

文章编号:1004-7220(2016)03-0218-09

# 基底硬度与形貌协同对大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

刘洋<sup>1</sup>, 韩东<sup>2</sup>, 华闻达<sup>1</sup>, 何飞<sup>1</sup>

(1. 昆明医科大学第一附属医院, 骨科, 昆明 650000; 2. 国家纳米科学中心, 北京 100190)

**摘要:** **目的** 探讨基底硬度与形貌协同对大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone mesenchymal stem cells, rBMSCs)形态、增殖以及成骨分化的影响。**方法** 分别在硬度为 3.5 MPa、槽、脊宽为 0.3  $\mu\text{m}$  的聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)基底;硬度为 3.5 MPa、槽、脊宽为 1.8  $\mu\text{m}$  的 PDMS 基底;硬度为 3.5 MPa 的平面 PDMS 基底;硬度为 0.27 MPa、槽、脊宽为 0.3  $\mu\text{m}$  的 PDMS 基底;硬度为 0.27 MPa、槽、脊宽为 1.8  $\mu\text{m}$  的 PDMS 基底;硬度为 0.27 MPa 的平面 PDMS 基底上培养 rBMSCs,利用倒置荧光显微镜观察 rBMSCs 的形态,CCK-8 试剂盒检测 rBMSCs 的增殖情况,碱性磷酸酶(alkalinephosphatase, ALP)试剂盒检测 rBMSCs 的 ALP 活性,免疫荧光技术检测骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)及 I 型胶原(collagen type I, COL I)的表达,qRT-PCR 检测 Runx2 mRNA 的表达。**结果** 在硬度为 3.5 MPa 以及槽、脊宽为 0.3  $\mu\text{m}$  的 PDMS 上 rBMSCs 铺展更好、增殖更快,ALP 活性更高,OCN、COL I 及 Runx2 mRNA 表达量明显多于其他各组。**结论** 基底硬度对 rBMSCs 的增殖有明显影响,而硬度与形貌能协同促进 rBMSCs 的增殖及成骨分化。研究结果有助于了解生物物理因素在某些疾病(如骨质疏松)发病机制过程中的作用,并可为骨组织工程新材料的研发提供理论基础。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞;成骨分化;硬度;形貌

中图分类号: R318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.03.218

## Synergic effects of substrate stiffness and topography on osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells

LIU Yang<sup>1</sup>, HAN Dong<sup>2</sup>, HUA Wen-da<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 investigate the synergic effects of substrate stiffness and topography on the morphology, proliferation and osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells (rBMSCs). **Methods** rBMSCs were cultured on polydimethylsiloxane (PDMS) substrates with different stiffness (3.5, 0.27 MPa) and ordered ridges and grooves (width 0.3 or 1.8  $\mu\text{m}$ , depth 0.5  $\mu\text{m}$ ) or planar substrate. Inverted fluorescence microscope was used to observe the morphology of rBMSCs. CCK-8 reagent was used to detect the proliferation of rBMSCs. Alkaline phosphatase (ALP) kit was used to detect the ALP activity of rBMSCs. Immunofluorescence technique was used to detect the expression of osteocalcin (OCN) and collagen I (COL I). QRT-PCR technique was used to detect the expression of Runx2 mRNA. **Results** rBMSCs cultured on substrate with 3.5 MPa stiffness, 0.3  $\mu\text{m}$  ridge width, 0.3  $\mu\text{m}$  groove width showed greater proliferation, spreading, cytoskeleton arrangement, and OCN and COL I secretion, ALP activity, Runx2 mRNA expression were significantly increased as compared to

收稿日期:2015-10-23; 修回日期:2015-12-09

基金项目:国家自然科学基金项目(31460244),云南省科技计划联合专项重点项目(2015FA002),云南省卫生系统骨科中青年学术技术带头人项目(D-201223),云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金项目(2012FB041)。

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

cells cultured on other groups. **Conclusions** Substrate stiffness has an obvious influence on rBMSCs proliferation, while substrate stiffness and topography can synergistically promote the proliferation and osteogenic differentiation of rBMSCs. The research findings not only help to understand the biophysical factors in the pathogenesis of certain diseases (such as osteoporosis), but also provide a theoretical basis for developing new materials for bone tissue engineering.

**Key words:** Bone mesenchymal stem cells; Osteogenic differentiation; Elasticity; Topography

骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 主要来源于骨髓腔, 是一种具有自我复制能力以及多向分化潜能的成体干细胞, 能够分化为成骨细胞、软骨细胞等多种组织细胞, 具有易分离、高分化潜能、低免疫原性等特点, 适用于骨修复和再生, 是骨组织工程中重点研究的种子细胞<sup>[1-2]</sup>。在复杂的组织微环境中, BMSCs 生物学行为不仅受到生物化学因素的影响, 传导力学信号的生物物理因素对 BMSCs 的影响也至关重要<sup>[3]</sup>; 其中, 基底的硬度和形貌均能调控 BMSCs 的行为<sup>[4-6]</sup>。

