



评述

机械力及力学信号转导影响干细胞命运的研究进展

雷晓华, 邓智利, 宁立娜, 曹宇静, 段恩奎*

中国科学院动物研究所, 生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101

* 联系人, E-mail: duane@ioz.ac.cn

收稿日期: 2013-11-27; 接受日期: 2014-03-31

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB710905)和中国科学院空间科学战略性先导科技专项(批准号: XDA04020202-20, XDA04020419)资助

doi: 10.1360/N052013-0080

摘要 干细胞作为一种未分化的祖细胞, 目前已被广泛应用于开展组织损伤修复、再生以及干细胞特异谱系分化的研究. 大量研究表明, 干细胞所处的微环境对调控干细胞的生长和分化具有重要作用, 多种溶液介质、细胞外基质和信号通路等参与了干细胞命运的调控. 尽管已有大量研究证明, 溶液介质(如激素和生长因子)在干细胞的生长和分化中发挥重要作用, 但近年来越来越多的研究表明, 机械力及力学信号转导同样在干细胞自我更新、分化、衰老和凋亡等细胞生理过程中起到重要的作用. 本文将对机械应力响应的细胞基础、生物力学及力学信号调控干细胞自我更新和分化, 以及生物力学调控干细胞命运可能的作用机制几个方面加以综述.

关键词机械力
力学信号转导
干细胞
自我更新
分化

干细胞被定义为一群具有自我更新和分化能力的祖细胞. 干细胞在一定条件下能够被诱导生成特定的组织和细胞, 因此, 它们被广泛用作组织工程研究和组织损伤修复的种子细胞^[1]. 随着近年来干细胞研究领域的快速发展, 人们对干细胞生物学的了解越来越深入, 特别是在干细胞命运的调控方面做了大量的研究. 由于此前人们在探讨干细胞自我更新、生长和分化的分子信号机制时大多关注于化学物质或溶液介质产生的生物化学信号^[2], 往往忽视了一些物理因素或生物机械信号的影响. 近年来, 许多研究表明, 细胞内外的力学微环境以及细胞机械力产生的机械信号对调控干细胞形态结构和功能发挥着重

要的作用^[3-5]. 研究表明, 生物机械力和力学信号影响干细胞的自我更新和分化^[6]. 本文对细胞外力学微环境, 生物力学及力学信号转导调控干细胞自我更新和分化, 以及生物机械力调控干细胞命运可能的作用机制等方面的研究进展加以综述.

1 细胞外微环境及细胞的生物力学

1.1 细胞外微环境对细胞命运的影响

细胞的聚集与细胞间的相互连接受到细胞外基质微环境的影响, 这些微环境多是由水合蛋白和多糖构成的化学可溶性信号和物理信号网络. 这些信

引用格式: 雷晓华, 邓智利, 宁立娜, 等. 机械力及力学信号转导影响干细胞命运的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 639-648

Lei X H, Deng Z L, Ning L N, et al. Roles of mechanical force and mechanotransduction in fate of stem cells. SCIENTIA SINICA Vitae, 2014, 44: 639-648, doi: 10.1360/N052013-0080

号分子与细胞表面的受体特异结合, 引起一系列复杂的胞内信号响应, 从而调控基因的表达, 促使细胞表型发生改变, 引发细胞增殖、存活、迁移以及分化等一系列生物学反应. 细胞表面黏附受体, 如整合素和黏连蛋白是一类重要的细胞表面受体, 其配体主要为细胞外基质蛋白(extra cellular matrix, ECM), 如胶原蛋白(collagen)、纤黏连蛋白(fibronectin)、层黏连蛋白(laminin)等. 整合素通过识别这些胞外基质蛋白, 介导细胞与细胞、细胞与 ECM 的黏附反应并接受转导级联信号后引起胞内信号响应, 一方面细胞在特定条件下启动维持自我更新程序, 另一方面细胞将面临分化, 老化和凋亡(图 1).

溶液介质及其激活的信号通路作为细胞外环境的重要调节因子已在多潜能干细胞方面进行了大量的研究. 前期研究表明, 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)可维持人胚胎干细胞长期的自我更新^[7]. Wnt (wingless)信号通路在调控干细胞的多能性以及启动早期造血细胞系统的分化具有重要功能^[8]. 此外转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β)亚家族成员如 TGF- β 、Activin、Nodal, 以及骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)在维持人胚胎干细胞自我更新中也发挥着关键的作用^[9]. 研究表明, TGF- β /Activin/Nodal 通过与成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)信号通路共同作用来调控人胚胎干细胞多潜能基因 *NANOG*(pron. nanOg)的表达, 从而维持干细胞的多潜能性, 倘若采用 Activin/Nodal 信号通路的抑制剂作用于干细胞, 将促使细胞向神经外胚层分化^[10]. 在鼠(*Mus musculus*)方面, 先前研究表明, BMP 信号通路通过与白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)结合来维持干细胞的多潜能

性^[11]. 采用全基因表达谱分析间充质干细胞证明, TGF- β 作为 3 个关键的生长因子信号通路之一, 不但对细胞的生长发挥作用, 而且影响细胞向成骨、软骨和脂肪细胞的分化. 以上研究表明, 细胞外微环境对干细胞的命运影响之大.

