

文章编号:1004-7220(2014)02-0119-07

# 生理水平流体剪应力对三维多孔支架中成骨细胞力学敏感性及其黏附、分化的影响

张寅星<sup>1</sup>, 崔玉红<sup>1,2</sup>, 黄 啸<sup>1</sup>, 周 瑾<sup>1</sup>, 易彩霞<sup>1</sup>, 范艺娟<sup>1</sup>, 李文娇<sup>2</sup>, 潘 君<sup>1</sup>

(1. 重庆大学 生物工程学院, 生物流变科学与技术教育部重点实验室, 重庆 400044;

2. 天津大学 力学系, 天津 300072)

**摘要:** **目的** 构建可以达到生理剪应力水平的三维流动模型, 研究流体剪应力对成骨细胞黏附、分化及力学敏感性的影响。**方法** 利用灌注式流动腔对生长在 $\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -TCP)多孔支架内的MC3T3-E1成骨样细胞施加不同强度的流体剪应力6 h, 比较加载组和静态组的细胞活性表征细胞黏附; 一氧化氮(NO)和碱性磷酸酶(ALP)表征力学敏感性和细胞分化。采用流固非线性耦合的数值计算, 获得支架内各流量下的剪应力分布。**结果** 平均剪应力小于0.4 Pa, 细胞的黏附率为74% ~ 81%; 0.41 Pa时, 黏附率为60.22%。NO的产生率在加载后5 min达到最大, 15 min显著降低, 30 min后产生率趋近于0。在0.232 ~ 0.304 Pa平均剪应力强度范围, ALP水平随着剪应力的升高显著增强( $P < 0.01$ ); 而在0.304 ~ 0.412 Pa范围, 剪应力增加对ALP水平的改变无显著影响( $P > 0.05$ )。**结论** 生理水平剪应力条件下, 支架内大部分细胞可以维持正常黏附。三维条件下细胞力学敏感性与剪应力变化率成正比, 与二维条件的规律相同。支架内平均剪应力小于0.304 Pa, 剪应力显著促进细胞分化; 大于这一剪应力, 细胞分化水平不再明显变化。该研究有望加快骨组织工程的实现。

**关键词:** 生理水平; 三维支架; 流体剪应力; 成骨细胞; 细胞分化; 力学敏感性

**中图分类号:** R 318.01 **文献标志码:** A

## Effects of shear stress at physiological level on mechanical sensitivity, adhesion and differentiation of MC3T3-E1 cells in three-dimensional porous scaffold

ZHANG Yin-xing<sup>1</sup>, CUI Yu-hong<sup>1,2</sup>, HUANG Xiao<sup>1</sup>, ZHOU Jin<sup>1</sup>, YI Cai-xia<sup>1</sup>, FAN Yi-juan<sup>1</sup>, LI Wen-jiao<sup>2</sup>, PAN Jun<sup>1</sup> (1. Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 2. Department of Mechanics, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract:** **Objective** To construct the three-dimensional (3D) fluid model at the physiological level of shear stresses and study the effects of fluid shear stress (FSS) on adhesion, differentiation and mechanical sensitivity of osteoblasts. **Methods** The MC3T3-E1 osteoblasts cultured on  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) scaffolds were subjected to various FSSs in the perfusion flow chamber for 6 hours to compare cell adhesion in FSS-loading groups and control group. Nitric oxide (NO) and alkaline phosphatase (ALP) were detected to compare mechanical sensitivity and cell differentiation. The FSS magnitude and distributions corresponding to various fluid rates were calculated with nonlinear fluid-structure coupling analysis. **Results** Cell adhesion rate was up to

收稿日期:2013-03-14; 修回日期:2013-04-23

基金项目:重庆大学生物流变科学与技术教育部重点实验室访问学者基金(CQKLBST-2012-002), 国家自然科学基金资助项目(11272366, 10972243, 11172207), 国家111计划项目(B06023)。

