

· 基础研究 ·

建立水合氯醛去除成骨细胞初级纤毛的细胞模型

马小妮¹, 石文贵¹, 谢艳芳¹, 马慧萍², 葛宝丰¹, 甄平¹, 陈克明¹

(1. 兰州军区兰州总医院骨科研究所, 甘肃 兰州 730050; 2. 兰州军区兰州总医院药材科, 甘肃 兰州 730050)

【摘要】 目的:建立水合氯醛去除成骨细胞初级纤毛的细胞模型,并观察去除成骨细胞初级纤毛对电磁场提高成骨细胞 ALP 染色和钙化结节染色的影响。**方法:**贴壁法分离培养 3 只出生 3 d, 体重 6~9 g 的雄性 SD 大鼠的乳鼠颅骨成骨细胞;待上述细胞生长至融合状态时传代培养并随机分成 4 组:不加水合氯醛组(对照组)、2 mM、4 mM 和 8 mM 水合氯醛处理组;将上述 4 组细胞置于 37 °C、5%CO₂ 的培养箱培养 72 h, 用激光共聚焦扫描显微镜观察初级纤毛形态,并用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析成骨细胞初级纤毛发生率;筛选出能有效去除成骨细胞初级纤毛的水合氯醛浓度的细胞,并将其分为以下 3 组:正常对照组(control group, C), 电磁场处理(electromagnetic fields, EMFs)组及电磁场处理+4 mM 水合氯醛组。向上述 3 组细胞加入含 10%FBS 的 DMEM 培养液继续培养 9 d, 碱性磷酸酶组织化学染色观察 ALP 的形成;培养 12 d, 茜素红染色观察钙化结节的形成。**结果:**与对照组和 2 mM 水合氯醛组相比,4 mM 水合氯醛能有效去除成骨细胞初级纤毛的发生($P<0.01$);去除成骨细胞初级纤毛削弱了 EMFs 促进成骨细胞 ALP 和钙化结节的形成,具体表现在:与 EMFs 组相比,EMFs+水合氯醛组 ALP 和钙化结节的染色面积明显减少($P<0.01$)。**结论:**4 mM 水合氯醛能有效去除成骨细胞的初级纤毛;初级纤毛部分参与了电磁场促进成骨细胞 ALP 和钙化结节的形成,为探讨电磁场促进成骨细胞成熟矿化的机理提供新思路。

【关键词】 成骨细胞; 纤毛; 水合氯醛; 细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.06.016

Establishment of osteoblast primary cilia model removed by chloral hydrate MA Xiao-ni, SHI Wen-gui, XIE Yan-fang, MA Hui-ping, GE Bao-feng, ZHEN Ping, and CHEN Ke-ming*. Institute of Orthopaedics, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, Gansu, China

ABSTRACT Objective: To establish osteoblast model, primary cilia model was removed by chloral hydrate, observe effects of osteoblast primary cilia moved on enhancing ALP staining and calcified nodules staining in electromagnetic field. **Methods:** Three 3-day-old male SD rats weighed between 6 and 9 g were killed, cranial osteoblast was drawn and adherencing cultured respectively. Cells were subcultured and randomly divided into 4 groups until reach to fusion states. The four groups included chloral hydrate non-involved group (control group), 2 mM, 4 mM and 8 mM chloral hydrate group, and cultured in 37 °C, 5% CO₂ incubator for 72 h. Morphology of primary cilia was observed by laser confocal scanning microscope, and incidence of osteoblast primary cilia was analyzed by Image-Pro Plus 6.0 software. Cells in the correct concentration group which can removed cilia most effectively were selected and divided into 3 groups, including control group (C), Electromagnetic fields group (EMFs), and EMFs with 4 mM chloral hydrate group. DMEM nutrient solution contained 10% FBS were added into three groups and cultured for 9 days and formation of ALP were observed by histochemical staining of alkaline phosphatase. After 12 days' cultivation, formation of mineralization nodes was observed by alizarin red staining. **Results:** Compared with control group and 2mM chloral hydrate group, 4 mM chloral hydrate group could effectively remove osteoblast primary cilia ($P<0.01$). Removal of osteoblast primary cilia could weaken the formation of ALP and mineralization nodes in osteoblast in EMFS. Compared with EMFs group, the area of ALP and mineralization nodes in EMFs with 4 mM chloral hydrate group were decreased obviously ($P<0.01$). **Conclusion:** 4mM chloral hydrate could effectively remove osteoblast primary cilia. Primary cilia participate in EMFs promoting formation of ALP and mineralization nodes in osteoblast and provide new ideas for exploring mechanism of EMFs promoting osteoblast maturation and mineralization.

