

文章编号:1004-7220(2010)06-0449-07

离心加压对前成骨细胞株 OCT-1 成骨功能的影响

卞琴^{1,2,3}, 杨铸^{1,2}, 刘书芬^{1,2}, 崔学军^{1,2}, 梁倩倩^{1,2}, 赵永见^{1,2},
卢盛^{1,2}, 施杞^{1,2}, 王拥军^{1,2}

(1. 上海中医药大学 附属龙华医院, 上海 200032; 2. 上海中医药研究院 脊柱病研究所, 上海 200032;
3. 复旦大学附属华山医院 中西医结合研究所, 上海 200040)

摘要: 目的 探讨模拟重力加压的可行性, 观察其对前成骨细胞株 OCT-1 成骨功能的影响。方法 将 OCT-1 细胞接种在 1% 终浓度的琼脂糖上, 使细胞终密度 2×10^7 个/mL。实验分为 1、5 d 两组, 各组再分为对照组、200 r/min 组和 500 r/min 组。200 r/min 组和 500 r/min 组离心加压 3 h \times 1 次/d, 对照组同步置于除离心外相同的环境中。结果 1d 200 r/min 组 Col I 阳性染色稍有增强, 1d 500 r/min 组明显增强。相反的, 5d 200 r/min 组 Col I 阳性染色强于 5d 500 r/min 组。成骨分化相关指标碱性磷酸酶 (ALP)、I 型胶原 (Col I)、骨钙素 (OC)、runt 相关转录因子 (Runx2) 的基因表达在离心后都上调。结论 离心是一种可行的细胞加压法。该法对前成骨细胞 OCT-1 成骨分化有显著促进作用, 并可作为一种新的模拟重力的加压方法。

关键词: 重力; 离心; 细胞加压; 细胞培养

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

Effects of centrifugating pressure on the function of preosteoblast OCT-1

BIAN Qin^{1,2,3}, YANG Zhu^{1,2}, LIU Shu-feng^{1,2}, CUI Xue-jun^{1,2}, LIANG Qian-qian^{1,2},
ZHAO Yong-jian^{1,2}, LU Sheng^{1,2}, SHI Qi^{1,2}, WANG Yong-jun^{1,2} (1. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 2. Institute of Spine, Shanghai Traditional Chinese Medicine Institute, Shanghai 200032, China; 3. Institute of Integrated Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of simulating gravity pressure and observe its effect on preosteoblast OCT-1 by centrifugation. **Method** OCT-1 cells were cultured in 1% agarose gel with a final concentration of 2×10^7 cells per millilitre. The experiment was divided into two groups according to the duration: one day (1 d) and five days (5 d). Each group was further divided into three subgroups: 0 r/min (control), 200 r/min, and 500 r/min. The 200 r/min group and 500 r/min group were centrifuged for three hours once a day for one day or five days respectively. The control group was kept in the same environment without centrifugation. **Results** The Col I positive staining was slightly strengthened in the 1d 200 r/min group while it was even more strengthened in the 1d 500 r/min group. Conversely, the positive staining was stronger in the 5d 200 r/min group than that in the 5d 500 r/min group. The markers related to osteoblast differentiation such as Alkaline phosphatase (ALP), Type I collagen $\alpha 2$ (Col1 $\alpha 2$), Osteocalcin (OC) and runt-related transcription factor-2 (Runx2) mRNA expression were all up-regulated after centrifugation. **Conclusions** Centrifugation is a practical method for cell pressure and plays a significant role in promoting the differentiation of preosteoblast OCT-1, which can be used as a new method to simulate the gravity.

Key words: Gravity; Centrifugation; Cell pressure; Cell culture

收稿日期:2010-08-12; 修回日期:2010-10-01

基金项目:国家 973 计划资助项目(2010CB530400), 国家杰出青年科学基金资助项目(30625043), 国家自然科学基金重点项目(30930111), 国家自然科学基金资助项目(81001526, 30701118), 上海市卫生局项目(2009Y092)。

