

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.36.003 [http://www.crter.org]

王秋实, 杨孝勤, 朱晓文, 胡静, 邹淑娟. 动静态不同牵张条件下大鼠骨髓间充质干细胞的增殖与分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(36):6396-6402.

动静态不同牵张条件下大鼠骨髓间充质干细胞的增殖与分化*[◆]

王秋实¹, 杨孝勤², 朱晓文¹, 胡静¹, 邹淑娟¹(¹口腔疾病研究国家重点实验室, 四川省成都市 610041; ²南方医科大学广东省口腔医院, 广东省广州市 510515)

文章亮点:

1 实验应用自行研制的多单元细胞拉伸与压缩装置(专利号: ZL 20091 0164248.0), 这台装置能够模拟临床的单轴牵张方式, 8个单元可同时进行牵张, 从而降低了组内误差, 提高了实验准确度。

2 国内外相关研究都是单独研究动、静态机械牵张力对于间充质干细胞的影响, 而该实验将动、静态的机械力同时纳入研究范围, 设组比较其对细胞影响的不同, 实验还将模拟临床牵张成骨的牵张方式单独设组, 与动、静态牵张方式进行比较, 这是同类研究间充质干细胞机械牵张的文献少见的。

3 实验结果验证了静态牵张刺激细胞的增殖作用优于动态牵张, 而动态牵张对于大鼠骨髓间充质干细胞成骨向分化刺激作用更为明显, 模拟临床的混合牵张方式综合了两者的优点对于细胞增殖和分化都有不同程度的促进作用, 这些也是以往文献所没有的。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 间充质干细胞; 牵张成骨; 机械牵张; 碱性磷酸酶; Runx2; 骨钙素; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

主题词:

干细胞; 细胞分化; 细胞增殖; 骨钙素

基金资助:

国家自然科学基金(81070859)*

摘要

背景: 在体外和体内关于细胞对于不同的机械牵张反应的大量研究表明, 牵张能够刺激成骨。然而鲜有文献报道不同的牵张方式对于同种细胞的影响有何不同。

目的: 比较不同机械牵张方式对大鼠骨髓间充质干细胞的影响。

方法: 分离培养大鼠骨髓间充质干细胞, 应用自行研制的牵张装置对骨髓间充质干细胞分别施加动态、静态和模拟临床的混合牵张刺激, 分别检测3种刺激方式下骨髓间充质干细胞的增殖能力、碱性磷酸酶活性及Runx2基因的mRNA表达, 并测量细胞骨钙素的分泌情况。

结果与结论: 静态牵张组与对照组相比, 细胞增殖能力提高18.67%, 碱性磷酸酶活性、Runx2表达及骨钙素分泌无明显差异; 动态牵张组相对于对照组, 细胞碱性磷酸酶活性提高60.33%, Runx2表达上升49.67%, 细胞外骨钙素的分泌提高了48%, 然而细胞增殖则受到了抑制; 混合牵张组相对于对照组, 细胞增殖能力稍有上升但无统计学差异, 其对碱性磷酸酶活性、Runx2表达以及骨钙素的分泌有一定的促进作用, 但没有动态牵张组明显。结果提示, 静态牵张能够显著刺激骨髓间充质干细胞的增殖, 而动态牵张对于刺激骨髓间充质干细胞成骨向分化作用更为明显, 混合牵张方式对于细胞增殖及成骨分化均有一定的促进作用。

Proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells under different mechanical strains

Wang Qiu-shi¹, Yang Xiao-qin², Zhu Xiao-wen¹, Hu Jing¹, Zou Shu-juan¹(¹State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ²Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: *In vitro* and *in vivo* studies of cell response to a variety of mechanical loadings have demonstrated the stimulation of bone formation by loads. However, the effects of different mechanical strains on the same cells have never been adequately studied by far.

OBJECTIVE: To investigate the effects of different mechanical strains on rat bone marrow mesenchymal stem cells.

METHODS: Rat bone marrow mesenchymal stem cells were isolated and cultured *in vitro*. Bone marrow mesenchymal stem cells were subjected to different stimulations including dynamic stretch, static stretch and hybrid stretch through the use of custom-made mechanical stretch device. Cellular proliferation, alkaline phosphatase activity and mRNA expression of Runx2 of bone marrow mesenchymal stem cells were detected

王秋实, 男, 1986年生, 四川省简阳市人, 汉族, 2010年四川大学毕业, 主要从事细胞牵张成骨方面的研究。
415070573@qq.com

通讯作者: 邹淑娟, 口腔疾病研究国家重点实验室, 四川省成都市 610041
shujuanzou@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)36-06396-07

收稿日期: 2012-12-21
修回日期: 2013-02-17
(20121221015/D·S)

Wang Qiu-shi, State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
415070573@qq.com

Corresponding author: Zou Shu-juan, State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
shujuanzou@yahoo.com.cn

