

不同杨氏模量聚丙烯酰胺水凝胶模型的构建及其对小鼠骨髓间充质干细胞行为的影响

张文青^{1,2} 强茹月¹ 裴丹丹^{1,3} 张辉^{1,4}

¹西安交通大学口腔医院,陕西省颅颌面精准医学研究重点实验室,西安 710004; ²西安交通大学口腔医院儿童牙颌面发育管理专科,西安 710004; ³西安交通大学口腔医院数字化种植修复科,西安 710004; ⁴西安交通大学生命科学与技术学院生物医学信息工程教育部重点实验室,仿生工程与生物力学研究所,西安 710049

通信作者:张辉,Email:zhang_hui@xjtu.edu.cn

【摘要】 目的 构建不同杨氏模量且表面粗糙度相近的聚丙烯酰胺水凝胶模型,观察不同基质刚度条件下小鼠骨髓间充质干细胞(mBMSC)的微丝形态、铺展及早期成骨相关基因表达,以评价该模型用于细胞力学响应研究的可行性。**方法** 制备低、中、高刚度3组聚丙烯酰胺水凝胶,检测其杨氏模量和表面粗糙度,并经sulfo-SANPAH活化后偶联I型胶原。将mBMSC接种于水凝胶表面,通过F-actin/DAPI荧光染色观察细胞微丝形态并分析相对铺展面积;采用细胞松弛素D干预微丝聚合,成骨诱导7 d后检测Alpl和Runx2的相对表达。采用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析。多组间比较根据数据分布及方差齐性选择单因素方差分析或Kruskal-Wallis检验,组间两两比较分别采用Tukey或Dunn多重比较检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。**结果** 低、中、高刚度组水凝胶平均杨氏模量分别为1.09、11.37和29.24 kPa,图示统计学标记提示组间差异有统计学意义($F = 766.60, P < 0.001$);3组表面粗糙度差异无统计学意义($H = 5.956, P > 0.05$)。随水凝胶刚度增加,mBMSC微丝束更加明显,相对铺展面积增大($H = 14.73$,低刚度组与高刚度组差异有统计学意义, $P = 0.0004$)。对照条件下,高刚度组Alpl和Runx2表达高于低刚度组($F_{Alpl} = 91.54, P_{Alpl} = 0.0039$; $F_{Runx2} = 12.93, P_{Runx2} = 0.0025$);细胞松弛素D干预后,低、高刚度组间上述基因表达差异无统计学意义($F_{Alpl} = 91.54, P_{Alpl} = 0.4019$; $F_{Runx2} = 12.93, P_{Runx2} = 0.8873$)。**结论** 本研究构建的聚丙烯酰胺水凝胶模型可在表面粗糙度相近的条件下形成明确的杨氏模量分级,基质刚度调控干细胞的早期成骨效应一定程度上可受到细胞骨架微丝的影响。

【关键词】 聚丙烯酰胺水凝胶; 杨氏模量; 骨髓间充质干细胞; 微丝; 成骨分化

基金项目:国家自然科学基金(12502365、82470960)

引用著录格式:张文青,强茹月,裴丹丹,等. 不同杨氏模量聚丙烯酰胺水凝胶模型的构建及其对小鼠骨髓间充质干细胞行为的影响[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2026, 20(4):304-310.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2026.04.007

Construction of polyacrylamide hydrogel models with different Young's moduli and their effects on mouse bone marrow mesenchymal stem cell behavior

Zhang Wenqing^{1,2}, Qiang Ruyue¹, Pei Dandan^{1,3}, Zhang Hui^{1,4}

¹Key Laboratory of Shaanxi Province for Craniofacial Precision Medicine Research, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ²Department of Pediatric Dentomaxillofacial Development Management, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ³Department of Digital Oral Implantology and Prosthodontics, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ⁴Bioinspired Engineering and Biomechanics Center (BEBC), The Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

Corresponding author: Zhang Hui, Email: zhang_hui@xjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct polyacrylamide hydrogel models with graded Young's moduli

