

Piezo1 离子通道介导的流体剪切应力抑制 MLO-Y4 骨细胞凋亡

刘众成,何良志,移穷,刘雪宁,张坤,王力夫,耿彬,夏亚一,姜金
兰州大学第二医院骨科/甘肃省骨与关节疾病重点实验室,甘肃 兰州 730000

【摘要】目的:研究 Piezo1 机械敏感性离子通道对骨细胞的调控作用。**方法:**应用课题组研发的流体剪切力(FSS)加载装置,使用免疫荧光探究 FSS 对 Piezo1 通道在 MLO-Y4 中影响的最佳强度;对 Piezo1 使用 FSS、激动剂 Yoda1 或阻滞剂 GsMTx4 进行干预。使用 Western Blot 探究 Cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax 凋亡相关蛋白的表达量;使用 Hoechst-33258 以及流式细胞凋亡检测 MLO-Y4 骨细胞的凋亡比例。**结果:**免疫荧光染色结果表明 FSS 对 MLO-Y4 骨细胞中 Piezo1 的表达呈现先增加后降低的单峰趋势,其中以 9 dyne/cm² 加载 30 min 为最佳刺激条件。使用 Yoda1 抑制 MLO-Y4 细胞凋亡 ($P<0.05$),使用 GsMTx4 促进 MLO-Y4 细胞凋亡 ($P<0.05$)。Piezo1 介导的 FSS 抑制 MLO-Y4 细胞凋亡 ($P<0.05$)。**结论:** Piezo1 机械敏感性离子通道介导的 FSS 在 9 dyne/cm² 条件下抑制 MLO-Y4 骨细胞凋亡,且 FSS 在该条件下可以有效逆转 Piezo1 阻滞剂 GsMTx4 在 4 μ mol/L 作用 0.5 h 下促进 MLO-Y4 细胞凋亡作用。

【关键词】流体剪切力;Piezo1;骨细胞;凋亡

【中图分类号】R318;R329.2

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2022)10-1287-06

Piezo1 ion channel-mediated fluid shear stress inhibits the apoptosis of MLO-Y4 osteocytes

LIU Zhongcheng, HE Liangzhi, YI Qiong, LIU Xuening, ZHANG Kun, WANG Lifu, GENG Bin, XIA Yayi, JIANG Jin
Gansu Provincial Key Laboratory of Orthopaedics/Department of Orthopaedics, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To investigate the regulation of mechanosensitive ion channel Piezo1 on osteocytes. **Methods** Immunofluorescence staining was used to investigate the best condition for Piezo1 channel-mediated FSS loaded by the self-developed fluid shear stress (FSS) loading device on MLO-Y4 osteocytes. Piezo1 was intervened with FSS, Piezo1 activator Yoda1, or Piezo1 blocker GsMTx4. The expression levels of apoptosis-related proteins (Cleaved Caspase-3, Bcl-2, and Bax) were analyzed using Western Blot analysis, and the apoptosis rates of MLO-Y4 osteocytes was detected by Hoechst-33258 and flow cytometry. **Results** The result of immunofluorescence staining indicated that in MLO-Y4 osteocytes exposed to FSS, the expression of Piezo1 had a unimodal tendency of increasing firstly and then decreasing, and that the optimal stimulation condition was 9 dyne/cm² loading for 30 minutes. Yoda1 inhibited the apoptosis of MLO-Y4 osteocytes ($P<0.05$), and GsMTx4 promoted the apoptosis of MLO-Y4 osteocytes ($P<0.05$). Piezo1-mediated FSS inhibited the apoptosis of MLO-Y4 osteocytes ($P<0.05$). **Conclusion** When loading FSS at 9 dyne/cm², the FSS mediated by mechanosensitive ion channel Piezo1 can inhibit the apoptosis of MLO-Y4 osteocytes, and FSS can effectively reverse the apoptosis of MLO-Y4 osteocytes promoted with Piezo1 blocker GsMTx4 at 4 μ mol/L for 0.5 h.

