

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00565

国外模拟失重条件下成骨细胞的细胞学研究进展

王 冰,曹新生,张 舒*

第四军医大学航空航天生物动力学教研室,航空航天医学国家教育部重点实验室,西安 710032

[摘要] 成骨细胞是骨组织中最重要力学感受细胞和成骨效应细胞。失重环境中骨丢失的主要原因是成骨细胞功能的下降。近年来有关模拟失重条件下成骨细胞的细胞学研究有较大的进展,在成骨细胞的增殖、分化、凋亡、细胞功能及信号转导的变化等方面取得了一系列成果,本文就这些方面的重要研究内容作简要综述。

[关键词] 模拟失重;成骨细胞;细胞学

[中图分类号] R 854 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0565-04

Osteoblast cytology study in simulated weightless condition: a review

WANG Bing, CAO Xin-sheng, ZHANG Shu*

Department of Aerospace Biodynamics, Key Laboratory of Aerospace Medicine of National Education Ministry, The Fourth Military Medical University, Shaanxi 710032, China

[ABSTRACT] Osteoblasts are the most important mechanoreceptive and osteogenic cells. The loss of bone in microgravity is mainly due to the dysfunction of osteoblasts. Research on osteoblast cytology under simulated weightlessness has made great progress in recent years. Current experiments are focusing on the changes in the cellular proliferation, differentiation, apoptosis, function and signal transduction in osteoblasts. This paper reviews the progress of the studies in this field.

[KEY WORDS] weightlessness simulation; osteoblast; cytology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 565-568]

随着航天事业的飞速发展,人类探索太空的步伐越来越快,而航天员在失重环境中长期停留引发的医学问题愈显突出,其中骨质丢失是相关研究热点之一。成骨细胞是骨组织中最重要力学感受细胞和成骨效应细胞,已有的实验结果^[1-2]提示失重性骨质丢失的主要原因是成骨细胞功能的下降。由于空间搭载进行细胞学实验的机会较少,因此目前更多的是利用地面模拟失重条件下培养的细胞进行研究。近年来国外学者在模拟失重条件下成骨细胞的细胞学研究上有了较大的进展,在成骨细胞的增殖、分化、凋亡、细胞功能及信号转导的变化等方面取得了一系列成果。本文简要介绍常用的模拟失重条件下培养成骨细胞的方法,从细胞生物学的角度综述国外近年来在此领域的重要研究成果。

1 模拟失重条件下进行细胞学研究的方法

细胞学研究采用的模拟失重方法主要有两种。第一种是将大鼠进行尾部悬吊模拟失重,失重期满获取细胞,进行传代培养。如 Basso 等^[3]取尾部悬吊大鼠的股骨近端,在超净工作台中剪碎,将碎片组织置于培养瓶内培养,待 13 d 后

用胶原酶和胰酶消化贴壁生长的组织块,将获得的细胞离心收集并重悬于培养液,再次接种于培养瓶中,用第一代传代细胞进行实验。第二种也是应用更多的方法是将细胞直接培养在模拟失重容器中。模拟失重的原理在于将细胞种植在固相支持物上,通过支持物的回转使细胞感受随机的重力矢量(即时间平均化的重力矢量)^[4-5]。由于重力矢量方向不停地改变,细胞总是来不及感受到重力,因此可认为与失重的效应是相似的^[6]。已经有相当数量的实验对各种类型的成骨细胞进行了模拟失重研究,所采用的仪器包括三维回转器和 rotating wall vessel (RWV) 系统。三维(3D)回转器又称为随机位置发生器(RPM),通过控制两个轴的旋转,可以产生多种方向的重力,使回转器中心的重力矢量累计为零,从而模拟失重效应^[7-8]。RWV 系统最为常用的是美国 Johnson 空间研究中心研制的旋转式细胞培养系统(rotary cell culture system, RCCS)。先将实验用细胞培养在特定的支持材料上,然后将细胞转移入 RCCS 的细胞培养容器中,根据容器半径的不同,调节容器的转速使其内培养的细胞相对于容器静止,即达到模拟失重的条件。

[收稿日期] 2007-09-13 **[接受日期]** 2007-12-27

[基金项目] 国家自然科学基金(30300398, 30570456, 30600132, 30700141), Supported by National Natural Science Foundation of China (30300398, 30570456, 30600132, 30700141).