作者简介:卞琴(1980-), 女, 研究方向:中医药防治骨退行性病变。

通讯作者:王拥军, Tel: (021)64385700; E-mail: yjwang88@hotmail.com。

机械应激在骨重建中扮演重要角色。微重力或长期卧床状态容易导致骨量丢失,而适当的机械应激可预防骨质流失。由于微重力状态加速了航天员骨骼的分解代谢,因此本实验假设超重力状态可模拟机械应激,促进骨合成代谢。关于微重力($10^{-3} \sim 10^9 g$)对航天发射、电磁场改变、压力变化、航天舱内大气成分的改变、发动机的机械振动、机组人员的活动、宇宙辐射、大气对流等的影响的报道不少,但鲜有研究重力场(超重)对骨细胞影响的报道。

细胞的加压方式包括机械压^[1]、流体静水压^[2-3]和气压^[4],每个方法都有其自身的优势和劣势。基于其他加压方式对设备的特殊要求抬高了细胞加压实验的门槛,本实验希望能通过离心加速度 a 来模拟重力加速度 g 这一简单的原理,获得一种简易的细胞加压方法。

1 材料与方法

1.1 细胞株

前成骨细胞株 OCT-1,来源于骨钙素驱动子 SV-40 转基因(OC-TAg)小鼠的头盖骨(由美国罗切斯特大学陈棣教授赠与)^[5]。

1.2 试剂

细胞培养基干粉(Gibico,美国)、细胞培养基(上海博升生物科技有限公司)、胎牛血清(上海博升生物科技有限公司)、三抗(即青霉素、链霉素、庆大霉素,Gibico,美国)、胰蛋白酶(beyotime,海门)、琼脂糖(Biowest,法国)、ALP 试剂盒(南京建成生物工程研究所)、细胞 RNA 抽提试剂盒(目录号:DP430,北京天根生化科技有限公司)、免疫组化试剂盒(武汉博士德)、Col I 一抗(abcam,美国)等。

1.3 实验仪器

细胞培养箱(SANYO,日本)、低速台式离心机(飞鸽,上海)、SANYO-MDF-J281AT-80 °C 超低温冰箱、冻存盒(Falco)、离心机 Allegra X-22R(BECKMAN,美国)、离心机 LE-80K 超速离心机、精密电子分析天平、HITACHI 7170 全自动生化分析仪(日立,日本)、DU800 紫外分光光度计(BECKMAN,美国)、DK-S24 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)、MK-III 型酶标仪(Dynex,美国)等。

1.4 细胞分组

分为 1 d 组和 5 d 组两个组,每组内分正常对照

组、200、500 r/min 压力组。

1.5 实验方法

1.5.1 双浓度琼脂糖制备方法

1 g 琼脂糖溶于 50 mL 超纯水,配成 2% 琼脂糖溶液(此浓度为接种后的 2 倍),高温高压消毒,乘热倒入 50 mL 离心管内进行分装,每管 10 mL,自然冷却凝固,常温保存。具体操作时用微波炉中火加热 1 min 即可融化。

1.5.2 双浓度培养基制备方法

500 mL 超纯水溶解 DMEM-HG 培养基冻干粉 13.4 g(1 袋配 1 L 的量),0.22 μm 过滤器过滤除菌,加 20 mL 胎牛血清,10 mL 三抗。4 °C 保存。

1.5.3 细胞接种

细胞在培养皿中平铺培养到几乎完全融合,常规消化,收集沉淀,用双浓度培养基悬浮沉淀,使浓度为 4×10^7 个/mL。平均接种到 1.5 mL 离心管(去酶,高温高压消毒处理)中,每管 200 μL 。将 2% 琼脂糖融化并冷却到 40 °C 左右,取同体积与室温条件下细胞悬液混匀,使细胞在混合瞬间的温度不超过 37 °C。最终获得的细胞浓度为 2×10^7 个/mL,琼脂糖浓度为 1%,每个样本细胞-琼脂糖体积为 400 μL 。

1.5.4 细胞收集

形态学染色前将细胞在 4% 多聚甲醛中固定 20 min,清水冲洗,冰冻切片。抽提 RNA 的细胞直接处理后检测。

1.6 检测指标

1.6.1 HE 染色

常规脱蜡至水,苏木素,伊红分别染色 2 min,脱水透明封片后镜下观察。

1.6.2 Col I 免疫组织化学荧光染色

将切片常规脱蜡后在 3% H_2O_2 与甲醇 1 : 50 溶液中孵育 15 min 去除内源性过氧化物酶,PBS 洗 2 min \times 3 次,蛋白酶 K 消化 10 min,加 5% BSA 封闭液。兔多克隆抗体 Col I (1 : 200 稀释,abcam,美国),37 °C 孵育 2 h,PBS 2 min \times 3 次,加荧光标记的二抗,37 °C 避光孵育 2 h,清水冲洗,荧光显微镜下观察并拍照。

