

心肌样软基质与玻璃硬基质对 CD34⁺ 细胞 向内皮系细胞分化的影响

张书宁, 马鑫, 杨文龙, 董震, 姚康, 朱宏, 王鹏, 邹云增, 杨向东, 孙爱军, 葛均波
(复旦大学附属中山医院心内科 上海市心血管临床医学中心 上海市心血管病研究所, 上海市 200032)

[关键词] 心肌组织; CD34; 细胞分化; 细胞外基质

[摘要] **目的** 比较心肌组织样软基质与玻璃硬基质对小鼠骨髓 CD34⁺ 及 CD34⁻ 细胞亚群向内皮系细胞分化的差异。**方法** 利用原子力显微镜检测正常 Balb/c 小鼠心肌组织硬度(弹性模量 \approx 15 kPa), 采用聚丙烯酰胺凝胶制备心肌样软培养基底铺于玻璃培养皿中, 利用密度梯度离心法及免疫磁珠分选法收集小鼠骨髓 CD34⁺ 及 CD34⁻ 细胞, 分别于心肌样软基底及玻璃硬基底培养皿(弹性模量 $>$ 1 GPa) 中进行细胞培养, 培养 7 天后, 利用激光共聚焦显微镜观测内皮细胞系表面标志物、细胞形态及细胞骨架。**结果** 在两个硬度培养体系中, CD34⁺ 细胞均表现出较 CD34⁻ 细胞更高的乙酰化低密度脂蛋白(ac-LDL)/ 荆豆凝集素 I(UEA-1) 双阳性比例($P < 0.01$), 以及更高的 CD31、vWF、Flk-1 和 VE-cadherin 等内皮细胞系标记物表达($P < 0.05$)。就两种细胞亚型的分化差异而言, 心肌样软基质较玻璃硬基质表现出更高的细胞分化诱导效率, 这可能与软基质上 CD34⁺ 细胞表现出更为浓集的黏着斑和 F-actin 有关。**结论** 与玻璃硬基质相比, 心肌样软基质能更为有效的诱导 CD34⁺ 细胞亚群向内皮系分化; 软基底培养体系是一种更佳的探讨细胞生物行为的培养体系。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Impacts of myocardium-like matrix soft gel versus glass rigid substrate on the specification of bone marrow CD34⁺ cell subsets along endothelial lineage

ZHANG Shuning, MA Xin, YANG Wenlong, DONG Zhen, YAO Kang, ZHU Hong, WANG Peng, ZOU Yunzeng, YANG Xiangdong, SUN Aijun, GE Junbo

(Department of Cardiology, Zhongshan Hospital of Fudan University & Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases & Shanghai Cardiovascular Medical Center, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] myocardial tissue; CD34; differentiation; extracellular matrix

[ABSTRACT] **Aim** Cell culture system with glass-like rigid substrates is currently used to detect cell biological behaviors. However, the impact of the stiffness of tissue-like soft substrates on stem cell morphology and differentiation is rarely considered in cell-based cardiac repair. This work aimed to access the effects of myocardium-like soft culture substrates on the specification of CD34⁺ as well as CD34⁻ subsets along endothelial lineage in comparison with conventional glass-like rigid substrates. **Methods** Elastic modulus (E, a material property that describes the stiffness or elasticity) of normal myocardium was measured using atomic force microscopy (elastic modulus \approx 15 kPa). Myocardium-like soft culture substrates were prepared using polyacrylamide gel with a similar stiffness to normal myocardium. Meanwhile, cell culture system with glass-like rigid substrates (elastic modulus $>$ 1 GPa) was used as the control. Mouse bone marrow-derived CD34⁺ and CD34⁻ cells were collected by density gradient centrifugation and magnetic activated cell sorting (MACS). The isolated cells were cultured both on myocardium-like soft matrix and glass rigid substrate ($E >$ 1 GPa). At day 7 of culture, the surface markers of endothelial lineage, cell morphology, and cytoskeleton were observed by laser scanning confocal microscopy. **Results** Regardless of the substrate stiffness, mouse bone marrow-derived CD34⁺ cell subsets exhibited higher

