论文

微图案技术研究 MSCs 几何形状对 YAP 定位的影响

张莹莹^{①②}, 孙艳^{①②}, 黄艳^①, 宫赫^{①*}^① 北京航空航天大学生物与医学工程学院, 北京 100191;^② 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 传感技术联合国家重点实验室, 上海 200050

* 联系人, E-mail: bmegonghe@buaa.edu.cn

收稿日期: 2016-01-05; 接受日期: 2016-03-01

国家自然科学基金(批准号: 11322223, 81471753, 11432016, 11421202)和教育部新世纪优秀人才支持计划(批准号: NCET-12-0024)资助

摘要 已有研究证明, 一些物理因素, 如基底的硬度、几何约束等对干细胞的凋亡、增殖及分化有影响. 转录因子 YAP 已被证实在外力刺激通过细胞骨架向细胞核内传递过程中起着非常重要的作用. 本研究通过微图案技术控制骨髓间充质干细胞(MSCs)的几何形状, 探讨了相同面积下, 7 种几何形状的 MSC 单细胞中 YAP 定位情况. 结果显示, 当微图案限制细胞的生长时, 这种几何约束促进 YAP 出核. 进一步观察发现, 在细胞骨架肌动蛋白纤维束较明显、收缩性较强的细胞内, YAP 核定位仍较明显; 反之, 丝状肌动蛋白(F-Actin)排列松散的几何结构细胞中, YAP 出核, 主要定位在细胞质. 通过用不同几何图案限制细胞铺展, 进一步证实了细胞的几何约束可以通过肌动蛋白收缩性对 YAP 活性进行调控, 肌动蛋白骨架对 YAP 的胞质、胞核转移有分子开关的作用.

关键词 微图案, 骨髓间充质干细胞, 几何形状, YAP

细胞的形状及大小对其行为和功能有重要影响, 不同组织的细胞所行使的功能不同, 因而具有不同的形状, 例如, 红细胞的扁圆形状利于其在流体环境中减小阻力, 行使运输的功能; 而神经元细胞为了传递神经信号而形成拉长的轴突结构的形状^[1]. 在普通的培养条件下, 即使同一类型的细胞也会表现出多种多样的形状, 而且这种细胞形状也多是短暂的, 因为细胞在运动过程中会不断拆卸和组装其细胞骨

架^[2]. 有研究曾证实, 通过控制单个内皮细胞的形态可以改变细胞的增殖能力^[3]. 近来研究证明, 细胞的几何形状可以影响细胞的变形、细胞骨架重排、染色质聚集、基因表达、细胞生长、凋亡以及细胞分裂等^[4,5]. MSCs 因来源丰富, 具有多向分化的潜能, 被广泛应用于组织修复工程领域^[6]. MSCs 的分化除了受到化学因子的影响, 还会受到周围微环境中力学因素的影响, 包括基质的硬度、细胞铺展面积, 抑或

引用格式: 张莹莹, 孙艳, 黄艳, 等. 微图案技术研究 MSCs 几何形状对 YAP 定位的影响. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 321–329
Zhang Y Y, Sun Y, Huang Y, et al. Effect of cell geometry on YAP localization of mesenchymal stem cells on micropatterned surfaces. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 321–329, doi: 10.1360/N052016-00005

是外界施加的压应力或张应力的刺激. Kilian 等人^[4]通过微图案技术将 MSCs 细胞控制在 $2500\ \mu\text{m}^2$ 的几种不同几何形状内, 发现细胞的成骨向、成脂向分化命运并不相同, 长方形及五角星形状内更利于细胞向成骨向分化, 而正方形及花瓣状内细胞更易于成脂向分化. 然而, 几何形状如何调控胞质、胞核调控因子的重分配, 从而控制基因表达仍不明确, 这其中的信号通路转移机制研究也尤为重要.

