

文章编号: 1004-7220(2024)05-0823-07

梯度流体剪应力下破骨前体细胞迁移与胞内钙分布的关联性

张竞之¹, 杨爱玲¹, 高颜², 王淑容¹, 霍波²

(1. 北京理工大学 宇航学院, 力学系, 生物力学实验室, 北京 100081; 2. 首都体育学院 体育人工智能研究院, 北京 100191)

摘要: **目的** 阐明局部梯度流体剪应力 (fluid shear stress, FSS) 是否会造成胞内 Ca^{2+} 浓度梯度的特异性分布, 并最终决定细胞的迁移方向。 **方法** 利用 COMSOL 软件对流动腔内 FSS 分布进行数值模拟。建立 FSS 作用下破骨前体细胞 RAW264.7 胞内 Ca^{2+} 染色方法, 并对细胞施加梯度 FSS, 定量分析胞内 Ca^{2+} 浓度分布和动态变化以及细胞迁移参数。 **结果** 破骨前体细胞更倾向于向低 FSS 区域迁移, 且振荡流会调节细胞内 Ca^{2+} 沿细胞迁移方向分布, 当阻断力敏感阳离子选择性通道、磷脂酶 C、内质网钙信号通路和清除细胞外钙后, 细胞向低 FSS 方向的迁移速度显著降低, 但是沿液体流动方向的迁移速度显著增强。同时, 细胞沿液体流动方向的 Ca^{2+} 分布显著升高。 **结论** 梯度 FSS 作用下, 破骨前体细胞可以感受到这种梯度效应, 且胞内 Ca^{2+} 沿迁移方向的特异性分布, 最终导致破骨前体细胞向低 FSS 区域迁移。研究结果为最终阐明动态外力作用下骨组织重建的细胞和分子机制提供了较为重要的基础数据。

关键词: 骨重建; 破骨前体细胞; 梯度流体剪应力; 胞内钙分布; 细胞迁移

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2024.05.005

Correlation Between Cell Migration and Intracellular Calcium Distribution of Osteoclast Precursors under Gradient Fluid Shear Stress

ZHANG Jingzhi¹, YANG Ailing¹, GAO Yan², WANG Shurong¹, HUO Bo²

(1. Biomechanics Lab, Department of Mechanics, School of Aerospace Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China; 2. Institute of Artificial Intelligence in Sports, Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100191, China)

Abstract: **Objective** To determine whether local gradient fluid shear stress (FSS) causes a specific distribution of intracellular calcium ion concentration, which ultimately determines the direction of cell migration. **Methods** Numerical simulations were performed using COMSOL software. The method of staining intracellular calcium ion for RAW264.7 osteoclast precursors was established. After applying gradient FSS on the cells, the distribution and dynamic changes of intracellular calcium ion concentration and cell migration parameters were analyzed. **Results** Osteoclast precursors tended to migrate towards regions with lower FSS, and oscillatory flow regulated the distribution of intracellular calcium ions along the direction of cell migration. After blocking phospholipase C (PLC), mechanosensitive cation-selective channels (MSCC), endoplasmic reticulum (ER), and removing

收稿日期: 2024-05-21; 修回日期: 2024-06-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (12072034)

通信作者: 霍波, 教授, E-mail: huobo@cupes.edu.cn

extracellular calcium, the migration speed of cells towards the low FSS direction was significantly reduced, but the migration speed along the liquid flow direction was significantly enhanced. Meanwhile, the calcium ion distribution along the liquid flow direction was significantly increased. **Conclusions** Osteoclast precursors can sense the FSS gradient, resulting in a specific distribution of intracellular calcium ions along the direction of migration. This ultimately leads to the migration of osteoclast precursors towards regions with lower FSS. This study provides important basic data for ultimately elucidating the cellular and molecular mechanisms of bone tissue remodeling under dynamic external forces.

