文章编号:1004-7220(2023)01-0149-07

周期性牵张应变对大鼠骨髓间充质干细胞神经向分化的影响

程 虹, 黄 艳*, 姚 杰, 陈 伟, 钱佳怡, 樊瑜波*
(北京航空航天大学 生物与医学工程学院,生物力学与力学生物学教育部重点实验室, 北京市生物医学工程高精尖创新中心, 北京 100083)

摘要:目的 研究周期性牵张应变对大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells, rBMSCs)向神经细胞分化的影响。**方法** 对 rBMSCs 加载不同幅度周期性应变 24 h,然后继续培养 5 d,检测神经细胞标志物表达和相关信号通路蛋白磷酸化水平。通过有限元分析牵张作用下细胞表面的应力分布。通过转录组测序分析周期性牵张应变引起差异表达的基因。**结果** 5% 幅度、0.5 Hz 周期性牵张应变可以显著促进神经细胞标志物的表达,提高细胞内胞外信号调节激酶(extracellular-signal-regulated kinase, ERK)、蛋白激酶 B (AKT)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的磷酸化水平。KEGG 通路富集分析发现,与细胞黏附、细胞外基质和受体相互作用相关的基因在周期性牵张作用后显著提高。**结论** 周期性牵张应变可以改变细胞与细胞外基质的相互作用,激活 AKT/mTOR 和 ERK 信号通路,从而促进 rBMSCs 向神经细胞分化。了解力学刺激对间充质干细胞分化的影响有望提高干细胞向神经细胞分化的效率,有利于组织工程的装置设计,促进间充质干细胞在神经组织再生和修复的临床应用。

关键词: 周期性牵张; 骨髓间充质干细胞; 神经细胞; 细胞分化
中图分类号: R 318.01 **文献标志码**: A
DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.01.022

Effects of Cyclic Strain on Neural Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells

CHENG Hong, HUANG Yan*, YAO Jie, CHEN Wei, QIAN Jiayi, FAN Yubo*
(*Beijing Advanced Innovation Center for Biomedical Engineering*, *Key Laboratory of Biomechanics and Mechanobiology*, *Ministry of Education*, *School of Biological Science and Medical Engineering*, *Beihang University*, *Beijing 100083*, *China*)

Abstract: Objective To study the mechanical effects of cyclic strain on neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs). **Methods** The rBMSCs were subjected to cyclic strain for 24 hours and then cultured for 5 days. The expression of neural markers and the phosphorylation of relative signaling pathway proteins were evaluated. The stress distribution on cell surface was analyzed by finite element method. The differentially expressed genes induced by strain were identified by RNA sequencing analysis. **Results** The 0.5 Hz strain with 5% magnitude could significantly induce higher expression of neural markers and elevated phosphorylation level of extracellular-signal-regulated kinase (ERK), protein kinase B (AKT) and mammalian target of rapamycin (mTOR). KEGG pathway analysis showed that the focal adhesion and ECM-receptor interaction were significantly enriched under cyclic strain. **Conclusions** Cyclic strain could change the interaction of cells with the extracellular matrix (ECM) and enhance the AKT/mTOR and ERK pathway, finally promote rBMSC neural differentiation. Knowledge about the impact of mechanical stimulation on BMSC neural differentiation

收稿日期:2022-05-09; **修回日期**:2022-05-20
基金项目:国家自然科学基金项目(11827803,11421202,11302020)
通信作者:黄艳,副教授,E-mail: huangyan@buaa.edu.cn;樊瑜波,教授,E-mail: yubofan@buaa.edu.cn
* 为共同通信作者

is expected to improve the efficiency of stem cell differentiation, shed light on device design for tissue engineering, and promote clinical application of mesenchymal stem cells in neural issue repair and regeneration.

