

跑步锻炼大鼠缺损股骨干内的骨质生长

张杰¹, 张文², 陈曦², 罗宗平², 杨惠林¹ (¹苏州大学附属第一医院, 江苏省苏州市 215006; ²苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215006)

文章亮点:

1 许多研究已经证实, 力学刺激能够促进骨折的愈合, 但是力学刺激对骨材料本身成骨性能的影响还不得而知。本实验通过观察跑步锻炼所产生的力学刺激对植入体内的骨材料成骨性能的影响, 提出力学刺激可以考虑到骨材料的研发和应用过程中这样一个新思路。

2 实验证实适度的跑步锻炼促进了大鼠骨缺损处新骨生成, 加速骨缺损的愈合, 为骨缺损患者术后功能锻炼提供理论支持。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 力学刺激; 跑步锻炼; 大鼠; 骨材料; 成骨性能; 骨传导性; 骨缺损; 骨折; 力学载荷; 微观断层扫描仪; 国家自然科学基金

主题词:

运动活动; 硫酸钙; 骨生成; 体层摄影术, X线

基金资助:

国家自然科学基金资助(11072165), 课题名称: 骨水泥填充材料对新骨形成的微观生物力学调控

摘要

背景: 研究已经证实, 力学刺激能够促进骨折的愈合。但是, 跑步锻炼所产生的力学刺激能否增加骨材料的骨传导性和促进骨缺损的愈合尚不清楚。

目的: 观察跑步锻炼所产生的间接力学刺激对骨缺损愈合和骨材料成骨性能的影响。

方法: 在 12 周龄 SD 大鼠左股骨远端制作一个直径 3 mm、高 3 mm 的缺损, 然后在缺损内塞入同等大小的硫酸钙支架材料。实验组于术后 1 周开始以 10 m/min, 45 min/d, 5 d/周的策略进行跑步锻炼, 持续 3 周; 对照组不给予跑步锻炼。

结果与结论: 通过 micro-CT 分析得到, 术后 1 周时, 实验组和对照组的骨缺损内已经有少量的新骨形成。在 2, 3, 4 周时, 实验组骨缺损内新骨生成量明显高于对照组, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。在 4 周时, 组织学切片结果也说明实验组新骨生成情况明显优于对照组。另外, 给予跑步锻炼之后, 实验组骨缺损内生成的新骨骨密度高于对照组, 但差异无显著性意义($P > 0.05$)。结果表明, 适度的跑步锻炼确实能够增加骨材料的成骨性能和加速骨缺损的愈合。

张杰, 张文, 陈曦, 罗宗平, 杨惠林. 跑步锻炼大鼠缺损股骨干内的骨质生长[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(15):2320-2325.

Bony ingrowth induced by treadmill exercise in rats with femoral shaft bone defects

Zhang Jie¹, Zhang Wen², Chen Xi², Luo Zong-ping², Yang Hui-lin¹ (¹First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China; ²Orthopaedic Institute of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: It is well-known that mechanical stimulation could promote fracture healing. However, what kind of mechanical stimulation induced by treadmill exercise can increase the bone conductivity of bone material and promote the healing of bone defect is still unclear.

OBJECTIVE: To evaluate the influence of indirect mechanical stimulation produced by treadmill exercise on bone defect healing and osteogenesis of bone materials.

METHODS: Sprague-Dawley rats at 12 weeks old were used in this study to establish a bone defect of 3 mm in diameter and height at the left distal femur. Afterwards, calcium sulphate scaffolds were implanted into the defects. The rats were divided into treadmill exercise group and control group. Treadmill exercise was began at 1 week postoperatively, 10 m/min, 45 minutes per day, 5 days per week, for 3 weeks. Control group did not receive any exercise. Micro-computed tomography was used to determine bone formation in the bone defects at 1, 2, 3, and 4 weeks after surgery. The sections of left distal femur were subject to hematoxylin-eosin staining, the new bone formation and degradation of bone materials in the bone defects were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: Micro-CT analysis showed that, a small amount of new bone formed in both treadmill exercise group and control group at 1 week after surgery. In treadmill exercise group, new bone formation was significantly higher than the control group at 2, 3, 4 weeks ($P < 0.05$). At 4 weeks, histological

