

文章编号:1004-7220(2018)05-0471-06

中枢神经发育中的力学-生物学响应与网络形成

赵飞^{1,2}, 陈旭义², 张西正³

(1. 锦州医科大学 研究生院, 辽宁 锦州 121000; 2. 武警后勤学院附属医院 脑科中心, 武警部队脑创伤与神经疾病研究所, 天津市神经创伤修复重点实验室, 天津 300162; 3. 军事医学科学院 卫生装备研究所, 天津 300162)

摘要:中枢神经发育与成熟过程中,生物力学因素长期以来并未受高度重视。近年来大量研究显示,力学环境等物理因素对神经细胞定向迁移、分化和成熟以及细胞间相互作用具有重要的影响作用。力学因素对脑和脊髓结构和功能的实现具有举足轻重的作用。简要回顾中枢神经发育过程中,神经细胞感受、寻路、调控以及网络塑形中的生物力学作用,并扼要介绍静态和动态力学对神经细胞力学-生物学反应,为未来重建修复中枢神经提供思路。

关键词:神经细胞; 中枢神经系统; 细胞相互作用; 力学-生物学反应; 生物力学

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2018.05.015

Mechanobiological Response and Network Formation in Central Nervous Development

ZHAO Fei^{1,2}, CHEN Xuyi², ZHANG Xizheng³

(1. Graduate School, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Neurotrauma Repair, Institute of Traumatic Brain Injury and Neuroscience, Center for Neurology and Neurosurgery, Affiliated Hospital of the Logistics University of the Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China; 3. Institute of Medical Equipment, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300162, China)

Abstract: In the process of central nervous system (CNS) development and maturation, the biomechanical factors have not been highly valued for a long time. In recent years, a large number of studies have shown that mechanical environment strongly affects the migration, differentiation and maturation of nerve cells, as well as the cell-cell interactions. Mechanical factors play an important role in realization of the structure and function of the brain and spinal cord. This review briefly summarized the role of biomechanics in CNS perception, path-finding, regulation and network shaping during CNS development. The effects of static and dynamic mechanics on mechanobiological response of nerve cells were also introduced, hoping to provide some ideas for CNS reconstruction and repair in future.

Key words: nerve cell; central nervous system (CNS); cell-cell interaction; mechanobiological response; biomechanics

收稿日期:2017-11-20; 修回日期:2018-02-27

基金项目:国家科技重点研发计划(2016YFC1101500),国家自然科学基金项目(11672332),天津市科技支撑计划重点项目(17YFZCSY00620, 15JCYBJC28600)

通信作者:陈旭义,副主任医师,副教授, E-mail:chenxuyi1979@sina.com.cn

早在1960年代,冯元桢教授就曾指出:生物体的结构和功能决定其力学特性,力学特性反过来调节生物体的结构和功能,使其发生适应性改变。近年来,随着微观力学观测方法的发展,固体生物力学、流体生物力学、运动生物力学等均取得了不错的进展,包括骨^[1]、血管^[2]、纤维结缔组织^[3]在内的大部分组织的力学性质得到了更加深入的探索。而相对于骨或其他组织,作为半固态存在的中枢神经生长发育力学作用一直处于认识的边缘。随着近年研究的深入,脑和脊髓的生物力学研究才逐渐被人所认知。其作用大致分为4个阶段——分化、寻路、调控和塑形。最初,神经干细胞的分化受力学环境的影响,向不同类型神经细胞分化;随后,神经细胞发出神经突,其尖端的生长锥主动地产生牵引力以感测其周围环境的力学性质,轴突通过收集并整合环境的力学信号来完成精准的寻路;在与目标细胞建立连接后,相互连接的轴突上的张力调控突触与囊泡的功能,促进其发育成熟;适当的细胞间生物力学作用调节神经细胞的形态,维持塑造神经网络的稳定。因此,中枢神经中力学的影响贯穿始终。

