调控 Col5a1 的表达及 BMSCs 分化参与肉鸡 FHN 的发生。在 FHN 发生发展中, Notch-RBPJ-Col5a1 通路激活从而抑制 BMSCs 的成骨及成软骨分化, 最终导致 FHN 的发生。

### 4 研究展望

本研究通过 Notch 通路激活剂、抑制剂、转染 si-RBPJ 干预 Notch 通路及干扰 Col5a1 的表达, 检测自发性 FHN 肉鸡股骨头组织及 BMSCs 模型中 Notch-RBPJ 对 Col5a1 的调控作用, 发现 Notch-RBPJ 对 Col5a1 的调控作用进而干预了 BMSCs 分化。因此, 在后续的研究中可通过体内试验激活或抑制 Notch-RBPJ-Col5a1 通路, 进一步分析肉鸡 FHN 发生中的信号传导网络, 体外试验应用染色质免疫沉淀 (ChIP)、双荧光素酶报告基因等方法深入探究 Notch-RBPJ 通路对 Col5a1 调控的具体机制。

## 参考文献

- [1] 范如彬. 肉鸡股骨头坏死脂代谢紊乱机制研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
- [2] 李鹏飞. 规模化养殖场肉鸡腿病情况调查及 bFGF 在肉鸡股骨头坏死发生中的作用机理研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [3] 肖艳宇. gga-let-7a-5p 通过靶向 GDF6 调节鸡骨髓间充质干细胞多向分化 [D]. 广西: 广西大学, 2021.
- [4] 徐沛然. HIF-1 与 Notch 信号通路在胰腺癌变中相互调控机制的探究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
- [5] 周振雷, 张旻, 刘德义. 肉鸡股骨头坏死研究进展 [J]. 安徽科技学院学报, 2019, 33 (05): 1-5.
- [6] Abeynayake N, Arthur A, Gronthos S. Crosstalk between skeletal and neural tissues is critical for skeletal health[J]. Bone, 2021, 142:115645.
- [7] Afshari-Kaveh M, Abbasalipourkabir R, Nourian A, et al. The Protective effects of vitamins A and E on titanium dioxide nanoparticles (nTiO<sub>2</sub>)-induced oxidative stress in the spleen tissues of male wistar rats[J]. Biological Trace Element Research, 2021, 199(10):3677-3687.
- [8] Al-Khalifa H, Al-Nasser A, Al-Surayee T, et al. Effect of dietary probiotics and prebiotics on the performance of broiler chickens[J]. Poultry Science, 2019, 98(10):4465-4479.
- [9] Aldahmash A, Zaher W, Al-Nbaheen M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells: basic biology and current clinical use for tissue regeneration[J]. Annals of Saudi Medicine, 2012, 32(1): 68-77.
- [10] An J, Yang H, Zhang Q, et al. Natural products for treatment of osteoporosis: The effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation[J]. Life Sciences, 2016, 147: 46-58.
- [11] Antebi B, Zhang L, Sheyn D, et al. Controlling arteriogenesis and mast cells are central to bioengineering solutions for critical bone defect repair using allografts[J]. Bioengineering (Basel), 2016, 3(1): 6-18.
- [12] Applegate TJ, Lilburn MS. Growth of the femur and tibia of a commercial broiler line[J]. Poultry Science, 2002, 81(9): 1289-1294.
- [13] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284(5415): 770-776.
- [14] Arthur A, Gronthos S. Clinical application of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells to repair skeletal tissue[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(24): 9759.

- [15] Arufa P, Mostafizer RM, Md F, et al. Characterization of bacterial pathogens from egg shell, egg yolk, feed and air samples of poultry houses[J]. Asian Journal of Medical and Biological Research, 2017, 3(2): 168-174.
- [16] Assouline-Dayana Y, Chang C, Greenspan A, et al. Pathogenesis and natural history of osteonecrosis[J]. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2002, 32(2): 94-124.
- [17] Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells[J]. Human Gene Therapy, 2010, 21(10): 1226-1238.
- [18] Ayaub EA, Kolb PS, Mohammed-Ali Z, et al. GRP78 and CHOP modulate macrophage apoptosis and the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Journal of Pathology, 2016, 239(4): 411-425.
- [19] B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, et al. The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(16): 7683-7699.
- [20] Baghdadi MB, Castel D, Machado L, et al. Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche[J]. Nature, 2018, 557(7707): 714-718.
- [21] Baliga B, Kumar S. Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow?[J]. Cell Death and Differentiation, 2003, 10(1): 16-18.
- [22] Bi H, Ye K, Jin S. Proteomic analysis of decellularized pancreatic matrix identifies collagen V as a critical regulator for islet organogenesis from human pluripotent stem cells[J]. Biomaterials, 2020, 233: 119673.
- [23] Birk DE, Brückner P. Collagens, suprastructures, and collagen fibril assembly[J]. Springer Berlin Heidelberg, 2011: 77-115.
- [24] Bizeray D, Leterrier C, Constantin P, et al. Sequential feeding can increase activity and improve gait score in meat-type chickens[J]. Poultry Science, 2002, 81(12): 1798-1806.
- [25] Boskey AL, Robey PG. The Composition of Bone[M]. John Wiley & Sons, Inc. 2013.
- [26] Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006, 7(9): 678-689.
- [27] Brewer JW. Regulatory crosstalk within the mammalian unfolded protein response[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014, 71(6): 1067-1079.
- [28] Bruderer M, Richards RG, Alini M, et al. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis[J]. European Cells and Materials, 2014, 28: 269-286.
- [29] Canalis E. The fate of circulating osteoblasts[J]. New England Journal of Medicine, 2005, 352(19): 2014-2016.

- [30] Cao J, Dai DL, Yao L, et al. Saturated fatty acid induction of endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human liver cells via the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2012, 364(2): 115-129.
- [31] Carina V, Della Bella E, Costa V, et al. Bone's response to mechanical loading in aging and osteoporosis: molecular mechanisms[J]. *Calcified Tissue International*, 2020, 107(4): 301-318.
- [32] Cescon M, Gattazzo F, Chen P, et al. Collagen VI at a glance[J]. *Journal of Cell Science*, 2015, 128(19): 3525-3531.
- [33] Chandrasekaran P, Kwok B, Han B, et al. Type V collagen regulates the structure and biomechanics of TMJ condylar cartilage: A fibrous-hyaline hybrid[J]. *Matrix Biology*, 2021, 102: 1-19.
- [34] Chang DW, Xing Z, Capacio VL, et al. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation[J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(16): 4132-4142.
- [35] Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, et al. Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2005, 94(2): 278-285.
- [36] Chen P, Geng N, Zhou D, et al. The regulatory role of COX-2 in the interaction between Cr(VI)-induced endoplasmic reticulum stress and autophagy in DF-1 cells[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 170: 112-119.
- [37] Chen S, Lee BH, Bae Y. Notch signaling in skeletal stem cells[J]. *Calcified Tissue International*, 2014, 94(1): 68-77.
- [38] Chen S, Tao J, Bae Y, et al. Notch gain of function inhibits chondrocyte differentiation via Rbpj-dependent suppression of Sox9[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2013, 28(3): 649-659.
- [39] Chen SL, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction[J]. *American Journal of Cardiology*, 2004, 94(1): 92-95.
- [40] Chen Y, Gui D, Chen J, et al. Down-regulation of PERK-ATF4-CHOP pathway by astragaloside IV is associated with the inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic rats[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2014, 33(6): 1975-1987.
- [41] Chia W, Liu J, Huang YG, et al. A circular RNA derived from DAB1 promotes cell proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs via RBPJ/DAB1 axis[J]. *Cell Death and Disease*, 2020, 11(5): 372-382.
- [42] Chiba S. Notch signaling in stem cell systems[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(11): 2437-2447.
- [43] Ching HS, Luddin N, Rahman IA, et al. Expression of odontogenic and osteogenic markers in DPSCs and SHED: a review[J]. *Current Stem Cell Research and Therapy*, 2017, 12(1): 71-79.

