

DOI: 10.13376/j.cblls/2021091

文章编号: 1004-0374(2021)07-0844-09

# 细胞外基质对细胞行为调控作用的研究进展

樊廷俊\*, 田梦, 赵君

(中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

**摘要:** 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是一种由水合大分子蛋白质及多糖组成的复杂网络结构, 构成组织的无细胞基质微环境。作为天然生物材料, ECM 一直是组织工程器官 / 组织体外制备的理想载体支架来源。随着天然组织中 ECM 对细胞影响的发现, ECM 调节细胞行为的生物化学作用越来越受到关注。该文系统概述了不同类型的 ECM 对细胞黏附、迁移、增殖和分化等细胞行为的影响, 重点分析了 ECM 对细胞行为的调控作用机理, 并阐述了基于模拟 ECM 的人工支架在器官 / 组织再生中的应用进展, 为全面了解 ECM 对细胞行为的调控作用机制及其再生应用潜能提供建议与参考。

**关键词:** 细胞外基质; 细胞黏附; 迁移; 增殖; 分化; 器官 / 组织再生

**中图分类号:** Q811; R318.08 **文献标志码:** A

## Progress in the regulation of extracellular matrix on cell behavior

FAN Ting-Jun\*, TIAN Meng, ZHAO Jun

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** Extracellular matrix (ECM) is a complex network structure composed of hydrated macromolecular proteins and polysaccharides, which constitutes the cell-free matrix microenvironment. As a natural biomaterial, ECM has always been an ideal source of biomaterials for the construction of the tissue engineering organ/tissue *in vitro*. With the discovery of the regulatory effect of ECM on cells in natural tissues, more and more attention has been paid to the biochemical effect of ECM on regulating cell behavior. In this article, the effects of ECM on cell adhesion, migration, proliferation and differentiation were systematically summarized, and the regulatory mechanisms of different ECM on cell behavior were analyzed. Furthermore, the application progress of artificial scaffolds based on ECM in tissue/organ regeneration was elaborated, which provided suggestions and reference for a comprehensive understanding of the regulatory mechanism of ECM on cell behavior and regeneration application.

**Key words:** extracellular matrix; cell adhesion; migration; proliferation; differentiation; organ/ tissue regeneration

细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 作为一种细胞分泌组装的蛋白质和多糖的复杂网络结构, 不仅能为细胞提供附着位点和结构支持, 还可以为调节细胞活性和器官 / 组织功能提供重要的生物信息<sup>[1]</sup>。根据 ECM 的主要成分和结构不同, 将其分为两种类型: 凝胶基质成分和纤维状蛋白成分<sup>[2]</sup>。其中凝胶基质成分主要是多糖类成分组成的水合凝胶样结构, 包括糖胺聚糖 (GAG) 和蛋白聚糖 (PG)。纤维状蛋白主要包括起结构支撑作用的胶原 (collagen) 和弹性蛋白 (elastin) 以及起黏结作用的纤连蛋白 (fibronectin, FN) 和层黏连蛋白 (laminin, LN)<sup>[3]</sup>。

上述 ECM 组件中不同亚型和组合赋予了 ECM 不同的功能, 对于维持机体的正常生理活动起着重要的作用。

ECM 通常由成纤维细胞分泌, 这种细胞的特征是具有广泛分布的高尔基体以及相对较大的内质网, 这些特征突显了成纤维细胞在合成和分泌 ECM 中的作用。不同生理、病理和反应条件也会调控细

收稿日期: 2021-03-25; 修回日期: 2021-04-28

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1106000)

\*通信作者: E-mail: tjfan@ouc.edu.cn

胞分泌 ECM 的数量、成分及构型, 如机械外力、高糖、高盐及外源药物环境等<sup>[4]</sup>。这种细胞-ECM 之间的相互作用调节了细胞功能和 ECM 重塑<sup>[5]</sup>, 从而为维持组织/器官的动态自我再生和更新提供了保障。

其中天然组织的再生受到 ECM 的高度调节, ECM 分子通过暴露其精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 序列结构域, 连接并激活整联蛋白, 进而通过胞内信号分子影响细胞骨架张力, 并诱导细胞形态及相关信号转导级联的改变, 最终影响基因的表达以改变细胞行为 (如细胞迁移、分化、增殖和凋亡)。

然而, 随着年龄的增长以及严重的伤害、疾病, 组织和器官的自我再生能力会发生衰退或损伤, 因此, 必须借助医疗设备进行替换或再生。早在 20 世纪初期, ECM 成分就开始作为生物材料用于人工器械的体外构建, 包括血管支架、人造髋关节、人工骨及人工角膜等, 用于病变组织或器官的治疗、修复或替代。在这些人工器械中, 过去的观念一直强调材料的惰性, 认为材料的“惰性”意味着它们无法提供足够的生物活性线索来触发组织工程所需的细胞功能, 即其对细胞无影响, 可以避免宿主生物的“生物排斥”。但随着对天然组织中 ECM 对细胞行为调控作用的发现, 以及越来越多的体外实验数据证明 ECM 成分及其造成的基质刚度变化对于调控细胞行为有着重要的作用, 人们发现 ECM 组件的组成和结构的变化不仅影响组织的整体结构和生物力学特性, 还影响细胞的传输信号和细胞应答, 细胞的行为因周围 ECM 的机械和生化特性变化而发生改变<sup>[6]</sup>, 表现出影响细胞的黏附、极化、细胞迁移、细胞的增殖以及调控细胞分化命运等<sup>[7]</sup>。因此, 本文对 ECM 在影响细胞黏附、迁移、增殖及分化等细胞行为中的作用机制进行了系统的概述, 并对其目前在人工支架中的应用进展进行了阐述, 同时展望了海洋生物资源作为理想器官/组织再生材料来源的可能性。

## 1 细胞如何感知ECM

细胞与 ECM 相互作用产生的牵引力会影响细胞骨架的张力, 并诱导细胞形态及相关信号转导级联反应的改变, 最终改变基因表达, 从而调节细胞的行为 (包括细胞黏附、迁移、增殖和分化) 以及器官/组织的再生<sup>[8]</sup>。如肌肉细胞中, 其表面的整联蛋白通过与 ECM 的黏附配体相互作用激活细胞