另外,不只是静态的力学环境,动态的力学作用更有可能对神经系统的发生发展产生显著的影响^[4]。在脊椎生物的自然发育中,随着体型的增大,脊椎也发生了伸长,在蓝鲸中其伸长的最快速率甚至达到了3 cm/d,长颈鹿的颈椎也达到了2 cm/d^[5],可以推测其中的脊髓随着脊柱的生长而经历了快速伸长的过程。然而,轴突在建立连接后驱动其继续伸长的化学因素就已经消失。因此,脊髓中互相连接的轴突可能以一种持续的动态牵拉的形式发生伸长。越来越多的证据表明神经细胞力-生物学反应的重要性^[6],提示结合细胞和生物材料之间的力学相互作用将有助于神经组织工程策略的制定,进而探索促进神经损伤修复新的思路。

由此可见,探索力学因素对神经细胞的影响对于了解神经系统的发生发展以及精确设计促进神经损伤修复再生至关重要。本文参考神经生物力学与组织工程学近20年来的研究,重点描述该领域研究现状与存在的相关问题。

1 神经发育期间的力学因素

1.1 神经干细胞分化中的力学因素

神经系统发育的第一个事件是神经干细胞的分化。体外研究发现,当间充质干细胞在弹性基板上培养时,较柔软的基底会促进干细胞向神经元分化^[7]。相比于神经元,胶质细胞的分化程度随着基底刚度的增加而增加。体外研究同时观察到神经元与胶质细胞的生长情况也依赖于基板的弹性模量。神经元通常在软底物上更好生长,而负责为神经元提供髓鞘的少突胶质细胞倾向于在更硬的底物上生长^[8]。神经元和神经胶质细胞相反的力学性质和偏好可能会吸引它们彼此,这一发现可以用来解释为什么混合培养时神经元通常在神经胶质细胞上层生长,进而可以推断髓鞘形成期间神经元与胶质细胞可能发生了力学相互作用。

1.2 神经突寻路和生长中的力学因素

神经突的寻路有赖于生长锥。生长锥是神经突尖端的圆锥形结构,常呈现为波状运动的扇形膜状物,或者丝状的伪足,生长锥通过延伸和缩回膜上的突起来不断地感测周围的力学环境,通过对力学信息进行收集和整合来引导轴突的生长,其相关机制在轴突和树突中非常相似。肌动蛋白在生长锥前缘不断聚合,同时由肌球蛋白II向后牵拉,产生F-肌动蛋白逆流。聚合速率和逆流速率调控生长锥的行为如下:如果聚合速率超过逆流,则生长锥延伸;如果聚合和逆流的速率平衡,则生长锥保持静止^[9]。而结合基底的跨膜蛋白(如整联蛋白、钙黏着蛋白)通过分子离合器将F-肌动蛋白连接到基底上,构成“底物-细胞骨架耦合”模型^[10]。根据该模型,如果基底刚度适宜,黏附受体与细胞外基质之间就会形成一个摩擦滑移界面,其传递机械力并减慢F-肌动蛋白的逆流速率,其结果使肌动蛋白在生长锥前缘的聚合速率超过逆流速率,生长锥向前延伸^[11]。生长锥通过这种耦合机制将机械力传递到细胞外,由此移动并测试其周围的机械环境。所有神经细胞在基底上表现出的类似的收缩力是其机械感知现象的重要基础——细胞能够主动地探测并响应其遇到的刚度。然而,目前鲜有关于神经元生长锥体中牵引力空间分布和动态的报道。另外,生长锥产生的牵引力和细胞机械敏感性之间

的具体关系尚不清楚,其指导神经突生长的具体机制也有待探索。

生长锥产生的牵引力与神经突的生长之间的关系似乎并不简单。由于肌球蛋白在底物-细胞骨架偶联模型中起到分子马达的作用,故在使用非肌肉的肌球蛋白 II ATP 酶活性抑制剂 blebbistatin 抑制肌球蛋白 II 后,发现生长锥施加基质上牵引力的显著减少^[12]。但是肌球蛋白 II 的抑制反而增加了轴突伸长率和前缘突出率^[13]。目前认为,肌球蛋白 II 可能有两种功能:① 通过控制黏着斑的组装和拆解来促进细胞黏附和力产生,② 调节微管和逆行肌动蛋白流的相互作用。抑制肌球蛋白 II 会同时影响这两个过程,黏着斑的减少会减弱生长锥与底物的耦合,导致牵引力的显著减少。逆行肌动蛋白流动的减少会使微管不受控制的装配,最终神经突向前延伸。但是神经突成功的寻路必须通过对外界施加力以感测外界的机械环境。因此,当肌球蛋白 II 活性被抑制时,轴突的寻路功能几乎完全丧失^[14],表明轴突的寻路需要其正确的响应环境的机械线索,其中生长锥产生的牵引力是必要的。由于以上研究采用的机制和细胞模型并不统一,目前仍然缺乏一个一致的模型来解释肌球蛋白如何参与在不同基质上生长的不同类型神经元的轴突伸长。