Keywords: fluid shear stress; Piezo1; osteocytes; apoptosis

【收稿日期】2022-05-04

【基金项目】国家自然科学基金(81874017, 81960403, 82060405, 82160422);甘肃省中医药管理局科研项目(TCM-IPC-2020-03);兰州市科技计划项目(2021-RC-102, 20JR5RA320);兰州大学第二医院“萃英科技创新”计划(CY2017-ZD02, CY2021-MS-A07, CY2021-MS-B02)

【作者简介】刘众成,硕士,研究方向:机械应力与骨质疏松、运动医学, E-mail: liuzhch_14@163.com;何良志,硕士,研究方向:机械应力与骨质疏松、运动医学, E-mail: 976620652@qq.com(刘众成和何良志为共同第一作者)

【通信作者】姜金,博士,研究方向:细胞生物力学、运动医学, E-mail: jiangjin2007@163.com;夏亚一,博士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:关节外科、生物材料、细胞生物力学, E-mail: xiayylzu@126.com

前言

我国罹患骨质疏松人口数量居于世界首位^[1]。骨质疏松作为一种好发于中老年人群的慢性、退行性疾病,具有全身骨量减少、女性多于男性、易发生脆性骨折等特点,该疾病是引起 50 岁以上人群脆性骨折的主要危险因素^[2]。世界范围内 50 岁以上女性中有 1/3、男性中有 1/5 以上会出现骨质疏松相关骨折^[3]。预估我国将在 2050 年时每年会出现 600 万例因骨质疏松而产生的脆性骨折并造成 250 亿美元以上的经济负担,这也比我国 2010 年同期数据增长了

2.7倍^[4]。这提示了尽管随着我国经济迅猛发展,人口老龄化导致罹患骨质疏松的人口基数正在不断增长。因此,探究骨质疏松的病因、发病机制,延缓骨质疏松进程便成为了亟待解决的医疗问题。

生理状态下骨量的维持由骨形成、骨重塑与骨吸收建立动态平衡而实现^[5]。作为哺乳动物体内骨骼中含量最丰富的细胞—骨细胞在骨形成、骨重塑以及骨量维持发挥着重要作用^[6]。骨细胞是骨组织中最主要的机械感受细胞,其通过感受机械刺激发挥内分泌功能^[7]。同时,小鼠MLO-Y4细胞系是作为体外实验研究骨细胞应用最广的细胞系^[6]。自1892年提出Wolff定律以来,机械应力对骨组织的影响逐渐被研究者所重视^[8]。Wolff定律提示:骨骼可以接受机械应力的信号并受其影响,机械载荷可以刺激骨形成。目前认为适量力学刺激有利于维持骨量与骨组织的生理功能。Piezo1/2通道(或称:Fm38A/B)由Coste及其同事在2010年发现^[9]。Piezo通道蛋白在骨骼疾病中的研究于2017年开始,Sugimoto等^[10]发现Piezo1在静水压下通过调节骨形态发生蛋白2表达决定间充质干细胞的命运。然而,机械应力刺激下Piezo1是否对骨细胞表型具有影响目前尚缺乏相关研究。

凋亡又称细胞生理性、程序性死亡^[11]。凋亡是细胞内稳态的关键自发性过程,对细胞的健康状态起着重要作用^[12]。Tan等^[13]认为凋亡的Ocy吸引微环境中的Oc,进而对骨重建产生影响,并发现机械应力抑制肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)诱导的Ocy凋亡。Yan等^[14]通过流式细胞凋亡检测发现机械应力可以有效抑制MLO-Y4细胞凋亡。因此,机械应力对预防或减缓骨细胞凋亡甚至是骨质疏松具有重要作用。然而,具体哪些分子以及调控机制参与其中仍存在一定的不确定性。流体剪切应力(Fluid Shear Stress, FSS)作为体外模拟生物体内应用的机械应力,被广泛应用于体外细胞实验。因此,本研究将对Piezo1机械敏感性钙离子通道介导的FSS抑制MLO-Y4骨细胞凋亡进行研究。

1 方法

1.1 实验试剂

MLO-Y4骨细胞购于上海富衡生物科技有限公司。试剂: α -MEM培养基(Hyclone, 美国),胎牛血清(Gibco, 美国),胰蛋白酶(Gibco, 美国),青霉素-链霉素溶液100X、磷酸盐缓冲液(PBS)、4%多聚甲醛、Triton-X100(Beyotime, 中国),DAPI染色液(Biosharp, 中国),Piezo1一抗、Bcl-2一抗、Bax一抗、 β -actin一抗、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗、山羊抗兔荧光二抗-488(Proteintech, 中国),Hoechst-33258即

用型染色液(Solarbio, 中国),Annexin V-PI凋亡检测试剂盒(Yeasen, 中国)。

1.2 细胞培养

将青霉素-链霉素溶液100X抽取1 mL加入至9:1比例的完全培养基(α -MEM:胎牛血清)中,细胞培养瓶中加入4 mL完全培养基,将细胞置于37 °C、5% CO₂培养箱内,每日观察1次,细胞增长至90%密度进行1:2传代。传代前使用PBS轻柔清洗残余培养基两遍,加入500 μ L胰蛋白酶悬浮细胞后加入3.5 mL完全培养基重新置入培养箱。