and comparable surface roughness, and to evaluate their feasibility for studying stiffness-related changes in the actin cytoskeleton, spreading, and early osteogenic gene expression of mouse bone marrow mesenchymal stem cells (mBMSCs). **Methods** Three groups of polyacrylamide hydrogels with low, medium, and high stiffness were prepared, characterized for Young's modulus and surface roughness, activated with sulfo-SANPAH, and functionalized with type I collagen. The morphology of F-actin and the relative spreading area of mBMSCs were assessed by fluorescence imaging. Actin polymerization was perturbed with cytochalasin D, followed by 7 days of osteogenic induction and measurement of *Alpl* and *Runx2* expression. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8. Comparisons among multiple groups were conducted using one-way analysis of variance (ANOVA) or the Kruskal-Wallis test, as appropriate, according to the data distribution and homogeneity of variances. Post hoc pairwise comparisons were performed using Tukey's multiple comparisons test or Dunn's multiple comparisons test, respectively. A two-sided *P* value of <0.05 was considered statistically significant. **Results** The average Young's moduli of the low-, medium-, and high-stiffness hydrogels were 1.09, 11.37, and 29.24 kPa, respectively, with statistically significant differences ($F = 766.60, P < 0.001$ for all pairwise comparisons), whereas surface roughness did not differ significantly among groups ($H = 5.956, P > 0.05$). Increasing stiffness was associated with more prominent actin bundles and greater cell spreading ($H = 14.73$, low stiffness group-high stiffness group: $P = 0.0004$). Under control conditions, *Alpl* and *Runx2* expression were higher on the high-stiffness group than in the low-stiffness group ($F_{Alpl} = 91.54, P_{Alpl} = 0.0039$; $F_{Runx2} = 12.93, P_{Runx2} = 0.0025$). After cytochalasin D treatment, the differences between the low- and high-stiffness groups were not significant ($F_{Alpl} = 91.54, P_{Alpl} = 0.4019$; $F_{Runx2} = 12.93, P_{Runx2} = 0.8873$). **Conclusions** The polyacrylamide hydrogel model developed in this study exhibited distinct levels of Young's modulus while maintaining comparable surface roughness. The effects of matrix stiffness on the early osteogenic responses of stem cells may depend, at least in part, on cytoskeletal actin filaments.

[Key words] Polyacrylamide hydrogel; Young's modulus; Bone marrow mesenchymal stem cells; F-actin; Osteogenic differentiation

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (12502365, 82470960)

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2026.04.007

牙槽骨缺损、拔牙后牙槽嵴吸收及种植位点骨量不足会增加口腔修复治疗的复杂性。骨替代支架材料不仅承担空间维持作用,其结构和力学性质也构成细胞所感知的局部微环境。现有位点保存材料种类较多,但材料特性与组织再生之间的对应关系仍需进一步明确^[1]。因此,建立变量可控的体外模型,有助于从力学微环境角度理解骨再生相关细胞行为。

细胞外基质并非被动支撑结构。贴壁细胞可通过整合素黏附、细胞骨架张力及核内转录调控感知基质刚度,并据此调整铺展、迁移和分化状态^[2-3]。间充质干细胞的形态和细胞骨架张力与其谱系倾向密切相关;充分铺展及较高的肌动蛋白-肌球蛋白张力通常与成骨倾向相关^[4]。这些发现提示,材料刚度可能成为调节骨组织工程细胞反应的重要设计参数^[5]。

聚丙烯酰胺水凝胶可通过调整丙烯酰胺与交联剂配比获得不同弹性,并可在表面偶联细胞黏附蛋白,因而被广泛用于二维细胞力学研究^[6]。然而,水凝胶配方改变除影响杨氏模量外,还可能伴随孔隙

结构、蛋白偶联状态或表面形貌变化,从而干扰对刚度效应的解释^[7-8]。因此,在构建刚度分级模型时,应尽可能保持细胞黏附配体处理一致,并结合必要的表面理化特征评价,以减少非刚度因素的干扰。

本研究制备低、中、高刚度3组聚丙烯酰胺水凝胶,以杨氏模量确认其力学分级,并检测表面粗糙度以评价不同组表面形貌的可比性。在此基础上,观察小鼠骨髓间充质干细胞(mouse bone marrow mesenchymal stem cell, mBMSC)的F-actin形态和铺展面积,并以细胞松弛素D干预微丝聚合,分析成骨诱导7 d后 *Alpl* 和 *Runx2* 表达。研究目的在于评价该模型能否用于探究水凝胶刚度与 mBMSC 成骨分化之间的关系。

材料与方法

一、研究设计与水凝胶分组方法

本研究为体外实验研究。根据聚丙烯酰胺前体液中丙烯酰胺(02150256-CF, MP Biomedicals, 美

国)和双丙烯酰胺(146072, Sigma, 美国)配比设置低、中、高刚度组水凝胶。各组采用相同的聚合方式、表面活化流程及 I 型胶原包被条件,以杨氏模量为主要分组指标,完整配方见表 1。

表 1 水凝胶前体溶液组分

溶液	低刚度组	中刚度组	高刚度组
40% 丙烯酰胺(μL)	100	250	500
2% 双丙烯酰胺(μL)	50	450	250
1% 1M 羟乙基哌嗪乙磺酸(μL)	10	10	10
10% 过硫酸铵(APS)(μL)	10	10	10
1‰ 四甲基乙二胺(μL)	1	1	1
超纯水(μL)	830	280	230
总体积(mL)	约 1	约 1	约 1

