

文章编号:1004-7220(2012)03-0305-07

不同基底硬度对人肝癌细胞黏附、铺展和迁移的影响

杨本艳^{a,b}, 王红兵^{a,b}, 谭乔燕^{a,b}, 杨力^{a,b}

(重庆大学 a. 生物工程学院, “生物流变科学与技术”教育部重点实验室; b. 生物工程学院国家“111计划”基地, 重庆 400044)

摘要: **目的** 研究不同基底硬度对肝癌细胞黏附、铺展和迁移行为的影响及对细胞骨架装配方式和细胞表面黏附蛋白整合素 $\beta 1$ 表达的调控, 探讨基底的力学特性在肝癌细胞恶性转移过程中的作用。**方法** 通过调节丙聚酰胺和双丙烯酰胺的比率制备不同硬度的聚丙烯酰胺基底, 并在基底表面裱衬 $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 纤维连接蛋白为细胞提供黏附位点; 用显微观察并记录不同硬度基底上细胞黏附、铺展和迁移的变化, 并用 Image J 软件定量分析; 分别运用免疫荧光和流式细胞仪的方法检测不同基底硬度对肝癌细胞骨架装配和细胞表面整合素 $\beta 1$ 表达的影响。**结果** 硬基底利于肝癌细胞的黏附和铺展并缩短细胞的铺展时间。过软 (1.1 kPa) 或过硬 (玻璃) 的基底都不利于肝癌细胞的迁移, 肝癌细胞在中间硬度的基底上 (10.7 kPa) 迁移速率最高。硬基底促进细胞骨架的装配和整合素 $\beta 1$ 表达。**结论** 基底硬度通过调节细胞骨架装配和整合素的表达从而影响肝癌细胞的黏附、铺展和迁移。

关键词: 基底硬度; 细胞黏附; 细胞铺展; 细胞迁移; 肝癌细胞; 力学特性

中图分类号: R 735

文献标志码: A

Effects of different substrate stiffness on adhesion, spreading and migration of human hepatocellular carcinoma cells

YANG BEN Yan-Zi^{a,b}, WANG Hong-Bing^{a,b}, TAN Qiao-yan^{a,b}, YANG Li^{a,b} (a. Key Laboratory of Biorheological Science and Technology, Ministry of Education; b. “111” Project Laboratory of Biomechanics and Tissue Repair, Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract; Objective To investigate the effects of substrate stiffness on the adhesion, spreading and migration of hepatocellular carcinoma cells as well as the regulation of cytoskeleton assembly and integrin $\beta 1$ expression, and to explore the role of substrate mechanical properties in the metastasis of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** The polyacrylamide gel with different stiffness was achieved by varying the relative ratio of acrylamide to bis acrylamide. The substrate surface was cross-linked with extracellular matrix molecules for cell adhesion. The adhesion, spreading and migration of hepatocellular carcinoma cells on substrates with different stiffness were recorded by phase contrast microscope and made quantitative analysis by Image J software. The cytoskeleton assembly on substrates with different stiffness was detected by immunofluorescence assay, and the expression of integrin $\beta 1$ on different substrates was measured by flow cytometer. **Results** The rigid substrate enhanced the adhesion and spreading of hepatocellular carcinoma cells in shortened time. Neither the soft (1.1 kPa) nor over rigid (glass) substrate facilitated the migration of hepatocellular carcinoma cells, and the maximum migration velocity was found on the substrate with moderate stiffness (10.7 kPa). The rigid substrate could promote cytoskeleton assembly and integrin $\beta 1$ expression. **Conclusions** The effects of substrate stiffness on adhesion, spreading and migration of hepatocellular carcinoma cells are regulated by the cytoskeleton assembly and integrin expression.