1.3 细胞干预

按课题组既往操作将细胞置于课题组自行研发的FSS加载装置中,调整加载参数,待加载完成后取出玻片进行下一步操作^[15]。该FSS加载装置由6通道平行小室构成,通过计算机监控实时加载的FSS大小,由计算机监控系统、储液系统、加载系统以及脉管系统构成^[16-17]。Piezo1激动剂Yoda1溶解于DMSO并配置成100 μ mol/L浓度,将其加入需要进行干预的细胞培养瓶并使最终浓度为10 μ mol/L,作用2 h。Piezo1阻滞剂GsMTx4溶解于PBS并配置成10 μ mol/L浓度,将其加入需要进行干预的细胞培养瓶并使最终浓度为4 μ mol/L,作用0.5 h。

1.4 免疫荧光

首先使用4%多聚甲醛进行固定30 min(室温),PBS清洗3遍,接下来将细胞置于1% Triton-X100中通透30 min(室温),PBS清洗3遍,然后将细胞置于10%山羊封闭血清封闭30 min(37 °C),PBS清洗3遍,将细胞置于Piezo1一抗(1:300)中过夜(4 °C),PBS清洗5遍,然后将细胞置于荧光二抗(-488)中染色1 h(37 °C),PBS清洗5遍,最后将细胞置于DAPI染色液中15 min(37 °C)并在荧光显微镜下观察细胞。

1.5 Hoechst-33258染色

封闭及之前步骤同免疫荧光,PBS清洗完成后将细胞置于Hoechst-33258即用型染色液中染色20 min(37 °C)并在荧光显微镜下观察细胞。

1.6 Western Blot检测

使用RIPA细胞裂解液与PMSF以100:1比例配置裂解液,向干预完成的细胞中加入1.0 mL裂解液冰上裂解30 min,12 000 rpm离心20 min后弃去沉淀。向剩余裂解液中加入1/3的4x蛋白质上样缓冲液。蛋白在10% SDS-PAGE胶中120 V电泳,待电泳完成后350 mA恒流转印30 min,封闭1 h后将转印膜置于相应一抗中4 °C过夜,接下来取出转印膜并置于相应二抗中作用1 h。拭干转印膜后滴加ECL发光液并曝光。

1.7 流式细胞检测凋亡

使用不含 EDTA 的胰蛋白酶悬浮细胞后将其加入流式管中,依照 AnnexinV-PI 凋亡检测试剂盒说明书依次配置试剂,将流式管插入流式细胞仪定量计算细胞凋亡率。

1.8 统计学方法

所有需要进行定量分析的实验均至少进行 3 次独立实验。首先使用 K-S 检验(Stata 15.0 软件)计算所得数据是否满足正态分布。所有满足正态分布的数据用均数±标准差表示,使用双尾 *t*-检验或单因素方差分析(Graphpad 8.0 软件)计算是否具有统计学意义并绘制统计图。Image-J(1.52 版本,美国)用于计算免疫荧光强度及 Western blot 条带灰度值。Adobe Illustrator (2019 版本,美国)进行图像组装及

成图。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FSS 激活并上调 Piezo1 表达

对 FSS 调控 Piezo1 通道蛋白的表达进行探究,分别探究不同 FSS 力梯度(0、3、6、9、12、15、18 dyne/cm²)以及不同时间梯度(0、15、30、45、60、90、120 min)对 MLO-Y4 细胞 Piezo1 通道蛋白的调控作用。如图 1 所示,在 MLO-Y4 细胞中使用免疫荧光染色对 Piezo1 通道蛋白进行染色,当加载条件为 FSS 力梯度时,9、12 dyne/cm²与空白组 Piezo1 免疫荧光强度具有较明显差异(图 1a);当加载条件为 FSS 时间梯度时,30、45 min 与空白组 Piezo1 免疫荧光强度具有较明显差异(图 1b)。

