

机械离心力对成骨细胞骨形态发生蛋白信号通路中Runx-2 mRNA的影响

段峰¹, 关键¹, 杨红岩², 王心彘¹, 张国梁¹, 朱杨¹ (¹佳木斯大学附属口腔医院, 黑龙江省佳木斯市 154004; ²深圳市龙岗区横岗人民医院口腔科, 广东省深圳市 518115)

文章亮点:

1 作者前期研究不同大小和不同时间机械离心力的刺激促进了成骨细胞 Runx-2 的表达, 激活了大部分 BMP/Smad 途径以及小部分 BMP/p38MAPK 途径, 这两种信号通路介导了机械离心刺激的成骨细胞的 Runx-2 表达。

2 本项目研究机械离心力对成骨细胞 Runx-2 mRNA 信号通路的影响, 并探讨成骨细胞将力学刺激转化为生化响应过程中骨形态发生蛋白信号转导通路的作用。实验试图通过加载不同转数及时间的离心力证实 Runx-2 表达存在变化。

3 结果表明不同大小和不同时间机械离心力的刺激促进了成骨细胞 Runx-2 的表达, 可以证实适宜的机械离心力持续作用一定的时间可以激活骨形态发生蛋白信号转导通路, 为应用骨形态发生蛋白及缩短牵张成骨时间提供理论基础。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 机械离心; 成骨细胞; 信号通路; 骨形态发生蛋白; Runx2 mRNA

主题词:

成骨细胞; 信号传导; 骨形态发生蛋白质类

基金资助:

黑龙江省教育厅自然科学面上项目(11551493)

段峰, 男, 1972 年生, 汉族, 佳木斯医学院毕业, 副主任医师, 副教授, 主要从事口腔颌面部创伤研究。

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

2014.33.010

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)33-05305-05

稿件接受: 2014-06-25

摘要

背景: 机械力对成骨细胞生理活动存在一定影响, Runx-2 是骨形态发生蛋白信号的靶目标, 是调节成骨细胞分化的重要因子, 骨形态发生蛋白信号转导通路参与了成骨细胞对机械离心力刺激的生理响应过程。

目的: 观察不同转速及时间作用下, 机械离心力对成骨细胞骨形态发生蛋白信号通路的影响。

方法: 将 MC3T3-E1 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基预处理 24 h 后, 分为对照组, 90 r/min 组、180 r/min 及 250 r/min 组, 每组再分为离心 6, 12, 24 h 亚组, 给予不同转速离心力和相同转速不同时间的刺激, 重复实验 3 次。对照组同步置于除离心外相同的环境中。提取总 RNA, 并反转录为 cDNA, 通过实时荧光定量 PCR 检测 Runx2 基因表达情况。

结果与结论: 随着加力时间的延长, Runx2 mRNA 的表达增加, 二者成正相关, 转速为 180 r/min 组的 Runx2 mRNA 表达明显高于 90 r/min 组和 250 r/min 组 ($P < 0.01$); 90 r/min 组和 250 r/min 组 Runx2 mRNA 的表达均高于对照组 ($P=0.039$), 且都随时间延长差异明显。结果可见离心力大小和离心持续时间不同对成骨细胞骨形态发生蛋白信号通路的生理响应不同, 该通路在对力学信号引起的信息传递级联反应中起重要作用。

段峰, 关键, 杨红岩, 王心彘, 张国梁, 朱杨. 机械离心力对成骨细胞骨形态发生蛋白信号通路中 Runx-2 mRNA 的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(33):5305-5309.

Effect of mechanical centrifugal force on Runx-2 mRNA in osteoblasts' bone morphogenetic protein signal pathway

Duan Feng¹, Guan Jian¹, Yang Hong-yan², Wang Xin-yu¹, Zhang Guo-liang¹, Zhu Yang¹ (¹Stomatological Hospital Affiliated to Jiamusi University, Jiamusi 154004, Heilongjiang Province, China; ²Department of Stomatology, Henggang People's Hospital of Longgang District, Shenzhen 518115, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Mechanical strain certainly has an effect on physiological activities of osteoblasts. Runx-2 is a target of bone morphogenetic protein signal and is an important factor for regulation of osteoblastic differentiation. Bone morphogenetic protein signal transduction pathway is involved in physiological response of osteoblast to stimulation of mechanical centrifugal force.

