

细胞外基质硬度调控间充质干细胞分化

吕洪伟^{1,2} 李莉莎^{1*} 张银^{1,2} 戎月^{1,3} 陈志深^{1,2} 杨子昊^{1,2} 孙美玉¹ 李玉林^{1*}

(¹吉林大学基础医学院, 病理生物学教育部重点实验室, 长春 130021;

²吉林大学公共卫生学院, 长春 130021; ³吉林大学临床医学院, 长春 130021)

摘要 新近研究表明, 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的物理性质, 特别是硬度或弹性, 能对细胞的黏附、铺展、迁移、增殖、分化和凋亡等多种功能和行为产生重要影响。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是组织工程和细胞治疗的理想种子细胞。ECM硬度可诱导MSCs向脂肪、软骨、神经、肌肉和骨等方向分化。该文综合论述了ECM硬度对干细胞分化的影响, 涵盖了构建ECM硬度的测量、调控与表征等, 不同培养条件下干细胞对硬度的响应和分化以及硬度和其他因素的联合作用; 在此基础上, 进一步论述了干细胞分化过程中细胞感应ECM硬度并转化为生物学信号的机制和信号通路。该文还总结了在ECM硬度调控干细胞分化行为领域最新的研究进展情况, 较为系统地分析了材料学、细胞生物学、分子生物学水平的主要影响因素, 并对本领域未来需要重点研究的问题进行了展望。

关键词 细胞外基质硬度; 间充质干细胞; 分化; 机制

Extracellular Matrix Stiffness Modulates the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells

Lü Hongwei^{1,2}, Li Lisha^{1*}, Zhang Yin^{1,2}, Rong Yue^{1,3}, Chen Zhishen^{1,3}, Yang Zihao^{1,2}, Sun Meiyu¹, Li Yulin^{1*}

(¹The Key Laboratory of Pathobiology, Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130021, China; ²College of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China; ³College of Clinical Medicine, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract Recent studies have suggested that the physical characteristics of extracellular matrix (ECM), especially the stiffness or elasticity, played an important role in regulating cellular functions and behaviors, including adhesion, spreading, migration, proliferation, differentiation, apoptosis and so on. Mesenchymal stem cells (MSCs) are important for cell therapy and tissue engineering. ECM stiffness can induce MSCs into cells of adipose tissue, cartilage, nerve, muscle, bone and others. This review discussed the studies of the effect of ECM stiffness on stem cell lineage specification, covering the materials and techniques to fabricate substrates, methods of controlling stiffness, properties, the response to ECM stiffness and the differentiation of stem cells in different culture conditions, as well as the combined effect of ECM stiffness and other biophysical and biochemical cues; On this basis, we further shed light on the mechanism and the signaling pathway of the reaction of stem cells to ECM stiffness and transduction of stiffness to biological signals during differentiation. This review summarized the latest research advancement in the field of differentiation behavior of stem cells modulated by ECM stiffness

收稿日期: 2013-11-01 接受日期: 2013-12-23

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB606201)和吉林大学青年科技创新基金(批准号: 450060487413)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0431-85793741, lilisha@jlu.edu.cn; Tel: 0431-85619481, E-mail: ylli@jlu.edu.cn

Received: November 1, 2013 Accepted: December 23, 2013

This work was supported by the State Key Development Program for Basic Research of China (Grant No.2011CB606201) and the Youth Technology Innovation Fund of Jilin University (Grant No.450060487413)

*Corresponding authors. Tel: +86-431-85793741, lilisha@jlu.edu.cn; Tel: +86-431-85619481, E-mail: ylli@jlu.edu.cn

网络出版时间: 2014-03-03 15:32 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.03.0359.html>

and presented a relatively systematic analysis of the major factors in the level of materials science, cell biology and molecular biology, as well as the prospects of some key problems to be studied in this field.

Key words extracellular matrix (ECM) stiffness; mesenchymal stem cells (MSCs); differentiation; mechanism

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)能对细胞的黏附、铺展、迁移、增殖、分化和凋亡等^[1-5]多种行为和功能产生重要影响。在组织工程材料的构建中, 为了模仿生理条件下细胞的生存环境, 陆续出现了人工合成的ECM替代物^[6-7]。ECM的物理性质可以影响细胞的多种生物学行为, 特别是其中的硬度(stiffness)。硬度是衡量材料软硬程度的一项重要性能指标, 它可理解为是材料抵抗弹性形变、塑性形变或破坏的能力。人体组织的硬度各有差异(图1)。目前, ECM硬度对细胞(尤其是干细胞)的影响及其中的信号转导机制成为研究热点。本文就ECM硬度在MSCs分化中的关键作用及其机制的研究进展作一综述, 旨在为新型生物医学材料的设计提供科学根据。

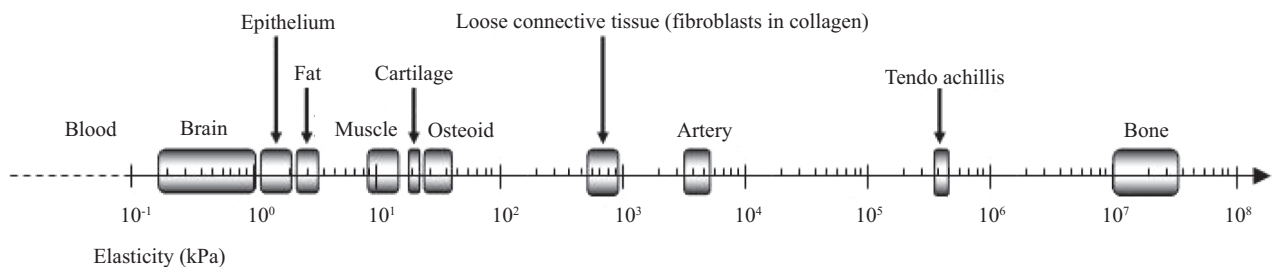
1 ECM硬度

硬度与模量关系很大, 但是模量是材料本体的性质, 而硬度更多的表现材料表面的性质。由于目前对于ECM硬度的研究基本上采用均质材料, 故大部分情况下可用杨氏模量(Young's modulus, E)或弹性模量(Elastic modulus, E)表征材料的硬度。杨氏模量是1807年由英国物理学家Thomas Young提出的描述固体材料抵抗形变能力和衡量材料硬度的物理量^[18]。杨氏模量的大小标志了材料的硬度, 杨氏模量越大硬度越大。对杨氏模量测定来说, 至今国内外还没有一个统一的方法能测试所有的材料的硬度。因为

杨氏模量既与待测材料的性质有关, 也与测量方法以及测量条件有关。不同材料的杨氏模量范围不同, 对测量方法的要求也不一样。而且相同材料在不同的条件下测量, 其杨氏模量值可能不同。依据测量仪器的不同, 测量硬度的方法大致可以分为拉伸法、压缩法、压痕法和旋转流变仪法^[19-21]。除了杨氏模量外, 液化抗剪强度(liquefaction stress), 即能使凝胶液化的最小剪应力, 也是衡量ECM硬度的理想参数^[22]。

ECM硬度的可控性构建是研究的关键环节。目前, 用于构建ECM硬度的化学成分包括聚丙烯酰胺(polyacrylamide, PAAm)、聚苯乙烯、聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)、胶原、琼脂糖凝胶和硅胶等^[7,23-26], 并且不同类型基质的硬度范围和硬度控制方法也有所差异(表1)。其中, PAAm凝胶因为本身的三维网络结构, 并具有一定的亲水性, 不易受微生物腐蚀和酶解, 理化性质稳定, 作为模拟体内细胞生长的理想基质, 应用最广^[24,27-28]。通过控制丙烯酰胺与双丙烯酰胺的比例可构建硬度范围从几百帕到几十万帕的凝胶, 该范围能够真实反映体内细胞生存的硬度。PAAm凝胶的出现为研究ECM硬度对MSCs分化的影响提供了良好的平台^[4,29-32]。

具有一定硬度梯度的基质利于系统研究ECM硬度对MSCs分化的影响。硬度梯度的构建主要通过以下两种方法: (1)基于PDMS交联密度与温度相关的性质, 将凝固前的PDMS垂直至于热板上, PDMS底



脑^[8-9]、上皮组织^[10]、脂肪^[11]、肌肉^[4]、软骨^[12]、类骨质^[4,13]、疏松结缔组织^[14]、动脉^[15]、跟腱^[16]、骨^[17]。

Brain^[8-9], epithelium^[10], fat^[19], muscle^[4], cartilage^[12], osteoid^[4,13], loose connective tissue^[14], artery^[15], tendo achillis^[16], bone^[17].