[收稿日期] 2019-01-06

[修回日期] 2019-04-12

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81570317)资助

[作者简介] 张书宁, 博士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的基础及临床研究, E-mail 为 zhang.shuning@zs-hospital.sh.cn。通信作者葛均波, 博士, 教授, 博士研究生导师, 中国科学院院士, 研究方向为冠心病的基础及临床研究, E-mail 为 jbge@zs-hospital.sh.cn。

percentage of double-positive cells for dil-labelled acetylated-low density lipoprotein (Dil-ac-LDL) uptake and FITC-labelled ulex europaeus agglutinin I lectin (FITC-UEA-1) binding, and higher expression of endothelial lineage markers, CD31, vWF, Flk-1, and VE-cadherin than CD34⁻ subsets. Moreover, in terms of the difference in cell specification efficacy between CD34⁺ subsets and CD34⁻ subsets, myocardium-like soft substrate showed a more potent induction capacity than conventional glass-like rigid substrate. It might partially result from more stressful F-actin fibers and more abundant focal adhesions of CD34⁺ cell subsets on myocardium-like soft substrates. **Conclusions** Myocardium-like soft substrate was capable of inducing potentially cell specification of CD34⁺ subsets compared with glass-like rigid substrate. It speculated that tissue-like soft substrate might be a more optimal culture system for detecting the specification of stem cells in vitro.

移植细胞类型和组织微环境是决定细胞修复效率的两个关键因素^[1-2]。细胞研究显示,来源于骨髓、脐带血或外周血的 CD34⁺单核细胞,能够分化为有利于病损心肌修复的内皮祖细胞^[1],动物实验和基础研究表明,CD34⁺细胞具有减轻缺血诱导的心肌损伤和保护心脏功能的潜在作用,这种有利效应与血管新生或细胞融合有关^[3-4]。另一方面,心肌组织的生物化学或物理微环境亦影响着心肌梗死后细胞治疗效率^[5-6]。近年来,心肌组织的物理微环境,主要指心肌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的硬度,对移植细胞生物学行为的影响,在病损心肌的细胞治疗领域受到广泛关注。移植细胞通过感知组织硬度,转化为生物信号,从而调节细胞的形态、增殖、迁移和分化等细胞生物学行为^[7-8],因此,适宜的物理微环境对于移植细胞(如 CD34⁺细胞)的存活和分化至关重要。值得注意的是,在传统的细胞研究中,很少考虑细胞培养体系的培养基底的硬度对细胞生物学行为的影响,并且,以玻璃或聚乙烯等硬材料为基底的培养系统来模拟软组织的 ECM 亦缺乏合理性。我们的前期研究中,已应用不同浓度的丙烯酸酯/双丙烯酸酯的聚丙烯酰胺凝胶模拟并明确了梗死心肌组织 ECM 硬度的时间变化规律^[9],在传统的玻璃硬基底细胞培养体系中,CD34⁺细胞亚群已显示了良好的促血管生成作用,而其在模拟正常心肌组织硬度的水凝胶软基底培养体系中的作用,以及与 CD34⁻细胞亚群的差异,尚不明确。本研究旨在明确正常心肌组织样软基质与玻璃硬基质对小鼠骨髓 CD34⁺或 CD34⁻细胞亚群的分化、细胞形态及细胞骨架的影响。

1 材料和方法

1.1 正常心肌组织硬度的体外模拟及软基底细胞培养体系的制备

使用原子力显微镜(Nanoscope III A; Digital Instruments 公司,美国)测量正常心肌组织的弹性模

量(elastic modulus, E)^[9]。正常心肌组织的 E 值约为 15 kPa。2% 丙烯酸酯和 40% 丙烯酸酯以 2:5 的容积配比,制备聚丙烯酰胺凝胶,体外模拟正常心肌组织的 ECM 硬度。根据 Pelham 等^[10]的研究方法制备具有心肌组织样硬度的聚丙烯酰胺凝胶作为基底的细胞培养系统。简言之,厚度约 0.3 mm 的凝胶凝固在 20 mm 圆形玻璃培养皿的底部,随后利用双异质交联剂 Sulfo-SANPAH(Thermo Fisher 公司,美国)激活凝胶表面,并与纤维连接蛋白(20 g/L, Biosource 公司,美国)化学交联。细胞培养前,用波长 275 nm 的紫外线照射 15 min,利用 M199 细胞培养基平衡培养体系 2 h,用于细胞培养。以玻璃硬基底培养皿(E>1 GPa)作为对照,玻璃基质表面直接包被相同浓度的纤维连接蛋白,用于细胞培养。

