

• 综述 •

流体剪切力对破骨细胞的影响

丁宁^{1,2} 姜金^{1,2} 杨全增^{1,2} 李忠浩^{1,2} 夏亚—^{1,2*}

1. 兰州大学第二医院骨科,甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省骨关节疾病研究重点实验室,甘肃 兰州 730000

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 09-1178-06

摘要: 骨组织受到成骨细胞成骨作用和破骨细胞溶骨作用共同影响。与成骨细胞和骨细胞不同,破骨细胞起源于造血干细胞,由单核巨噬细胞发育而来,具有吞噬功能,能对多种刺激因素产生效应,其中机械刺激是始终存在的影响方式。机械刺激诱导的成骨细胞的正性调节对于骨生成、骨修复有至关重要的作用,而破骨细胞在这些方面的效应也十分关键。流体剪切力作为骨组织内机械刺激的一种常见形式,作用于成骨细胞和骨细胞的时候,通过对 Ca^{2+} 、前列腺素、NO、RANKL 和 OPG 等信号因子的影响,表现出介导破骨细胞迁移、分化、吸收和生存维持等现象的功能,这承载了骨代谢必不可少的一部分。同时这些因子相互交错,表现出复杂信息网络及阶段特异性。但总的来说,人们对流体剪切力调节破骨细胞生理及病理功能具体信号传导的了解还不是很深入,需要用更多的研究来阐明流体剪切力和破骨细胞之间的关系。本文就流体剪切力对破骨细胞相关分子信号影响做一综述,简要展示流体剪切力影响破骨细胞的相关机理。

关键词: 流体剪切力; 破骨细胞; 信号分子

Effect of fluid shear stress on osteoclasts

DING Ning^{1,2}, JIANG Jin^{1,2}, YANG Quanzeng^{1,2}, LI Zhonghao^{1,2}, XIA Yayi^{1,2}

1. Institute of Orthopedics, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

2. Key Laboratory of Orthopedics of Gansu Province, Lanzhou 730000, China.

Corresponding author: XIA Yayi, Email: Xiayayi@126.com

Abstract: Bone is influenced by both osteogenesis from osteoblasts and osteolysis from osteoclasts. Distinguished to osteoblasts and osteocytes, osteoclasts are derived from hematopoietic stem cells. They have function of phagocytosis and can respond to many stimuli, of which mechanical stimulation is a constant stimulus. Mechanical stimulation-induced osteoblasts are critical for the positive regulation of bone formation and repairing. At the same time, the effect of osteoclasts is also essential. Fluid shear stress as a common mechanical stimulus affects osteoblasts and osteoclasts via signal factors, such as Ca^{2+} , prostaglandin, NO, RANKL, OPG, and so on. Its function includes mediation of osteoclast migration, differentiation, absorption, and survival, which plays an important role in bone metabolism. Those factors talk interactively and display stage-dependent specificity. Overall, the understanding of signal pathways between fluid shear stress and physiological and pathological function of osteoclasts is less in depth. More research is needed to demonstrate the relationship between fluid shear stress and osteoclasts. This article reviews the effect of fluid shear stress on osteoclasts and shows relevant mechanism between them.

Key words: Fluid shear stress; Osteoclast; Signal factors

1 介绍

骨骼每天承担着身体的负重,而每一个与承重相关的细胞都在经受持续变化着的负荷,它们的成

骨和破骨作用,让骨塑形和重塑在不断出现。机械负荷无疑成为影响骨细胞、成骨细胞、破骨细胞等骨组织细胞生物功能的重要因素。同时成骨功能与破骨功能的平衡是维持骨组织正常代谢的直接途径,这种平衡打破,骨组织疾病就会随之而来。骨骼内充斥着大量微小孔隙^[1],不管是哈弗氏管还是骨小梁或者细胞与基质之间的间隙,都有组织液体的存在和流动,液体流在压力负荷的驱使下流动并冲刷

基金项目: 国家自然科学基金(81450042); 甘肃省自然科学基金(1506RJZA240)