OBJECTIVE: To observe the effect of mechanical centrifugal force on bone morphogenetic protein signal pathway under different time period and speed.

METHODS: MC3T1-E1 cells were pre-treated in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum for 24 hours, and then divided into control group, 90 r/min group, 180 r/min group and 250 r/min group. Each group was then subdivided into 6 hours, 12 hours and 24 hours centrifugation subgroups. Experiments were repeated for three times for different centrifugal speed and different time period. Except centrifugation, the control group was

Duan Feng, Associate chief physician, Associate professor, Stomatological Hospital Affiliated to Jiamusi University, Jiamusi 154004, Heilongjiang Province, China

Accepted: 2014-06-25

under the same environment. Total RNA was extracted and reversely transcribed into cDNA. Runx-2 gene expression was determined by real time fluorescent quantitative PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: The expression of Runx-2 mRNA was increased with extension of time, showing a positive correlation between the two. The mRNA expression at 180 r/min was significantly higher than that at 90 r/min and 250 r/min ($P < 0.01$); at 90 r/min and 180 r/min, the Runx-2 mRNA expression was higher than that in the control group ($P=0.039$), both of them showed significant difference along with the time. The difference of centrifugal force speed and duration is associated with different physiological response of osteoblasts in bone morphogenic protein signal pathway, which plays an important role in mechanical signal transmission and cascade reaction.

Subject headings: osteoblasts; signal transduction; bone morphogenic proteins

Funding: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Provincial Education Bureau, No. 11551498

Duan F, Guan J, Yang HY, Wang XY, Zhang GL, Zhu Y. Effect of mechanical centrifugal force on Runx-2 mRNA in osteoblasts' bone morphogenetic protein signal pathway. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(33):5305-5309.

0 引言 Introduction

牵张成骨术是目前应用于口腔颌面外科领域的一种新兴治疗技术。牵张成骨技术具有无需植骨、创伤小、治疗后不易复发等传统手术难以比拟的优势,但过长时间的牵张和固定是限制其临床应用的主要原因。目前研究显示,牵张成骨的分子学机制复杂,多种细胞因子参与,但其主要因子仍不清楚。有研究报道,骨形态发生蛋白信号通路在骨组织发生及骨再生中起着主要作用。牵张成骨的分子生物学机制复杂,曾有研究表明,骨形态发生蛋白信号通路在骨组织发生及再生中起着主要作用。机械力对成骨细胞生物活性的影响较大,常采用离心、静水压、单双向膜拉伸和流体剪切等方式对成骨细胞施加机械力刺激^[1-6],这些不同的体外应变使实验中的细胞产生不同的形变,从而出现不同的生理响应过程。

近来研究表明,在牵张成骨期间许多细胞因子都参与调节新骨的生成,包括骨形态发生蛋白、胰岛素样生长因子1、成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子等,其中骨形态发生蛋白是一种有效的骨形成诱导因子。已有研究证实骨形态发生蛋白在牵张成骨的不同时间均有表达,骨形态发生蛋白信号转导通路可能参与牵张成骨中机械力信号向生物信号的转化过程。目前,关于外源性骨形态发生蛋白局部应用于牵张成骨的效果还存在争议。对牵引产生的机械力如何转化为生物学信号的细胞和分子机制尚不清楚,骨形态发生蛋白信号转导通路在成骨细胞对机械力刺激响应中的作用和意义还不甚清楚。

机械载荷刺激细胞组织后,其基本的机械力学生物化学转导机制与调节过程具有相同信号途径,主要为3条:通过细胞外基质信号-跨膜整合素-细胞骨架构像改变对信号的传递。激活细胞膜力敏感离子通道介导细胞内钙离子水平升高,触动G蛋白偶联酪氨酸激酶磷酸化与MAPKs调节的级联反应,各信号分子之间存在网络状调控,最后导致转录因子的激活。但不同的细胞类型对于不同的机械刺激有其不同特点。在成骨细胞应答机械力学刺激中,对力学敏感的钙离子通道复合体、G蛋白、整合素、各生长因子受体位于细胞膜表面或跨膜存在,这些都将是细胞外基质信号传递入细胞内。作者所研究的骨形态发生蛋白信号通路