1.2 小鼠骨髓源性 CD34⁺/CD34⁻单核细胞的分离及细胞培养

8 周龄雄性 Balb/c 小鼠的股骨在 PBS 中冲洗 3 次,收集骨髓细胞。利用 Ficoll 液(Sigma Aldrich 公司,美国)通过密度梯度离心分离小鼠骨髓源单核细胞(bone marrow-derived mononuclear cells, BMMNC)。利用免疫磁珠细胞分选(magnetic activated cell sorting, MACS)系统,通过 FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD34 单克隆抗体(BD 公司,美国)和抗 FITC 抗体磁珠(Miltenyi 公司,德国),从 BMMNC 中分离出 CD34⁺/CD34⁻细胞亚群。用流式细胞仪检测细胞纯度。将骨髓 CD34⁺和 CD34⁻细胞亚群分别悬浮于含有 20% 胎牛血清和 2.5 mg/L VEGF(PETEPCH 公司,美国)的 M199 培养基(Sigma 公司,美国)中,以每个培养皿 5×10⁵ 的细胞浓度开展细胞培养。每 48 h 换液一次。所有动物实验均经复旦大学中山医院动物伦理委员会批准,并遵守 NIH 实验室动物管理和使用指南要求。

1.3 乙酰化低密度脂蛋白摄取与荆豆凝集素 I 结合实验

细胞培养第 7 天,将贴壁细胞与含 10 g/L Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(acetylated-low density

lipoprotein, ac-LDL) (DiI-ac-LDL, Biomedical 公司, 美国) 的 M199 培养基, 在 37 °C 细胞培养箱中共孵育 12 h。PBS 洗涤后用 4% 多聚甲醛固定 (Sigma-Aldrich 公司, 美国) 后, 在室温下用 10 g/L 标记的 荆豆凝集素 I (ulex europaeus agglutinin I lectin, UEA-1) (FITC-UEA-1, Sigma-Aldrich 公司, 美国) 染色 2 h, 用 1 g/L DAPI (罗氏公司, 美国) 染核 15 min。然后用激光扫描共聚焦显微镜 (LSM710; Carl Zeiss 公司, 德国) 观察细胞。每个样本随机抽取放大 200 倍的 5 个视野, 根据图像计算出 DiI-ac-LDL/FITC-UEA-1 双阳性细胞的数目和比例。

1.4 内皮系表面抗原的表达

贴壁细胞用 PBS 冲洗 3 次, 室温下用 4% 多聚甲醛固定 15 min。在 3 g/L 山羊血清中孵育 20 min, 然后一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗孵育 1.5 h。一抗包括纯化的大鼠抗小鼠 CD31 (1 : 10, BD Biosciences 公司, 美国) 及 vWF (1 : 100)、Flk-1 (1 : 100) 和 VE-cadherin (1 : 100) (Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国)。二抗包括 Alexa Fluor 594 羊抗大鼠 IgG (H+L) 和 Alexa Fluor 488 羊抗兔 IgG (H+L) (1 : 200, Invitrogen 公司, 美国)。在室温下用 1 g/L DAPI 复染细胞核 15 min, 收集并分析荧光图像。

1.5 细胞骨架染色

利用 4% 多聚甲醛溶液固定贴壁细胞 15 min。1 : 100 抗 Paxillin 抗体 (Abcam 公司, 美国) 在 4 °C

下共孵育过夜, 用 1 : 200 羊抗兔 IgG H&L 抗体 (Abcam 公司, 美国) 在室温下共孵育 1.5 h, 随后用 1 : 1000 (0.1% Triton X-100) Phalloidin-TRITC (Sigma Aldrich 公司, 美国) 染色, 检测胞质 F-actin 分布。在室温下用 1 mg/L DAPI 复染细胞核。收集并分析荧光图像。

1.6 统计学分析

每组实验重复 3 次, 每次选择 5 个视野进行分析, 即每组共观察细胞视野共 15 次 ($n=15$)。每组细胞计数用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 心肌样软基质或玻璃硬基质培养下的两个细胞亚型的比较, 及软硬基质诱导细胞分化效率的比较, 均采用独立样本 t 检验。数据分析通过 SPSS 18.0 软件 (SPSS 公司, 美国) 完成。

2 结果

2.1 细胞亚群的分离效率

流式细胞分析显示, 利用密度梯度离心法分离获得的小鼠 BMMNC, CD34 抗原表达率为 12.8% (图 1A 左)。使用 MACS 分选后获得的 CD34⁺ 细胞纯度超过 95% (图 1A 右)。细胞培养 48 h, 从细胞形态上, 玻璃硬基质培养体系 (扁平状, 图 1B 上) 表现出比心肌样软基质 (球状, 图 1B 下) 更佳的细胞黏附, 从细胞数量上, CD34⁺ 细胞亚群的贴壁率明显高于 CD34⁻ 细胞 (图 1C)。