[作者简介] 王 冰,副教授, E-mail: bingwang@fmmu.edu.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 029-84774801, E-mail: shuzhang@fmmu.edu.cn

2 模拟失重条件下成骨细胞细胞学研究进展

2.1 模拟失重抑制骨髓间质干细胞的增殖与分化 模拟失重条件下骨髓间质干细胞(BMSC)增殖受抑制,并且向成骨细胞转化的能力减弱。如后肢脱负荷模拟失重 14 d 的大鼠,其股骨骨髓中骨源细胞的数量下降,成骨细胞克隆的体积也比对照组小,提示成骨细胞克隆的增殖能力下降^[9]。大鼠 BMSC 在回转器上培养后增殖受到抑制,细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、表皮生长因子(EGF)及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在正常重力环境下可显著刺激大鼠 BMSC 的增殖,而模拟失重下仅有微弱的刺激作用,Akt、ERK1/2 的磷酸化水平以及 cbf α 1 的表达下降。微阵列技术和基因分析也证实了大鼠 BMSC 的增殖和成骨能力下降^[10]。模拟失重 7 d 条件下培养的人 BMSC,检测不到成骨特异性标志物,如碱性磷酸酶(ALP)、I 型胶原以及 runt 相关转录因子 2(*Runx2*)基因的表达,也未见骨组织的形成^[11]。Nishikawa 等^[7]还发现大鼠 BMSC 在 3D 回转器上培养 2 周,ALP 活性比对照组下降了 40%,细胞外基质的生成量减少,而且将这种 BMSC 移植到同系大鼠的皮下位点一段时间后,新生成骨组织的量显著低于对照组,提示回转器抑制 BMSC 向成骨细胞的分化,从而抑制了新骨的形成。

模拟失重使 BMSC 向成骨细胞转化减弱的同时,向脂肪细胞转化的趋势增强。如人源 BMSC 在 RCCS 培养系统中培养 3 h 即可见到 F-肌动蛋白应力纤维的破坏,培养 7 d 的细胞比正常重力下生长的细胞要圆得多,而且应力纤维完全消失,占优势的是球状的 G-肌动蛋白,并且细胞内脂肪含量增加了 310%;模拟失重 7 d 显著降低了小 GTP 酶家族 Rho 中成员 RhoA 的活性和 cofilin 的磷酸化(分别降低了 88%和 77%),而应用 RhoA 的组成性活性腺病毒载体后,应力纤维的消失被逆转,且成骨特异性基因如 I 型胶原、ALP 和 *Runx2* 的表达显著增加,脂肪细胞相关基因如 *leptin* 和葡萄糖转运酶 4 的表达受到抑制,提示模拟失重时 RhoA 活性的抑制可能是人 BMSC 的成骨功能下降和脂肪形成增加的主要机制^[12]。Saxena 等^[13]也发现 RCCS 模拟失重抑制了人 BMSC 向成骨细胞转化,增加了其向脂肪细胞的转化,在这一转化中伴随着 RhoA 活性及 cofilin 磷酸化的下降,F-肌动蛋白应力纤维的破坏和整合素通过 FAK 转导信号的减弱,并且发现模拟失重还刺激了 BMSC 向破骨细胞的转化。