Hippo 信号通路在细胞增殖调节过程中扮演着极为重要的角色. YAP(yes-associated protein)是该信号通路中的重要转录因子. 最近有报道称, YAP 信号通路可以介导 MSC 的力学响应机制, YAP 通过 Rho-GTP 酶将力学信号传递入核内, 影响基因转录, 基底硬度介导 MSCs 分化过程中也需要这些力传导因子的参与^[7]. 另外, 也有报道称动态拉伸成肌细胞可以激活 YAP/TAZ 信号^[8]. 因此, YAP 介导的力传导作用可能依赖于细胞骨架与细胞核内的力学传递过程^[9]. 细胞培养过程中, Hippo 信号通路调控细胞增殖、细胞接触抑制, 且被认为与细胞密度密切相关^[10]: 细胞密度较低时, Hippo 信号通路受到抑制, YAP 能够在细胞核内积累, 进而能够促进细胞增殖; 相反, 细胞密度较高时, Hippo 信号通路激活, YAP 出核, 细胞增殖受到抑制. 因此, 细胞的接触及铺展形态与 Hippo 信号通路之间存在着某种关系^[11]. 已经有很多细胞-细胞黏附分子被证实参与了调控 Hippo 信号通路过程^[12-14]. 然而细胞形态影响 YAP 活性的机制还知之甚少. 对单细胞的研究能直接反映细胞内本质的变化, 因此非常重要.

微图案技术可以用来限定细胞在特定区域的铺展, 已被越来越多地用于研究细胞迁移、细胞骨架聚合、增殖及细胞的极性^[15-17]. Wada 等人^[11]研究发现, 细胞的形态可以调节 YAP 信号, 而且不依赖于细胞与细胞之间的接触和黏连. 通过改变微图案的几何形状可以控制细胞的铺展形状, 进而研究形状对细胞骨架分布影响的规律及其内在机制^[2]. 本研究利用微图案技术, 通过设计一组具有相同面积 ($\sim 1960\ \mu\text{m}^2$)、不同几何形状(圆形、六边形、五边形、正方形、三角形、菱形、梯形)的微图案, 实现了控制单个大鼠(*Rattus norvegicus*) MSCs 细胞的定位、形状及细胞铺展面积的大小, 减小了细胞与细胞之间的异质性影响, 主要考察单个细胞的几何形状对其 YAP 转录因子活性的影响.

1 材料与方法

1.1 微图案的设计与印章制备

利用 L-edit 软件设计绘制出几何图案阵列(圆形、三角形、正方形、五边形、六边形、菱形、梯形), 几何参数及大小如图 1 所示, 根据设计好的图案阵列, 制作玻璃光刻掩模板(北京机械工业自动化研究所), 然后利用掩膜制作具有微结构图案的硅片底板(北京大学微电子研究院). 将聚二甲基硅氧烷(PDMS, Sylgard 184, DOW corning)预聚体与固化剂按照 10:1 的比例混匀, 除泡后倒在硅片底板上. 65°C 固化 4 h 后将 PDMS 揭下, 其表面即翻印出所设计的图案阵列($1.6\ \text{cm}\times 1.6\ \text{cm}$), 如图 1 所示, 最后将其切割成合适大小的印章备用.

1.2 微转印法制备微图案基底

PDMS 胶溶液配制方法同上, 除泡后待用. 玻片洗净并干燥后置于匀胶机托盘中心, 将 PDMS 液体滴于玻片中心. 设定程序, 将 PDMS 均匀旋涂于玻片表面. 将玻片转移至电热板上, 65°C , 4 h 以上待其凝固. PDMS 印章放入 50% 酒精中超声处理 30 min, 移入超净台, 干燥, $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 纤连蛋白溶液(FN, BD)滴加到印章表面室温孵育 1 h, 再次吹干; 对于结构表面规整性检测实验, 用 FITC-BSA(博奥森, 北京)孵育 PDMS 印章 1 h. 铺有 PDMS 的玻片放入紫外/臭氧清洗机(PSD Pro, Novascan, 美国)处理 15 min 以灭菌, 同时增加 PDMS 的亲水性, PDMS 印章倒扣于玻片上转印 10 min 后揭起, 铺有 PDMS 的玻片上即形成有不同几何形状 of 蛋白微图案结构, 如图 1 所示. 最后用 1% Pluronic F127(Sigma, 美国)孵育玻片, 可使印有蛋白结构以外的表面不利于细胞的黏附, 这样就使得只有落在印有 FN 蛋白图案内的细胞才能黏附, 并且细胞的铺展, 生长将被限制在所设计的图案模式内.

