

文章编号:1004-7220(2018)06-0537-07

流体剪应力对成骨分化不同阶段细胞 Piezo1 基因表达的影响

郭萌萌¹, 余洋², 叶重阳¹, 孙青¹, 赵虎成², 霍波¹

(1. 北京理工大学 宇航学院 力学系, 北京 100081; 2. 清华大学 航天航空学院, 生物力学与医学工程研究所, 北京 100084)

摘要:目的 系统研究流体剪应力(fluid shear stress, FSS)作用下成骨分化方向不同阶段4种细胞内 Piezo1 离子通道蛋白的基因表达情况。**方法** 利用自行研发的锥板流动腔技术,对小鼠来源的间充质干细胞 MSC、成骨样细胞 MC3T3-E1、成骨末期细胞 MLO-A5 和骨细胞 MLO-Y4 施加不同强度 FSS(0.1、1.1 Pa),并分别在0、0.5、1、3、6、12 h 等不同时间点抽提细胞内总 RNA,应用实时荧光定量 PCR 技术研究 FSS 刺激对 Piezo1 基因表达的影响情况。**结果** MSC、MC3T3-E1、MLO-A5 和 MLO-Y4 细胞内都表达 Piezo1 和 Piezo2。FSS 作用后,所有细胞的 Piezo1 表达明显升高,并且 1.1 Pa FSS 刺激下的表达水平显著高于 0.1 Pa。MSC、MC3T3-E1 和 MLO-A5 这3种细胞在 FSS 刺激 1 h 后, Piezo1 表达水平达到最高。Piezo1 表达依赖于细胞种类,其中 MC3T3-E1 细胞的表达量高于其他3种细胞。**结论** Piezo1 的表达与成骨分化过程、FSS 水平和加载时间相关,研究结果对于揭示骨组织细胞内力学信号的传递机制以及发展相应临床治疗措施具有重要意义。

关键词: 流体剪应力; 成骨分化; 力敏感离子通道; 力学传导

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2018.06.010

Effects of Fluid Shear Stress on Gene Expression of Piezo1 in the Cells During Osteogenic Differentiation

GUO Mengmeng¹, YU Yang², YE Chongyang¹, SUN Qing¹, ZHAO Hucheng², HUO Bo¹

(1. Department of Mechanics, School of Aerospace Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China; 2. Institute of Biomechanics and Medical Engineering, School of Aerospace Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Objective To investigate the gene expression of Piezo1 in four types of bone cells at different stages of osteogenic differentiation under fluid shear stress (FSS). **Methods** The mouse-derived mesenchymal stem cells (MSC), osteoblast-like cells MC3T3-E1, post-osteoblasts MLO-A5 and osteocytes MLO-Y4 were exposed to FSS at different magnitude (0.1, 1.1 Pa) with a custom-made cone-plate flow chamber for 0.5, 1, 3, 6, 12 h, respectively. The expression of Piezo1 mRNA was assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Results** Both Piezo1 and Piezo2 were expressed in four types of bone cells. The expression of Piezo1 was significantly up-regulated in all cells under FSS stimulation, and the expression level under 1.1 Pa FSS was significantly higher than that under 0.1 Pa FSS. In addition, the expression of Piezo1 in MSC, MC3T3-E1 and MLO-A5

收稿日期:2017-11-29; 修回日期:2018-01-20

基金项目:国家自然科学基金项目(11372043,11572043)

通信作者:霍波,教授,博士研究生导师, E-mail: huobo@bit.edu.cn

cells increased to the highest level at 1 h under FSS stimulation. The expression of Piezo1 in MC3T3-E1 cells was much higher than that in the other three types of cells. **Conclusions** The expression of Piezo1 was related to the process of osteogenic differentiation, FSS level and loading time, and this research finding is of great significance to reveal the mechanism of mechanotransduction in bone tissues and to establish clinical treatment for bone diseases.

