

文章编号:1004-7220(2019)06-0668-05

微环境通过细胞骨架张力对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

徐弘远^a, 张鹏^{a,b}, 江凌勇^a

(上海交通大学医学院附属第九人民医院 a.口腔医学院 口腔颌面外科,国家口腔疾病临床研究中心,上海市口腔医学重点实验室,上海市口腔医学研究所; b. 口腔第二门诊部,上海 200011)

摘要:细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是微环境中为细胞提供力学线索的主要元件。干细胞对基质力学信号改变的响应主要通过细胞骨架实现。细胞外基质性能改变后,力学信号经信号复合体传递,细胞骨架作为贯穿细胞整体的网状支架结构,在分子马达的作用下纤维重组产生张力,该力学信号可以转导为化学信号或直接传递至细胞核骨架,产生一系列对干细胞干性、增殖、分化以及凋亡的影响。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)对于骨改建和治疗具有重要的意义。总结微环境改变后细胞骨架张力在 BMSCs 成骨分化过程中的影响及力信号响应机制。

关键词:微环境; 细胞骨架张力; 骨髓间充质干细胞; 力传导

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2019.06.016

Effects of Microenvironment on Osteogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Through Cytoskeleton Tension

XU hongyuan^a, Zhang Peng^{a,b}, JIANG linyong^a

(*a. College of Stomatology, National Clinical Research Center for Oral Diseases, Shanghai Key Laboratory of Stomatology & Shanghai Research Institute of Stomatology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology; b. Second Dental Center, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China*)

Abstract: Extracellular matrix is the main element to provide mechanical clues for cells. The response of stem cells to mechanical signals is mainly achieved through the cytoskeleton. After mechanical signal is transmitted, cytoskeleton can form contractile microfilaments that actively generate tension through reorganization induced by microenvironment changes. The mechanical signals can regulate gene expression through either coupling with the nuclear skeleton directly or being transformed by the second message. Recent studies have proven that cytoskeleton tension has a series of impact on lineage specification, proliferation, differentiation and apoptosis of bone mesenchymal stem cells (BMSCs). BMSCs are of great significance in bone reconstruction and clinical treatment. The possible mechanisms about mechanotransduction and its effects of cytoskeleton tension on osteogenesis of BMSCs after micro-environmental changes were summarized.

Key words: microenvironment; cytoskeleton tension; bone mesenchymal stem cells (BMSCs); mechanotransduction

收稿日期:2018-07-11; 修回日期:2018-08-27

基金项目:国家自然科学基金项目(81371121, 81570950), SMC-晨星青年学者奖励计划优秀青年教师(B类计划), 上海高校高峰高原学科建设项目

通信作者:江凌勇, 副教授, E-mail: jly117@sina.com

机体内所有组织器官均受到组织微环境所产生的力学刺激作用,而干细胞作为一类未充分分化,具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的特殊细胞群体展现出更为独特的力学性质。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是来源于单胚层的多能干细胞,可以在特定微环境条件下分化为成骨细胞、脂肪细胞等,对于骨组织的改建修复有重要作用。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是微环境中包绕细胞的固态结构,为细胞提供物理支持,能够在与细胞的相互作用中动态地提供机械线索,促进其迁移、分化、凋亡等等生物学行为。在整个复杂的信号传导过程中,细胞骨架通过纤维重组产生张力是其中起决定因素的主动响应过程。本文总结了细胞骨架张力的产生、相关结构基础以及在微环境改变过程中的作用,为进一步掌握干细胞在不同微环境下的分化调控提供参考。

1 细胞骨架张力

1.1 细胞骨架组成

细胞骨架由微管、微丝以及中间纤维组成。微管是中空圆柱状具有极性的细胞器,由微管蛋白及微管结合蛋白组成。微丝是由肌动蛋白的亚单位聚合形成螺旋状的应力纤维,在细胞内形成不稳定的束或复杂的网。肌动蛋白微丝在细胞内功能不一致,主要原因在于细胞质中存在许多种类的肌动蛋白结合蛋白。中间纤维在细胞核膜下形成一层坚固的核纤层,连接核膜、质膜以及其他细胞骨架。

