

文章编号:1004-7220(2009)04-0256-07

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

李振涵, 孙树津, 龙勉

(中国科学院力学研究所 国家微重力实验室/生物力学与生物工程中心, 北京 100190)

摘要:目的 利用微模式化基底研究基底几何微结构对骨髓间充质干细胞增殖、分化及迁移过程的影响。方法 设计制作微模式化基底,用以控制细胞的铺展形态和面积。比较不同模式控制下大鼠骨髓间充质干细胞的增殖、分化和迁移数据。结果 细胞铺展宽度狭小可抑制骨髓间充质干细胞的增殖,细胞铺展形状可以调节其向成骨细胞分化的进程,细胞铺展面积受限时迁移增强,其增殖迁移行为减弱与成骨细胞诱导因子地塞米松的作用有关。结论 细胞铺展的几何形状和面积是骨髓间充质干细胞增殖、分化及迁移过程中的重要调节因子。

关键词: 微模式化基底; 间充质干细胞; 增殖; 分化; 迁移

中图分类号: R3 文献标志码: A

Proliferation, differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells on micropatterned substrate

LI Zhen-han, SUN Shu-jin, LONG Mian (*National Microgravity Laboratory and Center for Biomechanics and Bioengineering, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*)

Abstract: Objective To quantify the micro-geometric and configuration of micropatterned substrate and analyze its effects on proliferation, differentiation, and migration of bone marrow mesenchymal stem cells (BM MSCs). **Method** Micropatterned substrates were designed and fabricated to control cells' spreading shape and area. Data of proliferation, differentiation and migration of rat BM MSCs on various patterned substrates were compared. **Result** Proliferation of BM MSCs was inhibited when their spreading width was narrowed. Osteoblastic differentiation was regulated distinctively in different spreading shape and area. Cell migration was more active when their spreading area was reduced. Dexamethasone was found to play an important role in down-regulating cell proliferation and migration on patterned substrate. **Conclusions** Cell spreading shape and area is important factors for regulating proliferation, differentiation, and migration of BM MSCs.

Key words: Micropatterned substrate; Mesenchymal stem cells; Proliferation; Differentiation; Migration

胞外基质微环境如何影响干细胞的分化存在许多未知因素。细胞在基质上的粘附与铺展不仅与基质的化学性质有关,也与基质的表面物理性质如刚度、亲水性以及几何构造等有关^[1-5]。在体外研究中,贴壁细胞一般是生长在简单的表面上,无法体现

体内真实生存空间对细胞铺展的限制。利用表面微模式化技术可以人为地修饰表面的几何构造,模拟体内细胞生存环境的空间微结构,这一技术已被大量用于相关的细胞生物学研究^[2,6,7]。本文以大鼠骨髓间充质干细胞 (Bone marrow mesenchymal stem

收稿日期:2009-03-03; 修回日期:2009-05-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400095、30870601、10332060)

作者简介:李振涵(1978-),男,研究方向:生物力学。

通讯作者:孙树津, Tel: (010)82544132; E-mail: sunshj@imech.ac.cn。

cell, BMMSCs) 作为模型细胞, 利用微模式化基底调控细胞的铺展状态, 考查了 BMMSCs 在增殖以及向成骨细胞分化过程中对不同基底几何微结构产生的响应。对这一问题的研究一方面有助于深化对干细胞分化机制的了解, 另一方面对筛选优化的诱导分化条件也具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 大鼠 BMMSCs 的提取、培养和成骨细胞诱导分化

将成年 SD 大鼠 (180 ~ 220 g) 脱颈处死, 无菌条件下取出双侧胫骨及股骨, 用注射器吸取低糖 DMEM (Hyclone) 培养液 (含 10% 胎牛血清, Gibco) 仔细冲洗骨髓腔两遍, 以获取骨髓细胞的冲洗液。将细胞冲洗液以 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 使用上述培养液将细胞重悬制成单细胞悬液, 接种于塑料培养瓶中。24 h 后换液并移除未贴壁细胞。之后每 3 d 换一次液。当贴壁细胞形成较大的克隆 (80% ~ 90% 汇合) 后以适当比例传代。