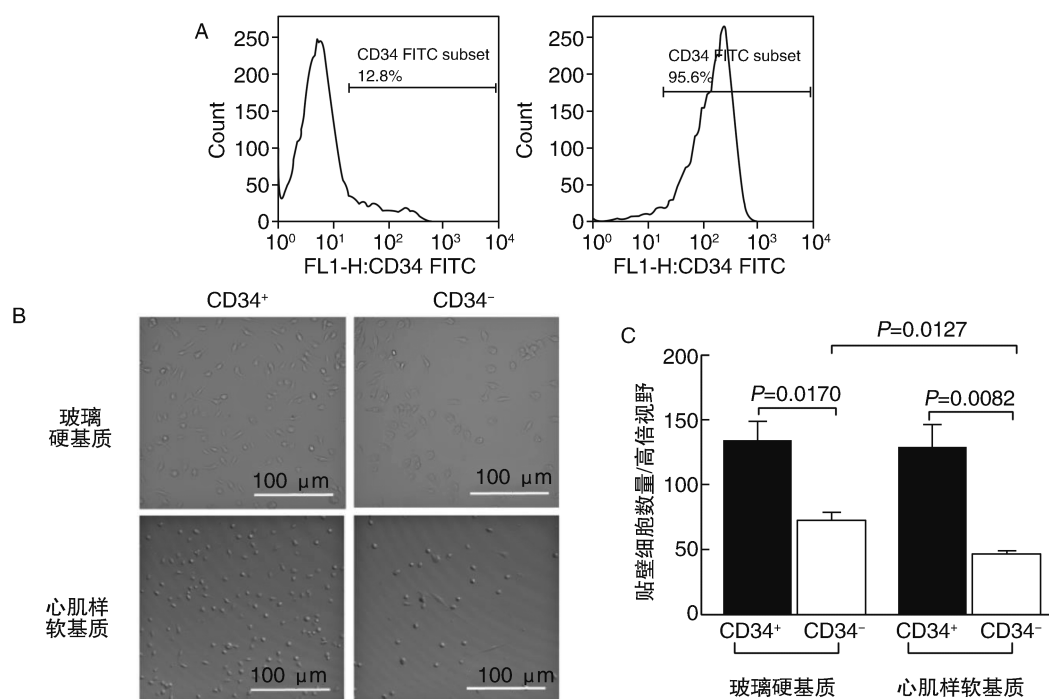


图 1. 小鼠骨髓 CD34⁺ 细胞的分离与鉴定 A 为流式细胞技术检测 BMMNC 中 CD34⁺ 细胞的百分比 (左图) 和免疫磁珠分选后 CD34⁺ 细胞的纯度 (右图); B 为观察贴壁后 CD34⁺/CD34⁻ 细胞亚群的形态及数量; C 为贴壁细胞数量统计分析。

Figure 1. Isolation and identification of CD34 cells

2.2 CD34⁺细胞在软基底培养体系中表现出更高 FITC-UEA-1/Dil-ac-LDL 双阳性表达

在软硬两种培养基底上, CD34⁺细胞亚群均表现出较 CD34⁻细胞更高的 FITC-UEA-1/Dil-ac-LDL

双阳性表达数量(图 2A), 两种细胞亚群的双阳性表达率亦存在统计学差异($P < 0.01$, 图 2B), 而且, 两种细胞亚型在软基底上的分化差异较硬基底更为显著(图 2B 和 2C)。