二、聚丙烯酰胺水凝胶制备与胶原功能化

将直径 14 mm 的玻片浸泡于按 1:1:14(v/v/v)混合的 3-(三甲氧基硅基)甲基丙烯酸丙酯/乙酸/无水乙醇溶液中,反应 15 min 以使玻片亲水。此外,将甲基二氯硅烷均匀滴加在直径为 12 mm 的玻片表面以使玻片表面疏水,反应 5 min 后,采用无尘纸擦拭玻片表面残留试剂,经去离子水冲洗 1 min 后充分干燥玻片。按图 1 所示流程,将水凝胶前体液滴加于亲水玻片表面并覆盖疏水玻片,形成三明治结构,于 37 °C 恒温条件下聚合 1 h。聚合完成后取下疏水玻片,形成水凝胶层。加入 1 mg/mL 的 sulfo-SANPAH(ab145610, Abcam, 英国)溶液以覆盖水凝胶表面,并经 365 nm 紫外光照射 15 min 活化;随后加入 100 μg/mL 鼠尾 I 型胶原(354236, Corning, 美国),于 4 °C 孵育过夜,以提供细胞黏附位点。在接种细

胞之前,将含有胶原的水凝胶在 37 °C 的单纯培养基中浸泡 30 ~ 45 min,随后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)清洗 3 次,365 nm 紫外光照射 1 h 后,接种细胞。

三、水凝胶杨氏模量与表面粗糙度检测

分别检测低、中、高刚度组水凝胶的杨氏模量,并获得各组表面形貌图和粗糙度指标。杨氏模量以 kPa 表示;表面粗糙度按低刚度组归一化后进行组间比较。力学测试采用原子力显微镜(NanoWizard 4 XP BioScience, Bruker, 德国)完成,配备 NP-O10A 型悬臂探针(Bruker, 德国)。该悬臂标称共振频率为 85 kHz,末端搭载标称半径为 6 μm 的球形探针。AFM 测量前,采用仪器内置的接触模式对悬臂进行校准:通过在刚性玻璃基底上采集力-距离曲线,拟合接触区线性段以确定偏转灵敏度;随后利用热噪声法标定悬臂弹性系数,测得值为 0.248 N/m。上述校准参数用于后续的压入力学测试及杨氏模量计算。聚丙烯酰胺水凝胶的表面形貌表征采用表面形貌仪(PS50, NANOVEA, 美国)在 PBS 湿润环境下进行。低、中、高刚度水凝胶均在相同成像参数下采集形貌图。采用算术平均高度参数(Sa)对表面粗糙度进行定量表征。各组水凝胶选取一致的感兴趣区域进行分析,以比较其表面形貌特征及粗糙度差异。

四、小鼠骨髓间充质干细胞来源与培养

4 周龄 C57BL/6J 雄鼠 10 只,购自西安交通大学医学部实验动物中心[许可证号:SCXK(陕)2023-002],体质量为(16±2.0) g/只,实验动物微生物学等级为 SPF 级。小鼠饲养于西安交通大学医学部实验动

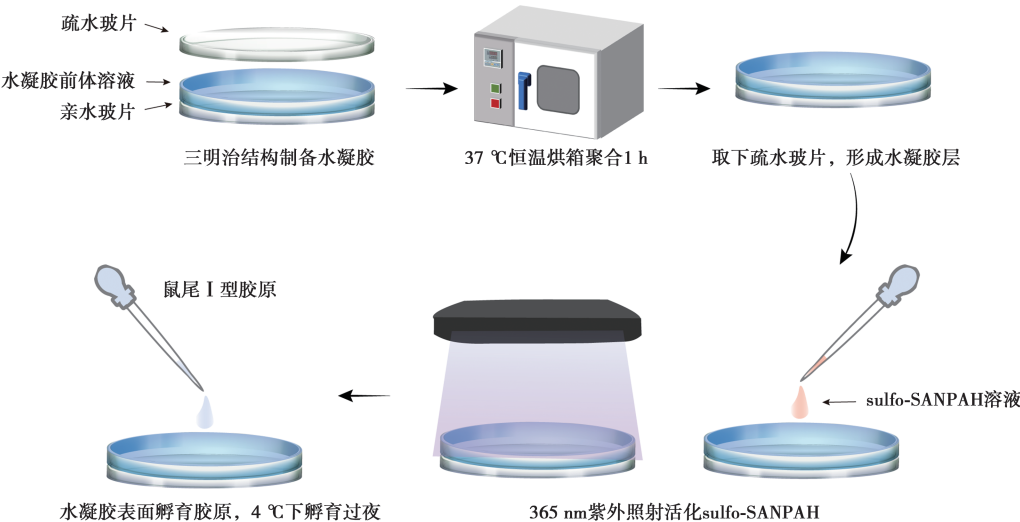


图 1 聚丙烯酰胺水凝胶制备及 I 型胶原功能化流程示意图 低、中、高刚度组通过调整前体液配比形成不同杨氏模量的水凝胶,水凝胶经 sulfo-SANPAH 活化后偶联鼠尾 I 型胶原。