KEYWORDS Osteoblasts; Cilia; Chloral hydrate; Cells

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(6): 547-552 www.zggszz.com

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81270963)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No. 81270963)

通讯作者: 陈克明 E-mail: chenkm@lut.cn

Corresponding author: CHEN Ke-ming E-mail: chenkm@lut.cn

初级纤毛是脊椎动物细胞表面的单根凸起结构,内含丰富的受体、离子通道和激酶等^[1-2],近年来已被证明是多种细胞接收各种化学和力学信号的“天线”^[3-4]。本实验室前期的研究发现电磁场能促进

成骨细胞的成熟矿化和骨髓基质细胞的成骨性分化^[5-6],但关于电磁场促进成骨细胞的成熟矿化和骨髓基质细胞的成骨性分化的机制时至今日仍不完全清楚^[6-8]。然而,本实验室近期的研究结果发现成骨细胞表面存在初级纤毛,为了阐明初级纤毛在电磁场促进成骨细胞成熟矿化和骨髓基质细胞的成骨性分化中的作用,本文试图建立水合氯醛去除成骨细胞初级纤毛的细胞模型,为进一步探讨初级纤毛在电磁场促进成骨细胞成熟矿化和骨髓基质细胞的成骨性分化过程中的作用机制奠定坚实基础并初步观察去除初级纤毛对电磁场促进成骨细胞 ALP 和钙化结节的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 出生 48 h 以内的 SPF 级 SD 大鼠[甘肃省中医学院动物实验中心,合格证号 SCXK(甘)2013-0006-152]。

1.1.2 试剂 水合氯醛(Sigma,分析纯)DME 准胎牛血清(兰州民海生物公司),胰蛋白酶,acetylated α -tubulin 一抗(Sigma)。DAPI, FITC 标记的山羊抗鼠的二抗(Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL)。

1.2 成骨细胞分离培养

出生 48 h 内的 SPF 级 SD 大鼠,75%乙醇浸泡,无菌条件下取出头盖骨,置入盛有 DMEM 培养基的培养皿中,去除骨膜、血管及结缔组织,PBS 漂洗 2 次。加入 0.25%胰酶 37 °C 消化 10 min,弃掉消化液;再加入 0.1% II 型胶原酶 37 °C 消化 3 次,每次 15 min,收集并合并消化液,200 目细胞筛过滤。收集消化液,1 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,沉淀用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮,吹打均匀后,调整细胞浓度至 1×10^5 个/ml。置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 天换液 1 次。待细胞生长至 85%左右时进行后续实验。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 激光共聚焦扫描显微镜观察成骨细胞表面初级纤毛的形态 待 1.2 节中的成骨细胞生长至融合状态时,将其传代培养于置有盖玻片的小皿中,细胞密度为 1×10^4 个/ml。培养 48 h 后弃去培养液,用 PBS 轻洗 3 次,4%多聚甲醛固定 15 min,0.1% Triton X-100 破膜处理 20 min,1%BSA 封闭 1 h,用 acetylated α -tubulin 抗体(1:1 000)于 37 °C 孵育 60 min,用荧光染料标记的二抗孵育 30 min,PBS 洗 3 次,细胞核用 DAPI 衬染,90%甘油封片,用 Zeiss LSM 510 MeTa 激光扫描共聚焦显微镜观察初级纤毛形态。

1.3.2 OLYMPUS 倒置显微镜观察不同的处理(实验分组)对成骨细胞形态的影响 待 1.2 节中的成

骨细胞生长至融合状态时,将其传代培养并随机分为 4 组:对照组、2 mM 水合氯醛组、4 mM 水合氯醛组和 8 mM 水合氯醛组,连续加药 3 d,每天加药 1 次,在 OLYMPUS 倒置显微镜下观察成骨细胞的生长状态并拍照,初步筛选对成骨细胞生长无明显影响的水合氯醛浓度。

1.3.3 激光共聚焦扫描显微镜观察不同的处理(实验分组)成骨细胞初级纤毛的形态发生 基于 1.3.2 节的观察结果:8 mM 水合氯醛使大量的成骨细胞死亡,所以本节将生长至融合状态的成骨细胞传代培养并随机分为 3 组:对照组、2 mM 水合氯醛组和 4 mM 水合氯醛组。目的是从形态发生上筛选去除成骨细胞初级纤毛的最佳水合氯醛浓度。上述不同处理组的成骨细胞培养 72 h 后弃去培养液,用 PBS 轻洗 3 次,4%多聚甲醛固定 15 min,0.1% Triton X-100 破膜处理 20 min,1%BSA 封闭 1 h,用 acetylated α -tubulin 抗体(1:1000)于 37 °C 孵育 60 min,用荧光染料标记的二抗孵育 30 min,PBS 洗 3 次,细胞核用 DAPI 衬染,90%甘油封片,用 Zeiss LSM 510 MeTa 激光扫描共聚焦显微镜观察初级纤毛形态发生。