* 通讯作者: 夏亚—, Email: Xiayayi@126.com

着各种细胞,从而产生一种液体流源性机械力,即为流体剪切力(fluid shear stress, FSS)。大量研究表明,流体剪切力等机械力能够刺激骨细胞^[1,2]和成骨细胞^[3,4],并已经发现诸多分子机制以阐明 FSS 的效应。但在 FSS 对破骨细胞的影响方面的研究并不多,没有像成骨细胞那样深入。本文章重点展示了目前 FSS 对破骨细胞影响的主要方面,迁移、分化、吸收和生存,值得注意的是,在这些细胞发育的特征性阶段,这些不是被仅有几个影响因素统治,而是有众多因素交织共同发生的,它们之间存在复杂的交叉关系。

2 破骨细胞特征及演变过程

破骨细胞是机体内唯一一种具有分解吸收骨质功能的细胞^[5,6],参与生理及病理骨塑形和重塑^[7]。它起源于造血干细胞,随后由多个单核巨噬细胞系的破骨细胞前体细胞融合而成,表现为大、多核细胞^[8,9]。目前多认为破骨细胞前体细胞分化为成熟破骨细胞是通过其与成骨细胞或间充质干细胞的细胞间作用完成的^[10]。多项研究表明,破骨细胞分化通过多种细胞因子刺激引起,主要为巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和 NF- κ B 受体活化因子配体(RANKL)^[5,9]。破骨细胞前体细胞的单核细胞从循环系统渗透并富集到骨表面从而启动了骨吸收作用^[11]。破骨细胞在发生破骨作用的时候表现出一种极化性,它会重构自身细胞骨架从而产生4种与功能相关的结构,即为缝合区(sealing zone, SZ)、褶皱缘(ruffled border, RB)、基底区(basolateral domain, BD)和功能分泌区(functional secretory domain, FSD)。缝合区在破骨细胞和细胞外基质之间围出一个封闭区域,形成吸收陷窝。褶皱缘在吸收陷窝内能够分泌氢离子和蛋白酶以分别降解矿物质和细胞外基质,并通过胞吞或胞饮的方式将分解产物吞噬,囊泡从褶皱缘转运到功能性分泌区排出细胞^[12]。TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase)和组织蛋白酶K(Cathepsin K)是破骨细胞功能标志性的酶^[13-15]。TRAP 被广泛运用于破骨细胞鉴别^[13]及功能研究中,有学者认为其存在于破骨细胞细胞转运小泡中而不是在褶皱缘(RB)或是吸收陷窝中^[16],他们后来猜测 TRAP 在破骨细胞中的生理作用是摧毁胞吞作用中内吞的基质降解产物。另外组织蛋白酶K也是破骨细胞一种功能特征性蛋白酶,在酸性环境中被活化,主要降解基质当中的I型胶原^[15]。目前研究的细胞主要有破骨细

胞前体细胞 RAW264.7 单核细胞^[6,17,18]和 4B12 细胞^[19],还有些是直接来自骨髓中提取体外诱导出来的具有巨噬细胞特征的细胞^[20,21]。

