

文章编号:1004-7220(2016)05-0456-05

力学过载对成骨细胞损伤及中药修复的研究进展

刘迎节^{1,2}, 李瑞欣², 赵滨^{2,3}, 李昊², 李军², 苏卫华², 郝宝辉^{2,3}, 徐云强¹, 张西正²

(1. 天津医科大学总医院 骨科, 天津 300052; 2. 军事医学科学院 卫生装备研究所, 天津 300161;

3. 吉林大学白求恩第一医院 骨科, 长春 130000)

摘要: 骨的生长代谢由成骨细胞的成骨及破骨细胞的吸收共同控制,而成骨细胞在成骨过程中起主要作用。过载影响成骨细胞的增殖与分化,其加载方式、强度、持续时间等因素都可改变成骨细胞的生物特性,进而影响成骨细胞的功能活性。而过载引起成骨细胞应答的机制还处于探索阶段,需要进一步深入研究。大量实验证明,中药淫羊藿苷促进成骨细胞增殖及分化,一定浓度的淫羊藿苷对骨损伤修复起重要作用。综述骨细胞对过载刺激后的反应及淫羊藿苷对成骨细胞的损伤修复。

关键词: 过载; 成骨细胞; 细胞应答; 淫羊藿苷

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.05.456

Research progress of mechanical overload on osteoblast injury and its repair by traditional Chinese medicine

LIU Ying-jie^{1,2}, LI Rui-xin², ZHAO Bin^{2,3}, LI Hao², LI Jun², SU Wei-hua², HAO Bao-hui^{2,3}, XU Yun-qiang¹, ZHANG Xi-zheng² (1. Department of Orthopedics, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China; 2. Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300161, China; 3. Department of Orthopedics, First Hospital of Jinlin University, Changchun 130000, China)

Abstract: The growth and metabolism of bone are controlled by osteogenesis of osteoblasts and absorption of osteoclasts, and osteoblasts play a main role in the process of osteogenesis. Overload will affect proliferation and differentiation of osteoblasts, while the loading mode, intensity, duration and other factors can change the biological properties of osteoblasts and further affect the functional activity of osteoblasts. However, the mechanism of osteoblast response to overload is still at the exploratory stage and needs in-depth study. Numerous studies have demonstrated that icariin, a kind of Chinese medicine, can promote proliferation and differentiation of osteoblasts, and icariin with a certain concentration plays an important role in the repair of osteoblast injuries. In this paper, the responses of osteoblasts to overload stimulation and repair of osteoblast injuries by icariin were summarized.

Key words: Overload; Osteoblast; Cell response; Icariin

人体骨组织细胞主要由成骨细胞、骨细胞和破骨细胞组成。正常骨骼生长代谢处于一个吸收与生

长重建的持续过程,成骨细胞的成骨作用和破骨细胞的骨吸收作用处于动态平衡,两者相互影响,相互

收稿日期:2015-11-03; 修回日期:2015-12-16

基金项目:国家自然科学基金项目(11432016,31370942,31470935)。

通信作者:张西正,研究员,Tel:022-84656717,E-mail:z56787@sohu.com;

徐云强,副教授,Tel:022-60814671,E-mail:docxu@sina.com。

协作完成^[1]。骨的生长代谢依赖于成骨细胞与破骨细胞的增殖与分化,亦受到机械力学载荷、激素和营养等因素的调节^[2-4]。Frost^[5]提出的骨应力稳态理论认为,正常骨应变生理水平为 200 ~ 2 500 $\mu\epsilon$,但骨可以耐受 10 000 ~ 30 000 $\mu\epsilon$ 应变,而 5 000 $\mu\epsilon$ 是骨生理应变与病理应变的分界线,而且它们各自的应变响应机制有可能不同。过载力学环境是指应变水平大于 5 000 $\mu\epsilon$ 或生理性过载应变水平下长期循环加载的环境,亦即疲劳载荷。在很多情况下,成骨细胞常常处于过载力学环境下,如负重训练的士兵^[6]、高强度训练的运动员^[7]等。给予成骨细胞过载的牵拉张力刺激,探索过载情况下成骨细胞生长状况及其发生机制,能进一步揭示骨损伤后细胞生长代谢状况,从而为临床预防提供理论依据,开辟新的治疗方法。

