

文章编号:1004-7220(2022)01-0162-07

周期性机械牵拉通过上调 Runx2 表达促进 MC3T3-E1 细胞迁移

闫旭¹, 李子通², 刘继婷², 齐颖新², 梅炯¹

(1. 上海市第六人民医院 骨科, 上海 200233; 2. 上海交通大学 力学生物医学研究所, 上海 200240)

摘要:目的 探究周期性牵拉对小鼠胚胎成骨细胞 MC3T3-E1 迁移功能的影响及其相关机制。方法 使用应变加载系统对体外培养的 MC3T3-E1 细胞施加 15% 幅度的牵拉, 模拟细胞体内受力情况。使用划痕愈合实验检测 MC3T3-E1 细胞的迁移功能, 使用蛋白免疫印迹法检测 Runx2 表达情况, 使用 RNA 干扰技术特异性降低 Runx2 表达量。结果 幅度 15%、频率 1.25 Hz、持续 24 h 的周期性机械牵拉可以促进 MC3T3-E1 细胞的迁移, 升高细胞内 Runx2 表达水平。在静态培养条件下, 干扰 Runx2 能抑制 MC3T3-E1 细胞的迁移。干扰 MC3T3-E1 细胞中 Runx2 表达可以部分降低机械牵拉对细胞迁移的促进效应。结论 周期性牵拉可以促进 MC3T3-E1 细胞的迁移, 在此过程中 Runx2 可能发挥重要作用。研究结果为寻找促进骨折愈合的创新临床治疗方法提供实验依据。

关键词:周期性机械牵拉; 细胞迁移; 成骨细胞; 骨折愈合

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.01.025

Cyclic Stretch Promotes Migration of MC3T3-E1 Cells via Increasing Runx2 Expression

YAN Xu¹, LI Zitong², LIU Jiting², QI Yingxin², MEI Jiong¹

(1. Department of Orthopedics, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China; 2. Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of cyclic stretch on migration of MC3T3-E1 cells and its related mechanism. **Methods** The strain loading system was used to stretch MC3T3-E1 cells cultured *in vitro* with 15% amplitude, to simulate the mechanical condition *in vivo*. The wound healing assay was used to detect the migration of MC3T3-E1 cells. Western blotting was used to test Runx2 expression. RNA interfering was used to decrease Runx2 expression. **Results** Cyclic mechanical stretch with 15% amplitude, 1.25 Hz frequency and lasting for 24 hours could promote the migration of MC3T3-E1 cells and increase the expression level of Runx2. Runx2 interference inhibited the migration of MC3T3-E1 cells in static culture condition. Interference with Runx2 expression in MC3T3-E1 cells could partially reduce the positive effect of cyclic mechanical stretch on cell migration. **Conclusions** Cyclic stretch can promote the migration of MC3T3-E1 cells, and Runx2 may play an important role in this process. This study provides experimental basis for finding innovative clinical treatment method to promote fracture healing.

Key words: cyclic mechanical stretch; cell migration; osteoblast; fracture healing

收稿日期:2021-03-18; 修回日期:2021-05-05

基金项目:上海交通大学医工交叉研究基金(YG2017MS16)

通信作者:梅炯,主任医师,博士生导师, E-mail: meijiong@163.com

骨折愈合是一个复杂的生物学过程,需要各种因素在时间和空间上的相互配合^[1]。研究表明,成骨细胞(osteoblasts, OBs)、破骨细胞(osteoclast, OCs)、内皮细胞(endothelial cells, ECs)、间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)等均在骨折愈合过程中发挥作用,其中 OB 发挥了重要作用^[2]。骨折发生后,MSC 分化成为 OB,OB 进一步迁移、增殖、分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM),形成骨质,并最终自身被骨质包埋变为骨细胞。骨折愈合受到多种因素的影响,细胞、细胞因子、细胞支架和局部力学因素均在骨折愈合过程中发挥作用^[3]。