通信作者:潘君, 研究员, E-mail:panj@cqu.edu.cn。

74% ~ 81% when the average FSS magnitude was lower than 0.4 Pa, but reduced to 60.22% when the average FSS was 0.41 Pa. The NO production rate reached the maximal concentration after loading for 5 min, then significantly reduced at 15 min, and gradually diminished to none at 30 min. ALP level significantly increased ( $P < 0.01$ ) at the shear stress range of 0.232 ~ 0.304 Pa, but maintained at the range of 0.304 ~ 0.412 Pa ( $P > 0.05$ ) with the increase of shear stress. **Conclusions** Majority of the cells kept a normal adherence to the scaffold at the physiological level of shear stresses. The mechanical sensitivity of the cells under 3D condition was dependent on the FSS rate, which was consistent with two-dimensional (2D) condition. When the average FSS was lower than 0.304 Pa in the scaffold, FSS could significantly promote cell differentiation, but no significant change in cell differentiation could be found when FSS was higher than 0.304 Pa. The present study is expected to accelerate the realization of bone tissue engineering.

**Key words:** Physiological level; Three-dimensional scaffold; Fluid shear stress (FSS); Osteoblast; Cell differentiation; Mechanical sensitivity

骨是人体承受机械应力最主要的组织。骨组织的生长和维持是体内流体剪应力、机械拉伸力、静水压力等机械力共同作用的结果,其中流体剪应力对骨组织的影响最为显著<sup>[1-2]</sup>。为了解释流体剪应力对骨组织的影响,科学家们从体外的细胞水平开展了广泛的研究,最早也最多的研究是在二维平行板流动腔中开展的。研究发现,成骨细胞受到剪应力刺激后,最先表现为胞内钙浓度上升,骨生成作用增强<sup>[3]</sup>,之后细胞会释放一氧化氮(NO)和前列腺素 $E_2$ ( $PGE_2$ )<sup>[4]</sup>,这两种分子涉及多项细胞功能,也是骨重建的重要信号分子<sup>[5]</sup>,常被作为成骨细胞力学敏感性的指标<sup>[6]</sup>。而较长时间的流体剪应力刺激会引起细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)水平升高,它也是细胞分化的早期指标<sup>[7]</sup>,更长时间的剪应力刺激则会引起胞外矿化基质沉积,标志着成骨细胞的成熟<sup>[2]</sup>。虽然二维水平的研究已经取得了一些成果,但二维环境与骨组织的三维结构差异巨大,故三维条件下流体剪应力对骨组织细胞的影响成为近些年研究的热点。

然而,骨组织结构复杂,目前的技术水平还无法直接采用骨组织定量研究流体剪应力对骨细胞的影响,也无法精确计算骨组织内骨细胞所受的流体剪应力,故人工设计合成具有已知三维结构的支架就成为一种有效的研究手段。Leclerc等<sup>[8]</sup>采用微加工和微流控技术设计制备了三维支架,对支架内部的流体进行了精确计算,但其内部结构与骨组织相差巨大;Sikavitsas等<sup>[2]</sup>使用钛纤维网状三维支架研究了长时间加载条件下大鼠骨髓基质成骨细胞对剪应力的响应;孙晓江等<sup>[9-10]</sup>使用 $\beta$ -磷酸三钙( $\beta$ -tri-

calcium phosphate,  $\beta$ -TCP)多孔支架研究了人骨髓间充质干细胞对力学的响应。然而类似研究中所涉及的剪应力水平基本都处于几~几十 mPa 级别<sup>[8,10]</sup>,远低于计算得到的骨生理剪应力水平(0.8~3.0 Pa)<sup>[11]</sup>,而且检测指标多为胞外矿化基质沉积、骨钙蛋白、骨桥蛋白这类长期指标,具有预测性的短期响应指标则研究较少。因此,本课题组使用结构较为均匀的 $\beta$ -TCP生物陶瓷多孔支架,自行设计加工了灌注装置,通过减小入口面积、增加入口流速等手段,使支架内的流体剪应力达到了骨生理水平,并对这一水平下支架内剪应力分布、细胞黏附、细胞力学敏感性和早期分化进行研究,以揭示三维条件下流体剪应力对骨细胞的影响规律。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和灌注式流动腔