2.2 模拟失重诱导成骨细胞凋亡的研究 将 ROS 17/2.8 细胞在回转器上培养 24 h,即有 35%的细胞脱离了培养瓶壁,贴壁细胞数量显著低于对照组,而且 19.8%的贴壁细胞和所有的脱离细胞是锥虫蓝染色阳性。脱离细胞发生了凋亡,而且细胞表面整合素 β 1 向核周边聚集,肌动蛋白细胞骨架也被破坏,提示回转器模拟微重力可通过改变细胞的骨架结构导致细胞的凋亡^[14]。大鼠成骨细胞系 ROS. SMER # 14 在 RWV 中培养后,增殖能力下降,且出现了凋亡的 DNA 核小体碎片,但未见凋亡相关的 p53、bcl-2/bax 和 caspase 8 等通路的激活^[15]。Bucaro 等^[16]在 RCCS 中培养小鼠 MC3T3-E1 成骨样细胞,发现其骨钙素(OC)、ALP、I 型胶原和 *Runx2* 的表达水平均下降,并且对致凋亡因子更加敏感。而

且抗凋亡蛋白 bcl-2 和调节线粒体功能的 Akt 蛋白的表达水平也下降,提示细胞暴露于微重力会引发凋亡事件。Nakamura 等^[17]在向量平均化重力条件下培养的人成骨细胞中也得到了类似的结果。Bax(促使细胞色素 C 从线粒体中释放的激发因子)与 bcl-2(抑制细胞色素 C 释放)的 mRNA 水平的比值显著高于 1 g 状态。然而 XIAP(抗凋亡分子)的 mRNA 水平也显著增加,提示模拟失重对促凋亡和抗凋亡分子均有调制作用。而 Bucaro 等^[18]在近期的实验中,将成骨细胞封入两种藻酸盐载体胶囊中,移入同一旋转式培养系统,实现了将细胞在模拟失重和正常重力下同步培养的环境,培养 14 d 后发现 C3H10T-1/2 干细胞、MC3T3-E1 成骨样细胞及 MLO-A5 骨样细胞对凋亡诱导因子十字孢碱和硝普钠的敏感性均未改变,RT-PCR 分析表明 MC3T3-E1 细胞表达 *Runx2*、OC 和 I 型胶原均不变,仅有 ALP 表达的下降,提示模拟失重不会直接导致成骨细胞的凋亡。

2.3 模拟失重对成骨细胞功能及相关信号转导通路的影响

I 型胶原是骨的细胞外基质中含量最丰富的蛋白质。回转器模拟失重培养的小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞中,胶原蛋白交联过程中所需酶的表达发生了下调,影响了胶原的翻译后修饰过程,从而导致成骨功能的下降^[19]。大鼠 BMSC 在 3D 回转器中培养 2 周后,ALP 活性下降了 40%,虽然未发现细胞数量和分布与对照组的差异,但是细胞外基质的形成减少了^[7]。HuO9 细胞系在水平回转器上培养,ALP 活性和 OC 产生是显著降低的,培养液中加入 1,25-(OH)₂-D₃后 ALP 活性增加,但仍然低于 1 g 对照组^[20]。正常人成骨细胞在回转器上培养,第 1 日即发现 OC、ALP、cbf α 1、VDR、RANKL 和 OPG 的 mRNA 水平分别下降为对照组的 21%、65%、62%、52%、43%和 54%,ALP 活性下降为对照的 75%,第 2 日 OC 和 RANKL 的 mRNA 水平下降为 77%和 61%^[21]。2T3 前成骨细胞在 RPM 上培养 9 d 后,ALP 活性显著受到抑制,ALP、*Runx2*、骨调素和甲状旁腺素受体 1 的 mRNA 表达都下调,而组织蛋白酶 K 的 mRNA 表达上调,骨形态发生蛋白-4(BMP-4)和 cystatin C 蛋白水平不变^[22]。也有相反的实验结果,如大鼠成骨细胞系在 RWV 中培养后,可检测到很高水平的 ALP 基因表达和活性,且骨桥蛋白、OC 和 BMP-4 表达都增加,而骨连接素、骨涎蛋白 II 和 BMP-2 表达未改变。还发现 IL-6 mRNA 表达增加,IL-6 在体外可刺激破骨细胞的形成和吸收活性^[15]。模拟失重 7 d 后 I 型胶原表达显著减少,与胶原联接的整合素通过 FAK、Ras 和 ERK 的信号转导显著下降。FAK 可以将信号转导给 ERK,并激活 *Runx2*,从而在成骨细胞的分化中发挥作用,因此整合素信号转导功能的下降可能导致了成骨细胞生成的减少^[23]。