1.2 细胞骨架张力模型

根据 Ingber 等^[1]提出的张力整合模式,Shafirir 等^[2]模拟了细胞内模型。细胞骨架的网状结构抽象化成一系列硬质管道和弹性丝状物。其中,硬质管道互不相接触,仅由弹性丝状物固定于空间内;弹性丝状物互相交联,不同的弹性丝状物连接硬质管道两端,使其时刻处于受压状态;硬质管道同时使得弹性丝状物处于拉伸状态,以此来维持力的平衡与稳定。该模式产生于细胞内部,使其网络中的结构时刻处于张力环境中,故称为原张力。原张力主要由肌动蛋白的收缩产生,还可以由细胞黏附至细胞外基质或其他细胞而产生。即细胞内部成份可以在非肌肉型肌球蛋白 II (non-muscle myosin II)

等分子马达作用下将三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)化学势能转化为机械势能,以此来响应微环境的改变。这个结构使得整个细胞成为一个整体,当细胞受到力的作用时,整个结构中的元件均可以传递力,在某一个局部施加力可以导致整体结构上的反应,故肌动蛋白细胞骨架的重组可以直接在大范围内响应微环境的改变^[3]。

2 细胞骨架张力通过黏着斑感受微环境的改变

黏着斑(focal adhesion, FA)在细胞表面通过整合素与细胞外基质相连,在细胞内部与细胞骨架相连,是细胞与周围基质的接触点。研究者起初观察到 FAs 的大小随着基质的硬度增加而增加,人们认为是局部黏着斑首先响应微环境改变。但随着研究的深入,发现其潜在机制涉及 FA 内部某些蛋白质力依赖性构象的改变^[11]。并且 Oakes 等^[4]研究表明,虽然 FA 生长需要力,但其本身无法提供足够力,来自细胞骨架的张力是 FA 生长和成熟所必需的。Plotnikov 等^[5]基于牵引力的研究显示,每个 FA 可以通过在基板上施加“牵引”力来充当局部基板刚度传感器,他们观察到牵引力可能在单个 FA 内波动。局部波动力的起源仍不确切,但目前研究归因于肌动蛋白收缩本身的波动,或肌动蛋白丝与 FA 蛋白之间瞬时的力依赖性相互作用,也称为“离合器”模型^[6],故认为在微环境改变过程中,细胞骨架通过黏着斑感受微环境改变并进一步做出响应。

3 微环境通过改变细胞骨架张力影响间充质干细胞的分化

3.1 基质拓扑结构改变

拓扑学是研究形态的有关学科,主要关注物体间的位置关系。天然生理组织具有特征性的微拓扑结构,其形状、结构与其承担的生理功能密切相关^[7]。Kilian 等^[8]研究发现,在相同面积下纵横比越高的矩形基质中培养的 BMSCs 骨向分化越明显,拥有锐利边缘的星形基质中培养的 BMSCs 表达更多的骨向分化。这一研究证明基质形状不同,培养出的细胞形状不同,细胞形状通过调节存在于细胞膜上的内源性小 G 蛋白亚族 RhoA 活性来调节干细胞分化命运,并且 RhoA 及其下游激酶 ROCK 传递

信号必须依赖肌动蛋白丝收缩所产生的细胞张力^[9]。Seo等^[10]研究发现,微环境通过RHO-ROCK-MLCK途径影响非肌肉II型肌球蛋白引起细胞骨架重组,而细胞骨架张力越大越能够通过黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)磷酸化招募黏着斑蛋白,促进黏附斑的成熟。