圆柱体 $\beta$ -TCP多孔支架购自上海贝奥路生物材料有限公司。 $\beta$ -TCP纯度大于95%,孔隙率( $75 \pm 10$ )%,内部球形孔径( $500 \pm 150$ ) $\mu\text{m}$ ,孔内连通径为( $150 \pm 50$ ) $\mu\text{m}$ ,孔间沟通率大于99%,直径为6.0 mm,高度为11.0 mm。研究证实这类支架无细胞毒性和排斥反应,无过敏、炎症、致畸、致癌等不良反应,具有良好的生物安全性,已在多项基础研究和临床研究中使用<sup>[12-13]</sup>。标准T25细胞培养瓶(Corning,美国),优级胎牛血清(Gibco,美国), $\alpha$ -MEM培养基、青霉素链霉素、胰蛋白酶(含EDTA, Hyclone,美国),鼠尾胶原I型(生友生物技术有限公司,杭州),噻唑兰(鼎国昌盛生物技术有限公司,北京),二甲亚砜(索莱宝科技有限公司,北京),碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物工程研究所,南

京),酶标仪(680, BIO-RAD, 美国),紫外可见分光光度计(Lambda 900, PerkinElmer, 美国),蠕动泵(BT00-100M, 兰格, 中国)

灌注式流动腔由本实验室自行设计加工(见图1),采用可高温灭菌的医用级聚碳酸酯为主腔体材料,整体加工为圆柱形,中间有一横隔,用来放置和固定支架,采用医用硅胶管进行连接,数字显示蠕动泵精确控制转速,转速最小步进为0.1 r/min。实验过程中,流动腔、储液槽均放置在细胞培养箱中,蠕动泵放置在培养箱外,避免污染。

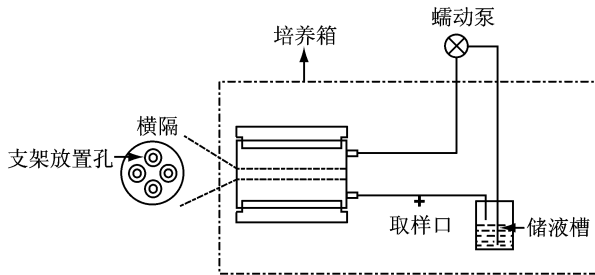


图1 灌注式流动腔示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the perfusion flow chamber

## 1.2 细胞培养和接种

实验采用 MC3T3-E1 成骨样细胞株(购自 ATCC 细胞库),细胞培养使用标准 T25 细胞培养瓶, $\alpha$ -MEM 培养基,10% 优级胎牛血清,1% 青霉素链霉素。培养瓶中细胞密度达到 80 ~ 90% 时,加入 0.25% 胰蛋白酶消化,1 500 r/min 离心 5 min,配成约  $2.5 \times 10^6$ /mL 的细胞悬液待用。将预先用鼠尾 I 型胶原预处理过的支架放入固定用的硅胶短管中,用移液枪吸取 300  $\mu$ L 细胞悬液,逐滴滴加在支架上表面,并多次重复。接种完毕后,缓缓加入完全培养基没过支架表面,并转移支架到细胞培养箱中使细胞静置贴壁培养,每 24 h 进行半换液。

## 1.3 加载过程

细胞在支架内静置生长 72 h 后取出,2 支放入 50 mL 无菌离心管,每管加入含 2% 优级胎牛血清,1% 青霉素链霉素的  $\alpha$ -MEM 培养基 15 mL,作为静态组;另外 2 支安装到流动腔中作为加载组,加入相同体积培养基,排出腔体内空气后,转入培养箱内静置 45 min,以消除安装过程的影响。开启蠕动泵加载 5、15、30、60、120、360 min 时分别取静态组和加载组培养液各 1 mL,迅速转入  $-20$   $^{\circ}$ C 冷冻保存待

用。实验结束后将加载和静态组支架全部取出待用。选择 6 h 最大加载时间主要依据预实验结果以及排除细胞增殖的对黏附率的影响。

## 1.4 剪应力数值计算模型的建立和分析

对试验用  $\beta$ -TCP 多孔支架进行 CT 扫描数据,根据扫描数据建立了剪应力数值计算模型,通过非线性流固耦合的数值计算方法<sup>[14]</sup>,获得试验条件下多孔支架的内部剪应力详细分布和规律。非线性流固耦合的数值计算基于有限元分析软件 ANSYS 11.0 平台,通过考虑大变形固体场(多孔支架固体部分)参数和考虑湍流的流体场(多孔支架中培养液)参数的交叉迭代,非线性流固计算结果达到收敛状态,获得收敛解。其中,通过电子万能试验机 DSS-25T 测得试验用多孔支架的弹性模量为 110.02 MPa,泊松比为 0.3。与试验相对应,共计算和分析 5、6、7、8、9、10 mL/min 6 个流量条件下支架内的剪应力分布和规律。