Key words: fluid shear stress (FSS); piezo1 channel; bone cells; osteogenic differentiation; mechanosensitive ion channels; mechanotransduction

尽管已经有大量研究表明,力学因素会经由激活细胞膜上阳离子通道引起细胞内的一系列生物学响应^[1-3],但哺乳动物细胞中具体的力敏感离子通道蛋白在很长时间内都未确定。2010年,美国克利普斯研究院的 Patapoutian 课题组从小鼠成神经细胞瘤细胞系中发现两种跨膜蛋白 Piezo1 和 Piezo2,当利用 RNA 干扰技术敲低其表达时,玻璃探针施压细胞所引起的通道电流会显著降低;而当两种蛋白分别过表达时,力学作用引起的通道电流都会显著升高^[4]。其后续工作证明 Piezo1 是具有成孔性的力敏感离子通道^[5]。2015年,研究者利用冷冻电镜技术解析小鼠 Piezo1 离子通道的三维结构^[6],并进一步确定 Piezo1 离子通道中负责离子通透与选择性的孔径区以及负责机械力感受与传递的结构域^[7]。Piezo 离子通道的发现及其结构、感受和传递分子机制的明确,极大地促进了细胞力学传导机制的研究。

目前研究发现,大部分生物组织(如肺、神经、膀胱、肌肉等)的细胞基因水平都会表达 Piezo1,而 Piezo2 仅在肺部和背根神经节中表达丰富^[8]。另外,关于 Piezo 在骨组织细胞中的表达研究,已经发现骨细胞系 MLO-Y4 中会表达 Piezo1,但利用 siRNA 技术沉默 Piezo1 后骨细胞对流体剪应力(fluid shear stress, FSS)的钙响应并无显著变化^[9]。在成骨样细胞系 MC3T3-E1 中也会表达 Piezo1 和 Piezo2,并且蛋白分子在胞浆中呈颗粒状分布^[10]。另外,在牙齿形成相关的细胞,如成牙本质细胞^[11]、牙骨质细胞^[12]中都已经发现了 Piezo 的表达。但是,目前还不清楚在其他骨组织细胞内 Piezo 基因水平的表达情况。

研究发现,当对细胞施加机械力刺激后,某些种类的细胞中 Piezo 在基因水平的表达会发生变化。例如,当施加静水压作用 0.5 h 后,人牙周韧带

成纤维细胞中 Piezo1 的 mRNA 水平会显著增加,但随着加载时间延长至 12 h,其表达会略有下降^[13]。对小鼠成牙骨质细胞施加静水压力后,其成骨标志物表达下降,并且在 24 h 内 Piezo1 mRNA 的表达也呈逐渐下降趋势。当利用 siRNA 技术降低 Piezo1 的表达后,静水压力所引起的成骨功能下降现象会被进一步增强^[12]。有关力学刺激对骨组织细胞中 Piezo 离子通道表达的影响,目前鲜有系统的研究报告。

本文针对 4 种成骨向分化过程中不同阶段的细胞(间充质干细胞 MSC、成骨样细胞 MC3T3-E1、成骨末期细胞 MLO-A5 和骨细胞 MLO-Y4),首先检测了其中 Piezo1 和 Piezo2 在基因水平的表达情况,然后对细胞分别施加不同强度 FSS,在加载的不同时间点检测胞内 Piezo1 在基因水平上的表达变化。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

选用 4 种成骨向分化相关的细胞系,其中小鼠间充质干细胞 MSC 和小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 购买自美国标准细胞库(ATCC),小鼠类骨质骨细胞(或成骨末期细胞) MLO-A5 和小鼠骨细胞 MLO-Y4 获赠于美国密苏里-堪萨斯大学 Lynda Bonewald 教授。以上 4 种细胞的培养基均为含 10% 胎牛血清(FBS, Gibco 公司,美国)和 1% PS 双抗(Sigma 公司,美国)的 α -MEM (Hyclone 公司,美国),培养环境为 37 °C、5% CO₂。