张杰, 男, 1988 年生, 江苏省苏州市人, 苏州大学在读硕士, 主要从事骨科生物力学方面的研究。

通讯作者: 罗宗平, 教授, 博士生导师, 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215006

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.15.005

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)15-02320-06

稿件接受: 2014-02-08

Zhang Jie, Studying for master's degree, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Luo Zong-ping, Professor, Doctoral supervisor, Orthopaedic Institute of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Accepted: 2014-02-08

results also confirmed the difference of new bone formation in bone defect between treadmill exercise group and control group. In addition, bone mineral density of treadmill exercise group was higher than that of control group at 2, 3, 4 weeks, but no significant difference was found ($P > 0.05$). The results suggest that moderate treadmill exercise could promote bone defect healing and enhance osteoconductivity of bone substitute.

Subject headings: motor activity; calcium sulfate; osteogenesis; tomography, X-ray

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 11072165

Zhang J, Zhang W, Chen X, Luo ZP, Yang HL. Bony ingrowth induced by treadmill exercise in rats with femoral shaft bone defects. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(15):2320-2325.

0 引言 Introduction

许多原因可以导致骨缺损的发生, 比如创伤、肿瘤切除等。骨缺损已成为临床治疗的一个难题。在骨折或矫形手术中, 填补骨缺损不仅可以加强骨骼的稳定, 而且还可以更好地促进骨缺损的愈合。目前治疗骨缺损主要有3种方法。自体骨被认为是治疗骨缺损的金标准, 但存在着一些缺陷, 比如说, 自体骨的获取本身就是一次手术, 可能引起取材部位的疼痛、血肿、感染等风险^[1]。自体骨的这些缺点, 促使外科医生思考采用同种异体骨来治疗骨缺损, 其具有良好的骨引导性, 并且可以提供充足的移植骨量, 是一些比较大的骨缺损治疗的选择。但是, 同种异体骨存在疾病传播、病毒感染和引起免疫排斥反应等风险^[2]。正是由于上述两种骨移植物的局限性, 促进了人工骨替代材料的迅猛发展。大家普遍认为, 优秀的人工骨材料应满足以下要求: 足够的力学强度, 良好的生物相容性、骨传导性和诱导性, 能够在体内降解, 最终被自体骨所取代^[3]。可是, 一种骨材料同时满足这些要求是十分困难的, 其中一个难点是: 如何提高骨材料的成骨性能, 加速骨缺损的愈合。

众所周知, 力学刺激对骨细胞和骨骼结构具有调节作用^[4-5]。体内研究表明, 短期动态的力学载荷能够促进大鼠胫骨骨质生成^[4]; 体外研究证实, 流体力学能够增加成骨细胞表型的表达^[6-7], 骨髓间充质干细胞的增殖和矿化^[8-9]。虽然力学刺激对骨质生长具有有益作用已经得到公认, 但是, 适度的跑步锻炼能否增加骨材料的成骨性能, 促进骨缺损内的新骨生成和加速骨缺损的愈合还不得而知。

研究表明承受身体质量的体育锻炼所产生的力学刺激对骨骼具有有益的效应^[10]。跑步锻炼常常用于力学刺激对动物骨骼系统影响的研究^[11]。本文主要探索跑步锻炼所产生的间接力学刺激对骨缺损内新骨生成和骨材料成骨性能的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 采用配对设计的方法研究实验组和对照组骨缺损内新骨生成量及其微观结构的变化。

时间及地点: 实验于2013年3至11月在苏州大学骨科研究所进行, 组织学切片由苏州大学病理研究室完成。

材料:

实验动物: 健康10周龄SD大鼠12只, 雌性, SPF级, 体质量(202±18) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号: SCXK(沪)2012-0002。随机分为两组: 实验组和对照组, 每组6只。

评估跑步锻炼刺激大鼠股骨干骨缺损内骨质生长实验所需主要材料和仪器:

材料和仪器	来源
半水硫酸钙	美国Sigma公司
Micro-CT及图像处理分析软件	比利时Bruker公司
动物跑步机	淮北正华生物仪器设备有限公司

实验方法:

