

# 骨细胞

吴浩 曹永平\*

北京大学第一医院骨科,北京 100034

中图分类号: R-1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 04-0486-13

**摘要:** 在过去的 10 年里,对骨细胞的研究有了爆炸性的突破。过去骨细胞被认为是“被动静止”的。但事实远非如此,骨细胞在许多方面都有着重要的作用。得益于其骨陷窝-小管结构,骨细胞可以感受机械应力并将其转化为生物信号,从而“指导”成骨细胞和破骨细胞根据外界力学环境的变化进行骨骼重建。另外,骨细胞还具有重要的内分泌功能,它不仅能够调节骨骼表面的细胞,同样还可以影响包括肾脏、甲状旁腺在内的其它组织器官,从而在钙磷代谢中起到重要的作用。另外,相比于成骨细胞和破骨细胞,骨细胞的寿命非常长。越来越多的证据显示,凋亡或功能异常的骨细胞可能是某些骨骼疾病的罪魁祸首。通过对骨细胞多方面功能的深入了解,将有机会在骨骼疾病方面找到新的治疗目标。本文将从骨细胞在应力感应、骨重建、内分泌调节、细胞生存等方面对骨细胞进行综述。

**关键词:** 骨细胞;应力感应;骨骼重建;内分泌调节;细胞生存能力

## Osteocytes

WU Hao, CAO Yongping

Department of Orthopedics, The First Hospital of Beijing University, Beijing 100034, China

Corresponding author: CAO Yongping, Email: caoyongping2010@sohu.com

**Abstract:** The last decade has provided a virtual explosion of data on the molecular biology and function of osteocytes. Far from being the “passive placeholder in bone”, this cell has been found to have numerous functions. Immured within the lacunar-canalicular system, Osteocyte can sense mechanical loads, transform them into biological signals, and orchestrate bone remodeling through regulation of both osteoclast and osteoblast activity. The osteocyte also acts as an endocrine cell. It not only targets cells on the bone surface but also targets distant organs, such as kidney, parathyroid, and other tissues. This cell plays a role in both phosphate metabolism and calcium availability. Moreover, compared with the osteoblast and the osteoclast, the osteocyte is much longer-lived cell. Emerging evidence indicates that signals arising from apoptotic and old/or dysfunctional osteocytes are seminal culprits in the pathogenesis of bone diseases. Therefore, with a better understanding of the role and actions of osteocytes, we have a chance to get the new therapeutic targets for the treatment of bone diseases. The review briefly demonstrates some new information of osteocyte in fields of mechanosensing, bone remodeling, endocrine regulation, and cell viability.

**Key words:** Osteocytes; Mechanosensory; Bone remodeling; Endocrine regulation; Osteocyte viability

## 1 骨细胞的组织形态学特点

骨细胞(Osteocyte)是人体骨骼中最主要的细胞成分。在成年人骨骼中,骨细胞占细胞总数的 90%~95%,大约是成骨细胞数量的 20 倍<sup>[1]</sup>。但是,过去对骨细胞的了解可谓知之甚少。直到最近 30 年,越来越多的学者才开始将精力集中在骨细胞的研究上。

与成骨细胞(Osteoblast)和破骨细胞

(Osteoclast)位于骨表面不同,骨细胞生长在骨骼内部的骨基质中。骨细胞的细胞体呈梭形或类圆形,位于基质构成的骨陷窝(osteocytic lacuna)内。与神经细胞类似,每个骨细胞具有大量向外延伸的突触(dendrites),而这些突触均位于由骨基质构成的骨小管(the canaliculi)结构中<sup>[2]</sup>。通过这些突触,骨细胞能够与骨表面的细胞、周围其它的骨细胞进行“交流”<sup>[3]</sup>。正是由于这种骨陷窝-小管系统的存在,使骨细胞的某些特定作用具有了解剖学基础。人骨细胞胞体长轴的直径大约为 20  $\mu\text{m}$ 、短轴的直径大约 10  $\mu\text{m}$ <sup>[4]</sup>;突触的直径被认为大约是骨小管

\*通讯作者:曹永平,Email:caoyongping2010@sohu.com

直径的一半,而骨小管的直径在 50 nm ~ 100 nm

之间<sup>[5]</sup>(见图1)。

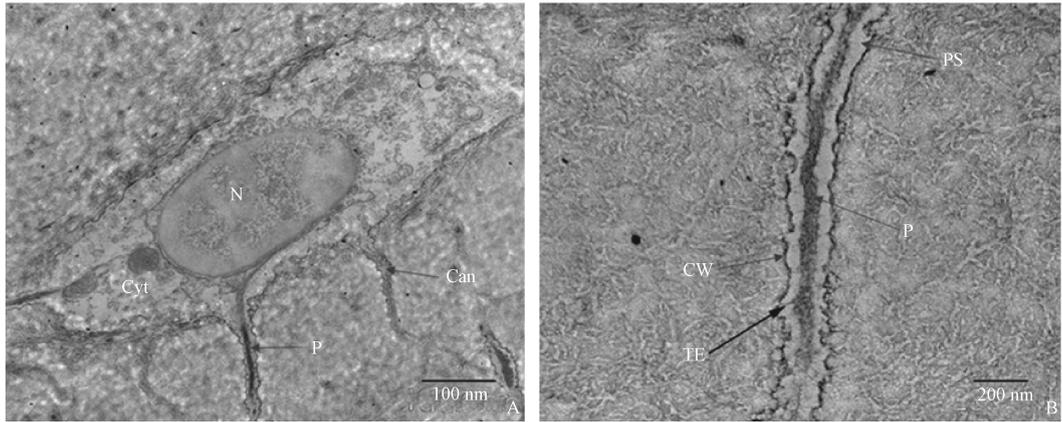


图1 骨细胞向细胞外基质发出树突样的突触

A:透射电镜下,一个骨细胞发出的突触(P)包含在骨小管(Can)内,其细胞质(Cyt)则围绕在细胞核(N)周围。骨小管之间相互连接,使所有骨细胞组成一个网络系统;B:电镜下被放大的骨小管,可以看到骨小管内穿行的骨细胞突触(P)被横穿细胞外空间(pericellular space,PS)的锚定结构(tethering elements,TE)固定在骨小管壁(CW)上  
引自:William R. Thompson, Clinton T. Rubin, Janet Rubin. Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene*, 2012, 503:179-493.

### Fig. 1 Bone cells to the extracellular matrix issue dendritic synapse

A: under transmission electron microscope, a bone cell sends synapse (P) contained in the canalculi (Can) in the cytoplasm (Cyt) around the nucleus (N) in peripheral. The mutual connection between the canalculi drives all bone cells to form a network system; B: bone canalculus is enlarged under the electron microscope. The bone cell synapse in bone canalculus through (P) is across the extracellular space (pericellularspace, PS) of the anchor structure (tethering elements, TE) and is fixed on the bone canalculus (CW) on the wall.

From: William R. Thompson, Clinton T. Rubin, Janet Rubin. Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene*, 2012, 503:179-493.

普遍认为,骨细胞起源于成骨细胞。在骨形成的终末阶段,成骨细胞将可能有3种不同的归宿:分化成为骨细胞、转移至骨表面成为暂不活动的成骨细胞、进入程序死亡过程(凋亡)<sup>[6]</sup>。在骨形成过程中,部分成骨细胞被遗留在矿化的骨基质中,这就形成了早期的骨细胞,也称为“骨样骨细胞(osteoid osteocyte)”。在被“埋入”骨基质的过程中,早期的骨细胞能够发出大量突触伸展至骨表面和血管附近,与成骨细胞、破骨细胞、内皮细胞产生广泛的联系。Holmbeck及其同事<sup>[7]</sup>的研究显示,骨细胞的形成是一个主动的长入过程,需要清除骨基质中的胶原纤维和其它基质分子。他们发现,在基质金属蛋白酶(MT1-MMP)缺陷的老鼠中,其骨细胞的突触数量和长度显著少于正常老鼠,但骨细胞的活性和密度没有受到明显影响。目前对突触生长的调节因素尚不太清楚,可能与骨细胞生长的位置、年龄、物种都有关联。

