

Efectos de la estimulación mecánica en la comunicación entre células óseas

Cadenas Martín M, Tirado I, Martín E, Ardura JA, Bravo B, Gortazar AR

Instituto de Medicina Aplicada de la Universidad San Pablo-CEU - Madrid (España)

Departamento de Ciencias Médicas Básicas - Facultad de Medicina - Universidad San Pablo CEU - Madrid (España)

Fecha de recepción: 10/07/2018 - Fecha de aceptación: 26/11/2018

Trabajo remitido como prestación de la beca FEIOMM TRASLACIONAL 2015

Resumen

La fuerza mecánica es importante para el modelado, el remodelado y la regeneración ósea; estimula a los osteocitos provocando una alteración en la producción y secreción de moléculas de señalización que regulan la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del medio condicionado de células osteocíticas de ratón estimuladas mecánicamente sobre la capacidad proliferativa y migratoria de células mesenquimales y células óseas. Para ello, se analizó la proliferación y migración de las células preosteoblásticas de ratón, células mesenquimales preadiposas humanas y macrófagos de ratón en presencia del medio condicionado de las células osteocíticas, tras 6 y 24 horas después de ser sometidas a un estrés mecánico de 10 dinas/cm² por flujo de fluido (FF) durante 10 minutos. Se encontró que la migración de células preosteoblásticas aumentó significativamente en presencia de medios condicionados de células osteocíticas con respecto al grupo control estático (SC) (SC=12,63±5,44; FF6h=23,03±11,57; FF24h=29,72±15,76; p<0,0001). De la misma manera, las células preadiposas también incrementaron significativamente su migración en presencia de dichos medios condicionados (SC=11,48±4,75; FF6h=18,43±9,94; FF24h=18,80±10,03; p<0,0007). Sin embargo, la migración de los macrófagos disminuyó en presencia del medio condicionado recogido a las 24 horas con respecto al grupo control estático (SC=69±22,71; FF24h=26,57±5,47; p<0,0001). Estos efectos se asociaron con la disminución de la expresión proteica de ciertas quimioquinas, como la proteína quimiotáctica de monocitos de tipo I (SC=0,25±0,06; FF24h=0,09±0,005; p=0,0262), la proteína del grupo I de alta movilidad (SC=0,25±0,04; FF24h=0,15±0,05; p=0,0159) y la proteína reguladora de la activación de linfocitos T y monocitos (SC=3,29±0,88; FF6h=1,33±1,09; FF24h=0,97±0,66; p<0,0314), por parte de los osteocitos en presencia de estímulo mecánico con respecto al grupo control estático. En conclusión, este estudio *in vitro* demuestra que la mecanotransducción de los osteocitos potencia el reclutamiento de osteoblastos y células mesenquimales preadiposas mientras que reduce la migración de los macrófagos.

Palabras clave: osteocitos, osteoblastos, macrófagos, células mesenquimales, estimulación mecánica, quimioquinas.

INTRODUCCIÓN

Uno de los estímulos más importantes que recibe el hueso para regular la masa ósea, la forma y la microarquitectura es la fuerza mecánica. El endoesqueleto reacciona ante un aumento de carga formando más hueso o disminuyendo su masa ante la falta de tensión mecánica¹. Esto es debido a que la estimulación desencadena el proceso de mecanotransducción en el cual los osteocitos, que se consideran las células clave mecanosensoras del hueso, cuando son estimulados, envían señales químicas que afectan a la regulación paracrina del comportamiento de los osteoblastos y los osteoclastos^{2,3}. También se ha observado que conlleva un efecto antiapoptótico de los osteocitos⁴.

Con la carga mecánica, la expresión de esclerostina, que es un inhibidor de la vía de señalización proteica Wnt/ β -catenina secretado de manera constitutiva por los osteocitos, disminuye provocando un incremento de la osteoblastogénesis^{5,6}. Por otra parte, los osteocitos apoptóticos inducen la secreción del ligando del recep-

tor activador del factor nuclear κ B (RANKL, del inglés *Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand*), estimulando indirectamente la osteoclastogénesis⁷.

Además, algunas quimioquinas, una familia de citoquinas quimiotácticas, podrían estar involucradas en la remodelación ósea al ser expresadas por células óseas y proporcionar señales clave para reclutar diferentes subpoblaciones celulares⁸.

Hay estudios recientes que indican que la proteína del grupo 1 de alta movilidad (HMGB1, del inglés *High Mobility Group Box 1*), la proteína reguladora de la activación de linfocitos T y monocitos (RANTES o CCL5, del inglés *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted/Chemokine (C-C motif) Ligand 5*, respectivamente) y la proteína quimiotáctica de monocitos de tipo 1 (MCP1 o CCL2, del inglés *Monocyte Chemoattractant Protein 1/Chemokine (C-C motif) Ligand 2*, respectivamente) intervienen en el reclutamiento de células madre mesenquimales para promover la reparación del tejido^{9,10}.