1.6.3 real-time RT-PCR 检测

(1) 细胞 RNA 抽提 按试剂盒步骤操作。

(2) 引物设计见表 1。

表 1 小鼠 ALP、 β -actin、Col1 α 2、OC、Runx2 引物设计序列
 Tab.1 ALP, β -actin, Col1 α 2, OC, Runx2 sequencing primer of mouse

Genes	Forward primer	Reverse primer
ALP	TGACCTTCTCTCCTC-CATCC	CTTCTGGGAGTCT-CATCCT
β -actin	GGAGATTACTGCCCTG-GCTCCTA	GACTCATCGTACTC-CTGCTTGCTG
Col1 α 2	TCCTGGCAATCGTGGT-TCAA	ACCAGCTGGGCCAA-CATTTTC
OC	TGCCCTCCTGGT-TCATTTC	TTCTGTTCCTCCT-GCTGT
Runx2	CCATAACGGTCTTCA-CAAATCCT	TCTGTCTGTGCCTTCT-TGCTTC

1.7 统计方法

采用 SPSS16.0 统计分析软件进行处理,数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm sd$) 表示,各组数据间的比较采用单因素方差分析的检验方法。对各数值变量进行方差齐性和正态性检验,检验水准取 $\alpha = 0.10$, $P > 0.10$ 为数据方差齐、资料呈正态分布。方差齐时,采用 LSD 法检验;方差不齐时,采用 Turkey 法检验。

2 结果

2.1 HE 染色结果

离心 1 d: 与对照组(0)相比,200 和 500 r/min 压力组细胞数量增加,500 r/min 压力更明显(见图 1A ~ C)。离心 5 d: 与对照组(0)相比,200 和 500 r/min 压力组细胞数量增加,200 r/min 压力更明显(见图 1D ~ F)。

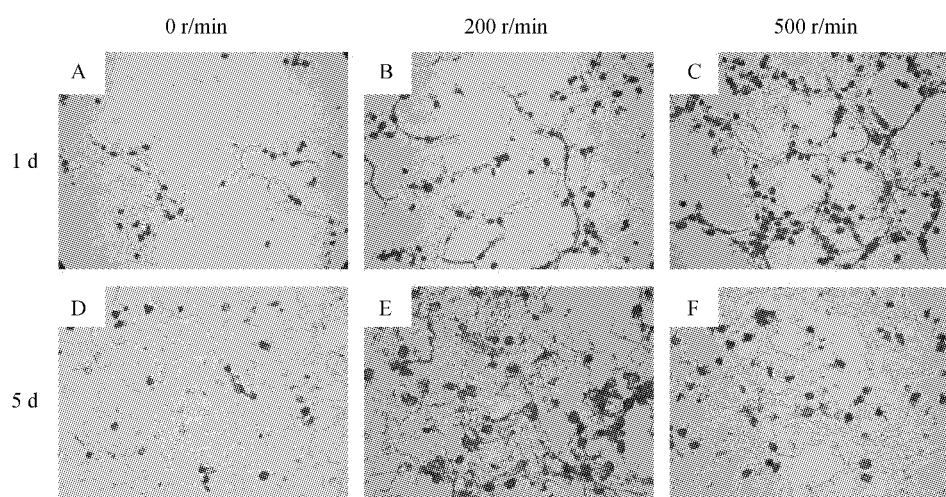


图 1 1% 琼脂糖-OCT-1 细胞 HE 染色 ($\times 100$)

Fig.1 HE staining for -OCT-1 cells in agarose gel of 1% concentration ($\times 100$)

2.2 Col I 免疫荧光染色结果

1 d 组: 与对照组相比,200 和 500 r/min 压力组荧光显色均较正常组略有增强。200 r/min 压力组比 500 r/min 压力组略强(见图 2A ~ C)。5 d 组: 200 和 500 r/min 压力组荧光显色较正常组明显增强,200 r/min 压力组比 500 r/min 压力组细胞浓集,显色也略强(见图 2D ~ F)。

2.3 Real time RT-PCR 结果

1 d 组: 与对照组比较,200 r/min 压力组 ALP mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$), 约为对照组的 1.2