Skardal 等<sup>[7]</sup> 研究发现, 材料的弹性模量能够调控干细胞的增殖、形态及分化。Engler 等<sup>[5]</sup> 研究表明, 在较硬的聚丙烯酰胺水凝胶 (polyacrylamide, PA) 上, BMSCs 向成骨分化; 在较软的 PA 上, BMSCs 向神经元分化; 并且细胞迁移速度与基底的硬度成正比, 在体内 MSCs 优先聚集在较硬的区域, 并且对该区域的组织修复有着更为重要的作用<sup>[8]</sup>。Sudha 等<sup>[9]</sup> 研究发现, 硬度为 7.1 MPa 的聚己内酯 (polycaprolactone, PCL) 静电纺丝诱导胚胎间质干细胞向软骨细胞分化, 而硬度为 30.6 MPa 的聚醚砜-聚己内酯 (polyethersulfone-polycaprolactone, PES-PCL) 静电纺丝则诱导干细胞成骨分化。Qiu 等<sup>[10]</sup> 模拟正常与纤维变性的心肌组织的弹性模量, 在硬度为 17.5、145 kPa 的聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 基底上培养绵羊的心脏侧群细胞 (cardiac side population cells, CSP), 结果发现, 在 145 kPa 的 PDMS 基底上 CSP 的增殖能力增强, 向心肌细胞分化能力减弱。Holmes 等<sup>[11]</sup> 在硬度为 31 MPa 的三维 PLA 静电纺丝上培养 BMSCs, 2 周后发现糖胺聚糖、II 型胶原蛋白的表达明显增多, 证明三维 PLA 静电纺丝支架能促进 BMSCs 软骨分化, 有望成为软骨缺损修复重建的理想支架材料。Nealey 等<sup>[12]</sup> 在不同槽宽、脊宽结构基底上培养人骨髓间充质干细胞 (human mesenchymal stem cells, hMSCs), 结果发

现, 槽、脊宽为 0.2  $\mu\text{m}$  的基底更容易诱导 hMSCs 成骨分化。Holmes 等<sup>[13]</sup> 研究发现, 直径为 1.33  $\mu\text{m}$ 、硬度为 0.75 ~ 2.00 MPa 的聚乳酸/多壁碳纳米管复合静电纺丝能促进 MSC 黏附及软骨分化。Jiang 等<sup>[14]</sup> 利用静电纺丝技术制作了一种多糖纳米纤维支架材料, 结果发现, 硬度为 7.84 kPa、纤维直径在 0.4 ~ 0.5  $\mu\text{m}$  范围内的支架能诱导 hMSCs 向神经元分化, 这有助于理解材料形貌和硬度协同对 MSC 分化的影响。

虽然已有较多研究证明细胞能够感知材料的特性, 材料硬度与形貌能够调控 MSCs 的行为, 但是有关材料硬度和形貌共同作用对 MSCs 成骨行为影响的研究较少, 基底硬度及形貌调控 MSCs 成骨分化的作用之间是否具有相互关联仍不清楚。此外, 物理因素调控 MSCs 成骨分化的具体分子机制仍不明确<sup>[15-16]</sup>。因此, 本文探讨了基底硬度与形貌协同对大鼠骨髓间充质干细胞 (rat bone mesenchymal stem cells, rBMSCs) 形态、增殖及成骨分化的影响。研究结果将对认识 BMSCs 与周围力学微环境的关联性有重要意义, 为 BMSCs 在组织工程提供新的运用前景, 也为研发新的组织工程支架材料提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 基底的制作及基底弹性模量的测定

利用电子束曝光及等离子体刻蚀技术制作槽宽分别为 0.3 和 1.8  $\mu\text{m}$ 、脊宽分别为 0.3 和 1.8  $\mu\text{m}$ 、深为 1.5  $\mu\text{m}$  的硅片表面<sup>[17-18]</sup>, 用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 表征硅片表面的脊槽结构。PDMS 基底的制作方法为: 按质量比 5:1 与 33:1 混合 184 预聚物和 184 固化剂 (Dow Corning 公司, 美国), 倒在具有脊槽结构的硅片表面, 制作具有脊槽结构的 PDMS 基底, PDMS 基底厚度约为 1 mm。用 SEM 表征 PDMS 基底的表面结构, 微机控制回弹力试验机测定 PDMS 基底的弹性

模量<sup>[19]</sup>。

## 1.2 PDMS 基底的预处理

PDMS 基底浸泡于 75% 的乙醇中,紫外照射 2 h 消毒后,37 °C 下用 0.2 mol/L 醋酸溶液稀释鼠尾 I 型胶原蛋白(collagen type I, COL I)(Gibco 公司,美国)至浓度为 0.02 mol/L,修饰基底 6 h,备用。

## 1.3 rBMSCs 分离与培养

利用贴壁法分离、纯化 rBMSCs。取 4 周龄雄性 Westar 大鼠 1 只,在无菌条件下分离出单侧股骨及胫骨,剪去长骨两侧干骺端,暴露骨髓腔,用含 10% FBS(Invitrogen, 美国)的 DMEM/F12 培养基(Gibco 公司,美国)反复冲洗骨髓腔,收集细胞,1 200 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 5 mL 上述培养液重悬细胞,种植于培养瓶中标记为 P0,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、80% 相对湿度的培养箱中培养。24 h 后更换培养液以去除未贴壁细胞和各种杂质。此后每隔 3 d 用上述培养基全量换液 1 次,倒置相差显微镜观察细胞形态及生长状况,直至细胞接近 80% ~ 90% 汇合,用 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA(Gibco 公司,美国)消化,以 1:3 传代培养,取第 2 ~ 5 代细胞用于实验。

## 1.4 rBMSCs 的表型鉴定

EP 管中加入密度为  $5 \times 10^9$ /mL 的 P2 代细胞悬液 1 mL,室温下配平后 1 200 r/min 离心 5 min,去除上清,每管中分别加入 50  $\mu$ L PBS,再分别加入 FITC Mouse anti-Rat CD44、PE Mouse anti-Rat CD45、APC Mouse anti-Rat CD90(eBioscience 公司,美国)各 3  $\mu$ L,混合均匀后室温下避光孵育 30 min。流式细胞仪检测 P2 代 rBMSCs 的表面分子标志。