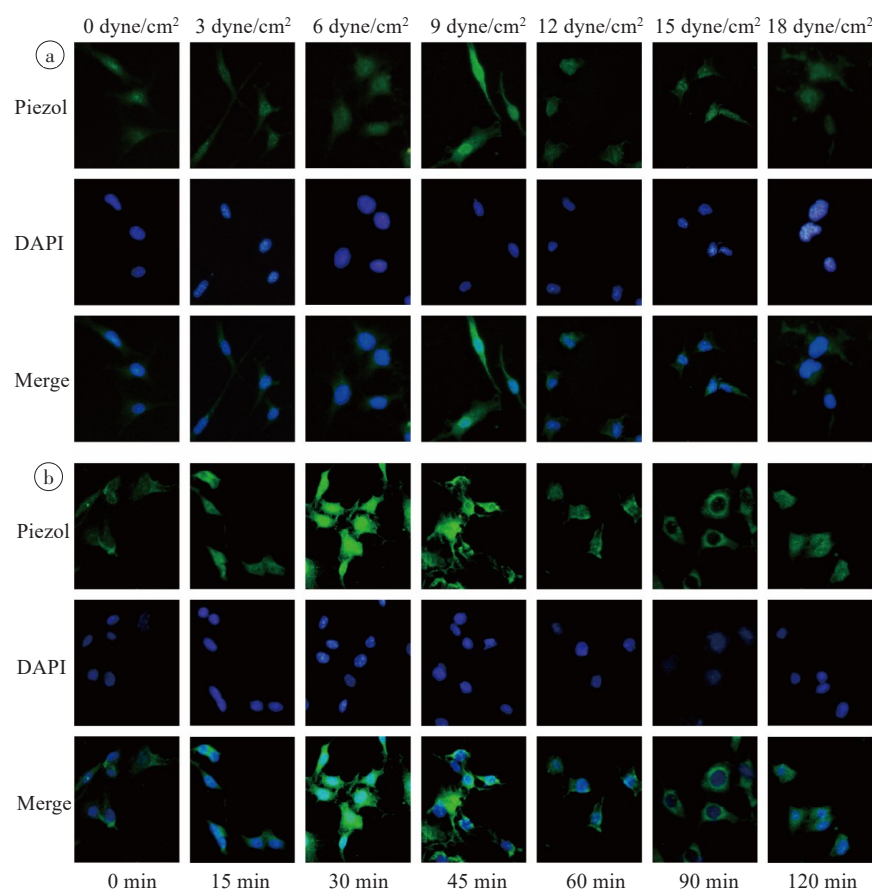


图1 加载不同强度 FSS,免疫荧光染色 Piezo1 表达强度(×200)

Figure 1 Expression level of Piezo1 in the immunofluorescence staining after loading different FSS (×200)

a:FSS时间恒定条件下力梯度对 Piezo1 免疫荧光强度表达的影响;b:FSS强度恒定时间梯度对 Piezo1 免疫荧光强度表达的影响。Piezo1(绿色),细胞核(蓝色),Piezo1 与细胞核合并(蓝绿色,Merge)

2.2 激活 Piezo1 通道蛋白抑制 MLO-Y4 细胞凋亡

按前文条件对 Piezo1 进行激活使用的 Yoda1 为干预条件(10 μmol/L, 2 h);使用的 GsMTx4 为干预条件(4 μmol/L, 0.5 h),分别与空白组进行比较,观察 Cleaved Caspase-3、Bcl-2 以及 Bax 分子的相对表达

量。如图 2 所示,使用 Yoda1 对 MLO-Y4 细胞进行干预时,Cleaved Caspase-3 以及 Bax 的蛋白表达量相较于空白组显著下调(*P*<0.000 1, *P*=0.014 8),Bcl-2 的蛋白表达量相较于空白组显著上调(*P*=0.046 1);相对应地,当使用 GsMTx4 进行干预时,Cleaved Caspase-3、

Bax的蛋白表达量相较于空白组显著上调($P=0.006\ 5$, $0.014\ 7$),Bcl-2的蛋白表达量相较于空白组显著下调($P=0.035\ 6$)(图2a~图2d)。Hoechst-33258染色显示

空白组凋亡率为 $9.35\%\pm 1.07\%$,Yoda1组凋亡率($6.19\%\pm 1.03\%$)显著下调($P=0.007\ 3$),而GsMTx4组凋亡率($26.02\%\pm 2.58\%$)显著上调($P=0.042\ 0$)(图2e~图2f)。