物中心 SPF 级别实验室,温度控制在 22 ~ 25 °C,相对湿度 40% ~ 60%,12 h/12 h 昼夜循环光照,提供标准小鼠饲料和超滤纯水,确保实验前小鼠的健康状态。本研究涉及实验动物的相关操作均经西安交通大学医学部生物医学伦理委员会批准(批准文号:2021-1259),并遵循相关实验动物伦理规范。小鼠脱颈处死后,用 75% 乙醇溶液浸泡消毒,于无菌条件下取下后肢,剔除附着肌肉,剪断股骨/胫骨两端,用注射器吸取含血清的培养基从一端冲洗骨髓腔,将冲出的骨髓细胞收集到培养皿中进行贴壁筛选。在对提取的细胞进行流式细胞术鉴定干细胞标志物后,将 P3 ~ P5 代的 mBMSC 接种于经 I 型胶原功能化的低、中、高刚度组水凝胶表面,并在相同培养条件下完成后续检测。

五、F-actin 荧光染色与细胞铺展面积分析

细胞经 4% 多聚甲醛固定液(143174,合肥白鲨生物技术有限公司)固定 10 min 后,0.5% Triton X-100/PBS(ST1723,上海碧云天生物技术有限公司)处理 10 min 后,以荧光标记鬼笔环肽显示 F-actin(C2201S,上海碧云天生物技术有限公司),以 DAPI(AR1176,武汉博士德生物工程有限公司)复染细胞核。使用激光共聚焦显微镜(FV3000, Olympus, 日本)获取图像,使用 ImageJ 软件计算单细胞铺展面积;各组结果以低刚度组归一化值表示。

六、细胞松弛素 D 干预

为观察微丝状态改变后细胞对水凝胶刚度的响应,细胞在低、中、高刚度水凝胶上接种培养待细胞贴壁后,在培养体系中加入细胞松弛素 D(1 μmol/L, C8273, Sigma-Aldrich, 美国)诱导培养 24 h,随后进行 F-actin/DAPI 染色;在培养体系中加入成骨诱导液及细胞松弛素 D 后,细胞在低、高刚度水凝胶上培养 7 d 进一步用于成骨相关基因检测。

七、成骨诱导及实时荧光定量聚合酶链反应

配制成骨诱导培养基(α-MEM 完全培养基 + 50 μmol/L 抗坏血酸 + 10 mmol/L β-甘油磷酸酯 + 100 nmol/L 地塞米松),将 mBMSC 在相应水凝胶上接受成骨诱导 7 d 后使用 Trizol 裂解细胞,提取和收集总 RNA,采用反转录试剂盒(AG11706,湖南艾科瑞生物工程有限公司)逆转录为 cDNA,使用定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)试剂盒(AG11701,湖南艾科瑞生物工程有限公司)进行 qPCR 反应,并通过实时荧光 qPCR(CFX96 Deep Well, Bio-Rad, 美国)检测 *Alpl* 和 *Runx2* 表达。结果以相对表达量表示。qPCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法

计算目的基因的相对表达量,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)为内参基因进行标准化,结果以低刚度组为校准组进行相对定量分析。本实验中基因 *Alpl*、*Runx2* 和 *GAPDH* 的引物序列由上海生工生物工程有限公司合成(表 2)。

表 2 实时荧光定量聚合酶链反应引物序列

目的基因	引物序列
<i>Alpl</i>	正向:GTGGAAGGAGGCAGGATTGA
	反向:AAGGTGCTTTCTGGGATGTCAT
<i>Runx2</i>	正向:TCGTCAGCATCTATCAGTTCC
	反向:GTCAGCGTCAACACCATCATTC
<i>GAPDH</i>	正向:TGTGTCCCGTCGTGGATCTGA
	反向:TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

八、统计学处理方法

所有统计分析均以独立生物学重复为统计单位,并根据数据分布、方差齐性及比较结构选择检验方法。图中误差线、显著性符号和精确 *P* 值需与原始统计输出一致。统计定量结果以不少于 3 个独立实验的 $\bar{x} \pm s(s.d)$ 表示。在进行统计分析前,首先对数据进行正态分布和方差齐性检验。当数据符合正态分布时,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Tukey 多重比较检验,当数据不符合正态分布时,多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验,组间两两比较采用 Dunn 多重比较检验。所有统计分析均采用 GraphPad Prism 8 软件进行。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、水凝胶模型形成明确的杨氏模量分级

低、中、高刚度组水凝胶均形成完整凝胶层。3 组杨氏模量分别为 (1.09 ± 0.10) 、 (11.37 ± 1.45) 和 (29.24 ± 0.51) kPa,随预设刚度等级依次增加(图 2)。图中显著性标记提示,3 组两两比较差异均有统计学意义($F = 766.60, P < 0.001$)。