Key words: bone remodeling; osteoclast precursors; gradient fluid shear stress; intracellular calcium distribution; cell migration

人体的运动会在骨骼上施加力学载荷,而当载荷位置和方向发生改变时,骨的结构会发生适应性重建,这种现象被称为 Wolff 定律^[1-2]。但是要真正阐明骨结构动态调整这一现象的机制,还需要从细胞和分子水平开展研究,因为骨组织的结构重建最终是由其中的细胞来调控^[3]。骨重建的主要调控细胞为破骨细胞和成骨细胞,它们分别负责骨吸收和骨形成^[4-6]。

通常在骨重建的过程中会出现“基本多细胞单元”(basic multicellular unit, BMU)。研究表明,骨中典型的线状微裂缝会引起裂缝周围局部骨细胞凋亡,这一凋亡区域与随后发生破骨反应的骨吸收区域共定位,而弥散性微损伤区域并不会引起骨的重塑反应^[7]。由于孔隙结构中液体不可压缩,当骨骼受到外力作用而发生变形时,孔隙的体积也会相应发生变化,从而导致液体之间的压力差异产生流动,在细胞表面施加流体剪应力(fluid shear stress, FSS)^[8]。

Ca²⁺是细胞中最重要的第二信使之一,是细胞运动重要的调节器。目前研究发现, Ca²⁺参与细胞的迁移过程,在速度、振幅和时空模式方面均表现出多功能性,对细胞的生理活动至关重要^[9-11]。Ca²⁺作为骨细胞内的重要信号因子,钙响应实验已经在包括破骨细胞等多种细胞中开展^[12-14]。而胞质内的 Ca²⁺是细胞运动的重要调节器。例如,细胞迁移过程中 Ca²⁺浓度从前端到尾端呈递增趋势。随着技术的不断发展,胞内力致钙响应分析方法这种常用的检测方法也在不断完善和优化。

本课题组前期研究发现,力敏感 Ca²⁺通道(mechanosensitive cation-selective channels, MSCC)-磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)-内质网

(endoplasmic reticulum, ER)钙信号通路是破骨细胞力致钙响应的主要通路^[15]。并且这些通路也调控细胞沿流场方向的迁移过程。Gao 等^[16]研究发现,在高梯度低幅值 FSS 作用下,破骨前体细胞更倾向于沿低应力区迁移。Wang 等^[17]研究表明,液体流动可以激活 Ca²⁺信号通路,并最终调节胞内 Ca²⁺的分布。但是该研究只使用了均匀流场,并未考虑梯度 FSS 场对胞内的钙分布及迁移关联性的影响。

本文重新设计了平行板流动腔装置中的垫片,即改变流室的截面形状和宽度的尺寸,使其成为一种可以用于激光共聚焦显微镜 100 倍油镜观察并可以对细胞施加方向可变的梯度 FSS 的新型流动腔装置;进而,应用荧光染色技术实时显示胞质中 Ca²⁺浓度分布的动态变化,并检测和分析梯度 FSS 作用下破骨前体细胞胞内 Ca²⁺浓度分布和动态变化参数,同时阻断 PLC、MSCC、ER 等胞内 Ca²⁺信号通路或者去除胞外 Ca²⁺等情况,分析细胞迁移的相关参数,研究胞内 Ca²⁺浓度分布和动态变化参数与细胞迁移参数之间的关系,以明确局部梯度 FSS 是否会对胞内 Ca²⁺浓度梯度特异性分布造成影响,并最终决定细胞迁移的方向。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

所用的破骨前体细胞 RAW264.7 购自广州华拓生物科技有限公司。细胞培养方法如下:冷冻的 RAW264.7 细胞复苏后,添加 5 mL 全培养基(其中 DMEM、胎牛血清 FBS 和双抗 PS 的比例为 DMEM:FBS:PS=89:10:1),将培养瓶放置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中,24 h 后换液。后续根据实验的需要,按照所需的密度把细胞接种至六孔板、培养皿

或者实验玻片上面,接种密度为 2×10^4 个/ cm^2 。

1.2 破骨前体细胞胞内 Ca^{2+} 染色

整个荧光染色操作在避光条件下进行。将接种好的细胞从孵箱中取出置于超净台中,将培养基和 Oregon Green 染料 (Invitrogen 公司,美国) 按照 1:1 000 比例混合,然后在振荡器中振荡 3 min 混匀。将接种有细胞的圆形玻片取出后,去除原有的培养基,加入含有染料的培养基,将其放入孵箱中,用锡箔纸进行避光,37 °C 温度下染色 30 min。染色结束后,把染料吸出,并用 PBS 清洗 3 遍,清除残留的染料,然后加入新鲜的培养基。

