

文章编号: 1004-7220(2022)05-0881-07

骨细胞 Cx43 在膝关节响应力学过载中的作用

陈家辉, 杨保强, 宁凯婷, 续惠云

(西北工业大学 生命学院, 西安 710072)

摘要:目的 探究骨细胞连接蛋白 43(connexin43, Cx43)通道在力学过载对小鼠膝关节影响中的作用。方法 对 15 周龄骨细胞特异 Cx43 转基因小鼠(R76W; 间隙连接功能抑制而半通道功能促进; Δ 130-136; 间隙连接和半通道都被抑制)及同窝野生型小鼠左膝关节施加单次应变($\varepsilon=1.764\ 62$), 右膝关节作为对照。1 周后分析小鼠步态, 评价小鼠膝关节骨与软骨情况。抑制 MLO-Y4 骨细胞 Cx43 通道功能后进行循环拉伸应变, 检测相关因子表达。收集条件培养基培养 ATDC5 软骨细胞, 检测相关基因表达和成骨分化能力。结果 步态分析显示, Cx43 通道抑制没有明显影响小鼠步态。但转基因小鼠关节股骨端 OARSI 评分显著增加, 骨小梁面积占比更小。抑制 MLO-Y4 细胞 Cx43 通道降低了 ADAMTS5 和 II 型胶原表达, 增强其成骨分化的能力。结论 骨细胞 Cx43 通道能够响应力学过载, 影响软骨细胞关键基因表达, 并参与其成骨分化过程的调控, 影响软骨对力学过载的响应。研究结果为骨关节炎的防治提供新思路。

关键词: 骨细胞连接蛋白 43; 膝关节; 软骨; 力学过载

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.05.018

Role of Osteocytic Cx43 in Response to Mechanical Overloading in Knee Joint

CHEN Jiahui, YANG Baoqiang, NING Kaiting, XU Huiyun

(School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract: Objective To investigate the role of osteocytic connexin43 (Cx43)-formed channels after being submitted to mechanical overloading on knee joint. **Methods** The strain was applied to left knee joint of 15-week Cx43 transgenic mice (R76W: gap junctions were blocked and hemichannels were promoted; Δ 130-136: both hemichannels and gap junctions were blocked) and their wild-type littermates, and right knee joint was as control. A week later, the mice gait was analyzed to evaluate the structure of subchondral bone and articular cartilage. After inhibition of Cx43 channels, MLO-Y4 cells were submitted to 15% cyclic tensile strain, and the expression of related factors were detected. The supernatant was collected to culture ATDC5 cells, and the gene expression and the osteogenic differentiation ability were detected in ATDC5 cells. **Results** Gait analysis showed that inhibition of Cx43 channels did not significantly affect the mice gait. However, the femoral OARSI score increased significantly and the ratio of trabecular bone area decreased in transgenic mice. Conditional medium from MLO-Y4 cells with inhibition of Cx43 channels reduced the expression of ADAMTS5 and COL2 in ATDC5 cells, and enhanced the osteogenic differentiation ability. **Conclusions** The osteocytic Cx43 channels can respond to mechanical overloading, affect the expression of key genes and is involved in osteogenic differentiation process in chondrocytes, thus affects cartilage structure in response to mechanical overloading. The study will provide new ideas for the prevention and treatment of osteoarthritis.

Key words: connexin43 (Cx43); knee joint; mechanical overloading; osteocyte

收稿日期: 2021-12-12; 修回日期: 2022-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(81772409)

通信作者: 续惠云, 教授, E-mail: celldon@nwpu.edu.cn

关节组织对力学环境非常敏感,力学负荷是调节关节组织发育和维持代谢平衡重要的外部因素。动物实验证明,关节组织受到异常力时,其自身力学性能也会改变,影响正常功能,减少负荷和力学过载都会引起关节软骨组织的分解代谢增加^[1-3]。

关节由关节软骨、软骨下骨、滑膜及其周围软组织构成,软骨和软骨下骨之间隔着一层薄的钙化软骨,具有通透性,为软骨下骨和软骨之间的交流提供基础^[4]。研究表明,软骨下骨和钙化软骨之间、软骨和软骨下骨之间有许多微血管联通^[5-6]。Duncan 等^[7]研究发现,软骨下骨板上存在小孔,其中一些小孔能够穿透软骨下骨板并与骨髓腔相连。由此可见,软骨下骨和关节软骨之间存在物理上的相互联系。

