

文章编号:1004-7220(2018)01-0055-07

压应力对破骨细胞活化的影响

张玲莉, 赵一龙, 雷乐, 郭健民, 邹军

(上海体育学院 运动科学学院, 上海 200438)

摘要:目的 建立3D水凝胶细胞模型,同时采用不同强度、频率、时间压应力作用于破骨细胞,观察压应力对破骨细胞分化的影响,探讨抑制破骨细胞分化的适宜压应力方案。方法 M-CSF和RANKL诱导骨髓单核细胞成破骨细胞,3D细胞水凝胶种板后,次日进行压应力干预,设计不同强度、频率压应力梯度方案对细胞水凝胶进行干预,对照组细胞不进行干预。分组如下:G0(对照组)、G1(1%,0.5 Hz,4 h)、G2(2%,0.5 Hz,4 h)、G3(3%,0.5 Hz,4 h)、G4(1%,1.0 Hz,4 h)、G5(2%,1.0 Hz,4 h)、G6(3%,1.0 Hz,4 h)。在此基础上,通过统计学计算出有效的强度和频率压应力方案后,按照不同干预时间施加压应力,分组如下:D1(4 h)、D2(8 h)、D3(12 h)、D4(16 h),每组两个孔。加压干预结束后即刻收集细胞,将RNA反转录为cDNA,再对样本中的Ctsk mRNA、NFATc1 mRNA、TRACP mRNA、M-CSF mRNA和RANK mRNA进行定量检测。结果 RANK表达水平显著依赖于压应力的强度和频率($P < 0.01$);TRACP的表达水平显著依赖于压应力的强度($P < 0.01$),且强度和频率两者对TRACP的表达量出现交互作用($P < 0.01$);Ctsk的表达量水平显著依赖于压应力的强度($P < 0.05$)和频率($P < 0.01$),且两者之间出现交互作用($P < 0.01$)。加压8 h M-CSF的表达量比加压12 h($P < 0.01$)和16 h($P < 0.05$)的低。加压8 h RANK的表达量比加压12 h($P < 0.05$)和16 h($P < 0.01$)的低。加压16 h Ctsk和NFATc1的表达量比加压4 h和8 h的高($P < 0.05$)。结论 在3D水凝胶模型中,以1%强度、0.5 Hz频率、8 h的压应力干预方案能够抑制破骨细胞的活化。研究结果为通过适宜的运动预防骨质疏松、提高峰值骨量奠定理论基础。

关键词:压应力;强度;频率;时间;破骨细胞

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI:10.16156/j.1004-7220.2018.01.010

Effects of Compressive Stress on Osteoclast Activation

ZHANG Lingli, ZHAO Yilong, LEI Le, GUO Jianmin, ZOU Jun

(School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China)

Abstract: Objective To establish the 3D hydrogel cell model and apply compressive stress with different intensities, frequencies and durations on osteoclasts, so as to observe the effect of compressive stress on osteoclast differentiation and investigate the appropriate compressive stress solution for inhibiting osteoclast differentiation.

Methods M-CSF and RANKL were used to induce bone marrow mononuclear cells into osteoclasts. After the 3D cell-agarose mixture was seeded in compression culture plate, compressive stress was applied on osteoclasts with different intensities, frequencies and durations the next day. The cells in control group were not interfered. The cells were divided as following: G0 (control group), G1 (1%, 0.5 Hz, 4 h), G2 (2%, 0.5 Hz, 4 h), G3 (3%, 0.5 Hz, 4 h), G4 (1%, 1.0 Hz, 4 h), G5 (2%, 1.0 Hz, 4 h), G6 (3%, 1.0 Hz, 4 h). After the loading plan with the most effective intensity and frequency was calculated by statistical analysis, compressive stresses were applied on cells with different durations as following: D1(4 h), D2(8 h), D3(12 h), D4(16 h), and each

收稿日期:2017-04-05;修回日期:2017-06-01

基金项目:国家自然科学基金项目(81572242),上海市人类运动能力开发与保障重点实验室资助项目(11DZ2261100)

