

文章编号:1004-7220(2012)06-0692-06

周期性机械拉伸对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖的影响

张非飞^{a,b}, 颜艳^{a,b}, 吕永钢^{a,b}, 钟莉^{a,b}, 宋关斌^{a,b}, Mohanad Khalid Ahmed^{a,b}, 杨力^{a,b}

(重庆大学 a. “生物流变科学与技术”教育部重点实验室, 生物工程学院; b. 生物工程学院国家“111 计划”基地, 重庆 400044)

摘要: **目的** 探讨周期性机械拉伸对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞(RA-FLSs)增殖能力的影响。**方法** 实验组细胞在周期性机械拉伸频率为 1.0 Hz、拉伸幅度为 3%、6% 和 9% 的条件下, 分别对 RA-FLSs 加载 2、6 和 12 h。对照组细胞在保持与实验组培养条件一致的情况下不进行拉伸刺激。机械拉伸后, 用流式细胞术和 MTS 检测细胞的增殖和活性。RT-PCR 检测加载后细胞周期调控因子(CyclinD1、CyclinE1、CDK2、P27)在基因水平上的表达变化。**结果** 6% 和 9% 的拉伸刺激持续作用 6、12 h 使 RA-FLSs 增殖和活性显著降低($P < 0.05$), 同时 CDK2 和 CyclinE1 的 mRNA 表达降低, P27 mRNA 的表达增高($P < 0.05$), 周期性机械拉伸对 CyclinD1 表达的影响相对较小。**结论** 周期性机械拉伸对 RA-FLSs 增殖能力的影响与拉伸强度以及持续的时间有关, 6% 和 9% 的机械拉伸刺激可以抑制 RA-FLSs 的增殖, 而这种增殖抑制作用可能是通过调控 CyclinE1、CDK2 和 P27 的表达来实现的。本研究对于探讨力学刺激在类风湿性关节炎的发病机制以及临床防治中的作用具有一定意义。

关键词: 机械拉伸; 滑膜细胞; 细胞增殖; 细胞表达; 类风湿性关节炎

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

Effects from cyclic mechanical stretch on proliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes

ZHANG Fei-fei^{a,b}, YAN Yan^{a,b}, LÜ Yong-gang^{a,b}, ZHONG Li^{a,b}, SONG Guan-bin^{a,b}, Mohanad Khalid Ahmed^{a,b}, YANG Li^{a,b} (a. Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, Bioengineering College; b. “111” Project Laboratory of Biomechanics and Tissue Repair, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: Objective To investigate the effects from cyclic mechanical stretch on proliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (RA-FLSs). **Methods** In the experimental groups, cyclic mechanical stretch, with frequency of 1.0 Hz and magnitude of 3%, 6% and 9%, respectively, was applied to RA-FLSs for 2 h, 6 h, and 12 h. The control group remained in the same culture condition as the experimental groups, but without any mechanical stretch. After mechanical loading, the cell viability was analyzed by MTS, and its proliferation was assayed by flow cytometry. RT-PCR was used to measure the gene expression of the cell cycle regulatory factors, including CDK2, cyclinD1, cyclinE1, and P27. **Results** Cyclic mechanical stretch with magnitude of 6% and 9% for 6 h or 12 h significantly decreased the cell proliferation and viability in RA-FLSs ($P < 0.05$). Meanwhile, both CDK2 and cyclinE1 gene expressions were significantly decreased, but P27 gene expression was increased ($P < 0.05$). The cyclic mechanical stretch had relatively small influence on expression of cyclinD1 ($P > 0.05$). **Conclusions** The effects from cyclic mechanical stretch on proliferation of RA-FLSs depend on the stretch magnitude

收稿日期:2012-01-12; 修回日期:2012-04-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(11032012, 30870608), 重庆市科委科技攻关重大项目资助(2009AA5045), 新世纪优秀人才支持计划资助(NCET-10-0879)。

通讯作者:杨力, 教授, E-mail: yangli@cqu.edu.cn。

and duration. Mechanical stretch with magnitude of 6% and 9% can inhibit RA-FLSs proliferation, which may be achieved by regulating the expression of Cyclin E1, CDK2 and P27. This study provides references for investigating the role of mechanical stimulation in pathogenesis of rheumatoid arthritis, as well as its prevention and treatment.