骨细胞是骨组织中执行力学信号感知和传递的主要细胞,关节软骨下骨细胞对力学刺激的影响能影响关节软骨的结构功能^[8]。Zhen 等^[9]研究发现,软骨下骨中高浓度的活性 TGF- β 启动骨关节炎的病理改变,抑制软骨下骨 TGF- β 信号可以减轻骨关节炎症状。也有研究表明,抑制骨细胞 TGF- β 表达可导致雌性小鼠关节软骨退变,软骨下骨板增厚,硬骨素增加,但雌性小鼠没有变化^[10]。抑制小鼠关节骨细胞 MMP-13 的表达,会影响关节软骨细胞 II 型胶原、蛋白聚糖和 MMP-13 产生,从而导致软骨退变^[11]。

骨细胞连接蛋白 43 (connexin43, Cx43) 能组成半通道和间隙连接,使骨组织形成一个信息传递的整体和同步化的网络,介导对外界力学刺激响应^[12-13]。力学刺激能促进骨细胞 Cx43 半通道释放信号代谢产物前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 和腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP)。抑制骨细胞 Cx43 通道功能促进皮质骨力学去负荷所导致的骨质流失^[14]。

针对关节软骨下骨中骨细胞 Cx43 通道是否会对外界力学刺激产生响应,并调节关节软骨的功能,本文以两种骨细胞 Cx43 显性负突变的转基因小鼠 R76W (间隙连接功能抑制而半通道功能促进) 和 Δ 130-136 (间隙连接和半通道都被抑制) 作为研究对象,探讨 Cx43 的间隙连接和半通道功能在力学过载下对关节软骨结构与功能的影响。研究结果在动物水平上初步揭示骨细胞 Cx43 通道在

响应力学刺激并传递信号到软骨细胞中的作用,丰富骨-软骨交流作用的实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型

骨细胞显性负突变 Cx43 转基因雄性小鼠 R76W 和 Δ 130-136 由美国德克萨斯大学健康科学中心姜欣教授惠赠。转基因小鼠以 10-kb DMP1 为启动子,使特异在骨细胞中表达。R76W 小鼠突变体氨基酸序列第 76 位精氨酸 (R) 被色氨酸 (W) 代替,骨细胞的间隙连接功能抑制而半通道功能被促进; Δ 130-136 小鼠突变体第 130~136 位氨基酸残基被删除,骨细胞间隙连接和半通道均被抑制。选用 15 周龄小鼠,SPF 级饲养。动物实验全部流程均已获得西北工业大学实验动物福利与伦理委员会批准。

1.2 力学加载

小鼠腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠溶液 (0.05 mL/10 g 体重)。待小鼠麻醉后,使用万能材料试验机 (Instron 5943, Instron 公司, 美国) 对小鼠左腿胫骨实施单次恒定应变 ($\epsilon = 1.76462$) 加载,达到应变要求即停止加载。小鼠右腿作为对照不做处理,笼内自由活动 1 周。

1.3 小鼠行为学分析

处死小鼠 24 h 前进行行为学测试^[15]。将长 90 cm、宽 12 cm、高 10 cm 的 U 型亚克力通道水平放置于实验台上,开口向上,白纸放在通道底部,通道的另一端与黑色暗盒的开口对齐。将小鼠的前足涂抹为红色,后足涂抹为黑色。之后,将小鼠放在无暗盒的一端,小鼠的趋暗性会使其跑入暗盒,待其通过亚克力通道后,将有足印的白纸取出,取足迹清晰的两步,分别记录并计算小鼠的前足宽度、后足宽度、前足距离、后足距离、前足步长偏倚程度、后足步长偏倚程度、足印重叠偏倚程度和后足步长。

1.4 石蜡切片和 HE/番红固绿染色

取完整膝关节固定在 4% 多聚甲醛中,常规脱钙脱水后进行石蜡切片,用于常规苏木精伊红染色和番红固绿染色。番红固绿染色后镜下观察,根据 OARSI 标准^[16]进行评分。0 分为正常软骨;0.5 分表面完整,但存在蛋白聚糖损失;1 分表面不平整,没有软骨丢失;2 分存在垂直裂隙和表面板层丢失;

