

# 电刺激提高骨骼肌微纤维致动器致动性能

陆志威 关冠 赵钢\*

(中国科学技术大学微纳米工程实验室, 安徽 230022)

**摘要** 生物混合致动器是生物混合机器人的重要部分, 该研究利用可光交联水凝胶(GelMA)作为小鼠成肌细胞C2C12细胞的细胞间基质, 制作了一种直径为500  $\mu\text{m}$ 的微纤维致动器, 并探究长时间电刺激对微纤维中C2C12细胞分化及致动能力的影响。该研究利用不同电压的方波脉冲信号在细胞分化期间对细胞进行每天15 min的电刺激, 同时利用刚性支架固定微纤维以保持其方向与电场方向一致, 并对微纤维施加30%机械拉伸。为表征电刺激对细胞分化的影响, 利用ImageJ软件统计肌管长度、宽度与取向角, 利用肌球蛋白重链(MHC)荧光染色表征其肌球蛋白重链表达, 利用ANSYS有限元仿真计算致动器主动张力。结果表明, 该微纤维致动器适合C2C12细胞生长并使其分化形成可收缩的骨骼肌, 通过分化期间的长时间电刺激可有效促进C2C12细胞的分化、增大骨骼肌中肌管尺寸并提高微纤维致动器致动性能。其中18 V的电刺激效果最为显著, 能使肌管长度有效提高30%, 肌管宽度提高24%, 肌管主动张力提高198%, 使其达到0.21  $\mu\text{N}$ 。含有性能增强的骨骼肌的微纤维致动器可进一步应用于生物混合机器人组装领域, 在药物筛选和骨骼肌再生等基础研究领域也有较强的应用潜力。

**关键词** C2C12细胞; 生物混合致动器; 电刺激; 细胞分化

## Electrical Stimulation Enhances Actuation Performance of Skeletal Muscle Microfiber Actuators

LU Zhiwei, GUAN Guan, ZHAO Gang\*

(Micro and Nano Engineering Laboratory, University of Science and Technology of China, Anhui 230022, China)

**Abstract** The biohybrid actuator is an important part of the biohybrid robot. In this study, a microfiber actuator with a diameter of 500  $\mu\text{m}$  was fabricated by using photocrosslinkable hydrogel (GelMA) as the intercellular matrix of mouse myoblast C2C12 cells and explore the effect of long-term electrical stimulation on the differentiation and actuation ability of C2C12 cells in microfibers. In this study, square wave pulse signals of different voltages were used to electrically stimulate cells for 15 min per day during cell differentiation, at the same time, a rigid scaffold is used to apply 30% mechanical stretching to the microfibers, as well as to immobilize the microfibers to maintain the direction consistent with the direction of the electric field. In order to characterize the effect of electrical stimulation on cell differentiation, ImageJ software was used to count the length, width and orientation angle of MHC (myotubes, myosin heavy chain). Fluorescence staining was used to characterize the expression of myosin heavy chain, and ANSYS finite element simulation was used to calculate the active tension of the actuator. The results show that the microfiber actuator is suitable for C2C12 cells to grow and differentiate into contractile skeletal

收稿日期: 2022-03-17 接受日期: 2022-05-19

国家自然科学基金(批准号: 51675503)资助的课题

\*通讯作者: Tel: 0551-63602718, E-mail: fvc@ustc.edu.cn

Received: March 17, 2022 Accepted: May 19, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.51675503)

\*Corresponding author. Tel: +86-551-63602718, E-mail: fvc@ustc.edu.cn

muscle, and long-term electrical stimulation during differentiation can effectively promote the differentiation of C2C12 cells, increase the size of myotubes in skeletal muscle, and increase actuation performance of the microfibers actuator. The electrical stimulation effect of the 18 V experimental group was the most significant, which can effectively increase the length of myotubes by 30%, increase the width of myotubes by 24%, and increase the active tension of myotubes by 198%, reaching 0.21  $\mu\text{N}$ . Microfiber actuators containing enhanced skeletal muscle can provide further applications in the field of biohybrid robotic assembly, and also have strong application potential in basic research fields such as drug screening and skeletal muscle regeneration.

**Keywords** C2C12 cells; bio-hybrid actuators; electrical stimulation; cell differentiation

生物混合机器人是将生物组织或生物材料与机械结构结合而成的一种新型机器人,生物部分在机器人中主要起致动器作用。可作为生物混合机器人致动器的生物材料主要有哺乳动物心肌细胞<sup>[1]</sup>、哺乳动物骨骼肌细胞<sup>[2]</sup>、昆虫DV组织<sup>[3]</sup>、微生物<sup>[4]</sup>等。其中哺乳动物骨骼肌细胞由于材料来源广、输出力大、可控性高而备受青睐。而在生物混合机器人中充当细胞间基质的材料常用各种生物相容性多功能水凝胶。多功能水凝胶是组织工程、医学研究的重要组成部分,由于其与细胞微环境非常相似可作为细胞培养的支架材料,受到研究者的广泛青睐。迄今为止,这些材料已被积极研究以开发各种生物替代品并激发可预测的生物反应。尽管水凝胶表现出这些显著特性,但它们仍然具有许多局限性,例如机械刚度低、热稳定性低、降解速度快等,以上缺陷限制了它们在组织工程和医学研究中的应用。2000年, VAN等<sup>[5]</sup>通过在明胶中接枝改性,制造了甲基丙烯酸酯化明胶(GelMA),使明胶获得光固化特性以及稳定的机械与生化性能。因为GelMA的可光交联特性、与生物组织相近且可调的机械强度、稳定安全的化学性质以及优异的生物相容性,已广泛应用于生物医疗领域,如制作细胞培养支架、生长因子递送载体。