1.3 神经细胞迁移中的力学因素

在大量的体外实验中,测量到神经细胞迁移方向的神经突具有很高的张力,同时观察到拖尾部的神经突非常薄^[15]。当剪断一部分高张力的神经突时,发现细胞体被拉向剩余高张力的轴突,进一步表明沿着神经突的张力驱动细胞的迁移,提示不同方向神经突之间张力的差异可能对神经细胞的迁移至关重要。Hanein 等^[16]提供了更为明确的证据,其在碳纳米管底物上培养蝗虫神经元以减少底物线索的影响,研究同一神经元 3 个方向神经突之间的张力平衡,提出神经元的迁移受到神经突上的张力控制,而不是完全由细胞和底物之间的相互作用决定。有研究进一步提出力学因素还会影响神经细胞的形态,包括神经元胞体的形状和神经突分支的几何形状^[17],可见力学对于神经系统的快速扩张与塑造形态有重要意义,深入了解其相关机制可能有助于修复损伤的神经系统。

1.4 神经网络形成中的力学因素

力学在神经元形态的各个方面发挥作用,进而影响单个神经元的功能。然而,最近的研究发现,力学因素还会影响神经系统功能发育的关键过程,包括影响神经元的网络连接、突触的形成和维持等。传统理论认为,突触前末端的神经递质囊泡的积聚主要是由于突触后细胞的生化信号传导。最近的研究发现,张力有助于神经递质囊泡在神经肌肉接头处的突触前末端的聚集^[18],并调节局部和球囊囊泡动力学^[19]。而一旦神经元网络连接,机械张力的累积将导致涉及的神神经突的缩短,这可能使神经电路变得更加紧凑。最后,力学因素还可能参与中枢神经系统组织形态的二次修改。研究发现,成熟哺乳动物脑白质中存在持续的拉伸应力使得灰质受到压迫,这一发现可能与中枢神经系统的发育机制有关,例如脑皮质的折叠以及脊髓细胞分布和轴突取向的调整^[20]。

2 环境的力学性质对神经细胞的影响

神经细胞对环境的力学敏感性取决于其生长锥产生的牵引力,其由整联蛋白建立细胞与基质的黏附并由肌动蛋白向后拉动所产生。神经细胞对于环境力学性质的这种依赖性可能有助于设计新的生物材料。环境的力学性质主要包括刚度和几何特征两个方面。

2.1 环境刚度对神经细胞的力学影响

2.1.1 不同类型神经细胞对刚度的敏感性 许多神经细胞类型具有机械敏感性,可以对环境刚度做出适应性改变,包括形态、蛋白质表达和生物功能。大量的研究表明,神经元更倾向于在柔软的基底上生长,并且发出更长的神经突^[21]。研究发现,高刚度的表面抑制海马神经元的神经突延伸和神经细胞的分化,而且脊髓神经元黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 的表达与其培养基底的刚度成负相关^[22],进一步支持了这一假设。而相同的较软顺应性的基底抑制星形胶质细胞的生长,其 F-肌动蛋白也散乱地排列,但是星形胶质细胞在高刚度的基底上能够更好地黏附扩散^[23]。另外,尽管常用 PC12 细胞模拟原代神经元的行为,但实验观察到更柔软或更硬的环境似乎不影响其神经突的生长和分支,故认为 PC12 细胞对其基底刚度的敏感性比

原代神经元要差^[24]。这些研究表明,神经系统中不同类型的神经细胞的机械敏感程度不同,其他因素可能影响神经元对其机械环境的响应。本文认为,其中主要是由于不同种类神经细胞的细胞骨架(提供细胞大部分的机械响应能力)的结构有所差异。