3分代表损伤区域占整个关节1%~25%;4分代表损伤区域占整个关节25%~50%;5分代表损伤区域占整个关节50%~70%;6分代表损伤区域占整个关节的75%以上。双人盲评,取平均分为最后得分。苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色后用Image J软件测量软骨和软骨下骨板厚度,选取软骨下骨小梁区域,Image J计算骨小梁与横截面总面积占比。

1.5 细胞力学加载

MLO-Y4骨细胞用含2.5%胎牛血清、2.5%小牛血清、1%双抗和1%谷氨酰胺的 α -MEM培养基在37℃孵育箱中培养。实验组加入0.1% 18 α 甘草次酸(18 α -glycyrrhetic acid, 18 α -AGA, 抑制间隙连接和半通道),对照组加入相同体积DMSO,随后

表1 qPCR引物序列

Tab. 1 Primers sequences for qPCR

引物	序列	引物	序列
MMP-13(F)	5'-TGTTGAGCTGGACTCCCTGT-3'	Tgfr1(R)	5'-AAAGGGCGATCTAGTGATGGA-3'
MMP-13(R)	5'-CAGGATCCCGCAAGAGTGG-3'	MMP-3(F)	5'-CCCTGGGTCTCTTTCACTCA-3'
COX-2(F)	5'-TCCCTTCCTGCGAAGTTAAC-3'	MMP-3(R)	5'-GCTGACAGCATCAAAGGACA-3'
COX-2(R)	5'-CATACATCATCAGACCAGGCACC-3'	ADAMTS5(F)	5'-GCCATTGTAATAACCCATGCACC-3'
SOST(F)	5'-AGCCTTCAGGAATGATGCCAC-3'	ADAMTS5(R)	5'-TCAGTCCCATCCGTAACCCTTTG-3'
SOST(R)	5'-CTTTGGCGTCATAGGGATGGT-3'	COL2(F)	5'-CTGGAAAACCTGGTGACG-AC-3'
Tgf- β (F)	5'-TGAACCAAGGAGACGGAATACAGG-3'	COL2(R)	5'-GAATCCACGAGCACCCATAG-3'
Tgf- β (R)	5'-GCCATGAGGAGCAGGAAGGG-3'	GAPDH(F)	5'-CGGTGCTGAGTATGTCG-TGG-3'
Tgfr1(F)	5'-TCTGCATTGCATTATGCTGA-3'	GAPDH(R)	5'-ATGAGCCCTCCACAATGCC-3'

1.7 ELISA

采用小鼠PGE2 ELISA试剂盒(江苏江莱生物科技有限公司),根据试剂盒要求操作,用酶标仪在450 nm处检测PGE2含量。

1.8 软骨细胞分化能力检测

ATDC5细胞用抑制或不抑制Cx43后循环拉伸应变3h的MLO-Y4细胞条件培养基:DMEM/F12完全培养基以1:1比例混合培养,隔天换液,21h后,4%多聚甲醛固定,茜素红染色分析其成骨分化能力。

1.9 统计学分析

用GraphPad Prism 6.0进行数据分析,3组之间差异采用独立样本*t*检验比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。所有数据以均值 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 过载对小鼠行为学的影响

力学过载1周后,小鼠步态分析显示,转基因

用FX-5000(Flexcell公司,美国)在1 Hz、15%循环拉伸应变处理3h,收取条件培养基。

ATDC5细胞用含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM/F12完全培养基,在37℃孵育箱中培养,取对数生长期细胞。用收集的上述加或不加18 α -AGA的MLO-Y4条件培养基与DMEM/F12完全培养基以1:1比例培养,用FX-5000在1 Hz、15%拉伸应变下处理24h。

1.6 qPCR检测

Trizol法提取MLO-Y4及ATDC5细胞的总RNA,反转录为cDNA,进行PCR,检测基因的相对表达。PCR扩增条件为95℃预变性40s,60℃再变性20s,72℃退火5s,80℃延伸2s,共41个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达。

小鼠与其同窝WT小鼠前足宽度、后足宽度、前足距离、后足距离、前足步长偏倚程度、足印重叠偏倚程度和后足步长均无明显差异。 $\Delta 130-136$ 转基因小鼠的后足步长偏倚程度较R76W小鼠明显增加(见图1)。该结果表明,骨细胞Cx43通道抑制没有明显影响小鼠过载后的步态,仅后足步长偏倚增加,说明单次力学过载不足以影响小鼠的关节疼痛。