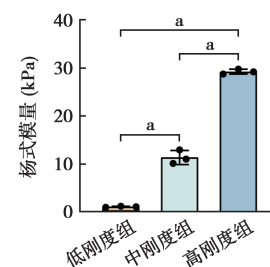


图 2 不同刚度组聚丙烯酰胺水凝胶的杨氏模量统计柱图($n = 3$) 组间比较差异有统计学意义, $^*P < 0.001$ 。

二、不同杨氏模量水凝胶的表面粗糙度相近

低、中、高刚度组水凝胶均呈连续表面形貌(图3A)。以低刚度组为参照进行归一化后,中刚度组和高刚度组的相对表面粗糙度均接近低刚度组(低刚度组 $1.25\ \mu\text{m}$ 、中刚度组 $1.35\ \mu\text{m}$ 、高刚度组 $1.50\ \mu\text{m}$),3组两两比较差异均无统计学意义($H=5.956, P>0.05$,图3B)。该结果表明,在本研究检测尺度下,基质刚度分级未伴随可检出的表面粗糙度差异。

三、水凝胶刚度增加伴随小鼠骨髓间充质干细胞微丝束和铺展面积增加

F-actin/DAPI 荧光图像显示,低刚度组 mBMSC 铺展相对有限;中刚度组细胞铺展增加并出现更明显的微丝结构;高刚度组细胞面积进一步增大,胞

质内可见较为密集的 F-actin 束(图4A)。定量结果显示,中刚度组和高刚度组相对细胞铺展面积依次升高,3组两两比较差异均有统计学意义($F=34.37, P<0.05$,图4B)。

四、细胞松弛素 D 改变不同刚度水凝胶上小鼠骨髓间充质干细胞的微丝形态

加入细胞松弛素 D 后,低、中、高刚度组 mBMSC 的 F-actin 形态均发生明显改变,连续应力纤维减少,细胞形态较对照条件下不规则,低刚度组和高刚度组的细胞铺展面积仍有统计学差异($H=14.73$,低刚度组与高刚度组间差异有统计学意义, $P=0.0004$,图5)。本实验未设置可用于判断细胞活性或药物非特异性效应的检测,因此该图仅用于确认微丝结构受到干预。

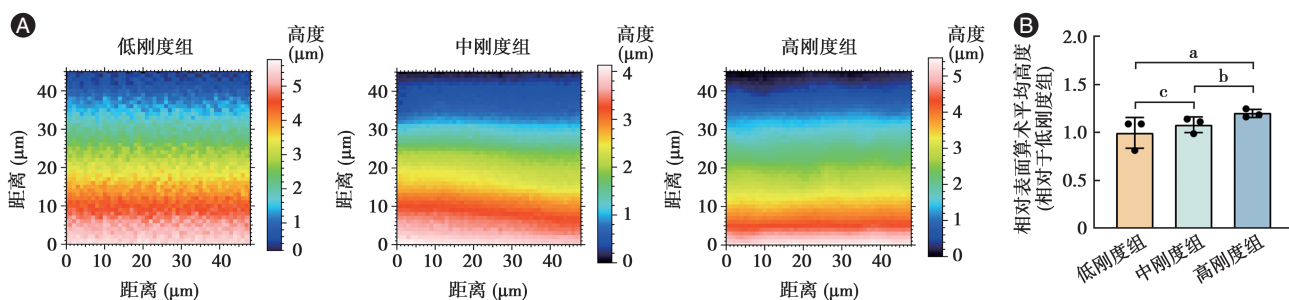


图3 不同杨氏模量水凝胶的表面形貌与相对粗糙度统计柱图 A:表面形貌图;B:以低刚度组归一化后的相对表面算术平均高度统计图($n=3$),组间比较差异均无统计学意义,^a $P=0.0512$,^b $P=0.3032$,^c $P>0.9999$ 。

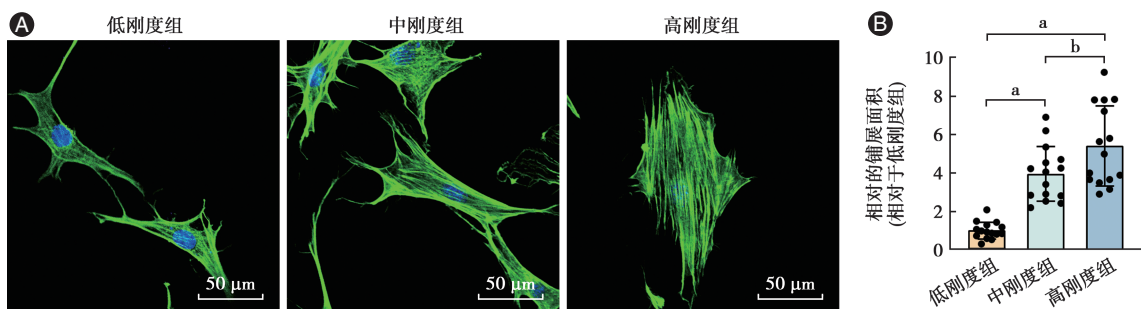


图4 不同杨氏模量水凝胶上小鼠骨髓间充质干细胞(mBMSC)的F-actin形态及铺展面积统计柱图 A:F-actin/DAPI 荧光图像,F-actin 为绿色,细胞核为蓝色;B:相对细胞铺展面积($n=15$),组间比较差异均有统计学意义,^a $P<0.001$,^b $P=0.0273$ 。

