

成骨细胞力致钙响应和钙传递的研究进展

霍波¹, 康英永¹, 胡漫¹, 李平^{1,2}

(1. 中国科学院力学研究所 微重力重点实验室 生物力学和生物工程中心,北京 100190;

2. 中国医学科学院 北京协和医院,北京 100730)

摘要: 钙是骨系细胞内和细胞间的重要信号分子,同时也是细胞外矿物基质的主要组成部分。尽管 100 多年的科学实践已经证明力学刺激可以影响骨系细胞内的分子信号转导、细胞间的通讯和协同作用以及组织水平的骨矿化和骨吸收,但为了阐明力致骨重建的机制,仍需在力致钙响应和钙传递方面进行更加深入的研究。本文总结了近年来在成骨细胞的力致钙响应和钙传递方面的研究进展,包括:(1)研究细胞力致钙响应和传递的主要实验手段;(2)成骨细胞感受力学刺激并发生钙响应的钙来源和机制;(3)细胞间钙传递的路径;(4)成骨细胞内力致钙响应和细胞间钙传递的特征参数。最后对该领域未来可能的研究方向进行了展望。

关键词: 成骨细胞; 钙响应; 钙传递; 力学刺激; 信号转导

中图分类号: R 3 **文献标志码:** A

Advances of mechanical stimulation-induced calcium response and transfer in osteoblasts

HUO Bo¹, KANG Ying-yong¹, HU Man¹, LI Ping^{1,2} (1. Center for Biomechanics and Bioengineering, Key Laboratory of Microgravity, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 2. Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

Abstract: Calcium is not only the important signaling molecule within and between bone cells, but also the primary component of extracellular matrix in bone. It has been demonstrated during the past over 100 years that mechanical stimulations can regulate the molecular signal transduction and intercellular communication in bone cells as well as the bone mineralization and resorption at tissue level, but further more researches are still needed to give insight into the mechanism of mechanical stimulation-induced bone remodeling. This paper will summarize the related works on the following aspects: (1) the primary experimental approaches for studying mechanical stimulation-induced calcium response and transfer in osteoblasts, (2) the calcium sources and mechanism of calcium response in osteoblasts, (3) the intercellular calcium transfer pathways and (4) characteristic parameters of calcium response and transfer in osteoblasts. Finally, several potential research directions in this field are presented in the paper.

Key words: Osteoblasts; Calcium response; Calcium transfer; Mechanical stimulation; Signal transduction

尽管人们很早就已经认识到骨骼可以改变其结构以获得适应其周围力学环境的功能^[1],但机械力是如何转化为化学信号进而调控其生物学行为的仍

是尚未完全阐明的问题。成骨细胞位于骨小梁的表面,细胞间距离约为 1 μm ,并通过间隙连接形成细胞网络。力学刺激可以调控成骨细胞的基质分泌行

为,从而影响骨的矿化过程^[2]。受到力学刺激后,在较短时间尺度(10 s ~ 1 min)内,成骨细胞内钙离子浓度的迅速升高是最早发生的生物学响应之一,这种现象通常称为力致钙响应^[3]。成骨细胞力致钙响应的关键作用体现在较长时间尺度(10 d 至数月)时,是指矿化过程中的钙沉积现象,即在胶原纤维上形成羟基磷酸钙结晶。钙响应信号不但可以调控成骨细胞的增殖与分化^[4],其在相邻细胞间的传递也是细胞间通讯和细胞群体行为的重要调控机制之一^[5]。因此,除了可以沉积为矿化的骨基质外,钙离子也常被看作是成骨细胞寿命期内的必要的信号分子。尽管目前已经积累了一些研究成果,但在如何将短期、长期两个时间尺度同细胞、组织两个空间尺度的现象加以关联以及各自的调控机制方面仍存在很多待研究的课题。例如,在细胞水平的力致钙响应与传递过程的机理研究方面,我们也还不知道这样一些问题的答案:成骨细胞是如何感受力学刺激并引起钙响应的?力学刺激引起的胞浆内迅速增加的钙离子主要来源于何处?钙响应是如何在细胞间传递的?成骨细胞网络内钙响应和传递的定量规律是什么?本文将针对上述问题,综述近年来在成骨细胞力致钙响应和钙传递方面的相关研究结果,并提出近期该领域内可能的热点研究方向。