2.2 过载对小鼠关节软骨的影响

小鼠过载后1周,对膝关节外侧矢状面组织学切片进行番红固绿染色。结果显示,力学过载诱发了小鼠膝关节软骨退变,关节胫骨端OARSI评分增加。但股骨端只有 $\Delta 130-136$ 小鼠评分增加。过载组中,3种小鼠外侧胫骨软骨厚度较对照组均有减小趋势,但无显著差异。股骨端 $\Delta 130-136$ 小鼠OARSI评分增加,表明两种通道都抑制会增加软骨改变,R76W小鼠增加的半通道功能可能部分缓解了间隙连接抑制对软骨的影响(见图2)。

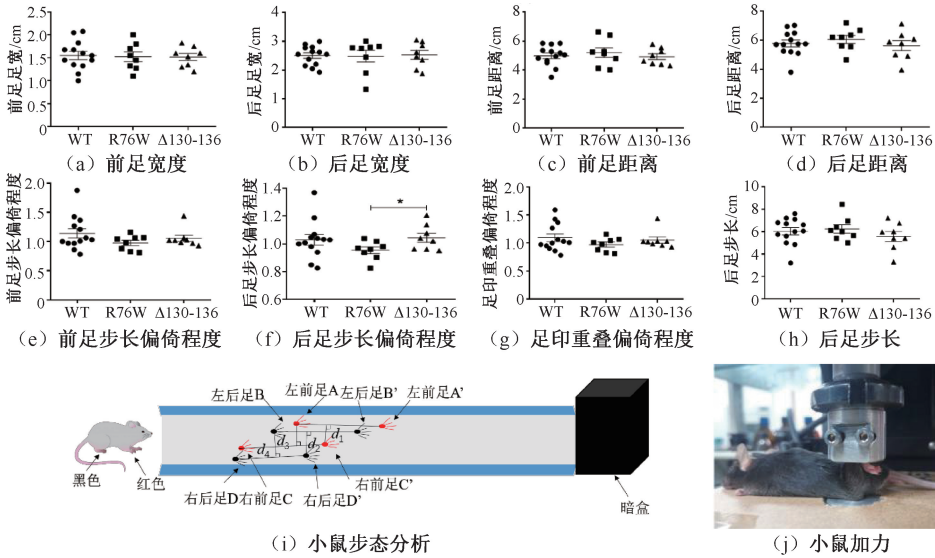


图 1 过载对小鼠步态的影响

Fig. 1 Effect of overloading on gait in mice (a) Forelimbs step width, (b) Hindlimb step width, (c) Forelimb step distance, (d) Hindlimb step distance, (e) Degree of forelimbs stride deviation, (f) Degree of hindlimbs stride deviation, (g) Footprints overlap degree, (h) Hindlimbs stride length, (i) Gait analysis of mice, (j) Loading of mice
注:前足宽度 = $(d_1 + d_3)/2$, 后足宽度 = $(d_2 + d_4)/2$, 前足距离 = $(A'C' + AC' + AC)/2$, 后足距离 = $(B'D' + BD' + BD)/2$, 前足步长偏倚程度 = CC'/AA' , 后足步长偏倚程度 = DD'/BB' , 足印重叠偏倚程度 = CD/AB , 后足步长 = BB' ; * $P < 0.05$, $n \geq 8$ 。

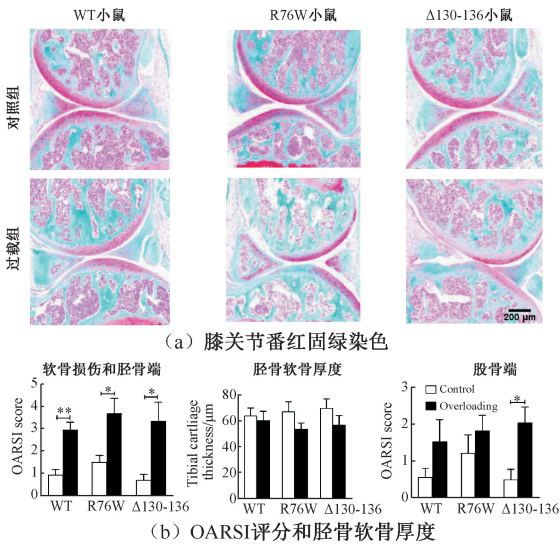


图 2 过载对小鼠关节软骨的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n \geq 6$)