- [44] Chopin F, Biver E, Funck-Brentano T, et al. Prognostic interest of bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis[J]. *Joint Bone Spine*, 2012, 79(1): 26-31.
- [45] Chrostek MR, Fellows EG, Crane AT, et al. Efficacy of stem cell-based therapies for stroke[J]. *Brain Research*, 2019, 1722: 146362.
- [46] Clarke SR, Foster SJ. Surface adhesins of staphylococcus aureus[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2006, 51: 187-224.
- [47] Collins M, Posthumus M. Type V collagen genotype and exercise-related phenotype relationships: a novel hypothesis[J]. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 2011, 39(4): 191-198.
- [48] Connizzo BK, Han L, Birk DE, et al. Collagen V-heterozygous and -null supraspinatus tendons exhibit altered dynamic mechanical behaviour at multiple hierarchical scales[J]. *Interface Focus*, 2016, 6(1): 20150043.
- [49] Corr SA, Gentle MJ, Mccorquodale CC, et al. The effect of morphology on walking ability in the modern broiler: A gait analysis study[J]. *Animal Welfare*, 2003, 12(2): 159-171.
- [50] Crowe R, Zikherman J, Niswander L. Delta-1 negatively regulates the transition from prehypertrophic to hypertrophic chondrocytes during cartilage formation[J]. *Development*, 1999, 126(5): 987-998.
- [51] Cui Q, Wang Y, Saleh KJ, et al. Alcohol-induced adipogenesis in a cloned bone-marrow stem cell[J]. *Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, 2006, 88(Suppl 3): 148-154.
- [52] Cui Q, Jo WL, Koo KH, et al. ARCO consensus on the pathogenesis of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head[J]. *Journal of Korean Medical Science*, 2021, 36(10): e65.
- [53] Deregowski V, Gazzo E, Priest L, et al. Notch 1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing Wnt/beta-catenin but not bone morphogenetic protein signaling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(10): 6203-6210.
- [54] Díaz-Tocados JM, Herencia C, Martínez-Moreno JM, et al. Magnesium chloride promotes osteogenesis through Notch signaling activation and expansion of mesenchymal stem cells[J]. *Scientific reports*, 2017, 7(1): 7839.
- [55] Dinev I. Clinical and morphological investigations on the prevalence of lameness associated with femoral head necrosis in broilers[J]. *British Poultry Science*, 2009, 50(3): 284-290.
- [56] Dinev I, Kanakov D, Kalkanov I, et al. Comparative pathomorphologic studies on the incidence of fractures associated with leg skeletal pathology in commercial broiler chickens[J]. *Avian Diseases*, 2019, 63(4): 641-650.
- [57] Dinev I. Leg weakness pathology in broiler chickens[J]. *Journal of Poultry Science*, 2012, 49(2): 63-67.

- [58] David E. Other Bacterial Diseases[M]. Diseases of Poultry, 2017.
- [59] Dong X, Zhai R, Liu Z, et al. The effect of intravenous infusions of glutamine on duodenal cell autophagy and apoptosis in early-weaned calves[J]. *Animals (Basel)*, 2019, 9(7): 404-410.
- [60] Dong Y, Long T, Wang C, et al. NOTCH-mediated maintenance and expansion of human bone marrow stromal/stem cells: a technology designed for orthopedic regenerative medicine[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2014, 3(12): 1456-1466.
- [61] Dong Y, Jesse AM, Kohn A, et al. RBPjkappa-dependent Notch signaling regulates mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation during skeletal development[J]. *Development*, 2010, 137(9): 1461-1471.
- [62] Donoviel DB, Hadjantonakis AK, Ikeda M, et al. Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects[J]. *Genes and Development*, 1999, 13(21): 2801-2810.
- [63] Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7(2): 79-94.
- [64] Duque G. Bone and fat connection in aging bone[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2008, 20(4): 429-434.
- [65] Durairaj V, Okimoto R, Rasaputra K, et al. Histopathology and serum clinical chemistry evaluation of broilers with femoral head separation disorder[J]. *Avian Diseases*, 2009, 53(1): 21-25.
- [66] Edwards HM. Nutrition and skeletal problems in poultry[J]. *Poultry Science*, 2000, 79(7): 1018-1023.
- [67] Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2015, 11(1): 45-54.
- [68] Enders AC, Carter AM. Review: The evolving placenta: different developmental paths to a hemochorial relationship[J]. *Placenta*, 2012, 33 Suppl: S92-98.
- [69] Engin F, Lee B. NOTCHing the bone: insights into multi-functionality[J]. *Bone*, 2010, 46(2): 274-280.
- [70] Engin F, Yao Z, Yang T, et al. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis[J]. *Nature Medicine*, 2008, 14(3): 299-305.
- [71] Fan JJ, Cao LG, Wu T, et al. The dose-effect of icariin on the proliferation and osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells[J]. *Molecules*, 2011, 16(12): 10123-10133.
- [72] Fan R, Liu K, Zhou Z. Abnormal lipid profile in fast-growing broilers with spontaneous femoral head necrosis[J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12: 685968.
- [73] Feng J, Wang J, Liu Q, et al. DAPT, a  $\gamma$ -secretase inhibitor, suppresses tumorigenesis, and

- progression of growth hormone-producing adenomas by targeting Notch signaling[J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 809.
- [74] Feng W, Jin Q, Yu MY, et al. MiR-6924-5p-rich exosomes derived from genetically modified Scleraxis-overexpressing PDGFR $\alpha$ (+) BMMSCs as novel nanotherapeutics for treating osteolysis during tendon-bone healing and improving healing strength[J]. *Biomaterials*, 2021, 279: 121242.
- [75] Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling[J]. *Annual Review of Pathology*, 2011, 6: 121-145.
- [76] Feng Y, Yang SH, Xiao BJ, et al. Decreased in the number and function of circulation endothelial progenitor cells in patients with avascular necrosis of the femoral head[J]. *Bone*, 2010, 46(1): 32-40.
- [77] Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, et al. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning[J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(3): 291-302.
- [78] Fleming RH. Nutritional factors affecting poultry bone health[J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2008, 67(2): 177-183.
- [79] Fondi C, Franchi A. Definition of bone necrosis by the pathologist[J]. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 2007, 4(1): 21-26.
- [80] Francois S, Mouiseddine M, Allenet-Lepage B, et al. Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects[J]. *Biomed Research International*, 2013, 2013: 151679.
- [81] Fu X, Liu G, Halim A, et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 784.
- [82] Galliera E, Luzzati A, Perrucchini G, et al. Bone formation and resorption markers as diagnostic tools for bone metastases evaluation[J]. *The International Journal of Biological Markers*, 2012, 27(4): e395-399.
- [83] Gangji V, Hauzeur JP, Schoutens A, et al. Abnormalities in the replicative capacity of osteoblastic cells in the proximal femur of patients with osteonecrosis of the femoral head[J]. *Journal of Rheumatology*, 2003, 30(2): 348-351.
- [84] Gao Q, Wang L, Wang S, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells: identification, classification, and differentiation[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 787118.
- [85] Gao Y, Zhu H, Wang Q, et al. Inhibition of PERK signaling prevents against glucocorticoid-induced endotheliocyte apoptosis and osteonecrosis of the femoral head[J]. *International journal of biological sciences*, 2020, 16(4): 543-552.