1 加载方式和钙响应测量方法

骨内包含 3 类不同尺度的孔隙结构,包括尺度在 10 ~ 100 μm 左右的血管和神经所占据的哈弗氏系统、直径约为 10 μm 的骨细胞及其间隙连接所占据的骨陷窝-骨小管系统以及大小约为 20 ~ 60 nm 的胶原纤维和羟基磷灰石之间的孔隙。需要指出的是,以上 3 种孔隙结构内都充满了液体。当我们的身体进行运动时,来自肌肉的收缩力以及重力会使骨发生变形,传递到骨内的细胞主要有以下一些力学刺激形式:骨基质的变形会对附着于其上的细胞产生拉力或压力;外力作用下细胞所处孔隙的体积会发生动态变化,从而造成其中的液体流动,并进而在细胞表面产生压力或剪切力。

骨系细胞所受的力学刺激可引起细胞内的钙响应,并且可在相邻的骨系细胞间传递,后者通常称为细胞间钙波^[6-8]。人们已经可以利用柔性基底膜实现对贴壁细胞的基底牵拉力学刺激的模拟^[9],但因

为动态加载时无法稳定聚焦,所以还没有行之有效的技术在模拟细胞基底变形的同时观察细胞内钙离子浓度的动态变化。施加单细胞压力有较好的办法(见图 1),如一些学者^[10-11]使用玻璃微管对单个骨细胞施加压力刺激并研究胞内钙响应。但使用玻璃微管的一个主要问题是难以准确控制所施加力的大小和频率,因而难以定量比较不同批次的实验结果。因此近年来人们采用原子力探针针对单个细胞施加压力以研究力致钙响应^[8, 12-13]。当改变单细胞压力的大小时,发现产生钙响应细胞的百分比也发生变化,在 1 Hz 频率下,可由 30 nN 时的 18% 增加到 90 nN 的约 50%^[12]。除了微管和原子力探针可以施加单细胞压力,人们也利用平板流动腔对铺展于基底上的所有细胞施加流体剪切力(见图 1)并观测钙响应^[14]。目前剪切流动的加载形式主要有两种:平稳流和振荡流。已经有大量关于两类剪切流动形式作用下的成骨细胞钙响应的相关研究^[15]。

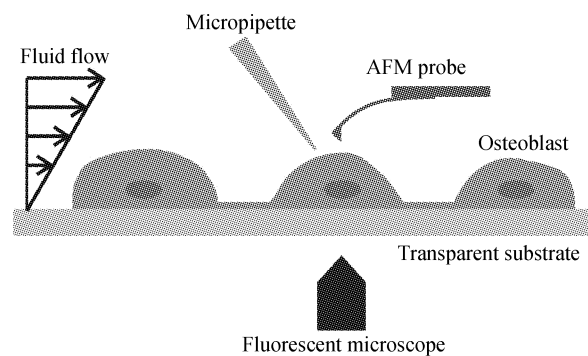


图 1 细胞中力致钙响应和钙传递的力学加载(微管、原子力探针、流动腔)和荧光观测示意图

Fig. 1 Schematic of mechanical stimulations (micropipette, AFM probe and flow chamber) and fluorescent observation for studying calcium response and transfer in bone cells

力学刺激引起的成骨细胞胞浆内的钙响应可以利用荧光显微镜及 CCD 相机观察和记录。目前通常使用的荧光染料是 fura-2/AM、Fluo-3 AM、Fluo-4 AM。使用 Fura-2/AM 时需要双波长(340 和 380 nm)的激发光,并分别利用 KCl 和 EGTA 刺激细胞得到荧光光强比值的最大值和最小值,进而可以直接得到胞浆内钙离子浓度的绝对值。这种方法的缺点是对装置要求较高,且操作较为繁琐,因此当不需要知