Received: 2012-12-21
Accepted: 2013-02-17

and the secretion of osteocalcin was evaluated under three different stretch modes respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared to the control group, cell proliferation increased by 18.67%, however, alkaline phosphatase activity, Runx2 expression and osteocalcin secretion were not changed obviously in the static stretch group. Compared to the control group, alkaline phosphatase activity, Runx2 expression and osteocalcin secretion increased by 60.33%, 49.67% and 48% respectively; however, cell proliferation was inhibited, in the dynamic stretch group. Compared to the control group, cell proliferation was slightly, but not significantly, increased in the hybrid stretch group, and the alkaline phosphatase activity, Runx2 expression and osteocalcin secretion increased although the increases were not as apparent as those in the dynamic stretch group. These findings suggest that static mechanical strain can significantly promote cell proliferation, the dynamic mechanical strain more greatly promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, and the hybrid mechanical strain promotes the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

Subject headings: stem cells; cell differentiation; cell proliferation; osteocalcin

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81070859*

Wang QS, Yang XQ, Zhu XW, Hu J, Zou SJ. Proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells under different mechanical strains. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(36):6396-6402.

0 引言 Introduction

骨髓间充质干细胞可以分化成为软骨、成骨、成脂和心肌细胞, 在生物医学的研究和应用中具有重要的价值^[1-5]。因而, 多潜能的骨髓间充质干细胞被用大量用于修复骨、软骨缺损以及受损心肌。骨是一个动态的组织, 一直进行不断的重建来保持其结构完整性和代谢活性, 而骨组织新生的细胞学基础是骨髓间充质干细胞能向成骨细胞分化。Altman等^[6]研究证实, 骨髓间充质干细胞在力学刺激的作用下能够成骨向分化, 经过力学刺激后, 骨髓间充质干细胞的I型胶原、II型胶原以及tenascin-cmRNA表达增加, 同时还能提高碱性磷酸酶活性。该研究提示力学刺激是促使骨髓间充质干细胞向成骨细胞定向分化的一种很重要的因素。Qi等^[7]在体外应用四点加力装置证实了机械牵张可以促进间充质干细胞增殖, 增加碱性磷酸酶活性, 上调Cbfa-1(Runx2)和Ets-1基因表达。Kim等^[8]在体外运用静态牵张, 证实了静态牵张在骨形态发生蛋白2诱导的C2C12多潜能成肌细胞成骨分化过程中能起到协同作用, 静态牵张和形态发生蛋白2共同作用, 能提高细胞的碱性磷酸酶活性, 上调成骨相关因子的表达。Campisi等^[9]在兔子下颌骨牵张成骨中采用模拟临床的牵张方式, 研究了形态发生蛋白在下颌骨牵张成骨过程中的表达, 证实了形态发生蛋白在机械应力诱导成骨分化中参与了机械应力转化为生物反应的过程。后续的大量研究分别从体内和体外不同角度揭示了细胞对于机械应力的生物反应。然而现有的文献多为单独研究动态、静态的机械应力对间充质干细胞的影响, 鲜有文献比较动态、静态机械应力对于间充质干细胞影响的差别^[7, 10-35]。实验应用自行研制的多单元细胞拉伸与压缩装置(专利号: ZL 20091 0164248.0)对骨髓间充质干细胞分别施加动态和静态, 以及模拟临床的力学刺激, 观察不同加载方式对骨髓间充质干细胞

增殖能力, 成骨相关基因表达及细胞外骨钙素分泌的影响, 为骨与骨缝牵张成骨的分子生物学机制探索提供一些参考依据。

1 材料和方法 Materials and methods

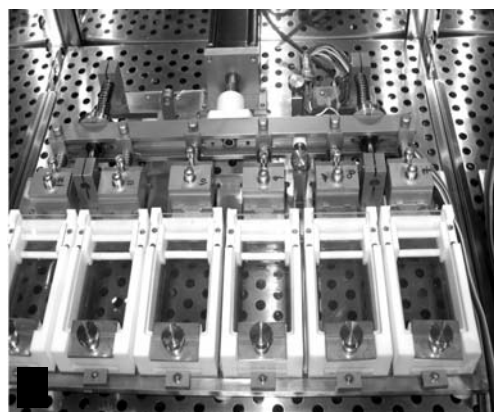
设计: 细胞体外观察。

时间及地点: 于2011年6月至2012年7月在四川大学华西附二院公共实验室完成。

材料:

实验动物: 选取健康SD大鼠2只, 3周龄, 体质量20g左右, 购于四川大学华西实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK(川)-10-2006。实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

牵张装置: 实验装置由控制单元、驱动单元和培养单元三部分组成, 见图1。



注: 实验装置由控制单元、驱动单元和培养单元三部分组成。

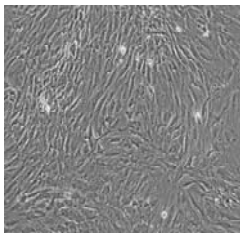
图1 细胞牵张时情形, 为牵张装置, 获国家发明专利, 专利号: ZL 20091 0164248.0