## 1.5 不同硬度及形貌 PDMS 基底上 rBMSCs 形态

取 P3 代细胞,以约  $6 \times 10^3$ /cm<sup>2</sup> 密度接种于 PDMS 基底,用上述培养基培养 24 h,4% 多聚甲醛(Sigma 公司,美国)固定细胞 30 min,0.1% 的 Triton X-100(Sigma 公司,美国)室温通透细胞膜 20 min,1% 的 BSA(Sigma 公司,美国)室温封闭细胞 2 h,避光条件下鬼笔环肽(Life Technologies 公司,美国)染色细胞 F-actin 40 min,DAPI(Life Technologies 公司,美国)染色细胞核 10 min,倒置荧光显微镜观察细胞骨架结构。

## 1.6 rBMSCs 黏附及增殖实验

取 P3 代细胞,以约  $6 \times 10^3$ /cm<sup>2</sup> 密度接种于

PDMS 基底,分别于接种后的第 1、3、7、14 d(每隔 3 d 用上述培养基全量换液 1 次),去掉培养液,加入含 10% CCK-8 试剂(DOJINDO 公司,日本)的培养液继续孵育 2 h,以含 10% CCK-8 试剂培养液但无细胞的孔作为空白对照,用酶标仪在 450 nm 波长处检测不同基底的吸光度值,以 650 nm 波长作为参比波长进行双波长测定。

## 1.7 免疫荧光染色 OCN、COL I

取 P3 代细胞,以约  $6 \times 10^3$ /cm<sup>2</sup> 密度接种于 PDMS 基底培养 14 d,每隔 3 d 用上述培养基全量换液 1 次,4% 的多聚甲醛固定细胞 30 min,0.1% 的 Triton X-100 室温破膜 20 min,1% 的 BSA 37 °C 孵育 2 h,1:200 稀释的骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)及 COL I 抗体(Abcam 公司,英国)4 °C 孵育 8 h,1:500 稀释的 FITC 标记的抗大鼠 IgG 二抗(Abcam 公司,英国)室温孵育 1 h,DAPI 室温染色细胞核 10 min,共聚焦激光扫描显微镜(LSM 710, Carl Zeiss 公司,美国)观察 OCN 及 COL I 的表达情况。

## 1.8 ALP 活性检测

取 P3 代细胞,以约  $1.2 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> 密度接种于 PDMS 基底,分别于第 3、7、14 d(每隔 3 d 用上述培养基全量换液 1 次),按照 BCA 蛋白浓度定量试剂盒(碧云天生物技术有限公司,中国)及 ALP 试剂盒(南京建成科技有限公司,中国)说明书检测细胞 ALP 活性,于酶标仪 520 nm 波长处测定结果。

## 1.9 qRT-PCR 检测 Runx2 mRNA 的表达

取 P3 代细胞,以约  $1.2 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> 密度接种于 PDMS 基底,分别于第 3、7、14 d(每隔 3 d 用上述培养基全量换液 1 次)收集细胞,trizol 提取总 RNA,采用两步法进行 RT-PCR 分析。采用 CT 值法( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法)定量分析<sup>[20]</sup>。引物序列:Runx2 上游 5'-GGACGAGGCAAGAGTTTCAC-3',下游 5'-GAGGCG-GTCAGAGAACAAAC-3';GAPDH 上游 5'-ATGACAT-CAAGAAGGTGGTG-3',下游 5'-CATAACCAGGAAAT-GAGCTTG-3'。

## 1.10 统计学分析

所有数据均使用 SPSS 18.0 进行处理,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验,两组之间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$  认为有统计学差异, $P < 0.01$  认为有显著统计学差异。

## 2 实验结果

### 2.1 PDMS 基底形貌及弹性模量的测定

SEM 表征硅片及 PDMS 表面脊和槽结构 [见图 1(a)、(b)], 微机控制回弹力试验机测定 PDMS 基底弹性模量, 按质量比 5:1 与 33:1 混合 184 预聚物和固化剂制得直径为 1.5 cm、高为 2 cm 的圆柱体 PDMS 的弹性模量以及应力-应变曲线 [见图 1

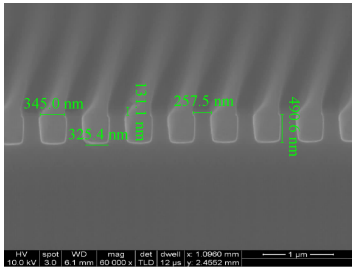
(c)], 根据公式

$$\Delta\sigma = F/\pi r^2$$

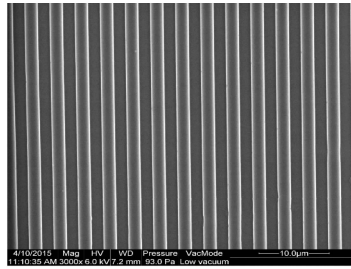
$$\Delta\varepsilon = \Delta L/L_0$$

$$E = \Delta\sigma/\Delta\varepsilon$$

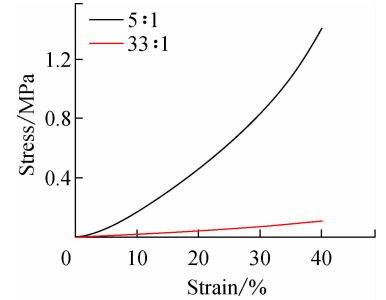
取 PDMS 被压缩 40% 时的应力值, 计算得到弹性模量分别为 3.5 和 0.27 MPa。其中:  $F$  为回弹力试验机测得的应力值;  $r$  为圆柱 PDMS 的半径;  $\Delta L$  为 PDMS 被压缩的长度,  $L_0$  为 PDMS 初始长度。



