

低强度高频振动对人牙周膜干细胞成骨分化能力的影响

白坤宏¹, 胡诚¹, 李青青², 王菲¹

(1. 西安交通大学口腔医院 正畸科,
西安交通大学口腔医学院 陕西省颅颌面精准医学研究重点实验室, 陕西 西安 710004;
2. 深圳市同步齿科医疗股份有限公司 同步口腔门诊部, 广东 深圳 518000)

[摘要] 目的: 研究低强度高频振动(low-magnitude high frequency vibration, LMHFV)对人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)增殖、迁移、成骨分化能力的影响。方法: 体外分离培养 hPDLSCs; 流式细胞术检测间充质干细胞表面标志物; 加载 LMHFV(加速度=0.3 g, 频率=40 Hz, 时间=15 min/24 h)刺激后, 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖能力, 通过细胞划痕实验检测细胞迁移能力; 通过 qRT-PCR、Western 免疫印迹检测成骨相关基因、蛋白表达水平, 通过茜素红染色检测细胞成骨分化能力。采用 SPSS 21.0 软件包对数据进行统计学分析。结果: 加载振动刺激后, hPDLSCs 的增殖能力增强, 迁移能力上升; RUNX2、ALP、Col-1、OCN 的 mRNA 表达量和蛋白表达量均上升, 茜素红染色结果与 qRT-PCR、Western 免疫印迹结果一致。结论: LMHFV 可提高 hPDLSCs 的增殖、迁移能力和成骨分化能力。

[关键词] 振动; 牙周膜干细胞; 增殖; 成骨分化

[中图分类号] R781.4

[文献标志码] A

DOI: 10.19439/j.sjos.2019.05.006

Effect of low-magnitude high frequency vibration on osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells BAI Kun-hong¹, HU Cheng¹, LI Qing-qing², WANG Fei¹. (1. Department of Orthodontics, Stomatological Hospital of Xi'an Jiaotong University, Key Laboratory of Shaanxi Province for Craniofacial Precision Medicine Research, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province; 2. Shenzhen Top Dental, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China)

[Abstract] **PURPOSE:** To investigate the effect of low-magnitude high frequency vibration (LMHFV) on proliferation, migration ability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs). **METHODS:** hPDLSCs were isolated from premolar and randomized into vibration culture group (magnitude: 0.3 g; frequency: 40 Hz; time: 15 min/24 h) and static culture group. CCK-8 was used to identify the proliferation of hPDLSCs. Wound-healing assay was used to evaluate migration ability of hPDLSCs. The osteogenesis gene expression was analyzed by RT-PCR, and the osteogenesis protein expression was analyzed by Western blot. The osteogenesis differentiation capability was evaluated by alizarin red staining. The data were analyzed using SPSS 21.0 software package. **RESULTS:** After LMHFV, the proliferation and migration ability of hPDLSCs were increased. The expression level of RUNX2, ALP, Col-1, and OCN was significantly augmented under LMHFV. Alizarin red staining and Western blot proved the same trend. **CONCLUSIONS:** The results demonstrate that LMHFV can promote hPDLSCs proliferation, migration ability and osteogenic differentiation.

[Key words] Vibration; Periodontal ligament stem cells; Proliferation; Osteogenic differentiation

Shanghai J Stomatol, 2019, 28(5): 478-483.

慢性牙周炎是一种发病率较高的牙周组织疾病, 可造成牙周支持组织丧失^[1]。对患者进行牙周治疗之后, 丧失的牙周支持组织恢复能力有限, 尤其是牙

槽骨。牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)是一种来源于牙周组织的间充质干细胞, 具有多向分化潜能, 是目前牙周组织工程的主要种子细胞之一^[2]。如何促进 hPDLSCs 成骨分化, 修复牙槽骨缺损, 是牙周组织工程的重要研究内容。