道钙离子的绝对浓度时,可以选用 Fluo-3 AM 或 Fluo-4 AM 来得到胞浆内钙离子浓度的相对变化量。Fluo-4 AM 是 Fluo-3 AM 的换代产品,其产生的荧光强度远远高于后者。

2 成骨细胞力致钙响应的机制和钙来源

细胞对外力刺激的直接物理响应包括以下几种:(1)细胞膜变形;(2)细胞骨架变形;(3)细胞质内物质运输改变。其中后两种变化与钙响应的关系的研究很少,目前研究较多的是细胞膜变形所致的钙响应。成骨细胞膜上存在着所谓“牵拉激活离子通道”(stretch-activated ion channel)或力学敏感性钙离子通道(mechanosensitive calcium channel, MSCC)(见图2)。已经证明了长期、间歇性的机械应变可增加通道的开放概率^[16-17],因而此类离子通道可以调控成骨细胞这种力学刺激敏感性细胞的许多功能。有研究表明^[18],流体剪切力引起的成骨细胞内钙离子浓度的升高可能部分(约30%)来自于经由 MSCC 通道的钙内流,但与 L 型电压敏感性钙离子通道(L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channel, L-VSCC)无关,这说明 MSCC 通道只是感受力学刺激的一个途径,可能还有其他感受途径,如细胞骨架。也有研究证明,阻断经由 L-VSCC 通道的钙内流抑

制了流体剪切引起的三磷酸腺苷(ATP)释放^[19],提示 L-VSCC 通道可能也是感受力学刺激的直接受体。需要指出的是,有研究表明成骨细胞上 MSCC 通道的激活部分依赖于 L-VSCC 通道的 α_{1C} 亚基的表达和功能^[17]。

胞浆中钙离子浓度升高的主要来源之一是胞外钙通过膜上离子通道进入胞浆。已经有工作证明^[14, 20]胞外钙可能是成骨细胞中力致钙响应的触发生源,没有胞外钙的进入,胞内钙池的钙也不能释放进入胞浆;更有研究表明胞外钙内流是 ATP 释放的必要条件^[19],进而可以影响细胞间的钙传递。如果阻断 MSCC 通道,就再不能观察到 ATP 所导致的 ERK/MAPK 通路的激活^[21]。因此, P2Y 的激活需要经由 MSCC 通道的钙内流,相关分子机制仍有待加以阐明(见图2)。当阻断 ROS 成骨细胞 L-VSCC 通道时细胞间力致钙传递不再发生,但受力刺激的细胞内仍可观察到钙离子浓度的升高^[22]。新霉素(neomycin)可以阻断磷脂酶 C(PLC)对 PIP_2 的水解生成肌醇三磷酸(inositol trisphosphate, IP_3)和甘油二酯(diacylglycerol, DG),研究发现使用新霉素时流体刺激引起的钙响应完全消失,说明经由离子通道的钙内流可能并未直接进入胞浆中,而仍需 IP_3 的调控释放进入胞浆^[18],但具体的机制仍有待进一步研究。