Figure 1 A mechanical stretch device (state patent No. ZL 20091 0164248.0) used in cell stretch

通过控制单元设置参数, 驱动单元带动培养单元上的硅胶膜, 按照预定的频率和长度进行前后向的拉伸达到实验目的。培养单元通过高压蒸汽灭菌, 在细胞种板前需添加培养基a-MEM浸没硅胶膜7 d。

实验方法:

大鼠骨髓间充质干细胞的分离培养: 于无菌条件下取下股骨, 去除肌肉组织, 用含抗生素的PBS冲洗2遍以上; 小心去除股骨头, 用a-MEM培养基将骨髓冲出, 再将悬液收集于25 cm²的培养瓶中, 并用空针反复抽打, 制成细胞悬液。原代细胞培养于含有50 U/mL青霉素、50 mg/L链霉素和体积分数10%胎牛血清的a-MEM培养基中, 24 h后换液。以后每2 d换液1次分离纯化大鼠骨髓间充质干细胞, 待细胞生长达80%融合后, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化传代, 细胞传至3代后待用, 见图2。



注: 第3代大鼠骨髓间充质干细胞贴壁于硅胶膜上, 细胞形态呈多边形、梭形, 排列紧密。

图2 硅胶膜上培养两天的第3代大鼠骨髓间充质干细胞($\times 100$)

Figure 2 Passage 3 rat bone marrow mesenchymal stem cells after 2 d culture on silica gel membrane ($\times 100$)

流式细胞鉴定: 当培养的第3代骨髓间充质干细胞汇合至80%时, 2.5 g/L胰蛋白酶37 °C常规消化细胞, 加入含体积分数4%胎牛血清的PBS封闭液终止消化, 以 3×10^9 L⁻¹数目的细胞分装于流式管, 离心半径13.5 cm, 1 000 r/min, 8 min离心后弃上清, 加入PBS封闭液3 mL, 常温封闭20 min。1 000 r/min, 8 min离心后弃上清。加入抗体(Biolegend, USA), 轻微震荡1 min, 4 °C避光孵育30 min。加入3 mL PBS封闭液, 吹打均匀, 离心, 加入300 μ L PBS, 200目细胞筛过滤, 上机检测。

骨髓间充质干细胞种板及诱导成骨向分化: 取第3代骨髓间充质干细胞2.5 g/L胰蛋白酶消化后1 000 r/min, 8 min离心, 重悬后稀释成浓度为 2×10^4 L⁻¹的细胞悬液。分别取2 mL接种至12个细胞培养单元的硅胶膜上, 待24 h细胞贴壁后补加10 mL a-MEM培养液完全浸没硅胶膜, 37 °C, 体积分数5%CO₂培养箱培养24 h, 然后换为成骨诱导培养基, 含有体积分数10% FBS, 50 mg/L-抗坏血酸、10 mmol/L β -甘油磷酸钠和0.1 mmol/L 地塞米松的a-MEM, 培养2 d, 2 d后开始对诱导的细胞进行牵张。

实验分组: 将12个单元随机分为4组, 分别设置为对照组, 静态牵张组, 混合牵张组及动态牵张组。对照组培养单元未施加牵张力; 静态牵张组以5%拉伸应变对培养单元加力, 频率为0 Hz; 混合牵张组以每天1%的拉伸应变, 频率为0 Hz对培养单元加力, 硅胶膜每天逐渐被拉长, 牵张5 d, 共计牵张应变5%; 动态牵张组以5%拉伸及收缩应变, 1 Hz的牵张频率对硅胶膜沿其长轴方向来回牵张2 h \times 3次, 时间间隔6 h。

检测指标及检测方法: 细胞培养5 d后, 细胞刷收集硅胶膜上贴壁细胞做骨髓间充质干细胞增殖能力, 碱性磷酸酶相对活性检测; 并提取细胞mRNA行PCR检测, 测定成骨相关因子Runx2的相对表达量, 同时收集1 mL单元内的培养液检测骨钙素浓度。

骨髓间充质干细胞增殖能力: 细胞重悬混匀后取1 mL通过细胞计数法计数不同牵张方式在细胞受力后5 d的细胞数量, 从而检测骨髓间充质干细胞受到不同牵张方式的增殖情况。

碱性磷酸酶活性检测: 碱性磷酸酶分解磷酸苯二钠, 产生游离酚和磷酸, 酚在碱性溶液中与4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物, 根据红色深浅可以测定碱性磷酸酶活力的高低。收集细胞0.05% triton+超声(冰浴、150 W、3 s间隙)细胞裂解, 参照试剂盒说明书(建成, 南京)进行碱性磷酸酶检测, 采用分光光度计方法, 检测红色醌衍生物浓度测定组间相对酶活力高低。