Correspondencia: Arancha R. Gortázar - IMMA Departamento de Ciencias Médicas Básicas - Facultad de Medicina - Universidad San Pablo CEU - Madrid (España)
Correo electrónico: argortazar@ceu.es

En base a estas evidencias, los objetivos del presente trabajo se centran en recrear un modelo de carga *in vitro* para generar mecanotransducción en un entorno de cultivo controlado¹¹ y poder estudiar el efecto del medio condicionado secretado por los osteocitos tras ser estimulados mecánicamente en la promoción de la capacidad proliferativa y migratoria de células mesenquimales y células óseas; así como la posible expresión proteica de ciertos factores quimiotácticos implicados en procesos de proliferación y migración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares. Para los ensayos del presente trabajo se utilizaron diferentes tipos celulares:

- Células mesenquimales preadiposas (*adipose stromal cells*, ASC) obtenidas por cultivo primario de lipoaspirados humanos realizados en el Hospital HM Montepíncipe (HM Hospitales), según se describió en los trabajos de Zuk y cols. en 2001¹². Todos los donantes dieron su consentimiento informado, de acuerdo con el protocolo clínico apropiado. Los pacientes fueron operados en el Departamento de Cirugía Plástica de HM Hospitales (Madrid, España), y la recogida de muestra de tejido fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional/Comité Ético de Investigación Clínica de HM Hospitales (Madrid, España). Estas células se cultivaron con DMEM (*dulbecco modified Eagles minimal essential medium*) + GlutaMAX (Gibco, Life Technologies, Alcobendas, España) con 10% de suero fetal bovino (*fetal bovine serum*, FBS) y 1% de penicilina-estreptomina (Invitrogen) a 37°C con 5% de CO₂.

- Línea continua de osteocitos MLO-Y4 de huesos murinos extraídos según se describe en Kato y cols. en 1997, por cortesía de L. Bonewald¹³, que fue cultivada en placa de 100 mm de diámetro (Jet Biofil, Guangzhou, China) previamente colagenizada con Colágeno I (Sigma-Aldrich) con α -MEM (*Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification*) al 2,5% de suero de ternero (*calf serum*, CS) (Sigma-Aldrich), 2,5% de FBS y 1% de penicilina-estreptomina a 37°C con 5% de CO₂.

- Línea continua de preosteoblastos de ratón de hueso de la bóveda del cráneo, MC3T3-E1 subclone 4 (ATCC CRL-2593).

- Línea continua de macrófagos de ratón capaces de diferenciarse a osteoclastos, RAW 264.7 (ATCC TIB-71), que fueron cultivadas con α -MEM con 10% de FBS, 1% de penicilina-estreptomina y 2 mM de L-glutamina a 37°C con 5% de CO₂.

Ensayos de estimulación mecánica por paso de fluido

(Fluid Flow, FF). Es una técnica para generar estímulo mecánico, fisiológicamente relevante, en las células óseas *in vitro*¹¹. Para ello, se sembraron 250.000 células MLO-Y4 en portaobjetos de cristal delimitados con teflón dejando un espacio de 15 cm² previamente colagenizado y se incubaron al menos 48 horas a 37°C con 5% de CO₂ hasta que llegaron a la confluencia. Posteriormente, las células fueron sometidas a estímulo mecánico o no (control estático o SC) con el dispositivo Flexcell Streamer de tensión de corte medio que produce un estrés de 10 dinas/cm² durante 10 minutos (Flexcell Internacional Corporation, Hillsborough, Carolina del Norte, EE.UU.). A continuación, las células se incubaron con α -MEM Medium sin rojo fenol (Gibco) con 0,5% de CS, 0,5% de FBS y 1% de penicilina-estreptomina para obtener medios condicionados (CM) de

los diferentes grupos experimentales: CM de células estimuladas (FF) recogido a las 6 horas después del estímulo, CM de células SC recogido a las 24 horas después del estímulo y CM de células FF recogido a las 24 horas tras el estímulo.

Ensayo de proliferación. Para realizar el ensayo de proliferación, tanto las células preosteoblásticas de ratón como las células preadiposas humanas fueron sembradas a una concentración de 6.000 células/pocillo en placas de cultivo de 12 pocillos (Jet Biofil), una placa por condición con cada una de las líneas celulares, e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Al día siguiente se cambió el medio por 20% de medio condicionado y 80% de su medio de cultivo ajustando el FBS al 10%. Pasadas 24 horas de incubación a 37°C con 5% de CO₂, se levantaron las células con Tripsina-EDTA y se hizo un recuento celular con Trypan Blue 0,4% en PBS (GE Healthcare, Hyclone, Logan, Utah, EE.UU.) en la cámara de Neubauer. Se repitió el proceso a las 48 y 72 horas, obteniéndose así una valoración de proliferación con cada uno de los medios condicionados durante 3 días y por triplicado.