对于模拟失重后成骨细胞中 MAPK 信号通路变化的研究,实验结果不尽相同。如培养在 3D 回转器中的人成骨细胞比 1 g 对照细胞更大更圆,培养了 10 d 才出现 ALP 活性(对照组出现在第 7 日),未见骨结节和钙化的出现(对照出现在第 12 日和第 20 日),cbf α 1 和 OC 表达下降,p38 MAPK 的磷酸化受到抑制,而 ERK 和 JNK 的磷酸化未见改变,提示 3D 回转器培养对成骨细胞分化的抑制主要是由于抑制了 p38 MAPK 的磷酸化^[8]。而人 BMSC 在模拟微重力作用后,

向成骨细胞分化的功能减弱,成骨细胞标志物 Runx2 的表达下降,PPAR γ 2 表达增加。模拟微重力使 ERK 磷酸化降低,而 p38 MAPK 磷酸化是增加的。联合应用 BMP(可增加 Runx2 的表达)、FGF2(增加 ERK 磷酸化但不增加成骨因子的表达)和 SB203580(p38 MAPK 的特异抑制剂)的实验结果,提示通过调节不同的信号通路可以显著逆转模拟微重力对人 BMSC 向成骨细胞分化的抑制作用^[24]。

人成骨细胞 HOS-TE85 在回转器上培养 72 h,然后在地面 1 g 条件下加入 TNF- α 处理 30 min,发现 TNF- α 依赖的 NF-kappa B 的激活显著下降,且 NF-kappa B 依赖的转录激活也减弱,TNF- α 依赖的内源性 NF-kappa B 反应基因 p105、I kappa B- α 和 IL-8 的诱导激活也显著减弱了,结果提示向量平均化的重力可抑制 NF-kappa B 的激活从而抑制成骨细胞对 TNF- α 的反应^[25]。ROS17/2.8 细胞在回转器模拟失重后,Egr-1、NF-kappa B 和 AP-1 家族成员都被诱导发生了基因表达和核内转位(除 fosB mRNA 外),抑制 ERK1/2、p38 MAPK 和 src 激酶的活性后几乎 AP-1 所有成员的核转位都被抑制(除 Fra-1 和 JunB 外),提示 MAPK 和 src 激酶途径参与了这一动力学过程^[26-27]。

模拟失重后成骨细胞分化和骨形成的关键调节因子 Runx2 的水平 and AP-1 的转录激活显著下降,而且维生素 D 受体、RANKL 及 OPG 的 mRNA 都显著下降^[28-29]。原代培养的小鼠成骨细胞在 RWV 中模拟失重 24 h 后,其培养基可促进小鼠 BMSC 向破骨细胞的转化和骨吸收活性,并且其 RANKL/OPG 比值高于 1 g 对照组,加入高浓度的 OPG 后可以抑制这种转化,提示模拟失重可以通过调控成骨细胞分泌关键性的因子,如 RANKL 和 OPG,而间接地激活破骨细胞的形成和活性^[30]。在向量平均化重力条件下培养的 BMSC,其 RANKL 的 mRNA 表达增加,而 OPG 表达水平降低,这种调节方式可能是失重引起骨质稀少的原因之一^[31]。目前研究者认为 OPG 是一种很有潜力的药物,可以用来治疗骨质疏松症、代谢性骨肿瘤引起的骨丢失以及长期暴露于微重力环境导致的骨丢失。