1 体外力学加载细胞的方式

1.1 单个细胞直接加载

利用显微和微管吸吮技术对单个细胞进行直接加载,并通过实时记录系统给予记录,再采用图像处理仪和计算机进行位移测量及变形数值分析^[8]。优点是精度高、易于标定、且能够观察和控制细胞的黏附方式,缺点是不能较好模拟大量细胞同时受力情况。

1.2 流体剪切法

主要是利用流变学原理间接通过流体流动而产生的剪切力或压力对细胞加载^[9]。优点是能保证细胞受不同水平的过载或者生理剪应力的同时依然保持黏附状态,不足是很难分清剪切应力与静水压作用的影响。

1.3 流体静压力加载装置

主要将细胞培养皿置放于密闭培养小室,通过以下方式对细胞进行力学加载:①向密闭培养室注入一定的气体使细胞受压;②抽真空产生负压使细胞受压;③利用培养液或向密闭小室内注入液体而产生的重力使细胞受压^[10]。优点是装置设备简单、操作方便、细胞受载均匀,缺点是不适于长时间实验研究。

1.4 基底应变加载

主要采用对细胞黏附的基底材料间接对细胞加载,通过对基底材料加载后使基底材料发生变形,从

而把相应应变传递到细胞上^[11]。优点是能够较好模拟大量细胞的受力情况,可提供持续性拉应力或压应力,如四点弯曲梁的单向应变加载^[12]、圆形负压 Flexcell 基底多向加载^[13]。

1.5 生物反应器加载

一种模拟体内环境的动态三维细胞加载装置,它可通过调控细胞氧浓度、压缩力、静水压、剪切力等生物物理因素,从而对细胞进行力学加载^[14]。优点是能提供可调控、可检测的恒力,缺点是这种加载方式需要将细胞接种到支架上。

1.6 离心力加载

在体外将细胞定量计数后,加入一定量的培养基制成细胞悬液,再把装有细胞悬液的培养瓶转移到低速离心机上离心,从而使悬浮的细胞受到重力、离心力及细胞与基质相互移动产生的摩擦力这3种力的综合作用。或者将附有贴壁生长细胞的培养瓶置于匀速旋转的离心机上,给予一定的转数,使细胞受到向外的牵张力刺激。优点是可提供轻至中度稳定、重复性好的恒力作用,缺点是细胞受离心力加载时各细胞并不处于相同的离心半径。

2 过载对成骨细胞的生物学效应

过载可引起骨生长代谢异常^[15],而碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、骨钙素(osteocalcin, OC)、钙结节等的合成都是成骨细胞分化的经典标志物,它们共同促进成骨细胞分化。张兵兵等^[16]用不同大小的剪应力(0、0.5、2.0 Pa)对成骨细胞加载,结果显示,细胞增殖能力的强弱依次为 0.5 Pa 组 > 0 Pa 组 > 2.0 Pa 组,而 ALP 活性大小依次为 2.0 Pa 组 > 0.5 Pa 组 > 0 Pa 组,由此可见细胞的增殖与分化能力并不与剪应力的成一致关系,过载剪应力在抑制细胞增殖的作用下可促进细胞分化。Visconti 等^[17]利用 Flexcell 细胞拉伸装置验证 0 ~ 25 000 $\mu\epsilon$ 应变对大鼠颅顶骨成骨细胞钙结节的影响,发现较小牵张力(< 999 $\mu\epsilon$)下产生的钙结节数量最多,大于 5 000 $\mu\epsilon$ 过载时钙结节数明显减少。Nomura 等^[18]通过对骨内细胞的研究发现,过载环境下成骨细胞的生物学效应主要受到细胞因子的影响。而胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF-1)由成骨细胞分泌,IGF-1 可作用于骨原细胞,促其增殖,