与成熟的骨细胞相比,新形成的骨细胞仍然保留有部分成骨细胞的特点,可以表达骨桥蛋白

(osteopontin)和整合素 $\beta 3$ (integrin  $\beta 3$ )<sup>[8]</sup>。这些早期的骨细胞体积较大,具有大量的核糖体、发达的内质网和高尔基体,从而能够合成大量的蛋白质和粘多糖<sup>[9]</sup>。在骨细胞分化成熟的过程中,某些特异性标记物,如碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)、骨唾液酸蛋白(bone sialoprotein)、骨钙素(osteocalcin),其表达逐渐减少,而另外一些标记物,如骨桥蛋白(osteopontin)、整合素 $\beta 3$ (integrin  $\beta 3$ ),仍然可以继续表达。同时,诸如牙本质基质蛋白1(dentin matrix protein 1, DMP1)、细胞外基质磷酸糖蛋白(matrix extracellular phosphor-glycoprotein, MEPE)等新的标记物则逐渐出现<sup>[9]</sup>。这些蛋白标记物与骨细胞所处的分化时期、功能阶段密切相关,并能够用以与成骨细胞区分,本文后面的内容会对其中一部分进行详细的叙述。

## 2 骨细胞的应力感应及转导作用

早在1982年,Wolff<sup>[10]</sup>就发现骨骼的骨量和正常生理状态的维持有赖于对骨骼施加适当的应力刺

激,即 Wolff 定律。随着近些年对骨细胞研究的深入,目前认为骨细胞在感受外界应力刺激、转化并传导应力信号上起着核心的作用。目前普遍被接受的观点是,外界机械应力作用于骨骼后,骨骼基质发生形变,骨骼中分布于骨陷窝的骨细胞和附着于骨基质上的成骨细胞受到牵拉而发生形变。同时,骨骼基质形变可造成对骨陷窝-小管系统里液体流动的改变,这些改变通过某些特殊的机制被骨细胞感受到,并经过细胞内途径转化成生物化学信号,通过骨细胞突触之间的广泛连接,影响到包括骨细胞、成骨细胞、破骨细胞在内多种细胞功能<sup>[11]</sup>。

## 2.1 应力在骨骼内的传导与转化

当应力施加在骨骼上后,应力在骨骼内传导并转化为能够被骨细胞感受的刺激形式(stimulation),这些方式包括牵拉力、静水压力、流体剪切应力以及流动电势(streaming potentials)<sup>[12]</sup>。最初,许多学者猜测流动电势是骨细胞感受外界应力的方式。他们在研究中对骨骼施加不同频率的应力,同时检测骨骼中由应力诱发的流动电势及骨骼骨质形成量。结果发现,随着施加应力的频率的增高,其流动电势与骨骼骨质形成量都与频率成正相关。据此,他们认为流动电势在间隙液流对骨骼细胞的刺激过程中有一定的作用<sup>[13]</sup>。而在另外一些学者的实验中,他们向液流中添加中性右旋糖酐来提高其黏度(在灌流液流速不变的情况下,灌流液黏度的增加使对细胞的流体剪切应力增加,而流动电势并无变化),结果显示,细胞的反应呈现出对流体剪切应力强度大小的依赖<sup>[14]</sup>。Klein-Nulend 等<sup>[15]</sup>通过实验发现,将鸡颅骨中分离出的骨细胞、成骨细胞、纤维母细胞分别置于不同的应力环境中(包括静水压力环境、脉冲液体流动环境),骨细胞对脉冲液体流动产生的剪切应力更加敏感。目前,经过过去 10 余年大量的理论和试验研究证实,更可能被骨细胞感受到的应力刺激方式可能是细胞周围液体的流动和基质形变产生的牵拉力,而不是流动电势和静水压力。

但是,经典的“液体流动假说”多来自体外试验所得到的结论。在体外试验时,骨细胞处于人工创造的二维环境中,而在体内,骨细胞所处的三维环境与体外完全不同。首先,在体内环境中,骨细胞胞体和突触上有许多结构将细胞锚定在周围矿化的基质上<sup>[16]</sup>。其次,经试验证实,与体外呈平面结构的细胞相比,保持三维结构的骨细胞对同等大小的应力刺激更加敏感<sup>[17]</sup>。另外,在体内环境中,骨细胞突触周围矿化基质所受到的剪切应力是突触细胞膜所

受应力的 20 倍,而在体外试验时,细胞体和突触所受应力几乎完全相同<sup>[18]</sup>。总之,体外二维环境下的试验在解释骨细胞感受和传导应力信号时存在一定的局限性。尽管如此,体外试验仍然为我们提供了许多可靠的信息。例如,体外试验证实,在应力刺激下,骨细胞内 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路相关基因表达显著升高,并伴有硬化蛋白(Sclerostin)表达下调<sup>[19]</sup>,这些结果在体内环境下的试验中得到了证实<sup>[20]</sup>。

另外,许多学者通过体外试验尝试区分骨细胞胞体和突触在应力感受时有无明显区别。Adachi<sup>[21]</sup>利用微型探针来探测细胞体和突触的局部形变。他发现,细胞体只有在发生更大程度形变时才会反应出现钙离子的流动。据此,他认为突触比细胞体对应力刺激更加敏感。Burra 等<sup>[22]</sup>最近发现,通过特定方法分别刺激骨细胞胞体和突触时,突触上的整合素(integrins)可能是重要的应力传导结构。另外,还有近期研究显示,只有当刺激作用于突触上的整合素而非细胞体或突触其它部位时,骨细胞表面才会出现可以探测到的电流。这有可能是整合素附着处牵张压力门控离子通道(stretch activated ion channels)被激活的缘故<sup>[23]</sup>。根据这些结果看来,骨细胞突触在应力传导中的作用较细胞体更大,而其表面附着的整合素可能起到了关键作用。

## 2.2 骨细胞感受应力

骨细胞的网络状结构是其感受外界应力刺激的重要基础。骨细胞发出的大量突触在骨小管中走行,并通过缝隙连接(gap junction)与细胞体或其它突触连结。在骨小管中充满了富含蛋白多糖的液体,并有横行的纤维将突触连接在骨小管壁上<sup>[23]</sup>。细胞外骨陷窝-小管系统内液体的流动不仅能够输送营养物质、带走代谢产物,还能够对骨细胞产生应力刺激。当应力刺激经过前述方式传导至骨细胞水平后,骨细胞通过特定的方式感知应力刺激,将其转化为生物化学信号。这个过程涉及的分子机制较广泛,目前相关的研究仍然不是非常透彻。这些机制可能单独起作用,也可能相互影响而共同发挥功能。以下仅介绍其中部分相关内容。

整合素(integrins)是骨细胞表面重要的具有感受作用的结构,它由 $\alpha$ 、 $\beta$ 两个亚单位组成的异二聚体粘附分子, $\alpha$ 、 $\beta$ 亚单位均为单跨膜糖蛋白。其中,胞外亚单位( $\alpha$ )可以通过特殊分子结构与细胞外基质成分的相应配体结合,从而介导细胞-细胞、细胞-细胞基质之间的相互作用<sup>[23]</sup>。在细胞内,整合

素在局灶粘着斑 (focal adhesion complexes, FACs) 处,通过接头蛋白(主要包括踝蛋白 talin、桩蛋白 paxillin 和  $\alpha$ -辅肌动蛋白  $\alpha$ -actinin)与肌动蛋白细胞骨架相连,从而构成整合素—细胞骨架复合体<sup>[24]</sup>。目前已经证实,整合素  $\beta 3$  可以在骨小管处将骨细胞突触固定在骨小管壁上(见图1)。另外,通过免疫染色研究发现,骨细胞突触的细胞膜上除了有整合素  $\beta 3$  外,还存在有 CD44<sup>[16]</sup>。由于 CD44 可以与细胞基质中的透明质酸相连接,它可能也是细胞突触上的固定位点。当骨陷窝—小管内的液体流动经过这些固定位点时,会施加一个环形应力 (hoop strain) 在突触的细胞膜上,从而使局部应力增大超过 100 倍<sup>[25]</sup>。由于骨细胞细胞体膜与骨陷窝壁的距离较大,这种锚定结构并不存在细胞体部<sup>[23]</sup>。

细胞骨架(cytoskeleton)为骨细胞感受应力刺激提供了内在的结构基础。细胞骨架由肌动蛋白(actin)、中间纤维(intermediate filaments)和微管(microtubule)构成,其涉及细胞内物质转运、细胞结构维持、细胞功能分区等一系列功能。当流体剪切应力作用在骨细胞时,骨细胞内的肌动蛋白纤维发生重组,转变为收缩状态<sup>[26]</sup>。另外,有实验证明,当细胞骨架中的肌动蛋白纤维断裂后,骨细胞对流体剪切应力的感受能力明显下降<sup>[27]</sup>。另外,细胞骨架不仅能够对高强度应力刺激作出反应,它同样还能够感受低强度震动。在对间充质干细胞的实验中,这两种形式的应力刺激均能够抑制干细胞向脂肪细胞的分化,并促进其向骨细胞方向分化<sup>[28]</sup>。