Key words: Substrate stiffness; Cell adhesion; Cell spreading; Cell migration; Hepatocellular carcinoma cells; Mechanical properties

收稿日期: 2011-06-15; 修回日期: 2011-09-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (11032012, 30870608), 重庆市科委科技攻关重大项目资助 (2009 AA5045), 重庆大学大型仪器设备开放基金, 中央高校基本科研业务费资助 (CDJXS10 23 11 20)。

通讯作者: 杨力, 教授, 博士研究生导师, E-mail: cquliyang@hotmail.com。

据报道,2007年全世界死于癌症的人约占总死亡人数的13%,2010年卫生部预计在我国每年约有140万人死于癌症^[1]。癌细胞的失控生长和恶化转移是癌症高致死率的主要原因,并且它们都依赖于癌细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相互之间特殊的理化作用^[2]。大量的研究表明,ECM的力学特性,特别是ECM的硬度已成为影响肿瘤细胞行为的一个重要调节因子^[3]。Paszek等^[4]研究发现,仅仅通过对ECM硬度的调整就可以诱导出乳腺上皮细胞恶性转化的特征。Ulrich等^[2]在恶性脑瘤细胞的研究中发现,ECM硬度的改变会对细胞的迁移和增殖速率产生明显的影响。此外,细胞对ECM硬度响应敏感度的改变与肿瘤细胞的恶性转化相关。转化的成纤维细胞在较软的ECM上也可以增殖,而未转化的成纤维细胞则不能存活^[5]。

大量临床研究和动物实验发现ECM硬化与许多疾病相关。肝癌是我国发病率最高的癌症之一,其与肝纤维化和肝硬化相联系是ECM硬化的一个典型例子^[6]。有研究表明,在肝癌的恶化过程中,肝癌组织的硬度远高于正常肝组织^[7]。肝癌的恶化转移过程可以看作是肝癌细胞对硬化的组织环境的一个病态响应过程。癌细胞的黏附、铺展和迁移行为是癌症离开原发病灶向临近组织侵袭的起始步骤,所以本文的主要目的是通过对基底硬度的调控,模拟在体的病理生理环境,研究基底硬度对肝癌细胞黏附、铺展、迁移的影响,试图揭示基底硬度在肝癌发生发展过程中的作用,以为肝癌的预防和控制提供一个新的视角。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肺转移肝癌细胞株 HCCLM3(缩写为 M3)购自复旦大学中山医院肝癌研究所。细胞用 RPMI-1640 培养基,10% 胎牛血清,在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中常规培养。

1.2 聚丙烯酰胺水凝胶 (poly-acrylamide gel, PA gel) 的制备及力学特性检测

PA 胶的制备方法参照 Beningo 等^[8]的工作,通过丙烯酰胺和双丙烯酰胺的不同配比来调节 PA 胶的硬度。PA 胶的表面裱衬 2.5 μg/mL 的 Fn 溶液,为细胞提供黏附位点。在 0.2 Hz 的震荡频率、最大

剪切应变为 1%、温度为 37 °C 的参数设置下用流变仪(TA instruments, AR2000ex)检测 PA 胶的剪切模量(G')。假设 PA 胶不可压缩,泊松比为 0.5,由 $E = 3 \times G'$ 近似求得 PA 胶的弹性模量(E)。

1.3 肝癌细胞黏附率分析

用 MTT 法检测肝癌细胞在不同硬度基底上的黏附率。在不同硬度 PA 胶上和盖玻璃片上(对照)以 10^5 /孔接种 M3 细胞。培养 2 h 后 PBS 清洗去掉未黏附的细胞,每孔加入 5 mg/mL MTT 200 μL,震荡摇匀后置 37 °C 培养 4 h,去上清加入 150 μL 10% DMSO,10 ~ 20 min 结晶完全溶解后于波长 570 nm 测 OD 值,并计算细胞黏附率:

$$\text{细胞黏附率} = \frac{\text{不同硬度 PA 胶组细胞 OD 值}}{\text{对照组细胞 OD 值}} \times 100\%$$

1.4 肝癌细胞形态分析

将不同硬度的 PA 胶及盖玻片放置于 12 孔板内,每孔接种约 10^5 细胞。用倒置相差显微镜记录细胞的铺展过程,总共观测时长为 12 h,每隔 30 min 取 1 组照片用于分析。用 Image J 软件对不同硬度 PA 胶上所铺展的单个细胞分别测量其投影面积和周长,以其均值来代表不同硬度基底对细胞铺展的影响。每个硬度至少选取 30 个细胞用于测量,每个独立实验重复 4 次。