Key words: Mechanical stretch; Synoviocytes; Cell proliferation; Cell expression; Rheumatoid arthritis

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以滑膜增生性炎症为特征的慢性全身性自身免疫性疾病^[1]。关节滑膜成纤维样细胞 (fibroblast-like synovial cells, FLSs) 是 RA 滑膜中的重要细胞, 具有异常增殖的特性, 可分泌多种炎症因子和生长因子, 促进 RA 的发生和发展^[2-3]; 因此, 抑制 RA-FLSs 的增殖有望成为控制 RA 病情的一种有效途径。有关 RA 的发病机制尚未明确, 之前的研究也大都从生化反应和信号通路两方面进行探索。滑膜组织处于人体的关节腔内, 在正常生理条件下会频繁受到各种机械力刺激。目前已有许多文献报道过机械刺激对体外培养细胞增殖的影响^[4]。根据 Bohannon^[5] 和 Banes 等^[6] 的研究, 正常成年人步行的平均速率约为 1.0 Hz, 而本研究所用的加载系统 6% 的机械拉伸力相当于关节组织在生理条件下的受力程度。因此, 在 1.0 Hz 的拉伸频率下, 选择了 3%、6%、9% 3 个拉伸幅度进行梯度研究, 并采用 Flexercell-4000 细胞拉伸力学装置进行加载实验; 该系统采用动态间歇性加载, 能准确控制施加机械拉伸强度的大小和作用频率, 可以相对真实地模拟滑膜细胞的受力状态^[4]。拉伸可促进细胞增殖或凋亡^[7], 故进一步探讨不同的拉伸条件对 RA-FLSs 增殖的影响对控制 RA 病情的发展具有重要的意义。

细胞的正常生长依赖于细胞周期中各种调节因子的调控, 其中参与细胞周期调控的主要因子有: 细胞周期蛋白 (cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin dependent kinases, CDKs) 和 CDK 抑制蛋白 (cyclin dependent kinase inhibitors, CDKIs)^[8]。本文应用流式细胞术、MTS 及 RT-PCR 3 种方法检测不同条件的拉伸刺激对 RA-FLSs 的细胞周期分布、细胞活性以及相关细胞周期调控因子 mRNA 表达的影响, 以考察不同条件周期性机械拉伸对 RA-FLSs 增殖过程的影响, 以及参与该过程的主要调控因子。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM (Gibco BRL 公司, 美国); 优质胎牛血清 (天津 TBD 生物有限公司); 青霉素和链霉素 (华北制药); 胰蛋白酶 (Gibco BRL 公司, 美国); DMSO (Sigma 公司, 美国); 琼脂糖 (Takara, 日本); MTS 试剂盒 (凯基生物, 中国); RNA 提取试剂盒 (百泰克, 中国); 反转录试剂盒 (Fermentas, 加拿大); BIO-RAD 酶标仪 (Bio-Rad, 美国); CO₂ 恒温培养箱 (Bio-Rad, 美国); 凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国); Flexercell-4000 弹性基底拉伸系统 (Flexercell 公司, 美国)。

1.2 细胞分离和培养

滑膜组织由重庆医科大学附属第一医院提供, 取自 6 例进行膝关节置换或滑膜切除术的 RA 病人, 所有病例的诊断符合 1987 年美国风湿病协会修订的类风湿关节炎分类标准^[9]。行滑膜切除术时无菌获取滑膜组织, 根据文献^[10] 分离培养获得滑膜细胞, 实验用 4~8 代细胞。

1.3 周期拉伸加载实验

将 RA-FLSs 以 $(1.0 \sim 1.5) \times 10^5$ /mL 密度接种于胶原蛋白 I 表衬的 6 孔 Bio-Flex (Flexercell international, 美国) 特制弹性基底培养板中, 待细胞覆盖率达 70%~80% 时, 更换为 1% 的低血清 DMEM 培养基饥饿 12 h, 使细胞同步化于 G₀ 期, 然后换用生长培养基, 按照设计好的加载方案通过 Flexercell-4000 系统对细胞进行加载^[11]。加载程式: 1.0 Hz; 3%、6%、9% 的拉伸幅度; 持续加载 2、6、12 h, 同时以静态为对照试验。

1.4 MTS 比色分析方法测定 RA-FLSs 的细胞活性

RA-FLSs 以 1.0×10^5 /mL 的密度接种于胶原蛋白 I 表衬的 6 孔 Bio-Flex 特制培养板中, 待细胞完全贴壁之后, 更换 5% 血清 DMEM 培养基, 按照设计