倍;500 r/min 压力组无显著差异(见表 2)。200 和 500 r/min 压力组 Col1 α 2 mRNA 表达均显著上调 ($P < 0.01$), 分别为对照组的 1.7 倍和 2.1 倍,且 500 r/min 压力组比 200 r/min 压力组仍上调 ($P < 0.05$)。200 r/min 压力组 OC mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$), 约为对照组的 1.3 倍;500 r/min 压力组无显著差异。200 r/min 压力组 Runx2 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$), 约为对照组的 3.5 倍;500 r/min 压力组无显著差异。

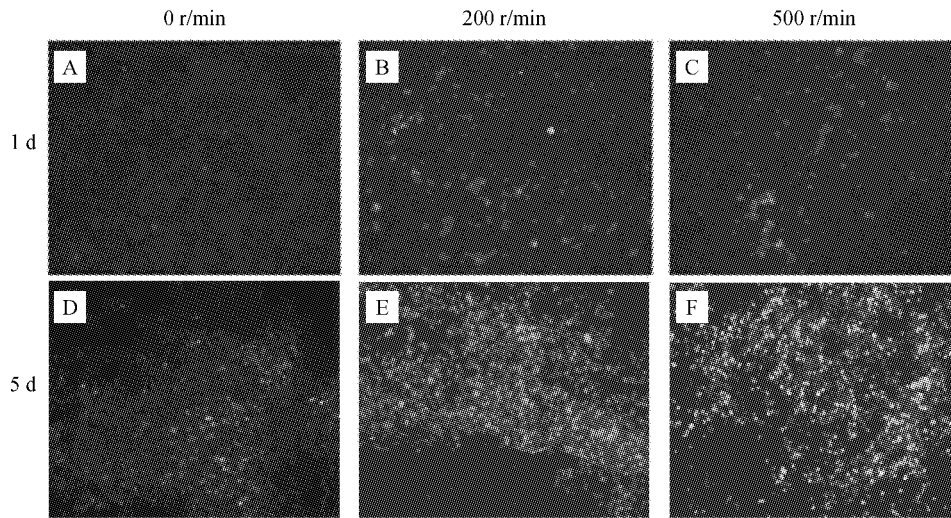


图2 1%琼脂糖-细胞 Col I 免疫组织化学染色 ($\times 200$)
Fig. 2 Immunofluorescence study of Col I ($\times 200$)

5 d 组:与对照组比较,200 和 500 r/min 压力组 ALP mRNA 表达均显著上调($P < 0.01$),分别为对照组的 1.2 倍和 2.8 倍,且 500 r/min 压力组比 200 r/min 压力组仍上调($P < 0.01$)。200 和 500 r/min 压力组 Col1 α 2 mRNA 表达均显著上调($P < 0.05, P < 0.01$),分别为对照组的 1.4 倍和 3.4 倍;且 500 r/min 压力组比 200 r/min 压力组仍上调($P <$

0.01)。200 和 500 r/min 压力组 OC mRNA 表达均显著上调($P < 0.05, P < 0.01$),分别为对照组的 1.2 倍和 2.1 倍;且 500 r/min 压力组比 200 r/min 压力组仍上调($P < 0.01$)。200 r/min 压力组 Runx2 mRNA 表达显著上调($P < 0.01$),约为对照组的 3.6 倍;500 r/min 压力组无显著差异。

表2 三维培养 OCT-1 细胞 ALP、Col1 α 2、OC、Runx2 基因表达量

Tab. 2 ALP、Col1 α 2、OC、Runx2 genetic expression level in 3D culture OCT-1 cells ($\bar{x} \pm sd$)

组别	ALP	Col1 α 2	OC	Runx2
1d 0 r/min	345.54 \pm 2.33	20.36 \pm 4.63	2026.67 \pm 32.02	21.43 \pm 4.77
1d 200 r/min	421.41 \pm 23.87 *	34.85 \pm 2.21 **	2650.41 \pm 83.51 **	75.28 \pm 7.27 **
1d 500 r/min	335.28 \pm 9.57	43.30 \pm 3.38 ** \blacktriangle	1929.91 \pm 74.18	14.86 \pm 1.88
5d 0 r/min	102.25 \pm 10.09	33.57 \pm 7.48	471.94 \pm 25.68	34.13 \pm 7.89
5d 200 r/min	127.11 \pm 4.63 **	46.24 \pm 2.53 *	549.46 \pm 36.35 *	124.28 \pm 17.77 **
5d 500 r/min	284.37 \pm 10.69 ** $\blacktriangle\blacktriangle$	115.19 \pm 6.19 ** $\blacktriangle\blacktriangle$	1005.17 \pm 75.74 ** $\blacktriangle\blacktriangle$	24.19 \pm 2.69