Key words: cyclic strain; bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs); neural cells; cell differentiation

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是来自于骨髓的具有自我更新能力和多向分化潜能的干细胞,在体外一定的条件下可以诱导分化为成多种类型的细胞,例如神经细胞、血管内皮细胞和肝细胞等[1-2]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为一种潜在的细胞疗法已经应用于治疗多种疾病,例如骨性关节炎、心血管疾病[3-4]。大量研究发现,MSCs 经体外诱导后可以分化成类神经元细胞,并表达神经细胞特有的一些标志性蛋白[5-6]。

体外诱导 BMSCs 分化成神经细胞的方法主要是依靠生长因子、小分子药物和基因手段,但是最近的研究发现,流体剪切应力、静态拉伸等力学刺激也有助于调控干细胞的命运和诱导分化方向[7-8]。虽然神经细胞在体内不是承受力的关键细胞,但在神经元生长和发育过程中也会受到拉伸、剪切等力学刺激,神经元与周围环境之间的相互作用也是控制神经元生长和再生过程的重要组成部分。研究证实,拉伸可以刺激神经元、轴突和突触的生长[9-11]。BMSCs 体外分化成神经细胞依赖于对体内环境的有效模拟,包括生化和机械刺激。研究发现,低幅度、低频率的循环拉伸刺激通过调节 Rho GTPases 活性促进 BMSCs 神经元样分化[12]。同时,剪切应力联合其他刺激可以更有效地促进 BMSCs 向神经细胞分化[13-14]。然而,目前有关力学刺激诱导干细胞分化的调控机制研究较少报道。

本文通过对大鼠骨髓间充质干细胞(rat bone marrow mesenchymal stem cells, rBMSCs)加载周期性牵张来促进其神经向分化,初步探讨周期性牵张诱导 BMSCs 向神经细胞分化的机制。了解力学刺激对 BMSCs 分化的影响有望提高干细胞向神经细胞分化的效率,为其临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

4 周龄 SD 雄性大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。低糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、磷酸盐缓冲液(PBS)、B27 细胞培养添加剂(ThermoFisher 公司,美国)。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, FGFb)(Sigma 公司,美国)。硅胶膜(Lubrizol Specialty Chemicals 公司,美国)。细胞凋亡检测试剂盒(BD 公司,美国)。细胞 mRNA 提取试剂盒、反转录试剂盒(Qiagen 公司,德国)。SYBR Green 荧光染料(ThermoFisher 公司,美国)。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。抗巢蛋白(nestin)抗体、抗神经细胞特异性微管蛋白(β3 tubulin)抗体、FITC 标记兔抗鸡二抗,PE 标记鼠抗兔二抗(Abcam 公司,英国)。四甲基异硫氰酸罗丹明(tetramethyl rhodamin isothiocyanate, TRITC)标记的二抗(武汉博士德公司,中国)、4′, 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)(Dojindo 公司,日本)。AKT、mTOR、ERK1/2 总蛋白和磷酸化 Alpha Screen Surefire 检测试剂盒(PerkinElmer 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 *原代细胞培养和分化* 处死 4 周龄 SD 雄性大鼠分离后腿双侧股骨和胫骨,通过 Percoll 密度梯度离心得到原代 BMSCs[15]。当细胞密度达到 80% ~ 90%时进行传代培养,本实验所用细胞为第 3、4 代。预诱导分化培养基(10% FBS 低糖 DMEM 培养基, EGF 20 ng/mL, FGFb 20 ng/mL, 1×B27)诱导分化 7 d 后进行力学加载 1 d,对照组接种到同样的基底上静止培养。力学加载结束后更换诱导分化培养基(10% FBS 低糖 DMEM 培养基, EGF 10 ng/mL, FGFb 10 ng/mL, 1×B27)继续诱导分化 5 d[16]。

1.2.2 *力学加载* 细胞预诱导分化 7 d 后接种到硅胶膜上,利用自制的 3D 打印牵张装置[17]对细胞施加周期性牵张应变, 牵张频率为 0.5 Hz, 加载 24 h, 然后继续诱导分化 5 d。

1.2.3 *实时定量 PCR* 收集细胞用 PBS 清洗 1 次后裂解细胞,利用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,检测 RNA 浓度和纯度,以总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA,最后加入引物进行实时定量 PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1　实时定量 PCR 相关引物