3 流体剪切力

骨的塑形需要受到机械刺激,这些机械力的刺激来源于体重负荷,也就是重力导致的机体各部位之间相互压力,还有肌肉收缩作用等,是成骨细胞成骨作用和破骨细胞分解作用的动态平衡的重要原因。多种机械刺激,包括流体剪切力、静水压、流动液体压力还有超重等,作为外界刺激因素被研究^[7]。骨组织含有大量微小孔隙^[1,22],包括陷窝、微管及血管周围间隙等^[23,24]构成一系列复杂的体系。近年来由于检测技术的发展,人们对骨组织内微型结构的认知也取得了比较大的进步。2012年 Tommasini 等检测得到大鼠股骨干的陷窝孔隙度达 2.4%^[25],而在其之前的 Schneider 等用串行 FIB/SEM(聚焦电子束/扫描电子显微镜)测量股骨干中部处陷窝以外的微管的孔隙度发现小于 1%^[26],也有发现胫骨近端的微管的孔隙度可以达到 14%^[22]。尽管目前对于长骨孔隙度的研究结果不相一致,但可以明确的是,骨质内存在大量这样的结构并充斥组织间液体,而且这种结构的存在也反映出流体剪切力对组织的影响以及对流体剪切力研究的必要。当骨组织受到机械负荷后,骨基质形态变化,这种形变驱使间隙内液体流动,这样就对成骨细胞和破骨细胞产生流体剪切力(FSS)^[27]。在体内流体剪切力的水平还没有办法完全了解清楚,而且也没有达成一致。2011年 Price 等^[28]用 FRAP(荧光漂白恢复)图像技术在加载循环压力负荷的情况下计算出最大流体剪切力为 5Pa。尽管一些学者认为生理骨骼负荷产生的剪切力估计在 1Pa 左右^[29]。早先研究者发现破骨细胞样细胞对静水压比较敏感,猜测破骨细胞可能是机械力敏感性细胞^[30],这也为后来对破骨细胞进行机械刺激研究提供了一定的理论基础。McAllister 等人首次报道了骨髓来源细胞具有 FSS 敏感性^[1]。Kurata 等^[7]发现在不存在间充质细胞时,机械刺激能够促进 TRAP 和组织蛋白酶K表达,而且后来的研究发现超生理剪切应力(4Pa、6Pa 和 17Pa)相比无剪切力(0Pa)和生理剪切力(0.5Pa 和 1.5Pa)能显著提升 TRAP 活性从而提升骨吸收作用。这些无疑表明破骨细胞能够接受机械刺激,尤其是流体剪切力的刺激^[29]。

研究人员在研究流体剪切力对破骨细胞作用的

时候,施加力的大小没有一个固定的通用的数值,一般在 $20\text{dyne}/\text{cm}^2$ 以内,但具体还是不尽相同。比如,施加 $10\text{dyne}/\text{cm}^2$ 的 FSS 可使破骨细胞明显沿着力的方向迁移,而且速度快于 $1\text{dyne}/\text{cm}^2$ 作用下破骨细胞迁移^[6]。研究 FSS 对 TRAP 等影响的时候, $16.08\text{dyne}/\text{cm}^2$ 是使结果最明显的应力大小^[31]。

4 流体剪切力对破骨细胞产生生物学效应

4.1 流体剪切力能驱使破骨细胞前体细胞迁移

流体剪切力作用于 RAW264.7 单核细胞后,大部分细胞能从未干预时随机自由迁移转变为沿液体流动方向的迁移,同时迁移速度也出现显著提升。而且机械敏感性阳离子选择通道(MSCC)、内质网等 Ca^{2+} 相关途径受到阻断后,细胞的迁移会受到显著抑制,说明流体剪切力能够活化 Ca^{2+} 通道,随后诱导单核细胞沿液体流方向运动。同时成熟多核破骨细胞也会在流体剪切力影响下发生类似的迁移,但不通过 Ca^{2+} 通道介导^[6]。但破骨细胞前体单核巨噬细胞在骨组织表面向病损部位迁移的机制还不是很清楚^[32],影响迁移的因素还有很多。有学者认为异常部位存在的凋亡骨细胞能释放细胞因子,比如 RANKL、ICAM-3 及 CD31 等因子调节细胞迁移和分化^[33,34]。

4.2 流体剪切力能促进破骨细胞分化

Fahlgren 等^[35]通过对骨内植物的研究提出,内植物的松动多与骨吸收作用密切相关,而且破骨细胞活动区是液体流丰富区域,这些部位能够产生流体剪切力刺激破骨细胞分化以及产生功能作用。虽然体内实验表明了流体剪切力能够促进破骨细胞分化,但具体的分子机制仍然不清楚。

细胞实验也提示破骨细胞的分化与一些因素存在相关性。RANKL 和 RANK 的连接能诱导破骨细胞出现钙振荡(CO),钙振荡作为细胞内重要的信息传递方式,能促进破骨细胞分化,这一现象会一直持续到多细胞核破骨细胞形成^[8]。而且 RANKL 导致破骨细胞钙振荡在小破骨细胞(即未成熟破骨细胞,小于 5 个核)比大破骨细胞内作用强^[36]。随后的研究也证实,破骨细胞分化的早期阶段钙振荡强于后期^[37]。钙振荡和破骨细胞分化阶段存在密切联系。破骨细胞发育状态和其细胞核数量有关,融合的细胞越多,破骨细胞分化的越成熟。流体剪切力作用下,大部分细胞内的钙含量会很快升高到峰值,随后降低到基础水平,表现为一个反应峰,有的细胞存在多个反应峰,就形成了钙振荡。反应峰的