## 1.5 检测指标

**1.5.1 细胞活性检测** 细胞活性采用经典的噻唑兰比色法(MTT)进行检测。MTT 溶液浓度为 10 mg/mL,与培养基体积比 1 : 10。完成实验的支架加入 MTT 溶液后 37  $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h,加入 2.1 mL 二甲亚砜(DMSO)反复冲洗支架,直到 DMSO 溶液颜色不变。用酶标仪检测 DMSO 溶液在 490 nm 处的吸光度,并用标准曲线定量。为了消除实验过程细胞状态、代数和环境噪音等因素的影响,将同一次实验的加载组和静态组的数据相比,得到加载组与静态组细胞活性的相对百分数,研究细胞活性的变化规律,以表征细胞在支架上的黏附。

**1.5.2 NO 检测** 采用格里斯试剂(Griess Reagent)对培养基中的 NO 稳定代谢产物——亚硝酸根离子( $\text{NO}_2^-$ )进行检测。按格里斯试剂与培养液样品体积比 1 : 2 加入,室温避光反应 20 min,紫外可见分光光度计检测 540 nm 处吸光度后带入标准曲线,得到 NO 浓度,之后用各时间点培养基体积和 MTT 结果均化 NO 量。将同一次实验中加载组和静态组的数据相比,得到 NO 的相对增加倍数和产生率,用于研究 NO 的变化规律,以表征细胞在支架上对剪应力相应的敏感性。

**1.5.3 ALP 检测** 采用 ALP 试剂盒检测静态组和加载组加载 6 h 后的培养液,用 MTT 法测得的细胞

活性均化,得到 ALP 的相对产生量,将同一次实验中加载组与静态组的 ALP 相对产生量相比,得到 ALP 的相对增加倍数,用于研究 ALP 的变化规律,以表征细胞在支架内的分化程度。

## 1.6 统计学分析

实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  的形式表示,使用 Excel 2010 进行单因素方差分析, $P < 0.05$  认为在统计学上具有显著性差异, $P < 0.01$  认为在统计学上具有极显著差异。

## 2 结果

### 2.1 三维支架中的剪应力分布

计算发现,三维多孔支架中流体剪应力的分布尽管比较复杂,也存在明显的规律。支架内单个孔的不同位置剪应力差距较大,支架不同区段剪应力分布也比较悬殊。将各流量下支架入口、中段和出口处(分别对应图中的左、中、右数值)的壁面剪应

力计算结果绘制成图 2。可以看出,支架入口和出口处的剪应力明显大于中段的剪应力,是因为入口和出口处液体流速较大,且存在处于不稳定状态的湍流;而中段液体流动速度已经达到稳定状态,对应的壁面剪应力也减小。计算结果显示湍流所占范围和数值均很小,故采用全段数值进行分析,而不是仅采用稳定区数值来计算平均剪应力。入口和出口位置的剪应力比较发现,出口处最大剪应力略大于入口处最大剪应力,而且这一差别随着流量的增加更加显著。最小剪应力的规律则刚好相反,入口处最小剪应力随着流量的增加逐渐增大,波动范围为  $0.088 \sim 0.1$  Pa,变化不大;而出口处最小剪应力随着流量增加却有明显的下降,波动范围为  $0.596 \sim 0.932$  Pa,变化大,说明出口处液体流动更加不稳定,可能是出口边界条件和重力对流速的加成作用。从单个孔来看,每个孔的最窄处剪应力都为最宽处的 10 倍以上。