1.2 施加 FSS

利用实验室自制的锥板流动腔装置对细胞施加 FSS。实验装置由加载锥形轴、电机和盖子组成,可直接应用于 6 孔细胞培养板,通过调节加载轴转动速度、加载轴与底板距离等参数来调节培养板底面上的流场分布(见图 1)。

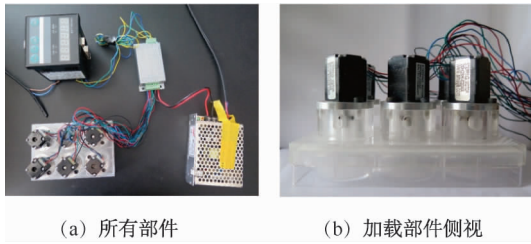


图1 锥板流动腔实验装置

Fig.1 Cone-and-plate flow chamber (a) Integrated device, (b) Side view of loading device

锥板流动腔旋转参数的确定利用 COMSOL 有限元计算软件完成。计算结果表明,当加载轴距底面的距离 $h=0.1\text{ mm}$ 、加载轴转速分别为 3、30 rad/s 时,在细胞培养板底面上距半径 8~15 mm 的环状区域内存在 FSS 为 0.1、1.1 Pa 的均匀流场[见图 2(a)]。实验前用免疫组化笔在 6 孔细胞培养板底面圈涂掉非均匀流场区域,然后将细胞悬液接种于培养板内上述具有均匀流场的目标接种区域[见图 2(b)]。培养 48 h 后,连续施加 FSS 0.5、1、3、6、12 h。

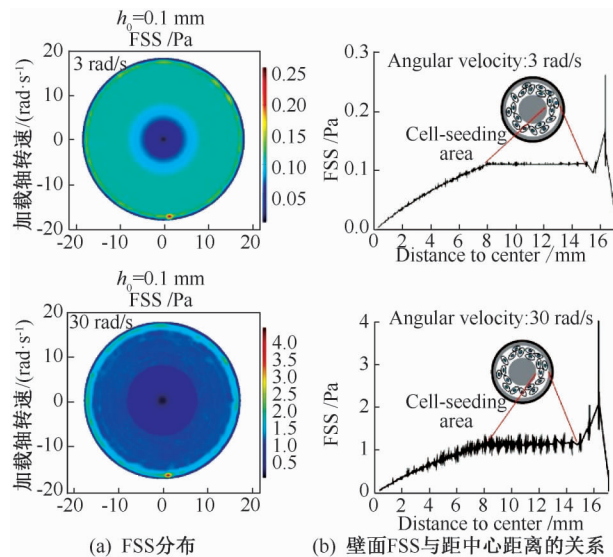


图2 不同加载轴转速下 6 孔板底面 FSS 数值模拟结果

Fig.2 Numerical simulation results of FSS on the plate surface at different rotating speed (a) FSS distribution, (b) Relation between FSS and the distance from the center

1.3 实时荧光定量 PCR

当对细胞完成 FSS 加载后,使用 TRIzol 试剂提取细胞中的总 RNA,并进行实时荧光定量 PCR 检测。引物序列如表 1 所示,所使用的试剂盒是 PrimerScript™ RT Master Mix 和 SYBR Premix Ex

Taq II(TaKaRa 公司,美国),根据 Ct 值,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算相对表达量^[14-15]。

表1 引物设计

Tab.1 Real Time QPCR Primers

引物名称	引物序列	扩增长度/bp	纯化方式
Piezo1	正向: 5' - GATTGGGCAGCCTAT-GAACT -3'	126	DSL
	逆向: 5' - AACACCGTGAGGAACAGACA -3'		
Piezo2	正向: 5' - GAGCCCACAGAGAAGGAA-GA -3'	132	DSL
	逆向: 5' - CACCTGATTACCCAGCAC-CT -3'		
GAPDH	正向: 5' - GGTGAAGGTCGGTGT-GAAGC -3'	233	DSL
	逆向: 5' - CTCGCTCCTGGAAGATG-GTG -3'		