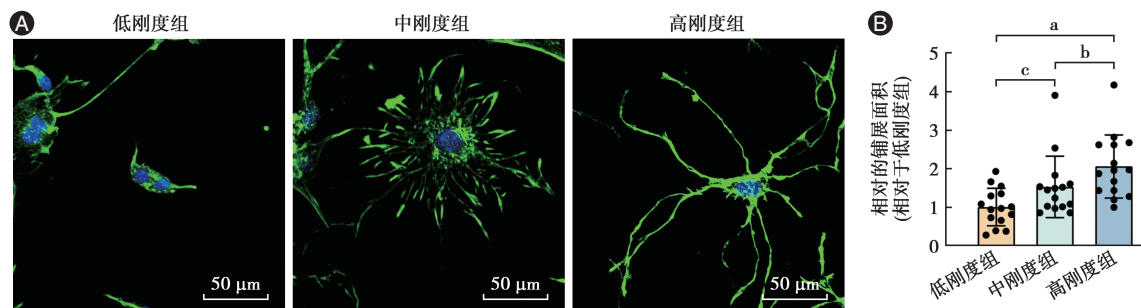


图5 细胞松弛素 D 处理 24 h 后不同杨氏模量水凝胶上小鼠骨髓间充质干细胞(mBMSC)的 F-actin 形态及铺展面积 A:F-actin/DAPI 荧光图像,F-actin 为绿色,细胞核为蓝色;B:相对细胞铺展面积($n=15$),^a $P=0.0004$,^b $P=0.1359$,^c $P=0.1995$ 。

五、干预微丝后低、高刚度水凝胶上细胞的早期成骨相关基因差异减弱

在未加入细胞松弛素D的对照条件下,高刚度水凝胶上细胞的 *Alpl* 和 *Runx2* 相对表达均高于低刚度组(图6),差异具有统计学意义($F_{Alpl} = 91.54, P_{Alpl} = 0.003\ 9; F_{Runx2} = 12.93, P_{Runx2} = 0.002\ 5$)。加入细胞松弛素D后,低、高刚度组 *Alpl* 和 *Runx2* 表达差异均无统计学意义($F_{Alpl} = 91.54, P_{Alpl} = 0.401\ 9; F_{Runx2} = 12.93, P_{Runx2} = 0.887\ 3$)。该结果说明,微丝状态改变后,mBMSC对低、高刚度水凝胶的早期成骨基因响应不再呈现原有组间差异,但不能据此判断细胞松弛素D对成骨分化的总体促进或抑制方向。

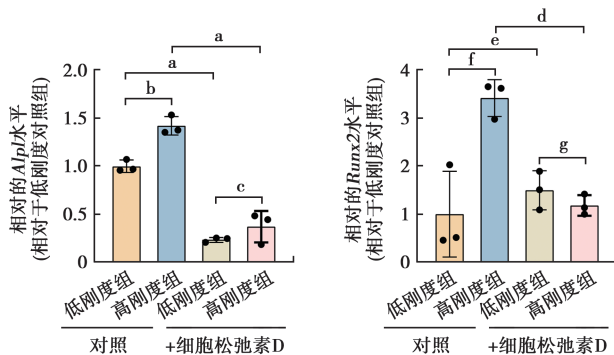


图6 细胞松弛素D干预并成骨诱导7 d后小鼠骨髓间充质干细胞(mBMSC)中 *Alpl* 和 *Runx2* 的相对表达($n=3$) ^a $P<0.001$, ^b $P=0.003\ 9$, ^c $P=0.401\ 9$, ^d $P=0.004\ 1$, ^e $P=0.679\ 8$, ^f $P=0.002\ 5$, ^g $P=0.887\ 3$ 。

讨 论

本研究构建了杨氏模量分别为1.09、11.37和29.24 kPa的低、中、高刚度聚丙烯酰胺水凝胶模型。3组表面粗糙度相近,而杨氏模量形成明确分级,使该模型能够在减少表面形貌差异干扰的前提下比较mBMSC的基质刚度相关响应。聚丙烯酰胺体系的这一可调特性是其用于细胞生物学研究的重要基础^[6];但水凝胶配方和表面蛋白偶联状态仍可能影响细胞感知,因此表面粗糙度相近并不等同于所有界面变量完全一致^[7-8]。