体外人工培养的骨骼肌组织输出力往往与动物体内的天然肌肉组织有较大的差异。提高体外培养的骨骼肌组织输出力,主要有两种途径。(1) 提高骨骼肌中肌管方向一致性。天然骨骼肌中的肌管方向一致,肌肉沿肌管方向,而体外培养的肌管往往方向杂乱,无法提供有效输出力,故人们通过物理拓扑结构<sup>[6]</sup>、机械拉伸<sup>[7]</sup>、电场刺激<sup>[8]</sup>等方法保持肌管方向一致。(2) 促进骨骼肌发育,提高骨骼肌输出力。人们通过化学刺激<sup>[9-11]</sup>、电刺激<sup>[12]</sup>、机械刺激<sup>[13-14]</sup>、生物共培养<sup>[15]</sup>等方式促进体外培养骨骼肌的发育,使体外培养骨骼肌输出力接近天然骨骼肌。但现有

方法往往制造复杂、设备昂贵,本文利用GelMA作为细胞间基质培养小鼠成肌细胞(C2C12细胞),制造了一种可拓展的尺寸灵活的生物致动器,利用机械拉伸提高肌管方向一致性,利用长时间电刺激促进C2C12细胞的分化,探究了促进微纤维中C2C12细胞分化成熟的最佳电刺激参数,并通过免疫荧光染色、有限元仿真等手段评估C2C12细胞分化状况与致动器致动性能,其操作简单,强化效果显著。最终C2C12细胞在水凝胶微纤维中生长分化形成可收缩的骨骼肌,这种结合GelMA与骨骼肌的生物混合致动器在生物混合致动、药物筛选和骨骼肌再生等领域具有巨大潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 C2C12小鼠成肌细胞来源为中国科学院上海细胞库,为保证分化效果,所使用细胞均传代不超过五代。

1.1.2 主要试剂与仪器 主要试剂: DMEM高糖培养基、1%青霉素-链霉素(1% P/S)、Trypsin-EDTA胰蛋白酶、PBS磷酸盐缓冲液购自美国Gibco公司; FBS胎牛血清、HS马血清购自乌拉圭Lonsera公司; MA甲基丙烯酸酯购自中国Aladdin公司; 猪皮明胶、小鼠单克隆抗体MY-32、Irgacure 2959光引发剂购自美国Sigma公司; 多聚甲醛、Triton X-100曲拉通购自美国Invitrogen公司; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)购自北京索莱宝科技有限公司; 山羊抗小鼠Alexa Fluor 488抗体购自英国Abcam公司。主要仪器: 倒置荧光显微镜购自德国Leica公司; 高分辨率双面曝光机购自美国ABM公司; 激光共聚焦显微镜购自德国Zeiss公司; 自制方波脉冲发生器。

### 1.2 方法

1.2.1 包裹细胞的水凝胶纤维制造 本实验使用

的水凝胶为可光交联的甲基丙烯酰化明胶(GelMA)水凝胶, 制造方法参考文献[8], 制造完成后为白色泡沫状固体。使用时将10% (w/V) GelMA、0.5% (w/V) Irgacure 2959溶解于PBS中, 50 °C避光水浴加热1 h, 得到浓度为10%的水凝胶预聚液, 利用0.22 μm滤菌膜滤菌后避光冷却备用。将培养皿中生长密度达到80%的C2C12细胞使用EDTA消化2 min后从培养皿底部剥离并离心, 最后使用移液器去除上清液。使用冷却至37 °C的水凝胶预聚液将C2C12细胞重悬, 得到细胞密度约为 $8.6 \times 10^6$ 个/mL的水凝胶预聚液。利用无菌注射器将包含C2C12细胞的水凝胶预聚液注射至500 μm内径硅胶管中(图1A), 将硅胶管置于UV光(强度为11.5 mW/cm<sup>2</sup>, 波长为365 nm)下进行曝光30 s(图1B), 最后将水凝胶预聚液光固化交联形成的微纤维从硅胶管中挤出到培养基中(图1C), 备用。

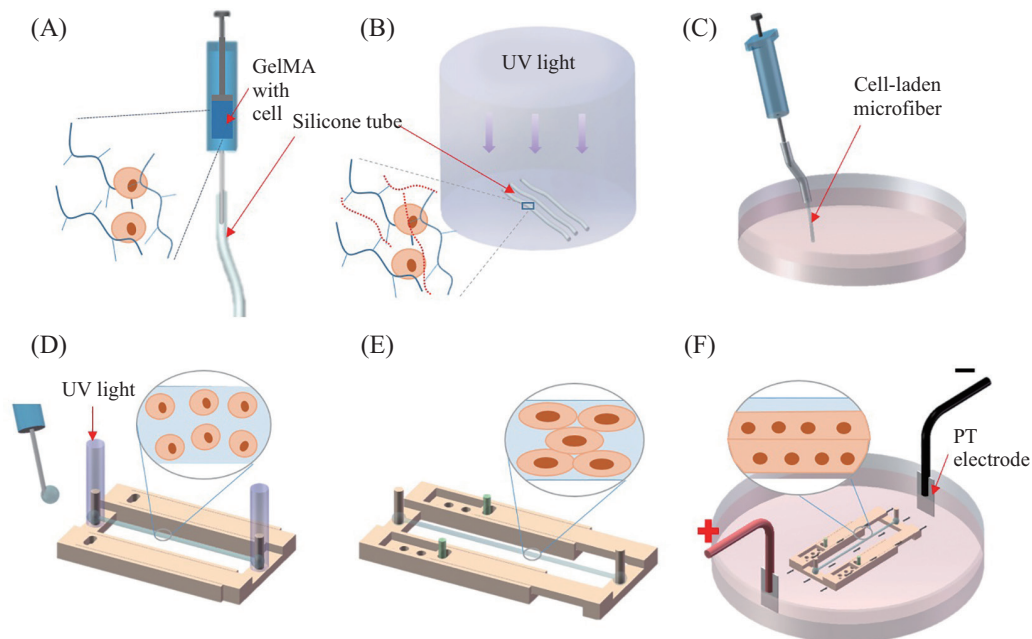
1.2.2 水凝胶纤维的固定与机械拉伸 为保证水凝胶纤维的方向与电场方向平行以及取得更一致的细胞取向, 需要对纤维进行固定与机械拉伸。将纤维两端缠绕在可伸缩的支架上, 并利用水凝胶预聚液作为黏合剂滴加在纤维与支架连接处, 进行局部二次曝光保证纤维与支架的稳定耦合(图1D)。最后通过拉伸支架, 对纤维施加30%的静态机械拉伸(图1E)。支架通过3D打印制作, 可控伸缩长度为20~38 mm, 以1 mm