1.3 流体作用下胞内 Ca^{2+} 浓度变化

应用激光共聚焦显微镜 (Nikon 公司,日本) 100 倍油镜观察破骨前体细胞的形态和 Ca^{2+} 染色情况。将流动腔装置轻轻平放于共聚焦显微镜载物台上,两端用夹片固定,将物镜镜头正对流室中央位置的下面,静置 20 min。静置结束后,对细胞施加 FSS,其梯度为 0.1 Pa/mm,幅值水平为 0~0.6 Pa。实验记录 20 min,每 3 s 获取 1 张图片。

1.4 细胞迁移参数及 Ca^{2+} 浓度变化的分析

使用 MATLAB R2018a 编写图像处理程序,对共聚焦显微镜下获取的时间序列图片进行识别和分析。首先利用 Sobel 算子检测图片的边缘,通过二值化、膨胀、腐蚀、填充孔洞、去除小面积对象 (非细胞区域) 的操作得到感兴趣的细胞区域。进而得到每个细胞在拍摄时间内的形态参数和迁移参数,以及 Ca^{2+} 信号的荧光强度和其在细胞内的分布情况。通过测量细胞不同区域的平均荧光强度值来分析细胞内 Ca^{2+} 的分布情况。细胞沿迁移方向的前端和后端的平均荧光强度分别表示为 M^f 和 M^r ,而沿流场方向上游和下游的平均荧光强度分别表示为 M^u 和 M^d 。定义两个归一化的荧光强度值 (DCM,表示 Ca^{2+} 分布情况):

$$R_M = (M^r - M^f) / (M^r + M^f)$$

$$R_F = (M^u - M^d) / (M^u + M^d)$$

其中: R_M 代表细胞沿迁移方向的钙分布; R_F 代表细胞沿液体流动方向的钙分布。

1.5 垫片设计和建模

由于垫片尺寸需要和流动腔的顶盖相符,故需要对垫片中间流室的宽度 (w) 和厚度 (h) 进行重新设计。根据之前的经验,流动腔需要真空泵来使流

动腔和玻片紧密结合,故接触的区域必须是一个平面,而且宽度不宜过大,否则会导致装置发生漏液和倒吸的现象。设计尺寸如图 1 所示。

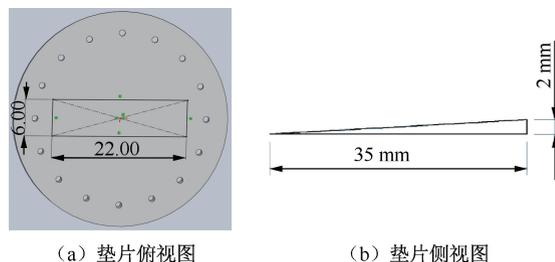


图 1 梯度平板流动腔尺寸设计

Fig. 1 Dimensional design of gradient plate flow chamber

(a) Main view of the gasket, (b) Side view of the gasket

1.6 梯度平板流动腔中壁面 FSS 数值模拟

利用 COMSOL 6.0 软件按照简化的梯度平板流动腔的真实尺寸进行建模。模型的截面为梯形,垫片厚度变化构成了具有梯形截面的流室。整个流动过程为层流、黏性且不可压缩的流动,壁边界条件设置为壁面无滑移,材料选择水 (water liquid),即动力黏度为 1 mPa·s,密度为 $1 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ 。入口处添加静水压力补偿和抑制回流,并对此处模型的网格单元进行细化划分 [见图 2(a)]。其中,流场流动的动量守恒通过纳维-斯托克斯方程描述,假设流体具有黏性且不可压缩,进而进行求解至计算收敛,可模拟该流场下的壁面 FSS。有限元模型结果显示,流室底面具有明显的垂直于流动方向的剪应力梯度 [见图 2(b)]。通过改变出入口的压力差,可改变 FSS 梯度。分析中将 FSS 增加的方向定义为梯度方向 (gradient of FSS)。