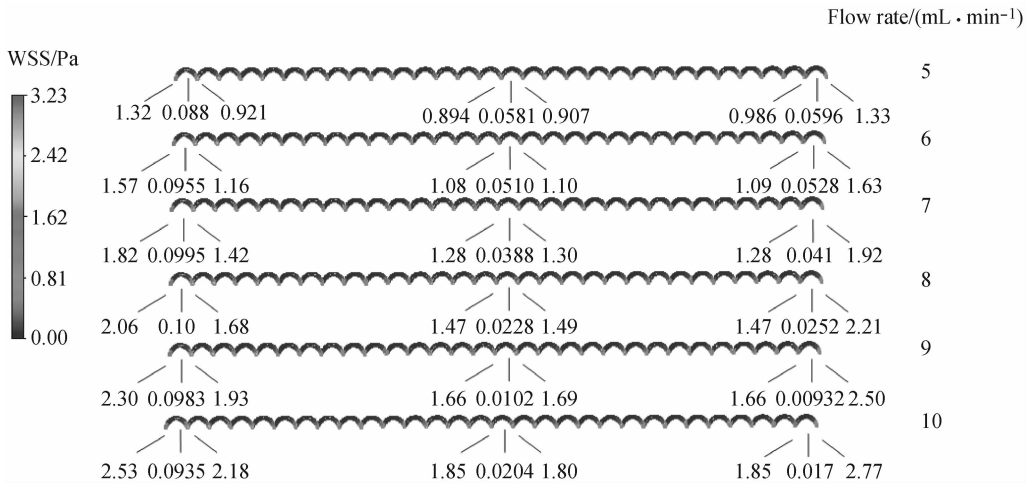


图 2 支架中不同区段剪应力

Fig. 2 Shear stress in different sections of the scaffold

各流量下支架数值计算结果的剪应力分布如图 3 所示。图中横坐标为剪应力,纵坐标为该段剪应力所占百分比,将剪应力和它所对应的百分比相乘后求和,得到每个流量下的平均剪应力,用该数值来表征每个流量的平均剪应力水平。各流量下  $0 \sim 0.1$  Pa 范围的剪应力占了最大比例( $41.1\% \sim 49.7\%$ );而且随着流量的增加,剪应力的分布明显向高剪应力区偏移。随着支架入口流量的增加,支

架内剪应力的变化范围也不同,最小范围为  $0.1 \sim 1.7$  Pa,而当流量达到 9 和 10 mL/min 时,剪应力范围分别达到了  $0.1 \sim 2.9$  Pa 和  $0.1 \sim 3.3$  Pa,覆盖了文献[11]中报道中的生理范围。具体结果如表 1 所示。

### 2.2 细胞黏附

将加载 6 h 与静置支架内的细胞活性相比,得到各流量(以对应的平均剪应力表示)下细胞相对

黏附率(见图4):平均剪应力小于0.4 Pa时,细胞的相对黏附率在74%~81%波动;当达到0.41 Pa,细胞黏附率陡降到60.22%,大量细胞不能维持黏附。

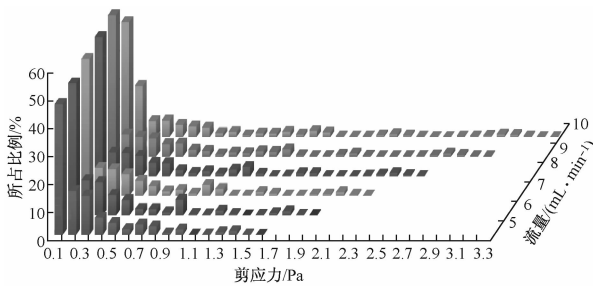


图3 支架内各流量下剪应力的分布图

Fig. 3 Shear stress distributions at different flow rates in the scaffold

表1 支架入口流量与剪应力比较

Tab. 1 Comparison between flow rate, range of shear stress and average shear stress

流量/(mL·min <sup>-1</sup> )	剪应力覆盖范围/Pa	平均剪应力/Pa
5.0	0.1 ~ 1.6	0.232
6.0	0.1 ~ 1.9	0.271
7.0	0.1 ~ 2.2	0.304
8.0	0.1 ~ 2.5	0.339
9.0	0.1 ~ 2.9	0.372
10.0	0.1 ~ 3.3	0.412