图1 硬度范围与相应的组织类型

Fig.1 Range of stiffness and relative tissue types

表1 不同类型细胞外基质的硬度范围及硬度控制方法

Table 1 Stiffness range of different types of ECM and methods of controlling ECM stiffness

二维/三维培养 2D/3D culture	细胞外基质类型 ECM type	硬度范围(kPa) Stiffness range (kPa)	控制细胞外基质硬度的方法 Method of controlling ECM stiffness
2D culture	Collagen-I (Col I)	0.1~1.0	The Young's modulus of the gel increased with the collagen concentration ^[26]
	Gtn-HPA-(Tyr) cross-linked with HRP and H ₂ O ₂	0.6~26.8	The storage modulus of the hydrogel was significantly raised by increasing the H ₂ O ₂ concentration ^[39-40]
	Poly (acrylamide-co-acrylic acid) (pACAA) hydrogel	0.5~70.0	The elastic modulus of the hydrogel had a positive correlation with the percentage of cross-linker (bis-acrylamide) used ^[41]
	Polyacrylamide (PAAm)	0.1~80.0	The Young's modulus of the gel was adjusted by varying the concentration of acrylamide and bis-acrylamide ^[4,30]
	Polyalkyl acrylate	250~2 200	The material substrates consist of a vinyl backbone chain with the side groups -COO(CH ₂) _x H, the elastic moduli decreased monotonically as the number of methyl groups in the side chain increased ^[42]
	Polydimethylsiloxane (PDMS)	11~1 100	As the ratio of oligomer [tetra(trimethylsiloxy)] to cross-linker (tetramethyl-tetravinylcyclotetrasiloxane) increased, the Young's modulus of the substrate decreased ^[43]
	Polyethylene glycol (PEG) gel	6~26	The shear modulus of the gel had a linear increase with mixed PEG macromers [4arm-PEG- thiol (SH) , 8arm-PEG- vinylsulfone (VS)] concentrations ^[44]
3D culture	Alginate gel	2.5~30	The elastic modulus of the gel was raised by increasing the concentration of cross-linker (calcium ions) ^[45]
	Collagen-glycosaminoglycan (CG) scaffold	0.5~1.5	The compressive modulus of the scaffold was raised by increasing the concentration of cross-linker (1-ethyl-3-3-dimethyl aminopropyl carbodiimide) ^[46]
	Collagen-hyaluronic acid scaffold	1~10	The elastic modulus of the substrates was modified by adjusting the concentration of 1-ethyl-3 (3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDC) as a cross-linker ^[47]
	HyA-Tyr gel cross-linked with HRP and H ₂ O ₂	5.4~11.8	The compressive modulus of the hydrogel was significantly raised by increasing the H ₂ O ₂ concentration ^[48]
	PEG gel	0.2~59.0	The compressive modulus of the scaffold increased with increasing PEG-tetramethacrylate (PEGTM) monomer mass fraction ^[49]
	PEG nanofiber scaffold	2~15	The storage modulus of scaffold increased with increasing photopolymerization time ^[50]
	PEG-silica gel	0.007~0.100	The liquefaction stress (τ_y) of the gel was proportional to the weight percentage of fumed silica incorporated gel ^[22]

Gtn-HPA-(Tyr): 明胶-对羟基苯丙酸-(酪胺); HRP: 辣根过氧化物酶; HyA-Tyr: 透明质酸-酪胺。

Gtn-HPA-(Tyr): gelatin-hydroxyphenylpropionic acid-(tyramine); HRP: horseradish peroxidase; HyA-Tyr: hyaluronic acid-tyramine.

部的热板(~120 °C)与顶部的环境空气温度(~20 °C)构成温度梯度, 导致PDMS交联密度不同, 从而形成具有一定硬度梯度的PDMS基质^[25]; (2)利用具有径向灰阶的光罩, 通过光聚作用, 使PAAm交联, 构建了具有径向硬度梯度的PAAm凝胶^[33]。近年来, 为模拟MSCs生存的三维物理环境, 出现了一种效果良好的触变性(thixotropic)聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)硅胶基质^[22]。通过调节煅制二氧化硅的量, 可得到不同硬度的基质, 并且利用这种纳米复合材料, 可单独控制物理或化学因素对细胞的影响。与传统聚合凝胶的酶促凝胶化^[34]、化学药品^[35]或光交联^[36]不同的是, 这种材料利用剪切应力液化PEG硅胶, 并

且在硅胶凝固之前, 便可轻易地将MSCs接种到硅胶上。然而, 细胞在材料表面的黏附是贴壁依赖型细胞生长的前提, 细胞只有在表面以一定的黏附力发生黏附并铺展后, 细胞才能生长^[37]。作为ECM替代物的人工合成的可降解高分子聚合物材料, 绝大多数亲水性差, 细胞吸附力弱, 需要进行必要的表面改性和表面修饰, 以提高表面生物活性, 利于细胞在材料上的黏附, 进而促进细胞的增殖和分化^[38]。

2 ECM硬度影响MSCs分化

近年来的许多研究表明, 二维培养条件或三维培养条件下模拟不同组织硬度的ECM均能诱导

MSCs分化成不同类型的细胞。二维培养条件和三维培养条件下, ECM诱导MSCs分化主要集中在神经、软骨、成肌及成骨方向。但二维培养条件下ECM硬度还可以诱导MSCs分化成腱细胞, 而三维培养条件下有关于血管组织, 包括内皮细胞和平滑肌细胞分化方向的报道。此外, 二维培养条件下ECM硬度还可以维持MSCs处于不分化状态。鉴定MSCs分化类型的特异性标志物和染色方法如表2和表3所示。

2.1 二维培养条件下ECM硬度对MSCs分化的影响

目前, 大量的研究表明, 二维培养条件下ECM硬度能诱导MSCs向神经、软骨、成肌和成骨等方向分化。2006年, Engler等^[4]参照之前Pelham和Wang^[56]的方法构建了由I型胶原蛋白(type I collagen, ColI)表面修饰且硬度不同的PAAm凝胶培养基, 首次开展ECM硬度对MSCs分化影响的研究, 发现在不存在化学诱导因子的条件下, 将MSCs培养于0.1~1.0 kPa(模拟脑组织硬度)的基质上, MSCs

表2 接种在不同硬度和表面成分细胞外基质上的MSCs分化方向及鉴定分化方向的特异性标志物
Table 2 Differentiation of MSCs seeded on ECM with different stiffness and surface compositions and specific marker to characterize specific lineages

分化方向 Specification	细胞外基质硬度(kPa) ECM stiffness (kPa)	细胞外基质表面成分 Composition of ECM surface	特异性标志物 Specific marker
Neurocyte	0.1~1.0	Collagen type I (Col I) ^[4] ppAAc ^[51]	β-III tubulin (early marker) ^[4]
	6.5		Microtubule-associated protein 2 (MAP2) (mid/late marker) ^[31] Neurofilament heavy chain (NFH) (late marker) ^[4] Neurofilament light chain (NFL, NEFL) ^[31] Nestin (neural stem cell marker) ^[31] Enolase2 (ENO2) ^[22]
Astrocyte	10	Col I-hyaluronic acid (HyA) ^[47]	Glial fibrillary acidic protein (GFAP) ^[47]
Oligodendrocyte	10	Col I-HyA ^[47]	CNPase (early marker) ^[47] O4 ^[47]
Endothelial cell	3	Col I ^[50]	Flk-1 ^[50]
Adipocyte	0.25	Col I-fibronectin (FN) ^[52]	PPAR-γ ^[45]
	1	Col I ^[29]	Lipoprotein lipase (LPL) ^[29]
Myoblast	2.5~5.0	RGD peptides ^[45]	Adiponectin (Adn) ^[45]
	8~17	Col I ^[4]	MyoD, MyoD1 ^[4]
	25	FN ^[30]	Myogenin (MYOG) ^[22] Desmin ^[39]
Smooth muscle cell	8~15	Col I ^[50]	α-actin ^[50]
	2 000 000	Col I ^[29]	Smooth muscle α-actin (α-SMA) ^[29] Calponin-1 ^[29]
Cardiomyocyte	10.2	Col I ^[53]	GATA4 ^[53] Myosin heavy chain (MHC) ^[53] α-sarcomeric actin (α-SCA) ^[53]
Chondrocyte	0.5	Col I-HyA ^[46]	Aggrecan (ACAN) ^[54]
	1	Col I ^[29]	Collagen type II (Col II) ^[54]
	1.6±0.3	Col I-FN ^[54]	Collagen type X (Col X) ^[54]
	5.4	HyA-tyramine (Tyr) ^[48]	Sox 9 ^[54]
Osteoblast	1.5	Col I-chondroitin sulphate ^[46]	Runx2 (CBFα1) (early marker) ^[4]
	11~30	RGD peptides ^[45]	Osterix (early marker) ^[41]
	15.4	BMP-2mimetic peptides ^[41]	Alkaline phosphatase (ALP) (early marker) ^[32]
	25~40	Col I ^[4]	osteocalcin (OCN) (late marker) ^[41]
	40.0±3.6	Col I-FN ^[54]	osteopontin (OPN) (late marker) ^[41]
	41	ppTMP ^[51]	Col I ^[32]
	41±6	pAAc ^[43]	
	47.5	RGD peptides ^[41]	
	80	Col I ^[30]	
	~250	FN ^[42]	
190~3 100	FN or gelatin ^[25]		
Tendon cell	30-50	Col I ^[55]	Scleraxis (Scx) ^[55] Tenomodulin (Tnm) ^[55]

ppAAc: 等离子体聚丙烯酸; ppTMP: 等离子体聚合磷酸三甲酯; pAAc: 聚丙烯酸。

ppAAc: plasma polymerised acrylic acid; ppTMP: plasma polymerized trimethyl phosphite; pAAc: polymerised acrylic acid.