Fig. 2 Effects of overloading on cartilage in mice

(a) Safranin-O/fast-green staining of knee joint, (b) OARSI scores and thickness of tibial cartilage

2.3 过载对小鼠关节软骨下骨板的影响

小鼠过载后 1 周,对膝关节外侧矢状面切片进行 HE 染色。结果显示,过载组 $\Delta 130-136$ 小鼠骨小梁面积占比与 R76W 小鼠相比有明显下降。两种

转基因小鼠软骨下骨板厚度与同窝 WT 小鼠相比均无差异(见图 3)。该结果说明,单次力学过载没有明显影响软骨下骨板,但可能对骨小梁的结构有影响,两种通道均抑制降低了骨小梁面积占比。同样,增加的半通道功能可能部分缓解了间隙连接抑制的这种影响。

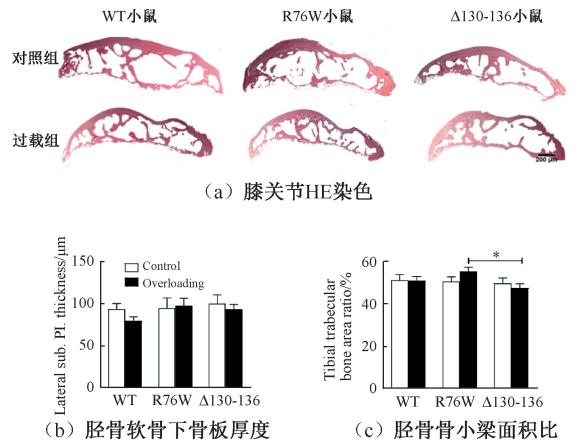


图 3 过载对小鼠关节软骨的影响(* $P < 0.05$, $n \geq 6$)

Fig. 3 Effects of overloading on cartilage in mice (a) HE staining of subchondral bone, (b) Subchondral bone plate thickness, (c) Subchondral trabecular bone area ratio

2.4 Cx43 在拉伸应变对 MLO-Y4 骨细胞及 ATDC5 软骨细胞影响中的作用

抑制 Cx43 后对 MLO-Y4 细胞进行拉伸应变处理 3 h。基因表达结果显示, Cx43 抑制没有影响基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase-13, MMP-13)、骨

硬化蛋白 (sclerostin, SOST)、转化生长因子 β (transforming growth factor β , Tgf- β)、转化生长因子 β 受体 1 (transforming growth factor β receptor 1, Tgfbr1) 的表达, 仅环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 表达升高, PGE2 分泌水平也无明显变化 (见图 4)。

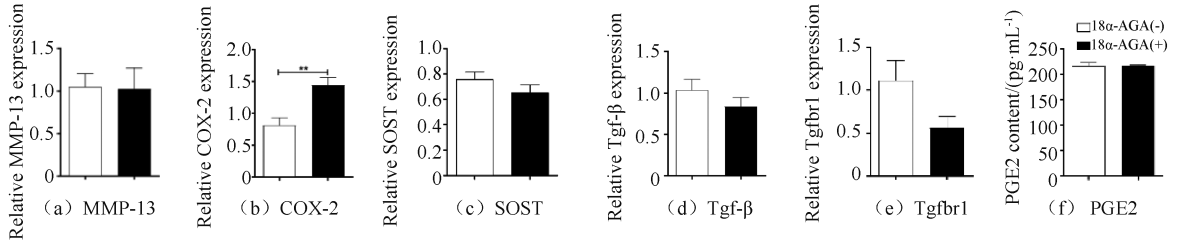


图 4 抑制 Cx43 通道对 MLO-Y4 基因表达及 PGE2 含量影响 (** $P < 0.01, n \geq 3$)

Fig. 4 Effects of Cx43 channels inhibition on gene expression and PGE2 content in MLO-Y4 cells (a) MMP-13, (b) COX-2, (c) SOST, (d) Tgf- β , (e) Tgfbr1, (f) PGE2

用抑制或不抑制 Cx43 的 MLO-Y4 条件培养基处理 ATDC5 细胞。显示抑制 Cx43 对基质金属蛋白酶 3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3)、