骨是力学敏感组织,力学因素对骨生长发育及损伤修复具有重要影响。骨受到组织液流动产生的流体剪切力和拉伸、压缩、弯曲应力,这些力学信号通过复杂的信号转导系统变为生物学信号,影响骨的生长发育^[4]。在此过程中,一些力学敏感分子承担将力学信号转变为生物信号的任务,包括应力敏感型离子通道和整合素-细胞骨架复合体及 Wnt 信号通路等^[5]。当骨受到力学刺激时,应力敏感型离子通道的活性发生改变,从而改变细胞内钙离子浓度,影响下游 COX-2 等基因的表达;整合素-细胞骨架系统可以把施加于 ECM 及细胞膜的力学刺激传递到核内。因此,研究力学感受器分子有助于理解骨受力时发生的适应性改变。

Runt 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)是成骨前体细胞分化的标记分子,在 MSC 的成骨分化过程中发挥重要作用。值得关注的是,Runx2 表达水平与 OB 迁移功能之间存在联系,同时它的表达水平也受到力学刺激的影响^[6-7]。

本文使用 Flexcell-5000 应力加载系统对 MC3T3-E1 细胞施加幅度为 15% 的周期性机械牵拉,探究机械牵拉对 MC3T3-E1 细胞迁移的影响,并使用 RNA 干扰技术降低 Runx2 表达量,寻找周期性牵拉促进 MC3T3-E1 细胞迁移的可能机制。本文聚焦牵拉对成骨前体细胞迁移的影响及相关机制,以期为骨科临床治疗的创新提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞获取、培养与传代

MC3T3-E1 细胞购自赛百慷(上海)生物技术股

份有限公司。在培养皿中加入 10 mL 含有 10% 胎牛血清(Gibco 公司,美国)的 α -MEM 培养液(Gibco 公司,美国),在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。细胞铺满皿底 80%~90% 时传代。

1.2 周期性机械牵拉加载

按照 2×10^5 个/孔密度将 MC3T3-E1 细胞种植在 Flexercell 六孔细胞培养板(BioFlex 公司,美国)上。待细胞形态恢复正常后,加入 α -MEM 基础培养液培养 24 h,同步细胞状态。同步化后使用 Flexcell-5000 型应力加载系统对细胞加载幅度 15%、频率 1.25 Hz 的周期性机械牵拉 24 h,模拟参与应力传导的骨痂在日常活动时的力学环境^[8]。设置不加载力学刺激的细胞为对照组,对应力遮挡条件下骨痂所处的力学环境。

1.3 细胞划痕实验

按照 2×10^5 个/孔密度将 MC3T3-E1 细胞种植在六孔培养板(Corning 公司,中国)或 Flexercell 六孔细胞培养板(BioFlex 公司,美国)上。待细胞贴壁并长满皿底后,使用 10 μ L 枪头对单层细胞进行垂直十字划痕。使用相差光学显微镜(CKX41, Olympus 公司,日本)采集划痕后 0、24 h 的图像。使用 Image J 9.0 软件计算十字划痕上、下、左、右 4 个区域的面积,用于计算划痕愈合指数。具体的计算方法为:

划痕愈合指数 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积

1.4 RNA 干扰实验

siRNA 干扰片段为吉玛(上海)公司合成(见表 1)。按照 2×10^5 个/孔密度将 MC3T3-E1 细胞种植在六孔培养板上,待细胞密度达到 70% 左右转染 siRNA 片段。将 siRNA 片段的干粉溶解于 DEPC 水中,配置成 siRNA 溶液待用,浓度为 20 μ mol/L。使用 Lippo 2000(Thermo 公司,美国)作为载体,包被干扰片段。分别取 5 μ L siRNA 溶液和 5 μ L Lippo 2000 与 245 μ L Opti-MEM 培养液于无酶 EP 管中混合均匀,静置 5~10 min。随后将两者混匀配置成转染液,静置 15 min。将欲转染 siRNA 的细胞使用 α -MEM 洗涤 3 次,然后在每孔中加入转染液和 500 μ L α -MEM。干扰后 6~8 h 补充含有 10% 胎牛血清的完全培养液。干扰效率计算方法为:

干扰效率 = (1 - Runx2 相对表达量) \times 100%

表1 Runx2 干扰片段序列

Tab.1 Runx2 si-RNA fragment sequences

干扰片段	干扰片段序列(5'~3')
Negative control	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT
Runx2-mus-492	CCG GGA AUG AUG AGA ACU ATT
Runx2-mus-909	GGU CCU AUG ACC AGU CUU ATT
Runx2-mus-1459	CAC GCU AUU AAA UCC AAA UTT