1.3.4 Image-Pro Plus 6.0 软件统计分析 1.3.3 节中成骨细胞初级纤毛的发生率(%)将 1.3.3 节中的每个处理组随机选取 5 个视野,用 Zeiss LSM 510 MeTa 激光扫描共聚焦显微镜对初级纤毛进行拍照,并用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析成骨细胞表面初级纤毛的发生率。目的是从初级纤毛发生率上筛选去除成骨细胞初级纤毛的最佳水合氯醛浓度。

1.3.5 ALP 染色 为了初步观察去除成骨细胞初级纤毛对电磁场促进成骨细胞 ALP 的影响,将生长至 85%左右的 P1 代成骨细胞分为 3 组:正常对照组(C 组),电磁场处理(EMFs)组,电磁场处理+水合氯醛组。正常对照组只用含 10%FBS 的 DMEM 培养基培养;电磁场处理组用含 10%FBS 的 DMEM 培养基培养的同时每天用电磁场处理 1.5 h;电磁场处理+水合氯醛组细胞先加入 4 mM 水合氯醛,连续加药 3 d,每天加药 1 次,待第 3 天时弃去培养液,PBS 漂洗 2 遍,加入含 10%FBS 的 DMEM 培养液继续培养并且每天用电磁场处理 1.5 h。后两组细胞均是同步暴露磁场处理至第 9 天时进行偶氮偶合染色,待出现紫色斑点后停止染色,相机拍照。照片使用 IPP (Image-Pro Plus 6.0) 软件扫描 ALP 染色区域的面积。ALP 染色面积计算公式:培养皿的面积 \times (ALP 染色区域扫描面积/照片中培养皿的扫描面积),进行数据分析。

1.3.6 钙化结节染色 为了初步观察去除成骨细胞初级纤毛对电磁场促进成骨细胞钙化结节的影

响, 将生长至 85% 左右的 P1 代成骨细胞同 1.3.5 节分为 3 组: 正常对照组, 电磁场处理组 (EMFs), 电磁场处理+水合氯醛组。后两组细胞均是同步暴露磁场处理至第 12 天, 弃培养液, PBS 漂洗 2 遍, 加入 10% 甲醛固定 10 min, 弃固定液, 加入 pH 8.9、0.1% 的茜素红染色液, 37 °C 水浴 1 h, 流水冲洗, 换固定液照相记录结果。照片使用 IPP (Image-Pro Plus 6.0) 软件扫描钙化结节染色区域的面积。钙化结节染色面积计算公式: 培养皿的面积×(钙化结节染色区域扫描面积/照片中培养皿的扫描面积), 进行数据分析。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 计量数据采用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 激光共聚焦扫描显微镜观察结果

激光共聚焦扫描显微镜观察成骨细胞表面结果显示: 图 1a 为 40 倍镜观察正常培养条件下成骨细胞表面存在的初级纤毛形态; 图 1b 为 20 倍镜观察正常培养条件下成骨细胞表面存在的初级纤毛形态。由此说明, 成骨细胞表面存在大量的初级纤毛。

2.2 OLYMPUS 倒置显微镜观察水合氯醛对成骨细胞的形态的影响

为了观察水合氯醛对成骨细胞的形态影响, 本实验分别用 0、2、4 和 8 mM 的水合氯醛处理成骨细胞 72 h, 并且每 24 h 用 OLYMPUS 倒置显微镜拍照观察成骨细胞的生长状态。如图 2 所示: 未加水合氯醛时 (即 C 组), 成骨细胞的生长状态良好, 细胞透亮并呈长梭形分布。用 2 mM 和 4 mM 的处理成骨细胞 24、48 和 72 h 后, 成骨细胞的形态与正常培养条件下的细胞形态一致: 即细胞形态清晰、透亮呈长梭

形、三角及多角等形状分布, 并且随着时间的延长水合氯醛对细胞的形态并没有明显的影响。而用 8 mM 的水合氯醛处理成骨细胞 24 h 后, 成骨细胞的形态与正常培养条件下的细胞形态相比: 细胞培养皿中出现少量的死细胞漂浮在培养液的上层, 少量贴壁的细胞开始皱缩, 8 mM 水合氯醛处理成骨细胞 48 h 和 72 h 后, 大量的细胞死亡, 仅有极少量的细胞贴于皿底。由此说明 8 mM 的水合氯醛对成骨细胞有明显的毒副作用, 所以在后续的实验中选择 2 mM 和 4 mM 的水合氯醛处理成骨细胞。

