

文章编号:1004-7220(2015)01-0043-07

# 骨髓间充质干细胞对不同时长应力刺激的力学响应

华闻达<sup>1</sup>, 韩东<sup>2</sup>, 吴迪<sup>1</sup>, 冯建涛<sup>2</sup>, 许明卿<sup>1</sup>, 何飞<sup>1</sup>

(1. 昆明医学院第一附属医院 骨科, 昆明 650032; 2. 国家纳米科学中心, 北京 100190)

**摘要:** **目的** 通过检测骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的弹性模量和表征细胞应力纤维结构, 研究不同时长应力刺激下 MSCs 的力学响应特点。**方法** 利用原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)和激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)对体外培养的大鼠 MSCs 细胞骨架进行高分辨成像, 同时使用带有微球的微悬臂实施微区力曲线检测, 进针时间分别选择为 0.1、0.5、1、5、10 s, 计算并比较 300 nm 压入深度时 MSCs 的弹性模量。**结果** 大鼠 MSCs 的细胞骨架呈现致密交联网状结构。细胞弹性模量随应力刺激时长改变而发生明显变化, MSCs 在作用时间分别为 0.1、0.5、1、5、10 s 时各组弹性模量中位数和 4 分位数(QR)间距分别为 10.02(QR=9.66)、1.94(QR=7.71)、3.63(QR=19.33)、17.15(QR=35.13)、23.52 kPa(QR=34.87)。除刺激时间极短(0.1 s)的情况, 细胞弹性模量有随应力刺激时间增长而增大的趋势。**结论** 大鼠 MSCs 具有完善的力学承载结构, 与理想弹性体不同, 可对较长时间应力刺激做出主动响应, 导致弹性模量上升。研究结果可以为组织工程学通过力学刺激调控 MSCs 行为的研究提供基础数据。

**关键词:** 间充质干细胞; 机械刺激; 弹性模量; 原子力显微镜

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.01.043

## Responses from mesenchymal stem cells to mechanical stimulation for variable duration

HUA Wen-da<sup>1</sup>, HAN Dong<sup>2</sup>, WU Di<sup>1</sup>, FENG Jian-tao<sup>2</sup>, XU Ming-qing<sup>1</sup>, HE fei<sup>1</sup>

(1. Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China; 2. National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China)

**Abstract: Objective** To study mechanical responses from mesenchymal stem cells (MSCs) under different mechanical stimulus duration, by measuring its elastic modulus and characterizing its stress fibers. **Methods** High resolution images of MSCs cytoskeleton *in vitro* were acquired by using atomic force microscope (AFM) and laser scanning confocal microscope (LSCM). AFM cantilever with micro-bead attached probe was used to perform force-distance curve experiment on MSCs at the approaching time of 0.1, 0.5, 1, 5, 10 s, respectively. The elastic modulus of MSCs at 300 nm indentation depth were measured and compared. **Results** The rat MSCs cytoskeleton presented an intensely organized network structure. The elastic modulus of rat MSCs varied obviously for different mechanical stimulus duration. The median and quartile (QR) of MSCs elastic modulus were 10.02 (QR=9.66), 1.94 (QR=7.71), 3.63 (QR=19.33), 17.15 (QR=35.13), 23.52 kPa (QR=34.87), with probe approaching time at 0.1, 0.5, 1, 5, 10 s, respectively. The MSCs elastic modulus showed the tendency of increasing with stimulus duration increasing, except for the extremely short stimulus (0.1 s). **Conclusions** Unlike inorganic elastomer, rat MSCs possess complete and flexible mechanical load-bearing structure and can respond actively to a relatively longer mechanical stimulation, with an increase of elastic modulus. These results may provide basic data for further tissue engineering researches on mechanical regulation of MSCs behavior.