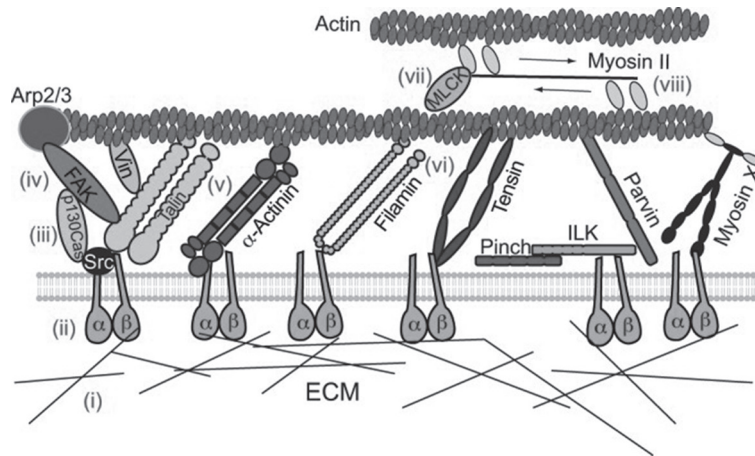
内的机械转导, 且这一过程会被细胞所在的 ECM 微环境的机械性能、组成和结构所调控<sup>[9]</sup>。

在初始阶段, 随着 ECM 分子中隐结构域的暴露, 延长了 ECM-整联蛋白 (捕获键) 的寿命并激活相关不同亚型的整联蛋白, 继而 p130Crk 相关底物蛋白 (p130 Crk-associated substrate, p130Cas) 的磷酸化水平增加, 这一过程会解除黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 的自抑制并增加其酪氨酸激酶活性, 进而激活踝蛋白 (talin) 并使其结构域中先前被隐藏的整联蛋白结合位点暴露; 踝蛋白与整联蛋白  $\beta$  尾结合, 激活肌球蛋白 II, 使肌球蛋白轻链激酶 (myosin light-chain kinase, MLCK) 磷酸化进而促使肌球蛋白 II-肌动蛋白相互作用产生收缩力, 该收缩力通过形成蛋白 (formin) 介导单个肌动蛋白丝聚合, 从而刺激肌动蛋白丝生长和肌动蛋白-肌球蛋白组装, 起始细胞对 ECM 的感知。在黏着斑成熟后, 肌球蛋白 II 的内源性收缩力成为驱动肌动蛋白丝聚合以及控制细胞运动的主要力量 (图 1)<sup>[10]</sup>。

整联蛋白通过蛋白适配器 [如踝蛋白、细丝蛋白 (filamin)、张力蛋白 (tensin)、parvin 和 (或) 肌球蛋白 X] 与肌动蛋白细胞骨架间接连接, 形成不同类型的细胞-ECM 相互作用, 包括新生黏附、局灶复合物、局灶黏附等。机械信号可以通过磷酸化/去磷酸化 GTP 酶和磷脂信号转导等的机械转导来调控细胞行为<sup>[8]</sup>。如细胞与 ECM 的机械相互作用可以激活受体型蛋白酪氨酸磷酸酶  $\alpha$  (RPTP- $\alpha$ ), 从而通过蛋白酪氨酸激酶 Fyn 磷酸化/去磷酸化提高 Rho-GTP 酶家族蛋白 Rac1 活性。活化的 Rac1 可以进一步诱导肌动蛋白聚合, 除调控细胞行为外, 还通过增加整联蛋白簇的数量进而提高 FAK 的磷酸化水平, 提高细胞在 ECM 上的附着强度。此外, FAK 还可以增加小 G 蛋白 Rho 活性, 以诱导应力纤维的形成<sup>[8]</sup>。上述 ECM 介导的与细胞间的相互作用, 最终导致细胞机械转导并影响细胞产生不同的行为。

## 2 ECM对细胞黏附行为的影响作用及分子调控机制

细胞黏附是一种重要且复杂的细胞行为, 是指从多细胞生物体中分离出来的细胞附着于 ECM 或另一种细胞的基本能力<sup>[11]</sup>。众所周知, 细胞黏附过程涉及广泛的分子相互作用, 包括受体-配体的结合、细胞骨架装配的调节以及细胞内信号通路的调控等<sup>[12]</sup>。一般来说, 有两种细胞黏附形式, 即



细胞感知ECM的分子传感机制为：(i)暴露ECM分子中的隐结构域；(ii)延长ECM-整联蛋白(捕获键)的寿命并激活相关不同亚型的整联蛋白；(iii)增加p130Cas底物结构域的磷酸化水平；(iv)解除FAK的自抑制并增加其酪氨酸激酶活性；(v)激活踝蛋白并使其结构域中先前被隐藏的整联蛋白结合位点暴露；(vi)踝蛋白与整联蛋白β尾结合；(vii)解除MLCK自抑制并激活肌球蛋白II；(viii)延长了肌球蛋白II-肌动蛋白键(捕获键)的寿命。p130Cas: p130Crk相关底物蛋白(p130 Crk-associated substrate); FAK: 黏着斑激酶(focal adhesion kinase); talin: 踝蛋白; MLCK: 肌球蛋白轻链激酶(myosin light-chain kinase); Myosin II: 肌球蛋白II; Actin: 肌动蛋白。

图1 细胞感知ECM的机制示意图<sup>[10]</sup>

细胞-细胞黏附和细胞-ECM黏附。通过这些相互作用，细胞可以感知外力和几何约束。细胞-细胞黏附主要由跨膜黏附分子(如钙黏蛋白)控制，而细胞-ECM黏附主要由整联蛋白介导<sup>[13]</sup>。其中细胞与ECM的黏附通过形成称为局灶性蛋白复合物的超分子蛋白复合物发生黏附，涉及到整联蛋白信号层、力转导层和肌动蛋白调节层，该纳米级的复合物有效地在ECM和肌动蛋白细胞骨架之间形成桥梁，介导细胞-基质的强烈黏附，并在细胞外分子和细胞质之间双向传递信息<sup>[14]</sup>。必须注意的是，细胞-细胞黏附和细胞-ECM黏附是相互依存的，这些过程负责将细胞组装成与ECM结合的组织并维持其3D结构<sup>[13]</sup>。通过这些相互作用，ECM的生物物理特征(例如成分、机械性能、表面形貌和几何学)直接传递给细胞或间接转化为细胞内生化学信号，以调节细胞行为和组织功能。