表3 鉴定MSCs分化的染色方法

Table 3 Staining method to characterize the differentiation of MSCs into specific lineages

分化方向 Specification	染色方法 Staining method	检测物质 Detection site	参考文献 References
Adipocyte	Oil red O	Oil droplet	[29]
Chondrocyte	Alcian blue	Proteoglycan	[29,54]
	Safranin-O	Proteoglycan	[48]
Osteoblast	Alizarin red	Calcium deposit	[25,32]
	Calcein blue	Calcium deposit	[25]
	Alkaline phosphatase (ALP) assay kit	ALP activity	[40]
	Fast blue	ALP activity	[45]

呈现神经细胞分支状的形态, 并且高表达神经细胞标志分子P-NFH和 β -III微管蛋白(β -III tubulin); 将MSCs培养于8~17 kPa(模拟肌肉组织硬度)的基质上, MSCs变成与C2C12成肌细胞相似的梭形且成肌细胞标志分子MYOD表达上调; 在25~40 kPa(模拟类骨质硬度)的基质上, MSCs呈现与成骨细胞相似的多角形, 并且成骨细胞标志分子RUNX2表达水平上调。

此外, 不仅单一ECM硬度能影响MSCs分化, 硬度梯度亦能在MSCs分化中发挥作用。无论在生理还是病理条件下, 机体内组织和器官的硬度都存在一定的梯度, 例如, 正常心肌组织的硬度梯度约为 0.6 ± 0.9 kPa/mm, 而梗塞的心肌组织的硬度梯度约为 8.7 ± 1.5 kPa/mm。Tse等^[33]通过光聚作用构建了ECM硬度梯度范围为1~12 kPa且径向梯度为 1.0 ± 0.1 kPa/mm的PAAm凝胶, 发现多数MSCs具有向ECM硬度较大的方向迁移的趋势, 并分化为成肌细胞, 但其中仍有少量MSCs表达神经细胞标志分子 β -III tubulin。另外, Sharma等^[55]利用PAAm凝胶模拟肌腱肉芽组织和类骨质的硬度范围(10~90 kPa), 构建了硬度梯度分别为10~90 kPa、10~30 kPa、30~50 kPa和70~90 kPa的四种基质; 发现70~90 kPa梯度的基质能诱导MSCs表达成骨细胞标志分子RUNX2和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP); 在硬度梯度为10~90 kPa, 纤连蛋白(fibronectin, FN)表面修饰的基质中, 硬度大于20 kPa的区域有钙结节形成, 说明MSCs向成骨细胞分化; 而在该硬度梯度的基质表面固定ColII或者添加含有ColII的培养基溶液后均能抑制成骨分化。此外, 研究还表明肌腱细胞标志分子Sc1x和肌调蛋白(Tnm)在30~50 kPa且表面固定有ColII的基质中表达水平上调。

ECM硬度不仅能促进MSCs分化, 还可以保持

MSCs处于静息状态。Winer等^[52]研究发现, 在不添加任何分化诱导因子的前提下, 接种于模拟骨髓硬度的软基质($E=0.25$ kPa)上的MSCs既不增殖也不分化, 处于静止状态。为证明处于软基质上的MSCs仍具有多向分化潜能, MSCs在软基质上培养2 d后, 添加成脂诱导液后, MSCs形成明显的脂滴, 说明其向脂肪细胞分化; 转到添加了成骨诱导液的硬性玻璃培养皿上诱导分化24 d后, 与未培养于软基质而直接诱导分化的细胞作对比, 发现鉴定成骨分化的茜素红染色均呈阳性, 说明软基质能保持MSCs处于静止状态, 保持多向分化潜能, 同时依然感应外界物理或化学刺激。

2.2 三维培养条件下ECM硬度对MSCs分化的影响

近年来, 三维培养技术逐渐成为细胞培养领域研究的热点, 其利用各种方法及材料, 使细胞以立体方式生长, 形成类似体内组织的空间结构, 进而减小二维培养条件与体内生长环境的差异性。因此研究三维培养条件下ECM硬度对MSCs分化的影响对组织工程学和临床应用都有重要意义。

三维培养条件下ECM硬度对MSCs分化的影响与前述二维培养条件下的研究结果相似^[22,45-50]。Pek等^[22]运用液化抗剪强度(τ_y)分别为7, 25, 40, 75, 100 Pa的PEG硅胶, 研究发现ECM硬度为7 Pa时, 神经标志分子ENO2的表达上调; 而成肌标志分子MYOD和成骨标志分子RUNX2分别在中等硬度基质($\tau_y=25$ Pa)和较高硬度基质($\tau_y=75$ 和100 Pa)中表达上调。此外, 他们通过将精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)肽固定在基质上, 发现RGD肽对处于 $\tau_y>75$ Pa的基质中的MSCs增殖和成骨分化均有促进作用。此外, Toh等^[48]通过辣根过氧化物酶(HRP)和 H_2O_2 调节透明质酸-酪胺偶联物的交联度, 获得了ECM硬度分别为5.4, 9.5, 11.8 kPa的三种基质, 他们研究发

现MSCs在硬度为5.4 kPa的低交联度基质中, 细胞呈圆形并出现细胞聚集现象。此外, 标志软骨形成的黏多糖和II型胶原(type II collagen, ColII)明显增多, 说明MSCs向软骨细胞分化。

除了上述几种分化方向外, 三维培养条件下ECM硬度还能诱导MSCs分化成血管类型的细胞。Wingate等^[50]利用硬度范围介于2 kPa与15 kPa之间(模拟血管内膜及中膜的硬度)的三维PEG纳米纤维凝胶, 研究发现24 h内95%的MSCs在硬度为3 kPa的基质中内皮细胞标志分子Flk-1表达上调, 但硬度大于8 kPa的基质中, 只有20%的MSCs表达Flk-1。相反, 在硬度大于8 kPa的基质中, 有大约80%的MSCs表达平滑肌细胞标志分子 α 肌动蛋白(α -actin), 而在硬度小于5 kPa的基质中, 只有不到10%的MSCs表达 α 肌动蛋白。上述结果对于人工血管的构建具有重要作用。

2.3 ECM硬度联合其他因素对MSCs分化的影响

干细胞的微环境中存在多种调控因素, ECM硬度不是决定MSCs分化命运的唯一因素, 其能与细胞生存的微环境中的其它物理或化学因素相互作用, 共同影响MSCs的分化过程。

2.3.1 ECM硬度和生长因子 转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β)是一类多功能的细胞因子, 它可促进MSCs分化成平滑肌细胞和软骨细胞。Park等^[29]利用硬度值为1 kPa的ColII凝胶和表面涂覆有ColII的细胞培养皿(硬度约为2 GPa^[57])分别模拟软性及硬性基质来探究ECM硬度对MSCs分化的影响。MSCs在硬性基质中不仅应力纤维较多, 而且增殖率也较软性基质中高。此外, 在硬性基质中, 平滑肌细胞标志分子 α -SMA、钙调蛋白-1(calponin-1)表达上调, 而软性基质中的MSCs, 软骨细胞标志分子ColIII和脂肪细胞标志分子LPL表达均上调。添加TGF- β 后, 硬性基质中的平滑肌细胞标志分子表达进一步上调, 但软性基质中的LPL表达水平下调, 说明MSCs向脂肪细胞分化受到抑制。

另外, 骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)模拟肽具有促进成骨的作用^[58]。Zouani等^[41]研究发现, MSCs在硬度为15.4 kPa的pACAA凝胶中MYOD表达上调, 说明其向成肌细胞分化, 而MSCs在硬度为47.5 kPa的基质中成骨细胞标志分子Osterix、RUNX2、OCN及OPN表达均上调,

说明MSCs向成骨细胞分化; 然后将BMP-2模拟肽固定在基质表面, 发现MSCs在上述两种硬度条件下均向成骨细胞分化; 而在更软的0.76~3.2 kPa基质上, BMP-2模拟肽的促进成骨作用受到抑制并且MSCs也不向神经细胞分化, 这可能与软基质诱导肌动蛋白细胞骨架重组有关。此外, 血小板衍生生长因子、甲状旁腺激素、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子等^[59-61]均能促进MSCs分化, 但它们与ECM硬度是否存在相互作用, 尚待进一步研究。

2.3.2 ECM硬度和细胞密度 除了ECM硬度外, 有研究证实, 高细胞接种密度促进MSCs成脂分化, 而低细胞接种密度促进成骨分化^[62]。Xue等^[54]基于以上研究基础, 揭示ECM硬度和细胞密度(细胞间的相互作用)两者共同决定了MSCs的分化方向。他们发现当细胞接种密度高(20 000/cm²)时, MSCs无论在硬度为1.6 \pm 0.3 kPa的软性基质或是硬度为40.0 \pm 3.6 kPa的硬性基质中, 不仅形态和铺展面积没有变化, 而且成骨分化标志分子RUNX2、ALP和ColII均不表达; 而当细胞接种密度低(1 000/cm²)时, MSCs在软性基质中的成骨分化标志分子与硬性基质中相比, 表达水平显著上调, 说明ECM硬度在细胞密度低时才对MSCs成骨分化产生影响。此外, 他们还发现软性基质对MSCs软骨分化具有促进作用, 但与细胞接种密度无关。