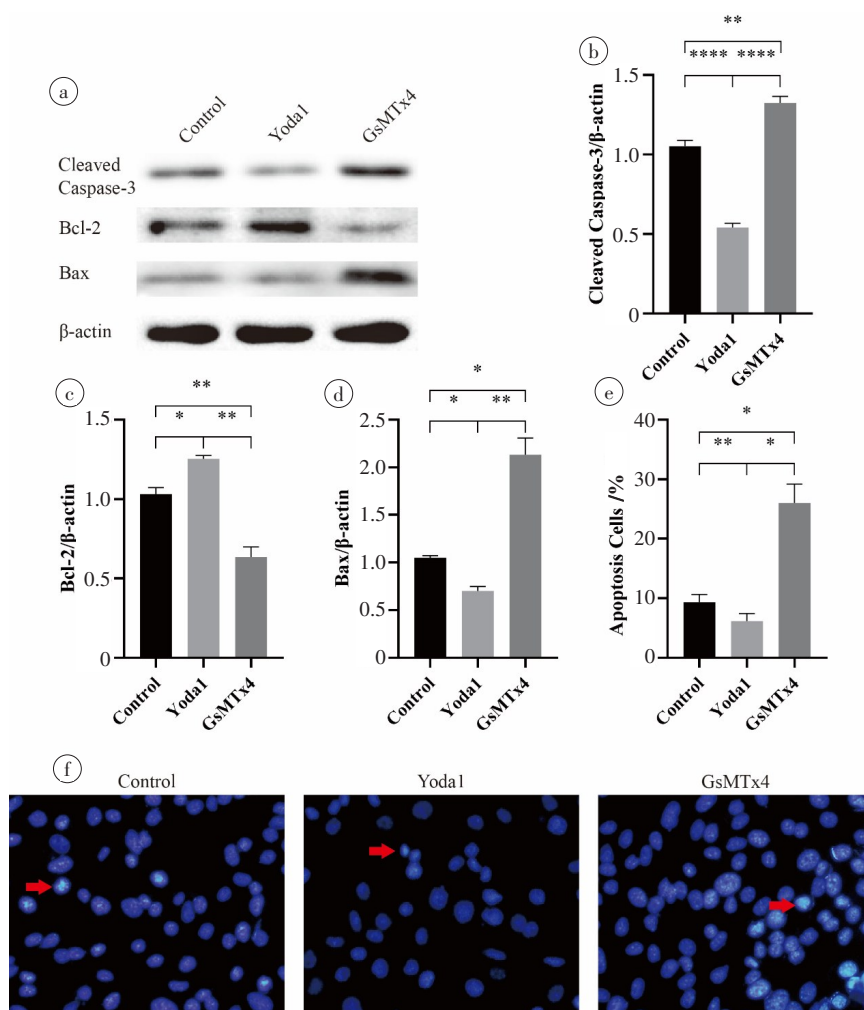


图2 Yoda1、GsMTx4对MLO-Y4细胞凋亡的影响

Figure 2 Effects of Yoda1 and GsMTx4 on apoptosis of MLO-Y4 osteocytes

a: Yoda1 (10 μmol/L, 2 h)、GsMTx4 (4 μmol/L, 0.5 h)对MLO-Y4细胞Cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax表达的影响; b~d: Yoda1、GsMTx4对上述蛋白表达影响的定量分析; e: Hoechst-33258染色检测细胞凋亡的定量分析; f: Yoda1、GsMTx4对MLO-Y4细胞凋亡的Hoechst-33258染色($\times 200$, $n=3$, 红色箭头: 凋亡细胞); * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.000\ 1$

2.3 Piezo1介导的FSS抑制MLO-Y4细胞凋亡

按前文条件探究Piezo1介导的FSS对MLO-Y4细胞凋亡的影响,设立4个组:空白组、FSS组、GsMTx4组和FSS+GsMTx4组,分别使用Western Blot、Hoechst-33258以及流式细胞凋亡检测技术对MLO-Y4的细胞凋亡进行探究。如图3所示,当加载FSS对MLO-Y4细胞进行干预后,Cleaved Caspase-3以及Bax的蛋白表达量相较于空白组显著下调($P=0.028\ 1$, $0.006\ 5$),Bcl-2蛋白表达量相较于空白组显著上调($P=0.023\ 5$);当使用GsMTx4对MLO-Y4细胞进行干预后,Cleaved Caspase-3以及Bax的蛋白表达量相较于空白组显著上调($P=0.016\ 4$, $0.003\ 7$),Bcl-2蛋白的表达

量相较于空白组显著下调($P=0.034\ 2$);且FSS+GsMTx4组可以有效阻断GsMTx4对上述3种蛋白调控的影响($P=0.046\ 5$, $0.024\ 5$, $0.036\ 0$)(图3a~图3c,图3f)。Hoechst-33258染色显示空白组凋亡率为 $6.04\%\pm 0.34\%$,FSS组凋亡率相较于空白组($2.25\%\pm 0.49\%$)显著下调($P=0.026\ 4$),而GsMTx4组凋亡率($11.12\%\pm 0.79\%$)相较于空白组显著上调($P=0.032\ 2$),且FSS+GsMTx4组($6.36\%\pm 0.40\%$)可以有效阻断GsMTx4对MLO-Y4细胞凋亡的调控作用($P=0.048\ 6$)(图3d,图3g)。流式细胞凋亡检测显示空白组凋亡率为 $4.20\%\pm 0.10\%$,FSS组凋亡率($3.21\%\pm 0.15\%$)相较于空白组显著下调($P=0.027\ 6$),而GsMTx4组凋亡