2.3 激光共聚焦扫描显微镜观察水合氯醛对成骨细胞初级纤毛形态发生的影响

激光共聚焦扫描显微镜观察结果所示: 正常对照组几乎每个成骨细胞表面都有 1 根初级纤毛, 形似棒槌状 (图 3a)。2 mM 水合氯醛处理成骨细胞 72 h 后, 成骨细胞表面的初级纤毛有所减少, 部分成骨细胞表面的初级纤毛消失 (图 3b)。4 mM 水合氯醛处理成骨细胞 72 h 后, 与对照和 2 mM 水合氯醛组相比, 成骨细胞表面的初级纤毛明显减少, 仅有极个别的细胞表面有初级纤毛 (3c)。由此说明, 4 mM 水合氯醛能更有效地抑制成骨细胞表面初级纤毛的形态发生。

2.4 Image-Pro Plus 6.0 分析成骨细胞初级纤毛的发生率

正常培养条件下 (即: 对照组) 成骨细胞表面初级纤毛的发生率为 $(77.855 \pm 4.692)\%$, 分别用 2 mM 和 4 mM 水合氯醛干预成骨细胞 72 h 后, 成骨细胞表面初级纤毛的发生率分别为 $(44.050 \pm 2.694)\%$ 和 $(15.089 \pm 3.404)\%$ 。与对照组和 2 mM 水合氯醛组相比, 4 mM 水合氯醛处理的成骨细胞初级纤毛的发生率最低 ($P < 0.01$), 见表 1。由此说明 4 mM 水合氯醛能有效地抑制成骨细胞表面初级纤毛的发生。

2.5 ALP 的组织化学染色结果

ALP 的组织化学染色显示, 与对照组相比, EMFs 组 ALP 形成面积显著增多 ($P < 0.01$), 表明电磁场能促进成骨细胞 ALP 的形成。EMFs+4 mM 水合氯醛组的染色明显地浅于 EMFs 组 (图 4)。EMFs+4 mM 水合氯醛组 ALP 的染色面积 (6.194) 显著低于 EMFs 组 (27.457) [与 EMFs 组相比 ($P < 0.01$), 见表 2], 表明 4 mM 水合氯醛抑制成骨细胞初级纤毛削弱 EMFs 促进成骨细胞 ALP 的形成, 由此说明初级纤毛在 EMFs

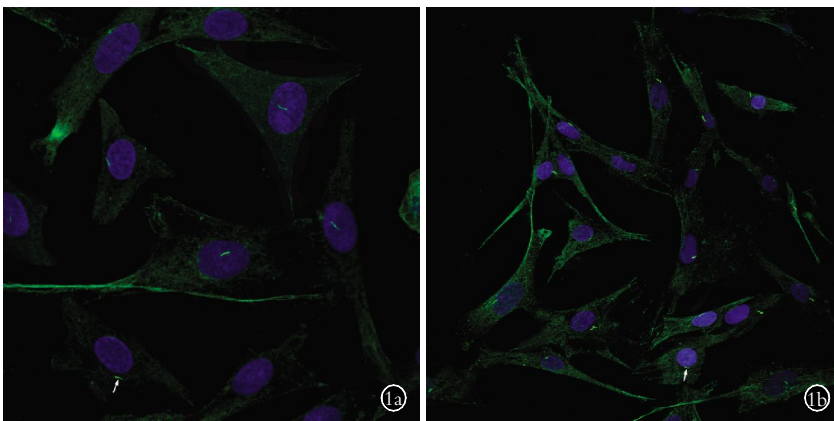


图 1 激光共聚焦扫描显微镜观察成骨细胞表面初级纤毛的形态 1a. 40 倍镜 1b. 20 倍镜
Fig.1 Morphology of primary cilla in osteoblast were imaged by laser confocal scanning microscope 1a. 40× 1b. 20×

表 1 Image-Pro Plus 6.0 分析不同浓度的水合氯醛处理成骨细胞 72 h 后初级纤毛的发生率

Tab.1 Incidence of primary cilia in osteoblasts dealt with different concentrations of chloral hydrate and analyzed by Image-Pro Plus 6.0

组别	样本含量	初级纤毛发生率($\bar{x}\pm s, \%$)
对照组	5	77.855±4.692
2 mM 水合氯醛组	5	44.050±2.694**
4 mM 水合氯醛组	5	15.089±3.404** $\Delta\Delta$

注: **与对照组比较, $P<0.01$; $\Delta\Delta$ 与 2 mM 水合氯醛组比较, $P<0.01$
 Note: Compared with control group, ** $P<0.01$; compared with 2 mM group, $\Delta\Delta P<0.01$