通信作者:邹军,教授,博士研究生导师,E-mail:zoujun777@126.com

group had two samples. Once compressive loading was finished, the total RNA extraction from cell-gel constructs were performed and Ctsk mRNA, NFATc1 mRNA, TRACP mRNA, M-CSF mRNA and RANK mRNA were measured by quantitative testing. **Results** RANK and TRACP mRNA expression significantly depended on intensities and frequencies of the compressive stress ($P < 0.01$), and Ctsk mRNA significantly depended on intensities ($P < 0.01$) while it differed notably with different frequencies ($P < 0.01$). M-CSF mRNA expression with 8 h was much lower than that with 12 h ($P < 0.01$) and 16 h ($P < 0.05$). RANK mRNA expression with 8 h was lower than that with 12 h ($P < 0.05$) and 16 h ($P < 0.01$). In addition, Ctsk and NFATc1 mRNA expression with 16 h was higher than that with 4 h and 8 h ($P < 0.05$). **Conclusions** In the 3D hydrogel model, 1% intensity, frequency of 0.5 Hz, cyclic compression intervention with 8 h can suppress the differentiation of osteoclasts. The research findings provide the theoretical basis for preventing osteoporosis and improving the peak bone mass by appropriate exercise.

Key words: compressive stress; intensity; frequency; duration; osteoclast

骨转换是由破骨细胞不断清除旧骨、成骨细胞形成类骨质并进行矿化的过程。骨骼内稳态受多个因素的影响,特别是受机械载荷和生长因子影响^[1]。体外特定力学传导装置可以将力学刺激信号转化为生物化学信号并传递到其他细胞^[2]。目前机械牵张力作用于细胞的研究较多,而压力作用于细胞的研究较少^[3-4]。

破骨细胞来源于造血干细胞中的单核前体细胞——破骨细胞前体(osteoclast precursors, OCPs)。研究表明,力学因素可直接影响破骨细胞的分化^[6],主要包括牵张力^[5-6]、微重力^[7-8]、流体剪切力^[9],而压应力研究较少。从人体骨细胞受力情况而言,压应力又必不可少。有关压应力的研究目前鲜有报道,主要难度在于细胞的3D建模。细胞3D培养能在细胞培养过程中为细胞提供一个更加接近体内生存条件的微环境,突破传统有盖培养皿、培养瓶或微孔板细胞培养耗时、繁琐等局限性。

因此,本研究在先前压应力作用于成骨细胞模型的基础上,建立3D水凝胶细胞模型,同时采用不同强度、频率、时间压应力对破骨细胞进行机械干预,观察压应力对破骨细胞活化的影响,为后续研究压应力作用于破骨细胞的机制确定干预方案。

1 材料与方法

1.1 破骨细胞的培养、鉴定

6周龄C57BL/6小鼠从两侧股骨、胫骨常规方法提取骨髓单核细胞(bone marrow monocyte, BMM),待骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)贴壁48 h后,收集皿中培

养液,离心后将细胞重悬种板,加入含有M-CSF(25 $\mu\text{g/L}$)和RANKL(50 $\mu\text{g/L}$) α -MEM培养液(含10% FBS + 1% PS),在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中常规培养^[10]。

用TRACP(tartrate-resistant acid phosphatase)染色鉴定破骨细胞形成,待到细胞长至第7 d时,固定后加入Trap染色液(Sigma公司,美国),用铝箔纸包裹培养皿避光放置于37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱内孵育1 h。

1.2 3D细胞水凝胶建模

10 cm规格的培养皿中细胞量达到90%左右进行干预,将细胞用胰酶消化后转移至15 mL离心管中,以1 000 r/min、5 min离心后弃上清,10%无菌蔗糖溶液清洗2遍,加入100 μL 无菌蔗糖溶液进行重悬,此时细胞计数浓度可以达到 $(1 \sim 2) \times 10^7$ 个/mL。若细胞量过低,在与水凝胶混合后极易溶解在培养液中。从4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中将BeaverNanoTM3D细胞水凝胶取出,室温放置30 min降低水凝胶原溶液的黏性成液态,加样器取100 μL 的细胞水凝胶置于1.5 mL无菌EP管中。在吸取的过程中容易产生气泡,故进行1 000 r/min、5 min离心处理。