(a) 硅片表面的 SEM 成像



(b) PDMS 基底 SEM 成像



(c) 应力-应变曲线

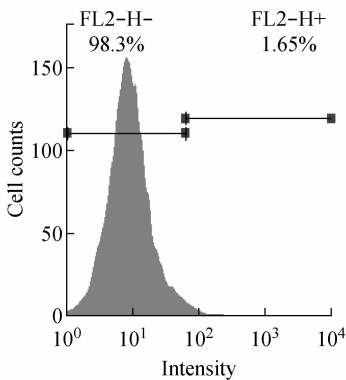
图 1 PDMS 基底形貌及弹性模量测定

Fig. 1 Measurement of PDMS substrate topography and elastic modulus (a) SEM image of a patterned silicon wafer surface, (b) SEM image of a patterned PDMS surface, (c) Stress-strain curve

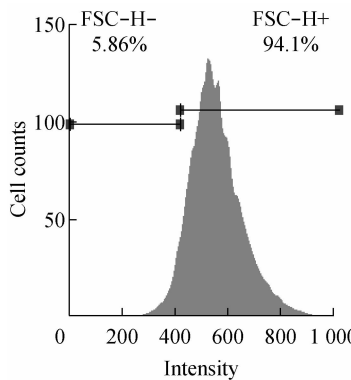
### 2.2 rBMSCs 细胞表面分子鉴定

流式细胞仪检测 P2 代 rBMSCs 表面分子标志 CD45-PE、CD44-FITC、CD90-APC。结果显示,

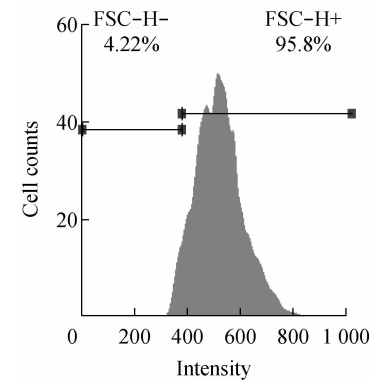
CD45-PE 低表达, 表达率为 1.65%; 而 CD44-FITC、CD90-APC 高表达, 表达率分别为 94.1% 和 95.8% (见图 2), 符合间充质干细胞的典型生物学特征。



(a) CD45-PE 表达率



(b) CD44-FITC 表达率



(c) CD90-APC 表达率

图 2 流式细胞术鉴定体外培养 P2 代 BMSCs 的分子表面标志物

Fig. 2 Molecular markers of P2 BMSCs *in vitro* detected by flow cytometry (a) Expression of CD45-PE, (b) Expression of CD44-FITC, (c) Expression of CD90-APC

### 2.3 不同硬度及形貌 PDMS 基底上 rBMSCs 细胞骨架观察

鬼笔环肽染色细胞 F-actin, DAPI 染色细胞核,

倒置荧光显微镜观察细胞骨架结构, 在硬度为 3.5 MPa 基底上 rBMSCs 铺展更充分, 呈多角形, 细胞面积更大, 细胞骨架排列更紧密; 而在 0.27 MPa

基底上 rBMSCs 铺展不充分,呈圆球形,细胞面积较小,细胞骨架蛋白少。相同硬度条件下,脊、槽宽为  $1.8\ \mu\text{m}$ 、深为  $0.5\ \mu\text{m}$  的基底对 rBMSCs 形貌影响较大,细胞沿着脊槽方向铺展,呈长梭形;而脊、槽宽为

$0.3\ \mu\text{m}$ 、深为  $0.5\ \mu\text{m}$  基底对 rBMSCs 形貌的影响较小,与平面 PDMS 基底相似,细胞任意铺展,呈多角形(见图 3)。