为步进, 材料为生物相容性光敏树脂。

1.2.3 细胞培养与电刺激 将固定好的水凝胶纤维转移至60 mm培养皿, 使用生长培养基(含10% FBS和1% P/S的DMEM培养基)培养5天, 待细胞密度达到一定程度之后改用分化培养基(含2% HS和1% P/S的DMEM培养基)培养7天, 在此期间对每组细胞进行电刺激15 min(图1F)(电刺激信号为方波脉冲信号, 频率为1 Hz, 脉宽为2 ms, 电压幅值为0、6、12、18、24、30 V, 电极间距为30 mm), 每天利用倒置荧光显微镜观察记录细胞形态。

1.2.4 肌管形状参数统计 骨骼肌是高度有序的平行收缩肌纤维, 而肌纤维由多核肌管组成, 使用ImageJ软件统计水凝胶微纤维中肌管的长度、宽度、角度等数据。其中角度定义为肌管长轴与微纤维主轴之间的夹角, 范围为0°~90°。

1.2.5 电刺激响应实验 在细胞分化7天后, 可观察到微纤维表面存在大量长条状肌管, 说明C2C12细胞已分化形成骨骼肌。为测试骨骼肌是否具有响应电信号产生主动收缩的能力, 在分化的第7天使用幅值40 V(电极间距50 mm)、频率1 Hz、脉宽2 ms的方波脉冲信号对水凝胶微纤维进行电刺激响应实验(图2)。使用显微镜明场模式观察微纤维致动器的运动情况, 并以30帧/s的帧率录屏记录微纤维致动



A: 注入模具; B: 光交联; C: 挤出; D: 固定; E: 拉伸; F: 电刺激。

A: injection mold; B: photocrosslinking; C: extrusion; D: fixing; E: stretching; F: electrical stimulation.

图1 水凝胶微纤维加工及细胞培养过程示意图

Fig.1 Schematic diagram of hydrogel microfiber processing and cell culture



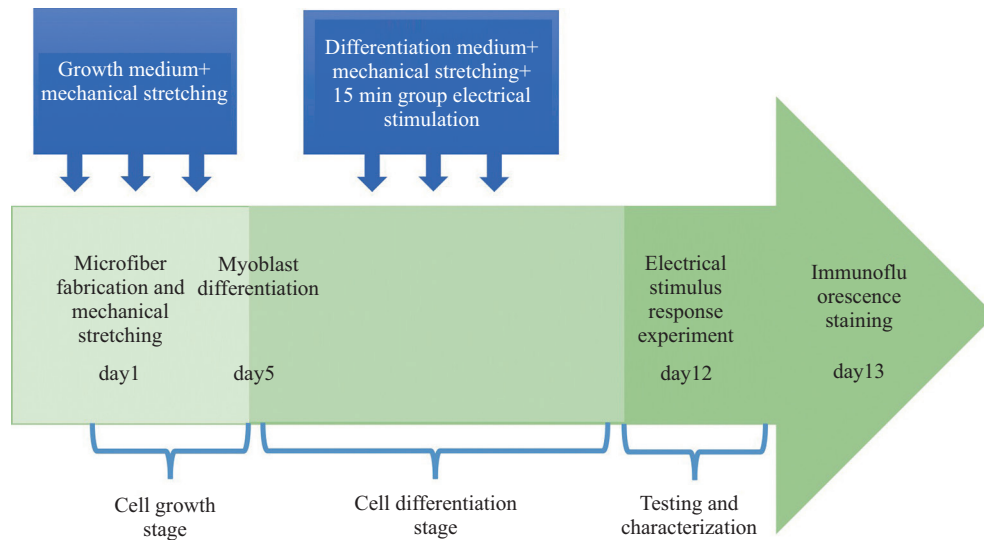


图2 实验流程示意图

Fig.2 Schematic diagram of the experimental process

器中央位置的运动视频。对于弹性体,受拉时产生的力 $F$ 的计算公式如下:

$$F=EA \frac{\Delta L}{L} \quad (1)$$

式中 $E$ 为材料杨氏模量,  $A$ 为材料横截面积,  $L$ 是变形前长度,  $\Delta L$ 是变形时的伸长量。

由式(1)可知,对中部的微纤维固定位置进行进行视频采集,保证 $L$ 的一致性,就能得到较为准确的计算结果,受拉时产生的力 $F$ 的计算结果与骨骼肌位置无关。得到的视频由ImageJ的2D粒子自动追踪功能追踪致动器运动情况,量化致动器位移速度等数据。

1.2.6 微纤维致动器主动张力数值模拟与仿真 利用有限元分析软件ANSYS建立骨骼肌-水凝胶微纤维收缩模型,通过有限元仿真计算微纤维致动器的主动张力。

1.2.7 肌球蛋白重链(MHC)免疫荧光染色 将纤维用适量PBS清洗3次,以去除残留培养基;使用4%多聚甲醛浸没纤维,室温下静置15 min以固定细胞;使用0.5% Triton X-100浸没纤维,室温静置15 min以通透细胞;使用3%牛血清白蛋白浸没纤维,室温静置1 h以封闭细胞;将小鼠单克隆抗体MY-32用PBS进行稀释以配置工作液,稀释比例为1:400,用适量工作液浸没纤维,并在黑暗中于4 °C静置过夜;将山羊抗小鼠Alexa Fluor 488抗体用PBS进行稀释以配置工作液,稀释比例为1:500,用适量工作液浸没纤