1.5 蛋白免疫印迹

将蛋白样加入 SDS-PAGE 凝胶,连接电泳仪 (Bio-Rad 公司,美国) 分离蛋白,随后使用转膜仪 (Bio-Rad 公司,美国) 将蛋白印迹转印至 PVDF 膜。使用含有 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭 1 h。将条带与 Runx2(1:1 000, Cell Signaling Technology 公司,美国)、GAPDH(1:1 000, Proteintech 公司,中国) 的一抗在 4 °C 条件下共同孵育过夜。待一抗孵育结束后洗涤条带,加入二抗,室温孵育 2 h, TBST 洗涤条带 3 遍,加入显色液(上海碧云天生物技术有限公司),使用显色仪 (LI-COR Biosciences 公司,美国) 扫描条带、读取灰度值。使用 Image Studio 软件计算灰度值。

1.6 实时定量 PCR

加入 TRIzol (Thermo Scientific 公司,美国) 裂解细胞,提取 RNA。使用分光光度计检测 RNA 的浓度。使用反转录试剂盒 (Thermo Scientific 公司,美国) 进行 RNA 反转录,按使用说明配成反应体系,分别在 65 °C、42 °C 和 70 °C 反应 5、60、5 min,合成 cDNA。在 cDNA 中加入引物 SYBR (Takara 公司,日本),放入 PCR 仪,设置程序为 95 °C, 30 s 后进入循环,每个循环设置为 95 °C 反应 15 s, 62 °C 反应 45 s,共进行 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 水平。VEGFA、MMP13 和 GAPDH 的引物序列见表 2。

表2 PCR 引物序列

Tab.2 PCR primer sequence

引物	正向	反向
VEGFA	AAC TTTC TGCTCTCTTG GGT	TTCACCACTTCATGGCCTT
MMP13	ATACGAGCATCCATCCCGAGACC	AACCGCAGCACTGAGCC TTTTC
GAPDH	GGCAAGGTCATCCAGAGCT	CCCAGGATGCCCTTTAGTGG

1.7 统计学方法

所有实验均进行 3 次及以上的独立重复检验,实验数据以均值 ± 标准差的形式表示。使用

GraphPad 9.0 作为制表和数据统计软件,使用非配对 *t* 检验分析两组之间的统计学差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 机械牵拉促进 MC3T3-E1 细胞迁移

使用 Flexcell-5000 应力加载系统对 MC3T3-E1 细胞施加幅度 15%、频率 1.25 Hz、持续时间 24 h 周期性机械牵拉。于开始后 0 h 划痕,拍照记录牵拉开始 0、24 h 划痕情况,并分别计算划痕愈合指数(见图 1)。划痕实验结果显示,相比于静止组的划痕愈合指数(0.401 3 ± 0.041),牵拉组 24 h 后划痕愈合指数(0.645 7 ± 0.062 0) 升高,差异具有统计学意义。该结果表明,周期性机械牵拉可以促进 MC3T3-E1 细胞迁移。

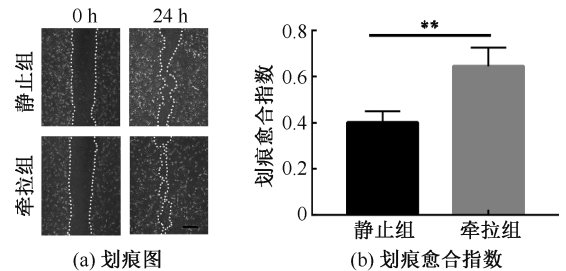


图1 周期性机械牵拉对 MC3T3-E1 细胞划痕愈合的影响 (** $P < 0.01$, $n = 4$, 标尺 = 100 μm)

Fig.1 Effects on MC3T3-E1 cells wound healing induced by cyclic stretch (a) Phase contrast graphs, (b) Wound healing index