注:与同 d0 r/min 组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;与同 d200 r/min 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

3 讨论

3.1 离心加压法的可行性探讨

由于力学因素与骨相关性疾病关系密切,各种骨细胞体外加压研究也蓬勃发展,尤其是骨细胞支架在组织工程中的应用。为了研究增加的负荷对细

胞生长的影响,人们设计了许多装置以尽量模拟体内细胞所受的生物力。本实验在综合多种加压方式后,为更好模拟体内因受重力而增加的压力负荷,尝试了离心加压,现就各种压力负荷的优缺点,分析如表 3 所示。

表3 细胞加压方式比较表

Tab.3 Comparison of different cell pressure methods

加压方式	细胞受压情况	可否变频	压力调节情况	装置和操作	成本	弊端
机械压	直接	可	可调节	特制装置,接触面需消毒	高	对装置要求高,无法达到5% CO ₂ 气体浓度
流体静水压	直接	可	难调节	特制装置,内部液体和接触面需消毒	高	对装置要求高,无法达到5% CO ₂ 气体浓度。液体消毒要求高
气压	间接	否	难调节	特制装置	较低	要达到5% CO ₂ 浓度,则混合气体(包括氧气、氮气、氦气)分压改变,其对细胞的影响无法排除
离心加压	间接	否	可调节	低速离心机	低	简易装置无法达到37 °C,5% CO ₂

从表3可以看出,离心加压的优势在于:操作简便,压力可调,成本低,不需要特制装置。其弊端在于:目前无法调节频率,无法达到37 °C,5% CO₂ 浓度,只能同步设对照组,平衡该因素。

3.2 三维培养的必要性

给细胞施加静压力是基于这样一种理论:即细胞骨架成分,特别是一些局部黏附分子对机械传导和流体剪切力的传导起着非常重要的作用。对悬浮细胞而言,静压力通常很少对细胞产生牵张,但对单层培养的细胞来讲^[8],细胞借助局部的黏附分子贴附于培养基底(培养皿、包被的表面等),静压力引起细胞的“运动”可在细胞与基底交界处产生剪切力。

但较多文献研究压力对细胞影响时都选择三维培养,并发现三维培养细胞对压力的反应性大大强于二维培养^[9]。本实验的研究也进行了二维培养的预实验,其结果证实了文献的报道。

骨细胞三维培养较多用于组织工程,支架应用较多。其他还有如离心管聚集体培养^[10]和琼脂糖凝胶^[11]。本次实验选择琼脂糖凝胶法,根据国内的报道实验发现,细胞是无法贴到凝固的琼脂糖表面的。因此,经过多次摸索,具体方法参考了文献^[12]的报道。

3.3 检测指标的目与意义

I型胶原 Col I 由成熟成骨细胞分泌^[13],压力会促使成骨细胞分泌该支撑型胶原^[14]。因此,本实验分别用免疫荧光法和 real time RT-PCR 检测了前成骨细胞 Col I 蛋白分泌和基因表达情况。

碱性磷酸酶(ALP)由成熟成骨细胞分泌,是骨的矿化过程中一种重要的酶^[13]。ALP 活性是骨形成早期阶段的重要标志,对机械刺激下的骨形成敏

感度一般^[15]。

骨钙素(OC)是一种丰富的骨细胞外基质蛋白,是成熟成骨细胞的特异性标志,也是前成骨细胞向成骨细胞分化的重要的分子标志^[13,16]。

Runx2,又称 Cbfa1,是成骨系特异性核转录因子^[17]。多种骨形成标记物如 ColII、ALP、骨桥蛋白等的启动子都存在 Runx2 的结合位点。前成骨细胞向成熟成骨细胞分化均需要 Runx2 的转录激活^[18]。