1.3 骨髓间充质干细胞的分离培养与接种

本文选用密度梯度离心法分离纯化骨髓间充质干细胞, 具体步骤如下: 颈椎脱臼处死 4 周龄 SD 大鼠, 将大鼠股骨和胫骨剪下, 软组织剔除干净, 去除胫骨和股骨的骨髓端, 无菌注射器吸取低糖 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)(Gibco, 美国)培养基冲洗骨髓腔, 200 目细胞筛过滤收集含有冲

图 1 几何图形设计参数及 PDMS 印章结构示意图(网络版彩图)

A: 几何图形面积固定为 $\sim 1960 \mu\text{m}^2$, 几何参数 r 代表半径, l 和 w 分别代表边长和宽; B: 微图案阵列印章示意图及局部结构

洗液, $500\times g$ 离心 5 min, 弃上清. 新的 DMEM 重悬细胞后缓慢加入到预先配制好的等体积 Percoll 分离液 (1.073 g/mL, Pharmacia, 美国) 中, $1100\times g$ 离心 20 min. 收集云雾状和白膜状交界处细胞, 用 DMEM 洗涤 2 次后加入含有 10% 胎牛血清 (四季青), 100 U/mL 青霉素, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素 (Invitrogen, 美国) 的完全培养基中, 接种至培养皿. 37°C , 5% CO_2 培养箱中静置培养, 24 h 后换液, 之后每 2~3 天换液. 2~4 代细胞用于本实验, 细胞接近 90% 满时传代, 0.25% 胰酶 (Gibco) 消化细胞, 计数, 以 $1250 \text{ 个}/\text{cm}^2$ 的密度接种至样品, 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养, 1 h 后更换培养液去除未黏附的细胞.

1.4 免疫荧光染色

细胞接种 6 h 后, 吸去培养基, 加入 4% 多聚甲醛固定 20 min, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline,

PBS) 漂洗 3 次, 每次 5 min, 0.2% Triton 破膜 8 min, PBS 冲洗 3 次, 1% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (Sigma) 溶液封闭 1 h. YAP 一抗 (1:200, Abclonal, 美国) 4°C 孵育过夜, PBS 漂洗 4 次, 每次 5 min. 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记二抗 (1:200, 中杉, 北京) 避光孵育 1 h, 罗丹明标记的鬼笔环肽 (1:200, Molecular Probes, 美国) 孵育 15 min, PBS 漂洗, Hoechst (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$, Invitrogen) 室温标记 10 min, 蒸馏水冲洗 3 次后封片剂 (碧云天, 中国南通) 封片, 激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SPE, 德国) 下观察拍照.

2 实验结果

2.1 PDMS 基底微图案结构平面的制备及检测

根据文献[4]的实验结果及本实验前期培养自由铺展的 MSCs 面积观察, 本文将设计的 7 种几何形状

图形的面积固定为 $\sim 1960\ \mu\text{m}^2$, 对称几何图形的直径、边长参数如图 1 所示. 微图案结构基底的制备流程如图 2 所示. 为了检测 PDMS 基底面蛋白几何微结构的均一性、完整性及蛋白转移效果, 采用 FITC-BSA 孵育 PDMS 印章, 通过微转印技术转移至铺有 PDMS 的玻片上, 荧光显微镜下观察, 结果可以看出, 微结构基底上转印蛋白的结构规整, 即微结构图案与所设计的结构图案一致(图 3).