- [86] Gardner BM, Walter P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response[J]. *Science*, 2011, 333(6051): 1891-1894.
- [87] Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, et al. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods[J]. *Bone Reports*, 2017, 6: 87-100.
- [88] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms[J]. *Journal of Pathology*, 2010, 221(1): 3-12.
- [89] Glueck CJ, Freiberg RA, Boppana S, et al. Thrombophilia, hypofibrinolysis, the eNOS T-786C polymorphism, and multifocal osteonecrosis[J]. *Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, 2008, 90(10): 2220-2229.
- [90] Guerado E, Caso E. The physiopathology of avascular necrosis of the femoral head: an update[J]. *Injury*, 2016, 47 (Suppl 6): 16-26.
- [91] Guo Y, Tang H, Wang X, et al. Clinical assessment of growth performance, bone morphometry, bone quality, and serum indicators in broilers affected by valgus-varus deformity[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(10): 4433-4440.
- [92] Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, et al. BMP4 and BMP antagonists regulate human white and beige adipogenesis[J]. *Diabetes*, 2015, 64(5): 1670-1681.
- [93] Hafeez A, Mader A, Boroojeni FG, et al. Impact of thermal and organic acid treatment of feed on apparent ileal mineral absorption, tibial and liver mineral concentration, and tibia quality in broilers[J]. *Poultry Science*, 2014, 93(7): 1754-1763.
- [94] Haffner-Luntzer M, Kovtun A, Lackner I, et al. Estrogen receptor  $\alpha$ - (ER $\alpha$ ), but not ER $\beta$ -signaling, is crucially involved in mechanostimulation of bone fracture healing by whole-body vibration[J]. *Bone*, 2018, 110: 11-20.
- [95] Hall AL. The effect of stocking density on the welfare and behaviour of broiler chickens reared commercially[J]. *Animal Welfare*, 2001, 10(1): 23-40.
- [96] Haque MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, et al. Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation: role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection[J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 169(3): 1542-1549.
- [97] Hauck CR, Ohlsen K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by staphylococcus aureus[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(1): 5-11.
- [98] Havenstein GB, Ferket PR, Qureshi MA. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets[J]. *Poultry Science*, 2003, 82(10): 1500-1508.

- [99] He YK, Cen XT, Liu SS, et al. Protective effects of ten oligostilbenes from *Paeonia suffruticosa* seeds on interleukin-1 $\beta$ -induced rabbit osteoarthritis chondrocytes[J]. *BMC Chemistry*, 2019, 13(1): 72-84.
- [100] Heidenreich A, Gillessen S, Heinrich D, et al. Radium-223 in asymptomatic patients with castration-resistant prostate cancer and bone metastases treated in an international early access program[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 12.
- [101] Herdt PD, Defoort P, Steelant JV, et al. Enterococcus cecorum osteomyelitis and arthritis in broiler chickens[J]. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 2009, 78(1): 44-48.
- [102] Hernigou P, Beaujean F. Abnormalities in the bone marrow of the iliac crest in patients who have osteonecrosis secondary to corticosteroid therapy or alcohol abuse[J]. *Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, 1997, 79(7): 1047-1053.
- [103] Hernigou P, Beaujean F, Lambotte JC. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis[J]. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 1999, 81(2): 349-355.
- [104] Herreman A, Hartmann D, Annaert W, et al. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(21): 11872-11877.
- [105] Herrmann M, Stanić B, Hildebrand M, et al. In vitro simulation of the early proinflammatory phase in fracture healing reveals strong immunomodulatory effects of CD146-positive mesenchymal stromal cells[J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2019, 13(8): 1466-1481.
- [106] Herzog A, Genin O, Hasdai A, et al. Hsp90 and angiogenesis in bone disorders--lessons from the avian growth plate[J]. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2011, 301(1): R140-147.
- [107] Hilton MJ, Tu X, Wu X, et al. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation[J]. *Nature Medicine*, 2008, 14(3): 306-314.
- [108] Hori K, Sen A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance[J]. *Journal of Cell Science*, 2013, 126(Pt 10): 2135-2140.
- [109] Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(13): 8932-8937.

- [110] Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta[J]. *Nature Medicine*, 1999, 5(3): 309-313.
- [111] Hou X, Liu G, Zhang H, et al. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) from Cherry Valley duck mediates signaling pathways and antiviral activity[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 12-26.
- [112] Houdek MT, Wyles CC, Packard BD, et al. Decreased osteogenic activity of mesenchymal stem cells in patients with corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Journal of Arthroplasty*, 2016, 31(4): 893-898.
- [113] Hu H, Tian M, Ding C, et al. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 3083.
- [114] Huang SC, Rehman MU, Lan YF, et al. Tibial dyschondroplasia is highly associated with suppression of tibial angiogenesis through regulating the HIF-1 $\alpha$ /VEGF/VEGFR signaling pathway in chickens[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 9089.
- [115] Huang Z, Ren PG, Ma T, et al. Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability[J]. *Cytokine*, 2010, 51(3): 305-310.
- [116] Huff GR, Huff WE, Rath NC, et al. Turkey osteomyelitis complex[J]. *Poultry Science*, 2000, 79(7): 1050-1056.
- [117] Hurtado C, Safarova A, Smith M, et al. Disruption of NOTCH signaling by a small molecule inhibitor of the transcription factor RBPJ[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 10811.
- [118] Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid[J]. *Alexandria Journal of Medicine*, 2017: S2090506817301550.
- [119] Iqbal J, Yuen T, Kim SM, et al. Opening windows for bone remodeling through a SLIT[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128(4): 1255-1257.
- [120] James AW. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation[J]. *Scientifica (Cairo)*, 2013, 2013: 684736.
- [121] Javed A, Bae JS, Afzal F, et al. Structural coupling of Smad and Runx2 for execution of the BMP2 osteogenic signal[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(13): 8412-8422.
- [122] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-49.

- [123] Jin H, Xu T, Chen Q, et al. The fate and distribution of autologous bone marrow mesenchymal stem cells with intra-arterial infusion in osteonecrosis of the femoral head in dogs[J]. *Stem Cells International*, 2016, 2016: 8616143.
- [124] Jin YZ, Lee JH. Mesenchymal stem cell therapy for bone regeneration[J]. *Clinics in Orthopedic Surgery*, 2018, 10(3): 271-278.
- [125] Jones JP. Alcoholism, hypercortisonism, fat embolism and osseous avascular necrosis. 1971[J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2001, (393): 4-12.
- [126] Jones KB, Seshadri T, Krantz R, et al. Cell-based therapies for osteonecrosis of the femoral head[J]. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2008, 14(10): 1081-1087.
- [127] Jones RC, Williams RA, Savage CE, et al. Isolation of infectious laryngotracheitis virus from proximal femora of lame broiler chickens[J]. *Research in Veterinary Science*, 1993, 55(3): 377-378.
- [128] Julian RJ. Production and growth related disorders and other metabolic diseases of poultry-a review[J]. *Veterinary Journal*, 2005, 169(3): 350-369.
- [129] Jung K, Lein M, Stephan C, et al. Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications[J]. *International Journal of Cancer*, 2004, 111(5): 783-791.
- [130] Jung SR, Song NJ, Yang DK, et al. Silk proteins stimulate osteoblast differentiation by suppressing the Notch signaling pathway in mesenchymal stem cells[J]. *Nutrition Research Reviews*, 2013, 33(2): 162-170.
- [131] Just NA, Létourneau V, Kirychuk SP, et al. Potentially pathogenic bacteria and antimicrobial resistance in bioaerosols from cage-housed and floor-housed poultry operations[J]. *Annals of Occupational Hygiene*, 2012, 56(4): 440-449.
- [132] Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, et al. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis[J]. *Biogerontology*, 2001, 2(3): 165-171.
- [133] Kabata T, Matsumoto T, Yagishita S, et al. Vascular endothelial growth factor in rabbits during development of corticosteroid-induced osteonecrosis: a controlled experiment[J]. *Journal of Rheumatology*, 2008, 35(12): 2383-2390.
- [134] Kense MJ, Landman WJ. Enterococcus cecorum infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology[J]. *Avian Pathology*, 2011, 40(6): 603-612.
- [135] Kerachian MA, Séguin C, Harvey EJ. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action[J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 114(3-5): 121-128.