好的加载方案对细胞进行加载,37 ℃、5% CO₂ 孵箱继续孵育 24 h,吸弃上清液,各孔按照 5 : 1 的比例加入 5% 血清 DMEM 培养基和 MTS 试剂,每组设 6 个平行孔,37 ℃、5% CO₂ 孵箱避光孵育 1~2 h,待培养液变成棕黄色,将培养液转入到 96 孔板中,每孔 150 μL。490 nm 波长测定各 OD 值。

1.5 流式细胞术检测细胞周期

加载后的细胞,继续培养 12 h,然后用胰酶消化细胞,收集细胞至离心管中,离心 1 500 r/min,5 min,去上清。用预冷 PBS 重悬细胞,洗涤细胞 1~2 次,离心 1 500 r/min,5 min,弃上清。加入 70% 预冷乙醇固定。30 min 后,依次进行离心、洗涤和碘化丙啶 (PI) 染色,经流式细胞仪检测和细胞周期分析软件拟合处理,分析细胞周期变化与增殖活性^[12],用增殖指数 (proliferation index, PI_{cell} 为 S + G2 期细胞百分比) 表示细胞群体的增殖速度,并与未拉伸组比较。

1.6 细胞总 RNA 的提取及 RT-PCR

加载后的细胞先用 PBS 洗 2 遍,然后每孔加入 RL 裂解液 1 mL,充分裂解之后,按照 RNA 提取试剂盒 (百泰克) 的说明书提取总 RNA,然后使用 Takara 的 AMV 反转录系统反转录,并以相应的 cDNA 为模板加入正、负引物链进行 PCR 扩增,最后在不同的反应条件下获得相应的产物,PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后利用凝胶成像系统显影拍照,CyclinD1、CyclinE1、CDK2、P27 和 GAPDH 5 种基因的扩增探针,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,序列见表 1^[10]。

表 1 扩增引物

Tab. 1 Primers for PCR

基因	引物序列
CyclinD1	上游: 5'-CGT GGC CTC TAA GAT GAA GG-3'
	下游: 5'-CTG GCA TTT TGG AGA GGA AG-3'
CyclinE1	上游: 5'-CTG GAT GTT GAC TGC CTT GA-3'
	下游: 5'-TCC CCG TCT CCC TTA TAA CC-3'
CDK2	上游: 5'-TTCTGCCATTCTCATCGG-3'
	下游: 5'-ATGGGTGTAAGTACGAACAGG-3'
P27	上游: 5'-ATG TCA A AC GTG CGA GTG TC-3'
	下游: 5'-TCT CTG CAG TGC TTC TCC AA-3'
GAPDH	上游: 5'-AAATTCATGGCCACCGTCAAGGCT-3'
	下游: 5'-CTCATGGTTCACCCCATGACGAA-3'

1.7 统计分析

实验结果以均数 ± 平均值表示,采用 Origin 7.5 统计分析软件对实验结果作单、双因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有显著性差异, $P < 0.01$ 为具有非常显著性差异。

2 结果

2.1 不同程度的机械拉伸刺激对 RA-FLSs 细胞活力的影响

分别在 3%、6%、9% 的拉伸幅度下,以 1.0 Hz 的频率对 RA-FLSs 施加 2、6、12 h 的拉伸刺激,然后用 MTS 比色法检测 RA-FLSs 的细胞活力。结果显示,3% 的机械拉伸对 RA-FLSs 细胞活力的影响与对照组相比没有显著性差异 ($P > 0.05$);而在 6% 的拉伸幅度下机械拉伸 2、6、12 h,RA-FLSs 的细胞活性显著降低,分别为 0.93 ± 0.01 、 0.94 ± 0.03 、 0.96 ± 0.01 ($P < 0.05$);9% 的机械拉伸 2、6 和 12 h 时,同样可以显著降低 RA-FLSs 的细胞活性,分别为 0.94 ± 0.03 、 0.90 ± 0.02 、 0.88 ± 0.03 ($P < 0.05$,见图 1)。