2.3.3 ECM硬度和表面形貌 ECM的表面形貌是细胞锚着微环境的另一物理特性, 其对干细胞行为有着重要而复杂的影响, 甚至决定着干细胞的分化命运^[63]。Yu等^[53]先采用光刻和微接触印刷技术在PAAm凝胶表面分别布满长条形和正方形的修饰蛋白岛并与表面均匀覆盖相同ECM蛋白的基质对照, 研究发现MSCs在硬度为10.2 kPa且表面布满长条形蛋白的基质上, 成肌细胞标志分子表达水平不仅明显高于表面均匀覆盖蛋白组, 而且高于硬度为40.7 kPa而无论表面形貌组。因此, ECM硬度与表面形貌在诱导MSCs成肌分化上具有联合效应。

2.3.4 ECM硬度和表面化学 模拟同一组织硬度范围的ECM却能使MSCs向不同方向分化, 并且有时在某一组织硬度范围外的ECM仍可以诱导MSCs分化为该种组织的细胞, 这些现象可能与ECM表面成分的不同有关, 提示ECM硬度联合表面化学在MSCs分化中发挥重要作用(表2)。Rowlands等^[30]运用ColII、IV型胶原蛋白(type IV collagen, ColIV)、层

黏连蛋白(laminin, LN)和FN四种ECM蛋白分别包被硬度为0.7, 9, 25, 80 kPa的四种PAAm凝胶表面, 组成十六种复合基质; 研究发现MSCs在80 kPa且ColI表面修饰的基质中, 成骨细胞标志分子RUNX2的表达水平最高; 而成肌细胞标志分子MYOD在25 kPa且FN表面修饰的基质中表达水平最高, 并且与表面固定有ColI, 硬度为80 kPa的基质中的MYOD表达水平相似。然而, Yu等^[53]证实MSCs在ColI表面修饰、硬度为10.2 kPa的基质上成肌细胞标志分子表达水平最高, 而当基质表面修饰蛋白换成FN后, MSCs在硬度为40.7 kPa的基质上成肌细胞标志分子的表达水平明显高于其在硬度为10.2 kPa的基质上的表达量。另有研究证明, ColI对ECM硬度诱导的MSCs成骨分化具有抑制作用^[55]。Wang等^[25]将表面分别经过FN和Gtn修饰的PDMS基质与表面仅用氧等离子体处理过的基质进行对比, 三者的硬度梯度均为190~3 100 kPa; 研究发现MSCs经过2周诱导培养, 其在FN包被的基质上成骨分化指标钙结节形成数量和尺寸略大于Gtn包被的基质, 但两者均明显大于表面用氧等离子体处理的基质, 说明FN和Gtn对MSCs成骨分化具有一定的促进作用^[64-65]; 然而, 经过3周诱导培养后, 他们发现在ECM硬度较大的条件下, FN和Gtn包被的基质上钙结节数量仍多于氧等离子体处理过的基质, 但在较软的基质上这种差距明显缩小, 且整个硬度梯度范围内三种基质上钙结节尺寸趋于相似。以上结果均表明, ECM硬度与ECM蛋白相互作用共同指导MSCs分化。

Murphy等^[46]应用硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)和HyA两种不同的黏多糖构建了成分不同的胶原-黏多糖支架, 其硬度分别为0.5, 1.0, 1.5 kPa。研究发现MSCs接种在含有HyA成分且硬度为0.5 kPa的支架表面, 软骨细胞标志分子Sox9表达上调, 而RUNX2在含有CS、硬度为1.5 kPa的支架上表达上调, 说明MSCs向成骨细胞分化。此研究不仅证明了三维培养条件下的支架硬度可调控MSCs分化, 而且支架成分能进一步促进MSCs分化。

除了ECM蛋白和支架成分外, ECM硬度还能联合ECM表面修饰聚合物影响MSCs分化。Lanniel等^[51]通过硬度范围介于5.5~152.0 kPa之间且表面与ColI和分别含有氨基、羧基、磷酸基团三种不同官能团的等离子体聚合物(ppAAM、pAAC和ppTMP)交联的PAAm凝胶, 研究ECM硬度与表面化学对MSCs分化

的作用。研究发现, MSCs在硬度为41 kPa, ppTMP表面修饰的基质中, 成骨细胞标志分子RUNX2表达上调; 成肌标志分子MYOD在中等硬度值(10~17 kPa), pAAC表面修饰的基质中表达上调; 神经细胞标志分子 β -III tubulin在硬度为6.5 kPa的pAAC表面修饰的基质中表达上调。此外, 添加成骨分化诱导因子后, 发现MSCs在硬度大于10 kPa, 表面交联ppAAM的基质中形成了标志成骨分化的钙结节, 但在ColI表面修饰的基质中无此现象。

3 ECM硬度调控MSCs分化的信号转导机制

细胞感应ECM硬度的过程归根结底还是对力学刺激的感应, 只有将力学刺激转变成相应信号传入胞内, 才能引起一系列应答反应, 其中的关键问题是力学信号如何转换为生物学信号。ECM-整合素-肌动蛋白细胞骨架系统在ECM硬度力学信号转导中起着重要作用。细胞内存在ECM硬度力学信号与生物化学信号的反馈循环(图2)。整合素介导的由内向外信号传递(inside-out signaling)和由外向内信号传递(outside-in signaling)造成了ECM硬度力学信号与整合素/Rho信号通路的循环作用。其中整合素/Rho信号通路将通过与其他信号通路的交谈“cross talk”, 影响相关基因的表达, 以调控细胞分化。

3.1 ECM硬度力学信号转导的生物学基础

3.1.1 整合素 整合素是由 α 、 β 两个亚单位组成的异二聚体黏附分子, α 、 β 亚单位均为单跨膜糖蛋白, α 亚单位决定着与ECM结合的受体特异性。迄今已发现6种 α 亚单位、9种 β 亚单位, 它们以不同的组合方式构成24余种整合素分子, 对不同的ECM蛋白有不同的结合特性^[66]。整合素 β 亚单位的胞内区能与黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的氨基端反应, FAK在细胞内信号转导中具有重要作用, 其进一步与各种信号分子反应, 如C-Src、Graf、IP-3激酶等, 这些信号分子又可进一步激活各种下游蛋白的级联反应, 包括促有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)和PIP-5激酶等^[67]。整合素通过特殊分子结构将ECM与肌动蛋白细胞骨架相连: 在细胞外通过识别包含RGD序列的多肽位点, 整合素与ECM蛋白相互作用; 在细胞内黏着斑(focal

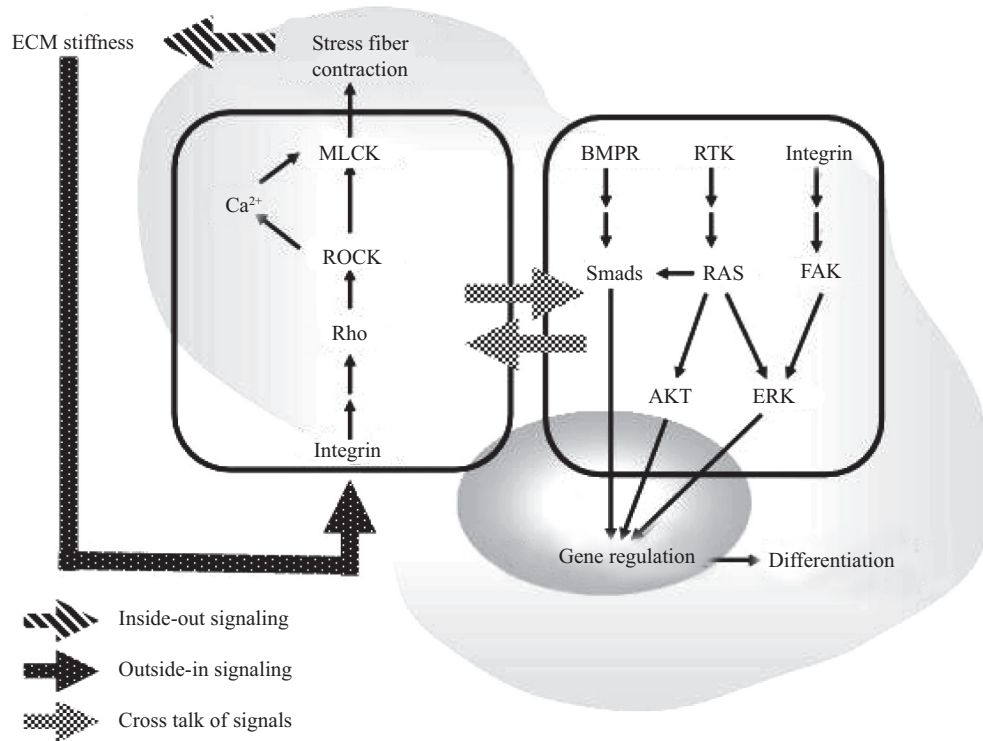


图2 细胞外基质硬度对细胞分化的力学和生化信号反馈循环

Fig.2 The mechanical and biochemical signals in the feedback loop of ECM stiffness on cell differentiation

adhesion, FA)处,整合素通过接头蛋白(主要包括踝蛋白、纽蛋白和 α -辅肌动蛋白)与肌动蛋白纤维束状结构,即应力纤维(stress fiber, SF)连接^[68]。通过上述结构,整合素成为力在ECM与肌动蛋白细胞骨架之间双向传递的分子连接。目前,越来越多的研究表明,ECM硬度力学信号通过整合素介导的信号通路调控MSCs增殖和分化^[31-32],因此整合素在ECM硬度力学信号转导中扮演关键角色,并定位于转导通路的起始端。