不同ECM对于细胞的黏附作用表现出类似的特性，ECM蛋白通常具有一个或多个细胞结合结构域，该结构域是由短的氨基酸序列组成的一级识别基序，例如RGD序列。最初在FN中鉴定出该序列，大多数细胞可以识别并结合RGD序列，该序列也存在于玻连蛋白(vitronectin)和LN等<sup>[15]</sup>。当ECM蛋白吸附到质膜表面时，蛋白质分子逐渐展开，其构象发生改变，暴露出隐藏在分子内部的活性位点，如RGD，而这些隐藏或暴露的活性位

点与不同亚型的整联蛋白结合，促进黏着斑的形成，激活细胞内肌动蛋白组织形成微丝束形成应力纤维，启动细胞的黏附<sup>[16]</sup>。对于FN的研究中发现，随着FN浓度的增大，细胞黏附能力显著增强，细胞黏附能力与FN浓度之间呈正相关，达到一定浓度后，细胞黏附能力达到最大值，超过该浓度值，增大浓度对细胞黏附能力的影响无显著性增加。LN和IV型胶原对细胞黏附的影响与FN相似，但作用明显弱于FN<sup>[17]</sup>。

除了ECM成分会影响细胞的黏附，ECM的刚度对细胞黏附也有非常重要的作用。ECM刚度由ECM组分的交联度和密度综合作用决定。人体中不同组织和器官具有不同的刚度，例如大脑中的组织非常柔软，其刚度的测量值低至10 Pa，而骨骼则具有非常坚硬的结构，高达 $10^9$  Pa<sup>[2]</sup>。体外大多数细胞单元更倾向于牢固地锚定到较硬的2D基质，而不是软基质。Pelham和Chang<sup>[18]</sup>研究发现，细胞能够感应周围环境的刚度，并以此调节其黏附结构和运动性。其中较硬基质可能会刺激细胞的FAK的酪氨酸磷酸化水平的增加，导致形成更加成熟稳定的黏着斑结构，促进细胞黏附。而在较软的基质上，细胞表现出较高的片足伸出/缩回活性，ECM-整联蛋白-细胞骨架之间的联系削弱，这些反应可能造成其黏附力的不稳定。

有趣的是，与细胞对体外2D基质的黏附相反，

在体内, 动态细胞对 3D 基质的黏附优先发生在柔韧的 3D 支架 ( $E \approx 1 \text{ kPa}$ ) 中, 但在坚硬的 3D 系统 ( $E \approx 30 \text{ } 100 \text{ kPa}$ ) 表现出稳定的细胞黏着性<sup>[19]</sup>, 推测 3D 基质之所以与 2D 基质上细胞表现出的黏附性质不同, 主要与在这两类基质中整联蛋白  $\alpha_5\beta_1$  和  $\alpha_v\beta_3$ 、桩蛋白 (paxillin)、FAK 酪氨酸磷酸化的水平以及其他细胞骨架成分的含量不同有关。相较于 2D 基质, 3D 基质上的细胞显示出增强的细胞生物学活性和狭窄的整联蛋白可使用性。虽然尚没有确切的解释来阐述体内独特的 3D 基质在结构、位置和功能性上与经典描述的体外细胞黏附性质的不同的原因, 但不可否认的是其可能更能代表活体生物中细胞黏附的特性<sup>[18]</sup>。

细胞与 ECM 的黏附是一个多步骤过程, 包括 3 个阶段 (图 2), 即沉降阶段、附着阶段和扩展阶段<sup>[20]</sup>。细胞在黏附阶段发生形态学改变、细胞骨架的被动变形、主动重塑以及由细胞内肌动蛋白细胞骨架与整联蛋白的跨膜蛋白及衔接蛋白结合 (例如  $\alpha$ -肌动蛋白、纤维蛋白、踝蛋白、纽蛋白) 等过程<sup>[21]</sup>。初始阶段, 细胞与基质附着, 细胞逐渐扁平化和扩展, 组织肌动蛋白骨架组装, 并促进细胞与基质之间黏着斑的形成。进入第二阶段后, 细胞和基质之间的黏附相互作用是由特定整联蛋白介导黏附驱动, 从单个受体-配体的结合开始, 随后受体-配体键数量迅速增加, 从而增加了总黏附强度<sup>[22]</sup>。在此阶段, 整联蛋白和 ECM 成分实现细胞和表面之间的机械和化学相互作用, 由于接触面积的扩大和细胞的减少, 细胞的形态变得扁平。在黏附的最后一个阶段 (扩散阶段), 完成局灶性黏附复合物的形成, 完成细胞骨架的主动重组, 细胞与 ECM 之间的黏附度增强, 细胞达到最大扩散区域<sup>[22]</sup>。

### 3 ECM对细胞迁移行为的影响作用及分子调控机制

除了细胞黏附, ECM 调控的另一个重要的细胞行为是细胞迁移。不同种类的细胞具有不同的运动类型, 细胞迁移是建立和维持多细胞生物形成正确组织的基础。在成年生物中, 细胞迁移对于适当的免疫反应、伤口修复和组织稳态是必不可少的。此外, 各种病理发展中常见异常的细胞迁移。人体的 ECM 具有成分梯度, 该梯度产生的自然驱动力可以指导细胞迁移 (趋化性)。例如, 体内感染部位需要内皮表面黏附蛋白的丰度梯度, 从而将 T 淋巴细胞募集到内皮细胞周围; 胶原和 LN 丰度梯度被发现与血管生成和癌症侵袭有关<sup>[23]</sup>。

ECM 通过其结构、组成和物理特性影响细胞的迁移轨迹和迁移速度。研究表明, ECM 具有指导细胞迁移的能力。例如, 称为触觉的细胞迁移<sup>[24]</sup>, 在黏附梯度作用下, 细胞从较低 ECM 浓度的区域迁移至较高浓度。但是, 如果 ECM 的浓度过高, 细胞则会因为承受的黏附力过大而无法继续迁移。因此, 迁移速度也取决于 ECM 的浓度。由于细胞迁移是通过细胞与 ECM 协调相互作用发生的, 因此, 细胞迁移的速度与 ECM 浓度呈钟形函数关系, 即在低浓度下, 迁移速度随着 ECM 浓度的升高而增加, 到达峰值后, 随着浓度升高而表现出迁移速度逐渐下降<sup>[25]</sup>。

