



# 细胞外基质刚度调控压电型机械敏感离子通道 组件1对神经干细胞分化的影响\*

徐汪洋 黄丽珊 姚 舜 黄子祥 张 力 张 辉 王业杨\*\*

(广东省第二人民医院骨科中心, 广州 510317)

**摘要** 目的 本研究旨在探讨细胞外基质刚度变化对神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 分化的影响及其作用机制。方法 本研究基于成功构建脊髓损伤大鼠模型, 并制备不同刚度 (0.7 kPa、40 kPa) 的聚丙烯酰胺凝胶基底, 将大鼠原代 NSCs 于不同刚度基底上培养。压电型机械敏感离子通道组件1 (piezo type mechanosensitive ion channel component 1, Piezo1) shRNA 质粒转染 NSCs 细胞。免疫荧光染色检测神经元标志物双皮质醇 (doublecortin, DCX) 和星形胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 阳性细胞百分比。免疫组织化学及蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法检测损伤组织及 NSCs 细胞中 Piezo1 蛋白的表达水平。结果 与 0.7 kPa 基质刚度组相比, 40 kPa 基质刚度组中 DCX 阳性细胞数增加, 而 GFAP 阳性细胞数减少, Piezo1 蛋白表达量上升。脊髓损伤大鼠损伤组织 Piezo1 蛋白表达显著高于空白对照 (sham) 组。40 kPa 基质刚度条件下沉默 Piezo1 后, DCX 阳性细胞数减少, 而 GFAP 阳性细胞数增加, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。机制研究发现, 沉默 Piezo1 导致 IV 型胶原及纤连蛋白表达下降。重组纤连蛋白逆转了 Piezo1 shRNA 对 NSCs 分化的影响, 即 DCX 阳性细胞数增加, 而 GFAP 阳性细胞数减少。结论 综上所述, 硬基底刚度通过促进 Piezo1 蛋白表达, 上调 IV 型胶原及纤连蛋白表达, 从而调控 NSCs 细胞分化。本研究为基于生物材料治疗脊髓损伤提供了新的视角。

**关键词** 脊髓损伤, 压电型机械敏感离子通道组件1, 神经干细胞, 基质刚度, 纤连蛋白

**中图分类号** R329.2, R744.1

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0319

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是脊柱损伤后严重的中枢神经系统创伤性疾病, 具有极高的致残、致畸与死亡率, 往往引起患者机体运动功能及感觉功能损伤, 给社会及家庭带来沉重的经济负担, 严重影响患者的身心健康<sup>[1-2]</sup>。神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 一直是 SCI 研究的热点, 但外源干细胞移植面临着免疫排斥和移植后肿瘤形成的风险<sup>[3]</sup>。从医学转化角度来看, 如何激活内源性 NSCs 产生神经元和神经胶质, 以进行脊髓修复值得探究。研究表明, 与正常的脊髓组织相比, 受伤的脊髓基质刚度明显降低<sup>[4-5]</sup>。细胞周围基质刚度的变化对骨髓间充质干细胞及肿瘤细胞的分化和激活产生影响<sup>[6-8]</sup>。但脊髓基质刚度如何影响 NSCs 细胞分化激活, 以及细胞如何将细胞外力学刺激信号转导为细胞内生化信号还有待研究。

压电型机械敏感离子通道组件1 (piezo type mechanosensitive ion channel component 1, Piezo1) 是一种机械敏感性阳离子通道, 可以响应机械信号

并通过调节钙离子的流入进而调节细胞密度和干细胞活化。在多种细胞中, Piezo1 都可调控力学刺激引起的阳离子内流, 且其是神经发育过程中的重要调节器, 参与轴突生长、少突胶质细胞的髓鞘形成和祖细胞分化<sup>[9]</sup>。Piezo1 介导视网膜神经节细胞机械敏感性, Piezo1 敲低改变了大脑的刚度, 导致轴突生长减缓<sup>[10]</sup>。体内外实验也表明, 药理性激活 Piezo1 可诱导脱髓鞘, 而抑制 Piezo1 减轻中枢神经系统的脱髓鞘<sup>[11]</sup>。激活 Piezo1 通道会减慢脂多糖刺激的星形胶质细胞的迁移速度及细胞因子和趋化因子的释放<sup>[12]</sup>。上述研究提示 Piezo1 调节的局部组织刚度参与神经发育过程。本文拟研究基质刚度

\* 广东省自然科学基金 (2018A0303130183), 广东省中医药局科研课题 (20211465), 广东省第二人民医院博士工作站基金 (2019BSGZ005) 和普宁市中医医院博士工作站基金 (BSGZZ-2021001) 资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 020-89169610, E-mail: yeyangwyy@163.com

收稿日期: 2021-10-20, 接受日期: 2022-04-21

变化及 Piezo1 响应细胞外基质刚度变化对 NSCs 分化的影响, 以期为基于生物材料的脊髓损伤治疗提供新的视角。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SD 大鼠购自南方科技大学实验动物中心。兔抗 Piezo1 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司; 兔抗双皮质醇 (doublecortin, DCX) 单克隆抗体及兔抗胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 辣根过氧化物酶标记的抗兔或抗羊 IgG、IV 型胶原 (collagen IV) 及纤连蛋白 (fibronectin) 抗体购自英国 Abcam 公司; 过硫酸铵购自北京化学试剂公司; 四甲基乙二胺和重组纤连蛋白购自美国 Sigma 公司; Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 购自美国 Invitrogen 公司; Piezo1 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 质粒由上海吉凯公司制备。