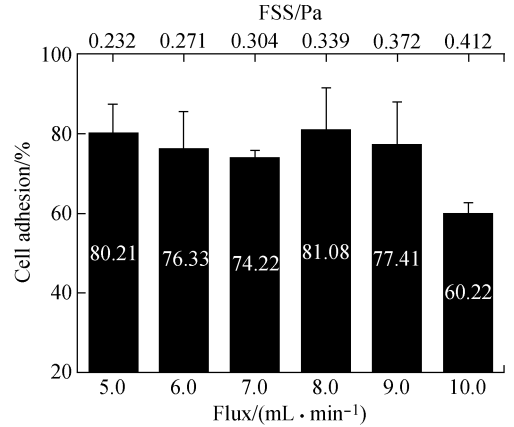
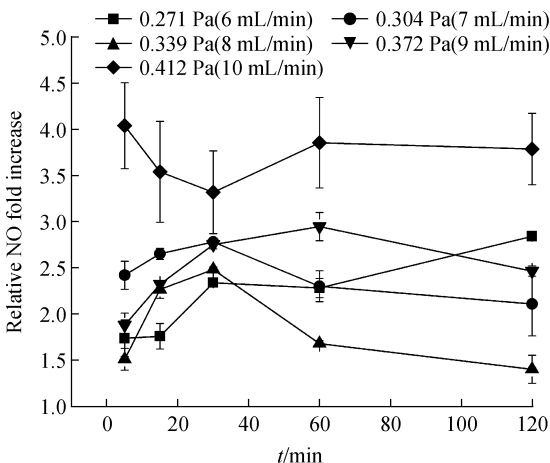


图4 支架内流量、剪应力与细胞黏附的关系

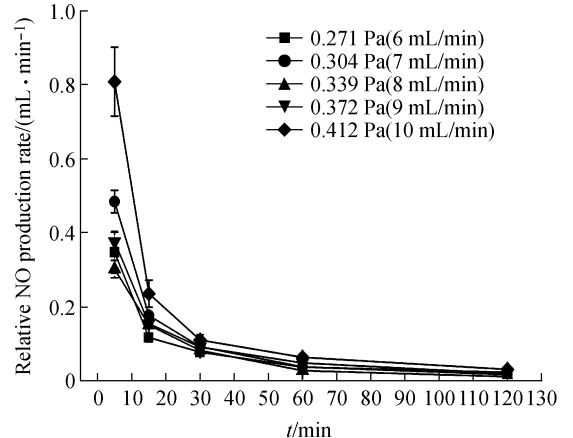
Fig. 4 Cell adhesion percentage under different FSSs at different FSS rates

### 2.3 NO产生率

对各流量(以对应的平均剪应力表示)条件下加载5、15、30、60和120 min 5个时间点的样品进行检测,计算得到NO的相对增加倍数(见图5(a))和相对产生率(见图5(b))。结果表明,这5个剪应力条件下,NO的产生率均在加载后5 min达到最大,15 min显著降低,30 min后NO产生率趋近于0,NO浓度维持稳定。NO产生率与剪应力变化率成正比,与剪应力大小没有明显关系。



(a) NO 相对增加倍数



(b) NO 相对产生率

图5 支架内不同剪应力细胞分泌的NO随时间的变化曲线

Fig. 5 NO production-time curves under different FSSs in the scaffold (a) Relative NO fold increase curve, (b) Relative NO production rate

## 2.4 ALP 水平

随着流量(以对应的平均剪应力表示)的增大,ALP 的增加倍数从 0.824 增加到 1.498;平均剪应力为 0.232、0.271 和 0.304 Pa 的 3 个条件下,ALP 增加倍数有非常显著的上升 ( $P < 0.01$ ),而在 0.304、0.339、0.372、0.412 Pa 这 4 个条件之间 ALP 的增加倍数变化不大,没有明显差异 ( $P > 0.05$ , 见图 6)。

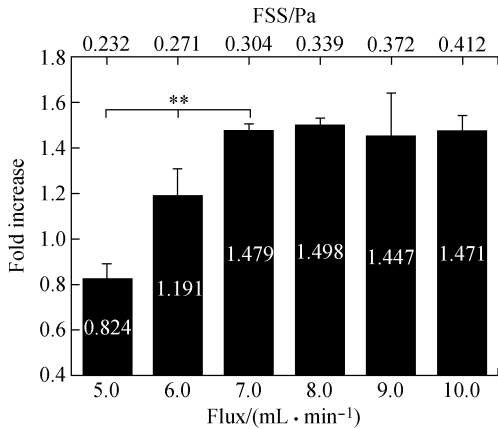


图6 支架内流量、剪应力对细胞碱性磷酸酶的影响 (\*\*  $P < 0.01$ )