2.2 周期性机械牵拉促进 MC3T3-E1 细胞表达 Runx2

为进一步探究周期性机械牵拉促进 MC3T3-E1 细胞迁移的分子机制,提取牵拉后的细胞蛋白,并使用免疫蛋白印迹法测定牵拉后细胞内 Runx2 的表达情况(见图 2)。以静止条件下培养作为对照组,探究在牵拉和非牵拉情况下 Runx2 的表达差异。免疫蛋白印迹实验结果显示,牵拉组细胞 Runx2 表达水平增高,差异具有统计学意义。该结果表明,周期性机械牵拉可以促进 MC3T3-E1 细胞表达 Runx2。

2.3 干扰 Runx2 抑制 MC3T3-E1 细胞迁移

为确保干扰有效,预先对干扰片段进行筛选,选取干扰效率最高的片段用作后续实验。将使用干扰片段 si-Runx2-492、si-Runx2-909 和 si-Runx2-

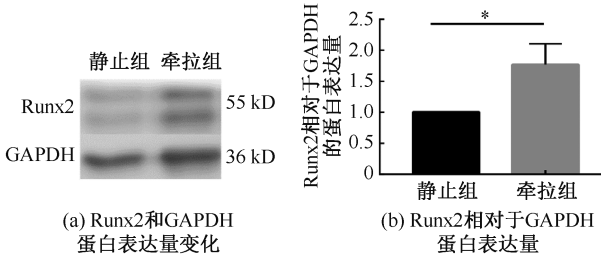


图2 周期性机械牵拉对 MC3T3-E1 细胞 Runx2 蛋白表达水平的影响 ($n=4$, $*P<0.05$)

Fig.2 Effects of cyclic stretch on Runx2 expression in MC3T3-E1 cells (a) Changes in Runx2 and GAPDH expression, (b) Runx2 expression relative to GAPDH

1459 的 3 组分别命名为干扰组 1、2、3, 测得 3 组样本中 Runx2 的相对表达量分别为 0.7365 ± 0.080 、 0.5552 ± 0.072 、 0.2098 ± 0.089 。经计算得出 si-Runx2-mus-492、si-Runx2-mus-909 和 si-Runx2-mus-1459 的干扰效率分别为 $(26.3 \pm 8.2)\%$ 、 $(44.5 \pm 7.2)\%$ 和 $(79.0 \pm 8.9)\%$ (见图 3)。因此, 选取 si-Runx2-mus-1459 作为干扰片段进行后续实验。

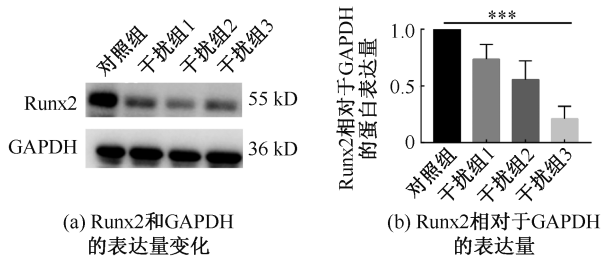


图3 Runx2 干扰效率测定 ($n=3$, $***P<0.001$)

Fig.3 Test on siRNA interference efficiency of Runx2 (a) Changes in Runx2 and GAPDH expression after applying si-Runx2, (b) Runx2 expression relative to GAPDH

为进一步探究 Runx2 表达水平对 MC3T3-E1 细胞迁移的影响, 使用 RNA 干扰技术特异性降低 Runx2 的表达水平。干扰组细胞予以转染 si-Runx2, 对照组转染 scramble NC 片段。在干扰后 24 h 进行划痕实验, 分别于干扰后 24、48 h 拍照, 计算划痕愈合指数 (见图 4)。划痕实验结果表明, 干扰 Runx2 可以显著降低 MC3T3-E1 细胞的迁移能力。