动物建模: 将12只10周龄的雌性SD大鼠在恒定室温(21±2) °C和夜/昼12 h/12 h的环境下适应性饲养2周, 给予充足的大鼠饲料和水分。待大鼠12周龄时, 进行动物造模, 方法如下: 采用10%的水合氯醛以腹腔注射的方式给予全身麻醉, 手术区进行备皮, 常规消毒铺巾, 经大鼠左侧大腿外侧肌间隙入路, 暴露股骨远端, 在股骨远端(不破坏生长板), 用手动钻制作一个直径3 mm、高3 mm的圆柱型缺损, 生理盐水反复冲洗。然后, 将经过紫外线灭菌的同样大小的硫酸钙支架塞入缺损内, 逐层关闭切口。术后3 d给予肌注青霉素, 预防感染。

跑步锻炼方法: 实验组术后1周开始跑步锻炼, 锻炼强度参照文献^[12], 10 m/min, 45 min/d, 5 d/周, 持续3周。对照组不给予跑步锻炼, 活动限制在相对狭小的饲养盒子中。

体内micro-CT图像采集与处理分析: 所有动物在术后4个时间点(术后1, 2, 3, 4周)连续用SkyScan 1176仪器进行扫描。扫描前, 先用较高浓度的异氟烷将大鼠诱导麻醉, 然后把大鼠放入动物床内, 两侧大腿与身体分开以及充分伸展开。在扫描的过程中, 持续给予低浓度异氟烷维持大鼠于麻醉状态。每次扫描采用相同的参数(18 μm, 65 kV, 365 μA, 1 mm Al filter, 600 ms曝光时间)。扫描之后获得的图像分别采用NRecon和CTan两种软件进行重建和分析。分析时, 兴趣区的选择以所造缺损大小为参照。

苏木精-伊红染色: 实验结束后, 用过量麻醉药处死动物

物, 取下大鼠左侧股骨, 修剪出包括骨缺损的股骨远端, 浸入体积分数为4%的甲醛溶液中进行固定。随后进行乙醇逐级脱水(体积分数为70%–100%的乙醇), 二甲苯透明, 聚合树脂包埋。沿着股骨长轴纵行切出厚10 μm 的切片, 进行苏木精-伊红染色, 用光学显微镜观察。

主要观察指标: ①根据micro-CT定量评价大鼠骨微观结构的标准^[13], 实验需定量得出以下一些指标: 骨形成分数(BV/TV)、骨密度(BMD)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁分离度(Tb.Sp)和骨小梁数量(Tb.N)。随后, 根据骨形成分数(BV/TV), 计算出相应的骨形成率(BFR)。②通过组织学观察骨缺损内新骨生成和骨材料降解情况。

统计学分析: 所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示, 使用统计学软件SPSS 17.0进行统计处理, 进行配对样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验纳入12只SD大鼠, 全部进行动物造模, 实验组给予跑步锻炼, 对照组的活动限制在盒子中, 12只大鼠没有出现死亡等异常现象, 全部进入结果分析。

2.2 micro-CT获得的骨形态学参数 术后1周时, 已经有少量的新骨生成。随时间推移, 两组的新骨生成量都在逐渐地增加。术后2, 3, 4周实验组的骨形成分数(BV/TV)均比对照组高, 且差异有显著性意义, 在第4周时, 实验组的骨形成分数比对照组高出11.91%(图1A)。表明给予跑步锻炼之后, 成骨效应有明显的提高。

两组新生骨的骨密度都随时间推移逐步地升高, 说明骨组织在不断地成熟。虽然实验组的骨密度在后3个时间点(术后2, 3, 4周)均高于对照组, 但差异无显著性意义(图1B)。