目前常用的拓扑结构多以纳米为单位,多种形状组合出现,包括凹陷的点状、突起的柱状等。Tsimbouri等^[11]在基质上排列同一深度、同一中心间距,但相互之间存在20 nm或50 nm位移的纳米颗粒,发现控制下的无序排列较有序排列更容易产生成骨分化。这种影响成骨分化最明显的纳米颗粒排列模式被称为DSQ50(disordered square arrays)。通过使用基因组方法,已经证明DSQ50纳米拓扑结构诱导的成骨分化,可以通过细胞骨架元件直接传递到细胞核,在已知存在大部分骨相关基因的区域中直接影响染色体空间排列。除此以外,纳米柱形状对间充质干细胞成骨分化也存在一定影响。Guvendik等^[12]研究发现,在正方形、三角形和线性纳米柱中,只有具有正方形纳米柱表面在不使用成骨诱导剂的情况下表现出Ca和P沉淀。

但Azeem等^[13]研究发现,体外实验中某特定深度的纳米凹槽能够促进成骨分化,但在体内实验中却未能观察到体内定向性骨生成。因此,他们认为2D印迹技术是体外细胞表型维持的有用工具,但体外效应是否可以转化为体内效应需要进一步研究。

3.2 基质硬度改变

Engler等^[14]通过探讨基底硬度在调控人间充质干细胞命运中的作用发现,不同基质硬度对细胞的分化影响不同。当细胞放入类似大脑组织的较软基质中培养时,细胞呈现出神经细胞的表型;当细胞生长于类似肌肉组织的较适中硬度基质中时,细胞表现出肌原性特性;而当细胞生长于类似骨胶原的较硬基质中时,细胞更趋向于成骨样的表型。关于基质硬度如何调节人间充质干细胞(human mesenchymal stem cells, hMSC)的分化, Mitrossilis等^[15]通过实时监测细胞对外基质硬度的反应时间,推测肌动蛋白细胞骨架可以在非肌肉II型肌球蛋白的作用下迅速对细胞外基质硬度的改变作出反应。Wolfenson等^[16]发现,将细胞种在小于直径1 μm微柱上时,基于肌动球蛋白的肌节收缩单位

(CU)以2.5 nm净步长移动相对的支柱。随着刚度的增加,肌节收缩单位激活α-辅肌动蛋白的所需步数减少,进而抑制细胞在软基质上的生长。Colombelli等^[17]研究证实,细胞骨架原本呈各向同性排列(即在不同方向上所测得的性能数值是相同的),基底刚性增加使得肌动蛋白丝分布开始呈一定方向性。随着肌动蛋白丝同向排列的增加,肌球蛋白分子马达将会在肌动蛋白凝胶内产生一个主动应力,软基质由于无法抵抗肌丝蛋白的滑动而应力消散,而较高刚性基质上细胞可以有更高的主动应力。

此外,Sheetz等^[18]研究发现,基质硬度改变还能够对肌动蛋白丝本身性质产生影响,并且认为该影响与细胞骨架张力产生的速度相关。细胞位于刚性基质表面时,骨架张力快速增加至一定水平,可能暴露连接蛋白复合物中磷酸化位点促进磷酸化进程;而软基质表面骨架张力缓慢上升至相同时,却使得肌动蛋白丝产生较大位移,阻止了磷酸化以及下游骨向分化的进程。

Yuan等^[19]利用不同的退火温度处理超细纤维,以生产相同成分组成的不同硬度基质,排除了改变基质硬度过程中材料化学对细胞的影响;结果发现,退火处理不改变纤维的直径,但增加了其聚合物结晶度和机械性能,之后较硬底物上的BMSC逐渐激活YAP并且上调YAP靶基因的转录物表达,促进成骨分化。

3.3 基质硬度与拓扑结构耦合的改变

Li等^[20]采用生物相容性较好的聚丙烯酰胺水凝胶制作弹性可调拓扑水凝胶基底,检测细胞的增殖和分化等行为。研究证实,在同样的基质硬度和尺度下,柱状相较于沟槽可以更好地促进骨向分化;在同样的形状和基质硬度下,尺度越大骨向分化越明显。多因素耦合的作用主要体现在对微丝和中间丝的调控上,其主要通过影响细胞骨架张力影响分化结果。