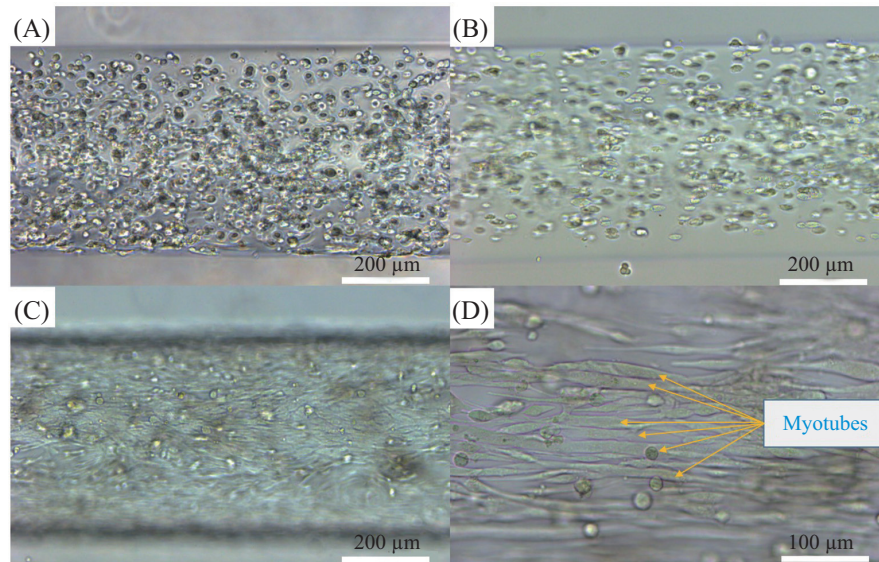
维,并在黑暗中于4 °C静置1 h;利用50 mg/mL DAPI溶液浸没细胞,黑暗中静置10 min以对细胞核进行染色;最后PBS清洗细胞3次,利用激光共聚焦显微镜成像。

1.2.8 统计学分析 各实验均独立重复3次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,使用Origin对数据进行方差齐性检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较时,方差齐性则采用Tukey检验,方差不齐则采用Dunnnett  $t$ 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义,用\*表示,NS表示差异不显著。

## 2 结果

### 2.1 细胞在水凝胶微纤维中生长分化

C2C12细胞在包裹进水凝胶微纤维后,呈较为规则的圆形(图3A)。经过机械拉伸后,细胞呈椭圆形,椭圆形长轴方向较为一致且与微纤维长轴平行(图3B)。微纤维中细胞经过30 s的UV光照射后,部分细胞由于UV光对细胞的损伤而凋亡,存活率随UV光曝光时间增长而降低。随着剩余存活细胞的生长分裂,细胞存活率在几天内逐渐回升,其中30 s曝光时间的微纤维由于其适宜的曝光时间与机械强度,其中的细胞在生长培养基中生长约5天后,在纤维中达到较高的密度(图3C),相较其他曝光时间其有最高的细胞存活率。第5天时,微纤维中细胞生长密集,将生长培养基换为分化培养基,并每天施加15 min电刺激,约7天后可观察到取向一致的多核肌管结构(图3D)。



A: 第1天微纤维中细胞呈圆形; B: 第1天拉伸后的细胞呈椭圆形; C: 第5天细胞在微纤维中生长密集; D: 第12天细胞分化成熟形成肌管。

A: the cells in the microfibrils were round on day1; B: the cells after stretching were oval on day 1; C: the cells grew densely in the microfibrils on day5; D: the cells differentiated and matured to form myotubes on day12.

图3 水凝胶微纤维适宜细胞生长与分化

Fig.3 Hydrogel microfibrils are suitable for cell growth and differentiation

## 2.2 电刺激促进C2C12细胞分化

利用ImageJ软件分析显微明场图像(图4A), 统计不同电压电刺激对细胞分化形成的肌管长度(图4B)、宽度(图4C)、角度(图4D)的影响。结果表明, 相对于不进行电刺激的对照组, 12~30 V的实验组的肌管长度、宽度均有一定程度提升。肌管长度、宽度与长期电刺激电压的关系并不是完全的线性, 而是随电压的上升而呈现先上升后下降的趋势, 其中肌管长度、宽度的最大值出现在长期电刺激电压18 V的实验组。长期电刺激电压18 V的实验组中肌管的长度从对照组的(322.74±53.39) μm提高至(409.87±91.64) μm, 提升约30%, 肌管的宽度从对照组的(19.74±6.29) μm提高到了(24.45±3.71) μm, 提高约24%。而0 V与6 V两组之间的肌管长度宽度均不存在统计学差异, 说明6 V的电刺激对成肌细胞分化的影响并不明显。各组肌管角度都在10°以内, 与微纤维主轴方向保持高度一致, 说明机械拉伸提高了肌管取向的一致性。

从荧光图像上看, 18 V与24 V两组细胞的分化效果明显强于其他组, 形成的肌管结构(如图5中绿色荧光形成的条状结构)比其他各组更为密集粗大, 说明长期电刺激促进了C2C12细胞的分化成熟与肌球蛋白重链的合成。