2.4 周期性机械牵拉通过上调 Runx2 促进 MC3T3-E1 细胞迁移

为探究机械牵拉促进 MC3T3-E1 细胞迁移

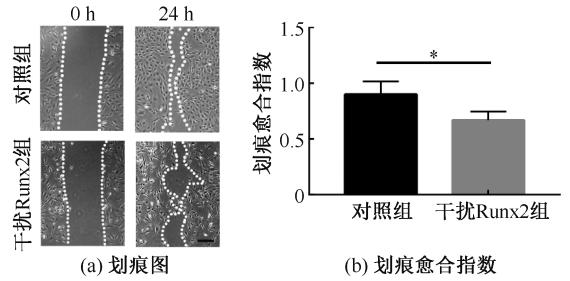


图4 干扰 Runx2 对 MC3T3-E1 细胞迁移的影响 ($n=4$, $*P<0.05$, 标尺 = 100 μm)

Fig.4 Effects of Runx2 si-RNA on migration of MC3T3-E1 cells (a) Phase contrast graphs, (b) Wound healing index

的分子机制, 向牵拉组和静止组细胞分别转染 si-Runx2 和 scramble NC 片段, 干扰 24 h 后给牵拉组加载周期性机械牵拉。加载周期性机械牵拉 0、24 h 后, 拍摄静止-非干扰组 (static-NC)、牵拉-非干扰组 (cyclic stretch-NC)、静止-干扰 Runx2 组 (static-Runx2) 和牵拉-干扰 Runx2 组 (cyclic stretch-Runx2) 的划痕相差图, 并计算划痕愈合指数 (见图 5)。结果表明, 非干扰-牵拉组在 24 h 后的划痕愈合指数 (0.7277 ± 0.010) 最高, 说明该组 MC3T3-E1 细胞的迁移最强。牵拉-干扰组 (0.381 ± 0.056) 和静止-非干扰组 (0.482 ± 0.035) 的划痕愈合指数较高, 而干扰-静止组的愈合指数 (0.2681 ± 0.054) 最低。

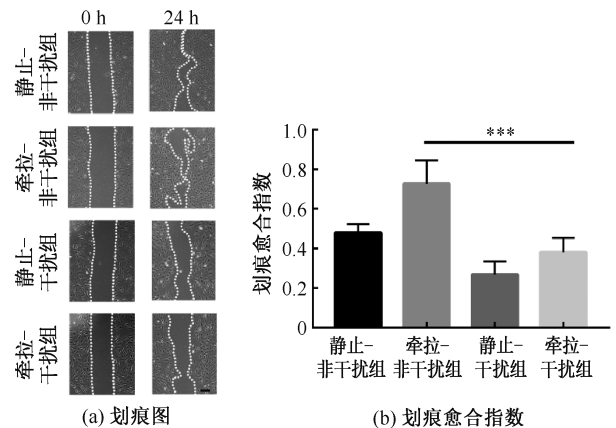


图5 干扰 Runx2 对机械牵拉促进 MC3T3-E1 细胞迁移的影响 ($n=4$, $***P<0.001$, 标尺 = 100 μm)

Fig.5 Effects of Runx2 si-RNA on migration of MC3T3-E1 cells promoted by cyclic stretch (a) Phase contrast graphs, (b) Wound healing index

2.5 Runx2 下游分子检测

为进一步探讨牵拉上调 Runx2 对骨愈合的影响,检测 Runx2 可能的下游分子 VEGFA、MMP13 的 mRNA 水平及 SOST 的蛋白表达水平。结果显示,在特异性抑制 Runx2 表达后,VEGF 和 MMP13 的 mRNA 水平显著降低。同时,抑制 Runx2 后,SOST 的蛋白表达水平显著升高(见图 6)。

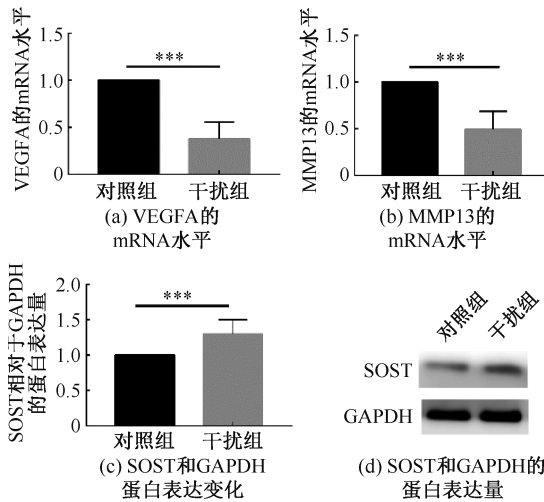


图 6 干扰 Runx2 对下游分子的 mRNA 水平及蛋白表达水平的影响 ($n=4$, *** $P<0.001$)