3.1.2 肌动蛋白细胞骨架 细胞骨架是胞浆中一组由纤维状结构组成的网架,具有支撑和维持细胞形态及细胞运动的功能。细胞骨架主要包括微丝、微管和中间丝。微丝即肌动蛋白纤维(actin microfilament),在真核细胞中由肌动蛋白组成,系直径约7 nm的骨架纤维。肌动蛋白以单体或多聚体的形式存在,单体的肌动蛋白呈球状,称为G-肌动蛋白;多聚体的肌动蛋白呈纤维状,称为F-肌动蛋白。肌动蛋白细胞骨架的主要组成成分是SF应力纤维(stress fiber, SF)和FA。FA是ECM和肌动蛋白细胞骨架的附着点,能够把细胞外信号传递到胞质内^[69]。SF由丝状的F-肌动蛋白组成,SF-FA复合结构使细胞有力量作用于ECM,并产生细胞形态改变、迁移

和分化^[70]。FA在细胞分化早期为MSCs通过SF收缩来感应其所处微环境的硬度提供了必要的力传递途径。细胞通过肌球蛋白II调控肌动蛋白SF收缩,对ECM产生牵引力^[71]。研究人员通过非肌肉肌球蛋白II(nonmuscle myosin II, NMMII)的阻断剂blebbistatin抑制SF收缩产生细胞骨架张力(cytoskeletal tension),发现ECM硬度诱导的MSCs分化作用也随之受到抑制,说明肌动蛋白细胞骨架是ECM硬度力学信号传导通路中的重要一环^[4,41]。

3.2 ECM硬度力学信号与整合素/Rho信号通路的循环作用

ECM硬度可以调节肌动蛋白细胞骨架张力,并藉此通过整合素调节胞内信号分子的活性。有研究表明,ECM硬度增加可以引发细胞内力学信号和整合素/Rho信号通路的反馈循环:ECM硬度增加激活整合素,进而刺激Rho活性增加,Rho藉由其受体蛋白Rho激酶(Rho associated kinase, ROCK)激活肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK);磷酸化的MLCK又进一步通过调节NMMII活性增强SF收缩,SF收缩增强反而促进FA装配,使细胞与ECM黏附增强,即细胞作用于ECM的牵引力增加,其影响ECM硬度,从而造成信号的循环作用^[72-74]。此外,

ECM硬度增加刺激Rho活性增加后,其受体蛋白ROCK还可以通过激活细胞膜上力敏感的离子通道使细胞内钙离子(Ca^{2+})浓度增加,进而激活MLCK,导致SF收缩增强^[75-76]。已有一些证据表明,MSCs中也存在类似的信号循环作用,例如,在硬性基质上,MSCs铺展面积大,SF增粗而呈紧张状态,FA紧密且装配完善;而在软性基质上细胞的表现则截然相反,它们的铺展面积小,趋近于圆形,肌动蛋白细胞骨架和FA装配都不够完善^[4,32,41]。此外, Kim等^[76]研究发现,ECM硬度能够调节胞质内钙离子浓度,而另有研究证明胞内 Ca^{2+} 浓度在细胞分化中起着重要作用^[77],例如电刺激调控钙振荡能促进MSCs成骨分化^[78]。故认为ECM硬度还可能通过调节钙离子浓度调控MSCs分化。

3.3 整合素/Rho信号通路与其他信号通路的“交谈(cross talk)”

在基质硬度力学信号与整合素/Rho信号通路的循环过程中,整合素/Rho信号通路直接或间接地与MSCs神经、成肌、成骨等分化相关信号通路之间发生交联。其中BMP/Smad信号通路、FAK信号通路、RhoA信号通路及Ras信号通路具有重要调控作用,彼此相互联系,构成一个复杂的信号网络,最终导致基因表达的变化。

3.3.1 BMP/Smad信号通路 BMP/Smad信号转导通路对于细胞分化十分重要,Smad蛋白是胞内介导BMP信号通路中重要的下游信号分子和细胞内信号传导中的枢纽^[79]。Du等^[31]研究表明,软性基质比硬性基质更大程度地诱导了MSCs整合素 $\beta 1$ 的活化,但软性基质中的MSCs表面整合素 $\beta 1$ 含量明显低于硬性基质。进一步研究发现,软性基质中的整合素 $\beta 1$ 发生了由小窝蛋白介导的胞吞作用所调控的内化。软性基质使整合素-ECM蛋白复合物解离,从而触发整合素的内化;软性基质导致骨形态发生蛋白受体(bone morphogenetic protein receptor, BMPR)的亚细胞定位发生改变,使其下游信号Smad1/5/8被抑制,神经标志分子微管相关蛋白2(microtubule associated protein 2, MAP2)、神经丝轻链(neurofilament protein light chain, NFL)蛋白和巢(nestin)蛋白表达上调,最终导致MSCs向神经细胞分化(图3A)。此外, Zouani等^[41]发现,在表面固定了BMP-2模拟肽且分别模拟肌肉和胶原骨组织硬度的ECM上, MSCs均向成骨细胞分化;然后通过NMMII的阻断剂blebbistatin抑制

SF收缩,结果导致上述两种硬度条件下成骨标志分子的表达均受到阻断,同时Smad1/5/8的磷酸化水平及核转位也随之被抑制,说明MSCs通过细胞骨架张力感应ECM硬度并调节BMP/Smad信号转导通路从而进行成骨分化(图3C)。因此, BMP/Smad信号通路的激活对ECM硬度介导的MSCs成骨分化具有促进作用,而BMP/Smad信号通路的抑制促进ECM硬度诱导的MSCs神经分化。

3.3.2 RhoA信号通路 Rho是一类重要的信号转导分子,发挥着“分子开关”的作用,在GTP结合的活化状态和GDP结合的非活化状态之间快速切换,将细胞外信号传至细胞内,并且其在肌动蛋白细胞骨架的调节中起着核心作用。Yu等^[53]研究表明,ECM硬度和表面形貌共同作用使MSCs形成形态细长的FA,细长的FA通过整合素 $\beta 3$ 聚集激活RhoA信号通路,同时RhoA又进一步增加下游信号分子MLCK磷酸化,其对NMMII的活性具有增强作用。NMMII通过增强SF收缩产生肌动蛋白细胞骨架张力,从而导致成肌细胞标志分子MYOD、GATA4和心肌细胞标志分子 α -横纹肌肌动蛋白(α -sarcomeric actin, α -SCA)、肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)表达上调,最终促使MSCs分化为成肌细胞^[62](图3B)。

3.3.3 FAK信号通路 FAK是整合素介导的胞外-胞内信号转导通路的基础信号传递分子^[80]。Friedland等^[81]证实在ECM硬度力学信号转化成生化信号的过程中,由肌球蛋白II调节肌动蛋白SF收缩产生的细胞骨架张力和ECM硬度产生的被动张力共同作用,触发整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 在松弛状态(relaxed state)和牵张状态(tensioned state)之间切换,该过程不仅可以通过改变整合素 $\alpha 5 \beta 1$ -FN黏合带($\alpha 5 \beta 1$ -fibronectin adhesive bonds)的强度影响细胞与ECM的黏附力度,而且能引起FN上协同位点的变化,而协同位点的变化具有激活下游信号分子FAK的作用。另外,FAK可以通过促进整合素的活化作用,增强细胞与ECM的黏附力度^[82]。Salasznyk等^[83]利用siRNA干扰的方法,证明FAK通过调节下游信号分子细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)的活性,调控MSCs成骨分化。另有研究揭示,ECM硬度通过RhoA-ROCK-ERK信号转导通路促进成骨细胞特异性转录因子RUNX2的表达,进而调控前成骨细胞MC3T3-E1的成骨分化^[84]。Shih等^[32]基于上述研

究结果, 探究FAK与ROCK两种信号通路在ECM硬度调控MSCs成骨分化过程中存在的联系, 研究证实ECM硬度通过整合素 α 2-ROCK-FAK-ERK1/2信号转导通路, 调控RUNX2的表达, 进而使MSCs分化为成骨细胞(图3C)。

3.3.4 Ras信号通路 Ras蛋白在传递细胞生长分化信号方面起重要作用, 其介导的信号传导被视为影响ERK、蛋白激酶B(protein kinase B, PKB或AKT)和Smad等许多信号通路的“总开关”^[85]。当生长因子激活受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)后, 受体胞质结构域磷酸化, 新的磷酸化位点同生长因子结合蛋白2(growth factor receptor-bound protein 2, Grb2)-SOS蛋白结合后, SOS蛋白被激活, 进而激活Ras蛋白。AKT是磷脂酰肌醇-3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)的一个下游靶点, 活化的AKT参与PI3K调控细胞增殖分化。Hamidouche等^[86]研究证实整合素 α 5与PI3K/AKT信号通路及ERK信号通路之间相互联系, 可通过激