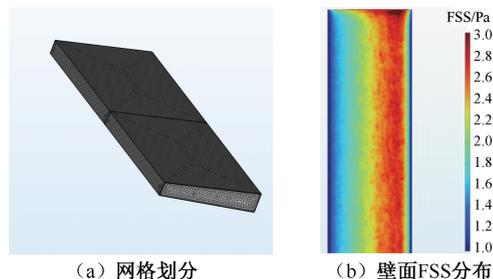


图 2 梯度平板流动腔底面处 FSS 分布的有限元分析

Fig. 2 Finite element analysis of FSS on the bottom of gradient plate flow chamber (a) Mesh division, (b) Distribution of wall FSS

在实验中,通过改变蠕动泵的转速以调节流量,进而可以控制施加在细胞上的 FSS;而在有限元模型中可以通过改变压差来控制。从模型中输出沿宽度方向不同位置的壁面 FSS,改变压差后,可以得到不同出入口压差所对应的壁面 FSS[见图 3(a)]。将得到的数据进行线性拟合,得到 FSS 梯度和出入口压差的关系[见图 3(b)]。结果表明,梯度流动腔装置的壁面 FSS 梯度和其出入口的压力差呈线性关系,随着出入口压差的增大,FSS 梯度也随之增加。同时,该装置具有速度稳定性。

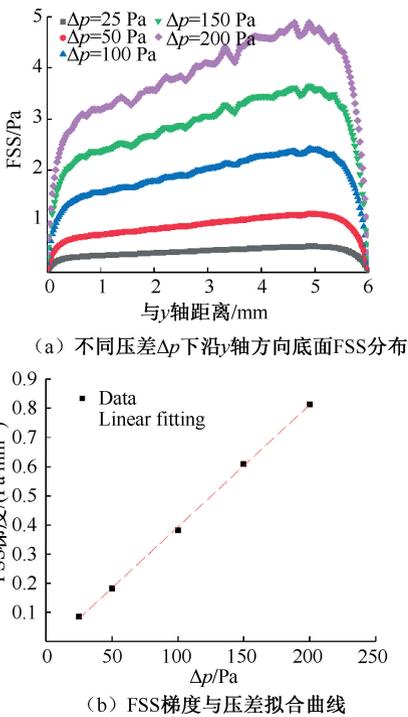


图 3 梯度流动腔底面 FSS 分布及与出入口压差的关系

Fig. 3 Distributions of FSS on the bottom of gradient flow chamber and its relationship with pressure difference
(a) Wall FSS distributions along y axis, (b) Fitting curve for FSS gradient and pressure difference

1.7 实验分组

对照组中不施加抑制剂,即不对细胞进行处理;而抑制组中加入 Ca^{2+} 通道抑制剂(见表 1)。对细胞施加更符合生理环境的振荡流,FSS 梯度为 0.1 Pa/mm 。拍摄时间 20 min ,每 3 s 拍摄 1 张。Oregon green 以 $1:1000$ 稀释比例在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下染色 30 min ,拍摄时激发波长为 488 nm 。

表 1 不同抑制剂的特性

Tab. 1 Properties of different blocking reagents

阻断剂	主要功能	所需浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	孵育时间/ min
U-73122	PLC 信号通路的抑制剂	10	10
GdCl_3	抑制细胞膜上力学敏感阳离子受体通道	10	10
TG	内质网中的 Ca^{2+} ATP 酶抑制剂	1	10
EGTA	提供细胞外无 Ca^{2+} 的环境	4 000	30

注: GdCl_3 为氯化钆;TG(thapsigargin)为毒胡萝卜素。

1.8 数据分析

数据以(平均值 \pm 标准差)表示。使用 Origin 2017 软件和 Excel 2016 软件进行统计学分析,采用单因素方差分析(ANOVA)和多组比较的 t 检验,以确定不同组别之间的差异是否有统计学意义。每组实验至少重复 3 次。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 破骨前体细胞向低 FSS 区域迁移