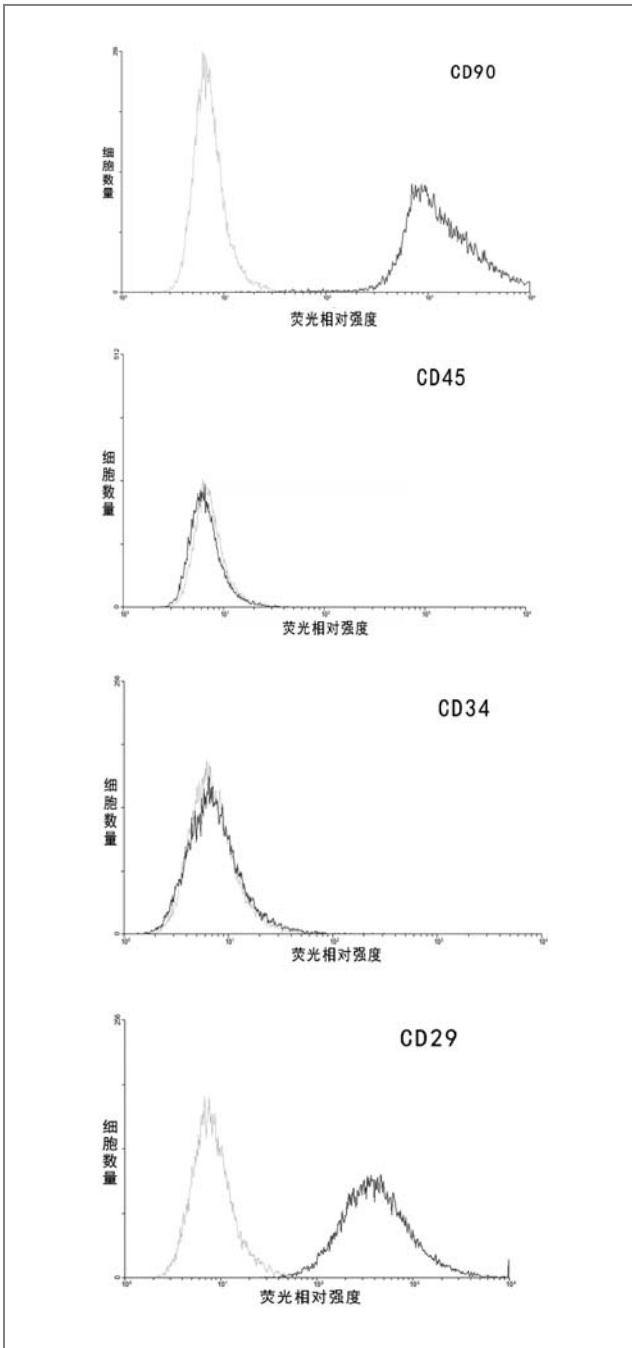
Runx2基因表达检测: 参照Trizol试剂盒说明书提取细胞总RNA(TaKaRa, 大连); 用紫外分光光度计测量其浓度; 采用Takara PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa, 大连)在BioRad 1000TM 上反转录成cDNA。再以第一链cDNA为模板, 采用SYBR Green I染料进行实时荧光定量RT-PCR反应。PCR反应所用的上游引物为5'- ctt cgt cag cgt cct atc agt tc-3', 下游引物为5'-cag cgt caa cac cat cat tct g-3', 以GAPDH为内参基因, 分析Runx2 mRNA相对表达量, 其上游引物为5'- tat gac tct acc cac ggc aag t-3', 下游引物为5'-ata ctc agc acc agc atc acc-3'。PCR扩增条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 57 °C 30 s, 共40个循环。

骨钙素检测: 于第5天收集单元内1 mL培养液离心2 000 r/min, 20 min, 仔细收集上清, 参照ELISA试剂盒(R&D, USA)说明书, 通过吸光度法, 测量培养液内骨钙素相对浓度。

统计学分析: 使用SPSS 20.0统计软件进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示数据差异有显著性意义。数据的绝对值被通过除以对照组的平均值, 转化为相对于对照组的百分数(对照组为100%)。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞的鉴定结果 待鉴定细胞的 CD29, CD90 为阳性, CD34, CD45 为阴性, 符合骨髓间充质干细胞的表面标记, 见图 3。



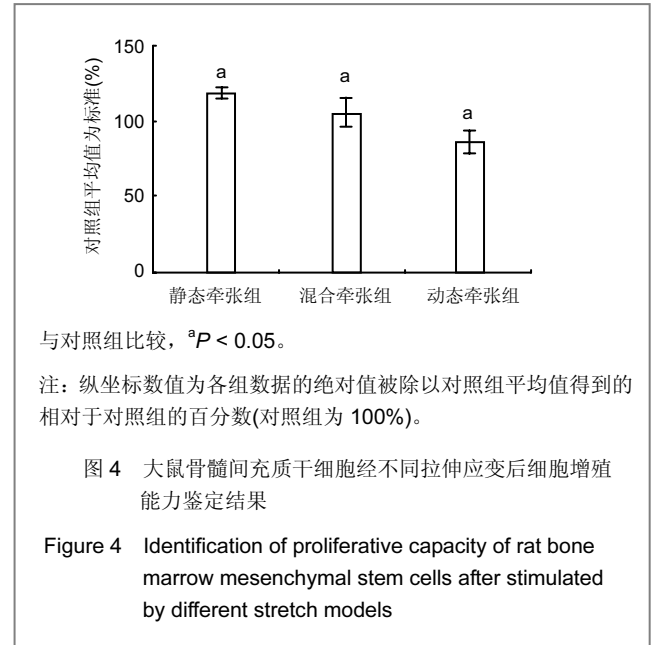
注: 细胞的 CD29, CD90 为阳性, CD34, CD45 为阴性, 说明培养细胞为骨髓间充质干细胞。