- [136] Kim J, Lee YJ, Kim JM, et al. PPAR $\gamma$  agonists induce adipocyte differentiation by modulating the expression of Lipin-1, which acts as a PPAR $\gamma$  phosphatase[J]. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2016, 81(Pt A): 57-66.
- [137] Kim T, Hong JM, Lee J, et al. Promoter polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene is associated with an osteonecrosis of the femoral head in the Korean population[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(3): 287-291.
- [138] Kimmel DB. A paradigm for skeletal strength homeostasis[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1993, 8 (Suppl 2): 515-522.
- [139] Kincaid S A. Bone Biology and Skeletal Disorders in Poultry, Poultry Science Symposium 23[J]. *Poultry Science*, 1993, 72(12): 2366.
- [140] Kitajima M, Shigematsu M, Ogawa K, et al. Effects of glucocorticoid on adipocyte size in human bone marrow[J]. *Medical Molecular Morphology*, 2007, 40(3): 150-156.
- [141] Koç ON, Day J, Nieder M, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2002, 30(4): 215-222.
- [142] Kohn A, Dong Y, Mirando AJ, et al. Cartilage-specific RBPjk-dependent and -independent Notch signals regulate cartilage and bone development[J]. *Development*, 2012, 139(6): 1198-1212.
- [143] Kokabu S, Lowery JW, Jimi E. Cell fate and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells International*, 2016, 2016: 3753581.
- [144] Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2006, 99(5): 1233-1239.
- [145] Koo KH, Jeong ST, Jones JP, Jr. Borderline necrosis of the femoral head[J]. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1999, (358): 158-165.
- [146] Koo KH, Lee JS, Lee YJ, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in patients with nontraumatic femoral head osteonecrosis[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2006, 24(8): 1722-1728.
- [147] Koo KH, Dussault R, Kaplan P, et al. Age-related marrow conversion in the proximal metaphysis of the femur: evaluation with T1-weighted MR imaging[J]. *Radiology*, 1998, 206(3): 745-748.
- [148] Kopan R, Goate A. A common enzyme connects notch signaling and Alzheimer's disease[J]. *Genes and Development*, 2000, 14(22): 2799-2806.
- [149] Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism[J]. *Cell*, 2009, 137(2): 216-233.
- [150] Kuang MJ, Huang Y, Zhao XG, et al. Exosomes derived from Wharton's jelly of human umbilical

- cord mesenchymal stem cells reduce osteocyte apoptosis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats via the miR-21-PTEN-AKT signalling pathway[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2019, 15(9): 1861-1871.
- [151] Kuttappan VA, Hargis BM, Owens CM. White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review[J]. *Poultry Science*, 2016, 95(11): 2724-2733.
- [152] Laurentie J, Loux V, Hennequet-Antier C, et al. Comparative genome analysis of enterococcus cecorum reveals intercontinental spread of a lineage of clinical poultry isolates[J]. *mSphere*, 2023: e0049522.
- [153] Lee JS, Lee JS, Roh HL, et al. Alterations in the differentiation ability of mesenchymal stem cells in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: comparative analysis according to the risk factor[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2006, 24(4): 604-609.
- [154] Lee KS, Lee J, Kim HK, et al. Extracellular vesicles from adipose tissue-derived stem cells alleviate osteoporosis through osteoprotegerin and miR-21-5p[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2021, 10(12): e12152.
- [155] Lee WS, Yoo WH, Chae HJ. ER Stress and Autophagy[J]. *Current Molecular Medicine*, 2015, 15(8): 735-745.
- [156] Lee YJ, Lee JS, Kang EH, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in patients with steroid-induced femoral head osteonecrosis[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2012, 30(1): 21-27.
- [157] Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases[J]. *Cell*, 2010, 141(7): 1117-1134.
- [158] Ley DH, Marusak RA, Vivas EJ, et al. Mycoplasma iowae associated with chondrodystrophy in commercial turkeys[J]. *Avian Pathology*, 2010, 39(2): 87-93.
- [159] Li L, Zhou X, Zhang JT, et al. Exosomal miR-186 derived from BMSCs promote osteogenesis through hippo signaling pathway in postmenopausal osteoporosis[J]. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2021, 16(1): 23-32.
- [160] Li PF, Zhou ZL, Shi CY, et al. Downregulation of basic fibroblast growth factor is associated with femoral head necrosis in broilers[J]. *Poultry Science*, 2015, 94(5): 1052-1059.
- [161] Li X, Cui Q, Kao C, et al. Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPARgamma2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures[J]. *Bone*, 2003, 33(4): 652-659.
- [162] Li X, Jin L, Cui Q, et al. Steroid effects on osteogenesis through mesenchymal cell gene expression[J]. *Osteoporosis International*, 2005, 16(1): 101-108.

- [163] Li Y, Wang J, Ma Y, et al. miR-101-loaded exosomes secreted by bone marrow mesenchymal stem cells requires the FBXW7/HIF1 $\alpha$ /FOXP3 axis, facilitating osteogenic differentiation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2021, 236(6): 4258-4272.
- [164] Lian J B, Stein GS, van Wijnen AJ, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2012, 8(4): 212-227.
- [165] Liao Q, Li BJ, Li Y, et al. Low-intensity pulsed ultrasound promotes osteoarthritic cartilage regeneration by BMSC-derived exosomes via modulating the NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 97: 107824.
- [166] Liao W, Ning Y, Xu HJ, et al. BMSC-derived exosomes carrying microRNA-122-5p promote proliferation of osteoblasts in osteonecrosis of the femoral head[J]. *Clinical Science (Lond)*, 2019, 133(18): 1955-1975.
- [167] Libby P. Interleukin-1 beta as a target for atherosclerosis therapy: biological basis of CANTOS and Beyond[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2017, 70(18): 2278-2289.
- [168] Linsenmayer TF, Gibney E, Igoe F, et al. Type V collagen: molecular structure and fibrillar organization of the chicken alpha 1(V) NH2-terminal domain, a putative regulator of corneal fibrillogenesis[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 1993, 121(5): 1181-1189.
- [169] Lires-Deán M, Caramés B, Cillero-Pastor B, et al. Anti-apoptotic effect of transforming growth factor-beta1 on human articular chondrocytes: role of protein phosphatase 2A[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(11): 1370-1378.
- [170] Liu J, Zhao Z, Ruan J, et al. Stem cells in the periodontal ligament differentiated into osteogenic, fibrogenic and cementogenic lineages for the regeneration of the periodontal complex[J]. *Journal of dentistry*, 2020, 92: 103259.
- [171] Liu K, Fan R, Zhou Z. Endoplasmic reticulum stress, chondrocyte apoptosis and oxidative stress in cartilage of broilers affected by spontaneous femoral head necrosis[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(8): 101258.
- [172] Liu K, Wang K, Wang L, et al. Changes of lipid and bone metabolism in broilers with spontaneous femoral head necrosis[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(3): 100808.
- [173] Liu K, Chen P, Lu J, et al. Protective effect of purple tomato anthocyanidin on chromium(VI)-induced autophagy in LMH cells by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Biological Trace Element Research*, 2020, 194(2): 570-580.
- [174] Liu M, Sun Y, Zhang Q. Emerging role of extracellular vesicles in bone remodeling[J]. *Journal of Dental Research*, 2018, 97(8): 859-868.

- [175] Liu S, Liu D, Chen C, et al. MSC transplantation improves osteopenia via epigenetic regulation of Notch signaling in lupus[J]. *Cell Metabolism*, 2015, 22(4): 606-618.
- [176] Liu X, Zhang M, Liu H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury-induced neuroinflammation and pyroptosis by modulating microglia M1/M2 phenotypes[J]. *Experimental Neurology*, 2021, 341: 113700.
- [177] Liu Z, Shi Q, Song X, et al. Activating transcription factor 4 (ATF4)-ATF3-C/EBP homologous protein (CHOP) cascade shows an essential role in the ER stress-induced sensitization of tetrachlorobenzoquinone-challenged PC12 cells to ROS-mediated apoptosis via death receptor 5 (DR5) signaling[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2016, 29(9): 1510-1518.
- [178] Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 13(1): 27-38.
- [179] Lowery JW, Rosen V. The BMP pathway and its inhibitors in the skeleton[J]. *Physiological Reviews*, 2018, 98(4): 2431-2452.
- [180] Lu GD, Cheng P, Liu T, et al. BMSC-derived exosomal miR-29a promotes angiogenesis and osteogenesis[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 608521.
- [181] Lu J, Liu K, Qi M, et al. Effects of Cr(VI) exposure on electrocardiogram, myocardial enzyme parameters, inflammatory factors, oxidative kinase, and ATPase of the heart in Chinese rural dogs[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(29): 30444-30451.
- [182] Luu YK, Capilla E, Rosen CJ, et al. Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2009, 24(1): 50-61.
- [183] Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2013, 53: 401-426.
- [184] Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, et al. The regulation of bone metabolism and disorders by Wnt signaling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(22): 5525.
- [185] Majumder S, Crabtree JS, Golde TE, et al. Targeting Notch in oncology: the path forward[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(2): 125-144.
- [186] Mak KM, Png CY, Lee DJ. Type V collagen in health, disease, and fibrosis[J]. *Anatomical Record (Hoboken)*, 2016, 299(5): 613-629.
- [187] Maki JJ, Bobeck EA, Sylte MJ, et al. Eggshell and environmental bacteria contribute to the intestinal microbiota of growing chickens[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2020, 11: 60-76.