另外,当应力刺激使突触内的肌动蛋白微丝相对于锚定部位发生滑动时,牵张压力门控离子通道(stretch activated ion channels)被激活,使应力信号转化为化学信号。研究发现,骨细胞在受到应力刺激早期即出现细胞内钙离子浓度增加<sup>[29]</sup>,这可能与牵张压力门控离子通道开放有关。随后,某种瞬时电位感应通道(transient receptor potential channels)可能被激活,从而使钙离子进一步向细胞内流动。但目前对骨细胞表面这种瞬时电位感应通道是否存在尚没有直接证据,需要进一步的研究<sup>[30]</sup>。

初级纤毛广泛存在于各种真核细胞表面。它由 9 根环形排列的鞭毛轴丝(axoneme)构成,而每根轴丝则由一对微管(microtubule)构成。初级纤毛依靠一种叫作纤毛内运输的(intraflagellar transport, IFT)过程形成和维持,这是一个沿纤毛轴丝进行的双相蛋白交换过程。由于纤毛内无法合成蛋白质,在细胞体内合成的蛋白质通过 IFT 运输至纤毛。驱动蛋

白 2 (Kinesin-2) 由驱动蛋白家族蛋白 3a (Kif3a) 和驱动蛋白家族蛋白 3b (Kif3b) 构成,负责顺向运输过程;而动力蛋白(dynein)则与逆向运输相关<sup>[31]</sup>。骨细胞同样具有初级纤毛<sup>[32]</sup>。多囊肾蛋白(polycystin)由多囊肾基因(Pkd)编码,是一种位于纤毛上的蛋白结构,与维持正常骨骼结构有重要意义<sup>[33]</sup>。在体外试验中,骨细胞能够通过表面的纤毛感受液体流动的变化。但在体内环境中,由于对液体流动的感受主要发生在突触周围,很难想象初级纤毛可以在不严重弯曲的情况下存在于骨陷窝—小管系统内<sup>[34]</sup>。因此,也有部分学者认为初级纤毛在体内能够感受骨细胞周围静水压力的变化,但这种假说并没有得到证实<sup>[35]</sup>。

连接蛋白(connexin)则是一种跨膜蛋白六聚体复合物,其组成单位被称作接合质(connexon)。它们通过在细胞膜表面的特定排列,在细胞之间形成缝隙连接(gap junction)。考虑到骨细胞间广泛的网络联系,连接蛋白在骨细胞功能中起到重要作用并不足为奇。尤其是连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43)对骨细胞更加重要。当骨细胞的 Cx43 缺陷时,骨细胞的凋亡明显增加<sup>[36]</sup>。另外,当骨细胞和成骨细胞的 Cx43 均出现异常时,这类转基因老鼠的破骨细胞生成和活性会明显提高,从而表现为骨质大量吸收、骨量减低<sup>[37]</sup>。虽然在体外试验中 Cx43 能够调节骨细胞对应力刺激的反应,但与预想结果不同的是,Cx43 缺陷的老鼠在应力刺激下成骨作用反而有所增强<sup>[37]</sup>。

从上面这些内容不难看出,骨细胞感受应力刺激的形式是相当复杂的,虽然对其中一部分方式已经有了一定的了解,但它们之间的内在联系、相互作用仍需要进一步研究。

### 2.3 骨细胞内信号传导

当应力信号被骨细胞感受到并转化为生化信号后,骨细胞内的一些经典传导通路被激活,从而改变了骨细胞的生长及分化过程。这其中涉及的分子机制包括一氧化氮(NO)、前列腺素(prostaglandins)、Wnt/ $\beta$ -连环蛋白(Wnt/ $\beta$ -catenin)通路等。

一氧化氮(NO)是 L 型精氨酸转化为 L 型瓜氨酸过程中在一氧化氮合酶(NOS enzyme)的作用下产生的。大量研究均显示,骨细胞在受到机械应力刺激后能够产生大量一氧化氮<sup>[38]</sup>。一氧化氮被证实能够调节成骨细胞和破骨细胞的活性,当一氧化氮的形成受抑制时,机械应力诱导的骨形成过程也会受到抑制<sup>[39]</sup>。但与过去观点不同的是,最近的研

究认为应力诱导的一氧化氮产生与表皮型一氧化氮合酶(eNOS)无关<sup>[40]</sup>。考虑到一氧化氮在应力刺激时骨形成过程中所起的作用,目前的研究热点多集中在骨细胞通过何种酶的作用产生一氧化氮。

前列腺素广泛存在于骨细胞及成骨细胞中,其在应力诱导的骨形成过程中发挥着重要的作用。许多研究都证实,在受到应力刺激时,骨细胞能够快速产生大量前列腺素<sup>[41]</sup>。前列腺素的产生主要依靠环氧酶(Cyclooxygenase, COX)的作用,它包括基本的COX-1和可诱导产生的COX-2。应力刺激对骨细胞中COX-1的活性没有影响,但COX-2的活性则会显著增加<sup>[42]</sup>。更重要的是,在体外试验时,只有当COX-2受到抑制时,液体流动刺激诱导的前列腺素增多才会受到抑制<sup>[43]</sup>。另外,当受到应力刺激时,骨细胞产生的前列腺素可以通过Cx43形成的半通道(hemi-channels)和嘌呤受体(purinergic receptors)被释放至细胞外<sup>[44]</sup>。

应力的变化会导致细胞内Ca<sup>2+</sup>的动员。许多研究都显示,在受到静态或动态流体剪切应力时,成骨细胞和骨细胞内Ca<sup>2+</sup>均会作出快速的反应<sup>[45]</sup>。进一步显示,当Ca<sup>2+</sup>在细胞内作为第二信使的功能受到破坏时,即使流体剪切应能够刺激骨细胞正常释放PGE<sub>2</sub>,细胞内相关基因的表达也不会发生变化<sup>[46]</sup>。这种细胞内钙离子浓度的快速升高被认为是由于磷脂酶C(phospholipase C)和三磷酸肌酸(IP3)的活化所致。稳定的液体流动能够诱导细胞内钙离子的释放,而不稳定的液体流动则不能,这说明细胞本身可能能够分辨应力刺激的临时变化<sup>[47]</sup>。

Wnt/ $\beta$ -连环蛋白(Wnt/ $\beta$ -catenin)信号通路被认为是目前最重要的细胞内信号通路。Wnt蛋白是一组由Wnt基因编码的分泌型糖蛋白,长度约为350~380个氨基酸<sup>[48]</sup>。通常,细胞内游离 $\beta$ -catenin的水平维持在一个较低的水平,而糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase, GSK-3 $\beta$ )、轴抑制蛋白(axis inhibitor, Axin)和结肠腺瘤性息肉蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)等与 $\beta$ -catenin结合组成可降解的蛋白复合体。在Wnt/ $\beta$ -catenin通路激活的过程中,首先Wnt与受体复合物结合,受体复合物包括低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)如LRP-5、LRP-6以及卷曲蛋白(Frizzled, Fz)。而后,在卷曲蛋白(Fz)的作用下,蓬松蛋白(Dsh)被磷酸化而激活,使其下游的糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )中丝氨酸9磷酸化而被抑制。受到抑制的GSK-3 $\beta$ 导致胞浆内 $\beta$ -catenin水平提高。最

终, $\beta$ -catenin迅速转移至细胞核内,通过一系列目前还不是很清楚的机制影响基因的转录<sup>[49]</sup>。

骨细胞相关的体外试验显示,各个信号通路之间存在着广泛的关联。流体剪切应力可以诱导骨细胞产生PGE<sub>2</sub>,并使骨细胞表面的连接蛋白43(connexin43)表达增多<sup>[50]</sup>。反过来,PGE<sub>2</sub>能够激活cAMP/蛋白激酶A(PKA)、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/苏氨酸激酶(Akt)途径,使细胞内GSK3磷酸化增强,从而导致细胞内 $\beta$ -catenin的转录<sup>[44]</sup>。在不受流体剪切应力刺激的情况下,仅PGE<sub>2</sub>同样可以诱导骨细胞和成骨细胞表达 $\beta$ -catenin并激活Wnt通路<sup>[51]</sup>。 $\beta$ -catenin还能诱导Cx43的表达,从而增加骨细胞之间的缝隙连接<sup>[52]</sup>。由此可见,PGE<sub>2</sub>、Cx43、Wnt/ $\beta$ -catenin通路、PI3K/Akt之间存在着广泛的内在联系,共同调节着骨细胞的功能。