1.4 统计分析

任一实验组至少重复 3 次,并且所有数据采用均值 ± 标准差来表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 检验不同实验组间平均值的差异, $P < 0.05$ 或 $P < 0.1$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 种细胞内表达 Piezo1 和 Piezo2

PCR 实验结果显示,在 MSC、MC3T3-E1、MLO-A5 和 MLO-Y4 这 4 种细胞内,均表达 Piezo1 和 Piezo2。统计分析表明,4 种细胞之间相比 Piezo1 mRNA 或 Piezo2 mRNA 的表达量相似,其与内参基因的相对比值分别为 0.5~0.8、0.2~0.3,细胞种类间无显著差异。另外, Piezo1 的表达量显著高于 Piezo2,后者的表达非常微弱(见图 3)。因此,本文只关注 FSS 对 Piezo1 表达的影响。

2.2 加载时间、大小对 Piezo1 表达的影响

对 MSC、MC3T3-E1、MLO-A5 和 MLO-Y4 细胞连续施加 FSS,作用 0.5、1、3、6 和 12 h 后,PCR 结果显示 Piezo1 mRNA 表达先升高再降低。在 1.1 Pa FSS 作用 0.5、1 和 3 h 时,所有细胞的 Piezo1 表达量均显著高于未加载的对照组。在 MSC、MC3T3-E1 和 MLO-A5 这 3 种细胞连续受到 FSS 作用 1 h 后, Piezo1 表达量达到峰值,其与内参基因的相对比值分别为 8.15 ± 2.22 、 10.68 ± 4.64 、 6.39 ± 0.44 ;而在 MLO-Y4 内, Piezo1 表达量在 0.5 h 时达到峰值,即 3.50 ± 0.77 。在 12 h 时, MSC、

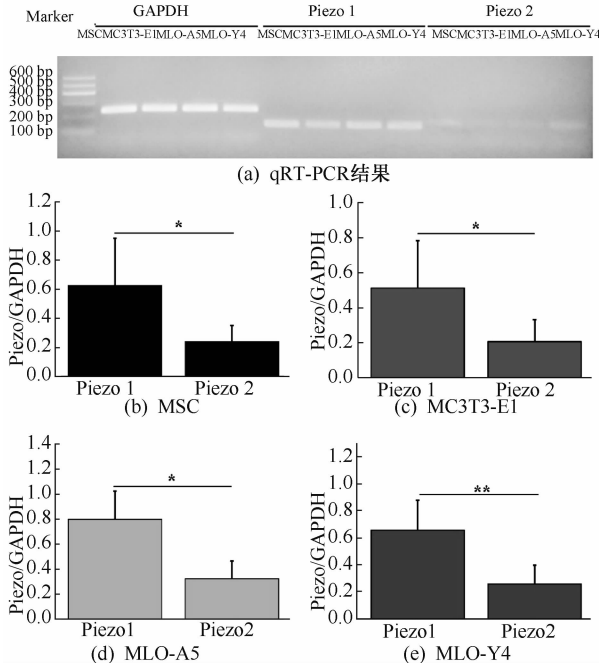


图3 4种细胞中Piezo1和Piezo2在mRNA水平的表达情况及统计分析(* $P < 0.05$, ** $P < 0.1$)

Fig. 3 The mRNA expression of Piezo1 and Piezo2 in four cell lines and statistical analyses (a) qRT-PCR results, (b) MSC, (c) MC3T3-E1, (d) MLO-A5, (e) MLO-Y4.