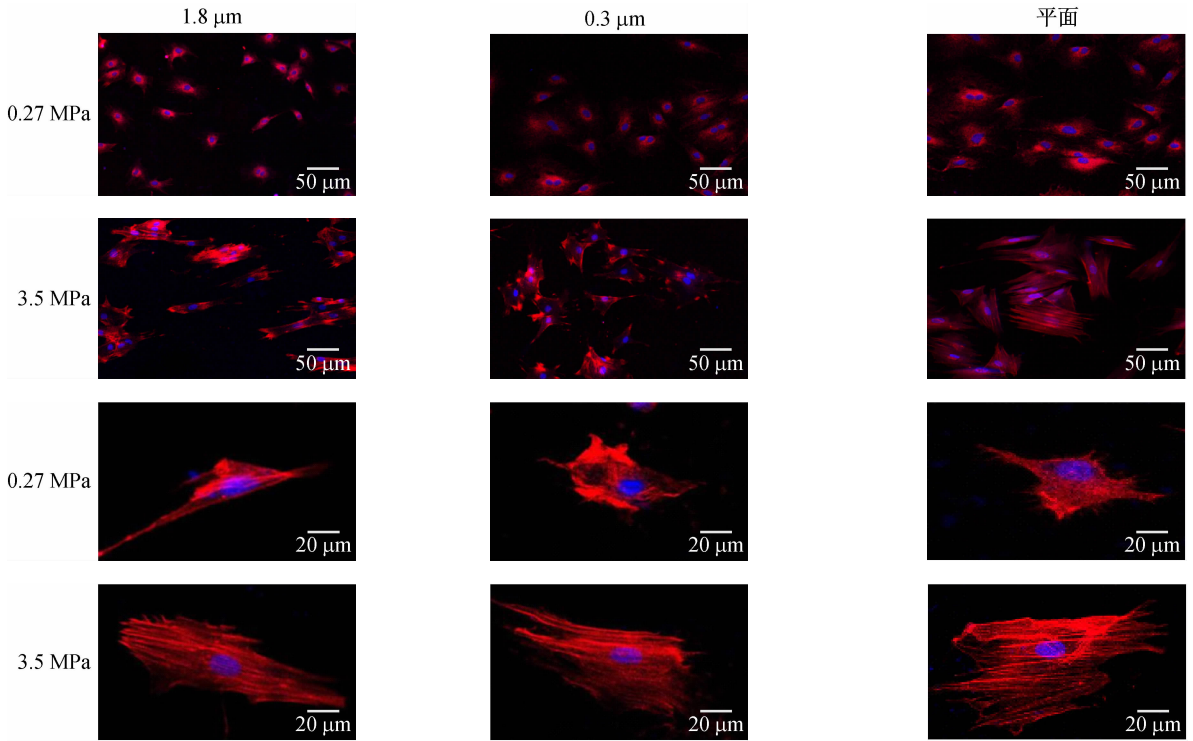


图3 倒置荧光显微镜观察不同硬度和形貌基底上 rBMSCs 的骨架情况(F-actin 红色,细胞核蓝色)

Fig.3 Skeleton of rBMSCs on substrates with different stiffness and topography observed by inverted fluorescence microscope

## 2.4 不同硬度及形貌 PDMS 基底对 rBMSCs 增殖的影响

CCK-8 实验发现,第 1、14 d,硬度为 3.5 MPa 时,各组 rBMSCs 增殖无统计学差异;第 7 d,硬度为 0.27 MPa 时,各组 rBMSCs 增殖无统计学差异;而在时间与基底形貌相同的条件下,3.5 MPa 基底细胞增殖率明显高于 0.27 MPa 基底,具有显著统计学差异( $P < 0.01$ )。基底硬度对 rBMSCs 的增殖影响显著,而基底脊槽结构对 rBMSCs 增殖影响不大(见图 4)。

## 2.5 免疫荧光染色

rBMSCs 培养 14 d 行 OCN 及 COL I 免疫荧光染色。结果发现,在硬度为 3.5 MPa、脊、槽宽为  $0.3\ \mu\text{m}$ 、深为  $0.5\ \mu\text{m}$  PDMS 基底上,OCN 及 COL I 的表达量明显多于其他各组,表明基底硬度与脊槽