Fig.6 Effects of Runx2 si-RNA on mRNA and protein expression of downstream molecules (a) mRNA levels of VEGFA, (b) mRNA levels of MMP13, (c) Changes in SOST and GAPDH expression, (d) SOST expression relative to GAPDH

3 讨论

骨折愈合是各种细胞、细胞因子和力学微环境在时间和空间上相互配合的高度有序的过程^[1]。骨折发生后,成骨前体细胞在细胞因子和力学刺激的影响下向损伤部位迁移,并进一步增殖、分化、继而形成成熟的骨组织^[9]。近年来,以 Ilizarov 技术为代表的诸多临床实践提示,力学刺激在骨再生过程中占据重要地位^[10]。本文聚焦机械牵拉对成骨前体细胞迁移产生的影响,探讨 Runx2 对机械牵拉促进成骨前体细胞迁移的调控作用,为骨科治疗方法的创新提供理论依据。

本文证实,机械牵拉可以通过上调 Runx2 表达量促进 MC3T3-E1 细胞的迁移。在对 MC3T3-E1 细胞施加幅度 15%、频率 1.25 Hz、持续 24 h 的机械牵

拉后,细胞迁移显著增强。使用 RNA 干扰技术降低 Runx2 的表达水平,并对其加载相同参数的力学条件,结果显示机械牵拉对 MC3T3-E1 细胞迁移的促进作用被部分减弱。以上结果表明,机械牵拉可以通过上调 Runx2 的表达促进 MC3T3-E1 细胞的迁移。

OB 及成骨前体细胞在的定向迁移是骨折愈合的先决条件^[11]。OB 及其前体细胞迁移在骨折愈合和骨平衡的维持中均发挥重要作用,未分化 OB 比已分化 OB 具有更大的迁移能力,这种迁移的实现可能与 OB 的血管浸润相关,迁移过程受到化学信号和力学信号的调控。Shirley 等^[4]追踪 OB 运动发现,截骨术后一些 OB 从骨髓较远的位置迁移到损伤部位,证实成骨前体细胞的迁移参与骨折愈合过程。Geurtzen 等^[12]在斑马鱼的骨折模型中观察到 OB 向损伤部位的移动,并且这种向损伤部位的移动是 OB 激活后的主动迁移,而非增殖引起的被动迁移。对 OB 迁移的研究不但有助于运用力学手段促进骨愈合,还可以帮助设计具有优良生物学功能的骨移植替代材料。运用机械刺激促进 OB 向生物材料定向迁移的原理,有望促进周围骨组织爬行替代成骨材料的过程,解决骨缺损难题^[13]。

机械牵拉是影响细胞迁移的一个重要因素。Zhang 等^[14]对间骨髓充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 施加幅度 10%、频率 1 Hz、持续 8 h 周期性牵拉。结果表明,机械牵拉可以激活 FAK-ERK1/2 信号通路,促进 BMSC 迁移。本研究中,机械牵拉促进 MC3T3-E1 细胞迁移的效应可能由 Runx2 介导。

Runx2 是成骨前体细胞分化的标记分子,在 MSC 的成骨分化过程中发挥重要作用^[15]。磷酸化是调节其生物学活性的重要方式,该过程发生在细胞核内,主要由 ERK/MAPK 介导^[16]。值得注意的是,近年许多研究已证实 Runx2 可以对多种细胞的迁移产生重要影响。Fujita 等^[6]研究证实,Runx2 的表达水平与 MC3T3-E1 细胞的迁移水平之间存在正相关性,Runx2 通过与 PI3K-Akt 信号通路耦合的方式促进 OB 和软骨细胞的迁移。此外,Ding 等^[17]研究发现,在周围神经损伤修复的过程中雪旺细胞和轴突细胞中 Runx2 的表达水平显著升高;在后续的体外研究中,他们证实 Runx2 可以通过激活 Akt-