MC3T3-E1和MLO-A5这3种细胞中表达量显著低于对照组,推测1.1 Pa FSS连续12 h的刺激对细胞而言是较为恶劣的环境,细胞不耐受而出现了异常。在0.1 Pa FSS作用0.5、1和3 h时, MSC、MC3T3-E1和MLO-Y4这3种细胞Piezo1表达量显著高于无加载对照组,但对MLO-A5细胞而言不同时间点并无显著差异。在MSC、MC3T3-E1和MLO-A5等3种细胞都会在受到FSS作用1 h时Piezo1的表达量达到最高值,但1.1 Pa作用下的表达量显著高于0.1 Pa,相对比值分别为231.30%、136.28%和269.36%;相同时间处, MLO-Y4胞内表达的相对比值为27.23%。当细胞分别受到0.1、1.1 Pa FSS作用0.5 h时, MLO-Y4胞内表达的Piezo1并没有显著差异,但是其他3种细胞内的Piezo1表达量在高剪应力下均显著高于低剪应力(见图4)。

2.3 Piezo1表达依赖于细胞种类

当4种细胞受到FSS作用0.5 h或1 h后, Piezo1在MC3T3-E1细胞内的表达量平均值最高,其次为MSC、MLO-A5和MLO-Y4。在1.1 Pa FSS作用0.5 h之后, Piezo1在MC3T3-E1细胞内的表达显著高于MLO-A5和MLO-Y4;而在施加剪切力1 h之后, Piezo1在MLO-Y4细胞内的表达显著低于其他

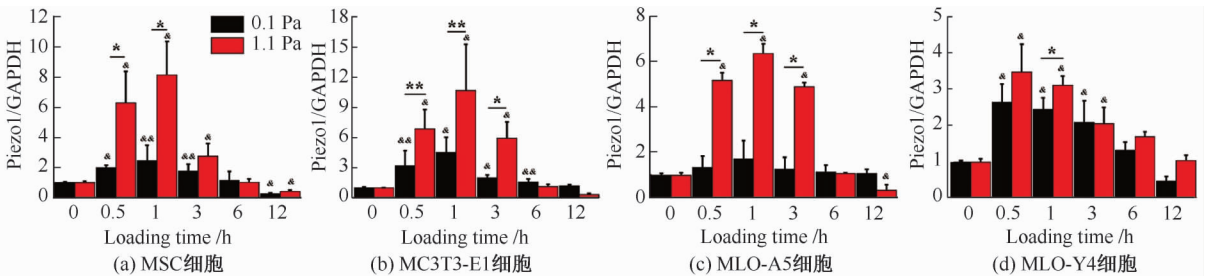


图4 不同FSS对4种细胞中Piezo1表达的影响(不同加载时间与各自未加载时比较, & $P < 0.05$, && $P < 0.1$; 相同加载时间不同FSS比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.1$)

Fig. 4 Effects of different FSS on Piezo1 expression in four cell lines (a) MSC, (b) MC3T3-E1, (c) MLO-A5, (d) MLO-Y4

3种细胞。与1.1 Pa FSS结果不同,在0.1 Pa FSS作用0.5 h后Piezo1在MLO-Y4细胞内的表达要显著高于MLO-A5,在作用1 h时在MC3T3-E1内的表达显著高于MLO-A5(见图5)。

3 讨论

细胞力学通常是指研究力学作用下细胞的生物学行为和机制,但细胞通过何种途径感受和传递

力学信号一直是此领域的核心问题,实际上该问题目前仍未得以很好地解决。在外力刺激作用下,细胞会发生细胞膜变形、细胞骨架变形、细胞质内物质运输改变等直接物理响应^[16]。其中,细胞膜变形会激活位于细胞膜上的离子通道,引起胞内外离子跨膜运输的变化,进而调节细胞的生物学响应。本课题组在骨组织细胞力学方面已经开展了大量工作,发现当使用金属钆($GdCl_3$)阻断细胞膜上的力