将100 μL 细胞蔗糖重悬液缓慢地注入到水凝胶中,尽可能不产生气泡。再将细胞蔗糖水凝胶混合液混匀后,每100 μL 注入到底部具有弹性膜的BioFlex[®] Plate弹性膜6孔板(Flexcell公司,美国),此前每个孔中已经加入2 mL α -MEM培养液。一般10 cm规格的培养皿细胞达到80%~90%融合时,建议种两个孔。将培养板放置培养箱内,15 min后换成含诱导分化剂的培养液(含M-CSF和RANKL)尽

快改变水凝胶的酸度。二次换液后,将培养板重新放置培养箱待细胞蔗糖水凝胶混合液凝固后即可进行加压干预。

1.3 压应力方案

细胞种板后第 2 d,利用细胞压应力装置(Flexcell-FX5000 Compression System,美国)对细胞进行压应力干预,该装置可以连接外界泵提供动力。其原理是利用橡胶密封垫在细胞培养板基底膜与基座之间形成封闭腔,把此密封腔的进、出气管插入 CO₂ 培养箱里,把此密封腔放入 CO₂ 培养箱,利用封闭腔正气压挤压培养孔里的活塞,进而使活塞和固定台之间的凝胶三维培养物间接受到压力而发生形变,通过计算机控制系统调节气体的压力来改变基底膜的形变量。设计不同强度、频率的压应力梯度方案对 3D 水凝胶进行干预,对照组为不施加压应力的细胞水凝胶组,每组两个孔。分组如下:G0(对照组)、G1(1%,0.5 Hz,4 h)、G2(2%,0.5 Hz,4 h)、G3(3%,0.5 Hz,4 h)、G4(1%,1.0 Hz,4 h)、G5(2%,1.0 Hz,4 h)、G6(3%,1.0 Hz,4 h)。在此基础上,通过统计学计算出有效的强度和频率压应力方案后,在已确定的强度和频率的基础上增加时间梯度的方案,分组如下:D1(4 h)、D2(8 h)、D3(12 h)、D4(16 h),每组两个孔。加压干预结束后即刻收集细胞,胶块放置 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管中,按照 RNA 的提取步骤,提取 RNA。经过酶标仪检测出每个样本 RNA 的纯度和浓度后,按照反转录试剂盒步骤,将 RNA 反转录为 cDNA。利用试剂盒,对样本中的 Ctsk mRNA、NFATc1 mRNA、TRACP (Acp5) mRNA、M-CSF mRNA 和 RANK mRNA 进行定量检测。在 Pubmed 数据库查询小鼠 Ctsk、NFATc1、TRACP (Acp5)、M-CSF、RANK 和 GAPDH 基因引物序列,后用 Primer Express 3.0 软件检测引物(见表 1),引物由上海生工生物工程公司合成。上述实验重复两次。

1.4 统计学分析

实验结果以均数 ± 标准差表示,数据均采用 SPSS 13.0 软件包处理。针对不同强度和频率梯度压应力的数据,先采用双因素方差分析,确定强度、频率是否产生独立作用或产生交互作用,针对不同因素产生的作用,再采用单因素方差分析或独立样本 *t* 检验推断组间是否存在差异;针对不同时间梯

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab.1 RT-PCR primer sequences

mRNA	引物	序列号(5' - 3')
Ctsk	5' 端	GGGAGAAAAACCTGAAGC
	3' 端	ATTCTGGGGACTCAGAGC
NFATc1	5' 端	CAACGCCCTGACCACCGATAG
	3' 端	GGCTGCCTTCCGCTCATACT
TRACP (Acp5)	5' 端	TGTGGCCATCTTTATGCT
	3' 端	GTCATTTCCTTTGGGGCTT
M-CSF	5' 端	CATCCAGGCAGAGACTGACA
	3' 端	CTTGCTGATCCTCTTCCAG
RANK	5' 端	CTGACTCTATGCCCGTGTCC
	3' 端	ACTGCCTGTGTAGCCATCTGT
GAPDH	5' 端	CCACAGTCCATGCCATCAC
	3' 端	CATACCAGGAAATGAGCTTGAC