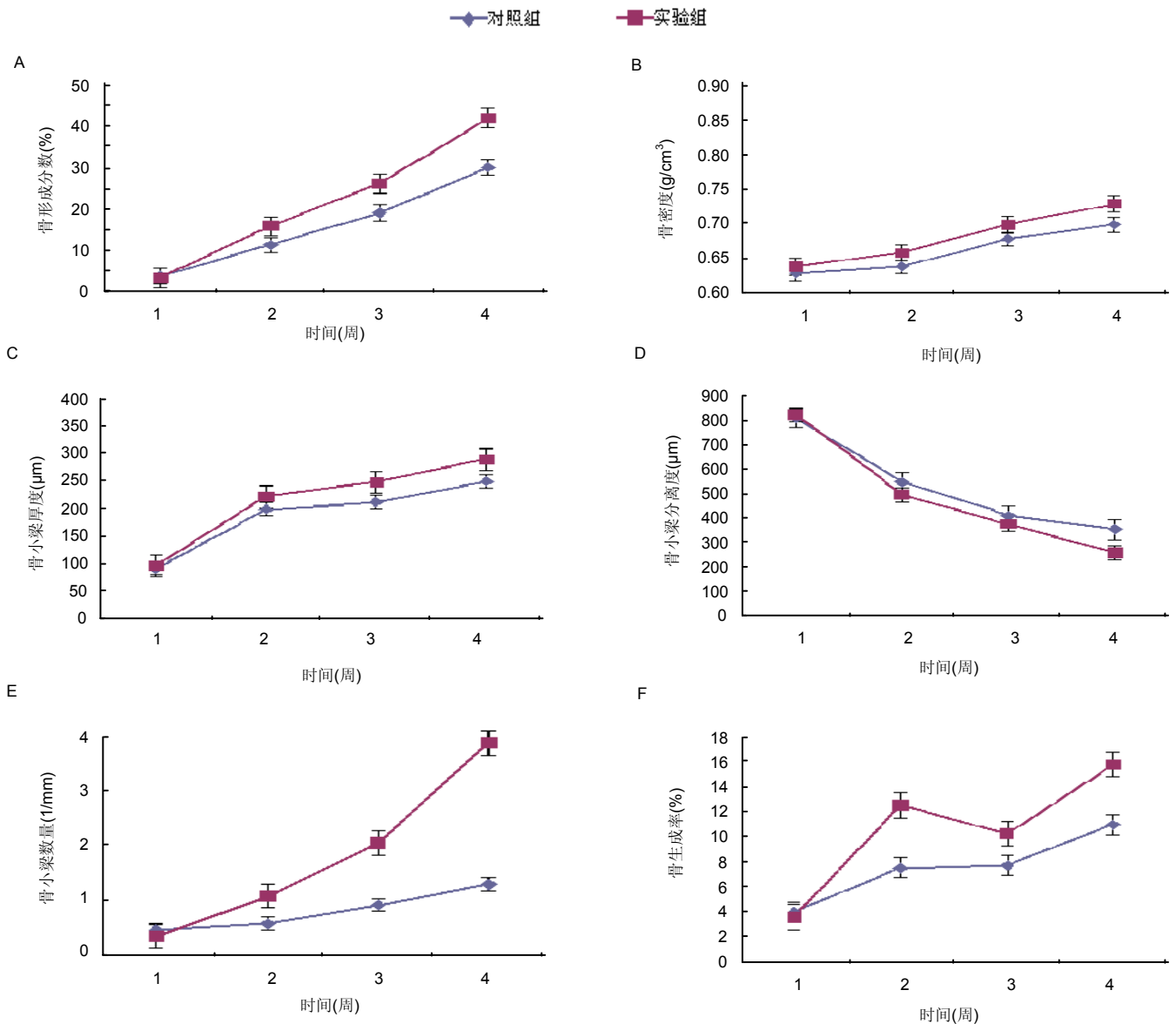


图1 两组大鼠于术后不同时间点经micro-CT获得的骨形态学参数

Figure 1 Bone morphometric parameters of rats in two groups by micro-CT at different time points postoperatively

两组骨小梁厚度(Tb.Th)随时间推移逐渐地增加, 实验组骨小梁厚度增加的程度要高于对照组, 并在后3个时间点(术后2, 3, 4周)差异有显著性意义(图1C)。

相反, 两组骨小梁分离度(Tb.Sp)随时间推移逐渐地降低, 但是实验组骨小梁分离度的下降程度要大于对照组, 且在第二和最后一个时间点(术后2, 4周), 差异有显著性意义(图1D)。

两组骨小梁数量(Tb.N)随时间推移逐渐增多, 实验组骨小梁数量快速的上升, 且在后3个时间(术后2, 3, 4周), 实验组骨小梁数量都要显著高于对照组, 差异有显著性意义, 表明适度跑步锻炼有利于骨小梁数量的增加(图1E)。