近年来, 利用振动刺激尤其是低强度高频率振动促进成骨多有报道。低强度高频率振动 (low-

[收稿日期] 2018-08-17; [修回日期] 2018-11-28

[基金项目] 陕西省牙颌疾病临床医学研究中心开放课题 (2017YHJB01)

[作者简介] 白坤宏(1991-), 男, 硕士, E-mail: bkh1991@163.com

[通信作者] 王菲, E-mail: wf751022@mail.xjtu.edu.cn

©2019 年版权归《上海口腔医学》编辑部所有

magnitude high frequency vibration, LMHFV) 是指加速度 $<1\text{ g}$, 频率 $=20\sim 90\text{ Hz}$ 的机械振动^[3]。近年来的一系列研究证实, LMHFV 可以促进骨髓间充质干细胞的成骨分化^[4]、改善软骨细胞对机械力的应答^[5]; 并可促进骨质疏松、骨折等疾病的恢复^[6-8]。多数研究发现, 当振动加速度为 0.3 g 、振动频率为 $40\sim 60\text{ Hz}$ 时, 机体表现出较好的生理应答^[5, 8-9]。在 LMHFV 的早期研究中, Rubin 等^[10]采用振动刺激(加速度 $=0.3\text{ g}$, 振动频率 $=20\sim 50\text{ Hz}$, 20 min/d)进行动物实验。研究结果显示, 实验组动物骨小梁的数量和密度显著增加。Prè 等^[11]、Zhang 等^[12]、Lu 等^[13]应用低强度高频率振动对人体细胞进行体外 LMHFV 加载实验, 均得到稳定的实验结果。但关于 LMHFV 对 hPDLSCs 生物学特性影响的研究尚不多见。

本研究采用 LMHFV(加速度 $=0.3\text{ g}$, 频率 $=40\text{ Hz}$, 15 min/d) 振动刺激 hPDLSCs, 探讨 LMHFV 对 hPDLSCs 增殖、迁移能力以及成骨分化能力的影响, 旨在为低强度高频振动用于慢性牙周病患者的牙周修复治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

α MEM 培养基 (Hyclone, 美国); 胎牛血清 (Gibco, 美国); I 型胶原酶、中性蛋白酶、 1000 U/mL 青霉素、 1000 U/mL 链霉素、CCK-8 试剂盒(上海七海复泰生物科技有限公司); β 甘油磷酸钠、地塞米松、抗坏血酸、Trizol Regent (Invitrogen, 美国); PrimeScript™ RT-PCR kit 反转录试剂盒、Syber Green 荧光定量 PCR 试剂盒(Takara, 日本); Z45CT 垂直振动机 (广州美亦丰试验设备有限公司); CO_2 恒温培养箱、酶联免疫检测仪 (Thermo, 美国); RealTime PCR 仪(Biosystems 7500, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 hPDLSCs 的分离培养 收集 12~18 岁因正畸需要拔除的前磨牙, PBS 冲洗至牙根洁净, 刮取根中 1/3 牙周膜组织, 加入 3 mg/mL I 型胶原酶 $500\ \mu\text{L}$ 及 4 mg/mL 中性蛋白酶 $500\ \mu\text{L}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 消化 30 min 。等体积含 10% 胎牛血清(FBS)的 α MEM 培养基终止消化, 1000 r/min 离心 5 min , 弃上清。加入含 10% FBS 的 α MEM 培养基重悬, 接种于培养瓶, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 5% CO_2 条件孵箱培养。原代细胞汇合达 80% 时, 进行传代培养。

1.2.2 hPDLSCs 间充质干细胞表面标志物检测 取第 3 代细胞, 以 5×10^5 个细胞/ $200\ \mu\text{L}$ 密度转移至 1.5 mL EP 管中, PBS 冲洗 2 次, 分别加入 $2\ \mu\text{L}$ 鼠抗人 CD105、CD90、CD29、CD44、CD45、CD34 抗体, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 1 h , PBS 冲洗 3 次, 流式细胞仪检测细胞表面标志物的表达。