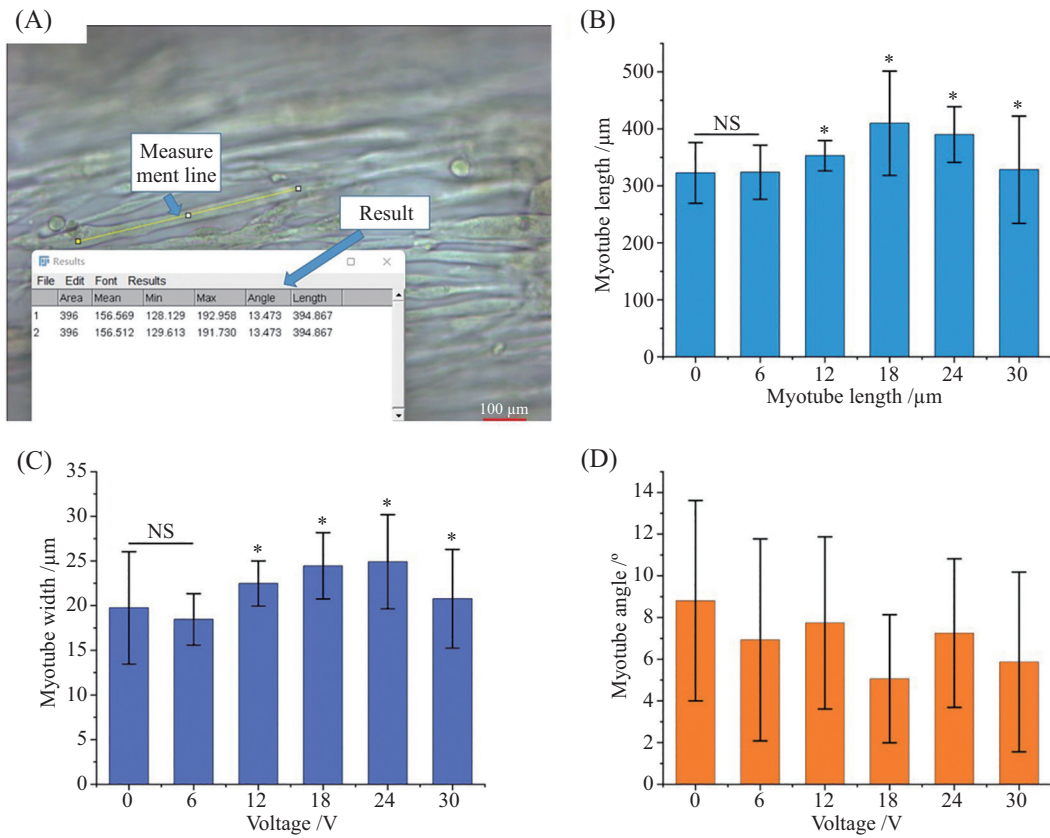
## 2.3 电刺激提高微纤维致动器收缩位移与主动张力在7天的长期电刺激结束后, 利用ImageJ软件测

量40 V(电极间距50 mm, 电信号波形如图6D所示)电刺激下骨骼肌收缩所导致的微纤维致动器位移(图6A)。在电刺激下, 骨骼肌随电信号的脉冲迅速收缩, 并带动微纤维致动器产生轴向位移。位移在0.3 s之内达到峰值3.12 μm(图6B, 图中以24 V实验组为例), 之后在微纤维本身拉力的作用下回归初始位置。不同组的微纤维致动器位移量与长期电刺激的电压也呈现先上升后下降的趋势, 与不同组肌管长度、宽度随电刺激电压的变化趋势类似。18 V的实验组有最大位移提升, 从对照组的(1.33±0.30) μm提升至(3.96±0.26) μm, 提升约198%(图6C)。利用ANSYS软件模拟计算微纤维变形时对支架产生的拉力(图6E), 此拉力即为微纤维致动器能产生的主动张力, 计算得到的输出力与纤维位移为线性关系。由图6F可知, 主动张力与长期电刺激的关系也呈先上升后下降的关系, 相对于对照组, 长期电刺激有效提高了微纤维致动器的主动张力, 其中18 V的电刺激提升效果最为明显, 主动张力从对照组的0.071 μN提升至0.210 μN, 提高约198%。

## 3 讨论

电刺激作为物理刺激对细胞行为有着显著的影响, 在大部分情况下, 电刺激能够促进细胞的增殖和分化, 促进细胞向阴极的迁移以及细胞取向的

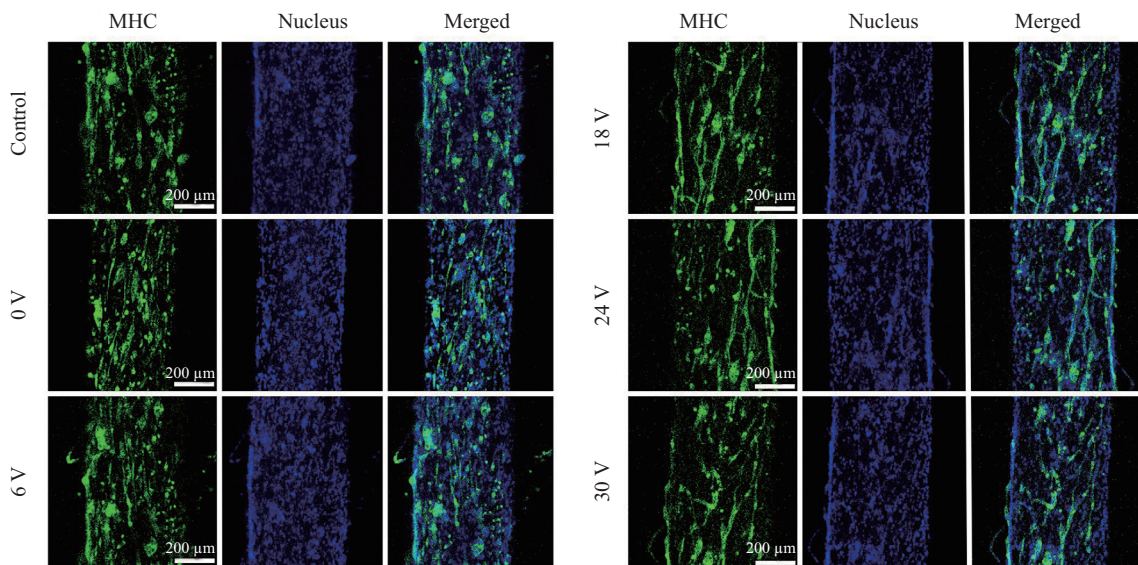




A: 使用ImageJ软件测量肌管形状参数; B-D: 肌管长度、宽度、角度与电压关系。\* $P < 0.05$ , 与对照组比较, NS表示两组之间无显著性差异。  
 A: myotube shape parameters were measured using ImageJ software; B-D: the relationship between the length, width, angle of the myotubes and voltage. \* $P < 0.05$  compared with control group, NS indicates no significant difference between the two groups.