Ensayo de migración en Transwell. Se sembraron en 4 placas de cultivo de 6 pocillos Transwell (Corning, Costar, Life Sciences, Nueva York, EE.UU.) 75.000 células/pocillo con su medio de cultivo sobre la membrana, y abajo se puso 20% de medio condicionado y 80% de su medio de cultivo al 1% de FBS. Pasadas 24 horas de incubación a 37°C con 5% de CO₂, se retiraron ambos medios y la capa celular superior de la membrana con la ayuda de un hisopo de algodón. Las células que quedaron en la parte inferior de la membrana se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS (Alfa Aesar, Thermo Fisher) durante 10 minutos y se tiñeron con 0,1% de cristal violeta en agua destilada (MERCK, Kenilworth, Nueva Jersey, EE.UU.) durante 15 minutos. Finalmente, las membranas se montaron en portaobjetos y se observaron en el microscopio de contraste de fase (Leica Microsystems DM5500 CTR6000) de donde se obtuvieron 20 imágenes a 50 μ m por pocillo para analizar el número de células que habían migrado en función del medio condicionado utilizado.

Western Blot. Las células se prepararon para extraer la proteína total con *buffer* RIPA (Sigma-Aldrich) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Calbiochem). Por otro lado, el medio condicionado se liofilizó y el *pellet* se resuspendió en agua MiliQ. Para cuantificar la cantidad de proteína que había en cada una de las muestras, tanto del medio condicionado liofilizado como del lisado celular, se utilizó el Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) con una plantilla Comassie. Una vez cuantificadas, se separaron en geles de 15% de acrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. A continuación, se bloqueó la membrana con albúmina de suero bovino (en inglés BSA) al 5% disuelta en TBS con Tween 20 (Sigma-Aldrich) durante una hora a temperatura ambiente y se incubó durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos policlonales de conejo: anti-HMGB1, anti-MCP1 y anti-RANTES (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Como control, se usó el anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -tubulina. Después se incubó durante una hora a temperatura ambiente con la correspondiente IgG acoplada a peroxidasa y se reveló la membrana en el transiluminador (Syngene DYV 6-E) con el sistema ECL (Electro-quimio-luminiscencia, GE-Amersham, Pittsburgh, EE.UU.). Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas por densitometría.

Análisis estadístico. En el análisis estadístico de los resultados, los datos se expresan como media \pm desviación estándar de al menos dos experimentos llevados a cabo por triplicado. Se realizó utilizando el programa GraphPad Prism V 7.0 (software GraphPad, La Jolla, California, EE.UU.), mediante un estudio no paramétrico usando t-test de dos colas o test de U-Mann-Whitney para las comparaciones dos a dos, y el test de Kuskal-Wallis para comparaciones de grupos. Se detectaron y se excluyeron los *outliers* mediante el programa GraphPad QuickCalcs ©2018 que utiliza el test de Grubb, y se consideraron como resultados significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efecto de los medios condicionados de los osteocitos estimulados mecánicamente en la proliferación de preosteoblastos y células mesenquimales preadiposas

Se realizó un estudio de proliferación de células preosteoblásticas de ratón MC3T3-E1 y de células mesenquimales preadiposas con 20% de medios condicionados de células osteocíticas de ratón MLO-Y4 en presencia (FF 6 horas y FF 24 horas) y ausencia (SC o control estático) de estímulo mecánico por paso de fluido.

Tal y como se representa en la figura 1A, no hay diferencias significativas en la proliferación de la línea celular MC3T3-E1 tras 24 horas ni tras 72 horas en presencia de medios condicionados de 6 y 24 horas. En el caso de las células mesenquimales preadiposas, los resultados tampoco mostraron diferencias significativas tras 24 horas ni tras 72 horas en presencia de los medios condicionados anteriormente mencionados (Figura 1B).

Efecto de los medios condicionados de los osteocitos estimulados mecánicamente en la migración de preosteoblastos, células mesenquimales preadiposas y macrófagos

El estudio de migración de células preosteoblásticas MC3T3-E1, células mesenquimales preadiposas y macrófagos RAW 264.7 se realizó con medio de cultivo específico de cada estirpe celular (control) y los medios condicionados de células osteocíticas MLO-Y4 en presencia (FF 6 horas y FF 24 horas) y ausencia (SC) de estimulación mecánica.

Las células preosteoblásticas duplicaron y triplicaron su migración en presencia de los medios condicionados de los osteocitos recogidos tras 6 y 24 horas de ser sometidos a estímulos por paso de fluido, respectivamente (Figura 2).