1.5 肝癌细胞迁移分析

用 Time-lapse 显微镜定点观察细胞在 PA 胶和玻璃表面的运动轨迹,观测时间为 1 h,每间隔 5 min 取 1 张图片用 Image J 软件追踪单个细胞几何中心的变化,并定量分析细胞的运动轨迹及运动距离,将不同时间间隔的细胞运动距离进行加和得到细胞在总的观测时间内的运动距离。每个硬度的基底至少取 12 个细胞进行测算,每次独立实验重复 3 次。细胞的有效运动距离定义为细胞从起始时间点到观察时间结束所移动的直线距离;总的迁移距离定义为细胞在观察时间内所运动距离的总和;细胞的迁移速率为总迁移距离与观测时间的比值。由于细胞与细胞的接触会影响到细胞的迁移速度,故只计算单个细胞的运动速度。

1.6 细胞骨架的免疫荧光分析

用免疫荧光的方法检测基底硬度对细胞骨架装配的影响。约 10^4 细胞接种于 PA 胶及玻璃表面于 37 °C 培养箱培养 24 h 后检测。4% 多聚甲醛固定,

0.5% Triton X-100 处理样本后,用 FITC-标记的鬼笔环肽(0.5 μg/mL, P5282, Sigma, 美国)染色并在激光共聚焦显微镜下观察。

1.7 整合素 β1 的表达的检测

约 10⁵ 细胞接种于不同硬度 PA 胶及玻璃基底上,培养 24 h 后胰酶消化并收集细胞。用离心机以 2 000 r/min 转速离心 10 min 后吹散,制备单细胞悬液。分别加入 FITC-标记的小鼠抗人整合素 β1 抗体(No. 251014, Abbiotec, 美国)和小鼠抗人 IgG(阴性对照),用流式细胞仪(BD FACSCalibur, 美国)检测基底硬度对肝癌细胞表面整合素 β1 表达的影响。

$$\text{整合素 } \beta 1 \text{ 相对表达量} = \frac{\text{样本的相对荧光值}}{\text{阴性对照的相对荧光值}}$$

1.8 数据分析

实验数据用 Sigma plot 软件处理,结果以均数 ± 标准差表示,并进行 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为具有统计学差异,每个实验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 PA 胶的弹性模量及表面处理

用于本实验的 PA 胶弹性模量分别为(1.1 ± 0.2), (2.5 ± 0.2), (3.6 ± 0.6), (5.5 ± 0.6), (10.7 ± 1.2), (15.3 ± 0.6)和(33.7 ± 1.1) kPa(见图 1)。据报道正常肝组织的硬度约为 4 ~ 7 kPa^[7],而肝癌组织的硬度(20.4 ~ 75 kPa)^[9-10]约为周围正

常组织的 10 倍。1.1 ~ 33.7 kPa 基底硬度范围内可模拟肝癌发展进程中肿瘤组织的硬度变化,与在体的病理生理环境硬度相符合。

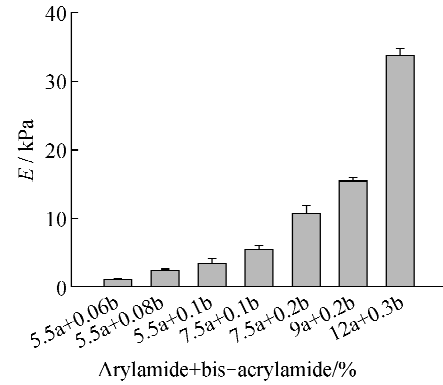
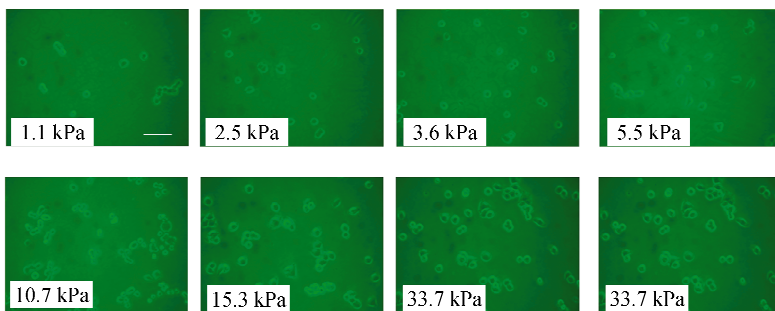


