

文章编号: 1004-7220(2023)04-0663-07

流体剪切力通过下调 p21 促进 MC3T3-E1 成骨细胞增殖

移 穷, 刘众成, 刘雪宁, 张 坤, 王力夫, 耿 彬, 夏亚一

(兰州大学第二医院 骨科; 甘肃省骨科临床医学研究中心; 甘肃省骨关节疾病研究重点实验室, 兰州 730030)

摘要:目的 探讨流体剪切力(fluid shear stress, FSS)对成骨细胞 p21 表达的影响, 并明确 p21 在 FSS 诱导的成骨细胞增殖过程中的作用。方法 对成骨细胞加载不同时间(0、15、30、45、60 min)、1.2 Pa FSS。用 CCK-8 实验、EdU 实验检测成骨细胞增殖活性。用 siRNA p21 或 pcDNA p21 转染成骨细胞, 并用 Western blotting 检测转染效果。Western blotting 检测不同干预条件下 p21、cyclin D1、CDK4 的表达变化。结果 加载 1.2 Pa FSS 后, p21 表达显著下调, 且加载 45 min 后表达水平最低。加载 FSS 和下调 p21 表达都显著增强成骨细胞增殖, 并增加 cyclin D1、CDK4 表达。而上调 p21 表达后, 加载 FSS 不再具有增强成骨细胞增殖和增加 cyclin D1、CDK4 表达的作用。结论 1.2 Pa FSS 能够下调成骨细胞 p21 表达, 在加载 45 min 时下调最为明显。p21 下调对成骨细胞增殖具有促进作用, 且 FSS 通过下调 p21 促进成骨细胞增殖。

关键词: 流体剪切力; 成骨细胞; 细胞增殖

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.04.004

Fluid Shear Stress Promotes Proliferation of MC3T3-E1 Osteoblasts Through Down-Regulating p21

YI Qiong, LIU Zhongcheng, LIU Xuening, ZHANG Kun, WANG Lifu, GENG Bin, XIA Yayi

(Department of Orthopedics, Lanzhou University Second Hospital; Orthopedic Clinical Medical Research Center of Gansu Province; Orthopedics Key Laboratory of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of fluid shear stress (FSS) on p21 expression in osteoblasts, and to clarify the role of p21 in osteoblast proliferation induced by FSS. **Methods** Osteoblasts were treated with 1.2 Pa FSS for different duration (0, 15, 30, 45, 60 min). Osteoblasts were transfected with siRNAp21 or pcDNAP21, and the transfection effect was detected by Western blotting. The proliferation of osteoblasts was assessed by CCK-8 assay or EdU labelling assay. The expression of p21, cyclinD1 and CDK4 was detected by Western blotting. **Results** 1.2 Pa FSS significantly down-regulated p21 expression, and the expression level of p21 was the lowest when treated with FSS for 45 min. Both FSS and down-regulation of p21 significantly increased the proliferation of osteoblasts and the expression of cyclin D1 and CDK4. However, after up-regulating p21 expression, FSS couldn't increase the proliferation of osteoblasts and the expression of cyclin D1 and CDK4. **Conclusions** 1.2 Pa FSS can down-regulate p21 expression in osteoblasts, and the expression level of p21 was the lowest when treated with FSS for 45 min. Down-regulation of p21 can promote osteoblast proliferation, and FSS promotes osteoblast proliferation through down-regulating p21.

Key words: fluid shear stress (FSS); osteoblasts; p21; cell proliferation

收稿日期: 2022-03-18; 修回日期: 2022-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(81874017, 81960403, 82060405), 兰州市科技计划项目(2021-RC-102), 兰州大学第二医院“萃英科技创新”计划(CY2017-ZD02, CY2021-MS-A07)

通信作者: 夏亚一, 教授, 博士生导师, E-mail: xiayylzu@126.com

随着人口老龄化的日益加剧,骨质疏松症已经成为全世界面临的严重公共健康问题。调查结果显示,2019年我国50岁以上人群骨质疏松症的患病率高达19.2%,而且随着年龄的增长,患病率也呈明显的上升趋势^[1]。骨质疏松症不仅影响患者的生活质量,其严重的并发症还可能导致患者残疾甚至死亡^[2-3]。成骨细胞新骨形成和破骨细胞旧骨吸收过程通常处于动态平衡状态,当骨形成不足或骨吸收过快时,机体会发生骨质流失,从而引起骨质疏松症^[4-5]。深入研究骨质疏松症发生的内在机制,对骨质疏松症的防治非常重要。