Tab. 1　Primers for quantitative real-time PCR

基因	引物序列(5'-3')
NES	CCGGGTCAAGACGCTAGAAGA
	CTCCAGCTCTTCCGCAAGGTTGT
β3 tubulin	GTCCGCCTGCCTCTTCGTCTCTA
	GGCCCCTATCTGGTTGCCGCACT
MAP2	CAAACGTCATTACTTTACAACTTGA
	CAGCTGCCTCTGTGAGTGAG
NT-3	CTTCTGCCACGATCTTAC
	AACATCTACCATCTGCTTG
NT-4	CTAATGTGTGACTCTGCTAAC
	GATACGGTGCTCAGGATAG
BDNF	GCGGCAGATAAAAAGACTGC
	GCCAGCCAATTCTCTTTTTG
GAPDH	GGTGTGAACGGATTTGGCCGTAT
	CTCAGCACCAGCGTCACCCCATT

1.2.4　*细胞转录组分析*　诱导分化 13 d 后提取细胞总 mRNA,由诺禾致源公司完成转录组测序。采用 HISAT2-2.1.0、StringTie-1.3.5 和 DEseq 软件分析差异表达基因。$P<0.05$ 和 $\log_2$(Fold Change)>1 的基因被筛选为差异表达。使用 DAVID 在线工具进行基因富集分析。通路富集分析基于最新的京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)数据库。

1.2.5　*细胞免疫荧光染色*　收集分化后细胞加入固定液 4%多聚甲醛室温孵育 30 min;PBS 洗 3 次;破膜剂 0.1%Triton X-100 室温孵育 10 min;PBS 洗 3 次;封闭液 1%BSA 室温孵育 30 min;PBS 洗 3 次;加入一抗温孵育 30 min;PBS 洗 3 次;加入二抗和 DAPI 温孵育 30 min;PBS 洗 3 次;抗荧光衰减封片剂封片;激光共聚焦显微镜下观察并成像。

1.2.6　*流式细胞分析*　细胞预诱导分化 7 d,力学加载 1 d 后消化并收集细胞,利用细胞凋亡试剂盒对细胞进行染色,通过流式细胞仪分析经力学加载后细胞凋亡的情况。诱导分化共 13 d 后,细胞固定破膜后孵育一抗 30 min,PBS 洗 3 次后孵育二抗 30 min,PBS 洗 3 次后上机分析蛋白的表达。

1.2.7　*信号通路相关蛋白磷酸化检测*　诱导分化共 13 d 后,收集不同处理组相同数量的细胞加入裂解液,利用 Alpha Screen Surefire 试剂盒检测相应磷酸化蛋白的含量。

1.2.8　*有限元建模力学分析*　以静止对照组细胞免疫荧光层扫数据为源数据(像素 0.284 μm,图像尺寸 1 024×1 024 Pixel,层厚 0.6 μm),利用图像处理软件 Mimics 10.0(Materialise 公司,比利时)重建细胞的几何模型。采用有限元软件 ABAQUS 6.0(Simulia 公司,美国)分析细胞在牵张作用下的应力分布情况。将细胞简化为各向同性线弹性材料,弹性模量为 2.4 kPa,泊松比为 0.37[18]。硅胶膜弹性模量为 6.2 MPa,泊松比为 0.49。采用四面体单元对细胞进行网格划分,采用六面体网格对硅胶膜进行网格划分,单元边长为 10 μm。

1.2.9　*统计学分析*　图形数据表示为均值±标准差。使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析。采用 Mann-Whitney 检验 t 检验和方差分析(ANOVA)对各组进行比较。$P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