### 3 骨细胞对骨代谢的调节

如前文所述,由于具有复杂的网络状结构,骨细胞与位于骨表面的成骨细胞和破骨细胞存在广泛联系。在受到外界应力刺激时,骨细胞能够作为感受细胞感受应力信号,将应力信号转化为生化信号,调节成骨细胞和破骨细胞的功能,从而调节骨的代谢。

#### 3.1 骨细胞和成骨细胞

基于对骨细胞形态学的研究以及骨细胞来源于成骨细胞的事实,许多学者在很早就通过实验证明骨细胞能够调控成骨细胞的活性<sup>[53]</sup>。通过前文提到的多种细胞内通路的相互作用,骨细胞得以完成对成骨细胞活性的调控。除前文提到的NO和PGE<sub>2</sub>对骨形成的影响外,骨细胞能够表达多种Wnt/ $\beta$ -连环蛋白通路的抑制因子,调控成骨细胞的活性。

硬化蛋白(Sclerostin)是由成熟骨细胞分泌的一类Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路的抑制因子,它能够与低密度脂蛋白受体相关蛋白5(LRP-5)结合,从而减少Wnts与LRP-5的结合,其编码基因为Sost基因<sup>[54]</sup>。目前认为,硬化蛋白可以通过骨小管系统被输送至骨表面,抑制骨表面成骨细胞的活性。在研究硬化蛋白缺陷的转基因老鼠时发现,这类老鼠表现出类似于人类的骨硬化病(sclerosteosis)的特点,而骨硬化病则是由于SOST基因表达异常所致<sup>[55]</sup>。与此相反,当SOST过表达时,其骨量则会因为骨形成的减少而降低<sup>[56]</sup>。

另外,骨细胞还能够表达分泌型卷曲蛋白相关蛋白1(sFRP1)和Dkk1蛋白,两者均是Wnt蛋白的

抑制因子。Dkk1 蛋白能够竞争性抑制 Wnts 与 LRP-5/6 的结合,从而抑制成骨细胞的分化及骨形成过程<sup>[57]</sup>。选择性地删除 Dkk1 的一个等位基因就足以促进骨形成过程,但对骨吸收过程没有影响<sup>[58]</sup>。sFRP1 既可以与 LRP-5/6 结合也可与 Wnt 结合,从而抑制 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路的活性。当老鼠的 sFRP1 被删除后,其松质骨的骨密度明显增加;在体外,其成骨细胞则表现出更强的增生能力,分化为骨细胞的能力也有增强<sup>[59]</sup>。sFRP1 的表达在早期凋亡的骨细胞中表达更多,而成熟骨细胞表达的 sFRP1 则有所减少,由此推断,sFRP1 可能对骨细胞的生存具有负性调节作用<sup>[60]</sup>。

应力刺激诱导骨形成的过程中,骨细胞内 SOST 基因转录下降,硬化蛋白(Sclerostin)表达减低;同时,Dkk1 的表达也减低,而 sFRP1 的转录没有明显影响;当缺乏应力刺激时,骨细胞内 Dkk1 和 sFRP1 的表达则显著提高<sup>[61]</sup>。当老鼠的 SOST 基因被选择性删除后,即使缺乏应力刺激,老鼠的骨量也不会明显减低<sup>[62]</sup>。由这些结果可以看出,在受到应力刺激时,骨细胞可以减少 Wnt 的抑制因子的表达,从而使 LRP-5/6 能够与 Wnt 结合,激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路。

除此之外,牙基质蛋白 1(DMP1)可能是另外一种在骨细胞内高表达的调控因子。应力刺激下,骨细胞能够产生大量牙基质蛋白 1(DMP1),尤其是在骨小管周围的基质中,其功能可能与羟基磷灰石的形成有关<sup>[63]</sup>。另外还有细胞外基质磷酸化糖蛋白(MEPE),它可能具有抑制骨形成的作用。MEPE 缺陷的老鼠表现出骨形成水平的增高,其骨量随年龄的丢失也相对更加缓慢<sup>[64]</sup>。

### 3.2 骨细胞和破骨细胞

区别于对骨细胞调控骨形成过程的认识,直到近几年,关于骨细胞在控制骨吸收(bone resorption)中的作用的研究才逐渐增多。

骨吸收(bone resorption)过程对于骨骼生长中矿化基质的清除、骨骼重建、维持钙磷代谢平衡、清除受损骨基质等许多生理过程都具有重要的意义。骨吸收过程是需要由破骨细胞完成。破骨细胞的寿命比较短暂,其分化、生存、功能都受到支持细胞产生的 NF $\kappa$ B 配体的细胞因子受体激活因子(cytokine receptor activator of NF $\kappa$ B ligand, RANKL)的影响。相反,与 RANKL 起拮抗作用的细胞因子是骨保护素(osteoprotegerin, OPG),它能够与 RANKL 竞争性地与 NF $\kappa$ B 配体的细胞因子受体(RANK)结合,从

而抑制 RANKL 的作用<sup>[65]</sup>。在人体内,能够产生 RANKL 的细胞非常多,包括成骨细胞、骨细胞、未分化的原始干细胞、B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞、滑膜成纤维母细胞等。在体外试验时,这些细胞都具有促进破骨细胞生成的作用<sup>[66]</sup>。但是,对于体内环境中,何种特定细胞能够调控骨吸收却不得而知。直到最近,人们才逐渐确信骨细胞具有通过 RANKL 通路调控骨吸收过程的功能。

最初的证据来自 Tatsumi 等人,他们发现在使用白喉毒素诱导骨细胞凋亡时,随着骨细胞死亡的增加,RANKL 的表达也明显增加<sup>[67]</sup>。但他们仍然不知道 RANKL 是否是由骨细胞产生的,也不知道具体的分子机制。随后,有学者通过特定的方法培育出一种骨细胞的甲状旁腺激素受体被持续激活(caPTHr)的转基因老鼠。他们发现这种老鼠体内的成骨细胞和破骨细胞数量都有明显增加,并伴有 RANKL 表达的增加和硬化蛋白表达的降低<sup>[68]</sup>。毫无疑问,这个实验证明了骨细胞能够调节骨吸收和骨形成过程,但仍无法确定增加的 RANKL 来自骨细胞。随后又有学者对这种 caPTHr 转基因老鼠进行研究,他们利用过表达硬化蛋白的方法抑制了骨形成过程,但骨吸收过程却没有受到影响<sup>[69]</sup>。同时,还有学者利用基因技术特异性地减少了老鼠体内的成骨细胞数量,他们发现骨吸收过程、破骨细胞数量、RANKL 表达均未受到明显影响<sup>[70]</sup>。综合以上研究成果,最终确定骨细胞可以独立调控骨吸收过程,而非成骨细胞或其它细胞。

影响骨细胞调控 RANKL 通路的影响因子很多。如前文所述,PTH 受体激活能够促进骨细胞表达 RANKL。Schaffler 及其同事的研究显示,对于雌激素缺陷的老鼠,皮质骨内骨吸收与骨细胞的凋亡相关;当细胞凋亡被抑制后,皮质骨骨吸收也随即受到抑制<sup>[71]</sup>。这说明雌激素可以通过维持骨细胞生存抑制骨吸收过程,但这个过程是否与骨细胞表达 RANKL 相关尚不十分清楚。另外,骨细胞在凋亡过程中也会伴有 RANKL 表达增高。Schaffler 实验室的研究显示,正在凋亡的骨细胞可以通过向周围正常骨细胞发出某些细胞因子,使这些正常骨细胞表达大量 RANKL,从而促进骨吸收过程<sup>[72]</sup>。

## 4 骨细胞的内分泌作用

虽然骨细胞是骨骼内数量最多的细胞类型,但骨细胞具有的生理功能仍然显得非常“神秘”。除了具有前文提到的感受并转导应力信号、调节骨代

谢等功能,最新的研究认为骨细胞还能像内分泌细胞一样调节人体其它器官的代谢。

过去的研究认为,慢性肾脏病(chronic renal disease,CKD)中所出现的钙磷代谢异常是由于继发性甲状旁腺功能亢进引起的。但近几年在研究慢性肾脏病的过程中发现,骨细胞也具有调节机体磷代谢的功能,它能像内分泌细胞一样向包括肾脏等靶器官发出信号,调节其功能<sup>[73]</sup>。目前认为,在调节磷离子代谢时,骨细胞产生的具有激素样作用的物质是纤维母细胞生长因子23(Fibroblast growth factor 23,FGF23)。