### 1.2 大鼠脊髓损伤模型的构建

麻醉后将大鼠 (2 月龄) 剪除手术切口周围 2 cm 范围毛发, 消毒, 定位 T8~T10 位置后行背部正中切口, 长约 2 cm, 剪开皮肤, 钝性分离皮下筋膜组织, 将 T9~T11 椎板全切除后暴露相应节段脊髓, 显露硬脊膜并保持其完整和表面干洁, 采用 10 g×25 mm 致伤势能对大鼠脊髓进行垂直坠落打击损伤, 打击完毕后可见损伤区硬膜下血肿、大鼠双后肢抽搐及鼠尾痉挛性摆动后下垂, 大鼠苏醒后双后肢呈瘫痪状态表示造模成功。空白对照 (sham) 组大鼠仅行 T9~T11 椎板切除术, 不损伤脊髓。每组 3 只大鼠。本研究获得广东省第二人民医院动物实验伦理委员会批准 (批准号: 2022-DW-SB-94), 所有动物实验遵循国家及医院实验动物福利伦理审查指南。

### 1.3 大鼠脊髓 NSCs 的分离与细胞分组

出生 1~2 d 大鼠以脱颈椎法处死, 75% 酒精常规消毒皮肤。无菌 PBS 清洗后, 剥离背部皮肤, 剥离椎板、硬脊膜, 分离出脊髓组织, 用 DMEM/

F12 液冲洗 3~4 遍, 去除脊髓组织表面的血细胞和杂质。用眼科剪将脊髓组织剪碎至大约 0.5 mm<sup>2</sup> 的小块, 吹打成细胞悬液。收集细胞悬液过筛网 (200 目铜网过滤), 获得单细胞悬液。然后采用 1 200 r/min 离心 8 min, 获细胞沉淀。将细胞重悬于无血清 NSCs 基础培养液中, 进行细胞计数, 调整细胞浓度为 (4~5)×10<sup>8</sup>/L。

取刚分离或第二代脊髓 NSCs 悬液, 置入装有 0.1% 多聚赖氨酸处理过盖玻片的 3.5 cm 培养皿中, 培养条件为无血清 NSCs 基础培养液, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。

细胞分组如下: 0.7 kPa 组、20 kPa 组、40 kPa 组 (NSCs 分别培养于 0.7、20、40 kPa 刚度基底); sh-NC 组 (20 nmol/L sh-NC 转染 NSCs 细胞, 并培养于 40 kPa 刚度基底); sh-Piezo1 组 (20 nmol/L Piezo1 shRNA 转染 NSCs 细胞, 并培养于 40 kPa 刚度基底)。

### 1.4 免疫组织化学

大鼠麻醉处死, 快速开胸, 经心灌注生理盐水约 200 ml 以置换出血液, 然后在冰上以损伤处为中心取出长约 1 cm 脊髓组织。多聚甲醛固定后 OCT 包埋。制备冰冻切片。经复温, PBS 漂洗, 0.3% Triton X-100 通透后, 10% 正常山羊血清的 PBS 液室温封闭 1 h。然后用羊抗鼠 Piezo1 (1:200) 一抗 4℃ 孵育过夜, 加入稀释后的 30 μl 抗鼠 IgG 二抗 (1:200), PBS 漂洗后, DAPI 复染。封片后, 于显微镜下观察并拍照。

### 1.5 不同刚度的基质制备

聚丙烯酰胺凝胶基底的制备方法参考 Tse 等<sup>[13]</sup> 的研究。具体配方见表 1。配好相应刚度的溶液后, 加入 10% 的过硫酸铵 (北京化学试剂公司) 和 0.1% 的四甲基乙二胺 (美国 Sigma 公司), 快速混匀。将混合液加入间隔为 0.75 mm 的平行制胶板中静置 1 h 使其凝固。将水凝胶切成合适大小的圆形, PBS 清洗后, 将光交联剂 (Sulfo-SANPA) 均匀滴于胶表面, 紫外灯照射 30 min, 活化聚丙烯酰胺胶以便与胶原连接。PBS 清洗 3 次, 在胶的表面

Table 1 Polyacrylamide gel formulations with different elastic modulus

| Modulus of elasticity/kPa | Acrylamide/% | 40% Acrylamide<br>volume/ml | Bis-acrylamide/% | 2% Bis-acrylamide volume/ml | H <sub>2</sub> O volume /ml |
|---------------------------|--------------|-----------------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 0.7                       | 4            | 1                           | 0.03             | 0.15                        | 8.85                        |
| 20                        | 8            | 2                           | 0.264            | 1.32                        | 6.68                        |
| 40                        | 8            | 2                           | 0.48             | 2.4                         | 5.6                         |

2023; 50 (1)

铺上合适体积的I型胶原蛋白 (collagen I, 25 mg/L), 4°C孵育过夜。

### 1.6 Piezo1及重组纤维连接蛋白处理NSCs细胞

根据 Invitrogen 公司说明书, 用 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 将 20 nmol/L sh-Piezo1 或 sh-NC 分别转染 NSCs 细胞, 孵育 48 h。对于重组纤维连接蛋白处理 NSCs 细胞, 50 mg/L 重组纤维连接蛋白加入 40 kPa 聚丙烯酰胺凝胶基底, 37°C 处理 4 h, PBS 清洗后紫外杀菌 30 min。