度压应力的数据,采用单因素方差分析推断组间是否存在差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 破骨细胞鉴定

待到细胞长至第 7 d 时,100 倍倒置显微镜下发现细胞融合成一个陷窝;用 Trap 染色鉴定细胞,40 倍倒置显微镜下观察细胞呈多核,深红色,符合破骨细胞形态学(见图 1)。

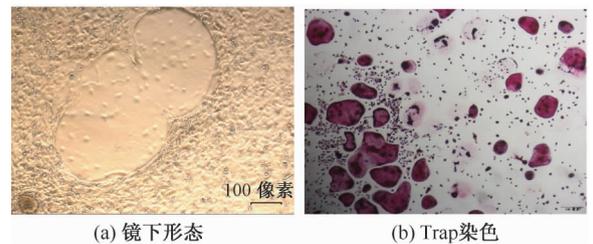


图 1 破骨细胞的鉴定

Fig.1 Osteoclast identification (a) Osteoclast morphology under inverted microscope, (b) Trap staining for osteoclasts

2.2 不同强度和频率压应力对破骨细胞的作用

如图 2 所示,针对不同强度和频率梯度压应力数据,先采用双因素方差分析发现,不同强度和频率压应力对 RANK 作用显著($P < 0.01$),但两者没有出现交互作用;不同强度压应力对 TRACP 作用显著($P < 0.01$),且强度和频率两者之间出现交互作用($P < 0.01$);不同强度压应力对 Ctsk 作用显著($P < 0.05$),不同频率压应力对 Ctsk 作用显著($P < 0.01$),且两者之间出现交互作用($P < 0.01$)。

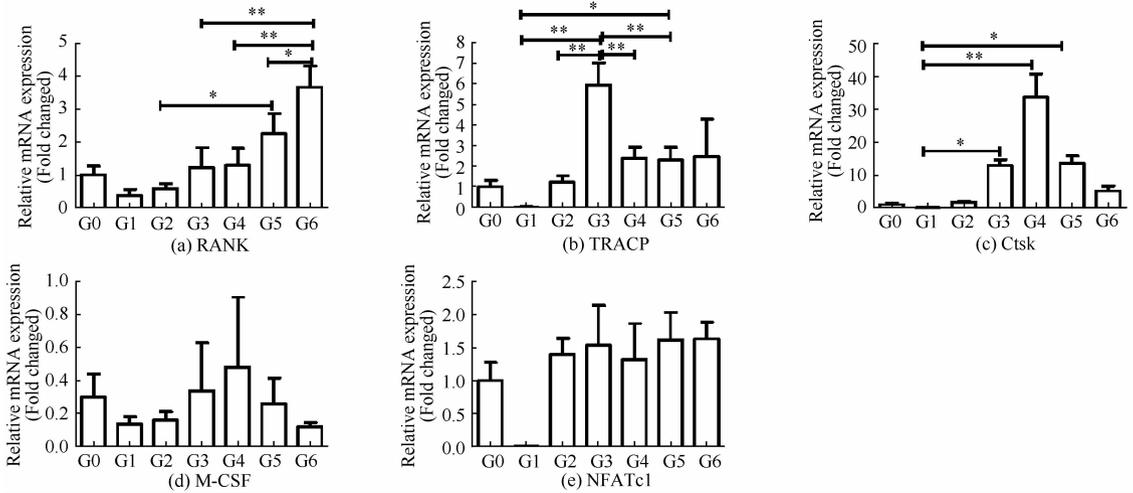


图2 不同强度和频率压应力对破骨细胞 mRNA 影响

Fig. 2 Effects of compressive stress with different intensities and frequencies on mRNA of osteoclast (a) RANK, (b) TRACP, (c) Ctsk, (d) M-CSF, (e) NFATc1