FGF23是一种32kDa的小分子蛋白质,绝大多数来源于骨细胞,另外还有少量FGF23来源于成骨细胞。骨细胞分泌FGF23受到血液内1,25-羟基维生素D和磷含量的调节。当1,25-羟基维生素D和磷摄入量增多时,血液中FGF23降低;反之亦然。但是,磷摄入量变化对骨细胞分泌FGF23的影响并不受1,25-羟基维生素D的调节,它对骨细胞的影响是独立产生的<sup>[74]</sup>。

FGF23能够与多种FGF受体及其共受体Klotho结合,抑制肾脏近曲小管上皮细胞表面IIa和IIc型钠-磷共转运体的功能,从而促进肾脏对磷的排泄。另外,它还能够抑制肾脏1 $\alpha$ -羟化酶的活性并刺激肾脏24-羟化酶的活性,抑制骨化醇的生成,并增加25-羟基维生素D和1,25-羟基维生素D的降解<sup>[75]</sup>。有研究显示,血液中FGF23含量升高可能是CKD病人最早出现变化的指标之一。当病人的肾功能不全处于2期时,其骨细胞分泌的FGF23就已经明显升高,而此时血液中甲状旁腺素、维生素D、钙、磷的含量仍没有明显变化<sup>[76]</sup>。与CKD早期FGF23升高同步发生的只有早期即出现的骨转化和基质矿化异常<sup>[77]</sup>。由此可见,骨细胞分泌的FGF23能够独立于其它因素,单独对机体钙磷代谢及骨矿代谢产生影响。

最近,新的研究认为,在某些病理状态下,骨细胞过量分泌的FGF23能够以旁分泌的形式作用于骨骼内的其它细胞。有证据显示,当在体外给予成骨细胞系超过生理量的 $\alpha$ -Klotho和FGF23时,成骨细胞的增殖明显升高,而其矿化作用降低<sup>[78]</sup>。进一步的试验则显示,即使在缺乏 $\alpha$ -Klotho的条件下,FGF23同样能够对幼鼠锁骨内的成骨细胞产生类似的作用<sup>[79]</sup>。由此可见,在发生一些会导致FGF23分泌增多的疾病(如慢性肾功能不全、慢性肾病等)时,骨的代谢将受到影响,而这种影响将导致机体内

磷代谢的紊乱。

而后在研究X染色体低磷血症(X-linked hypophosphatemia,XLH)、常染色体显性低磷血症性佝偻病(autosomal dominant hypophosphatemic rickets,ADHR)和常染色体隐性低磷血症性佝偻病(autosomal recessive hypophosphatemic rickets,ARHR)过程中揭示了FGF23在调节矿物质代谢中的核心作用。研究显示,在ADHR的病人中,由于编码FGF23的基因发生错义突变,细胞内的FGF23难以被水解,从而导致其含量升高,引起低磷血症、骨软化症状等佝偻病样表现<sup>[80]</sup>。与之相类似,ARHR、XLH病人也表现出相类似的症状,而且这些病人血清中FGF23含量也显著升高<sup>[81]</sup>。随后的研究证明,ARHR是由于DMP1突变引起的,PHEX基因突变则导致XLH的发生。由于DMP1和PHEX均对FGF23的血清含量具有下调作用,当DMP1或PHEX缺失时,升高的FGF23导致肾脏排出的磷增多、血磷含量降低,从而导致骨软化症等佝偻病表现<sup>[82-83]</sup>。

另外,FGF23不仅能够调节钙磷的代谢,FGF23的升高可能还与心血管疾病相关。最近的实验数据显示,FGF23能够通过非Klotho途径对心肌细胞产生影响,诱导心肌细胞过度增生肥大<sup>[84]</sup>。同时,Klotho在CKD病人大动脉相关细胞表达下降也可能与血管弹性丧失有关<sup>[85]</sup>。虽然对于这些研究结果的具体机制还不十分清楚,但相关的深入研究有助于我们更进一步了解骨细胞产生的细胞因子在全身性疾病中起的作用。

## 5 骨细胞的生存

骨细胞是人体中高度分化的细胞之一,其生存和死亡都对骨骼功能的维持具有非常重要的意义。因此,对骨细胞凋亡(apoptosis)和自噬(autophagy)进行研究具有重要的意义。

### 5.1 骨细胞的凋亡

当细胞处于低氧环境、DNA受损等条件下时,细胞内线粒体膜通透性发生改变,线粒体内的细胞色素C被释放到胞浆内,激活细胞内的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspases)。在caspases的作用下,细胞内重要的结构蛋白被降解,细胞最终裂解成许多凋亡小体。这个过程即细胞凋亡过程。骨细胞死亡即是通过细胞凋亡过程完成的,它对清除异常细胞、维持骨的稳态发挥了重要作用<sup>[86]</sup>。

最近的研究表明,应力刺激能够调节骨细胞的

凋亡,从而使骨骼适应应力刺激的变化。在啮齿类动物的实验中,当骨骼没有受到应力刺激时,皮质骨和松质骨内凋亡的骨细胞明显增多;另一方面,当应力足以诱导骨形成时,凋亡的骨细胞数量则明显减少<sup>[87]</sup>。这种抗凋亡作用可能与流体剪切应力<sup>[88]</sup>和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)有关<sup>[89]</sup>。也有证据表明,骨细胞表面起锚定作用的整合素分子的激活具有抗凋亡作用<sup>[90]</sup>。除此之外,骨细胞周围基质的水解可能产生某些具有抗凋亡作用的分子,从而抑制骨细胞的凋亡<sup>[91]</sup>。当外界应力超过骨骼的承受范围时,骨组织就会出现微损伤(microdamage)。微损伤产生的微裂隙(microcrack)会造成骨陷窝-小管系统的中断,影响骨细胞周围液体的流动、营养的运输并造成缺氧环境,从而使骨细胞凋亡增多<sup>[92]</sup>。

雌激素的缺乏也是诱导骨细胞凋亡增加的重要原因。动物实验的数据显示,啮齿动物在卵巢切除术后2周左右,其骨细胞凋亡显著增高<sup>[93]</sup>。与此类似,子宫内膜异位症的年轻女性病人在口服促性腺激素释放激素类似物后,其雌激素水平显著下降,同时出现髌骨松质骨内骨细胞凋亡的显著增加<sup>[94]</sup>。由此推断,雌激素是维持骨细胞生存的重要基础。体外试验的结果显示,雌激素可以通过某种核外受体激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)相关的抗氧化信号途径,从而维持骨细胞的生存<sup>[95]</sup>。

另外,糖皮质激素的应用能够直接刺激骨细胞及成骨细胞的凋亡,并延长破骨细胞的寿命而非增加其数量<sup>[96]</sup>。糖皮质激素能够阻断局部黏着斑激酶(FAK)介导的生存信号,从而诱导骨细胞的凋亡<sup>[97]</sup>。随着年龄的增加,由于骨细胞表达的11 $\beta$ -类固醇脱氢酶1(11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1)增多,机体对糖皮质激素的这种作用更加敏感。使用糖皮质激素的病人的骨细胞凋亡导致骨骼脆性的增加,骨折风险大大提高,而此时,其骨密度往往下降不明显,或仅有轻度下降<sup>[98]</sup>。

凋亡的骨细胞能够直接增强破骨细胞的活性,从而促进骨吸收过程。但似乎更合理的解释是凋亡的骨细胞能够向周围正常骨细胞发出某些细胞因子,使这些正常骨细胞表达大量RANKL,从而促进骨吸收过程<sup>[72]</sup>。试验证明,微裂隙周围凋亡的骨细胞中无法探测到RANKL的产生,而距离微裂隙100~300  $\mu\text{m}$ 的有生命的骨细胞则能够表达大量的RANKL<sup>[72]</sup>。与此类似,凋亡细胞表达的OPG及

VEGF量也非常低,而与之邻近的存活的骨细胞则能够表达产生大量OPG和VEGF<sup>[99]</sup>。随后的研究则显示,凋亡骨细胞调节周围正常骨细胞时传递的细胞因子可能是高迁移率族蛋白1(high mobility group box 1, HMGB1),它能够促进周围骨细胞表达RANKL、TNF $\alpha$ 等细胞因子<sup>[100]</sup>。另有体外试验证明,细胞凋亡时产生的凋亡小体能够促进正常骨细胞表达更多RANKL,但考虑到凋亡小体的大小及骨小管的直径,凋亡小体在体内能否产生同样的效果尚不确定<sup>[101]</sup>。