图 1 PA 胶的弹性模量(a-内烯酰胺,b-双内烯酰胺)

Fig.1 Elastic modulus of PA gels

2.2 基底硬度对肝癌细胞黏附的影响

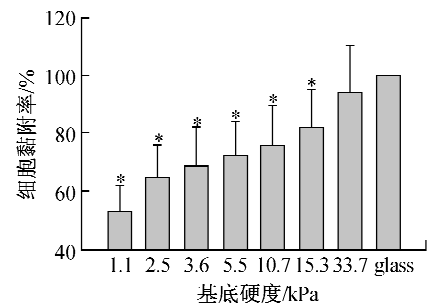
如图 2 所示,随着基底硬度的增加,肝癌细胞的黏附量增多。将细胞在玻璃上的黏附率看作 100%,在较软的基底上(1.1 kPa),细胞的黏附率为(52.8 ± 9.1)%;在中间硬度的基底上(2.5 ~ 15.3 kPa),细胞的黏附率从(64.7 ± 9.1)%升高至(81.6 ± 12.4)%;在较硬的基底上(33.7 kPa),细胞的黏附率达到(94.3 ± 16.4)% ,与细胞在玻璃上的黏附率相比无显著性差异。说明硬基底促进肝癌细胞的黏附,软基底不利于肝癌细胞的黏附。



* $P < 0.05$,与培养在玻璃上细胞的黏附率相比较, $n = 3$,标尺 20 μm

图 2 肝癌细胞在不同硬度基底上的黏附率

Fig.2 Percentage of hepatocellular carcinoma cell adhesion on substrates with different stiffness



2.3 基底硬度对肝癌细胞铺展的影响

图 3(a)显示肝癌细胞在不同硬度基底上的投影面积和周长表明细胞铺展投影面积和周长与基底

硬度成正比,在 1.1 ~ 3.6 kPa 的硬度范围内,细胞的周长和面积随基底硬度增长比较快;在 3.6 ~ 10.7 kPa 的硬度范围内,细胞的周长和面积随基底

硬度增长比较平缓;当基底硬度大于 10.7 kPa, 细胞的周长与培养在玻璃基底上的细胞周长和面积无显著性差异($P > 0.05$)。

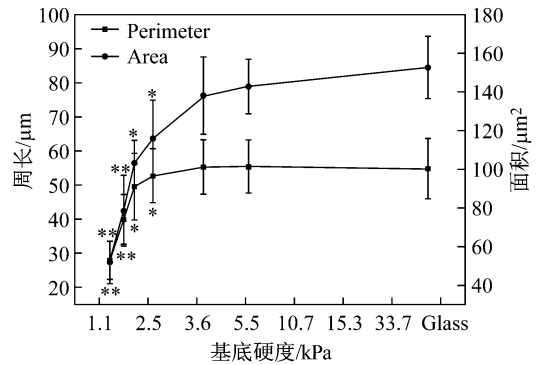
基底硬度不但影响细胞的铺展周长和面积,也在一定程度上影响肝癌细胞的铺展时间。将细胞的铺展面积达到 $80 \mu\text{m}^2$ (约为细胞初始观测面积的 2 倍)以上定义为细胞有明显的铺展。通过比较不同硬度基底上肝癌细胞达到明显铺展所需的时间发现,随着基底硬度的增加,细胞铺展所需的时间减少。在 1.1 kPa 基底上需要约 6 h 以上才有明显的铺展,在 10.7 kPa 基底上需要约 2 h,而在玻璃基底上达到细胞明显铺展所需的时间缩短为 1 h(见图 3 (b))。