便为其中的重要信号通路之一。

实验观察不同大小离心力和离心持续不同时间对成骨细胞骨形态发生蛋白信号通路中Runx-2 mRNA的生理响应,探索成骨细胞受力后信号传入细胞核的通路,以及该通路转导机械应力的机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 分组对照细胞学实验。

时间及地点: 实验于2012年3至10月在佳木斯大学基础医学院细胞培养工作室及口腔医学实验室完成。

材料:

机械离心力对成骨细胞Runx-2 mRNA的影响实验所用细胞及仪器:

细胞及仪器	来源
MC3T3-E1细胞(小鼠胚胎成骨细胞)	百恩维生物科技有限公司
倒置相差显微镜及照相系统	OLYMPUS CXX41
TDZ5-WS多管架自动平衡离心机、低温高速台式离心机	长沙湘仪离心机仪器有限公司
Px2 Thermal Cycler PCR仪	Thermo公司, 美国
ABI7300实时荧光定量PCR仪	ABI公司, 美国
凝胶成像分析系统	北京亚力恩机电技术研究所

实验方法:

MC3T3-E1细胞的培养: 将MC3T3-E1细胞按 3×10^5 /瓶接种于25 mL细胞培养瓶, CO₂孵箱培养, 条件为37 °C, 体积分数为5%CO₂, 含体积分数为10%胎牛血清DMEM培养基, 隔天换液。当MC3T3-E1细胞生长铺满培养瓶底80%以上时, 在无菌条件下传代。传代前用1×PBS清洗铺满细胞的培养瓶2次, 加入0.25%胰蛋白酶1.5 mL, 37 °C消化3-5 min, 见瓶底出现针孔样透明时, 加入等量体积分数为10%胎牛血清DMEM培养基终止消化, 吹打细胞制成细胞悬液按1:3传代, 第2天换液。

细胞冻存和复苏: 将铺满培养瓶的MC3T3-E1细胞用0.25%胰蛋白酶按传代的消化方法收集后, 加入1 mL冻存液(含75%DMEM, 体积分数为20%胎牛血清, 5%二甲基亚砜), 吸入冻存管, 分4阶段冻存: 4 °C 30 min, -20 °C

表1 Runx2 对不同转速和不同时间离心力刺激的响应 MC3T3-E1 细胞中Runx2 mRNA 的检测结果

Table 1 Runx2 mRNA expression in MC3T3-E1 cells in response to mechanical centrifugal force at different speed and time ($\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h
对照组	0.45±0.02	0.56±0.01	0.88±0.02
90 r/min 组	0.55±0.01	0.96±0.02	2.48±0.02
180 r/min 组	0.90±0.02 ^a	1.22±0.01 ^a	3.96±0.01 ^a
250 r/min 组	0.60±0.01	0.93±0.02	2.28±0.01

表注: 180 r/min 组 Runx2 mRNA 表达明显高于其他 3 组, 且每组中随着加力时间的延长, Runx2 mRNA 的表达成正相关。与其他 3 组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2 h, -80 °C 12 h(过夜), 液氮灌长期保存, 缓慢(约 1 °C/min)放入液氮罐内长期保存。细胞复苏时采用快速复温法, 将液氮中冻存的装有MC3T3-E1细胞的冻存管取出后立即置于37 °C水浴中复温, 1 min融化后立即以DMEM培养基离心清洗3次(1 500 r/min, 10 min/次), 再接种细胞培养瓶于CO₂孵箱内培养。

细胞分组: 实验分为4组: 对照组, 90 r/min组, 180 r/min组, 250 r/min组, 分别离心6, 12, 24 h。将处于指数生长期铺满培养瓶底80%以上的MC3T3-E1细胞, 经0.25%胰酶消化后按 2×10^5 /孔完全随机接种于6孔细胞培养板, 每组6孔。12组细胞同时种板, 培养48 h后以无血清的DMEM培养基继续培养24 h, 使尽可能多的细胞处于同一生长周期。加力前24 h更换为含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养基将6孔板无菌密封。实验重复3次。

细胞加力: 将6孔细胞培养板在无菌条件下以无菌密封胶密封, 置于离心加力支架中, 固定于LXJ-II型离心沉淀机中离心, 根据公式: 离心力(RCF)= $1.118 \times 10^{-5} \times R \times V^2$ 计算离心力的大小, 单位为重力加速度 $\times g$ 。离心半径R约为19 cm, 转速V, 单位为r/min。对照组除不进行离心处理外, 其他环境相同。