## 5.2 骨细胞与自噬

自噬(autophagy)一词来源于希腊语,意指“自我吞食”。自噬广泛存在于各种真核细胞中,是具有高度保守性的细胞行为之一。当细胞在应激刺激下受到损伤时,细胞内的大分子物质及细胞器通过自噬作用被降解为细胞可以再利用的小分子物质。因此,自噬在维持细胞内环境稳态、促进细胞生存方面起着重要的作用<sup>[102]</sup>。对于骨细胞这类高度分化的细胞而言,自噬的作用则更加重要。当骨细胞受到氧化应激、线粒体功能损伤、低氧等刺激时,自噬过程可以清除细胞内产生的有害的大分子物质,避免骨细胞的进一步损伤。最新的体外研究显示,对体外培养的骨细胞使用小剂量地塞米松可以显著提高自噬水平,并可以探测到自噬小体明显增多<sup>[103]</sup>。

但是,自噬过程对细胞的保护作用也是一把“双刃剑”。当细胞所受到的应激刺激较小时,自噬能够保护细胞免受损伤;然而,随着应激刺激的不断积累,骨细胞的自噬作用可能导致细胞内自噬小体的积聚及细胞死亡。实验证明,对老鼠实施长达56天的高剂量泼尼松龙[5.6 mg/(kg·d)]治疗后可以观察到其椎体松质骨内的骨细胞的凋亡明显增多<sup>[104]</sup>。另外,这种接受高剂量泼尼松龙治疗的老鼠的骨细胞能够表达更多与基质水解相关的蛋白,如基质金属蛋白酶、组织蛋白酶等(cathepsins)<sup>[105]</sup>。考虑到溶酶体内为强酸性环境,当自噬小体被排除到骨细胞外后,骨细胞外基质可能发生水解并脱矿。久而久之,整个骨组织的结构和力量将会受到明显的影响<sup>[106]</sup>。由此可见,在治疗糖皮质激素引起的骨脆性增加时,抑制或增强骨细胞的自噬功能可能成为新的治疗方向。

## 6 骨细胞研究对骨质疏松治疗的影响

随着社会人口的老齡化,骨质疏松及其造成的骨质疏松性骨折已经成为影响老年人生存及生活质

量的重要公共卫生课题。据统计,在美国,50岁以上的骨质疏松患者大约有1000万左右,另外还有3000万以上存在发生骨质疏松的风险,如果不采取任何措施,这个数字可能在未来25年中增加2~3倍<sup>[107]</sup>。另外,骨质疏松造成的髌部骨折和脊柱骨折会使生存率降低约20%<sup>[108]</sup>。随着对骨细胞认识的深入,骨细胞在骨骼重构中的重要作用逐渐被越来越多的学者所承认。对骨细胞的分子生物学研究使临床医生对骨质疏松有了新的认识,并深刻影响了其治疗决策的制定。

骨细胞接受并传导应力信号的过程是复杂的,其涉及应力环境的变化、多样的感受机制、大量的信号传导通路。对这些过程的深入研究都具有潜在的临床意义。这其中,最先被认识到的是应力刺激对骨骼的重要作用。不论是日常的活动还是特定的运动锻炼都是维持骨骼完整性最重要的非药物方法。利用应力刺激维持或促进骨骼的健康较其它方式具有诸多优势,例如它对骨骼的作用是完全生理性的、在低负荷时它具有很高的安全性等<sup>[109]</sup>。另外,应力刺激同样可以影响到包括肌腱、韧带、肌肉在内的其它组织,从而对骨骼产生影响。因此,目前越来越多的研究致力于活动锻炼对女性绝经后骨质疏松的研究,并显示出积极的效果<sup>[110]</sup>。为确定合理的应力刺激范围、刺激力量的大小、频率、周期,则需要更深入的研究。

根据对骨代谢的影响,目前的抗骨质疏松药物大致分为促进骨形成药物和抑制骨吸收药物两大类。

目前最主要的促进骨形成药物是PTH。许多年前学者们就注意到,体内少量PTH增加即会引起骨吸收增强,但间断的PTH释放则能够同时促进骨形成和骨吸收过程,其最终结果是骨的合成代谢增加。另外,PTH能够增强骨细胞的生存活性,并抑制骨细胞释放骨硬化蛋白而促进成骨细胞活性,这可能是其促进骨形成的机制。一项已经发表的临床试验显示,使用PTH治疗骨质疏松的老年妇女,其椎体骨折发生率下降了65%,而非椎体骨折下降35%<sup>[111]</sup>。虽然效果显著,但PTH用于人体的研究仍在进行,对其可能诱发骨肉瘤的担心使很多人仍对其持谨慎态度。

抗骨吸收类药物则是目前临床上应用最多的抗骨质疏松药物。它主要包括雌激素类药物、选择性雌激素受体调节因子(SERMs)、降钙素和二磷酸盐。目前认为,虽然这些药物能够有效地降低破骨

细胞的骨吸收作用,但其同样对骨形成作用产生负性影响。因此,许多学者们都希望能够找到只抑制骨吸收而不影响骨形成的药物。通过对骨细胞的研究则为这类新的抗骨质疏松药物找到了明确的作用靶点。例如,认识到RANKL在骨吸收过程中的核心作用后,研究人员研制出德尼单抗(Denosumab),一种RANKL的人类抗体,能够通过阻断RANKL通路从而抑制骨吸收过程。在一项最近涉及7868位骨质疏松妇女的临床研究中发现,60mg/半年的德尼单抗可以降低椎体骨折发病率68%、髌部骨折40%、非椎体骨折20%,而且其皮肤感染等副作用的发生率并不高于安慰剂组<sup>[112]</sup>。另外,组织蛋白酶K(Cathepsin K)抑制剂、胰高血糖素样多肽2(GLP-2)、骨保护素(OPG)、整合素拮抗剂类药物也已经问世,虽然均处于药物试验的早期阶段,其远期效果仍不肯定,但近期效果确实令人感到鼓舞。具有促进骨形成作用的药物的研究也同样有所进展。如前文提到的,骨细胞表达产生的硬化蛋白对于调节成骨细胞功能具有重要作用。基于这种认识,Amgen公司研制的硬化蛋白抗体AMG785已进入试验阶段。临床前试验数据显示,AMG785能够提高绝经后老鼠松质骨及皮质骨的骨密度<sup>[113]</sup>;在一期临床试验中,经过85天的AMG785治疗后,试验组患者髌部骨密度较对照组明显提高<sup>[114]</sup>;在二期临床试验中,使用AMG785一年后,受试患者髌部及腰椎骨密度明显高于使用特立帕肽及双磷酸盐的患者<sup>[115]</sup>;而且在这些临床试验中,AMG785未见明显严重不良反应。

相信随着新的生物工程技术、新的转基因动物模型在骨细胞研究中的出现,会有越来越多新的研究热点出现,从而彻底改变目前对某些遗传性或退行性骨病的治疗方式。

## 【参 考 文 献】

- [1] Parfitt AM. Bone forming cells in clinical conditions. In: Hall BK (ed) Bone: a treatise the osteoblast and osteocyte. Telford Press, Caldwell, 1990; 351-429.
- [2] Vatsa A, Breuls RG, Semeins CM, et al. Osteocyte morphology in fibula and calvaria-is there a role for mechanosensing?. Bone, 2008, 43: 452-458.
- [3] Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D, et al. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. Acta Anat, 1990, 137: 350-358.
- [4] Mullender MG, van der Meer DD, Huiskes R, et al. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. Bone, 1996, 18: 109-