使成骨细胞数目增多,也可以直接促进成骨细胞分化。邹淑娟等^[19]通过 Flexcell 细胞拉伸装置对成骨细胞进行 6%、24% 拉伸应变加载研究,结果显示,24% 过载力应变抑制 IGF-1 的表达,而 6% 过载力应变增加 IGF-1 的表达。胡新永等^[20]在加力板上分别对成骨细胞加载 1 000、2 000、3 000 $\mu\epsilon$ 牵张刺激,结果发现,3 000 $\mu\epsilon$ 过载应力抑制成骨细胞骨钙素基因表达和增殖。韩磊等^[21]通过 Flexcell 细胞拉伸装置对大鼠颅顶骨成骨细胞同时施加 6%、9% 的过载应力,作用 12、24 及 48 h 后,在 6% 过载应力下,成骨细胞 BGP、COLI 和总蛋白的分泌量减少,但细胞的增殖活性明显增高;而在 9% 过载应力下,成骨细胞的增殖与分化能力均受到抑制。综上所述,由于各研究者采用的加载方式、加载力大小和加载装置不同,导致过载处理后成骨细胞的生物学效应不同,但过载应力大于 5 000 $\mu\epsilon$ 后成骨细胞的增殖与分化能力均受抑制已被广泛接受,而在 2 500 ~ 5 000 $\mu\epsilon$ 生理性过载应力水平下成骨细胞的增殖与分化能力还需进一步验证。

3 过载后细胞应答中的信号传导

过载刺激细胞组织后,细胞接受的生物物理信号是如何转导成细胞及细胞间可传导的生物化学信号,其机制与调节过程并不清楚,当前有以下 4 种信号转导通路被广泛认可。

3.1 MAPK 信号通路

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路是细胞外信号引起细胞内反应的重要信号通路。它存在于大多数动物细胞内,可将细胞外力学刺激信号转导至核内,从而引起细胞增殖、分化、转化或凋亡等^[22]。MAPK 激活后可以使丝/苏氨酸和酪氨酸磷酸化,最终高度选择性地激活细胞外调节蛋白激酶 1 (extracellular signal-regulated protein kinase 1, ERK1) 和细胞外调节蛋白激酶 2 (extracellular signal-regulated protein kinase 2, ERK2)^[23],而 ERK 可以使核内的转录因子磷酸化,如 C-fos、C-Jun、Elk-1 等,从而影响细胞的增殖与分化^[24-25]。另外,被力学刺激激活后的 ERK,也可迅速穿过核膜调控转录因子的表达,进而调节其下游一些重要细胞因子的表达,如胰岛素样生长因子-1、白细胞介素-1、前列腺素等^[26]。机械拉伸能活化

MAPK^[27],而 MAPK 能促进 ERK 磷酸化,ERK 的磷酸化又可以调节相关转录因子的表达,从而影响成骨细胞的增殖与分化。

3.2 早期响应基因

早期响应基因为一组控制细胞生长和信号传递的正常基因,如 C-fos、C-jun 等。在力学刺激下,这些基因被激活。Chen 等^[28]通过实验验证,成骨细胞受到一定流体剪切力作用后提高早期响应基因 C-fos、Cox-2 的表达,而这些激活的早期反应基因与 BGP、ALP 的 API 位点结合,由 TNF- α 、白细胞介素-1 等调节 MMP 的基因表达^[29]。这些基因的表达与细胞的生长及细胞间的信号传导密切相关。例如, Cox-2 基因所表达的蛋白质是前列腺素合成的关键限速酶,而成骨细胞受过载刺激后释放大量的前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂),进而调控骨生成与骨吸收之间的平衡^[30]。