率(11.13%±1.00%)相较于空白组显著上调($P=0.030\ 6$), 且 FSS+GsMTx4 组(6.69%±0.58%)可以有效阻断 GsMTx4 对 MLO-Y4 细胞凋亡的调控作用($P=0.012\ 3$) (图 3e, 图 3h)。

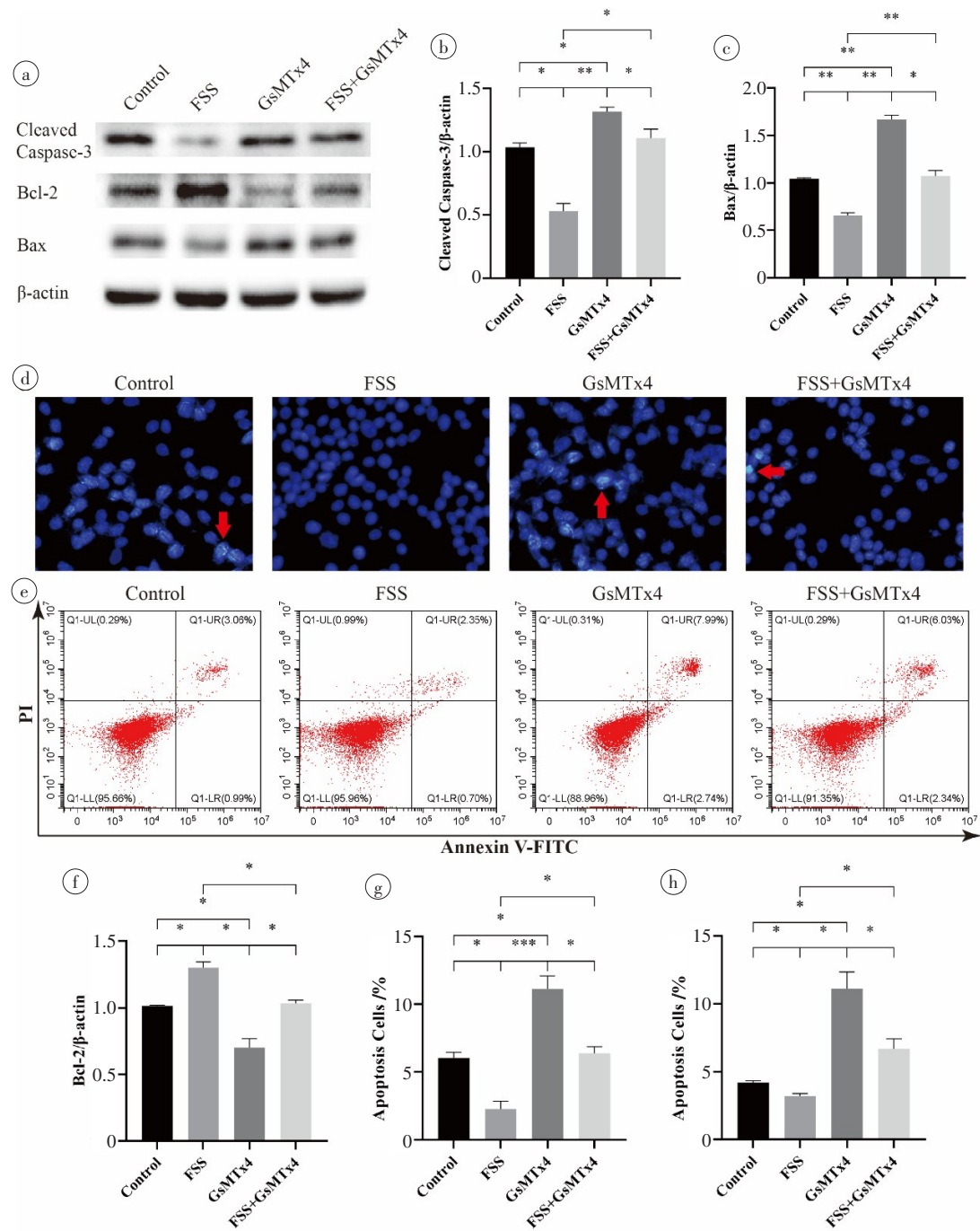


图3 Piezo1介导的FSS对MLO-Y4细胞凋亡的影响

Figure 3 Effects of Piezo1-mediated FSS on apoptosis of MLO-Y4 osteocytes

a:FSS(9 dyne/cm²×30 min)、GsMTx4(4 μmol/L,0.5 h)、FSS+GsMTx4(前文两干预叠加)对MLO-Y4细胞 Cleaved Caspase-3、Bcl2、Bax 表达的影响;b~c、f:上述干预对上述蛋白表达影响的定量分析;d:上述干预对MLO-Y4细胞凋亡的Hoechst-33258染色(×200, n=3,红色箭头:凋亡细胞);e:上述干预对MLO-Y4细胞流式细胞检测凋亡;g:Hoechst-33258染色检测MLO-Y4细胞凋亡的定量分析;h:流式细胞检测MLO-Y4凋亡的定量分析;* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$