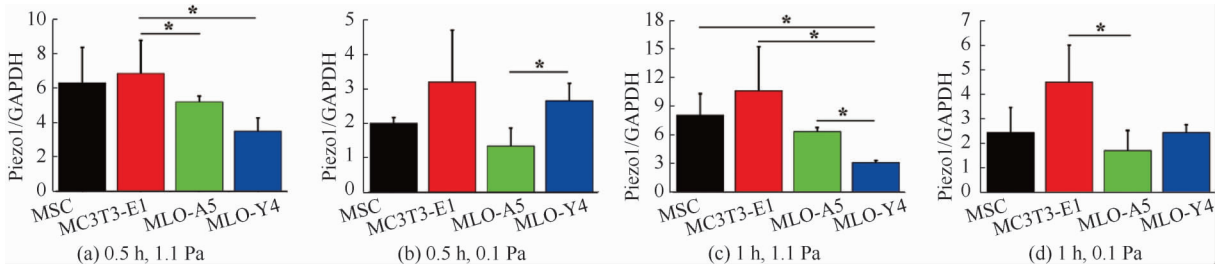


图5 4种细胞系在不同FSS作用0.5、1 h的Piezo1 mRNA表达情况(* $P < 0.05$)

Fig. 5 Piezo1 mRNA expression in four cell lines under different FSS for 0.5 h and 1 h, respectively

(a) 0.5 h, 1.1 Pa, (b) 0.5 h, 0.1 Pa, (c) 1 h, 1.1 Pa, (d) 1 h, 0.1 Pa

敏感离子通道后, FSS引起的破骨细胞的钙响应以及沿液体流动方向的定向迁移都会受到显著抑制^[17-18]。与他在细胞力学方面的工作类似, 虽然能够证明细胞膜上存在对力学刺激敏感的离子通道, 但该种离子通道是什么及其调控机制仍不清楚。Piezo力敏感离子通道的发现为细胞力学方向的机制研究指明了重要的研究对象。本文研究了Piezo1和Piezo2在4种成骨向分化相关细胞中的在基因水平上的表达情况以及FSS对其表达的影响, 可为后续骨组织细胞中的力学传导机制研究提供初步的数据和结果。

处于成骨向分化不同阶段的细胞的力学敏感性一直是骨生物力学领域十分感兴趣的问题。由于骨陷窝-骨小管孔隙结构中的骨细胞深埋于骨基质内, 人们推测它们应该最容易探测到骨骼受到外力后的变形, 是最可能的力学感受器。而大量研究工作也支持这一推断, 例如当利用转基因技术敲除骨内70%~80%的骨细胞后, 正常情况下无外载所导致的骨质流失将不再发生^[19]。本课题组此前的一项工作也证明, 与成骨样细胞系MC3T3-E1相比, FSS作用下骨细胞系MLO-Y4的钙振荡更为显著^[20]。但骨细胞对力学刺激更为敏感的机制仍不清楚, 显然力敏感离子通道表达量是一个最值得重点关注的原因。本文结果表明, Piezo1和Piezo2都会表达于MSC、MC3T3-E1、MLO-A5、MLO-Y4这4种细胞中, 并且在未受到FSS刺激时, Piezo1 mRNA和Piezo2 mRNA表达量在细胞间无显著性差异, 说明未加载时Piezo力敏感离子通道的表达量并不会导致成骨向分化不同阶段细胞间在受力初始瞬间响应的差异。本研究还发现, 在上述4种细胞中Piezo1的基因表达显著高于Piezo2, 实际上此前关于

细胞力学感受和响应的研究也多关注Piezo1。例如, 对人脐静脉内皮细胞细胞施加FSS, 结果发现Piezo1参与细胞钙信号的传递^[21]。静止状态培养时人脐静脉内皮细胞的排列并不具有方向性, 但当施加FSS后, 与Piezo1低表达的细胞相比, 正常表达Piezo1的细胞会呈现沿液体流动方向的排列, 说明Piezo1参与对力学加载方向的感受并调控细胞铺展极性^[21-22]。鉴于已有研究中Piezo1对细胞力学转导的作用, 在此初步工作中本文只研究了FSS作用下Piezo1在基因水平的表达, 后续将探讨Piezo2的表达情况及两者对细胞力学转导的调控作用。当对这4种细胞施加FSS后, 细胞中Piezo1的表达量都会在0.5~3 h内迅速升高到峰值, 然后在6~12 h后逐渐恢复到与未加载时接近的水平。特别是骨细胞MLO-Y4, 其在受到力学刺激0.5 h后即可迅速达到峰值。尽管明显早于其他3种细胞, 但其中Piezo1的表达量仍与其他3种细胞无显著差异, 说明从力敏感离子通道的基因水平表达量方面并不足以说明骨细胞具备更优于其他细胞的力敏感性。因此, 阐明骨细胞具有特殊力敏感性的机制仍需开展进一步深入的工作。