1.2 细胞的生物力学效应

(1) 细胞张力. 细胞张力的完整性结构由承受压力构件和一系列连续的张力构件相互连接组成. 这种结构的稳定性取决于细胞内部结构完整性的保持, 因而也被称为张力完整性. 研究表明, 细胞的结构符合张力完整性原理, 而且细胞骨架(cellular framework, CF)的张力完整性影响细胞的形状和功能^[12]. 此外, 细胞骨架的张力完整性是细胞形变的主要决定因素. 相关研究表明, 扁平细胞比圆形细胞 DNA 合成更为旺盛, 提示细胞的变形是信息传递的重要环节. 在机械应力的作用下, 细胞骨架的所有构件为了分散张力和压力而发生整体重排, 这将导致细胞发生形变, 细胞形状调节发出的调节信息以力的形式传递^[13]. 因此, 机械应力的变化可以通过改变细胞及其骨架内的力平衡而对细胞的生长和生化性质产生影响, 即细胞直接受到来自外界的力学刺激时, 它的形态和功能都可能会发生改变. 组织细胞常受到动态牵拉应力作用, 体内牵拉应力通过细胞外基质传递到细胞. 牵张应力模型利用液体或气体对弹性基底膜施加可控位移或压力作用, 使细胞基底膜产生弹性变化从而使黏附于膜上的细胞受到相应的牵张应力作用.

(2) 流体静压力. 处于相对静止状态下的流体, 由于本身的重力或其他外力的作用, 在流体内部及流体与容器壁面之间存在着垂直于接触面的作用力,

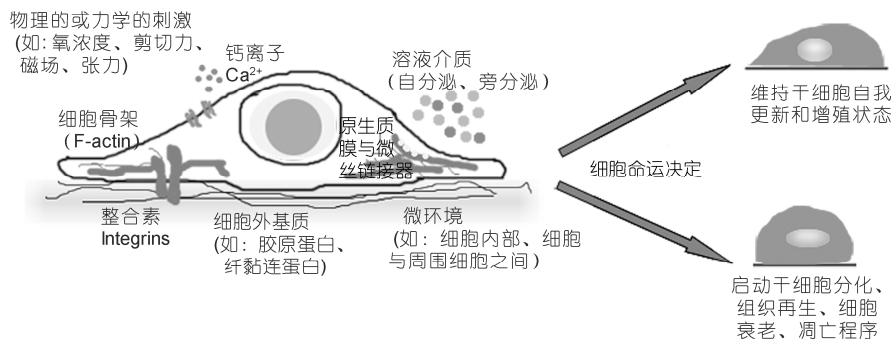


图 1 细胞微环境影响干细胞命运

这种作用力称为流体的静压力. 目前有研究表明, 流体静压力对调控软骨代谢和维持其细胞胞外基质正常表型起重要作用, 其中静压力刺激减少了II型胶原和蛋白多糖的合成, 而正常动压力刺激则促进II型胶原和蛋白多糖的合成^[14]. Holmval 等人^[15]发现, 持续高流体静压力抑制蛋白多糖的合成和分泌, 减少了整合素 mRNA 的表达, 改变了高尔基复合体的形态和抑制微丝的组成. Stewart 等人^[16]在研究细胞有丝分裂过程中发现了引起细胞形状发生变化的作用机制, 即黏附细胞是怎么从扁平形变成圆形的. 研究发现, 有丝分裂中让细胞形状变成圆形的力既取决于肌动球蛋白的细胞骨架, 还取决于细胞响应“克分子渗透压浓度”(osmolality, 即为了表示某溶液的渗透压, 有时使用该溶液具有等渗的非电解质溶液的克分子浓度, 称为克分子渗透压浓度)变化的能力. 研究认为, 让细胞形状变成圆形的力是由于渗透压改变产生的, 而肌动球蛋白皮质(actomyosin cortex)抵抗外力来维持细胞变圆的力是必不可少的. 肌动球蛋白皮质瞬间的分解将使细胞体积增加, 肌动球蛋白收缩刺激引起细胞体积减小, 这表明细胞可通过内在调控肌动球蛋白皮质的收缩来维持渗透压的平衡. 因此通过从局部调节肌动球蛋白依赖的表面张力以及从全局上调节渗透压, 细胞可以控制它的体积、形态及机械性能.

(3) 流体剪切力. 一些细胞可能长期处于具有流体流动的环境中, 例如, 血管、淋巴管的内皮细胞和平滑肌细胞, 食管、肠道的上皮细胞以及骨骼中的成骨和破骨细胞等. 这些细胞始终暴露于血流、淋巴液、组织液或消化的食物残渣的冲刷, 这种流体对细胞产生的机械力称为流体剪切力. 研究表明, 流体剪切力能够调控细胞的功能. 目前认为流体流动主要分为 2 种形式: 层流的流动(laminar)和湍流的流动(turbulent)^[17]. 近年研究表明, 流体剪切力是影响组织代谢, 尤其是影响骨组织代谢和调节骨细胞的功能和形态的一个重要因素.