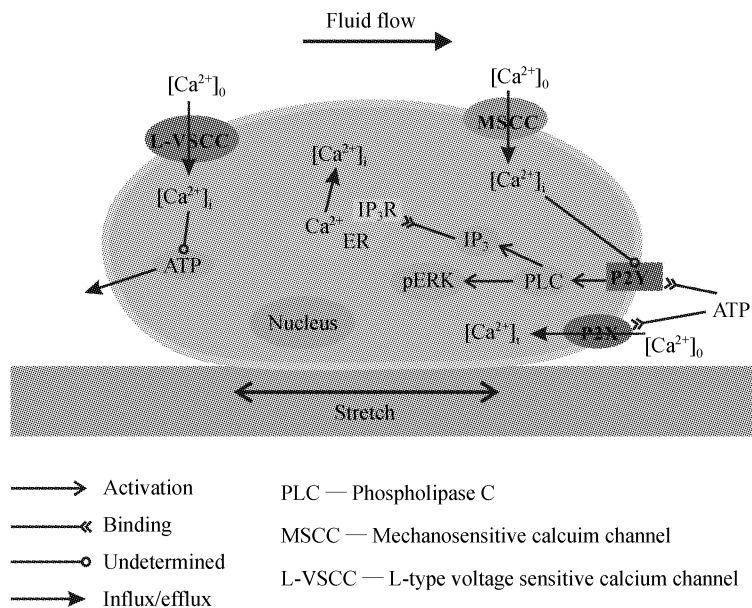


图2 骨内细胞中力致钙响应的信号转导示意图

Fig.2 Schematic showing signaling pathways of mechanically stimulated calcium response in osteoblasts

胞浆内钙离子浓度升高的另一来源是胞内钙池,在成骨细胞内主要指内质网(endoplasmic reticulum, ER)。当利用毒胡萝卜素(thapsigargin)提前耗尽 ER 中的钙时,细胞间力致钙传递不再发生,说明胞内钙池调控钙传递^[12]。当骨系细胞受到流体剪切力等力学刺激后,胞内的 ATP 会经由激活的间隙连接半通道(主要由连接蛋白 Cx43 组成)流出到胞外溶液中^[19, 23]。胞外的 ATP 会与细胞膜上的 P2 能受体结合^[20],进而激活 G 蛋白耦联受体以及 PLC,产生 IP₃, IP₃ 与 ER 上的相应受体结合促使钙离子释放进入胞浆中。当胞浆中钙离子浓度升高到一定程度后,钙离子将回到胞内钙池中直到下一次钙释放。因此,即使细胞间存在有功能的间隙连接以及胞外的 ATP 通路,当胞内钙池排空后,力学刺激只能引起胞外钙内流所导致的第 1 个钙响应峰,而不会出现 2 个以上的多峰。

与肌细胞等兴奋性细胞类似,在成骨细胞这种非兴奋性细胞中也可观察到胞内钙池与膜上钙离子通道之间的耦合作用。当阻断 MSCC 通道后,成骨细胞内的钙响应显著减弱^[24];而当耗尽胞内钙池中的钙后,可以引起膜上电压依赖型钙离子通道的打开,从而使胞外钙离子注入胞内^[25]。前者通常称为“钙致钙释放”(calcium-induced calcium release, CICR),而后者通常称为“容积性钙注入”(capacitative calcium entry, CCE)或“钙池排空致钙内流”(store-operated calcium entry, SOCE)。

3 细胞间钙传递路径

钙信号传导在骨系细胞行使其功能(如增殖与分化等)和骨代谢过程中异常重要,因而研究细胞间钙波的产生和传递的机制对理解不同物理条件下细胞的生物学功能非常必要。许多学者已经观察到力学刺激所导致的成骨细胞间的钙传递^[8, 26-27]。人们通常认为 IP₃ 通过间隙连接孔隙内扩散至相邻细胞,并触发可感受 IP₃ 的钙池,从而导致所谓细胞间钙传递现象^[28]。间隙连接是细胞间的连接通道,由 2 个相邻细胞膜上的连接蛋白半通道对接形成,中心的孔道可直接连通相邻细胞的胞质,该孔道允许小于约 1 kD 的小分子在细胞间快速(毫秒量级)传递^[29]。目前普遍认为间隙连接是构成骨系细胞网络的主要物理介质。