Hartman 等<sup>[26]</sup> 研究表明, 迁移速度和方向还受 ECM 组成的影响。他们发现成纤维细胞在用 FN 包被形成的刚度梯度支架上会有趋硬性迁移, 而在 LN 或 FN/LN 混合物包被的基质支架上, 培养的成纤维细胞则表现出随机迁移的现象。这说明 ECM

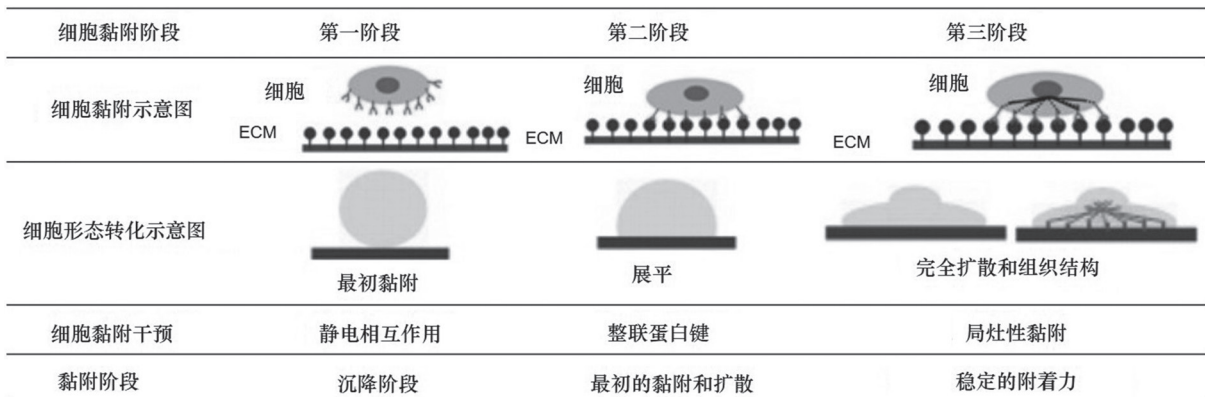


图2 体外细胞黏附过程示意图<sup>[22]</sup>

类型是细胞对机械梯度反应的关键决定因素。尽管需要进一步研究阐明导致这种结果的机制,但对此行为的一种可能解释是 FN 和 LN 联合包被会导致整联蛋白之间的串扰<sup>[27]</sup>。LN 与整联蛋白的结合可能具有下游效应,导致细胞通过 FN 对机械梯度的反应方式发生变化,从而影响迁移的趋硬变化。

ECM 的机械性能不仅能够调节细胞黏附,而且能够调控细胞迁移。使用机械梯度来调节细胞迁移的过程称为“机械作用”,其可以分为 4 种类型:durotaxis (刚度介导的迁移)、plithotaxis (拉力诱导的定向集体迁移)、ECM 变形诱导的单迁移和 cohesotaxis (由细胞内张力梯度引导的迁移)。Petrie 和 Yamada<sup>[28]</sup> 研究发现,在具有不同机械特性的基质中,细胞可能以不同的模式迁移。如非线性弹性材料会触发细胞片足的铺展,而弹性材料则会促进细胞伪足的伸出和迁移。究其原因可能为肌动蛋白结合的肌球蛋白 II 使肌动蛋白丝保持低张力水平,肌动蛋白丝进而通过细胞-ECM 黏附与 ECM 偶联。其中 RhoA-ROCK-肌球蛋白 II 信号轴能够感知 ECM 结构的变化,并通过增加肌动球蛋白的收缩力做出响应,从而调节细胞的迁移<sup>[29]</sup>。

细胞迁移的过程表现为整联蛋白与配体结合后,其  $\beta$  亚基与细胞内细胞骨架蛋白如踝蛋白、 $\alpha$ -肌动蛋白和丝质蛋白 (fibronin) 结合。而细胞骨架蛋白则直接与肌动蛋白或其他锚蛋白结合,继而将整联蛋白连接到细胞肌动蛋白上,使得整联蛋白聚集并在细胞和 ECM 之间形成黏着斑。这种相互作用通过将整联蛋白锁定在构象中,产生强作用力共价键,使得整联蛋白更紧密地结合到 ECM 配体上。黏着斑的形成伴随着 FAK 及衔接蛋白的募集,继而还会激活细胞迁移相关信号通路引起细胞迁移<sup>[30]</sup>。

尽管迁移类型多种多样,但细胞迁移的机制涉及 4 个步骤的重复:突出、黏附、收缩和回缩,但不同的类型有一些细微差别。细胞迁移过程中,上述步骤必须在时间和空间上协调一致。其中,膜突出是形成新的黏附所必需的,如果在黏着斑成熟之前发生收缩,则新的黏着斑将无法维持有效的收缩力。空间调节则必须防止在整个细胞外围出现随机的突起和收缩,以避免混乱的细胞运动和细胞位移的停滞。前后轴的方向决定了细胞迁移的方向,其维持性也决定了迁移方向的持久性。迁移细胞的极化组织与活性信号分子的极化分布一致。其中, Rho 家族的小 G 蛋白,包括研究最多的 RhoA、Rac1 和

细胞分裂周期蛋白 Cdc42,是细胞迁移的关键调节因子<sup>[31]</sup>。与 GTP 结合的 Rac 和 Cdc42 是活性形式,主要积累在细胞的前缘,在那里它们促进了细胞的突起并启动黏附。此外, Rho 活性对于黏附位点的成熟和细胞收缩也至关重要。

#### 4 ECM对细胞增殖行为的影响作用及分子调控机制

具有 ECM 成分的底物通常都会增加细胞的增殖行为。实验表明,来源于骨髓的间充质干细胞、真皮成纤维细胞、成骨细胞和骨肉瘤细胞的 ECM 预铺于培养板后均可以促进间充质干细胞的增殖<sup>[32]</sup>。其中 LN 的亲域可以通过调节其构象来调控整联蛋白的结合方式,从而帮助细胞在增殖和分化行为间切换<sup>[33]</sup>,而整联蛋白  $\alpha 5/\beta 1$  可以与 LN 结合通过激活 EGF 受体诱导上皮细胞增殖<sup>[34]</sup>。