破骨前体细胞 RAW264.7 在梯度的振荡流体中暴露 20 min (每 4 min 改变 1 次流体方向),通过在激光共聚焦显微镜 100 倍油镜下拍摄的时间序列图像,可以得到细胞的迁移情况。随后,利用程序根据时间序列图像对迁移参数进行分析。当 FSS 梯度为 0.1 Pa/mm 时,在流体刺激 20 min 后,细胞迁移的方向和流体方向夹角的平均角度超过 70° [见图 4(a)]。结果表明,细胞更倾向于逆着 FSS 梯度迁移,即向 FSS 较低的区域发生迁移,说明细胞可以感受到 FSS 梯度的存在。

2.2 胞外钙/PLC/MSCC/ER 信号通路影响破骨前体细胞的迁移

使用 U-73122 和 TG 防止细胞内 ER 中 Ca^{2+} 的流出,使用 GdCl_3 和 EGTA 阻断细胞外的 Ca^{2+} 进入细胞。结果表明,与对照组相比,通过化学方法阻断 PLC、MSCC、ER 和清除细胞外钙后,细胞沿低 FSS 方向的速度显著降低,但是沿液体流动方向的迁移速度显著增强[见图 4(b)、(c)]。另外,加入 4 种抑制剂后,细胞迁移的角度也明显减小。本文认为,细胞向低 FSS 区域迁移的现象很有可能受 Ca^{2+} 信号通路的调控。

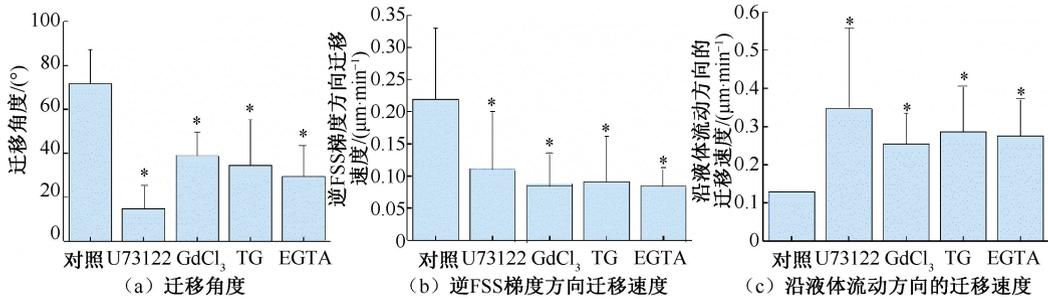


图4 梯度流体剪应力和抑制剂对破骨前体细胞 RAW264.7 迁移的影响

Fig. 4 Effects of gradient FSS and blocking reagents on migration of RAW264.7 cells (a) Migration angle, (b) Migration speed against FSS gradient, (c) Migration speed along the flow direction

注: * $P < 0.05$ 。

2.3 梯度的振荡流调节胞内钙分布

破骨前体细胞 RAW264.7 暴露在梯度的振荡流 20 min 后,细胞沿液体流动方向的分布显著低于其沿迁移方向的分布(见图 5)。该结果说明,每 4 min 改变 1 次方向的梯度振荡流调节胞内的 Ca^{2+} 分布沿细胞迁移方向(即流体剪应力低的区域),而不是沿液体的流动方向。在每次改变流体方向时,细胞沿液体流动方向的分布均有上升的趋势[见图 6(a)],而细胞沿迁移方向的分布则没有此现象。在 16 min 后,两者均未发生明显的变化,说明细胞逐渐失去了对流体刺激响应调节胞内 Ca^{2+} 分布的能力。

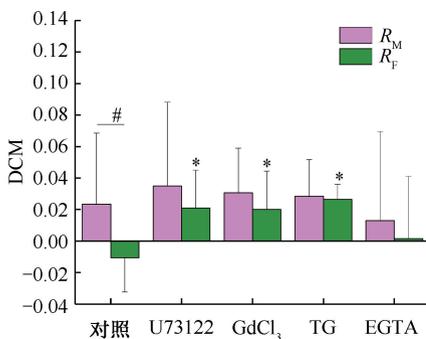


图5 梯度振荡流或抑制剂作用对破骨前体细胞 RAW264.7 内钙离子分布的影响

Fig. 5 Effects of gradient FSS and blocking reagents on DCM of RAW264.7 cells

注: R_F 为细胞沿液体流动方向的分布, R_M 为细胞沿迁移方向的分布; DCM 为钙离子的分布情况; * $P < 0.05$, # $P < 0.05$ 。