2 生物机械力及力学信号转导调控干细胞的自我更新和分化的作用

在干细胞的研究中如何维持多能干细胞的自我更新是研究的一个重要内容. 此外, 多能干细胞可向诱导或自发分化, 转变为组织特异类型细胞, 如神

经细胞、皮肤细胞或肌肉细胞. 但长期以来, 研究人员都是通过体外添加生长因子、小分子化合物来维持多能干细胞的多潜能状态, 即便如此, 在长期培养的过程中, 干细胞还是会进入不同的分化阶段, 呈现出不同的基因表达模式. 因此, 体外培养条件下如何长期、有效地维持多能干细胞的干性仍然是一项值得深入研究的课题. 近年研究表明, 生物机械力及力学信号转导在胚胎发育、干细胞分化谱系命运的调控过程中发挥着很重要的作用, 一些未分化细胞能够感知周围的生物力及力学信号的刺激使其向特定方向分化^[6]. 研究表明, 通过细胞形态变化, 基底硬度、基底几何结构变化以及对细胞施加各种生物机械外力刺激对干细胞的增殖和分化命运具有重要的影响^[5].

2.1 基底硬度影响干细胞的增殖、分化命运

细胞外基质传感弹性能力的重要性已在成纤维细胞、间充质干细胞、表皮干细胞等研究中被证实^[18-20]. Engler 等人^[21]首次探讨基底硬度在调控人间充质干细胞的命运中的作用. 利用包被胶原的聚丙烯酰胺凝胶作为人工细胞基质用于细胞的体外贴壁培养, 通过调整化学成分的比例来制备软硬弹性不同的细胞基质, 然后将人间充质干细胞放入不同软硬程度的胶中培养来测试细胞生长. 结果显示, 不同基质硬度对细胞生长的命运的影响不同, 当细胞放入类似大脑组织的较软的基质中培养时, 细胞呈现出神经细胞的表型; 当细胞生长于类似于肌肉组织的较适中硬度的基质中时, 细胞表现出肌原性特性; 而当细胞长在类似于骨胶原的较硬的基质中时, 细胞更趋向于成骨样的表型. 美国密西根大学的研究者通过新型的基质材料来培养成体和胚胎干细胞, 发现了一种能够预测干细胞分化命运的方法. 他们发现, 干细胞会对细胞基质施加一定的力, 而这种力可能与细胞分化相关. 如干细胞在坚硬的基质中生长最后分化成骨细胞, 而在较软的机制中生长则分化成脂肪细胞^[22]. 此外, 美国伊利诺伊大学华裔科学家汪宁教授领衔的研究组发现, 小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)更倾向于黏附在一起形成圆形克隆, 但那些在克隆边缘与坚硬的培养皿接触的细胞的分化则要相对容易和快一些. 基于该现象, 研究人员将研究方向集中到 mESCs 的生物力学而非生物化学研究上, 发现在软凝胶上培养的细胞表现出更强的同质性和多能性. 甚至在缺乏

LIF 的条件下, 细胞仍可连续培养 3 个月以上. 该研究表明, 降低基质与细胞的弹力作用有助于细胞维持多能状态^[23]. 最近, 汪宁和华中科技大学同济医学院的黄波等的研究团队选用了从大马哈鱼(*Salmo*)中提取的一种特殊的蛋白胶来培养癌细胞, 分别将黑色素瘤、卵巢癌、肝癌等的癌细胞放入蛋白胶中培养, 发现有一小部分细胞最后能够存活下来, 这些细胞生长速度比较快, 只需将存活下来的细胞注射低至 10 个细胞就能在小鼠体内产生肿瘤. 进一步的研究表明, 黑色素瘤癌细胞表达一种自我更新的基因, 它们具有与胚胎干细胞相似的生物力学特征并具有很强的抗凋亡能力. 研究人员认为, 这种方法或许为筛查恶性肿瘤再生细胞(癌干细胞)提供了一种新的技术手段^[24]. 然而, 细胞外基质弹力的变化在诱导干细胞特异分化作用方面的分子机制是一直困扰生物力学界的一个问题. 最近, 清华大学的 Du 等人^[25]在解答这个问题上取得了重要进展. 他们的研究认为, 细胞表面整合素的活化和内吞可能是软基质弹性诱导干细胞分化的机制之一.

2.2 基底形状变化影响干细胞的增殖、分化命运

细胞培养基底形状的不同对细胞增殖、分化具有重要的影响. Nelson 和 Bissell^[26]将相同的细胞分别培养在圆形和方形的培养皿中, 研究发现, 在牵引力较大的地方, 即圆形培养皿的边缘和方形培养皿的四个角里的细胞增殖最快. McBeath 等人^[27]用微接触印刷法控制细胞的生长面积, 结果表明, 在面积较小的基底上培养的间充质干细胞分化为脂肪细胞, 而在面积较大的基底上培养的则分化为成骨细胞. 为了研究基底几何微结构及生物力学效应对间充质干细胞分化的影响, 李振涵等人^[28]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、分化及迁移的影响, 结果表明, 细胞铺展的几何形态和面积与骨髓间充质干细胞增殖、分化和迁移有重大联系, 当细胞铺展宽度狭小时可抑制骨髓间充质干细胞的增殖, 当细胞铺展面积受限时细胞迁移增强. 研究认为, 成骨细胞诱导因子地塞米松可能在降低细胞增殖和迁移中起到重要作用. 此外, 该研究组进一步探讨了基质硬度、形状和维度 3 个生物物理参数对大鼠(*Rattus norvegicus*)间充质干细胞的影响, 表明基质硬度或维度对于生长在较硬、维度不均衡的基质的细胞主要起到增殖调控作用. 但基质几何形状在生长

在柱状基质中形成球状而非槽状的细胞中主要起控制细胞的形态和伸展作用. 研究认为, 尽管基质的软硬度对大鼠间充质干细胞向骨细胞分化或神经细胞分化有调节作用, 但基质几何形态和维度同样在干细胞的分化过程中有调控作用^[29]. Lü 等人^[30]采用聚丙烯酰胺水凝胶精密加工成 3 种拓扑地形的培养皿(凹槽、柱形和六边形)对小鼠胚胎干细胞进行培养并系统分析了细胞的形态、增殖和干性. 研究表明, 基底的拓扑地形对调控干细胞的干性具有重要作用, 在凹槽状和柱状皿中所形成的克隆相对较为扁平, 而在六边形的皿底形成的克隆较圆润.