2.4 基底硬度对肝癌细胞迁移的影响

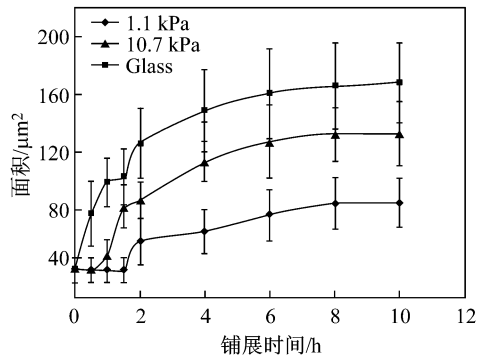
如图 4(a)所示,肝癌细胞的迁移速度开始随着基底硬度的增加而增加,在 10.7 kPa 的基底硬度上达到顶峰,然后随着基底硬度的进一步增加而下降。比较肝癌细胞塑料(3 GPa)和玻璃(70 GPa)基底上的迁移速率发现,在非常硬的基底上肝癌细胞的迁移速率无显著性差异($P > 0.05$)。基底硬度对细胞运动速率的影响导致了肝癌细胞在不同硬度基底上运动距离的差异。在相对硬(如塑料和玻璃基底)或相对软的基底(1.1 kPa)上,细胞总的运动距离和有效运动距离较短;在中间硬度的基底上(10.7 kPa),细胞的总的运动距离和有效运动距离达到最大(见图 4(b) ~ (c))。

2.5 基底硬度对肝癌细胞骨架排列的影响

图 5 的结果显示硬基底促进 F-actin 纤维的发育及装配。在较软的基底上(1.1 kPa) F-actin 在胞浆中弥散分布未见明显的骨架纤维装配;在 3.6 kPa



(a)

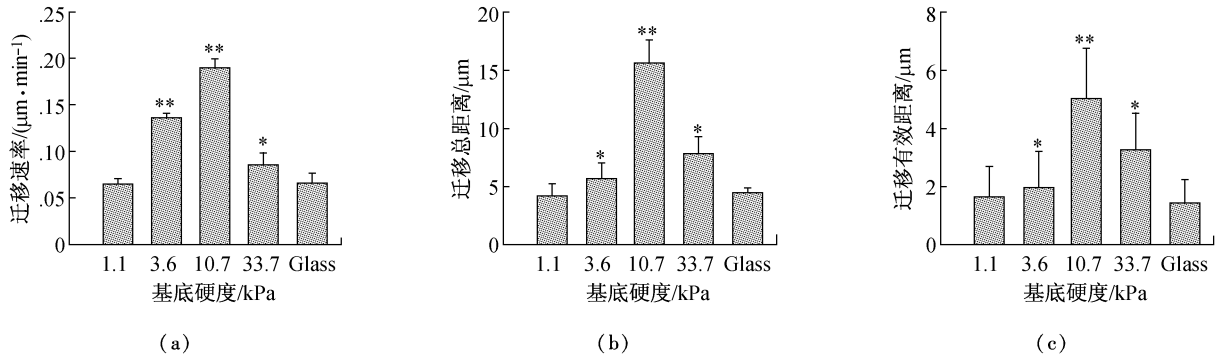


(b)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与培养在玻璃上细胞的周长和面积相比较, $n \geq 30$, 独立实验重复 4 次

图 3 肝癌细胞在不同硬度基底上的周长、投影面积(a)和铺展时间(b)

Fig.3 Perimeter, project area (a) and spreading time (b) of hepatocellular carcinoma cells on substrates with different stiffness



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与培养在玻璃上细胞的运动能力相比较, $n \geq 12$, 独立实验重复 3 次

图 4 肝癌细胞在不同硬度基底上的迁移速率(a), 迁移总距离(b)和迁移的有效距离(c)

Fig.4 Migration velocity (a), total path length (b) and net path length (c) of migration of hepatocellular carcinoma cells on substrates with different stiffness