2.4 胞外钙/PLC/MSCC/ER 信号通路调节梯度振荡流下细胞内的钙分布

与未处理组相比,破骨前体细胞在 20 min 梯度

振荡流刺激下,除了 EGTA 组,当 PLC、MSCC、ER 钙信号通路被阻断后,细胞沿液体流动方向的 Ca^{2+} 分布 R_F 显著升高(见图 5)。这一现象与上述抑制组细胞沿液体流动方向的迁移速度增大相符。然而加入抑制剂后,细胞沿迁移方向的分布并未发现有显著的差异。而且,抑制组胞内钙的分布并不受液体流动方向的影响。与未处理组相比,抑制组细胞沿迁移方向的分布和沿液体流动方向的分布差异无统计学意义;反而,在很多时间内两个值非常接近甚至重合[见图 6(b)~(e)]。

综上所述,本文推测,由于微损伤附近具有明显的 FSS 梯度,其内部是 FSS 较低的区域。因此,破骨前体细胞感受到微损伤附近的 FSS 梯度,并导致细胞内 Ca^{2+} 沿迁移方向的特异性分布,最终导致破骨前体细胞向低 FSS 区域迁移,并在微损伤区域完成骨吸收的功能。

3 讨论与结论

本课题组前期通过有限元方法数值模拟骨小梁中微损伤附近的流场后发现,在微损伤部位存在明显的梯度 FSS,微损伤内部的 FSS 远低于外侧^[18]。因此,有理由推测破骨前体细胞感受到了微损伤附近的 FSS 梯度并向微损伤内部迁移,并聚集在微损伤内侧,融合分化成熟的破骨细胞以启动骨吸收。因此,本文首先对流动腔中的垫片进行改造,使其可以对细胞施加方向可变的梯度 FSS,并对其中的流室进行有限元数值模拟。

Ca^{2+} 信号来源于内部存储或外部介质^[19-20]。在外部介质情况下,不同的质膜通道控制 Ca^{2+} 从外部

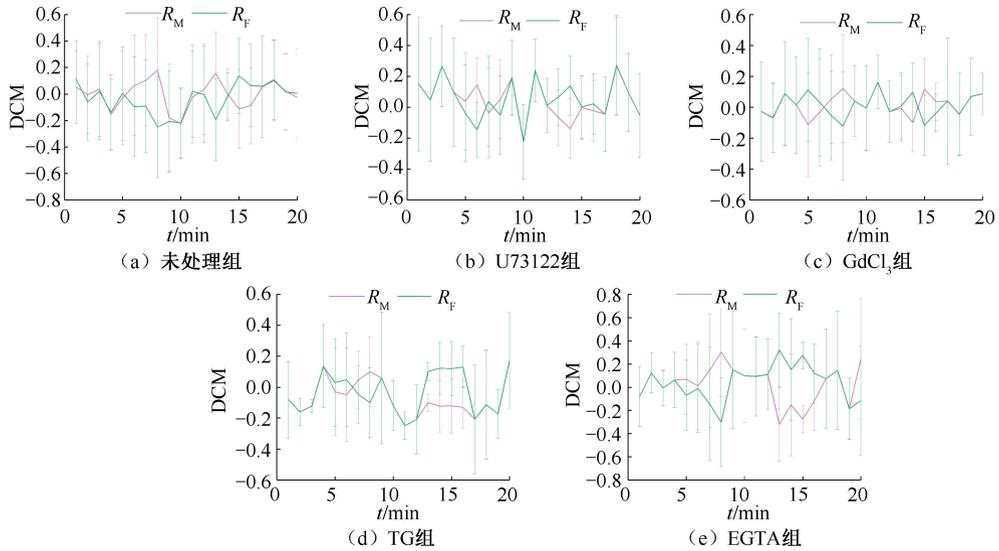


图6 梯度振荡流对不同处理条件下破骨前体细胞 RAW264.7 沿迁移方向和流场方向的影响

Fig. 6 Effects of gradient FSS on RAW264.7 cells along migration and flow directions under different blocking treatments (a) Control group, (b) U73122 group, (c) $GdCl_3$ group, (d) TG group, (e) EGTA group

