

文章编号:1004-7220(2015)02-0154-05

# FoxO1 在持续张应力促 MC3T3-E1 细胞成骨向分化中的表达变化

欧阳宁鹃, 张鹏, 傅润卿, 王洁, 房兵, 江凌勇

(上海交通大学医学院附属第九人民医院 口腔颅颌面科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海 200011)

**摘要:** 目的 研究体外持续张应力对 MC3T3-E1 细胞成骨向分化过程中 Forkhead 转录因子 1 (Forkhead box protein O1, FoxO1) 表达的影响, 探讨 FoxO1 在持续张应力促进骨向分化机制中的作用。方法 MC3T3-E1 细胞接种, 应用 FX-4000T<sup>TM</sup> 细胞应力加载系统予以体外力学干预。施加频率 1 Hz、幅度 10% 的张应力, 按照加力时间长短分为对照和 1、4、6、12、24、48、72 h 组。运用酶化学染色、实时荧光定量 PCR、蛋白免疫印迹、细胞免疫荧光等方法观察持续张应力对 MC3T3-E1 成骨能力变化的影响及 FoxO1 基因、蛋白表达和细胞定位情况。结果 (1) 持续张应力能够促进 MC3T3-E1 骨向分化。细胞碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 表达量在 24、48 h 显著高于对照组, 骨钙素 (osteocalcin, OCN) 表达水平于 72 h 达峰值并显著高于对照组, 骨特异性转录因子 (runt-related transcription factor-2, Runx2) 表达量在 4 h 与对照组相比显著升高, 其蛋白表达量也随加力时间而改变。加力组 ALP 染色结果与对照组有显著差异。(2) 持续张应力促进 FoxO1 的基因和蛋白表达。FoxO1 基因表达水平 24 h 增高最明显, 其蛋白表达量于 12 h 显著上升。(3) 加力 6 h FoxO1 胞核聚集, 胞浆可见, 但于 24 h 转位在胞浆大量表达。结论 10% 持续张应力可以促进 MC3T3-E1 的成骨向分化, 同时 FoxO1 基因和蛋白表达上调、蛋白定位改变。探寻 FoxO1 表达水平和定位情况在力学刺激下的变化规律, 可为研究其在力学刺激中发挥的作用提供实验基础。

**关键词:** Forkhead 转录因子 1; 持续张应力; 骨向分化; 成骨细胞

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.02.154

## Changes in FoxO1 expression of MC3T3-E1 cells during continuous tensile stress-induced osteogenic differentiation

OUYANG Ning-juan, ZHANG Peng, FU Run-qing, WANG Jie, FANG Bing, JIANG Ling-yong (Department of Oral and Cranio-maxillofacial Science, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of continuous tensile stress on expression of Forkhead box protein O1 (FoxO1) in MC3T3-E1 cells *in vitro* during osteogenic differentiation, and explore the role of FoxO1 in the mechanism of continuous tensile stress induced-osteogenic differentiation. **Methods** MC3T3-E1 cells were seeded and applied with tensile stress at the frequency of 1 Hz and amplitude of 10% by FX-4000T<sup>TM</sup> mechanical loading system. MC3T3-E1 cells were divided into control, 1 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h group, respectively, according to the time subjected to the tensile stress. Alkaline phosphatase (ALP) staining, real-time PCR, Western blotting and immunofluorescence were applied to detect the effects of continuous tensile stress on osteogenesis

收稿日期:2014-12-11; 修回日期:2015-02-10

基金项目:国家自然科学基金项目(81371121, 11342005, 30901698, 10972142), 上海市自然科学基金项目(13ZR1423700), 上海交通大学“医工交叉基金”(YG2012MS40), 上海市科委基础研究重点项目(12JC1405700), 上海交通大学 SMC-晨星青年学者奖励计划优秀青年教师(B类计划), 上海市教委创新团队。

通信作者:江凌勇, 副教授, E-mail: jly117@sina.com; 房兵, 教授, E-mail: braces\_dr@hotmail.com。

ability of MC3T3-E1 cells, mRNA and protein expression of FoxO1, and allocation of FoxO1 in MC3T3-E1 cells.