活PI3K/AKT信号通路和ERK信号通路诱导成骨标志分子表达, 促进MSCs成骨分化。Xue等^[54]证实, 40.0 \pm 3.6 kPa的硬性基质对MSCs成骨分化有促进作用。并且硬性基质中Smad1/5/8、AKT和ERK的磷酸化水平均较软性基质明显上调, 抑制Ras表达, 发现下游信号分子Smad1/5/8、ERK和AKT均受到抑制, 并且成骨分化标志分子RUNX2、ALP和ColI表达下调; 而活化Ras后, 发现Smad1/5/8、ERK和AKT中, 只有ERK磷酸化水平上调, 而成骨分化标志分子表达未上调。上述结果提示, Ras-Smad1/5/8/AKT/ERK信号通路在ECM硬度调控MSCs成骨分化中扮演必要而不充分的角色, 还有其他的信号网络参与该过程的调控(图3)。

3.4 三维和二维培养条件下ECM硬度调控MSCs分化机制的差异

三维培养条件下ECM硬度调控MSCs分化的机制与二维培养培养条件的差异主要体现在细胞感应ECM硬度的过程。二维培养条件下细胞通过SF收缩

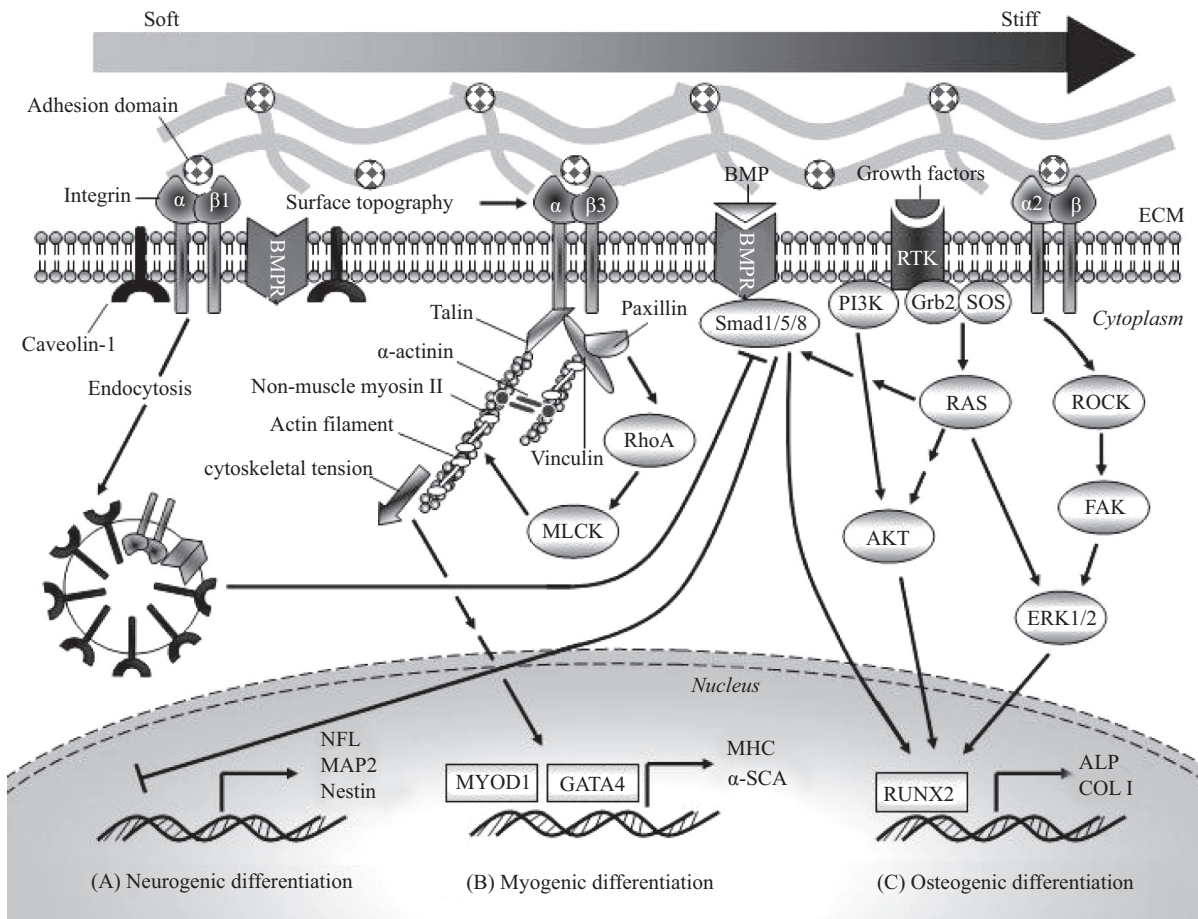


图3 细胞外基质硬度调控MSCs分化的信号转导通路

Fig.3 Signal transduction pathways of MSCs differentiation modulated by ECM stiffness

对ECM产生牵引力来感应ECM硬度并形成ECM硬度和整合素/Rho信号通路的循环作用;而三维培养条件下细胞感应ECM硬度的过程与SF收缩和ROCK级联反应无关,但可能与整合素-ECM蛋白黏合带和中间丝有关。Sapun等^[49]利用硬度为0.2~59.0 kPa的PEG凝胶,发现MSCs在硬度为59.0 kPa基质中,成骨标志物表达上调。与二维培养条件下的硬性基质中MSCs呈铺展面积较大多角形,并且肌动蛋白SF密集相比^[1,4,52],三维培养条件下, MSCs呈圆球形、微丝和微管稀疏分散,这与之前Huebsch等^[45]的研究结果相同。进一步通过可溶性的RGD肽阻断整合素与ECM蛋白间的联系,发现ECM硬度诱导的MSCs成骨分化随之受到抑制,因此整合素-ECM蛋白黏合带是该过程所必需的。此外,他们利用拉春库林A、秋水仙素、blebbistatin、ML7与Y-27632分别阻断微丝、微管、NMMII、MLCK和ROCK,研究发现除了拉春库林A有促进MSCs成骨分化作用外,其他几种阻断剂均无影响。上述结果提示,三维培养条件下MSCs感应ECM硬度过程与肌球蛋白调控SF收缩产生的张力和ROCK级联反应无关^[49]。此外,细胞骨架除了微丝和微管外,还具有中间丝结构,其与FA组装有关,并在胞内与整合素存在联系^[87]。研究发现前成骨细胞通过中间丝感受剪切应力^[88],破坏中间丝后,细胞不仅形态发生了改变^[89],而且其对应力的反应^[90]也随之消失。因此三维培养条件下细胞感应ECM硬度的过程可能与整合素-ECM蛋白黏合带和中间丝有关^[91],但具体机制还有待进一步研究。

4 结语与展望

ECM硬度调控MSCs分化对组织工程及再生医学都具有极大的启示。目前,对于ECM硬度调控MSCs分化还有许多方面的研究亟需深入,具体包括如下几个方面:

(1)目前采用的模拟组织硬度的ECM材料存在一定缺陷,主要包括PAAm和胶原凝胶等,比如PAAm凝胶具有一定的细胞毒性,同时如何稳定控制其吸水后的弹性模量也是不容忽视的问题;而由胶原等生物活性物质制备的凝胶,则由于其本身就是ECM成分而对实验结果造成一定干扰。因此如何能够制备出与体内生理环境更加相似、适合MSCs植入、培养和分化为特定组织器官且具备生物相容性和组织硬度的支架材料值得学者研究和探讨。

(2)虽然三维培养条件下ECM硬度对MSCs分化的影响与二维培养条件下相似,但由于缺乏保持两种条件下表面形貌、剪切应力、孔隙率和几何学统一而硬度可变的培养模型,因此难以客观地比较两种条件下ECM硬度影响细胞行为的差异。

(3)统一而高效的ECM硬度测量和表示方法将为ECM硬度调控MSCs分化的进一步研究和应用打下坚实基础。

(4)由于ECM硬度不是调控MSCs分化的唯一因素,ECM硬度单独诱导分化成的细胞在形态、结构和功能等方面与特定功能的成熟细胞相比仍然存在差距,因此需要寻找更多与ECM硬度共同作用的生物化学和物理因素,精确控制细胞命运。

(5)细胞感应ECM硬度的过程是目前研究的热点,一方面新的力感应信号分子及其转导过程不断被研究者发现;另一方面众多实验结果间的内在联系还不够明确,研究思路仍局限于ECM硬度力学信号如何转变为生化学信号这个单向的转化,而没有重视生化学信号亦可通过调节细胞骨架的张力、细胞黏附力和整合素等而转变为力学信号,而这样的力学信号更可引发细胞内力学信号和生化信号的反馈循环,形成一个更为广泛和多层次的信号网络。这些过程的细节尚待进一步研究和发掘。