ECM 刚度也与细胞增殖密切相关。ECM 上的机械信息主要通过机械转导转移到细胞中,从而开启细胞增殖的促有丝分裂信号通路<sup>[35]</sup>。许多类型的细胞表现出在软基质上增殖能力的下降。如干细胞在 10 Pa 的软基质上增殖活性会被抑制,通常它们在不小于 100 Pa 的基质上才具有增殖能力。细胞的活动是由收缩的细胞骨架产生的力与 ECM 的刚度之间的动态平衡决定的。肿瘤细胞在软基质 ( $\approx 1$  kPa) 上显示出有限的增殖,而硬质基质 ( $\approx 12$  kPa) 可能通过促使细胞快速形成应力纤维以及黏着斑成熟而极大地增加细胞增殖<sup>[36]</sup>。同时,细胞增殖还会受到表面粗糙度的影响。例如,与平坦的基质相比,粗糙的基质促进了细胞的增殖。这可能是因为粗糙的基质可以激活 Rac 介导的信号转导,进而激活细胞骨架的体内组装,从而改善细胞的增殖<sup>[37]</sup>。

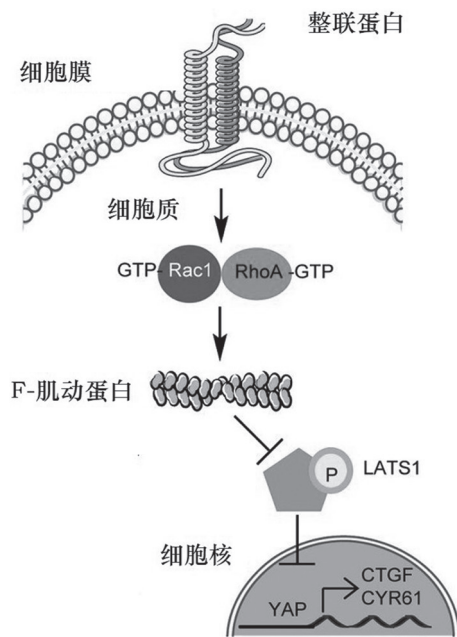
YAP/TAZ 是两个与细胞增殖高度相关的转录调节因子,细胞中的 YAP/TAZ 活性直接受到其形状和极性的控制,而细胞形状和极性又由细胞骨架结构决定<sup>[38]</sup>。这些本质上是物理信号,包括 ECM 的拓扑结构、刚度以及细胞附着于另一细胞所产生的力<sup>[39]</sup>。值得注意的是,细胞通过调节周围 ECM 的组成和精细的 3D 组织,继而重新组织细胞-细胞黏附,响应机械应力变化。因此,由细胞骨架收缩产生的向内定向的力与 ECM 刚性及其他细胞或流体流动拉动的外力总是处于一个动态平衡。

YAP 和 TAZ 活性受 F-肌动蛋白细胞骨架的构象和张力的调节,而 F-肌动蛋白的细胞骨架又受

到细胞黏附底物的影响。当细胞铺在大而硬的基质上时, 细胞会扩散, 此时细胞表现出 ROCK 和非肌肉肌球蛋白 II 驱动的高细胞骨架张力, 激活 YAP/TAZ 入核, 进而激活 YAP/TAZ 下游的增殖相关基因 CTGF 和 CYR61 (图 3)<sup>[40]</sup>。相反地, 在较软的或更小的基质上, 细胞会黏附继而导致 YAP 和 TAZ 的胞质滞留和活性抑制<sup>[41]</sup>。

在机械转导领域中一种公认的理论是 YAP 定位仅取决于底物刚度, 软底物诱导胞质 YAP, 而硬底物诱导核 YAP。Stanton 等<sup>[19]</sup>在研究中证明了细胞中的 YAP 易位不仅取决于底物的刚度, 还取决于用作生化配体的 ECM 类型。他们选择了 4 种在基质中含量丰富的主要 ECM 类型, 它们被广泛用作支持细胞黏附的涂层, 包括 FN、I 型胶原、IV 型胶原和 LN。触发核 YAP 的 ECM 蛋白涂层密度的阈值范围取决于 ECM 类型和底物硬度。对于所有 4 种测试的 ECM 类型, 变化的 ECM 密度可以进一步调节 YAP 易位。但是, 导致核 YAP 的配体密度范围在不同的 ECM 类型之间有所不同。

各种 ECM 类型对 YAP 产生影响作用可能由几



细胞膜外信号与整联蛋白受体起作用以激活 RhoA 和 Rac1, 增加应力纤维装配, F-肌动蛋白积累抑制 LATS1 磷酸化, 触发 YAP 易位进入细胞核, 并最终启动 YAP 依赖性转录。LATS1: 大肿瘤抑制基因 (large tumor suppressor gene 1); CTGF: 结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor); CYR61: 富半胱氨酸蛋白 61 (cysteine-rich angiogenic inducer 61)。

图3 ECM对细胞增殖行为的分子调控机理<sup>[40]</sup>

个因素解释。首先, 不同的 ECM 类型表现出不同的掺入效率和分布。例如, 可以与聚丙烯酰胺表面结合的残基的可用性。其次, 先前的研究表明, 改变 ECM 类型可以改变细胞扩散行为, 这是与机械转导相关的细胞命运决定。使用 FN 包被的基质, 以前的研究已经报道了增加配体密度会增加细胞面积。此外, 改变 ECM 类型还可以以不同的方式调节细胞牵引力。一项研究直接比较了在涂有相似浓度的 I 型胶原或 FN 的水凝胶上培养细胞的牵引力的差异, 结果表明, 对于肌上皮细胞, FN 涂层上细胞的牵引力高于 I 型胶原<sup>[42]</sup>。所有这些因素都可能共同导致观察到的 YAP 易位差异, 以响应变化的 ECM 类型和密度。

细胞通过黏附继而感知基质刚度继而影响细胞增殖, 整联蛋白起到了重要作用。不同类型 ECM 激活 YAP 易位所需的特定整联蛋白亚基不同。研究发现, FN 可以激活整联蛋白  $\alpha_1$ ; I 型胶原和 IV 型胶原可以激活整联蛋白  $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_1$ ; LN 可以激活整联蛋白  $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_1$ 。虽然以前的文献显示不同的 ECM 蛋白需要不同的整联蛋白亚基来支持细胞黏附, 但整联蛋白亚基在调节 YAP 易位中的作用仍不清楚<sup>[19]</sup>。