- [188] Mandal R, Barrón JC, Kostova I, et al. Caspase-8: The double-edged sword[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2020, 1873(2): 188357.
- [189] Marchi S, Patergnani S, Pinton P. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1837(4): 461-469.
- [190] Marciniak D, Furey C, Shaffer JW, et al. Osteonecrosis of the femoral head[J]. *The Journal of Bone Joint Surgery-American Volume*, 2005, 87(4): 742-747.
- [191] Mares DC, Heidler KM, Smith GN, et al. Type V collagen modulates alloantigen-induced pathology and immunology in the lung[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2000, 23(1): 62-70.
- [192] Marie PJ, Kassem M. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets[J]. *European Journal of Endocrinology*, 2011, 165(1): 1-10.
- [193] Marston SB, Gillingham K, Bailey RF, et al. Osteonecrosis of the femoral head after solid organ transplantation: a prospective study[J]. *Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, 2002, 84(12): 2145-2151.
- [194] Maruyama M, Lin T, Pan CC, et al. Cell-based and scaffold-based therapies for joint preservation in early-stage osteonecrosis of the femoral head: a review of basic research[J]. *JBJS Reviews*, 2019, 7(9): e5.
- [195] McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21(4): 1249-1259.
- [196] McDevitt CA. Biochemistry of articular cartilage. Nature of proteoglycans and collagen of articular cartilage and their role in ageing and in osteoarthritis[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1973, 32(4): 364-378.
- [197] McNamee PT, Smyth JA. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis (femoral head necrosis) of broiler chickens: a review[J]. *Avian Pathology*, 2000, 29(4): 253-270.
- [198] McNamee PT, McCullagh JJ, Thorp BH, et al. Study of leg weakness in two commercial broiler flocks[J]. *Veterinary Record*, 1998, 143(5): 131-135.
- [199] Mcnamee PT, McCullagh JJ, Rodgers JD, et al. Development of an experimental model of bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broiler chickens using *Staphylococcus aureus* administered by aerosol[C]. *Western Poultry Disease Conference*, 1999.
- [200] Mead TJ, Yutzey KE. Notch pathway regulation of chondrocyte differentiation and proliferation during appendicular and axial skeleton development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(34): 14420-14425.

- [201] Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche[J]. *Nature*, 2010, 466(7308): 829-834.
- [202] Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, et al. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 1989, 108(1): 191-197.
- [203] Menuki K, Mori T, Sakai A, et al. Climbing exercise enhances osteoblast differentiation and inhibits adipogenic differentiation with high expression of PTH/PTHrP receptor in bone marrow cells[J]. *Bone*, 2008, 43(3): 613-620.
- [204] Meurette O, Mehlen P. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(4): 536-548.
- [205] Miller M, Shuman JD, Sebastian T, et al. Structural basis for DNA recognition by the basic region leucine zipper transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(17): 15178-15184.
- [206] Ming LG, Chen KM, Xian CJ. Functions and action mechanisms of flavonoids genistein and icariin in regulating bone remodeling[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2013, 228(3): 513-521.
- [207] Mitchell JR, De Boom HP. Traumatic avulsion of the proximal femoral articular cartilage as a cause of hip dislocation in broiler chickens[J]. *Journal of the South African Veterinary Association*, 1986, 57(3): 133-137.
- [208] Miyaki S, Lotz MK. Extracellular vesicles in cartilage homeostasis and osteoarthritis[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2018, 30(1): 129-135.
- [209] Miyanishi K, Yamamoto T, Irida T, et al. Bone marrow fat cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis[J]. *Bone*, 2002, 30(1): 185-190.
- [210] Mobasher A. Role of chondrocyte death and hypocellularity in ageing human articular cartilage and the pathogenesis of osteoarthritis[J]. *Medical Hypotheses*, 2002, 58(3): 193-197.
- [211] Mok SK, Chen WF, Lai WP, et al. Icariin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR 106 cells[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2010, 159(4): 939-949.
- [212] Mont MA, Salem HS, Piuze NS, et al. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: where do we stand today? : a 5-year update[J]. *Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, 2020, 102(12): 1084-1099.
- [213] Mori T, Okimoto N, Sakai A, et al. Climbing exercise increases bone mass and trabecular bone turnover through transient regulation of marrow osteogenic and osteoclastogenic potentials in mice[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2003, 18(11): 2002-2009.
- [214] Morisawa T, Nakagomi A, Kohashi K, et al. Serum Tartrate-resistant acid phosphatase-5b levels are

- associated with the severity and extent of coronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease[J]. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 2017, 24(10): 1058-1068.
- [215] Morishima N, Nakanishi K, Nakano A. Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein via induction of WW domain binding protein 1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(40): 35227-35235.
- [216] Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, et al. Bone marrow fat-cell enlargement in early steroid-induced osteonecrosis--a histomorphometric study of autopsy cases[J]. *Pathology Research and Practice*, 2005, 200(11-12): 807-811.
- [217] Muguruma Y, Hozumi K, Warita H, et al. Maintenance of bone homeostasis by DLL1-mediated Notch signaling[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, 232(9): 2569-2580.
- [218] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Cell*, 2002, 108(1): 17-29.
- [219] Niimi R, Kono T, Nishihara A, et al. Determinants associated with bone mineral density increase in response to daily teriparatide treatment in patients with osteoporosis[J]. *Bone*, 2014, 66: 26-30.
- [220] Noël D, Gazit D, Bouquet C, et al. Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(1): 74-85.
- [221] Novak S, Roeder E, Sinder BP, et al. Modulation of Notch1 signaling regulates bone fracture healing[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2020, 38(11): 2350-2361.
- [222] O'Connor-Robison CI, Spencer JD, Orth MW. The impact of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids on bone and cartilage in gilts and sows[J]. *Journal of Animal Science*, 2014, 92(10): 4607-4615.
- [223] Oh EJ, Lee HW, Kalimuthu S, et al. In vivo migration of mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a living mouse model[J]. *Journal of Controlled Release*, 2018, 279: 79-88.
- [224] Okada K, Nishioka M, Kaji H, et al. Roles of fibrinolytic factors in the alterations in bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells during bone repair[J]. *Inflammation and Regeneration*, 2020, 40(1): 22.
- [225] Oldershaw RA, Tew SR, Russell AM, et al. Notch signaling through Jagged-1 is necessary to initiate chondrogenesis in human bone marrow stromal cells but must be switched off to complete chondrogenesis[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(3): 666-674.
- [226] Olkowski AA, Laarveld B, Wojnarowicz C, et al. Biochemical and physiological weaknesses associated with the pathogenesis of femoral bone degeneration in broiler chickens[J]. *Avian Pathology*, 2011, 40(6): 639-650.