1.2.3 hPDLSCs 加载 LMHFV 刺激 取第 3 代细胞, 以 1×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板, 随机分为 LMHFV(V)组(vibration culture group)、静态培养(S)组(static culture group)。将垂直振动机置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 5% CO_2 条件孵箱内, V 组 6 孔板固定于振动台, 以加速度 $=0.3\text{ g}$ 、频率 $=40\text{ Hz}$ 、 15 min/d 培养(图 1)。S 组 6 孔板置于相同条件孵箱培养。

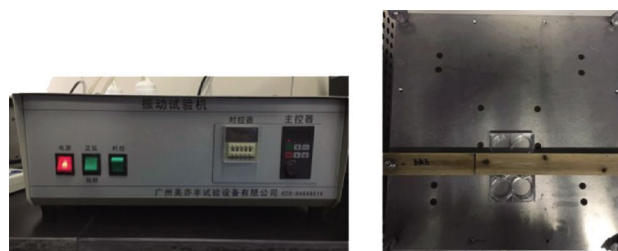


图 1 LMHFV 加载体系

Figure 1 LMHFV culture system and fixture

1.2.4 hPDLSCs 增殖能力检测 取第 3 代细胞, 以 1500 个细胞/孔接种于 96 孔板, 随机分为 V 组、S 组, 在相应条件下培养 13 d 。分别于 $1, 3, 5, 7, 9, 11, 13\text{ d}$, 每孔加入 $10\ \mu\text{L}$ CCK-8 试剂, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 5% CO_2 孵育 2 h , 酶标仪检测 450 nm 波长的吸光度(A)值。

1.2.5 hPDLSCs 迁移能力检测 取第 3 代细胞, 以 2×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板, 随机分为 V 组、S 组。待细胞汇合至 80% , 用 1 mL 枪头垂直于孔板底, 划 3 条纵线, 尽量保持间距一致; 加入无血清培养基, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 5% CO_2 条件孵箱培养; 分别于 $0, 12, 24\text{ h}$ 时选取同一视野拍照记录, 随后使用 Image J 分析细胞迁移量。

1.2.6 hPDLSCs 成骨相关基因检测 取第 3 代细胞, 以 1×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板, 随机分为 V 组、S 组。待细胞汇合至 60% , 更换成骨诱导液(含 10% FBS 的 α -MEM 培养基, 加 β 甘油磷酸钠 10 mmol/L 、抗坏血酸 50 g/mL 、地塞米松 $1\times 10^{-8}\text{ mol/L}$)进行成骨诱导。分别于成骨诱导的 $1, 7, 14\text{ d}$, 使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA; 控制 RNA 浓度在 $300\sim 500\text{ ng}/\mu\text{L}$, A_{260}/A_{280} 为 $1.8\sim 2.0$ 。使用 PrimeScript™ RT-PCR kit 反转录试剂盒合成 cDNA, 使用 Syber Green 荧光定

量 PCR 试剂盒进行 qPCR 检测。实验所用引物序列如表 1 所示。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Specific primers for PCR

基因	引物序列(5'-3')
β-actin	F: TGGCACCCAGCACAATGAA
	R: CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA
RUNX-2	F: CCCGTGGCCTTCAAGGT
	R: CGTTACCCGCCATGACAGTA
ALP	F: GGACCATTCCACGTCTTCAC
	R: CCTTGTAGCCAGGCCCATTC
Col-1	F: CCAGAAGAACTGTTACAGCAA
	R: CGCCATACTCGAGGAATC
OCN	F: TGAGAGCCCTCACACTGCTC
	R: CGCCTGGGTCTTCTCACTAC