GSK3 β 信号通路促进雪旺细胞的迁移。

机械牵拉可以通过 Ras-ERK1/2、 β -catenin 信号通路等多种途径实现对细胞内 Runx2 水平的调控。Zhang 等^[18]对脂肪干细胞施加 1 组不同时相点的周期性拉伸,结果显示, Runx2 在牵拉后表达上调,ERK 和 P38 均可作为力影响 Runx2 等分化指标的正向调节因子,并且 P38 的调控作用更迅速,而 ERK 的调节作用则显现较晚。该研究结果表明,在不同的时相点,机械牵拉上调 Runx2 水平的机制可能存在差异。Gao 等^[19]通过对黄韧带细胞施加牵拉发现, Runx2 的表达量明显升高,并且伴随 Hedgehog 通路的激活,说明机械牵拉对 Runx2 的升高作用可能是由 Hedgehog 通路介导。Costessi 等^[20]研究认为,力对 OB 中 Runx2 的影响可能是骨细胞、OB、骨髓干细胞、EC 等多种细胞共同作用的结果;进而提出一种可能的方式,即骨细胞在这个过程中发挥力学感受器的作用,接受刺激并以旁分泌 ATP 的方式传递信息,诱导 OB 中 PKC 的激活,进而引起 OB 核中的 Runx2 基因的活性增强。该研究结果提示,构成骨组织的不同细胞间可能存在分工和信息交流,以一个整体的形式对力学刺激做出响应。此外,microRNA 和细胞外囊泡也可以调控细胞受到力学刺激的发生改变的过程^[21]。除机械牵拉外,流体剪切力也可改变 MC3T3-E1 细胞内 Runx2 的表达水平,这种效应是经由力学刺激敏感的离子通道 PIEZO1 介导而实现^[22]。上述研究结果提示,多种形式的力学刺激都能对 Runx2 的表达量产生影响,最终的表现可能是包括牵拉、剪切力在内的多种力综合作用的结果。

Runx2 在细胞能具有广泛的生物学效应,它的下游分子包括 VEGFA、SOST 及 MMP13 等^[15]。MMP13 作为调节 ECM 生成的重要酶,可能参与调节 OB 迁移的过程。基质金属蛋白酶调节细胞迁移的现象已经在肝癌细胞中被观察到^[23]。本文的 PCR 结果证实了 Runx2 对 MMP13 和 VEGFA 的调节作用,提示周期性机械牵拉在促进 ECM 形成和血管形成方面发挥作用。值得注意的是,Runx2 本身还具有强大的促成骨分化的功能,它的下游分子 SOST 是调节 Wnt 信号通路的负性调节因子^[24]。本文发现,干扰 Runx2 会显著上调 SOST 的表达,表明对于机械牵拉作用下的 OB 而言,Runx2 可能具有

促迁移和促成骨分化的双重作用。

4 结果

骨生物力学环境会对骨生长、发育及损伤修复的过程产生重要影响,因而改善骨生物力学环境对促进骨折愈合具有重要意义^[25]。本文结果表明,在机械牵拉促进 MC3T3-E1 细胞迁移的过程中,Runx2 可能发挥重要作用。研究结果为骨科医生利用力学刺激改善骨愈合、降低骨延迟愈合及骨不连发生率和设计符合骨生物力学微环境的新型内固定材料提供新思路。

参考文献:

- [1] EINHORN TA, GERSTENFELD LC. Fracture healing: Mechanisms and interventions [J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(1): 45-54.
- [2] THIEL A, REUMANN MK, BOSKEY A, et al. Osteoblast migration in vertebrate bone [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2018, 93(1): 350-363.
- [3] GIANNOUDIS PV, EINHORN TA, MARSH D. Fracture healing: The diamond concept [J]. Injury, 2007, 38: S3-S6.
- [4] SHIRLEY D, MARSH D, JORDAN G, et al. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing [J]. J Orthop Res, 2005, 23(5): 1013-1021.
- [5] BOPPART MD, MAHMASSANI ZS. Integrin signaling: Linking mechanical stimulation to skeletal muscle hypertrophy [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2019, 317(4): C629-C641.
- [6] FUJITA T, AZUMA Y, FUKUYAMA R, et al. Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling [J]. J Cell Biol, 2004, 166(1): 85-95.
- [7] LI N, WANG WB, BAO H, et al. MicroRNA-129-1-3p regulates cyclic stretch-induced endothelial progenitor cell differentiation by targeting Runx2 [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(4): 5256-5267.
- [8] YU HS, KIM JJ, KIM HW, et al. Impact of mechanical stretch on the cell behaviors of bone and surrounding tissues [J]. J Tissue Eng, 2016, 7: 1-24
- [9] RUNYAN CM, GABRICK KS. Biology of bone formation, fracture Healing, and distraction osteogenesis [J]. J Craniofac Surg, 2017, 28(5): 1380-1389.
- [10] GUBIN AV, BORZUNOV DY, MALKOVA TA. The Ilizarov paradigm: Thirty years with the Ilizarov method, current concerns and future research [J]. Int Orthop, 2013, 37