数量能够反应细胞钙振荡的能力。FSS 作用下,单核细胞和小破骨细胞(未成熟破骨细胞)的钙振荡大于成熟多核破骨细胞的钙振荡,并且在 FSS 水平升高的情况下,诱导早期的细胞即小破骨细胞和单核细胞的钙振荡会随之升高,但诱导分化后期的多核大破骨细胞则会降低,对于大于 10 个细胞核的破骨细胞来说,几乎没有检测到明显钙振荡。另外在破骨细胞发育最后阶段,其对钙反应的敏感性会降低^[17]。

4.3 流体力能增强破骨细胞吸收活性

在降解骨矿化基质的过程中,通过褶皱缘膜上存在的液泡膜 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶(V-ATPase)向吸收陷窝分泌 H^+ 是至关重要的^[38,39]。液泡膜 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶由多个亚单位组成,其中亚单位 A 是该酶的催化核苷酸连接位点,它的基因为 ATP6V1A,另一个亚单位 a3,其编码基因为 TCIRG1,而且 $2.9\text{dyne}/\text{cm}^2$ 的 FSS 持续 15min 后,ATP6V1A 和 TCIRG1 的 mRNA 表达开始升高,30min 达到高峰,加载 $0.9\text{dyne}/\text{cm}^2$ 后这两种酶的 mRNA 表达就有上调,并且增加到 $26.3\text{dyne}/\text{cm}^2$ 为止,都表现出正相关的关系。说明 FSS 能增强液泡膜 $\text{H}^+ - \text{ATP}$ 酶的活性,促进 H^+ 的分泌,从而提升破骨细胞吸收功能^[39]。

另外,流体剪切力作用于破骨细胞后,施加 $5.97\text{dyne}/\text{cm}^2$ 、 $11.36\text{dyne}/\text{cm}^2$ 、 $16.08\text{dyne}/\text{cm}^2$ 和 $20.54\text{dyne}/\text{cm}^2$ 的剪切力后发现 $16.08\text{dyne}/\text{cm}^2$ 作用 30min 可使 TRAP 活性最强,通过扫描电镜观察吸收陷窝,发现面积和数量都有较为明显的提升,同时 TRAP 和吸收陷窝数量存在显著的相关性^[31]。TRAP 和吸收陷窝是破骨细胞功能的重要表现,这直接证明了, FSS 能够促进破骨细胞的吸收活性产生。另外 Kurata 等^[7]的研究表明牵拉刺激能够刺激破骨细胞显著表达 TRAP 和组织蛋白酶 K 并使吸收陷窝总体面积和数量的增多。

随后有研究者指出,细胞内钙浓度升高会活化磷酸酶,再激活活化 T 细胞核因子(NFATc1),NFATc1 上调 TRAP、组织蛋白酶 K 和 $\beta 3$ 整合素的表达,从而强化破骨细胞生成和骨吸收作用^[8]。机械敏感的 Ca^{2+} 进入会调节破骨细胞功能^[40]。已经知道 FSS 能够促进 Ca^{2+} 通过几种通道在胞质内富集^[6],而这也可能会导致如前所述的上调磷酸酶从而随后引发一系列级联反应产生破骨表现。

