文章编号：1004-0374(2009)05-0620-06

干细胞发育的生物力学调控

周军年，裴雪涛*
(军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室，北京 100850)

摘 要：生物力学是采用力学方法对生物系统的结构和功能进行的研究，与生物化学信号一起是调节胚胎发育、干细胞发育分化和组织器官形成的重要因素。近年来，随着学科交叉的深入，生物力学因素越来越受到研究者的重视。目前的研究表明：在心血管和造血系统，血流产生的流体剪切力对于血管内皮和造血细胞的发育分化至关重要；此外，对于广泛研究的间充质干细胞，由细胞外基质物理特性诱导的细胞张力对于干细胞功能及其向不同子代细胞的分化也扮演了重要的角色；而在肝脏等上皮组织来源的器官，也有研究提示生物力学因素，如基质弹性等在疾病的发生发展过程中起到了不可忽视的作用。总之，在干细胞发育分化过程中，生物力学调控与生物化学信号通路怎样协同发挥作用将成为今后研究的重点。

关键词：干细胞；发育；生物力学；流体剪切力；张力
中图分类号：Q813；Q66 **文献标识码**：A

Biomechanical regulation of stem cell development

ZHOU Jun-nian, PEI Xue-tao*
(Stem Cell and Regenerative Medicine Laboratory, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract: The term biomechanics is used here to mean the study of the structure and function of biological systems using the methods of mechanics. Both of the biochemical and biochemical signaling pathways play a critical role in embryogenesis, stem cell development, differentiation, and organogenesis. With the advances of the cross discipline between biology and mechanics, much more attentions have been paid to biomechanical regulation. Recent studies suggest that blood flow-induced fluid shear stress is virtually involved in the development of hematopoietic and endothelial cells. For mesenchymal stem cells, a widely studied stem cell, the physical properties of extracellular matrix-induced tension forces also play key roles in determining stem cell function and fate. Several independent evidences also indicate that biomechanical factors such as tissue level elasticity are implicated in progressions of liver diseases and cancer. Taken together, how biomechanical and biochemical signaling pathways are intertwined will be focused in the future.

Key words: stem cells; development; biomechanics; fluid shear stress; tension forces

在胚胎发育过程中，整个胚胎发生剧烈的形态变化，尤其是原肠胚形成(gastrulation)阶段，在这个阶段胚胎发生内陷(invagination)和翻转(turning)，奠定三胚层分化的基础，此后经历神经胚形成(neurulation)阶段，三胚层进一步发生特化，而后各个胚层进一步成熟，进入器官发生(organogenesis)阶段，在上述发育过程中都牵涉到复杂的调控网络，包括各种生长因子和基质蛋白介导的生化信号以及细胞及流体介导的生物力学调控[1]。在此前的绝大部分研究中，研究者大量关注的是各种生化信

收稿日期：2009-08-17
基金项目：国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2006AA02A107)；国家重点基础研究发展计划(“973”计划) (2005CB522702)；国家自然科学基金项目(30671098)
***通讯作者**：010-66932240; E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

号通路在胚胎及干细胞发育过程中的作用，而对生物力学调控机制知之甚少，近几年来，随着生物科学的发展及与其他学科交叉力度的加大，人们开始逐渐关注干细胞发育的生物力学调控，并取得了很好的进展。

美国生物力学协会(American Society of Biomechanics，ASB)将生物力学定义为“采用力学方法对生物系统的结构和功能进行的研究”。这个系统包括小至细胞，大至组织、器官，甚至整个生物体，范围非常广泛。在本文中我们将重点关注心血管系统、造血系统，以及间质组织来源的干细胞发育分化的生物力学调控及其研究进展。