1.2.7 成骨相关蛋白检测 于成骨诱导第 7 天提取总蛋白,经 BAC 蛋白定量试剂盒对样品进行检测定量,按 30 μg/20 μL 体系加入蛋白上样缓冲液,煮沸 10 min,置于-80℃冰箱待用。制备 SDS-PAGE 胶,依照蛋白分子量大小进行电泳、转膜。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,洗膜后加入一抗,4℃静置过夜。次日洗膜后加入二抗,于室温摇床孵育 2 h,洗膜后于暗室中将 ECL 荧光剂均匀浸湿膜表面,最后进行显影、定影及曝光。

1.2.8 茜素红染色 成骨诱导第 21 天进行茜素红染色(茜素红染液:1 g 茜素红溶于 100 mL 蒸馏水, pH=4.3),弃 6 孔板培养液,蒸馏水冲洗 2 次,60%异丙醇固定,茜素红染液染色 5 min,蒸馏水冲洗,观察并采用酶标仪检测 450 nm 波长的吸光度(A)值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件包对实验数据进行 t 检验, P<0.05 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 hPDLSCs 间充质干细胞表面标志物检测结果

流式细胞仪检测结果显示,hPDLSCs 强阳性表达间充质干细胞表面标志物 CD105、CD90、CD29、CD44; 阴性表达造血系统来源细胞表面标志物 CD45、CD34,表明所分离培养的细胞为间充质来源干细胞(图 2)。

2.2 LMHFV 对 hPDLSCs 增殖能力的影响

CCK-8 实验结果显示,在 3、5、7、9 d 时,

LMHFV 可显著提高 hPDLSCs 的增殖能力(图 3)。

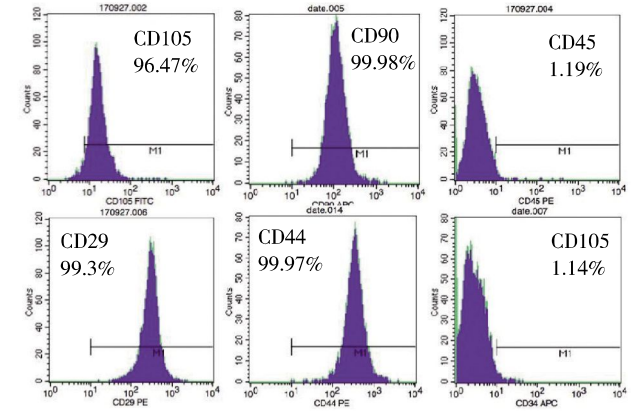


图 2 流式细胞仪检测 hPDLSCs 细胞表面标志物的表达
Figure 2 Detection of mesenchymal stem cell phenotype by flow

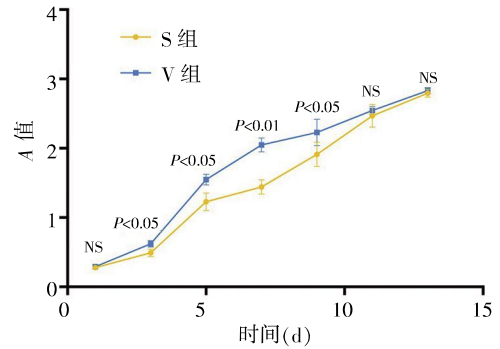


图 3 LMHFV 促进 hPDLSCs 增殖
Figure 3 Proliferation of hPDLSCs was increased by LMHFV

2.3 LMHFV 对 hPDLSCs 迁移能力的影响

细胞划痕实验结果显示,在 12、24 h 时, LMHFV 可显著提高 hPDLSCs 的迁移能力(图 4)。

2.4 LMHFV 对 hPDLSCs 成骨分化的影响

2.4.1 qRT-PCR 结果 成骨诱导 1 d,S 组与 V 组成骨相关基因的 mRNA 表达量无显著差异;成骨诱导 7 d,ALP、Col-1、RUNX-2、OCN 的表达均显著增高;成骨诱导 14 d,ALP、RUNX-2、OCN 的表达显著提高。说明 LMHFV 可以促进 hPDLSCs 成骨相关基因的表达(图 5)。