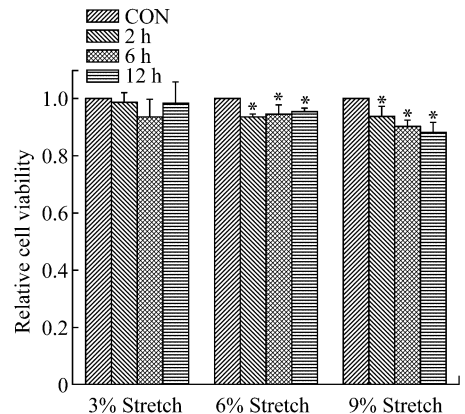


图 1 不同的机械拉伸刺激对 RA-FLSs 细胞活力的影响

(* $P < 0.05$, $n = 3$)

Fig. 1 Effects of different mechanical stretch on cell viability of RA-FLSs

2.2 不同程度的机械拉伸刺激对 RA-FLSs 细胞增殖的影响

分别在 3%、6%、9% 的拉伸幅度下,以 1.0 Hz 的频率对 RA-FLSs 施加 2、6、12 h 的拉伸刺激,然后用流式细胞术检测细胞在各个细胞周期的分布状

况,用增殖指数 (proliferation index, PI_{cell} 为 S + G2 期细胞百分比) 表示细胞群体的增殖活性和 DNA 的合成速度。结果显示,与对照组相比,3%的机械拉伸条件对 RA-FLSs 增殖的影响与对照组相比没有统计学意义 ($P > 0.05$);而 6% 的拉伸幅度持续作用 6、12 h 显著地降低了 RA-FLSs 的增殖指数,分别为 0.77 ± 0.13 ($P < 0.05$)、 0.79 ± 0.02 ($P < 0.01$); RA-FLSs 在 9% 的拉伸幅度下持续拉伸 6、12 h,其细胞增殖都呈显著性降低,其中拉伸 12 h 时,细胞增殖指数降低为 0.78 ± 0.08 ($P < 0.01$,见图 2)。

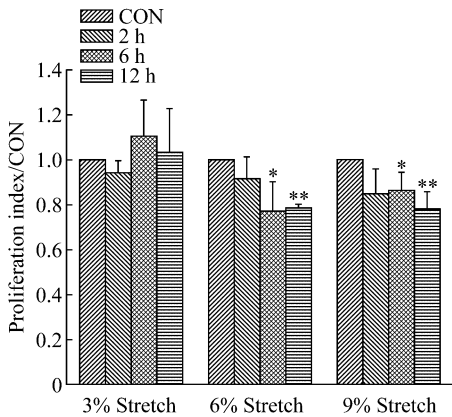


图 2 不同的机械拉伸刺激对 RA-FLSs 细胞增殖的影响
 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$)

Fig. 2 Effects of different mechanical stretch on proliferation of RA-FLSs

2.3 不同程度的机械拉伸刺激对 CyclinD1、CyclinE1、CDK2 和 P27 在 RA-FLSs 中基因表达的影响

为了进一步考察不同程度的机械拉伸对 RA-FLSs 增殖调控的作用机制,用 RT-PCR 分别检测 CyclinD1、CyclinE1、CDK2、和 P27 在 RA-FLSs 中的基因表达,并以 GAPDH 作为内参。

2.3.1 不同的机械拉伸刺激对 CyclinD1 表达的影响 用 RT-PCR 检测不同的机械拉伸对 CyclinD1 mRNA 表达的影响。统计数据表明,3% 和 6% 的机械拉伸 6 h,可以显著性降低 CyclinD1 的表达至 0.85 ± 0.004 ($P < 0.01$)、 0.99 ± 0.003 ($P < 0.05$)。而在 9% 的拉伸幅度下拉伸 2 h,其基因的表达则显著性升高为 1.04 ± 0.02 ($P < 0.05$,见图 3)。

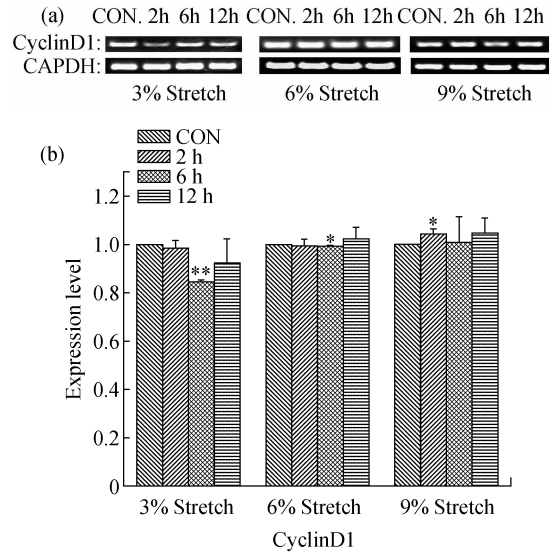


图 3 不同的机械拉伸对 RA-FLSs 中 CyclinD1 基因表达的影响
 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$) (a) 实际电泳图片, (b) 电泳条带 OD 值