### 1.7 蛋白质免疫印迹 (Western blot)

RIPA 裂解液在冰上裂解 NSCs 细胞, BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。随后取 10 µg 蛋白质经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至 12% PVDF 膜上, 10% 牛血清白蛋白封闭 1 h。加入 Piezo1 一抗稀释液, 4°C 孵育过夜。次日加入二抗, ECL 发光试剂盒检测目的蛋白的表达。以  $\beta$ -actin 作为内参蛋白, Image-Pro Plus 6.0 软件进行定量分析。

### 1.8 免疫荧光检测DCX和GFAP阳性细胞百分比

将  $1 \times 10^4$  个 NSCs 细胞培养在不同刚度的基底上 48 h 后, 吸弃培养板内的促分化培养基; 4% 多聚甲醛固定后 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min; 10% 山羊血清的 PBS 溶液室温封闭 30 min, 随后滴

加兔抗小鼠 DCX 一抗 (1 : 800) 或 GFAP 一抗 (1 : 200), 4°C 孵育过夜; 滴加 Alexa Fluor® 594 标记的荧光二抗, 室温孵育 1 h; DAPI (0.1 µg/L) 避光孵育 10 min, 封片后, 于 Olympus IX53 显微镜下观察并拍照。重复 3 次。

### 1.9 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据的统计分析。脊髓损伤大鼠损伤组织 Piezo1 表达采用独立样本 *t* 检验进行两组间比较, 其他实验数据均采用单因素方差分析及 Bonferroni 事后检验进行多组间比较。  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 硬基质刚度促进NSCs向神经元细胞分化

将 NSCs 分别培养于 0.7、20、40 kPa 刚度基底上, 免疫荧光法检测神经元标志物 DCX 和星形胶质细胞标志物 GFAP 阳性细胞百分比。如图 1 所示, 与 0.7 kPa 组相比, 20 kPa 组和 40 kPa 组 DCX 阳性细胞数增加 (图 1a, b), 而 GFAP 阳性细胞数减少 (图 1c, d)。NSCs 培养 96 h 时, DCX 阳性细胞数较培养 48 h 增加 (图 1a, b), 而 GFAP 阳性细胞数

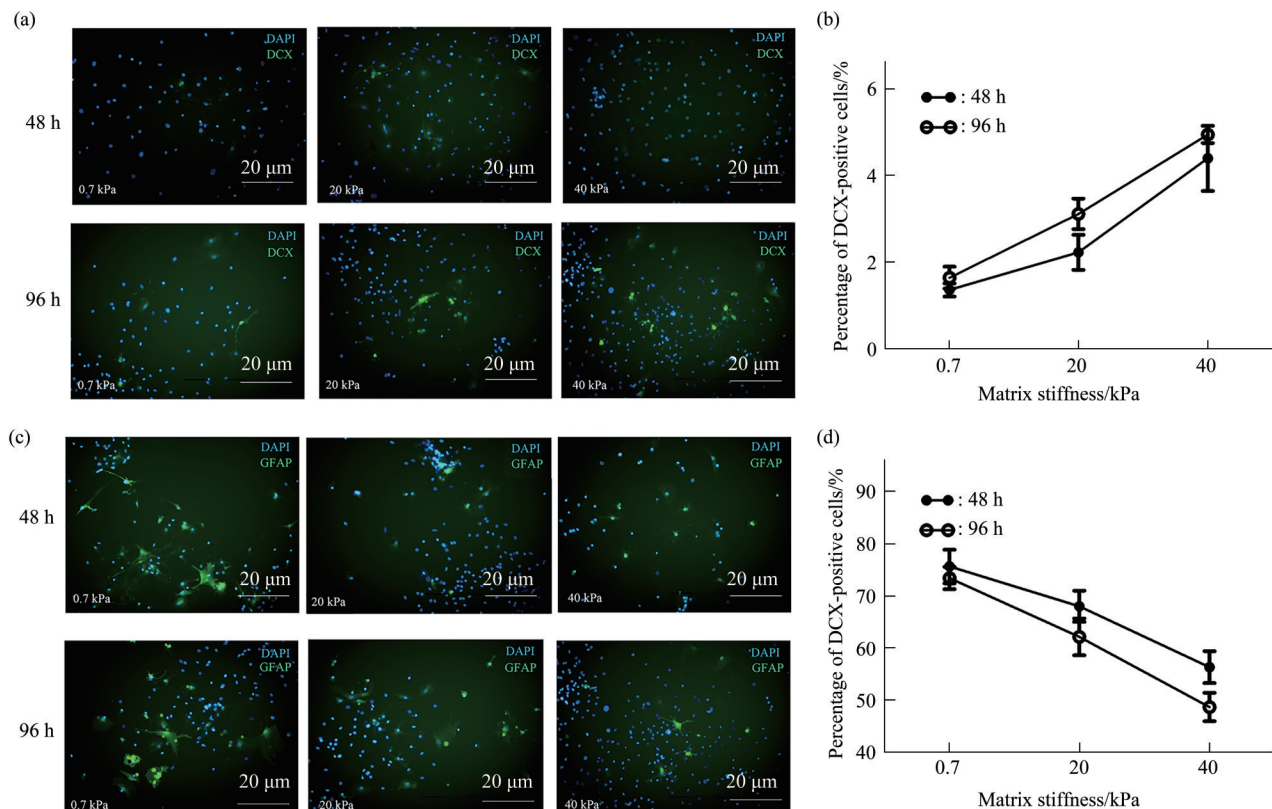


Fig. 1 Matrix stiffness affects differentiation of NSCs

(a, b) DCX-positive cells. (c, d) GFAP-positive cells.  $n=3$ .