2.4.2 Western 免疫印迹结果 成骨诱导 7 d,hPDLSCs 成骨相关蛋白量 V 组显著高于 S 组,说明 LMHFV 可以提高 hPDLSCs 成骨相关蛋白的表达(图 6)。

2.4.3 茜素红染色结果 成骨诱导 21 d,倒置显微镜下观察,与 S 组相比,V 组 hPDLSCs 细胞基质内形成的矿化结节面积更大、颜色更深;矿化结节的定量与镜下观察结果一致(图 7)。

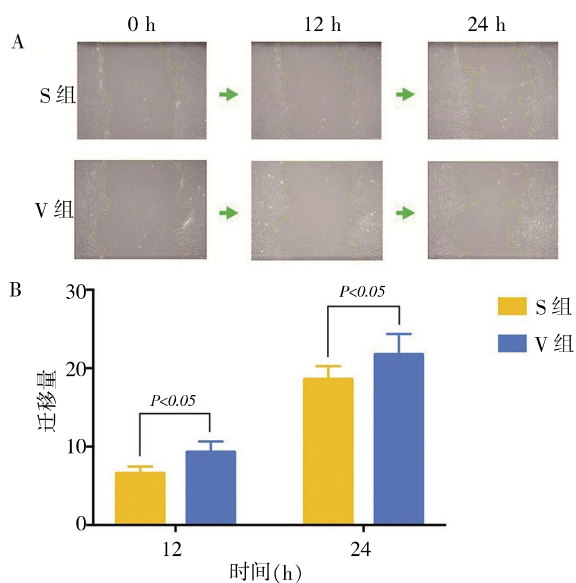


图4 LMHFV提高hPDLSCs的细胞迁移能力。A.细胞迁移镜下观; B.细胞迁移定量分析

Figure 4 Migration ability of hPDLSCs was increased by LMHFV. A. Cell migration under microscope; B. Quantitative analysis of cell migration

以上检测结果说明,LMHFV可提高hPDLSCs的成骨分化能力。

3 讨论

慢性牙周炎患者在进行牙周基础治疗后,牙周刺激因素基本去除,炎症得到控制,但是由于牙周组织的再生能力有限,牙周缺损尤其是牙槽骨缺损的修复主要依赖于手术植骨,或者应用组织工程材料

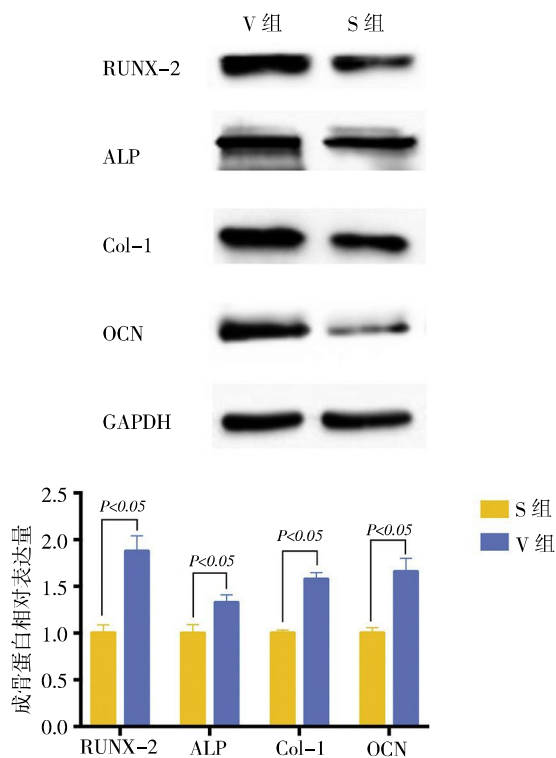


图6 LMHFV提高hPDLSCs成骨相关蛋白的表达

Figure 6 Expression of osteogenic proteins was enhanced by LMHFV

进行修复。应用组织工程技术修复慢性牙周炎患者牙槽骨缺损时,主要面临以下2个难题。其一,炎症的控制。慢性牙周炎患者进行牙周基础治疗后,虽然炎症减轻,并且去除了主要的牙周刺激因素(如菌斑、牙石等),但是牙周组织仍然处于炎性微环境