3.3 第 2 信使系统

钙离子 (Ca²⁺) 是细胞内重要的第 2 信使,参与细胞及细胞间的信号传导。受到力学刺激后,在极短时间内,致成骨细胞内 Ca²⁺ 浓度升高是最早发生的生物学响应之一,通常称这种现象为力致钙响应。Malviya 等^[31]证实,对大鼠成骨细胞施加周期性拉伸刺激后,细胞内 Ca²⁺ 浓度迅速升高,胞内 Ca²⁺ 浓度的升高与细胞膜上 Ca²⁺ 通道的激活和胞内 Ca²⁺ 释放有关。成骨细胞膜上存在着“力学敏感性钙离子通道”或“牵拉激活离子通道”。大量研究证明,间歇性或长期的机械应变可增加通道的开放概率^[32]。鉴于细胞内外 Ca²⁺ 浓度与接受力学刺激后发生相应改变,这就意味着细胞对力学刺激的传导,而后导致各种细胞因子发生改变,影响成骨细胞的增殖与分化。

3.4 整合素-细胞骨架

整合素是细胞膜上的一种跨膜受体,它为细胞内骨架结构与细胞外基质的联系提供了桥梁。在细胞骨架中,如 α -肌动蛋白、纽带蛋白等特异的结构蛋白成分和一些信号传导激酶联合构成灶性黏附复合物,这些复合物成为细胞与细胞外基质附着端,进而与整合素相连接。整合素与细胞外特有配体(如骨桥蛋白、纤维结合素等蛋白质)结合后可引起细胞内一系列的变化,如细胞骨架的重排、特异信号传导激酶的激活和 pH 值的变化,这些变化都可导致

细胞功能发生改变^[33]。力学刺激可使成骨细胞骨桥蛋白、纤维结合素等蛋白的合成增加,相应地增加了与整合素的结合,从而导致成骨细胞的增殖与分化发生相应的改变。

3.5 BMPs-Smad 信号通路

成骨细胞在受到力学刺激后表现的生物学效应,受到各种生物活性因子的调控,如 PGE2、OPG 及 BMPs 等。其中 BMPs 是转化生长因子- β 超家族中的重要成员之一,其受体为丝氨酸/苏氨酸激酶受体。研究表明,在力学刺激下成骨细胞中 BMPs 的表达明显增加。过载基底拉伸应变可上调 BMP-2 和 BMP-4 的表达,从而激活 Smad1 和 Smad5 信号通路^[34]。BMPs 通过激活相应 Smad 蛋白进入成骨细胞核内,对骨形成相关基因的表达活化进行调控,从而引起成骨细胞的生物学效应发生相应的改变。

4 中药对成骨细胞的影响

中药由中成药、中药材和中药饮片组成。在中国,中药用于骨损伤的治疗具有悠久的历史,并且积累了宝贵的临床经验。目前人们越来越关注骨损伤治疗药物的副作用,故利用中药治疗骨损伤的研究变得炙手可热。而在细胞水平上观察各种中药对骨细胞功能的作用,已经成为探讨其对骨损伤修复药理作用的重要手段。目前在细胞水平上,很多中药材用于治疗骨损伤修复的研究,譬如淫羊藿苷^[35]、人参^[36]和三七三醇皂苷^[37]等。其中,淫羊藿苷用于骨损伤修复得到研究者的普遍关注。淫羊藿苷是一种中药单体,它是箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿、朝鲜淫羊藿等干燥茎叶的提取物;它也是淫羊藿中含黄酮最丰富的物质,具有广泛的生物活性。大量实验研究发现,淫羊藿苷可以促进体外培养的成骨细胞的增殖及分化。Hsieh 等^[38]研究发现,淫羊藿苷通过影响骨形态发生蛋白 2 和一氧化氮的合成促进成骨细胞的增殖与分化,继而促进骨骼的形成。郭海玲等^[39]用不同浓度的淫羊藿苷对成骨细胞进行干预,结果发现,浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 对成骨细胞增殖作用最强。殷晓雪等^[40]观察不同浓度对成骨细胞的影响,结果显示,浓度为 $20 \mu\text{g/mL}$ ($29.6 \mu\text{mol/L}$) 淫羊藿苷能够显著促进成骨细胞的增殖和分化。钱卫庆等^[41]用不同浓度淫羊藿苷对大鼠成骨细胞进行干预,结果发现,浓度为 $10 \mu\text{g/L}$ ($14.8 \mu\text{mol/L}$) 淫