对 BMMSCs 进行成骨细胞诱导时, 先将生长至 80% ~ 90% 汇合的细胞, 以 PBS 清洗 1 次, 用胰蛋白酶消化, 以上述低糖 DMEM 培养液制成单细胞悬液, 调整细胞密度, 一般以 1 500 个/cm² 密度接种。24 h 后将培养液更换为成骨诱导培养液 (培养液中加入 100 nmol/L 地塞米松, 10 mmol/L β -甘油磷酸钠, 50 μ g/mL 维生素 C), 之后每 3 d 换一次诱导培养液。取诱导培养第 14 d 的细胞进行钙钴法碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 染色以检验细胞的分化程度。具体步骤为: 将培养板内的细胞用 PBS 清洗后加入 3.7% 多聚甲醛在 4 $^{\circ}$ C 固定 10 min, 蒸馏水清洗。加入工作液 (3% β -甘油磷酸钠 2.5 mL, 2% 巴比妥钠 2.5 mL, 2% 无水氯化钙 5.0 mL, 5% 氯化镁 0.25 mL, 双蒸水 1.25 mL, 调 pH 至 9.0 ~ 9.4), 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 h。蒸馏水洗数次, 加入 2% 硝酸钴溶液 3 至 5 min, 蒸馏水漂洗, 加入 1% 硫化铵显色 2 min, 蒸馏水漂洗, 用 1:1 甘油和 PBS 混合物封片。ALP 活性处将生成棕黑色沉淀, 沉淀颜色随酶活性增加而变深。

1.2 微模式化培养基底的制作

根据设计好的模式图案阵列, 首先制作玻璃版光刻掩模 (mask), 然后利用掩模制作光刻胶底板。

其基本步骤为: 在硅片表面甩涂光刻胶, 覆盖以掩模, 紫外曝光处理。由于掩模上的模式图案为不透明的, 其余部分皆为透明区域, 掩模透明区域覆盖的光刻胶 (正胶) 曝光后可被溶解并清洗掉, 剩下的未被曝光的凸起部分即为所设计的模式图案形状, 以此作为光刻胶底板。将聚二甲基硅氧烷 (PDMS) (Dowcorning, Sylgard[®] 184) 与固化剂按照 10:1 的比例混匀后倒在准备好的光刻胶硅片底板上。待 PDMS 固化后将其小心揭下, 其表面即翻印出所设计的图案阵列, 最后将其切割成合适大小的印章备用。

本文使用一种称为 Comb-polymer 的聚合材料制作微模式化基底。Comb-polymer 是由 methyl methacrylate (MMA), hydroxy-poly (oxyethylene methacrylate) (HPOEM), poly (oxyethylene methacrylate) (POEM) 以一定比例聚合成的一种梳状双亲聚合物 (Amphiphilic comb polymers), 该聚合物经适当的预处理后, 具有极强的抑制蛋白吸附性能^[7,8]。基本步骤如下: 将 Comb-polymer 溶于 80% 乙醇, 旋涂于 PDMS 印章表面并翻印至常规的塑料细胞培养器皿基底上, 即将 PDMS 印章凸起部分的 Comb-polymer 溶液转移到培养基底表面。待乙醇挥发后, 基底表面即可形成不溶于水的模式图案, 只有落在未覆盖 Comb-polymer 的模式图案内的细胞才能黏附, 并且细胞的铺展、生长将被限制在所设计的图案模式内 (见图 1)。使用新配制的 Comb-polymer 的溶液可以获得最好的抑制细胞黏附效果, 而将 Comb-polymer 的乙醇溶液放置时间延长, 可逐步降低其抑制效果, 从而达到人为控制细胞铺展的目的。

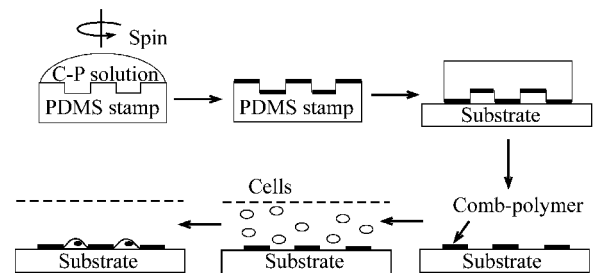


图 1 利用 PDMS 印章和 Comb-polymer 制作微模式化基底过程示意图

Fig.1 Sketch of fabrication of micropatterned substrate using PDMS stamp and Comb-polymer