- 113.
- [ 5 ] Zhang P, Su M, Tanaka SM, et al. Knee loading stimulates cortical bone formation in murine femurs. *BMC musculoskeletal disorders*, 2006(7):73.
- [ 6 ] Manolagas SC. Birth and death of bone cells; basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 2000, 21:115-137.
- [ 7 ] Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, et al. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci*, 2005, 118:147-156.
- [ 8 ] Aubin JE, Turksen K. Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage. *Microsc Res Tech*, 1996, 33:128-140.
- [ 9 ] Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*, 2006, 235:176-190.
- [ 10 ] Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin: Hirschwald, 1892: 11.
- [ 11 ] Huijskes R, Ruimerman R, van Lenthe GH, et al. Effect of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature*, 2000, 405:704-706.
- [ 12 ] Cowin SC, Moss-Salentijn L, Moss ML. Candidates for the mechanosensory system in bone. *J Biomech Eng*, 1991, 113:191-197.
- [ 13 ] Turner CH, Forwood MR, Otter MW. Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow. *FASEB*, 1994 (8):87.
- [ 14 ] Reich KM, Gay CV, Frangos JA. Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J Cell Physiol*, 1990, 143(1):100-104.
- [ 15 ] Klein-Nulend J, Van der Plas A, Semeins CM, et al. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB*, 1995 (9):441-445.
- [ 16 ] McNamara LM, Majeska RJ, Weinbaum S, et al. Attachment of osteocyte cell processes to the bone matrix. *Anat Rec (Hoboken)*, 2009, 292:355-363.
- [ 17 ] Bacabac RG, Mizuno D, Schmidt CF, et al. Round versus flat: bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing. *J Biomech*, 2008, 41:1590-1598.
- [ 18 ] Price C, Zhou X, Li W, et al. Real-time measurement of solute transport within the lacunar-canalicular system of mechanically loaded bone: direct evidence for load-induced fluid flow. *J Bone Miner Res*, 2011, 26:277-285.
- [ 19 ] 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, 27:1280-1287.
- [ 20 ] Moustafa A, Sugiyama T, Saxon LK, et al. The mouse fibula as a suitable bone for the study of functional adaptation to mechanical loading. *Bone*, 2009, 44:930-935.
- [ 21 ] Adachi T, Aonuma Y, Tanaka M, et al. Calcium response in single osteocytes to locally applied mechanical stimulus: differences in cell process and cell body. *J Biomech*, 2009, 42:1989-1995.
- [ 22 ] Burra S, Jiang JX. Connexin 43 hemichannel opening associated with Prostaglandin E2 release is adaptively regulated by mechanical stimulation. *Commun Integr Biol*, 2009 (2):239-240.
- [ 23 ] You LD, Weinbaum S, Cowin SC, et al. Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anat Rec*, 2004, 278A:505-513.
- [ 24 ] Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*, 1995, 57 (5):344-358.
- [ 25 ] You L, Cowin SC, Schaffler MB, et al. A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. *J Biomech*, 2001, 34:1375-1386.
- [ 26 ] Pavalko FM, Chen NX, Turner CH, et al. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am J Physiol*, 1998, 275: C1591-C1601.
- [ 27 ] Meyers VE, Zayzafoon M, Douglas JT, et al. RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity. *J Bone Miner Res*, 2005, 20:1858-1866.
- [ 28 ] Sen B, Xie Z, Case N, et al. Mechanical signal influence on mesenchymal stem cell fate is enhanced by incorporation of refractory periods into the loading regimen. *J Biomech*, 2011, 44:593-599.
- [ 29 ] Donahue SW, Donahue HJ, Jacobs CR. Osteoblastic cells have refractory periods for fluid-flow-induced intracellular calcium oscillations for short bouts of flow and display multiple low-magnitude oscillations during long-term flow. *J Biomech*, 2003, 36:35-43.
- [ 30 ] Little R, Muimo R, Robson L, et al. The transient receptor potential ion channel TRPV6 is expressed at low levels in osteoblasts and has little role in osteoblast calcium uptake. *PLoS One*, 2011 (6):e28166.
- [ 31 ] Schwartz EEA, Leonard ML, Bizios R, et al. Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am J Physiol*, 1997, 272:F132-138.
- [ 32 ] Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, et al. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem*, 2006, 281:884-895.
- [ 33 ] Xiao Z, Dallas M, Qiu N, et al. Conditional deletion of Pkd1 in osteocytes disrupts skeletal mechanosensing in mice. *FASEB J*, 2011, 25:2418-2432.
- [ 34 ] Fritton SP, Weinbaum S. Fluid and solute transport in bone: flow-induced mechanotransduction. *Annu Rev Fluid Mech*, 2009, 41:347-374.
- [ 35 ] Bell A. The pipe and the pinwheel: is pressure an effective stimulus for the 9 + 0 primary cilium?. *Cell Biol Int*, 2008, 32:462-468.
- [ 36 ] Bivi N, Condon KW, Allen MR, et al. Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation. *J Bone*

- Miner Res, 2012, 27:374-389.
- [37] Zhang Y, Paul EM, Sathyendra V, et al. Enhanced osteoclastic resorption and responsiveness to mechanical load in gap junction deficient bone. *PLoS One*, 2011 (6) : e23516.
- [38] Vatsa A, Smit TH, Klein-Nulend J. Extracellular NO signalling from a mechanically stimulated osteocyte. *J Biomech*, 2007, 40: S89-95.
- [39] 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: E634-639.
- [40] Das Gupta V, Williamson RA, Pitsillides AA. Expression of endothelial nitric oxide synthase protein is not necessary for mechanical strain-induced nitric oxide production by cultured osteoblasts. *Osteoporos Int*, 2012, 23(11) : 2635-2647.
- [41] Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, 1996, 271: 157-160.
- [42] Westbrook I, Ajubi NE, Alblas MJ, et al. Differential stimulation of prostaglandin G/H synthase-2 in osteocytes and other osteogenic cells by pulsating fluid flow. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268: 414-419.
- [43] Bakker AD, Klein-Nulend J, Burger EH. Mechanotransduction in bone cells proceeds via activation of COX-2, but not COX-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305: 677-683.
- [44] Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, et al. Mechanical strain opens connexin 43 hemi-channels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 3100-3106.
- [45] Hung CT, Pollack SR, Reilly TM, et al. Real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow. *Clin Orthop Relat*, 1995 (313) : 256-269.
- [46] You J, Reilly GC, Zhen X, et al. Osteopontin gene regulation by oscillatory fluid flow via intracellular calcium mobilization and activation of mitogen-activated protein kinase in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biol Chem*, 2001, 276: 13365-13371.
- [47] Chen NX, Ryder KD, Pavalko FM, et al. Ca<sup>2+</sup> regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 278: C989-C997.
- [48] Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 1982, 31(1) : 99-109.
- [49] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14: 59-88.
- [50] Letechipia JE, Alessi A, Rodriguez G, et al. Would increased interstitial fluid flow through in situ mechanical stimulation enhance bone remodeling?. *Med Hypotheses*, 2010, 75: 196-198.
- [51] Kamel MA, Picconi JL, Lara-Castillo N, et al. Activation of beta-catenin signaling in MLO-Y4 osteocytic cells versus 2 T3 osteoblastic cells by fluid flow shear stress and PGE2: Implications for the study of mechanosensation in bone. *Bone*, 2010, 47: 872-881.
- [52] Xia X, Batra N, Shi Q, et al. Prostaglandin promotion of osteocyte gap junction function through transcriptional regulation of connexin 43 by glycogen synthase kinase 3/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol*, 2010, 30: 206-219.
- [53] Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, 2008, 42: 606-615.
- [54] Ellies DL, Viviano B, McCarthy J, et al. Bone density ligand, sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. *J Bone Miner Res*, 2006, 21: 1738-1749.
- [55] Balemans W, Ebeling M, Patel N, et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet*, 2001, 10: 537-543.
- [56] Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J*, 2003, 22: 6267-6276.
- [57] Li J, Sarosi I, Cattley RC, et al. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone*, 2006, 39: 754-766.
- [58] Balemans W, Piters E, Cleiren E, et al. The binding between sclerostin and LRP5 is altered by DKK1 and by high-bone mass LRP5 mutations. *Calcif Tissue Int*, 2008, 82: 445-453.
- [59] Bafico A, Gazit A, Pramila T, et al. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem*, 1999, 274: 16180-16187.
- [60] Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol*, 2004, 18: 1222-1237.
- [61] Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem*, 2008, 283: 5866-5875.
- [62] Li X, Omsinsky MS, Niu QT, et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res*, 2008, 23: 860-869.
- [63] Feng JQ, Ward LM, Liu S, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*, 2006, 38: 1310-1315.
- [64] Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, et al. Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J Biol Chem*, 2003, 278: 1998-2007.
- [65] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
- [66] Xiong J, Onal M, Jilka RL, et al. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med*, 2011, 17: 1235-1241.
- [67] Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab*, 2007 (5) : 464-475.
- [68] O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, et al. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS One*, 2008 (3) : e2942.
- [69] Rhee Y, Allen MR, Condon K, et al. PTH receptor signaling in