图4 电刺激促进C2C12细胞分化

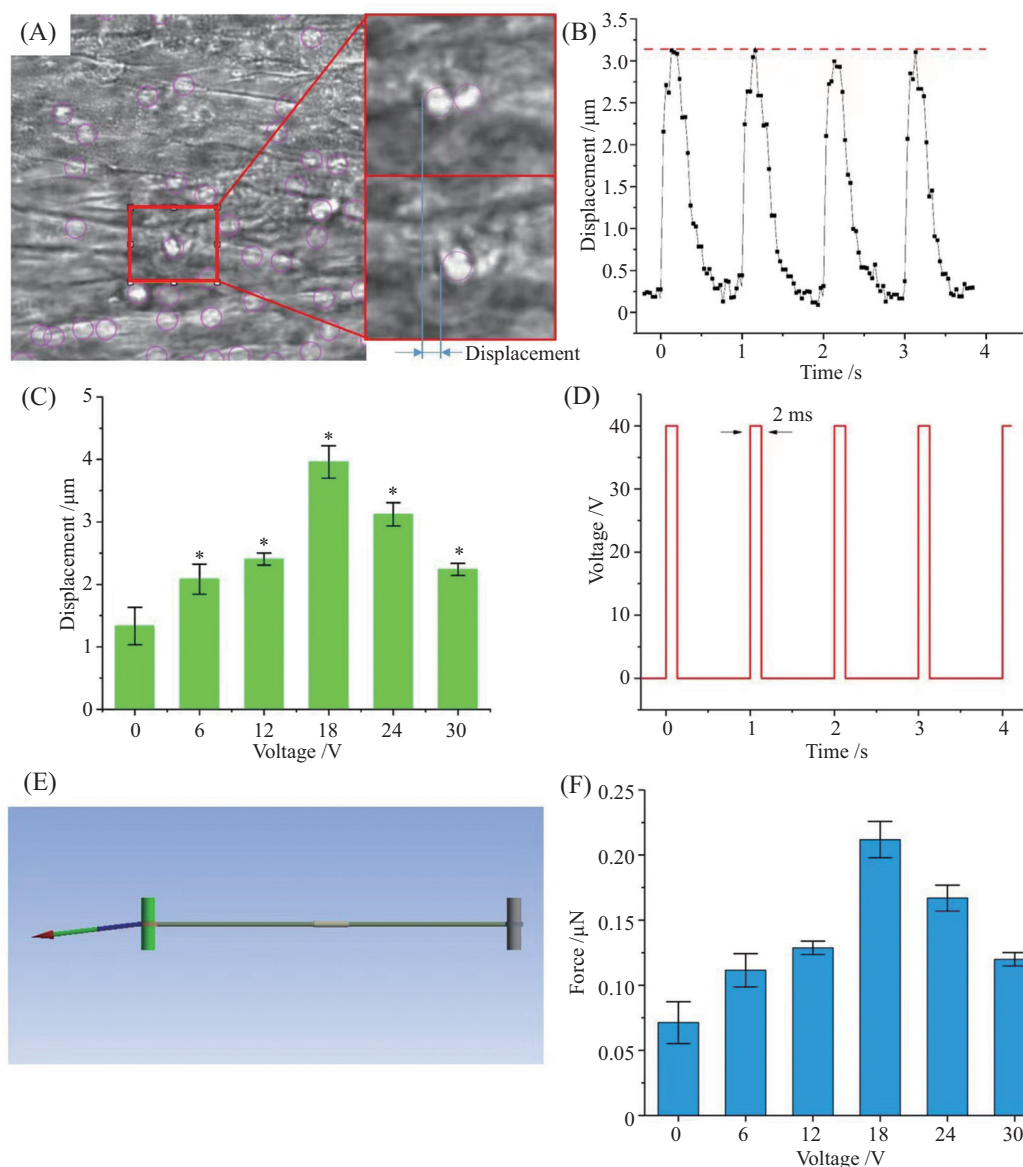
Fig.4 Electrical stimulation promotes differentiation of C2C12 cells



对0、6、12、18、24、30 V六组微纤维进行MHC免疫荧光染色(绿色, 左), 并使用DAPI进行细胞核染色(蓝色, 中)。  
 MHC immunofluorescence staining (green, left) for six groups of microfibers at 0, 6, 12, 18, 24, 30 V, and nuclear staining using DAPI (blue, middle).

图5 电刺激促进肌管成熟与MHC合成

Fig.5 Electrical stimulation promotes myotube maturation and MHC synthesis



A: ImageJ粒子追踪, 红框内为同一粒子在不同时间下的局部放大图; B: 微纤维位移波形; C: 不同组的纤维位移; D: 电信号波形; E: 有限元仿真; F: 不同组的微纤维致动器主动张力。

A: ImageJ particle tracking, in the red frame is a partial enlarged view of the same particle at different times; B: fiber displacement waveform; C: fiber displacement of different groups; D: electrical signal waveform; E: finite element simulation; F: active tension of different groups of microfiber actuators.