1.3 实验设计及数据采集

1.3.1 BMMSCs 在铺展宽度受到限制下的生长行为

传代次数在3~4代以内的大鼠BMMSCs,大多呈较狭长的梭状或纤维状,其铺展宽度最宽接近20 μm 。采用条带模式控制细胞的铺展宽度,即在12孔板内分别制作了宽度为5、10和20 μm 的条带模式,条带间隔50 μm 。在3种微模式基底上分别进行大鼠BMMSCs的培养。将制成的单细胞悬液以3000个/ cm^2 的面密度接种到各孔中以后,只有落在条带内的细胞可以黏附生长,接种后24h换液以清除未落在条带内的未贴壁细胞。随机选择3至4个视野,并标记其位置。每隔24h用显微镜采集各视野的图像,通过图像处理软件算出细胞在条带模式中铺展的投影面积与视野内条带总面积,进而统计出两者的比例,以此反映细胞在宽度限制下的铺展及增殖能力。

1.3.2 限定铺展形状对单个BMMSC细胞分化的影响

干细胞分化后其形态会发生显著改变,如BMMSCs经成骨诱导后,其形状由梭状渐趋多边形。采用不同面积的圆形(接近成骨诱导分化后的多边形形状)和狭长椭圆形(接近未分化的梭形形状)微模式研究BMMSCs单细胞形状控制下的分化行为:模式图案面积分别为1000(相当于第1次传代的大鼠BMMSCs单细胞的平均铺展面积)和314 μm^2 (用于模拟细胞铺展受到限制的情况),对应圆形直径分别约为36和20 μm ,对应椭圆长、短轴分别约为110、12 μm 和50、8 μm 。模式图案分布密度7000~10000个/ cm^2 ,每两个图案边缘最近距离大于70 μm (该间距可以有效防止大多数刚接种的细胞跨模式生长)(见图2A)。将4种微模式基底仍然分别制作在12孔板内。分别使用第1和第4次传代的BMMSCs,在4种微模式基底上进行成骨细胞诱导培养实验。初始以普通培养基配制细胞悬液,以3000个/ cm^2 的面密度接种,24h移除上清及未贴壁细胞,更换为成骨细胞诱导培养液,诱导培养至第14d进行钙钴法ALP染色,检测细胞的分化程度。

对表达ALP活性的细胞进行如下统计:在显微镜下对同一视野分别获得相差场和普通亮场图片。ALP未显色细胞在亮场下模糊,而在相差场中仍可识别,对比分析这2张图片便于对结果的准确统计。统计时以一个模式图案为单位,当亮场图片内看到图案内有黑色斑点,则记为分化细胞;如果相差图片

中看到图案内有细胞,而亮场图片中未见黑色斑点,则记为未分化细胞(见图3)。每一种形状和面积的数据均为4个随机视野平行样本的统计均值和方差。

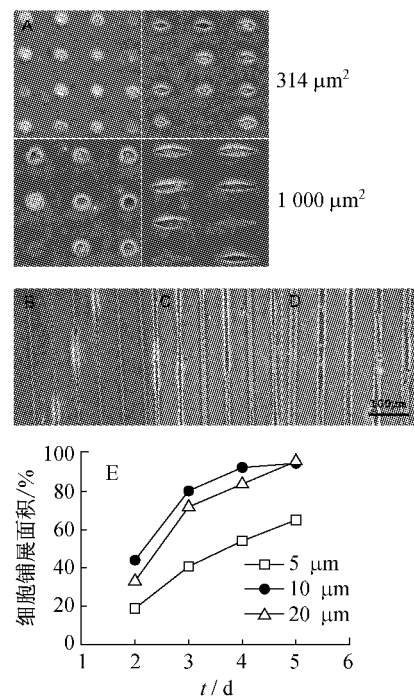


图2 大鼠BMMSCs在面积为314和1000 μm^2 的圆形和椭圆形模式(A)和宽度为5 μm (B)、10 μm (C)和20 μm (D)的条带模式上的生长以及在条带模式上的铺展时间过程(E)