较培养48 h减少 (图1c, d)。

## 2.2 Piezo1在脊髓损伤大鼠损伤组织的表达

免疫组织化学结果显示, 与sham组比较, 脊

髓损伤大鼠损伤组织Piezo1蛋白表达上调 (图2a)。Western blot结果与免疫组织化学结果一致 (图2b, c)。

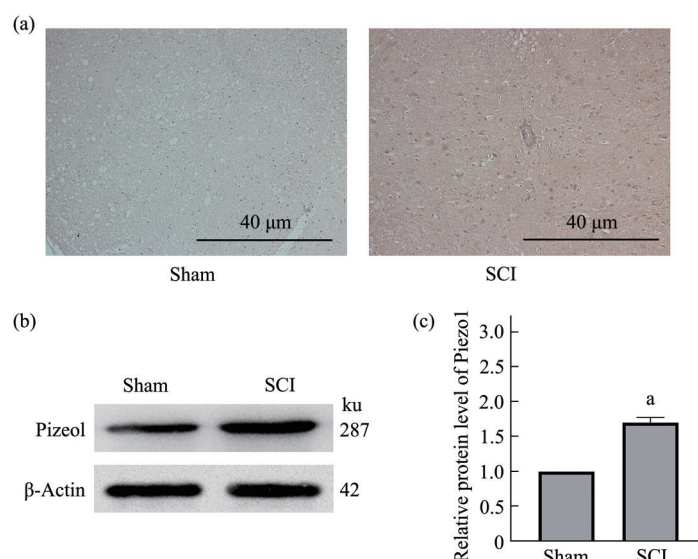


Fig. 2 Expression of Piezo1 in rat spinal cord tissue

(a) Immunohistochemistry on the injured tissues of each group. (b) Western blot on the injured tissues of each group. (c) Quantitative analyze of Piezo1 protein expression.  $n=3$ . <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs sham group.

## 2.3 硬基质刚度促进Piezo1蛋白表达

Western blot结果表明, 与0.7 kPa基质刚度相比, 随着基质刚度上升, Piezo1蛋白表达量显著上

调 (图3)。与培养48 h相比, NSCs在相应刚度基质上培养96 h时Piezo1表达量更高 (图3)。

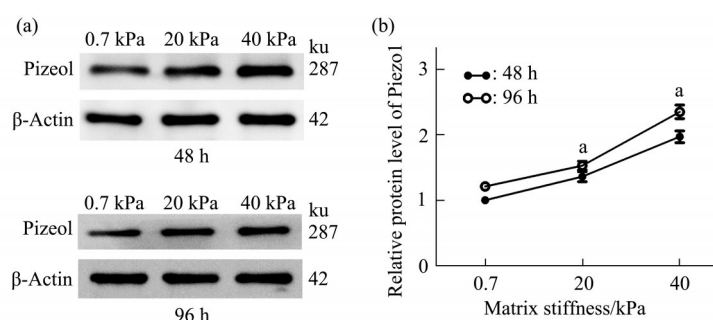


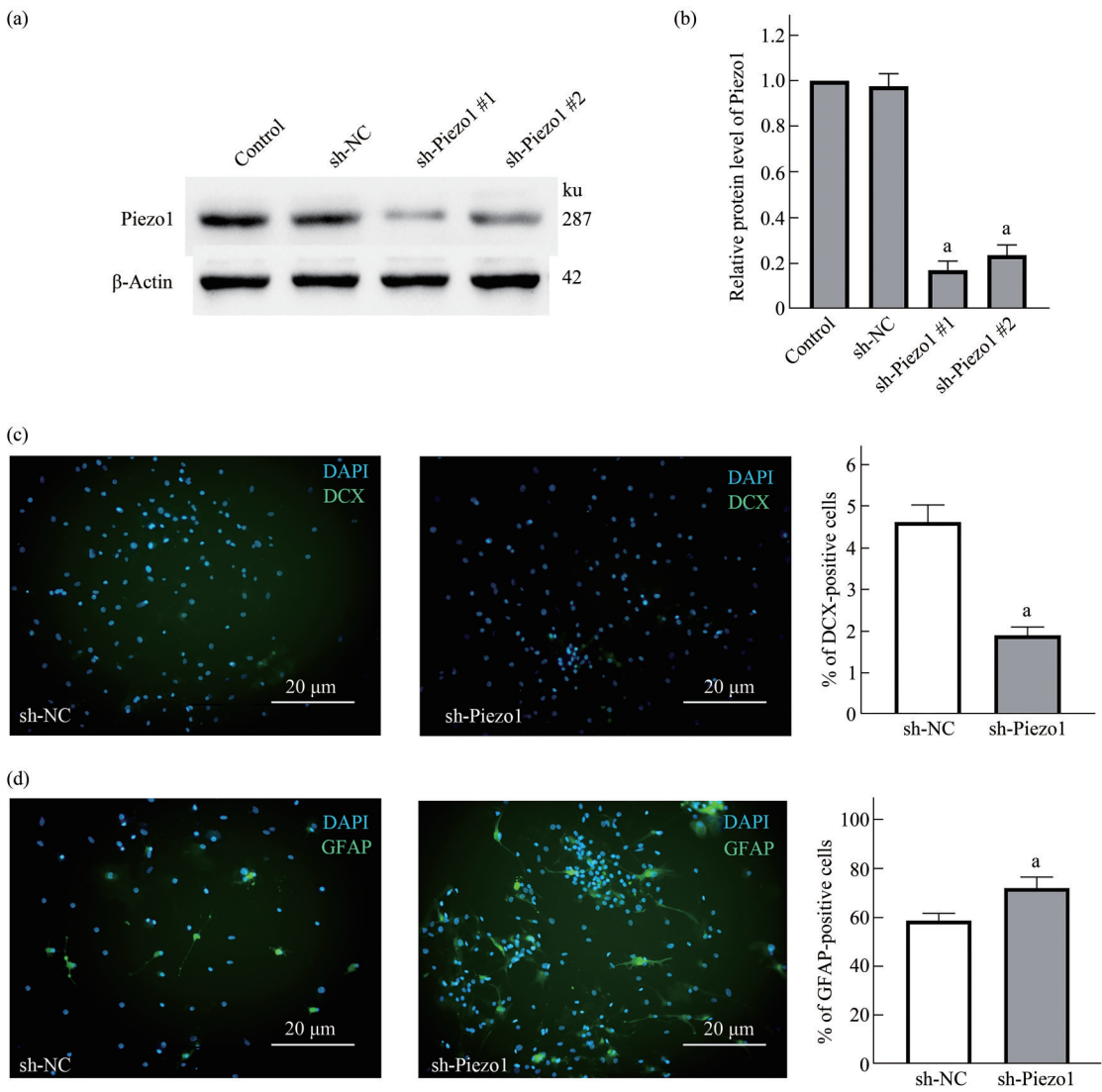
Fig. 3 Effect of matrix stiffness on expression of Piezo1 in NSCs