促进成骨细胞 ALP 形成中发挥一定作用。

2.6 钙化结节染色结果

茜素红的染色结果显示, 与对照组相比, EMFs 组钙化结节形成的面积显著地增多($P<0.01$), 说明电磁场能促进成骨细胞钙化结节的形成。与 EMFs 组相比, EMFs+4 mM 水合氯醛组的钙化结节形成的面积减少(图 5)。EMFs+4 mM 水合氯醛组的钙化结

表 2 Image-Pro Plus 6.0 分析不同处理组成骨细胞 ALP 染色面积

Tab.2 ALP stained areas in osteoblasts dealt with different methods and analyzed by Image-Pro Plus 6.0

组别	样本含量	ALP 染色面积($\bar{x}\pm s, \text{cm}^2$)
正常对照组	3	1.180±0.096
EMFs 组	3	27.457±2.039**
EMFs+4mM 水合氯醛组	3	6.194±0.714 $\Delta\Delta$

注: **与对照组比较, $P<0.01$; $\Delta\Delta$ 与 SEMF 组比较, $P<0.01$
 Note: Compared with control group, ** $P<0.01$; compared with SEMF group, $\Delta\Delta P<0.01$

节染色面积 (6.350) 显著地低于 EMFs 组 (16.308) (与 EMFs 组相比, $P<0.01$, 表 3)。说明 4 mM 水合氯醛抑制成骨细胞初级纤毛消弱 EMFs 促进成骨细胞钙化结节的形成, 由此说明初级纤毛在 EMFs 促进成骨细胞钙化结节的形成中发挥一定作用。