Fig.2 Proliferation of rat BMMSCs on spherical and elliptical patterns at a given area of 314 and 1000 μm^2 (A) and on striped pattern at a given width of 5 μm (B), 10 μm (C) and 20 μm (D). Also plotted was time course of cell spreading area on striped pattern (E)

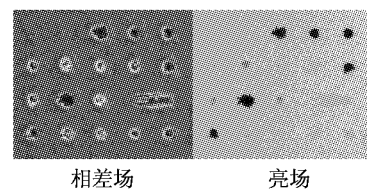


图3 对模式图案内成骨诱导的大鼠BMMSCs进行ALP染色后,分别在相差场和亮场下获得的照片

Fig.3 Photographs of ALP staining of osteo-induced rat BMMSCs on micro-patterned substrate under phase-contrast field and bright field

1.3.3 BMMSCs在微模式化基底上的迁移

先将Comb-polymer乙醇溶液常温放置数天以降低其抑制细胞黏附性能,仍然利用314和1000

μm^2 的圆形模式印章, 在 12 孔板内制成微模式化基底。细胞在这种基底上会逐渐地摆脱模式图案的限制, 延伸到模式图案外生长。在每种微模式基底上分别进行 BMMSCs 的生长实验和成骨细胞诱导实验, 以考查各种条件下 BMMSCs 的迁移行为。细胞接种方法同前两节。实验开始后每 2 d 用显微镜在每一种基底上随机采集 3 个视野的图像, 至第 12 d 为止。算出每一视野内脱离模式图案束缚的细胞数与总细胞数的比例, 并统计均值和方差, 以衡量细胞的迁移能力。

1.3.4 成骨诱导培养液成份对 BMMSCs 迁移和铺展的影响

地塞米松可以影响细胞骨架结构^[9,10], 而细胞骨架与细胞的黏附铺展以及迁移密切相关。采用成骨诱导液中的地塞米松分离考查对模式化表面细胞迁移和铺展的影响。实验方法与上节细胞迁移实验基本相同, 并在面积为 $1\ 000\ \mu\text{m}^2$ 的圆形微模式基底上进行。对于每种微模式基底, 分别包括 4 组实验: 第 1 组为常规培养组(对照组), 使用普通培养液; 第 2 组为全成分诱导组(即使用全成分诱导液, 普通培养液中加入 $100\ \text{nmol/L}$ 地塞米松, $10\ \text{mmol/L}$ β -甘油磷酸钠和 $50\ \mu\text{g/mL}$ 维生素 C); 第 3 组, 在普通培养液中加入 $100\ \text{nmol/L}$ 地塞米松; 第 4 组, 在普通培养液中加入 $10\ \text{mmol/L}$ β -甘油磷酸钠和 $50\ \mu\text{g/mL}$ 维生素 C。按前述方法统计 12 d 内细胞脱离模式图案束缚的比例。

2 结果

2.1 BMMSCs 的铺展宽度受到限制下的生长行为

在大鼠 BMMSCs 的增殖过程中, 10 与 $20\ \mu\text{m}$ 条带内的细胞铺展面积增长十分接近。在 $5\ \mu\text{m}$ 条带内, 细胞总体铺展面积在初始阶段相对 10 和 $20\ \mu\text{m}$ 条带较低, 并在增殖过程中始终保持这一趋势(见图 2B~E); 单细胞铺展长度显著增长, 约是 $10\ \mu\text{m}$ 条带中的 2 倍, $20\ \mu\text{m}$ 条带中的 4 倍, 最长可达 $200\ \mu\text{m}$, 在更宽的条带以及普通培养皿中都观察不到大鼠 BMMSCs 能延长到如此长度; 细胞在相差显微镜下可观察到细胞核两侧明显亮斑(图 2B), 表明该处曲度很大, 细胞呈水滴状隆起。实验结果显示铺展宽度影响 BMMSCs 的铺展状态、进而影响其增殖过程。