De la misma manera, las células mesenquimales preadiposas también duplicaron su migración en presencia de dichos medios (Figura 3).

En el caso de la línea de macrófagos de ratón RAW 264.7, nuestros resultados señalan una disminución de tres veces su migración en presencia de medios condicionados recogidos tras 24 horas de realizarles el *Fluid Flow* (Figura 4).

Análisis de la expresión y secreción de quimioquinas tras estimular mecánicamente los osteocitos

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos anteriormente, se llevó a cabo el análisis de la expresión de proteínas quimioatrayentes mediante la técnica de *Western Blot*. Para ello se obtuvieron por un lado los lisados de células osteocíticas MLO-Y4 en presencia y ausencia de estimulación mecánica por paso de fluido y, por otro, el liofilizado de sus respectivos medios condicionados, tal y como se describe en el apartado de materiales y métodos.

Se estudiaron tres posibles proteínas implicadas en la migración de las células mesenquimales tras un estímulo mecánico, dos de ellas pertenecientes a la familia de las quimioquinas con patrón C-C: MCP1 y RANTES, y la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1). Para normalizar las muestras de lisado celular se utilizó la tubulina.

Como se observa en la figura 5, en los lisados celulares de MLO-Y4 estimuladas mecánicamente se produjo una disminución de dos veces en la expresión de la proteína quimiotáctica MCP1 (Figuras 5A-5B). En las muestras de medios condicionados liofilizados se observó que la secreción de MCP1 también disminuyó en las condiciones de estímulo mecánico, en este caso disminuyó tres veces (Figuras 5C-5D).

En los lisados celulares de MLO-Y4 estimuladas mecánicamente se observó una disminución de dos veces en la expresión de la proteína quimiotáctica HMGB1 en la condición de FF a 24 horas (Figuras 5E-5F).

De forma similar, en los lisados celulares de MLO-Y4 estimuladas mecánicamente se observó una disminución de tres veces en la expresión de la proteína quimiotáctica RANTES en las condiciones de FF a 6 y 24 horas (Figuras 5G-5H).

Figura 1. Proliferación celular de MC3T3-E1 (A) y ASC (B) (células mesenquimales de origen adiposo) en presencia y ausencia de medios condicionados de 6 y 24 horas tras estímulo mecánico. Los valores son la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. Resultados presentados como número de células vs. control

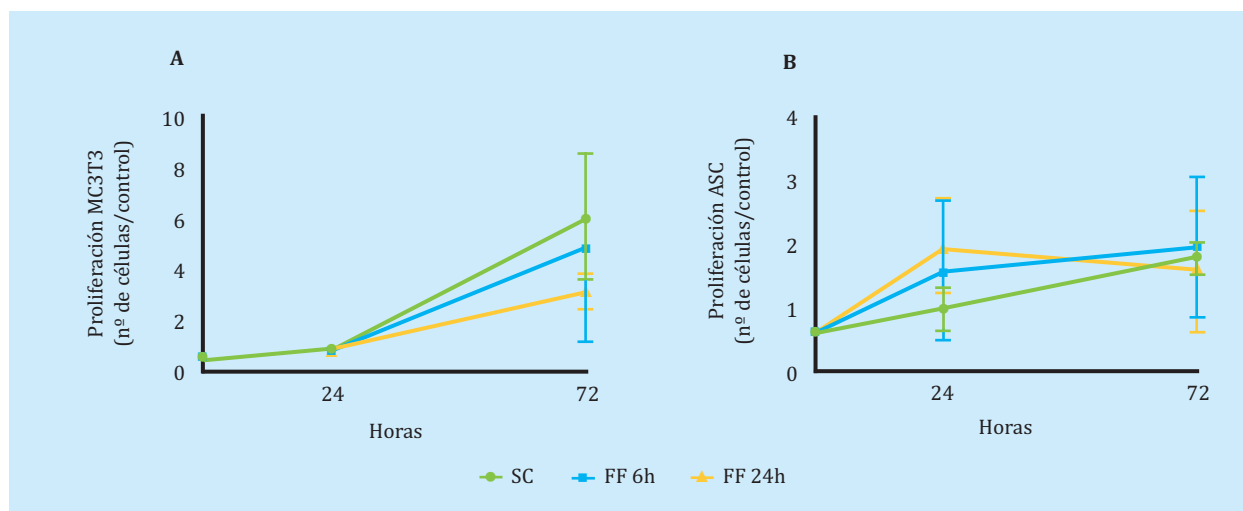


Figura 2. Migración de células MC3T3-E1. Imágenes representativas correspondientes a la migración de MC3T3-E1 en cada una de las condiciones de estudio (A-C). Número de células por campo de la migración de MC3T3 en ausencia y presencia de los medios condicionados de estudio (D). Los valores son la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes por triplicado. **p<0,001 vs. control estático****