**Key words:** Mesenchymal stem cells (MSCs); Mechanical stimulation; Elastic modulus; Atomic force microscope (AFM)

收稿日期:2014-02-24; 修回日期:2014-03-24

基金项目:云南省科技计划项目应用基础研究(昆医联合专项)(2012FB041)。

通信作者:何飞, 副主任医师, Tel:(0871)5532543; E-mail:drhefei@sina.com。

在体外特定的培养条件下,骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)可被诱导分化成为多种功能细胞(如心肌细胞、神经细胞、成骨细胞等),是组织工程学重点研究的种子细胞<sup>[1-6]</sup>。如何成功诱导 MSCs 向特定类型细胞分化是实现其应用的关键环节。细胞的生物活性和功能持续受到所处微环境的物理和化学因素调节。物理因素中的力学因素(包括机械刺激、基底形貌和基底刚度等)已被证实对细胞的增殖、迁移、分化等生理活动起到重要调节作用<sup>[7-9]</sup>。例如,通过改变基底的硬度或形貌,即可诱导 MSCs 向多种功能细胞分化<sup>[10-11]</sup>。因此,理解 MSCs 在力学因素作用下的行为,是进一步在组织工程中实现通过力学因素诱导其增殖、分化的基础。然而,关于 MSCs 对力学信号的响应机制目前尚未阐明。

在细胞和分子水平上认识生命活动的过程中,目前的研究主要集中于分子生物学领域。然而,随着扫描探针显微镜等技术的发展,微观水平的力学观测逐渐受到重视,并且生物力学理论也被越来越多地用于阐释生命活动过程<sup>[12-14]</sup>。研究 MSCs 对机械刺激的力学响应可以从生物力学角度完善对其运动、分裂、增殖、机械力传导等行为的理解。本研究应用原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)对 MSCs 的应力承载结构——细胞骨架系统进行高分辨成像,了解其结构特征。同时,通过力谱分析定量研究 MSCs 在不同时长单次微区应力刺激下弹性模量的改变,掌握其规律,在单细胞水平上为组织工程学研究提供相应的实验数据。

## 1 材料与方法

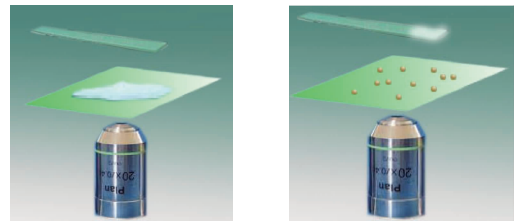
### 1.1 MSCs 体外分离与培养

Wistar 大鼠,雄性(80~100 g),腹腔麻醉后,断颈处死,分离大腿股骨、胫骨,抽取骨髓,离心分离细胞,接种于培养瓶(Corning),培养液为 DMEM/F12(1:1)培养基(Hyclone), penicillin-G sodium streptomycin sulfate 双抗(Gibco),胎牛血清(Hyclone)。置于细胞培养箱培养。待贴壁细胞形成群落,达到 80%~90% 融合后,按 1:2 比例传代。取第 3 代(P3)细胞,在成骨诱导培养液(含 10% FBS 的 DMEM, 100 nmol/L 的地塞米松, 0.05 mmol/L 的抗坏血酸、10 mmol/L 的  $\beta$ -甘油磷酸钠)中培养 21 d

后,进行骨桥蛋白和骨钙素免疫荧光检测鉴定,应用的一抗为:骨桥蛋白(兔抗鼠, 1:200, Santa)和骨钙素(兔抗鼠, 1:200, Santa)。二抗为:用 FITC 标记的二抗(山羊抗兔, 1:200, Santa)。细胞核用 DAPI(Sigma)染色。通过形态学和细胞分化能力的检测鉴定细胞<sup>[15]</sup>。

### 1.2 带有聚苯乙烯小球 AFM 探针的制备

将 AFM(5500, Agilent)与倒置荧光显微镜(Eclipse Ti, Nikon)集成为生物型 AFM。利用 AFM 的自动控制,将无针尖的微悬臂(CSG11/tipless, NT-MDT)自动逼近涂有紫外固化胶的盖玻片表面,在 AFM 微悬臂顶端蘸取适量胶(见图 1(a)),抬起微悬臂。置换带有分散良好的 7  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯小球的盖玻片,通过光学显微镜选取合适小球,AFM 自动控制微悬臂逼近并接触小球(见图 1(b)),再利用紫外光(380~470 nm 波长光)照射悬臂,使胶固化<sup>[16]</sup>。