2.2 限制 MSCs 的铺展促进细胞内 YAP 出核

由于 PDMS 的透明性, 所得到的细胞图案可以直接用于观察. MSCs 细胞在 PDMS 基底上铺展较好, 自由铺展的细胞呈梭形纤维状(图 4A). 接种培养 6 h 后, 对 MSCs 的骨架肌动蛋白 F-Actin 及 YAP 染色, 荧光显微镜下可见 F-Actin 均匀分布, MSCs 细胞周围及中心区域均有较强的 F-Actin 及应力纤维排列, 而且可见绝大部分细胞内 YAP 蛋白核定位更为显著, 如

图 2 微图案基底制备及细胞接种过程示意图

图 3 微图案结构基底结构规整, 与所设计的结构一致

FITC-BSA 孵育 PDMS 印章, 通过微转印技术转移至铺有 PDMS 的玻片上, 荧光显微镜下观察. 依次显示为: 圆形、三角形、正方形、五边形、六边形、菱形、梯形, 对照

图 4A 所示. 在微图案上生长的细胞, YAP 主要分布在细胞核内的只有很少一部分, 大部分细胞中的 YAP 平均分布于细胞核/细胞质中, 另外还有一部分细胞的 YAP 主要分布于细胞质中(图 4B). 在微图案基底上的细胞自由铺展受到限制, 被限定于不同的几何结构

的形状内, 大部分细胞的骨架蛋白 F-Actin 呈不均匀排列, 如圆形几何结构内, MSCs 细胞沿着几何图案的边缘组装肌动蛋白微丝, 也就是说细胞可以感知周围的环境, 使自身达到最大化铺展, 而细胞中间的 Actin 呈分散斑点状分布, 如图 5 所示. 其他几何图案

图 4 无结构基底自由铺展的 MSCs 代表及不同形状细胞内 YAP 分布情况

A: 细胞培养 6 h 后, 分别对 F-Actin(红色), YAP(绿色), 细胞核(蓝色)进行染色; B: 不同 YAP 定位细胞数量百分比. Nucleus 代表 YAP 主要定位在胞核; Cytoplasm 代表 YAP 主要定位在胞质; Both 代表 YAP 平均分布于胞质/胞核. 统计结果来自 3 次实验, 每次实验每种结构细胞不少于 50 个

图 5 圆形 MSCs 免疫荧光染色结果

细胞培养 6 h 后, 分别对 F-Actin(红色), YAP(绿色), 细胞核(代表)进行染色. 上面为 YAP 主要分布在细胞核中的细胞典型; 下面为 YAP 主要分布在细胞质中的细胞典型

的微图案基底上的多数细胞也呈现相同趋势(图 6).

2.3 松散的细胞骨架应力纤维导致 YAP 出核增加
虽然限定了 MSCs 细胞的铺展, YAP 出核增加,

但仍然有部分细胞 YAP 核定位明显. 对于相同铺展面积、相同形状而蛋白分布状态却不一样的细胞, 做了进一步比较. 通过比较少数存在的 YAP 核定位明显的细胞与部分存在的胞浆定位明显的细胞, 发现

图 6 其他几种不同几何形状 MSCs 的 YAP 主要分布于核内/核外典型图

细胞培养 6 h 后, 分别对 F-Actin(红色), YAP(绿色), 细胞核(蓝色)进行染色. A: 三角形; B: 正方形; C: 五边形; D: 六边形; E: 菱形; F: 梯形

细胞骨架蛋白成松散状态分布的细胞中 YAP 主要定位于细胞浆中, 这些细胞的边缘肌动蛋白组装较为明显, 但细胞中间的 F-Actin 聚合不明显, 整体 F-Actin 纤维束明显减少或没有, 呈分散性分布, 细胞骨架显得较为松散; 而对于胞质中 F-Actin 排列较为整齐, 聚合作用更明显的细胞, 其 YAP 核定位明显, 这些细胞不仅在边缘有明显的微丝结构, 细胞中间的 F-Actin 微丝结构也较为明显, 呈有序排列状态. 反之亦然, 且这种规律与细胞的铺展形状没有关系 (图 5 和 6).

3 讨论与结论

细胞的增殖、分化除了受化学因子的影响, 还会受到周围微环境中力学因素的影响, 包括基质的硬度、细胞铺展面积, 抑或是外界施加的压应力或张应力的刺激^[18-20]. 细胞通过调整细胞骨架的张力来响应外界刺激, 可以调节细胞本身的许多力学及结构特性, 将物理信号转变为生物信号, 从而影响细胞分化状态^[21]. 细胞骨架的张力向核内传递的过程是细胞感应力学响应过程的核心, 因而研究干细胞周围力学微环境与细胞如何将这些信号转换成内部生物信号的关系非常重要^[9]. MSCs 被广泛应用于这种类型的研究^[9,22].