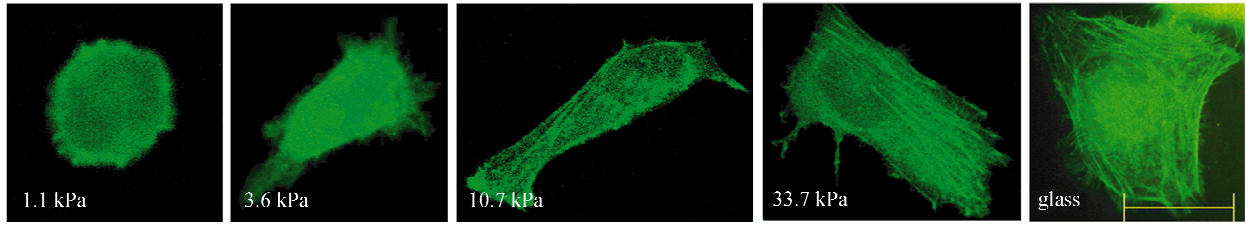


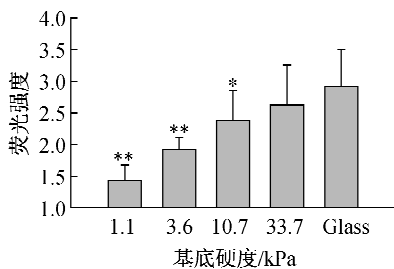
图5 培养 24 h 后不同硬度基底上肝癌细胞骨架的排列(标尺为 10 μm)

Fig.5 Cytoskeleton arrangement of hepatocellular carcinoma cells on substrates with different stiffness after 24 h culture

的基底上 F-actin 开始装配并在细胞的前端及尾部伸出一些小的突触;在 10.7 kPa 的基底上细胞内有一些较细的骨架纤维出现;当基底硬度提高到 33.7 kPa, F-actin 装配成明显的应力纤维并沿着细胞的长轴方向排列;在玻璃基底上,细胞呈现出不规则的多角形,骨架纤维沿着核周分布。

2.6 基底硬度对细胞表面整合素 $\beta 1$ 表达的影响

整合素在细胞黏附、铺展、运动、细胞骨架的装配中都起着重要作用。流式细胞仪的结果显示肝癌细胞表面整合素 $\beta 1$ 的表达依赖于基底硬度(见图 6)。在较软的基底(1.1 kPa)上肝癌细胞整合素 $\beta 1$ 的表达比较低,随着基底硬度的增高整合素 $\beta 1$ 的表达不断增加,在 33.7 kPa 基底上整合素 $\beta 1$ 的表达水平与在玻璃上相比无显著性差异($P > 0.05$)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与培养在玻璃上细胞的整合素表达相比较

图6 不同硬度基底上肝癌细胞表面整合素 $\beta 1$ 的表达

Fig.6 Integrin $\beta 1$ expression of hepatocellular carcinoma cells on substrates with different stiffness

3 讨论

以往有关肝癌细胞黏附、铺展和迁移的研究多集中在生化和遗传因素的影响方面。在对其他类型细胞的研究中发现,生物力学相关的因素如基底的硬度也可以影响细胞的行为^[2-5]。本研究通过对比基底在病理和生理硬度条件下对肝癌细胞行为调节

的差异性,以期为肝癌的预防和控制提供一些理论依据。

当细胞黏附在基底上时,细胞表面的黏附受体与基底上的配体相结合,细胞开始铺展并在细胞与基底黏附的连接位点产生张力,从而引起基底的形变。由于基底硬度的差异,细胞黏附位点产生的张力不同,由此所引起的基底形变幅度也不同。细胞可感知并区分这种力学信号的差异并将其转化为生化信号来指导细胞的行为。整合素连接细胞骨架和 ECM 在细胞和基底之间的力学信号传递中起着重要的作用^[11]。它既可将细胞骨架产生的收缩力通过质膜传递到 ECM 上,也可将 ECM 的应力传递到细胞中^[12]。以这种方式整合素感知基底硬度的变化,将其转换成不同的力学信号在细胞和基底间传递,通过激活下游的 Rho 蛋白等信号通路调节细胞骨架纤维的装配和收缩^[13],从而影响细胞的行为。