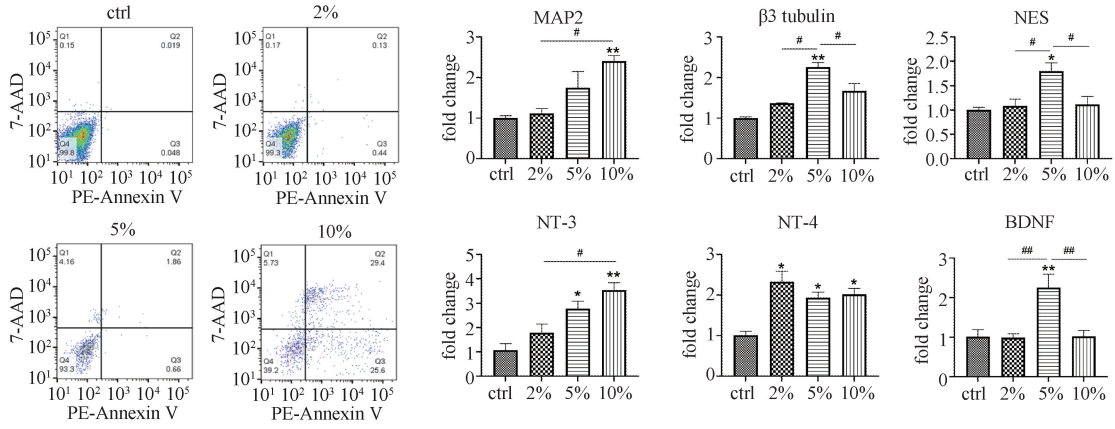
2　结果

2.1　不同周期性牵张应变对 rBMSCs 表达神经细胞相关基因的影响

对细胞施加 0.5 Hz、不同牵张幅度的周期性牵张刺激 24 h。结果显示,2%、5%周期性牵张对细胞活性没有显著影响,10%周期性牵张会引起约 30%细胞的凋亡[见图 1(a)]。与静止对照组相比,微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2,MAP2)和神经营养因子 3(neurotrophin 3,NT-3)在 10%牵张应变时表达水平最高;β 微管蛋白 III(β3 tubulin)、巢蛋白(nestin, NES)和脑源性生神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)在 5%牵张应变时表达水平最高[见图 1(b)]。神经营养因子 4(neurotrophin 4,NT-4)在不同周期性牵张作用下没有显著差异。因此,在 0.5 Hz 牵张频率下,5%周期性牵张应变是诱导 rBMSCs 向神经细胞分化的最有利的牵张幅度。

2.2　周期性牵张应变对 rBMSCs 向神经细胞分化的影响

BMSCs 加载 5%幅度、0.5 Hz 周期性牵张应变 24 h 后,继续分化 5 d。实验结果表明,周期性牵张应变可以诱导 rBMSCs 表达更多的神经细胞标志物和神经因子[见图 2(a)],NES 和 β3 tubulin 的蛋白表达水平比静置对照组更高[见图 2(b)],并且分化后的神经细胞有更长的突起[见图 2(c)]。