1　血管发育分化及其生物力学调控

在小鼠胚胎中，在E8.0时心脏即已经开始跳动，从而启动血液循环，血液循环在发育中的作用很早就引起了人们的重视。早在1918年，就有两个独立的研究小组在鸡胚中的研究表明，合适的血流对于心血管的发育[2]和血管的复原[3]至关重要。血管的形态发生分为两类，一类是在胚胎发育过程中从血管前体细胞生成血管的过程称为vasculogenesis；一类是在成体中，从已有的血管结构再产生新的血管的过程，称为angiogenesis。较早的时候人们就已经清楚的是，后一过程的发生不依赖于流体剪切力(fluid shear stress)的作用[4]，但成体血管功能的维持仍需要剪切力的作用[5]。一直以来，人们并不清楚究竟是生物力学因素还是遗传因素在心血管的发育分化过程中发挥更多的作用，因为很多和心血管发育相关的基因在完全敲除后往往会导致胚胎致死，很难进行深入的机制研究。以N-cadherin基因敲除为例，该基因敲除后小鼠胚胎死于孕中期，但出乎意料的是，在心脏特异性的表达N-cadherin 或E-cadherin蛋白可以重新产生正常的血液循环并拯救(rescue)血管的异常形态发生。le Noble等[6]的研究也表明血流可能是血管发育的主要因素，因为在小鼠卵黄囊，血流可以显著的调节动脉标志基因ephrinB2 和 neuropilin 1的表达[7]。这些结果表明缺乏血流可能是血管内皮异常发育，从而导致胚胎致死的直接原因。但究竟是血流输送的营养还是血流产生的流体剪切力在内皮的发育过程中发挥重要作用，Lucitti等[7]设计了一个巧妙的实验回答了这个问题。该小组采用物理方法将发育的小鼠卵黄囊血岛(blood island)中的原始红细胞去除，从而导致血流黏度下降和液体剪切力降低，使卵黄囊中已经存在的血管不能进一步发育成熟，而在去除原始红细胞的血液中加入淀粉，增加血液的黏度和液体剪切力，则拯救了血管的形态发生过程。这有力的表明了血液循环产生的液体剪切力对于发育的胚胎中新生血管网络的形成至关重要[8]。

由于液体剪切力在血管前体细胞向内皮细胞的分化中至关重要，人们开始采用具有发育全能性的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)向内皮分化作为研究剪切力作用机制的模型。Yamamoto等[9]发现流体剪切力可以诱导小鼠ESCs细胞增加血管内皮特异性标志Flk-1、Flt-1、VE-cadherin和PECAM-1的表达，但是血管平滑肌细胞标志α-SMA、血细胞标志CD3和上皮细胞标志角蛋白的表达没有上调。受到剪切力作用的Flk-1^{+} ESCs更容易在胶原中形成网络样血管结构。随后的研究发现，流体剪切力促进ESCs来源的祖细胞向内皮细胞分化可能是通过Flk-1-PI3K-Akt信号通路稳定和激活组蛋白去乙酰化酶3(HDAC3)发挥作用的，但这条通路在VEGF诱导的血管内皮细胞的分化过程中也能检测到[10]，说明可能不是力学特异性的。实际上，内皮细胞在生物力学信号作用下会表达大量基因，但这其中有很多基因既不是细胞类型特异性的，也不是流体特异性的。Dekker等[11]通过芯片转录表达谱分析，最后鉴定出只有肺KLF2 (krüppel-like factor2)是特异性地由流体诱导产生的转录因子，另外有研究表明，氧自由基成分在剪切力诱导内皮分化过程中也发挥了重要作用[12]。

2　造血细胞的发育分化及其生物力学调控

自从人们观察到卵黄囊血岛的存在之后，就一直推测造血和内皮在发育上具有密切的关系。目前在已有的研究结果上，人们对造血细胞和血管内皮细胞发育关系提出了成血血管细胞(hemangioblast)和生血内皮(hemogenic endothelium)两种不同的发育模式[13]。在脊椎动物发育过程中，造血干细胞(hematopoietic stem cells,HSCs)的形成位置和主动脉血管密切相关，当心脏跳动开始后，在背侧动脉、胎盘血管、脐动脉和卵黄囊动脉腹侧下排布的细胞开始表达一个主要的造血转录因子——Runx1，然后逐渐生成造血细胞。此前并不清楚在这个发育阶段作用于血管壁的生物力学作用力是否是造血潜能的一个决定性因素，而最近两个独立的杰出研究则直接的证明了这个假说。