2.4 模拟失重对成骨细胞作用的基因组学和蛋白质组学研究 为了阐明失重诱导骨丢失的机制,近几年来学者们不再停留于对个别因子的研究上,而是采用了基因组学和蛋白质组学的研究方法,系统地观察模拟失重后成骨细胞中基因谱和蛋白谱的变化,得到了一些有意义的结果。

如 Patel 等^[32]将 2T3 前成骨细胞在 RWV 上培养 3 d 后,采用 cDNA 微阵列技术发现 61 个基因表达上调和 45 个基因下调,且变化幅度是 1 g 对照的 2 倍以上,其中 7 个基因和蛋白,包括骨调素、Runx2 和 osteoglycin 的变化得到了实时 PCR 和 Western 印迹实验结果的证实。通过比较 RWV 和 RPM 模拟失重后的结果,发现有 14 个机械应力敏感基因的变化是一致的,其中有 3 个基因的表达是被模拟失重下调而被机械应力刺激上调的。Pardo 等^[22]也发现了类似的结果,他们应用微阵列研究证实模拟微重力条件下培养的 2T3 前成骨细胞中,Runx2 功能下调(其所调节的 OC 表达也下降),骨调素(与骨基质合成有关)和甲状腺素受体 1(促进 Ca²⁺ 从骨中释放)也发生下调。骨溶解因子例如组织

蛋白酶 K 发生上调。组织蛋白酶 K 主要在破骨细胞中表达,它在成骨细胞中的病理含义尚不清楚,提示其可能直接激活破骨细胞或通过一些未知的成骨细胞依赖的机制而引起骨丢失^[22]。

Nichols 等^[33]采用液相色谱分析和微分二维凝胶电泳技术相结合的比较蛋白质组学方法,发现了 RWV 模拟失重培养的人成骨细胞中很多蛋白发生了表达上调或下调。如与成骨细胞分化和骨形成相关的蛋白(Osx,PAP)、与细胞间黏附相关的联蛋白(catenin)发生了下调,与凋亡(TGF- β 诱导的早期生长应答因子 2,即 TIEG2)、应激(HSP70)和细胞生长/重塑(鸟氨酸脱羧酶抗酶)相关的蛋白发生了上调。模拟失重下钙依赖磷酸酶 calcineurin(由细胞内 Ca²⁺ 的持续增加而激活)和白蛋白均上调。Osx 主要调节成骨细胞分化的后期过程,是骨形成所必需的。细胞 PAP 在体外可直接增强骨细胞的分化(非增殖)特征,即合成胶原和 ALP。这些结果提示模拟失重下成骨细胞分化途径是受损的。细胞黏附蛋白如联蛋白的下调可能会弱化细胞间的联接,影响细胞间的信号转导和组织稳定。已经发现仓鼠上皮细胞中 TIEG2 的过度表达会诱发凋亡,而 HSP70 可以防止环境应激引起的细胞损伤。白蛋白表达的上调,可以抑制 MC3T3-E1 细胞的分化而促进其增殖,进一步提示模拟失重下成骨细胞的分化受阻^[33]。

3 展望

由于空间搭载进行细胞学实验的机会相对较少,而且成本很高,因此地面模拟失重研究就成为对真实失重研究的重要补充。综上所述,在模拟失重条件下成骨前体细胞的增殖和分化受到了抑制,且失重诱导了成骨细胞的凋亡,使得有成骨功能的细胞数量下降,从而骨形成减少,并且多个信号通路参与了这一过程。这些结果与太空失重条件下获得的实验数据基本一致,进一步证实了模拟失重研究的必要性。

目前关于失重性骨质丢失机制的结论尚不一致,同时对于骨丢失的对抗药物和防护措施的研究还尚显不足,这些方面还需要做大量的进一步的实验工作。

[参考文献]