(a) Piezo1 protein expression was detected by Western blot assay. (b) Quantitative analyze of Piezo1 protein expression. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 0.7 kPa group.

## 2.4 Piezo1沉默逆转了硬基质刚度对NSCs分化的影响

为了检测Piezo1是否参与基底刚度调节的NSCs细胞分化, NSCs细胞转染sh-Piezo1质粒并于40 kPa基质刚度条件下培养。Western blot实验表明, sh-Piezo1转染后Piezo1蛋白表达量降低, sh-Piezo1 #1的沉默效率高于sh-Piezo1 #2 (图4a, b),

因此用sh-Piezo1 #1干扰质粒进行后续实验。免疫荧光结果显示, 40 kPa基质刚度条件下沉默Piezo1后, DCX阳性细胞数减少 (图4c), 而GFAP阳性细胞数增加 (图4d)。上述结果说明, 沉默Piezo1会逆转硬基质刚度引起的NSCs向神经元细胞分化。



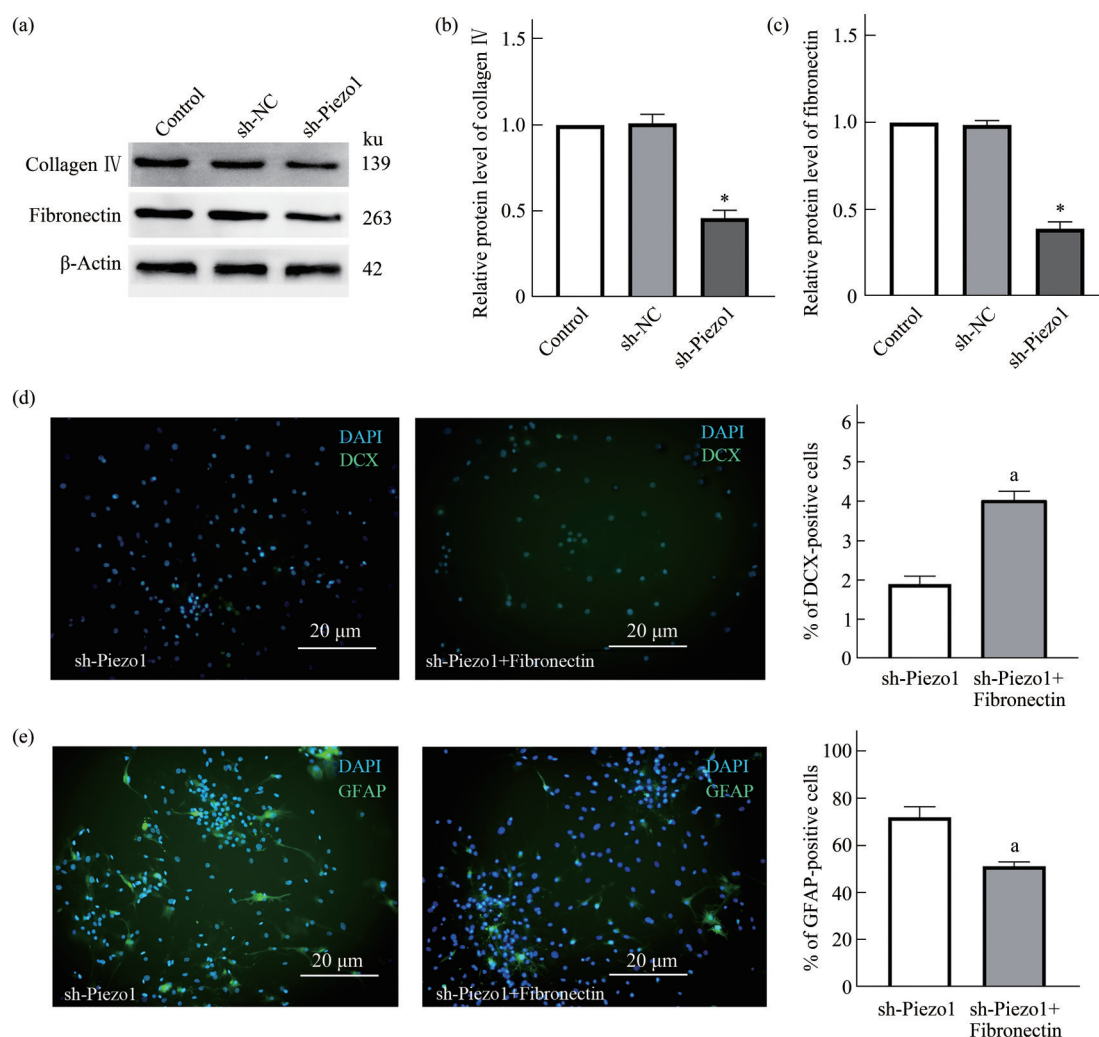
**Fig. 4 Piezo1 directs neuronal-glial lineage choice in NSCs**