Runx2表达的检测: 各组同时收获细胞。按Trizol试剂说明提取细胞总RNA, 并反转录成cDNA。采用PowerSYBR®Green染料法进行PCR, 引物由Invitrogen公司合成。

PCR反应条件为: 95 °C 10 s, 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 共45个循环。Runx2 mRNA的检测结果采用 $\Delta\Delta Ct$ 法计算。

主要观察指标: 荧光定量PCR检测Runx2 mRNA表达, 以及实时荧光定量PCR产物电泳分析。

统计学分析: 采用SPSS 16.0软件包对数据进行处理, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对各组Runx2 mRNA表达的相对拷贝数进行单因素方差分析比较; 两两比较使用SNK检验。显著性检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果 Results

2.1 Runx2对不同转速和不同时间离心力刺激的响应 MC3T3-E1细胞中Runx2 mRNA的检测结果: 180 r/min组

引物序列:

基因	引物序列
Runx2	上游引物: 5'-AGC CAC CGA GAC CAA CCG AGT-3'; 下游引物: 5'-TCC CTG ATA CCG CAG TTT GTC GG-3'。
β -actin	上游引物: 5'-CCT AAA AGC CAC CCC ACT TCT-3', 下游引物: 5'-AAC TTA CTA CTC GGA AGC ACG-3'。

Runx2 mRNA表达明显较其他3组增加($P < 0.05$), 且每组中随着加力时间的延长, Runx2 mRNA的表达成正相关, 90 r/min组和250 r/min组Runx2 mRNA表达接近, 差异无显著性意义($P=0.619$), 但均高于空白对照组(表1)。说明Runx-2 mRNA在特定转数情况下表达明显高于其他转数情况, 其他转数情况下无明显差异。

2.2 实时荧光定量PCR产物电泳分析结果 MC3T3-E1细胞经处理因素作用后, 凝胶电泳显示PCR产物为单一条带, 说明在各时间点均有Runx2和 β -actin的特异表达。其中180 r/min处理6, 12, 24 h后Runx2的表达条带较亮, 表达量较其他组高。说明特定转数情况下Runx-2 mRNA表达随时间增长成正相关。

3 讨论 Discussion

成骨细胞是力学敏感细胞^[9], 它在骨改建过程中处于一个中心调控的位置。MC3T3-E1细胞表型稳定, 因此在对成骨细胞的各项研究中得到了广泛地应用。机械力对细胞生物学行为的影响是目前细胞生物力学研究的一个重要课题。研究体外培养细胞加力装置是细胞力学研究基础之一。

根据马爱群等^[10]细胞牵张刺激装置的原理设计制造体外培养成骨细胞的机械离心力装置。牵张(加载离心力)原理: 将贴有细胞的培养板置于匀速水平旋转的平台上, 当平台以一定的速度旋转时, 贴壁细胞产生一向外的离心力, 细胞被牵张。每个细胞距轴心的距离是恒定的, 故 $F_{离} \propto \text{转速}^2$ 。力的作用大小与旋转的速度呈正相关关系, 通过控制转速可相应控制作用于细胞的牵张力大小。

实验选择90 r/min, 180 r/min 及250 r/min转速主要考虑到会产生不同大小的离心力, 这3组的力值范围都属于牵张成骨的轻力范畴, 而且这3组转速又不会影响细胞的质量。选择6, 12, 24 h 3组时间主要是根据临床牵张成骨牵引的时间和频率设定的, 过长或过短的时间均无临床意义。

实验中180 r/min组Runx2 mRNA表达明显较其他3组增加($P < 0.05$), 证明牵张力大小适中并且牵张时间适宜则成骨细胞骨形态发生蛋白信号通路更容易被激活, 为牵张成骨探求合适的牵张力以及适当的牵张时间提供理论依据。

骨形态发生蛋白是转化生长因子 β 超家族中的重要组成部分, 在细胞成骨分化的信号传导网络中起着关键作用。从细胞膜受体到细胞核内通过Smads通路和非Smads通路, 并受许多细胞外和细胞间蛋白的调节。有实验证明骨形态发生蛋白/Smad信号通路中Smad和p38MAPK在调节