除了 Ca^{2+} 参与到流体剪切力诱导破骨细胞吸收功能以外,还有其他因子起着重要作用。液体流诱导的成骨细胞和骨细胞产生 NO/PG 通过旁分泌

途径介导破骨细胞活性,同时破骨细胞还有自分泌的功能。流体剪切力能促使破骨细胞样细胞产生并释放 NO 和前列腺素,尤其是 PGE_2 和 PGI_2 ,并作用于自身。实验中发现破骨细胞前体细胞在 FSS 作用下产生快速双阶段的 NO 释放,在干预 1h 内的早期阶段显著产生 NO,而在后来会降低。而 PGE_2 和 PGI_2 则表现为开始阶段的低水平和后期持续阶段的高水平。前列腺素生成在 1h 时出现转折点,可能与前列腺素合成酶对 FSS 的反应有关^[1]。花生四烯酸在环加氧酶(COX)的作用下合成前列腺素,NO 能够与 COX 结合并直接活化 COX^[41,42]。抑制 NO 能削弱部分 PGE_2 产生,也验证了 NO 部分介导 PGE_2 产生,而且还能参与其他的信号通路^[1]。前列腺素对破骨细胞正性影响还是负性影响存在争议。研究发现 UMR106 和单核细胞共培养时表现为抑制吸收功能,而 ST2 与单核细胞共培养时表现为促进破骨细胞形成和骨吸收作用,值得注意的是 UMR106 来自大鼠骨肉瘤细胞,而 ST2 是骨髓干细胞来源,这说明 PGE_2 对破骨细胞前体细胞的影响还取决于与其共培养的干细胞种类^[43]。但可以说,在一定条件下,PG 能够介导破骨细胞的骨吸收作用。NO 具有双向调节破骨细胞的作用,这种调节是通过浓度来控制的^[44]。

有文献报道 Ca^{2+} 能够促进破骨细胞吞噬亲脂性染料,而且这一过程是发动蛋白(dynamin)和 V-ATPase 介导的,这说明钙振荡能强化破骨细胞吞噬吸收作用^[37],但这是否能与 FSS 刺激钙振荡联系起来还没有直接的证据证实。

另外在对内植物松动的研究中,人们发现骨吸收作用出现在开始已经存在的骨腔隙内,在压力区外围开始发展,而这些区域存在高的液体流,这提示高的液体流产生剪切力作用促进了骨吸收作用^[35]。之前的一些动物研究也说明一定幅度的液体流或流体压力是诱导破骨细胞活动所必须的^[45,46]。

4.4 流体剪切力能抑制破骨细胞生存

摆动液体流(Oscillatory fluid flow, OFF)被认为是当骨组织接受负荷时,液体会流向低压力区,当负荷取消后液体会回流^[47],这样以来会产生剪切力。干细胞和成骨细胞能够表达 RANKL 和 OPG, RANKL 能够与破骨细胞及前体细胞表达的 RANK 结合,被认为具有促进破骨细胞分化功能,而 OPG 为骨保护素,是 RANKL 的诱导性受体, RANK 和 OPG 能竞争性结合 RANKL^[48], OPG 与 RANKL 结合会抑制破骨细胞生成作用甚至之前以存在的破骨

细胞生存^[49]。实验表明 FSS 使 RANKL/OPG 比率降低,而且 RAW264.7 和 ST-2(骨髓基质干细胞)共培养时,OFF 干预与不干预相比,破骨细胞显著减少^[50],这也证实了之前剪切刺激能够抑制 RANKL 生成和促进 OPG 生成来抑制破骨细胞的形成^[49],从而表现出正性成骨作用。

后来的研究中表明 MLO-Y4(成骨细胞)和 RAW264.7 共培养能够促进破骨细胞形成,而 OFF 干预能降低成骨细胞中 RANKL/OPG 比例,降低了成骨细胞对破骨前体细胞的诱导作用,并且成骨细胞分泌 RANK 和 OPG 等可溶性物质通过液体流作用于破骨细胞从而参与这一效应实现,毕竟骨细胞直接连接单核巨噬细胞可能还是存在一些限制^[51]。另外, FSS 刺激产生的 OPG 存在时间依赖性,诱导最初 OPG 会显著上升, RANKL 会降低,但随后会逐渐向基础水平恢复,可能还存在其他来自成骨细胞的因子介导抑制破骨细胞生成作用^[51],比如 TGF- β 、VEGF^[52]等。