2.3 细胞形态的改变影响干细胞增殖及分化命运

细胞分化过程中会改变其形状和形态特征. 研究表明, 细胞形态与细胞的增殖、存活及分化等有着重要的联系^[31,32]. 改变细胞形态是否能够改变人间充质干细胞的分化命运呢? McBeath 等人^[27]通过利用微/纳米图案化技术来调控细胞生长的面积从而约束细胞伸展行为. 当细胞处于黏附、扁平 and 伸展状态时, 细胞启动成骨形成的机制; 而当细胞处于不伸展、圆形状态时, 细胞则易变成脂肪. 早期研究表明, 细胞形态的改变会影响 Rho 家族三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)酶的活性, 研究发现, RhoA 参与了细胞形变的过程, RhoA 活性的改变介导了这种依赖细胞形态来调控人间充质干细胞的不同分化^[33]. 抑制 RhoA 的活性将诱导人间充质干细胞生成脂肪, 相反, 持续地激活 RhoA 使细胞变成成骨细胞. 此外, 细胞形态改变会影响 RhoA 下游信号的多种调控机制. 研究表明, Rho GTP 酶家族成员需要在膜脂筏中被激活^[34], 而这个位置会随着细胞形状改变而发生变化. 影响干细胞命运的 RhoA-ROCK(RhoA-dependent kinase)-Tension 信号可能通过黏着斑转导. 改变细胞的伸展将改变 RhoA 介导的细胞骨架的收缩、黏着斑的装配以及整合素的下游信号通路^[35,36]. 总之, 上面提到的细胞形态、生化信号和骨架收缩之间的相互作用表明了细胞结构和力学在细胞和组织发育中的重要性, 它提供了一个细胞及组织完成自身稳定机制负反馈调控的分子基础.

2.4 生物机械力对干细胞基因表达和分化命运的影响

流体剪切力对胚胎干细胞和间充质干细胞分化

具有重要作用^[37]. 在胚胎干细胞研究方面, Yamamoto 等人^[38]报道流体剪切力可促进小鼠胚胎干细胞分化, 当将 FIK-1 阳性的小鼠胚胎干细胞置于流动的液体中培养时, 结果显示, 与静止培养相比显著增加了细胞处于 S 和 G2-M 期细胞的数量和比例. 此外剪切力还显著提高血管内皮细胞标志分子 Flk-1, Flt-1, VE(vascular endothelial)-cadherin 以及 PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecular)-1 蛋白水平和 RNA 水平的表达. Adamo 等人^[39]研究表明, 流体剪切应力可促进胚胎期造血发生. 小鼠胚胎干细胞体外分化时, 在流体剪切力刺激下, 会提高 CD41 和 c-kit 双阳性造血前体细胞中 Runx1 的表达. 此外, 消除 NO 信号可能是剪切应力提高造血细胞克隆形成能力以及增加小鼠胚胎造血标志分子表达的原因之一. Toh 和 Voldman^[40]采用一种多通道微流体芯片装置来研究剪切力对小鼠胚胎干细胞自我更新的影响. 结果显示, 流体剪切力特异地上调外胚层特异标志分子 Fgf5(fibroblast growth factor 5). 小鼠胚胎干细胞对剪切力的力学感知可能是通过细胞外的硫酸类肝素蛋白多糖介导的, 从而调节 Fgf5 的表达. 在间充质干细胞方面, Glossop 和 Cartmell^[41]采用 DNA 芯片和逆转录实时定量 PCR 分析发现, 不同的流体剪切强度和作用时间影响人骨髓间充质干细胞 (human bone mesenchymal stem cells, hBMSCs) 丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路中相关基因的表达. 在不同的剪切力强度和作用时间刺激下细胞出现不同的基因表达模式, 但比较不同力学强度和作用时间的各组细胞时, 发现无论力学强度的大小和作用时间的长短, 剪切力总能持续和显著地上调 MAP3K8(MAP kinase kinase kinase 8)和 IL1 β (interleukin-1 beta)的表达. 该研究认为, MAP3K8 可能是 hBMSCs 重要的细胞内力转导的媒介分子. Yourek 等人^[42]研究表明, 剪切力可刺激 hMSC 在无化学因子的诱导下向成骨性细胞分化的表型.