Runx2/Cbfa1表达上都发挥重要作用^[11]。Nishimura等^[12]用C2C12细胞研究成骨细胞分化中的Cbfa1在出现或缺乏与Smad1或Smad5的互作用, 最终证实Cbfa1表达需要由骨形态发生蛋白激活Smad1或Smad5。

Runx2是转化生长因子 β 和骨形态发生蛋白信号通路下游的靶基因, Runx2和由骨形态发生蛋白激活的Smads共同诱导成骨细胞特异基因表达^[13]。Runx-2是骨形态发生蛋白信号的靶目标, 骨形态发生蛋白信号转导通路参与了成骨细胞对机械离心力刺激的生理响应过程, 而且在成骨细胞对力学信号引起的信息传递级联反应中扮演了重要角色^[14-20]。

在牵张成骨过程中骨形态发生蛋白基因持续表达产生的骨形态发生蛋白2、骨形态发生蛋白4等因子, 并通过旁分泌和自分泌途径作用于牵引区骨痂中的成骨细胞和成软骨细胞及其前体细胞, 诱导膜内成骨和软骨成骨^[21-30]。骨形态发生蛋白被激活以后就可以与其受体结合并启动它影响骨组织形成的信号, 骨形态发生蛋白受体是成骨形态发生蛋白信号通路的重要组成部分^[31]。已经证实骨形态发生蛋白有骨形态发生蛋白受体 I A、骨形态发生蛋白受体 I B、骨形态发生蛋白受体 II 3类受体, 和转化生长因子 β 的受体一样, 这3类受体也属于丝氨酸/苏氨酸激酶型受体。当骨形态发生蛋白与骨形态发生蛋白受体 I A、骨形态发生蛋白受体 I B型受体结合后, 骨形态发生蛋白受体 II 型受体就与骨形态发生蛋白受体 I A、骨形态发生蛋白受体 I B型受体结合形成异源二聚体, 骨形态发生蛋白受体 II 型受体磷酸化骨形态发生蛋白受体 I 型受体GS区而活化骨形态发生蛋白受体 I 型受体相应的激酶, 在通常情况下GS区抑制骨形态发生蛋白受体 I 型受体不表现出激酶活性^[32]。然后, 骨形态发生蛋白受体 I 型受体磷酸化其下游靶分子如Smads。在脊椎动物, 迄今已发现7种骨形态发生蛋白受体 I 型受体和5种骨形态发生蛋白受体 II 型受体。骨形态发生蛋白受体 II 型受体依其配体命名, 如ActR-IIA(细胞活素-II型受体), 骨形态发生蛋白 II 型受体, 骨形态发生蛋白 I 型受体通常为ALKs, 如ALK1, ALK2。ALK2最先认为是转化生长因子 β I 型受体^[33], 后生化证实为细胞活素-I型受体^[34]。目前, 包括ALK2有3种骨形态发生蛋白 I 型受体(BMPR-I A即ALK3, BMPR-I B即ALK6和ALK2), 3种骨形态发生蛋白受体 II 型受体(BMPR-II, ActR II A和ActR-II B)。除骨形态发生蛋白受体 I 型受体外, ALK1和ALK5是转化生长因子 β I 型受体, ALK4和ALK7是Nodal-I型受体, ALK4也是细胞活素 I 型受体。

骨形态发生蛋白受体 I 激活后在细胞质中大量招募并磷酸化-SMADs, R-SMADs能单独进入细胞核结合DNA序列但亲和力低^[35]。R-SMADs与co-SMADs结合形成复合体后能提高SMADs与DNA序列亲和力。R-SMADs-co-SMADs复合体进入细胞核后与协同激活因子p300和CBP, 协同调节因子结合后与特异靶基因结合调控基因表达。R-SMADs-co-SMADs复合体移入细胞核后激活

Runx2/Cbfa1, 活化Osx促使基因表达增加, 此外ATF4, Satb2等因子相互作用调节成骨细胞特异基因表达。骨形态发生蛋白将成骨细胞外的机械力刺激信号传入细胞核, 通过影响基因表达而对外界刺激作出反应, 如促使成骨细胞分化成熟, 增加骨钙素和骨桥蛋白表达, 成骨细胞外骨基质增多。同时分泌包括骨形态发生蛋白在内的大量细胞因子, 通过自分泌、旁分泌途径形成正负反馈调节^[36]。