随水凝胶刚度增加,mBMSC铺展面积增加,F-actin束更加明显。这一结果与既往二维聚丙烯酰胺模型中的观察一致:高刚度水凝胶基质可增强间充质干细胞铺展、黏附及成骨相关表型^[9-10]。细胞通常通过黏附复合物向基质施加牵引力,基质提供的反作用力进一步调节细胞骨架张力和核内信号^[2,11-12]。不过,本研究未直接检测整合素、黏着斑、RhoA/ROCK或YAP/TAZ,因此不能将观察到的形态变化归因于某一特定通路。

对照条件下,高刚度组 *Alpl* 和 *Runx2* 表达高于低刚度组;细胞松弛素D处理后,低、高刚度组间差异消失。结合细胞松弛素D对F-actin形态的影响,该结果提示微丝状态可能参与mBMSC对水凝胶刚度的早期响应。既往研究已显示,细胞形态、肌动蛋白-肌球蛋白张力和机械记忆可共同调节间充质干细胞的成骨倾向^[4,13-15]。水凝胶刚度增加首先诱导细胞早期骨架重塑及力学适应,随后促进成骨相关基因表达及分化过程。本研究分别于细胞接种后24 h和7 d评价上述变化,旨在捕获机械感知的早期响应及其后续成骨效应。尽管两者检测时间点不同,但符合机械信号由感知、传递至功能响应的动态过程。然而,细胞松弛素D本身可在不同来源的间充质干细胞中启动复杂的转录和成骨反应^[16]。因此,本研究中药物干预后组间差异减弱只能作为F-actin参与的支持证据,不能证明其为单一中介,也不能将药物效应简单解释为抑制成骨。

该模型对口腔骨再生研究具有潜在参考价值。牙周膜来源细胞和其他口腔间充质细胞同样能够感知基质刚度,但二维和三维培养、细胞来源、刚度范围及配体条件均可能改变响应方向^[17-18]。有研究显示,基质刚度可通过表观遗传调控影响人牙周膜干细胞成骨分化^[19];在三维GelMA模型和牙槽骨缺损模型中,较软基质又可能促进牙周膜干细胞铺展、成骨及新骨形成^[20]。这些结果提示,材料刚度不宜被视为脱离维度和材料体系的单一参数。本研究建立的是二维、线弹性聚丙烯酰胺模型,其用途主要是分离并观察细胞对基质刚度变化产生的响应,而非直接预测植入材料的体内成骨效果。

本研究仍存在以下限制。第一,虽然不同刚度聚丙烯酰胺水凝胶之间未检测到表面粗糙度差异,且本研究采用统一的Sulfo-SANPAH偶联方法及相同浓度I型胶原进行表面包被,但表面粗糙度仅能反映水凝胶表面形貌,尚不能全面评价孔隙结构及蛋白偶联状态,因此不能完全排除界面理化特性差异对实验结果的潜在影响。第二,聚丙烯酰胺水凝胶为二维线弹性基底,而天然细胞外基质具有三维、黏弹性和动态重塑特征^[21]。第三,当前证据仅包括细胞形态、铺展面积以及单一时间点的 *Alpl* 和 *Runx2* 表达,尚缺少细胞活性、增殖、黏附、蛋白水平、碱性磷酸酶活性和矿化检测。第四,细胞松弛素D具有多效性,且现有资料不足以确认剂量、溶剂对照和毒性影响。后续研究应补充水凝胶孔隙结构及蛋

白偶联状态的定量表征、剂量与挽救实验,并结合蛋白、功能性成骨指标及三维或体内模型验证。

综上,本研究构建的聚丙烯酰胺水凝胶模型在表面粗糙度相近的条件下形成了低、中、高3个明确的杨氏模量等级,并可区分mBMSC在不同基质刚度下的细胞铺展、F-actin形态及早期成骨相关基因响应。该模型为研究口腔骨再生相关细胞的力学生物学行为,以及优化组织工程材料的力学性能设计提供了可控的体外研究平台。在此基础上,未来可进一步结合水凝胶孔隙结构与胶原偶联状态的定量表征、细胞响应的动态观察、功能性成骨指标检测及三维或体内模型验证,深入解析基质刚度影响细胞命运的时空规律和分子机制,为口腔骨再生材料的设计与评价提供实验依据

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 张文青:研究设计、实验实施、数据分析;强茹月:论文撰写;裴丹丹:研究设计、审阅和经费支持;张辉:研究设计、论文撰写、审阅和经费支持