5 讨论

从目前的研究中可知,流体剪切力作为一种液体流激发的刺激对造血干细胞源性的破骨细胞前体细胞和成熟破骨细胞都有很重要的影响。FSS 诱导破骨细胞迁移方面,尽管已经发现 Ca^{2+} 在其中的关键性地位^[6],但也仅局限在局部的前一方向和微小距离上,至于宏观上细胞迁移到骨组织损伤部位还不清楚。对于破骨细胞发挥功能性作用来说,通过直接的实验发现 FSS 可以诱发其产生标志性酶类以及吸收陷窝^[31],而且 Ca^{2+} 也参与其中^[8]。另外, FSS 诱发产生的前列腺素和 NO 对破骨细胞的影响存在双向性^[44],这是否与破骨细胞发育阶段有关。FSS 调节破骨细胞分化,其中同样是 Ca^{2+} 相关的钙振荡起了至关重要作用,值得注意的是钙振荡在破骨细胞分化发育的不同阶段的表现有明显不同,在发育成熟后这种作用会显著降低^[17]。最后, FSS 诱导 OPG 增多抑制了 RANKL 和 RANK 结合所接到的破骨细胞的生成和维持^[50,51]。可以看出, FSS 对破骨细胞影响的分子机制研究很单一,而且对破骨细胞产生生物学效应的信号通路研究也缺乏多样性。另外,从目前的研究来看, FSS 对破骨细胞的影响主要表现在抑制其维持,促进迁移和吸收,而且有研究表明, $\text{Bim}^{-/-}$ 的破骨细胞表现为低吸收活性和强维持生存能力^[53],而 Bcl_{XL} 的破骨细胞表现为高吸收性和凋亡趋势^[54],那么破骨细胞的生存和功能是否