3 讨论

初级纤毛的功能长期被人们所忽视, 然而, 近年来初级纤毛作为一种细胞信号的感受器, 在信号转

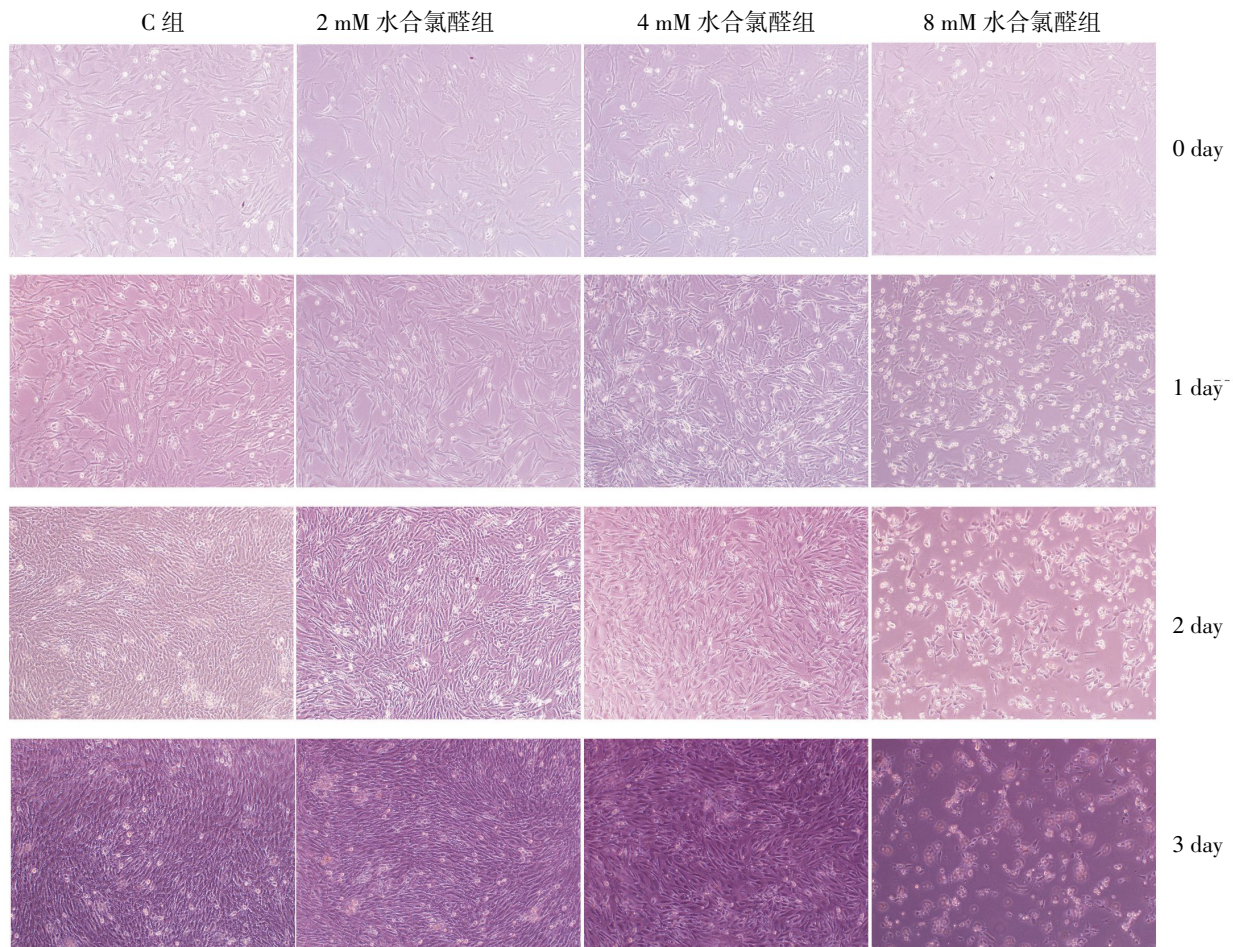


图 2 不同时期 OLYMPUS 倒置显微镜观察不同浓度水合氯醛处理成骨细胞的形态

Fig.2 Morphology of osteoblast dealt with different concentrations of chloral hydrate were observed under OLYMPUS inverted microscope

表 3 Image-Pro Plus 6.0 分析不同处理组成骨细胞钙化结节染色面积

Tab.3 Mineralization nodes stained areas of different dealed with different methods and analyzed by Image-Pro Plus 6.0

组别	样本含量	钙化结节染色面积($\bar{x} \pm s$, cm ²)
正常对照组	3	2.187±0.153
EMFs 组	3	16.308±3.227**
EMFs+4 mM 水合氯醛组	3	6.350±2.886 ^{△△}

注: **与对照组比较, $P < 0.01$; ^{△△}与 SEMF 组比较, $P < 0.01$

Note: Compared with control group, ** $P < 0.01$; compared with SEMF group, ^{△△} $P < 0.01$

导与疾病研究中占有越来越多的重要地位而被研究者所重视^[9-11]。而且,已有文献报道,初级纤毛是一种感受应力和剪切力的“天线”^[12]。

本课题组前期研究发现电磁场能促进成骨细胞的成熟矿化和骨髓基质细胞的成骨性分化,那么,笔

者提出电磁场促进成骨细胞的成熟矿化和骨髓基质细胞的成骨性分化是否也与初级纤毛有关?为了证明上述假设,首先必须干涉掉初级纤毛后观察电磁场是否还具有促进成骨细胞的成熟矿化和骨髓基质细胞的成骨性分化的能力。为此,本实验建立水合氯醛干涉成骨细胞初级纤毛的细胞模型,初步观察初级纤毛在电磁场促进成骨细胞成熟矿化中的作用,为进一步探讨初级纤毛在电磁场促进骨髓基质细胞成骨性分化和成骨细胞成熟矿化的作用机制奠定坚实的基础。

已有文献报道水合氯醛可有效去除肾细胞的初级纤毛^[13]。目前为止,还没有文献报道水合氯醛能去除原代培养成骨细胞表面的初级纤毛。所以本研究首次用水合氯醛去除原代培养成骨细胞表面的初级纤毛,为后续探讨初级纤毛在电磁场促进骨髓基质细胞成骨性分化和成骨细胞成熟矿化的作用机制奠定坚实的基础。