Adamo等[14]采用小鼠ESCs体外分化模型表明，

流体剪切力增加了造血祖细胞CD41$^+$c-Kit$^+$中Runx1的表达，同时增强造血克隆形成能力。他们进一步地发现流体剪切力在体内增强了小鼠胚胎PSp/AGM (para-aorticsplanchnopleura/aorta-gonad-mesonephros)区细胞造血克隆形成能力和造血标志基因的表达。而阻断介导流体剪切力信号通路的一氧化氮(NO)的产生会降低体内外造血分化潜能。那在没有液体剪切力的胚胎中，造血细胞的情况如何呢？此前[15]建立的一个心脏停止跳动的NCX1$^{-/-}$小鼠模型在此发挥了很大的作用。这个模型在2008年曾被用来研究胚胎造血起源[16]。在本研究中，Adamo等[14]分离了NCX1$^{-/-}$小鼠的AGM区细胞，发现NCX1$^{-/-}$小鼠也表达内皮细胞标志，但是Runx1的表达下调，并且形成造血克隆的能力也下降。但将分离的细胞在体外暴露于剪切力的条件下又可以重新上调造血转录因子Runx1的表达和促进造血细胞的分化潜能。

North等[17]也在斑马鱼中证明了血流是HSCs形成的一个保守调节因素。在sih胚胎(无血液循环和心跳)中，HSCs数量急剧降低。为了进一步揭开血流调控HSCs发育的机制。他们采用了一个化学遗传扫描的方法来鉴定影响HSCs发育的成分，即将斑马鱼胚胎暴露于一系列的化学成分中，结果表明哪些诱导血管扩张和增加血流的成分无一例外的均能上调Runx1的表达，而收缩血管的成分下调Runx1的表达。和Adamo等[14]的研究一致，该研究也表明NO在血流诱导HSCs发育分化中发挥重要作用。血流中的调控成分影响HSCs的发育分化是在心跳启动之后，然而，North等[17]发现NO成分，甚至在血液循环启动之前就可以调节HSCs的数量，并可以拯救sih胚胎中HSCs的产生。

总之，这两个研究小组[14,17]的工作首次直接将血流和胚胎造血发育联系起来并鉴定出NO是血流调控HSCs发育的保守下游。然而，这两项研究都没有回答内皮的动脉特化和内皮产生HSCs之间的发育关系，因为此前的研究表明内皮的动脉分化也是受血流的影响。一个可能的解释就是，在缺少血流的条件下，动脉特化没有发生，而HSCs发育缺失的原因可能是因为内皮微环境发生了改变[18](图1)。

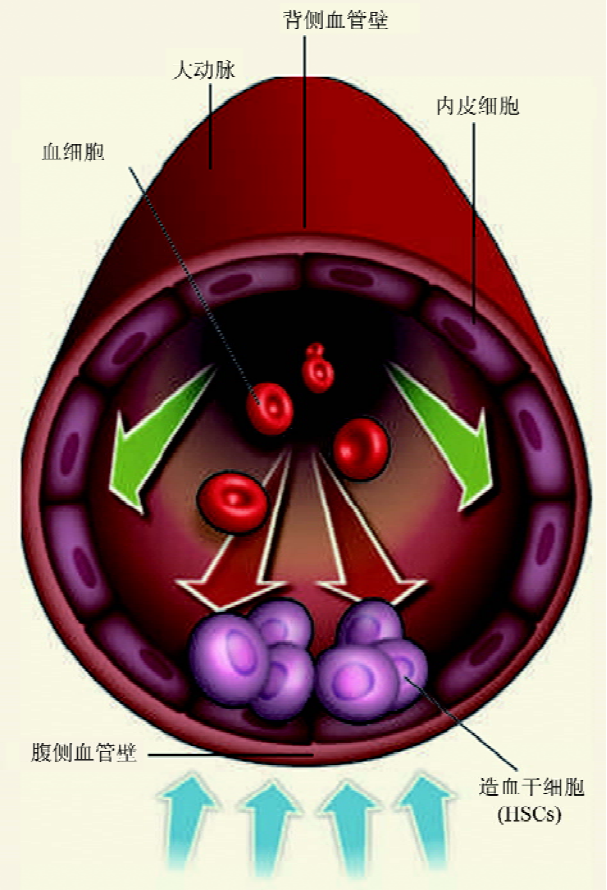

图 1 血流促进HSCs发育示意图[18]

HSCs从血管的腹侧内皮进入血管，HSCs只在动脉的腹侧发育，虽然血管的腹侧(红色箭头)，侧面(绿色箭头)和背侧都受到剪切力的作用。蓝色箭头代表来自中胚层诱导主动脉向HSCs分化并感受剪切力的信号。