研究发现,在失重、长期卧床、肢体石膏固定等力学负荷减轻的情况下,人体发生骨质疏松及相关骨折的风险明显增加,说明力学因素对骨代谢具有重要作用^[6]。人体骨组织处在复杂的力学环境中,这些应力包括流体剪切力(fluid shear stress, FSS)、牵张力、剪切力、压应力等^[7-8]。Basso等^[9]研究发现, FSS是影响骨代谢的主要力学因素。FSS能够影响成骨细胞增殖、凋亡、分化等生物学行为^[10-12]。

p21是一种由CDKN1A基因编码的蛋白。研究发现,氟化钠处理成骨细胞后,细胞p21表达下调,成骨细胞增殖增加^[13]。此外,Blaber等^[14]研究发现,小鼠在进行15 d航天飞行后,股骨近端骨膜表面的成骨细胞p21表达增多,推测其可能与失重条件诱导的骨丢失有关。然而,p21是否参与力学因素对成骨细胞生物学行为的影响,仍需进一步研究去证实。本实验以FSS作为力学刺激,研究成骨细胞p21在FSS作用下的表达变化,并探讨p21在FSS诱导成骨细胞增殖中的作用,以期骨质疏松治疗提供新的治疗靶点。

1 实验材料和方法

1.1 实验主要试剂

α -MEM基础培养基(Hyclone公司,美国);胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco公司,美国),青-链霉素、封闭液、4%多聚甲醛(上海碧云天生物技术有限公司);RIPA裂解液、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);CCK-8试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司);EdU染色试剂(广州锐博生物技术公司);Triton X-100、 β -actin抗体(1:2 000)、山羊抗鼠二抗(1:5 000)、山羊抗兔二抗

(1:5 000)(北京中杉金桥生物技术有限公司);p21抗体(1:1 000)(Proteintech公司,美国);CDK4抗体(1:1 000)、cyclin D1抗体(1:1 000)(CST公司,美国);GP-transfect-Mate转染试剂(上海吉玛制药技术有限公司)。

1.2 细胞培养

实验所用小鼠MC3T3-E1成骨细胞购自北京协和细胞技术资源中心。用 α -MEM基础培养基、胎牛血清和青-链霉素配制成10%的完全培养基,用于培养MC3T3-E1成骨细胞。细胞放入37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养,待成骨细胞生长至80%~90%或者出现接触抑制时,进行传代。

1.3 加载FSS

将无菌盖玻片放入培养皿备用。取1瓶生长至80%~90%的成骨细胞,用胰蛋白酶将细胞消化下来,并将细胞密度稀释至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取800 μL 稀释好的细胞悬液小心地滴在盖玻片上,然后将培养皿放入细胞培养箱中,待细胞贴壁后再向培养皿中加入6 mL完全培养基过夜。打开FSS加载装置(专利号:ZL201520637211.6),夹取爬有细胞的盖玻片,将细胞贴壁的一面朝上放入装置平行板凹槽中。设置FSS强度为1.2 Pa,根据需要设置加载时间为15、30、45、60 min,启动装置加载FSS。

1.4 CCK-8实验

将对照组和干预组细胞以同一密度接种在96孔板上,每组设5个复孔,并设置1组仅含有完全培养基的空白组。分别在细胞贴壁后0、24、48、72 h,从培养箱中取出96孔板,每孔加入10 μL CCK-8溶液,再将96孔板放入培养箱中培养2 h后,酶标仪检测在450 nm处的OD值。

1.5 Western blotting实验

将RIPA裂解液和PMSF按1:100配制成蛋白裂解液。取对照组或干预组细胞,加入蛋白裂解液裂解30 min。收集含有细胞碎片的裂解液,12 000 r/min离心20 min,留取上清液。按照BCA试剂盒说明书,计算样品蛋白浓度,加入上样缓冲液后煮沸备用。蛋白样品在10% SDS-PAGE凝胶中电泳,随后转膜、封闭(1 h)。封闭结束,一抗孵育2 h,4℃冰箱过夜。TBST洗涤3遍,二抗孵育1 h。TBST洗涤3遍,曝光条带,用Image J软件计算灰度值。