图6 电刺激提高致动器位移与主动张力

Fig.6 Electrical stimulation enhances actuator displacement and active tension

对齐。但并不是所有形式的电刺激形式与电刺激参数都能取得正面的效果, 如YANG等<sup>[16]</sup>使用高频交变电场促进C2C12细胞沿电场平行方向取向, 但1.2 kV/cm的高场强刺激会提高细胞的死亡率; MESTRE等<sup>[17]</sup>利用不同频率与幅值的电刺激促进C2C12细胞发育, 结果表明10 Hz的电刺激会使肌管产生强直性抽搐行为。这是因为肌管的收缩舒张并不是瞬时的过程, 过高的电刺激频率使肌管无法进入到舒张阶段, 时刻处于收缩状态, 长时间的高频电刺激显

著降低了细胞的生命活性。几乎在所有场景下, 过高的电刺激电压均表现出了对细胞生命活动的损害。同时, 电刺激参数也受到细胞周围介质与环境的影响, 如YANG等<sup>[16]</sup>的研究表明当C2C12细胞处于不同黏度的生物墨水中时, 较低黏度的生物墨水中的C2C12细胞更易与电场方向对齐, 故有必要对光固化水凝胶微纤维中的C2C12细胞的电刺激方案进行研究。

利用ImageJ软件测量C2C12细胞分化形成的肌

管的长度与宽度发现电刺激有效促进了细胞分化过程中沿电场方向的细胞融合、多核肌管的形成与肌管的发育与肥大。不同电压的长时间电刺激对细胞分化的促进效果不尽相同,而是随电压的上升呈现先上升后下降的趋势,并在18 V的实验组中取得了最佳的促进效果。MHC免疫荧光染色的结果也证实了这一点,18 V的实验组相比于其他组,肌管尺寸与肌球蛋白重链均有更优秀的表现。

不同实验组的肌管角度并无统计学差异,但可以注意到各实验组的肌管角度均值均在 $10^\circ$ 以内,说明大部分肌管沿水凝胶方向取向。这是因为固定机械拉伸通过人为干涉确定了C2C12细胞长轴的方向,有利于肌管的对齐<sup>[7]</sup>。

对于生物致动器而言,最重要的指标是致动器的输出力,因此计算致动器主动张力是必要的。通常表征骨骼肌收缩能力的参数是骨骼肌的收缩位移,直接统计骨骼肌收缩位移能获得较大的收缩位移数据。但骨骼肌的局部收缩位移仅能表征骨骼肌发育情况,无法用来具体计算致动器对外做功能力。因此统计骨骼肌带动的微纤维致动器位移更具有代表性。我们统计了距离收缩骨骼肌一段距离之外的微纤维上同一轴向位置不同高度的点的位移,结果表明位移的方差很小,说明骨骼肌收缩确实带动了微纤维致动器的位移而非仅仅是骨骼肌本身的局部位移。同时也发现,微纤维轴向距离骨骼肌收缩位置越远的地方,微纤维的位移越小,说明微纤维位移的本质是骨骼肌的收缩使微纤维产生了轴向的弹性拉伸变形。

对于各组的统计结果表明,18 V的实验组对致动性能有最大的提升,微纤维位移从0 V的 $(1.33 \pm 0.30) \mu\text{m}$ 提升至 $(3.96 \pm 0.26) \mu\text{m}$ ,提升约198%。这与肌管尺寸统计结果相似,发育更良好的骨骼肌致动性能也更强。

利用ANSYS软件进行有限元仿真,将微纤维简化为均匀弹性体,可利用微纤维位移计算出支架两端刚性支架所受拉力,以经过调制的正弦波作为肌管收缩过程的近似模拟,结果表明拉力与纤维位移成线性关系,这与理论计算结果相符合,18 V的实验组致动器主动张力最大,达到 $0.21 \mu\text{N}$ 。

就细胞如何与电信号相互作用而言,电信号对细胞代谢活动的影响仍未被完全阐明。目前研究者认为电信号主要从信号转导途径、 $\text{Ca}^{2+}$ 瞬变、细胞

骨架重组和肌动蛋白分布、表面受体再分布、三磷酸腺苷(ATP)合成、活性氧产生等几方面影响细胞的生命活动。以上简要描述的细胞机制在细胞和组织中的一系列复杂事件中相互关联,且不同的电刺激方案可能从不同机制影响细胞的生命活动。在使用类似电刺激方案的研究中,研究者们认为 $\text{Ca}^{2+}$ 瞬变与细胞骨架重组和肌动蛋白分布可能是其主要作用的机制。特定频率的电脉冲可以诱导 $\text{Ca}^{2+}$ 振荡影响肌节蛋白的组装,从而加速分化肌管中成熟肌节结构的形成<sup>[20-21]</sup>。骨骼肌的机械训练可以通过影响细胞骨架重组和肌动蛋白分布来促进肌管肥大与相关蛋白的合成,无论是光刺激、电刺激引起的骨骼肌自主收缩<sup>[20]</sup>还是外界机械刺激<sup>[13]</sup>都能促进成肌细胞的分化。

结合肌管形状与主动张力综合分析,6 V的电刺激对C2C12细胞发育的促进效果微弱,可能是由于幅值过小的电刺激电场较弱,难以促使 $\text{Ca}^{2+}$ 瞬变的发生,且无法引起骨骼肌的自主收缩;从12 V(电极间场强约4 V/cm)开始,实验组的各项指标随电刺激电压的提升而相应提高,一方面是电刺激可通过 $\text{Ca}^{2+}$ 瞬变加速肌管的形成并促进肌管中肌节结构的形成<sup>[19]</sup>,另一方面我们在实验中观察到骨骼肌对4 V/cm的电刺激开始产生响应而收缩,从而促进细胞骨架重组和改变肌动蛋白分布。研究表明,适当的肌管收缩可模拟肌管在自然生理条件下的收缩,有效促进肌管的发育肥大<sup>[20]</sup>;而30 V的实验组在各方面参数都产生了下滑,这可能是因为电刺激产生的肌管收缩的累积应力与刚性机械约束一起导致对组织的有害影响以及高强度电场对细胞的电化学损伤。更高幅值的电刺激则会在更大程度上损害细胞生命活动,更有可能在长时间电刺激过程中发生培养基电解现象,改变溶液pH值、产生各种有毒有害物质,极大提高细胞死亡率,故更高幅值的电刺激参数不必探究。