(a) 自动逼近蘸胶

(b) 光固化粘球

图1 AFM 探针修饰小球示意图

Fig.1 Schematic diagram of attaching bead to AFM cantilever

(a) Cantilever approaching to the glue automatically, (b) Cantilever sticking to the bead

### 1.3 MSCs 细胞骨架高分辨成像

经过形态观察和诱导分化实验鉴定后,取 3~5 代生长良好的 MSCs,更换 AFM 工作液(M199, Gibco)、penicillin-G sodium streptomycin sulfate 双抗(Gibco)、胎牛血清(Hyclone),体积比分别为 89%、1%、10%。将培养皿固定于生物型 AFM 样品盘上,采用磁驱动轻敲模式(MAC)成像。MAC 探针(Type 1 MAClevers, Agilent)的弹性系数为 0.1 N/m,共振频率为 25 kHz,室温下(24  $^{\circ}\text{C}$ )成像。AFM 成像结束后, PBS 清洗 2 次,多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗 2 次;加入 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  罗丹明-鬼笔环肽(Invitrogen)室温染色 60 min, PBS 清洗细胞 2 次;hoechst 33258(Invitrogen)染细胞核 10 min, PBS 清洗细胞 2 次;加

荧光封片液, 盖上盖玻片, 荧光显微镜下观察。

### 1.4 力曲线采集

将铺有 MSCs 的培养皿放置于生物型 AFM 样品盘上, 通过显微镜, 定位贴壁良好的 MSCs。每个细胞选取核区为测量区域, 用带有聚丙烯小球探针在接触模式下采集力曲线, 进针时间分别选择 0.1、0.5、1、5、10 s, 每个进针时间重复采集 5 个力曲线, 共取 30 个细胞。

### 1.5 数据统计

由于本研究中各组数据不服从正态分布, 各组数据以中位数和 4 分位数 (QR) 间距描述, 并使用 SAS 软件进行 Kruskal-Wallis H 检验。  $P < 0.05$  为差

异具有显著性,  $P < 0.01$  为差异具有高度显著性。

## 2 结果

### 2.1 MSCs 培养

原代培养第 3 d 时, 可见许多贴壁细胞, 均匀分散生长。细胞以小三角形、梭形及椭圆形为主, 胞核位于细胞中央。经过细胞换液, 细胞增殖迅速, 以集落形式生长, 呈现典型的长梭形, 有一定的极性。细胞传代以后, 细胞增殖活力强, 形成均一的长梭形、多角形细胞, 其他形态的细胞极少见。成骨诱导实验鉴定结果如图 2 所示, 细胞骨桥蛋白和骨钙素表达阳性, 显示细胞具有成骨分化能力。

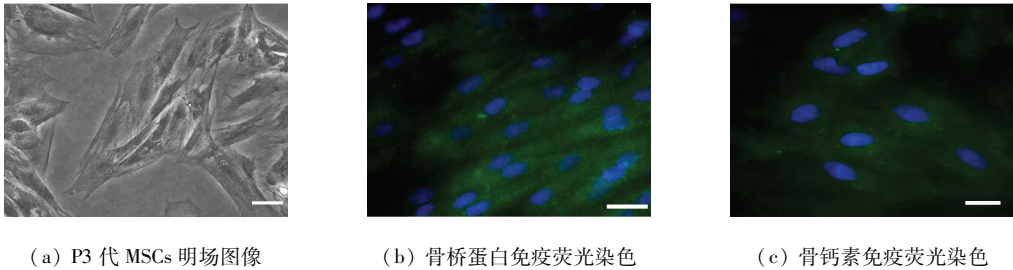


图 2 MSCs 形态和成骨分化鉴定 (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ )

Fig.2 MSCs morphology and identification of osteogenesis differentiation (a) Bright field image of MSCs (P3), (b) Immunofluorescence staining of osteopontin, (c) Immunofluorescence staining of osteocalcin