- osteocytes governs periosteal bone formation and intra-cortical remodeling. *J Bone Miner Res*, 2011, 26:1035-1046.
- [70] Galli C, Fu Q, Wang W, et al. Commitment to the osteoblast lineage is not required for RANKL gene expression. *J Biol Chem*, 2009, 284:12654-12662.
- [71] Emerton KB, Hu B, Woo AA, et al. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone*, 2010, 46:577-583.
- [72] Kennedy OD, Herman BC, Laudier DM, et al. Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. *Bone*, 2012, 50:1115-1122.
- [73] Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci*, 2007(6):281-290.
- [74] Antoniucci DM, Yamashita T, Portale AA. Dietary phosphorus regulates serum fibroblast growth factor-23 concentrations in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(8):3144-3149.
- [75] Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest*, 2004, 113(4):561-568.
- [76] Isakova T, Wahl P, Vargas GS, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 2011, 79(12):1370-1378.
- [77] Lobao R, Carvalho AB, Cuppari L, et al. High prevalence of low bone mineral density in pre-dialysis chronic kidney disease patients; bone histomorphometric analysis. *Clin Nephrol*, 2004, 62(6):432-439.
- [78] Shalhoub VSW, Stevens J, Renshaw-Gegg L, et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and alpha-klotho stimulate MC3T3.E1 cell proliferation and inhibit mineralization. *Calcif Tissue Int*, 2011, 89(2):140-150.
- [79] Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, et al. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res*, 2008, 23:939-948.
- [80] White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, et al. Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney Int*, 2001, 60:2079-2086.
- [81] Martin A, Liu S, David V, et al. Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. *FASEB J*, 2011, 25:2551-2562.
- [82] Feng JQ, Ward LM, Liu S, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*, 2006, 38:1310-1315.
- [83] Yuan B, Takaiwa M, Clemens TL, et al. Aberrant PheX function in osteoblasts and osteocytes alone underlies murine X-linked hypophosphatemia. *J Clin Invest*, 2008, 118:722-734.
- [84] Faul C, Amaral AP, Oskouei B, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest*, 2011, 121(11):4393-4408.
- [85] Lim K, Lu TS, Molostvov G, et al. Vascular Klotho Deficiency Potentiates the Development of Human Artery Calcification and Mediates Resistance to FGF-23. *Circulation*, 2012, 125(18):2243-2255.
- [86] Noble BS, Stevens H, Loveridge N, et al. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. *Bone*, 1997, 20:273-282.
- [87] Noble BS, Peet N, Stevens HY, et al. Mechanical loading; biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 284:C934-943.
- [88] Bakker A, Klein-Nulend J, Burger E. Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 320:1163-1168.
- [89] Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, et al. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis; requirement of integrins, Src kinases, and ERKs. *Am J Physiol*, 2005, 289:C633-643.
- [90] Stupack DG, Cheresch DA. Get a ligand, get a life; integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci*, 2002, 115:3729-3738.
- [91] Zhao W, Byrne MH, Boyce BF, et al. Bone resorption induced by parathyroid hormone is strikingly diminished in collagenase-resistant mutant mice. *J Clin Invest*, 1999, 103:517-524.
- [92] Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res*, 2000, 15:60-67.
- [93] Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, et al. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res*, 1998, 13:1243-1250.
- [94] Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, et al. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82:3128-3135.
- [95] Almeida M, Han L, Ambrogini E, et al. Oxidative stress stimulates apoptosis and activated NF- $\kappa$ B in osteoblastic cells via a PKC $\beta$ /p66shc signaling cascade; counter regulation by estrogens or androgens. *Mol Endocrinol*, 2010, 24:2030-2037.
- [96] Adler RA, Curtis JR, Saag K, et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Nelsen DA, Rosen CJ, editors. *Osteoporosis*. San Diego, CA: Elsevier-Academic Press, 2008:1135-1166.
- [97] Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Glucocorticoids induce osteocyte apoptosis by blocking focal adhesion kinase-mediated survival; evidence for inside-out signaling leading to anoikis. *J Biol Chem*, 2007, 282:24120-24130.
- [98] Weinstein RS. Clinical Practice. Glucocorticoid-induced bone disease. *N Engl J Med*, 2011, 365:62-70.
- [99] Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol*, 2009, 174:239-247.
- [100] Bidwell JP, Yang J, Robling AG. Is HMGB1 an osteocyte alarmin?. *J Cell Biochem*, 2008, 103:1671-1680.
- [101] Kogianni G, Mann V, Noble BS. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone

- destruction. *J Bone Miner Res*, 2008, 23:915-927.
- [102] Martinet W, Agostinis P, Vanhooe B, et al. Autophagy in disease: a double-edged sword with therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 116:697-712.
- [103] Xia X, Kar R, Gluhak-Heinrich J, et al. Glucocorticoid induced autophagy in osteocytes. *J Bone Miner Res*, 2010, 25 (11): 2479-2488.
- [104] Dalle Carbonare L, Arlot ME, Chavassieux PM, et al. Comparison of trabecular bone microarchitecture and remodeling in glucocorticoid-induced and postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 2001, 16:97-103.
- [105] Yao W, Cheng Z, Busse C, et al. Glucocorticoid excess in mice results in early activation of osteoclastogenesis and adipogenesis and prolonged suppression of osteogenesis: a longitudinal study of gene expression in bone tissue from glucocorticoid-treated mice. *Arthritis Rheum*, 2008, 58:1674-1686.
- [106] Lane NE, Yao W, Balooch M, et al. Glucocorticoid-treated mice have localized changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in placebo-treated or estrogen-deficient mice. *J Bone Miner Res*, 2006, 21:466-476.
- [107] U. S. Department of Health and Human Services. Bone health and osteoporosis: a report of the surgeon general. U. S. Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General; Rockville, MD, 2004.
- [108] Cooper C, Atkinson EJ, Jacobsen SJ, et al. Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol*, 1993, 137(9):1001-1005.
- [109] Carter DR, Caler WE, Spengler DM, et al. Fatigue behavior of adult cortical bone: the influence of mean strain and strain range. *Acta Orthop Scand*, 1981, 52:481-490.
- [110] Tolomio S, Ermolao A, Travain G, et al. Short-term adapted physical activity program improves bone quality in osteopenic/osteoporotic postmenopausal women. *J Phys Activ Health*, 2008 (5):844-853.
- [111] Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, 2001, 344(19):1434-1441.
- [112] Cummings SR, San Martin J, McClung MR, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, 2009, 361(8):756-765.
- [113] Li X, Ominsky MS, Warmington KS, et al. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 2009, 24:578-588.
- [114] Padhi D, Jang G, Stouch B, et al. Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *J Bone Miner Res*, 2011, 26:19-26.
- [115] Reid IR. Osteoporosis treatment at ASBMR 2012. *IBMS BoneKEy* 9. doi:10.1038/bonekey.2012.245.

(收稿日期: 2014-09-14)

## (上接第471页)

- [5] Jepsen KJ, Pennington DE, Lee YL, et al. Bone brittleness varies with genetic background in A/J and C57BL/6J inbred mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001, 16:1854-1862.
- [6] Smith EA, Frankenburg EP, Goldstein SA, et al. Effects of long-term administration of vitamin D3 analogs to mice. *Journal of Endocrinology*, 2000, 165:163-172.
- [7] Jamsa T, Jalovaara P, Peng Z, et al. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone*, 1998, 23:155-161.
- [8] Robling AG, Turner CH. Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. *Bone*, 2002, 31:562-569.
- [9] Wergedal JE, Sheng MH, Ackert-Bicknell CL, et al. Mouse genetic model for bone strength and size phenotypes: NZB/B1NJ and RF/J inbred strains. *Bone*, 2002, 31:670-674.
- [10] Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, 1993, 14:595-608.
- [11] Jepsen KJ, Schaffler MB, Kuhn JL, et al. Type I collagen mutation alters the strength and fatigue behavior of mov13 cortical tissue. *Journal of Biomechanics*, 1997, 30:1141-1147.
- [12] Kodama Y, Umemura Y, Nagasawa S, et al. Exercise and mechanical loading increase periosteal bone formation and whole bone strength in C57BL/6J mice but not in C3H/HeJ mice. *Calcified Tissue International*, 2000, 66:298-306.
- [13] Li KC, Zernicke RF, Bernard RJ, et al. Differential response of rat limb bones to strenuous exercise. *Journal of Applied Physiology*, 1991, 70:554-560.
- [14] Schrieffer JL, Robling AG, Warden SJ, et al. A comparison of mechanical properties derived from multiple skeletal sites in mice. *Journal of Biomechanics*, 2005, 38:467-475.
- [15] 崔伟, 刘成林. 基础骨生物力学(二). *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4(1):90-92.  
CUI Wei, LIU Chenglin. Basic bone biomatic(二). *Chinese Journal of Osteoporosis*, 1998, 4(1):90-92. (in Chinese)
- [16] An YH, Zhang J, Kang Q, et al. Mechanical properties of rat epiphyseal cancellous bone studied Indentation testing. *J Mater Sci Mater Med*, 1997, 8(8):493-495.

(收稿日期: 2014-05-16)