水平拉伸应力对间充质干细胞分化具有重要的影响. Kurpinski 等人^[43]采用微型图像束来检测间充质干细胞在受到单轴水平应力拉伸后的变化情况. 结果显示, 水平应力引起平滑肌细胞的标志分子 calponin1 的表达升高, 而软骨基质标志分子的表达却发生下降. 倘若将细胞处于应力拉伸的垂直方向时, 前面这种基因表达的变化则消失. 这些结果表明,

机械应力对间充质干细胞的基因表达和细胞命运具有重要作用. 最近, Kurpinski 等人^[44]报道, 若将 TGF- β 和周期性的机械应力同时作用于细胞, 将导致 calponin1 基因表达的上调. 这说明溶液介质和机械应力可以通过协同作用来调控间充质干细胞的基因表达. 何学令等人^[45]应用双轴力学应变加载系统对大鼠 BMSCs 施加周期性机械牵张应力刺激, 结果表明, 成骨化学诱导剂和应力刺激均能促进大鼠 BMSCs 成骨向分化, 二者具有协同作用. Lü 等人^[46]利用拉伸装置和改良的侵袭小室方法进行了人表皮细胞或人成纤维细胞的侧向前以及跨膜迁移的动力学研究. 观察发现, 当表皮细胞与成纤维细胞非接触共培养时, 表皮细胞具有不对称迁移现象. 例如, 那些远离人纤维细胞或者说能够从下往上跨膜迁移的人表皮细胞数量要显著高于那些靠近人成纤维细胞或者是从上往下迁移的表皮细胞. 这种不对称迁移主要受来自成纤维细胞分泌的表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 的调控. 此外, 机械拉伸可通过增加成纤维细胞 EGF 的分泌进一步影响人表皮细胞的不对称迁移.

高频的磁珠振荡影响干细胞的增殖、分化命运. Chowdhury 等人^[23]将微米级的磁珠置于胚胎干细胞表面, 然后施加一个微小的震荡磁场, 使磁珠在磁场中来回震荡. 研究发现, 这种持续的振荡能够刺激细胞内部力的产生, 如肌球蛋白周期性运动. 他们还发现, 小鼠的胚胎干细胞相比其分化为其他类型的细胞要更柔软, 对局部周期性的力更敏感, 一个很小的局部力能够改变单个胚胎干细胞 *Oct3/4* 基因的表达, 其他基因的表达也可以被改变.

2.5 旋转培养产生的力学效应对干细胞增殖和分化命运的影响

近年来, 国内外不时有报道称旋转培养产生的力学效应可影响干细胞的增殖和分化^[47]. Yuge 等人^[48]将人间充质干细胞培养于三维回转器(3D-clinostat)中, 结果显示, 培养1周后细胞扩增了14倍, 而正常重力培养只扩增了4倍, 此外, 三维回转器中扩增的细胞经体内移植具有分化成透明软骨的能力, 相反, 正常重力下培养的细胞则失去这种性能. 该研究认为, 三维的旋转培养环境也许可以作为扩增干细胞的重要工具, 而且扩增培养后的细胞可以避免在细胞移植后发生的一些不利影响. Kawahara 等人^[49]

采用三维回转器来模拟微重力环境培养小鼠胚胎干细胞发现, 在无饲养层、无血清和 LIF 的情况下, 小鼠的胚胎干细胞仍可以保持干性生长, 扩增后的胚胎干细胞具有向 3 个胚层分化的潜能. 本实验室采用美国国家航空和宇宙航行局(National Aeronautics and Space Administration, NASA)研制的旋转式生物反应器来培养了人包皮来源表皮干细胞, 结果显示, 在该三维旋转培养条件下人表皮干细胞增殖能力增强, 其人表皮干细胞终末分化标志分子 *involucrin* 的表达降低. 扩增后的细胞可见形成紧密的三维结构^[50]. 此外, 在小鼠胚胎干细胞分化研究中发现, 旋转式悬浮培养促进细胞向中内胚层分行, 其作用机制主要是通过上调 Wnt/beta-catenin 信号通路^[51]. 尽管旋转培养产生的力学效应能够影响细胞增殖和分化命运, 但其确切的作用机制还不清楚, 有待于进一步研究.

3 生物机械力调控干细胞命运可能的机制

细胞感受 ECM 的弹性的过程是细胞将感受到的力学刺激转化为生物化学信息的过程. 该过程称为细胞力学信号转导. 细胞通过黏着斑与 ECM 黏附, 黏着斑由一系列信号分子组成, 并与胞质中微丝骨架相连. 这些信号分子在力学刺激作用下可产生构象变化, 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.

3.1 整合素活性及信号的力学调控

目前, 越来越多的研究表明, 细胞应力感受的一个关键分子机制为整合素、黏着斑蛋白以及其他相关结构蛋白的形变. 整合素具有机械应力转导的功能, 它主要集中于整合素聚焦黏附区域, 起到将机械力学信号变为化学信号的作用. Friedland 等人^[52]报道, $\alpha_5\beta_1$ -整合素是由 Myosin II 引起细胞骨架应力纤维处于松弛状态和紧张状态的开关. 此外有一些证据表明, 在肌动蛋白肌丝与整合素的细胞质区部分之间起介导作用的 α -辅肌动蛋白是一个关键分子结构, 干扰肌动蛋白应力纤维的形成可阻止信号向细胞核的传递. G 蛋白为常见的信号转导关键分子, 大 G 蛋白通过对其亚基上氨基酸残基的脂化修饰作用而锚定在细胞膜上, 从而为其接受细胞膜结构信号提供了结构基础, 而小 G 蛋白则通过细胞外基质-整合素-

细胞骨架接受细胞外机械信号^[53]. 最近, Grashoff 等人^[54]利用黏着斑张力生物感受器证明了在活细胞中黏着斑的恢复以及黏着斑之间力的传递对受力状态下黏着斑的稳定是必要的. 因此, 整合素活性和信号的机械调控方式可能是决定干细胞命运的一个关键机制之一.