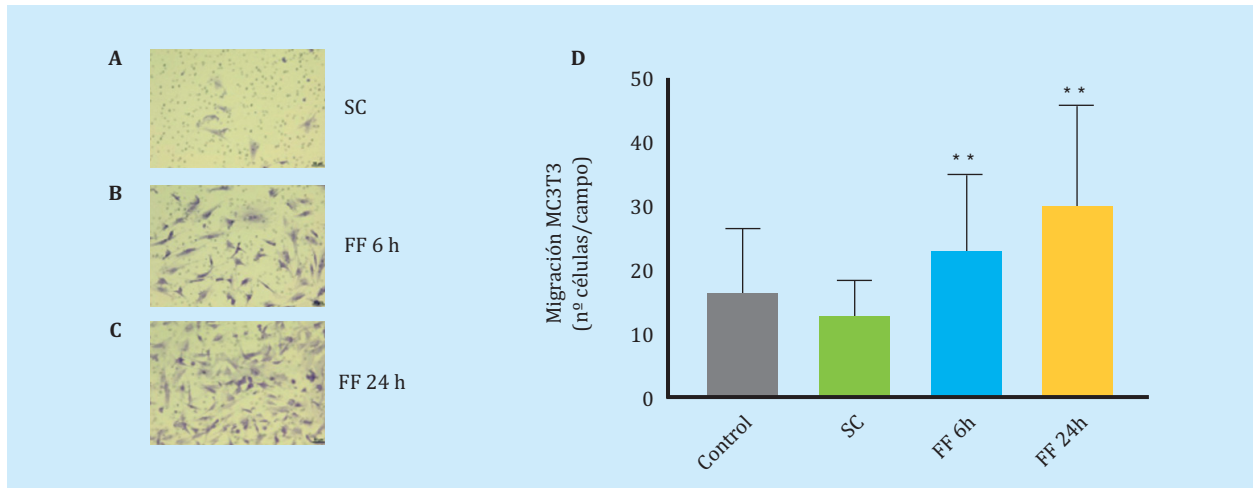


Figura 3. Migración de células ASC (células mesenquimales de origen adiposo). Imágenes representativas correspondientes a la migración de ASC en cada una de las condiciones de estudio (A-C). Número de células por campo de la migración de ASC en ausencia y presencia de los medios condicionados de estudio (D). Los valores son la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes por triplicado. **p<0,001 vs. control estático****

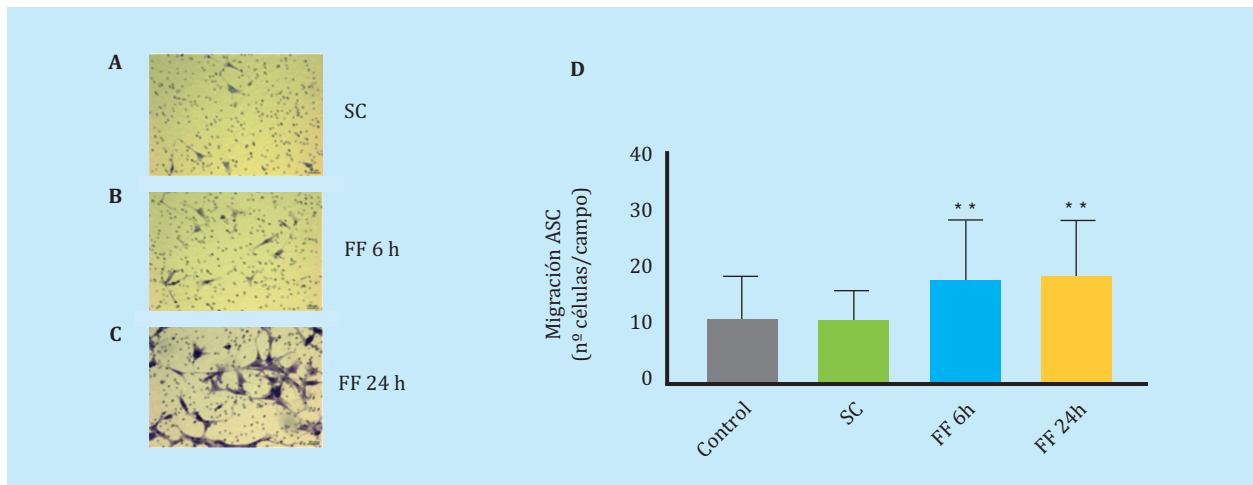


Figura 4. Migración de células RAW 264.7. Imágenes representativas correspondientes a la migración de RAW 264.7 en cada una de las condiciones de estudio (A-C). Número de células por campo de la migración de RAW 264.7 en ausencia y presencia de los medios condicionados de estudio (D). Los valores son la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes por triplicado. **p<0,001 vs. control estático****