然而机械拉伸与电刺激结合的效果并不是完全正向的,刚性支架可以带来精确稳定的机械拉伸,有效提高细胞取向一致性,但对肌管的运动产生了一定阻碍,它会导致电刺激肌管收缩时肌管相互拮抗无法产生最大主动张力,有研究表明,低频电刺激在使用柔性机械约束时会产生更好的效果<sup>[12]</sup>;因此,在未来的研究中,需要寻找一种刚性适中、蠕变性低且生物相容的柔性材料与刚性支架结合来提供更



良好的机械拉伸。

综上所述,本研究利用可光交联水凝胶(Gel-MA)作为C2C12细胞的细胞间基质,制作了一种直径500  $\mu\text{m}$ 的微纤维致动器。C2C12细胞在微纤维中生长分化形成具有可控收缩性能的骨骼肌并具备对外做功能力。我们通过长时间的不同电压电刺激有效促进了C2C12细胞的分化与多核肌管的生成与肥大,有效提高了肌管的主动张力与GelMA微纤维致动器的致动性能,其中18 V的电刺激有最好的效果。这种微纤维致动器制作简单,拓展性强,具备生物混合致动、药物筛选和骨骼肌再生等领域的巨大潜力。

### 参考文献 (References)

- [1] SHIN S R, MIGLIORI B, MICCOLI B, et al. Electrically driven microengineered bioinspired soft robots [J]. *Adv Mater*, 2018, 30(10): 1704189.
- [2] RAMAN R, CVETKOVIC C, UZEL S G M, et al. Optogenetic skeletal muscle-powered adaptive biological machines [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(13): 3497-502.
- [3] YALIKUN Y, UESUGI K, HIROKI M, et al. Insect muscular tissue-powered swimming robot [C]//Actuators. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019, 8(2): 30.
- [4] ZHUANG J, PARK B W, SITTI M. Propulsion and chemotaxis in bacteria-driven microswimmers [J]. *Adv Sci*, 2017, 4(9): 1700109.
- [5] VAN DEN BULCKE A I, BOGDANOV B, DE ROOZE N, et al. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels [J]. *Biomacromolecules*, 2000, 1(1): 31-8.
- [6] GAMBOA J R, MOHANDES S, TRAN P L, et al. Linear fibroblast alignment on sinusoidal wave micropatterns [J]. *Colloids Surf B*, 2013, 104: 318-25.
- [7] LI Y, HUANG G, GAO B, et al. Magnetically actuated cell-laden microscale hydrogels for probing strain-induced cell responses in three dimensions [J]. *NPG Asia Mater*, 2016, 8(1): e238-e238.
- [8] AHADIAN S, RAMÓN-AZCÓN J, OSTROVIDOV S, et al. Interdigitated array of Pt electrodes for electrical stimulation and engineering of aligned muscle tissue [J]. *Lab Chip*, 2012, 12(18): 3491-503.
- [9] 崔亚凤, 严云勤, 李树峰, 等. Egr1对小鼠成肌细胞C2C12分化的影响[J]. *中国细胞生物学学报*(CUI Y F, YAN Y Q, LI S F, et al. The Effect of Egr1 on C2C12 differentiation [J]. *Chin J Cell Biol*), 2018, 40(1): 25-32.
- [10] 刘利, 马蓓蓓, 李梦俊, 等. 环黄芩醇通过Nrf2/HO-1信号通路在t-BHP诱导的C2C12细胞损伤中的保护作用[J]. *中国细胞生物学学报*(LIU L, MA B B, LI M J, et al. Cycloastragenol prevents the oxidative damage induced by t-BHP in C2C12 cells through Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Chin J Cell Biol*), 2021, 43(11): 2134-41.
- [11] 陈绍娟, 向力, 江淼, 等. 异丙肾上腺素在C2C12细胞分化中的作用及机制[J]. *中国细胞生物学学报*(CHEN S J, XIANG L, JIANG M, et al. Isoprenaline induced muscle Atrophy by inhibiting the differentiation of C2C12 cells into skeletal muscle cells [J]. *Chin J Cell Biol*), 2017, 39(9): 1178-87.
- [12] MESTRE R, PATIÑO T, BARCELÓ X, et al. Force modulation and adaptability of 3D-bioprinted biological actuators based on skeletal muscle tissue [J]. *Adv Mater Technol*, 2019, 4(2): 1800631.
- [13] SOMERS S M, ZHANG N Y, MORRISSETTE-MCALMON J B F, et al. Myoblast maturity on aligned microfiber bundles at the onset of strain application impacts myogenic outcomes [J]. *Acta Biomater*, 2019, 94: 232-42.
- [14] 雷乐, 张玲莉, 赵一龙, 等. 机械应力对破骨细胞影响的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*(LEI L, ZHANG L L, ZHAO Y L, et al. Advances in effects of mechanical stress on osteoclasts [J]. *Chin J Cell Biol*), 2017, 39(8): 1113-7.
- [15] SHIMA A, ITOU A, TAKEUCHI S. Cell fibers promote proliferation of co-cultured cells on a dish [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 1-7.
- [16] YANG G H, KIM W, KIM J, et al. A skeleton muscle model using GelMA-based cell-aligned bioink processed with an electric-field assisted 3D/4D bioprinting [J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 48.
- [17] MESTRE R, PATIÑO T, BARCELÓ X, et al. Force modulation and adaptability of 3D-bioprinted biological actuators based on skeletal muscle tissue [J]. *Advanced Adv Mater Technol*, 2019, 4(2): 1800631.
- [18] AHADIAN S, RAMÓN-AZCÓN J, OSTROVIDOV S, et al. A contactless electrical stimulator: application to fabricate functional skeletal muscle tissue [J]. *Biomed Microdevices*, 2013, 15(1): 109-15.
- [19] FUJITA H, NEDACHI T, KANZAKI M. Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(9): 1853-65.
- [20] RAMAN R, CVETKOVIC C, BASHIR R. A modular approach to the design, fabrication, and characterization of muscle-powered biological machines [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(3): 519-33.