介质的进入,另一个 Ca^{2+} 信号传导的主要来源是位于内质网/肌质网中的内部储存,其中 $Ins(1,4,5)P_3Rs$ 或兰尼碱受体(ryanodine receptors, RYRs)调节 Ca^{2+} 的释放。本文所使用的 U-73122 和 Thapsigargin 抑制了第 1 种 Ca^{2+} 信号来源,而 $GdCl_3$ 和 EGTA 则对第 2 种 Ca^{2+} 信号来源进行了阻断。而细胞迁移是一个依赖于 Ca^{2+} 的过程^[21-22]。因为迁移机制包括很多 Ca^{2+} 敏感效应分子,例如肌球蛋白 II、钙蛋白酶以及一些离子通道和转运蛋白。本文发现,使用 4 种抑制剂后,对细胞的迁移以及其调整胞内钙分布的能力均有影响,说明这些 Ca^{2+} 信号通路是流体刺激其迁移的主要调控通路。

针对 FSS 作用下成骨细胞中的钙响应现象及机制,大量研究已经开展^[23-24]。由于力学作用下成骨细胞的迁移能力较弱,目前有关力致钙响应与成骨细胞迁移关联性的研究鲜有报道。破骨细胞的迁移能力较强,且其迁移行为与骨吸收功能有关,因此,阐明骨内液体流动作用下破骨细胞的迁移机制非常重要。本课题组已经开展了一系列的工作,包括 FSS 作用下破骨细胞的钙响应^[12]、力学刺激和细胞迁移的关系^[9],以及胞内钙分布和细胞迁移的关系^[17]。本文进一步研究了有梯度、振荡 FSS 作用下破骨细胞迁移、胞内钙响应、力学刺激之间的联系。

振荡流刺激与跑步以及步行等人体运动有关,故选择让细胞暴露在振荡流的环境下。分析显示,在梯度的振荡流刺激下,细胞更倾向于逆着 FSS 梯度迁移,即低 FSS 区域迁移,该结果与课题组前期 Gao 等^[16]的实验结果相符。当通过化学方法阻断 PLC、MSCC、ER 和清除细胞外钙后,细胞沿低 FSS 方向的速度显著降低,但是沿液体流动方向的迁移速度显著增强,细胞迁移与液体流动方向之间的夹角也变小。破骨前体细胞沿液体流动方向的钙分布显著低于其沿迁移方向的钙分布,加入 4 种抑制剂后,细胞沿液体流动方向的 Ca^{2+} 分布显著升高。本文在 Wang 等^[17]均匀流场钙分布研究的基础上,探究梯度流场下胞内钙的分布,进一步阐明了动态外力作用下骨组织重建的细胞和分子机制。

由于细胞在体内所处的生理环境十分复杂,在未来的研究中,可以改变振荡流的 FSS 梯度以及频率,设置更多可变的实验参数,来探究其对细胞迁移参数和 Ca^{2+} 分布的影响,得到更多流体刺激下破骨前体细胞相关响应的数据。除了力学刺激以外,细胞在体内的生理活动还会受到其他化学等因素的影响,且力学刺激的形式也不止 FSS 一种,如何能使细胞处于更复杂且可控的外力环境中,并且能准确测量出细胞的行为参数还是研究的一个难点。因此,未来需要从多方面来探索影响细胞迁移的机制。

本文同时考虑梯度 FSS 和胞内钙分布两个因素,结果表明,破骨前体细胞可以感知到 FSS 梯度,并调节胞内的 Ca^{2+} 沿迁移方向(低 FSS 区)的梯度分布,进而决定细胞迁移的方向,进一步明确了梯度 FSS 场下破骨前体细胞迁移与胞内 Ca^{2+} 分布的关系。研究结果可为最终阐明动态外力作用下骨组织重建的细胞和分子机制提供重要的基础数据。

利益冲突声明:无。

作者贡献声明:霍波和张竞之负责整个研究的规划以及论文撰写;张竞之负责实验实施和数据分析;杨爱玲、高颜和王淑容负责实验前期的准备工作以及实验装置的构建,并协助实验和数据分析。