羊藿苷对成骨细胞的增殖与分化能力均有促进作用,且作用最强,最为持久。在细胞水平上,一定浓度的淫羊藿苷可以促进成骨细胞的增殖与分化,但淫羊藿苷对过载损伤后的成骨细胞是否也存在一个最佳浓度,从而促进成骨细胞的增殖与分化,使它成为对抗过载环境所致骨损伤的新方法,还需进一步的探索。

5 展望

综上所述,目前在体外力学加载方式上并不统一,各装置都存在一定的不足,在模拟细胞受力微环境上与体内还存在一定差距,如何对加载装置进行改进,从而更好为后期过载造模提供更真实的受力微环境将是未来研究的趋势。如今大量士兵、搬运工人等长期处于过载力学环境下,长期忍受着过载骨损伤的病痛。在细胞水平上给予成骨细胞过载刺激,研究成骨细胞的增殖和分化,可进一步了解过载力对骨生长代谢的影响及骨内细胞的响应机制。随着人们健康意识的提高,人们对治疗药物的要求不断提高,药物的副作用也就成为人们关注的焦点,这恰恰为传统中药带了发展的新契机。而研究淫羊藿苷对过载成骨细胞的影响,能进一步揭示淫羊藿苷对过载骨损伤的预防及治疗机制,为未来传统中药用于治疗临床骨损伤具有重要的现实意义,用中药(如淫羊藿苷)对抗极端过载力学环境下骨损伤有望成为未来研究的热点。

参考文献:

- [1] HOU B, FUKAI N, OLSEN BR. Mechanical force-induced midpalatal suture remodeling in mice [J]. *Bone*, 2007, 40(6): 1483-1493.
- [2] SIMS NA, GOOI JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19(5): 444-451.
- [3] KIKUTA J, KAWAMURA S, OKIJI F, et al. Sphingosine-1-phosphate-mediated osteoclast precursor monocyte migration is a critical point of control in antiresorptive action of active vitamin D [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(17): 7009-7013.
- [4] 姚晓琳, 李良. 雌激素受体在骨生长、代谢及其力学响应中的作用和机制[J]. *医用生物力学*, 2013, 28(3): 357-362.
YAO XL, LI L. The role and mechanism of estrogen recep-