### 2.2 聚苯乙烯小球 AFM 探针制备

聚苯乙烯小球经过紫外固化胶黏着后, 经低真空电镜观察, 证明其稳定地黏附于 AFM 微悬臂的前端 (见图 3)。此方法操作规范、简便易行, 成功率高。

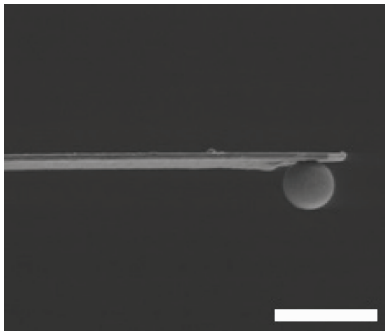
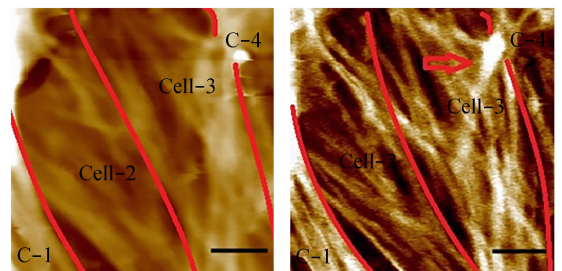


图 3 粘有小球的探针悬臂在环境扫描电镜低真空模式下的侧面放大照片 (标尺 = 20  $\mu\text{m}$ )

Fig.3 The environmental scanning electron microscopy zoomed-in side-view image of an AFM cantilever attached with a bead under the low vacuum mode

### 2.3 MSCs 细胞骨架成像

利用轻敲模式 AFM 适合于液下成像的特点, 原位获得活体 MSCs 细胞骨架网络的三维超微结构图 (见图 4)。束状交联成网的骨架结构形态 (图中箭头所示), 可能对其贴壁生长、铺展、移动及向其他组织细胞分化起特殊的作用。



(a) 表面形貌图 (b) 相位差图

图 4 MSCs 的 AFM 图像 (标尺 = 10  $\mu\text{m}$ )

Fig.4 AFM images of MSCs

(a) Topography image, (b) Phase image

MSCs 多呈长梭形,细胞体积较大,长可达 100  $\mu\text{m}$ ,宽可达 30 ~ 40  $\mu\text{m}$ 。通过对其局部结构观察发现细胞骨架明显,细胞边缘结构复杂,有突触状骨架伸出,尾端有鱼尾状结构骨架(见图5)。

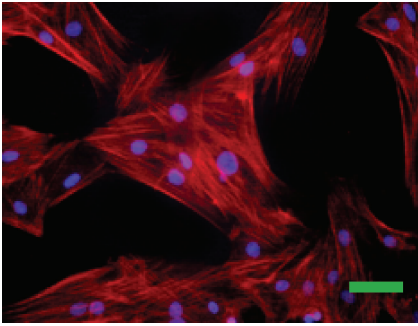


图5 MSCs 骨架荧光染色图(标尺 = 50  $\mu\text{m}$ )

Fig.5 Fluorescence image of MSCs

## 2.4 MSCs 弹性模量计算与分析

选取锚定良好的梭形细胞,进行力曲线测定实验(见图6),横坐标为针尖下压距离,纵坐标为针尖偏转度。a点右侧(曲线第1部分)呈水平直线,表明微悬臂还未发生偏转,即针尖与细胞没有接触;当针尖下压至a点时(曲线第2部分),力曲线呈非线性,说明针尖接触细胞表面并开始下压细胞,微悬臂发生偏转,且细胞呈非均质弹性体;针尖继续下压到b点(曲线第3部分),力曲线表现为似线性,细胞呈近似均质弹性体状态,通过曲线3部分的斜率可大致推断细胞在近似弹性体状态下的刚度<sup>[17]</sup>。在本研究中,弹性模量的计算公式参考 Hertz 模型<sup>[18]</sup>:

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1 - \nu^2} R^{\frac{1}{2}} \delta^{\frac{3}{2}}$$