2.2 限定铺展形状对单个 BMMSC 细胞分化的影响

BMMSCs 向成骨细胞诱导分化过程明显受到细胞铺展形状和铺展面积的影响。从铺展形状角度观察, 在 $1\ 000\ \mu\text{m}^2$ 的模式内, 对于第 1 代细胞, 按圆形模式铺展的细胞分化程度高于按椭圆形模式铺展的细胞($P=0.05$); 这一差异对于第 4 代细胞更为显著($P<0.01$)。在 $314\ \mu\text{m}^2$ 的模式内, 对于第 1 代细胞, 2 种铺展形状的细胞分化没有出现显著性差异; 但对于第 4 代的细胞, 圆形铺展细胞的分化程度仍高于椭圆形铺展细胞($P<0.05$)(见图 4)。从铺展面积角度考查, 在圆形模式内, 铺展面积为 $1\ 000\ \mu\text{m}^2$ 的细胞分化程度均高于铺展面积为 $314\ \mu\text{m}^2$ 的细胞($P<0.05$); 但在椭圆形模式内, 2 种铺展面积的细胞分化均未得到显著性差异(见图 4)。

2.3 BMMSCs 在微模式化基底上的迁移

在微模式化表面上, 细胞在接种后 2 d 内的铺展仍然只限于模式图案内, 自第 3 d 起开始逐渐延伸至模式图案外。至第 12 d, 细胞迁移出模式的比例达到 $50\% \sim 90\%$ 。但对于不同的模式图案, 细胞迁移发生的速度和发生时间均有差别。在 $314\ \mu\text{m}^2$ 模式内的细胞会更早出现脱离模式控制现象, 在第 3~5 d 脱离模式生长的细胞因分裂增殖迅速增多。在 $1\ 000\ \mu\text{m}^2$ 模式图案内的细胞脱离模式控制后, 其迅速增殖阶段约较 $314\ \mu\text{m}^2$ 模式上的细胞推迟 2 d 发生(见图 5A)。

在上述基底上进行成骨细胞诱导分化培养的 BMMSCs, 其向模式外迁移并增殖的能力显著下降, 没有出现明显跨模式生长的高峰期。但在 $1\ 000\ \mu\text{m}^2$ 和 $314\ \mu\text{m}^2$ 模式图案内的细胞向模式外迁移的速度仍有差别, 仍存在前者低于后者的趋势(见图 5B)。

上述结果表明, BMMSCs 在铺展面积受限时增殖迁移行为更为积极, 有主动寻求维持正常铺展面积的生长趋势。细胞在分化时其迁移及增殖能力下降。

2.4 成骨诱导培养液成分对 BMMSCs 迁移和铺展的影响

分别在面积为 $1\ 000\ \mu\text{m}^2$ 的圆形和椭圆形的微模式基底上进行的实验得到了相似的结果。与对照组相比, 添加全部成骨细胞诱导成分和部分诱导成