2.3 动态骨形态学变化 不管对于实验组或对照组, 骨形成分数(BV/TV)都在不断地增加, 说明这样一个事实: 缺损处新骨生成速度总是快于骨质吸收速度。通过分析骨生成率(BFR), 发现给予跑步锻炼后, 实验组骨生成率迅速大幅度上升, 而对照组上升幅度明显低于实验组, 说明给予跑步锻炼之后, 成骨效率是明显增加的。虽然, 在此之后实验组骨生成率有所下降, 但仍比对照组要高。并且, 在最后一个时间点, 实验组骨生成率再次出现快速上升, 与对照组相比, 差异有显著性意义(图1F)。

2.4 组织学变化 通过组织学观察发现, 两组骨缺损内的骨材料全部降解吸收, 而实验组的新骨生成量明显高于对照组, 说明跑步锻炼所产生的力学刺激有利于骨缺损内新骨生成(图2)。

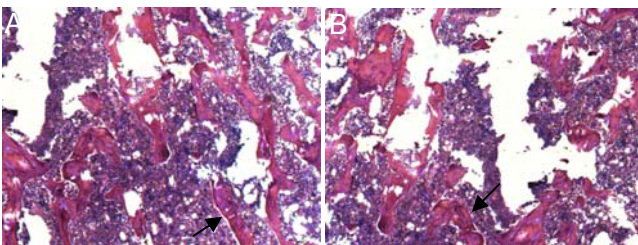


图2 术后4周时缺损内的成骨情况, 箭头表示新生骨(苏木精-伊红染色, $\times 500$)

Figure 2 Bone formation (arrows) in bone defect at 4 weeks after surgery (hematoxylin-eosin staining, $\times 500$)

图注: 图中A为实验组, B为对照组。通过组织学观察发现, 两组骨缺损内的骨材料全部降解吸收, 而实验组的新骨生成量明显高于对照组, 说明跑步锻炼所产生的力学刺激有利于骨缺损内新骨生成。

3 讨论 Discussion

提高骨材料的成骨性能一直是研究者们探讨的热点, 而且, 已经有一些方法应用于提高骨材料的成骨性能, 加速骨质生长和骨折修复。比如说, 有些研究者在骨材料内接种上骨髓间充质干细胞或胎儿骨细胞^[14-15]; 还有些科学家在骨材料内加入各种生长因子^[16-17], 虽然这些方法在一定程度上取得了成功, 但也存在一些劣势, 比如价格昂贵, 合成技术还不成熟等等。而力学刺激对骨骼具有有益作用已经得到公认, 本实验通过让大鼠进行适度的跑步锻炼, 观察跑步锻炼所产生的间接力学刺激能否增加骨材料的成

骨性能和加速骨缺损内新骨生成。实验结果发现, 在术后4周时, 实验组的骨形成分数(BV/TV)明显高于对照组, 差异有显著性意义, 表明跑步锻炼确实增强了骨材料的成骨性能和进一步加速骨缺损处骨质生长。

骨骼是一种能够随着外界力学环境的改变而发生一些适应性变化的生物组织^[18], 这种适应性变化过程主要由成骨细胞和破骨细胞来调控。力学刺激作用于骨骼到发生实质性的适应性改变是一个多步骤地过程, 主要包括4个阶段^[19], 第1个阶段是将作用于骨骼的外界力学刺激转换感受器细胞能够感受的局部力学刺激; 第2个阶段是感受器细胞感应了局部力学刺激之后分泌一些生物信号分子, 启动基因表达; 第3个阶段是感受器细胞与效应细胞(成骨细胞和破骨细胞)之间信号的传递。第4个阶段是骨组织水平的实质性改变。但是, 力学刺激是如何促进骨质生成和骨骼微观结构改变的确切细胞和分子机制还不是很清楚。有文献报道, 力学刺激能够促进成骨细胞产生血管内皮细胞生长因子^[20-23], 并且, 血管内皮细胞生长因子的表达有利于提高成骨细胞活性, 从而起到诱导成骨的作用^[24]。另一些研究报道^[25], 力学刺激有利于血管内皮细胞生长因子表达的增加和血管的长入, 而且血管的数量与成骨效应成正相关, 与破骨效应成负相关, 阻断血管内皮细胞生长因子的作用之后, 成骨效应受到了明显的影响。还有研究结果表明, 阻断血管生成后完全抑制了骨折处骨痂的再生从而影响骨折的愈合^[26]。这些研究充分证实了骨质生长与血管内皮细胞生长因子调节密切相关, 血管的长入和血液的供应对成骨具有重要的作用, 力学刺激的成骨效应可能是通过促进血管长入来实现的。一氧化氮是力学信号传导过程中一个重要因子, 其作用是通过抑制破骨细胞活性和增加成骨细胞活性来实现的^[27-30], 并且流体力学能够刺激成骨细胞快速持续的分泌一氧化氮^[31], 体内研究表明, 通过分子标记或检测流体电流的方法证实了力学载荷下细胞间液流动的存在^[32-35], 而且, 采用一氧化氮合成酶阻滞剂抑制了力学刺激所诱导的大鼠骨质生成^[36-37]。另外, 力学刺激还可能通过促使骨细胞产生其他的一些信号分子^[38-41], 如前列腺素, 骨形态发生蛋白等等, 来调节成骨细胞与破骨细胞数量和活性, 从而发挥成骨效应。综上所述, 作者认为, 跑步锻炼可能通过对股骨远端产生力学载荷, 从而促进骨缺损内的血管长入和一些力学传导信号分子的释放, 最终发挥成骨效应。