YAP 是 Hippo 信号通路中的一个重要的转录因子, 可以通过磷酸化与去磷酸化实现核内与核外的定位. 磷酸化的 YAP 与 14-3-3 结合滞留在细胞质, YAP 去磷酸化即进入细胞核, 活性增加, 在细胞核中积累可以与许多转录因子结合调控基因表达^[23]. 已经有研究报道, Hippo 信号通路通过转录因子 YAP 对一些世系特异性转录因子进行调控, 从而影响干细胞的分化方向. 也有研究证明了 YAP 在外界力学刺激, 胞外基底结构等信号向细胞核内传递过程中有重要的作用. 近期研究也表明, Actin 细胞骨架可以调控 Hippo 信号通路^[24,25], 力学因素引起的细胞骨架改变会导致 YAP 活性的改变^[7,11,26]. 已有研究发现, 细胞密度较低时, 细胞的铺展面积较大, YAP 主要定位在细胞核内; 而当细胞密度较大时, 细胞的铺展受到限制, YAP 主要定位在细胞质内^[10,11,27]. 在过去几年中, 一些学者致力于研究激活 Hippo 信号通路的因素, 其中一个比较有趣的发现是肌动蛋白细胞骨架.

F-Actin 是细胞骨架的其中一个组分, 参与许多细胞行为, 如细胞形态、运动、分裂.

本研究使用 PDMS 包被的玻片做微图案基底, 通过微图案及微转印技术, 将细胞黏附蛋白 FN 转移到 PDMS 基底面上形成 7 种几何结构的微图案基底, 实现了将 MSCs 细胞固定于不同的几何铺展形状中, 排除了细胞与细胞之间的接触黏附等影响作用, 研究单个 MSCs 的形态对 Hippo 信号通路的影响. 将不同几何图案和对照设计在同一个微图案基底上, 在一个样本上有大量的同等培养条件下的单细胞, 这样就保证了这些不同形状的单细胞有着同样的培养条件和材料基底, 处于相同的微环境之中. 因此就可以排除由于细胞分泌因子或其他因素、基底材料的化学官能团、基底的软硬等因素对细胞其生长和功能的材料的影响^[28]. 对于单个细胞的定位, 也就排除了细胞的异质性影响. 固定几何图形的面积为 $\sim 1960 \mu\text{m}^2$, 限定细胞的自由铺展, 如图 4~6 所示, MSCs 细胞接种 6 h 后, 即可很好地黏附分布于印有蛋白图案的微图案基底上, 而 FN 区域以外没有细胞黏附, 细胞的铺展形状完全受蛋白几何图案的限制, 与所设计的几何形状基本一致. 在没有图案的对照区域, MSCs 细胞自由铺展, 面积较大, 细胞周围及中心区域均有较强的肌动蛋白纤维束. 细胞骨架蛋白的装配与胞内收缩力有关, 细胞的形状可以调控细胞应力纤维的分布^[2]. 对于微图案结构上的 MSCs, 大多数的细胞在几何图案的边缘组装肌动蛋白纤维束, 也就是说细胞在感应周围的微环境以尽量增加自身的铺展面积. 免疫荧光染色结果证实了本文设计的 7 种几何结构中, 细胞的铺展面积相近, 胞内 F-Actin 分布也相似, 尽管在细胞边缘纤维蛋白束较密集, 大部分细胞内部无明显的肌动蛋白纤维束线性排列, F-Actin 呈点状分散, 应力纤维很少 (图 5 和 6), 不同结构之间的差异并不明显. 已经有报道称细胞骨架对于干细胞分化的命运有重要的影响作用^[4,29,30]. 随后又对不同形状的细胞内 YAP 定位进行了比较, 通过统计胞内 YAP 分别主要定位于细胞核、细胞质、均匀分布于胞核/胞质的细胞数量比例, 发现几乎所有的自由铺展的细胞, 胞内 YAP 定位于细胞核明显 (图 4A), 而被限定于不同的几何形状微结构内的细胞, 大多数的细胞 YAP 出核明显 (图 4B), 不同几何形状之间的差异不大. 本课题组认为, 原因可能是所设计的形状