- [1] Collet P, Uebelhart D, Vico L, Moro L, Hartmann D, Roth M, et al. Effects of 1- and 6-month spaceflight on bone mass and biochemistry in two humans[J]. Bone, 1997, 20: 547-551.
- [2] Caillot-Augusseau A, Vico L, Heer M, Voroviev D, Souberbielle J C, Zitterman A, et al. Space flight is associated with rapid decreases of undercarboxylated osteocalcin and increases of markers of bone resorption without changes in their circadian variation: observations in two cosmonauts[J]. Clin Chem, 2000, 46 (8 Pt 1): 1136-1143.
- [3] Basso N, Jia Y, Bellows C G, Heersche J N. The effect of reloading on bone volume, osteoblast number, and osteoprogenitor characteristics: studies in hind limb unloaded rats[J]. Bone, 2005, 37: 370-378.
- [4] Hammond T G, Hammond J M. Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001,

- 281;F12-F25.
- [5] Unsworth B R, Lelkes P I. Growing tissues in microgravity[J]. *Nat Med*, 1998, 4: 901-907.
- [6] Hejniewicz Z, Sondag C, Alt W, Sievers A. Temporal course of graviperception in intermittently stimulated cress roots[J]. *Plant Cell Environ*, 1998, 21: 1293-1300.
- [7] Nishikawa M, Ohgushi H, Tamai N, Osuga K, Uemura M, Yoshikawa H, et al. The effect of simulated microgravity by three-dimensional clinostat on bone tissue engineering[J]. *Cell Transplant*, 2005, 14: 829-835.
- [8] Yuge L, Hide I, Kumagai T, Kumei Y, Takeda S, Kanno M, et al. Cell differentiation and p38^{MAPK} cascade are inhibited in human osteoblasts cultured in a three-dimensional clinostat[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003, 39(1-2): 89-97.
- [9] Basso N, Bellows C G, Heersche J N. Effect of simulated weightlessness on osteoprogenitor cell number and proliferation in young and adult rats[J]. *Bone*, 2005, 36: 173-183.
- [10] Dai Z Q, Wang R, Ling S K, Wan Y M, Li Y H. Simulated microgravity inhibits the proliferation and osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Cell Prolif*, 2007, 40: 671-684.
- [11] Zayzafoon M, Gathings W E, McDonald J M. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis[J]. *Endocrinology*, 2004, 145: 2421-2432.
- [12] Meyers V E, Zayzafoon M, Douglas J T, McDonald J M. RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity[J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20: 1858-1866.
- [13] Saxena R, Pan G, McDonald J M. Osteoblast and osteoclast differentiation in modeled microgravity[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1116: 494-498.
- [14] Sarkar D, Nagaya T, Koga K, Nomura Y, Gruener R, Seo H. Culture in vector-averaged gravity under clinostat rotation results in apoptosis of osteoblastic ROS 17/2. 8 cells[J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 489-498.
- [15] Rucci N, Migliaccio S, Zani BM, Taranta A, Teti A. Characterization of the osteoblast-like cell phenotype under microgravity conditions in the NASA-approved Rotating Wall Vessel bioreactor (RWV)[J]. *J Cell Biochem*, 2002, 85: 167-179.
- [16] Bucaro M A, Fertala J, Adams C S, Steinbeck M, Ayyaswamy P, Mukundakrishnan K, et al. Bone cell survival in microgravity: evidence that modeled microgravity increases osteoblast sensitivity to apoptogens[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1027: 64-73.
- [17] Nakamura H, Kumei Y, Morita S, Shimokawa H, Ohya K, Shinomiya K. Antagonism between apoptotic (Bax/Bcl-2) and anti-apoptotic (IAP) signals in human osteoblastic cells under vector-averaged gravity condition[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1010: 143-147.