1.6 siRNA 和 pcDNA 的转染

实验所用 siRNA-nc、siRNA p21、对照质粒空载体 pcDNA 3.1、pcDNA p21 过表达质粒由上海吉玛制药技术有限公司负责构建合成。按照说明书,将基础培养基分别与转染试剂或 siRNA/pcDNA 混匀,然后静置 5 min,再将两者混合,静置 20 min 制成转染复合物。细胞用新鲜培养基换液后,加入转染复合物,siRNA 终浓度不低于 50 nmol/L,DNA 为 0.5~1.5 μg (24 孔板为例,细胞培养量不同,则依据说明书调整剂量)。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h,更换为完全培养基后继续培养。72 h 后提取蛋白,检测 p21 的蛋白表达量。

1.7 EdU 实验

细胞接种于盖玻片上,贴壁后在 50 $\mu\text{mol/L}$ EdU 培养基中孵育 2 h,PBS 洗涤 2 遍。4% 多聚甲醛固定 30 min 后弃去。2 mg/mL 甘氨酸中和多聚甲醛 5 min 后 PBS 洗涤 2 遍。0.5% Triton X-100 孵育 10 min 后 PBS 洗涤 2 遍。制备 Apollo 染色反应液避光染色 30 min 后弃去。加入 0.5% Triton X-100 洗涤 10 min。甲醇洗涤 2 遍。Hoechst 33342 避光染色 30 min,PBS 洗涤后立即观察。

1.8 统计学分析

所有实验均进行 3 次重复,结果以均值 \pm 标准差表示。使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计学分析,两组间比较用 *t* 检验,两组以上组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 FSS 对成骨细胞的 p21 表达的影响

研究发现,生理 FSS 强度为 0.8~3.0 Pa^[15]。目前,研究多以 1.2 Pa FSS 刺激成骨细胞^[16]。因此,本文设置 1.2 Pa 作为 FSS 的实验强度,设置 0、15、30、45、60 min 加载时间梯度,探究 FSS 影响成骨细胞 p21 表达的最适作用时间。

结果表明,加载 1.2 Pa FSS 后,成骨细胞 p21 表达显著下调,并且随着 FSS 作用时间的延长,表达水平逐渐降低。其中,在加载 45 min 时,p21 表达水平最低(见图 1)。在后续实验中,FSS 均设置为 1.2 Pa、45 min。

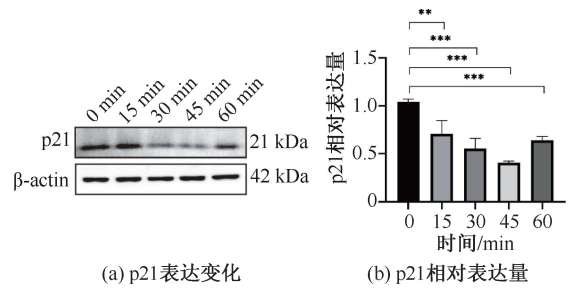


图 1 FSS 加载时间对 p21 表达的影响

Fig. 1 Effects of FSS loading time on p21 expression

(a) Changes in p21 expression, (b) P21 protein expression

注: $n=3$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.2 FSS 对成骨细胞增殖具有促进作用

本文验证加载 1.2 Pa、45 min 的 FSS 对成骨细胞增殖的作用。采用 CCK-8 实验检测成骨细胞增殖的变化,Western blotting 检测成骨细胞增殖相关蛋白 cyclin D1 和 CDK4 的变化。结果表明,与对照组相比,加载 FSS 后,成骨细胞的增殖活性显著增强[见图 2(a)]。相较于对照组,加载 FSS 后成骨细胞 cyclin D1、CDK4 的表达显著上调,p21 表达显著下调[见图 2(b)~(e)]。

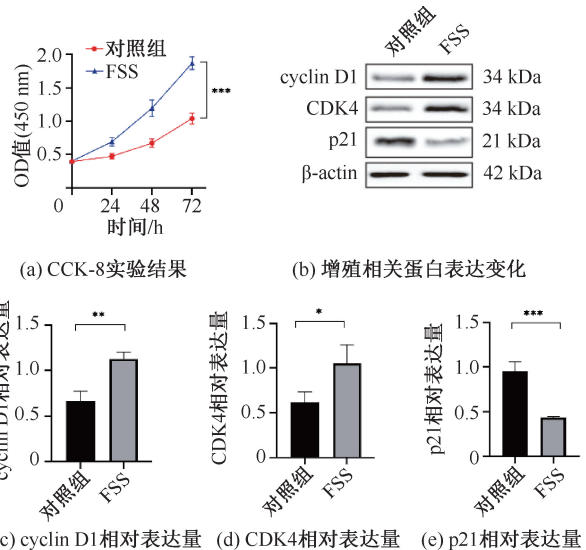


图 2 FSS 对成骨细胞增殖影响

Fig. 2 Effects of FSS on the osteoblast proliferation

(a) Result of CCK-8 assay, (b) Changes in proliferation-related proteins, (c) Cyclin D1 protein expression, (d) CDK4 protein expression, (e) P21 protein expression