2.1.2 不同种类神经元对环境刚度的敏感性 然而机械敏感性的差异不局限于神经元和胶质细胞之间。Koch等^[25]系统地比较了来自外周神经系统(背根神经节)和中枢神经系统(海马神经元)的神经元对底物刚度的依赖性生长以及产生的牵引力,观察到背根神经节的神经元在弹性模量为1 kPa基底上有最大的生长,而海马神经元的生长似乎不依赖底物刚度。此外,还有研究显示,力学对皮质神经元的生长发育几乎没有作用^[26]。对CNS和PNS的神经元在软底物上生长的观察研究显示,相比于背根神经节神经元,海马神经元生长锥体中黏着斑的密度很低,且逆行肌动蛋白流速度约是背根神经节神经元的3倍^[25]。根据摩擦离合器假说,逆行肌动蛋白流动与牵引力之间呈负相关,较弱的黏附时肌动蛋白流动较快(脱离离合器),而强烈的黏连导致逆流速率显著降低。背根神经节神经元的生长锥能够更强烈地耦合到细胞外基质上,提示黏附强度差异会导致产生牵引力的显著差异。而细胞通过对环境施加牵引力来感测其刚度,故细胞可以响应的刚度范围由其产生和调节机械力的能力决定。背根神经节神经元产生大而稳定的牵引力,因而对基板的刚度非常敏感,而海马神经元显示出弱而不稳定的牵引力,因而对环境刚度的敏感性很差。对此现象进一步的解释是,在周围神经中,轴突的寻路需要穿过由神经系统和相邻的组织结构建立的不同机械性质的环境,而在胚胎发育的初期,海马神经元在体内刚度最小的放射状胶质细胞(弹性模量约为500 Pa)上完成迁移^[27],皮质神经元也生存在非常软且机械性质均一的环境中。尽管不同机械环境影响神经突生长和寻路的机制在很大程度上仍然未知,但可以推测不同部位的神经元在适应环境刚度时产生的细胞骨架动力学也有所不同。周围神经的轴突可能需要高度的机械敏感性和刚度偏好,以便在复杂的机械环境中正确的寻路。

2.2 几何特征对神经细胞的力学影响

随着神经组织工程的快速发展,越来越多的研

究强调材料表面的几何特征对神经细胞的影响。相比光滑的表面,具有微观形貌特征的表面上的神经元更容易发出轴突^[28]。神经元以惊人的灵敏度感知基底形状变化并作出响应。最初发现微米尺寸(与轴突的尺寸相当)的形貌特征可以修饰轴突生长,轴突优先生长在脊边缘和较高的形貌上,而不是在凹陷处形成较为封闭的结构^[29]。随着纳米技术的进步,Baranes等^[31]研究发现,神经元甚至对10 nm的几何特征敏感^[30]。而近来光刻技术的发展使得制作更加复杂的结构成为可能,使用光刻技术在基底上制作成行排列的线条可以阻止轴突束间的交叉连接,在不使用化学诱导的条件下对轴突进行分类并分别编排。这提示通过精确调控基底的形貌特征,可能使其拥有亲和或排斥细胞的机械特性,从而精确的诱导神经元的迁移与分化。这是一个极具研究价值的新概念,一方面,其可能用于构建极为细微的神经-芯片接口,有助于解决脑机结合所面临的技术难题;另一方面,其可能诱导形成更为定向有序的神经网络结构,可能用于组织工程支架的改进。

神经细胞相应于微观形貌的机制仍有待探索。研究观察到突出的纳米形貌成为细胞的黏附位点,并且非侵入性的抑制神经元生长^[32],一种可能的解释是微观形貌特征使得神经元产生的牵引力具有不连续性。而不连续性的机械力影响轴突和生长锥的形态,这可能影响神经突的发出和伸长。另一方面,基底上突出的结构使黏着斑位置产生重新分布,而细胞的黏附位点变化可能影响肌动蛋白的流动,导致控制轴突伸长的细胞骨架的扭曲,进而影响神经细胞的运动模式。最近的研究发现,将肌动蛋白与底物相耦合的“分子离合器”可以感受到微米尺度的变形,进而调节肌动蛋白逆流,刺激生长锥延伸^[33]。但是大量研究指出,不同物种的神经元对基底微观形貌的敏感性有显著差异,同一物种的不同神经细胞类型其敏感性也有显著差异。其中,纳米形貌与细胞的相互作用机制是否通用仍未查明。进一步探索其相互作用的机制是今后工作的重点。