(a) The protein expression of Piezo1 in NSCs transfected with Piezo1 shRNA plasmid was analyzed by Western blot. (b) Quantitative analyze of Piezo1 protein expression. (c) NSCs transfected with 20 nmol/L Piezo1 shRNA showed reduced neurogenesis as compared with cells transfected with 20 nmol/L control shRNA (sh-NC). (d) NSCs transfected with 20 nmol/L Piezo1 shRNA differentiate into astrocytes more efficiently than NSCs transfected with 20 nmol/L sh-NC. <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs sh-NC group. *n* = 3.

### 2.5 纤连蛋白逆转Piezo1对NSCs分化的影响

据报道, 在Piezo1敲除人胶质母细胞瘤中, 包括细胞外基质形成、胶原分解代谢、细胞黏附、ECM-受体相互作用在内的多种通路成分下调<sup>[14]</sup>。Western blot实验表明, 40 kPa基质刚度条件下沉

默Piezo1后, 细胞外基质IV型胶原及纤连蛋白表达下降(图5a~c)。与sh-Piezo1处理的NSCs相比, 重组纤连蛋白处理NSCs后, DCX阳性细胞数增加(图5d), 而GFAP阳性细胞数减少(图5e)。



**Fig. 5 Fibronectin reversed the effect of Piezo1 on NSCs differentiation**

(a) The protein expression of collagen IV and fibronectin in NSCs transfected with Piezo1 shRNA plasmid was analyzed by Western blot. (b) Quantitative analyze of collagen IV protein expression. (c) Quantitative analyze of fibronectin protein expression. (d, e) NSCs were transfected with 20 nmol/L Piezo1 shRNA and treated with fibronectin. DCX expression (d) and GFAP expression (e) were analyzed by immunofluorescence. \* $P < 0.05$  vs sh-NC group, <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs sh-Piezo1 group.  $n=3$ .

### 3 讨 论

本文研究发现, 较硬的基底刚度使 NSCs 向神经元分化, 并能显著上调 NSCs 细胞 Piezo1 的表达。沉默 Piezo1 可通过下调 IV 型胶原及纤连蛋白表达逆转硬基底刚度对 NSCs 分化的影响。

内源性 NSCs 的激活及分化一直是脊髓损伤研究的重点<sup>[15]</sup>。然而现有研究多以生物化学手段为主, 机械力学因素对 NSCs 分化的调控研究较少。研究表明, 与正常的脊髓组织相比, 受伤的脊髓基质刚度明显降低<sup>[4-5]</sup>。且随着脊髓受力增加, 脊髓刚度降低<sup>[16]</sup>。本文用 0.7 kPa 基底刚度模拟受伤脊

髓组织的强度, 用 40 kPa 基底刚度模拟正常脊髓组织的强度。研究发现, 40 kPa 基底刚度使 NSCs 向神经元分化, 而 0.7 kPa 基底刚度使 NSCs 向星形胶质细胞分化。这解释了为什么受伤后 NSCs 更趋向于向星形胶质细胞而非神经元分化的原因。最新的研究表明, 软基质支持多能细胞的成脂分化和软骨分化, 而硬基质调节成骨细胞增值<sup>[17]</sup>。基底刚度对不同组织细胞分化的影响有很大差异, 如大脑在软基质刚度下表现为神经源性, 而肌肉在较硬基质刚度下表现为肌源性<sup>[18]</sup>。另有研究指出, 神经植入物的表面刚度适应神经组织的表面刚度可以最大程度地减少炎症反应并改善生物相容性<sup>[19]</sup>。综上