- [18] Bucaro M A, Zahm A M, Risbud M V, Ayyaswamy P S, Mukundakrishnan K, Steinbeck M J, et al. The effect of simulated microgravity on osteoblasts is independent of the induction of apoptosis[J]. *J Cell Biochem*, 2007, 102: 483-495.
- [19] Saito M, Soshi S, Fujii K. Effect of hyper- and microgravity on collagen post-translational controls of MC3T3-E1 osteoblasts[J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18: 1695-1705.
- [20] Kunisada T, Kawai A, Inoue H, Namba M. Effects of simulated microgravity on human osteoblast-like cells in culture[J]. *Acta Med Okayama*, 1997, 51: 135-140.
- [21] Nakamura H, Kumei Y, Morita S, Shimokawa H, Ohya K, Shinomiya K. Suppression of osteoblastic phenotypes and modulation of pro- and anti-apoptotic features in normal human osteoblastic cells under a vector-averaged gravity condition[J]. *J Med Dent Sci*, 2003, 50: 167-176.
- [22] Pardo S J, Patel M J, Sykes M C, Platt M O, Boyd N L, Sorescu G P, et al. Simulated microgravity using the Random Positioning Machine inhibits differentiation and alters gene expression profiles of 2T3 preosteoblasts[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288: C1211-C1221.
- [23] Meyers V E, Zayzafoon M, Gonda S R, Gathings W E, McDonald J M. Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2004, 93: 697-707.
- [24] Zheng Q, Huang G, Yang J, Xu Y, Guo C, Xi Y, et al. Could the effect of modeled microgravity on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells be reversed by regulation of signaling pathways[J]? *Biol Chem*, 2007, 388: 755-763.
- [25] Kobayashi K, Kambe F, Kurokouchi K, Sakai T, Ishiguro N, Iwata H, et al. TNF-alpha-dependent activation of NF-kappa B in human osteoblastic HOS-TE85 cells is repressed in vector-averaged gravity using clinostat rotation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 279: 258-264.
- [26] Granet C, Boutahar N, Vico L, Alexandre C, Lafage-Proust M H. MAPK and SRC-kinases control EGR-1 and NF-kappa B inductions by changes in mechanical environment in osteoblasts[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284: 622-631.
- [27] Granet C, Vico A G, Alexandre C, Lafage-Proust M H. MAP and src kinases control the induction of AP-1 members in response to changes in mechanical environment in osteoblastic cells[J]. *Cell Signal*, 2002, 14: 679-688.
- [28] Narayanan R, Smith C L, Weigel N L. Vector-averaged gravity-induced changes in cell signaling and vitamin D receptor activity in MG-63 cells are reversed by a 1, 25-(OH)₂-D₃ analog, EB1089[J]. *Bone*, 2002, 31: 381-388.
- [29] Ontiveros C, McCabe L R. Simulated microgravity suppresses osteoblast phenotype, Runx2 levels and AP-1 transactivation[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 88: 427-437.
- [30] Rucci N, Rufo A, Alamanou M, Teti A. Modeled microgravity stimulates osteoclastogenesis and bone resorption by increasing osteoblast RANKL/OPG ratio[J]. *J Cell Biochem*, 2007, 100: 464-473.
- [31] Kanematsu M, Yoshimura K, Takaoki M, Sato A. Vector-averaged gravity regulates gene expression of receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand and osteoprotegerin in bone marrow stromal cells *via* cyclic AMP/protein kinase A pathway[J]. *Bone*, 2002, 30: 553-558.
- [32] Patel M J, Liu W, Sykes M C, Ward N E, Risin S A, Risin D, et al. Identification of mechanosensitive genes in osteoblasts by comparative microarray studies using the rotating wall vessel and the random positioning machine[J]. *J Cell Biochem*, 2007, 101: 587-599.
- [33] Nichols H L, Zhang N, Wen X. Proteomics and genomics of microgravity[J]. *Physiol Genomics*, 2006, 26: 163-171.