Cas-interacting zinc finger protein(CIZ)锌指蛋白调节由骨形态发生蛋白诱导的成骨细胞分化过程。研究证实CIZ是骨形态发生蛋白/S信号通路的重要负性调节因子^[37]。成骨细胞骨形态发生蛋白信号通路的另一重要负性调节因子Tob蛋白, Tob蛋白通过抑制co-SMADs活性而负性调节成骨细胞骨形态发生蛋白/Smad信号传导^[38]。Gremlin是一种能结合和拮抗骨形态发生蛋白2, 4和7的糖蛋白, 其作用是通过抑制骨形态发生蛋白2诱导Smad1/5/8磷酸化和骨形态发生蛋白/Smad受体发挥对成骨细胞骨形态发生蛋白/Smad信号负性调节作用。除依靠SMADs途径外, ERK, JNK, 和p38MAP kinase(MAPK)途径在骨形态发生蛋白信号传递调控成骨细胞分化中具有重要作用。最近研究表明骨形态发生蛋白2能通过蛋白激酶D(PKD)激活JNK和p38, 而不依靠蛋白激酶C(PKC)进而促使Dlx5, Runx2的表达^[39]。骨形态发生蛋白2也能通过Smad途径和PKC途径促进成骨细胞凋亡, PKC途径通过Bax/Bcl-2和c-caspase-9-caspase-3, -6, -7促进人成骨细胞凋亡^[40]。

作者贡献: 实验设计为段峰, 实施为杨红岩、王心戛、张国梁、朱杨, 评估为关键。盲法评估。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 小鼠胚胎成骨细胞 MC3T3-E1-成纤维细胞样, 有多个亚克隆, 可以作为体外研究成骨细胞分化的良好模型, 以及ECM信号通路的作用研究。

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] Nakashima K,Zhou X,Kunkel G,et al.The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell. 2002; 108(1):17-29.
- [2] Kumamoto H,Ooya K.Expression of bone morphogenetic proteins and their associated molecules in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. Oral Dis. 2006;12(2): 163-170.
- [3] Fan D,Chen Z,Wang D,et al.Osterix is a key target for mechanical signals in human thoracic ligament flavum cells.J Cell Physiol.2007;211(3):577-584.
- [4] Fitzgerald J,Hughes-Fulford M.Mechanically induced c-fos expression is mediated by cAMP in MC3T3-E1 osteoblasts. FASEB J.1999;13(3):553-557.