不同强度压应力对 Ctsk 作用显著, 表现为 G1 vs G3 ($P < 0.05$)、G1, 2 vs G3 ($P < 0.05$)、G4 vs G5 ($P < 0.01$)、G4 vs G6 ($P < 0.01$)。不同频率压应力对 Ctsk 作用显著, 表现为 G1 vs G4 ($P < 0.01$)、G1, 2 vs G5 ($P < 0.05$)。强度和频率之间出现交互作用, 表现为 G1 vs G5 ($P < 0.05$)、G1, 2 vs G5 ($P < 0.05$)、G3 vs G4 ($P < 0.01$)。不同强度压应力对 M-CSF 和 NFATc1 并未出现显著作用, 不同频率压应力对 M-CSF 和 NFATc1 也未出现显著作用, 且两者没有出现交互作用。

2.3 不同时间压应力对破骨细胞的作用

如图 3 所示, 针对不同时间梯度压应力的数据, 采用单因素方差分析发现, 加压 8 h M-CSF 的表达量比加压 12 h ($P < 0.01$) 和 16 h ($P < 0.05$) 的低; 加压 12 h M-CSF 的表达量比加压 4 h 和 16 h 的高 ($P < 0.01$)。加压 8 h RANK 的表达量比加压 12 h ($P < 0.05$) 和 16 h ($P < 0.01$) 的低; 加压 16 h RANK 的表达量比加压 4 h ($P < 0.01$) 和 12 h ($P < 0.05$) 的高。加压 16 h Ctsk 和 NFATc1 的表达量比加压 4 h 和 8 h 的高 ($P < 0.05$)。

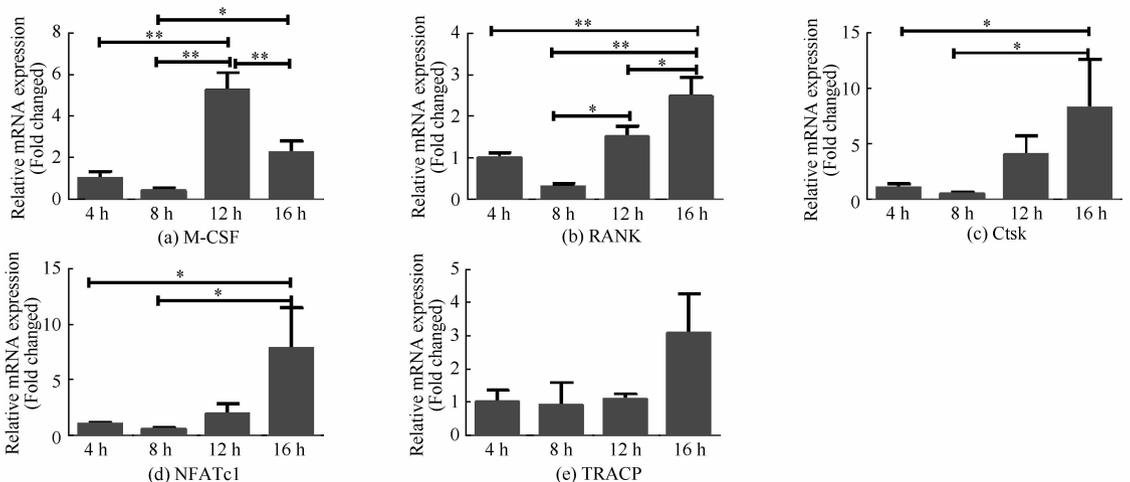


图3 不同时间压应力下破骨细胞中基因表达

Fig. 3 Effects of compressive stress at different durations on gene expression of osteoclasts (a) M-CSF, (b) RANK, (c) Ctsk, (d) NFATc1, (e) TRACP

3 讨论

破骨细胞骨吸收与成骨细胞骨形成之间的平衡是维持正常骨代谢的基础。破骨细胞活性改变是导致各种代谢性骨病的主要原因,骨质疏松症就是由于破骨细胞被异常活化而引起骨吸收增强所致^[6]。抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)常作为检验破骨细胞的标志物。