**Results** (1) Continuous tensile stress could promote the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells. Compared with the control group, the mRNA expression of ALP increased significantly at 24 h, 48 h, and the mRNA expression level of osteocalcin (OCN) reached the peak value at 72 h, which was significantly higher than that in the control group. The mRNA expression of runt-related transcription factor-2 (Runx2) significantly increased at 4 h as compared to the control group, and Runx2 protein level changed accordingly. The ALP staining results of the stress group and control group were significantly different. (2) Continuous tensile stress could increase mRNA and protein expression of FoxO1. The mRNA expression of FoxO1 markedly increased at 24 h, and its protein expression significantly elevated at 12 h. (3) FoxO1 was expressed in the nucleus and cytoplasm at 6 h, and then significantly increased in the cytoplasm at 24 h. **Conclusions** 10% continuous tensile stress can stimulate the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells, up-regulate the mRNA and protein expression of FoxO1 and change the allocation of FoxO1 in MC3T3-E1 cells. The investigation on the change rules of FoxO1 expression and allocation under mechanical stimulation will provide the experimental basis for studying the role of FoxO1 in mechanical stimulation.

**Key words:** Forkhead transcription factor (FoxO1); Continuous tensile stress; Osteogenic differentiation; Osteoblast

众所周知,力学刺激是维持骨细胞生存和生长的重要因素,它能够调节细胞的增殖及分化,在骨骼的发育、形成、重建中起关键作用。机械刺激对于骨组织的重建与再生尤为重要,不同大小、刺激方式及频率的力可引发不同的生物学效应。机械信号转化为生物学信号的过程错综复杂,作为众多传导通路的交叉点, Forkhead 转录因子 1 (Forkhead box protein O1, FoxO1) 除可参与细胞凋亡、应激、DNA 损伤/修复、肿瘤发生、血管生成及糖代谢等生命过程外<sup>[1]</sup>,也与骨代谢密切相关<sup>[2]</sup>。在成骨细胞系中, FoxO1 能通过与转录激活因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4)、骨特异性转录因子 (runt-related transcription factor 2, Runx2)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 等的相互作用,调节氧化还原平衡、蛋白质合成以及细胞的成骨向分化。FoxO1 在去磷酸化后被激活,移至核内与目标基因的启动子相结合;同时, FoxO1 的乙酰化可加强 FoxO1 的磷酸化,进一步调节其转录活性。基于 FoxO1 在成骨分化中的重要作用,该转录因子成为研究热点。然而,力学刺激下 FoxO1 参与调控成骨向分化的研究鲜有报道。既往研究<sup>[3]</sup>及本课题组的前期研究表明,频率 1 Hz、幅度 10% 体外持续张应力可上调骨钙素 (osteocalcin, OCN)、I 型胶原 (collagen type I, COL-I)<sup>[4]</sup>及 ALP 等成骨相关基因表达,促进其骨向分化,最适用于成骨相关细胞的体外持续张应力加载<sup>[5-7]</sup>。本研究采用课题组前期筛

选力值,观测持续张应力下小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 骨向分化过程中 FoxO1 的表达变化,以期进一步探究 FoxO1 在力学促进骨向分化中的作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

高糖  $\alpha$ -MEM 培养液 (HyClone 公司,美国),胎牛血清 (FBS) (浙江天杭生物科技有限公司,中国),1% 双抗 (100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素, Hyclone 公司,美国),总 RNA 提取试剂、逆转录反应试剂盒 (Takara 公司,日本),real-time PCR 试剂盒 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Takara 公司,日本),引物设计及合成由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。抗 FoxO1 抗体、抗 Runx2 抗体、抗 GAPDH 抗体、荧光二抗 (CST 公司,美国),BCIP/NBT ALP 染色液 (碧云天公司,中国),CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (Heraeus 公司,德国),荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司,美国),细胞应力加载系统 FX-4000T<sup>™</sup> (Flexercell 公司,美国)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 MC3T3-E1 细胞培养** 细胞计数并按  $5 \times 10^5$ /L 浓度接种于培养皿内,并置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内。待细胞长成融合状态后常规传代,按 1:2 至 1:3 传代。