MMP-13、聚蛋白聚糖 (aggrecan) 的表达没有明显影响, 但引起 ADAMTS5 和 COL2 表达下降 (见图 5)。

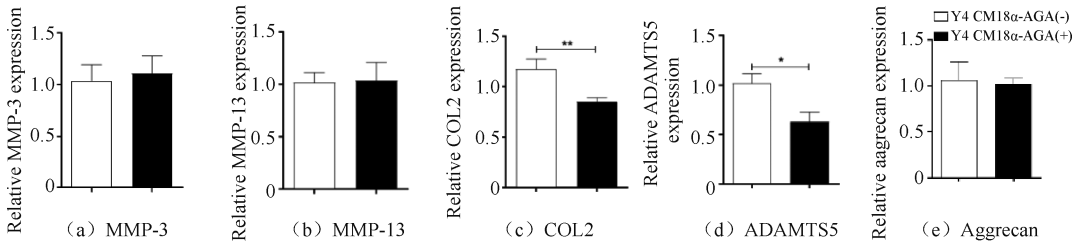


图 5 抑制 Cx43 通道的 MLO-Y4 条件培养上清对 ATDC5 基因表达的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01, n \geq 3$)

Fig. 5 Effects of MLO-Y4 conditioned culture supernatant inhibiting Cx43 channels on ATDC5 cells gene expression (a) MMP-3, (b) MMP-13, (c) COL2, (d) ADAMTS5, (e) Aggrecan

茜素红染色显示, 抑制 Cx43 的 MLO-Y4 细胞条件培养基能促进 ATDC5 细胞的成骨分化。该结果表明, 骨细胞 Cx43 通道能分泌一些调控因子影响软骨细胞的关键基因表达, 并参与其成骨分化过程的调控 (见图 6)。

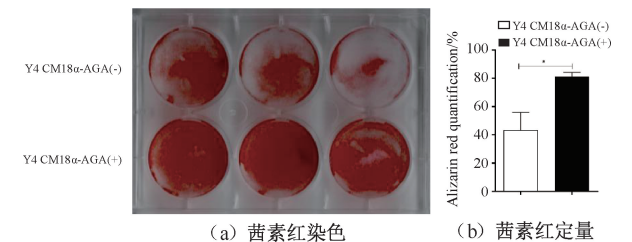


图 6 抑制 Cx43 通道的 MLO-Y4 条件培养上清对 ATDC5 成骨分化的影响 (* $P < 0.05, n = 3$)

Fig. 6 Effects of MLO-Y4 conditioned culture supernatant inhibiting Cx43 channels on ATDC5 cells osteogenic differentiation (a) Alizarin red staining, (b) Alizarin red quantification

3 讨论

已有研究认为, 对小鼠胫骨的正常加载应变 $\varepsilon \approx 1.2$ [17-18], 而异常的力学刺激会导致关节组织遭到破坏 [19]。Christiansen 等 [20] 建立小鼠胫骨的过载模型, 认为单次应变 $\varepsilon > 1.734$ 已经达到力学过载。该研究发现, 力学过载速度影响小鼠膝关节对力的响应, 力学过载可导致小鼠炎性细胞因子和蛋白酶

的变化, 影响骨小梁结构, 引起关节软骨退变, 造成

关节损伤^[21-22]。在本研究中,由于转基因和野生型小鼠自身对力学响应存在差异,根据原来用应变片对 3 种小鼠所做的应力-应变曲线,当 WT 小鼠的单次轴向应力为 10 N(与 Christiansen^[23]等采取的加力大小一致)时,其应变 $\varepsilon = 1.76462$ 。为保证施加的应变一致,此时对 R67W 小鼠、 $\Delta 130-136$ 小鼠分别施加的应力为 10.41、14.22 N。

Cx43 在骨组织力学响应中起着很重要的作用^[24]。本文发现,骨细胞 Cx43 通道功能改变会影响其条件培养基中代谢物成分和含量,并对成肌细胞分化产生影响。骨细胞 Cx43 组成的通道是否参与力学过载引起的代谢物分泌,并对关节软骨产生影响,目前的研究还很有限。本文使用骨细胞特异的显性负突变转基因小鼠,研究间隙连接和半通道两种通道在关节受到力学过载时对软骨的作用。