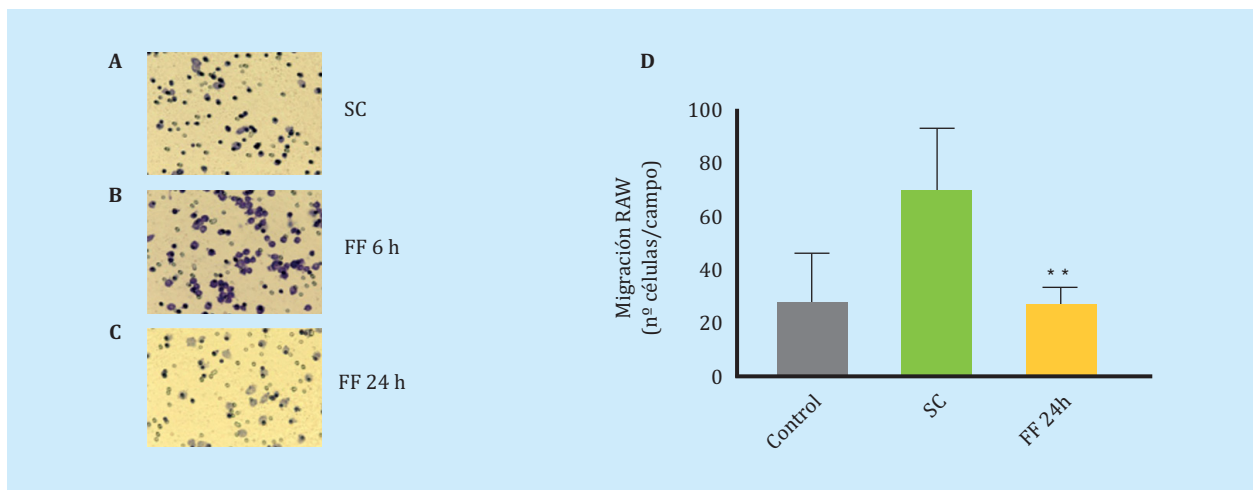
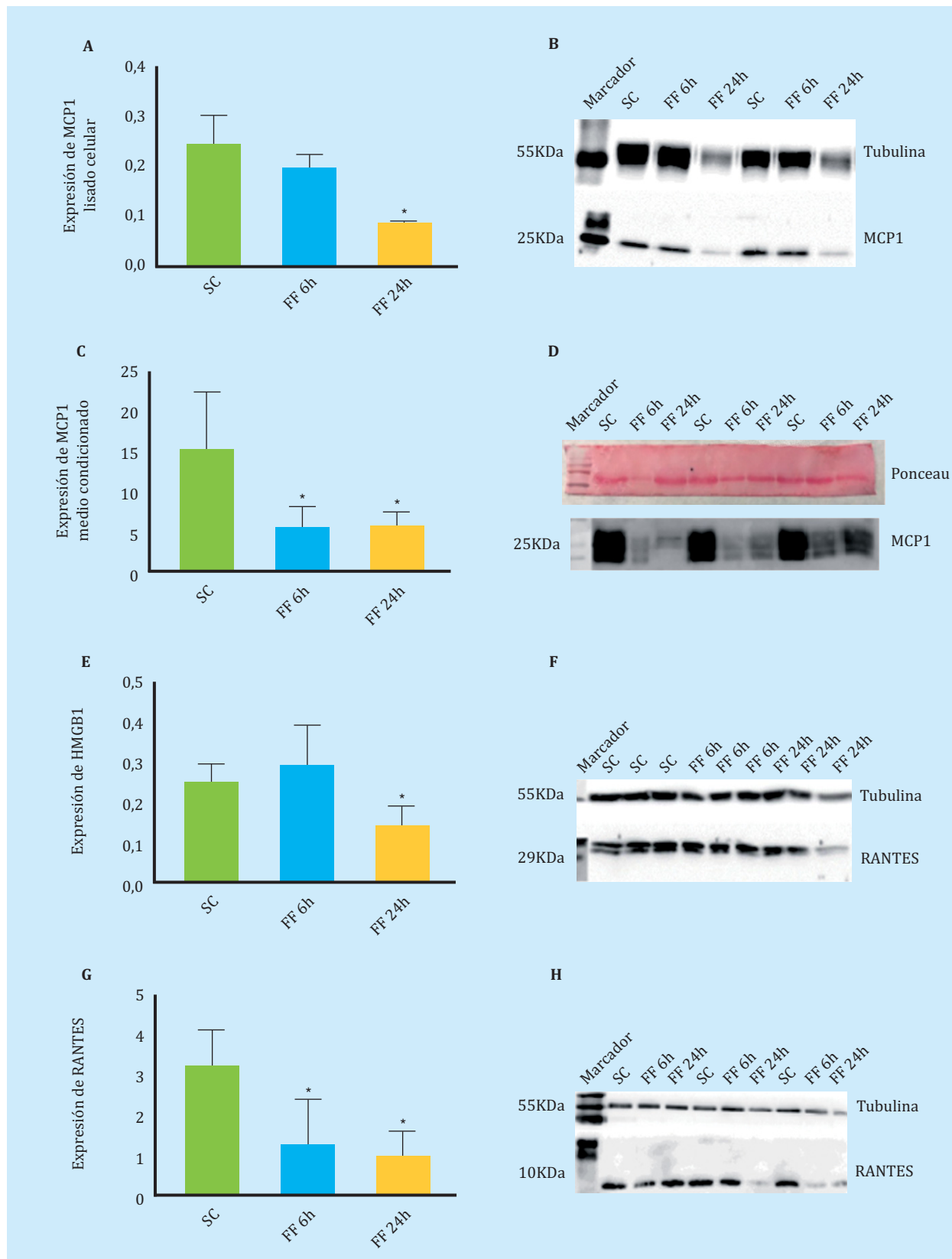