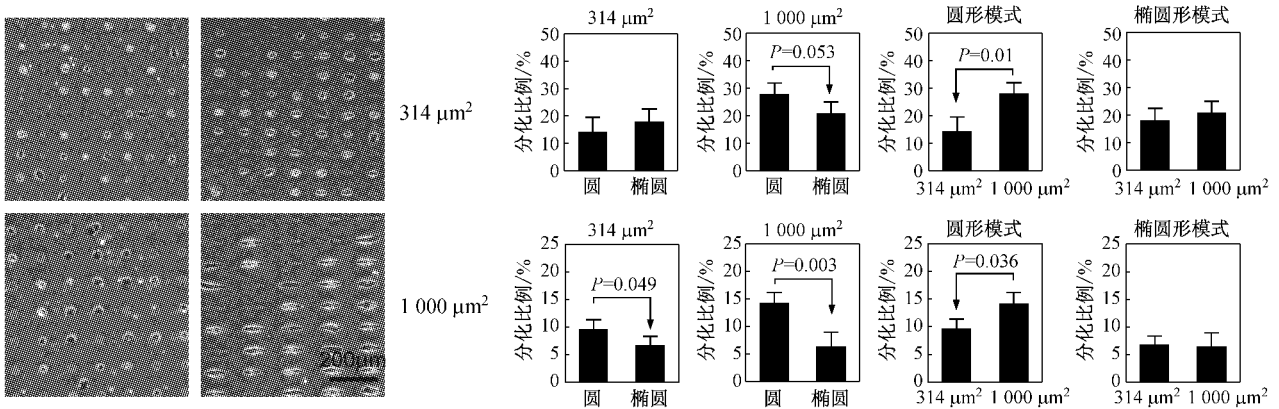


图4 A. 在不同形状和面积的微模式基底上成骨诱导的大鼠 BMSCs 进行 ALP 染色 (ALP 阳性, 黑色) 的结果, B. 大鼠 BMSCs 在不同形状和面积的微模式基底上向成骨细胞分化的比例

Fig.4 A. ALP staining (ALP-positive, black) of osteo-induced rat BMSCs on micro-patterned substrate in different shapes and areas; B. Percentage of osteoblastic differentiation of rat BMSCs on micro-patterned substrate in different shapes and areas

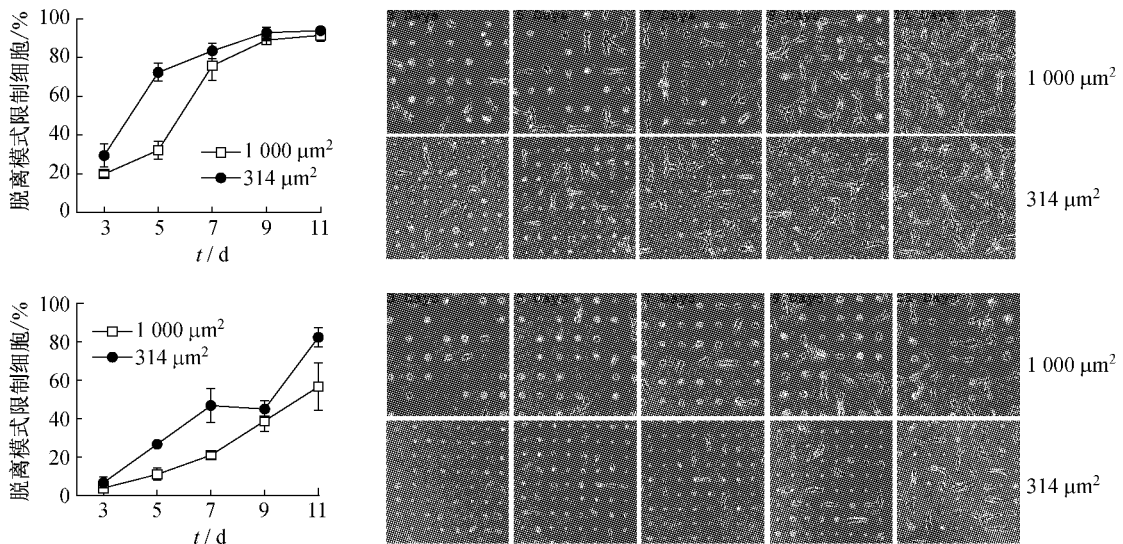


图5 不同大小的圆形模式内 BMSCs 随时间的迁移情况 (A. 使用普通培养液; B. 使用成骨细胞诱导液)

Fig. The migration course of BMSCs constrained by circle patterns of different size (A. Cells cultured with normal medium; B. Cells cultured with osteoblast inducing medium)

分的实验组, 细胞迁移、增殖能力均有所下降。完全诱导组迁移、增殖能力最低, 添加部分诱导成分的实验组刚好位于对照组和完全诱导组之间。单独加入地塞米松的实验组数据与完全诱导组最为接近 (见图6)。上述结果表明, 对照组和诱导组之间细胞迁移增殖能力的差别主要与地塞米松的作用有关。