- [227] Ongaro A, Pellati A, Bagheri L, et al. Characterization of Notch signaling during osteogenic differentiation in human osteosarcoma cell line MG63[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2016, 231(12): 2652-2663.
- [228] Ono N, Balani DH, Kronenberg HM. Stem and progenitor cells in skeletal development[J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2019, 133: 1-24.
- [229] Osathanon T, Manokawinchoke J, Sa-Ard-Iam N, et al. Jagged1 promotes mineralization in human bone-derived cells[J]. *Archives of Oral Biology*, 2019, 99: 134-140.
- [230] Packialakshmi B, Rath NC, Huff WE, et al. Poultry femoral head separation and necrosis: a review[J]. *Avian Diseases*, 2015, 59(3): 349-354.
- [231] Packialakshmi B, Liyanage R, Lay J, et al. Prednisolone-induced predisposition to femoral head separation and the accompanying plasma protein changes in chickens[J]. *Biomark Insights*, 2015, 10: 1-8.
- [232] Packialakshmi B, Liyanage R, Lay JO, et al. Proteomic changes in the plasma of broiler chickens with femoral head necrosis[J]. *Biomark Insights*, 2016, 11: 55-62.
- [233] Paludo E, Ibelli AMG, Peixoto JO, et al. The involvement of RUNX2 and SPARC genes in the bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers[J]. *Animal*, 2017, 11(6): 1063-1070.
- [234] Palumbo C, Ferretti M. The osteocyte: from "prisoner" to "orchestrator"[J]. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*, 2021, 6(1): 28.
- [235] Pasteris JD, Yoder CH, Wopenka BJ. Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite: The key to a better understanding of bone mineral[J]. *American Mineralogist*, 2014, 99(1): 16-27.
- [236] Paxton H, Anthony NB, Corr SA, et al. The effects of selective breeding on the architectural properties of the pelvic limb in broiler chickens: a comparative study across modern and ancestral populations[J]. *Journal of Anatomy*, 2010, 217(2): 153-166.
- [237] Paxton H, Daley MA, Corr SA, et al. The gait dynamics of the modern broiler chicken: a cautionary tale of selective breeding[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2013, 216(17): 3237-3248.
- [238] Paxton H, Tickle PG, Rankin JW, et al. Anatomical and biomechanical traits of broiler chickens across ontogeny. Part II. Body segment inertial properties and muscle architecture of the pelvic limb[J]. *PeerJ*, 2014, 2: e473.
- [239] Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism[J]. *Metabolism*, 2011, 60(11): 1500-1510.

- [240] Peng S, Zhou G, Luk KD, et al. Strontium promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/MAPK signaling pathway[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2009, 23(1-3): 165-174.
- [241] Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(6): 868.
- [242] Pongit A, Haque ZF, Sabuj AAM, et al. Characterization of staphylococcus aureus isolated from chicken and quail eggshell[J]. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 2018, 5(4): 466-471.
- [243] Prisby R, Menezes T, Campbell J, et al. Kinetic examination of femoral bone modeling in broilers[J]. Poultry Science, 2014, 93(5): 1122-1129.
- [244] Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, et al. ER Stress Triggers Apoptosis by Activating BH3-Only Protein Bim[J]. Cell, 2007, 129(7): 1337-1349.
- [245] Qi J, Zhou Y, Jiao Z, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth through hedgehog signaling pathway[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017, 42(6): 2242-2254.
- [246] Qi WN, Scully SP. Extracellular collagen regulates expression of transforming growth factor-beta1 gene[J]. Journal of Orthopaedic Research, 2000, 18(6): 928-932.
- [247] Qiu M, Zhai S, Fu Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-150-3p promotes osteoblast proliferation and differentiation in osteoporosis[J]. Human Gene Therapy, 2021, 32(13-14): 717-729.
- [248] Raeth S, Sacchetti B, Siegel G, et al. A mouse bone marrow stromal cell line with skeletal stem cell characteristics to study osteogenesis in vitro and in vivo[J]. Stem Cells and Development, 2014, 23(10): 1097-1108.
- [249] Richardson SM, Kalamegam G, Pushparaj PN, et al. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration[J]. Methods, 2016, 99: 69-80.
- [250] Rodgers JD, McCullagh JJ, McNamee PT, et al. Recovery of pathogenic Staphylococcus aureus from broiler hatchery air samples[J]. Veterinary Record, 2003, 153(21): 656-657.
- [251] Rowland AA, Voeltz GK. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012, 13(10): 607-625.
- [252] Sanchez-Rodriguez E, Benavides-Reyes C, Torres C, et al. Changes with age (from 0 to 37 D) in tibiae bone mineralization, chemical composition and structural organization in broiler chickens[J]. Poultry Science, 2019, 98(11): 5215-5225.

- [253] Sarvari BK, Sankara Mahadev D, Rupa S, et al. Detection of bone metastases in breast cancer (BC) patients by serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b), a bone resorption marker and serum alkaline phosphatase (ALP), a bone formation marker, in lieu of whole body skeletal scintigraphy with technetium99m MDP[J]. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2015, 30(1): 66-71.
- [254] Sato AY, Tu X, McAndrews KA, et al. Prevention of glucocorticoid induced-apoptosis of osteoblasts and osteocytes by protecting against endoplasmic reticulum (ER) stress in vitro and in vivo in female mice[J]. *Bone*, 2015, 73: 60-68.
- [255] Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, et al. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture[J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2008, 19(5): 459-466.
- [256] Schindler F, Lajolo PP, Pinczowski H, et al. Bone and total alkaline phosphatase for screening skeletal metastasis in patients with solid tumours[J]. *European Journal of Cancer Care*, 2008, 17(2): 152-156.
- [257] Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain[J]. *Nature*, 1998, 393(6683): 382-386.
- [258] Sciaudone M, Gazzo E, Priest L, et al. Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(12): 5631-5639.
- [259] Seamon J, Keller T, Saleh J, et al. The pathogenesis of nontraumatic osteonecrosis[J]. *Arthritis*, 2012, 2012: 601763.
- [260] Shahzad M, Gao J, Qin P, et al. Expression of genes encoding matrilin-3 and cyclin-I during the impairment and recovery of chicken growth plate in tibial dyschondroplasia[J]. *Avian Diseases*, 2014, 58(3): 468-473.
- [261] Shang X, Luo Z, Wang X, et al. Deletion of RBPJK in mesenchymal stem cells enhances osteogenic activity by up-regulation of BMP signaling[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135971.
- [262] Shapiro F, Connolly S, Zurakowski D, et al. Femoral head deformation and repair following induction of ischemic necrosis: a histologic and magnetic resonance imaging study in the piglet[J]. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 2009, 91(12): 2903-2914.
- [263] Sharff KA, Song WX, Luo X, et al. Hey1 basic helix-loop-helix protein plays an important role in mediating BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(1): 649-659.
- [264] Shen H, Wang Y, Zhang Z, et al. Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy: optimization of cell differentiation strategy[J]. *Stem Cells International*, 2015, 2015: 524756.
- [265] Shiu HT, Leung PC, Ko CH. The roles of cellular and molecular components of a hematoma at

- early stage of bone healing[J]. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2018, 12(4): e1911-e1925.
- [266] Shu B, Zhao Y, Wang Y, et al. Oleanolic acid enhances mesenchymal stromal cell osteogenic potential by inhibition of Notch signaling[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 7002.
- [267] Siebel C, Lendahl U. Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease[J]. *Physiological Reviews*, 2017, 97(4): 1235-1294.
- [268] Sivaraj KK, Jeong HW, Dharmalingam B, et al. Regional specialization and fate specification of bone stromal cells in skeletal development[J]. *Cell Reports*, 2021, 36(2): 109352.
- [269] Song Y, Du Z, Chen B, et al. Association of SREBP2 gene polymorphisms with the risk of osteonecrosis of the femoral head relates to gene expression and lipid metabolism disorders[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(5): 7145-7153.
- [270] Sprinzak D, Blacklow SC. Biophysics of Notch signaling[J]. *Annual Review of Biophysics*, 2021, 50: 157-189.
- [271] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans[J]. *Circulation*, 2002, 106(15): 1913-1918.
- [272] Su N, Kilberg MS. C/EBP homology protein (CHOP) interacts with activating transcription factor 4 (ATF4) and negatively regulates the stress-dependent induction of the asparagine synthetase gene[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(50): 35106-35117.
- [273] Sumpter TL, Wilkes DS. Role of autoimmunity in organ allograft rejection: a focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection[J]. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2004, 286(6): 1129-1139.
- [274] Sun M, Chen S, Adams SM, et al. Collagen V is a dominant regulator of collagen fibrillogenesis: dysfunctional regulation of structure and function in a corneal-stroma-specific Col5a1-null mouse model[J]. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(23): 4096-4105.
- [275] Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2013, 34(6): 340-346.
- [276] Szafraniec GM, Szeleszczuk P, Dolka B. Review on skeletal disorders caused by *Staphylococcus* spp. in poultry[J]. *The Veterinary Quarterly*, 2022, 42(1): 21-40.
- [277] Szekely Y, Arbel Y. A review of interleukin-1 in heart disease: where do we stand today?[J]. *Cardiology and Therapy*, 2018, 7(1): 25-44.
- [278] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, 13(3): 184-190.