## 5 ECM对细胞分化行为的影响及分子调控机制

ECM 对于细胞分化行为影响作用机制的实验通常以间充质干细胞作为研究对象。间充质干细胞是一类能分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞的多能干细胞, 其通常可以受到 ECM 的组成、机械特性及形貌的调控从而指导干细胞的命运<sup>[43]</sup>。

各种 ECM 衍生的蛋白质和 (或) 肽具有调节细胞分化的功能。例如, 将 LN、FN、硫酸乙酰肝素、I 型胶原、IV 型胶原或它们的组合引入基质上, 可以选择性地指导神经发生、肌发生和成骨生成<sup>[44]</sup>。

ECM 的机械性能也能引起细胞分化潜能的变化。细胞通过机械转导从 ECM 感知机械信号, 这涉及细胞内黏着斑的形成、细胞骨架网络的重塑以及分子马达的组装等。这些复杂的动态过程调节细胞形状和细胞命运, 并诱导细胞表达用于重塑 ECM 的新物质。如前述, 细胞与 ECM 的相互作用在调节细胞功能 (包括细胞黏附、迁移和增殖) 中起着重要作用, 这些功能是触发细胞分化成特定谱系的关键因素<sup>[45]</sup>。

目前已有大量的研究围绕 ECM 的机械性能如何调节细胞分化展开。公认的是, 干细胞在具有组

织样硬度的基质上优先分化成特定的细胞谱系<sup>[46]</sup>。如弹性模量为 30~35 kPa 的硬基质有利于成骨生成, 软质基质 (< 1 kPa) 则会促进神经发生, 而中度刚度 ( $\approx 10$  kPa) 则有利于成肌或成脂分化。分化的细胞可以通过肌动蛋白-肌球蛋白产生相等的牵引力来重塑 ECM, 从而加速组织的再生过程<sup>[47]</sup>。研究表明, 抑制非肌肉细胞中的肌球蛋白可以消除这些间充质干细胞刚度依赖性的分化, 这意味着肌动蛋白-肌球蛋白的收缩可能是将有关 ECM 刚度的信息传递到细胞中以调节其细胞命运的必要条件。

此外, ECM 的微观形貌特征还能够调节细胞骨架收缩和细胞内张力来指导干细胞分化<sup>[48]</sup>。具有较小周长和较低纵横比的表面会促进干细胞向成脂分化, 具有较大周长和较高纵横比的表面可促进干细胞向成骨分化。

目前发现 ECM 影响细胞分化的机制主要是 ECM 与整联蛋白相互作用通过影响相关信号通路并激活核内专一转录因子的表达来调控细胞分化。Pennacchio 等<sup>[49]</sup>发现, 基质硬度增加可以激活 FAK-ERK 信号通路, 而该通路的激活对于间充质干细胞的成骨分化具有非常重要的调控作用。研究表明, 硬度为 26.12 kPa 的基质能够激活整联蛋白  $\alpha_2\beta_1$ , 进而激活 FAK-ERK1/2, 诱导脐带间充质干细胞的成骨分化标志 ALP 和 RUNX2 表达增多。ECM 改变激活的信号蛋白分子 FAK 在整联蛋白  $\alpha_2\beta_1$  诱导脐带间充质干细胞成骨分化的过程中起到了关键的调节作用。

RhoA 是一种小分子 GTP 酶, 由 GTP 酶激活蛋白 (GAPs) 调控 RhoA 在与 GTP 结合的活化状态和与 GDP 结合的非活化状态之间切换, 在细胞内发挥着“分子开关”的作用。当 GAPs 活化时, RhoA 能够促进肌动球蛋白的收缩性, 从而调节细胞骨架发生变化<sup>[50]</sup>。其中, RhoA 及其下游的 ROCK 在增加肌动球蛋白的收缩力促使细胞迁移的同时, ROCK 还可参与到细胞的成骨分化中。有研究表明, 在增加基质硬度诱导干细胞成骨分化的过程中, ROCK、FAK 和 ERK1/2 激酶的活性均有显著增加, 在此过程中, 抑制 FAK 和 ROCK 的活性则可以导致成骨标志物的表达降低, 抑制细胞的成骨分化。此外, ROCK 还可以调节 FAK 和 ERK1/2 的表达。综上所述, RhoA 及其下游的 ROCK 也参与调控了细胞的定向分化过程。

研究发现, 在基质硬度的调控下, 骨形态发生蛋白 (BMP)-2 可以通过与整联蛋白  $\beta_3$  相互作用,

通过激活 Smad 信号分子激活转录, 从而对细胞的命运进行调控。研究发现, 在分别模拟肌肉 (13~17 kPa) 和类骨质 (45~49 kPa) 的基质上预铺有 BMP-2 的模拟物, 两种基质均能诱导细胞向成骨细胞方向分化, 而在更软的基质上 (0.5~3.5 kPa) 上, BMP-2 却不能引起细胞的分化。同时, Smad1/5/8 信号分子被抑制后也会减弱细胞的成骨分化, 说明基质硬度诱导干细胞成骨分化是通过 BMP/Smad 信号通路来实现的<sup>[51]</sup>。虽然已有大量的研究围绕 ECM 如何调控细胞分化展开, 但仍有很多未解决的问题, 如通常只用单一研究因素 (如基质硬度) 来研究调控细胞分化的影响机制, 而忽略了体内复杂的环境。因而, 如何更好模拟体内环境进行研究, 从而增加干细胞在体内的稳定分化或许会成为下一个研究目标。

## 6 ECM在器官/组织再生中的应用

根据组织特征 (如成分、机械性能、形貌和 3D 几何形状), 模拟 ECM 仿生设计的人工支架发挥对细胞黏附、迁移、增殖及分化的调控作用, 进而有效地利用组织工程学使组织/器官再生成为可能。

胶原是最早被应用于器官/组织再生中的生物材料, 其生物相容性好、低免疫原性、可降解及助凝血, 目前已经被广泛的应用于组织工程皮肤、骨组织、心脏、气管及血管组织的再生中<sup>[52]</sup>。过去对于胶原的研究主要集中在陆地哺乳动物中, 近年来随着海洋资源的开发与利用, 人们发现海洋生物中胶原的来源广泛, 且与陆地动物相比, 海洋来源具备诸多优点, 包括生物毒性几乎可以忽略不计、相对分子质量低、炎症反应极小、生物相容性好及宗教和道德约束少等。袁晓龙等<sup>[53]</sup>利用来自太平洋鳕鱼的纯化鱼皮胶原体外构建出了三维鱼类胶原支架, 为其作为载体支架用于组织工程角膜的体外构建研究提供了可能。同时除常规的脊椎动物如鱼类外, 无脊椎动物和结壳珊瑚藻类也是胶原最丰富和潜在的来源, 因为它们具有蛋白质成分和矿化过程 (如钙化海洋无脊椎动物) 的类似特征, 使得它们在成为骨植入应用材料中具备得天独厚的优势<sup>[54]</sup>。