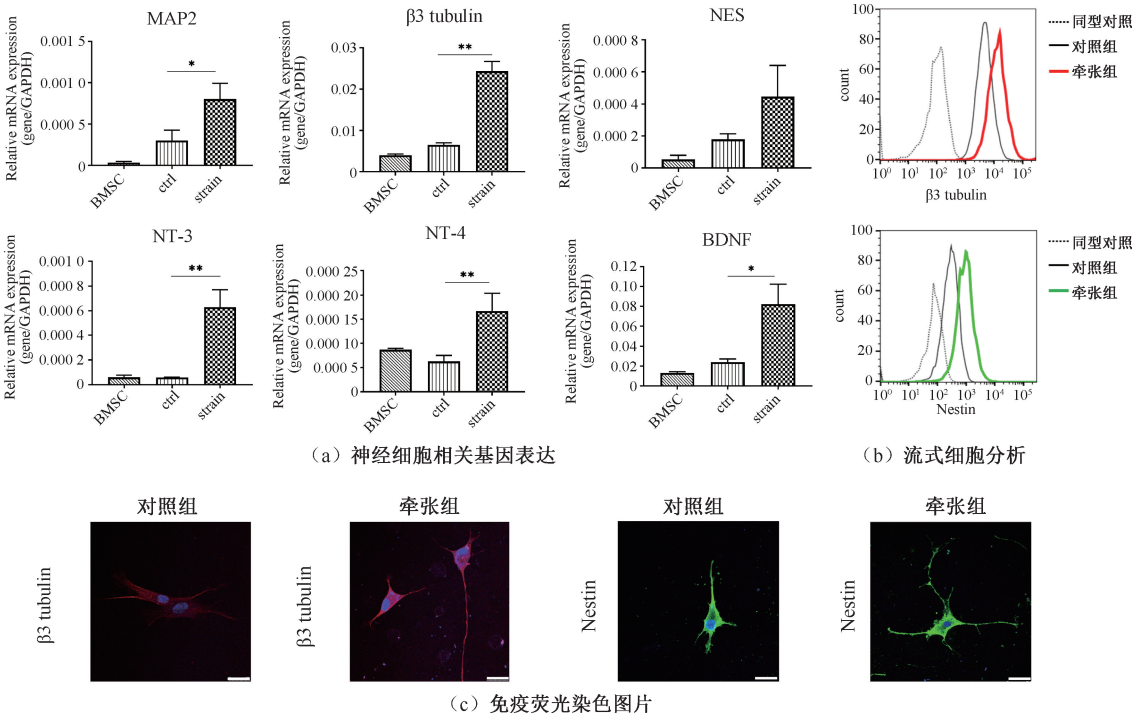


（a）细胞活性　（b）神经细胞相关基因表达

图 1　不同周期性牵张应变对 rBMSCs 向神经细胞分化的影响

Fig. 1　Effects of cyclic strain with different magnitudes on neural differentiation of rBMSCs　(a) Viability of rBMSCs, (b) Neural related gene expressions

注：$n=4$，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。ctrl 表示静置对照。



（a）神经细胞相关基因表达　（b）流式细胞分析

（c）免疫荧光染色图片

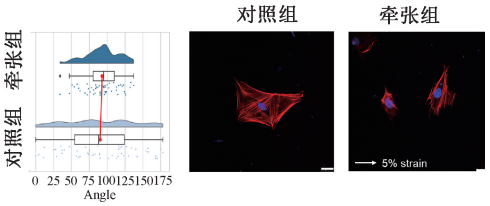
图 2　周期性牵张应变对 rBMSCs 表达神经细胞标志物的影响

Fig. 2　Effect of cyclic strain on the neural marker expressions of rBMSCs　(a) Neural related gene expressions, (b) Flow cytometry analysis, (c) Immunofluorescence staining images

注：$n=4$，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；标尺 = 25 μm。

2.3　周期性牵张应变在细胞上的力学分布

经周期性牵张作用后对细胞排列方向进行统计(设牵张方向为 0°)，大部分细胞沿着与牵张方向垂直的方向排列[见图 3(a)]。免疫荧光染色结果显示，细胞骨架微丝蛋白在静置时沿各个方向随机分布，在经过周期性牵张刺激后，所有的骨架微丝蛋白均靠近垂直牵张方向排列[见图 3(b)]。



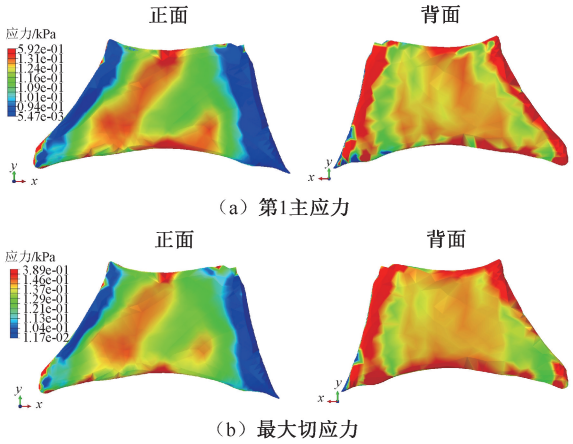
（a）细胞排列方向　（b）细胞骨架免疫荧光染色

图 3　牵张作用对细胞排列的影响

Fig. 3　Effects of stretch on cell alignment　(a) Cell alignment, (b) Immunostaining images of F-actin in cells

注:标尺=25 μm。

有限元建模分析结果显示,在细胞正面,第 1 主应力和最大切应力主要分布在细胞中部与牵张方向垂直的区域,在沿牵张方向的细胞边缘区域应力相对较小;在细胞背面(即与硅胶膜接触面),第 1 主应力和最大切应力主要分布在牵张方向的细胞边缘(见图 4)。



（a）第1主应力

（b）最大切应力

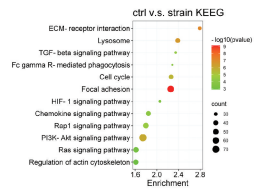
图 4　牵张作用下细胞表面应力分布

Fig. 4　Stress distributions on cell surface under stretch　(a) The first principal stress, (b) The maximum shear stress