术后多久开始给予机械应力刺激算合适仍然存在争议。有文献报道^[42], 不论载荷的强度大小, 骨折后立即给予力学载荷反而会阻碍骨折的愈合。另一研究发现, 术后3d给予力学载荷会导致骨量的一过性下降^[43]。尽管发生这种现象的确切机制并非十分清楚, 但是立即或太早给予力学刺激可能会妨碍或破坏新生血管长入到血肿中^[44-46]。上述研究结果都说明术后立即或太早给予力学刺激会对骨的生长产生不利的影响。最近, 为了避免早期力学刺

激的负面作用, 有研究者将给予力学刺激的时间推迟到术后2周^[47]。并且, 他们的研究证实, 2周后给予力学刺激没有出现骨生成量的一过性降低。然而, 通过将早期与晚期的力学刺激进行相比, 他们发现, 与晚期给予力学刺激相比, 早期的力学刺激能够更好地促进骨质生长, 骨生成的效率也更好。因此, 他们建议, 术后1至2周的时间开始给予力学刺激是相对比较合适的。再者, 适度的延迟给予力学刺激的时间确实很有必要, 这有利于早期的血管和神经的长入^[48-49]。为了优化力学刺激的成骨效应, 作者决定术后1周开始让大鼠进行跑步锻炼, 没有出现抑制骨质生长的现象, 说明术后1周的恢复时间对大鼠来说是合适的。

力学刺激不仅能够增加新骨生成, 而且还能降低骨质吸收^[50-52]。因此, 本研究的一个局限性就在于, 作者在计算骨形成率时, 并没有考虑到力学刺激同时也会降低骨质吸收, 这就导致了通过计算得到的实验组的骨形成率要比实际骨形成率要低。但是, 尽管存在这种误差, 研究结果还是证明, 与对照组相比, 跑步锻炼所产生的力学刺激能够明显地增加骨缺损内新骨生成。

众所周知力学性能是骨骼系统的重要特点, 骨骼的力学性能不仅与骨量有关, 而且与骨骼的微观结构也有密切的关系。有文献报道, 骨量并不能完全反应骨骼的强度^[53-54]。因此, 本研究的另一个局限性是标本取下来之后未做力学测试。另外, 跑步锻炼是一种传统的力学刺激, 但其所在骨缺损处产生的具体的力学参数无法确定, 无法为今后的研究提供一个定量的参考。

总之, 跑步锻炼能够调节骨缺损内骨质生长。与对照组相比, 适度的跑步锻炼促进了大鼠骨缺损处新骨生成。但是, 不同力学刺激方式和强度对骨缺损内骨质内生长的影响, 是否存在一种更为优化的力学刺激条件, 力学刺激调节骨微观结构改变的细胞或分子机制还有待更深入的研究。今后若要将力学刺激应用于临床骨缺损患者, 还需要确定一种具体可靠的力学刺激参数, 这些问题值得进一步深入的研究和探讨。