不像其他细胞那样表现为一致性,而是会表现为反向发生。FSS 影响破骨细胞的机制还存在很多待研究的方面。

【参 考 文 献】

- [1] McAllister TN, Du T, Frangos JA. Fluid shear stress stimulates prostaglandin and nitric oxide release in bone marrow-derived preosteoclast-like cells[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2000 270(2): 643-8.
- [2] Fritton SP, Weinbaum S. Fluid and Solute Transport in Bone: Flow-Induced Mechanotransduction[J]. Annual review of fluid mechanics, 2009 41: 347-74.
- [3] Kapur S, Baylink DJ, William Lau KH. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways[J]. Bone 2003 32(3): 241-51.
- [4] Bin G, Cuifang W, Bo Z, et al. Fluid shear stress inhibits TNF- α -induced osteoblast apoptosis via ERK5 signaling pathway[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2015 466(1): 117-23.
- [5] Teitelbaum SL. Bone Resorption by Osteoclasts[J]. Science, 2000 289(5484): 1504-8.
- [6] Liu C, Li S, Ji B, et al. Flow-Induced Migration of Osteoclasts and Regulations of Calcium Signaling Pathways[J]. Cellular and Molecular Bioengineering 2014 8(1): 213-23.
- [7] Kosaku Kurata, Toshimasa Uemera, Atsuko Nemoto, et al. Mechanical Strain Effect on Bone-Resorbing Activity and Messenger RNA Expressions of Marker Enzymes in Isolated Osteoclast Culture[J]. Journal of Bone And Mineral Research, 2001 16(4): 722-30.
- [8] Takako Negishi-Koga HT. Ca^{2+} -NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation[J]. Immunological Reviews, 2009 231: 241-56.
- [9] Sophie Roux FP, Julian Quinn AL, Caroline Morieux AJ. Effects of Prostaglandins on Human Hematopoietic Osteoclast Precursors[J]. Endocrinology, 1997 138(4): 1476-82.
- [10] Tatsuo Suda NT, Nobuyuki Udagawa EJ, Matthew T. et al. Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand Families[J], Endocrine Reviews, 1999 20(3): 345-57.
- [11] B. Baroukh MC, C. Dobigny DG, Saffar JL. Osteoclasts differentiate from resident precursors in an in vivo model of synchronized resorption a temporal and spatial study in rats[J]. Bone 2000 27(5): 627-34.
- [12] Itzstein C, Coxon FP, Rogers MJ. The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases[J]. Small GTPases, 2011 2(3): 117-30.
- [13] Minkin C. Bone Acid Phosphatase Tartrate-Resistant Acid Phosphatase[J]. CalcifTissue Int, 1982 34: 285-90.
- [14] K. Debari TS, N. Udagawa, B. R. Rifkin. An Ultrastructural Evaluation of the Effects of Cysteine-Proteinase Inhibitors on Osteoclastic Resorptive Functions [J]. Calcified tissue international, 1995 56: 566-70.
- [15] Takashi Inui OI, Tetsuya Inaoka YO, Masayoshi Kumegawa TK, et al. Cathepsin K Antisense Oligodeoxynucleotide Inhibits Osteoclastic Bone Resorption[J]. The Journal of biological chemistry, 1997 272(13): 8109-12.
- [16] Jussi M H, Seija Raisanen, Jari J Salo, et al. Intracellular Fragmentation of Bone Resorption Products by Reactive Oxygen Species Generated by Osteoclastic Tartrate-resistant Acid Phosphatase[J]. The Journal of biological chemistry, 1999 274(33): 22907-10.
- [17] Li P, Hu M, Sun S, et al. Fluid flow-induced calcium response in early or late differentiated osteoclasts [J]. Annals of biomedical engineering, 2012 40(9): 1874-83.
- [18] Li P, Liu C, Hu M, et al. Fluid flow-induced calcium response in osteoclasts: signaling pathways [J]. Annals of biomedical engineering 2014 42(6): 1250-60.
- [19] Amano S, Chang YT, Fukui Y. ERK5 activation is essential for osteoclast differentiation [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0125054.
- [20] T. J. Chambers Par, K. Fuller NAA. Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts[J]. J Cell Sci, 1984 6: 383-99.
- [21] Iain Macintyre MZ, A. S. M. Towhidul Alam HKD, Baljit S, et al. Osteoclastic inhibition: an action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991 88: 2936-40.
- [22] Sharma D, Ciani C, Marin PA, et al. Alterations in the osteocyte lacunar-canalicular microenvironment due to estrogen deficiency [J], Bone, 2012 51(3): 488-97.
- [23] Cardoso L, Fritton SP, Gailani G et al. Advances in assessment of bone porosity, permeability and interstitial fluid flow [J]. J Biomech 2013 46(2): 253-65.
- [24] Cowin SC, Cardoso L. Blood and interstitial flow in the hierarchical pore space architecture of bone tissue [J]. J Biomech, 2015 48(5): 842-54.
- [25] Tommasini SM, Trinward A, Acerbo AS, et al. Changes in intracortical microporosities induced by pharmaceutical treatment of osteoporosis as detected by high resolution micro-CT [J]. Bone, 2012 50(3): 596-604.
- [26] Schneider P, Meier M, Wepf R, et al. Serial FIB/SEM imaging for quantitative 3D assessment of the osteocyte lacuno-canalicular network [J]. Bone, 2011 49(2): 304-11.
- [27] Thompson WR, Rubin CT, Rubin J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone[J]. Gene, 2012 503(2): 179-93.
- [28] 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]. Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 2011 26(2): 277-85.
- [29] Oest ME, Miller MA, Howard KI, et al. A novel in vitro loading system to produce supraphysiologic oscillatory fluid shear stress