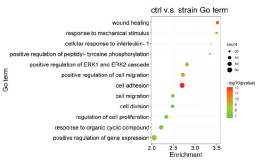
注:标尺=25 μm。

2.4　转录组分析周期性牵张应变对 rBMSCs 向神经细胞分化的影响

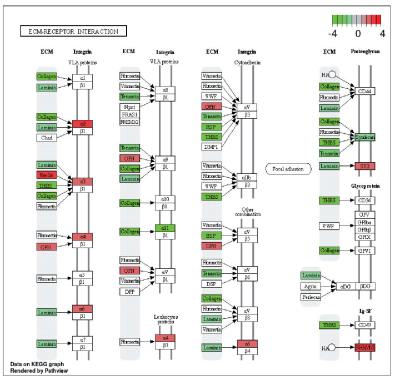
转录组测序结果分析共获得了 2 633 个差异表达基因,其中 2 046 个基本表达下调,587 个基因上调。图 5(a)、(b)分别显示了 KEGG 通路富集分析和 Go 富集分析的结果(仅显示最显著差异的前 12 条)。图 5(c)显示,周期性牵张后整合素 α2、α3、α4、α6 表达显著上升,而细胞外基质成分 collagen、laminin 的表达显著下降。细胞骨架调节相关的多个基因(Itgb3、Iqgap3、Diaph3 等)在周期性牵张应变刺激后显著上调,Rac2、mylk 和 FGD2 等基因显著下调[见图 5(d)]。



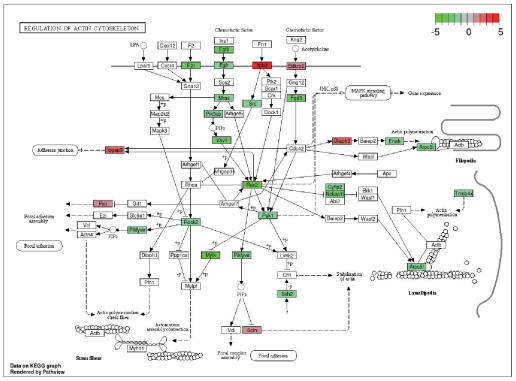
（a）KEGG 通路富集分析



（b）Go富集分析



（c）ECM受体相互作用通路分析



（d）细胞骨架调节通路分析

图 5　转录组分析周期性牵张应变对细胞的影响

Fig. 5　Transcriptome analysis of the effects of cyclic strain on cells　(a) KEGG pathway enrichment analysis, (b) Go term analysis, (c) ECM-receptor interaction path analysis, (d) Regulation of actin cytoskeleton pathway analysis

2.5　周期性牵张应变对 AKT/mTOR 和 ERK 信号通路的作用

为了进一步分析周期性牵张应变引起的细胞内信号传递,收集分化后细胞检测 AKT、mTOR 和 ERK 的活化。在周期性牵张应变作用后,AKT1/2/3、mTOR 和 ERK1/2 总蛋白水平无明显变化,而磷酸化 AKT1/2/3、磷酸化 mTOR 和磷酸化 ERK1/2 的水平显著升高(见图 6)。

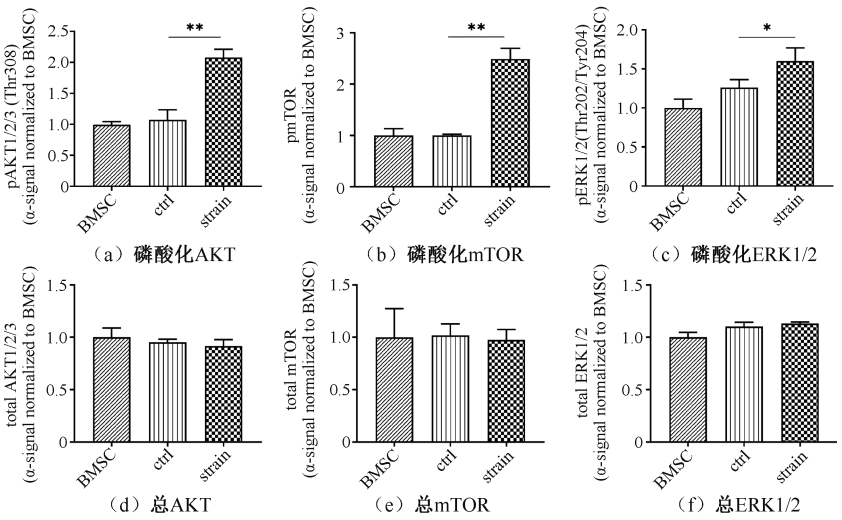


图 6 周期性牵张应变对信号通路的影响

Fig. 6 Effect of cyclic strain on signaling pathway (a) Phospho-AKT, (b) Phospho-mTOR, (c) Phospho-ERK1/2, (d) Total AKT, (e) Total mTOR, (f) Total ERK1/2