- tor in bone growth, metabolism and mechano-responsiveness [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(3): 357-362.
- [5] FROST HM. Bone "mass" and the "mechanostat": A proposal [J]. *The Anatomical Record*, 1987, 219(1): 1-9.
- [6] 臧建华, 刘建军. 军事训练膝关节应力性损伤的机制及预防策略[J]. *西北国防医学杂志*, 2014, 35(3): 251-254.
- [7] BURR DB, MILGROM C, FYHRIE D, *et al.* *In vivo* measurement of human tibial strains during vigorous activity [J]. *Bone*, 1996, 18(5): 405-410.
- [8] 张西正, 匡震邦, 蔡绍哲, 等. 细胞力学实验技术研究[J]. *实验力学*, 2001, 16(1): 66-76.
- [9] YANAGISAWA M, SUZUKI N, MITSUI N, *et al.* Effects of compressive force on the differentiation of pluripotent mesenchymal cells [J]. *Life Sci*, 2007, 81(5): 405-412.
- [10] LIU C, ZHAO Y, CHEUNG WY, *et al.* Effects of cyclic hydraulic pressure on osteocytes [J]. *Bone*, 2010, 46(5): 1449-1456.
- [11] MAUNEY JR, SJOSTORM S, BLUMBERG J, *et al.* Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds *in vitro* [J]. *Calcif Tissue Int*, 2004, 74(5): 458-468.
- [12] 张西正, 康少华, 蔡绍哲. 一种四点弯曲单向交变应变细胞加载装置的研制[J]. *医疗卫生装备*, 1999, 4: 6-8.
- [13] BANES AJ, GILBERT J, TAYLOR D, *et al.* A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells *in vitro* [J]. *Cell Sci*. 1985, 75: 35-42.
- [14] 汤亭亭. 生物反应器在组织工程研究中的应用[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(1): 6-7.
- Tang TT. Application of bioreactors in tissue engineering [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(1): 6-7.
- [15] 张鹏, 房兵, 江凌勇. 机械刺激对成骨细胞骨架的影响[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(1): 87-91.
- ZHANG P, FANG B, JIANG LY. Effect of mechanical stimulation on osteoblast cytoskeleton [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(1): 87-91.
- [16] 张兵兵, 潘君, 王远亮, 等. 流体剪应力对成骨细胞的作用研究[J]. *生物医学工程杂志*, 2008, 25(4): 845-848.
- [17] VISCONTI LA, YEN EH, JOHNSON RB. Effect of strain on bone nodule formation by rat osteogenic cells *in vitro* [J]. *Arch Oral Biol*, 2004, 49(6): 485-492.
- [18] NOMURA S, TAKANO-YAMAMOTO T. Molecular events caused by mechanical stress in bone [J]. *Matrix Biol*, 2000, 19(2): 91-96.
- [19] 邹淑娟, 胡静, 高占巍. 成骨样细胞受张力作用后 PGE₂ 含量及 GIF-I 表达变化[J]. *口腔医学杂志*, 2002, 22(1): 1-2.
- [20] 胡新永, 殷力, 陈建文, 等. 牵张应力对成骨细胞骨钙素基因表达和增殖的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(6): 1163-1166.
- [21] 韩磊, 李煌, 赵计林, 等. 不同牵张力对成骨细胞增值与合成功能的影响[J]. *实用口腔医学杂志*, 2012, 28(6): 677-681.
- [22] SHAUL YD, SEGER R. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8): 1213-1226.
- [23] TSAI JR, CHONG IW, CHEN CC, *et al.* Mitogen-activated protein kinase pathway was significantly activated in human bronchial epithelial cells by nicotine [J]. *DNA Cell Biol*, 2006, 25(5): 312-322.
- [24] BOONYARATANAKOMKIT V, MCGOWAN E, SHERMAN L, *et al.* The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(2): 359-375.
- [25] HAINICH EC, PIZZIO GA, GOLOMBEK DA. Constitutive activation of the ERK. MAPK pathway in the suprachiasmatic nuclei inhibits circadian resetting [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(28): 6665-6668.
- [26] JACKSON RA, KUMARASURIYAR A, NURCOMBE V, *et al.* Long-term loading inhibits ERK1/2 phosphorylation and increases FGFR3 expression in MC3T3-E1 osteoblast cells [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 209(3): 894-904.
- [27] WEYTS FA, BOSMANS B, NIESING R, *et al.* Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation [J]. *Calcif Tissue Int*, 2003, 72(4): 505-512.
- [28] CHEN NX, RYDER KD, PAVALKO FM, *et al.* Ca²⁺ regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and expression in osteoblasts [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 278(5): 989-997.
- [29] ROSENSCHEIN U, ROTH A, RASSIN T, *et al.* Analysis of coronary ultrasound thrombolysis endpoints in acute myocardial infarction (ACUTE trial). Results of the feasibility phase [J]. *Circulation*, 1997, 95(6): 1411-1416.
- [30] TIAN XY, ZHANG Q, ZHAO R, *et al.* Continuous PGE2 leads to net bone loss while intermittent PGE2 leads to net bone gain in lumbar vertebral bodies of adult female rats [J]. *Bone*, 2008, 42(5): 914-920.
- [31] MALVIYA AN, KLEIN C. Mechanism regulating nuclear calcium signaling [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006, 84(3-4): 403-422.
- [32] KIZER N, GUO XL, HRUSKA K. Reconstitution of stretch-activated cation channels by expression of the alpha-subunit of the epithelial sodium channel cloned from osteoblasts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(3): 1013-1018.