- [J]. J Biomech, 2014, 47(2): 518-25.
- [30] Janet Rubin DB, Xian Fan, Clinton Rubin KM, et al. Pressure regulates osteoclast formation and MCSF expression in marrow culture [J]. Journal of cellular physiology, 1997, 170: 81-7.
- [31] 刘应芬, 李红, 吴江, 等. 流体剪应力对大鼠破骨细胞骨吸收活性的影响 [J]. 生物医学工程杂志, 2007, 24(3): 544-8. Liu Yingfen, Li Liang, Wu Jiang, et al. Effects of Fluid Shear Stress on Bone Resorption in Rat Osteoclasts [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2007, 24(3): 544-8. (in Chinese)
- [32] Roland Baron LN, Jean-Raphael Nefussi AV. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts [J]. American Journal of Pathology, 1986, 122(2): 363-78.
- [33] Al-Dujaili SA, Lau E, Al-Dujaili H, et al. Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation in vitro [J]. Journal of cellular biochemistry, 2011, 112(9): 2412-23.
- [34] 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 [J]. Bone, 2012, 50(5): 1115-22.
- [35] Fahlgren A, Bostrom MP, Yang X, et al. Fluid pressure and flow as a cause of bone resorption [J]. Acta orthopaedica, 2010, 81(4): 508-16.
- [36] Masuyama R, Vriens J, Voets T, et al. TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts [J]. Cell metabolism, 2008, 8(3): 257-65.
- [37] Hiromu Sakai YM, Takuya Notomi, Junko Kawawaki KO, et al. Phospholipase C-dependent Ca^{2+} -sensing pathways leading to endocytosis and inhibition of the plasma membrane vacuolar H^{+} -ATPase in osteoclasts [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 299(3): C570-C8.
- [38] Morethson P. Extracellular fluid flow and chloride content modulate H^{+} transport by osteoclasts [J]. BMC cell biology, 2015, 16: 20.
- [39] Guo D, Zhang Q, Li J, et al. Fluid shear stress changes cell morphology and regulates the expression of ATP6V1A and TCIRG1 mRNA in rat osteoclasts [J]. Mol Med Rep, 2010, 3(1): 173-8.
- [40] Anneke Wiltink, Peter J. Nijweide, Wim J. et al. Cell membrane stretch in osteoclasts triggers a self-reinforcing Ca^{2+} entry pathway [J]. Pflugers Arch, 1995, 429: 663-71.
- [41] Daniela Salvemini KS, Jaime L, Masferrer TPM, et al. Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation [J]. Journal of Clinical Investigation, 1994, 93: 1940-7.
- [42] Daniela Salvemini SLS, Jaime L. Masferrtr KS, et al. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis [J]. British Journal of Pharmacology, 1995, 114: 1171-8.
- [43] J. M. W. Quinn AS, M. Denne, M.-C. de Vernejoul JODM, et al. Inhibitory and stimulatory effects of prostaglandins on osteoclast differentiation [J]. Calcified tissue international, 1997, 60: 63-70.
- [44] M. L. Brandi mh, T. Umeda nm-B, S. Bianchi ssg, et al. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92: 2954-8.
- [45] Qin YX, Lin W, Rubin C. The Pathway of Bone Fluid Flow as Defined by In Vivo Intramedullary Pressure and Streaming Potential Measurements [J]. Annals of biomedical engineering, 2002, 30(5): 693-702.
- [46] T. Sato TH, S. Mori, H. Shirai, et al. Threshold for Bone Resorption Induced by Continuous and Intermittent Pressure in the Rat Hard Palate [J]. J Dent Res, 1998, 77(2): 387-92.
- [47] K. Piekarski MM. Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones [J]. Nature, 1977, 269: 80-2.
- [48] W S Simonet DLL, C R Dunstan, M Kelley M-SC, et al. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density [J]. Cell Press, 1997, 89: 309-19.
- [49] Masazumi Nagai NS. Reciprocal Gene Expression of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor and Osteoclast Differentiation Factor Regulates Osteoclast Formation [J]. Biochemical and biophysical research communications, 1999, 257: 719-23.
- [50] Kim CH, You L, Yellowley CE, et al. Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling [J]. Bone, 2006, 39(5): 1043-7.
- [51] You L, Temiyasathit S, Lee P, et al. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading [J]. Bone, 2008, 42(1): 172-9.
- [52] Sipola A, Nelo K, Hautala T, et al. Endostatin inhibits VEGF-A induced osteoclastic bone resorption in vitro [J]. BMC musculoskeletal disorders, 2006, 7: 56.
- [53] Toru Akiyama PB, Tsuyoshi Miyazaki, Yuho Kadono HC, et al. Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim [J]. The EMBO Journal, 2003, 22(24): 6653-64.
- [54] Iwasawa M, Miyazaki T, Nagase Y, et al. The antiapoptotic protein Bcl-xL negatively regulates the bone-resorbing activity of osteoclasts in mice [J]. The Journal of clinical investigation, 2009, 119(10): 3149-59.

(收稿日期: 2016-01-23; 修回日期: 2016-03-18)