Fig. 3 Effects of different mechanical stretch on mRNA expression of CyclinD1 to RA-FLSs (a) Electrophoresis results, (b) Electrophoresis band opacity density (OD)

实验组在 3%、6% 和 9% 的拉伸幅度下分别受周期性机械加载 2、6、12 h, RA-FLSs 中 CyclinD1 的表达与对照组比较

2.3.2 不同的机械拉伸刺激对 CyclinE1 表达的影响 利用 RT-PCR 检测不同的机械拉伸对 CyclinE1 mRNA 表达的影响。结果显示,在 3%、6% 和 9% 的拉伸幅度下,周期性机械拉伸持续 6 h 以上均可显著性抑制 CyclinE1 的基因表达,而且 9% 的机械拉伸 2 h,同样可以显著性降低 CyclinE1 的基因表达至 0.88 ± 0.02 ($P < 0.01$,见图 4)

2.3.3 不同的机械拉伸刺激对 CDK2 表达的影响 用 RT-PCR 检测不同的机械拉伸刺激对 CDK2 mRNA 表达的影响。结果显示,3%、6% 和 9% 的机械拉伸 2、6、12 h,基本上都可以显著地抑制 CDK2 mRNA 的表达;只有在 9% 的拉伸幅度下,机械拉伸 12 h 其抑制作用并不十分显著 ($P > 0.05$,见图 5)

2.3.4 不同的机械拉伸刺激对 P27 表达的影响 用 RT-PCR 检测机械拉伸对 P27 mRNA 表达的影响。统计数据表明,3% 的周期性机械拉伸对 P27 mRNA 的表达没有显著性影响 ($P > 0.05$);但是 6% 和 9% 的机械拉伸 2、6、12 h 均可非常显著地提高 P27 mRNA 的表达 ($P < 0.01$,见图 6)。

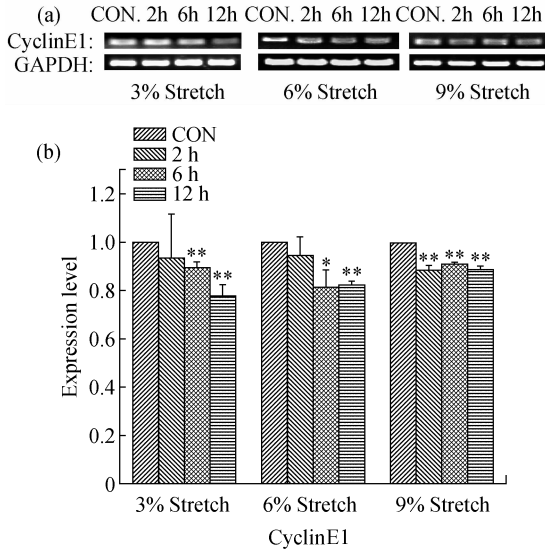


图4 不同的机械拉伸对 RA-FLSs 中 CyclinE1 基因表达的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$) (a) 实际电泳图片, (b) 电泳条带 OD 值

Fig. 4 Effects of different mechanical stretch on mRNA expression of CyclinE1 to RA-FLSs (a) Electrophoresis results, (b) Electrophoresis band opacity density (OD)

实验组在 3%、6% 和 9% 的拉伸幅度下分别受周期性机械加载 2、6、12 h, RA-FLSs 中 CyclinE1 的表达与对照组比较

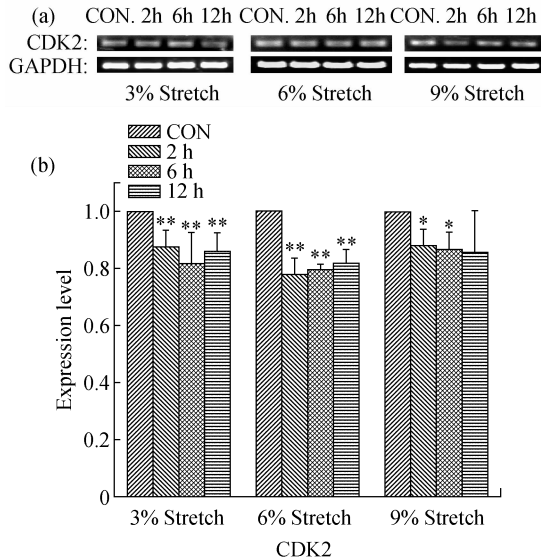


图5 不同的机械拉伸对 RA-FLSs 中 CDK2 基因表达的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$) (a) 实际电泳图片, (b) 电泳条带 OD 值