本课题组曾选用琼脂糖凝胶进行3D水凝胶建模,但是琼脂糖凝胶需要在37℃时融化才可将细胞注入胶内,容易导致细胞大量凋亡^[11]。后来选用的BeaverNano™水凝胶是由多肽类生物纳米材料制备而成,其主要成分是1% (w/v)多肽水溶液(pH: 2.0~2.5),无色透明,室温状态下呈液态;同时有极好的生物相容性,采用细胞注射的方式即可植入。相较于琼脂糖凝胶、胶原蛋白、甲基纤维素凝胶,该水凝胶的工作浓度比较低(0.125%~0.500%),有利于营养物质的扩散和细胞的迁移;纳米纤维孔径为50~200 nm,理化性质稳定,不会因为温度或湿度等因素的影响而发生改变,更接近细胞在体内的微环境;且成分明确,减少不确定因素对细胞生长的影响。此外,该水凝胶可以填充任意形状的缺损,进入机体后可迅速在损伤部位启动凝胶化过程。

细胞种植于水凝胶中会导致细胞凋亡。为了说明这个情况,在前期的研究中,本课题组已经将成骨细胞系MC3T3-E1与水凝胶混合种板,通过制成10 μm冰冻切片,用Tunel Apo-Green Detection Kit(Biotool公司,美国)进行凋亡染色、RT-PCR和Western印迹技术观察细胞在水凝胶的存活凋亡情况。

压应力干预机械设备Flexcell-FX5000 Compression System存在强度、频率和时间3个变量因素。如果按照严格的3因素实验设计,强度(1%、2%、3%)、频率(0.5、1.0 Hz)、时间(4、8、12、16 h),加上对照组需要25组,再加之细胞种板总量大,总体实验需要重复两遍,实验不具备可操作性,故将实验设计拆分成两部分进行,第1部分先验证强度和频率两因素,在此基础上再验证时间因素对破骨细胞的影响。本文推测机械性刺激转变为化学

性刺激的两种途径:一是G蛋白偶联受体感受器途径,二是跨膜整合蛋白、细胞骨架和核转录之间的直接联系。机械载荷通过激活细胞膜上Ca²⁺通道引起胞外Ca²⁺内流,促进胞内Ca²⁺释放,细胞在接收到机械信号后先被跨膜的表面受体如整合蛋白、G蛋白偶联受体或离子通道等传递到细胞质内,这样机械信号转换为胞质中的生化信号^[12],通过调节第2信使或活化信号分子最终调控细胞迁移、生长、分化和基质重建等行为^[13-14]。

M-CSF最初由成骨细胞分泌产生,可与髓系细胞上相应的受体结合并促进破骨细胞形成。M-CSF对于破骨细胞形成过程中基因谱的表达具有关键的调控作用^[15]。溶酶体在破骨细胞行使骨吸收功能中的关键细胞器^[4,16]。按照对破骨细胞骨吸收功能的影响分为两类:一类主要与骨吸收陷窝的酸化环境相关;另一类主要调节细胞外基质,其中CTSK^[17]、TRAP^[18-19]都是关键蛋白,也可作为破骨细胞的潜在靶点。RANKL是核因子κB受体活化因子配体,主要由成骨细胞系、T细胞和B细胞分泌^[20]。研究发现,在松质骨中骨细胞分泌的RANKL才是调节破骨细胞形成的主要来源^[21-22]。RANKL是RANK的受体,两者结合后参与破骨细胞的分化,促进骨吸收^[23]。M-CSF和RANKL是启动破骨细胞分化时不必可少的基因转录,两者作用互补。M-CSF增加破骨前体细胞池,而RANKL结合到破骨前体细胞和成熟破骨细胞表面表达的RANK受体上,促进破骨细胞的分化、活化并抑制^[24-25]。NFATc1是调控破骨细胞成熟过程的关键转录因子,是NFAT转录因子家族成员之一,该家族首先发现于T淋巴细胞中^[4]。在破骨细胞前体中,NFATc1通过钙调磷酸酶的去磷酸化作用被激活,并参与破骨细胞的形成、活化的所有方面,是抗破骨细胞疗法的一个首要靶向目标^[26-27]。