所述, 脊髓、大脑组织相关的组织工程材料需更多考虑软基质刚度。

本文研究发现, 基底刚度调控 NSCs 分化可能与 Piezo1 有关。Piezo1 是一种机械敏感性阳离子通道, 可以通过调节钙离子的流入进而调节细胞密度和干细胞活化, 在动物生物力学中起着重要的作用<sup>[20]</sup>。Piezo1 对机械刺激有反应, 并在星形胶质细胞反应性中起作用<sup>[21]</sup>。临床研究发现, 骨质疏松的病人 Piezo1 表达下降与成骨功能减弱相一致, 在成骨细胞中敲除 Piezo1 的小鼠出现严重的骨发育缺陷, 成骨细胞功能显著降低<sup>[22]</sup>。Lee 等<sup>[23]</sup>报道, 小鼠关节软骨受到力学刺激时 Piezo1 表达量增加, 引发钙离子转运的增强; 在遭受过度应力时, 可通过抑制 Piezo1 调控的力传导减轻软骨损伤和创伤性关节炎。本文研究发现, Piezo1 参与基底刚度对 NSCs 分化的调节。首先, 在脊髓损伤患者损伤组织 Piezo1 表达显著升高; 基底刚度增加时 Piezo1 表达量增加。其次, 沉默 Piezo1 逆转硬基底刚度对 NSCs 分化的影响, 使之向胶质细胞分化。以上结果说明, 硬基底刚度通过促进 Piezo1 表达促进其神经生成。这一研究结果与 Pathak 等<sup>[24]</sup>的研究结果一致, 即抑制 Piezo1 抑制神经生成, 促进胶质生成。另有研究指出, 老年大鼠少突胶质细胞祖细胞可以在新生大鼠的大脑中被激活, 且 Piezo1 蛋白可以告诉细胞周围环境是柔软的还是僵硬的。抑制 Piezo1 蛋白的表达可以促使老化的中枢神经系统中的少突胶质细胞恢复再生能力<sup>[25]</sup>, 提示 Piezo1 可能调控细胞外基质刚度。

细胞外基质影响干细胞分化的研究已有报道<sup>[26]</sup>。体内外实验发现, 纤连蛋白是细胞分化成为特定细胞类型的关键<sup>[27]</sup>。缺乏 ECM 蛋白时, Piezo1 受体对机械力刺激不敏感, 因而难以被机械力激活; 而 IV 型胶原增加 Piezo1 受体对机械力刺激的敏感性<sup>[28]</sup>。本文研究表明, 敲低 Piezo1 后, 纤连蛋白表达下降; 重组纤连蛋白处理可逆转 Piezo1 对 NSCs 的影响, 促进其向神经元分化。新生小鼠的脊髓损伤模型表明, 新生小鼠的脊髓修复不伴随瘢痕形成, 这与小胶质细胞的短暂激活及纤连蛋白的表达增高有关, 从而促进大量神经轴突穿过损伤区域<sup>[29]</sup>。Piezo1 介导的纤连蛋白改变是否会促进神经轴突穿过脊髓损伤区域值得进一步研究。

当然, 2D 维度环境无法概括 3D 维度环境所发现的所有信息<sup>[30]</sup>。因此, 在解释生物学数据并将

体外研究结果转换为体内实验时, 维度是重要的考虑因素, 也是后续工作需要研究的一个重点。

## 4 结 论

综上所述, 本文发现沉默 Piezo1 可逆转硬基底刚度对 NSCs 分化的影响。机制研究表明, Piezo1 通过上调纤连蛋白表达促进 NSCs 神经元分化。这一发现, 为基于生物材料治疗脊髓损伤提供了新的视角。

## 参 考 文 献

- [1] Anjum A, Yazid M D, Fauzi Daud M, *et al.* Spinal cord injury: pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(20): 7533
- [2] Liao L L, Looi Q H, Chia W C, *et al.* Treatment of spinal cord injury with mesenchymal stem cells. *Cell Biosci*, 2020, **10**:112
- [3] Assinck P, Duncan G J, Hilton B J, *et al.* Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nat Neurosci*, 2017, **20**(5): 637-647
- [4] Moeendarbary E, Weber I P, Sheridan G K, *et al.* The soft mechanical signature of glial scars in the central nervous system. *Nat Commun*, 2017, **8**: 14787
- [5] Prager J, Adams C F, Delaney A M, *et al.* Stiffness-matched biomaterial implants for cell delivery: clinical, intraoperative ultrasound elastography provides a 'target' stiffness for hydrogel synthesis in spinal cord injury. *J Tissue Eng*, 2020, **11**:2041731420934806
- [6] Sun M, Chi G, Xu J, *et al.* Extracellular matrix stiffness controls osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells mediated by integrin  $\alpha 5$ . *Stem Cell Res Ther*, 2018, **9**(1): 52
- [7] Tan F, Huang Y, Pei Q, *et al.* Matrix stiffness mediates stemness characteristics via activating the Yes-associated protein in colorectal cancer cells. *J Cell Biochem*, 2018, **122**(1): 143
- [8] Sun M, Chi G, Li P, *et al.* Effects of matrix stiffness on the morphology, adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci*, 2018, **15**(3): 257-268
- [9] Wang S, Cao S, Arhatte M, *et al.* Adipocyte Piezo1 mediates obesogenic adipogenesis through the FGF1/FGFR1 signaling pathway in mice. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 2303
- [10] Koser D E, Thompson A J, Foster S K, *et al.* Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat Neurosci*, 2016, **19**(12): 1592-1598
- [11] Velasco-Estevez M, Gadalla K K E, Liñan-Barba N, *et al.* Inhibition of Piezo1 attenuates demyelination in the central nervous system. *Glia*, 2020, **68**(2): 356-375
- [12] Velasco-Estevez M, Rolle S O, Mampay M, *et al.* Piezo1 regulates calcium oscillations and cytokine release from astrocytes. *Glia*, 2020, **68**(1): 145-160
- [13] Tse J R, Engler A J. Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr Protoc Cell Biol*, 2010,