- (8): 1533-1539.
- [11] ZHANG Z, HU P, WANG Z, *et al.* BDNF promoted osteoblast migration and fracture healing by up-regulating integrin beta1 via TrkB-mediated ERK1/2 and AKT signalling [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(18): 10792-10802.
- [12] GEURTZEN K, KNOPF F, WEHNER D, *et al.* Mature osteoblasts dedifferentiate in response to traumatic bone injury in the zebrafish fin and skull [J]. *Development*, 2014, 141(11): 2225-2234.
- [13] ALSHIHRI A, NIU W, KAMMERER PW, *et al.* The effects of shock wave stimulation of mesenchymal stem cells on proliferation, migration, and differentiation in an injectable gelatin matrix for osteogenic regeneration [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2020, 14(11): 1630-1640.
- [14] ZHANG B, LUO Q, CHEN Z, *et al.* Cyclic mechanical stretching promotes migration but inhibits invasion of rat bone marrow stromal cells [J]. *Stem Cell Res*, 2015, 14(2): 155-164.
- [15] KOMORI T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation [J]. *Histochem Cell Biol*, 2018, 149(4): 313-323.
- [16] VIMALRAJ S, ARUMUGAM B, MIRANDA PJ, *et al.* Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 78: 202-208.
- [17] DING D, ZHANG P, LIU Y, *et al.* Runx2 was correlated with neurite outgrowth and schwann cell differentiation, migration after sciatic nerve crush [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(12): 2423-2434.
- [18] ZHANG L, WANG Y, ZHOU N, *et al.* Cyclic tensile stress promotes osteogenic differentiation of adipose stem cells via ERK and p38 pathways [J]. *Stem Cell Res*, 2019, 37(101433): 1-6.
- [19] GAO R, SHI C, YANG C, *et al.* Cyclic stretch promotes the ossification of ligamentum flavum by modulating the Indian hedgehog signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2): 1119-1128.
- [20] COSTESSI A, PINES A, D'ANDREA P, *et al.* Extracellular nucleotides activate Runx2 in the osteoblast-like HOBIT cell line: A possible molecular link between mechanical stress and osteoblasts' response [J]. *Bone*, 2005, 36(3): 418-432.
- [21] 陈远秀, 包晗, 阎靖, 等. 周期性张应变调控血管平滑肌细胞黏附血小板微体及其在自噬中的作用 [J]. *医用生物力学*, 2020, 35(1): 49-55.
- CHEN YX, BAO H, YAN Q, *et al.* Cyclic stretch induces adhesion of VSMCs with platelet-derived microparticles and the role in autophagy [J]. *J Med Biomech*, 2020, 35(1): 49-55.
- [22] SONG J, LIU L, LV L, *et al.* Fluid shear stress induces Runx-2 expression via upregulation of PIEZO1 in MC3T3-E1 cells [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(7): 1491-1502.
- [23] WANG C, INZANA JA, MIRANDO AJ, *et al.* NOTCH signaling in skeletal progenitors is critical for fracture repair [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1471-1481.
- [24] MAEDA K, KOBAYASHI Y, KOIDE M, *et al.* The regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 1-37.
- [25] AUGAT P, HOLLENSTEINER M, RUDEN C. The role of mechanical stimulation in the enhancement of bone healing [J]. *Injury*, 2020, 13(24): 1-6.