2.3 动态的力学因素对神经细胞的影响

已有研究猜测,随着动物的身体(主要是脊柱)生长,神经元细胞体和突触之间的距离缓慢增加,

从而对轴突施加拉伸力;而体外研究已证实机械拉伸神经和细胞可以显著改变其形态,甚至影响其功能。Fister 等^[34]使用生物反应器证明了这种生长机制。他们设计了一种专门的拉伸培养室,神经元在两个重叠的生物膜上进行培养,随后使用步进电机以逐渐增加的速率将膜拉开,从而对连接两个生物膜的轴突施加机械力。结果发现,轴突可以以 8 mm/d (330 $\mu\text{m}/\text{h}$) 的持续速率延长至 10 cm 长度。这比典型的生长锥介导的轴突生长速度快 10 倍,并且可以持续许多天。有趣的是,尽管轴突经历了快速拉伸,但是仍具有正常的内部超微结构,且直径趋于增加,其电生理功能也维持正常。

3 总结

近年来,技术的进步使得人们能够以不断增加的精确度测量并研究力学对神经系统的影响。本文总结了力学因素在神经发育中的作用。然而生物力学很可能与生物化学共同调节神经系统的生长发育,故需要更全面地探索生物力学与生物化学之间的相关性。且体外与体内神经细胞所处的机械环境也有着巨大的差异,体外培养表现出的力学性质仍然很难解释在体内复杂环境下发现的力学现象。未来的探索需要将体外和体内的研究相关联,这对现在的观测技术是一个巨大的挑战。

参考文献:

- [1] 张西正. 骨重建的力学生物学研究[J]. 医用生物力学, 2016, 31(4): 356-361.
 ZHANG XZ. The research on mechanobiology mechanism of bone remodeling [J]. J Med Biomech, 2016, 31(4): 356-361.
- [2] 任长辉, 刘肖, 康红艳, 等. 剪切力条件下血管内皮细胞与平滑肌细胞的相互作用[J]. 医用生物力学, 2015, 30(2): 185-191.
 REN CH, LIU X, KANG HY, et al. Interactions between vascular endothelial cells and smooth muscle cells under shear stress [J]. J Med Biomech, 2015, 30(2): 185-191.
- [3] 宋关斌, 杨力. 组织损伤修复中的生物力学问题[J]. 医用生物力学, 2016, 31(5): 376-378.
 SONG GB, YANG L. Biomechanics in tissue injury and repair [J]. J Med Biomech, 2016, 31(5): 376-378.
- [4] CHEN HI, WOLF JA, SMITH DH. Multichannel activity propagation across an engineered axon network [J]. J Neural Eng, 2017, 14(2): 026016.
- [5] SUTER DM, MILLER KE. The emerging role of forces in axonal elongation [J]. Prog Neurobiol, 2011, 94(2): 91-101.
- [6] ATHAMNEH AIM, SUTER DM. Quantifying mechanical force in axonal growth and guidance [J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 359-367.
- [7] YUAN J, SAHNI G, TOH YC. Stencil micropatterning for spatial control of human pluripotent stem cell fate heterogeneity [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1516: 171-181.
- [8] FRANZE K. The mechanical control of nervous system development [J]. Development, 2013, 140(15): 227-251.
- [9] BETZ T, MOORE D, LU YB, et al. Growth cones as soft and weak force generators [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(33): 13420-13425.
- [10] CHANGEDE R, XU X, MARGADANT F, et al. Nascent integrin adhesions form on all matrix rigidities after integrin activation [J]. Dev Cell, 2015, 35(5): 614-621
- [11] NICHOL RH, HAGEN KM, LUMBARD D C, et al. Guidance of axons by local coupling of retrograde flow to point contact adhesions [J]. J Neurosci, 2016, 36(7): 2267-2282.
- [12] PASAPERA AM, SCHNEIDER IC, RERICHA E, et al. Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation [J]. J Cell Biol, 2010, 188(6): 877-890.
- [13] KOLLINS KM, HU J, BRIDGMAN PC, et al. Myosin-II negatively regulates minor process extension and the temporal development of neuronal polarity [J]. Dev Neurobiol, 2009, 69(5): 279-298.
- [14] BROWN JA, WYSOLMERSKI RB, BRIDGMAN PC. Dorsal root ganglion neurons react to semaphorin 3a application through a biphasic response that requires multiple myosin ii isoforms [J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(4): 1167-1179.
- [15] MARIN O, VALDEOLMILLOS M, MOYA F. Neurons in motion: Same principles for different shapes? [J]. Trends Neurosci, 2006, 29(12): 655-661.
- [16] HANEIN Y, TADMOR O, ANAVA S, et al. Neuronal soma migration is determined by neurite tension [J]. Neuroscience, 2011, 172(172): 572-579.
- [17] SHEFI O, HAREL A, CHKLOYSKII DB, et al. Biophysical constraints on neuronal branching [J]. Neurocomputing, 2004, 65(3): 487-495.
- [18] SIECHEN S, YANG S, CHIBA A, et al. Mechanical tension contributes to clustering of neurotransmitter vesicles at presynaptic terminals [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 106(31): 12611-12616.
- [19] AHMED WW, LI TC, RUBAKHIN SS, et al. Mechanical tension modulates local and global vesicle dynamics in