但越来越多的证据表明,间隙连接并非是细胞间钙传递的主要通路。相关研究表明,当利用 18 α -GA 阻断间隙连接后,发现并不能减弱流体剪切力^[14]或单细胞压力^[12-13]等力学刺激作用下引起的成骨细胞 MC3T3-E1 间的钙传递现象,说明力致胞间钙传递主要是由 ATP 通路而非间隙连接介导的。主要原因是经由高敏感性 P2Y 受体/IP₃ 信号路径的细胞间钙传递可能比间隙连接路径的速度更快^[30]。当对成骨细胞 MC3T3-E1 施加 12 dyne/cm² 的流体剪切力刺激时,可以观察到 ATP 由胞内释放进入胞外溶液中,并在约 1 min 后达到峰值,力致 ATP 释放需要胞外钙内流,但其分子机制仍有待研究^[19]。当应用无钙的培养基时,无论是单细胞压缩^[12-13]或流体剪切^[14],都不能观察到使用正常培养基时力学刺激所引起的钙响应,此结果说明力致钙响应或细胞间钙传递都需要胞外钙的内流以及 ATP 释放。利用 apyrase 水解成骨细胞 MC3T3-E1 胞外溶液中的 ATP 或利用 18 α -GA 阻断间隙连接都不能完全消除细胞间钙传递,但同时阻断胞外 ATP 和间隙连接时则没有胞间钙传递发生,说明两种细胞间钙传递同时存在^[12]。但由于 ATP 传递途径发生快速且敏感,对成骨细胞细胞间钙传递的影响应占主导地位。这一结论的佐证是表达连接蛋白 Cx43 且没有 ATP 能受体 P_{2U} 的成骨细胞 ROS 17/2.8 间的细胞间钙传递较慢,而表达另一连接蛋白 Cx45 且表达 P_{2U} 的成骨细胞 UMR106-01 间钙传递较快^[26]。

4 成骨细胞内钙响应和传递的特征参数

大量研究表明力学刺激精确控制着钙信号传导的时间和空间特性^[15]。一个有趣的例子是,当应用稳定流刺激成骨细胞时,可以观察到胞外钙内流导致的胞内钙释放,但使用振荡流时则观察不到此现象,说明细胞可以精确感知力学刺激随时间变化的模式^[15]。因此,为了定量研究成骨细胞间距离、铺展形状等几何参数对其钙响应与传递规律的影响,人们利用基于分子自组装单层技术的微模式化方法,建立了具有可控几何分布和功能性间隙连接的成骨细胞网络^[8]。对此种成骨细胞网络施加流体剪切力后的 9 min 之内,大概有 50% 的细胞能够产生 3 个以上的钙响应峰^[14](见图 3(a))。单细胞钙响应曲线的特点是在施加剪切力后约 40 s 后首先

出现一个幅值较高(平均相对比值约为1.6)的峰,然后出现多个幅值较低的响应峰^[14, 31],各响应峰出现的间隔时间约为100 s。当胞内钙池中的钙离子被耗尽后,钙响应峰的数目减少到1个左右,说明ER负责上述第2个以后的低幅值的钙响应峰;而且与有胞内的情况相比钙响应峰的幅值改变不明显,这说明胞外钙内流是上述第1个钙响应峰的主要来源^[32];另外,无论是模式化的成骨细胞网络^[14]还是自由铺展的成骨细胞单层^[32],都有大概60%的细胞可以发生钙响应。

利用原子力探针对二维成骨细胞网络中的一个细胞施加单细胞压力^[12],受压细胞迅速发生钙响应(10 s左右)。另外,发现始于受压细胞的钙响应可以传递的距离是有限的,通常在相距200 μm 左右的细胞上将不再能观察到钙响应,且钙响应峰的幅值随距离的增加而减弱,由相对比值4(受压细胞)迅速减弱到1.5左右(相邻细胞)。利用微模式化方法建立通过间隙连接相联系的一维的成骨细胞

链,并利用原子力探针对一端的细胞施加压力后,观察到钙响应在链状细胞上的传递规律与二维成骨细胞网络相似(见图3(b)),钙传递可以到递到与受压细胞相隔约180 μm 的第3个细胞处^[13]。还发现未受压的相邻细胞中的钙响应不降低,即维持在较高的胞内钙离子浓度,相似的现象也发生于平滑肌细胞中^[33],其中约35%的平滑肌细胞在ATP刺激后约6 min内一直维持在较高的胞内钙离子浓度,但这种现象的机制仍未找到清晰的解释。流体剪切力刺激模式化的MC3T3-E1成骨细胞网络,钙传递的速度约为0.9 $\mu\text{m}/\text{s}$ ^[14]。类似地,细胞单层培养的以链状连接的ROS成骨细胞中,微管刺激下钙传递的速度约为0.6~0.8 $\mu\text{m}/\text{s}$ ^[6]。由于ATP是成骨细胞间力致钙传递的主要通路,此种传递速度可能由受力学刺激细胞分泌ATP、ATP在胞外溶液中扩散以及ATP与膜上受体结合引起相邻胞内钙响应的速度决定。