致谢: 感谢苏州大学骨科研究所对本研究的支持。

作者贡献: 张杰进行实验设计及实施, 陈曦、张文进行micro-CT图像扫描和分析, 张杰进行数据分析和成文, 罗宗平审校, 张杰对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验获得苏州大学动物伦理委员会和苏州大学附属第一医院动物伦理委员会批准。

学术术语: 骨传导性—是骨替代材料的一个不可或缺的特点, 指骨替代材料在骨组织内所具有的促进成骨的作用, 并且只能在骨组织内, 而不能在骨组织之外的组织或器官中发挥成骨作用。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, et al. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;(329):300-309.
- [2] Grauer JN, Beiner JM, Kwon B, et al. The evolution of allograft bone for spinal applications. *Orthopedics*. 2005;28(6): 573-579.
- [3] Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog*. 2009;25(6):1539-1560.
- [4] Forwood MR, Owan I, Takano Y, et al. Increased bone formation in rat tibiae after a single short period of dynamic loading in vivo. *Am J Physiol*. 1996;270(3 Pt 1):E419-423.
- [5] Turner CH, Forwood MR, Otter MW. Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow. *FASEB J*. 1994;8(11):875-878.
- [6] Tanaka SM, Sun HB, Roeder RK, et al. Osteoblast responses one hour after load-induced fluid flow in a three-dimensional porous matrix. *Calcif Tissue Int*. 2005;76(4):261-271.
- [7] Zhao F, Chella R, Ma T. Effects of shear stress on 3-D human mesenchymal stem cell construct development in a perfusion bioreactor system: Experiments and hydrodynamic modeling. *Biotechnol Bioeng*. 2007;96(3):584-595.
- [8] Song G, Ju Y, Shen X, et al. Mechanical stretch promotes proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2007;58(2):271-277.
- [9] Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, et al. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng*. 2005;33(1):63-70.
- [10] Nordström A, Olsson T, Nordström P. Sustained benefits from previous physical activity on bone mineral density in males. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(7):2600-2644.
- [11] Yeh JK, Aloia JF, Tierney JM, et al. Effect of treadmill exercise on vertebral and tibial bone mineral content and bone mineral density in the aged adult rat: determined by dual energy X-ray absorptiometry. *Calcif Tissue Int*. 1993; 52(3):234-238.
- [12] Bourrin S, Palle S, Pupier R, et al. Effect of physical training on bone adaptation in three zones of the rat tibia. *J Bone Miner Res*. 1995;10(11):1745-1752.
- [13] Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7): 1468-1486.
- [14] Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. *Ann Biomed Eng*. 2004; 32(1):112-122.
- [15] Pioletti DP, Montjovent MO, Zambelli PY, et al. Bone tissue engineering using foetal cell therapy. *Swiss Med Wkly*. 2006; 136(35-36):557-560.
- [16] Murakami N, Saito N, Horiuchi H, et al. Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and a synthetic polymer. *J Biomed Mater Res*. 2002; 62(2):169-174.
- [17] Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, et al. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*. 2001;19(11): 1029-1034.