步态分析结果显示,仅 $\Delta 130-136$ 小鼠的后足步长偏倚程度较 R76W 小鼠略高,其他指标 3 种小鼠间均无明显差异。该结果表明,骨细胞 Cx43 组成通道没有明显影响小鼠过载后的步态,单次力学过载不足以影响小鼠的关节疼痛。后续可以对小鼠进行更大应变的加载,或增加加载的次数,研究其对小鼠行为的影响。

研究显示,力学过载会导致小鼠胫骨骨小梁的快速丢失,加速软骨细胞衰老^[23,25]。短期冲击载荷增加了软骨外植体蛋白多糖的释放,并诱导软骨细胞凋亡^[26-27]。Zhen 等^[9]认为,在关节炎进程中软骨下骨结构变化先于软骨,并会调节软骨稳态。Cx43 是对应力刺激敏感的分子,成骨细胞 Cx43 缺失减弱了骨对力学负荷的合成代谢,而骨细胞及破骨细胞敲除 Cx43 增强了负荷引起的骨合成代谢,骨细胞及成骨细胞 Cx43 缺失使骨对力学去负荷的响应变得不敏感^[28-30]。本课题组前期研究则发现,骨细胞 Cx43 通道抑制使骨对力学去负荷的敏感性增加^[14]。本文结果显示,3 种小鼠胫骨端 OARS1 评分在力学过载后均明显增加,但股骨端仅 $\Delta 130-136$ 小鼠有明显增加,表明两种通道都抑制会更明显地影响关节软骨对力学加载的响应,引起其蛋白多糖的丢失和软骨厚度的降低。R76W 小鼠增强的半通道可能部分缓解了这种影响。

在细胞水平上,Huang 等^[31]使用 0.5 Hz、12% 和 0.5 Hz、20% 循环拉伸应变作为过度载荷培养原

代软骨细胞,而 Chang 等^[32]将 0.5 Hz、10% 循环拉伸应变作为过度载荷培养原代软骨细胞。本文使用 1 Hz、15% 循环拉伸应变作为力学过载培养 MLO-Y4 及 ATDC5 细胞,结果发现,18 α -AGA 抑制通道功能没有明显改变骨细胞对循环拉伸应变的响应,表现为 PGE2 的释放没有改变。这与从前的研究结果不一致。Genetos 等^[24]发现,15 min 震荡流体(2.0 Pa、1 Hz)可以激活 Cx43 半通道功能,诱导 MLO-Y4 骨细胞释放 PGE2,加入抑制剂可减少 PGE2 的释放。本实验室前期研究同样,表明震荡流体(2 h、1 Hz、1.0 Pa)和模拟失重(2 h)能诱导 MLO-Y4 骨细胞半通道开放,引起 PGE2 释放增加^[33-34]。这种不一致可能与采取的力学刺激大小和方式等有关,也许循环拉伸应变对于体外的 MLO-Y4 细胞不是一种有效的力学刺激方式。后续应该用流体剪切力等方式进行加载,进一步研究骨细胞对软骨细胞的作用。

4 结论

骨细胞 Cx43 通道参与膝关节及软骨细胞对力学过载的响应,骨细胞 Cx43 组成的两种通道都抑制会更明显地导致软骨下骨骨小梁丢失,引起软骨退变,而增强的半通道可能部分缓解这种影响。Cx43 参与骨细胞对力学刺激的响应,并可能通过分泌一些调控因子,影响软骨细胞细胞外基质的产生及其功能。

本文只进行单次力学过载实验,在细胞实验上也只选择一种拉伸应变,且在细胞水平上没有区分两种通道的功能。后续研究可在体内和体外实验方面采取多种力学加载方式,设置多种力学加载参数进行进一步研究。

参考文献:

- [1] BUCKLAND-WRIGHT C. Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(Suppl A): S10-19.
- [2] 庞祥超,王会珍,唐斌. 关节软骨表面力学性能与骨性关节炎的关系 [J]. *医用生物力学*, 2021, 36(S1): 23.
- [3] SUN HB. Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1211: 37-50.
- [4] LORIES RJ, LUYTEN FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(1): 43-49.