PGs 由于其生物相容性好、亲水性佳及可降解等使得其成为器官/组织再生中的关键部件。目前, 最常用的多糖包括壳聚糖、透明质酸、纤维素和海藻酸钠, 约占组织/器官再生研究的 70%<sup>[55]</sup>。

其中, 壳聚糖是一种天然存在的黏多糖, 广泛存在于海洋甲壳类动物、昆虫和真菌细胞壁的外骨

髓中。壳聚糖及其衍生物由于其独特的物理化学特性为组织/器官再生提供了各种优势。如其可以通过简单程序塑造成多孔支架结构, 并且它易与各种天然和合成聚合物形成混合物<sup>[56]</sup>, 同时其可为生物活性分子(LN、含有肽/蛋白质的RGD、 $\gamma$ -聚葡萄糖酸等)的结合提供机会, 从而支持细胞生长、分化和增殖。除上述特性外, 固有的抗菌特性、生物降解性和生物相容性使壳聚糖成为组织工程应用的热门选择, 目前已被广泛应用于组织工程皮肤、骨、软骨、神经、血管及牙科植入物的体外构建中<sup>[57]</sup>。

## 7 总结与展望

ECM的组成和结构的变化不仅影响机体的整体结构和生物力学特性, 还影响传输到细胞的信号, 从而调节细胞的应答。随着越来越多关于ECM调控细胞黏附、驱动细胞极化、增强细胞迁移、调节细胞增殖及指导细胞分化等研究的发现, 如何精细调节这些ECM的物理参数并将其最佳整合到支架中一直是并且将是组织/器官开发应用中有效“真实”模拟移植物的挑战性课题。同时, 大量海洋生物资源作为ECM蛋白的来源库, 目前已经被广泛应用于各类组织工程产品的开发, 势必也将成为该领域的研究热点。

### [参 考 文 献]

- [1] Gresham RCH, Bahney CS, Leach JK. Growth factor delivery using extracellular matrix-mimicking substrates for musculoskeletal tissue engineering and repair. *Bioact Mater*, 2020, 6: 1945-56
- [2] Petersen EV, Chudakova DA, Skorova EY, et al. The extracellular matrix-derived biomarkers for diagnosis, prognosis, and personalized therapy of malignant tumors. *Front Oncol*, 2020, 10: 575569
- [3] Sergi R, Bellucci D, Cannillo V. A review of bioactive glass/natural polymer composites: state of the art. *Materials (Basel)*, 2020, 13: 5560
- [4] Avagliano A, Granato G, Ruocco MR, et al. Metabolic reprogramming of cancer associated fibroblasts: the slavery of stromal fibroblasts. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 6075403
- [5] Madl CM, Heilshorn SC. Bioorthogonal strategies for engineering extracellular matrices. *Adv Funct Mater*, 2018, 28: 1706046
- [6] Kim HD, Amirthalingam S, Kim SL, et al. Biomimetic materials and fabrication approaches for bone tissue engineering. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6: 1700612
- [7] Zhu M, Li W, Dong X, et al. *In vivo* engineered extracellular matrix scaffolds with instructive niches for oriented tissue regeneration. *Nat Commun*, 2019, 10: 4620
- [8] Mierke CT. Mechanical cues affect migration and invasion of cells from three different directions. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 583226
- [9] Srivastava P, Kilian KA. Micro-engineered models of development using induced pluripotent stem cells. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 357
- [10] Roca-Cusachs P, Iskratsch T, Sheetz MP. Finding the weakest link: exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways. *J Cell Sci*, 2012, 125: 3025-38
- [11] Shinde A, Illath K, Gupta P, et al. A review of single-cell adhesion force kinetics and applications. *Cells*, 2021, 10: 577
- [12] Manou D, Caon I, Bouris P, et al. The complex interplay between extracellular matrix and cells in tissues. *Methods Mol Biol*, 2019, 1952: 1-20
- [13] McMillen P, Holley SA. Integration of cell-cell and cell-ECM adhesion in vertebrate morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 36: 48-53
- [14] Han SJ, Azarova EV, Whitewood AJ, et al. Pre-complexation of talin and vinculin without tension is required for efficient nascent adhesion maturation. *Elife*, 2021, 10: e66151
- [15] Chen J, Zou X. Self-assemble peptide biomaterials and their biomedical applications. *Bioact Mater*, 2019, 13: 120-31
- [16] Hwang YJ, Jung GS, Jeon WB, et al. Arg-Gly-Asp-modified elastin-like polypeptide regulates cell proliferation and cell cycle proteins via the phosphorylation of Erk and Akt in pancreatic  $\beta$ -cell. *Heliyon*, 2020, 6: e0918
- [17] 吴群, 忻勤芳, 祝晓丽, 等. 细胞外基质对舌鳞癌Tca8113细胞黏附性及迁移性的影响. *实用口腔医学杂志*, 2004, 20: 235-8
- [18] Pelham RJ Jr, Chang F. Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *schizosaccharomyces pombe*. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 235-44
- [19] Stanton AE, Tong X, Yang F. Extracellular matrix type modulates mechanotransduction of stem cells. *Acta Biomater*, 2019, 96: 310-20
- [20] Fujita M, Somasundaram V, Basudhar D, et al. Role of nitric oxide in pancreatic cancer cells exhibiting the invasive phenotype. *Redox Biol*, 2019, 22: 101158
- [21] Mierke CT. The matrix environmental and cell mechanical properties regulate cell migration and contribute to the invasive phenotype of cancer cells. *Rep Prog Phys*, 2019, 82: 064602
- [22] Khalili AA, Ahmad MR. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 18149-84
- [23] Zheng Y, Nan H, Liu Y, et al. Modeling cell migration regulated by cell extracellular-matrix micromechanical coupling. *Phys Rev E*, 2019, 100: 043303
- [24] Li X, Wang J. Mechanical tumor microenvironment and transduction: cytoskeleton mediates cancer cell invasion and metastasis. *Int J Biol Sci*, 2020, 16: 2014-28
- [25] Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, et al. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 1997, 385: 537-40