3 心肌的发育分化及其生物力学调控

心脏是少有的几个在未完全发育成熟之前就必须发挥功能的器官之一。基于这一事实，人们推测心脏本身的生物力学功能可能影响其自身的形态发生[19]。为了验证心肌细胞的搏动在诱导心肌细胞分化过程中的作用，Iijima等[20]建立了骨骼肌来源的细胞与搏动的心脏细胞共培养体系，结果发现搏动心脏细胞能够诱导骨骼肌细胞横向分化(transdifferentiate)为心肌细胞。而在共培养体系中加入抑制心肌搏动的药物硝苯地平后，则抑制了骨骼肌的这种横向分化，但是对共培养的细胞进行被动牵张(passive stretch)则可以继续实现横向分化。这个研究表明作用于肌肉细胞的机械张力而不是流体剪切力对于向心肌细胞分化至关重要[20]。但骨骼肌的横向分化并不能完全反映体内心肌细胞分化的真实情况。为了进一步验证这个假说，Gwak等[21]将ESCs培养于高分子弹性支架上并对其进行周期性的拉伸以模仿心肌细胞跳动的周期机械力。结果表明，与未拉伸组相比，拉伸组ESCs向心肌细胞分化增加，在移植到心肌梗塞大鼠中后，可以有效的降低组织成纤维化，抑

制细胞凋亡，提高VEGF的表达和心肌特异性超微结构以及血管的形成。

4　间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的发育分化及其生物力学调控

与造血细胞不同，绝大多数组织的构成细胞为贴壁生长。贴壁生长细胞通过分泌大量的细胞外基质蛋白(extra cellular matrix, ECM)而锚定生长在培养表面。ECM通过和细胞表面的整合素(integrin)受体结合而形成黏着斑(focal adhesions)，黏着斑是一个由众多蛋白组成的高度有序的动态蛋白复合物，是细胞感受外界力学信号刺激的重要复合物。它通过整合素蛋白将细胞内应力纤维(stress fiber)和ECM连接起来[22,23]。应力纤维主要由肌动蛋白丝(actin filaments)和肌球蛋白(myosin)构成，细胞的各种形变及运动主要由它来介导。整合素介导的黏着斑引起的细胞收缩(contraction)作用会受到基质的抵制，随后在这个部位进一步产生更多的蛋白并沉积，这个过程使得细胞产生的张力在细胞-基质交界面处得到平衡，肌球蛋白会扰乱这个过程。细胞感受到外力作用后会激活胞浆内的信号通路如Rho　GTP酶和MAPK介导的信号通路活性，从而影响基因的表达和胚胎发育过程[24]。

ECM生物力学特性在细胞生理活动中的重要性已经在成纤维细胞和肿瘤细胞得到很好的研究[25, 26]，但ECM生物力学特性在干细胞分化中的作用尚知之甚少。2004年，McBeath等[27]研究发现，分离培养的MSCs在接触的纤连蛋白(fibronectin)面积不同的条件下可以改变其分化路径。当在小面积纤连蛋白上培养时，MSCs克隆岛呈现圆形并向脂肪细胞分化；当培养于较大面积的纤连蛋白上时，MSCs向成骨细胞分化，但该工作并没有进一步研究为什么细胞与硬基质表面接触的面积会影响干细胞的分化，是否基质蛋白的形状(geometry)可以影响干细胞的分化。2008年，Ruiz等[28]的研究发现证实了这一点。他们发现培养在圆形纤连蛋白上的MSCs在分化形成的多细胞结构中，中间的细胞较多的向脂肪分化，边缘的细胞较多的向成骨分化。而将细胞培养于正弦曲线形状上发现，细胞在凸面的向成骨分化，凹面的向脂肪分化，更为重要的是，该研究小组测量了细胞的受力情况，结果表明正弦曲线形状凸面边缘细胞受到的张力(tension)是凹面边缘的3倍，从而很好的证明了在这个过程中细胞所受的张力才是决定其不同分化命运的关键，而多细胞结构的形状和面积只是激发应力差异的因素。