参 考 文 献

- [1] 胡景超,刘怡.骨替代支架材料在种植前位点保存中的应用[J].中华口腔医学杂志,2023,58(8):864-870. DOI:10.3760/cma.j.cn112144-20230621-00247.
- [2] Discher D E, Janmey P, Wang Y L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate[J]. Science, 2005,310(5751):1139-1143. DOI:10.1126/science.1116995.
- [3] Saraswathibhatla A, Indana D, Chaudhuri O. Cell-extracellular matrix mechanotransduction in 3D[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023,24(7):495-516. DOI:10.1038/s41580-023-00583-1.
- [4] Wu M C, Yu H W, Chen Y Q, et al. Early committed polarization of intracellular tension in response to cell shape determines the osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells[J]. Acta Biomater, 2023(163):287-301. DOI:10.1016/j.actbio.2022.10.052.
- [5] Park J H, Jo S B, Lee J H, et al. Materials and extracellular matrix rigidity highlighted in tissue damages and diseases: Implication for biomaterials design and therapeutic targets[J]. Bioact Mater, 2023(20):381-403. DOI:10.1016/j.bioactmat.2022.06.003.
- [6] Shakiba D, Genin G M, Zusiak S P. Mechanobiology of cancer cell responsiveness to chemotherapy and immunotherapy: Mechanistic insights and biomaterial platforms[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2023(196):114771. DOI:10.1016/j.addr.2023.114771.
- [7] Li L, Griebel M E, Uroz M, et al. A Protein-adsorbent hydrogel with tunable stiffness for tissue culture demonstrates matrix-dependent stiffness responses[J]. Adv Funct Mater, 2024,34(17):2309567. DOI:10.1002/adfm.202309567.
- [8] Yan T, Rao D, Chen Y, et al. Magnetic nanocomposite hydrogel with tunable stiffness for probing cellular responses to matrix stiffening[J]. Acta Biomater, 2022(138):112-123. DOI:10.1016/j.actbio.2021.11.001.
- [9] Sun M, Chi G, Li P, et al. Effects of matrix stiffness on the morphology, adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Int J Med Sci, 2018,15(3):257-268. DOI:10.7150/ijms.21620.
- [10] Sun M, Chi G, Xu J, et al. Extracellular matrix stiffness controls osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells mediated by integrin $\alpha 5$ [J]. Stem Cell Res Ther, 2018,9(1):52. DOI:10.1186/s13287-018-0798-0.
- [11] Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction[J]. Nature, 2011,474(7350):179-183. DOI:10.1038/nature10137.
- [12] Swift J, Ivanovska I L, Buxboim A, et al. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation[J]. Science, 2013,341(6149):1240104. DOI:10.1126/science.1240104.
- [13] Yang C, Tibbitt M W, Basta L, et al. Mechanical memory and dosing influence stem cell fate[J]. Nat Mater, 2014,13(6):645-652. DOI:10.1038/nmat3889.
- [14] Hsieh W T, Liu Y S, Lee Y H, et al. Matrix dimensionality and stiffness cooperatively regulate osteogenesis of mesenchymal stromal cells[J]. Acta Biomater, 2016(32):210-222. DOI:10.1016/j.actbio.2016.01.010.
- [15] Kim E, Riehl B D, Bouzid T, et al. YAP mechanotransduction under cyclic mechanical stretch loading for mesenchymal stem cell osteogenesis is regulated by ROCK[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2023(11):1306002. DOI:10.3389/fbioe.2023.1306002.
- [16] Samsonraj R M, Paradise C R, Dudakovic A, et al. Validation of osteogenic properties of cytochalasin d by high-resolution RNA-sequencing in mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissues[J]. Stem Cells Dev, 2018,27(16):1136-1145. DOI:10.1089/scd.2018.0037.
- [17] 张辉,李晔,裴丹丹,等.口腔力学[J].中华口腔医学杂志,2024,59(12):1197-1205. DOI:10.3760/cma.j.cn112144-20240129-00042.
- [18] Li Y, Zhang H, Zhou H, et al. Oral and maxillofacial mechanomedicine: Exploring biomechanical insights and their clinical implications[J]. Translational Dental Research, 2025,1(1):100008. DOI:10.1016/j.tdr.2024.100008.
- [19] Ding R, Chen C, Wang L, et al. Matrix stiffness regulates the osteogenic differentiation of hPDLSCs via DNA methylation[J]. Int Dent J, 2025,75(4):100783. DOI:10.1016/j.identj.2025.02.022.
- [20] Wu S, Chai Z, Yang Y, et al. Effect of matrix stiffness on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells in a three-dimensional culture hydrogel: A preliminary study[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2025,11(9):5616-5626. DOI:10.1021/acsbomaterials.5c01151.
- [21] Chaudhuri O, Cooper-White J, Janmey P A, et al. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour[J]. Nature, 2020,584(7822):535-546. DOI:10.1038/s41586-020-2612-2.

(收稿日期:2026-05-22)

(本文编辑:王嫚)