注: $n=3$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.3 p21 下调促进成骨细胞增殖

本文进一步探究 p21 下调在成骨细胞增殖中的作用。利用小干扰 RNA (siRNA) 转染成骨细胞, 从而下调 p21 的表达。共设计 3 条 siRNA, 序列分别为 UCUGAGCGGCCUGAAGAUAUTTAUCUUCAGGCCGCUCAGATT、CCAGCCUGACAGAUUUCUATTUAGAAAUCUGUCAGGCUGGTT、GCAGAUUGGUCUUCUGCAATT UUGCAGAAGACCAAUCUGCTT。利用 Western blotting 实验验证干扰效率。

结果表明, 与对照组相比, 转染 siRNA-nc 对成骨细胞 p21 蛋白表达没有显著影响, 转染 siRNA p21 后, 成骨细胞 p21 蛋白表达显著下调, siRNA #1、#2、#3 对 p21 蛋白表达的干扰效率分别为 $(57.47 \pm 6.43)\%$ 、 $(70.95 \pm 2.52)\%$ 、 $(55.17 \pm 1.36)\%$ (见图 3)。可以看出, siRNA #2 对 p21 表达的干扰效率最高, 故选择 siRNA #2 作为后续实验的 siRNA p21。

为了明确 p21 下调对成骨细胞增殖的影响, 将

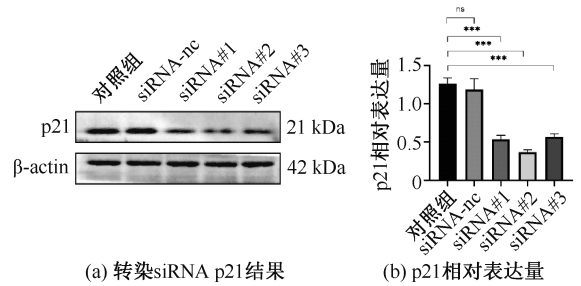


图 3 p21 干扰效率检测

Fig. 3 Test on siRNA interference efficiency of p21

(a) Result of transfecting siRNA p21, (b) P21 protein expression

注: $n=3$; ns: $P>0.05$; *** $P<0.001$ 。

成骨细胞分为对照组、siRNA-nc 组和 siRNA p21 组, 转染完毕后爬片, 进行 EdU 染色。结果表明, 细胞核显示红色荧光表示细胞正在进行 DNA 复制, 以红色荧光细胞占视野总细胞的比率代表细胞增殖率 [见图 4(a) ~ (b)]。相较于对照组, siRNA-nc 组