Fig. 5 Effects of different mechanical stretch on mRNA expression of CDK2 to RA-FLSs (a) Electrophoresis results, (b) Electrophoresis band opacity density (OD)

实验组在 3%、6% 和 9% 的拉伸幅度下分别受周期性机械加载 2、6、12 h, RA-FLSs 中 CDK2 的表达与对照组比较

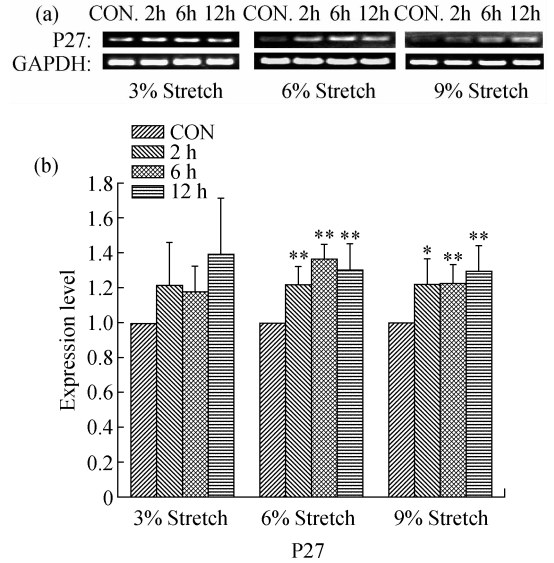


图6 不同的机械拉伸对 RA-FLSs 中 P27 表达的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$) (a) 实际电泳图片, (b) 电泳条带 OD 值

Fig. 6 Effects of different mechanical stretch on mRNA expression of P27 to RA-FLSs (a) Electrophoresis results, (b) Electrophoresis band opacity density (OD)

实验组在 3%、6% 和 9% 的拉伸幅度下分别受周期性机械加载 2、6、12 h, RA-FLSs 中 P27 与对照组比较

3 讨论

在 RA 的发病过程中,滑膜炎是最具特征性的病变,滑膜组织具有增生性侵蚀性生长的特征,在生长及病理学行为方面与肿瘤组织的特性类似。研究表明,肿瘤细胞的无限制增殖大多是因为细胞生长过程中细胞周期的失调所致,细胞生命活动的基本过程是细胞周期,所以其运行受到细胞周期的精密调控^[13]。而细胞周期的失调,从分子水平看,则是由于基因突变致使细胞周期的正调控因子异常活化,以及负调控因子失活造成细胞周期调节失控的结果。

本实验设计了 3%、6%、9% 3 种拉伸应变对滑膜细胞进行牵张刺激。综合分析细胞活性、细胞周期和基因表达 3 种实验结果表明,6%、9% 的机械拉伸可以显著地降低 RA-FLSs 的细胞活性以及 CyclinE1 和 CDK2 的表达,同时提高了 P27 的基因表达,并在拉伸持续 6 h 以后显著地降低了细胞增殖指数。此外,RT-PCR 的实验结果显示,3% 的机械拉伸同样可以降低 CyclinE1 和 CDK2 的表达,但是结合流式细胞术和 MTS 的实验结果可以推断,6%