不同强度和(或)频率压应力对破骨细胞RANK、TRACP和Ctsk mRNA都存在影响,以1%强度、0.5 Hz频率、4 h的压应力干预方案是众多方案中抑制破骨细胞的生长的最优方案(见图2),这与文献^[6]中所得“低强度载荷抑制破骨细胞分化,较高强度的生理载荷促进破骨细胞分化和功能”的结论一致。时间因素对破骨细胞影响的验证结果表明,不同时间压应力对破骨细胞RANK、M-CSF、

NFATc1 和 Ctsk mRNA 都存在影响,即使对 TRACP 作用的差异性不显著,但是趋势表现一致:加压 8 h 时破骨细胞的各个基因表达量最低;而加压 4、12、16 h 破骨细胞相关的基因表达量都上升(见图 3)。有研究报道,破骨细胞较之于成骨细胞而言对力学刺激更为耐受^[28];同时在前期对成骨细胞的研究中发现,在 3D 水凝胶模型中,以 1% 强度、0.5 Hz 频率、4 h 的压应力干预方案能够促进成骨细胞的活化,故加压 4 h 对于抑制破骨细胞并不是一个最优的时间段。而加压 12 h 和 16 h 破骨细胞相关基因逐步增高,说明持续时间较长促进破骨细胞活化。

破骨细胞起源于造血干细胞,RAW264.7 细胞是破骨细胞前体细胞株,在以往的实验中大多数研究者选用的是通过 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞获得成熟的破骨细胞株,且仅仅只针对压力的强度或时间改变破骨细胞株的分化得出结论^[29-31]。本研究采用原代破骨细胞,较之于细胞株更接近于破骨细胞在机体内的状态。

4 结语

本文建立 3D 水凝胶细胞模型,采用不同强度、频率、时间压应力对破骨细胞进行机械干预,结果发现,以 1% 强度、0.5 Hz 频率、8 h 的压应力干预方案能够抑制破骨细胞的活化。研究结论为后续研究压应力作用于破骨细胞的机制确定干预方案,同时为运动调节骨代谢、预防骨质疏松提供理论基础。

参考文献:

[1] IURA A, MCNERNY EG, ZHANG Y, *et al.* Mechanical loading synergistically increases trabecular bone volume and improves mechanical properties in the mouse when BMP signaling is specifically ablated in osteoblasts [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0141345.

[2] 艾江平, 谭光宏, 余德涛, 等. 机械刺激对骨质疏松症的影响的研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2012, 28(20): 3474-3476.

[3] 赵莹, 张旻, 王安辉, 等. 流体静压力及雌激素共同作用对骨髓间充质干细胞成骨及成软骨分化的影响[J]. *医用生物力学*, 2013, 28(2): 201-209.

ZHAO Y, ZHANG M, WANG AH, *et al.* Combined effects of hydrostatic pressure and estrogen on osteogenic and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal

stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(2): 201-209.

[4] 刘阳, 安美文, 芦莹, 等. 压力下角质形成细胞与成纤维细胞共培养对细胞增殖及胶原合成的影响[J]. *医用生物力学*, 2015, 30(2): 148-153.

LIU Y, AN MW, LU Y, *et al.* Effects of keratinocytes/fibroblasts co-culture under pressure on cell proliferation and collagen synthesis [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(2): 148-153.

[5] 郭春, 闫玉仙, 张西正, 等. 力学拉伸强度对小鼠单核细胞 RAW264.7 诱导分化为破骨细胞的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(37): 7211-7216.

[6] 李永明, 林珠, 张晓东, 等. 周期性牵张力对骨髓破骨细胞形成的影响[J]. *临床口腔医学杂志*, 2004, 20(12): 723-725.

[7] TAMMA R, COLAIANNI G, CAMERINO C, *et al.* Microgravity during spaceflight directly affects *in vitro* osteoclastogenesis and bone resorption [J]. *FASEB J*, 2009, 23(8): 2549-2554.

[8] NABAVI N, KHANDANI A, CAMIRAND A, *et al.* Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion [J]. *Bone*, 2011, 49(5): 965-974.

[9] KIM CH, YOU L, YELLOWLEY CE, *et al.* Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling [J]. *Bone*, 2006, 39(5): 1043-1047.