- [18] Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec.* 1990;226(4):414-422.
- [19] Turner CH, Pavalko FM. Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *J Orthop Sci.* 1998;3(6):346-355.
- [20] Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SR, et al. Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise. *Am J Physiol.* 1999;277(6 Pt 2):H2247-2252.
- [21] Hiscock N, Fischer CP, Pilegaard H, et al. Vascular endothelial growth factor mRNA expression and arteriovenous balance in response to prolonged, submaximal exercise in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(4):H1759-1763.
- [22] Kohno S, Kaku M, Tsutsui K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement. 2003;82(3):177-182.
- [23] Fong KD, Nacamuli RP, Lobo EG, et al. Equibiaxial tensile strain affects calvarial osteoblast biology. *J Craniofac Surg.* 2003;14(3):348-355.
- [24] Hiltunen MO, Ruuskanen M, Huuskonen J, et al. Adenovirus-mediated VEGF-A gene transfer induces bone formation in vivo. *FASEB J.* 2003;17(9):1147-1149.
- [25] Yao Z, Lafage-Proust MH, Plouët J, et al. Increase of both angiogenesis and bone mass in response to exercise depends on VEGF. *J Bone Miner Res.* 2004;19(9):1471-1480.
- [26] Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone.* 2001;29(6):560-564.
- [27] Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N, et al. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(9):3569-3573.
- [28] MacIntyre I, Zaidi M, Alam AS, et al. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(7):2936-2940.
- [29] Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, et al. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 1995;10(3):439-446.
- [30] Riancho JA, Zarrabeitia MT, Fernandez-Luna JL, et al. Mechanisms controlling nitric oxide synthesis in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;107(1):87-92.
- [31] Johnson DL, McAllister TN, Frangos JA. Fluid flow stimulates rapid and continuous release of nitric oxide in osteoblasts. *Am J Physiol.* 1996;271(1 Pt 1):E205-208.
- [32] Hung CT, Pollack SR, Reilly TM, et al. Real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow. *Clin Orthop Relat Res.* 1995;(313):256-269.
- [33] Dillaman RM. Movement of ferritin in the 2-day-old chick femur. *Anat Rec.* 1984;209(4):445-453.
- [34] Otter MW, Palmieri VR, Cochran GV. Transcortical streaming potentials are generated by circulatory pressure gradients in living canine tibia. *J Orthop Res.* 1990;8(1):119-126.
- [35] Seliger WG. Tissue fluid movement in compact bone. *Anat Rec.* 1970;166(2):247-255. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5414695>
- [36] Fox SW, Chambers TJ, Chow JW. Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation. *Am J Physiol.* 1996;270(6 Pt 1):E955-960.
- [37] Turner CH, Takano Y, Owan I, et al. Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am J Physiol.* 1996;270(4 Pt 1):E634-639.
- [38] Tan SD, de Vries TJ, Kuijpers-Jagtman AM, et al. Osteocytes subjected to fluid flow inhibit osteoclast formation and bone resorption. *Bone.* 2007;41(5):745-751.
- [39] Robling AG, Bellido T, Turner CH. Mechanical stimulation in vivo reduces osteocyte expression of sclerostin. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006;6(4):354.
- [40] Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, et al. Pulsating fluid flow modulates gene expression of proteins involved in Wnt signaling pathways in osteocytes. *J Orthop Res.* 2009;27(10):1280-1287.
- [41] You L, Temiyasathit S, Lee P, et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone.* 2008;42(1):172-179.
- [42] Gardner MJ, van der Meulen MC, Demetrakopoulos D, et al. In vivo cyclic axial compression affects bone healing in the mouse tibia. *J Orthop Res.* 2006;24(8):1679-1686.
- [43] Roshan-Ghias A, Terrier A, Bourban PE, et al. In vivo cyclic loading as a potent stimulatory signal for bone formation inside tissue engineering scaffold. *Eur Cell Mater.* 2010;19:41-49.
- [44] Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res.* 2002;20(5):1099-1105.
- [45] Goodship AE, Cunningham JL, Kenwright J. Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;(355 Suppl):S105-115.
- [46] Hente R, Cordey J, Rahn BA, et al. Fracture healing of the sheep tibia treated using a unilateral external fixator. Comparison of static and dynamic fixation. *Injury.* 1999;30 Suppl 1:A44-51.
- [47] Roshan-Ghias A, Lambers FM, Gholam-Rezaee M, et al. In vivo loading increases mechanical properties of scaffold by affecting bone formation and bone resorption rates. *Bone.* 2011;49(6):1357-1364.
- [48] Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res.* 2002;20(5):1099-1105.
- [49] Wallace AL, Draper ER, Strachan RK, et al. The vascular response to fracture micromovement. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;(301):281-290.
- [50] Schulte FA, Lambers FM, Kuhn G, et al. In vivo micro-computed tomography allows direct three-dimensional quantification of both bone formation and bone resorption parameters using time-lapsed imaging. *Bone.* 2011;48(3):433-442.
- [51] Hillam RA, Skerry TM. Inhibition of bone resorption and stimulation of formation by mechanical loading of the modeling rat ulna in vivo. *J Bone Miner Res.* 1995;10(5):683-689.
- [52] Yeh JK, Aloia JF, Chen MM, et al. Influence of exercise on cancellous bone of the aged female rat. *J Bone Miner Res.* 1993;8(9):1117-1125.
- [53] Mow VC, Huiskes R. Basic orthopaedic biomechanics and mechano-biology[M]. Lippincott Williams & Wilkins, 2005
- [54] Wolf S, Janousek A, Pfeil J, et al. The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 1998;13(4-5):359-364.