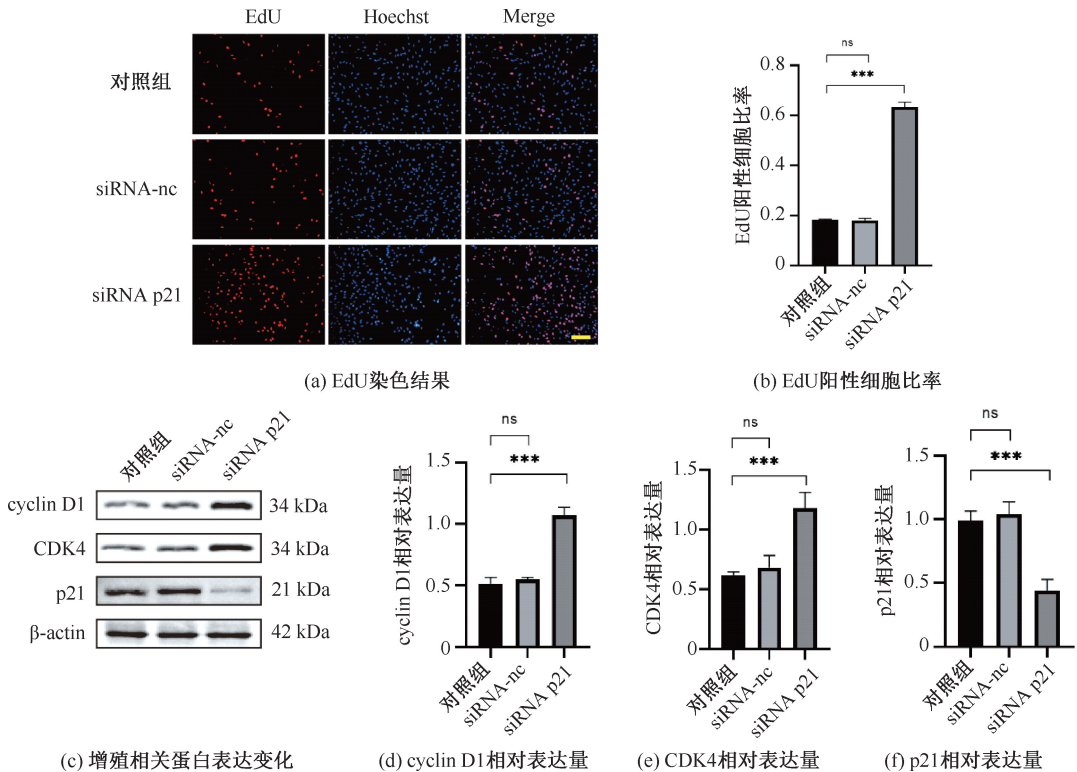


图 4 p21 下调对成骨细胞增殖的影响

Fig. 4 Effects of down-regulation of p21 on osteoblast proliferation (a) EdU labelling assay, (b) Rate of EdU positive cells, (c) Changes in proliferation-related proteins, (d) Cyclin D1 protein expression, (e) CDK4 protein expression, (f) P21 protein expression

注: $n=3$; ns: $P>0.05$; *** $P<0.001$; 比例尺 = 200 μm 。

细胞增殖率无明显变化, 而 siRNA p21 组细胞增殖率显著升高。在 siRNA 转染 72 h 后, 分别提取各组细胞蛋白质, Western blotting 检测细胞增殖相关蛋白 cyclin D1、CDK4 以及 p21 的表达变化。与对照组相比, 转染 siRNA-nc 对成骨细胞 cyclin D1、CDK4 和 p21 无明显影响, 而转染 siRNA p21 后, p21 表达显著下调, cyclin D1、CDK4 表达显著上调 [见图 4(c)~(f)]。

2.4 p21 参与 FSS 诱导的成骨细胞增殖过程

基于以上实验结果, 对 p21 是否参与 FSS 诱导的成骨细胞增殖过程开展进一步研究。细胞转染 pcDNA p21 过表达质粒, 转染 72 h 后提取对照组和干预组成骨细胞蛋白质。结果表明, 与对照组相比, pcDNA p21 组成骨细胞 p21 蛋白表达水平显著上调 [见图 5(a)~(b)]。

为了明确 p21 在 FSS 诱导的成骨细胞增殖中的作用, 将细胞分为对照组、FSS 组、FSS + pcDNA 3.1 组和 FSS + pcDNA p21 组, 利用 EdU 染色检测成骨细胞增殖情况, 利用 Western blotting 检测成骨细胞增殖相关蛋白表达的变化。相较于对照组, 加载 FSS 后, 成骨细胞增殖率显著增加, 转染 pcDNA3.1 不影响 FSS 对成骨细胞增殖的促进作用, 而上调 p21 后, 这一促进作用被逆转 [见图 5(c)~(d)]。Western blotting 检测细胞增殖相关蛋白 cyclin D1、CDK4 以及 p21 的表达变化。结果发现, 加载 FSS 后, 成骨细胞 CDK4、CyclinD1 的表达显著上调, 而 p21 上调后, FSS 对 CDK4、cyclinD1 表达的上调作用被逆转, 进一步说明 p21 参与了 FSS 诱导的成骨细胞增殖过程 [见图 5(e)~(h)]。