均为对称结构, 从三角形、四边形、五边形、六边形到圆形, 面积相同, 仅是图形的圆度(roundness)逐渐增加; 而对于梯形和菱形结构, 也许是图形的长轴和短轴的比例不够大。本课题组的结果也与之之前的报道相一致, 即细胞自由铺展时, 细胞内的应力纤维形式 F-Actin 较密集且丰富, 胞内的收缩力也较强, 而细胞铺展面积受限, 胞内应力纤维较少, 也不明显, 收缩性也较弱, 促进了 YAP 的出核, YAP 活性降低^[11]。

结果显示, 尽管限定细胞后 YAP 出核现象显著, 但对于同种几何形状铺展的细胞, 还是有一部分细胞 YAP 核定位的细胞, 对这部分细胞与 YAP 胞浆定位明显的细胞进行了进一步比较, 如圆形(图 5), 可以明显看出细胞骨架张力有明显不同, 对于 YAP 核定位明显的细胞, 细胞边缘以内区域的应力纤维明显, Actin 排列有序, 聚合程度较高, 而在 YAP 胞浆定

位明显的细胞中, F-Actin 呈点状分散, 应力纤维很少。对于其他几何形状(三角形、正方形、五边形、六边形、菱形、梯形)的细胞, 有着同样的现象(图 6)。Lucas 等人^[31]报道, Actin 细胞骨架与 YAP 活性之间的关系并非单向的; 也有报道, Hippo 信号通路也可以影响细胞骨架的形状^[24], 它们之间的作用是相互的。然而这种信号如何向下游传递控制细胞的功能仍不完全明确, 需要更深层次的研究。

综上所述, 本研究利用微图案技术从单细胞角度对 MSCs 的几何形状对 YAP 定位的影响进行了探讨, 虽然在设计的不同几何形状的细胞之间 YAP 的定位没有显著性的差异, 但通过与自由铺展的 MSCs 相比, 结果进一步证实了细胞的几何约束可以通过细胞骨架蛋白的收缩性对 YAP 的活性进行调控, 肌动蛋白骨架对 YAP 的定位有分子开关的作用, 具体的分子机制还有待于深入探索。

参考文献

- 1 Spiegelman B M, Ginty C A. Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3-adipocytes. *Cell*, 1983, 35: 657-666
- 2 Thery M, Pepin A, Dressaire E, et al. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2006, 63: 341-355
- 3 Chen C S, Mrksich M, Huang S, et al. Geometric control of cell life and death. *Science*, 1997, 276: 1425-1428
- 4 Kilian K A, Bugarija B, Lahn B T, et al. Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 4872-4877
- 5 Harris G M, Piroli M E, Jabbarzadeh E. Deconstructing the effects of matrix elasticity and geometry in mesenchymal stem cell lineage commitment. *Adv Funct Mater*, 2014, 24: 2396-2403
- 6 陈海旭, 杨超, 徐文焕, 等. 骨髓干细胞动员在心脑血管疾病中的研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45: 1194-1202
- 7 Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 2011, 474: 179-183
- 8 Bertrand A T, Ziaei S, Ehret C, et al. Cellular microenvironments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors. *J Cell Sci*, 2014, 127: 2873-2884
- 9 Driscoll T P, Cosgrove B D, Heo S J, et al. Cytoskeletal to nuclear strain transfer regulates YAP signaling in mesenchymal stem cells. *Biophys J*, 2015, 108: 2783-2793
- 10 Ota M, Sasaki H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development*, 2008, 135: 4059-4069
- 11 Wada K, Itoga K, Okano T, et al. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*, 2011, 138: 3907-3914
- 12 Zhao B, Li L, Lu Q, et al. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev*, 2011, 25: 51-63
- 13 Silvis M R, Kreger B T, Lien W H, et al. alpha-catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci Signal*, 2011, 4: ra33
- 14 Chen C L, Gajewski K M, Hamaratoglu F, et al. The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 15810-15815
- 15 Cheng Q, Li S, Komvopoulos K. Plasma-assisted surface chemical patterning for single-cell culture. *Biomaterials*, 2009, 30: 4203-4210
- 16 Thakar R G, Cheng Q, Patel S, et al. Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation. *Biophys J*, 2009, 96: 3423-3432
- 17 Gautrot J E, Trappmann B, Ocegüera-Yanez F, et al. Exploiting the superior protein resistance of polymer brushes to control single cell adhesion and polarisation at the micron scale. *Biomaterials*, 2010, 31: 5030-5041
- 18 Yeung T, Georges P C, Flanagan L A, et al. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2005, 60: 24-34