其中: $F$  为所施加的力; $E$  为所求的弹性模量; $\delta$  为压

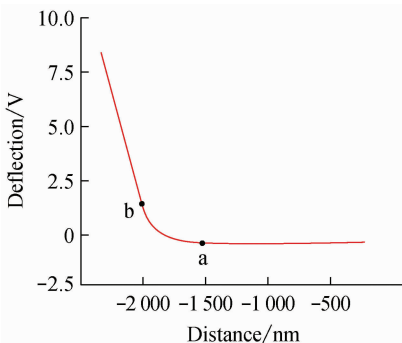


图6 MSCs 力距离曲线

Fig.6 Force-distance curve of MSCs

入的深度, $\delta = 300 \text{ nm}$ ;  $R$  为针尖的曲率半径; $\nu$  为泊松比,细胞假定是不可压缩, $\nu = 0.5$ 。应用 SAS 统计学软件进行统计学分析。

MSCs 在 0.1、0.5、1.5、10 s 时弹性模量的中位数和 4 分位数间距分别为 10.02 (QR = 9.66)、1.94 (QR = 7.71)、3.63 (QR = 19.33)、17.15 (QR = 35.13)、23.52 kPa (QR = 34.87), Kruskal-Wallis H 检验结果为卡方值等于 85.85,  $P < 0.0001$ , 频数分布如图7所示。

## 3 讨论

细胞骨架参与细胞形态维持、力学信号转导等多种功能,在不同生理或病理过程中,其结构往往会发生很多变化。细胞骨架既能对力学刺激以重排、聚合、解聚等方式做出反应,又能因其形态改变而带来细胞力学性质的改变<sup>[19-20]</sup>。因此,若对 MSCs 在不同时长刺激下力学性质改变的现象做出解释,有必要对细胞骨架结构进行细致的观察。AFM 可以无损地进行活细胞成像,而荧光染色可以特异性显示细胞骨架,故本实验采用两种方法结合表征 MSCs 的细胞骨架,取得了良好效果。

在 AFM 形貌像下,可清晰地分辨出粗大并基本与细胞长轴方向一致的粗纤维束,还可观测到搭连交错的细纤维束,两者交汇形成网状结构。此外,在相位像中,一些更细的纤维束也清晰可见;相位偏移比较大的地方,说明纤维束绷得比较紧,即对 AFM 的针尖来说显得比较“硬”。根据纤维束对成像力反作用程度的不同,可将它们分为主要应力纤维束和辅助应力纤维束:前者强大,起主要支撑作用,对应粗大且与细胞长轴方向基本一致的粗纤维束;后者相对较弱,起辅助作用,对应搭连交错的细纤维束。两者交汇形成细胞骨架的网状应力结构。

微丝免疫荧光染色显示 MSCs 含有丰富的微丝,束状交联成网的骨架结构,纤维束清晰而分布均匀。细胞整体骨架呈网架结构,边界整齐,微丝密集,较大较长,中间丝呈“鱼网状”,无极性多点联系,紧密结合成束,束间联系密切。

AFM 和荧光成像验证了 MSCs 具有的特征性结构,如长梭型外形,贯穿细胞两端与细胞长轴平行的细胞骨架<sup>[21]</sup>;并通过相位图发现,细胞网状应力结构中的张力分布特点,这些结构的存为 MSCs 的