除了细胞接触的基质蛋白面积、形状，还有一个重要的特性可以决定干细胞的分化命运，即基质弹性(elasticity)。在体内，不同组织微环境中的基质弹性不同。Engler等[29]采用了一个模拟体内不同基质弹性的方法，结果表明MSCs在定向分化过程中对基质弹性极度敏感。模拟脑部微环境的软基质(0.1－1 kPa)促进MSCs向神经系分化，模拟肌肉的中等强度的基质(8－17 kPa)促进向成肌细胞分化，模拟骨骼的硬基质(25－40 kPa)促进向成骨细胞分化。该研究的重大意义在于首次直接地证明了基质弹性是干细胞分化微环境中一个新的调节子，从而表明除了生长因子和基质分子的特定的配体-受体相互作用，局部微环境的物理特性在细胞功能和命运的决定中也是至关重要的。而随后的两项研究进一步表明，成骨细胞[30]和成纤维细胞[31]等已经分化的间质细胞与未分化的MSCs细胞在生物力学特性上存在着差异，为生物力学作用促进MSCs分化的理论研究进一步提供了支持证据。

对于基质蛋白介导的细胞张力促进干细胞分化的具体机制目前还知之甚少。但可以肯定的是，小G蛋白家族Rho在这个过程中发挥了重要作用[32](图2)。另外，基质介导细胞命运可能和调控了干细胞的有丝分裂方向有关[33]。目前的最新研究认为，哺乳动物细胞有丝分裂方向的定位主要由细胞黏附及其相关的在细胞分裂间期产生的牵引力(traction forces)控制，而不是此前认为的由细胞形状控制。细胞形状只是这些黏附、张力作用产生的现象或者

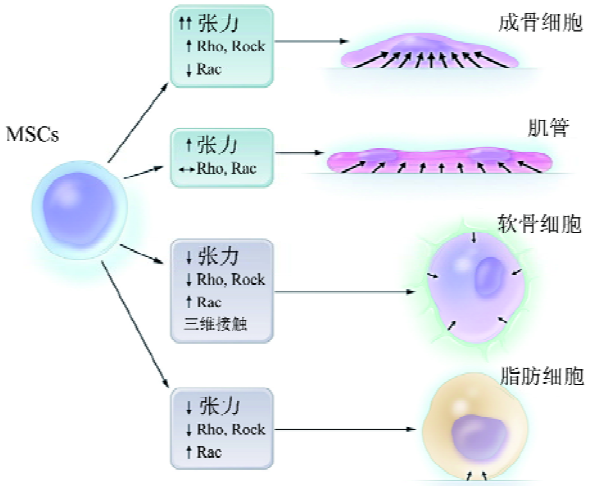

图2　Rho介导的细胞张力的产生促进MSCs的分化[32]

说是作用的结果[34]。

5 展望

在干细胞发育分化和组织器官形成的研究中，一系列多学科交叉融合的新理论和新技术还将会层出不穷，而生物力学调控与生物化学信号通路之间怎样协同发挥作用也将成为今后研究的重点。

5.1 生物力学信号和生物化学信号的协同作用 对于干细胞的发育分化和三维组织器官的形成，生物化学信号和生物力学信号似乎都是必需的。进一步的深入研究可能要将重点放在两者作用的相互协调上，即在发育过程中生物力学作用力是怎样转换成生物化学信号、基因表达及其功能改变的，而参与干细胞发育和细胞以及组织器官形态发生的分子信号通路的激活又是怎样产生干细胞及其子代细胞结构的生理变化的。

5.2 上皮组织发育分化过程中生物力学的调控作用 上皮组织来源的器官是体内最为复杂的器官。以肝脏为例，肝脏含有中胚层来源的造血细胞、肝星状细胞、成纤维细胞、窦状内皮细胞和内胚层来源的肝胆细胞，形态发生较为复杂，既包括管状样的血管、胆管结构，也包括发挥重要代谢功能的肝实质细胞，涉及到细胞的极性产生和维持、细胞排列等复杂过程，并受到流体剪切力、张力、挤压力(compression forces)等外力的综合作用，因此研究难度较大。目前比较清楚的是，肝脏的硬度(stiffness)和肝硬化以及癌症的发生密切相关[35, 36]。因此，对于肝脏干细胞发育分化过程中生物力学调控的研究不仅有助于拓宽人们对于干细胞发育分化调控机制的理解，同时，也有助于对肝硬化和肝癌等难治性肝脏疾病发病机制的理解，更有助于体外生物人工肝和组织化肝单元构建的实现及寻找新的、更有效的治疗药物。

[参 考 文 献]

[1] Keller R, Davidson LA, Shook DR. How we are shaped: the biomechanics of gastrulation. Differentiation, 2003, 71(3): 171-205

[2] Chapman WB. The effect of the heart-beat upon the development of the vascular system in the chick. Am J Anat, 1918, 23(1): 175-203