(6)此外,ECM硬度调控MSCs分化有许多信号通路参与,迄今为止关于ECM硬度调控MSCs成骨分化的研究较多,或许还存在没有发现的信号通路,大多数信号通路的确切机制并不明了,各通路之间的相互联系研究较少,进一步研究信号通路任重道远。

总之,尽管许多关于ECM硬度调控MSCs分化的研究成果令人振奋,但更为深入而系统的研究,将为我们揭示更多关于MSC分化的细节,使我们能够利用更多的手段去控制分化的进程,并有望对现代生物学和医学的发展做出重要贡献。

参考文献 (References)

- 1 Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 2005; 310(5751): 1139-43.
- 2 Oakes PW, Patel DC, Morin NA, Zitterbart DP, Fabry B, Reichner JS, *et al.* Neutrophil morphology and migration are affected by substrate elasticity. *Blood* 2009; 114(7): 1387-95.
- 3 O'Connor RS, Hao X, Shen K, Bashour K, Akimova T, Hancock WW, *et al.* Substrate rigidity regulates human T cell activation

- and proliferation. *J Immunol* 2012; 189(3): 1330-9.
- 4 Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126(4): 677-89.
- 5 Zhang YH, Zhao CQ, Jiang LS, Dai LY. Substrate stiffness regulates apoptosis and the mRNA expression of extracellular matrix regulatory genes in the rat annular cells. *Matrix Biol* 2011; 30(2): 135-44.
- 6 Ng CK, Yu KN. Proliferation of epithelial cells on PDMS substrates with micropillars fabricated with different curvature characteristics. *Biointerphases* 2012; 7(1/2/3/4): 21.
- 7 Fortunel NO, Chadli L, Bourreau E, Cadio E, Vaigot P, Marie M, *et al.* Cellular adhesion on collagen: A simple method to select human basal keratinocytes which preserves their high growth capacity. *Eur J Dermatol* 2011; 21(Suppl 2): 12-20.
- 8 Elkin BS, Azeloglu EU, Costa KD, Morrison B, 3rd. Mechanical heterogeneity of the rat hippocampus measured by atomic force microscope indentation. *J Neurotrauma* 2007; 24(5): 812-22.
- 9 Georges PC, Miller WJ, Meaney DF, Sawyer ES, Janmey PA. Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophys J* 2006; 90(8): 3012-18.
- 10 Thie M, Rospel R, Dettmann W, Benoit M, Ludwig M, Gaub HE, *et al.* Interactions between trophoblast and uterine epithelium: Monitoring of adhesive forces. *Hum Reprod* 1998; 13(11): 3211-9.
- 11 Patel PN, Smith CK, Patrick CW. Rheological and recovery properties of poly (ethylene glycol) diacrylate hydrogels and human adipose tissue. *J Biomed Mater Res A* 2005; 73(3): 313-9.
- 12 Abrams MB, Dominguez C, Pernold K, Reger R, Wiesenfeld-Hallin Z, Olson L, *et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells attenuate chronic inflammation and injury-induced sensitivity to mechanical stimuli in experimental spinal cord injury. *Restor Neurol Neurosci* 2009; 27(4): 307-21.
- 13 Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Yamamoto H, Nifuji A, *et al.* Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture *in vivo*. *J Bone Miner Res* 2003; 18(9): 1706-15.
- 14 Wakatsuki T, Kolodney MS, Zahalak GI, Elson EL. Cell mechanics studied by a reconstituted model tissue. *Biophys J* 2000; 79(5): 2353-68.
- 15 Bank AJ, Kaiser DR. Smooth muscle relaxation: Effects on arterial compliance, distensibility, elastic modulus, and pulse wave velocity. *Hypertension* 1998; 32(2): 356-9.
- 16 Lewis G, Shaw KM. Tensile properties of human tendo Achillis: Effect of donor age and strain rate. *J Foot Surg* 1997; 36(6): 435-45.
- 17 Schaffler MB, Burr DB. Stiffness of compact bone: Effects of porosity and density. *J Biomech* 1988; 21(1): 13-6.
- 18 Tskhovrebova L, Trinick J. Flexibility and extensibility in the titin molecule: Analysis of electron microscope data. *J Mol Biol* 2001; 310(4): 755-71.
- 19 Bala Y, Depalle B, Douillard T, Meille S, Clement P, Follet H, *et al.* Respective roles of organic and mineral components of human cortical bone matrix in micromechanical behavior: An instrumented indentation study. *J Mech Behav Biomed* 2011; 4(7): 1473-82.
- 20 Gerhardt LC, Schmidt J, Sanz-Herrera JA, Baaijens FPT, Ansari T, Peters GWM, *et al.* A novel method for visualising and quantifying through-plane skin layer deformations. *J Mech Behav Biomed* 2012; 14: 199-207.
- 21 Drira Z, Yadavalli VK. Nanomechanical measurements of polyethylene glycol hydrogels using atomic force microscopy. *J Mech Behav Biomed Mater* 2013; 18: 20-8.
- 22 Pek YS, Wan ACA, Ying JY. The effect of matrix stiffness on mesenchymal stem cell differentiation in a 3D thixotropic gel. *Biomaterials* 2010; 31(3): 385-91.
- 23 Sanchez-Vaquero V, Satriano C, Tejera-Sanchez N, Gonzalez Mendez L, Garcia Ruiz JP, Manso Silvan M. Characterization and cytocompatibility of hybrid aminosilane-agarose hydrogel scaffolds. *Biointerphases* 2010; 5(2): 23-9.
- 24 Boudou T, Ohayon J, Picart C, Tracqui P. An extended relationship for the characterization of Young's modulus and Poisson's ratio of tunable polyacrylamide gels. *Biorheology* 2006; 43(6): 721-8.
- 25 Wang PY, Tsai WB, Voelcker NH. Screening of rat mesenchymal stem cell behaviour on polydimethylsiloxane stiffness gradients. *Acta Biomater* 2012; 8(2): 519-30.
- 26 Lopez-Garcia MDC, Beebe DJ, Crone WC. Young's modulus of collagen at slow displacement rates. *Bio-Med Mater Eng* 2010; 20(6): 361-9.
- 27 Deshmukh S, Mooney DA, MacElroy JMD. Molecular simulation study of the effect of cross-linker on the properties of poly (N-isopropyl acrylamide) hydrogel. *Mol Simulat* 2011; 37(10): 846-54.
- 28 Cretu A, Castagnino P, Assoian R. Studying the effects of matrix stiffness on cellular function using acrylamide-based hydrogels. *J Vis Exp* 2010; (42): e2089.
- 29 Park JS, Chu JS, Tsou AD, Diop R, Tang Z, Wang A, *et al.* The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF-beta. *Biomaterials* 2011; 32(16): 3921-30.
- 30 Rowlands AS, George PA, Cooper-White JJ. Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: Interplay of stiffness and adhesive ligand presentation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295(4): C1037-44.
- 31 Du J, Chen XF, Liang XD, Zhang GY, Xu J, He LR, *et al.* Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(23): 9466-71.
- 32 Shih YR, Tseng KF, Lai HY, Lin CH, Lee OK. Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 2011; 26(4): 730-8.
- 33 Tse JR, Engler AJ. Stiffness gradients mimicking *in vivo* tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS One* 2011; 6(1): e15978.
- 34 Williams RJ, Hall TE, Glattauer V, White J, Pasic PJ, Sorensen AB, *et al.* The *in vivo* performance of an enzyme-assisted self-assembled peptide/protein hydrogel. *Biomaterials* 2011; 32(22): 5304-10.
- 35 Hanif M, Ranjha NM, Shoaib MH, Mudasser J, Yousuf RI, Khan A, *et al.* Preparation, characterization and release of verapamil hydrochloride from polycaprolactone/acrylic acid (PCL/AA) hydrogels. *Pak J Pharm Sci* 2011; 24(4): 503-11.