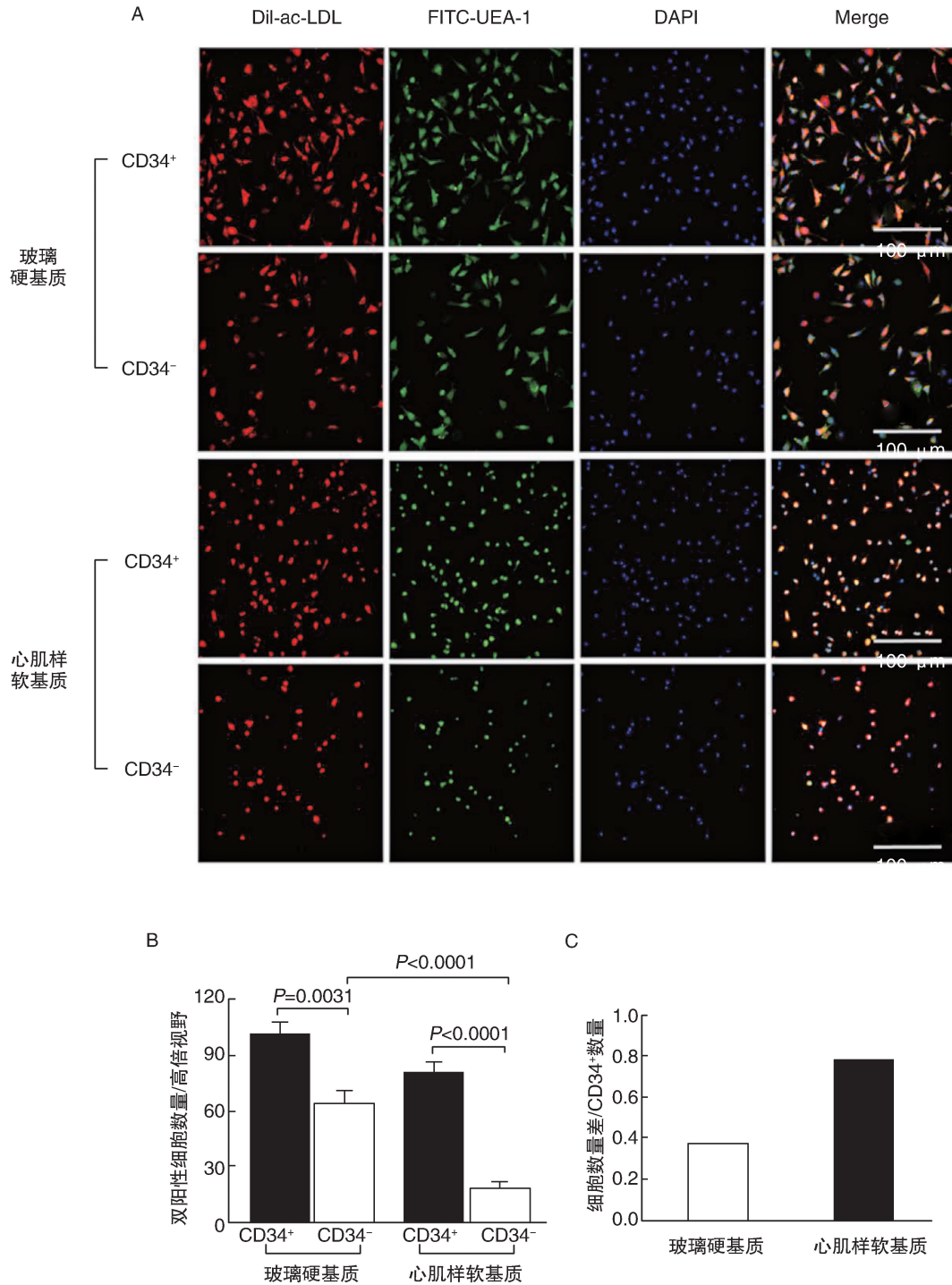


图 2. Dil-ac-LDL/FITC-UEA-1 双阳性表达 A 为免疫荧光染色; B 为双阳性细胞数量的统计分析; C 为两种硬度基质细胞双阳性表达差异率比较。

Figure 2. Double-positive cells for Dil-ac-LDL uptake and FITC-UEA-1 binding on myocardium-like soft substrates and glass rigid substrates