- [279] Takam Kanga P, Bazzoni R, Dal Collo G, et al. The role of Notch and Wnt signaling in MSC communication in normal and leukemic bone marrow niche[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 599276.
- [280] Tang Q, Zheng G, Feng Z, et al. Trehalose ameliorates oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction and ER stress via selective autophagy stimulation and autophagic flux restoration in osteoarthritis development[J]. *Cell Death and Disease*, 2017, 8(10): e3081.
- [281] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(26): 9607-9611.
- [282] Tao SC, Yuan T, Rui BY, et al. Exosomes derived from human platelet-rich plasma prevent apoptosis induced by glucocorticoid-associated endoplasmic reticulum stress in rat osteonecrosis of the femoral head via the Akt/Bad/Bcl-2 signal pathway[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 733-750.
- [283] Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor[J]. *Cell*, 1994, 79(7): 1147-1156.
- [284] Trudeau S, Thibodeau A, Côté JC, et al. Contribution of the broiler breeders' fecal microbiota to the establishment of the eggshell microbiota[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 666.
- [285] Tu X, Chen J, Lim J, et al. Physiological notch signaling maintains bone homeostasis via RBPjk and Hey upstream of NFATc1[J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(3): e1002577.
- [286] Tullo E, Fontana I, Peña Fernandez A, et al. Association between environmental predisposing risk factors and leg disorders in broiler chickens[J]. *Journal of Animal Science*, 2017, 95(4): 1512-1520.
- [287] Valenti MT, Garbin U, Pasini A, et al. Role of ox-PAPCs in the differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) and Runx2 and PPAR $\gamma$ 2 expression in MSCs-like of osteoporotic patients[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20363.
- [288] van Kuppevelt TH, Veerkamp JH, Timmermans JA. Immunoquantification of type I, III, IV and V collagen in small samples of human lung parenchyma[J]. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1995, 27(8): 775-782.
- [289] van Tetering G, Vooijs M. Proteolytic cleavage of Notch: "HIT and RUN"[J]. *Current Molecular Medicine*, 2011, 11(4): 255-269.
- [290] Wagley Y, Chesi A, Acevedo PK, et al. Canonical Notch signaling is required for bone morphogenetic protein-mediated human osteoblast differentiation[J]. *Stem Cells*, 2020, 38(10): 1332-1347.
- [291] Wang A, Ren M, Wang J. The pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: A systematic review of the literature[J]. *Gene*, 2018, 671: 103-109.

- [292] Wang BL, Sun W, Shi ZC, et al. Decreased proliferation of mesenchymal stem cells in corticosteroid-induced osteonecrosis of femoral head[J]. Orthopedics, 2008, 31(5): 444.
- [293] Wang C, Xu W, An J, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 accelerates vascular calcification by upregulating Runx2[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1203.
- [294] Wang GJ, Sweet DE, Reger SI, et al. Fat-cell changes as a mechanism of avascular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits[J]. Journal of Bone and Joint Surgery American Volume, 1977, 59(6): 729-735.
- [295] Wang HT, Fang YQ, Bao XC, et al. Expression changes of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in the rat lung of decompression sickness induced by fast buoyancy ascent escape[J]. Undersea and Hyperbaric Medicine, 2015, 42(1): 23-31.
- [296] Wang J, Cui C, Chim YN, et al. Vibration and  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate treatment suppresses intramuscular fat infiltration and adipogenic differentiation in sarcopenic mice[J]. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2020, 11(2): 564-577.
- [297] Wang JC, Kanim LE, Yoo S, et al. Effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone marrow cells on spinal fusion in rats[J]. Journal of Bone and Joint Surgery American Volume, 2003, 85(5): 905-911.
- [298] Wang Y, Zhou X, Wang D. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles inhibit osteoporosis via microRNA-27a-induced inhibition of DKK2-mediated Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. Inflammation, 2022, 45(2): 780-799.
- [299] Wang Y, Hao J, Zhang S, et al. Inflammatory injury and mitophagy induced by Cr(VI) in chicken liver[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27(18): 22980-22988.
- [300] Weimer SL, Wideman RF, Scanes CG, et al. Impact of experimentally induced bacterial chondronecrosis with osteomyelitis (BCO) lameness on health, stress, and leg health parameters in broilers[J]. Poultry Science, 2021, 100(11): 101457.
- [301] Weinstein RS, Hogan EA, Borrelli MJ, et al. The pathophysiological sequence of glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in male mice[J]. Endocrinology, 2017, 158(11): 3817-3831.
- [302] Wenstrup RJ, Florer JB, Cole WG, et al. Reduced type I collagen utilization: a pathogenic mechanism in COL5A1 haplo-insufficient Ehlers-Danlos syndrome[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2004, 92(1): 113-124.
- [303] Wenstrup RJ, Florer JB, Brunskill EW, et al. Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(51): 53331-53337.
- [304] Whitehead CC, McCormack HA, McTeir L, et al. The maximum legal limit for vitamin D3 in broiler

- diets may need to be increased[J]. *British Poultry Science*, 2004, 45 (Suppl 1): 24-26.
- [305] Whitehead CC, McCormack HA, McTeir L, et al. High vitamin D3 requirements in broilers for bone quality and prevention of tibial dyschondroplasia and interactions with dietary calcium, available phosphorus and vitamin A[J]. *British Poultry Science*, 2004, 45(3): 425-436.
- [306] Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization[J]. *Endocrine Reviews*, 1994, 15(4): 439-461.
- [307] Wideman RF, Prisby RD. Bone circulatory disturbances in the development of spontaneous bacterial chondronecrosis with osteomyelitis: a translational model for the pathogenesis of femoral head necrosis[J]. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2012, 3: 183.
- [308] Wideman RF. Bacterial chondronecrosis with osteomyelitis and lameness in broilers: a review[J]. *Poultry Science*, 2016, 95(2): 325-344.
- [309] Wideman RF, Pevzner I. Dexamethasone triggers lameness associated with necrosis of the proximal tibial head and proximal femoral head in broilers[J]. *Poultry Science*, 2012, 91(10): 2464-2474.
- [310] Wideman RF, Blankenship J, Pevzner IY, et al. Efficacy of 25-OH Vitamin D3 prophylactic administration for reducing lameness in broilers grown on wire flooring[J]. *Poultry Science*, 2015, 94(8): 1821-1827.
- [311] Wideman RF, Hamal KR, Stark JM, et al. A wire-flooring model for inducing lameness in broilers: evaluation of probiotics as a prophylactic treatment[J]. *Poultry Science*, 2012, 91(4): 870-883.
- [312] Wideman RF, Al-Rubaye A, Kwon YM, et al. Prophylactic administration of a combined prebiotic and probiotic, or therapeutic administration of enrofloxacin, to reduce the incidence of bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broilers[J]. *Poultry Science*, 2015, 94(1): 25-36.
- [313] Wijesurendra DS, Chamings AN, Bushell RN, et al. Pathological and microbiological investigations into cases of bacterial chondronecrosis and osteomyelitis in broiler poultry[J]. *Avian Pathology*, 2017, 46(6): 683-694.
- [314] Williams B, Waddington D, Solomon S, et al. Dietary effects on bone quality and turnover, and Ca and P metabolism in chickens[J]. *Research in Veterinary Science*, 2000, 69(1): 81-87.
- [315] Williams B, Waddington D, Murray DH, et al. Bone strength during growth: influence of growth rate on cortical porosity and mineralization[J]. *Calcified Tissue International*, 2004, 74(3): 236-245.
- [316] Wright JA, Nair SP. Interaction of staphylococci with bone[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(2-3): 193-204.
- [317] Wu ZQ, Chen XT, Xu YY, et al. High uric acid (UA) downregulates bone alkaline phosphatase (BALP) expression through inhibition of its promoter activity[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 85670-85679.