[3] Clark ER. Studies on the growth of blood vessels in the tail of frog. Am J Anat, 1918, 23(1): 37-88

[4] Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis *in vitro*. Nature, 1980, 288(5791): 551-6

[5] Luo Y, Ferreira-Cornwell M, Baldwin H, et al. Rescuing the N-cadherin knockout by cardiac-specific expression of N- or E-cadherin. Development, 2001, 128(4): 459-69

[6] le Noble F, Moyon D, Pardanaud L, et al. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. Development, 2004, 131(2): 361-75

[7] Lucitti JL, Jones EAV, Huang C, et al. Vascular remodeling of the mouse yolk sac requires hemodynamic force. Development, 2007, 134(18): 3317-26

[8] Gimbrone MA. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and athero-genesis. Am J Pathol, 1999, 155(1): 1-5

[9] 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(4): 1915-24

[10] Zeng LF, Xiao QZ, Margariti A, et al. HDAC3 is crucial in shear- and VEGF-induced stem cell differentiation toward endothelial cells. J Cell Biol, 2006, 174(7): 1059-69

[11] Dekker RJ, van Soest S, Fontijn RD, et al. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2). Blood, 2002, 100(5): 1689-98

[12] Schmelter M, Ateghang B, Helmig S, et al. Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. FASEB J, 2006, 20(8): 1182-4

[13] 要晖宇, 刘兵, 毛宁. 造血发育和内皮细胞的关系. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(1): 198-201

[14] Adamo L, Naveiras O, Wenzel PL, et al. Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis. Nature, 2009, 459(7250): 1131-5

[15] Koushik SV, Wang J, Rogers R, et al. Targeted inactivation of the sodium-calcium exchanger (Ncx1) results in the lack of a heartbeat and abnormal myofibrillar organization. FASEB J, 2001, 15(7): 1209-11

[16] Rhodes KE, Gekas C, Wang Y, et al. The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. Cell Stem Cell, 2008, 2(3): 252-63

[17] North TE, Goessling W, Peeters M, et al. Hematopoietic stem cell development is dependent on blood flow. Cell, 2009, 137(4): 736-48

[18] Pardanaud L, Eichmann A. Stem cells: the stress of forming blood cells. Nature, 2009, 459(7250): 1068-9

[19] Bartman T, Hove J. Mechanics and function in heart morphogenesis. Dev Dyn, 2005, 233(2): 373-81

[20] Iijima Y, Nagai T, Mizukami M, et al. Beating is necessary for transdifferentiation of skeletal muscle-derived cells into cardiomyocytes. FASEB J, 2003, 17(10): 1361-3

[21] Gwak SJ, Bhang SH, Kim IK, et al. The effect of cyclic strain on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. Biomaterials, 2008, 29(7): 844-56

[22] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell, 2002, 110(6): 673-87

[23] Bökel C, Brown NH. Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. Dev Cell, 2002, 3(3): 311-21

[24] Even-Ram S, Artym V, Yamada KM. Matrix control of stem cell fate. Cell, 2006; 126(4): 645-7

[25] Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. Science, 2005, 310(5751): 1139-43
[26] Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. Cancer Cell, 2005, 8(3): 241-54
[27] McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. Dev Cell, 2004, 6(4): 483-95
[28] Ruiz SA, Chen CS. Emergence of patterned stem cell differentiation within multicellular structures. Stem Cells, 2008, 26(11): 2921-7
[29] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell, 2006, 126(4): 677-89
[30] Titushkin I, Cho M. Modulation of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Biophys J, 2007, 93(10): 3693-702
[31] Titushkin I, Cho M. Distinct membrane mechanical properties of human mesenchymal stem cells determined using laser optical tweezers. Biophys J, 2006, 90(7): 2582-91
[32] Patwari P, Lee RT. Mechanical control of tissue morphogenesis. Circ Res, 2008, 103(3): 234-43
[33] Théry M, Racine V, Pepin A, et al. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. Nat Cell Biol, 2005, 7(10): 947-53
[34] Théry M, Bornens M. Cell shape and cell division. Curr Opin Cell Biol, 2006, 18(6): 648-57
[35] Castera L, Forns X, Alberti A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography. J Hepatol, 2008, 48(5): 835-47
[36] Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, et al. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. Hepatology, 2009, 49(6): 1954-61