[10] LI D, LIU J, GUO B, *et al.* Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10872.

[11] CHEN X, GUO J, YUAN Y, *et al.* Cyclic compression stimulates osteoblast differentiation via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 2890-2896.

[12] MAMMOTO T, INGBER DE. Mechanical control of tissue and organ development [J]. *Development*, 2010, 137(9): 1407-1420.

[13] ALENGHAT FJ, TYTELL JD, Thodeti CK, *et al.* Mechanical control of cAMP signaling through integrins is mediated by the heterotrimeric Galphas protein [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(4): 529-538.

[14] 刘迎节, 李瑞欣, 赵滨, 等. 力学过载对成骨细胞损伤及中药修复的研究进展[J]. *医用生物力学*, 2016, 31(5): 456-466.

LIU YJ, LI RX, ZHAO B, *et al.* Research progress of mechanical overload on osteoblast injury and its repair by traditional Chinese medicine [J]. *J Med Biomech*, 2016, 31(5): 456-466.

[15] SAMBANDAM Y, BLANCHARD JJ, DAUGHTRIDGE G, *et al.* Microarray profile of gene expression during osteo-

- clast differentiation in modelled microgravity [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(5): 1179-1187.
- [16] LACOMBE J, KARSENTY G, FERRON M. Regulation of lysosome biogenesis and functions in osteoclasts [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(17): 2744-2752.
- [17] LI CY, JEPSEN KJ, MAJESKA RJ, *et al.* Mice lacking cathepsin K maintain bone remodeling but develop bone fragility despite high bone mass [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(6): 865-875.
- [18] EK-RYLANDER B, ANDERSSON G. Osteoclast migration on phosphorylated osteopontin is regulated by endogenous tartrate-resistant acid phosphatase [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(3): 443-451.
- [19] MAKRYPIDI G, DAMME M, MULLER-LOENNIES S, *et al.* Mannose 6 dephosphorylation of lysosomal proteins mediated by acid phosphatases Acp2 and Acp5 [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(4): 774-782.
- [20] PACIFICI R. Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(2): 231-239.
- [21] XIONG J, ONAL M, JILKA RL, *et al.* Matrix-embedded cells control osteoclast formation [J]. *Nat Med*, 2011, 17(10): 1235-1241.
- [22] NAKASHIMA T, HAYASHI M, FUKUNAGA T, *et al.* Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression [J]. *Nat Med*, 2011, 17(10): 1231-1234.
- [23] 田虹, 樊瑜波. OPG、RANK、RANKL 的结构、作用机制和在骨疾病中的作用[J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(20): 3963-3966.
- [24] SCHOPPET M, PREISSNER KT, HOFBAUER LC. RANK ligand and osteoprotegerin: Paracrine regulators of bone metabolism and vascular function [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(4): 549-553.
- [25] 仲蕾蕾, 杨冰, 黄晓斌, 等. OPG/RANKL/RANK 系统在成骨细胞和破骨细胞相互调节中的作用[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2011, 17(11): 1010-1013.
- [26] TAKAYANAGI H. Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(4): 292-304.
- [27] TAKAYANAGI H, KIM S, KOGA T, *et al.* Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts [J]. *Dev Cell*, 2002, 3(6): 889-901.
- [28] HAYAKAWA T, YOSHIMURA Y, KIKUIRI T, *et al.* Optimal compressive force accelerates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5879-5885.
- [29] 耿远明, 申晓青, 徐平平. 三维培养成骨细胞压应力作用下的破骨诱导机制研究[J]. *广东牙病防治*, 2015, 23(10): 509-513.
- [30] ICHIMIYA H, TAKAHASHI T, ARIYOSHI W, *et al.* Compressive mechanical stress promotes osteoclast formation through rankl expression on synovial cells [J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007, 103(3): 334-341.
- [31] 黄生高, 凌天牖, 钟孝欢, 等. 压应力对小鼠单核细胞 RAW264.7 DNAX 活化蛋白 12、抗酒石酸酸性磷酸酶表达的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2013, 31(4): 360-364.