参考文献:

- [1] WOLFF J. The law of bone remodeling [M]. Berlin: Hirschwild, 1892.
- [2] ROUX W. A discussion of the mechanisms of biological evolution [M]. Leipzig: Wilhelm Engelmann, 1895.
- [3] 张生亮. 骨关节炎时软骨下骨力学特性变化的数值分析 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2018.
- [4] WEIVODA MM, BRADLEY EW. Macrophages and bone remodeling [J]. *J Bone Miner Res*, 2023, 38(3): 359-369.
- [5] RAMCHAND SK, SEEMAN E. Reduced bone modeling and unbalanced bone remodeling: Targets for antiresorptive and anabolic therapy [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2020(262): 423-450.
- [6] WEIVODA MM, CHEW CK, MONROE DG, *et al.* Identification of osteoclast-osteoblast coupling factors in humans reveals links between bone and energy metabolism [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 87.
- [7] HERMAN BC, CARDOSO L, MAJESKA RJ, *et al.* Activation of bone remodeling after fatigue: Differential response to linear microcracks and diffuse damage [J]. *Bone*, 2010, 47(4): 766-772.
- [8] 霍波, 康英永, 胡漫, 等. 成骨细胞力致钙响应和钙传递的研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2011, 26(4): 382-388.
- [9] HUO B, KANG YY, HU M, *et al.* Advances of mechanical stimulation induced calcium response and transfer in osteoblasts [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(4): 382-388.
- [10] LIU CL, LI SN, JI BH, *et al.* Flow-induced migration of osteoclasts and regulations of calcium signaling pathways [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2015, 8(1): 213-223.
- [11] WANG SR, LI SN, HU M, *et al.* Calcium response in bone cells at different osteogenic stages under unidirectional or oscillatory flow [J]. *Biomicrofluidics*, 2019, 13(6): 1-13.
- [12] WEI C, WANG X, CHEN M, *et al.* Calcium flickers steer cell migration [J]. *Nature*, 2009, 457(7231): 901-905.
- [13] AN S. The emerging role of extracellular Ca^{2+} in osteo/odontogenic differentiation and the involvement of intracellular Ca^{2+} signaling: From osteoblastic cells to dental pulp cells and odontoblasts [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2169-2193.
- [14] LI P, LIU CL, MAN H, *et al.* Fluid flow-induced calcium response in osteoclasts: Signaling pathways [J]. *Ann Biomed Eng*, 2014(42): 1250-1260.
- [15] GAO Y, LI T, SUN Q, *et al.* Gradient fluid shear stress regulates migration of osteoclast precursors [J]. *Cell Adhes Migr*, 2019, 13(1): 183-191.
- [16] WANG SR, SUN Q, ZHAO Y, *et al.* Distribution of intracellular calcium during flow-induced migration of RAW264.7 cells [J]. *Mechanobiol Med*, 2024, 1(2): 100012.
- [17] 高颜. 梯度流体剪应力场对破骨前体细胞迁移和融合的影响及机制 [D]. 北京: 北京理工大学, 2019.
- [18] BERRIDGE MJ, BOOTMAN MD, RODERICK HL. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodeling [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2003, 4(7): 517-529.
- [19] CLAPHAM DE. Calcium signaling [J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1047-1058.
- [20] LAI YS, CHANG YH, CHEN YY, *et al.* Ca^{2+} -regulated cell migration revealed by optogenetically engineered Ca^{2+} oscillations [J]. *Cell Physiol*, 2021, 236(6): 4681-4693.
- [21] NAFFA R, HEGEDÜSL, HEGEDÜST, *et al.* Plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 4 function in cell migration and cancer metastasis [J]. *J Physiol*, 2024, 602(8): 1551-1564.
- [22] LIU D, GENETOS DC, SHAO Y, *et al.* Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca^{2+} - and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts [J]. *Bone*, 2008, 42(4): 644-652.
- [23] LU XL, HUO B, CHIANG V, *et al.* Osteocytic network is more responsive in calcium signaling than osteoblastic network under fluid flow [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(3): 563-574.