Figura 5. Secreción y expresión de proteínas quimiotácticas medidas por Western Blot (A-C). Expresión de la proteína MCP1 en lisado celular de MLO-Y4 en ausencia de estímulo mecánico (SC) y tras 6 y 24 horas de realizar FF durante 10 minutos (FF6h y FF24h) (C-D). Secreción de la proteína MCP1 en medios condicionados de MLO-Y4 en ausencia y presencia de estímulo mecánico (E-F). Expresión de HMGB1 en lisado celular de MLO-Y4 en ausencia y presencia de estímulo mecánico (G-H). Expresión de RANTES en lisado celular de MLO-Y4 en ausencia y presencia de estímulo mecánico. Los valores densitométricos relativos son la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes por triplicado. * $p < 0,05$ vs. control estático



DISCUSIÓN

El envejecimiento, la pérdida de esteroides sexuales, el exceso de glucocorticoides y ciertas enfermedades óseas como la osteoporosis, provocan un desacoplamiento en el remodelado óseo y una pérdida de la calidad de la masa ósea por la acumulación de osteocitos apoptóticos que preceden el reclutamiento de precursores osteoclasticos y su diferenciación para llevar a cabo el proceso de resorción ósea dirigida^{14,15}.

Sin embargo, niveles fisiológicos de estimulación mecánica como el ejercicio físico mantiene la viabilidad de los osteocitos y, además, como se demuestra en este trabajo, actúa sobre su comportamiento modificando la producción de ciertas quimioquinas y regulando la migración de diferentes tipos celulares.

En nuestros resultados encontramos que la exposición de las células preosteoblásticas MC3T3-E1 y de las células mesenquimales preadiposas humanas a medios condicionados de células osteocíticas MLO-Y4 de ratón estimuladas mecánicamente no afecta a su proliferación, pero si aumenta su capacidad migratoria. Estudios anteriores ya evidenciaron que el medio condicionado de los osteocitos estimulados mecánicamente es capaz de reclutar osteoprogenitores (células mesenquimales y osteoblastos) y promover el compromiso del linaje osteogénico de estas células para reponer los osteoblastos agotados, mejorar la formación ósea y fortalecer el tejido^{16,17}.

Por otra parte, nuestros resultados señalan una disminución de la migración de los macrófagos RAW 264.7 en presencia de medios condicionados de células MLO-Y4 recogidos tras 24 horas de realizarles el *Fluid Flow*. Lo que corrobora lo observado por otros autores que in-

dican que dicho medio condicionado también es capaz de inhibir la osteoclastogénesis¹⁸.

Todo esto sugiere un mecanismo de retroalimentación negativa mediado por factores paracrinos que regularían el proceso de formación y resorción del hueso. Por ello, comprobamos si ciertas quimioquinas seleccionadas intervienen en este proceso a través de ensayos de *Western Blot* tanto de las células osteocíticas estimuladas mecánicamente como de los medios condicionados. Según nuestros resultados, aunque se observa una disminución significativa de la proteína quimiotáctica de monocitos de tipo 1 (MCP-1), de la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1) y de la proteína quimiotáctica RANTES en los lisados celulares de MLO-Y4 estimuladas mecánicamente, no parecen estar directamente asociadas con la migración de las células formadoras y repobladoras del hueso.