注:$n=4$, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$。

3 讨论

本文旨在研究周期性牵张应变对 rBMSCs 向神经细胞分化的影响。结果显示,经 5% 幅度、0.5 Hz 周期性牵张应变刺激后,rBMSCs 沿垂直于牵张方向排列,分化的神经细胞内的神经标志物和神经因子表达水平都显著提高,并且细胞形态更接近神经细胞,神经突起更长。Leong 等[12]研究发现,对人 MSC 施加 0.5% 幅度、0.5 Hz 拉伸应变可以促进 NES 和 MAP2 的表达和树突状伪足的生长。Kampanis 等[19]研究发现,对成年大鼠背根神经节细胞施加 10%、0.5 Hz 循环拉伸应变可以促进神经细胞轴突生长,而 20% 拉伸幅度不能进一步促进轴突生长,反而会减少大直径神经元的轴突生长。以上研究与本文结果一致,只有在一定拉伸频率和幅度的刺激下才能更好地促进神经细胞标志物的表达和突触的生长。而不同研究中牵张幅度和频率的差异是由于不同的细胞类型导致。

研究表明,AKT 和 ERK 通路在神经细胞的分化过程中起着非常重要的作用:AKT 激活后可通过多个下游信号调控神经细胞的生长:通过激活 CREB 提高 BDNF 的表达水平,进而提高神经元的存活率[20];通过局部 Rac1 信号传导调节神经元生长锥扩张;激活 mTOR 调节轴突分支和体细胞大小[21];ERK 信号传导可以促进未成熟神经元的轴突生长和损伤轴突的再生[22]。本文结果显示,周期性牵张应变刺激可以引起 AKT、mTOR 和 ERK1/2 的磷酸化水平显著升高。因此,周期性牵张的力学刺激可以激活细胞内 PI3K/AKT/mTOR、ERK 信号通路并促进 rBMSCs 向神经细胞分化。

本文通过 KEGG 通路富集分析显示,细胞外基质受体相互作用(ECM-receptor interaction)和黏着斑(focal adhseion)是周期性牵张应变引起的最大差异通路。周期性牵张应变刺激后,上调最显著的差异基因是整合素和参与细胞骨架调控的相关基因(Iqgap3、Diaph3 等)。整合素是介导细胞骨架和细胞外基质之间的相互作用关键膜蛋白,不同的整合素家族可以通过不同的信号通路参与调控 MSCs 不同方向分化[23]。Diaph3 是参与胞质分裂、应力纤维形成所必需的,与 GTP 结合形式的 Rho 结合促进肌动蛋白聚合和延长,可以重塑细胞骨架。有研究发现,Diaph3 的缺陷可导致神经祖细胞核分裂和分化的不确定,最终导致皮质祖细胞丧失、小头畸形和自闭症样行为[24]。此外,下调的小 GTP 酶和上调的 Rac 是众所周知的肌动蛋白细胞骨架调节剂,对神经元形态发生至关重要[25]。

4 结论

5% 幅度、0.5 Hz 周期性牵张应变可以引起细

胞骨架的改变,激活 AKT/mTOR 和 ERK 信号通路,促进神经细胞相关蛋白的表达,最终促进了 rBMSCs 向神经细胞分化。本研究也有局限性,细胞分化是一个较长时间的动态过程,目前仅分析分化始末阶段的蛋白和信号通路变化。本研究没有对转录组分析富集得到所有信号通路进行验证,其他信号通路将在以后的工作中进行研究。

参考文献:

[1] TAKIZAWA S. Differentiation of adult bone marrow cells into neurons and endothelial cells in rat brain after stroke in the presence of cytokines [J]. Rinsho Shinkeigaku, 2003, 43(11): 830-831.