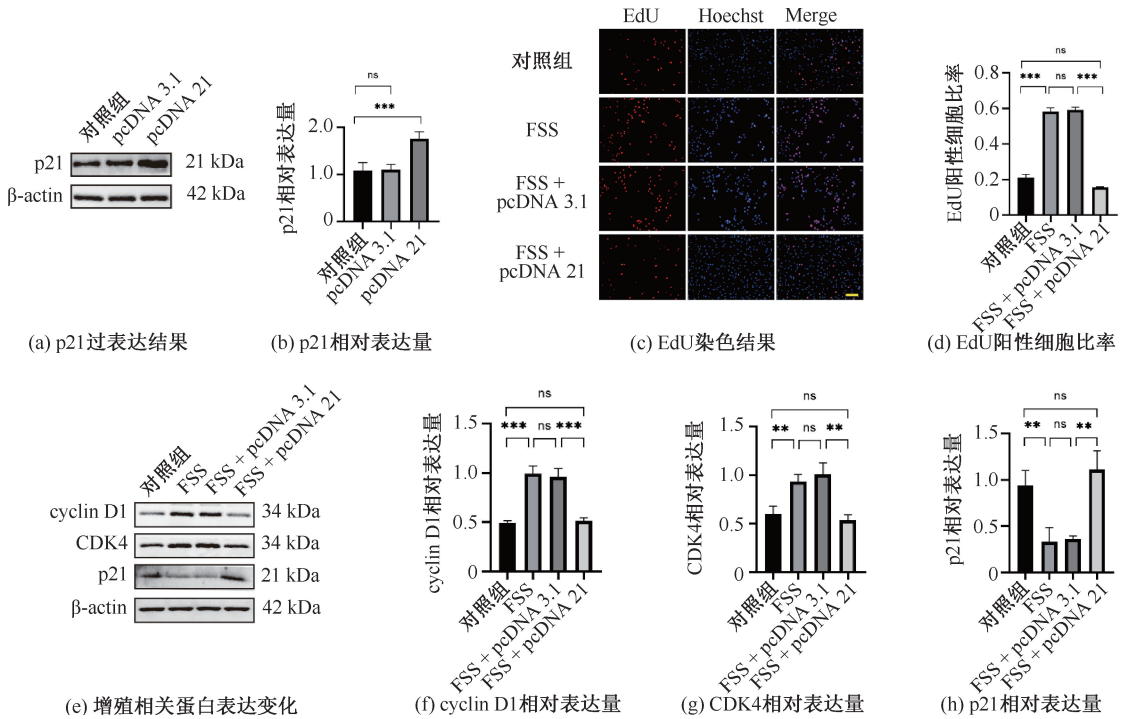


图 5 p21 上调对成骨细胞增殖的影响

Fig. 5 Effects of p21 up-regulation on osteoblast proliferation (a) Result of transfecting pcDNA, (b) P21 protein expression, (c) EdU labelling assay, (d) Rate of EdU positive cells, (e) Changes in proliferation-related proteins, (f) Cyclin D1 protein expression, (g) CDK4 protein expression, (h) P21 protein expression

注: $n=3$; ns: $P>0.05$; *** $P<0.001$; 比例尺 = 200 μm 。

3 讨论

骨是一种动态组织, 新骨形成和陈旧骨吸收维

持着骨代谢平衡。成骨细胞是负责新骨形成的主要细胞, 能够合成 I 型胶原蛋白、骨钙素和其他组成骨骼主要成分的蛋白质, 并促进骨基质矿化 [17-18]。

成骨细胞是一种力学敏感细胞,能够对力学刺激做出生物学反应。本实验以 FSS 作为力学刺激,对 FSS 影响成骨细胞增殖的内在分子机制进行研究。

结果发现,加载 FSS 后,成骨细胞 p21 表达显著下调。此外,加载 FSS 和下调 p21 均能促进成骨细胞增殖。而当上调 p21 表达后,加载 FSS 不再对成骨细胞增殖具有促进作用,表明 FSS 通过下调 p21 促进成骨细胞增殖。

近年来,力学因素对骨代谢的影响已经成为一个研究热点。各种力学刺激通过整合素-细胞骨架-核基质、阳离子通道以及 G 蛋白依赖通路等途径转化为细胞内的生物化学信号,调节成骨和破骨细胞的骨形成和骨吸收过程^[19]。目前认为,FSS 是影响骨代谢的主要力学因素。日常生活中,爬楼梯、跑步,甚至单纯的站立都会对骨骼产生机械负荷,导致骨基质形变。骨组织小管-腔隙网络中含有丰富的细胞外液,力学刺激引起的骨基质形变在小管内产生压力梯度,驱动细胞外液流动,从而在骨组织细胞膜上产生 FSS^[20-21]。Liu 等^[22]研究发现,受到 FSS 刺激后,成骨细胞形态变得狭长,并沿着力的方向重新排列生长。FSS 强度是影响其生物学效应的因素之一。Xu 等^[23]研究指出,1.2 Pa FSS 刺激成骨细胞后,细胞出现重新排列的趋势,但 0.3 Pa 的 FSS 对成骨细胞无明显影响。此外,FSS 还能够抑制成骨细胞凋亡,促进细胞分化。Pavalko 等^[24]研究发现,加载 FSS 抑制了 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡。Geng 等^[11]的研究也支持 FSS 抑制成骨细胞凋亡的结论,并发现下调 ERK5 后,FSS 的凋亡抑制作用被逆转。Zhao 等^[12]研究加载持续性和间歇性 FSS 对成骨细胞分化的影响,发现两种模式的 FSS 均能促进成骨细胞分化,且间歇性 FSS 的作用更为明显。