3.2 RhoA/Rho-激酶(ROCK)信号通路的作用

RhoA 是位于细胞内的一种 GTP 酶, ROCK 是位于 RhoA 下游的效应分子, 它被活化的 RhoA 激活. ROCK 可以将肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)和肌球蛋白磷酸酶磷酸化, 抑制其活性; 对保持细胞骨架张力纤维的完整性, 提高肌动蛋白张力纤维的伸缩性, 调控细胞的形态、黏附和运动等起着非常重要的作用. 尽管 RhoA 在细胞的力学响应上发挥重要作用, 但其分子机制一直是人们探讨的一个问题. 最近, Guilluy 等人^[55]通过分子印记的生物化学和生物物理学方法, 鉴定出 2 个鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs, GEF-H1)和 LARG(leukaemia-associated Rho GEF)是调控细胞对力适应的关键分子. 结果显示, 张力通过整合素介导刺激了这 2 个分子的活化以及招募它们到黏附复合物上. 此外, 结果揭示了 LARG 受 Src 家族酪氨酸激酶(Src family kinases, SFKs)Fyn 的激活, 而 GEF-H1 活性的增强是受到细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)下游级联信号, 包括 FAK(focal adhesion kinase)和 Ras(rat sarcoma)的催化. Dupont 等人^[56]发现, Yorkie-同源物 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)和与 PDZ 结合的转录辅激活子 TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ)是外露于核的两个力学信号传感分子. YAP/TAZ 的活性可受到 ECM 硬度变化、细胞形状及几何形变的调控. 其调控方式主要依赖于 Rho GTP 酶的活化和肌动球蛋白细胞骨架拉伸, 但它不依赖于 Hippo/LATS(large tumor suppressor)级联效应. 此外, 在由细胞外基质软硬诱导的间充质干细胞分化以及通过细胞几何形态改变调控内皮细胞的存活方面, YAP/TAZ 发挥至关重要的功能, 相反, 激活 YAP 的表达对细胞行为上的变化超过了物理约束. 因此, YAP/TAZ 可能是细胞微环境中调控力学信号的传感器和介质之一.

3.3 力学信号超长距离转导的作用

在活细胞中短距离的力学转导及作用机制已研究得比较清楚了^[57]. 力及能量可以跨膜通过整合素、黏连蛋白、结合黏着斑以及细胞骨架网络来连接细胞核、核内部支架以及环联的染色质达到信号转导. 这种细胞内机械信号反应的速度和精度是可以通过改变细胞骨架的预应力来调节的. 预应力的改变可以控制处于紧张时细胞骨架微丝的劲度, 比如在细胞质中跨度较大的肌动蛋白应力纤维和中间纤维. 作用于细胞核的力可能造成核内特异承重分子形态变化、折叠以及动力学改变, 也可能改变染色质的高级结构, 进而影响核蛋白的自组装、基因转录、DNA复制以及RNA加工等^[58]. 这种机械信号在活细胞的长距离转导比由扩散方式产生的生化信号转导更加快速和有效. 力学信号的长距离转导同样有助于理解机械力是如何同时改变细胞质和细胞核中不同位置的多个分子的活性. 这种胞内、胞外的细胞响应对调控细胞的行为、组织的发生以及干细胞的命运也是至关重要的.

3.4 Myosin II 调控干细胞命运的作用

非肌肉肌球蛋白 II (non-muscle myosin II, NMM II) 是一类肌动蛋白结合蛋白, 具有调节细胞收缩的作用. 在已鉴定的 3 个不同 NMM II 亚型里面, NMM II A 和 NMM II B 几乎存在于所有的高等生物中. 基因敲除 *NMM II A* 或者 *NMM II B* 导致小鼠胚胎期致死^[59,60]. *NMM II A* 敲除引起的死亡发生于胚胎的围植入期, 而 *NMM II B* 敲除小鼠死于妊娠晚期. 因此, NMM II 对胚胎早期发育至关重要.

NMM II 在机械力调控干细胞命运中发挥的重要作用已有研究. 有报道称, 基质弹性和细胞形态决定的间充质干细胞谱系依赖于 NMM II, 但其具体的分子机制还不清楚. 研究表明, 人胚胎干细胞消化成单细胞后培养表现出超低的活性和克隆形成效率, 而 NMM II 依赖的收缩力是降低细胞成活的主要原因. 若将单细胞接种于培养皿前短暂抑制 NMM II 或者 Rho-ROCK-NMM II 级联, 其他元件组分会改善人胚

胎干细胞的活性, 增强细胞在细胞外基质底物中黏附和扩展的能力^[61]. 有趣的是, 尽管在分散的单个个人胚胎干细胞培养初期 NMM II 的高活化会降低细胞存活, 但美国伊利诺伊大学王霏研究组与本实验室的合作研究发现, NMM II 的活化事实上对维持人胚胎干细胞的长期自我更新是必需的. 研究发现, NMMIIA 的缺失会破坏 OCT-4(octamer-binding transcription factor 4)/SOX2(sex determining region Y)-box 2)/NANOG(pron. nanOg)转录路线的稳定, 阻碍细胞克隆的形成, 降低细胞长时间的生存能力^[62]. 此外, 钙黏素(E-cadherin)是 NMM II A 作用于人胚胎干细胞的关键靶分子. 体外利用 *Myosin II A* 特异的干扰 RNA 敲低 *Myosin II A* 基因, 导致了人胚胎干细胞细胞间连接紊乱, 细胞与细胞外基质的机械力降低, 同时 E-cadherin 蛋白的表达也下降. 若通过外源性过表达 E-cadherin 可以恢复 *Myosin II A* 特异的干扰 RNA 敲低 *Myosin II A* 基因后的胚胎干细胞特性. 总之, 上述结果表明, NMM II 引起的收缩不只作为阅读细胞外信号的功能, 而在决定干细胞命运信号的产生和转导方面也具有相当重要的作用.