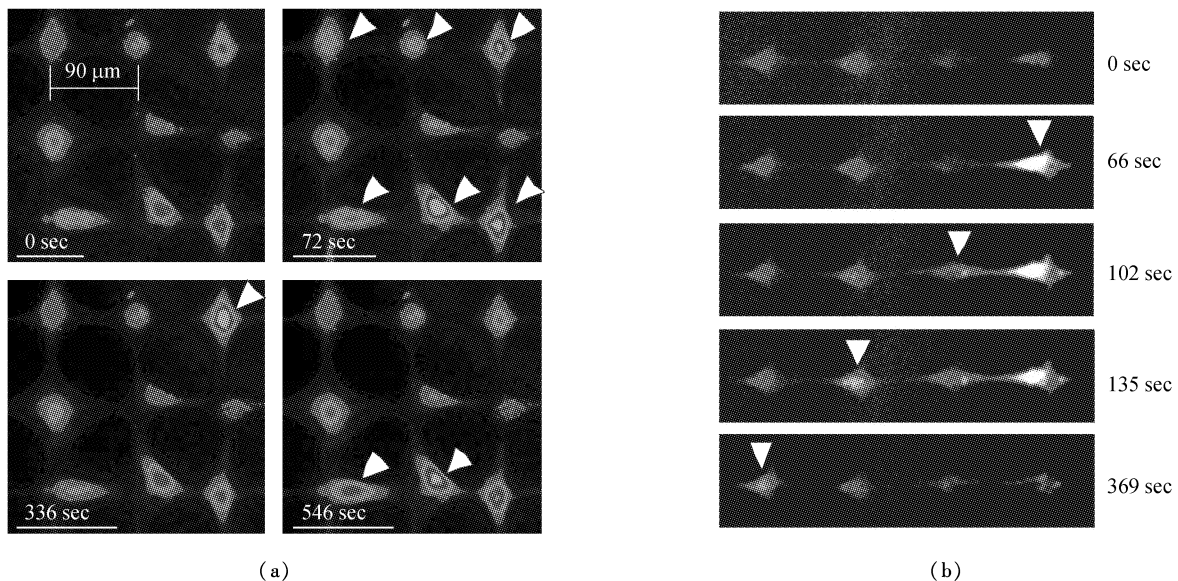


图3 力学刺激后典型的细胞内钙响应(伪彩)(a)成骨细胞网络,60 s时开始施加流体剪切^[14];(b)成骨细胞链,60 s时对右端细胞施加单细胞压力^[13](箭头所指为出现钙响应的细胞,有些细胞可以响应多次)

Fig. 3 Pseudo-color images of typical intracellular calcium responses after mechanical stimulation (a) Osteoblast network stimulated by fluid flow at 60 seconds^[14], (b) Linear osteoblast chain in which the cell at right end was stimulated by an AFM probe at 60 seconds^[13] (Arrowheads highlight those cells with calcium response and some cells could respond for multiple times)

5 展望

本文综述了成骨细胞力致钙响应和钙传递的相

关研究进展,但我们注意到仍有许多问题尚未解决。为解决这些问题,可能应该在未来5至10年开展如下相关研究。

细胞的力学感受机制仍是目前研究的关键问题。由于骨系细胞钙响应对力学刺激形式的敏感性,实验研究中应注意力学加载条件的严格控制。例如流体剪切力的方向、大小、频率应仔细设计以反映真实的生理状态。还应综合考虑基底牵拉、静水压等力学刺激对骨系细胞内钙响应与钙传递的影响。