3 讨论

通过本实验发现 FSS 上调 MLO-Y4 细胞中 Piezo1 通道的蛋白质表达,FSS 通过上调 MLO-Y4 细

胞中的 Piezo1 通道蛋白进而调控 MLO-Y4 细胞中的 Cleaved Caspase-3、Bcl-2 以及 Bax 蛋白质表达量,并最终抑制该细胞的凋亡。本研究为治疗骨量减少以及骨质疏松提供潜在的治疗靶点。

本实验首先探究 FSS 刺激下 Piezo1 离子通道的表达情况,并通过免疫荧光与 Western Blot 实验发现本课题组研发的 FSS 加载装置对 MLO-Y4 细胞的 Piezo1 表达呈现随加载时间以及力梯度增加的“先增后减”的单峰平滑曲线,以 6~12 dyne/cm² 加载 15~45 min 条件下 Piezo1 呈现表达增高,其中以 9 dyne/cm² 加载 30 min 为上调 MLO-Y4 细胞中 Piezo1 通道蛋白的条件为最佳。Williams 等^[18]发现 FSS 加载范围在 6~60 dyne/cm² 时,新生大鼠颅骨细胞的钙应答会随着剪切应力的增加而增加。Kapur 等^[19]发现当 FSS 加载 20 dyne/cm² 持续 1 h 后,人成骨细胞的增殖显著增加。而 Bin 等^[20]发现当加载条件为 12 dyne/cm² 持续 1 h 后,鼠源 MC3T3-E1 系成骨细胞通过细胞外信号调节激酶 5 信号通路显著抑制其凋亡。通过分析上述结果,发现用于模拟体内骨骼微环境的 FSS 强度对于不同分子的最佳刺激条件不尽相同,普遍的 FSS 加载条件为 6~20 dyne/cm²。

其次,本实验通过探究骨细胞(MLO-Y4 细胞系)中对 Piezo1 进行 FSS 后上调、激活剂 Yoda1 以及阻滞剂 GsMTx4 等干预后发现 Piezo1 上调表达量或阻滞其表达会影响 MLO-Y4 细胞凋亡表型。Piezo1 离子通道自 2010 年被发现以来,已探明其与体内多种周围微环境存在 FSS 的细胞相关疾病有关,例如在血管内皮细胞膜富集的 Piezo1 参与调控生物体血压^[21]、在红细胞细胞膜富集的 Piezo1 突变导致溶血性贫血^[22]以及在成骨细胞中 Piezo1 缺乏可以进一步引起骨丢失^[23]等。Sun 等^[24]发现敲除成骨细胞 Piezo1 基因破坏了成骨细胞的成骨过程并严重损坏了骨的结构和强度。Li 等^[25]首次报道了 FSS 决定骨细胞中 Piezo1 的基因表达变化,且成骨细胞和骨细胞中 Piezo1 缺失导致小鼠骨量显著下降。

本研究通过 Western Blot 实验、Hoechst-33258 以及流式细胞检测细胞凋亡等多方面验证了 Piezo1 介导的 FSS 可以改善 MLO-Y4 细胞状态并抑制其凋亡,并同时发现 Piezo1 的特异性阻滞剂 GsMTx4 有促进其凋亡的作用,揭示了 Piezo1 在对抗骨细胞凋亡中的作用。Tan 等^[13]认为凋亡的骨细胞吸引微环境中的破骨细胞,进而对骨重建产生影响,并发现 FSS 抑制 TNF- α 诱导的骨细胞凋亡。Yan 等^[14]通过流式细胞凋亡检测发现 FSS 可以有效抑制 MLO-Y4 细胞凋亡。本研究通过对 MLO-Y4 细胞加载 FSS 对 Piezo1 离子通道的最佳上调条件(9 dyne/cm² 持续 30 min)后发现 Piezo1 介导的 FSS 抑制 MLO-Y4 细胞凋亡,首次揭示了 Piezo1 为 FSS 抑制骨细胞凋亡的重要调控分子。