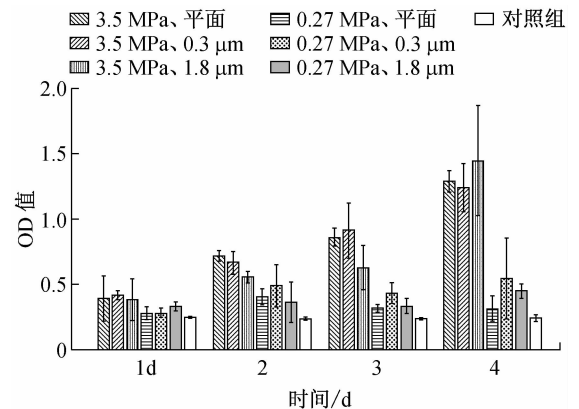


图4 CCK-8 细胞增殖实验结果

Fig.4 Cck-8 cell proliferation assay results

结构对 rBMSCs 成骨分化有协同促进作用,成骨细胞特异性蛋白表达增多(见图 5)。

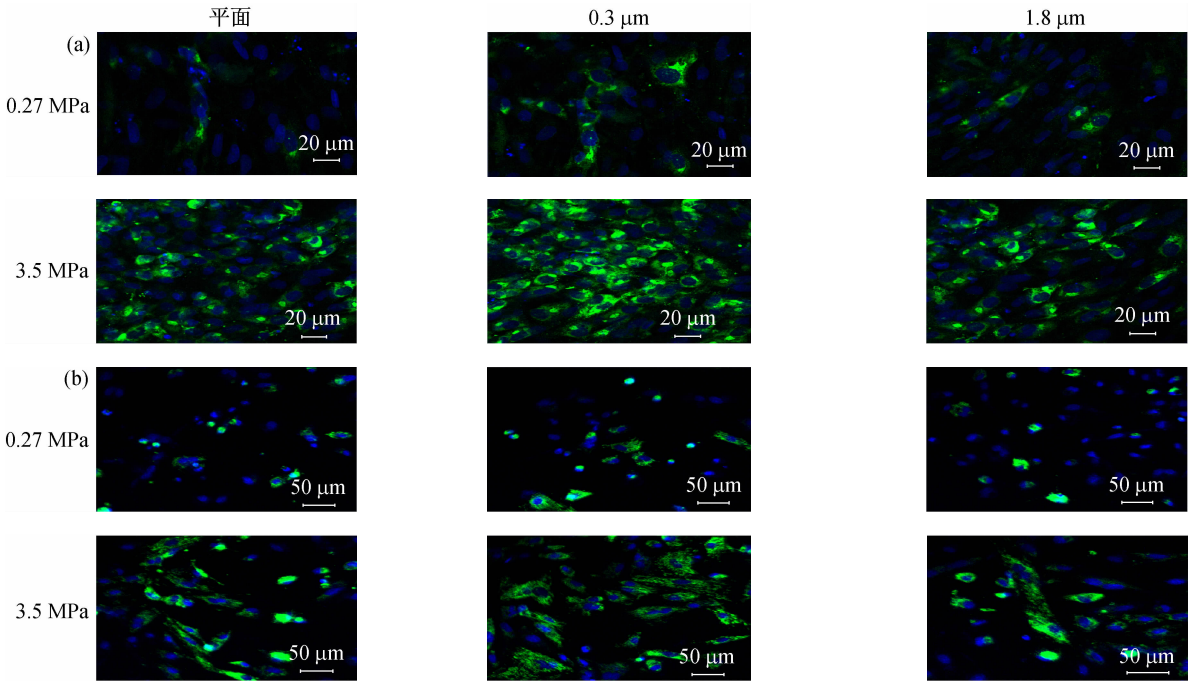


图 5 rBMSCs 在不同硬度及形貌 PDMS 基底上培养 14 d 后免疫荧光染色图片 [细胞核 (蓝色), OCN、COL I (绿色)]

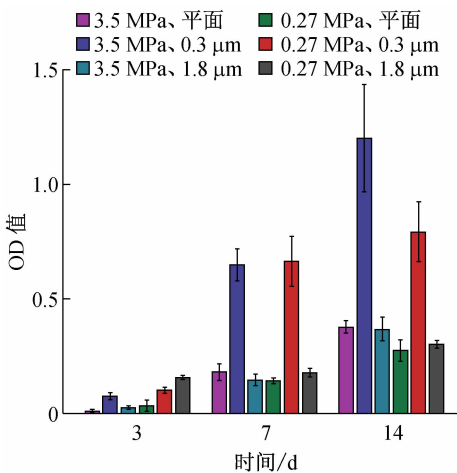
(a) OCN 染色, (b) COL I 染色

Fig. 5 Fluorescent images of rBMSCs cultured on PDMS substrates with different stiffness and topography for 14 days [Nuclei (blue) staining and OCN, COL I (green) staining] (a) OCN Staining, (b) COL I staining

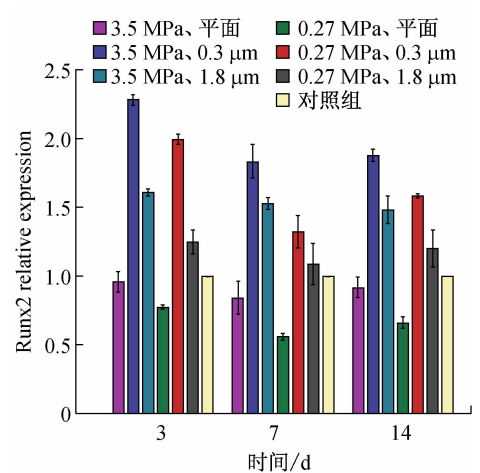
## 2.6 ALP 活性及 Runx2 mRNA 的表达

分别于第 3、7、14 d 采用酶标仪法检测 rBMSCs 内 ALP 活性,第 3 d rBMSCs 内 ALP 活性均较低;第 7、14 d,在硬度为 3.5 MPa、脊、槽宽为 0.3 μm、深为

0.5 μm PDMS 基底与硬度为 0.27 MPa、脊、槽宽为 0.3 μm、深为 0.5 μm PDMS 基底上 ALP 活性明显高于其他组,具有显著统计学差异( $P < 0.01$ ) [见图 6(a)]。rBMSCs 培养至第 3、7、14 d 行 qRT-PCR 检



(a) ALP 活性



(b) Runx2 mRNA 相对表达量

图 6 不同硬度及形貌 PDMS 基底上 ALP 活性及 Runx2 mRNA 相对表达

Fig. 6 ALP activity and relative expression of Runx2 mRNA of different stiffness and topography of PDMS substrate

(a) ALP activity, (b) The expression of Runx2 mRNA



测发现,无论基底硬度如何,脊、槽宽为 $0.3\ \mu\text{m}$ 、深为 $0.5\ \mu\text{m}$  PDMS 基底上 Runx2 mRNA 的表达明显高于其他各组( $P < 0.01$ ),脊、槽宽为 $1.8\ \mu\text{m}$ 、深为 $0.5\ \mu\text{m}$  PDMS 基底和平面基底上 Runx2 mRNA 的表达无明显统计学差异( $P > 0.05$ ) [见图 6(b)]。Runx2 是成骨分化的主要调控基因,主要在成骨细胞早期增殖过程中起重要作用<sup>[21]</sup>,故第 3 d Runx2 mRNA 表达量明显增多,随着时间延长有下调趋势。

### 3 讨论

基底硬度对 BMSCs 的生物学行为具有重要影响<sup>[22-23]</sup>。大量研究表明,基底的力学特性能诱导细胞自身骨架蛋白的重排,也能调控干细胞的分化<sup>[24]</sup>。

本实验研究基底硬度与形貌共同对 rBMSCs 生物学行为的影响。基底硬度及形貌能影响 rBMSCs 的铺展、形态及增殖,在较硬的 PDMS 基底上,rBMSCs 铺展充分,细胞面积大,呈多角形,细胞骨架排列紧张;在较软的 PDMS 基底上,rBMSCs 面积较小,呈圆球形,胞内骨架蛋白较少。在相同硬度条件下,脊、槽宽为 $1.8\ \mu\text{m}$ 、深为 $0.5\ \mu\text{m}$  PDMS 基底对 rBMSCs 有明显的引导作用,细胞沿着脊槽的方向呈长梭形铺展;而在脊、槽宽为 $0.3\ \mu\text{m}$ 、深为 $0.5\ \mu\text{m}$  PDMS 基底及平面 PDMS 基底上,rBMSCs 任意铺展,呈多角形(见图 3)。rBMSCs 在较硬 PDMS 基底上增殖率明显高于在软 PDMS 基底上的增殖率,而在脊、槽宽分别为 $0.3$ 、 $1.8\ \mu\text{m}$ 、深为 $0.5\ \mu\text{m}$  PDMS 基底及平面 PDMS 基底上 rBMSCs 的增殖无明显差异,说明细胞增殖主要取决于基底的硬度,而基底形貌作用不大(见图 4)。