2.3 CD34⁺ 细胞在软基质中表现出更高 CD31、vWF、Flk-1 和 VE-Cadherin 阳性表达

无论基质硬度如何,CD34⁺ 细胞的内皮标记物 CD31、vWF、Flk-1 和 VE-cadherin 的表达显著高于

CD34⁻ 细胞($P < 0.05$)。并且,这种优势在软基质培养体系中比硬基质培养体系表现的更为明显($P < 0.01$,图 3)。

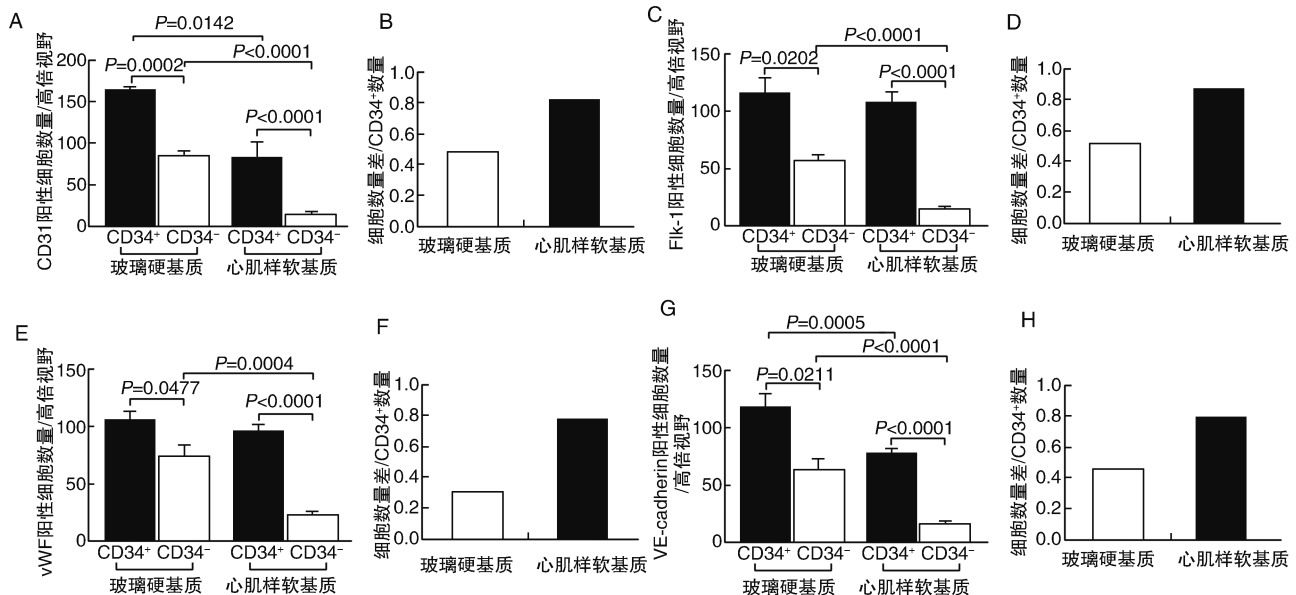


图 3. 内皮系标记物 CD31 (A,B)、Flk-1 (C,D)、vWF (E,F)、VE-cadherin (G,H) 阳性表达 A、C、E、G 为双阳性细胞的数量统计分析;B、D、F、H 为两种硬度基质细胞双阳性表达差异率比较。

Figure 3. CD31 (A,B), Flk-1 (C,D), vWF (E,F) and VE-cadherin (G,H) expression of CD34⁺/CD34⁻ cell subsets on myocardium-like soft substrates and glass rigid substrates

2.4 细胞黏附和形态与基质硬度密切相关

在硬基质上细胞形态表现为细长或纺锤形,细胞周围分布着更为丰富的应力纤维 F-actin 及更为密集的黏附相关蛋白 Paxillin (图 4A);心肌组织样软基质上的细胞呈类圆形,细胞周围的应力纤维较少,表明细胞与 ECM 的相互作用较弱。此外,无论基质硬度如何,CD34⁺ 细胞亚群与 CD34⁻ 亚群均表现出相似的延伸能力和黏附相关蛋白分布(图 4B)。

3 讨论

本研究发现,在两种细胞培养体系下(心肌组织样软基质和玻璃硬基质),小鼠骨髓 CD34⁺ 细胞亚群均表现出比 CD34⁻ 细胞更为有利的向内皮系细胞分化的潜能;同时,两种细胞亚型的分化差异在软基底培养条件下更为显著。此外,无论基质硬度如何,CD34⁺ 细胞周围分布着更为密集的 F-actin 及黏附相关蛋白。

在“适宜”的心肌微环境中移植“适当”的干/祖

细胞,从而实现有效的血管新生,是心肌缺血损伤后细胞治疗的主要理论依据^[11-12]。干/祖细胞能够感知周围组织的物理微环境(主要指组织 ECM 的硬度),并对其作出反应,细胞-ECM 交互作用会使细胞生物学行为更接近于正常宿主组织细胞^[13-15]。Bhana 等^[16]发现大鼠心肌细胞黏附在模拟心肌硬度的凝胶上表现出最佳的心肌功能。此外,之前的几项研究表明,基质硬度亦可通过改变细胞基因表达从而改变细胞转归^[17-18]。在我们之前的研究中,心肌梗死后在最佳时间窗内的“适宜”硬度更有利于 BMMNC 向内皮系细胞分化及病损心肌的细胞修复^[9]。在本研究中,就 CD34⁺/CD34⁻ 两种细胞分化效率的差异而言,心肌组织样软基质较玻璃硬基质表现出更为明显的差异。结果表明,与传统的硬基质相比,软基质可能更为理想的呈现干/祖细胞的细胞生物学特征。因此,在细胞研究中,ECM 硬度这一物理参数应该作为一个重要考量因素。