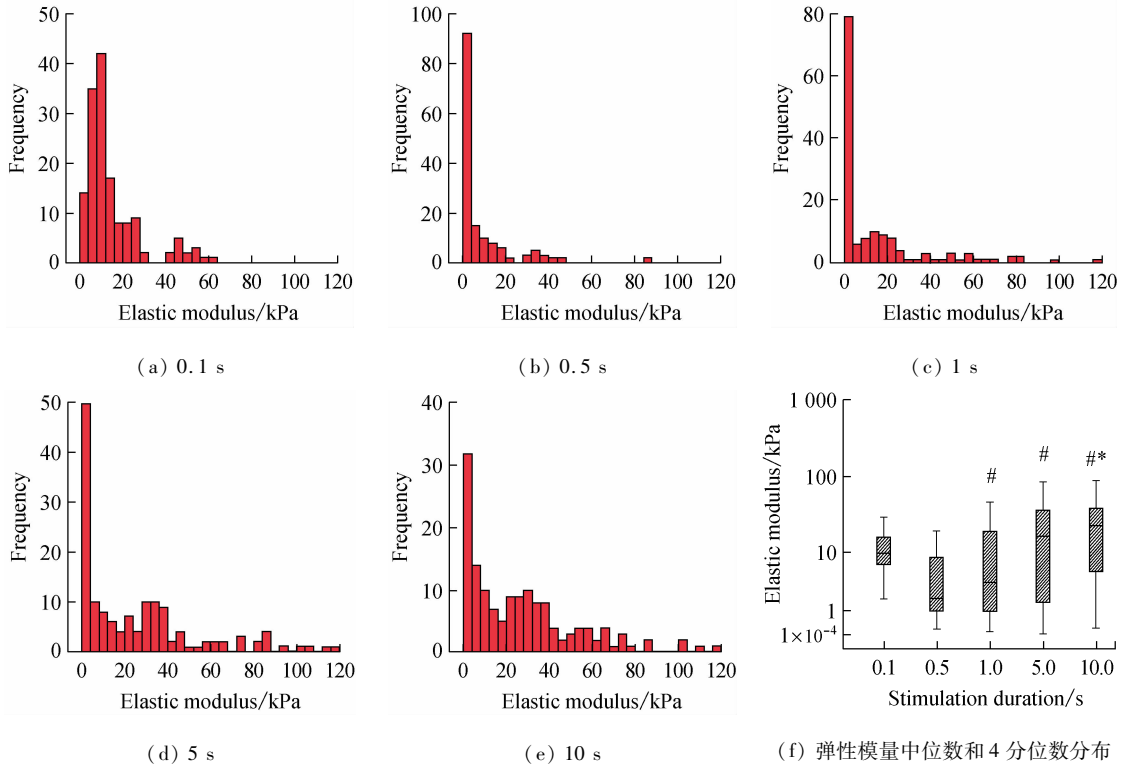


图7 探针不同作用持续时间下细胞弹性模量频数分布 ( $^{\#}P < 0.05$  vs 0.1 s 组,  $^*P < 0.05$  vs 0.5 s 组)

Fig. 7 Frequency counts of elastic modulus of MSCs under different stimulus duration (a) 0.1 s, (b) 0.5 s, (c) 1 s, (d) 5 s, (e) 10 s, (f) Median and quartile of elastic modulus

力学传导和力学响应提供了物质基础。

为进一步揭示细胞力学性质变化与机械刺激时长的对应关系,本研究利用 AFM 研究了单细胞水平 MSCs 对不同时长机械刺激的反应。为更加准确地施力和测力,采用聚苯乙烯小球替代原用的刚性针尖,其优势在于:首先,可避免过硬针尖对细胞产生的可能损伤,从而导致测量数据的不准确。其次,直径  $7 \mu\text{m}$  的小球增加了球与细胞之间的接触面积,降低了传统针尖(直径通常小于  $100 \text{ nm}$ )在形貌复杂的细胞表面反复测量时带来的异质性。最后,球形针尖规则的几何外形更便于使用 Hertz 模型,对实验结果做出解释。因而,用聚苯乙烯小球针尖进行测量,可大大增加数据的均一性。实验中,通过测量在不同时长刺激下的细胞弹性模量,发现细胞弹性模量随探针与细胞接触时间加长出现先减后增加的趋势。此结果与文献[9]中在研究成骨细胞对不同频率周期刺激力学反应时发现细胞弹性模量随刺激频率加快(即刺激时长增加)而增加的结果相

似,而与文献[22]中研究弹性体聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 对不同时长机械刺激的反应时发现作用时间越短 PDMS 越倾向于增大弹性模量的结论明显不同。本实验结果显示, MSCs 除在极短时间刺激下(0.1 s)弹性模量较大,有随时间增长刚度由软变硬的趋势。对此结果,本文主要从 AFM 力距离曲线实验中探针和细胞的作用特点,从黏弹性理论以及细胞对力学刺激能够做出主动响应的角度考虑解释。根据在高速 AFM 成像时探针与细胞相互作用的分析<sup>[23]</sup>,将细胞视为黏弹体,在短时间刺激下,根据动量守恒定律可推出,探针的压入深度与作用时间的立方根成正比。在极短时间的刺激下(0.1 s),探针压入深度仅触及细胞膜和膜下少量细胞质,胞膜和浅层胞质可视为非牛顿流体,在探针快速下压时黏度增加,使探针大幅偏转从而测得较高的模量。随进针时间加长,胞膜和浅层胞质的黏度下降,使探针可以压入到细胞的弹性区,即骨架密集的胞质区和核区。细胞骨架力学不再把活细胞