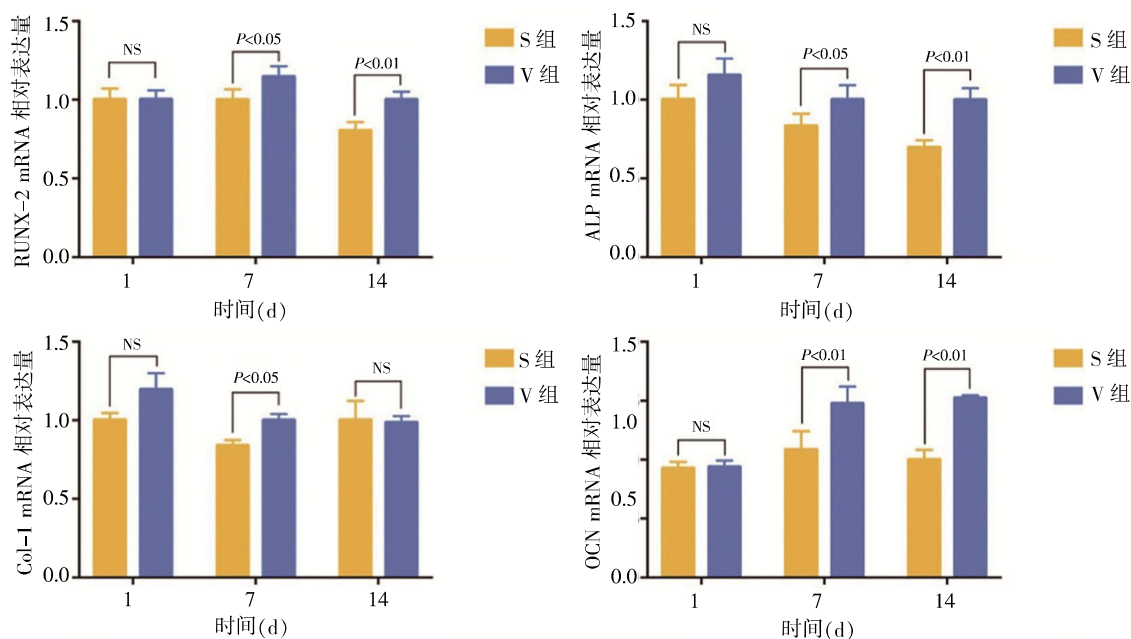


图5 LMHFV促进hPDLSCs成骨相关基因的表达

Figure 5 mRNA expression of osteogenic genes was increased by LMHFV

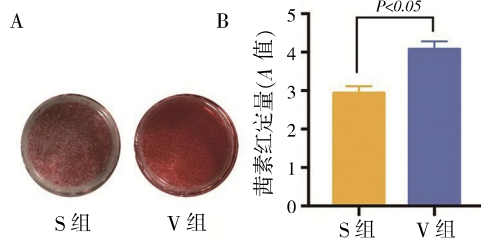


图7 LMHFV提高hPDLSCs的成骨分化能力。A.茜素红染色大体观;B.茜素红染色定量分析

Figure 7 The osteogenesis differentiation capability of hPDLSCs was enhanced by LMHFV. A. Gross observation of alizarin red staining; B. Quantitative analysis of alizarin red staining