不同骨系细胞钙响应与传递的时空特性与其特定的细胞生物学行为之间的联系具有重要的科学意义,细胞的短时钙响应与骨组织的长期重建行为之间的关联是未来迫切需要加以阐释的问题。联系时间与空间不同尺度的一个关键是发展空间分布形式可控的异种细胞共培养技术。

钙响应和钙传递信号通路的研究中化学试剂的副作用应予以重视。例如,人们通常使用 18α -GA 阻断细胞间的间隙连接,但目前尚无证据表明这种试剂不会影响 ATP 的释放及下游通路,反而有研究表明 18α -GA 亦可阻断 ATP 的释放^[34]。解决这个问题可以设法构建无直接物理连接的成骨细胞模式。

同时,在未来的研究中还应注意基底的使用。近年来已经有大量的实验结果说明基底的力学性质影响细胞的生物学行为,例如干细胞的分化^[35];不同种类的基底蛋白也会影响细胞黏附能力,进而影响细胞内信号通路,如黏附斑的激活和 PGE2 的释放^[36]。因此,需要更多的实验结果来说明基底蛋白的种类是否会影响细胞的钙响应。

致谢:感谢国家自然科学基金委面上项目(30970707)、科技部国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2009AA02Z407)的支持。

参考文献:

[1] Wolff J. Das Gesetz der Transformation der Knochen[M]. Berlin: Hirschwald, 1892.
 [2] Chan ME, Lu XL, Huo B, *et al.* A trabecular bone explant model of osteocyte-Osteoblast co-culture for bone mechanobiology [J]. Cell Mol Bioeng, 2009, 2(3): 405-415.
 [3] Hung CT, Pollack SR, Reilly TM, *et al.* Real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow [J]. Clin Orthop Relat Res, 1995, 313: 256-269.
 [4] Zayzafoon M. Calcium/calmodulin signaling controls osteo-

blast growth and differentiation [J]. J Cell Biochem, 2006, 97(1): 56-70.
 [5] Carafoli E. Calcium signaling: A tale for all seasons [J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(3): 1115-1122.
 [6] Xia SL, Ferrier J. Propagation of a calcium pulse between osteoblastic cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 186(3): 1212-1219.
 [7] Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, *et al.* Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells [J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(2): 209-217.
 [8] Guo XE, Takai E, Jiang X, *et al.* Intracellular calcium waves in bone cell networks under single cell nanoindentation [J]. Mol Cell Biomech, 2006, 3(3): 95-107.
 [9] Yu HC, Wu TC, Chen MR, *et al.* Mechanical stretching induces osteoprotegerin in differentiating C2C12 precursor cells through noncanonical Wnt pathways [J]. J Bone Miner Res, 2010, 25(5): 1128-1137.
 [10] Adachi T, Aonuma Y, Ito S, *et al.* Osteocyte calcium signaling response to bone matrix deformation [J]. J Biomech, 2009, 42(15): 2507-2512.
 [11] Henriksen Z, Hiken JF, Steinberg TH, *et al.* The predominant mechanism of intercellular calcium wave propagation changes during long-term culture of human osteoblast-like cells [J]. Cell Calcium, 2006, 39(5): 435-444.
 [12] Huo B, Lu XL, Costa KD, *et al.* An ATP-dependent mechanism mediates intercellular calcium signaling in bone cell network under single cell nanoindentation [J]. Cell Calcium, 2010, 47(3): 234-241.
 [13] Huo B, Lu XL, Guo XE. Intercellular calcium wave propagation in linear and circuit-like bone cell networks [J]. Philos Transact A Math Phys Eng Sci, 2010, 368(1912): 617-633.
 [14] Huo B, Lu XL, Hung CT, *et al.* Fluid flow induced calcium response in bone cell network [J]. Cell Mol Bioeng, 2008, 1(1): 58-66.
 [15] Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone [J]. Gene, 2006, 367, 1-16.
 [16] Kizer N, Guo XL, Hruska K. Reconstitution of stretch-activated cation channels by expression of the alpha-subunit of the epithelial sodium channel cloned from osteoblasts [J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(3): 1013-1018.
 [17] Duncan RL, Kizer N, Barry EL, *et al.* Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of a swelling-activated cation channel in osteoblast-like osteosarcoma cells [J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93(5): 1864-1869.
 [18] Hung CT, Allen FD, Pollack SR, *et al.* Intracellular Ca²⁺ stores and extracellular Ca²⁺ are required in the real-time Ca²⁺ response of bone cells experiencing fluid flow [J]. J