4 细胞骨架张力影响间充质干细胞成骨分化的可能机制

微环境的改变经力信号复合体传入胞内引起细胞骨架的重排,细胞骨架可以作为物理结构直接将力传递给核内细胞骨架,称为力信号传递机制。同时也可以改变与之偶联的离子通道通透性或相

胞内受体的活性,将力学信号转导为化学信号调节相关基因的表达,称为力信号转导机制。两种机制协同作用,共同完成力学信号的传递和转换。

4.1 力信号传递机制

微环境改变引起细胞骨架的重组,细胞骨架微丝可以通过细胞核膜 Nesprin 蛋白与核膜下方的核纤层蛋白 Lamins 相连,引起细胞核骨架变化,进而通过直接或间接方式影响染色质高级结构以及转录过程。Tajik 等^[21]研究发现,激活细胞骨架产生的内源性应力可以直接在活细菌内观察到染色质的拉伸,影响到二氢叶酸还原酶的转录上调,并且与染色质拉伸程度相当。

4.2 力信号转导机制

细胞骨架纤维重组使得与之偶联的离子通道通透性和部分力依赖性蛋白的活性改变,进而力信号传导分子可以进入细胞核,调控基因的表达。Ehrlicher 等^[22]研究发现,原本和细丝蛋白 a 结合的 FilGAP(GTP 酶激活蛋白)可以在细胞骨架张力的作用下脱落下来,后重新定位于质膜,下调 RAC 基因的表达。Dupont 等^[23]研究发现,YAP/TAZ 两个力学信号传感分子可以在细胞骨架张力的作用下移动到细胞核内改变基因表达。Wang 等^[24]研究表明,抑制细胞骨架张力可阻止 smad 蛋白 1C 端的磷酸化以及 smad1 与 smad4 二聚化等,进而阻止 Runx2 对 hMSC 的骨向分化作用。

5 总结与展望

随着有关微环境对干细胞结构和功能调控研究的不断深入,人近年来的研究重点逐渐趋向于更加微观的亚细胞力学^[25]。除细胞骨架外,细胞核、线粒体等细胞器力学性质不仅决定其本身的主动力学行为,也是细胞整体力学性质的重要组成部分。Swift 等^[26]研究发现,Lamin-A 蛋白可以维持细胞核的坚硬,阻止染色质的分解。硬基质可以阻止 Lamin-A 蛋白的磷酸化并提高其水平,进而通过调节 SRF 途径和改变 YAP1 的分布促进骨向分化。但亚细胞力学的研究难点在于如何建立更加微观的研究模型以及多种力学方法的选择,对于干细胞的力学响应还需要深入探索。相信未来通过对亚细胞层面的力学应答研究可以进一步解答细胞的力学-生物学-化学耦合关系。

综上所述,研究细胞骨架内应力有助于更好地理解微环境是如何直接或间接影响 BMSCs 分化,以确定细胞外基质、培养条件和生长因子的最佳组合,选择性调控实验室中的干细胞命运。

参考文献:

- [1] INGBER DE, WANG N, STAMENOVIC D. Tensegrity, cellular biophysics, and the mechanics of living systems [J]. *Rep Prog Phys*, 2014, 77(4) : 046603.
- [2] SHAFRIR Y, FORGACS G. Mechanotransduction through the cytoskeleton [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(3) : C479-486.
- [3] TRICHET L, DIGABEL J, HAWKINS RJ, *et al.* Evidence of a large-scale mechanosensing mechanism for cellular adaptation to substrate stiffness [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(18) : 6933-6938.
- [4] OAKES PW, BECKHAM Y, STRICKER J, *et al.* Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template [J]. *J Cell Biol*, 2012, 196(3) : 363-374.
- [5] PLOTNIKOV SV, PASAPERA AM, SABASS B, *et al.* Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration [J]. *Cell*, 2012, 151(7) : 1513-1527.
- [6] CASE LB, WATERMAN CM. Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(8) : 955-963.
- [7] 宫元卫, 孙树津, 吕东媛, 等. 基底微拓扑结构对细胞生物学行为的影响 [J]. *医用生物力学*, 2013, 28(1) : 115-120.
GONG YW, SUN SJ, LV DY, *et al.* Impacts of surface micro-topography on cellular biological responses [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(1) : 115-120.
- [8] KILIAN KA, BUGARIJA B, LAHN BT, *et al.* Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(11) : 4872-4877.
- [9] MCBEATH R, PIRONE DM, NELSON CM, *et al.* Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(4) : 483-495.
- [10] SEO CH, FURUKAWA K, MONTAGNE K, *et al.* The effect of substrate microtopography on focal adhesion maturation and actin organization via the RhoA/ROCK pathway [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(36) : 9568-9575.
- [11] TSIMBOURI PM, MURAWSKI K, HAMILTON G, *et al.* A genomics approach in determining nanotopographical effects on MSC phenotype [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(9) : 2177-2184.

- [12] GUVENDIK S, TRABZON L, RAMAZANOGLU M. The effect of Si nano-columns in 2-D and 3-D on cellular behaviour; Nanotopography-induced CaP deposition from differentiating mesenchymal stem cells [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2011, 11(10): 8896-8902.
- [13] AZEEM A, ENGLISH A, KUMAR P, *et al.* The influence of anisotropic nano- to micro-topography on *in vitro* and *in vivo* osteogenesis [J]. Nanomedicine, 2015, 10(5): 693-711.
- [14] ENGLER AJ, SEN S, SWEENEY HL, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification [J]. Cell, 2006, 126(4): 677-689.
- [15] MITROSSILIS D, FOUCHARD J, PEREIRA D, *et al.* Real-time single-cell response to stiffness [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(38): 16518-16523.
- [16] WOLFENSON H, MEACCI G, LIU S, *et al.* Tropomyosin controls sarcomere-like contractions for rigidity sensing and suppressing growth on soft matrices [J]. Nat Cell Biol, 2016, 18(1): 33-42.
- [17] GUPTA M, DOSS B, LIM CT, *et al.* Single cell rigidity sensing: A complex relationship between focal adhesion dynamics and large-scale actin cytoskeleton remodeling [J]. Cell Adh Migr, 2016, 10(5): 554-567.
- [18] JIANG G, HUANG AH, CAI Y, *et al.* Rigidity sensing at the leading edge through alphavbeta3 integrins and RPTPalpha [J]. Biophys J, 2006, 90(5): 1804-1809.
- [19] YUAN H, ZHOU Y, LEE MS, *et al.* A newly identified mechanism involved in regulation of human mesenchymal stem cells by fibrous substrate stiffness [J]. Acta Biomaterialia, 2016, 42: 247-257.
- [20] LI Z, GONG Y, SUN S, *et al.* Differential regulation of stiffness, topography, and dimension of substrates in rat mesenchymal stem cells [J]. Biomaterials, 2013, 34(31): 7616-7625.
- [21] TAJIK A, ZHANG Y, WEI F, *et al.* Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin [J]. Nat Mater, 2016, 15(12): 1287-1296.
- [22] EHRLICHER AJ, NAKAMURA F, HARTWIG JH, *et al.* Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A [J]. Nature, 2011, 478(7368): 260-263.
- [23] DUPONT S. Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction [J]. Exp Cell Res, 2016, 343(1): 42-53.
- [24] WANG YK, YU X, COHEN DM, *et al.* Bone morphogenetic protein-2-induced signaling and osteogenesis is regulated by cell shape, RhoA/ROCK, and cytoskeletal tension [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(7): 1176-1186.
- [25] 吕东媛, 周吕文, 龙勉. 干细胞的生物力学研究[J]. 力学进展, 2017, 47(1): 538-589.
- [26] SWIFT J, IVANOVSKA IL, BUXBOIM A, *et al.* Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation [J]. Science, 2013, 341(6149): 1240104.