- [26] Hartman CD, Isenberg BC, Chua SG, et al. Extracellular matrix type modulates cell migration on mechanical gradients. *Exp Cell Res*, 2017, 359: 361-6
- [27] Qu C, Bao Z, Zhang X, et al. A thermosensitive RGD-modified hydroxybutyl chitosan hydrogel as a 3D scaffold for BMSCs culture on keloid treatment. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125: 78-86
- [28] Petrie RJ, Yamada KM. At the leading edge of three-dimensional cell migration. *J Cell Sci*, 2012, 125: 5917-26
- [29] Morales X, Cortés-Domínguez I, Ortiz-de-Solorzano C. Modeling the mechanobiology of cancer cell migration using 3D biomimetic hydrogels. *Gels*, 2021, 7: 17
- [30] Zhan X. Effect of matrix stiffness and adhesion ligand density on chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*, 2020, 108: 675-83
- [31] Song S, Cong W, Zhou S, et al. Small GTPases: structure, biological function and its interaction with nanoparticles. *Asian J Pharm Sci*, 2019, 14: 30-9
- [32] Cai R, Kawazoe N, Chen G. Influence of surfaces modified with biomimetic extracellular matrices on adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells and osteosarcoma cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 126: 381-6
- [33] Parisi L, Toffoli A, Ghezzi B, et al. A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface. *Jpn Dent Sci Rev*, 2020, 56: 50-5
- [34] Hou S, Hang Q, Isaji T, et al. Identification of the minimal *N*-glycosylation on integrin  $\alpha_5\beta_1$  required for its inhibitory effect on EGFR signaling and cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 523: 226-32
- [35] Chen CA, Cheng YC, Hwang JC, et al. Cyclin D1 expression in podocytes: regulated by mitogens in collaboration with integrin-extracellular matrix interaction through extracellular signal-regulated kinase. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2012, 237: 516-23
- [36] You Y, Zheng Q, Dong Y, et al. Matrix stiffness-mediated effects on stemness characteristics occurring in HCC cells. *Oncotarget*, 2016, 7: 32221-31
- [37] Zmurchok C, Holmes WR. Simple Rho GTPase dynamics generate a complex regulatory landscape associated with cell shape. *Biophys J*, 2020, 118: 1438-54
- [38] Dasgupta I, McCollum D. Control of cellular responses to mechanical cues through YAP/TAZ regulation. *J Biol Chem*, 2019, 294: 17693-706
- [39] D'Urso M, Kurniawan NA. Mechanical and physical regulation of fibroblast-myofibroblast transition: from cellular mechanoreponse to tissue pathology. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 609653
- [40] Zhang YL, Li Q, Yang XM, et al. SPON2 promotes M1-like macrophage recruitment and inhibits hepatocellular carcinoma metastasis by distinct integrin-Rho GTPase-hippo pathways. *Cancer Res*, 2018, 78: 2305-17
- [41] Shen AR, Zhong X, Tang TT, et al. Integrin, exosome and kidney disease. *Front Physiol*, 2021, 11: 627800
- [42] Rens EG, Merks RMH. Cell shape and durotaxis explained from cell-extracellular matrix forces and focal adhesion dynamics. *iScience*, 2020, 23: 101488
- [43] Iacobazzi D, Swim MM, Albertario A, et al. Thymus-derived mesenchymal stem cells for tissue engineering clinical-grade cardiovascular grafts. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24: 794-808
- [44] Kothapalli CR, Kamm RD. 3D matrix microenvironment for targeted differentiation of embryonic stem cells into neural and glial lineages. *Biomaterials*, 2013, 34: 5995-6007
- [45] Lee JH, Kim DH, Lee HH, et al. Role of nuclear mechanosensitivity in determining cellular responses to forces and biomaterials. *Biomaterials*, 2019, 197: 60-71
- [46] Guan S, Zhang K, Li J. Recent advances in extracellular matrix for engineering stem cell responses. *Curr Med Chem*, 2019, 26: 6321-38
- [47] Lv H, Li L, Zhang Y, et al. Union is strength: matrix elasticity and microenvironmental factors codetermine stem cell differentiation fate. *Cell Tissue Res*, 2015, 361: 657-68
- [48] Elsafadi M, Shinwari T, Al-Malki S, et al. Convergence of TGF $\beta$  and BMP signaling in regulating human bone marrow stromal cell differentiation. *Sci Rep*, 2019, 9: 4977
- [49] Pennacchio FA, Nastały P, Poli A, et al. Tailoring cellular function: the contribution of the nucleus in mechanotransduction. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 8: 596746
- [50] Dalby MJ, Giannaras D, Riehle MO, et al. Rapid fibroblast adhesion to 27 nm high polymer demixed nano-topography. *Biomaterials*, 2004, 25: 77-83
- [51] Mombini S, Mohammadnejad J, Bakhshandeh B, et al. Chitosan-PVA-CNT nanofibers as electrically conductive scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Int J Biol Macromol*, 2019, 140: 278-87
- [52] 黄成, 罗旭松. 脱细胞真皮基质在组织工程与再生医学中的应用. *组织工程与重建外科杂志*, 2020, 16: 65-6
- [53] 袁晓龙, 徐彬, 樊廷俊. 三维鱼类胶原支架的制备及其生物相容性研究. *山东大学学报(理学版)*, 2016, 51: 36-42
- [54] Macha II, Ben-Nissan B. Marine skeletons: towards hard tissue repair and regeneration. *Mar Drugs*, 2018, 16: 225
- [55] Tchobanian A, Van Oosterwyck H, Fardim P. Polysaccharides for tissue engineering: current landscape and future prospects. *Carbohydr Polym*, 2019, 205: 601-25
- [56] Rajagopal K, Ramesh S, Walter NM, et al. *In vivo* cartilage regeneration in a multi-layered articular cartilage architecture mimicking scaffold. *Bone Joint Res*, 2020, 9: 601-12
- [57] Lekshmi G, Sana SS, Nguyen VH, et al. Recent progress in carbon nanotube polymer composites in tissue engineering and regeneration. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 6440