4 结 论

Piezo1 机械敏感性离子通道介导的 FSS 在 9 dyne/cm² 条件下抑制 MLO-Y4 骨细胞凋亡,且 FSS 在该条件下可以有效逆转 Piezo1 阻滞剂 GsMTx4 在 4 μ mol/L 作用 0.5 h 下促进 MLO-Y4 细胞凋亡作用。

【参考文献】

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317-318.
Chinese Medical Association Osteoporosis and Bone Mineral Disease Branch. An epidemiological survey of osteoporosis in China and the results of the "healthy Skeleton" campaign released [J]. Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Research, 2019, 12(4): 317-318.
- [2] Bouvard B, Annweiler C, Legrand E. Osteoporosis in older adults [J]. Joint Bone Spine, 2021, 88(3): 105-135.
- [3] Anam AK, Insogna K. Update on osteoporosis screening and management [J]. Med Clin North Am, 2021, 105(6): 1117-1134.
- [4] Si L, Winzenberg TM, Jiang Q, et al. Projection of osteoporosis-related fractures and costs in China: 2010-2050 [J]. Osteoporos Int, 2015, 26(7): 1929-1937.
- [5] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation [J]. Cell, 1998, 93(2): 165-176.
- [6] Robling AG, Bonewald LF. The osteocyte: new insights [J]. Annu Rev Physiol, 2020, 82: 485-506.
- [7] Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell and more [J]. Endocr Rev, 2013, 34(5): 658-690.
- [8] Rice JC, Cowin SC, Bowman JA. On the dependence of the elasticity and strength of cancellous bone on apparent density [J]. J Biomech, 1988, 21(2): 155-168.
- [9] Coste B, Mathur J, Schmidt M, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels [J]. Science, 2010, 330(6000): 55-60.
- [10] Sugimoto A, Miyazaki A, Kawarabayashi K, et al. Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17696.
- [11] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4): 495-516.
- [12] Fleisher TA. Apoptosis [J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 1997, 78(3): 245-249.
- [13] Tan SD, Kuijpers-Jagtman AM, Semeins CM, et al. Fluid shear stress inhibits TNF α -induced osteocyte apoptosis [J]. J Dent Res, 2006, 85(10): 905-909.
- [14] Yan Z, Wang P, Wu J, et al. Fluid shear stress improves morphology, cytoskeleton architecture, viability, and regulates cytokine expression in a time-dependent manner in MLO-Y4 cells [J]. Cell Biol Int, 2018, 42(10): 1410-1422.
- [15] 何良志, 姜金, 刘众成, 等. 不同强度流体剪切力对 MC3T3-E1 成骨细胞内 Piezo1 蛋白表达的影响 [J]. 中国医学物理学杂志, 2020, 37(12): 1579-1582.
He LZ, Jiang J, Liu ZC, et al. Effect of different fluid shear stress intensities on expression of Piezo1 protein in MC3T3-E1 osteoblasts. [J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2020, 37(12): 1579-1582.
- [16] Jiang J, Zhao LG, Teng YJ, et al. ERK5 signalling pathway is essential for fluid shear stress-induced COX-2 gene expression in MC3T3-E1 osteoblast [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 406(1-2): 237-243.
- [17] Bin G, Bo Z, Jing W, et al. Fluid shear stress suppresses TNF- α -induced apoptosis in MC3T3-E1 cells: Involvement of ERK5-AKT-FoxO3a-Bim/FasL signaling pathways [J]. Exp Cell Res, 2016, 343(2): 208-217.
- [18] Williams JL, Iannotti JP, Ham A, et al. Effects of fluid shear stress on bone cells [J]. Biorheology, 1994, 31(2): 163-170.
- [19] Kapur S, Baylink DJ, 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): 241-251.
- [20] Bin G, Cuifang W, Bo Z, et al. Fluid shear stress inhibits TNF- α -induced osteoblast apoptosis via ERK5 signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 466(1): 117-123.
- [21] Zeng WZ, Marshall KL, Min S, et al. PIEZO1 mediates neuronal sensing of blood pressure and the baroreceptor reflex [J]. Science, 2018, 362(6413): 464-467.
- [22] Zarychanski R, Schulz VP, Houston BL, et al. Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis [J]. Blood, 2012, 120(9): 1908-1915.
- [23] Wang L, You X, Lotinun S, et al. Mechanical sensing protein PIEZO1 regulates bone homeostasis via osteoblast-osteoclast crosstalk [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 282.
- [24] Sun W, Chi S, Li Y, et al. The mechanosensitive Piezo1 channel is required for bone formation [J]. eLife, 2019, 8: e47454.
- [25] Li X, Han L, Nookaew I, et al. Stimulation of Piezo1 by mechanical signals promotes bone anabolism [J]. eLife, 2019, 8: e49631.

(编辑:陈丽霞)