本实验主要关注 FSS 对成骨细胞增殖的影响。研究已证实,适宜的 FSS 对成骨细胞增殖具有促进作用。Li 等^[10]采用每隔 30 min 加载 FSS 30 min 的方式刺激成骨细胞 4 h,发现细胞增殖显著增加,而且这一增殖促进效应与 ERK5 信号通路的激活有关。后续研究指出,FSS 对成骨细胞 ERK5 信号通路的激活,与 NFATc1 和 G α q 的表达增加有关^[25-26]。Zhang 等^[27]研究表明,KLF4 也参与 FSS 诱导的成骨细胞增殖过程,其表达上调受到 ERK5

信号通路的调控。另外,FSS 还能调控成骨细胞非编码 RNA,如 miR-140-5p、lncRNA TUG1 的表达,促进成骨细胞的增殖^[28-29]。本实验也得出 FSS 对成骨细胞的增殖具有促进作用的结论。此外,本文还发现,p21 是 FSS 诱导成骨细胞增殖过程中的关键分子之一。

p21 属于 CDK 抑制蛋白(CDK inhibitor,CKI)家族成员,被认为是控制细胞周期从 G1 期向 S 期转变的主要检查点^[30-31]。一般认为,p21 是一种肿瘤抑制基因。研究发现,p21 基因缺陷的小鼠易发生原发性肿瘤,且肿瘤细胞来源涉及血细胞、上皮细胞和内皮细胞等多种细胞类型^[32]。另有研究指出,p21 在骨肉瘤组织和细胞中表达降低,并且 miRNA-93 和 miR-140 通过下调 p21 促进骨肉瘤细胞的增殖^[33-34]。一项包含 45 例骨肉瘤样本的研究表明,p21 高表达的骨肉瘤患者较低表达者肿瘤分化程度更高,显示出更好的预后^[35]。此外,p21 也与细胞增殖密切相关。小鼠 p21 基因功能缺失后,肝脏和神经干细胞增殖增加,处于静止状态的细胞数量减少^[36-37]。另外,敲除 p21 基因也显著加速了小鼠间充质干细胞的增殖^[38]。Pan 等^[13]在氟骨症的研究中发现,氟化钠干预后,成骨细胞 p21 基因甲基化水平升高,p21 表达下调,细胞增殖增加。本文结果表明,p21 下调在 FSS 诱导的成骨细胞增殖过程中具有重要作用,进一步拓展了对 FSS 促进成骨细胞增殖的分子机制的认识。需要注意的是,本文结果基于体外细胞实验,要准确解释体内成骨细胞的对力学刺激的反应,还需严谨的在体实验进一步验证。

4 结论

FSS 能够下调成骨细胞 p21 表达,p21 下调能够促进成骨增殖,并参与 FSS 诱导的成骨细胞增殖过程。本研究结果加深了对力学因素影响骨代谢的理解,并为骨质疏松症研究提供一个新的角度。

参考文献:

- [1] 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317-318.
- [2] KEENE GS, PARKER MJ, PRYOR GA. Mortality and morbidity after hip fractures [J]. Br Med J, 1993, 307