**1.2.2 细胞体外持续张应力加载** 采用

FX-4000T<sup>TM</sup> 细胞应力加载系统,将生长良好的 MC3T3-E1 细胞以  $1 \times 10^5/\text{cm}^2$  密度接种于弹性硅胶膜 6 孔培养板,48 h 后待细胞达 70% ~ 80% 融合后予以力学干预。施加频率 1 Hz、幅度 10% 的张应力,按照加力时间长短分为 1、4、6、12、24、48、72 h 组。同时,另设对照组为静止组,于同一时间种于 6 孔培养板,48 h 后待细胞达 70% ~ 80% 融合后收样检测。

**1.2.3 real-time PCR** 总 RNA 抽提试剂提取细胞总 RNA 后逆转录,按说明操作,运用 ABI Stepone 系统进行 real-time PCR 实验,对成骨相关基因 ALP、OCN、Runx2 及 FoxO1 进行检测,引物序列见表 1。运行条件如下:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,50 个循环扩增,4 °C 冷却。每个样本重复 3 次分析。

表 1 real-time PCR 目的基因引物序列

Tab.1 Real-time PCR primer sequences for the target genes

| 基因      | 引物序列(5' - 3')               |
|---------|-----------------------------|
| β-actin | 上游: CACCCGCGAGTACAACCTTC    |
|         | 下游: CCCATACCCACCATCACACC    |
| ALP     | 上游: TATGTCTGGAACCGCACTGAAC  |
|         | 下游: CACTAGCAAGAAGAAGCCTTTGG |
| OCN     | 上游: GCCCTGACTGCATTCTGCCTCT  |
|         | 下游: TCACCACCTTACTGCCCTCCTG  |
| Runx2   | 上游: ATCCAGCCACCTTCACTTACACC |
|         | 下游: GGGACCATTGGAACTGATAGG   |
| FoxO1   | 上游: GGTGAAGAGTGTGCCCTACT    |
|         | 下游: TCTTCTCCGGGTGATTTCC     |

**1.2.4 蛋白免疫印迹实验** 提取细胞总蛋白,用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,以电转法转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭非特异性抗原后,依次与抗 FoxO1 抗体(1:500 稀释)、抗 Runx2 抗体(1:500 稀释)、抗 GAPDH 抗体(1:2 000 稀释)4 °C 孵育过夜。兔二抗(1:5 000 稀释)室温孵育 1 h。条带经 Odyssey 红外荧光扫描后采用 Image-Pro Plus 图像分析软件分析。

**1.2.5 ALP 染色** 细胞加力完成后,吸弃培养液,PBS 清洗 3 次,40 g/L 多聚甲醛溶液固定 20 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。按比例配制 BCIP/NBT

ALP 染色工作液,每孔加入 1 mL,避光反应 30 min 后吸弃。用蒸馏水清洗,光学显微镜下拍照,放大倍数为 4 倍。

**1.2.6 细胞免疫荧光** 加力结束后 PBS 冲洗 3 次,加 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 20 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。裁剪膜至合适大小放于 24 孔板中,5% FBS 室温封闭、3% Triton-X100 细胞通透 1 h,抗 FoxO1 抗体(1:200 稀释)、抗 Runx2 抗体(1:200 稀释)4 °C 孵育过夜,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。荧光二抗(1:200 稀释)室温避光孵育 2 h,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。使用细胞核染料 Hoechst 室温下避光孵育 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。染色完毕的细胞在避光状态下保存,选择合适的激发光和发射光范围在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

### 1.3 统计学分析

实验数据均以均数 ± 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$  表示差异具有高度统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 持续张应力对 MC3T3-E1 成骨向分化的影响

随着加力时间延长,ALP 基因表达量逐渐上升,并在 24 h 达峰值( $P < 0.01$ ),于 48 h 仍保持显著升高水平( $P < 0.05$ ),至 72 h 有所下降。OCN 基因表达水平在持续张应力作用初期平稳升高,于 24 h 起与对照组有明显差异( $P < 0.05$ ),并在 72 h 出现大幅上升( $P < 0.01$ ),表达量为对照组的 4.38 倍(见图 1)。