中。在炎症微环境中,炎症因子(如IL-1、IL-6、TNF- α 等)会不同程度地抑制牙周间充质干细胞的修复能力,影响牙周组织工程治疗的效果。目前,临床上主要通过通过在牙周基础治疗后应用抗炎药物、定期牙周复诊、口腔卫生宣教等方法控制炎症、巩固治疗效果。其二,提高组织工程种子细胞的性能。如何提升牙周组织工程种子细胞的性能(如细胞增殖、迁移能力、成骨分化能力等),也是牙周组织修复治疗的关键。人体的细胞存在于三维环境中,时刻受到外界机械应力的作用,而机体需要依赖这些外界的刺激变成机体内部的机械力信号,进而将其转化为电化学或生物化学信号,进一步调节更为广泛的机体反应^[14-15]。Mauney等^[16]的研究表明,对间充质干细胞如人骨髓间充质干细胞(human bone marrow stem cells, hBMSCs)施加适当的机械力刺激,可对其成骨分化、成软骨分化、增殖等能力产生积极影响。振动是一种十分重要的机械力形式,近年的研究表明,振动刺激在机体生理、心理、精神以及病理的发展过程中起着重要作用^[17-18]。

LMHFV对细胞增殖的影响,目前尚无统一认识。Luu等^[19]对C57BL/6J小鼠加载微振动刺激(加速度=0.2 g,频率=90 Hz,15 min/d,5 d/周),持续6周,发现微振动刺激促进了小鼠间充质干细胞的增殖。Kim等^[20]的研究发现,在三维培养条件下,对人间充质干细胞加载微振动刺激(加速度=0.3 g,频率=30~40 Hz,10 min/d),可显著提高其增殖能力。但Zhou等^[21]对大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow stem cells, rBMSCs)加载微振动刺激(加速度=0.3 g,频率=40 Hz,30 min/12 h),发现微振动会在一定程度上抑制rBMSCs增殖。本实验通过对hPDLSCs加载LMHFV(加速度=0.3 g,频率=40 Hz,15 min/d)后发现,V组hPDLSCs的增殖能力较S组显著提高。因

此认为,振动刺激对细胞生物学活性的影响可能与振动频率、加力时间等因素有关,而且不同的培养环境也会影响细胞的增殖能力。

Runt相关转录因子2(runt-related transcription factor-2, RUNX-2)是骨发育过程中重要的转录因子,对成骨细胞分化、软骨细胞成熟、破骨细胞分化及细胞外基质的分泌都有重要的调控作用。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是成骨细胞的一种外酶,其表达活性是成骨细胞分化的一个明显特征。ALP在机体中的主要生理功能是在成骨过程中水解磷酸酯,为羟基磷灰石的沉积提供必要的磷酸;同时水解焦磷酸盐,解除其对骨盐形成的抑制作用,有利于成骨作用。I型胶原(collagen type I, Col-1)是骨组织细胞外基质的主要成分,具有诱导成骨分化的能力,在骨组织矿化过程中起着重要作用。骨钙素(osteocalcin, OCN)是骨基质中重要的胶原蛋白,与骨组织的成熟有关。本实验通过hPDLSCs加载LMHFV,比较V组与S组的成骨相关指标,发现RUNX-2、ALP、Col-1、OCN的mRNA表达量均显著增高,且RUNX-2、ALP、Col-1、OCN的蛋白表达量也显著增加。经茜素红染色后,V组的A值显著高于S组。说明LMHFV可在一定程度上提高hPDLSCs的成骨分化能力。

上述结果说明,LMHFV可提高hPDLSCs的成骨分化能力,并且对其增殖能力、细胞迁移能力也有促进作用,这为低强度高频率振动用于慢性牙周病患者的牙周修复治疗提供了理论基础。近几年,国外将微振动装置用于口腔正畸治疗中,以实现牙的快速移动,但并未得到稳定的治疗效果^[21-22],原因可能是微振动不一定加速牙槽骨的破骨吸收,而是仅仅提高其成骨能力,但加速正畸牙移动的牙槽骨改建需要成骨与破骨双重作用。由于牙周组织所处的微环境十分特殊,且不同患者的牙周缺损程度、缺损类型以及炎症控制情况均有所差异,因此,LMHFV的临床应用有待进一步探讨。