- 19 Ghibaudo M, Saez A, Trichet L, et al. Traction forces and rigidity sensing regulate cell functions. *Soft Matter*, 2008, 4: 1836–1843
- 20 Tee S Y, Fu J, Chen C S, et al. Cell shape and substrate rigidity both regulate cell stiffness. *Biophys J*, 2011, 100: L25–L27
- 21 雷晓华, 邓智利, 宁立娜, 等. 机械力及力学信号转导影响干细胞命运的研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44: 639–648
- 22 Baker B M, Shah R P, Huang A H, et al. Dynamic tensile loading improves the functional properties of mesenchymal stem cell-laden nanofiber-based fibrocartilage. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17: 1445–1455
- 23 Matsui Y, Lai Z C. Mutual regulation between Hippo signaling and actin cytoskeleton. *Protein Cell*, 2013, 4: 904–910
- 24 Fernandez B G, Gaspar P, Bras-Pereira C, et al. Actin-capping protein and the Hippo pathway regulate F-actin and tissue growth in *Drosophila*. *Development*, 2011, 138: 2337–2346
- 25 Sansores-Garcia L, Bossuyt W, Wada K, et al. Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J*, 2011, 30: 2325–2335
- 26 Zhao B, Li L, Wang L, et al. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev*, 2012, 26: 54–68
- 27 Zhao B, Wei X, Li W, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*, 2007, 21: 2747–2761
- 28 彭荣. 高分子表面微图案技术研究干细胞形状、尺寸和密度对其分化的影响. 博士学位论文. 上海: 复旦大学, 2012
- 29 Yourek G, Hussain M A, Mao J J. Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation. *ASAIO J*, 2007, 53: 219–228
- 30 Rodriguez J P, Gonzalez M, Rios S, et al. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. *J Cell Biochem*, 2004, 93: 721–731
- 31 Lucas E P, Khanal I, Gaspar P, et al. The Hippo pathway polarizes the actin cytoskeleton during collective migration of *Drosophila* border cells. *J Cell Biol*, 2013, 201: 875–885

Effect of Cell Geometry on YAP Localization of Mesenchymal Stem Cells on Micropatterned Surfaces

ZHANG YingYing^{1,2}, SUN Yan^{1,2}, HUANG Yan¹ & GONG He¹

¹ School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China;

² State Key Laboratory of Transducer Technology, Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China

Mechanical forces such as substrate rigidity or geometrical constraints have been proved to direct gene expression and cell differentiation. There is growing evidence that YAP (yes-associated protein) plays an important role in mechanosensing via transmitting through the cytoskeleton and to the nucleus. In this study, we use micropatterned surfaces to manipulate cellular geometries of triangle, square, pentagon, hexagon, circle, diamond and trapezoid with the same small area. Mesenchymal stem cells (MSCs) were cultured on the micropatterned surface and the role of single-cell morphology in the regulation of YAP location was investigated. The results show that geometric constraints decreased YAP nuclear accumulation. In addition, we found that YAP was mostly localized in nuclei at cells with strong actomyosin contractility and in the cytoplasm at cells with thin and less evident stress fibers. Taken together, our work further demonstrates the regulation of YAP cytoplasm/nuclear translocation based on the actomyosin contractility state and the patency of the actin cytoskeleton by single-cell constraints on seven different geometric micropatterns with the same surface area. Actin cytoskeleton may act as a molecular switch in regulation of YAP activity.

micropattern, MSCs, geometry, YAP

doi: 10.1360/N052016-00005