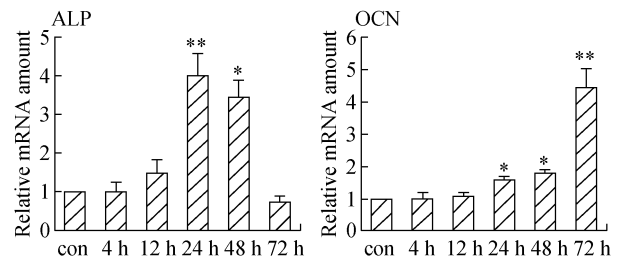


图 1 10% 持续张应力下 MC3T3-E1 细胞 ALP 和 OCN 表达变化 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

Fig.1 Changes of the mRNA expression of ALP and OCN under 10% continuous tensile stress in MC3T3-E1 cells

10% 持续张应力作用下,Runx2 基因表达在 4 h

时明显升高 ( $P < 0.05$ , 见图 2)。同时,持续张应力使 Runx2 蛋白表达量在 6 h 较对照组有明显升高,于 24、48 h 略有回落,但仍高于对照组。

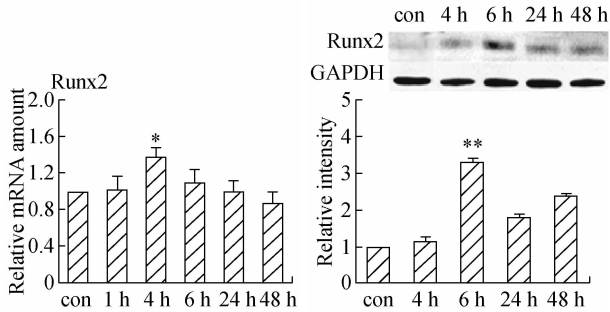


图 2 10% 持续张应力下 MC3T3-E1 细胞 Runx2 基因和蛋白表达变化 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

Fig. 2 Changes of the mRNA and protein expression of Runx2 under 10% continuous tensile stress in MC3T3-E1 cells

4 倍放大倍率的光学显微镜下观察可见 48 h 加力组的染色结果与对照组有显著差异。加力组被 ALP 染为紫红的细胞数目明显多于对照组 (见图 3)。

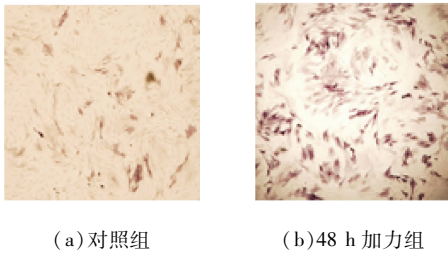


图 3 10% 持续张应力下 MC3T3-E1 细胞 ALP 染色结果 ( $\times 4$ )

Fig. 3 ALP staining results of MC3T3-E1 cells under 10% continuous tensile stress

(a) The control group, (2) The 48 h stress group

## 2.2 持续张应力下 FoxO1 表达水平变化

持续张应力刺激下, FoxO1 基因表达水平在 1 h 有较明显上升, 于 24、48 h 升高明显 ( $P < 0.05$ )。FoxO1 蛋白表达量在 6 h 较对照组有所升高, 于 12 h 显著上升, 24、48 h 略有回落, 仍高于对照组水平 (见图 4)。

## 2.3 持续张应力下 FoxO1 蛋白胞内定位的变化

免疫荧光结果显示, 与对照组相比, 6 h 的 FoxO1 的荧光表达量增加, 胞核聚集, 胞浆均匀可见; 24 h 的 FoxO1 荧光表达量出现明显增加, 且大部分转位出核定位在胞浆 (见图 5)。