此外,细胞与 ECM 相互作用也直接影响细胞形态和黏附状态^[13, 19]。一项小鼠气道平滑肌细胞的研究发现,细胞的黏附面积与培养皿的基底硬度成

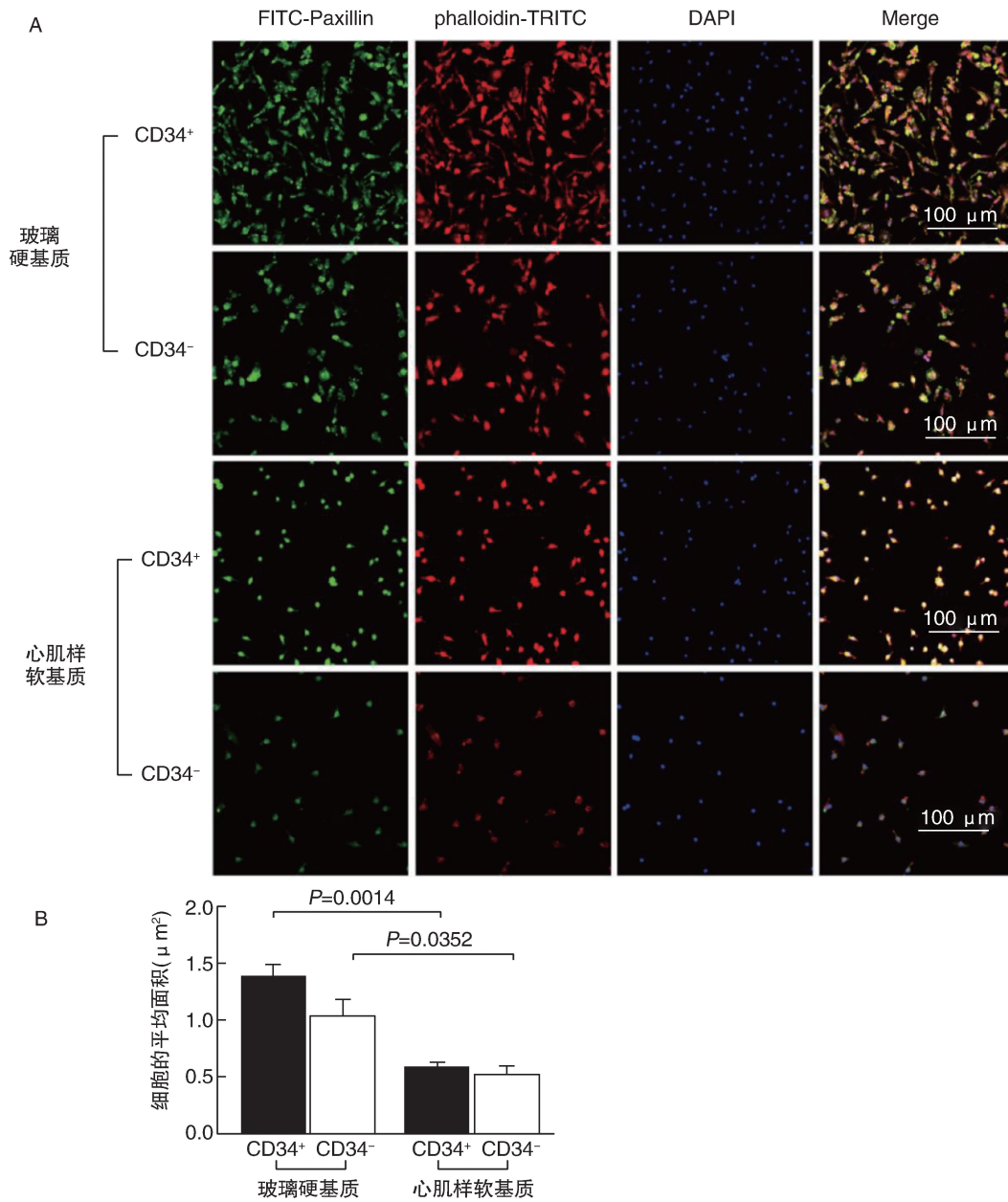


图 4. 细胞骨架染色 A 为免疫荧光染色; B 为贴壁细胞平均伸展面积的比较。

Figure 4. Cytoskeleton staining of CD34⁺/CD34⁻ cell subsets on myocardium-like soft substrates and glass rigid substrates

正比,细胞在弹性模量 93 kPa 凝胶上的黏附面积比在 15 kPa 上大 3.4 倍^[16],也就是说,培养细胞的基质越硬,对培养基底的黏附力越强。本研究表明,在传统的玻璃硬基质 ($E > 1$ GPa) 上培养的小鼠骨髓 CD34⁺/CD34⁻ 细胞亚群,表现为细长或纺锤形的形态和较大的伸展面积,而在心肌样软基质 ($E \approx 15$ kPa) 上的细胞则表现为类球形状及较小的伸展面积。从力学角度讲,细胞形态主要取决于细胞-ECM 黏附力和细胞骨架结构。玻璃硬基质上的细胞表现出细胞周围丰富的应力纤维,而在心肌组织样软基质上则表现出较弱的 F-actin 表达,一个可能的解