整合素在基底的黏附位点聚集形成黏附结构是细胞黏附、铺展和迁移的起始步骤。黏附结构的形成需要具备两个条件:细胞内肌动球蛋白所产生的张力以及能与这种张力相抗衡的足够的基底硬度。软基底不能提供足够硬度以供肝癌细胞整合素聚集和肌动蛋白骨架纤维装配,细胞不能产生足够的收缩力驱使细胞铺展和运动,所以在软基质上细胞铺展能力差,运动速率低。反之,硬基底可促进整合素表达并为整合素聚集和肌动蛋白骨架纤维的装配提供足够的应力,促进应力纤维的形成和张力的产生^[14],利于细胞的铺展(见图 3、5、6)。虽然硬基底促进肝癌细胞的铺展,但却不利于细胞运动(见图 4)。由于硬基底在促进黏附斑形成增强细胞与基底黏附力的同时也降低了黏附斑的翻转频率,增大了细胞在向前运动时细胞尾部与基底解离时的阻力,而这一步恰恰是细胞运动中的限速步骤;另外,在硬基底上细胞骨架装配成粗的应力纤维束,虽然

应力纤维可为细胞提供运动所需的收缩力,但阻碍了细胞运动中所必需的骨架重组速率,所以硬基底也不利于肝癌细胞的迁移。只在中等硬度的基底上,细胞骨架产生的张力和黏附斑的翻转频率适中,利于肝癌细胞达到最大运动速率。

基底硬度对细胞铺展面积和应力纤维取向的影响与基底与细胞的相对硬度有关^[15-16]。当细胞的硬度小于所黏附基底的硬度时,细胞可通过装配细胞骨架和增大细胞铺展面积来调整细胞自身硬度,使其与基底硬度相适应;当细胞硬度与所黏附基底硬度相接近时,细胞骨架装配和细胞铺展逐渐停止,细胞铺展面积达到饱和值。一旦达到该平衡点,继续增加基底的硬度,细胞硬度和铺展面积基本无变化,细胞内开始出现应力纤维^[15]。对肌动蛋白骨架的免疫荧光染色结果显示在中等硬度基底上细胞应力纤维的极化水平最高(见图5)。Zemel等^[16]研究发现,细胞内应力纤维的取向与细胞内张力的极化有关。细胞铺展的早期阶段(细胞与基底接触时)细胞内的应力是各向同性的。当细胞培养在极端硬的基底上时,细胞内各向同性的张力与基底上大小相等,各向同性的反作用力相抗衡。由于不破坏细胞内原有应力的对称性,随着细胞内这种各向同性的张力不断增长,最终形成应力纤维也是各向同性的,极化程度低。相反,在非常软的基底上,由于基底不足以提供细胞内应力发育所需的相反的作用力,细胞内张力在所有的方向上都非常小,不能为细胞内应力纤维的极化提供方向性的支持。只有当基底的硬度与细胞硬度达到一个适当的比率时,细胞内不同方向上的张力随基底硬度以不同的速率增加,细胞内张力的极化分布达到最大,并通过反馈调节肌球蛋白的各向异性诱导细胞内应力纤维各向异性,并达到最达极化程度。

基底硬度在诱导人肝癌细胞的细胞黏附和铺展的增加、调节细胞的迁移中起着重要的作用。基底的硬化放大了整合素信号通路,增强了肝癌细胞的力学信号响应,可能通过激活 Rho 蛋白等下游信号通路促进肿瘤细胞的增殖,破坏肿瘤细胞间连接使肝癌细胞易于从癌变组织中脱离并向周围正常组织浸润^[4]。因此,除了干涉肿瘤细胞的力学传导信号(如抑制整合素表达等来减缓或抑制肝癌细胞的浸润转移),还可通过改变基底的力学特性来实现。

例如,由于肝癌细胞在非常硬的环境中运动能力下降,可通过将局部肝癌组织硬化的方法将肝癌细胞囚禁在原地,使其不能够向周围组织浸润,再通过靶向给药从而达到杀伤肝癌细胞的目的。

参考文献:

- [1] 吴孟超,沈锋. 肝癌[M]. 北京:北京大学医学出版社, 2010: 3.
- [2] Ulrich TA, de Juan Pardo EM, Kumar S. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(10): 4167-4174.
- [3] Tang X, Kuhlenschmidt TB, Zhou J, *et al.* Mechanical force affects expression of an in vitro metastasis-like phenotype in HCT-8 cells [J]. *Biophys J*, 2010, 99(8): 2460-2469.
- [4] Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, *et al.* Tensional homeostasis and the malignant phenotype [J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(3): 241-254.
- [5] Wang HB, Dembo M, Wang YL. Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 279(5): C1345-1350.
- [6] Zeng Z, Guan L, An P, *et al.* A population-based study to investigate host genetic factors associated with hepatitis B infection and pathogenesis in the Chinese population [J]. *BMC Infect Dis*, 2008, 8: 1.
- [7] Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, *et al.* Assessing liver tumor stiffness by transient elastography [J]. *Hepatol Int*, 2007, 1(3): 394-397.
- [8] Beningo KA, Lo CM, Wang YL. Flexible polyacrylamide substrata for the analysis of mechanical interactions at cell-substratum adhesions [J]. *Methods Cell Biol*, 2002, 69: 325-339.
- [9] Sporea I, Sirlu R, Deleanu A, *et al.* Liver stiffness measurements in patients with HBV vs HCV chronic hepatitis: A comparative study [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(38): 4832-4837.
- [10] Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, *et al.* Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2005, 41(1): 48-54.
- [11] 吕守芹,杨帆,龙勉. 细胞-分子生物力学研究进展[J]. *医用生物力学*, 2009, 24(2): 79-84.
Lv SQ, Yang F, Long M. Advances in study on cellular and molecular biomechanics [J]. *J Med Biomech*, 2009, 24(2): 79-84.

- [12] Chen CS. Mechanotransduction-A field pulling together [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 20): 3285-3292.
- [13] Asparuhova MB, Gelman L, Chiquet M. Role of the actin cytoskeleton in tuning cellular responses to external mechanical stress [J]. *Scand J Med Sci Sports*, 2009, 19(4): 490-499.
- [14] Katsumi A, Orr AW, Tzima E, *et al.* Integrins in mechanotransduction [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(13): 12001-12004.
- [15] Solon J, Levental I, Sengupta K, *et al.* Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates [J]. *Biophys J*, 2007, 93(12): 4453-4461.
- [16] Zemel A, Rehfeldt F, Brown AE, *et al.* Optimal matrix rigidity for stress fiber polarization in stem cells [J]. *Nat Phys*, 2010, 6(6): 468-473.

~~~~~

(上接第 293 页)

- [12] 王超,张春秋,董心,等. 骨功能适应性数值模拟的若干进展[J]. *医用生物力学*, 2008, 23(5): 399-404.  
Wang C, Zhang CQ, Dong X, *et al.* Advances of mathematical simulation of bone functional adaptation [J]. *J Med Biomech*, 2008, 23(5): 399-404.
- [13] Weinans H, Huiskes R, Grootenboer HJ. Effects of fit and bonding characteristics of femoral stems on adaptive bone remodeling[J]. *J Biomech Eng*, 1994, 116(4): 393-400.
- [14] Simões JA, Vaz MA, Blatcher S, *et al.* Influence of head constraint and muscle forces on the strain distribution within the intact femur [J]. *Med Eng Phys*, 2000, 22(7): 453-459.
- [15] Senapati SK, Pal S. UHMWPE-alumina ceramic composite: A proposed metal substitute for artificially replaced hip joint [J]. *J Inst Eng (India)*, 2005, 85: 157-162.
- [16] Brown TD, Pedersen DR, Baker KJ, *et al.* Mechanical consequences of core drilling and bone grafting on osteonecrosis of the femoral head [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1993, 75(9): 1358-1367.
- [17] Pishdast H, Farahmand F, Rouhi G. Using a truss-inspired model with the uniform strength optimization theory to predict spongy bone geometry in proximal femur [J]. *Am J Appl Sci*, 2009, 6(3): 449-455.