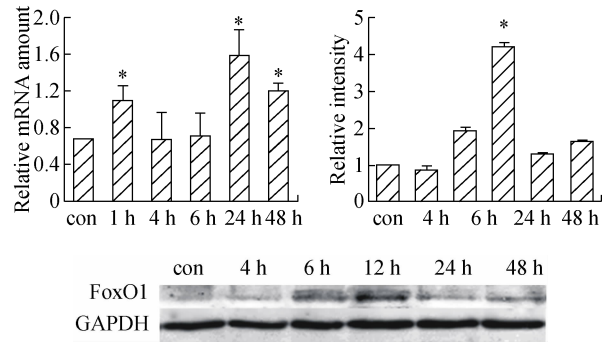


图 4 10% 持续张应力下 MC3T3-E1 细胞 FoxO1 基因和蛋白表达变化 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ )

Fig. 4 Changes of the mRNA and protein expression of FoxO1 under 10% continuous tensile stress in MC3T3-E1 cells

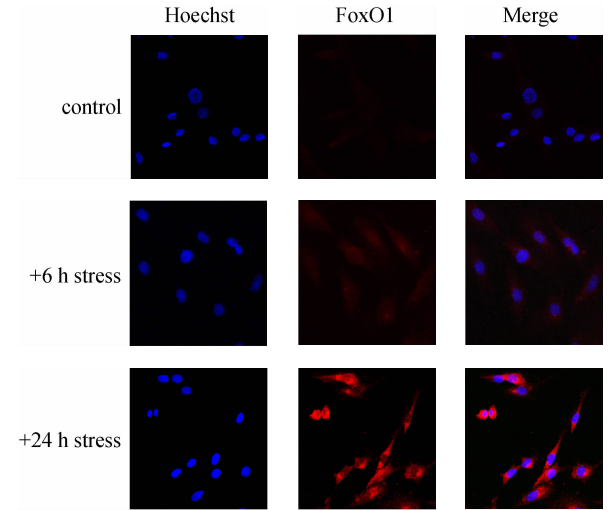


图 5 10% 持续张应力下 FoxO1 蛋白胞内定位的变化

Fig. 5 Changes of FoxO1 allocation in MC3T3-E1 cells under 10% continuous tensile stress

## 3 讨论

力学刺激对于骨骼的生长改建尤为重要, 可以调控新生骨的形态与功能, 一旦缺乏易导致骨吸收增加, 引起骨量减少。既往研究表明, 机械刺激作用于成骨细胞表面, 可改变细胞骨架结构<sup>[8]</sup>, 传递生物学信号, 调控相关基因表达<sup>[9]</sup>。小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 可以作为一种良好的体外力学细胞刺激模型。Kyung 等<sup>[10]</sup> 研究发现, 循环力合并超声的共刺激能增加 MC3T3-E1 中成骨标记基因 COL-I、OCN 表达, 上调 ALP 活性, 促进骨向分化。同时, 成骨相关基因表达可以反映成骨细胞分化中的 3 个阶段。

在增殖阶段,前成骨细胞分泌细胞外基质,此时 ALP 高表达;随着钙化期的开始,OCN 和骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 表达上调,辅助钙离子及羟磷灰石的结合<sup>[11]</sup>。本课题组前期研究已表明,1 Hz、10% 体外持续张应力可抑制大鼠骨髓间充质细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 的增殖能力,并促进其早期的骨向分化。根据既往研究<sup>[6-7]</sup>,本课题组选用频率 1 Hz、幅度 10% 的张应力体外作用于 MC3T3-E1 细胞。

本实验中,ALP、OCN 基因表达水平皆逐渐上升,且在 24 h 达到峰值。其中,ALP 表达水平于 48 h 仍显著高于对照组;而 OCN 表达水平也在 72 h 大幅上升。另外,Runx2 基因在成骨细胞成熟和代谢过程中发挥重要作用,可以调节 ALP 和 OCN 等的表达<sup>[12]</sup>。Runx2 的活性由多种途径激活,力学刺激是与之关系最为紧密的一种。在人牙周膜细胞中,Runx2 作为机械刺激靶点能在生理条件下感受到力学刺激,使启动子中的成骨细胞特异顺式作用元件 (osteoblast specific-acting element 2, OSE2) 活性增强,上调基因表达,参与骨组织改建<sup>[13]</sup>。在成骨细胞中,施以低频机械拉力后,Runx2 基因、蛋白表达水平以及 DNA 结合活性都有所上升,且这一系列反应是通过 ERK1/2 介导的丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路实现<sup>[14]</sup>。本实验在 MC3T3-E1 细胞中得到相仿结果,即 Runx2 基因水平在初始加力阶段即出现增高,4 h 达到高峰,之后又逐渐下降;Runx2 蛋白表达量于 6 h 达到高峰,故 Runx2 在成骨早期发挥重要作用。另外,ALP 染色水平也在 24、48 h 与对照组有显著差异,说明 10% 持续张应力可以促进 MC3T3-E1 的成骨向分化。