3 讨论

干细胞的迁移、分化和增殖过程, 是机体发育以及组织修复的基本过程, 迄今为止尚未充分了解其

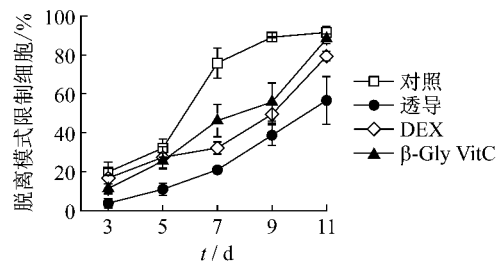


图6 成骨细胞诱导液的不同组分对 BMSCs 迁移过程的影响

Fig.6 Effects of different components in osteoblast inducing medium on migration course of BMSCs

内在调控机制。利用微模式化技术研究这一问题是一个很有用的实验手段。本文通过研究微模式化基底对大鼠 BMMSCs 增殖、迁移以及向成骨细胞分化过程的影响,发现除生化因素之外细胞铺展的几何形状和面积亦是上述过程中的重要调节因子。

BMMSCs 在条带模式中的铺展行为显示了细胞的铺展状态对细胞增殖过程的影响。实验中发现,在一定铺展宽度范围内,BMMSCs 可以通过调节铺展长度维持一定的铺展面积,以适应宽度方向的限制。如果认为单细胞的平均铺展面积是一定的,那么在 10 和 20 μm 宽的条带中,因为细胞铺展面积的增加速度没有明显差别(见图 2E),表明细胞增殖速度没有明显差别。但细胞铺展宽度被限制在 5 μm 时,虽然细胞仍可以数倍延长,但铺展面积的增加速度减缓表明细胞增殖减缓。这也许说明大鼠骨髓 MSCs 的铺展宽度存在一个阈值范围,当铺展宽度过窄时就会使细胞增殖受到抑制。已有研究以微模式化基底限定人和牛的血管内皮细胞的铺展面积,发现细胞铺展面积减小会抑制 DNA 的合成并诱导细胞凋亡^[2]。而条带模式只限制了细胞铺展宽度,细胞通过延伸铺展长度仍能维持一定的铺展面积。宽度减小到一定程度后将会影响增殖,一种可能性是细胞铺展宽度过于狭窄时,细胞器的位置、形状也受到影响(如 5 μm 的铺展宽度和细胞核的直径已经处在同一量级)。实验中观察到 5 μm 条带内细胞核处呈水滴状隆起,可能与此有关。此外,BMMSCs 在 5 μm 条带中异常的铺展长度显示其有很强的可塑性。

BMMSCs 的可塑性尤其表现在铺展形状对其分化的影响。由于圆形更接近于成骨细胞的铺展形状(多边形),当细胞被限制在这一形状内,向成骨细胞的分化就得以进行;而狭长的椭圆形接近于 MSCs 未分化时的铺展形状,当细胞被限制在这一形状内,向成骨细胞的分化就受到了抑制。在进行模式化培养时,细胞是随机落在模式内的,而原代提取的 BMMSCs 一般混有一定数量的杂细胞,实验中很难鉴别或分离模式内的杂细胞,因而对单细胞分化状态进行统计可能因杂细胞的存在带来误差。BMMSCs 在贴壁生长时具有一定的竞争优势,经多次传代后可以得到一定的纯化^[11],但是 MSCs 的分化能力却是随体外传代次数增多而降低的,实验中

选用了第 1 和第 4 代的细胞。前者 MSCs 的分化能力强,后者 MSCs 的纯度相对较高,期望对 2 代细胞的实验结果进行比较。从结果来看,虽然第 1 代细胞的分化程度的确高于第 4 代,但对于形状控制与铺展面积的影响均表现出相同趋势的实验结果。在 314 μm^2 的模式内,由于细胞铺展面积严重受限,BMMSCs 向成骨细胞方向的分化都受到了抑制(见图 4)。这与人 BMMSCs 在模式化基底上的分化时所发现限制细胞的铺展面积会抑制其向成骨细胞分化^[12]的结果一致。而在同样的铺展面积上,BMMSCs 向成骨细胞的分化直接受控于铺展的几何形状则是本文的新结论。