- [5] CLARK JM, HUBER JD. The structure of the human subchondral plate [J]. *J Bone Joint Surg Br*, 1990, 72(5): 866-873.
- [6] IMHOF H, SULZBACHER I, GRAMPP S, *et al.* Subchondral bone and cartilage disease: A rediscovered functional unit [J]. *Invest Radiol*, 2000, 35(10): 581-588.
- [7] DUNCAN H, JUNDT J, RIDDLE JM, *et al.* The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1987, 69(8): 1212-1220.
- [8] BONEWALD LF, JOHNSON ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling [J]. *Bone*, 2008, 42(4): 606-615.
- [9] ZHEN G, WEN C, JIA X, *et al.* Inhibition of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis [J]. *Nat Med*, 2013, 19(6): 704-712.
- [10] BAILEY KN, NGUYEN J, YEE CS, *et al.* Mechanosensitive control of articular cartilage and subchondral bone homeostasis in mice requires osteocytic transforming growth factor beta signaling [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021, 73(3): 414-425.
- [11] MAZUR CM, WOO JJ, YEE CS, *et al.* Osteocyte dysfunction promotes osteoarthritis through MMP13-dependent suppression of subchondral bone homeostasis [J]. *Bone Res*, 2019, 7: 34.
- [12] CIVITELLI R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 473(2): 188-192.
- [13] TEN BROEK RW, GREFFE S, VON DEN HOFF JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 224(1): 7-16.
- [14] ZHAO D, LIU R, LI G, *et al.* Connexin 43 channels in osteocytes regulate bone responses to mechanical unloading [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 299.
- [15] WALKER JL, RESIG P, GUARNIERI S, *et al.* Improved footprint analysis using video recording to assess functional recovery following injury to the rat sciatic nerve [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 1994, 6(3): 189-193.
- [16] GLASSON SS, CHAMBERS MG, VAN DEN BERG WB, *et al.* The OARSI histopathology initiative-recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(Suppl 3): S17-23.
- [17] DE SOUZA RL, MATSUURA M, ECKSTEIN F, *et al.* Non-invasive axial loading of mouse tibiae increases cortical bone formation and modifies trabecular organization: A new model to study cortical and cancellous compartments in a single loaded element [J]. *Bone*, 2005, 37(6): 810-818.
- [18] LYNCH ME, MAIN RP, XU Q, *et al.* Cancellous bone adaptation to tibial compression is not sex dependent in growing mice [J]. *J Appl Physiol*, 2010, 109(3): 685-691.
- [19] 阚天佑, 严孟宁. 软骨细胞力学信号转导在骨性关节炎中的作用 [J]. *医用生物力学*, 2021, 36(3): 485-490.
- KAN TY, YAN MN. Role of chondrocyte mechanotransduction in development of osteoarthritis [J]. *J Med Biomech*, 2021, 36(3): 485-490.
- [20] LOCKWOOD KA, CHU BT, ANDERSON MJ, *et al.* Comparison of loading rate-dependent injury modes in a murine model of post-traumatic osteoarthritis [J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(1): 79-88.
- [21] SATKUNANATHAN PB, ANDERSON MJ, DE JESUS NM, *et al.* *In vivo* fluorescence reflectance imaging of protease activity in a mouse model of post-traumatic osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, 22(10): 1461-1469.
- [22] ANDERSON MJ, DIKO S, BAEHR LM, *et al.* Contribution of mechanical unloading to trabecular bone loss following non-invasive knee injury in mice [J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(10): 1680-1687.
- [23] CHRISTIANSEN BA, ANDERSON MJ, LEE CA, *et al.* Musculoskeletal changes following non-invasive knee injury using a novel mouse model of post-traumatic osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(7): 773-782.
- [24] 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.
- [25] ZHANG H, SHAO Y, YAO Z, *et al.* Mechanical overloading promotes chondrocyte senescence and osteoarthritis development through downregulating FBXW7 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2022, doi: 10.1136/annrheumdis-2021-221513.
- [26] TORZILLI P A, GRIGIENE R, BORRELLI J, JR, *et al.* Effect of impact load on articular cartilage: Cell metabolism and viability, and matrix water content [J]. *J Biomech Eng*, 1999, 121(5): 433-441.
- [27] QUINN TM, ALLEN RG, SCHALET BJ, *et al.* Matrix and cell injury due to sub-impact loading of adult bovine articular cartilage explants: Effects of strain rate and peak stress [J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2001, 19(2): 242-249.
- [28] GRIMSTON SK, BRODT MD, SILVA MJ, *et al.* Attenuated response to *in vivo* mechanical loading in mice with conditional osteoblast ablation of the connexin43 gene (Cx43) [J]. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(6): 879-886.