FoxO1 是一种在生物进化中具高保留性的转录因子,影响细胞的分化、增殖和生存,对抗氧化应激,调节新陈代谢,在机体中发挥着至关重要的作用。研究表明,FoxO1 与骨生成和骨代谢亦密切相关。FoxO1 在间充质细胞以及前成骨细胞的成骨向分化中发挥着重要作用<sup>[14]</sup>。在体内实验中,Teixeira 等<sup>[10]</sup>发现在敲除小鼠胚胎中的 FoxO1 基因后,其骨骼发育产生重大的改变,表明 FoxO1 在间充质细胞分化为成骨细胞的早期起作用。小鼠胚胎中的 FoxO1 在膜内成骨的早期阶段表达;在体外,FoxO1

活性在间充质干细胞分化为成骨细胞的早期开始增高。在成骨细胞系中,FoxO1 通过与 ATF4、Runx2、ALP 等的相互作用,调节氧化还原平衡、蛋白质合成及这类细胞的成骨向分化。同时,FoxO1 可能通过间接机制抑制破骨细胞的形成。FoxO1 含 Thr-24、Ser-253 和 Ser-316 三个磷酸化位点,去磷酸化后被激活,移至核内与目标基因的启动子相结合,抑制间充质细胞向脂肪或是肌肉分化,促进骨向分化。然而,目前鲜有关于 FoxO1 是否参与在体外持续牵张应力促进 MC3T3-E1 细胞成骨向分化及其表达变化规律的报道。本实验结果显示,持续张应力作用下,FoxO1 基因表达水平在 1 h 有所上升,于 24、48 h 继续升高。FoxO1 蛋白表达量在 6 h 较对照组上升,在 12 h 显著升高,在加力后期仍高于对照组水平。免疫荧光结果提示,FoxO1 在加力 6 h 后较均一地表达于胞核与胞浆中,但于 24 h 转位于胞浆,提示在完成调控功能后,FoxO1 蛋白可能会进一步发生降解。通过上述实验数据可知在持续张应力促 MC3T3-E1 细胞成骨向分化中 FoxO1 的表达变化情况,推测 FoxO1 参与这一过程。另外,FoxO1 表达水平在持续张应力作用下可能呈周期性变化,将力学刺激时间延长后可进一步验证此假设。但蛋白的转位究竟发挥何种功效,与 Runx2 是否有相关作用,有无通过 Runx2 进行调控,都需要开展后续研究。本研究结果为进一步了解 FoxO1 在体外力学促骨向分化中的作用提供前期基础。

## 参考文献:

- [1] Kousteni S. FoxO1: A molecule for all seasons [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(5): 912-917.
- [2] Siqueir MF, Flowers S, Bhattacharya R, *et al.* FOXO1 modulates osteoblast differentiation [J]. *Bone*, 2011, 48(5): 1043-1051.
- [3] Davisson T, Kunig S, Chen A, *et al.* Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage [J]. *J Orthop Res*, 2002, 20(4): 842-848.
- [4] Saito M, Fujii K, Tanaka T, *et al.* Effect of low- and high-intensity pulsed ultrasound on collagen post-translational modifications in MC3T3-E1 osteoblasts [J]. *Calcif Tissue Int*, 2004, 75(5): 384-395.