图 3 大鼠骨髓基质来源细胞的流式细胞仪分析鉴定结果

Figure 3 Flow cytometry of rat bone marrow stromal stem cells

2.2 骨髓间充质干细胞增殖能力 静态牵张组细胞数相

对于对照组显著提高18.67% ($P < 0.05$); 混合牵张组细胞数相对于对照组提高0.06%, 但差异无显著性意义; 动态牵张组相对于对照组下降13.67% ($P < 0.05$), 见图4。



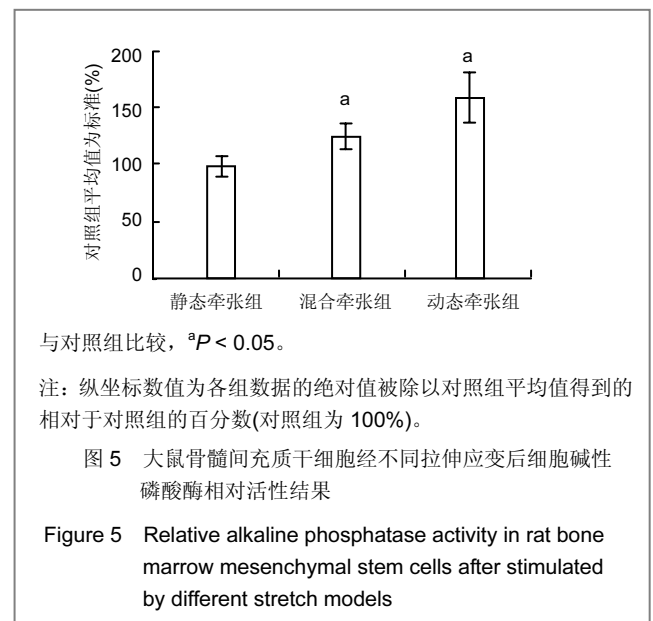
与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注: 纵坐标数值为各组数据的绝对值被除以对照组平均值得到的相对于对照组的百分数(对照组为 100%)。

图 4 大鼠骨髓间充质干细胞经不同拉伸应变后细胞增殖能力鉴定结果

Figure 4 Identification of proliferative capacity of rat bone marrow mesenchymal stem cells after stimulated by different stretch models

2.3 碱性磷酸酶相对活性 静态牵张组碱性磷酸酶活性与对照组比较, 差异无显著性意义。混合牵张组和动态牵张组与对照组比较, 碱性磷酸酶活性分别提高26.33%和60.33%, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。见图5。



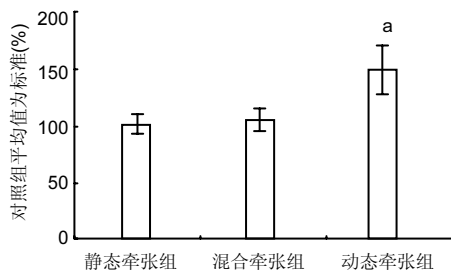
与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注: 纵坐标数值为各组数据的绝对值被除以对照组平均值得到的相对于对照组的百分数(对照组为 100%)。

图 5 大鼠骨髓间充质干细胞经不同拉伸应变后细胞碱性磷酸酶相对活性结果

Figure 5 Relative alkaline phosphatase activity in rat bone marrow mesenchymal stem cells after stimulated by different stretch models

2.4 Runx2的相对表达量 静态牵张组、混合牵张组Runx-2的表达与对照组比较, 差异无显著性意义, 动态牵张组相对于对照组表达提高了49.67%, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。见图6。



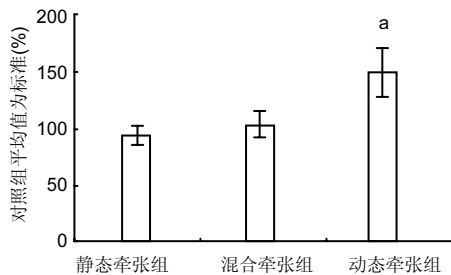
与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注: 纵坐标数值为各组数据的绝对值被除以对照组平均值得到的相对于对照组的百分数(对照组为 100%)。

图 6 大鼠骨髓间充质干细胞经不同拉伸应变后细胞 Runx2 mRNA 的相对表达量

Figure 6 Relative Runx2 mRNA expression in rat bone marrow mesenchymal stem cells after stimulated by different stretch models