文献报道,在诱导剂的作用下,受压会加速骨髓间充质细胞向成骨细胞转化,参与的因子包括 TGF-β1、Runx2 和 Col I^[3]。OCT-1 是前成骨细胞,处于骨髓间充质细胞向成骨细胞转化的一个阶段^[19],因此,本实验也观察了成骨相关基因 ALP、Col I、OC 和 Runx2、TGF-β1 由于溶解曲线不好,故未用该数据。

3.4 离心加压法对前成骨细胞株 OCT-1 的影响

实验观察到,离心加压1 d,细胞即可出现改变,最突出的变化是细胞外基质蛋白 Col I,这与文献报道的压力主要可以促使细胞外基质蛋白分泌增加,以保持细胞骨架,适应压力的改变^[20-21]相符,其作用机制可能是通过自分泌或旁分泌途径^[22]。且 Col I 转录水平随转速的增加而增加。而免疫荧光实验结果显示 200 r/min 压力组对增强 Col I 蛋白水平反而稍强于 500 r/min 压力组,这可能与短时高速(500 r/min)加压作用到转录水平,但该转速下细胞翻译能力受到延缓或抑制的缘故。而其他成骨相关基因如 ALP、OC 和 Runx2 都对 200 r/min 低转速更敏感,出现显著性上调,对高转速 500 r/min 反应不明显。在形态学上,离心加压呈现细胞增殖、ALP 增多趋势,后者则是反映钙离子转运和释放的

指标。综合而言,短期离心加压,小剂量压力作用更显著。文献也有报道,对细胞增殖的促进作用是低频率,小剂量压力作用下最显著^[23-24]。这也为细胞离心加压模型的成功建立提出佐证。

离心加压5 d,细胞成骨相关基因 ALP 和 OC 显著上调,且随转速的增加而增加。并且,这两种基因的变化趋势基本一致,提示 ALP 与 OC 间存在上下游的相关性^[25]。此外,Col1 α 2 mRNA 表达在 500 r/min 压力组发生显著上调,而 Runx2 mRNA 表达则在 200 r/min 压力组显著上调。Runx2 转录水平变化趋势与其他 3 组基因不同,提示 Runx2 可能不是上述 3 组成骨相关蛋白的核转录因子。形态学上,200 r/min 压力组细胞增殖最明显,Col I 免疫荧光显色也显示该转速下细胞浓集最明显,阳性显色也最强,而 ALP 阳性计数以 500 r/min 压力组最多,但强度不及 200 r/min 压力组。说明长期离心加压,小剂量压力(5d 200 r/min 压力)对前成骨细胞增殖、浓集和分化作用优于长期大剂量离心(5d 500 r/min 压力);后者在促成骨相关基因表达方面效应显著,但蛋白翻译水平可能受抑制或延迟。

小剂量压力(200 r/min 压力)对于 Col1 α 2 基因的调节主要体现在早期,对于其他成骨相关基因 ALP、OC 和 Runx2 基因的调节在早、晚期均呈上调作用,且上调幅度没有明显改变,以 Runx2 上调幅度最大,这可能与离心时间的选择有关,1 d 和 5 d 对细胞而言均还处于“早期”阶段,尚未进入体内实验所观察到的晚期变化。但 Col1 α 2 基因的变化也提示了细胞在胶原分泌方面出现“适应”反应。大剂量压力(500 r/min 压力)对于 Col1 α 2 基因的调节在早、晚期均发挥作用,且晚期上调幅度大于早期;而对 ALP 和 OC 基因的调节主要体现在晚期,可能细胞对大剂量压力的反应首先体现在细胞基质方面,通过分泌大量支撑性胶原以加固细胞骨架,而晚期才开始动员钙离子运输的相关蛋白的表达。综上所述,大小剂量压力作用于细胞,细胞首先出现支撑性胶原增加的表现;小剂量压力在早期就开始动员钙离子运输的相关蛋白的表达,而大剂量压力到晚期才有此作用。

此外,由于离心加压实验温度都只有 26 $^{\circ}$ C,即使对照组平衡了该因素,但仍可能会对实验结果造成影响。

4 结论

离心是一种可行的细胞加压法。该方法优势在于:操作简便,压力可调,成本低,不需要特制装置。其弊端在于:目前无法调节频率,无法达到 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 浓度,只能同步设对照组,平衡该因素。离心加压法对前成骨细胞 OCT-1 成骨分化有一定促进作用。大小剂量压力作用于细胞,细胞首先出现支撑性胶原增加的表现;小剂量压力在早期就开始动员钙离子运输的相关蛋白的表达,而大剂量压力到晚期才有此作用。