笔者分别用 2 mM、4 mM 和 8 mM 水合氯醛干

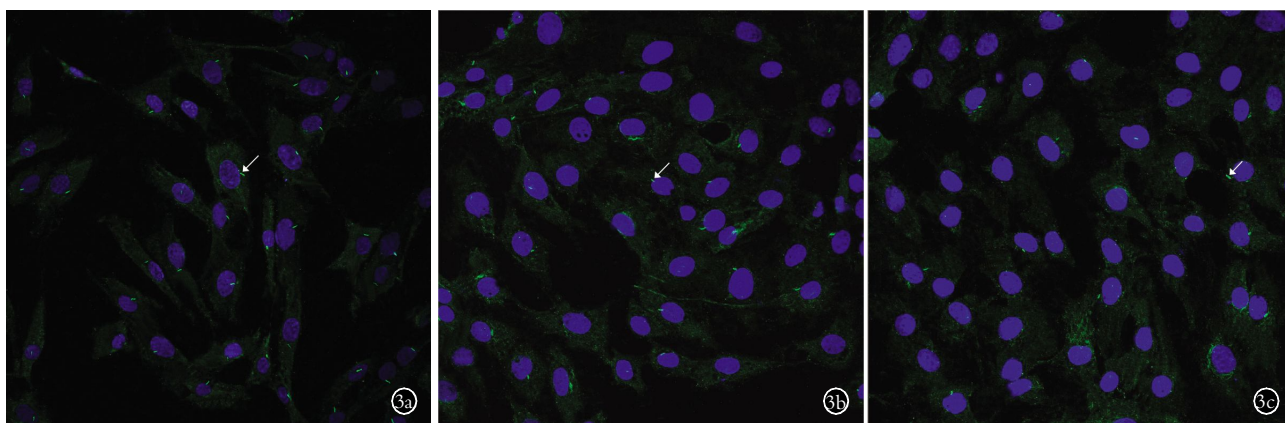


图 3 不同浓度水合氯醛处理成骨细胞各组成骨细胞初级纤毛的形态 (箭头所示) 3a. 正常对照组 3b. 2 mM 水合氯醛组 3c. 4 mM 水合氯醛组

Fig.3 Morphology of primary cilla in osteoblasts was dealed with different concentrations of chloral hydrate 3a. Control group 3b. 2 mM chloral hydrate group 3c. 4 mM chloral hydrate group

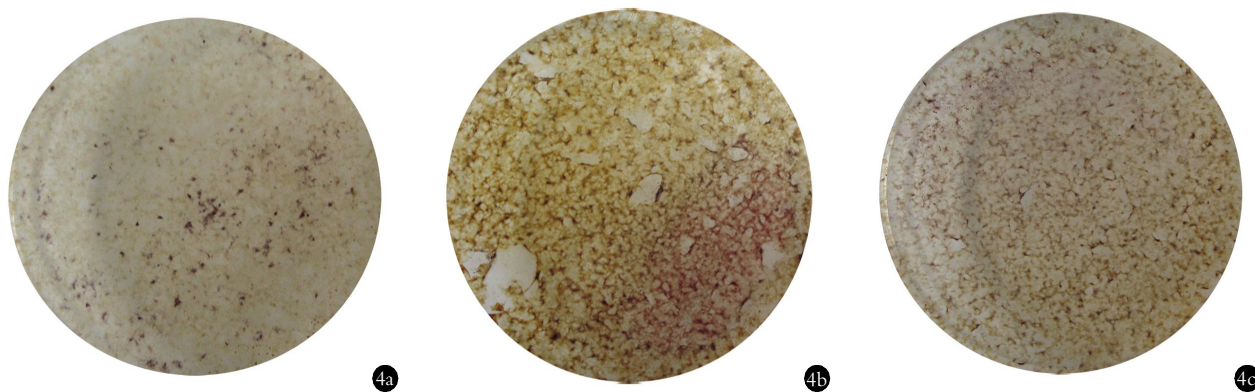


图 4 4 mM 水合氯醛抑制成骨细胞初级纤毛削弱 EMFs 促进成骨细胞 ALP 的形成 4a. 正常对照组 4b. EMFs 组 4c. EMFs+4 mM 水合氯醛组

Fig.4 4 mM chloral hydrate inhibited primary cilla in osteoblast weakening formation of ALP in osteoblast 4a. Contral group 4b. EMFs group 4c. EMFs with 4 mM chloral hydrate group

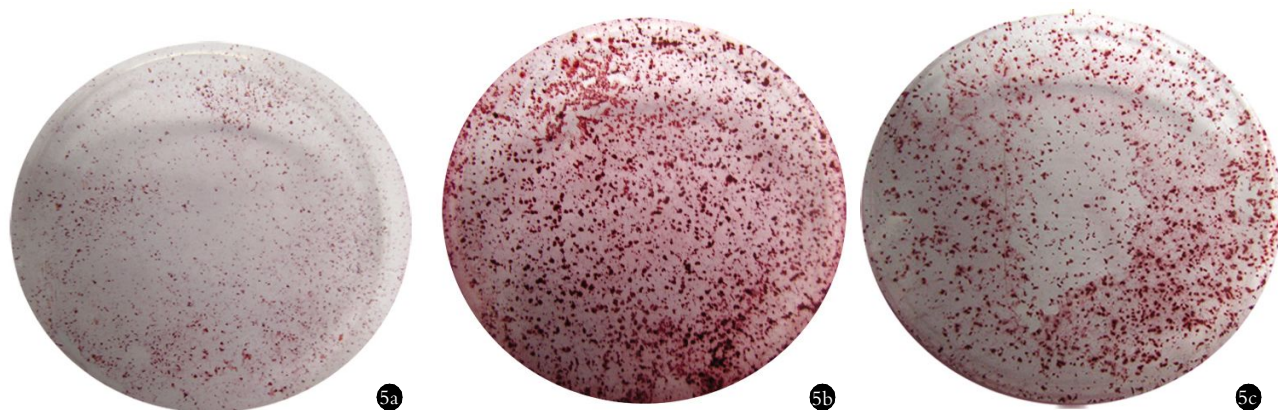


图 5 4 mM 水合氯醛抑制成骨细胞初级纤毛削弱 EMFs 促进成骨细胞钙化结节的形成 5a. 正常对照组 5b. EMFs 组 5c. EMFs+4 mM 水合氯醛组