Piezo1的表达量依赖于FSS的大小。例如, 这4种细胞在受到较高FSS(1.1 Pa)作用0.5~3 h后, Piezo1的表达量都显著高于低FSS水平(0.1 Pa)的相应结果。骨内存在多种尺度的充满液体的孔隙结构, 外载作用下液体流动会对骨组织细胞施加FSS, 研究者已经通过理论分析推测其大小应为0.8~3.0 Pa^[23]。因此, 与低于生理水平的FSS相比, 正常生理水平的力学刺激会在骨组织细胞上引起显著增强的Piezo1表达, 提示细胞在较高水平的力学作用下可增强其力敏感性。Patapoutian等^[24]

利用一个希腊词汇“πίεση”来命名他们发现的这种蛋白,意为压力或挤压,表明该通道具有被压力激活的特性。实际上,已有研究发现,模拟压力作用时细胞中 Piezo 的表达也有类似的现象。例如, Jin 等^[13]对人牙周韧带细胞施加 200 Pa 静水压力 0.5 h, Piezo1 的相对比值提高至未加载时的 7 倍,但随着加载时间的增加,其表达量逐渐下降; Zhang 等^[12]对小鼠成牙骨质细胞施加 200 Pa 压力后,细胞中的 Piezo1 的 mRNA 和蛋白水平在加载 3 h 后即逐渐下降^[12]。因此,力学作用会调控细胞中 Piezo 离子通道的表达,并且其表达量与力学刺激的大小有关。

通常研究者采用平行板流动腔对细胞施加 FSS 刺激^[25]。平行板流动腔是一种狭长腔室结构,其高度远小于宽度和长度,通过蠕动泵驱动培养基流过腔室,并对接种于腔室底板上的细胞施加 FSS。平行板流动腔的流场计算简单,可以用来对细胞进行短时间的实时加载观察实验。平行板流动腔的缺点是使用操作复杂,并且安装过程中容易污染细胞,难以对细胞进行长时间的 FSS 作用。本实验室研制了新型的锥板流动腔技术,可以直接应用于生物实验室常规的 6 孔细胞培养板。此装置的缺点是流场计算较为复杂,优点是操作简便,并且可以对细胞施加长期的 FSS 作用。

综上所述, MSC、MC3T3-E1、MLO-A5、MLO-Y4 这 4 种成骨向分化不同阶段细胞,均能够表达 Piezo1 和 Piezo2。FSS 作用下会引起 Piezo1 mRNA 的表达升高,在加载 0.5 h 或 1 h 时, Piezo1 会出现峰值,显著高于未加载的对照组。该初步结果为进一步深入研究骨组织细胞的力学传导机制提供了基础数据。

参考文献:

[1] GARCÍA AÑOVEROS J, SAMAD TA, ŽUVELAJELASKA L, *et al.* Transport and localization of the DEG/ENaC ion channel BNaCl α to peripheral mechanosensory terminals of dorsal root ganglia neurons [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(8): 2678-2686.

[2] HONORE E. The neuronal background K₂P channels: Focus on TREK1 [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(4): 251-261.

[3] MASUYAMA R, VRIENS JT, KARASHIMA Y, *et al.* TR-

PV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts [J]. *Cell Metabolism*, 2008, 8(3): 257-265.

[4] COSTE B, MATHUR J, SCHMIDT M, *et al.* Piezo1 and Piezo2 Are Essential Components of Distinct Mechanically Activated Cation Channels [J]. *Science*, 2010, 330(6000): 55-60.