简化为皮质膜包裹下的弹性、黏性或黏弹性连续介质体,而是看作基于细胞骨架的离散网络结构<sup>[24]</sup>。细胞骨架组成成分的含量、几何特点和力学属性对细胞刚度有直接的影响<sup>[25-26]</sup>。而细胞在外力刺激下可产生局部骨架蛋白高分子链的弛豫、滑动、交联和折叠等行为,这些行为多与蛋白质构型的改变有关,可以在百毫秒量级的时间内完成<sup>[27]</sup>,从而改变局部纤维网络的构象、交联度等特征。因此,推测细胞在数秒内有时间在受压局部通过骨架做出主动反应,随刺激时间加长,增加自身的弹性模量以更好承载外力,从而显示出不同于无机弹性体的力学性质变化。结构决定功能,MSCs粗大、丰富的骨架结构,具有纤维束搭连交错、节点重多的特点,不具有规则固定的拓扑结构,属于有一定取向的准随机网络。这使得细胞可以通过相对滑动调整三维网状细胞骨架的构型和预应力,从而获得复杂且变化多样的几何形状,以及动态改变的弹性模量,以便于承受来自不同方向不同性质的外力,同时可为其分化、迁移、分裂时进行形态和力学性质的改变提供结构基础。本实验对骨架的研究较为初步,未能和不同时长的机械刺激形成良好的对应,原因在于机械刺激的时间短、力度小,仅能引起细胞短暂而有限的形变,不易被显微镜捕捉到。但本研究结果显示了细胞具有的丰富且排列有序的骨架结构,一方面说明细胞具有传导力学信号、改变细胞形态结构进而改变细胞力学性质的物质基础,另一方面为今后通过细胞骨架力学模型研究细胞行为提供部分实验数据。

MSCs在骨折不愈合、软骨缺损、成骨不全治疗中被证实有效<sup>[28-30]</sup>,这些应用刺激了组织工程、再生医学对细胞体外扩增、分化控制技术的需要。为给这类技术的发展提供理论支持和可行思路,对MSCs在力学刺激下行为改变的研究正成为一个热点<sup>[31]</sup>。由MSCs分化而来的不同种类的细胞有截然不同的弹性模量,说明MSCs必然需要很大的力学性质的可塑性,以及在分化过程中转变自身力学性质的能力。本文研究了MSCs作为一种多功能干细胞如何在力学刺激下经历力学性质的变化,实验证实了MSCs可以在较大范围改变自身弹性模量,有较大的力学性质可塑性,并证实不同时长的力学刺激可以诱导这种改变,为通过控制力学刺激时间调节MSCs分化的可能性提供了依据。

## 参考文献:

- [1] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, *et al.* Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications [J]. *Stem Cell*, 2001, 19(3): 180-192.
- [2] Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy [J]. *J Cell Biochem*, 1994, 56(3): 283-294.
- [3] Kawada H, Fujita J, Kinjo K, *et al.* Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction [J]. *Blood*, 2004, 104(12): 3581-3587.
- [4] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, *et al.* Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61(4): 364-370.
- [5] Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views [J]. *Stem Cell*, 2007, 25(11): 2896-2902.
- [6] 于波,朱振安.力学因素在间充质干细胞构建功能性组织工程化软骨中的作用[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(5): 482-486.  
Yu B, Zhu ZA. Role of mechanobiology in mesenchymal stem cell-based tissue engineered cartilage [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(5): 482-486.
- [7] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 677-689.
- [8] Friedl G, Schmidt H, Rehak I, *et al.* Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: Transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro [J]. *Osteoarthritis Cartil*, 2007, 15(11): 1293-1300.
- [9] Zhang X, Liu X, Sun J, *et al.* Real-time observations of mechanical stimulus-induced enhancements of mechanical properties in osteoblast cells [J]. *Ultramicroscopy*, 2008, 108(10): 1338-1341.
- [10] Byrne EM, Farrell E, McMahon LA, *et al.* Gene expression by marrow stromal cells in a porous collagen-glycosaminoglycan scaffold is affected by pore size and mechanical stimulation [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19(11): 3455-3463.
- [11] Juncosa-Melvin N, Matlin KS, Holdcraft RW, *et al.* Mechanical stimulation increases collagen type I and collagen type III gene expression of stem cell-collagen sponge constructs for patellar tendon repair [J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(6): 1219-1226.