2.5 骨钙素的相对浓度 静态牵张组、混合牵张组分泌的骨钙素浓度与对照组比较, 差异无显著性意义, 动态牵张组相对于对照组骨钙素分泌提高了48%, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。见图7。



与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 。

注: 纵坐标数值为各组数据的绝对值被除以对照组平均值得到的相对于对照组的百分数(对照组为 100%)。

图 7 大鼠骨髓间充质干细胞经不同拉伸应变后细胞骨钙素的分泌

Figure 7 Osteocalcin secretion in rat bone marrow mesenchymal stem cells after stimulated by different stretch models

3 讨论 Discussion

实验采用的是自行研制的细胞加载装置, 该仪器能够同时对多个细胞培养单元中的细胞进行单轴的静态或动态的细胞牵张, 使组间受力条件一致, 从而提高了研究效率, 减少了组内误差。由于研究装置不同, 本文的研究结果不能和采用其他牵张装置的研究结果相等, 如Kim等^[8]研究采用的BioFlexs的牵张装置, 其细胞贴壁于薄膜上, 通过垂直向上移动顶端半球状的柱子对薄膜施压使薄膜变形, 从而对薄膜上的细胞产生非单轴

牵张力。该, 实验装置也不同于Qi等^[19]的四点加力装置。相对于这两种加力方式, 该装置产生的为单轴的力, 控制牵张应变的大小和方向更为容易, 而且与临床骨与骨髓的牵张模式更为相似。另外, Altman等^[6]研究的虽然也是单轴牵张, 但是, 由于细胞贴壁于胶原基质中, 培养基添加了成纤维生长因子, 所以, 得到的结果应该区别对待。实验的牵张装置和Haasper等^[18], Jagodzinski等^[36]以及Diederichs等^[26]研究所采用的装置类似, 但他们只是单纯的研究了动态牵张方式对于骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化的影响。

碱性磷酸酶是成骨细胞和成骨细胞分化的关键性酶, 它作为成骨细胞表型特征之一, 在体外钙化中起关键性作用^[37-38]。因此可以把碱性磷酸酶作为骨髓间充质干细胞向成骨细胞转化的重要标志^[39-40]。Runx2因子能调节骨髓间充质干细胞的成骨细胞系分化并能参与到成骨细胞的成熟的调控过程, 被确定为成骨细胞分化的关键因子, 是骨髓间充质干细胞成骨分化和骨发育所必需的^[41-43]。骨钙素是成骨细胞合成分泌的一种非胶原蛋白, 能准确表示成骨细胞的活性, 其主要功能是维持骨的正常矿化速率, 并能够促进骨组织矿物质沉积的正常钙化过程, 对于骨髓间充质干细胞的成骨向分化具有非常重要的作用^[44-46]。

在实验中分别研究了动、静态以及模拟临床的混合牵张模式对大鼠骨髓间充质干细胞的增殖能力和成骨关键因子Runx2表达及对骨矿化具有重要作用的骨钙素分泌的影响, 而细胞的增殖和分化是牵张成骨成功的细胞理论基础, 其保证了新骨的形成。通过实验作者发现, 动态牵张对骨髓间充质干细胞的成骨向分化具有非常显著的促进作用, 其能够提高成骨分化标志物碱性磷酸酶的活性, 提高Runx2成骨因子的mRNA表达, 以及增加对骨基质矿化具有重要作用的骨钙素的分泌^[47-48]。但这次研究发现动态牵张对大鼠的骨髓间充质干细胞的增殖具有抑制作用。

Kang等^[32]通过对脐带间充质干细胞施加5%及10%的动态牵张力得到了与作者这次实验相似的结论, Sumanasinghe等^[13]运用3D胶原基质培养人骨髓间充质干细胞, 并对其施加10%及12%的单轴动态牵张力也发现了类似的结果。然而, Qi等^[7, 19]通过四点加力装置对间充质干细胞实施牵张, 发现了动态牵张虽然能够促进间充质干细胞的成骨向分化, 但是其对于间充质干细胞的增殖却具有促进作用。推测, 可能由于牵张方式和施加牵张力强度、频率以及培养环境的不同, 导致了间充质干细胞增殖结果的差异^[49-50]。本次实验发现静态牵张主要作用是促进细胞的增殖。其对于提高成骨分化标志物碱性磷酸酶的活性、Runx2因子mRNA表达及骨钙素的分泌的作用并不明显, 这和Kim等^[28]运用BioFlex牵张装置对人骨髓间充

质干细胞进行静态牵张得到的结论相似; 另外, 混合牵张模式对于骨髓间充质干细胞的增殖、碱性磷酸酶的活性、Runx2因子mRNA表达及骨钙素的分泌均有一定的促进作用, 在此之前并没有类似实验的相关报道。