BMMSCs 在微模式化基底上的迁移行为,为研究干细胞的迁移过程提供了有益的线索。MSCs 在铺展面积受到严重限制时有更强的迁移趋势,这与细胞的增殖需要维持一定的铺展面积有关,当铺展面积受限时,MSCs 表现出极强的主动寻求铺展空间的能力。实验结果显示 MSCs 在向成骨细胞分化时迁移活跃程度下降,表明两者存在关联,但尚不能断定分化是细胞迁移能力降低的直接原因。对于多种细胞,分化与增殖存在互斥的关系^[13],因而 MSCs 分化时迁移活跃程度相对降低也可能是由于细胞的诱导分化抑制了增殖所导致的。

在成骨细胞诱导液的成分中,地塞米松对 MSCs 迁移活跃程度趋缓起主要影响(见图 6)。这可能与地塞米松能够影响多种细胞的骨架系统、促进内皮细胞微丝的组装等功能相关^[8,9]。MSCs 在向成骨细胞分化过程中形态的改变与细胞骨架的重构密切相关。贴壁细胞通过在基底上沉积胞外基质(ECM)并与细胞骨架连接而实现铺展。研究发现,在抑制蛋白吸附能力退化的模式基底上,微模式图案初期虽然仍能限制细胞铺展,但随着时间增长,细胞开始逐渐向模式外迁移和增殖,细胞迁移的速度可能反映了胞外基质合成和沉积的速率。根据张力驱动组织重建模型^[14],局部胞外基质厚度决定了该处基质顺应性,进而影响相邻细胞的伸展或细胞骨架张力。而细胞分裂的同时也伴随着新基底膜的生成。因此,细胞的增殖、分化和细胞形态的变化,以及由此产生的与胞外基质间相互作用的变化必然存在密切的耦合机制。本文所发现的现象可能反映出地塞米松在 BMMSCs 向成骨细胞分化过程中对细胞

骨架以及合成胞外基质能力的影响。

中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所马宏伟研究员在微模式化基底制作技术上提供的真诚帮助,以及中国科学院力学研究所微重力室陈娟高级实验师等人给予的技术协助,在此一并感谢!

参考文献:

- [1] Mooney D, Hansen L, Vacanti J, et al. Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix [J]. *J Cell Physiol*, 1992, 151: 497-505.
- [2] Chen CS, Milan M, Huang S, et al. Geometric control of cell life and death [J]. *Sci*, 1997, 276: 1425-1428.
- [3] Adam JE, Shamik S, Sweeney HL, et al. Discher matrix elasticity directs stem cell lineage specification [J]. *Cell*, 2006, 126: 677-689.
- [4] Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, et al. Microfabrication of hepatocyte/fibroblast co-culture: role of homotypic cell interactions [J]. *Biotechnol. Prog*, 1998, 14: 378-387.
- [5] Hanein D, Geiger B, Addadi L. Cell adhesion to crystal surfaces: A model for initial stages in the attachment of cells to solid substrates [J]. *Cell Mater*, 1995, 5: 197-210.
- [6] Raghavan S, Chen CS. Micropatterned environments in cell biology [J]. *Adv Mater*, 2004, 16: 1303-1313.
- [7] Nath N, Hyun J, Ma H, et al. Surface engineering strategies for control of protein and cell interactions [J]. *Surf Sci*, 2004, 570: 98-110.
- [8] Zhang Z, Ma H, Hausner DB, et al. Pretreatment of amphiphilic comb polymer surfaces dramatically affects protein adsorption [J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 3388-3396.
- [9] 曹娟, 张德秀. 低剂量微丝解聚剂对地塞米松诱导的牛小梁细胞骨架及基质蛋白 TSP-1 的影响 [J]. *眼科研究*, 2007, 25(7): 502-505.
- [10] Koukouritaki SB, Margioris AN, Gravanis A, et al. Dexamethasone induces rapid actin assembly in human endometrial cells without affecting its synthesis [J]. *J Cell Biochem*, 1997, 65: 492-500.
- [11] Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics [J]. *Stem Cell Dev*, 2005, 13: 436-448.
- [12] McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, et al. Cell Shape, cytoskeletal tension, and rhoA regulate stem cell lineage commitment [J]. *Develop Cell*, 2004, 6: 483-495.
- [13] Olson EN. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage [J]. *Dev Biol*, 1992, 154: 261-72.
- [14] Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell growth control [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(5): E131-138.