Fig. 6 ALP level under different FSSs at different FSS rates

## 3 讨论

$\beta$ -TCP 三维多孔支架是一种具有应用前景的可降解生物陶瓷支架,已在骨组织修复中应用<sup>[15]</sup>。它具有与天然骨组织相近的三维多孔结构,根据这一特点构建的三维流动加载模型可以比二维模型更真实的模拟骨组织内细胞的力响应情况。利用自制的灌注式流动腔,通过减小流体入口面积、增大流速,使支架内最大流体剪应力达到 3.3 Pa(见图 3),达到了文献[11]中报道的骨生理剪应力的上限,但这一条件下细胞的黏附率只有 60.22%,大量细胞不能维持正常黏附。而与生理剪应力上限最接近的 2.9 Pa 的条件下,细胞黏附率上升到 77.21%。更低的剪应力条件下,成骨细胞的黏附率维持在 80%左右,表明实验所采用的细胞接种方法和支架的预处理方法以及支架材料本身可有效支持细胞黏附。加载后细胞黏附与静置状态相比降低,主要原因可能是在加载 6 h 的过程中,支架内的剪应力,特别是高剪应力区的剪应力导致细胞被流体冲掉或死亡。

NO 是与骨组织代谢相关的一种重要信号分子,许多研究表明 NO 在骨重建、骨组织细胞的生长和分化<sup>[16]</sup>中发挥着重要作用,同时也是骨组织细胞力学敏感性的指标。NO 对力学刺激非常敏感,低强度的液体晃动、较强的环境噪音、环境温度的波动都会刺激细胞分泌 NO。由于实验的对照——未加载组也处于三维环境,受到一定的静水压力刺激,故静态组仍会分泌一定水平的 NO,且呈现一种缓慢的波动上升状态;实验中单纯对比加载组的 NO 水平会造成一定的误差,故使用加载组与静态组的比例来表征 NO 的变化规律。实验发现,NO 对力学信号的响应非常迅速,NO 产生率在加载后 5 min 即达到最大值,动静比例也达到最大的 1.74 ~ 4.04 倍,15 min 时 NO 产生率明显下降,动静比例降至 1.76 ~ 3.54 倍,超过 30 min 后 NO 产生率则趋近于 0,成骨细胞 NO 分泌量和消耗量基本达到平衡。这种结果产生的原因可能是由于成骨细胞的 NO 释放量主要与力学信号的变化率有关<sup>[17]</sup>,加载开始时剪应力变化率最高,此时细胞受到短时间高强度的剪应力刺激后迅速被激活并大量释放 NO,骨生成作用增强;而 15 min 时剪应力变化率降低,NO 释放量也随之降低,骨生成作用减弱;30 min 后随着时间的延长,剪应力变化率逐渐趋近于 0,NO 达到平衡状态。这一结果与文献[4,17]在二维条件下的结果一致。

成骨细胞受到机械力刺激后会引发细胞向表现型分化,表现为细胞 ALP 活性增强,细胞增殖速度减慢,细胞外基质分泌增加等<sup>[18]</sup>。ALP 为细胞早期分化指标,比较 6 h 后加载和静态组的比例发现,成骨细胞分化水平随着剪应力的增加明显上升,最高达到了静态组的 1.498 倍。在平均剪应力小于 0.339 Pa 的条件下,ALP 增加量最为显著,而 0.304 ~ 0.412 Pa 剪应力水平下 ALP 增加量在 1.447 ~ 1.498 之间小幅波动,4 组数据之间没有显著性差异,说明较低剪应力条件下,成骨细胞的分化与剪应力成一定的比例关系;而在高剪应力水平下,两者之间没有明显的比例关系。另外观察到,流量最小的 0.23 Pa 条件下,加载组的 ALP 分泌量反而小于静态组,细胞的黏附水平大,而分化水平低。对比图 3 中剪应力分布,推断可能是这一剪应力水平下,支架内低剪应力所占比例最大,多数细胞受到的剪应力小,分化作用不明显,而培养基的流动却加快了氧气