- Biomech, 1996, 29(11): 1411-1417.
- [19] Genetos DC, Geist DJ, Liu D, *et al.* Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(1): 41-49.
- [20] Hung CT, Allen FD, Mansfield KD, *et al.* Extracellular ATP modulates $[Ca^{2+}]_i$ in retinoic acid-treated embryonic chondrocytes [J]. *Am J Physiol*, 1997, 272 (5 Pt 1): C1611-1617.
- [21] Katz S, Boland R, Santillan G. Modulation of ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways by ATP in osteoblasts: involvement of mechanical stress-activated calcium influx, PKC and Src activation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(12): 2082-2091.
- [22] Jorgensen NR, Teilmann SC, Henriksen Z, *et al.* Activation of L-type calcium channels is required for gap junction-mediated intercellular calcium signaling in osteoblastic cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(6): 4082-4086.
- [23] Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, *et al.* Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212(1): 207-214.
- [24] Chen NX, Ryder KD, Pavalko FM, *et al.* Ca^{2+} regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 278(5): C989-97.
- [25] Labelle D, Jumarie C, Moreau R. Capacitative calcium entry and proliferation of human osteoblast-like MG-63 cells [J]. *Cell Proliferation*, 2007, 40(6): 866-84.
- [26] Jorgensen NR, Geist ST, Civitelli R, *et al.* ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells [J]. *J Cell Biol*, 1997, 139(2): 497-506.
- [27] Gomez P, Vereecke J, Himpens B. Intra- and intercellular Ca^{2+} -transient propagation in normal and high glucose solutions in ROS cells during mechanical stimulation [J]. *Cell Calcium*, 2001, 29(2): 137-148.
- [28] Jorgensen NR, Henriksen Z, Brot C, *et al.* Human osteoblastic cells propagate intercellular calcium signals by two different mechanisms [J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(6): 1024-32.
- [29] Shapiro F. Variable conformation of GAP junctions linking bone cells: a transmission electron microscopic study of linear, stacked linear, curvilinear, oval, and annular junctions [J]. *Calcif Tissue Int*, 1997, 61(4): 285-93.
- [30] Jorgensen NR. Short-range intercellular calcium signaling in bone [J]. *APMIS Suppl*, 2005, 118): 5-36.
- [31] Donahue SW, Donahue HJ, Jacobs CR. Osteoblastic cells have refractory periods for fluid-flow-induced intracellular calcium oscillations for short bouts of flow and display multiple low-magnitude oscillations during long-term flow [J]. *J Biomech*, 2003, 36(1): 35-43.
- [32] Batra NN, Li YJ, Yellowley CE, *et al.* Effects of short-term recovery periods on fluid-induced signaling in osteoblastic cells [J]. *J Biomech*, 2005, 38(9): 1909-1917.
- [33] Fanchaouy M, Serir K, Meister JJ, *et al.* Intercellular communication: Role of gap junctions in establishing the pattern of ATP-elicited Ca^{2+} oscillations and Ca^{2+} -dependent currents in freshly isolated aortic smooth muscle cells [J]. *Cell Calcium*, 2005, 37(1): 25-34.
- [34] Riddle RC, Taylor AF, Rogers JR, *et al.* ATP release mediates fluid flow-induced proliferation of human bone marrow stromal cells [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(4): 589-600.
- [35] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 677-689.
- [36] Takai E, Landesberg R, Katz RW, *et al.* Substrate modulation of osteoblast adhesion strength, focal adhesion kinase activation, and responsiveness to mechanical stimuli [J]. *Mol Cell Biomech*, 2006, 3(1): 1-12.