参考文献:

- [1] Pufe T, Lemke A, Kurz B, *et al.* Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(1): 185-192.
- [2] Hutton WC, Elmer WA, Bryce LM, *et al.* Do the intervertebral disc cells respond to different levels of hydrostatic pressure? [J]. *Clin Biomech*, 2001, 16(9): 728-734.
- [3] Wagner DR, Lindsey DP, Li KW, *et al.* Hydrostatic pressure enhances chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells in osteochondrogenic medium [J]. *Ann Biomed Eng*, 2008, 36(5): 813-820.
- [4] 彭磊,胡蕴玉,徐华祥,等. 间歇性压力培养环境对兔骨髓基质干细胞增殖的影响[J]. *中国骨伤*, 2007, 20(2): 92-93.
- [5] Tang DZ, Cheng SD, Shi Q. Different doses of osthole regulate expression of genes associated with preosteoblast [C]//6th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies. Hawaii;2007.
- [6] 王国辉,陈维毅,谢永芳. 力学刺激对巩膜成纤维细胞增殖活性及结缔组织生长因子表达的影响[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(3): 186-189.
- [7] 王汉琴,白玲,王燕华,等. 切应力对与内皮细胞联合培养的血管平滑肌细胞粘附的影响及其机制[J]. *医用生物力学*, 2007, 22(1): 4-7.
- [8] Mitsui N, Suzuki N, Maeno M, *et al.* Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone morphogenetic proteins production and decreasing their antagonists production by Saos-2 cells [J]. *Life Sci*, 2006, 78(23): 2697-2706.
- [9] Tanaka SM, Sun HB, Roeder RK, *et al.* Osteoblast responses one hour after load-induced fluid flow in a three-dimensional porous matrix [J]. *Calcif Tissue Int*, 2005, 76(4): 261-271.
- [10] 何清义,李起鸿,许建中,等. 转化人关节软骨细胞的 II 型胶

- 原表型诱导[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(5): 524-526.
- [11] Walker J, Martin C, Callaghan R. Inhibition of P-glycoprotein function by XR9576 in a solid tumour model can restore anticancer drug efficacy [J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(4): 594-605.
- [12] Mouw JK, Connelly JT, Wilson CG, *et al.* Dynamic compression regulates the expression and synthesis of chondrocyte-specific matrix molecules in bone marrow stromal cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(3): 655-663.
- [13] Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006, 8: 455-498.
- [14] Nagatomi J, Arulanandam BP, Metzger DW, *et al.* Cyclic pressure affects osteoblast functions pertinent to osteogenesis [J]. *Ann Biomed Eng*, 2003, 31(8): 917-923.
- [15] Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation [J]. *Iowa Orthop J*, 1995, 15: 118-140.
- [16] Candelieri GA, Liu F, Aubin JE. Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires [J]. *Bone*, 2001, 28(4): 351-361.
- [17] Komori T, Yagi H, Nomura S, *et al.* Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts [J]. *Cell*, 1997, 89(5): 755-764.
- [18] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, *et al.* *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation [J]. *Cell*, 1997, 89(5): 747-754.
- [19] Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress [J]. *Matrix Biol*, 1999, 18(5): 417-426.
- [20] Takahashi I, Nuckolls GH, Takahashi K, *et al.* Compressive force promotes Sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1 expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells [J]. *J Cell Sci*, 1998, 111(Pt14): 2067-2076.
- [21] 于胜吉, 邱硅兴. 周期性压力下椎间盘细胞中肌动蛋白的变化及其意义[J]. *中华骨科杂志*, 2005, 25(9): 560-564.
- [22] Furukawa K. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: molecular basis of ectopic bone formation induced by mechanical stress [J]. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100(3): 201-204.
- [23] 彭磊, 胡蕴玉, 徐华梓, 等. 间歇性压力培养环境对兔骨髓基质干细胞增殖的影响[J]. *中国骨伤*, 2007, 20(2): 92-93.
- [24] 张广程, 范卫民, 马益民, 等. 不同频率周期性压力对组织工程软骨的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(6): 677-678.
- [25] Patel MJ, Chang KH, Sykes MC, *et al.* Low magnitude and high frequency mechanical loading prevents decreased bone formation responses of 2T3 preosteoblasts [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 106(2): 306-316.