总之, 本实验发现为不同的牵张方式对大鼠骨髓间充质干细胞的增殖和分化的作用各有侧重: 静态牵张刺激细胞的增殖作用优于动态牵张, 而动态牵张对于大鼠骨髓间充质干细胞成骨向分化刺激作用更为明显, 模拟临床的混合牵张方式正是综合了两者的优点对于细胞增殖和分化都有不同程度的促进作用。

本实验装置的设计虽然在拉伸方向与加力方式类同于临床, 但仍不能完全模拟体内复杂的受力环境, 而且细胞在硅胶膜应变下产生的张应力也不完全等同于临床上骨与骨缝牵张成骨对于断面的加载方式。因此将来可选择三维培养基质以及开展模拟体内不同细胞之间交互作用的实验研究来进一步揭示牵张和骨髓间充质干细胞增殖和成骨向分化的内在联系。

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实验实施及评估为第一及第二作者, 资料收集为第一及第三及第四作者, 成文为第一作者, 通讯作者(邹淑娟)负责审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

学术术语: 骨钙素是成骨细胞合成分泌的一种非胶原蛋白, 能准确表示成骨细胞的活性, 其主要功能是维持骨的正常矿化速率, 并能够促进骨组织矿物质沉积的正常钙化过程, 对于骨髓间充质干细胞的成骨向分化具有非常重要的作用。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, et al. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*. 2006;39(4):678-683.
- [2] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739-2749.
- [3] Luo Q, Zhang C, Song G. Research progresses of paracrine effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells on wound healing. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2012;29(5):999-1002.
- [4] Salamon A, Toldy E, Nagy L, et al. The role of adult bone marrow derived mesenchymal stem cells in the repair of tissue injuries. *Orv Hetil*. 2012;153(46):1807-1815.
- [5] Steinert AF, Rackwitz L, Gilbert F, et al. Concise review: the clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: current status and perspectives. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(3):237-247.
- [6] Altman GH, Horan RL, Martin I, et al. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J*. 2002;16(2):270-272.
- [7] Qi MC, Hu J, Zou SJ, et al. Mechanical strain induces osteogenic differentiation: Cbfa1 and Ets-1 expression in stretched rat mesenchymal stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(5):453-458.
- [8] Kim IS, Song YM, Cho TH, et al. Synergistic action of static stretching and BMP-2 stimulation in the osteoblast differentiation of C2C12 myoblasts. *J Biomech*. 2009;42(16):2721-2727.
- [9] Campisi P, Hamdy RC, Lauzier D, et al. Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg*. 2003;111(1):201-208; discussion 209-210.
- [10] Simmons CA, Mattis S, Thornton AJ, et al. Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *J Biomech*. 2003;36(8):1087-1096.
- [11] Ignatius A, Blessing H, Liedert A, et al. Effects of mechanical strain on human osteoblastic precursor cells in type I collagen matrices. *Orthopade*. 2004;33(12):1386-1393.
- [12] Jing Y, Li L, Li Y, et al. The effect of mechanical strain on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from rats. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2006;23(3):542-545.
- [13] Sumanasinghe RD, Bernacki SH, Lobo EG. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen matrices: effect of uniaxial cyclic tensile strain on bone morphogenetic protein (BMP-2) mRNA expression. *Tissue Eng*. 2006;12(12):3459-3465.
- [14] David V, Martin A, Lafage-Proust MH, et al. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology*. 2007;148(5):2553-2562.
- [15] Friedl G, Schmidt H, Rehak I, et al. Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(11):1293-1300.
- [16] Ward DF Jr, Salaszyk RM, Klees RF, et al. Mechanical strain enhances extracellular matrix-induced gene focusing and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through an extracellular-related kinase-dependent pathway. *Stem Cells Dev*. 2007;16(3):467-480.
- [17] Haasper C, Drescher M, Hesse E, et al. Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells (hBMSC) by cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone. *Z Orthop Unfall*. 2008;146(5):636-643.
- [18] Haasper C, Jagodzinski M, Drescher M, et al. Cyclic strain induces FosB and initiates osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Exp Toxicol Pathol*. 2008;59(6):355-363.
- [19] Qi MC, Zou SJ, Han LC, et al. Expression of bone-related genes in bone marrow MSCs after cyclic mechanical strain: implications for distraction osteogenesis. *Int J Oral Sci*. 2009;1(3):143-150.