No obstante, a diferencia de lo que ocurre en nuestro trabajo, hay estudios previos que señalan que la HMGB1 es liberada en el entorno extracelular mediante la secreción activa de células estimuladas¹⁹ y promueve la migración y diferenciación osteogénica de las MSC^{9,20}. En el caso de la MCP-1, se ha observado que las células madre mesenquimales de la médula ósea migran en respuesta a esta quimiocina²¹. Y hay hallazgos que indican que la RANTES es capaz de provocar la migración de diferentes tipos celulares, entre ellos las células madre mesenquimales de médula ósea, mediante la inducción de autofagia²²⁻²⁴.

Para futuras investigaciones, sería necesario realizar un estudio proteómico de los medios condicionados de los osteocitos tanto sin estímulo como con estímulo mecánico para profundizar en los procesos de comunicación de los osteocitos con su entorno.



Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre JJ, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res.* 2006;21(4):605-15.
2. Hoey DA, Kelly DJ, Jacobs CR. A role for the primary cilium in paracrine signaling between mechanically stimulated osteocytes and mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412(1):182-7.
3. Klein-Nulend J, Bakker AD, Bacabac RG, Vatsa A, Weinbaum S. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone.* 2013;54(2):182-90.
4. de Castro LF, Maycas M, Bravo B, Esbrit P, Gortazar A. VEGF Receptor 2 (VEGFR2) Activation Is Essential for Osteocyte Survival Induced by Mechanotransduction. *J Cell Physiol.* 2015;230(2):278-85.
5. Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, et al. Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem.* 2006;281(42):31720-8.
6. Yavropoulou MP, Yovos JG. The molecular basis of bone mechanotransduction. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2016;16(3):221-36.
7. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(1):25-34.
8. Gortazar AR, Martin-Millan M, Bravo B, Plotkin LI, Bellido T. Crosstalk between caveolin-1/extracellular signal-regulated kinase (ERK) and β -catenin survival pathways in osteocyte mechanotransduction. *J Biol Chem.* 2013;288(12):8168-75.
9. Feng L, Xue D, Chen E, Zhang W, Gao X, Yu J, et al. HMGB1 promotes the secretion of multiple cytokines and potentiates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/MAPK signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2016;12(6):3941-7.
10. Zhao H, Chen D, Cao R, Wang S, Yu D, Liu Y, et al. Alcohol consumption promotes colorectal carcinoma metastasis via a CCL5-induced and AMPK-pathway-mediated activation of autophagy. *Sci Rep.* 2018;8(1):8640.
11. Michael Delaine-Smith R, Javaheri B, Helen Edwards J, Vazquez M, Rumney RM. Preclinical models for in vitro mechanical loading of bone-derived cells. *Bonekey Rep.* 2015;19;4:728.
12. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.
13. Kato Y, Windle JJ, Koop BA, Mundy GR, Bonewald LF. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res.* 1997;12(12):2014-23.
14. Lee K, Kim H, Kim JM, Kim JR, Kim KJ, Kim YJ, et al. Systemic transplantation of human adipose-derived stem cells stimulates bone repair by promoting osteoblast and osteoclast function. *J Cell Mol Med.* 2011;15(10):2082-94.
15. Kogianni G, Mann V, Noble BS. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J Bone Miner Res.* 2008;23(6):915-27.
16. Brady RT, O'Brien FJ, Hoey DA. Mechanically stimulated bone cells secrete paracrine factors that regulate osteoprogenitor recruitment, proliferation, and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;459(1):118-23.
17. Turner CH, Owan I, Alvey T, Hulman J, Hock JM. Recruitment and proliferative responses of osteoblasts after mechanical loading in vivo determined using sustained-release bromodeoxyuridine. *Bone.* 1998;22(5):463-9.
18. Suzuki N, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Kitagawa Y. Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med.* 2008;21(3):291-6.
19. Naglova H, Bucova M. HMGB1 and its physiological and pathological roles. *Bratisl Lek Listy.* 2012;113(3):163-71.
20. Xue D, Zhang W, Chen E, Gao X, Liu L, Ye C, et al. Local delivery of HMGB1 in gelatin sponge scaffolds combined with mesenchymal stem cell sheets to accelerate fracture healing. *Oncotarget.* 2017;8(26):42098-115.
21. Ryan CM, Brown JA, Bourke E, Prendergast AM, Kavanagh C, Liu Z, et al. ROCK activity and the β complex mediate chemotactic migration of mouse bone marrow-derived stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:136.
22. Lechner J, von Baehr V. Chemokine RANTES/CCL5 as an unknown link between wound healing in the jawbone and systemic disease: is prediction and tailored treatments in the horizon? *EPMA J.* 2015;6(1):10.
23. Lu L, Zhang X, Zhang M, Zhang H, Liao L, Yang T, et al. RANTES and SDF-1 Are Keys in Cell-based Therapy of TMJ Osteoarthritis. *J Dent Res.* 2015;94(11):1601-9.
24. Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindle L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone.* 2005;36(5):840-53.