- neurons [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2012, 5(2): 155-164.
- [20] KOSER DE, MOEENDARBARY E, HANNE J, *et al.* CNS cell distribution and axon orientation determine local spinal cord mechanical properties [J]. *Biophys J*, 2015, 108(9): 2137-2147.
- [21] HOSHIBA T, TANAKA M. Integrin-independent cell adhesion substrates: Possibility of applications for mechanobiology research [J]. *Anal Chem*, 2016, 32(11): 1151-1157.
- [22] JIANG FX, YURKE B, FIRESTEIN BL, *et al.* Neurite outgrowth on a DNA crosslinked hydrogel with tunable stiffnesses [J]. *Ann Biomed Eng*, 2008, 36(9): 1565-1579.
- [23] MOSHAYEDI P, COSTA LF, CHRIST A, *et al.* Mechano-sensitivity of astrocytes on optimized polyacrylamide gels analyzed by quantitative morphometry [J]. *J Phys Condens Matter*, 2010, 22(19): 194114.
- [24] LEACH JB, XIN QB, JACOT JG, *et al.* Neurite outgrowth and branching of PC12 cells on very soft substrates sharply decreases below a threshold of substrate rigidity [J]. *J Neural Eng*, 2007, 4(2): 26-34.
- [25] KOCH D, ROSOFF W, JIANG J, *et al.* Strength in the periphery: Growth cone biomechanics and substrate rigidity response in peripheral and central nervous system neurons [J]. *Biophys J*, 2012, 102(3): 452-460.
- [26] NORMAN LL, ARANDA-ESPINOZA H. Cortical neuron outgrowth is insensitive to substrate stiffness [J]. *Cell Mole Bioeng*, 2010, 3(4): 398-414.
- [27] FRANZE K, GUCK J. The biophysics of neuronal growth [J]. *Rep Prog Phys*, 2010, 73(9): 094601.
- [28] TOMA M, BELU A, MAYER D, *et al.* Flexible gold nanone array surfaces as a tool for regulating neuronal behavior [J]. *Small*, 2017, 13(24), doi: 10.1002/smll.201700629.
- [29] KLYMOV A, RODRIGUES NEYES CT, RIET J, *et al.* Nanogrooved surface-patterns induce cellular organization and axonal outgrowth in neuron-like PC12-cells [J]. *Hear Res*, 2015, 320: 11-17.
- [30] BARANES K, CHEJANOYSKY N, ALON N, *et al.* Topographic cues of nano-scale height direct neuronal growth pattern [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(7): 1791-1797.
- [31] CAI H, WOLFENSON H, DEPOIL D, *et al.* Molecular occupancy of nanodot arrays [J]. *Acs Nano*, 2016, 10(4): 4173-4183
- [32] XIE C, HANSON L, XIE W, *et al.* Noninvasive neuron pinning with nanopillar arrays [J]. *Nano Lett*, 2010, 10(10): 4020-4024.
- [33] ATHAMNEH AI, CARTAGENA-RIVERA AX, RAMAN A, *et al.* Substrate deformation predicts neuronal growth cone advance [J]. *Biophys J*, 2015, 109(7): 1358-1371.
- [34] PFISTER BJ, BONISLAWSKI DP, SMITH DH, *et al.* Stretch-grown axons retain the ability to transmit active electrical signals [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(14): 3525-3531.