和营养物质的输运和交换,促进了细胞的黏附和生长,导致了加载组 ALP 浓度低于静态组。

## 4 结论

三维多孔支架与天然骨组织孔状结构相似,其中的剪应力分布非常复杂,流体入口、中段、出口处剪应力差别大,单个孔的不同位置剪应力差别也很大。采用多次接种,配合胶原蛋白预处理支架可以维持成骨细胞在  $\beta$ -TCP 支架的黏附和生长,在平均剪应力小于 0.4 Pa、最大剪应力小于 3.3 Pa 的条件下可以维持接种在支架内 74% 以上的细胞黏附。三维条件下 NO 呈现与二维相似的规律,与剪应力变化率有关。平均剪应力小于 0.304 Pa,细胞的分化水平随着剪应力增大而增大,大于这一剪应力细胞分化水平不再明显变化。

## 参考文献:

- [1] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor [J]. *J Biomed Mater Res*, 2002, 62(1): 136-148.
- [2] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Holtorf HL, *et al.* Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 14683-14688.
- [3] Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, *et al.* Ex vivo real-time observation of Ca<sup>2+</sup> signaling in living bone in response to shear stress applied on the bone surface [J]. *Bone*, 2013, 53(1): 204-215.
- [4] Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J, *et al.* The production of nitric oxide and prostaglandin E-2 by primary bone cells is shear stress dependent [J]. *J Biomech*, 2001, 34(5): 671-677.
- [5] Turner CH, Takano Y, Owan I, *et al.* Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1996, 270(4): E634-639.
- [6] Vatsa A, Smit TH, Klein-Nulend J. Extracellular NO signalling from a mechanically stimulated osteocyte [J]. *J Biomech*, 2007, 40(Suppl 1): S89-95.
- [7] Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, *et al.* Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in bio-degradable polymer foam scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(11): 1279-1288.
- [8] Leclerc E, David B, Griscom L, *et al.* Study of osteoblastic cells in a microfluidic environment [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(4): 586-595.
- [9] 孙晓江,戴冠戎,谢幼专,等. 灌注型生物反应器中流速对人骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响[J]. *医用生物力学*, 2012, 27(5): 582-587.  
Sun XJ, Dai KR, Tang TT, *et al.* Effect of perfusion flow rate on proliferation and osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2012, 27(5): 582-587.
- [10] 孙晓江,戴冠戎,汤亭亭,等. 灌注式生物反应器中大段多孔磷酸三钙载体内流场分布的模拟研究[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(1): 21-27.  
Sun XJ, Dai KR, Tang TT, *et al.* Simulation of flow field within large scale porous  $\beta$ -TCP scaffold in perfusion bioreactor [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(1): 21-27
- [11] 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.
- [12] Sun X, Gan Y, Tang T, *et al.* In vitro proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in autologous plasma derived from bone marrow [J]. *Tissue Eng*, 2008, 14(3): 391-400.
- [13] Dai LY, Jiang LS. Anterior cervical fusion with interbody cage containing beta-tricalcium phosphate augmented with plate fixation: A prospective randomized study with 2-year follow-up [J]. *Euro Spine J*, 2008, 17(5): 698-705.
- [14] 翟雅斌,崔玉红,李文娇. 方形孔结构细胞支架非线性流固耦合数值计算[J]. *医用生物力学*, 2010, 25(1): 4-10.  
Zhai YB, Cui YH, Li WJ. Numerical computation on the scaffolds models with regular square holes using nonlinear fluid-solid-coupling approaches [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(1): 4-10.
- [15] Xie YZ, Hardouin P, Zhu ZN, *et al.* Three-dimensional flow perfusion culture system for stem cell proliferation inside the critical-size beta-tricalcium phosphate scaffold [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(12): 3535-3543.
- [16] Wimalawansa SJ. Nitric oxide and bone [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1192: 391-403.
- [17] Bacabac RG, Smit TH, Mullender MG, *et al.* Nitric oxide production by bone cells is fluid shear stress rate dependent [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(4): 823-829.
- [18] Johnson LD, Mcallister TN, Frangos JA. Fluid flow stimulates rapid and continuous release of nitric oxide in osteoblasts [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1996, 271(1): E205-208.