- [5] Hutton WC, Elmer WA, Bryce LM, et al. Do the intervertebral disc cells respond to different levels of hydrostatic pressure? *Clin Biomech* (Bristol, Avon). 2001;16(9):728-734.
- [6] Wagner DR, Lindsey DP, Li KW, et al. Hydrostatic pressure enhances chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells in osteochondrogenic medium. *Ann Biomed Eng*. 2008;36(5):813-820.
- [7] Liu J, Zou L, Zheng Y, et al. NF-kappaB responds to mechanical strains in osteoblast-like cells, and lighter strains create an NF-kappaB response more readily. *Cell Biol Int*. 2007;31(10):1220-1224.
- [8] Kapur S, Baylink DJ, Lau KH. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. *Bone*. 2003;32(3):241-251.
- [9] Wadhwa S, Godwin SL, Peterson DR, et al. Fluid flow induction of cyclo-oxygenase 2 gene expression in osteoblasts is dependent on an extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *J Bone Miner Res*. 2002;17(2):266-274.
- [10] 马爱群, 席雨涛. 体外单个细胞离心力机械牵张装置[P]. 中国专利: CN2736772, 2005-10-26.
- [11] Lee KS, Hong SH, Bae SC. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene*. 2002;21(47):7156-7163.
- [12] Nishimura R, Hata K, Harris SE, et al. Core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) induces osteoblastic differentiation of C2C12 cells without interactions with Smad1 and Smad5. *Bone*. 2002;31(2):303-312.
- [13] Lee KS, Kim HJ, Li QL, et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol*. 2000;20(23):8783-8792.
- [14] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. *Nature*. 2003;425(6958):577-584.
- [15] Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(3):251-263.
- [16] Wan M, Cao X. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(3):651-657.
- [17] Higuchi C, Myoui A, Hashimoto N, et al. Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix. *J Bone Miner Res*. 2002;17(10):1785-1794.
- [18] 关键, 程宗生, 王健平, 等. 成骨细胞中Runx2对机械离心力刺激响应[J]. 华西口腔医学杂志, 2010, 28(1):38-40.
- [19] Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, et al. The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem*. 2002;277(26):23934-23941.
- [20] Li J, Jiang L, Liao G, et al. Centrifugal forces within usually-used magnitude elicited a transitory and reversible change in proliferation and gene expression of osteoblastic cells UMR-106. *Mol Biol Rep*. 2009;36(2):299-305.
- [21] 陈铭, 关键, 段峰, 等. 机械离心力对成骨细胞骨形态发生蛋白信号通路的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 16(20):3626-3629.
- [22] Liu H, Lu Q, Huang K. Selenium suppressed hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cells calcification through inhibiting oxidative stress and ERK activation. *J Cell Biochem*. 2010;111(6):1556-1564.
- [23] Bennett M, Yu H, Clarke M. Signalling from dead cells drives inflammation and vessel remodelling. *Vascul Pharmacol*. 2012;56(5-6):187-192.
- [24] Mohamed Ariff I, Mitra A, Basu A. Epigenetic regulation of self-renewal and determination in neural stem cells. *J Neurosci Res*. 2012;90(3):529-539.
- [25] Hatzia Apostolou M, Iliopoulos D. Epigenetics aberrations during oncogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(10):1681-1702.
- [26] Madrigano J, Baccarelli A, Mittleman MA, et al. Aging and epigenetics: longitudinal changes in gene-specific DNA methylation. *Epigenetics*. 2012;7(1):63-70.
- [27] Javierre BM, Hernando H, Ballestar E. Environmental triggers and epigenetic deregulation in autoimmune disease. *Discov Med*. 2011;12(67):535-545.
- [28] Chowdhury S, Erickson SW, MacLeod SL, et al. Maternal genome-wide DNA methylation patterns and congenital heart defects. *PLoS One*. 2011;6(1):e16506.
- [29] Tamura M, Nemoto E, Sato MM, et al. Role of the Wnt signaling pathway in bone and tooth. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010;2:1405-1413.
- [30] Galli C, Macaluso GM, Piemontese M, et al. Titanium topography controls FoxO/beta-catenin signaling. *Journal of dental research*. 2011;90:360-364.
- [31] Tan TW, Huang YL, Chang JT, et al. CCN3 increases BMP-4 expression and bone mineralization in osteoblasts. *Journal of cellular physiology*. 2012;227:2531-2541.
- [32] Biggs MJ, Richards RG, Gadegaard N, et al. The use of nanoscale topography to modulate the dynamics of adhesion formation in primary osteoblasts and ERK/MAPK signalling in STRO-1+ enriched skeletal stem cells. *Biomaterials*. 2009;30:5094-5103.
- [33] Liu H, Webster TJ. Mechanical properties of dispersed ceramic nanoparticles in polymer composites for orthopedic applications. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:299-313.
- [34] Zhao L, Mei S, Wang W. Suppressed primary osteoblast functions on nanoporous titania surface. *J Biomed Mater Res Part A*. 2011;96:100-107.
- [35] Menagh PJ, Turner RT, Jump DB, et al. Growth hormone regulates the balance between bone formation and bone marrow adiposity. *J Bone Miner Res*. 2010;25(4):757-768.
- [36] Baliram R, Latif R, Berkowitz J, et al. Thyroid-stimulating hormone induces a Wnt-dependent, feed-forward loop for osteoblastogenesis in embryonic stem cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(39):16277-16282.
- [37] Yang J, Zhang X, Wang W, et al. Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cell. *Cell Biochem Funct*. 2010;28(4):334-341.
- [38] Matsumoto T, Kuriwaka-Kido R, Kondo T, et al. Regulation of osteoblast differentiation by interleukin-II via AP-1 and Smad signaling. *Endocr J*. 2012;59(2):91-101.
- [39] Barhanpurkar AP, Gupta N, Srivastava RK, et al. IL-3 promotes osteoblast differentiation and bone formation in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(4):669-675.
- [40] Smink JJ, Leutz A. Instruction of mesenchymal cell fate by the transcription factor C/EBPbeta. *Gene*. 2012;497(1):10-17.