Fig.5 4 mM chloral hydrate inhibited primary cilla in osteoblast weakening formation of mineralization nodes in osteoblast 5a. Control group 5b. EMFs group 5c. EMFs with 4 mM chloral hydrate group

预成骨细胞 72 h, 并且每 24 h 用 OLYMPUS 倒置显微镜观察细胞的生长状况, 发现加药 24 h 后, 8 mM 水合氯醛对成骨细胞有严重的毒副作用, 于是在后期的实验中采用 2 mM、4 mM 水合氯醛干预成骨细胞, 并用激光共聚焦扫描显微镜及 Image-Pro Plus 6.0 软件分析 2 mM 和 4 mM 水合氯醛对成骨细胞初级纤毛的干预效果, 结果发现, 4 mM 水合氯醛无论从形态还是数量上都明显好于 2 mM 水合氯醛, 由此说明, 4 mM 水合氯醛能有效地去除成骨细胞的初级纤毛。并且初步观察初级纤毛在电磁场促进成骨细胞 ALP 和钙化结节的形成中作用, 发现去除初级纤毛明显抑制了 EMFs 促进成骨细胞 ALP 和钙化结节的形成。由此推测初级纤毛在 SEMFs 促进成骨细胞成熟矿化中发挥重要作用。然而, 关于初级纤毛调节电磁场促进成骨细胞成熟矿化的作用机制尚待进一步研究。

参考文献

[1] Bodle JC, Rubenstein CD, Phillips ME, et al. Primary cilia: the chemical antenna regulating human adipose-derived stem cell osteogenesis[J]. PloS One, 2013, 8(5): e62554.
 [2] Ludeman DA, Farrar N, Riesgo A, et al. Evolutionary origins of sensation in metazoans: functional evidence for a new sensory organ in sponges[J]. BMC Evol Biol, 2014, 14(1): 3.
 [3] Nathwani BB, Miller CH, Yang TLT, et al. Morphological differences of primary cilia between human induced pluripotent stem cells and their parental somatic cells[J]. Stem Cells Dev, 2013, 23(2): 115-123.
 [4] Pan A, Chang L, Nguyen A, et al. A review of hedgehog signaling in cranial bone development[J]. Front Physiol, 2013, 4: 61.
 [5] Zhou J, Ming LG, Ge BF, et al. Effects of 50Hz sinusoidal electromagnetic fields of different intensities on proliferation, differentia-

tion and mineralization potentials of rat osteoblasts[J]. Bone, 2011, 49(4): 753-761.
 [6] 王嘉琪, 葛宝丰, 马小妮, 等. 静磁场不同处理时间对体外培养成骨细胞增殖与分化的影响[J]. 中国骨伤, 2012, 2012, 25(11): 931-936.
 Wang JQ, Ge BF, Ma XN, et al. Effects of static magnetic field at different times on the proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(11): 931-936. Chinese with abstract in English.
 [7] 丁立峰, 郑刚, 杨军, 等. 聚乙二醇化骨形态发生蛋白-2 基因转染兔骨髓间充质干细胞及其表达测定[J]. 中国骨伤, 2014, 27(1): 48-53.
 Ding LF, Zheng G, Yang J, et al. Study on bone mesenchymal stem cells transfected by polyethylene glycol/bone morphogenetic protein-2[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(1): 48-53. Chinese with abstract in English.
 [8] 赖圆圆, 罗黄黄. Hedgehog 信号通路与骨质疏松症[J]. 中国骨伤, 2014, 27(2): 169-172.
 Lai YY, Luo HH. Hedgehog signaling pathway and osteoporosis[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(2): 169-172. Chinese with abstract in English.
 [9] Garcia-Gonzalo FR, Reiter JF. Scoring a backstage pass: mechanisms of ciliogenesis and ciliary access[J]. J Cell Biol, 2012, 197(6): 697-709.
 [10] Yoder BK. Role of primary cilia in the pathogenesis of polycystic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(5): 1381-1388.
 [11] Kee HL, Verhey KJ. Molecular connections between nuclear and ciliary import processes[J]. Cilia, 2013, 2(1): 11.
 [12] Praetorius HA, Spring KR. A physiological view of the primary cilium[J]. Annu Rev Physiol, 2005, 67: 515-529.
 [13] Praetorius HA, Spring KR. The renal cell primary cilium functions as a flow sensor[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003, 12(5): 517-520.

(收稿日期: 2014-08-20 本文编辑: 王玉蔓)