- [12] Long M, Sato M, Lim CT, *et al.* Advances in experiments and modeling in micro- and nano-biomechanics: A mini review [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2011, 4(3): 327-339.
- [13] Lü S, Ye Z, Zhu C, *et al.* Quantifying the effects of contact duration, loading rate, and approach velocity on P-selectin-PSGL-1 interactions using AFM [J]. *Polymer*, 2006, 47(7): 2539-2547.
- [14] Zhang Y, Lü S, Long M. Probe stiffness regulates receptor-ligand bond lifetime under force [J]. *Sci China Phys Mech Astron*, 2011, 54(5): 923-929.
- [15] 韩立赤, 胡静, 戚孟春, 等. 大鼠骨髓 MSCs 体外分离培养及多向分化的实验研究[J]. *口腔医学研究*, 2004, 20(2): 142-145.
- [16] Shi L, Shi S, Li J, *et al.* AFM and fluorescence imaging of nanomechanical response in periodontal ligament cells [J]. *Front Biosci*, 2009, 2: 1028-1041.
- [17] 丁永霞, 孙全梅, 马珂, 等. 宫颈上皮脱落细胞的微尺度力学性质及形貌学研究[J]. *电子显微学报*, 2011, 30(3): 222-226.
- [18] Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, *et al.* Atomic force microscopy probing of cell elasticity [J]. *Micron*, 2007, 38(8): 824-833.
- [19] Hu M, Wang J, Zhao H, *et al.* Nanostructure and nanomechanics analysis of lymphocyte using AFM: From resting, activated to apoptosis [J]. *J Biomech*, 2009, 42(10): 1513-1519.
- [20] Pelling AE, Veraitch FS, Chu CPK, *et al.* Mechanical dynamics of single cells during early apoptosis [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2009, 66(7): 409-422.
- [21] 戚孟春, 胡静, 邹淑娟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞和颅骨成骨细胞在张应力下细胞骨架的改变[J]. *华西口腔医学杂志*, 2005, 23(2): 110-112.
- [22] Kim KS, Lin Z, Shrotriya P, *et al.* Iterative control approach to high-speed force-distance curve measurement using AFM: Time-dependent response of PDMS example [J]. *Ultramicroscopy*, 2008, 108(9): 911-920.
- [23] Li J, Deng ZF, Chen DX, *et al.* High-speed AFM for scanning the architecture of living cells [J]. *Nanoscale*, 2013, 5(18): 8355-8358.
- [24] Lim CT, Zhou EH, Quek ST. Mechanical models for living cells—A review [J]. *J Biomech*, 2006, 39(2): 195-216.
- [25] Gardel M, Shin J, MacKintosh F, *et al.* Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks [J]. *Science*, 2004, 304(5675): 1301-1305.
- [26] Matthews BD, Overby DR, Mannix R, *et al.* Cellular adaptation to mechanical stress: Role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(3): 508-518.
- [27] Higashida C, Miyoshi T, Fujita A, *et al.* Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells [J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2007-2010.
- [28] Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, *et al.* Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99(13): 8932-8937.
- [29] Undale A, Fraser D, Hefferan T, *et al.* Induction of fracture repair by mesenchymal cells derived from human embryonic stem cells or bone marrow [J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(12): 1804-1811.
- [30] Brittberg M. Autologous chondrocyte implantation—Technique and long-term follow-up [J]. *Injury*, 2008, 39(1): 40-49.
- [31] 何学令, 姚晓玲, 冯贤, 等. 力学刺激和成骨化学诱导剂对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化能力的影响[J]. *医用生物力学*, 2011, 26(2): 116-120.
- He XL, Yao XL, Feng X, *et al.* Effects from mechanical stimulation and osteogenic chemical inductor on osteoblastic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 2011, 26(2): 116-120.