4 结语

随着近年来有关机械应力对干细胞结构和功能调控研究的不断深入, 细胞对应力产生适应性应变的响应和力学转导机制已逐渐为人们所认识, 但在这个领域中仍有许多未知细节问题等待人们去探索, 如应力大小、频率与干细胞增殖、分化、凋亡的量效关系如何, 应力对组织修复的干细胞的生物学行为的影响以及应力作用下细胞内力学信号转导和基因表达调控的确切机制等. 因此, 进一步深入研究机械应力和力学转导通路与细胞的关系, 探索出一条力学影响细胞生命活动的力学生物学耦合规律, 将有助于了解力在某些疾病的发病机制和创伤修复过程中的作用, 有助于针对这些机制、过程采取新的更有效的应对策略, 同样对组织工程、基因治疗、干细胞再生医学以及空间生命与航天医学的研究具有重要意义.

参考文献

- 1 Griffith L G, Naughton G. Tissue engineering—current challenges and expanding opportunities. *Science*, 2002, 295: 1009–1014

- 2 Demehri S, Kopan R. Notch signaling in bulge stem cells is not required for selection of hair follicle fate. *Development*, 2009, 136: 891–896
- 3 Janmey P A, Mcculloch C A. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu Rev Biomed Eng*, 2007, 9: 1–34
- 4 Discher D E, Mooney D J, Zandstra P W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, 2009, 324: 1673–1677
- 5 Chowdhury F, Li Y, Poh Y C, et al. Soft substrates promote homogeneous self-renewal of embryonic stem cells via downregulating cell-matrix tractions. *PLoS One*, 2010, 5: e15655
- 6 Estes B T, Gimble J M, Guilak F. Mechanical signals as regulators of stem cell fate. *Curr Top Dev Biol*, 2004, 60: 91–126
- 7 Levenstein M E, Ludwig T E, Xu R H, et al. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells*, 2006, 24: 568–574
- 8 Woll P S, Morris J K, Painschab M S, et al. Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells. *Blood*, 2008, 111: 122–131
- 9 Xu R H, Sampsel-Barron T L, Gu F, et al. NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 196–206
- 10 Smith J R, Vallier L, Lupo G, et al. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Dev Biol*, 2008, 313: 107–117
- 11 Ying Q L, Nichols J, Chambers I, et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 2003, 115: 281–292
- 12 Ingber D E, Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci*, 2003, 116: 1157–1173
- 13 Parker K K, Brock A L, Brangwynne C, et al. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J*, 2002, 16: 1195–1204
- 14 Carter D R, Wong M. Modelling cartilage mechanobiology. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci*, 2003, 358: 1461–1471
- 15 Holmvall K, Camper L, Johansson S, et al. Chondrocyte and chondrosarcoma cell integrins with affinity for collagen type II and their response to mechanical stress. *Exp Cell Res*, 1995, 221: 496–503
- 16 Stewart M P, Helenius J, Toyoda Y, et al. Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature*, 2011, 469: 226–230
- 17 Long M, Sato M, Lim C T, et al. Advances in experiments and modeling in micro- and nano-biomechanics: a mini review. *Cell Mole Bioeng*, 2011, 4: 327–339
- 18 Discher D E, Janmey P, Wang Y L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 2005, 310: 1139–1143
- 19 Paszek M J, Zahri N, Johnson K R, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 2005, 8: 241–254
- 20 Connelly J T, Gautrot J E, Trappmann B, et al. Actin and serum response factor transduce physical cues from the microenvironment to regulate epidermal stem cell fate decisions. *Nat Cell Biol*, 2010, 12: 711–718
- 21 Engler A J, Sen S, Sweeney H L, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, 126: 677–689
- 22 Fu J, Wang Y K, Yang M T, et al. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat Methods*, 2010, 7: 733–736
- 23 Chowdhury F, Na S, Li D, et al. Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nat Mater*, 2010, 9: 82–88
- 24 Liu J, Tan Y, Zhang H, et al. Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells. *Nat Mater*, 2012, 11: 734–741
- 25 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 9466–9471
- 26 Nelson C M, Bissell M J. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin Cancer Biol*, 2005, 15: 342–352
- 27 McBeath R, Pirone D M, Nelson C M, et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*, 2004, 6: 483–495
- 28 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. *医用生物力学*, 2009, 24: 256–262
- 29 Li Z, Gong Y, Sun S, et al. Differential regulation of stiffness, topography, and dimension of substrates in rat mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 2013, 34: 7616–7625
- 30 Lü D Y, Luo C H, Zhang C, et al. Differential regulation of morphology and stemness of mouse embryonic stem cells by substrate stiffness and topography. *Biomaterials*, 2014, 35: 3945–3955
- 31 Watt F M, Jordan P W, O'Neill C H. Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 5576–5580