- 36 Horio T, Ishihara M, Fujita M, Kishimoto S, Kanatani Y, Ishizuka T, *et al.* Effect of photocrosslinkable chitosan hydrogel and its sponges to stop bleeding in a rat liver injury model. *Artif Organs* 2010; 34(4): 342-7.
- 37 Menko AS, Boettiger D. Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell* 1987; 51(1): 51-7.
- 38 Wang YC, Kao SH, Hsieh HJ. A chemical surface modification of chitosan by glycoconjugates to enhance the cell-biomaterial interaction. *Biomacromolecules* 2003; 4(2): 224-31.
- 39 Wang LS, Boulaire J, Chan PP, Chung JE, Kurisawa M. The role of stiffness of gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogels formed by enzyme-mediated crosslinking on the differentiation of human mesenchymal stem cell. *Biomaterials* 2010; 31(33): 8608-16.
- 40 Wang LS, Du C, Chung JE, Kurisawa M. Enzymatically cross-linked gelatin-phenol hydrogels with a broader stiffness range for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* 2012; 8(5): 1826-37.
- 41 Zouani OF, Kalisky J, Ibarboure E, Durrieu MC. Effect of BMP-2 from matrices of different stiffnesses for the modulation of stem cell fate. *Biomaterials* 2013; 34(9): 2157-66.
- 42 Gonzalez-Garcia C, Moratal D, Oreffo ROC, Dalby MJ, Salmeron-Sanchez M. Surface mobility regulates skeletal stem cell differentiation. *Integr Biol-Uk* 2012; 4(5): 531-39.
- 43 Colley HE, Mishra G, Scutt AM, McArthur SL. Plasma polymer coatings to support mesenchymal stem cell adhesion, growth and differentiation on variable stiffness silicone elastomers. *Plasma Process Polym* 2009; 6(12): 831-9.
- 44 Gobaa S, Hoehnel S, Roccio M, Negro A, Kobel S, Lutolf MP. Artificial niche microarrays for probing single stem cell fate in high throughput. *Nat Methods* 2011; 8(11): 949-55.
- 45 Huebsch N, Arany PR, Mao AS, Shvartsman D, Ali OA, Bencherif SA, *et al.* Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater* 2010; 9(6): 518-26.
- 46 Murphy CM, Matsiko A, Haugh MG, Gleeson JP, O'Brien FJ. Mesenchymal stem cell fate is regulated by the composition and mechanical properties of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *J Mech Behav Biomed* 2012; 11: 53-62.
- 47 Her GJ, Wu HC, Chen MH, Chen MY, Chang SC, Wang TW. Control of three-dimensional substrate stiffness to manipulate mesenchymal stem cell fate toward neuronal or glial lineages. *Acta Biomater* 2013; 9(2): 5170-80.
- 48 Toh WS, Lim TC, Kurisawa M, Spector M. Modulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis in a tunable hyaluronic acid hydrogel microenvironment. *Biomaterials* 2012; 33(15): 3835-45.
- 49 Parekh SH, Chatterjee K, Lin-Gibson S, Moore NM, Cicerone MT, Young MF, *et al.* Modulus-driven differentiation of marrow stromal cells in 3D scaffolds that is independent of myosin-based cytoskeletal tension. *Biomaterials* 2011; 32(9): 2256-64.
- 50 Wingate K, Bonani W, Tan Y, Bryant SJ, Tan W. Compressive elasticity of three-dimensional nanofiber matrix directs mesenchymal stem cell differentiation to vascular cells with endothelial or smooth muscle cell markers. *Acta Biomater* 2012; 8(4): 1440-9.
- 51 Laniel M, Huq E, Allen S, Buttery L, Williams PM, Alexander MR. Substrate induced differentiation of human mesenchymal stem cells on hydrogels with modified surface chemistry and controlled modulus. *Soft Matter* 2011; 7(14): 6501-14.
- 52 Winer JP, Janmey PA, McCormick ME, Funaki M. Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells become quiescent on soft substrates but remain responsive to chemical or mechanical stimuli. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(1): 147-54.
- 53 Yu HY, Lui YS, Xiong SJ, Leong WS, Wen F, Nurkafianto H, *et al.* Insights into the role of focal adhesion modulation in myogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2013; 22(1): 136-47.
- 54 Xue R, Li JY, Yeh Y, Yang L, Chien S. Effects of matrix elasticity and cell density on human mesenchymal stem cells differentiation. *J Orthop Res* 2013; 31(9): 1360-5.
- 55 Sharma RI, Snedeker JG. Paracrine interactions between mesenchymal stem cells affect substrate driven differentiation toward tendon and bone phenotypes. *PLoS One* 2012; 7(2): e31504.
- 56 Pelham RJ Jr, Wang Y. High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate. *Mol Biol Cell* 1999; 10(4): 935-45.
- 57 Tzvetkova-Chevolleau T, Stephanou A, Fuard D, Ohayon J, Schiavone P, Tracqui P. The motility of normal and cancer cells in response to the combined influence of the substrate rigidity and anisotropic microstructure. *Biomaterials* 2008; 29(10): 1541-51.
- 58 Zouani OF, Chollet C, Guillotin B, Durrieu MC. Differentiation of pre-osteoblast cells on poly (ethylene terephthalate) grafted with RGD and/or BMPs mimetic peptides. *Biomaterials* 2010; 31(32): 8245-53.
- 59 Pountos I, Georgouli T, Henshaw K, Bird H, Jones E, Giannoudis PV. The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone. *J Orthop Trauma* 2010; 24(9): 552-6.
- 60 Hamidouche Z, Fromigie O, Nuber U, Vaudin P, Pages JC, Ebert R, *et al.* Autocrine fibroblast growth factor 18 mediates dexamethasone-induced osteogenic differentiation of murine mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2010; 224(2): 509-15.
- 61 Jin W, Xing YQ, Yang AH. Epidermal growth factor promotes the differentiation of stem cells derived from human umbilical cord blood into neuron-like cells via taurine induction in vitro. *In Vitro Cell Dev-An* 2009; 45(7): 321-7.
- 62 McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004; 6(4): 483-95.
- 63 Faghihi F, Baghaban Eslaminejad M. The effect of nano-scale topography on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2013; doi: 10.5507/bp.2013.013.
- 64 Martino MM, Mochizuki M, Rothenfluh DA, Rempel SA, Hubbell JA, Barker TH. Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials* 2009; 30(6): 1089-97.

- 65 Rim NG, Lee JH, Jeong SI, Lee BK, Kim CH, Shin H. Modulation of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by poly[(L-lactide)-co-(epsilon-caprolactone)]/gelatin nanofibers. *Macromol Biosci* 2009; 9(8): 795-804.
- 66 Hynes RO. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69(1): 11-25.
- 67 Lanfer B, Seib FP, Freudenberg U, Stamov D, Bley T, Bornhauser M, *et al.* The growth and differentiation of mesenchymal stem and progenitor cells cultured on aligned collagen matrices. *Biomaterials* 2009; 30(30): 5950-8.
- 68 Schwartz MA, DeSimone DW. Cell adhesion receptors in mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(5): 551-6.
- 69 Geiger B, Yamada KM. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(5): doi: 10.1101/cshperspect.a005033.
- 70 Mathieu PS, Lobo EG. Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18(6): 436-44.
- 71 Inoue Y, Tsuda S, Nakagawa K, Hojo M, Adachi T. Modeling myosin-dependent rearrangement and force generation in an actomyosin network. *J Theor Biol* 2011; 281(1): 65-73.
- 72 Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2009; 10(1): 21-33.
- 73 Hirata H, Tatsumi H, Sokabe M. Mechanical forces facilitate actin polymerization at focal adhesions in a zyxin-dependent manner. *J Cell Sci* 2008; 121(17): 2795-804.
- 74 Huang S, Ingber DE. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell* 2005; 8(3): 175-6.
- 75 Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, *et al.* Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science* 2003; 302(5651): 1704-9.
- 76 Kim TJ, Seong J, Ouyang M, Sun J, Lu S, Hong JP, *et al.* Substrate rigidity regulates Ca²⁺ oscillation via RhoA pathway in stem cells. *J Cell Physiol* 2009; 218(2): 285-93.
- 77 den Dekker E, Molin DGM, Breikers G, van Oerle R, Akkerman JWN, van Eys GJJM, *et al.* Expression of transient receptor potential mRNA isoforms and Ca²⁺ influx in differentiating human stem cells and platelets. *Bba-Mol Cell Res* 2001; 1539(3): 243-55.
- 78 Sun S, Liu YM, Lipsky S, Cho M. Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells. *FASEB J* 2007; 21(7): 1472-80.
- 79 Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 2010; 147(1): 35-51.
- 80 Cohen LA, Guan JL. Mechanisms of focal adhesion kinase regulation. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5(8): 629-43.
- 81 Friedland JC, Lee MH, Boettiger D. Mechanically activated integrin switch controls alpha(5)beta(1) function. *Science* 2009; 323(5914): 642-4.
- 82 Michael KE, Dumbauld DW, Burns KL, Hanks SK, Garcia AJ. Focal adhesion kinase modulates cell adhesion strengthening via integrin activation. *Mol Biol Cell* 2009; 20(9): 2508-19.
- 83 Salaszyk RM, Klees RF, Williams WA, Boskey A, Plopper GE. Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2007; 313(1): 22-37.
- 84 Khatiwala CB, Kim PD, Peyton SR, Putnam AJ. ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK. *J Bone Miner Res* 2009; 24(5): 886-98.
- 85 Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, Otani H, Inagaki K, Miyoshi T, *et al.* Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor- α inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Endocrinol* 2008; 196(3): 601-13.
- 86 Hamidouche Z, Fromiguet O, Ringe J, Haupl T, Vaudin P, Srouji S, *et al.* Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Bone* 2009; 44(2): S218-S9.
- 87 Homan SM, Martinez R, Benware A, LaFlamme SE. Regulation of the association of alpha 6 beta 4 with vimentin intermediate filaments in endothelial cells. *Exp Cell Res* 2002; 281(1): 107-14.
- 88 Norvell SM, Ponik SM, Bowen DK, Gerard R, Pavalko FM. Fluid shear stress induction of COX-2 protein and prostaglandin release in cultured MC3T3-E1 osteoblasts does not require intact microfilaments or microtubules. *J Appl Physiol* 2004; 96(3): 957-66.
- 89 Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* 1996; 134(4): 971-83.
- 90 Pekny M, Lane EB. Intermediate filaments and stress. *Exp Cell Res* 2007; 313(10): 2244-54.
- 91 Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: Mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2009; 10(1): 75-82.