- [20] Sen B, Xie Z, Case N, et al. Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable beta-catenin signal. *Endocrinology*. 2008;149(12): 6065-6075.
- [21] Hanson AD, Marvel SW, Bernacki SH, et al. Osteogenic effects of rest inserted and continuous cyclic tensile strain on hASC lines with disparate osteodifferentiation capabilities. *Ann Biomed Eng*. 2009;37(5):955-965.
- [22] Zhao H, Zhou H, Wang X, et al. Effect of mechanical strain on differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2009;26(3): 518-522.
- [23] Han LC, Qi MC, Sun H, et al. Response of bone marrow mesenchymal stem cells to mechanical stretch and gene expression of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-II under mechanical strain. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2009;27(4):381-385.
- [24] Huang CH, Chen MH, Young TH, et al. Interactive effects of mechanical stretching and extracellular matrix proteins on initiating osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2009;108(6):1263-1273.
- [25] Case N, Xie Z, Sen B, et al. Mechanical activation of beta-catenin regulates phenotype in adult murine marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2010;28(11):1531-1538.
- [26] Diederichs S, Bohm S, Peterbauer A, et al. Application of different strain regimes in two-dimensional and three-dimensional adipose tissue-derived stem cell cultures induces osteogenesis: implications for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94(3):927-936.
- [27] Kearney EM, Farrell E, Prendergast PJ, et al. Tensile strain as a regulator of mesenchymal stem cell osteogenesis. *Ann Biomed Eng*. 2010;38(5):1767-1779.
- [28] Kim IS, Song YM, Hwang SJ. Osteogenic responses of human mesenchymal stromal cells to static stretch. *J Dent Res*. 2010;89(10):1129-1134.
- [29] Sittichokechaiwut A, Edwards JH, Scutt AM, et al. Short bouts of mechanical loading are as effective as dexamethasone at inducing matrix production by human bone marrow mesenchymal stem cell. *Eur Cell Mater*. 2010;20:45-57.
- [30] Maul TM, Chew DW, Nieponice A, et al. Mechanical stimuli differentially control stem cell behavior: morphology, proliferation, and differentiation. *Biomech Model Mechanobiol*. 2011;10(6):939-953.
- [31] Huang C, Ogawa R. Effect of hydrostatic pressure on bone regeneration using human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(19-20):2106-2113.
- [32] Kang MN, Yoon HH, Seo YK, et al. Effect of mechanical stimulation on the differentiation of cord stem cells. *Connect Tissue Res*. 2012;53(2):149-159.
- [33] Michalopoulos E, Knight RL, Korossis S, et al. Development of methods for studying the differentiation of human mesenchymal stem cells under cyclic compressive strain. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(4):252-262.
- [34] Zhang P, Wu Y, Jiang Z, et al. Osteogenic response of mesenchymal stem cells to continuous mechanical strain is dependent on ERK1/2-Runx2 signaling. *Int J Mol Med*. 2012;29(6):1083-1089.
- [35] Case N, Thomas J, Xie Z, et al. Mechanical input restrains PPARgamma2 expression and action to preserve mesenchymal stem cell multipotentiality. *Bone*. 2013;52(1): 454-464.
- [36] Jagodzinski M, Drescher M, Zeichen J, et al. Effects of cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Eur Cell Mater*. 2004;7:35-41; discussion 41.
- [37] 黄旋平,周诺,江献芳,等. 人骨形态发生蛋白2基因修饰自体骨髓间充质干细胞移植促进兔下颌骨牵张成骨实验的组织形态学观察[J]. *中国组织工程研究*,2012,16(23):4242-4246.
- [38] 马佳音,胥春,郝轶,等. 动态牵张应变对人牙周膜细胞的细胞骨架的影响[J]. *上海交通大学学报:医学版*,2012,32(1):42-47.
- [39] Alborzi A, Mac K, Glackin CA, et al. Endochondral and intramembranous fetal bone development: osteoblastic cell proliferation, and expression of alkaline phosphatase, m-twist, and histone H4. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1996;16(2): 94-106.
- [40] Balcerzak M, Hamade E, Zhang L, et al. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(4):1019-1038.
- [41] Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem*. 2002;87(1):1-8.
- [42] Okazaki K, Sandell LJ. Extracellular matrix gene regulation. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;(427 Suppl):S123-128.
- [43] Saito T, Ogawa M, Hata Y, et al. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod*. 2004;30(4): 205-208.
- [44] Xu Q, Tian X. The investigative development of differentiation and biochemical standard of osteoblasts. *Clinical Focus*. 2003; 18(1):55.
- [45] 白明海,吴汉江,张婷婷,等. 体外培养兔鼻软骨细胞在静态牵张应力作用下增殖活性变化及其临床意义[J]. *中国美容医学*,2010, 19(8): 1152-1155.
- [46] 杨开祥,吴颖星,宋明宇,等. 周期性单轴牵张应力对大鼠前软骨干细胞相关增殖基因的影响[J]. *骨科*,2013,4(1):1-3
- [47] 黎润光,邵景范,魏明发,等. 牵张应力对人骨髓间充质干细胞增殖及细胞周期的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*,2007, 11(7): 1247-1251.
- [48] 吕振京,李志忠. 力学因素对间充质干细胞成骨分化的影响[J]. *中国组织工程研究*,2012,16(36):6795-6799.
- [49] 薛媛媛,龚惠,闫媛,等. 机械牵张对诱导多能干细胞向心肌细胞分化的研究[J]. *中国分子心脏病学杂志*,2012,12(6):350-355.
- [50] Li JJ, Li D, Ju XL, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells retain immunomodulatory and anti-oxidative activities after neural induction. *Nerve Regen Res*. 2012; 7(34):2663-2672.