**Chapter 10:** Unit 10.16

- [14] Chen X, Wanggou S, Bodalia A, *et al.* A feedforward mechanism mediated by mechanosensitive ion channel piezo1 and tissue mechanics promotes glioma aggression. *Neuron*, 2018, **100**(4): 799-815.e797
- [15] Gong Z, Xia K, Xu A, *et al.* Stem cell transplantation: a promising therapy for spinal cord injury. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2020, **15**(4): 321-331
- [16] Tunturi A R. Elasticity of the spinal cord, pia, and denticulate ligament in the dog. *J Neurosurg*, 1978, **48**(6): 975-979
- [17] Brielle S, Bavli D, Motzik A, *et al.* Delineating the heterogeneity of matrix-directed differentiation toward soft and stiff tissue lineages *via* single-cell profiling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(19): e2016322118
- [18] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 2006, **126**(4): 677-689
- [19] Moshayedi P, Ng G, Kwok J C, *et al.* The relationship between glial cell mechanosensitivity and foreign body reactions in the central nervous system. *Biomaterials*, 2014, **35**(13): 3919-3925
- [20] Zhu D, Zhang G, Guo X, *et al.* A new hope in spinal degenerative diseases: Piezo1. *Biomed Res Int*, 2021, **2021**: 6645193
- [21] Liu J, Yang Y, Liu Y. Piezo1 plays a role in optic nerve head astrocyte reactivity. *Exp Eye Res*, 2021, **204**: 108445
- [22] Sun W, Chi S, Li Y, *et al.* The mechanosensitive Piezo1 channel is required for bone formation. *Elife*, 2019, **8**: e47454
- [23] Lee W, Leddy H A, Chen Y, *et al.* Synergy between Piezo1 and Piezo2 channels confers high-strain mechanosensitivity to articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(47): E5114-E5122
- [24] Pathak M M, Nourse J L, Tran T, *et al.* Stretch-activated ion channel Piezo1 directs lineage choice in human neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(45): 16148-16153
- [25] Segel M, Neumann B, Hill M F E, *et al.* Niche stiffness underlies the ageing of central nervous system progenitor cells. *Nature*, 2019, **573**(7772): 130-134
- [26] Vieira M S, Santos A K, Vasconcellos R, *et al.* Neural stem cell differentiation into mature neurons: mechanisms of regulation and biotechnological applications. *Biotechnol Adv*, 2018, **36**(7): 1946-1970
- [27] Villegas S N, Rothová M, Barrios-Llerena M E, *et al.* PI3K/Akt1 signalling specifies foregut precursors by generating regionalized extra-cellular matrix. *Elife*, 2013, **2**: e00806
- [28] Gaub B M, Müller D J. Mechanical stimulation of piezo1 receptors depends on extracellular matrix proteins and directionality of force. *Nano Lett*, 2017, **17**(3): 2064-2072
- [29] Li Y, He X, Kawaguchi R, *et al.* Microglia-organized scar-free spinal cord repair in neonatal mice. *Nature*, 2020, **587**(7835): 613-618
- [30] Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?. *Front Mol Biosci*, 2020, **7**: 33



## Extracellular Matrix Stiffness Affects Differentiation of Neural Stem Cells by Regulating Piezo1\*

XU Wang-Yang, HUANG Li-Shan, YAO Shun, HUANG Zi-Xiang, ZHANG Li,  
ZHANG Hui, WANG Ye-Yang\*\*

(Department of Orthopedic, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, China)

**Abstract Objective** The aim of this study is to investigate the effect of matrix stiffness changes on the differentiation of neural stem cells (NSCs) and the underlying mechanism. **Methods** A rat model of spinal cord injury was constructed. Polyacrylamide gel substrates with different stiffness (0.7 kPa, 40 kPa) were prepared, and were cultured with primary rat NSCs. NSCs cells were transfected with piezo type mechanosensitive ion channel component 1 (Piezo1) shRNA plasmid. Immunofluorescence staining was used to detect the percentage of positive cells for the neuron marker doublecortin(DCX) and the astrocyte marker GFAP. Immunohistochemistry experiment and Western blot were used to detect the protein expression of Piezo1. **Results** The results showed that compared with the 0.7 kPa group, the number of DCX-positive cells in the 40 kPa group increased, while the number of GFAP-positive cells decreased, as well as the protein expression of Piezo1 increased. The expression of Piezo1 was significantly up-regulated in the injured tissue of rats with spinal cord injury compared with the sham group. Silencing of Piezo1 reverse the effect of 40 kPa matrix stiffness on NSCs proliferation, as indicated by decreased number of DCX-positive cells, and increased number of GFAP-positive cells increased. Further studies found that knockdown of Piezo1 leads to decreased expression of collagen IV and fibronectin. Recombinant fibronectin reversed the effect of sh-Piezo1 on the differentiation of NSCs. **Conclusion** Rigid base stiffness regulates the differentiation of NSCs by promoting the expression of Piezo1 protein and up-regulating the expression of type IV collagen and fibronectin. This study provides a new perspective for the treatment of spinal cord injury based on biomaterials.

**Key words** spinal cord injury, Piezo1, neural stem cells, matrix stiffness, fibronectin

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2021.0319

\* This work was supported by grants from the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2018A0303130183), Research project of Traditional Chinese Medicine Bureau of Guangdong province (20211465), Doctoral Foundation of Guangdong Second Provincial General Hospital (2019BSGZ005), and Doctoral Foundation of Traditional Chinese Medicine Hospital of Puning City (BSGZZ2021001).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-20-89169610, E-mail: yeyangwyy@163.com

Received: October 20, 2021 Accepted: April 21, 2022