利益冲突声明:无。

作者贡献声明:白坤宏负责实验设计、数据收集及论文撰写;胡诚负责文献查阅、资料收集;李青青负责样本采集;王菲负责实验设计及论文修改。

[参考文献]

- [1] Reich E, Hiller KA. Reasons for tooth extraction in the western states of Germany[J]. Community Dent Oral Epidemiol, 2010, 21(6):

- 379–383.
- [2] Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament [J]. *Lancet*, 2004, 364(9429): 149–155.
- [3] Zhou Y, Guan X, Zhu Z, et al. Osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on bone-derived scaffolds: effect of microvibration and role of ERK1/2 activation [J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 22(7): 12–25.
- [4] Zhao Q, Lu Y, Yu H, et al. Low magnitude high frequency vibration promotes adipogenic differentiation of bone marrow stem cells *via* P38 MAPK signal [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0172954.
- [5] Weber JF, Waldman SD. Stochastic resonance is a method to improve the biosynthetic response of chondrocytes to mechanical stimulation [J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(2): 231–239.
- [6] Judex S, Lei X, Han D, et al. Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude [J]. *J Biomech*, 2007, 40(6): 1333–1339.
- [7] Ozcivici E, Luu Y K, Rubin C T, et al. Low-level vibrations retain bone marrow's osteogenic potential and augment recovery of trabecular bone during reambulation [J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11178.
- [8] Garman R, Gaudette G, Donahue LR, et al. Low-level accelerations applied in the absence of weight bearing can enhance trabecular bone formation [J]. *J Orthop Res*, 2010, 25(6): 732–740.
- [9] Rubin CT, Capilla E, Luu YK, et al. Adipogenesis is inhibited by brief, daily exposure to high-frequency, extremely low-magnitude mechanical signals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(45): 17879–17884.
- [10] Rubin C, Turner AS, Müller R, et al. Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention [J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(2): 349–357.
- [11] Prè D, Ceccarelli G, Gastaldi G, et al. The differentiation of human adipose-derived stem cells (hASCs) into osteoblasts is promoted by low amplitude, high frequency vibration treatment [J]. *Bone*, 2011, 49(2):295–303.
- [12] Zhang C, Li J, Zhang L, et al. Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells [J]. *Arch Oral Biol*, 2012, 57(10): 1395–1407.
- [13] Lu Y, Zhao Q, Liu Y, et al. Vibration loading promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells *via* p38 MAPK signaling pathway [J]. *J Biomech*, 2018, 71: 67–75.
- [14] Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again [J]. *FASEB J*, 2006, 20(7): 811–827.
- [15] Jaalouk DE, Lammerding J. Mechanotransduction gone awry [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(1): 63–73.
- [16] Mauney JR, Sjostrom S, Blumberg J, et al. Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds *in vitro* [J]. *Calcif Tissue Int*, 2004, 74(5): 458–468.
- [17] Chan ME, Uzer G, Rubin CT. The potential benefits and inherent risks of vibration as a non-drug therapy for the prevention and treatment of osteoporosis [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2013, 11(1): 36–44.
- [18] Jacobs PL, Burns P. Acute enhancement of lower-extremity dynamic strength and flexibility with whole-body vibration [J]. *J Strength Cond Res*, 2009, 23(1): 51–57.
- [19] Luu YK, Capilla E, Rosen CJ, et al. Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 24(1): 50–61.
- [20] Kim IS, Song YM, Lee B, et al. Human mesenchymal stromal cells are mechanosensitive to vibration stimuli [J]. *J Dent Res*, 2012, 91(12): 1135–1140.
- [21] Yadav S, Dobie T, Assefnia A, et al. Effect of low-frequency mechanical vibration on orthodontic tooth movement [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2015, 148(3): 440–449.
- [22] Jing D, Xiao J, Li X, et al. The effectiveness of vibrational stimulus to accelerate orthodontic tooth movement: a systematic review [J]. *BMC Oral Health*, 2017, 17(1): 143.