- (6914): 1248-1250.
- [3] OSNES EK, LOFTHUS CM, MEYER HE, *et al.* Consequences of hip fracture on activities of daily life and residential needs [J]. *Osteoporos Int*, 2004, 15(7): 567-74.
- [4] ZAIDI M. Skeletal remodeling in health and disease [J]. *Nat Med*, 2007, 13(7): 791-801.
- [5] CHEN X, WANG Z, DUAN N, *et al.* Osteoblast-osteoclast interactions [J]. *Connect Tissue Res*, 2018, 59(2): 99-107.
- [6] WITTKOWSKA C, REILLY GC, LACROIX D, *et al.* *In vitro* bone cell models: Impact of fluid shear stress on bone formation [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2016, 4: 87.
- [7] 闫旭, 李子通, 刘继婷, 等. 周期性机械牵拉通过上调 Runx2 表达促进 MC3T3-E1 细胞迁移 [J]. *医用生物力学*, 2022, 37(1): 162-168.
- YAN X, LI ZT, LIU JT, *et al.* Cyclic stretch promotes migration of MC3T3-E1 cells via increasing Runx2 expression [J]. *J Med Biomech*, 2022, 37(1): 162-168.
- [8] THOMPSON WR, RUBIN CT, RUBIN J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone [J]. *Gene*, 2012, 503(2): 179-193.
- [9] BASSO N, HEERSCHKE JN. Characteristics of *in vitro* osteoblastic cell loading models [J]. *Bone*, 2002, 30(2): 347-351.
- [10] LI P, MA YC, SHENG XY, *et al.* Cyclic fluid shear stress promotes osteoblastic cells proliferation through ERK5 signaling pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 364(1-2): 321-327.
- [11] GENG B, ZHANG B, WANG J, *et al.* Fluid shear stress suppresses TNF- α -induced apoptosis in MC3T3-E1 cells: Involvement of ERK5-AKT-FoxO3a-Bim/FasL signaling pathways [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 343(2): 208-217.
- [12] ZHAO LG, CHEN SL, TENG J, *et al.* The MEK5/ERK5 pathway mediates fluid shear stress promoted osteoblast differentiation [J]. *Connect Tissue Res*, 2014, 55(2): 96-102.
- [13] PAN X, YAN W, QIU B, *et al.* Aberrant DNA methylation of cyclinD-CDK4-p21 is associated with chronic fluoride poisoning [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 315: 108875.
- [14] BLABER EA, DVOROCHKIN N, LEE C, *et al.* Microgravity induces pelvic bone loss through osteoclastic activity, osteocytic osteolysis, and osteoblastic cell cycle inhibition by CDKN1a/p21 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61372.
- [15] FRITTON SP, WEINBAUM S. Fluid and solute transport in bone: Flow-induced mechanotransduction [J]. *Annu Rev Fluid Mech*, 2009, 41: 347-374.
- [16] YU L, MA X, SUN J, *et al.* Fluid shear stress induces osteoblast differentiation and arrests the cell cycle at the G0 phase via the ERK1/2 pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8699-8708.
- [17] CAETANO-LOPES J, CANHÃO H, FONSECA JE. Osteoblasts and bone formation [J]. *Acta Reumatol Port*, 2007, 32(2): 103-110.
- [18] RAUT N, WICKS SM, LAWAL TO, *et al.* Epigenetic regulation of bone remodeling by natural compounds [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 147: 104350.
- [19] DUNCAN RL, TURNER CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain [J]. *Calcif Tissue Int*, 1995, 57(5): 344-358.
- [20] WEINBAUM S, COWIN SC, ZENG Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses [J]. *J Biomech*, 1994, 27(3): 339-360.
- [21] 张兵兵, 潘君, 王远亮, 等. 流体剪切力在骨生长、重建中的重要作用 [J]. *医用生物力学*, 2005, 20(2): 123-126.
- ZHANG BB, PAN J, WANG YL, *et al.* Resultful effects of fluid flow on bone growth and remodeling [J]. *J Med Biomech*, 2005, 20(2): 123-126.
- [22] LIU X, ZHANG X, LEE I. A quantitative study on morphological responses of osteoblastic cells to fluid shear stress [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2010, 42(3): 195-201.
- [23] XU H, DUAN J, REN L, *et al.* Impact of flow shear stress on morphology of osteoblast-like IDG-SW3 cells [J]. *J Bone Miner Metab*, 2018, 36(5): 529-536.
- [24] PAVALKO FM, GERARD RL, PONIK SM, *et al.* Fluid shear stress inhibits TNF- α -induced apoptosis in osteoblasts: A role for fluid shear stress-induced activation of PI3-kinase and inhibition of caspase-3 [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 194(2): 194-205.
- [25] DING N, GENG B, LI Z, *et al.* Fluid shear stress promotes osteoblast proliferation through the NFATc1-ERK5 pathway [J]. *Connect Tissue Res*, 2019, 60(2): 107-116.
- [26] ZHANG B, GENG B, WANG J, *et al.* Fluid shear stress promotes osteoblast proliferation via the G α q-ERK5 signaling pathway [J]. *Connect Tissue Res*, 2016, 57(4): 299-306.
- [27] ZHANG B, AN L, GENG B, *et al.* ERK5 negatively regulates Kruppel-like factor 4 and promotes osteogenic lineage cell proliferation in response to MEK5 overexpression or fluid shear stress [J]. *Connect Tissue Res*, 2021, 62(2): 194-205.