和9%的机械拉伸对 RA-FLSs 的增殖抑制作用比3%的机械拉伸显著。RT-PCR 的实验结果表明,机械拉伸对 CyclinD1 的基因表达有影响但相对较小。采用双因素方差分析结果显示,影响 RA-FLSs 增殖水平的主要因素首先是机械拉伸时间,其次是机械拉伸幅度,且两者之间有交互作用。为了探究机械拉伸对 RA-FLSs 增殖抑制作用的内在机制,对其细胞周期进行研究,发现 RA-FLSs 在 6%、9% 的机械拉伸条件下,持续加载 6、12 h 其 G1 期细胞明显增多,而 S 期和 G2 期细胞减少。哺乳动物细胞分裂的调节事件主要发生在 G1 期,它是细胞对胞外信号做出复制还是分化选择的重要时期。G1 期细胞周期蛋白的异常表达可以引起细胞异常增殖的发生。CyclinD1 是 G1 期早期细胞周期蛋白,CyclinE1 则为 G1 期晚期细胞周期蛋白,两者都是 G1 期关键的限速因子。它们分别与 CDK4 和 CDK2 结合形成 Cyclin D1-CDK4 和 Cyclin E1-CDK2 复合体,激活 CDK4、CDK2 的蛋白激酶活性,导致 Rb (视网膜母细胞瘤基因蛋白) 磷酸化,磷酸化失活的 Rb 蛋白释放出与之结合的核转录因子 E2F,从而引起一系列与 S 期有关的靶分子的表达,促使细胞完成 DNA 复制,细胞由 G1 期进入 S 期,促进细胞的增殖^[14-15]。因此,G1 期阻滞是细胞增殖抑制的重要环节,而 P27 是细胞周期 G1 期进程中的另一个重要的抑制因子,它主要与 CDK2 结合,并抑制 CDK2 的活性,从而通过抑制 CyclinE-CDK2 复合物的形成,阻滞细胞周期于 G1 期,是最直接的细胞周期负调控因子^[16]。

MTS 和 RT-PCR 的实验结果表明,6%、9% 的周期性机械拉伸能够降低 RA-FLSs 的细胞活性,以及细胞周期相关正调控因子 CyclinE1 和 CDK2 mRNA 的表达,同时增强抑制因子 P27 mRNA 的表达;这说明机械拉伸是通过调节 Cyclin E1-CDK2-P27 细胞周期调控因子,将 RA-FLSs 阻滞于 G1 期,从而抑制 RA-FLSs 失控性增殖。并且这种增殖抑制作用随着加载时间的延长,效果相对显著。本文初步探讨了机械拉伸对 RA 病人 FLSs 的影响,在 6%、9% 的应变力作用下持续刺激 6、12 h,细胞增殖水平较低。机械刺激作为外部因素引起细胞活性和增殖的变化,必然通过内部细胞因子起作用,若要探讨负荷刺激对细胞增殖影响的机制,还需要进行大量的基础

实验来研究不同的负荷刺激对滑膜细胞生长因子的影响,从而阐明不同运动负荷形式与滑膜细胞代谢的关系^[4]。

结合有关研究推测,RA-FLSs 细胞表面或细胞内可能有感受力学信号的细胞受体,力学刺激通过一定的信号通路传到细胞内,通过力学-化学耦联,最终引起 mRNA、细胞因子等生物分子合成的改变,从而对细胞的增殖及凋亡等行为产生影响。关于力学信号如何传导到细胞内来调控细胞的增殖,以及如何将力学刺激对细胞的影响应用于 RA 的预防和治疗,还有待于进一步研究^[17-18]。

参考文献:

- [1] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 356-361.
- [2] Kontoyiannis D, Kollias G. Synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: Leading role or chorus line [J]. *Arthritis Res*, 2000, 2(5): 342-343.
- [3] 舒强, 李兴福, 刘花香, 等. 类风湿关节炎滑膜成纤维样细胞增殖特性的体外研究[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2006, 44(11): 1095-1099.
- [4] 史仍飞, 危小焰, 卞玉华. 机械牵拉刺激对大鼠骨骼肌卫星细胞增殖的影响[J]. *体育科学*, 2007, 27(5): 74-76.
- [5] Bohannon RW. Comfortable and maximum walking speed of adults aged 20-79 years: Reference values and determinants [J]. *Age Ageing*, 1997, 26(1): 15-19.
- [6] Banes AJ, Gilbert J, Taylor D, et al. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro [J]. *J Cell Sci*, 1985, 75(1): 35-42.
- [7] Nishimura K, Blume P, Ohgi S, et al. The effect of different frequencies of stretch on human dermal keratinocyte proliferation and survival [J]. *J Surg Res*, 2009, 155(1): 125-131.
- [8] 刘巧红, 沈凌汛, 滕云, 等. 类风湿关节炎滑膜细胞的增殖及细胞周期的研究[J]. *临床内科杂志*, 2004, 21(12): 814-816.
- [9] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1988, 31(3): 315-324.
- [10] 周薇, 吕永钢, Gurinder K Singh, 等. 周期性机械拉伸对类风湿关节炎和骨关节炎成纤维样滑膜细胞 BMP-2 表达的影响[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(2): 121-127.