MSCs 向成骨细胞分化过程中能合成分泌成骨特异性蛋白和细胞外基质成分,其中 ALP、OCN 和 COL I 是 MSCs 成骨分化过程中极为重要的分化产物。ALP 是成骨细胞表面标志酶,被认为是成骨细胞分化和功能的标志,能够反映成骨细胞合成 COL I、形成骨基质的能力。COL I 是体外培养成骨细胞所分泌的特异性胶原蛋白,所形成的网状结构也是成骨细胞矿化功能实现的前提。OCN 是成骨细胞合成分泌的一种非胶原蛋白,是反映成骨细胞分化成熟的指标,能准确表示成骨细胞的活性,其主要功能是维持骨的正常矿化速率,促进骨组织矿物

质沉积的正常钙化过程。

PDMS 基底硬度与形貌对 rBMSCs 成骨分化有协同促进作用,硬度相同的条件下,脊、槽宽为 $0.3\ \mu\text{m}$ 、深为 $0.5\ \mu\text{m}$  PDMS 基底上 ALP 活性以及 OCN、COL I 和 Runx2 mRNA 表达量均明显高于脊、槽宽为 $1.8\ \mu\text{m}$ 、深为 $0.5\ \mu\text{m}$  PDMS 基底及平面基底( $P < 0.01$ );在形貌相同的条件下, $3.5\ \text{MPa}$  基底上 ALP 活性以及 OCN、COL I 和 Runx2 mRNA 表达量与 $0.27\ \text{MPa}$  基底相比亦增高( $P < 0.05$ ) (见图 5、6),表明基底硬度与形貌能协同促进 rBMSCs 的成骨分化。相比硬度而言,基底脊槽结构更能促进 rBMSCs 成骨分化。

rBMSCs 通过细胞表面整合素与基底相结合,整合素活化且在结合位点产生张力,引起基底的形变,而基底硬度不同,基底形变幅度亦不同,细胞可感知区分这种力学信号差异,并将其转化为生物化学信号,从而触发激酶活化、磷酸化位点暴露、信号分子胞内运输和受体配体结合强度改变等一系列分子事件来调控细胞骨架纤维的装配及细胞的增殖、分化<sup>[25-26]</sup>。在硬基底上,rBMSCs 自身蛋白骨架发生重排,细胞肌动蛋白纤维增多、增粗,细胞张力增大,进而适应较硬的基底环境,这可能是硬度诱导 rBMSCs 成骨分化的机制之一<sup>[27-28]</sup>,并且这与生理环境下成骨细胞所处较硬的外周环境相符合。而基底形貌能直接影响 rBMSCs 的黏附与伸展行为。有研究表明,当 MSCs 处于黏附、扁平状态时,MSCs 成骨分化增强;当 MSCs 伸展受限或处于圆形状态时,成骨分化减弱。这是由于 MSCs 形态的改变影响了 Rho 家族三磷酸鸟苷(guanosinetriphosphate, GTP) 酶的活性,RhoA · Rock 信号通路可能通过细胞黏着斑转导,MSCs 形态变化将改变 RhoA 介导的细胞骨架的重排、黏着斑的装配及整合素介导的下游信号通路,从而影响 MSCs 的生物学行为<sup>[29]</sup>。本研究发现,在较硬基底上,rBMSCs 铺展更充分,骨架收缩增强,成骨行为有增强趋势。当基底硬度耦合了微拓扑结构后,rBMSCs 成骨行为更加明显,推测在一定力学强度下,仿生骨小梁表面胶原纤维直径的脊槽结构能够更好地为 rBMSCs 提供黏附位点,细胞表面黏着斑活化并激活 RhoA · Rock 信号通路,从而调控 rBMSCs 的增殖及成骨分化。但是基底硬度诱导 rBMSCs 成骨分化的趋势没有基底形貌促成骨分化

明显,可能是因为硬基底上 rBMSCs 增殖较快,从而在一定程度上抑制了 rBMSCs 成骨分化。

研究表明,具有细胞行为引导能力的硬度,即细胞能感受到的硬度,来源于细胞与基底间的界面<sup>[30]</sup>,故细胞感受到的不会是整个骨组织的硬度,而是细胞与骨表面几百纳米到几微米的细胞外基质的硬度,而细胞外基质主要由胶原纤维网络和其他蛋白、多糖相互层叠而成,硬度约几兆帕<sup>[5]</sup>,并且这些胶原纤维直径在几纳米到几百纳米范围<sup>[31-32]</sup>。因此,仿生骨与细胞外基质界面硬度及形貌的材料更能诱导 BMSCs 的成骨分化。本实验结果也发现,硬度为 3.5 MPa、脊、槽宽为 0.3  $\mu\text{m}$ 、深为 0.5  $\mu\text{m}$  PDMS 基底最具成骨诱导潜力。

骨质疏松患者由于骨小梁硬度及微结构的改变,影响了 BMSCs 的黏附、增殖及分化,从而导致骨量减少,骨密度下降,易发生骨折。本研究结果不仅有助于了解生物物理因素在某些疾病(如骨质疏松)发病机制中的作用,还为骨组织工程新材料的研发提供理论基础。本研究中选择的基底硬度及形貌范围太狭窄,更大的基底硬度以及更小的基底脊槽结构是否会进一步增强 BMSCs 成骨行为,还需进一步实验证实;并且基底硬度及形貌影响 BMSCs 成骨分化的具体蛋白分子机制仍不确定,还需从分子水平探讨两者相互作用诱导 BMSCs 增殖、分化所涉及的相关信号通路,从分子生物学和生物力学角度为骨组织工程支架材料的研发提供理论支持。

## 参考文献:

[1] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow [J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 41-49.