释是,较硬的基质会增加酪氨酸磷酸化,导致更稳定的细胞黏附^[10]。细胞黏附和分化由粘着/整合素系统和活化的 FAK/MAP 激酶通路介导的^[20]。本研究结果进一步证实基质硬度显著影响了细胞迁移能力和细胞张力^[21-22]。

综上所述,与 CD34⁻ 亚群相比,心肌样软基质和玻璃硬基质均更利于 CD34⁺ 细胞亚群向内皮系细胞分化,同时,在软基质的诱导下细胞分化差异更大;此外,无论基质的硬度如何,CD34⁺ 细胞均比 CD34⁻ 细胞具有更强的细胞黏附和生存能力。本研究对于理解物理微环境对细胞黏附、分化等生物学行为

的影响具有积极意义,并为病损心脏的细胞治疗研究提供了一个合适的体外模型。

[参考文献]

- [1] Kim SW, Jin HL, Kang SM, et al. Therapeutic effects of late outgrowth endothelial progenitor cells or mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood on infarct repair[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 203(1): 498-507.
- [2] Liu Z, Wang H, Wang Y, et al. The influence of chitosan hydrogel on stem cell engraftment, survival and homing in the ischemic myocardial microenvironment [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(11): 3093-3106.
- [3] Lee JH, Lee SH, Yoo SY, et al. CD34 hybrid cells promote endothelial colony-forming cell bioactivity and therapeutic potential for ischemic diseases [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(7): 1622-1634.
- [4] Qin Q, Qian J, Ge L, et al. Effect and mechanism of thrombospondin-1 on the angiogenesis potential in human endothelial progenitor cells: an in vitro study [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88213.
- [5] Lee CY, Kim R, Ham O, et al. Therapeutic potential of stem cells strategy for cardiovascular diseases [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016(10): 4285938.
- [6] Aonuma T, Takehara N, Maruyama K, et al. Apoptosis-resistant cardiac progenitor cells modified with apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox factor 1 gene overexpression regulate cardiac repair after myocardial infarction [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(8): 1067-1078.
- [7] They M, Racine V, Piel M, et al. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(52): 19771-19776.
- [8] Zaman MH, Trapani LM, Sieminski AL, et al. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(29): 10889-10894.
- [9] Zhang S, Sun A, Ma H, et al. Infarcted myocardium-like stiffness contributes to endothelial progenitor lineage commitment of bone marrow mononuclear cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(10): 2245-2261.
- [10] Pelham RJ Jr, Wang Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(25): 13661-13665.
- [11] Ye K, Cao L, Li S, et al. Interplay of matrix stiffness and cell-cell contact in regulating differentiation of stem cells [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(34): 21903-21913.
- [12] 李慧萍, 朱向情, 尹娜, 等. Klotho 基因转染骨髓间充质干细胞移植对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(7): 541-547.
- [13] Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells [J]. *Science*, 2009, 324(5935): 1673-1677.
- [14] Kuraitis D, Giordano C, Ruel M, et al. Exploiting extracellular matrix-stem cell interactions: a review of natural materials for therapeutic muscle regeneration [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(2): 428-443.
- [15] Floren M, Bonani W, Dharmarajan A, et al. Human mesenchymal stem cells cultured on silk hydrogels with variable stiffness and growth factor differentiate into mature smooth muscle cell phenotype [J]. *Acta Biomater*, 2016, 31(2): 156-166.
- [16] Bhana B, Iyer RK, Chen WL, et al. Influence of substrate stiffness on the phenotype of heart cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(6): 1148-1160.
- [17] Coombs KE, Leonard AT, Rush MN, et al. Isolated effect of material stiffness on valvular interstitial cell differentiation [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(1): 51-61.
- [18] Yuan Y, Zhong W, Ma G, et al. Yes-associated protein regulates the growth of human non-small cell lung cancer in response to matrix stiffness [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6): 4267-4272.
- [19] 王慷慨, 肖献忠. 心肌再生: 心肌细胞增殖与体细胞转分化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(10): 973-977.
- [20] Cozzolino AM, Noce V, Battistelli C, et al. Modulating the substrate stiffness to manipulate differentiation of resident liver stem cells and to improve the differentiation state of hepatocytes [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 2016(1): 5481493.
- [21] Missirlis D, Spatz JP. Combined effects of PEG hydrogel elasticity and cell-adhesive coating on fibroblast adhesion and persistent migration [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(1): 195-205.
- [22] Liao YC, Ma YT, Huang CH, et al. Rigidity guided cell attachment on inkjet-printed patterns [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2012, 4(7): 3335-3339.

(此文编辑 许雪梅)