- 32 Ben-Ze'ev A. The role of changes in cell shape and contacts in the regulation of cytoskeleton expression during differentiation. *J Cell Sci Suppl*, 1987, 8: 293–312
- 33 Ren X D, Kiosses W B, Schwartz M A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J*, 1999, 18: 578–585
- 34 Hancock J F. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 373–384
- 35 Riveline J P, Capeau J, Robert J J, et al. Extreme subcutaneous insulin resistance successfully treated by an implantable pump. *Diabetes Care*, 2001, 24: 2155–2156
- 36 Chen C S, Alonso J L, Ostuni E, et al. Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 307: 355–361
- 37 Adamo L, Garcia-Cardena G. Directed stem cell differentiation by fluid mechanical forces. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15: 1463–1473
- 38 Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, et al. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells *in vitro*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288: H1915–H1924
- 39 Adamo L, Naveiras O, Wenzel P L, et al. Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. *Nature*, 2009, 459: 1131–1135
- 40 Toh Y C, Voldman J. Fluid shear stress primes mouse embryonic stem cells for differentiation in a self-renewing environment via heparan sulfate proteoglycans transduction. *FASEB J*, 2011, 25: 1208–1217
- 41 Glossop J R, Cartmell S H. Effect of fluid flow-induced shear stress on human mesenchymal stem cells: differential gene expression of IL1B and MAP3K8 in MAPK signaling. *Gene Expr Patterns*, 2009, 9: 381–388
- 42 Yourek G, McCormick S M, Mao J J, et al. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regen Med*, 2010, 5: 713–724
- 43 Kurpinski K, Chu J, Hashi C, et al. Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 16095–16100
- 44 Kurpinski K, Chu J, Wang D, et al. Proteomic profiling of mesenchymal stem cell responses to mechanical strain and TGF-beta1. *Cell Mol Bioeng*, 2009, 2: 606–614
- 45 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. *医用生物力学*, 2011, 26: 116–120
- 46 Lü D Y, Liu X F, Gao Y X, et al. Asymmetric migration of human keratinocytes under mechanical stretch and cocultured fibroblasts in a wound repair model. *PLoS One*, 2013, 8: e74563
- 47 雷晓华, 宁立娜, 曹宇静, 等. 微重力条件下细胞培养和组织工程研究进展. *生命科学*, 2010, 22: 1047–1052
- 48 Yuge L, Kajiume T, Tahara H, et al. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. *Stem Cells Dev*, 2006, 15: 921–929
- 49 Kawahara Y, Manabe T, Matsumoto M, et al. LIF-free embryonic stem cell culture in simulated microgravity. *PLoS One*, 2009, 4: e6343
- 50 Lei X H, Ning L N, Cao Y J, et al. NASA-approved rotary bioreactor enhances proliferation of human epidermal stem cells and supports formation of 3D epidermis-like structure. *PLoS One*, 2011, 6: e26603
- 51 Lei X H, Deng Z L, Zhang H S, et al. Rotary suspension culture enhances mesendoderm differentiation of embryonic stem cells through modulation of Wnt/ β -catenin pathway. *Stem Cell Rev Rep*, 2014, doi: 10.1007/s12015-014-9511-6
- 52 Friedland J C, Lee M H, Boettiger D. Mechanically activated integrin switch controls $\alpha_5\beta_1$ function. *Science*, 2009, 323: 642–644
- 53 Somlyo A P, Somlyo A V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, 2000, 522: 177–185
- 54 Grashoff C, Hoffman B D, Brenner M D, et al. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 2010, 466: 263–266
- 55 Guilluy C, Swaminathan V, Garcia-Mata R, et al. The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat Cell Biol*, 2011, 13: 722–727
- 56 Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 2011, 474: 179–183
- 57 Hahn C, Schwartz M A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 53–62
- 58 Wang N, Tytell J D, Ingber D E. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 75–82
- 59 Tullio A N, Accili D, Ferrans V J, et al. Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 12407–12412
- 60 Conti M A, Even-Ram S, Liu C, et al. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *J Biol Chem*, 2004, 279: 41263–41266
- 61 Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*,

2007, 25: 681–686

62 Li D, Zhou J, Wang L, et al. Integrated biochemical and mechanical signals regulate multifaceted human embryonic stem cell functions. *J Cell Biol*, 2010, 191: 631–644

Roles of Mechanical Force and Mechanotransduction in Fate of Stem Cells

LEI XiaoHua, DENG ZhiLi, NING LiNa, CAO YuJing & DUAN EnKui

State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Stem cells are undifferentiated progenitor cells that are accepted as a source of seed cells for therapeutic applications in tissue regeneration and as a model to investigate the lineage-specific differentiation of stem cells. Outstanding research in recent years has shed light on the role of micro-environment of stem cells in the proliferation and differentiation. Although studies have indicated that soluble mediators such as cytokines and growth factors play a significant role in proliferation and differentiation of stem cells, a critical role for mechanical force and mechanotransduction in controlling self-renewal, differentiation, aging and apoptosis of stem cells has also been revealed. In this review, we summarize and discuss the mechanisms of cells' response to mechanical stimuli, the biomechanical force as a regulator for stem cell self-renewal and differentiation, and the putative mechanisms of mechanotransduction.

mechanical force, mechanotransduction, stem cells, self-renewal, differentiation

doi: 10.1360/N052013-0080