- [11] 傅维杰, 刘宇, 李路. 运动鞋对人体落地冲击和下肢软组织振动的影响 [J]. 体育科学, 2013, 33(7): 45-52.
- [12] Oleson M, Adler D, Goldsmith P. A comparison of forefoot stiffness in running and running shoe bending stiffness [J]. J Biomech, 2005, 38(9): 1886-1894.
- [13] 傅维杰, 刘宇, 李路. 基于足底压力的羽毛球运动足部受力特征研究 [J]. 天津体育学院学报, 2012, 27(6): 511-514.
- [14] 魏勇. 运动鞋对羽毛球典型步法中跖趾关节和后足稳定性的影响 [J]. 体育科学, 2009, 29(10): 89-97.
- [15] 李世明. 对优秀男排运动员沙地扣球起跳阶段的运动生物力学研究 [D]. 北京: 北京体育大学博士学位论文, 2000.
- [16] Hudson JL. Utilization of stored elastic energy with respect to jumping ability and coordination [J]. Med Sci Sports Exerc, 1981, 13(2): 97.
- [17] Hudson JL. Coordination of segments in the vertical jump [J]. Med Sci Sports Exerc, 1986, 18(2): 242-251.
- [18] 李世明, 刘学贞. 沙滩排球扣球起跳动作协调性特征的运动生物力学研究 [J]. 西安体育学院学报, 2002, 19(1): 62-65.
- [19] Hamilton N, Luttgens K, Weimar W. Scientific basis of human motion [M]. USA: Saunders, 2002.
- [20] Hamill J, Knutzen KM. Biomechanical basis of human movement [M]. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [21] Argon-Vargas L, Gross M. Kinesiological factors in vertical jump performance: Differences within individuals [J]. J Appl Biomech, 1997, 13(1): 24-44.
- [22] Bobbert MF, Huijing PA, van Ingen Schenau GJ. Drop jumping I: The influence of jumping technique on the biomechanics of jumping [J]. Med Sci Sports Exerc, 1987, 19(4): 332-328.
- [23] Bobbert MF, Huijing PA, van Ingen Schenau GJ. Drop jumping II: The influence of dropping height on the biomechanics of drop jumping [J]. Med Sci Sports Exerc, 1987, 19(4): 339-346.
- [24] 李世明, 刘学贞. 纵跳理论研究进展 [J]. 北京体育大学学报, 2004, 27(1): 65-68.
- [25] 康子英, 赵科研. 排球运动员上步纵跳的运动学分析 [J]. 鞍山师范学院学报, 2005, 7(4): 77-79.

(上接第 158 页)

- [5] Meyer U, Buchter A, Nazer N, *et al.* Design and performance of a bioreactor system for mechanically promoted three-dimensional tissue engineering [J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2006, 44(2): 134-140.
- [6] Hamilton DW, Maul TM, Vorp DA. Characterization of the response of bone marrow-derived progenitor cells to cyclic strain: Implications for vascular tissue-engineering applications [J]. Tissue Eng, 2004, 10(3-4): 361-369.
- [7] Zhang P, Wu Y, Jiang Z, *et al.* Osteogenic response of mesenchymal stem cells to continuous mechanical strain is dependent on ERK1/2-Runx2 signaling [J]. Int J Mol Med, 2012, 29(6): 1083-1089.
- [8] Yang RS, Lin WL, Chen YZ, *et al.* Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts [J]. Bone, 2005, 36(2): 276-283.
- [9] Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, *et al.* Mechanical stress-mediated Runx2 activation is dependent on Ras/ERK1/2 MAPK signaling in osteoblasts [J]. J Cell Biochem, 2007, 101(5): 1266-1277.
- [10] Teixeira CC, Liu Y, Thant LM, *et al.* FoxO1, a novel regulator of osteoblast differentiation and skeletogenesis [J]. J Biol Chem, 2010, 285(40): 31055-31065.
- [11] Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, *et al.* Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix [J]. J Cell Physiol, 1990, 143(3): 420-430.
- [12] Dalle Carbonare L, Innamorati G, Valenti MT. Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering [J]. Stem Cell Rev, 2012, 8(3): 891-897.
- [13] Turner CH. Bone strength: Current concepts [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1068: 429-446.
- [14] Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. Runx2: Of bone and stretch [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(9): 1659-1663.