[5] COSTE B, XIAO B, SANTOS JS, *et al.* Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels [J]. *Nature*, 2012, 483(7388): 176-181.

[6] GE J, LI W, ZHAO Q, *et al.* Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel [J]. *Nature*, 2015, 527(7576): 64-69.

[7] ZHAO Q, WU K, GENG J, *et al.* Ion permeation and mechanotransduction mechanisms of mechanosensitive piezo channels [J]. *Neuron*, 2016, 89(6): 1248-1263.

[8] SUCHYNA TM. Piezo channels and GsMTx4: Two milestones in our understanding of excitatory mechanosensitive channels and their role in pathology [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2017, 130(Pt B): 244-253.

[9] LEE KL, GUEVARRA MD, NGUYEN AM, *et al.* The primary cilium functions as a mechanical and calcium signaling nexus [J]. *Cilia*, 2015, 4: 7.

[10] 康婷. 机械敏感性离子通道 Piezo 在正畸牙周组织中表达和功能的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2014.

[11] 李鹏. 新型机械敏感离子通道 Piezo 在成牙本质细胞表达和功能研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2013.

[12] ZHANG YY, HUANG YP, ZHAO HX, *et al.* Cementogenesis is inhibited under a mechanical static compressive force via Piezo1 [J]. *Angle Orthod*, 2017, 87(4): 618-624.

[13] JIN Y, LI J, WANG Y, *et al.* Functional role of mechanosensitive ion channel Piezo1 in human periodontal ligament cells [J]. *Angle Orthod*, 2015, 85(1): 87-94.

[14] SWARTZ MF, FINK GW, LUTZ CJ, *et al.* Left versus right atrial difference in dominant frequency, K⁽⁺⁾ channel transcripts, and fibrosis in patients developing atrial fibrillation after cardiac surgery [J]. *Heart Rhythm*, 2009, 6(10): 1415-1422.

[15] HUGHES PA, BRIERLEY SM, YOUNG RL, *et al.* Localization and comparative analysis of acid-sensing ion channel (ASIC1, 2, and 3) mRNA expression in mouse colonic sensory neurons within thoracolumbar dorsal root ganglia [J]. *J Comp Neurol*, 2007, 500(5): 863-875.

[16] 霍波, 康英永, 胡漫, 等. 成骨细胞力致钙响应和钙传递的研究进展[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(4): 382-388.

HUO B, KANG YY, HU M, *et al.* Advances of mechanical stimulation induced calcium response and transfer in osteoblasts [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(4): 382-388.

- [17] LI P, LIU C, HU M, *et al.* Fluid flow-induced calcium response in osteoclasts: Signaling pathways [J]. *Ann Biomed Eng*, 2014, 42(6): 1250-1260.
- [18] LIU C, LI S, JI B, *et al.* Flow-Induced migration of osteoclasts and regulations of calcium signaling pathways [J]. *Cell Mole Bioeng*, 2015, 8(1): 213-223.
- [19] TATSUMI S, ISHII K, AMIZUKA N, *et al.* Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction [J]. *Cell Metab*, 2007, 5(6): 464-475.
- [20] LU XL, HUO B, CHIANG V, *et al.* Osteocytic network is more responsive in calcium signaling than osteoblastic network under fluid flow [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(3): 563-574.
- [21] LI J, HOU B, TUMOVA S, *et al.* Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force [J]. *Nature*, 2014, 515(7526): 279-282.
- [22] RANADE SS, QIU Z, WOO SH, *et al.* Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(28): 10347-10352.
- [23] WEINBAUM S, COWIN SC, ZENG Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses [J]. *J Biomech*, 1994, 27(3): 339-360.
- [24] COSTE B, MATHUR J, SCHMIDT M, *et al.* Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels [J]. *Science*, 2010, 330(6000): 55-60.
- [25] JI BH, HUO B. Probing the mechanosensitivity in cell adhesion and migration: Experiments and modeling [J]. *Acta Mechanica Sinica*, 2013, 29(4): 469-484.