[2] 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.

[3] 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 osteoblas-

tic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells [J]. *J Med Biomech*, 26(2): 116-120.

[4] Jiang J, Papoutsakis ET. Stem-cell niche based comparative analysis of chemical and nano-mechanical material properties impacting *ex vivo* expansion and differentiation of hematopoietic and mesenchymal stem cells [J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2(1): 25-42.

[5] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 677-689.

[6] 李振涵,孙树津,龙勉. 微模式化基底上大鼠骨髓间充质干细胞的增殖、分化和迁移[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(4): 256-262.

Li ZH, Sun SJ, Long M. Proliferation, differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells on micropatterned substrate [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(4): 256-262.

[7] Skardal A, Mack D, Atala A, et al. Substrate elasticity controls cell proliferation, surface marker expression and motile phenotype in amniotic fluid-derived stem cells [J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2013, 1(7): 307-316.

[8] Vincent LG, Choi YS, Alonso-Latorre B, et al. Mesenchymal stem cell durotaxis depends on substrate stiffness gradient strength [J]. *Biotechnol J*, 2013, 8(4): 472-484.

[9] Nam J, Johnson J, Lannutti JJ, et al. Modulation of embryonic mesenchymal progenitor cell differentiation via control over pure mechanical modulus in electrospun nanofibers [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(4): 1516-1524.

[10] Qiu Y, Bayomy AF, Gomez MV, et al. A role for matrix stiffness in the regulation of cardiac side population cell function [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(9): H990-997.

[11] Holmes B, Zhu W, Li J, et al. Development of novel three-dimensional printed scaffolds for osteochondral regeneration [J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(1-2): 403-415.

[12] Watari S, Hayashi K, Wood JA, et al. Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(1): 128-36.

[13] Holmes B, Castro NJ, Li J, et al. Enhanced human bone marrow mesenchymal stem cell functions in novel 3D cartilage scaffolds with hydrogen treated multi-walled carbon nanotubes [J]. *Nanotechnology*, 2013, 24(36): 365-378.

[14] Jiang X, Nai MH, Lim CT, et al. Polysaccharide nanofibers with variable compliance for directing cell fate [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(3): 959-968.

[15] Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction [J]. *Nature*, 2011, 474(7350):



- 179-183.
- [16] Shih YR, Tseng KF, Lai HY, *et al.* Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(4): 730-738.
- [17] Liliensiek SJ, Campbell S, Nealey PF, *et al.* The scale of substratum topographic features modulates proliferation of corneal epithelial cells and corneal fibroblasts [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 79(1): 185-192.
- [18] Karuri NW, Liliensiek S, Teixeira AI, *et al.* Biological length scale topography enhances cell-substratum adhesion of human corneal epithelial cells [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117 (Pt 15): 3153-3164.
- [19] Wang ZX, Volinsky AA, Gallant ND. Crosslinking effect on polydimethylsiloxane elastic modulus measured by custom-built compression instrument [J]. *J Appl Polym Sci*, 2014, 131(22): 102-110.
- [20] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Augello A, De Bari C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21 (10): 1226-1238.
- [22] Park K, Millet LJ, Kim N, *et al.* Measurement of adherent cell mass and growth [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(48): 20691-20696.
- [23] Tee SY, Fu J, Chen CS, *et al.* Cell shape and substrate rigidity both regulate cell stiffness [J]. *Biophys J*, 2011, 100(5): L25-27.
- [24] 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(Pt 3): 508-518.
- [25] 华闻达, 韩东, 吴迪, 等. 骨髓间充质干细胞对不同时长应力刺激的力学响应[J]. *医用生物力学*, 2015, 30(1): 43-49.
- Hua WD, Han D, Wu D, *et al.* Responses from mesenchymal stem cells to mechanical stimulation for variable duration [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(1): 43-49.
- [26] Asparuhova MB, Gelman L, Chiquet M. Role of the actin cytoskeleton in tuning cellular responses to external mechanical stress [J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2009, 19 (4): 490-499.
- [27] MacKay JL, Hammer DA. Stiff substrates enhance monocytic cell capture through E-selectin but not P-selectin [J]. *Integr Biol*, 1(8): 62-72.
- [28] Du J, Chen X, Liang X, *et al.* Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(23): 9466-9471.
- [29] Chen CS, Alonso JL, Ostuni E, *et al.* Cell shape provides global control of focal adhesion assembly [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 307(2): 355-361.
- [30] Sen S, Engler AJ, Discher DE. Matrix strains induced by cells: Computing how far cells can feel [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2009, 2(1): 39-48.
- [31] Mwenifumbo S, Stevens MM. ECM interactions with cells from the macro-to nanoscale [M]// Gonsalves K, Halberstadt C, Laurencin CT, Nair L, editors. *Biomedical nanostructures*. New York: John Wiley & Sons, 2008: 223e60.
- [32] Martin RB, Burr DB, Sharkey NA. Material properties of cortical bone [M]// Martin RB, Burr DB, Sharkey NA (eds). *Skeletal tissue mechanics*. New York: Springer, 1998: 143e65.