[2] AURICH H, SGODDA M, KALTWASSER P, *et al.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue *in vitro* promotes hepatic integration *in vivo* [J]. Gut, 2009, 58(4): 570-581.

[3] MANCUSO P, RAMAN S, GLYNN A, *et al.* Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: The critical role of the cell secretome [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2019, 7: 9.

[4] SHAFEI AE, ALI MA, GHANEM HG, *et al.* Mesenchymal stem cell therapy: A promising cell-based therapy for treatment of myocardial infarction [J]. J Gene Med, 2017, 19(12): e2995.

[5] SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro* [J]. Exp Neurol, 2000, 164(2): 247-256.

[6] SALLAM A, SUDHA T, DARWISH NHE, *et al. In vitro* differentiation of human bone marrow stromal cells into neural precursor cells using small molecules [J]. J Neurosci Methods, 2021, 363: 109340.

[7] CLAUSE KC, LIU LJ, TOBITA K. Directed stem cell differentiation: The role of physical forces [J]. Cell Commun Adhes, 2010, 17(2): 48-54.

[8] MARYCZ K, LEWANDOWSKI D, TOMASZEWSKI KA, *et al.* Low-frequency, low-magnitude vibrations (LFLM) enhances chondrogenic differentiation potential of human adipose derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs) [J]. Peer J, 2016, 4: e1637.

[9] LOVERDE JR, PFISTER BJ. Developmental axon stretch stimulates neuron growth while maintaining normal electrical activity, intracellular calcium flux, and somatic morphology [J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 308.

[10] DE VINCENTIIS S, FALCONIERI A, MAINARDI M, *et al.* Extremely low forces induce extreme axon growth [J]. J Neurosci, 2020, 40(26): 4997-5007.

[11] HIGGINS S, LEE JS, HA L, *et al.* Inducing neurite outgrowth by mechanical cell stretch [J]. Biores Open Access, 2013, 2(3): 212-216.

[12] LEONG WS, WU SC, PAL M, *et al.* Cyclic tensile loading regulates human mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like phenotype [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6(S3): s68-s79.

[13] MASCOTTE-CRUZ JU, RIOS A, ESCALANTE B. Combined effects of flow-induced shear stress and electromagnetic field on neural differentiation of mesenchymal stem cells [J]. Electromagn Biol Med, 2016, 35(2): 161-166.

[14] JEON KJ, PARK SH, SHIN JW, *et al.* Combined effects of flow-induced shear stress and micropatterned surface morphology on neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. J Biosci Bioeng, 2014, 117(2): 242-247.

[15] HUANG Y, JIA X, BAI K, *et al.* Effect of fluid shear stress on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Arch Med Res, 2010, 41(7): 497-505.

[16] YANG Q, MU J, LI Q, *et al.* A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 372(4): 520-524.

[17] CHENG H, HUANG Y, CHEN W, *et al.* Cyclic strain and electrical co-stimulation improve neural differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 624755.

[18] YEN MH, CHEN YH, LIU YS, *et al.* Alteration of Young's modulus in mesenchymal stromal cells during osteogenesis measured by atomic force microscopy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526(3): 827-832.

[19] KAMPAINS V, TOLOU-DABBAGHIAN B, ZHOU L, *et al.* Cyclic stretch of either PNS or CNS located nerves can stimulate neurite outgrowth [J]. Cells, 2020, 10(1): 32.

[20] WANG Y, ZHANG J, HAN M, *et al.* SMND-309 promotes neuron survival through the activation of the PI3K/Akt/CREB-signalling pathway [J]. Pharm Biol, 2016, 54(10): 1982-1990.

[21] GRIDER MH, PARK D, SPENCER DM, *et al.* Lipid raft-targeted Akt promotes axonal branching and growth cone expansion via mTOR and Rac1, respectively [J]. J Neurosci Res, 2009, 87(14): 3033-3042.

[22] HUANG H, LIU H, YAN R, *et al.* PI3K/Akt and ERK/MAPK signaling promote different aspects of neuron survival and axonal regrowth following rat facial nerve axotomy [J]. Neurochem Res, 2017, 42(12): 3515-3524.

(下转第 163 页)