- [318] Xiao N. Application of bone marrow stem cell based therapy in bone loss diseases[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, 23(41): 6288-6297.
- [319] Xu J, Gong H, Lu S, et al. Animal models of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head-a comprehensive research review up to 2018[J]. *International Orthopaedics*, 2018, 42(7): 1729-1737.
- [320] Xu N, Liu H, Qu F, et al. Hypoxia inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts by activation of Notch signaling[J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2013, 94(1): 33-39.
- [321] Xu R, Wei B, Li J, et al. Investigations of cartilage matrix degeneration in patients with early-stage femoral head necrosis[J]. *Medical Science Monitor*, 2017, 23: 5783-5792.
- [322] Xu Y, Rivas JM, Brown EL, et al. Virulence potential of the staphylococcal adhesin CNA in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2004, 189(12): 2323-2333.
- [323] Yang A, Yu C, You F, et al. Mechanisms of zuogui pill in treating osteoporosis: perspective from bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 2018: 3717391.
- [324] Yang X, Yang J, Lei P, et al. LncRNA MALAT1 shuttled by bone marrow-derived mesenchymal stem cells-secreted exosomes alleviates osteoporosis through mediating microRNA-34c/SATB2 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(20): 8777-8791.
- [325] Yang Z, Wilkie-Grantham RP, Yanagi T, et al. ATG4B (Autophagin-1) phosphorylation modulates autophagy[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(44): 26549-26561.
- [326] Yao X, Yu S, Jing X, et al. PTEN inhibitor VO-OHPic attenuates GC-associated endothelial progenitor cell dysfunction and osteonecrosis of the femoral head via activating Nrf2 signaling and inhibiting mitochondrial apoptosis pathway[J]. *Stem Cell Research and Therapy*, 2020, 11(1): 140.
- [327] Yasufuku K, Heidler KM, Woods KA, et al. Prevention of bronchiolitis obliterans in rat lung allografts by type V collagen-induced oral tolerance[J]. *Transplantation*, 2002, 73(4): 500-505.
- [328] Yasufuku K, Heidler KM, O'Donnell PW, et al. Oral tolerance induction by type V collagen downregulates lung allograft rejection[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2001, 25(1): 26-34.
- [329] Yi X, Wright LE, Pagnotti GM, et al. Mechanical suppression of breast cancer cell invasion and paracrine signaling to osteoclasts requires nucleo-cytoskeletal connectivity[J]. *Bone Research*, 2020, 8(1): 40.

- [330] Yin L, Li YB, Wang YS. Dexamethasone-induced adipogenesis in primary marrow stromal cell cultures: mechanism of steroid-induced osteonecrosis[J]. Chinese Medical Journal, 2006, 119(7): 581-588.
- [331] Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, et al. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(40): 30299-30304.
- [332] Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, et al. Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development[J]. Nature Genetics, 2002, 32(4): 633-638.
- [333] Ytrehus B, Carlson CS, Ekman S. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis[J]. Veterinary Pathology, 2007, 44(4): 429-448.
- [334] Yu Y, Wang S, Zhou Z. Cartilage homeostasis affects femoral head necrosis induced by methylprednisolone in broilers[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(14): 4841.
- [335] Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease[J]. Nature Medicine, 2007, 13(7): 791-801.
- [336] Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D, et al. Coordinated activation of notch, Wnt, and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene Hey1 inhibits mineralization and Runx2 transcriptional activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(36): 37704-37715.
- [337] Zanotti S, Canalis E. Notch regulation of bone development and remodeling and related skeletal disorders[J]. Calcified Tissue International, 2012, 90(2): 69-75.
- [338] Zanotti S, Canalis E. Notch signaling and the skeleton[J]. Endocrine Reviews, 2016, 37(3): 223-253.
- [339] Zeng C, Xing R, Liu J, et al. Role of CSL-dependent and independent Notch signaling pathways in cell apoptosis[J]. Apoptosis, 2016, 21(1): 1-12.
- [340] Zhai R, Dong X, Feng L, et al. The effect of heat stress on autophagy and apoptosis of rumen, abomasum, duodenum, liver and kidney cells in calves[J]. Animals (Basel), 2019, 9(10): 854.
- [341] Zhang M, Shi CY, Zhou ZL, et al. Bone characteristics, histopathology, and chondrocyte apoptosis in femoral head necrosis induced by glucocorticoid in broilers[J]. Poultry Science, 2017, 96(6): 1609-1614.
- [342] Zhang M, Li S, Pang K, et al. Endoplasmic reticulum stress affected chondrocyte apoptosis in femoral head necrosis induced by glucocorticoid in broilers[J]. Poultry Science, 2019, 98(3): 1111-1120.
- [343] Zhang Q, Jin L, Lie J. Role of coagulopathy in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Journal of International Medical Research, 2018, 46(6): 2141-2148.

- [344] Zhang Q, Yang YJ, Wang H, et al. Autophagy activation: a novel mechanism of atorvastatin to protect mesenchymal stem cells from hypoxia and serum deprivation via AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway[J]. *Stem Cells and Development*, 2012, 21(8): 1321-1332.
- [345] Zhang W, Yang N, Shi XM. Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(8): 4723-4729.
- [346] Zhang W, Zhang F, Shi H, et al. Comparisons of rabbit bone marrow mesenchymal stem cell isolation and culture methods in vitro[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88794.
- [347] Zhao J, Xia W, Nie M, et al. The levels of bone turnover markers in Chinese postmenopausal women: Peking Vertebral Fracture study[J]. *Menopause*, 2011, 18(11): 1237-1243.
- [348] Zhou B, Lin W, Long Y, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1): 95.
- [349] Zhou DA, Zheng HX, Wang CW, et al. Influence of glucocorticoids on the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2014, 15: 239.
- [350] Zhou M, Liu L, Xu Y, et al. Effects of osteoblast autophagy on glucocorticoid-induced femoral head necrosis[J]. *Joint Diseases and Related Surgery*, 2020, 31(3): 411-418.
- [351] Zhou M, Xi J, Cheng Y, et al. Reprogrammed mesenchymal stem cells derived from iPSCs promote bone repair in steroid-associated osteonecrosis of the femoral head[J]. *Stem Cell Research and Therapy*, 2021, 12(1): 175.
- [352] Zhou X, Cao H, Yuan Y, et al. Biochemical signals mediate the crosstalk between cartilage and bone in osteoarthritis[J]. *Biomed Research International*, 2020, 2020: 5720360.
- [353] [353] Zhou X, Cao H, Guo J, et al. Effects of BMSC-derived EVs on bone metabolism[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(5): 1012.
- [354] Zhu W, Guo M, Yang W, et al. CD41-deficient exosomes from non-traumatic femoral head necrosis tissues impair osteogenic differentiation and migration of mesenchymal stem cells[J]. *Cell Death and Disease*, 2020, 11(4): 293.
- [355] Zhuang HL, Zhang X, Zhu CT, et al. Molecular mechanisms of PPAR- $\gamma$  governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation[J]. *Current Stem Cell Research and Therapy*, 2016, 11(3): 255-264.
- [356] Zou W, Yue P, Khuri FR, et al. Coupling of endoplasmic reticulum stress to CDDO-Me-induced up-regulation of death receptor 5 via a CHOP-dependent mechanism involving JNK activation[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(18): 7484-7492.